



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΟ - ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
(ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ)**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ ΒΑΛΣΑΜΟΧΟΡΤΟ (HYPERICUM PERFORATUM)
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ**

**ΙΩΑΝΝΗΣ ΤΣΙΜΑΡΗΣ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2019



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΟ - ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
(ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ)**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ ΒΑΛΣΑΜΟΧΟΡΤΟ (HYPERICUM PERFORATUM)
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ**

**ΙΩΑΝΝΗΣ ΤΣΙΜΑΡΗΣ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2019

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)

Ημερομηνία αίτησης του κ. Τσίμαρη Ιωάννη: 8-1-2004

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 529^ο/23-3-2004

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Στεφάνου Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μαλάμου-Μήτση Βασιλική, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Φώτης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 1-4-2004

«Χημειοπροφυλακτική δράση του εκχυλίσματος του φυτού *hypericum perforatum* στον καρκίνο της κύστεως. Πειραματική μελέτη»

Ημερομηνία ανασυγκρότησης της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 887^ο/12-3-2019

Επιβλέπων

Στεφάνου Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Φώτης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σκάλκος Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Διοίκησης Καινοτομίας στις Επιχειρήσεις Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής της Σχολής Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Αιγαίου

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 890^ο/7-5-2019

Γούσια Άννα	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπατιστάτου Άννα	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στεφάνου Δημήτριος	ομότιμος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτσης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σκάλκος Δημήτριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Διοίκησης Καινοτομίας στις Επιχειρήσεις Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής της Σχολής Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου

Αιγαίου
Παπούδου –Μπάη Αλεξάνδρα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος
Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 5-7-2019

Ιωάννινα 15-7-2019

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Στην γυναίκα μου Ευτέρπη
Στις κόρες μου Αριάδνη και Νίκη
Στους γονείς μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Δημήτριο Στεφάνου, Καθηγητή της Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και επιστημονικά υπεύθυνο της διατριβής μου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ' αρχής, αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, την επιστημονική του καθοδήγηση και τη συνεχή του υποστήριξη.

Ευχαριστώ τον κύριο Θεόδωρο Φώτση, Καθηγητή Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της Τριμελούς Επιτροπής, για τις υποδείξεις του και την δυνατότητα να πραγματοποιήσω σημαντικό μέρος στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας και στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΒΕ-ΙΤΕ). Για τον ίδιο λόγο θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ερευνήτρια Β' κ. Carrol Murphy του ΙΒΕ-ΙΤΕ.

Ευχαριστώ επίσης την κυρία Άννα Μπατιστάτου Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, την κυρία Άννα Γούσια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, την κυρία Αλεξάνδρα Παπούδου – Μπάη Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής καθώς και την Κωνσταντίνα Γκαρτζονίκα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων οι οποίες διετέλεσαν μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής.

Θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην εκλιπούσα Βασιλική Μαλάμου-Μήτση, Καθηγήτρια Παθολογικής. Θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον φίλο Μιχάλη Μιχαήλ για τις ατελείωτες ώρες που αφιέρωσε μαζί μου ώστε να γίνει η μελέτη των δειγμάτων και η εξαγωγή των αποτελεσμάτων, καθώς και σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου της Παθολογικής Ανατομικής για την βοήθεια τους σε ότι χρειάστηκα καθόλο το διάστημα της διατριβής. Επίσης θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον κύριο Δημήτρη Σταλικά, Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Ανόργανης και Αναλυτικής της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την πραγματοποίηση σημαντικού πειραματικού μέρους της διατριβής στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας. Κύριος αρωγός σε αυτήν την προσπάθεια ήταν η κυρία Ελένη Γιώτη την οποία ευγνωμονώ και ευχαριστώ για την βοήθεια της. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους Κώστα Χασταζέρη, Βασίλη Καφαράκη και Νικόλαο Γρίβα, επιμελητές της Ουρολογικής Κλινικής του ΓΝΙ «Γ. Χατζηκώστα» για το ενδιαφέρον και την αμέριστη συμπαράστασή τους.

Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κυρία Σοφία Μπέλλου, Μεταδιδάκτορα του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας (IMBB-ITE) για την σημαντική βοήθειά της για την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους των κυτταρικών σειρών. Με τις συμβουλές της με βοήθησε να κατανοήσω και να υποστηρίξω τα αποτελέσματα που προέκυψαν. Επίσης με τις παρατηρήσεις της επί της οργάνωσης της δομής και του περιεχόμενου αυτής της διατριβής βοήθησε στην τελική της διαμόρφωσή της.

I am grateful to Dr. Unyime O. Nseyo, Clinical Assistant Professor Department of Urology, University of Florida. The motivation and assistance that I received were far greater than I could have ever imagined.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω και να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε δύο ανθρώπους χωρίς τους οποίους δεν θα είχε πραγματοποιηθεί τίποτα:

Τον Διευθυντή μου στην Ουρολογική Κλινική του ΓΝΙ «Γ. Χατζηκώστα», κύριο Νικόλαο Ε. Σταυρόπουλο ο οποίος ήταν αυτός που έκανε την κλινική παρατήρηση και είχε την αρχική ιδέα. Με την πολύτιμη και χαρισματική καθοδήγηση και υποστήριξή του, την εμπιστοσύνη και εκτίμηση που μου έδειξε, τις παραγωγικές υποδείξεις του, συνέβαλλε τα μέγιστα για την κατάρτιση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τον κύριο Δημήτριο Σκάλκο, Αναπληρωτή Καθηγητή Διοίκησης Καινοτομίας στις Επιχειρήσεις Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής της Σχολής Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Αιγαίου και μέλος της Τριμελούς Επιτροπής ,τον οποίο ευχαριστώ για την αμέριστη, άοκνη και υπομονετική καθοδήγησή του. Στάθηκε σημαντικός αρωγός στην προσπάθειά μου και με υποστήριξε σε κάθε φάση της πορείας μου με το αμείωτο ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος. Οφείλω να ομολογήσω ότι σε αυτόν οφείλω ένα σημαντικό μέρος στην επιτυχημένη ολοκλήρωση της όλης προσπάθειας.

Ακρογωνιαίοι λίθοι σε αυτή την προσπάθεια υπήρξε η ακούραστη και υπομονετική σύζυγός μου Ευτέρπη η οποία εδώ και δεκαεπτά χρόνια μου προσφέρει απλόχερα την αγάπη της, αναλαμβάνοντας αλόγιστα όλες τις υποχρεώσεις της οικογένειας. Την ευχαριστώ, όπως και τις κόρες μου Αριάδνη και Νίκη, από τα βάθη της καρδιάς μου για τις θυσίες που υπομείνανε και την κατανόηση που έδειξαν.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως είναι ο δεύτερος πιο συχνός καρκίνος του ουροποιητικού. Η μακροχρόνια επιβίωση των ασθενών αυτών και η αναγκαιότητα για τακτική παρακολούθηση και θεραπευτική αντιμετώπιση δια βίου τον καθιστά σε όρους συνολικής δαπάνης υγείας τον πέμπτο πιο ακριβό καρκίνο. Η ανάγκη ανακάλυψης συστατικών που θα βοηθήσουν την πρόληψη της εμφάνισης και της υποτροπής του καρκίνου της κύστεως, η αναζήτηση μεθόδων πρόωξης διάγνωσης και ριζικότερης αντιμετώπισης, κυρίως στα στάδια που παρουσιάζεται ως επιφανειακός μη μυοδιηθητικός καρκίνος, γίνεται επιτακτικότερη ώστε να υπάρξει επίτευξη μείωσης της επίπτωσης, της νοσηρότητας και της θνητότητας του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως.

Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στην αναγνώριση διαιτητικών ή συνθετικών συστατικών με αντικαρκινικές ιδιότητες. Τα φυτά έχουν μία μακρά ιστορία στην χρήση για την πρόληψη – αντιμετώπιση του καρκίνου. Η ανακάλυψη αρκετών αποτελεσματικών αντικαρκινικών παραγόντων, οι οποίοι είναι φυτικής προέλευσης, μπορεί να αποδοθεί, άμεσα ή έμμεσα, σε ένα ιστορικό χρήσης του σχετικού φυτού στην παραδοσιακή ιατρική.

Στην περιοχή της Ηπείρου η χρήση του βαλσάμου ή του *Hypericum Perforatum*, όπως είναι η επιστημονική του ονομασία, είναι διαδεδομένη για διάφορες φαρμακευτικές χρήσεις. Αρκετοί άρρωστοι της περιοχής της Ηπείρου με υποτροπές επιφανειακών όγκων της ουροδόχου κύστεως, οι οποίοι λαμβάνουν το συγκεκριμένο βότανο με δική τους πρωτοβουλία, δεν έχουν παρουσιάσει υποτροπή για μεγάλο χρονικό διάστημα σύμφωνα με τα στοιχεία της παρακολούθησης που διαθέτουμε. Αυτό ήταν το έναυσμα για τη σχεδίαση και πραγματοποίηση αυτής της διατριβής. Ενός ταξιδιού που ξεκίνησε με αφορμή μια κλινική παρατήρηση και την ανάγκη πειραματικής επιβεβαίωσης και διερεύνησής της, που πραγματοποιήθηκε μέσα από «αχαρτογράφητα νερά», με πορεία η οποία επανακαθοριζόταν και διαμορφώνονταν μετά από κάθε πειραματικό βήμα.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η συστηματική και εις βάθος έρευνα της αντικαρκινικής (χημειοπροφυλακτικής) και διαγνωστικής δράσης του φυτού βαλσαμόχορτου γνωστού και ως *Hypericum Perforatum* (HP) κατά του καρκίνου της κύστης.

1. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1.	Η ουροδόχος κύστη.....	7
1.2.	Καρκίνος της ουροδόχου κύστεως.....	8
1.2.1.	Επιδημιολογία.....	8
1.2.2.	Παράγοντες κινδύνου.....	9
1.2.3.	Παθολογοανατομία.....	14
1.2.4.	Φυσική ιστορία και μοριακή βιολογία του ουροθηλιακού καρκίνου της ουροδόχου κύστεως.....	19
1.2.5.	Διάγνωση και Σταδιοποίηση.....	21
1.2.6.	Θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως.....	23
1.2.7.	Προγνωστικοί παράγοντες.....	26
1.2.8.	Πρόληψη του καρκίνου της ουροδόχου κύστης.....	27
1.2.9.	Φθορισμός, Φωτοδυναμική Διάγνωση και Φωτοδυναμική Θεραπεία στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως.....	30
1.2.10.	Φωτοδυναμική θεραπεία στον επιφανειακό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως.....	40
1.3.	Βαλσαμόχορτο ή <i>Hypericum Perforatum</i>	41
1.3.1.	Εισαγωγή για φυσικά προϊόντα.....	41
1.3.2.	Βαλσαμόχορτο – <i>Hypericum Perforatum</i> L.....	42
2.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	55
3.	ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ	57
3.1.	Συλλογή φυτού.....	57
3.2.	Διερεύνηση της χημειοπροφυλακτικής – αντικαρκινικής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος του <i>Hypericum Perforatum</i> L. έναντι, προκαλούμενων από p.os. χορήγηση νιτροζαμίνης, ουροθηλιακών καρκίνων σε αρσενικά BULBc ποντίκια.....	57
3.2.1.	Καρκινογόνος παράγοντας.....	57
3.2.2.	Προετοιμασία του υδατικού διαλύματος.....	57
3.2.3.	Πειραματόζωα.....	58

3.2.4.	Παραγωγή διαλυμάτων, εκχυλισμάτων και κλασμάτων του φυτού	58
3.2.5.	Διαλύματα, εκχυλίσματα και κλάσματα παρασκευασμάτων	60
3.2.6.	Προσδιορισμός των Υπερικινών	62
3.2.7.	Προσδιορισμός χλωροφυλλών	62
3.2.8.	Όργανα – Συσκευές	63
3.2.9.	Προσδιορισμός υπερικίνης, ψευδοϋπερικίνης και υπερφορίνης στα υπέργεια τμήματα του υπέρεικου με RP-HPLC	63
3.2.10.	Μετρήσεις φθορισμού	64
3.3.	Διερεύνηση του πιο δραστικού παραγώγου του φυτού σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστεως T24 και NBT-II σε συνθήκες σκότους.....	65
3.3.1.	Δοκιμασία κυτταρικού πολλαπλασιασμού.....	65
3.3.2.	Δοκιμασία TUNEL	66
3.4.	Διερεύνηση φωτοδυναμικής δράσης του Πολικού Μεθανολικού Κλάσματος.....	67
3.4.1.	Επίδραση μονοχρωματικού φωτός-λείζερ στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων T24 και RT4.....	67
3.4.2.	Με φωτοδιέγερση λευκού φωτός σε καρκινικά κύτταρα T24	70
3.4.3.	Εντόπιση του προκαλούμενου από την υπερικίνη φθορισμού μετά από έγχυση του Πολικού Μεθανολικού Κλάσματος του <i>Hypericum Perforatum</i> L σε φυσιολογικό ουροθήλιο θηλυκών αρουραίων Wistar	73
3.4.4.	Αποτίμηση της φωτοδυναμικής δράσης του ΠΜΚ μετά από βραχεία ενδοκυστική έγχυση και φωτοδιέγερση με λευκό φως σε θηλυκούς αρουραίους Wistar	76
3.4.5.	Σε μοντέλο ορθότοπης εμφύτευσης καρκινικών κυττάρων εκ μεταβατικού επιθηλίου AY-27 σε θηλυκούς αρουραίους Wistar	78
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	81
4.1.	Διερεύνηση της χημειοπροφυλακτικής – αντικαρκινικής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος του <i>Hypericum Perforatum</i> L. έναντι, προκαλούμενων από p.os. χορήγηση νιτροζαμίνης, ουροθηλιακών καρκίνων σε αρσενικά BULBe ποντίκια	81
4.1.1.	Γενικές παρατηρήσεις επί των πειραματόζωων	81
4.1.2.	Παθολογοανατομικά αποτελέσματα	81
4.2.	Αποτελέσματα εκχυλισμάτων και κλασμάτων των παρασκευασμάτων	83

4.2.1.	Προσδιορισμός υπερικίνης, ψευδοϋπερικίνης και υπερφορίνης στα υπέργεια τμήματα του υπέρεικου με RP-HPLC	84
4.2.2.	Διερεύνηση του πιο δραστικού παραγώγου του φυτού σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστεως T24 και NBT-II σε συνθήκες σκότους.....	88
4.3.	Διερεύνηση φωτοδυναμικής δράσης του Πολικού Μεθανολικού Κλάσματος in vitro	94
4.3.1.	Έναντι καρκινικών κυττάρων T24 και RT4 μετά από φωτοδιέγερση με μονοχρωματικό φως – λέιζερ.....	94
4.3.2.	Έναντι καρκινικών κυττάρων T24 μετά από φωτοδιέγερση με λευκό φως.....	99
4.4.	In vivo πειράματα: Εντόπιση του προκαλούμενου από την υπερικίνη φθορισμού μετά από έγχυση του Πολικού Μεθανολικού Κλάσματος του Hypericum Perforatum L σε φυσιολογικό ουροθήλιο θηλυκών αρουραίων Wistar	103
4.4.1.	Μετρήσεις της έντασης διέγερσης (φθορισμού) του τοιχώματος μέσω εγκαρσίων γραμμών κατά μήκος του τοιχώματος	103
4.4.2.	Μετρήσεις έντασης διέγερσης (φθορισμού) σε ολόκληρες της ανατομικές δομές του τοιχώματος της ουροδόχου.....	111
4.5.	Αποτίμηση της φωτοδυναμικής δράσης του ΠΜΚ και φωτοδιέγερση με λευκό φως ποικίλης έντασης σε θηλυκούς αρουραίους Wistar.....	114
4.5.1.	Χορήγηση λευκού φωτός σε διανοιγμένη ουροδόχο κύστη μετά από λαπαροτομία	114
4.6.	Ενδοκυστική χορήγηση λευκού φωτός με την βοήθεια οπτικής ίνας	115
4.7.	Μοντέλο ορθότοπης εμφύτευσης καρκινικών κυττάρων εκ μεταβατικού επιθηλίου AY-27 σε θηλυκούς αρουραίους Wistar	117
4.7.1.	Μέτρηση απόπτωσης με την μέθοδο TUNEL.....	117
4.8.	Φωτοδυναμική Θεραπεία μετά από τροποποίηση της καλ/γεια κυττάρων και αύξηση της δόσης ΠΜΚ.....	120
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	123
6.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	139
7.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	143
8.	ABSTRACT	147
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	151

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Η ουροδόχος κύστη

Εμβρυολογικά το κυρίως τμήμα της ουροδόχου κύστεως σχηματίζεται από το κρανιακό άκρο του ουρογεννητικού σωλήνα το οποίο έρχεται σε επαφή με τον αλλαντοειδή υμένα ενώ το κυστικό τρίγωνο σχηματίζεται από το σημείο επαφής του κρανιακού άκρου με τους μεσονεφρικούς πόρους (1). Το μεταβατικού τύπου επιθήλιο της ουροδόχου κύστεως προέρχεται από το ενδόδερμα του ουρογεννητικού σωλήνα, το χόριο και ο μυϊκός ιστός προέρχονται από το γειτονικό σπλαχνικό μεσέγγυμα (1).

Η ουροδόχος κύστη βρίσκεται πίσω από την ηβική σύμφυση, στην ελάσσονα πύελο, και είναι ένα κοίλο, μυώδες όργανο, που αφ' ενός μεν υποδέχεται το ούρο από τους ουρητήρες, αφ' ετέρου δε χρησιμεύει για την εξώθηση αυτού μέσω της ουρήθρας. Στο μεν άνδρα κείται ανάμεσα στην ηβική σύμφυση και στο απευθυσμένο, έχοντας από κάτω τον προστάτη και από πάνω τις εντερικές έλικες. Στη μεν γυναίκα βρίσκεται ανάμεσα στην ηβική σύμφυση και στη μήτρα, έχοντας από κάτω το περίνεο και από πάνω τη μήτρα μαζί με τις εντερικές έλικες (2).

Στη στήριξη αυτής εκτός από το περίνεο συμβάλλουν: το περιτόναιο, οι ομφαλοκυστικοί σύνδεσμοι, οι ηβοκυστικοί (ηβοπροστατικοί στον άνδρα) σύνδεσμοι και η προκυστική περιτονία. Το εσωτερικό της εμφανίζει πολλές πτυχές, οι οποίες όμως εξαφανίζονται κατά την πλήρωσή της. Το τρίγωνο εντοπίζεται στη βάση της κύστεως έχει σχήμα τριγωνικό. Η κορυφή να αντιστοιχεί στο έσω στόμιο της ουρήθρας. Στους άντρες από κάτω βρίσκεται ο προστάτης αδένας όπου οι ίνες τους εξωστήρα σχηματίζουν τον έσω σφικτήρα στους άντρες (κυκλοτερής διάταξη των μυϊκών ινών). Στις γυναίκες οι μυϊκές ίνες έχουν επιμήκη φορά και έτσι δεν σχηματίζουν σφικτήρα (3). Η βάση να αφορίζεται από την ενδοτοιχωματική πορεία των δυο ουρητήρων το ουρητηρικό όγκωμα, στα δύο άκρα του οποίου αναγνωρίζουμε τα στόμια των ουρητήρων.

Το τοίχωμα της ουροδόχου κύστης αποτελείται από έξω μεν το μυϊκό χιτώνα από μέσα το ουροθήλιο. Ο μυϊκός χιτώνας εμφανίζει τρεις στιβάδες, την έξω επιμήκη, τη μέση κυκλοτερή και την έσω πλεγματοειδή. Οι στιβάδες αυτές αναστομόνονται μεταξύ των και αποτελούν, από λειτουργική άποψη, ενιαίο μυ, τον εξωστήρα μυ της κύστης. Η σύσπασή του επιτυγχάνει την εξώθηση του ούρου στην ουρήθρα κατά την ούρηση (2).

Αρτηρίες της κύστης είναι δύο από κάθε πλάγιο, η άνω κυστική (κλάδος της ομφαλικής) και η κάτω κυστική (κλάδος της έσω λαγόνιας). Οι κυστικές φλέβες εκβάλλουν στην έσω λαγόνια φλέβα. Τα λεμφαγγεία εκβάλλουν στα πρόσθια και στα πλάγια κυστικά λεμφογάγγλια, μερικά δε και στα έσω λαγόνια (2). Η ουροδόχος κύστη νευρώνεται από το κυστικό πλέγμα.

Η ουροδόχος κύστη επενδύεται από μεταβατικού τύπου επιθήλιο. Το επιθήλιο έχει πάχος 6-7 κύτταρων και χωρίζεται σε τρία επίπεδα: α) τα επιφανειακά κύτταρα, τα οποία έρχονται σε επαφή με το περιεχόμενο της κύστεως (ούρα), β) τα ενδιάμεσου τύπου κύτταρα, και γ) τα βασικά κύτταρα, τα οποία εδράζονται στη βασική μεμβράνη. Όταν η κύστη είναι διατεταμένη τότε το επιθήλιο έχει πάχος 2-3 αποπλατυσμένων κυττάρων (4). Το χόριο βρίσκεται μεταξύ βασικής μεμβράνης και μυϊκού χιτώνα και αποτελείται από πυκνό συνδετικό ιστό με πλούσιο αγγειακό δίκτυο, λεμφαγγεία, νευρικές απολήξεις και λίγες ελαστικές ίνες (5). Ο **μυϊκός χιτώνας** αποτελείται από τρεις στοιβάδες λείων μυϊκών ινών, οι οποίες διαπλέκονται μεταξύ τους, πλην της περιοχής του αυχένα όπου ξεχωρίζουν σε τρεις στοίχους, έσω και έξω επιμήκη και ένα μέσο κυκλωτερή η οποία σχηματίζει τον έσω σφιγκτήρα. Ο **υπορογόνιος χιτώνας** αποτελείται από πυκνό συνδετικό ιστό.

1.2. Καρκίνος της ουροδόχου κύστεως

1.2.1. Επιδημιολογία

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως είναι η πέμπτη πιο συχνά διαγνωσμένη μη επιφανειακή συμπαγής κακοήθειας και ο δεύτερος πιο συχνός καρκίνος του ουροποιητικού μετά τον καρκίνο του προστάτη (6). Περίπου 357000 άτομα παγκοσμίως διαγιγνώσκονται με καρκίνο ουροδόχου κύστεως κάθε έτος, ενώ 145000 άνθρωποι καταλήγουν από την ασθένεια ετησίως (7).

Η επίπτωση ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων κρατών και περιοχών (Γραφήματα 1 Άνω A & B). Στην Ευρώπη η υψηλότερη επίπτωση, τυποποιημένη με βάση την ηλικία, έχει αναφερθεί στην Ισπανία (41,5 άνδρες και 4,8 γυναίκες) και η χαμηλότερη στην Φινλανδία (18,1 στους άνδρες και 4,3 στις γυναίκες) (8). Η θνητότητα παγκόσμια είναι τρεις άνδρες έναντι μίας γυναίκας ανά 100000 ενώ στην Ευρωπαϊκή Ένωση η θνητότητα είναι 8 για τους άνδρες και 3 για τις γυναίκες ανά 100000 (Γραφήματα 1 Κάτω A & B) (8).

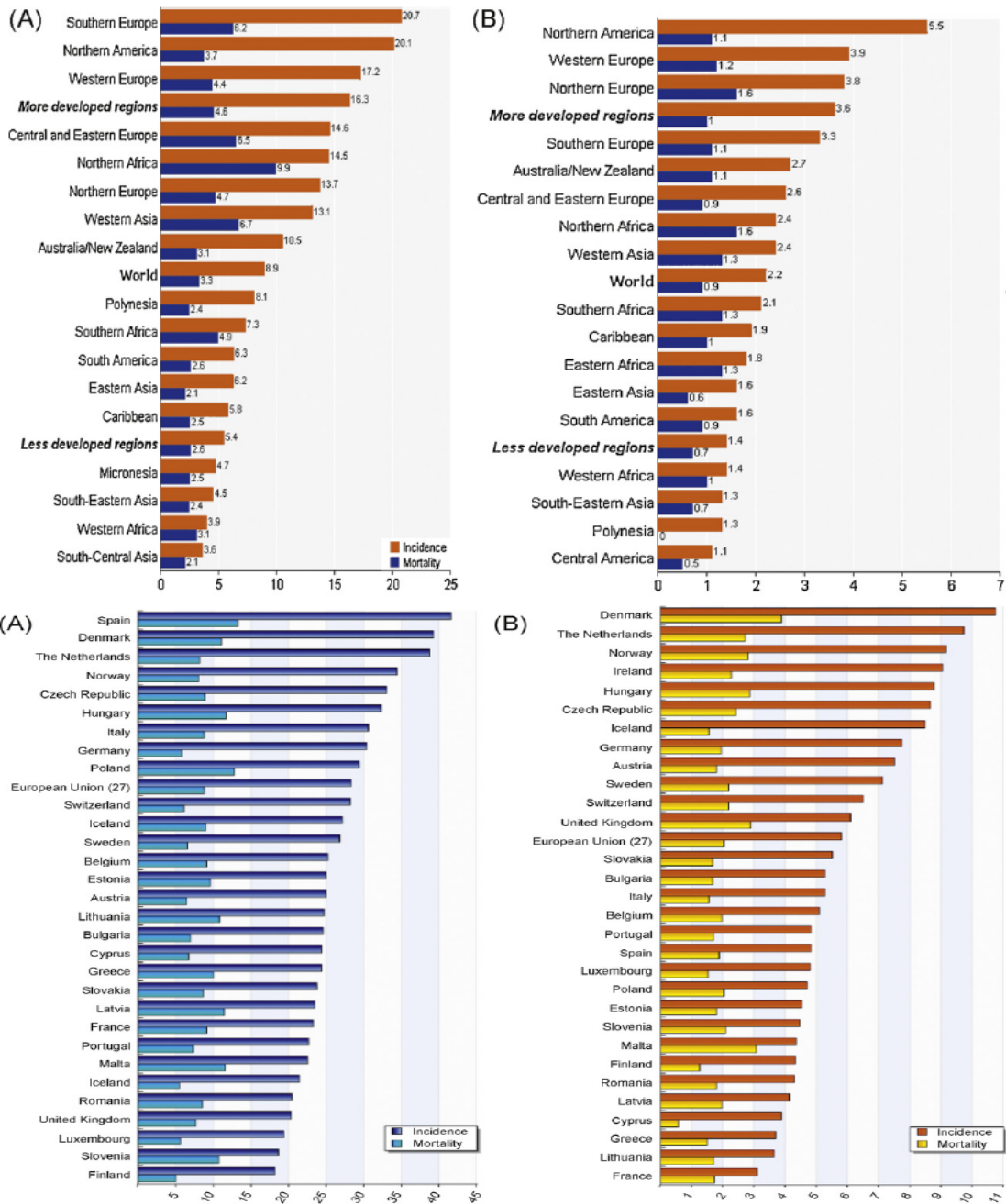
Η μείωση της έκθεσης σε αιτιολογικούς παράγοντες, κυρίως του καπνίσματος και της επαγγελματικής εκθέσεως σε καρκινογόνους παράγοντες οδήγησε σε μείωση της επίπτωσης (9). Η θνητότητα έχει επίσης μειωθεί αντανακλώντας την πρόιμη διάγνωση και καλύτερη αντιμετώπιση (10). Θα πρέπει να λάβουμε υπόψιν και μία λανθάνουσα περίοδο τριάντα ετών μέχρι την εμφάνιση του καρκίνου (11).

Περίπου 75% των ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως παρουσιάζονται με μη μυοδιηθητική νόσο, δηλαδή η βλάβη περιορίζεται στο ουροθήλιο (στάδιο Ta ή CIS) ή στο υποουροθήλιο (στάδιο T1). Έχουν χαμηλά ποσοστά επιδείνωσης και κατ' επέκταση μεγαλύτερη επιβίωση, έτσι οι ασθενείς αυτοί έχουν μεγαλύτερο επιπολασμό. Αντιθέτως οι ασθενείς που πάσχουν από μυοδιηθητικούς όγκους έχουν μεγαλύτερη σχετιζόμενη με τον καρκίνο θνητότητα (8,12).

1.2.2. Παράγοντες κινδύνου

Οι παράγοντες κινδύνου διακρίνονται σε κληρονομικούς γενετικούς προδιαθεσικούς παράγοντες και παράγοντες από εξωτερικές εκθέσεις (external exposures) όπως καρκινογόνα του καπνού του τσιγάρου (13). Κάθε παράγοντας κινδύνου μπορεί να έχει διαφορετική βαρύτητα στην επίπτωση και την παθοφυσιολογία του καρκίνου της ουροδόχου. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται αιτιολογικό κλάσμα (etiologic fraction) ή αποδοτέος κίνδυνος (attributable risk) (14).

Προς το παρόν πολλοί πιστεύουν ότι οι περιβαλλοντολογικοί παράγοντες παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην εμφάνιση του καρκίνου της ουροδόχου τη στιγμή που κληρονομικοί παράγοντες τροποποιούν τον φαινότυπο και την κλινική παρουσία της νόσου. Επειδή η έκθεση σε καρκινογόνα παίζει τον σπουδαιότερο λόγο η πρωταρχική πρόληψη (δηλ. η αποφυγή καρκινογόνων) φαίνεται ότι μπορεί να μειώσει τη θνησιμότητα που σχετίζεται με την νόσο (14). Οι παράγοντες κινδύνου είναι οι διάφορες καρκινογόνες ουσίες και/ή οι μεταβολίτες τους. Αποβάλλονται κυρίως με τα ούρα οπότε συγκεντρώνονται σε αυτά σε υψηλές δόσεις, υψηλότερες από ότι σε άλλους ιστούς ή υγρά, εκ τούτου αυξάνεται η επιβλαβής τους δράση. Επίσης σημαντικό ρόλο παίζει η διάρκεια αλλά και η ένταση της έκθεσης στο καρκινογόνο (15).



Γράφημα 1 Άνω Α & Β Εκτιμώμενο Παγκόσμιο ποσοστό επίπτωσης και θνητότητας, με βάση την τυποποιημένη παγκόσμια ηλικία, από ουροθηλιακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως ανά 100 000 σε (Α) άνδρες και (Β) γυναίκες (GLOBOCAN) (8)

Κάτω Α & Β. Εκτιμώμενο Ευρωπαϊκό ποσοστό επίπτωσης και θνητότητας, με βάση την τυποποιημένη παγκόσμια ηλικία, από ουροθηλιακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως ανά 100 000 σε (Α) άνδρες και (Β) γυναίκες (GLOBOCAN) (8).

1.2.2.1. Γενετική ευαισθησία

Συνεχώς αυξανόμενα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η γενετική προδιάθεση έχει σημαντική επίδραση στην επίπτωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, κυρίως μέσω της επίδρασής της στην ευαισθησία του οργανισμού σε άλλους παράγοντες κινδύνου (10,12). Συγγενείς πρώτου βαθμού έχουν διπλάσιο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της ουροδόχου. Τρεις μεγάλες μελέτες έχουν συσχετίσει τον καρκίνο με αλληλουχίες που βρίσκονται στους εξής τόπους στα 8q24.21, 3q28, 8q24.3, 4p16.3, 22q13.1, 19q12, 2q37.1, and 5p15.33 (16 - 18).

1.2.2.2. Κάπνισμα

Η καύση του καπνού είναι ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου και στην χρήση του οφείλονται περίπου 50% των περιπτώσεων (12,13). Απελευθερώνει τουλάχιστον 69 γνωστά καρκινογόνα συμπεριλαμβανομένου νιτροζαμίνες, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες και άλλες αρωματικές αμίνες, οι οποίες ουσίες έχουν ενοχοποιηθεί ως μεταλλαξιογόνα που προκαλούν καρκίνο της ουροδόχου (19). Αυτές οι ουσίες εκκρίνονται από τα νεφρά στα ούρα και ασκούν έτσι την καρκινογόνο δράση τους σε όλο το ουροποιητικό σύστημα (20). Οι καπνίζοντες έχουν διπλάσιο με τετραπλάσιο κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου της ουροδόχου σε σχέση με μη καπνίζοντες (21). Ο κίνδυνος αυξάνεται όσο αυξάνεται η ένταση και η διάρκεια του καπνίσματος (22). Οι καπνιστές έχουν την τάση να αναπτύσσουν μεγαλύτερους, πολυεστιακούς και υψηλότερης κακοήθειας καρκίνους της κύστεως (23). Επίσης έχουν υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας λόγω του καρκίνου από μη καπνιστές (40% έναντι 20%) (24).

Το κάπνισμα πούρων ή πίπας, παρόλο που η εισπνεόμενη συγκέντρωση των ουσιών είναι μικρότερη από αυτή των τσιγάρων (25), αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της κύστεως στο διπλάσιο σε σύγκριση με μη καπνίζοντες (26).

Μία οριστική σύνδεση μεταξύ παθητικού καπνίσματος και καρκίνου της ουροδόχου δεν έχει τεκμηριωθεί παρόλη τη σημαντική έρευνα για αυτό το θέμα. Κάποιες μελέτες προτείνουν έναν αυξημένο κίνδυνο για γυναίκες και άνδρες (27), ενώ άλλες δεν κατόρθωσαν να αποδείξουν κάποια σύνδεση (28,29).

1.2.2.3. Επαγγελματικοί παράγοντες κινδύνου

Το 1895 ο Ludwig Rehn, Γερμανός ιατρός, πρώτος παρατήρησε ότι ένας σημαντικός αριθμός εργαζομένων σε βιομηχανίες βαφών ανέπτυξαν καρκίνο ουροδόχου κύστεως θεωρώντας ως υπεύθυνη την ανιλίνη (30). Η επαγγελματική έκθεση σε αρωματικές αμίνες (βενζιδίνη, 4-αμινοδιφαινύλιο, 2-ναφθυλαμίνες, 4-χλωρο-τουλοϊδίνη), πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες και χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες θεωρούνται ως ο δεύτερος πιο σημαντικός παράγοντας εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (31) αποδίδοντας περίπου το 20% των περιστατικών. Η επίγνωση του φαινομένου έφερε αλλαγές στον εργασιακό χώρο. Παρόλα αυτά την δεκαετία 2000-2010 υπάρχει μεγαλύτερη αύξηση στις γυναίκες κατά 14% σε σχέση με τους άνδρες λόγω αύξησης της συμμετοχής τους στην εργασία (32).

Έχει φανεί ότι ενώ η επίδραση των βαφών μαλλιών στις κομμώτριες ήταν ασήμαντη για την εμφάνιση καρκίνου η εικόνα άλλαξε όταν επρόκειτο για γυναίκες που έφεραν το γονίδιο του αργού αλκυλιωτή NAT2 (33).

1.2.2.4. Διαιτητικοί παράγοντες

Όπως και σε άλλους καρκίνους έτσι και στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως έχουν ενοχοποιηθεί διαιτητικοί παράγοντες. Η κατανάλωση υγρών έχει αντικρουόμενη δράση. Η λήψη μεγάλων ποσοτήτων υγρών δρα προφυλακτικά επειδή αυξάνει την διούρηση και μειώνει έτσι το χρονικό διάστημα που έρχεται το καρκινογόνο με το ουροθήλιο (34,35). Από την άλλη άλλες μελέτες παρατήρησης ισχυρίζονται πως αν το νερό περιέχει καρκινογόνα (αρσενικό ή παράγωγα απολυμαντικών) τότε αυξάνεται η πρόσληψή τους και ευνοείται η δράση τους (36,37). Η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών δεν φαίνεται να επηρεάζει την εμφάνιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Ούτε η κατανάλωση κόκκινου κρέατος (38). Η κατανάλωση βιταμινών δεν επηρεάζει την εμφάνιση του καρκίνου (39,40). Ο δείκτης μάζας σώματος δεν παίζει και αυτός κάποιο ρόλο (41).

1.2.2.5. Φύλο

Σε μία αναδρομική μελέτη οι γυναίκες έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να διαγνωστούν με μυοδιηθητικό καρκίνο από τους άνδρες (85% έναντι 51%) (42). Η γυναίκες έχουν πιο καθυστερημένη διάγνωση από τους άνδρες, ίσως γιατί αναζητούνται άλλοι παράγοντες για

την αιματοουρίας τους (43). Σε μια προοπτική μελέτη κοόρτης η εμμηνόπαυση ήταν παράγοντας κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου κύστεως (44). Επίσης φαίνεται πως η ασθένεια είναι πιο επιθετική στις νεαρές γυναίκες και σε διαφορετικούς κλινικούς φαινοτύπους (45,46).

1.2.2.6. Ιατρικές καταστάσεις (Medical Conditions)

Η σχιστοσωμίαση της ουροδόχου είναι παρασιτική λοίμωξη με 600 εκατομμύρια κατοίκων να έχουν εκτεθεί στην Αφρική, Ασία, Νότια Αμερική και στην Καραϊβική (47). Οι ασθενείς αυτοί λόγω χρόνιας φλεγμονής στο ουροθήλιο από το παράσιτο αναπτύσσουν καρκίνους εκ πλακωδών κυττάρων. Η επίπτωση μειώνεται τα τελευταία χρόνια λόγω καλύτερων μεθόδων ελέγχου του παρασίτου και της ασθένειας στους ενδημικούς πληθυσμούς (48,49).

Δεν έχει συσχετιστεί ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης με την ύπαρξη ιογενών ή βακτηριακών λοιμώξεων σε προοπτικές μελέτες (50). Παρόλα αυτά η ύπαρξη μόνιμου καθετήρα για μεγάλο χρονικό διάστημα έχει ενοχοποιηθεί για αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της κύστης (51).

Έχουν παρατηρηθεί αυξημένα ποσοστά περιστατικών καρκίνου της ουροδόχου κύστεως τόσο μετά από εξωσωματική ακτινοθεραπεία για γυναικολογικούς όγκους, σχετικός κίνδυνος 2 - 4 φορές (52), όσο και μετά βραχυθεραπεία ή εξωσωματική ακτινοθεραπεία για καρκίνο του προστάτη, σχετικός κίνδυνος 1,1 έως 1,42 (53,54). Για αυτόν τον λόγο, ασθενείς που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία, εξωσωματική ή βραχυθεραπεία, και μεγάλο προσδόκιμο επιβίωσης θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά (52,53).

Η κυκλοφωσφαμίδη, ένας αλκυλιοποιητικός παράγοντας που χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση της λευχαιμίας και του λεμφώματος, αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου (55). Επίσης η πιογλιταζόνη, ένα αντιδιαβητικό φάρμακο φαίνεται να έχει ασθενή συσχέτιση με τον ουροθηλιακό καρκίνο μετά από μακροχρόνια χρήση (HR: 1.4; 95% CI, 1.03–2.0) (56).

1.2.3. Παθολογοανατομία

1.2.3.1. Ιστολογική ταξινόμηση

Η πιο πρόσφατη ιστολογική ταξινόμηση των αλλοιώσεων της ουροδόχου κύστεως είναι της WHO'04 (57) η οποία παρουσιάζεται στον Πίνακα 1

Πίνακας 1: Ιστολογική ταξινόμηση των αλλοιώσεων της ουροδόχου κύστεως κατά WHO '04

1. Επιθηλιακοί όγκοι της ουροδόχου κύστεως	
1.1. Καλοήθεις όγκοι της ουροδόχου κύστεως	
1.1.1. Ουροθηλιακό (εκ μεταβατικού επιθηλίου) θήλωμα	8121/0
1.1.2. Ουροθηλιακό (εκ μεταβατικού επιθηλίου) θήλωμα, ανάστροφου τύπου	8121/0
1.1.3. Θήλωμα εκ πλακωδών επιθηλίων	8052/0
1.1.4. Λαχνωτό Αδένωμα	8261/0
1.2. Θηλώδες ουροθηλιακό (εκ μεταβατικού επιθηλίου) νεόπλασμα χαμηλού κακοήθους δυναμικού	8130/1
1.3. Κακοήθειες	
1.3.1. Ουροθηλιακό (εκ μεταβατικού επιθηλίου) καρκίνωμα	8120/3
1.3.2. Καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων	8070/3
1.3.3. Ακροχορδον καρκίνωμα	8051/3
1.3.4. Αδενοκαρκίνωμα	8140/3
1.3.5. Καρκίνωμα ουραχού	8310/3
1.3.6. Μικροκυτταρικού τύπου καρκίνωμα	8041/3
1.3.7. Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα	8020/3
1.3.8. Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα	8020/3
2. Μη επιθηλιακής προέλευσης όγκοι	
3. Μεσεγγυματικής προέλευσης όγκοι	
3.1. Παραγαγγλίωμα	8680/1
3.2. Νεοπλάσματα αιμοποιητικού και λεμφικού ιστού	
3.3. Κακόηθες μελάνωμα	8720/3
4. Μεταστατικοί όγκοι και διήθηση από νεοπλάσματα γειτονικών ιστών	
5. Μη ταξινομούμενοι όγκοι	
6. Ανωμαλίες επιθηλίου	
6.1. Υπερπλασία	72000
6.2. Επίπεδη ουροθηλιακή (εκ μεταβατικού επιθηλίου) υπερπλασία	72000
6.3. Θηλώδης ουροθηλιακή (εκ μεταβατικού επιθηλίου) υπερπλασία	72050
6.4. Αντιδραστική ατυπία, ατυπία ακαθόριστης σημαντικότητας	
6.5. Αδένια von Brunn	76060
6.6. Κυστική κυστίτιδα	73370
6.7. Αδενικού τύπου μετάπλαση	73300
6.8. Νεφρογενές αδένωμα	73380
6.9. Πλακώδους τύπου μετάπλαση	73220

1.2.3.2. Ταξινόμηση κατά TNM (Tumour, Node, Metastasis)

Ο τύπος και το είδος του καρκίνου αποτιμάται με βάση τα δεδομένα της TNM ταξινόμησης των κακοηθειών του 2002. Αυτή έχει ως κεντρικό άξονά της την ύπαρξη ή όχι διηθητικότητας του καρκίνου. Έτσι Τα (μη διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα), Tis (καρκίνωμα in situ) και T1 (καρκίνος διηθεί τον υποουροθηλιακό συνδετικό ιστό) αντιπροσωπεύουν τους μη μυοδιηθητικούς όγκους ενώ T2, T3 και T4 αντιπροσωπεύουν τους μυοδιηθητικούς καρκίνους. Θα πρέπει να παρατηρηθεί ότι εξ' ορισμού ο CIS είναι επίπεδος (δηλαδή μη θηλωματώδης), υψηλού σταδίου, μη διηθητικός καρκίνος εκ κυττάρων μεταβατικού επιθηλίου τονίζοντας ότι είναι πραγματικός καρκίνος σε σχέση με άλλα in situ που καταγράφονται σε άλλες νοσολογικές οντότητες (58,59).

Η ταξινόμηση TNM του 2002 έχει ευρέως υιοθετηθεί από Διεθνή Ένωση Εναντία στον Καρκίνο (Union International Contre le Cancer (UICC)). Η έκδοση ενημερώθηκε το 2009 (7η έκδοση) αλλά δεν υπήρξαν μεταβολές για τον καρκίνο της κύστεως (60) (Πίνακας 2).

1.2.3.3. Ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης των μη μυοδιηθητικών ουροθηλιακών καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστεως

Το 2004, η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Π.Ο.Υ.) και η Διεθνής Κοινότητα της Παθολογοανατομίας του Ουροποιητικού (International Society of Urological Pathology ISUP) παρουσίασαν μία νέα ταξινόμηση των μη-μυοδιηθητικών ουροθηλιακών όγκων (60,61) (Πίνακας 2). Τα κατά 1973 WHO Grade 1 καρκινώματα έχουν επανακαθοριστεί ως θηλωματώδη ουροθηλιακά νεοπλάσματα χαμηλού κακοήθους δυναμικού [papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PUNLMP)] και ως χαμηλού βαθμού κακοήθειας (Low Grade) στην ταξινόμηση κατά WHO 2004, ενώ τα Grade 2 καρκινώματα ως Low Grade και High Grade καρκινώματα. Όλα τα Grade 3 κατά WHO 1973 καρκινώματα επανακαθορίστηκαν ως υψηλού βαθμού (High Grade) καρκινώματα. Οι σχέσεις μεταξύ των δύο σταδιοποιήσεων στο ιστολογικό φάσμα του ουροθηλιακού καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (62) παρουσιάζονται στο Σχήμα 3, ενώ τα ιστολογικά χαρακτηριστικά μεταξύ του φυσιολογικού ουροθηλίου και των νέων βαθμών διαφοροποίησης (grading) (63) στον Πίνακα 3. Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά των ουροθηλιακών θηλωματωδών αλλοιώσεων (57) στον Πίνακα 4.

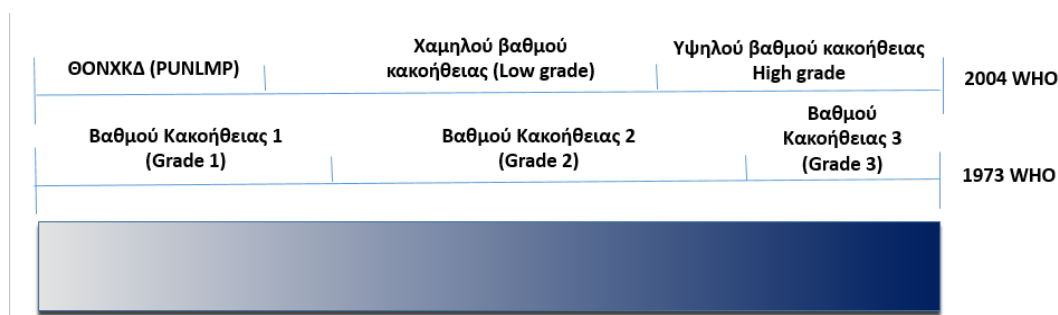
Πίνακας 2 Ταξινόμηση κατά TNM (Tumour, Node, Metastasis) (63)

T – Πρωτοπαθής όγκος	
TX	Πρωτοπαθής όγκος ο οποίος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
T0	Καμία ένδειξη πρωτοπαθή όγκου
Ta	Μη διηθητικό θηλωματώδες καρκίνωμα
Tis	Καρκίνωμα <i>in situ</i> : «επιφανειακός όγκος»
T1	Όγκος διηθεί τον υποουροθηλιακό συνδετικό ιστό
T2	Όγκος διηθεί τον μυϊκό
	T2a Όγκος διηθεί την επιφανειακή μυϊκή στοιβάδα (έσω μισό)
	T2b Όγκος διηθεί εν τω βάθει μυϊκή στοιβάδα (έξω μισό)
T3	Όγκος διηθεί περικυστικό ιστό
	T3a Μικροσκοπικά
	T3b Μακροσκοπικά (εξωκυστική μάζα)
T4	Όγκος διηθεί οποιοδήποτε από τα ακόλουθα: προστάτη, μήτρα, κόλπο, πυελικό έδαφος, κοιλιακό τοίχωμα
	T4a Όγκος διηθεί προστάτη, σπερματοδόχες κύστεις, μήτρα ή κόλπο
	T4b Όγκος διηθεί πυελικό έδαφος ή κοιλιακό τοίχωμα
N - Λεμφαδένες	
NX	Περιοχικοί λεμφαδένες δεν μπορούν να αποτιμηθούν
N0	Χωρίς μετάσταση στους περιοχικούς λεμφαδένες
N1	Μετάσταση σε μονήρη λεμφαδένα στην αληθή πύελο (υπογάστριο, θυρεοειδικό, έξω λαγόνιο ή προίερό)
N2	Μετάσταση σε πολλαπλούς λεμφαδένες στην αληθή πύελο (υπογάστριους, θυρεοειδικούς, έξω λαγόνιους ή προίερούς)
N3	Μετάσταση σε λεμφαδένα/ες της κοινής λαγονίου
M – απομακρυσμένες μεταστάσεις	
MX	Απομακρυσμένες μεταστάσεις δεν μπορούν να αποτιμηθούν
M0	Χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις
M1	Απομακρυσμένες μεταστάσεις
	M1a Μη περιοχικοί λεμφαδένες
	M1b Άλλη απομακρυσμένη μετάσταση

Το θηλωματώδες ουροθηλιακό νεόπλασμα χαμηλού κακοήθους δυναμικού ορίστηκε ως η αλλοίωση η οποία δεν έχει κυτταρικά χαρακτηριστικά κακοήθειας αλλά παρουσιάζουν φυσιολογικά ουροθηλιακά κύτταρα με θηλωματώδη διάταξη, κάποια από τα οποία είχαν ταξινομηθεί ως G1 στην ταξινόμηση του 1973. Παρόλο που έχουν μηδαμινό κίνδυνο διήθησης δεν είναι τελείως καλοήθη και έχουν μία τάση για υποτροπή. Η κατηγορία αυτή αφορά αποκλειστικά μόνο Ta όγκους. Η κατηγορία Grade 2 έχει εξαλειφθεί από την καινούρια ταξινόμηση λόγω έντονων αμφισβητήσεων (57,64). Οι δημοσιευμένες συγκρίσεις μεταξύ των δύο ταξινομήσεων δεν κατάφεραν να αναδείξουν την καλύτερη επαναληψιμότητα της μίας από την άλλη (65). Συστήνεται να χρησιμοποιούνται και οι δύο ταξινομήσεις.

Πίνακας 3 Ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης των ουροθηλιακών καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστεως κατά WHO'1973 (66) & WHO'2004 (61)

<p>1973 σταδιοποίηση κατά ΠΟΥ Ουροθηλιακό θήλωμα Grade 1: καλά διαφοροποιημένο Grade 2: μετρίως διαφοροποιημένο Grade 3: πτωχά διαφοροποιημένο</p>
<p>2004 σταδιοποίηση κατά ΠΟΥ Επίπεδες βλάβες Υπερπλασία (επίπεδες βλάβες χωρίς ατυπία ή θηλωματώδη στοιχεία) Αντιδραστική ατυπία (επίπεδες βλάβες με ατυπία) Ατυπία αγνώστου σημαντικότητας Ουροθηλιακή δυσπλασία Ουροθηλιακό CIS (είναι πάντοτε υψηλού Grade)</p> <p>Θηλωματώδεις βλάβες Ουροθηλιακό θήλωμα (εντελώς καλοήθης αλλοίωση) Θηλωματώδες ουροθηλιακό νεόπλασμα χαμηλού κακοήθους δυναμικού Χαμηλού – grade (Low – Grade) θηλωματώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα Υψηλού – grade (High – Grade) θηλωματώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα</p>



Σχήμα 1 Ιστολογικό φάσμα του ουροθηλιακού καρκινώματος εκ μεταβατικού επιθηλίου ΘΟΝΧΚΔ : θηλωματώδη ουροθηλιακά νεοπλάσματα χαμηλού κακοήθους δυναμικού

Πίνακας 4: Ιστολογικά χαρακτηριστικά των ουροθηλιακών θηλωματωδών αλλοιώσεων (57)

	Θήλωμα	Θηλωματώδες νεόπλασμα χαμηλού καοήθους δυναμικού	Χαμηλού βαθμού κακοήθειας (Low-grade) θηλώδες καρκίνωμα	Υψηλού βαθμού κακοήθειας (High-grade) θηλώδες καρκίνωμα
Αρχιτεκτονική				
Θηλή	Λεπτή	Λεπτή. Περιστασιακά διάχυτη	Διάχυτη, με διακλαδώσεις, και λεπτοφυής	Διάχυτη, με διακλαδώσεις, και λεπτοφυής
Οργάνωση των κυττάρων	Ταυτόσημη με το φυσιολογικό	Πολικότητα παρόμοια με το φυσιολογικό. Οποιοδήποτε πάχος. Συνεκτικότητα	Κυρίως σε τάξη, παρόλα ελάχιστη αύξηση αριθμού και ελάχιστη απώλεια της πολικότητας. Οποιοδήποτε πάχος. Συνεκτικότητα	Κατά κύριο λόγο διαταραγμένη με συχνή απώλεια της πολικότητας. Οποιοδήποτε πάχος. Συχνά χωρίς συνεκτικότητα
Κυτταρολογία				
Μέγεθος πυρήνα	Παρόμοιο με το φυσιολογικό	Μπορεί να είναι ομοιόμορφα μεγεθυμένος	Μεγάλος με ποικιλία μεγέθους	Μεγάλος με ποικιλία μεγέθους
Σχήμα πυρήνα	Παρόμοιο με το φυσιολογικό	Επιμηκυμένος, στρογγυλός – ωοειδής, ομοιόμορφος	Στρογγυλός – ωοειδής, μικρή διαφοροποίηση στο σχήμα και στο περίγραμμα	Μέτριος - σεσημασμένος πλειομορφισμός
Πυρηνική χρωματίνη	Λεπτή	Λεπτή	Ήπια ποικιλία μέσα και ανάμεσα στα κύτταρα	Ήπια – σεσημασμένη ποικιλία τόσο μέσα όσο και ανάμεσα στα κύτταρα με υπερχρωμασία
Πυρηνίσκος	Απών	Απών έως υποσημαινόμενος	Συνήθως υποσημαινόμενος (διαφέρουν σαφώς από αυτούς των HG)	Πολλαπλοί κυρίαρχοι πυρηνίσκοι οι οποίοι είναι παρόντες
Μιτώσεις	Απούσες	Σπάνιες, στα βασικά κύτταρα	Περιστασιακές σε οποιοδήποτε επίπεδο	Συνήθως συχνές σε οποιοδήποτε επίπεδο
Κύτταρα δίκην ομπρέλας	Ομοιόμορφα παρόντα	Παρόντα	Συνήθως παρόντα	Μπορεί να είναι απόντα

1.2.3.4. Καρκίνωμα *in situ* (CIS)

Ο CIS είναι, εξ' ορισμού, επίπεδος (δηλαδή μη θηλωματώδης), υψηλού σταδίου, μη διηθητικός καρκίνος εκ κυττάρων μεταβατικού επιθηλίου. Θα πρέπει να τονιστεί ότι είναι πραγματικός καρκίνος σε σχέση με άλλα *in situ* που καταγράφονται σε άλλες νοσολογικές οντότητες (58). Υπάρχει υψηλός κίνδυνος για υποτροπή και επιδείνωση στους ασθενείς που πάσχουν από CIS εξαιτίας των βιολογικών αλλοιώσεων που φέρουν αυτά τα κύτταρα καθώς επίσης από την απρόβλεπτη βιολογική συμπεριφορά αυτών των αλλοιώσεων. Θεωρείται επιθετικός, με την ικανότητα να διηθεί και να μεθίστανται (67). Ιστορικά, έως και 50% αυτών των ασθενών επιδεινώνονται σε μυοδιηθητική νόσο μέσα σε διάστημα πέντε ετών (68).

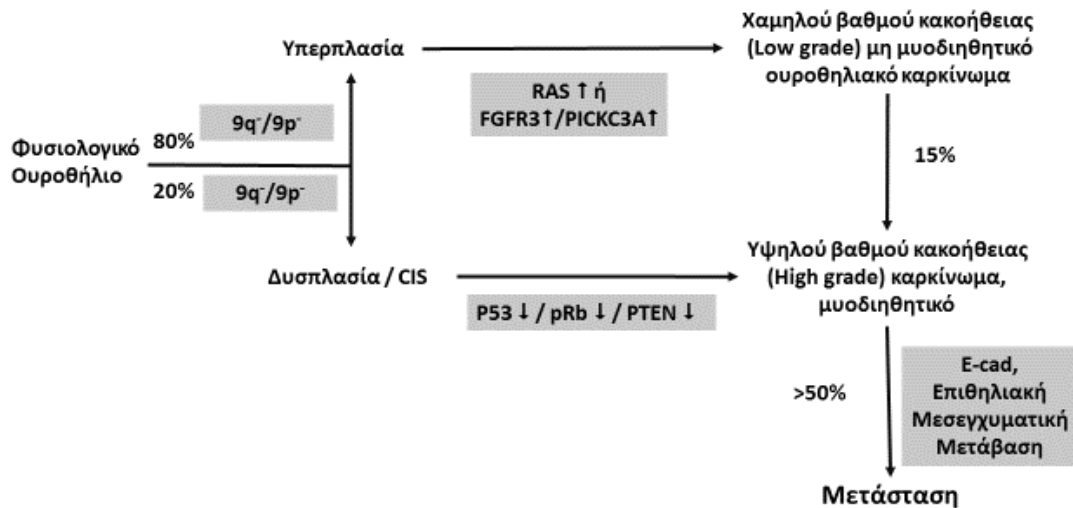
Παρόλο που μπορεί να παρουσιάζεται ως μονήρης βλάβη, συνήθως είναι πολυεστιακή και διάχυτη. Συχνά ανιχνεύεται στην βάση ή σε γειτονική περιοχή του εξωφυτικού όγκου, ενώ δεν είναι σπάνιο να βρίσκεται σε απομακρυσμένο σημείο της ουροδόχου. Αλλοιώσεις CIS μπορεί να ανιχνευθούν εξωκυστικά στον ουρητήρα και στην προστατική ουρήθρα (69).

Ταξινόμηση CIS σε κλινικούς τύπους (67).

- **Πρωτοπαθής:** μεμονωμένο CIS χωρίς προηγούμενη ή σύγχρονη ύπαρξη θηλωματώδων όγκων ή προηγούμενη ύπαρξη CIS
- **Δευτεροπαθής:** CIS που ανιχνεύθηκε κατά την παρακολούθηση ασθενών με προηγούμενο όγκο ο οποίος δεν ήταν CIS
- **Συνυπάρχον:** CIS κατά την παρουσία άλλου ουροθηλιακού όγκου της κύστεως
- **Υποτροπιάζον:** Επαναλαμβανόμενη παρουσία μεμονωμένου CIS μετά από επιτυχή αρχική ανταπόκριση στην ενδοκυστική θεραπεία

1.2.4. Φυσική ιστορία και μοριακή βιολογία του ουροθηλιακού καρκίνου της ουροδόχου κύστεως

Περίπου 90% των κακοηθών όγκων της ουροδόχου είναι ουροεπιθηλιακής προέλευσης με την πλειοψηφία αυτών να είναι καρκινώματα κυττάρων εκ μεταβατικού επιθηλίου. Οι ουροθηλιακοί καρκίνοι των αρχικών σταδίων έχουν σταδιοποιηθεί σε δύο ομάδες με διακριτή συμπεριφορά και μοναδικά μοριακά προφίλ: όγκοι χαμηλού grade (πάντα



Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση των δύο ξεχωριστών γενετικών οδών που χαρακτηρίζουν την εξέλιξη των ουροθηλιακών νεοπλασμάτων. Τα χαμηλού κακοήθειας προέρχονται από μετάλλαξη ογκογονιδίων, ενώ τα υψηλού βαθμού κακοήθειας από μεταλλάξεις ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τροποποιημένη έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική προσκόλληση καθώς και προκαλούν την μετάπτωση σε μεσεγχυματικό τύπο οδηγούν στην μεταστατική μεταμόρφωση.

θηλωματώδεις και επιφανειακοί) και καρκίνοι υψηλού grade (είτε θηλωματώδεις ή μη και συχνά διηθητικοί). Κλινικά οι επιφανειακοί (σταδίου T_a, T₁ & T_{is}) αποτελούν το 75% έως 85% των νεοπλασμάτων ενώ το υπόλοιπο 15% με 25% είναι διηθητικοί (T₂ – T₄) με ή χωρίς την παρουσία μεταστάσεων κατά την διάγνωση (12).

Από τους ασθενείς που εμφανίστηκαν με μη μυοδιηθητικό ουροθηλιακό καρκίνο το 6,1% επιδεινώνεται σε μυοδιηθητικό καρκίνο σε ένα μέσο διάστημα 21 μηνών από την αρχική διάγνωση (70). Μεταξύ των ασθενών που αντιμετωπίστηκαν με ριζική κυστεκτομή λόγω μυοδιηθητικού καρκίνου, 57% είχαν μυοδιηθητική νόσο κατά την διάγνωση ενώ 43% είχαν διαγνωστεί αρχικά ως μη μυοδιηθητικοί όγκοι και στην πορεία επιδεινώθηκαν. Περίπου το ένα τρίτο των ασθενών που διαγιγνώσκονται με μυοδιηθητικό καρκίνο ουροδόχου έχουν μη ανιχνεύσιμες μεταστάσεις κατά τη στιγμή της αντιμετώπισης της πρωταρχικής εστίας, ενώ 25% των ασθενών που υποβάλλονται σε ριζική κυστεκτομή έχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις που ανιχνεύονται διεγχειρητικά (71).

Φαίνεται πως στα αρχικά στάδια εμφανίζεται απώλεια της ετεροζυγοτικότητας σε προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις όπως η υπερπλασία, η δυσπλασία ή ακόμα και στο

φυσιολογικό ουροθήλιο, κυρίως απώλειες των αλληλουχιών του μακρού σκέλους (9q) (72). Οι επιφανειακοί ουροθηλιακοί όγκοι χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις που σχετίζονται με την αύξηση της λειτουργίας των γονιδίων, κυρίως επηρεάζοντας τα κλασσικά ογκογονίδια όπως το RAS (73,74) και το FGFR3 (74). Το επιφανειακό καρκίνωμα *in situ* (Tis), επιφανειακοί όγκοι υψηλής κακοήθειας (High grade) και οι διηθητικοί όγκοι χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις που προκαλούν απώλεια κυτταρικών λειτουργιών, επηρεάζοντας τα πρωτότυπα ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως το p53 (75-77), RB (76) and PTEN (77).

Στη συνέχεια εμφανίζουν σαρκοματοειδή εξαλλαγή η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην επιδείνωση και την μετάσταση των όγκων αυτών. Κατά την μετάβαση αυτή μειώνεται η έκφραση της E-cadherin (78), p63 (79) και αυξάνεται η έκφραση μεταλλοπρωτεασών (MMP2, MMP9) (80), vimentin και των γονιδίων Zeb-1, Zeb-2 (81).

1.2.5. Διάγνωση και Σταδιοποίηση

1.2.5.1. Συμπτωματολογία

Ανώδυνη μακροσκοπική αιματουρία είναι το πιο συχνό σύμπτωμα. (82). Σε όλους τους ασθενείς που εμφανίζουν συμπτωματολογία από το κατώτερο ουροποιητικό θα πρέπει να υποπτευόμαστε καρκίνωμα *in situ*.

1.2.5.2. Κλινική εξέταση

Οι επιφανειακοί όγκοι δεν ανιχνεύονται με την κλινική εξέταση. Στους μυοδιηθητικούς όγκους, όταν είναι προχωρημένου κλινικού σταδίου, μπορεί κάποιος να ψηλαφήσει κατά την αμφίχειρη εξέταση, κυρίως υπό νάρκωση, ψηλαφητή μάζα η οποία μπορεί να είναι κινητή ή καθηλωμένη στο πυελικό τοίχωμα (83).

1.2.5.3. Απεικονιστικές εξετάσεις

Το υπερηχογράφημα είναι συνήθως η αρχική απεικονιστική εξέταση για την εκτίμηση του ουροποιητικού λόγω της ευκολίας πραγματοποίησής της (84). Μπορούμε να διαπιστώσουμε ενδοκυστικούς όγκους, διάταση πυελοκαλυκτικού συστήματος καθώς και όγκους ανώτερου ουροποιητικού. Η Ουρογραφία με αξονική τομογραφία είναι η

μέθοδος που προτιμάται στην απεικόνιση του ουροποιητικού (85). Ειδικότερα σε μυοδιαθητικούς όγκους μας δίνει πληροφορίες για την τοπική επέκταση της νόσου ή την ύπαρξη μεταστάσεων. Η ενδοφλέβια πυελογραφία είναι χρήσιμη όταν δεν έχουμε στην διάθεσή μας αξονική (86).

1.2.5.4. Κυτταρολογική ούρων

Η εξέταση των ούρων ή δειγμάτων μετά από έκπλυση της ουροδόχου κύστεως και αναζήτηση αποφολιδομένων καρκινικών κυττάρων έχει υψηλή ευαισθησία στους καρκίνους υψηλής κακοήθειας αλλά μικρή ευαισθησία στους χαμηλής κακοήθειας όγκους με αποτέλεσμα να είναι αρνητική ενώ υπάρχει όγκος (87). Θεωρείται εξέταση εκλογής για την ανίχνευση του καρκινώματος *in situ* (88). Θετική κυτταρολογική σημαίνει ύπαρξη όγκου σε οποιοδήποτε σημείο της ουροφόρου οδού, από τους κάλυκες έως την ουρήθρα. Η αρνητική κυτταρολογική δεν αποκλείει την ύπαρξη νεοπλασματος.

1.2.5.5. Μοριακοί δείκτες ούρων

Έχουν μελετηθεί πολλοί μοριακοί δείκτες στα ούρα. Έχουν υψηλότερη ευαισθησία με αντίκτυπο όμως στην ειδικότητα, η οποία είναι χαμηλότερη από την κυτταρολογική (89). Προς το παρόν, από τις υπάρχουσες μελέτες, δεν έχει προκριθεί κανένας για εφαρμογή στην διάγνωση ή στην παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (90).

1.2.5.6. Κυστεοσκόπηση

Η κλασική κυστεοσκόπηση πραγματοποιείται με την βοήθεια λευκού φωτός. Είναι η εξέταση η οποία θέτει την διάγνωση και κάνει φανερή την νεοπλασματική αλλοίωση. Καταγράφονται η θέση, το μέγεθος, ο αριθμός και η εμφάνιση (θηλωματώδης ή συμπαγής) της αλλοίωσης, όπως καταγράφονται τυχόν επίπεδες αλλοιώσεις του ουροθηλίου. Για την καλύτερη και αντικειμενική καταγραφή χρήσιμη είναι η χρήση ενός διαγράμματος κύστης (91).

1.2.6. Θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως

1.2.6.1. Μη μυοδιηθητικοί όγκοι της ουροδόχου κύστεως

1.2.6.1.1. Διουρηθρική εκτομή

Η διουρηθρική εκτομή του όγκου με την βοήθεια λευκού φωτός είναι ο χρυσός κανόνας στην θεραπεία του μη μυοδιηθητικού καρκίνου της κύστεως. Η πλήρη αφαίρεση των ύποπτων βλαβών και η σωστά διενεργούμενη TURBT είναι ουσιαστικές παράμετροι για την επίτευξη μία καλής πρόγνωσης (92). Η ύπαρξη μυϊκού στα παρασκευάσματα σχετίζεται με την πλήρη αφαίρεσή των επιφανειακών όγκων ενώ η έλλειψή του σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο υπολειμματικής ασθένειας και πρόωμης υποτροπής (93). Το στάδιο παίζει σημαντικό ρόλο στην ύπαρξη υπολειμματικής νόσου. Έχει παρατηρηθεί ότι 33 - 53% των ασθενών με T1 όγκους έχουν υπολειμματική νόσο ενώ το ποσοστό αυτό είναι 41.4% σε TaG3 όγκους (93). Επίσης είναι αυξημένη η πιθανότητα υποσταδιοποίησης. Στους T1 όγκους η πιθανότητα ύπαρξης μυοδιηθητικής νόσου είναι από 4 - 25% (94). Έτσι συστήνεται η πραγματοποίηση δεύτερης διουρηθρικής εκτομής σε διάστημα έως και τριών εβδομάδων μετά την αρχική αντιμετώπιση στις περιπτώσεις που έχουμε είτε T1 όγκο, είτε Grade III όγκο (εκτός του αμιγούς CIS), όταν δεν υπάρχει μυϊκός στο αρχικό παρασκεύασμα (95).

Έχει γίνει προσπάθεια εφαρμογής νέων μεθόδων απεικόνισης κατά την διουρηθρική εκτομή του μη μυοδιηθητικού καρκίνου της κύστεως, ώστε να γίνονται φανερές αλλοιώσεις οι οποίες δεν είναι ορατές με το λευκό φως. Η εισαγωγή της φωτοδυναμικής διάγνωσης, δηλαδή της κυστεοσκόπησης φθορισμού, και η κατευθυνόμενη εκτομή υπό την αναγνώριση της φθορίζουσας ουσίας αρχίζει να κάνει δειλά την εμφάνισή της στην καθ' ημέρα κλινική πράξη. Έχει επιβεβαιωθεί ότι η κυστεοσκόπηση και διουρηθρική εκτομή με την χρήση φθορίζουσας ουσίας και πολωμένου φωτός έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από τη συμβατική κυστεοσκόπηση στην ανίχνευση κακοηθών όγκων, ειδικότερα του καρκινώματος *in situ* (96,97). Κατά την διαδικασία χορηγούμε ενδοκυστικά μία φθορίζουσα ουσία η οποία αθροίζεται κυρίως στα κακοήθη κύτταρα. Μετά από ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, που είναι απαραίτητο για επώαση της ουσίας, πραγματοποιούμε επισκόπηση με την χρήση ειδικού πολωμένου φωτός. Με αυτό τον τρόπο τα καρκινικά κύτταρα γίνονται ορατά λόγω της διεγέρσεως της φθορίζουσας ουσίας από το πολωμένο φως. Περισσότερες λεπτομέρειες υπάρχουν στο κεφάλαιο: **«Φθορισμός, Φωτοδυναμική Διάγνωση και Φωτοδυναμική Θεραπεία στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως»**.

Παρά ταύτα ένα ποσοστό 30%-90% των αρρώστων θα υποτροπιάσει με την εμφάνιση νέου επιφανειακού όγκου μέσα στην ουροδόχο κύστη συνήθως σε άλλα σημεία πλην της αρχικής θέσης ενώ σε ποσοστό 7%-30% θα παρατηρηθεί επιδείνωση της νόσου σε μυοδιηθητικό καρκίνο (70).

1.2.6.1.2. Ενδοκυστικές εγχύσεις

Η ενδοκυστική χημειοθεραπεία μπορεί να είναι είτε προφυλακτική ως συμπληρωματική μιας πλήρους εκτομής ή θεραπευτική σε περιπτώσεις όπου η πλήρης εκτομή των επιφανειακών όγκων δεν είναι εφικτή, συνήθως σε καρκίνωμα *in situ*. Ανοσοδιεγερτικοί παράγοντες (Bacillus Calmette-Guerin φάρμακο εκλογής για την αντιμετώπιση του καρκινώματος (91)) - και χημειοθεραπευτικοί παράγοντες (Μιτομικίνη C, Thiotepa, Δοξορουμπικίνη) εγχέονται με την βοήθεια καθετήρα στην κύστη, αποφεύγοντας με αυτόν τον τρόπο την αυξημένη νοσηρότητα που συνεπάγεται η συστηματική (p.os.) χορήγηση αυτών (98).

Στην πράξη η ενδοκυστική θεραπεία προσφέρει ένα μέτριο συγκριτικό αποτέλεσμα 14% για 1-3 χρόνια (97). Μια μετα-ανάλυση ελεγχόμενων κλινικών δοκιμών έδειξε ότι το μέσο ποσοστό επιδείνωσης σε μυοδιηθητικό καρκίνο σε αυτούς που χορηγήθηκε ενδοκυστική χημειοθεραπεία ήταν 7,5% σε σύγκριση με 6,9% της ομάδας ελέγχου (99). Η ενδοκυστική χημειοθεραπεία είναι επίσης μέτρια ωφέλιμη στις περιπτώσεις ατελούς εκτομής καρκινώματος *in situ* με ποσοστά πλήρους ανταπόκρισης 38%-53% (100).

Το BCG είναι προς το παρόν ο πλέον αποτελεσματικός παράγοντας για την ενδοκυστική χημειοθεραπεία. Μια αρχική σειρά ενδοκυστικής ανοσοθεραπείας με BCG έχει θετική ανταπόκριση σε 31%-88% των περιπτώσεων καρκινώματος *in situ* (98). Το 39%-58% των υποτροπών μετά την αρχική θεραπεία BCG θα ανταποκριθεί σε δεύτερη σειρά εγχύσεων με BCG (101) Δυστυχώς το ποσοστό θετικής ανταπόκρισης στη θεραπεία των υποτροπών είναι μόνο 30% με το ίδιο ή διαφορετικό φάρμακο ενδοκυστικά (101). Από αυτά είναι φανερό ότι το επιφανειακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως είναι χρόνια νόσος η οποία είναι δυνατόν να βρίσκεται σε συνεχή καταστολή με ενδιάμεσα αποτελεσματικά θεραπευτικά σχήματα. Φαίνεται λοιπόν πως είναι απαραίτητα πλέον αποτελεσματικά μέσα για την αντιμετώπιση του επιφανειακού καρκίνου της ουροδόχου κύστεως.

1.2.6.2. Διηθητικοί όγκοι της ουροδόχου κύστεως

Αυτοί αντιμετωπίζονται με Ριζική κυστεκτομή. Πρόκειται για ασθενείς σταδίου T2 – T4a, N0 – Nx, M0 (102). Συνοδεύεται από εκτεταμένο λεμφαδενικό καθαρισμό (103,104). Η ταυτόχρονη εκτροπή των ούρων γίνεται με διάφορους τρόπους όπως:

Πίνακας 5. Βασικές θεραπευτικές επιλογές του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως κατά στάδιο

Κλινικό στάδιο	Βασικές Θεραπευτικές Επιλογές
TIS	Πλήρης διουρηθρική εκτομή με συνακόλουθες ενδοκυστικές εγχύσεις BCG
TaGr1, μονήρες	Πλήρης διουρηθρική εκτομή, παρακολούθηση
Ta (μεγάλος, πολ/πλοί υψηλού Grade, ή υποτροπιάζον) ή T1	Πλήρης διουρηθρική εκτομή με συνακόλουθες ενδοκυστικές εγχύσεις με χήμειο- ή ανοσοθεραπεία
T2 – T4	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ριζική κυστεκτομή 2. Εισαγωγική (neoadjuvant) χημειοθεραπεία ακολουθούμενη από ριζική κυστεκτομή 3. Ριζική κυστεκτομή ακολουθούμενη από επικουρική (adjuvant) χημειοθεραπεία 4. Εισαγωγική (neoadjuvant) χημειοθεραπεία ακολουθούμενη από σύγχρονη χημειο- θεραπεία και ακτινοβολία
Οποιοδήποτε T, N+, M+	Συστηματική χημειοθεραπεία ακολουθούμενη με χειρουργική θεραπεία εκλογής ή ακτινοβολία

ουρητηροστομία, conduit ειλεού, εγκρατής νεοκύστη, εκτροπή ούρων στο σιγμοειδές και ορθότοπη νεοκύστη (105). Ο τύπος της εκτροπής των ούρων δεν επηρεάζει το ογκολογικό αποτέλεσμα. Άλλες ενδείξεις αποτελούν ασθενείς με υποτροπιάζοντες επιφανειακούς όγκους υψηλού κακοήθους δυναμικού που δεν ανταποκρίνονται στις ενδοκυστικές εγχύσεις BCG όπως Tis, TaG3 (106).

Η ακτινοθεραπεία αποτελεί εναλλακτική της ριζικής κυστεκτομής μορφή θεραπείας για διηθητικούς όγκους κυρίως σε ασθενείς που η χειρουργική θεραπεία αντενδείκνυται. Η 5ετής επιβίωση για στάδια T2-T3 είναι 18 – 41% (107).

Η χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται κυρίως στον προχωρημένο καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (T>3, N>0, M>0) ή ως εισαγωγική θεραπεία (neoadjuvant). Κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται η σισπλατίνη (ως μονοθεραπεία) ενώ άλλες ουσίες όπως η μεθοτρεξάτη, η δοξορουμπικίνη, η βινμπλαστίνη, η κυκλοφωσφαμίδη και η 5-φλοουρακίλη χρησιμοποιούνται σε συνδυασμένη θεραπεία με σισπλατίνη. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται συνοπτικά οι βασικές θεραπευτικές επιλογές στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως.

Πίνακας 6. Διαβάθμιση ομάδων κινδύνου για υποτροπή και επιδείνωση του μη μωδοδιηθητικού ουροθηλιακού καρκίνου (110)

Διαβάθμιση των ομάδων κινδύνου	Κλινικά χαρακτηριστικά
Χαμηλού κινδύνου όγκοι	Πρωτοπαθής, μονήρης, Ta,G1 (low grade), < 3 cm, χωρίς CIS
Ενδιάμεσου κινδύνου όγκοι	Όλοι οι όγκοι που δεν περιλαμβάνονται στους όγκους χαμηλού ή υψηλού κινδύνου
Υψηλού κινδύνου	Οποιοδήποτε από τα ακόλουθα: <ul style="list-style-type: none"> • T1 όγκος • G3 (high grade) όγκος • CIS • Πολ/πλοι και υποτροπιάζοντες και μεγάλοι > 3cm TaG1/G2 όγκοι

1.2.7. Προγνωστικοί παράγοντες

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως είναι μία νοσολογική οντότητα που μεταβάλλεται στον χώρο (διαφορετικά σημεία υποτροπής) και στη συμπεριφορά (επιθετικότητα, επιδείνωση). Το κρίσιμο σημείο είναι να προβλέψουμε ποιοι ασθενείς θα υποτροπιάσουν και θα επιδεινωθούν ώστε να παρέμβουμε αποτελεσματικά. Έτσι δημιουργήθηκαν πίνακες όπου τοποθετούμε τα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, αν είναι πρώτη διάγνωση ή

υποτροπή και το διάστημα της υποτροπής. Οι τιμές που προκύπτουν μας βοηθούν στη προσαρμογή του θεραπευτικού μας πλαισίου. Με βάση το άθροισμα οι ασθενείς αυτοί κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες, χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου (Πίνακας 6). Στους μυοδιηθητικούς όγκους σημαντικό ρόλο παίζει η έκταση διήθησης του εξωστήρα (103), το στάδιο (108) και το διάστημα έως την επέμβαση (109).

1.2.8. Πρόληψη του καρκίνου της ουροδόχου κύστης

Ένα πρόγραμμα για την επίτευξη μείωσης της επίπτωσης, της νοσηρότητας και της θνητότητας του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως θα πρέπει να είναι μέρος των μελλοντικών σχεδίων όλων των Ουρολογικών Εταιρειών καθώς και των κυβερνητικών παραγόντων. Η επίπτωση μίας ασθένειας μπορεί να μειωθεί μέσω της πρόληψης.

Υπάρχουν τρεις στρατηγικές για την επίτευξη πρόληψης του καρκίνου: η πρωτογενής, η δευτερογενής και η τριτογενής.

Η πρωτογενής πρόληψη εμπλέκει παρεμβάσεις που είναι έτσι σχεδιασμένες ώστε να βοηθούν υγιή άτομα να προλαμβάνουν την ανάπτυξη μίας στοχευμένης νόσου.

Η δευτερογενής πρόληψη είναι σχεδιασμένη να παρέχει θεραπεία για προκαρκινικές αλλοιώσεις με στόχο την πρόληψη επιδείνωσης αυτών σε καρκίνο.

Η τριτογενής πρόληψη παρέχεται σε ασθενείς με ιστορικό καρκίνου, ο οποίος έχει αντιμετωπιστεί θεραπευτικά, με στόχο την αποφυγή ανάπτυξης δευτεροπαθών εστιών.

Η πιο ελκυστική στρατηγική είναι η πρωτογενής πρόληψη γιατί **«προλαμβάνει ει κρίτων θεραπεύει»**, αλλά είναι και η πιο δύσκολα εφαρμόσιμη. Η μείωση της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου της κύστεως μπορεί να γίνει μέσω της μείωσης της έκθεσης σε γνωστά καρκινογόνα καθώς και χορήγηση και λήψη φαρμακευτικών ουσιών, διατροφικών συμπληρωμάτων ή τροφών τα οποία αποτελούν ή εμπεριέχουν ουσίες η οποίες έχουν αντικαρκινική δράση.

1.2.8.1. Μείωση της έκθεσης σε γνωστά καρκινογόνα

Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω διακοπής του καπνίσματος ειδικότερα, και γενικότερα μέσω μείωσης της επαγγελματικής και περιβαλλοντικής έκθεσης. Καπνιστές οι οποίοι έχουν ήδη διαγνωσθεί με καρκίνο ουροδόχου κύστεως επωφελούνται από την διακοπή του

καπνίσματος. Πολλαπλές μελέτες έχουν δείξει μείωση τόσο της καρκινικής υποτροπής όσο και αύξηση του χρόνου επιδείνωσης της νόσου σε μυοδιηθητικό καρκίνο σε καπνιστές με καρκίνο της κύστεως οι οποίοι διακόπτουν την λήψη προϊόντων καπνού (111, 112). Μετά την διακοπή του καπνίσματος ο κίνδυνος ανάπτυξης ουροθηλιακού καρκίνου πέφτει κατά 30% σε 1-4 έτη και κατά 60% μετά την 25ετία χωρίς να επιστρέφει στα επίπεδα των μη καπνιζόντων (25).

Στην επαγγελματική έκθεση αποδίδονται περίπου 20% των καρκίνων της κύστεως στις ΗΠΑ με λανθάνουσα περίοδο μεταξύ έκθεσης και κλινικής εμφάνισης από 30 έως και 50 έτη (113, 114). Γίνεται προσπάθεια για ενημέρωση και μείωση της έκθεσης των εργαζομένων με λήψη συγκεκριμένων προστατευτικών μέτρων στον χώρο εργασίας.

Η σχέση της περιβαλλοντολογικής έκθεσης, όσον αφορά τον καρκίνο της ουροδόχου, είναι διφορούμενη. Κάποιες αντικρουόμενες ενδείξεις υπάρχουν για το Αρσενικό (115, 116) και τα νιτρώδη (20, 117).

1.2.8.2. Χημειοπροφύλαξη για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης

Ο όρος χημειοπροφύλαξη (chemoprevention) σημαίνει την παύση της εμφάνισης της ασθένειας. Αυτή μπορεί να επιτευχθεί είτε με την χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών, συμπληρωμάτων διατροφής, ιχνοστοιχεία, φρούτα και λαχανικά. Τα τελευταία μπορούν να χορηγηθούν ωμά, παρασκευασμένα ή σε μορφή εκχυλίσματος. Η χρήση λήψης βιοδραστικών συστατικών, μέσω της διατροφής, για την πρόληψη του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως είναι εύλογη διότι οι περισσότερες ουσίες ή μεταβολίτες απεκκρίνονται μέσω της ουροφόρου οδού και κατά συνέπεια έρχονται απευθείας σε επαφή με το ουροθήλιο της κύστεως. Ένας σπουδαίος παράγοντας είναι ο προσδιορισμός του πληθυσμού που υπόκεινται σε κίνδυνο. Δεν υπάρχει λόγος να υποβάλλεσαι σε προφύλαξη για κάτι για το οποίο είναι απίθανο να νοσήσεις.

Στην χημειοπροφύλαξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως έχουν μελετηθεί η αυξημένη λήψη υγρών, οι βιταμίνες, τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, το πράσινο τσάι, τα φρούτα και τα λαχανικά.

Ως διαιτητική τροποποίηση η αύξηση λήψης υγρών έχει ως σκεπτικό την αύξηση του αποβαλλόμενου όγκου ούρων μειώνοντας το χρονικό διάστημα επαφής των

καρκινογόνων με το ουροθήλιο καθώς και μέσω της αραίωσης, πετυχαίνοντας μείωση της συγκέντρωσης τους. Η αντίστροφη σχέση αύξησης της λήψης υγρών και εμφάνισης του καρκίνου της κύστης έχει τεκμηριωθεί σε πρόσφατη μελέτη. Άνδρες που λάμβαναν περισσότερα από 2.351 ml/ημέρα είχαν περίπου τον μισό κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου σε σχέση με αυτούς που κατανάλωναν 1.290 ml/ ημέρα (35). Το νερό ήταν το μόνο αφέψημα που σχετίζονταν με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Για γίνουν όμως τελικές συστάσεις όσον αφορά την αυξημένη λήψη υγρών και ποιων υγρών, θα πρέπει να γίνουν διεξοδικότερες και περισσότερες έρευνες.

Ασθενείς που λάμβαναν υψηλές δόσεις βιταμινών A, B6, C, E και ψευδάργυρο είχαν μεγαλύτερο διάστημα υποτροπής σε σχέση με αυτούς που έπαιρναν κανονικές δόσεις ($p=0.0014$). Τα ποσοστά μεταξύ των δύο ομάδων ήταν πανομοιότυπα στους πρώτους 9 μήνες και κατόπιν διαχωρίστηκαν σε πολύ μεγάλο βαθμό. Πιθανολογήθηκε ότι οι υψηλές δόσεις προλάμβαναν την ανάπτυξη δευτερογενούς όγκου ή εμπόδιζαν την ανάπτυξη μικροσκοπικών ή την επιδείνωση προκαρκινωματώδων αλλοιώσεων (118). Σε άλλη μελέτη η μέγιστη δράση τους εμφανιζόταν σε μη καπνιστές (119). Η βιταμίνη E φαίνεται ότι αυξάνει την λειτουργία του ανοσοποιητικού, μειώνει τη σύνθεση DNA, ευοδώνει την απόπτωση και καταστέλλει την αύξηση των καρκινικών κυττάρων (120). Η βιταμίνη A εμφανίζει αλληλοσυγκρουόμενα στοιχεία. Μείωση της εμφάνισης καρκίνου σε πειραματικά μοντέλα *in vivo* (121) αλλά συσχέτιση με την εμφάνιση καρκίνου σε ανθρώπους (122).

Χρόνια χρήση ΜΣΑΦ σχετίζεται με μείωση 20% του καρκίνου της κύστεως, με μεγαλύτερη δράση των ουσιών που εμπεριέχουν οξικό οξύ όπως η ινδομεθακίνη και η σουλινδάκη (123). Υπάρχουν δεδομένα ότι η χρήση τους αυξάνει τα καρδιαγγειακά συμβάματα (124), οπότε μετριάζεται κατά πολύ το ενδιαφέρον για την προφυλακτική τους χορήγηση.

Η επίπτωση του καρκίνου είναι πολύ μικρότερη σε χώρες που καταναλώνουν τσάι από ότι στις ΗΠΑ και στην Δυτική Ευρώπη. Μελέτες αναδεικνύουν την αντίστροφη σχέση της πόσης τσαγιού και καρκίνου κύστεως (125). Το τσάι περιέχει πολυφαινόλες. Μελέτες σε ανθρώπους επιβεβαίωσαν ότι οι πολυφαινόλες παρεμβαίνουν στην καρκινογένεση μειώνοντας την παραγωγή νιτρωδών και την χρωμοσωμική βλάβη (126).

Μία μέτα-ανάλυση παρουσίασε τον μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου κύστεως σε δίαιτα με υψηλή πρόσληψη φρούτων και λαχανικών (121). Παρόμοια αποτελέσματα εμφάνισε μία προοπτική μελέτη 39000 Ιαπώνων επιζώντων των ατομικών βομβών, όπου αναδείχθηκε η μείωση της πιθανότητας κατά 50% καταναλώνοντας πράσινων και κίτρινων λαχανικών (127). Περαιτέρω ανάλυση αυτών των μελετών δείχνει μεγαλύτερη προστατευτική δράση των λαχανικών έναντι των φρούτων, ενώ φαίνεται να έχουν την μεγαλύτερη επίδραση σε μη καπνιστές.

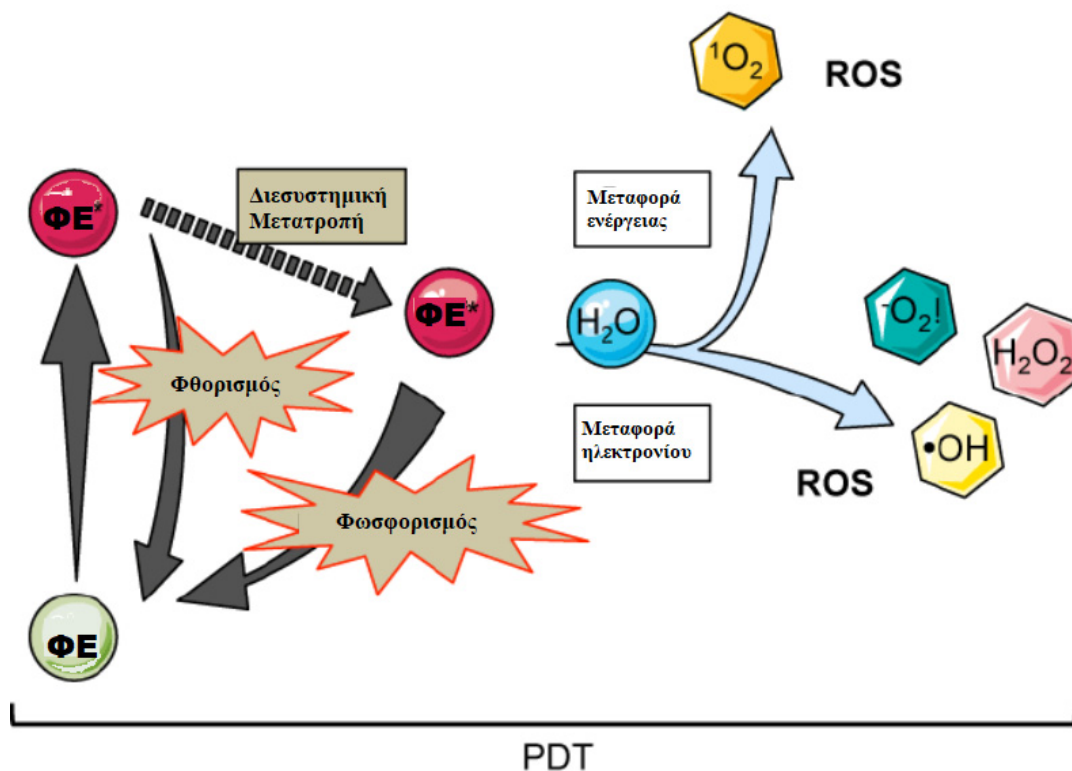
Υπάρχει μία επείγουσα ανάγκη για την έρευνα των διαιτητικών φυτοχημικών. Αυτά τα χημικά μπορεί να είναι χρήσιμα πρόσθετα στην πρόληψη της υποτροπής, διακόπτοντας την καρκινογένεση μέσω αλληλεπίδρασης γονιδίων – θρεπτικών συστατικών ή αντιοξειδωτικών μονοπατιών. Η κατανόησή μας για τον ρόλο της διατροφής στην ανάπτυξη και διαδρομή του καρκίνου της κύστεως διευρύνεται ραγδαία. Όσο εξαπλώνεται η έρευνα και γίνεται πιο εξειδικευμένη θα μπορέσουμε να μεταβούμε από την αναγνώριση και εστίαση από συγκεκριμένα τρόφιμα και γενικά διαιτητικά μοτίβα σε ειδικά ιχνοστοιχεία.

1.2.9. Φθορισμός, Φωτοδυναμική Διάγνωση και Φωτοδυναμική Θεραπεία στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως

1.2.9.1. Ο μηχανισμός φωτοδυναμικής θεραπείας

Ο μοριακός μηχανισμός της φωτοδυναμικής θεραπείας βασίζεται σε τρία μη τοξικά συστατικά τα οποία παράγουν τα επιθυμητά φαινόμενα στους παθολογικούς ιστούς μόνο με αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους:

- Τον φωτοευαισθητοποιητή (ΦΕ)
- Φως με κατάλληλο μήκος κύματος
- Το οξυγόνο που υπάρχει διαλυτό στα κύτταρα (128)



Σχήμα 3 Μηχανισμός της Φωτοδυναμικής Αντίδρασης. Τροποποιημένο από τους (129, 130)

Υπάρχουν δύο κύριοι μηχανισμοί της φωτοδυναμικής αντίδρασης. Και οι δύο σχετίζονται στενά με τα μόρια οξυγόνου μέσα στα κύτταρα. Το πρώτο στάδιο και των δύο μηχανισμών είναι παρόμοιο. Ένας φωτοευαισθητοποιητής, αφού εισέλθει στο κύτταρο, ακτινοβολείται με φως μήκους κύματος που συμπίπτει με το φάσμα απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή και μεταπίπτει από την μονήρη ηλεκτρονιακή κατάσταση S_0 στην διεγερμένη μονήρη κατάσταση S_1 εξαιτίας της απορρόφησης πρωτονίου. Μέρος της ενέργειας εκπέμπεται με την μορφή κβαντικού φθορισμού και η εναπομείνουσα ενέργεια κατευθύνει το μόριο του φωτοευαισθητοποιητή στην διεγερμένη τριπλή κατάσταση T_1 την κατάλληλη θεραπευτική μορφή της ένωσης. Εικόνα 1 (129, 130).

- **Τύπος I μηχανισμός της φωτοδυναμικής αντίδρασης:**

Στην διεγερμένη τριπλή κατάσταση T_1 ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί να μεταφέρει ενέργεια στα βιομόρια. Μεταξύ του φωτοευαισθητοποιητή στο στάδιο T_1 και του καρκινικού ιστού (υπόστρωμα) μεταφέρεται ένα υδρογόνο ή ένα ηλεκτρόνιο, το οποίο οδηγεί στην δημιουργία ελεύθερων ριζών και ριζών ανιόντων του ΦE και του

υποστρώματος. Τα ηλεκτρόνια αλληλοεπιδρούν με μόρια οξυγόνου, τα οποία παραμένουν στην βασική τους ενεργειακή κατάσταση. Αυτή η διαδικασία οδηγεί στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species (ROS)), αρχικά με την μορφή της ελεύθερης ρίζας ανιόντος του υπεροξειδίου του οξυγόνου (superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$)), το οποίο παράγει επιπλέον δραστικές μορφές οξυγόνου μέσα στα κύτταρα. Η προκαλούμενη αλληλουχία αντιδράσεων που εισάγεται έτσι οδηγεί σε οξειδωτικό στρες που έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων (131, 132).

- **Τύπος II του μηχανισμού της φωτοδυναμικής δράσης:**

Ως αποτέλεσμα της μετάπτωσης του φωτοευαισθητοποιητή στο διεγερμένο τριπλό στάδιο, η ενέργεια μεταφέρεται απευθείας στα μόρια οξυγόνου στο βασικό στάδιο ενέργειας (το βασικό τριπλό στάδιο). Άμεση μεταφορά ενέργειας μεταξύ των μορίων ($\Phi E \rightarrow O_2$) είναι δυνατόν γιατί έχουν την ίδια φορά περιστροφής. Με αυτό τον τρόπο διεγερμένα μόρια οξυγόνου, τα επονομαζόμενα και μονήρη οξυγόνα (singlet oxygen), δημιουργούνται, τα οποία χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά ισχυρές οξειδωτικές ιδιότητες (131, 133).

Οι πιο πολλές οργανικές ενώσεις βρίσκονται στην μονήρη βασική κατάσταση. Παρόλα αυτά τα μόρια οξυγόνου χαρακτηρίζονται από το τριπλό τους στάδιο (ως κατάσταση ηρεμίας) και διεγείρονται στην μονήρη κατάσταση. Λόγω αυτού του δεδομένου, τα διεγερμένα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή δεν προκαλούν βλάβη στις κυτταρικές δομές και αντιδρούν μόνο με τα μόρια οξυγόνου τα οποία είναι διαλυμένα στο κυτταρόπλασμα (134).

Πιθανολογείται ότι ο μηχανισμός τύπου II είναι η πιο σπουδαία διαδικασία που ρυθμίζει την αποτελεσματικότητα της ΦΔΘ. Παρόλα αυτά ο βαθμός που συνεισφέρουν και οι δύο μηχανισμοί εξαρτάται από πολλούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου: την συγκέντρωση του οξυγόνου, την διηλεκτρική σταθερά του ιστού, το pH και η δομή του φωτοευαισθητοποιητή. Από τη στιγμή που υπάρχει ένδεια οξυγόνου αρχίζει να κυριαρχεί ο τύπος I (130).

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου προκαλούν την φωτοδυναμική βλάβη των πρωτεϊνών, λιπαρών οξέων και άλλων μορίων της περιοχής. Αυτό οδηγεί σε άμεσο θάνατο

των καρκινικών κυττάρων με την διαδικασία της απόπτωσης και/ή της νέκρωσης (135). Η αμοιβαία συνεισφορά των διαφορετικών ειδών του κυτταρικού θανάτου εξαρτάται από την ενδοκυττάρια εντόπιση του φωτοευαισθητοποιητή. Η βλάβη στα μιτοχόνδρια μπορεί να οδηγήσει στην απόπτωση, η καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης και απώλεια της ακεραιότητάς της οδηγεί σε νέκρωση, και η βλάβη των λυσοσωμάτων ή ενδοπλασματικού δικτύου μπορεί να προκαλέσει αυτοφαγία (136-138).

1.2.9.2. Φωτοδυναμική διάγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως

1.2.9.2.1. Φωτοδυναμική δράση – Φωτοδυναμική διάγνωση

Ο όρος «φωτοδυναμική δράση» (*photodynamische Wirkung*) εισήχθηκε το 1904 από έναν από τους πρωτοπόρους της φωτοβιολογίας, τον Hermann von Tarpeiner καθηγητή στο Ludwig-Maximilians πανεπιστήμιο του Μονάχο (139). Ο όρος «δυναμικός» δεν είναι γνωστό με ποιο σκεπτικό ορίστηκε. Ο ίδιος δεν ήταν ευχαριστημένος. Στον πρόλογο του βιβλίου του *Die Sensibilisierende Wirkung Fluoreszierender Substanzen* «εάν και κατά πόσο θα χρησιμοποιηθεί αυτός ο όρος στο μέλλον μένει στην διακριτική ευχέρεια των συναδέλφων μου» (140). Σήμερα ο όρος φωτοδυναμική χρησιμοποιείται στην χρήση φωτοευαισθητοποιητών και διέγερσή τους από λευκό φως, πολωμένο φως ή λέιζερ σε βιολογικές εφαρμογές που αφορούν είτε την διάγνωση (φθορισμός) είτε την θεραπεία (πρόκληση ιστικής βλάβης μέσω φωτοευαισθητοποίησης Τύπου I & II).

Η επιλεκτική πρόσληψη του φωτοευαισθητοποιητή πιθανώς να μην οφείλεται σε κάποιες ειδικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων (141) αλλά μάλλον στις διαφορές στην φυσιολογία μεταξύ των φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων:

1. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν:
 - a. Μεγαλύτερο ενδοϊστικό όγκο από τους φυσιολογικούς ιστούς
 - b. Πολλούς υποδοχείς για λιποπρωτεΐνες
2. Ο όγκος φυσιολογικά περιέχει μεγαλύτερο ποσοστό μακροφάγων από τον φυσιολογικό ιστό
3. Οι όγκοι έχουν διάτρητη μικροαγγείωση
4. Οι όγκοι έχουν πτωχή λεμφική παροχέτευση
5. Το εξωκυττάριο pH είναι χαμηλό στους όγκους
6. Οι όγκοι περιέχουν ένα σχετικά μεγάλο ποσό νεόδητου κολλαγόνου

Η φωτοδυναμική διάγνωση (Photodynamic Diagnosis PDD) εκμεταλλεύεται την φωτοενεργή φύση μιας συγκεκριμένης ουσίας με σκοπό να αυξήσει την οπτική οριοθέτηση ανάμεσα του φυσιολογικού και του νεοπλαστικού ιστού. Αυτοί οι παράγοντες αθροίζονται κατά προτίμηση στους νεοπλαστικούς ιστούς και όταν φωτίζονται με φως κατάλληλου μήκους κύματος φθορίζουν, εκπέμποντας φως μήκους κύματος στο ορατό φως, με αποτέλεσμα να γίνονται οπτικά αντιληπτοί οι ύποπτοι για κακοήθεια ιστοί χωρίς να υπάρχει η ανάγκη επεξεργασίας της εικόνας από ειδικές συσκευές (142).

1.2.9.2.2. Κυστεοσκόπηση φθορισμού στον μη μυοδιηθητικό ουροθηλιακό καρκίνο της ουροδόχου κύστης

Η ανάγκη για ακριβή διάγνωση, συνεχόμενη παρακολούθηση και πιθανώς επαναλαμβανόμενες θεραπευτικές παρεμβάσεις για τον μη μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, μαζί με την επιθετική θεραπευτική προσέγγιση της διηθητικής νόσου καταναλώνει σημαντικό ποσοστό των πόρων σε όρους της συνολικής θεραπευτικής δαπάνης. Σε όρους συνολικής δαπάνης υγείας είναι ο πέμπτος πιο ακριβός καρκίνος, αναλίσκοντας το ποσό των 4 δις δολαρίων στις ΗΠΑ. Το ποσό που δαπανάτε εκτιμάτε από 96000 \$ έως 187000\$ ανά ασθενή. Αυτό οφείλεται στην μακροχρόνια επιβίωση των ασθενών αυτών και στην αναγκαιότητα για τακτική παρακολούθηση και θεραπευτική αντιμετώπιση δια βίου (112).

Η πρώιμη διάγνωση και θεραπευτική αντιμετώπιση των όγκων είναι θεμελιώδους σημασίας για την αντιμετώπιση της νόσου. Τα υψηλά ποσοστά υποτροπής και επιδείνωσης της νόσου αποτελούν ένα σημαντικό ιατρικό πρόβλημα. Το ερώτημα που τίθεται σε κάθε υποτροπή είναι αν αυτή είναι αλλοίωση την οποία δεν την διακρίναμε κατά την προηγούμενη θεραπευτική παρέμβαση και την παραβλέψαμε ή είναι νέα. Αν είναι καινούργια θεωρούμε πως ο καρκίνος έχει επιθετική συμπεριφορά οπότε οι θεραπευτικοί μας χειρισμοί είναι επιθετικοί ενώ αν πρόκειται για υπολειμματικό αρχικό όγκο η διουρηθρική και μόνο εκτομή του αρκεί.

Η συνήθης διαγνωστική προσέγγιση είναι κυστεοσκόπηση λευκού φωτός, βιοψία και κυτταρολογικές ούρων. Η κυτταρολογική ούρων έχει ικανοποιητική ικανότητα να ανιχνεύει καρκίνους υψηλού βαθμού κακοήθειας ενώ η ευαισθησία της είναι χαμηλή στην ανίχνευση καρκίνων χαμηλού βαθμού κακοήθειας δίνοντας έτσι ψευδώς αρνητικά

αποτελέσματα. Για αυτό το λόγο η μέθοδος για την ανίχνευση του καρκίνου κύστεως είναι η κυστεοσκόπηση λευκού φωτός. Παρόλο που μπορεί να διακρίνει θηλωματώδεις αλλοιώσεις η ικανότητά της να ανιχνεύει CIS είναι περιορισμένη. Εξαιτίας του γεγονότος ότι το χρονικό περιθώριο που μπορούμε να επέμβουμε αποτελεσματικά στον CIS είναι μικρό, η πρόωμη ανίχνευση και η ακριβή εκτίμηση, ακολουθούμενη από στενή τακτική παρακολούθηση, είναι πρωτεύουσας σημασίας.

Το 5 – αμινολεβουλονικό οξύ (5 – ALA) παρουσιάστηκε την δεκαετία του '90 ως ένας πολλά υποσχόμενος φωτοευαισθητοποιητής. Το 5 – ALA είναι μια πρόδρομη ουσία στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της αίμης. Ενδοκυττάρια αθροίζεται ως ενδογενής πρωτοπορφυρίνη IX (PpIX) όταν χορηγείται εξωγενώς (ενδοκυστικά) σε μεγάλες ποσότητες. Η PpIX συγκεντρώνεται έως και 10 φορές περισσότερο στον όγκο από ότι στα φυσιολογικά κύτταρα. Η ουσία είναι ένας φωτοευαισθητοποιητής, φθορίζει μετά την διέγερση με φως ειδικού μήκους κύματος, στην συγκεκριμένη περίπτωση με την χρήση του μπλε φωτός το οποίο απορροφά ανακλώντας έτσι κόκκινο φως. Η πάσχουσα περιοχή γίνεται εμφανής ως εξέρυθρη περιοχή κατά την κυστεοσκόπηση φθορισμού (143, 144). Έχει αποδειχθεί με κλινικές μελέτες ότι η ικανότητα της κυστεοσκόπησης φθορισμού με την χρήση μπλε φωτός εμφανίζει στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση όγκων της ουροδόχου κύστεως διατηρώντας τουλάχιστον παρόμοια επίπεδα ειδικότητας (145).

Εμπόδιο στην επικράτηση της κυστεοσκόπησης φθορισμού με 5 – ALA ως διαγνωστικό εργαλείο ήταν μικρή πρόσληψή του λόγω της σχετικής αδιαπερατότητας για φορτισμένα μόρια της διπλής λιποειδικής κυτταρικής μεμβράνης. Μελέτες έδειξαν ότι αν εστεροποιηθεί μία ουσία αποκτά μεγαλύτερες λιποφιλικές ιδιότητες και έτσι βελτιώνεται σημαντικά η ικανότητά της να διεισδύει σε βιολογικές μεμβράνες *in vitro* και *in vivo* (145, 146). Με βάση αυτό το σκεπτικό δημιουργήθηκε ο εξυλαμινολεβουλονικός εστέρας (HAL – HexVixTM). Είναι πιο ικανός από το 5-ALA έχοντας καλύτερη εκλεκτικότητα, με φωτεινότερο φθορισμό, ενώ χρειάζεται και μικρότερους χρόνους ενδοκυστικής παραμονής (144). Συγκρινόμενο με το 5-ALA η ιδανική του συγκέντρωση είναι 45 φορές πιο μικρή και παράγει 2.5 φορές μεγαλύτερη ένταση φθορισμού (δηλ. συγκέντρωση PpIX). Κλινικά αυτό σημαίνει ότι χορηγούμε 20 φορές μικρότερη συγκέντρωση HLA παράγοντας διπλάσια ένταση φθορισμό. Η συνιστώμενη ενδοκυστική παραμονή της ουσίας για

επίτευξη πρόσληψής από τα καρκινικά κύτταρα είναι μόνο μία ώρα έναντι τριών ωρών του 5-ALA. Τα παραπάνω αποτελούν σημαντικές βελτιώσεις σε ότι αφορά την κλινική διαχείριση των ασθενών.

Τρεις πολυκεντρικές κλινικές μελέτες φάσης III που πραγματοποιήθηκαν σε ΗΠΑ και Καναδά (147) και δύο στην Ευρώπη (144, 148) έχουν αποδείξει την υπεροχή της κυστεοσκόπησης φθορισμού στην διάγνωση και παρακολούθηση του καρκίνου της κύστεως έναντι της κυστεοσκόπησης λευκού φωτός. Βάση αυτών των μελετών το HAL πήρε έγκριση ως διαγνωστικό εργαλείο του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως σε 26 Ευρωπαϊκές χώρες μέσω του European Mutual Recognition Procedure (MRP) τον Μάρτιο του 2005. Η Ευρωπαϊκή Ουρολογική Εταιρεία (European Urology Association) το συμπεριέλαβε στις κατευθυντήριες οδηγίες της για την διάγνωση του CIS (62).

1.2.9.3. Φωτοδυναμική θεραπεία

1.2.9.3.1. Εισαγωγή

Ως φωτοδυναμική θεραπεία (Photodynamic Therapy (PDT)) μπορεί να οριστεί η διαδικασία κατά την οποία χορηγείται ένα μη τοξικό φάρμακο ή χρώση, το οποίο ονομάζεται φωτοευαισθητοποιητής, είτε συστηματικά, είτε τοπικά ή εστιακά, σε ασθενή που φέρει αλλοιώσεις (όχι απαραίτητα καρκίνο), και ακολουθείται, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, από την φωταγώγηση με φως. Αυτό οδηγεί στην παραγωγή κυτταροτοξικών χημικών ειδών και στη συνέχεια στην καταστροφή των κυττάρων που έχουν προσλάβει τον φωτοευαισθητοποιητή.

Κατά τον Blum (149) ο όρος φωτοδυναμική θεραπεία θα πρέπει να αποδίδεται μόνο σε φωτοχημικές αντιδράσεις κατά τις οποίες καταναλώνεται οξυγόνο. Τέτοιες αντιδράσεις ονομάζονται φωτοευαισθητοποιές διαδικασίες τύπου I και τύπου II, ανάλογα της φύσης των αντιδράσεων. Συνοπτικά εάν δημιουργούνται ενδιάμεσες ουσίες μεταφοράς ενέργειας (ελεύθερες ρίζες λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων ή ατόμων υδρογόνου), όπου δεν απαιτείται οξυγόνο, και οι οποίες στην συνέχεια αντιδρούν με το διαθέσιμο ιστικό οξυγόνο δημιουργώντας υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και ρίζα υδροξυλίου (OH^\cdot) ονομάζονται τύπου I αντιδράσεις, είτε είναι αναγκαίο από την αρχή το οξυγόνου και έχουμε σχηματισμό ανιόντος υπεροξειδίου O_2^- ($^1\Delta$) τύπου II αντιδράσεις. Το τελευταίο έχει βραχεία διάρκεια ημίσειας ζωής (<0.04 microsecond) και γι' αυτό έχει μικρή ακτίνα δράσης (<0.02 μm) (150).

1.2.9.4. Έναρξη της σύγχρονης εποχής της φωτοδυναμικής

Αυτή ξεκινά με τις μελέτες του S. Schwartz και R. L. Lipson στην κλινική Mayo το 1960 οι οποίοι παρατήρησαν ότι η ενδοφλέβια έγχυση ακατέργαστου δείγματος αιματοπορφυρίνης είχε ως αποτέλεσμα τον φθορισμό νεοπλασματικών βλαβών κατά την επέμβαση. Η επανάσταση πραγματοποιείται την δεκαετία του 1970 από τις προσπάθειες του Dr Thomas Dougherty και της ομάδας του στο Roswell Park Cancer Institute στο Buffalo, NY. Αυτοί εισήγαγαν ένα υδατοδιαλυτό μείγμα πορφυρινών το οποίο ονομάστηκε «παράγωγο αιματοπορφυρίνης» (haematoporphyrin derivative (HpD)). Περαιτέρω επεξεργασία του δείγματος ώστε να συμπεριλαμβάνονται μόνο οι πολύ ενεργείς πορφυρίνες οδήγησε στην δημιουργία του Photofrin® (151) του πιο ευρέως χρησιμοποιούμενου φωτοευαισθητοποιητή στην κλινική PDT.

Επειδή όμως το συγκεκριμένο αποτελείται από μείγμα ουσιών, στην προσπάθεια για καλύτερη απόδοση της φωτοευαισθητοποιητών, και κατ' επέκταση της φωτοδυναμικής, δημιουργήθηκαν νέοι φωτοευαισθητοποιητές, οι οποίες είναι καθαρές ουσίες, με καλύτερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (152, 153).

1.2.9.5. Ιδανικός φωτοευαισθητοποιητής

Ο φωτοευαισθητοποιητής (ΦΕ) θα πρέπει να είναι μια καθαρή ουσία, να παρασκευάζεται κάτω από συνθήκες που συνάδουν με την ορθή παρασκευαστική πρακτική (good manufacturing practice (GMP)) με τον ανάλογο έλεγχο ποιότητας και με χαμηλό κόστος, ενώ θα πρέπει να είναι σταθερός σε συνθήκες αποθήκευσης. Να αθροίζεται στον καρκινικό ιστό που θέλουμε να φωτοβολήσουμε και λιγότερο ή καθόλου στους φυσιολογικούς ιστούς, να έχει ένα χρόνο κάθαρσης ικανό για θεραπευτικούς χειρισμούς αλλά και αποβολής του από τους φυσιολογικούς ιστούς (154).

Δεν θα πρέπει να έχει τοξικότητα στο σκοτάδι. Θα πρέπει να έχει μεγάλη απορρόφηση των φωτονίων στη περιοχή κοντά του υπέρυθρου φάσματος, δηλαδή στα 650 με 800 nm, γιατί η απορρόφηση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος δεν παρέχει αρκετή ενέργεια για διέγερση του οξυγόνου σε $^1\text{O}_2$.

Για να αναπτύξει κάποιος έναν φωτοευαισθητοποιητή θα πρέπει να γνωρίζει επακριβώς που προσλαμβάνεται και δρα. Από τη στιγμή που φθορίζει μπορεί να αναγνωριστούν οι θέσεις άθροισής του με την βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού. Εφόσον

το κυτταροτοξικό παράγωγο της φωτοδυναμικής $^1\text{O}_2$ μπορεί να μετακινηθεί μόνο 0.02μm τα σημεία δράσης του ΦΕ θα είναι τα σημεία που αυτός ανιχνεύεται με την μικροσκόπηση φθορισμού.

1.2.9.6. Φωτοδυναμική δράση

Η κυτταρική μεμβράνη (155), τα λυσοσώματα (156), το cytosol (157) και τα μιτοχόνδρια των κυττάρων είναι ανάμεσα στα σημεία πρόσληψης των ΦΕ, και κατ' επέκταση της δράσης τους (158). Η ΦΔΘ μπορεί να προκαλέσει καταστροφή κυττάρων μέσω τριών μορφολογιών κυτταρικού θανάτου: την απόπτωση, τη νέκρωση και την αυτοφαγία.

Η απόπτωση εισάγεται όταν ο ΦΕ εισέρχεται στο μιτοχόνδριο μέσω ενός υποδοχέα βενζοδιαζεπίνης (159) και όντας ενεργοποιημένος προκαλεί διάνοιξη μιτοχονδριακών διαύλων και απελευθέρωση κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα (159, 160). Αυτό σημαίνει πως η ΦΔΘ μπορεί να εισάγει απευθείας απόπτωση, χωρίς την ανάγκη ύπαρξης ενδιάμεσων μονοπατιών μεταγωγής σήματος τα οποία μπορεί να λείπουν σε συγκεκριμένα ανθεκτικά στα αντικαρκινικά φάρμακα νεοπλασματικά κύτταρα. Ο άμεσος κυτταρικός αποπτωτικός θάνατος μετά την ΦΔΘ δεν εξαρτάται από το στάδιο κυτταρικού κύκλου ή γενετικούς παράγοντες, π.χ. p53, τα οποία μπορεί διαφορετικά να επηρεάσουν την ανταπόκριση στο φάρμακο. Μοριακές μελέτες έχουν προάγει τις γνώσεις μας για την ενεργοποίηση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων από το οξειδωτικό στρες που εισάγει η ΦΔΘ. Το αποτέλεσμα είναι η μεταγραφή και μετάφραση πρωτεϊνών που παίζουν ρόλο στο οξειδωτικό στρες (161) ή στο θερμικό στρες (162). Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι η ΦΔΘ μπορεί να τροποποιήσει την έκφραση ιντερλευκίνης 6 (IL-6) & IL-10 σε καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς (163).

Εκτός από το κυτταρικό επίπεδο ο ΦΕ αθροίζεται και στα μικρά αγγεία (microvasculature) που τροφοδοτούν τον όγκο. Η συρρίκνωση μπορεί να παρατηρηθεί άμεσα με το πέρας της ΦΔΘ (164-166) με αποτέλεσμα την θρόμβωση αυτών με πρόκληση σοβαρής και παρατεταμένης υποξίας/ανοξίας (167). Οι μηχανισμοί που επιτυγχάνεται η καταστροφή των αγγείων είναι διαφορετικοί σε κάθε ΦΕ.

Οι θεραπευτικές ιδιότητες της ΦΔΘ προκύπτουν επίσης από τον θάνατο καρκινικών κυττάρων που διαφυλάχθηκαν από την άμεση κυτταροτοξική δράση από ένα συνδυασμό δευτερογενών ογκοκτόνων ενεργειών που εισάγονται/προκαλούνται από το

οξειδωτικό στρες (168). Σε αντίθεση με την σύγχρονη επικρατούσα αντίληψη, αυτά τα δευτερογενή αποτελέσματα δεν περιορίζονται σε καμία περίπτωση στον ισχαιμικό θάνατο που προκαλείται από την απόφραξη του αγγειακού δικτύου του όγκου. Στο προσκήνιο έρχονται άλλες δράσεις: 1)αντικαρκινική δράση των φλεγμονωδών κυττάρων και 2) ευαισθητοποιημένη από τον όγκο ανοσολογική αντίδραση.

Οι αλλαγές που προκαλούνται φωτοδυναμικά στις κυτταρικές μεμβράνες και στις μεμβράνες των κυτταρικών οργανιδίων, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις πιο συχνά προκαλούμενες βλάβες των περισσότερων ΦΕ, μπορεί να ενεργοποιήσουν γεγονότα με πιο εκτεταμένες συνέπειες. Κάποιες από τις ενεργοποιούμενες πρωτεΐνες του στρες από την ΦΔΘ παίζουν κάποιο ρόλο στην προσκόλληση των κυττάρων και την παρουσίαση αντιγόνων και μπορεί να μετέχουν στην ανάπτυξη τις φλεγμονώδους/ανοσολογικής ανταπόκρισης που εκδηλώνεται με αυτή την θεραπεία (169).

Ένας άλλος μηχανισμός είναι οι φωτο-οξειδωτικές βλάβες λιπιδίων των μεμβρανών (170) οι οποίες απελευθερώνουν αραχιδονικό οξύ το οποίο είναι ένας ισχυρός διαμεσολαβητής της φλεγμονής (171). Η σύσπαση λόγω βλάβης των αγγείων εισάγει την χημειοταξία ουδετερόφιλων, τα οποία αθροίζονται σε μεγάλους αριθμούς, αποκοκκιώνονται προκαλώντας περαιτέρω απελευθέρωση διαμεσολαβητών της φλεγμονής επιτείνοντας της αγγειακή βλάβη και αυξάνοντας την ανοσολογική ανταπόκριση. Επίσης υπάρχει ενεργοποίηση μακροφάγων (172,173) απελευθερώνοντας TNF-β (174).

Εισάγεται ανοσολογική αντίδραση που είναι ειδική του όγκου και των κυττάρων αυτού, εξαλείφοντάς τυχόν καρκινικά κύτταρα που διέφυγαν των παραπάνω περιγραφόμενων μηχανισμών της φωτοδυναμικής δράσης και μπορεί να είναι αποφασιστικής σημασίας για τον μακροχρόνιο έλεγχο του όγκου. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της φαγοκύτωσης καρκινικών κυττάρων από μακροφάγα και/ή δενδριτικά κύτταρα που δρουν ως αντιγόνο-παρουσιαστικά όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Η δράση αυτών των κυττάρων δεν περιορίζεται μόνο στην βλάβη που ακτινοβολήθηκε αλλά επεκτείνεται και σε τυχόν μεταστάσεις προκαλώντας ανοσία ακόμα και λιγότερο ανοσογονικούς όγκους (168). Εξαιτίας όμως της προκαλούμενης παρατεταμένης δερματικής φωτοτοξικότητας διάφοροι νέοι φωτοευαισθητοποιητές έχουν εισαχθεί σε κλινικές μελέτες (175).

1.2.10.Φωτοδυναμική θεραπεία στον επιφανειακό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως

Η ΦΔΘ είναι ιδανική για την αντιμετώπιση του CIS. Περίπου το 30% των ασθενών υποτροπιάζουν παρόλη την ενδοκυστική χορήγηση BCG μέσα στα επόμενα 3 χρόνια (176) και σε αυτή την υποομάδα υπάρχει μεγαλύτερος κίνδυνος (έως 60%) για επιδείνωση της νόσου σε μυοδιηθητικό καρκίνο και θεραπευτική αντιμετώπιση εκλογής την ριζική κύστεο-προστατεκτομή με εκτροπή των ούρων (177).

Η πρώτη εστιακή ΦΔΘ στην ουροδόχο κύστη αναφέρθηκε το 1976 (178). Η φωτοβόληση όλης της κύστης πραγματοποιήθηκε στο 1984 (179). Από τότε η ΦΔΘ στον επιφανειακό καρκίνο της κύστης έχει εφαρμοστεί σε αρκετές κλινικές μελέτες σε μικρές ομάδες ασθενών οι οποίοι πάσχουν από καρκίνωμα *in situ* (75% των ασθενών), το οποίο είναι ανθεκτικό στις ενδοκυστικές εγχύσεις και εμφανίζει μεγάλη συχνότητα υποτροπών, ή επιφανειακό καρκίνωμα (25% των ασθενών) (180-184).

Η ανταπόκριση στους τρεις μήνες ήταν ενθαρυντική, με διάμεση πλήρη ανταπόκριση 80% (33-100%) και 50% (22-80%), σε προηγουμένως ανθιστάμενες στις κλασσικές θεραπείες αλλοιώσεις *in situ* και θηλωματώδεις αλλοιώσεις αντίστοιχα (185).

Παρόλα αυτά η κλινική αποδοχή της ΦΔΘ της ουροδόχου κύστεως ήταν περιορισμένη, κυρίως λόγω της σχετικής περιπλοκότητάς της και των αναφερόμενων ανεπιθύμητων παρενεργειών. Στην ανασκόπηση της ανωτέρω σειράς ασθενών 10% ανέπτυξαν σημαντική ίνωση και ρίκνωση κύστεως και 20% ανέφεραν δερματική φωτοευαισθησία η οποία διαρκούσε αρκετές εβδομάδες. Αυτά τα προβλήματα ήταν εγγενή της διαδικασίας γιατί οι πρώτοι ΦΕ, κυρίως το Photofrin και τα παράγωγα της αιματοπορφυρίνης, χορηγούνταν συστηματικά, μεταβολίζονταν αργά και σχετίζονταν με χαμηλή εκλεκτικότητα μεταξύ όγκου και εξωστήρα, δηλαδή το φάρμακο κατανέμονταν και στο μυϊκό τοίχωμα της ουροδόχου, με αποτέλεσμα κατά την ΦΔΘ ο εξωστήρας να καταστρέφεται και να επέρχεται η ρίκνωση της ουροδόχου (182). Για την αποφυγή αυτού του φαινομένου γινόταν προσεκτική κατανομή της δόσης στα σημεία ενδιαφέροντος μέσω δοσιμετρίας το οποίο όμως πρόσθετε στην περιπλοκότητα της διαδικασίας της ΦΔΘ.

Για να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα αυτά αναπτύχθηκαν φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς. Ο πρώτος ήταν το 5-αμινολεβουλεμικό οξύ (5-aminolaevulinic acid

(ALA)). Είναι πρόδρομη ουσία στην βιοσύνθεση της αίμης και εισάγει μια άθροιση φθοριζουσών ενδογενών πορφυρινών, κυρίως της πρωτοπορφυρίνης IX (PPIX) σε ιστούς επιθηλιακής προέλευσης (186).

Όταν χορηγείται ενδοκυτταρικά δεν περνά στον εξωστήρα οπότε κάνει την πιθανότητα για βλάβη και ρίκνωσή του ελάχιστη (187). Αυτό αποδεικνύεται και από τις κλινικές μελέτες με ALA ΦΔΘ όπου παρουσιάζεται παρόμοια αποτελεσματικότητα με το Photofrin αλλά χωρίς καμία αναφορά ρίκνωσης της ουροδόχου ή μακροχρόνια λειτουργική βλάβη αυτής (188-190). Επιπλέον δεν έχει συσχετισθεί με παρατεταμένη φωτοευαισθησία λόγω του ραγδαίου μεταβολισμού του ALA (191).

Η τιτλοποίηση της δοσιμετρίας του ALA που έχει πραγματοποιηθεί σε ανθρώπους συστήνει χορήγηση 50mL μέσω καθετήρα, σε συγκέντρωση 3%, ιδανικά όμως $\geq 6\%$, διαλυμένο σε φυσιολογικό ορό με pH 5-6, το οποίο παραμένει ενδοκυτταρικά για 4 ώρες (188,192). Κατόπιν φωτοβολείται με δόση 50 J/cm².

Η ανταπόκριση των ασθενών με CIS στην ΦΔΘ τόσο με Photofrin όσο και με ALA είναι υψηλή και φτάνει το 80%. Παρόλο που τα ποσοστά μειώνονται στην 2ετία στο 20%, η ΦΔΘ παραμένει ελκυστική για ασθενείς που δεν μπορούν να υποβληθούν σε ριζική χειρουργική θεραπεία ή απλά δεν την επιθυμούν. Είναι δυνατόν να επαναλάβουν τις συνεδρίες (185).

1.3. Βαλσαμόχορτο ή Hypericum Perforatum

1.3.1. Εισαγωγή για φυσικά προϊόντα

Κατά την διάρκεια των αιώνων οι άνθρωποι είχαν βασιστεί στην φύση για τις βασικές τους ανάγκες και όχι λιγότερο για τα φάρμακά τους. Τα φυτά είχαν διαμορφώσει την βάση των εξεζητημένων και σύνθετων παραδοσιακών συστημάτων ιατρικής τα οποία έχουν υπάρξει για χιλιάδες χρόνια. Οι πρώτες αναφορές ήταν σε πίνακες από πηλό στη Μεσοποταμία που χρονολογούνται το 2600 π.Χ., αναφορές για χρήση περίπου 1000 φυτών, ενώ η πιο γνωστή αναφορά για φαρμακολογική χρήση φυτών γίνεται στο Πάπυρο του Έμπερς το 1500 π.Χ., όπου αναφέρονται περίπου 700 φάρμακα.

Οι Αρχαίοι Έλληνες συνείσφεραν ουσιαστικά στην ορθολογική χρήση και ανάπτυξη των φυτικών φαρμάκων με κυριότερους εκπροσώπους τον φιλόσοφο Θεόφραστο (300π.Χ.),

τον Διοσκουρίδη (100 μ.Χ.) και τον Κλαύδιο Γαληνό (130 – 200 μ.Χ.) ο οποίος συνέγραψε πολύπλοκες συνταγές για την παρασκευή φαρμακευτικών σκευασμάτων, τα οποία κάποιες φορές περιείχαν δεκάδες συστατικά, τα γνωστά Γαληνικά Σκευάσματα. (193).

Κατά τον Μεσαίωνα η γνώση αυτή διασώθηκε από τους Άραβες και τον 8^ο αιώνα ο Πέρσης Αβικέννας έγραψε τον *Κανόνα* ο οποίος θεωρείται ότι περιέχει την «τελική κωδικοποίηση όλων των ελληνορωμαϊκών φαρμάκων» αλλά πρόσθεσε τόσο δεδομένα των Αράβων όσο και των Κινέζων και των Ινδών που ήταν άγνωστα στην Ευρώπη. Για αναλυτικότερα δεδομένα μπορεί κανείς να ανατρέξει στην Εθνική Βιβλιοθήκη των Η.Π.Α. (194)

Η επιθυμία να συλλάβουμε την γνώση των παραδοσιακών συστημάτων θεραπείας οδήγησε στην αναζωπύρωση του ενδιαφέροντος για τα φυτικά φάρμακα, ειδικά στην Ευρώπη και την Βόρεια Αμερική, όπου τα φυτικά προϊόντα ενσωματώθηκαν στα ονομαζόμενα «εναλλακτικά», «συμπληρωματικά», «ολιστικά» και «ολοκληρωτικά» ιατρικά συστήματα. (195)

Ο συνεχιζόμενος και ουσιαστικός ρόλος που παίζουν ιατροφαρμακευτικά συστήματα που βασίζονται σε χρήση φυτικών σκευασμάτων στην υγειονομική περίθαλψη πολλών διαφορετικών πολιτισμών έχει τεκμηριωθεί εκτενώς (196,197). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (W.H.O) εκτιμά ότι περίπου το 65% του παγκόσμιου πληθυσμού βασίζεται κυρίως σε φυτικής βάσης παραδοσιακά φάρμακα για την πρωτοβάθμια περίθαλψη.

Τα φυτικά παράγωγα παίζουν σπουδαίο ρόλο επίσης στα συστήματα υγείας των αναπτυσσόμενων χωρών επίσης (198). Σε μία μελέτη παρακολούθησης τα συστατικά τα οποία παρέχονται απευθείας από φυτά (μη τροποποιημένα) και χρησιμοποιούνται ως φάρμακα στις χώρες που υπάρχουν κέντρα παραδοσιακής ιατρικής εγκεκριμένα από τον Π.Ο.Υ. (WHO-Traditional Medicine Centers), στο 80% χορηγούνται με τις ίδιες ή παρόμοιες ενδείξεις και παράγονται από μόνο 94 είδη φυτών (199).

1.3.2. Βαλσαμόχορτο – *Hypericum Perforatum L*

Το υπέρεικον, ή γνωστό ως βαλσαμόχορτο, είναι ίσως από τα πιο διαδεδομένα θεραπευτικά φυτά χρησιμοποιούμενο από φαρμακευτικές βιομηχανίες, κυρίως της Ευρώπης, οι οποίες παρασκευάζουν ποικίλες φαρμακευτικές μορφές του, οι οποίες λαμβάνονται από

εκατομμύρια ασθενείς ανά έτος. Τα τελευταία χρόνια η κατανάλωσή του έχει αυξηθεί πολύ και παγκοσμίως οι ετήσιες πωλήσεις φαρμακευτικών προϊόντων που βασίζονται στο υπέρεικο ανέρχονται σε μερικά δισεκατομμύρια δολάρια. (200)

Η ονομασία που επικράτησε στους Αρχαίους Έλληνες ήταν «υπέρεικο», από το υπέρ- (άνω) και εικόν (εικόνα) γιατί τοποθετούταν πάνω από θρησκευτικά είδωλα πιστεύοντας ότι με αυτό τον τρόπο θα προστατεύονταν από δαιμονικά πνεύματα διότι ήταν πολύ μισητό από αυτά. Η παραπάνω ονομασία παραλήφθηκε από τους Ρωμαίους ως *Hypericum* (201) και στην νεοελληνική αναγράφεται και ως υπέρεικο.

Έχει λάβει και ονομασίες θρησκευτικής προέλευσης. Την ημέρα που τιμάται η μνήμη του Αγ. Ιωάννη του Βαπτιστή, στο θερινό ηλιοστάσιο, καίγανε τα φυτά που είχαν προηγουμένως χρησιμοποιηθεί για «να τραβήξουν το κακό» ώστε να καεί μαζί τους και το κακό που είχε «προσροφηθεί». Για αυτό το υπέρεικο ονομαζόταν *St. John's wort* (αγγλικά: ρίζα), Βοτάνι του Προδρόμου (ελληνικά) και αντίστοιχα *Johanniskraut* (γερμανικά), *Barbe de saint Jean* (Γαλλικά), *Erba di San Giovanni* (ιταλικά), *Hierba de San Juan* (ισπανικά).

Μία από τις κυριότερες χρήσεις του ήταν ως αντικαταθλιπτικού. Η θεραπεία των ατόμων αυτών με υπέρεικο και η βελτίωσή τους θεωρούνταν ότι οφειλόταν στην απομάκρυνση των δαιμονίων και για αυτό έλαβε ονομασίες που σχετίζονται με την μαγεία, Φυγή του διαβόλου: *Fuga demonum*, *Scacciadiavolo*, *chasse diable*, *Teufelsflucht* (202).

Η ονομασία *perforatum* (διάτρητο) οφείλεται στις πολυάριθμες κηλίδες των φύλλων του στο φως που το κάνουν να φαίνεται διάτρητο. Κατά την Γερμανική παράδοση ο διάβολος ήταν τόσο οργισμένος με το φυτό λόγω των ισχυρών δυνάμεών του, που πήρε μία βελόνη και τρύπησε τα φύλλα, όμως αυτό άντεξε και μέχρι και σήμερα εμφανίζει τις «τρύπες» αυτές (201).

1.3.2.1. Βοτανολογία

Το Υπέρεικο το διάτρητον (*Hypericum perforatum*) (Εικόνα 1) αναπτύσσεται σε ηλιόλουστες περιοχές με εδάφη που έχουν καλή απορροή υδάτων, κυρίως σε δρόμους, πλαγιές, ξύλινους φράχτες και λατομεία. Από βοτανολογική άποψη, το φυτό ανήκει στην



Εικόνα 1. Άνθη του *Hypericum Perforatum* L. γνωστού και βάλσαμου

οικογένεια των *Hypericaceae* και είναι ιθαγενές φυτό της χλωρίδας της Ευρώπης, της Δυτικής Ασίας, της Βορείου Αφρικής και άλλων περιοχών, ενώ έχει εγκλιματιστεί στη Βόρεια Αμερική και την Αυστραλία. Είναι ποώδες πολυετές φυτό με εκτεταμένα υφέρποντα ριζώματα. Τα στελέχη του είναι όρθια, διακλαδισμένα στο άνω τμήμα και φτάνει σε ύψος 50-100 εκ. Τα φύλλα είναι κίτρινο-πράσινου χρώματος, με διάσπαρτα ημιδιαφανή στίγματα του αδενικού ιστού. Φτάνει σε ύψος 50-100 εκ. Τα φωτεινά κίτρινα, με σχήμα αστεριού, άνθη είναι συχνά συγκεντρωμένα ανά τρία. Έχουν πέντε πέταλα και τα φύλλα περιέχουν μικροσκοπικούς διαφανείς αδένες που φέρουν έλαιο και μοιάζουν με διατρήσεις. Επίσης, εμφανίζονται σε πλατιά συμπλέγματα ανθέων στα άκρα των άνω κλάδων, από τα τέλη της άνοιξης και στις αρχές έως τα μέσα του καλοκαιριού. Όταν οι μαύρες κουκίδες συνθλίβονται μεταξύ των δακτύλων, δηλαδή οι ανθοφόροι οφθαλμοί των ανθών (όχι αυτά καθαυτά τα άνθη) ή οι λοβοί των σπόρων, παράγεται ένα ερυθρωπό / πορφυρό υγρό και τα δάκτυλα γίνονται κόκκινα. (203).

Η περίοδος συγκομιδής στην Ευρώπη είναι αμέσως πριν ή μετά την ανθοφορία του, τον Ιούνιο κυρίως. Συλλέγονται οι ανθοφόρες κορυφές, οι βόστρυχοι, τα κλειστά μπουμπούκια και τα άνθη του. Μετά τη συλλογή τους τα μέρη του φυτού θα πρέπει να αποξηραθούν άμεσα, σε θερμό και ξηρό περιβάλλον ώστε να αποφύγουμε την αποδόμηση των ενεργών συστατικών του, κυρίως των υπερφορινών (204).

1.3.2.2. Παραδοσιακές χρήσεις

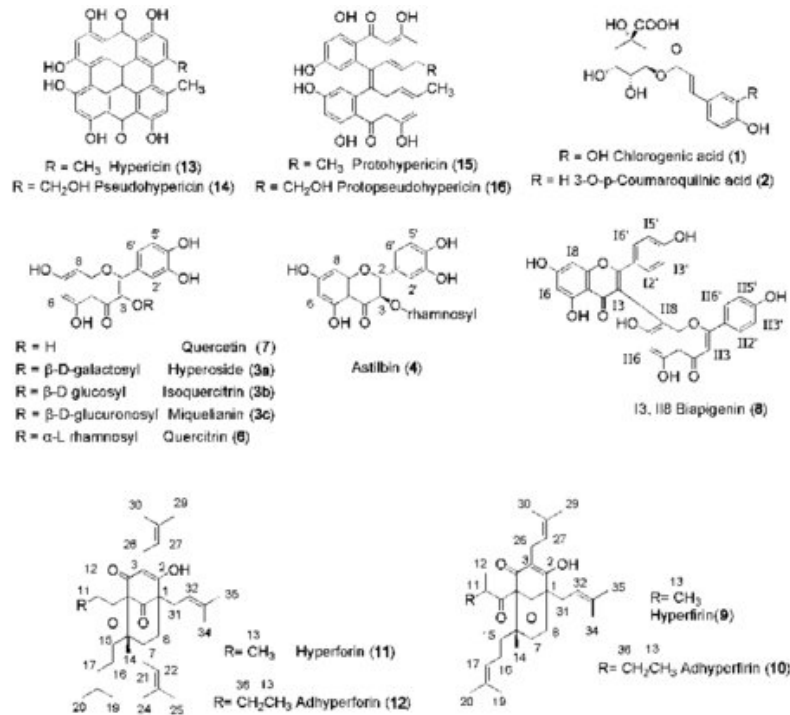
Ανάμεσα σε όλες τις περιγραφόμενες χρήσεις στην λαϊκή ιατρική, η επίσημη μονογραφία για την παραδοσιακή χρήση του υπέρεικου από Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (205) (EMA) (official 2009 HMPC monograph of the European Medicines Agency) αποδέχεται την χρήση από του στόματος χορηγούμενων παρασκευασμάτων υπέρεικου για την ανακούφιση από την παροδική νοητική κόπωση και την ήπια γαστρεντερική δυσανεξία, και τα παρασκευάσματα για τοπική χρήση για τη συμπτωματική αντιμετώπιση μικρών φλεγμονωδών δερματικών αλλοιώσεων και μικρών τραυμάτων. Λόγω της έλλειψης προκλινικών ή κλινικών δεδομένων δεν υπάρχουν παραδοσιακές ενδείξεις για άλλες χρήσεις που περιγράφονται στην λαϊκή ιατρική.

Η μόνη χρήση η οποία υποστηρίζεται με κλινικά δεδομένα είναι για την αντιμετώπιση της ήπιας προς μέτριας κατάθλιψης. Δεδομένα από 27 κλινικές μελέτες και 2291 ασθενείς, στις οποίες τα παρασκευάσματα υπέρεικου που χορηγήθηκαν διέφεραν μεταξύ των μελετών, κατέληξαν ότι ήταν πιο αποτελεσματικό από το εικονικό φάρμακο ή εξίσου αποτελεσματικό με φαρμακευτικό αντικαταθλιπτικό παλιά γενιάς με βαθμό τεκμηρίωσης A (206-208).

Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να γίνει αποδεκτό ως αντικαταθλιπτικό με καλά τεκμηριωμένη ιατρική χρήση με επίσημη μονογραφία από την Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (209)

1.3.2.3. Βιολογικά δραστικά συστατικά του υπέρεικου

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα παρασκευάσματα του υπέρεικου είναι τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα των ανθοφόρων βοστρύχων του φυτού. Αυτά περιέχουν τουλάχιστον 10 διαφορετικά είδη βιοχημικών ενώσεων: φλαβονοειδή (συμπεριλαμβανομένου ρουτίνη, υπεροσίδη, κουερσετίνη, κουερσιτρίνη), ναφθοδιανθρόνες (συμπεριλαμβανομένου υπερικίνη και ψεύδοϋπερικίνη), ακυλφλωρογλουκινόλες (συμπεριλαμβανομένου υπερφορίνη και αντυπερφορίνη), προανθοκυανίδες, προκυανιδίνες, τανίνες, αιθέρια έλαια, αμινοξέα, φαινυλοπροπάνες, ξανθόνες και άλλα υδατοδιαλυτές χημικές ενώσεις (οργανικά οξέα. Πεπτίδια και πολυσακχαρίτες) (210).



Εικόνα 2 Χημικές μορφές των κύριων χημικών συστατικών του υπέρικου (215)

Οι πρώτες τρεις ομάδες είναι οι πιο άφθονες και οι κύριοι υπεύθυνοι παράγοντες για την παραδοσιακή χρήση του ποώδους φυτού. Για την μοναδική τεκμηριωμένη κλινική του ένδειξη, την αντιμετώπιση της ήπιας προς μέτριας κατάθλιψης, η αντικαταθλιπτική δράση αποδίδεται στην υπερφορίνη (211, 212), την υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη (213) και για κάποια φλαβονοειδή (214). Οι χημικές μορφές των κύριων χημικών συστατικών του υπέρικου (215) παρατίθενται στην Εικόνα 2.

Ο ρόλος και οι μηχανισμοί δράσης αυτών των διαφορετικών συστατικών στην κατάθλιψη παραμένει αντικείμενο αντιπαράθεσης. Παρόλα αυτά βάση νεότερων δεδομένων φαίνεται πως η κυρίαρχη απλοϊκή θεώρηση του ένα φυτό → μια δραστική ουσία → ένας μηχανισμός δράσης είναι λανθασμένη. Είναι πιθανότερο ότι πολλαπλά δραστικά συστατικά του ακατέργαστου φυτικού εκχυλίσματος συνεισφέρουν δρώντας συνεργικά στην αντικαταθλιπτική δράση με έναν πολύπλοκο τρόπο.

Δύο συστατικά του υπέρικου, η υπερφορίνη και η υπερικίνη, έχουν απομονωθεί μόνο από ελάχιστα άλλα φυτά.

1.3.2.4. Η υπερφορίνη

Είναι η κύρια ουσία από τις δύο παρούσες ακυλφορογλυκινόλες του *Hypericum Perforatum*. Ανακαλύφθηκε το 1971 από τον Gurevich (216). Αποτελεί το 5% του βάρους του σωστά αποξηραμένου φυτού. Είναι χημικά ασταθής οπότε η συγκέντρωση της μειώνεται πάρα πολύ σε λανθασμένη αποξήρανση. Η υπερφορίνη έχει έντονη ευαισθησία στον οξειδωτικό μετασχηματισμό, στην ζέστη και στο φως, είτε ως σκόνη είτε ως διάλυμα (217)

Από πλήθος μελετών φαίνεται ότι έχει αντικαταθλιπτική δράση σε διάφορα πειραματικά μοντέλα (218, 219). Επίσης φαίνεται να έχει και αγχολυτική δράση (220) ενώ φαίνεται να μειώνει την ανάγκη για πρόληψη αλκοόλ και προτείνεται για την ενδεχόμενη θεραπευτική της χρήση για την αντιμετώπιση του αλκοολισμού (221). Έχει ένα μοναδικό φαρμακολογικό προφίλ γιατί αναστέλλει την πρόσληψη της σεροτονίνης (5-HT), νορεπινεφρίνης, ντοπαμίνης καθώς και της γλουταμάτης της GABA.

Αυτή η δράση δεν σχετίζεται με ειδική σύνδεση σε διαφορετικά μόρια μεταφορείς αλλά με έναν μηχανισμό που εμπλέκει αγωγή μονοπάτια Na^+ , ο οποίος σχετίζεται με την δραστηριότητα όλων των μεταφορέων νευροδιαβιβαστών. (212). Επιπλέον διεγείρει απευθείας την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών από τα συναπτοσώματα, επηρεάζει την αγωγιμότητα/διαπερατότητα καναλιών ιόντων, το συναπτοσωμικό και αγγειακό pH. Έχει ανανεωθεί το ενδιαφέρον για τις αντιμικροβιακές ιδιότητές της επειδή καταστέλλει τον πολυανθεκτικό στα αντιβιοτικά τύπο του *Staphylococcus aureus* (222).

Επειδή είναι διπλός αναστολέας της 5-λιποξυγενάσης και της κυκλοοξυγενάσης 1, αναστέλλοντας έτσι την παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων από το αραχιδονικό οξύ, προτείνεται για την χρήση της ως δυνητικού θεραπευτικού για φλεγμονώδης νόσους (223). Επιπλέον έχουν αναφερθεί ενδιαφέροντα αποτελέσματα που αφορούν την αντικαρκινική της δράση. Έχει κατασταλτική δράση σε ανθρώπινα επιδερμικά κύτταρα και κυτταροστατική δράση σε αυτόλογο MT-40 καρκίνο στήθους σε αρουραίους (224). Η αντιπολλαπλασιαστική της δράση έχει αποδειχθεί σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και σχετίστηκε με την εισαγωγή απόπτωσης μέσω ενός μονοπατιού που εξαρτάται από τις κασπάσες (225).

1.3.2.5. Η υπερικίνη

Η υπερικίνη (4,5,7,4',5',7'-εξαυδροξυ-2,2'-διμεθυλναφθοδιανθρόνη) είναι μία ένωση που απαντάται στην φύση και συντίθεται από μερικά είδη του γένους *Hypericum*. Η διερεύνηση της δράσης της υπερικίνης είναι τόσο παλιά όσο και η διαπίστωση του

υπερικινισμού, hypericism, της διαπίστωσης δηλαδή φωτοευαισθησίας του δέρματος, φωτοδερματίτιδας, των αγελάδων που κατανάλωναν μεγάλες ποσότητες υπέρικου και εκθέτονταν στο ηλιακό φως (226, 227) Η υπερικίνη έχει παρατηρηθεί σε 27 από τα 36 είδη του υπέρικου (228).

Η λειτουργία των υπερικινών στο είδος του *Hypericum* δεν είναι ακόμα γνωστός. Θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως αναχαιτιστική ουσία (allochemicals) για την άμυνα των φυτών έναντι εντόμων και παρασίτων, από την στιγμή που μόνο λίγα έντομα έχουν αναπτύξει συμπεριφερσιολογικές, φυσικές ή βιοχημικές προσαρμογές οι οποίες μπορούν να τους επιτρέψουν να τραφούν χωρίς συνέπειες από τα φυτά που περιέχουν υπερικίνη (226)

Ο πιο κοινός αντιπρόσωπος του γένους είναι το *Hypericum Perforatum* (υπέρικο το διάτριτο) ή το βότανο του Άγιου Ιωάννη (St John's wort) (229) Στην πραγματικότητα δεν βρίσκεται η υπερικίνη στα φυτά αλλά οι πρόωρες μορφές της, δηλαδή πρωτοϋπερικίνη και πρωτοψευδοϋπερικίνη, καθώς και η ομοειδή της ουσία η ψευδοϋπερικίνη, εμφανίζονται ως σκούρα σφαιρίδια (230). Αυτές οι δομές αντιπροσωπεύουν κυκλικές πρόδρομες ουσίες οι οποίες μετά από ακτινοβόληση με ορατό φως μετατρέπονται πολύ αποτελεσματικά σε ναφθοδιανθρόνες (ή αλλιώς φαινανθροπεριλεν-κινόνες) που είναι ανάλογα της υπερικίνης (Εικόνα 2) και της συγγενούς ουσίας ψευδοϋπερικίνης. Έρευνες για την φωτοδυναμική δραστηριότητα αυτών των πρωτομορφών έδειξαν ότι ενδογενώς παρουσιάζουν μία δραστικά χαμηλότερη φωτοδυναμική δραστηριότητα, σχεδόν μηδενική, συγκριτικά με τις αντίστοιχες ναφθοδιανθρόνες (230, 231). Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι το φυτό προστατεύει τον εαυτό του από φωτοεξαρτώμενη αυτοκαταστροφή διατηρώντας υψηλό λόγο πρωτοναφθιανθρόνων/ ναφθιανθρόνων.

Μία άλλη εξήγηση για την απύσα δραστηριότητα των υπερικινών μέσα στο ίδιο το φυτό είναι ότι οι ίδιες αποθηκεύονται σε μη διαπερατά κυστίδια και έτσι δεν έχουν πρόσβαση στους ιστούς του φυτού παρά μόνο όταν καταστραφούν.

Τα φυτά του γένους *Hypericum* ήταν το αντικείμενο ερευνών λόγω της αυξημένης χρήσης τους από την παραδοσιακή ιατρική για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Σήμερα το εκχύλισμα του *Hypericum* χρησιμοποιείται ευρέως για την αντιμετώπιση της ήπιας και μέτριας μορφής κατάθλιψης. Η ημερήσια δόση που συστήνεται των 500mg αντιπροσωπεύει μία συνολική δόση 1 -2mg υπερικινών. Αυτές οι δόσεις όταν δίδονται από το στόμα δεν προκαλούν φωτοδερματίτιδα (231, 232).

1.3.2.6. Χημικές ιδιότητες της υπερικίνης

Στην βιβλιογραφία η υπερικίνη αναφέρεται ως παράγωγο της ναφθοδιανθρόνης και σε αναφορές χημικών συγγραμμάτων ως 1, 3, 4, 6,8, 13-εξαϋδροξυ-10, 11-διμεθυλφαινανθρο [1, 10, 9, 8-οργρα]περυλεν-7, 14-διόνη (233). Η χημική της δομής φαίνεται στην εικόνα 2.

Η πρώτη αναλυτική περιγραφή απομόνωσης της υπερικίνης από το *Hypericum Perforatum* δημοσιεύτηκε το 1939 (234) αλλά χρειάστηκαν άλλα 10 χρόνια για βρεθεί η σωστή χημική δομή της (235) από την ίδια ομάδα.

Η υπερικίνη είναι υδρόφοβη και αδιάλυτη στο νερό, τα έλαια και στους περισσότερους μη πολικούς διαλύτες. Η υπερικίνη παρουσιάζει μία σαφή οξύτητα στην περιοχή του κόλπου της περιοχής των υδροξυλομάδων με αποτέλεσμα να υπάρχει ως μονοβασικό άλας σε φυσιολογικές συνθήκες (236). Είναι διαλυτή σε αλκαλικά υδατικά διαλύματα, οργανικές βάσεις όπως η πυριδίνη και πολικές οργανικές ενώσεις όπως ακετόνη, αιθανόλη, μεθανόλη, οξικό μεθύλιο, αιθυλομεθύλ-κετόνη.

Είναι επίσης διαλυτή σε βιολογικά μέσα, το οποίο γίνεται δυνατό μέσω του σύνδεσης των υπερικινών με βιολογικά μακρομόρια, όπως DNA, ανθρώπινη αλβουμίνη ορού και άλλες πρωτεΐνες πλάσματος, θραύσματα μεμβρανών και κυτταρικές ενώσεις (233). Ο υδρόφοβος χαρακτήρας της δίνει την δυνατότητα να αθροίζεται, με έναν χρονο-εξαρτώμενο τρόπο (2 – 4 ώρες), στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες (237).

1.3.2.7. Ενδοκυττάρια άθροιση υπερικίνης

Φαίνεται ότι η υπερικίνη μεταφέρεται μέσα στα κύτταρα ή δια των κυττάρων μέσω διάχυσης (238), διαχωρισμού, πινοκύττωσης και ενδοκύττωσης (239). Μελέτες χαρτογράφησης κυττάρων με την βοήθεια φθορίζουσων ουσιών που στοχεύουν οργανίδια έδειξαν πως η υπερικίνη συγκεντρώνεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (240), της συσκευής του Golgi (241), τα λυσοσώματα (242) και λιγότερο έως καθόλου στα μιτοχόνδρια (241).

Παρόλα αυτά η κυτταρική πρόσληψη και ενδοκυττάριας εντοπισμός της μπορεί να επηρεάζεται από την λιποφυλικότητά της, τις συγκεντρώσεις επώασης και/ή της αλληλεπίδρασης με λιποπρωτεΐνες του ορού (241).

1.3.2.8. Φωτοδυναμικές ιδιότητες της υπερικίνης

Η υπερικίνη λόγω της υψηλής κβαντικής απόδοσης τριπλέτας (high triplet quantum yield) και της ικανότητάς της να παράγει σε ικανές ποσότητες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και ανιόντα υπεροξειδίου είναι πιθανώς ο πιο ισχυρός φωτοευαισθητοποιητής που απαντάτε στην φύση (243). Τον κυριότερο ρόλο στη φωτοτοξικότητα της υπερικίνης τον παίζει η παραγωγή μονήρους οξυγόνου (Singlet Oxygen) (Μηχανισμός Τύπου II) χωρίς όμως να παραβλεφθεί η παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS reactive oxygen radicals) (Μηχανισμός Τύπου I) (244, 245).

Πράγματι η εγγύτητα του φωτοευαισθητοποιητή με το στόχο του είναι απαραίτητη προϋπόθεση στην φωτοδυναμική διαδικασία που εμπλέκει το σχηματισμό του $^1\text{O}_2$ (αντίδραση τύπου II) επειδή αυτό το υψηλής αντιδραστικότητας οξειδωτικό μόριο μπορεί να διαχυθεί μόνο 20nm και έχει πολύ μικρή διάρκεια ημίσειας ζωής ($<0.04 \mu\text{s}$) (246, 247).

Σε αυτό το πλαίσιο, λαμβάνοντας υπόψιν τα σημεία άθροισης της υπερικίνης στο κύτταρο, το παραγόμενο $^1\text{O}_2$ μετά από φωτοδιέγερση της υπερικίνης εμπλέκεται στην καταστροφή των αντλιών Ca^{2+} -ATPase-2 του σαρκοπλασματικού δικτύου διαταράσσοντας την ομοιόσταση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} (240), την καταστολή των μιτοχονδριακών ενζύμων: της σουκινικής οξειδάσης (248) και της ακονιτάσης (249), υποέκφραση της μεταλλοπρωτεάσης – 9 (250), καταστροφή των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών που προκαλεί μια αλληλουχία ενεργοποίησης ενζύμων καθώς και καταστολή της γλουταθιόνης (245).

Έτσι η φωτοενεργοποίηση της υπερικίνης μπορεί, μέσω των βλαβών και των μεταβολών που θα προκληθούν στις ανωτέρω κυτταρικές δομές, να προκαλέσει νέκρωση (250), απόπτωση (242), κυτταρικό θάνατο σχετιζόμενο με αυτοφαγία (240) και κυτταρικό θάνατο ανοσολογικής αιτιολογίας (251).

Η φωτοτοξικότητα της υπερικίνης είναι σε μεγάλο βαθμό οξυγόνο-εξαρτώμενη, ενώ δεν εμφανίζεται καμία φωτοτοξική δράση σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου (246) (247). Η ανταπόκριση *in vivo* της ΦΔΘ με υπερικίνη επηρεάζεται από μια σειρά παραγόντων: τη συγκέντρωσή του στους ιστούς, το πρωτόκολλο ακτινοβολήσης συμπεριλαμβανομένου του τύπου της πηγής, του μήκους κύματος και την προσλαμβανόμενη ενέργεια, το είδος του όγκου, το επίπεδο οξυγόνωσής του, το pH και την κυτταρική εντόπιση της (252, 253). Έτσι σε καρκινικές σειρές από διάφορους ιστούς φαίνεται πως σε χαμηλές συγκεντρώσεις

υπερικίνης ή σε χαμηλές δόσης ενέργειας φωτός (J/cm^2) φαίνεται ότι το κυρίαρχο φαινόμενο είναι η απόπτωση, ενώ σε περίπτωση αύξηση της συγκέντρωσης της υπερικίνης ή της χορηγούμενης ενέργειας φωτός υπάρχει μετατόπιση προς την νέκρωση (242, 254).

Η απόπτωση μετά από ΦΔΘ εισάγεται μέσω του μονοπατιού των κασπασών. Απελευθέρωση Καθεψίνης D από τα λυσοσώματα ενεργοποιεί την κασπάση 3 ενώ δρα στην μιτοχονδριακή μεμβράνη προκαλώντας οίδημα. Το οίδημα που προκαλείται και η συνεπαγόμενη καταστροφή του μιχονδρίου λόγω ώσμωσης έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση κυτοχρώματος C. Αυτό ενεργοποιεί τις κασπάσες -8, -9 και -3 (255). Ακόμα πιθανολογείται ότι εμπλέκονται στην προκαλούμενη απόπτωση από υπερικίνη το νιτρικό οξείδιο (NO), το Fas/FasL αποπτωτικό μονοπάτι (254). Επίσης σπουδαίο ρόλο παίζει και η Bcl-2 πρωτεΐνη, καταστροφή της κατά την φωτοδυναμική θεραπεία προκαλεί αυξημένη ευαισθησία στην απόπτωση (256)

Η κυτταρική νέκρωση εισάγεται λόγω ραγδαίας καταστροφής των μιτοχονδρίων και μεγάλη απελευθέρωση κυτοχρώματος C με αποτέλεσμα να μην ενεργοποιούνται οι κασπάσες λόγω οξειδωσης πρωτεϊνών απαραίτητων για ενεργοποίησή τους. Επίσης προκαλείται και σε δραστική μείωση των επιπέδων του ATP, καταστρέφοντας έτσι την ικανότητα του κυττάρου να εισάγει την διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου επειδή για την πραγματοποίησή της απαιτείται ενέργεια η οποία δεν είναι διαθέσιμη. (257, 258)

Η υπερικίνη προκαλεί αυτοφαγία σε κύτταρα που ήταν ανεπαρκή για απόπτωση, δηλαδή έλλειπαν ένζυμα που εισάγουν την απόπτωση *Bax*-/*Bak*-/ DKO (259), αλλά φαίνεται ότι συνυπάρχει ως διαδικασία ανεξαρτήτως αν το κύτταρο είναι ικανό ή όχι να εισάγει απόπτωση (233).

1.3.2.9. Αντικαρκινική δράση της υπερικίνης

Η *in vitro* αντικαρκινική δράση της υπερικίνης μετά από φωτοδυναμική θεραπεία έχει διερευνηθεί διεξοδικά σε πολλές ανθρώπινες καρκινικές σειρές όπως εκ πλακωδών κυττάρων πνεύμονα (UCLA-P3), ινοσάρκωμα (TE671) (260), τραχήλου μήτρας, δέρματος, (246) καθώς και σε κύτταρα από κόλον, ουροδόχο κύστη και ρινοφάρυγγα (254), εμφανίζοντας υψηλή αποτελεσματικότητα.

Η φωτοδυναμική της δράση έχει αποτιμηθεί *in vivo* σε καρκινικά μοντέλα υποδόριας ή ενδοπεριτοναϊκής εμφύτευσης καρκινικών κυττάρων με διάφορους τύπους κυττάρων, τα οποία διερεύνησαν την χορήγηση διαφορετικών δόσεων υπερικίνης (1 – 20 mg/kg) σε συνδυασμό με διάφορα χρονικά διαστήματα μεταξύ χορήγησης και ακτινοβολήσης. Όλα εμφάνισαν υψηλή φωτοδυναμική αποτελεσματικότητα προκαλώντας μερική καταστροφή ή υποστροφή του όγκου. Η *in vivo* φωτοδυναμική δράση της υπερικίνης έχει περιγράψει και συνοψιστεί σε μια μεγάλη ανασκόπηση (261).

Μόνο τρεις κλινικές μελέτες έχουν δημοσιευτεί με την εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας με την εφαρμογή υπερικίνης. Αφορούν και οι τρεις την εξωτερική τοπική εφαρμογή της σε δερματικές αλλοιώσεις, καρκινικές και μη, όπως βασικοκυτταρικού καρκίνου και καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων (262), ακτινική κεράτωση, νόσο του Bowen (263), κακοήθη σπογγοειδή μυκητίαση (264).

Ολική υποστροφή παρατηρήθηκε σε λίγους ασθενείς ενώ η πλειοψηφία εμφάνισε συρρίκνωση των όγκων καθιστώντας την υπερικίνη μια πολλά υποσχόμενη και ασφαλή εναλλακτική θεραπεία για αυτού του είδους των δερματικών αλλοιώσεων.

1.3.2.10. Υπερικίνη και καρκίνος της ουροδόχου κύστης

Στην προσπάθεια για την αντικατάσταση των υπάρχοντων φωτοευαισθητοποιητών, του Photophrin 6[®] και του ALA, η υπερικίνη χρησιμοποιήθηκε για την φωτοδυναμική διάγνωση των επιφανειακών βλαβών της ουροδόχου κύστεως. Η πρώτη κλινική μελέτη πραγματοποιήθηκε το 2000 σε ασθενείς που έπασχαν από μη μυοδιηθητικό εξωφυτικό καρκίνο ουροδόχου κύστεως και καρκινώματος *in situ* μετά από ενδοκυστική έγχυση (τουλάχιστον 2ωρη παραμονή στην ουροδόχο). Ο φθορισμός προκλήθηκε με την βοήθεια κυστεοσκόπησης φθορισμού με την χρήση μπλε φωτός. Η υπερικίνη αθροίστηκε στους καρκινικούς ιστούς ενώ το φυσιολογικό ουροθήλιο δεν προσέλαβε καθόλου ουσία, δηλαδή δεν φθόριζε κατά την κυστεοσκόπηση. Οι βιοψίες που ελήφθησαν έδειξαν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα της φωτοδυναμικής διάγνωσης με υπερικίνη για την ανίχνευση του ουροθηλιακού καρκίνου της ουροδόχου κύστεως συγκριτικά με την κυστεοσκόπηση λευκού φωτός (265). Τα ανωτέρω αποτελέσματα έδωσαν το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση της υπερικίνης ως πιθανού φωτοευαισθητοποιητή για την φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστης.

Η διερεύνηση της αντικαρκινικής δράσης της υπερικίνης στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης *in vitro* διερευνήθηκε πρώτη φορά από τον Kamuhabwa (266). Πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων εκ μεταβατικού επιθηλίου (J-82, T-24 and RT-4), καρκινικών κυττάρων αρουραίου (NBT-II), φυσιολογικών κυττάρων ουροδόχου κύστεως (HEL229, RPE and PHK). Τα κύτταρα έδειξαν την ίδια ευαισθησία στην φωτοδυναμική δράση της υπερικίνης ανεξαρτήτως προέλευσης ή κακοήθους δυναμικού.

Η ίδια ομάδα μελέτησε *in vivo*, σε θηλυκούς αρουραίους Fisher με ορθότοπο ουροθηλιακό καρκίνο στην ουροδόχο κύστη, την πιθανότητα εκλεκτικής πρόσληψης της υπερικίνης από τους όγκους (267). Στην ακτινοβολήση των όγκων στο ίδιο πειραματικό μοντέλο παρατηρήθηκε ιστική βλάβη προκαλούμενη από την ΦΔΘ με υπερικίνη χωρίς να καταγράφεται καταστροφή φυσιολογικού ιστού (268). Παρόλα αυτά 2-5% των καρκινικών κυττάρων επιβίωσαν της διαδικασίας και ήταν υπεύθυνα για την υποτροπή των όγκων. Στα ανωτέρω πειραματικά μοντέλα χρησιμοποιήθηκε Laser ως πηγή φωτός.

1.3.2.11. Μειονεκτήματα της χρήσης υπερικίνης

Παρόλο που οι παραπάνω μελέτες δείχνουν ότι η ΦΔΘ με την χρήση υπερικίνης καταστέλλει την ανάπτυξη όγκων σε διάφορα πειραματικά μοντέλα με αρουραίους ή ποντίκια, οι κλινικές εφαρμογές για την διερεύνηση του πιθανού διαγνωστικού και θεραπευτικού δυναμικού της είναι σπάνιες.

Στην ιδανική περίπτωση, ένας φωτοευαισθητοποιητής πρέπει να είναι υδατοδιαλυτός για συστημική εφαρμογή και εισαγωγή σε σωματικές κοιλότητες. Η υπερικίνη είναι υδρόφοβη και σχεδόν αδιάλυτη στο νερό (269), αλλά και στο έλαιο, μεθυλενοχλωρίδιο και στα περισσότερους άλλους μη πολικούς διαλύτες. Είναι όμως διαλυτή σε αλκαλικά υδατικά διαλύματα, οργανικές βάσεις όπως πυριδίνη και πολικές οργανικές ουσίες όπως ακετόνη, αιθανόλη, μεθανόλη, οξικό αιθύλιο, αιθυλομεθυλοκετόνη.

Σε αντίθεση με τα διαλύματα, που είναι ευδιάλυτη, η υπερικίνη στο νερό υπάρχει με τη μορφή διασκορπισμένων συσσωματωμάτων (270) και δεν παρουσιάζει φάσμα εκπομπής στις ερυθρές περιοχές (270). Για αυτό τον λόγο θεωρητικά μειώνεται δραστικά η φωτοδυναμικής της δράση λόγω του μειωμένου συντελεστή απορρόφησης (271).

Αυτές οι ιδιότητες εμποδίζουν την παρασκευή φαρμάκων για κλινική εφαρμογή. Εξαιτίας της αδιαλυτότητάς της και την καθίζησή της, σχηματίζοντας μη φθορίζοντα ιζήματα στα υδατικά διαλύματα, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν διαλύματα με 1% πρωτεΐνες του πλάσματος για πετύχουν μονομοριακή κατανομή της (265). Λόγω του δυνητικού κινδύνου για την μετάδοση μολυσματικών ασθενειών η χρήση αλβουμίνης δεν είναι κατάλληλη για ιατρικές εφαρμογές.

Νέοι τρόποι μεταφοράς της υπερικίνης με μόρια φορείς οι οποίοι καθιστούν την υπερικίνη υδατοδιαλυτή διερευνώνται. Έχει προταθεί ότι τα συσσωματώματα μορίων υπερικίνης έχουν διαφορετικό μοριακό συντελεστή απορρόφησης από ότι η μονομοριακή διαλυμένη υπερικίνη (272). Πιο υποσχόμενη μέθοδος είναι το υδατικό διάλυμα υπερικίνης μη ομοιοπολικά συνδεδεμένο με πολυβινυλοπυρρολιδόνη (polyvinylpyrrolidone (PVP)) (273) η οποία δοκιμάζεται ήδη σε κλινικές μελέτες φάσης ΠΑ για φωτοδυναμική διάγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως με κυστεοσκόπηση φθορισμού (274).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό πως ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως είναι πολύ-παραγοντικής αιτιολογίας. Πρόκειται για μία νόσο όπου πάσχει όλο το ουροθήλιο, σε όλη την έκταση κατανομής του. Υψηλά ποσοστά υποτροπών και θανάτου είναι τα κύρια χαρακτηριστικά της ασθένειας η οποία έχει προφανή υγειονομική και οικονομική επίδραση στην κοινωνία μας.

Η πολυεστιακότητα του καρκίνου της ουροδόχου κύστης και κυρίως η ύπαρξη του καρκινώματος *in situ* καθιστούν τις συμβατικές μεθόδους διάγνωσης και θεραπείας ανεπαρκείς. Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι υπό διερεύνηση για την αντιμετώπισή του καρκίνου εκ μεταβατικών κυττάρων. Ο λόγος που η εφαρμογή της δεν έχει διαδοθεί στην καθημερινή κλινική πράξη είναι τα μειονεκτήματα των φωτοευαισθητοποιητών.

Ανέκδοτες κλινικές παρατηρήσεις σε ασθενείς της Ουρολογικής Κλινικής του ΓΝΙ «Γ. Χατζηκώστα», οποίοι έπασχαν από επιφανειακό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως και λάμβαναν καθημερινά υδατικό εκχύλισμα του *Hypericum Perforatum L.*, του κοινού βαλσαμόχορτου, στα πλαίσια της παραδοσιακής ηπειρώτικης ιατρικής, δεν εμφάνιζαν υποτροπές. Οι ασθενείς αυτοί, ανήκαν σε ομάδες μετρίου & υψηλού κινδύνου για υποτροπή και επιδείνωση της νόσου.

Η παρατήρησή μας, από την πορεία των ασθενών, μας οδήγησε να διερευνήσουμε την πιθανή χημειοπροφυλακτική δράση του φυτού, στην δοσολογία που το λάμβαναν οι ασθενείς, καθώς επίσης την χημική της ανάλυση. Επιπλέον επειδή το βαλσαμόχορτο είναι η φυσική πηγή της υπερικίνης εστιάσαμε στην πιθανότητα της άμεσης παραγωγής της από το φυτό και την διερεύνηση των φωτοδυναμικών της ιδιοτήτων. Συνοπτικά ο σχεδιασμός της έρευνας είναι:

1. Διερεύνηση δραστικών ουσιών υδατικού διαλύματος – κλασματοποίηση – παραγωγή υπερικίνης
2. Διερεύνηση χημειοπροφυλακτικής αντικαρκινικής δράσης *in vitro* σε καρκινικά κύτταρα ουροθηλίου και *in vivo* σε αρσενικά ποντίκια BULBc.
3. Διερεύνηση φωτοδυναμικής δράσης *in vitro* σε καρκινικά κύτταρα ουροθηλίου και *in vivo* και της κατανομής της σε φυσιολογικό ουροθήλιο και σε μοντέλο ορθότοπης εμφύτευσης καρκινικών κυττάρων εκ μεταβατικού επιθηλίου AY-27 σε θηλυκούς αρουραίους Wistar.

3. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

3.1. Συλλογή φυτού

Φυτικό Υλικό: Συγκομιδή και συντήρηση υπέρεικου

Τα φρέσκα υπέργεια τμήματα του *Hypericum Perforatum* της Ηπείρου, δηλαδή οι ανθοφόροι βλαστοί, συλλέχθηκαν από την περιοχή του λεκανοπεδίου των Ιωαννίνων τον Ιούνιο του 2003. Παραστατικό δείγμα του φυτού στάλθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών το οποίο επιβεβαίωσε το δείγμα (κωδικός N. 1022). Κάθε φυτικό μέρος αφέθηκε να ξηραθεί σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνθήκες έλλειψης φωτός, για 30 ημέρες και κατόπιν κονιορτοποιήθηκε, με τη βοήθεια ηλεκτρικού τεμαχιστή (chopper) και αποθηκεύτηκε έως την τελική του χρήση (10 κιλά).

3.2. Διερεύνηση της χημειοπροφυλακτικής – αντικαρκινικής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος του *Hypericum Perforatum* L. έναντι, προκαλούμενων από p.os. χορήγηση νιτροζαμίνης, ουροθηλιακών καρκίνων σε αρσενικά BULBc ποντίκια

3.2.1. Καρκινογόνος παράγοντας

N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (OH-BBN) αποκτήθηκε από την Tokyo Chemical Industry, Τόκιο, Ιαπωνία.

3.2.2. Προετοιμασία του υδατικού διαλύματος

Τα φυτικά διαλύματα παρασκευάστηκαν κατ' αρχήν ως υδατικό εκχύλισμα, το οποίο παρασκευάστηκε με τον παραδοσιακό τρόπο που λαμβάνεται το υπέρικο από τους γηγενείς πληθυσμούς της περιοχής των Ιωαννίνων, δηλαδή 75g αποξηραμένων ανθοφόρων βοστρύχων σε 4,5 L νερού. Αυτό θερμαίνεται στο σημείο ζέσεως για 30 λεπτά. Αφού ψύχονταν, αφαιρούσαμε με διήθηση τα στερεά υλικά και αποθηκεύονταν στη συντήρηση. Τα ανωτέρω διάλυμα δίδονταν στα πειραματόζωα και παρασκευάζονταν φρέσκο κάθε φορά που η προηγούμενη ποσότητα είχε καταναλωθεί ή το χρονικό διάστημα από την παρασκευή του ξεπερνούσε τις τέσσερις ημέρες.

3.2.3. Πειραματόζωα

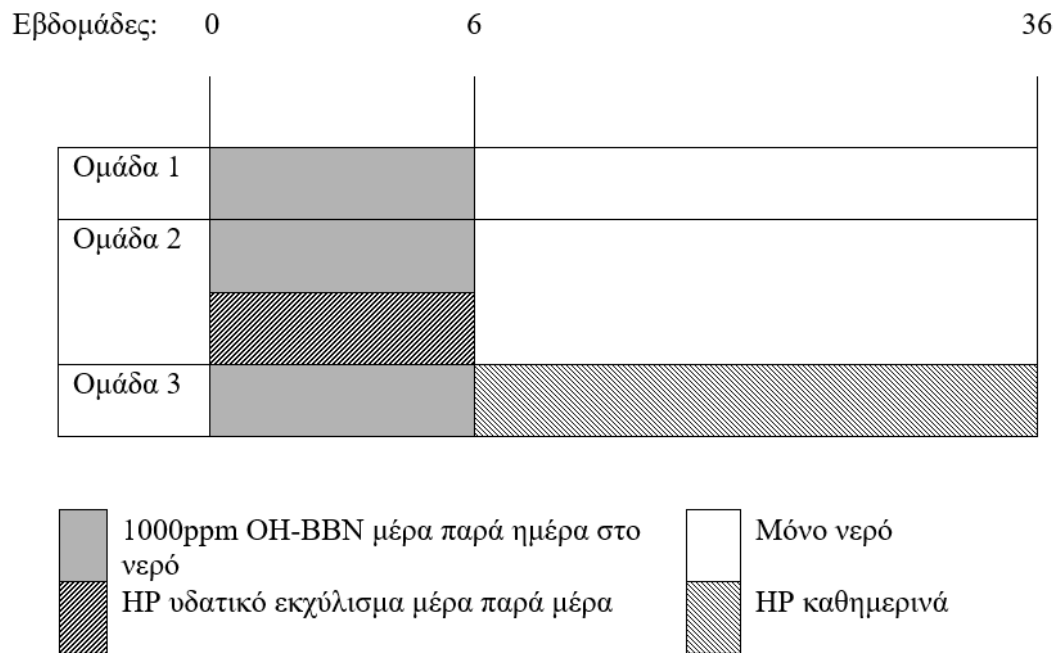
Χρησιμοποιήθηκαν 78 αρσενικά ποντίκια BULBc, ηλικίας 5 εβδομάδων, από το εκτροφείο πειραματόζωων του τμήματος Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Όλα τα πειραματόζωα παρέμεναν σε κλουβιά που ήταν στρωμένα με πριονίδι σε κλιματιζόμενο δωμάτιο σε θερμοκρασία $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (SD), $50 \pm 10\%$ σχετική υγρασία, σε έκθεση 12ώρου κύκλου φωτός/σκότους. Εφαρμόστηκε τροποποιημένο το πειραματικό μοντέλο των Yang M et al (275). Τα ποντίκια διαχωρίστηκαν τυχαία σε τρεις ομάδες των 26. Η πρώτη ομάδα, ομάδα ελέγχου, έλαβε μόνο νιτροζαμίνη (OH-BBN) 1000 ppm στο νερό μέρα παρά μέρα για τις πρώτες 6 εβδομάδες και κατόπιν για 30 εβδομάδες λάμβαναν μόνο νερό. Η δεύτερη ομάδα λάμβανε νιτροζαμίνη (OH-BBN) 1000 ppm στο νερό όπως η πρώτη ομάδα αλλά στις ενδιαμέσες ημέρες αντί για νερό λάμβανε το υδατικό διάλυμα HP εναλλάξ για 6 εβδομάδες, δηλαδή μία ημέρα λάμβαναν υδατικό διάλυμα νιτροζαμίνης και μία υδατικό εκχύλισμα HP. Για τις υπόλοιπες 30 εβδομάδες λάμβαναν μόνο νερό. Η τρίτη ομάδα έλαβε νιτροζαμίνη (OH-BBN) 1000 ppm μέρα παρά μέρα για 6 εβδομάδες και στην συνέχεια στις υπόλοιπες 30 εβδομάδες το υδατικό διάλυμα νιτροζαμίνης καθημερινά. Όλα τα πειραματόζωα παρακολουθήθηκαν στενά και η καθημερινή κατανάλωση νερού με νιτροζαμίνη (OH-BBN) ή του υδατικού εκχυλίσματος HP καταγραφόταν. Όλα τα ποντίκια θυσιάστηκαν την 36η εβδομάδα του πειράματος με χορήγηση αιθέρα. Το πειραματικό πρωτόκολλο φαίνεται στο Σχήμα 4.

Αφαιρέθηκαν οι κύστες τους, διανοίγονταν, μονιμοποιήθηκαν σε φορμαλδεΰδη 10%, τοποθετήθηκαν σε παραφίνη, κόπηκαν σε τομές 3μm και βάφτηκαν με ηωσίνη/αιματοξυλίνη. Οι παθολογοανατομικές αλλοιώσεις του ουροθηλίου αξιολογήθηκαν από δύο ανεξάρτητους παθολογοανατόμους με βάση τα κριτήρια σταδιοποίησης της WHO το 2004.

3.2.4. Παραγωγή διαλυμάτων, εκχυλισμάτων και κλασμάτων του φυτού

3.2.4.1. Υλικά

- Μεθανόλη, διχλωμεθάνη και πετρελαϊκός αιθέρας αποκτήθηκαν από την Lab-Scan Ltd (Δουβλίνο, Ιρλανδία).



Σχήμα 4 Πειραματικό πρωτόκολλο υδατικού εκχυλίσματος του *Hypericum Perforatum L*

- Το διμεθυλσουλφοξειδίο [dimethylsulfoxide (DMSO)] λήφθηκε από την Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Το καλλιεργητικό θρεπτικό υλικό του Eagle τροποποιημένο κατά Dulbecco [Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)], 10% ορό εμβρυϊκών κυττάρων [fetal cell serum (FCS)], πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη, γλουταμίνη, το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (pH 6,5-7,5) (phosphate-buffered saline (PBS) αγοράστηκαν από την GIBCO® /Invitrogen™.
- NBT-II καρκινικά κύτταρα, μέσο κυτταρικής καλλιέργειας EMEM (EBSS), 2mM γλουταμίνης, 1% μη ουσιωδών αμινοξέων [non-essential amino acids (NEAA), 1 mM νατριούχο πυρουβάτη (NaP), 10% ορός εμβρύου βοοειδούς (FBS) αγοράστηκαν από την ECACC (Salsbury, UK).
- Υπερικήνη καθαρότητας 98% καθώς και πυριτικής γέλης (440 πλέγμα, 220 μέγεθος σωματιδίων) αγοράστηκαν από την Fluka (Sigma-Aldrich Hellas Ltd).

Την υπερφορίνη και την ψευδοϋπερφορίνη τις προμηθευτήκαμε από την Alexis Corp. (Λοζάνη, Ελβετία) και ήταν $\geq 97.0\%$ και $\geq 98.0\%$ καθαρότητας αντίστοιχα. Τα προς αποθήκευση διαλύματα με την χρήση των ανωτέρω χημικών παρασκευάστηκαν σε μεθανόλη και αποθηκεύτηκαν στους -5°C .

3.2.5. Διαλύματα, εκχυλίσματα και κλάσματα παρασκευασμάτων

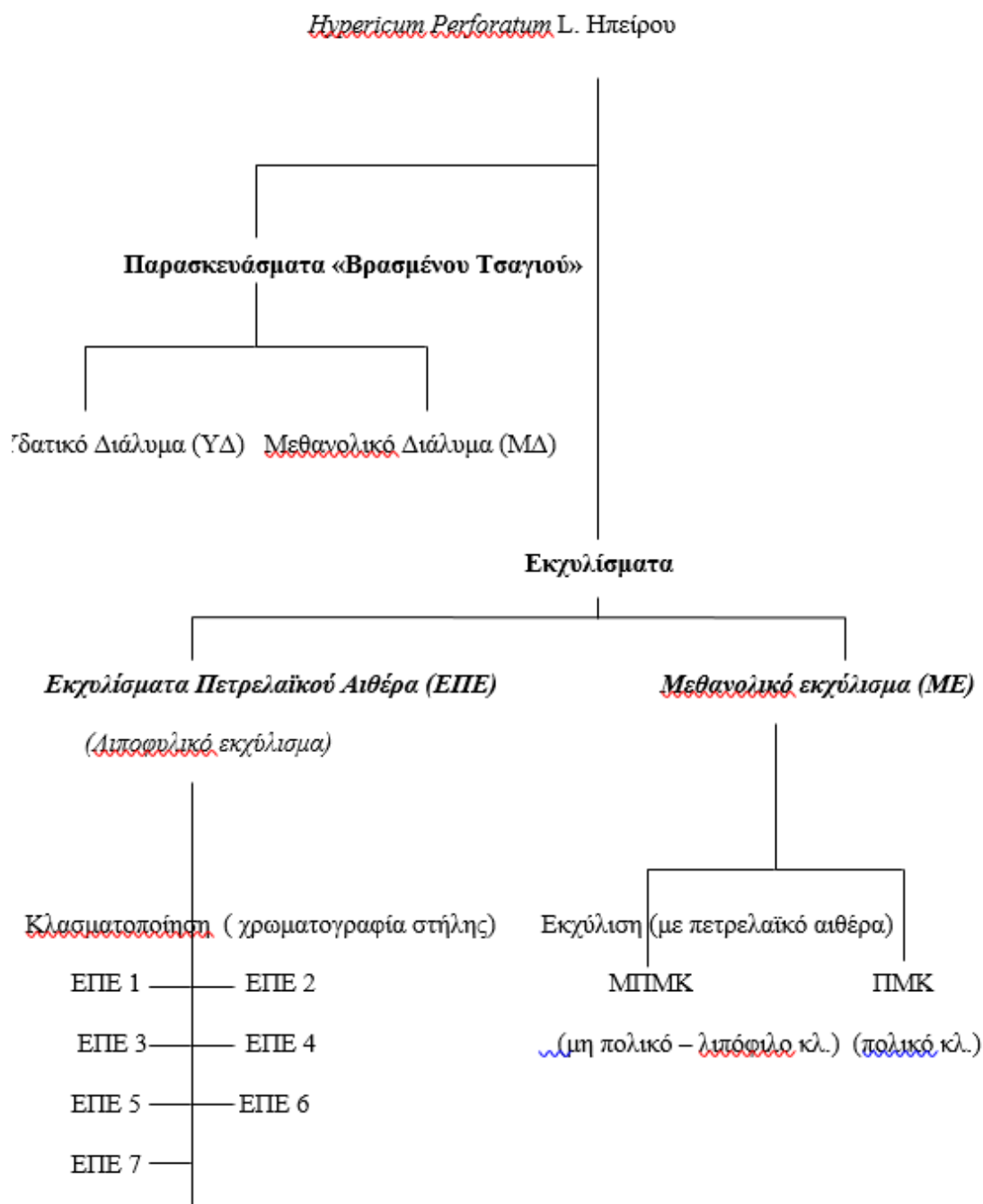
Το υδατικό διάλυμα παρασκευάστηκε προσθέτοντας 9g αποξηραμένου υπέρικου σε 100 ml ισότονου φυσιολογικού ορού στον οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (pH 6,5-7,5) (phosphate-buffered saline (PBS)). Αυτό θερμάνθηκε και αφέθηκε στο σημείο ζέσεως για 30 λεπτά. Μετά την ψύξη του διαλύματος αυτό αποσταλάζεται από στερεά υπολείμματα, φυγοκεντρείται για 10 λεπτά και χρησιμοποιήθηκε για τις πειραματικές δοκιμασίες in vitro την ίδια ημέρα (Υδατικό διάλυμα ΥΔ).

Το μεθανολικό διάλυμα παρασκευάστηκε με παρόμοιο τρόπο, δηλαδή προσθέτοντας 9g αποξηραμένου υπέρικου σε 100ml μεθανόλης, το διάλυμα διατηρήθηκε στο σημείο ζέσεως για 30 λεπτά, αφέθηκε να κρυώσει, φυγοκεντρήθηκε και χρησιμοποιήθηκε για τις in vitro δοκιμασίες την ίδια ημέρα (Μεθανολικό διάλυμα ΜΔ).

Το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού παρασκευάστηκε βράζοντας 10 g αποξηραμένου υπέρικου σε 100 ml μεθανόλης για 30 λεπτά. Το διάλυμα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού μέσω εξάτμισης υπό μειωμένη πίεση, για να προκύψουν 1,1 g εκχυλίσματος, απόδοση (yield) 11% (δηλαδή από 100 gr φυτού πήραμε 11 gr πούδρας) (Μεθανολικό εκχύλισμα ΜΕ).

Δέκα γραμμάρια αποξηραμένου υπέρικου σε 100 ml μεθανόλης βράζονται για 30 λεπτά, διηθούμε και παίρνουμε την υγρή φάση. Κάνουμε τρεις συνεχόμενες εκχυλίσεις με ισόποσο πετρελαϊκό αιθέρα. Παραλαμβάνουμε την μεθανολική φάση και αφαιρούμε τον διαλύτη μέσω κλασματοποίησης χρησιμοποιώντας εκχύλιση υγρού/υγρού με πετρελαϊκό αιθέρα και μεθανόλη από το οποίο προκύπτει το πολικό μεθανολικό κλάσμα (ΠΜΚ) [(polar methanolic fraction (PMF)] σε 90% w/w. Το κλάσμα του πετρελαϊκού αιθέρα συλλέγεται, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού κάτω από μειωμένη πίεση για να μας δώσει 0.1 g μη πολικού μεθανολικού κλάσματος (ΜΠΜΚ) [(non polar methanolic fraction (NPMF)] σε 10% w/w. Η απόδοση του ΠΜΚ και του ΜΠΜΚ από το ολικό μεθανολικό εκχύλισμα είναι 90% και 10% αντίστοιχα.

Το εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα (ΕΠΑ) (λιποφιλικό) (petroleum ether extract) του φυτού παρασκευάστηκε βράζοντας 60 g αποξηραμένου υπέρικου σε 300 ml πετρελαϊκού αιθέρα για 30 λεπτά. Το διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού κάτω από μειωμένη πίεση για να μας δώσει 1.3 g εκχυλίσματος πετρελαϊκού αιθέρα (ΕΠΑ). Αυτό το εκχύλισμα αντιπροσωπεύει τη συνολική λιποφιλική μερίδα του φυτού, αποκτήθηκε με απόδοση 2% w/w μόνο.



Σχήμα 5. Διαδικασίες εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν για το *Hypericum Perforatum* L της Ηλείου

Το ΕΠΑ υποβλήθηκε σε κλασματοποίηση με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας 10% μεθανόλη με ισοκρατική έκλυση διχλωρομεθανίου. Επτά κλάσματα συλλέχθηκαν, συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού και αποθηκεύτηκαν για τις *in vitro* δοκιμασίες. Η όλη ανωτέρω διαδικασία παρουσιάζεται συνοπτικά στο Σχήμα 5.

3.2.6. Προσδιορισμός των Υπερικινών

Ο ορισμός της περιεκτικότητας των ολικών υπερικινών (ναφθοδιανθρονών) πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας την φασματοφωτομετρική διαδικασία που έχει εγκριθεί από την Αμερικάνικη φαρμακοποιία (U.S. Pharmacopoeia (276)).

Μεθανολικά διαλύματα παρασκευάστηκαν για την παραγωγή εκχυλισμάτων / κλασμάτων και ως σημείο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε καθαρή υπερίκίνη. Το ορατό φάσμα το οποίο αποκτήθηκε σε ένα εύρος 450 – 700 nm καταγράφηκε σε UV-Vis Shimadzu φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιώντας μία κυψελίδα με 1 cm μήκους διαδρομής.

3.2.7. Προσδιορισμός χλωροφυλλών

Στα ανώτερα φυτά υπάρχουν κυρίως οι χλωροφύλλες a και b. Ο προσδιορισμός του περιεχομένου των χλωροφυλλών a και b και των συνολικών χλωροφυλλών, που θεωρητικά θα πρέπει να ισούται με το άθροισμα της ποσότητας των χλωροφυλλών a και b, γίνεται με απευθείας μέτρηση της μέγιστης απορρόφησης των κορυφών τους σε μεγάλα μήκη κύματος και η συγκέντρωση υπολογίζεται με χρήση κατάλληλων εξισώσεων. Η κορυφή της χλωροφύλλης a σε μεγάλα μήκη κύματος παρουσιάζει μέγιστο στα 663 nm ενώ της b στα 645 nm. Η ακριβής θέση των κορυφών εξαρτάται και από τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη, οπότε μπορεί να παρατηρηθούν φασματικές αλλαγές με χρήση διαφορετικών διαλυτών.

Ο προσδιορισμός των χλωροφυλλών έγινε σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο της Ένωσης Αναλυτικών Χημικών (Association of Official Analytical Chemists, AOAC). Από κάθε εκχύλισμα φυτού, παρασκευάστηκαν μεθανολικά διαλύματα κατάλληλης συγκέντρωσης (1,0-3,0 mg/ml) και μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 640 nm και στα 663 nm με φασματοφωτόμετρο UV-Vis (UV2100 Shimadzu, Kyoto, Japan) χρησιμοποιώντας μία κυψελίδα με 1 cm μήκους διαδρομής. Η συγκέντρωση των χλωροφυλλών a και b καθώς και των συνολικών χλωροφυλλών υπολογίστηκε με χρήση των παρακάτω γραμμικών εξισώσεων συμμεταβολής [AOAC Official Methods of Analysis]:

$$\text{Συνολικές χλωροφύλλες (mg/l)} = 7,12 A_{663} + 16,8 A_{640}$$

$$\text{Χλωροφύλλη a (mg/l)} = 9,93 A_{663} - 0,777 A_{640}$$

$$\text{Χλωροφύλλη b (mg/l)} = 17,6 A_{640} - 2,81 A_{663}$$

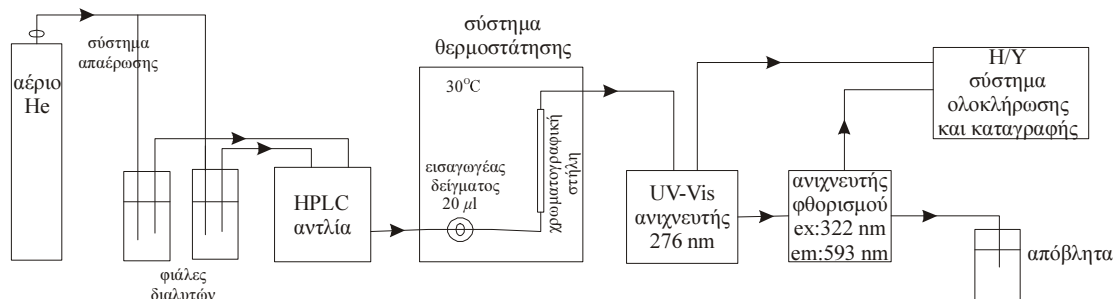
Οι ολικές χλωροφύλλες

3.2.8. Όργανα – Συσκευές

Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Το σύστημα περιλάμβανε αντλία LC-10AD, με 20 μl βρόχο δείγματος, χειροκίνητο Rheodyne σύστημα εισαγωγής δείγματος (7725i, Cotati, CA, USA), μίκτη διαλυτών FCV-10AL, σύστημα θερμοστάτησης CTO-10Avp, ανιχνευτή υπεριώδους - ορατού (UV-Vis) SPD-10AV και ανιχνευτή φθορισμού RF 551. Τα δεδομένα αναλύθηκαν και επεξεργάστηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με το λογισμικό Class-VP, Chromatography Data System, version 4.3. Όλες οι μονάδες της υγρής χρωματογραφίας και το πρόγραμμα ανάλυσης και επεξεργασίας των δεδομένων ήταν της εταιρείας Shimadzu (Duisburg, Germany). Ο διαχωρισμός των συστατικών του υπέρικου έγινε σε στήλη Hypersil ODS (Thermohypersil – Keystone, Cheshire, UK) μήκους 250 mm, εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm και μεγέθους κόκκων 5 μm , θερμοστατημένης στους 300 C.

3.2.9. Προσδιορισμός υπερικίνης, ψευδοϋπερικίνης και υπερφορίνης στα υπέργεια τμήματα του υπέρικου με RP-HPLC

Ο προσδιορισμός υπερικίνης, ψευδοϋπερικίνης και υπερφορίνης στα φυτικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων του υπέρικου έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) σε Hypersil ODS column (250 x 4.6 mm I.D., 5 μm , Thermohypersil-Keystone, Cheshire, UK). Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο σύστημα Shimadzu HPLC. Η σχηματική διάταξη παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.



Σχήμα 6 Σχηματική διάταξη της χρησιμοποιούμενης HPLC

Η έκλυση των συστατικών πραγματοποιήθηκε με ισοκρατική έκλυση με μίγμα (μεθανόλης: οξικού αιθυλεστέρα : ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 2,2) (95:25:5, v/v/v), σε θερμοκρασία 30 °C και με ροή 0,3 ml/min. Β) ισοκρατική έκλυση με μίγμα (76:20:4, v/v), σε θερμοκρασία 30 °C και με ροή 0,3 ml/min. Η κινητή φάση παρασκευαζόταν καθημερινά και πριν τη χρησιμοποίησή της διηθούταν με μεμβράνη νιτρικής κυτταρίνης 0,45 μm σε συσκευή Milli-Q Water Purification System, Millipore. Οι υπερικίνες προσδιορίστηκαν με ανιχνευτή φθορισμού στα 322/593 nm (excitation/emission, ex/em), ενώ η υπερφορίνη με ανιχνευτή UV-Vis στα 276 nm, που ήταν συνδεδεμένος σε σειρά με τον ανιχνευτή φθορισμού. Η ανάκτηση των σημάτων και η επεξεργασία τους για το HPLC σύστημα φέρονταν σε πέρας με το λογισμικό Shimadzu CLASS VP, Version 4.3 Chromatography Software.

3.2.10.Μετρήσεις φθορισμού

Για την διέγερση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα cw Argon ion λέιζερ (Spectra Physics) το οποίο εκπέμπει στα 514nm. Ο ρυθμός ροής της ακτινοβολίας στο δείγμα ήτα 40mW cm². Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μηχανική βαθμίδα x-y-z (New Focus Inc.-A Division of Bookham, Model 9064-XYZ). Για την συλλογή του εκπεμπόμενου φθορισμού χρησιμοποιήθηκε μια πολυτροπική ίνα (500μm πυρήνας + επένδυση). Χρησιμοποιήθηκε ειδικό βάθρο με σκοπό να διασφαλιστεί η ίδια θέση για όλα τα δείγματα όσο αφορά την ακτίνα και την οπτική ίνα. Το αρχικό άκρο της οπτικής ίνας συνδέθηκε σε ένα φασματογράφο (CVI Laser Corporation-Model CM 112), το οποίο ήταν κατάλληλο για το ορατό φως. Μία διάταξη 1024 εικονοστοιχείων (pixels) χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής (CVI Laser Corporation-Model AD 150). Η βαθμονόμηση του μήκους κύματος πραγματοποιήθηκε με λαμπτήρα Hg-Ar. Δείγματα των Μεθανολικού εκχυλίσματος (ME), Πολικού Μεθανολικού Κλάσματος (ΠΜΚ) και της καθαρής υπερικίνης (0.33mg/ml το καθένα) παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις φθορισμού.

3.3. Διερεύνηση του πιο δραστικού παραγώγου του φυτού σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστεως T24 και NBT-II σε συνθήκες σκότους

3.3.1. Δοκιμασία κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Χρησιμοποιήθηκαν:

1. Η T24 ανθρώπινη καρκινική ουροθηλιακή κυτταρική σειρά η οποία προέρχεται από ανθρώπινο καρκίνο ουροδόχου κύστεως Grade III. Τα T24 κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό θρεπτικό υλικό [Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)], εμπλουτισμένο με 1g/L D- γλυκόζης, 10% ορός εμβρύου βοοειδούς, 100 U/mL πενικιλίνης, 100 μg/mL στρεπτομυκίνης και 2 mM γλουταμίνης.
2. Η NBT-II καρκινική ουροθηλιακή κυτταρική σειρά η οποία προέρχεται από αρσενικούς Wistar αρουραίους στους οποίους προκλήθηκε καρκίνος ουροδόχου κύστεως μετά από χορήγηση N-βουτύλ-N-(4-υδροξυβουτύλ) νιτροζαμίνης. Τα NBT-II καρκινικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Minimum Essential Eagle's medium (MEM), εμπλουτισμένο με 2mM γλουταμίνης, 1% απαραίτητα αμινοξέα, 1 mM NaP, 10% ορός εμβρύου βοοειδούς, 100 U/mL πενικιλίνης, 100 μg/mL στρεπτομυκίνης.

Κύτταρα T24 τοποθετήθηκαν σε τριβλία των 12 φρεατίων σε συγκέντρωση 5×10^3 κύτταρα/ml. Μετά από 24 ώρες, σε κάθε φρεάτιο χορηγήθηκε κλάσμα ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), ή ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε ποικίλες ποσότητες, εκφρασμένες σε μl/ml του υδατικού εκχυλίσματος σε PBS με μέγιστο τα 20μl/ml. Σαράντα οκτώ ώρες αργότερα ισόποση ποσότητα των ίδιων δειγμάτων προστέθηκαν ξανά. Καταμέτρηση των κυττάρων έξι ημέρες αργότερα με την βοήθεια ενός Coulter particle counter. Οι τιμές που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών (duplicate determinations) οι οποίες διέφεραν λιγότερο από 10% από την μέση τιμή.

Το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας Μεθανολικό Διάλυμα, αντί του ΥΔ, με μέγιστη συγκέντρωση τα 5μL μεθανόλης/ml μέσου. Σε αυτήν την περίπτωση η χορήγηση στα κύτταρα 5μl μεθανόλης/ml μέσου χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα αναφοράς για αυτό το πειραματικό σκέλος.

Δείγματα του Μεθανολικού Εκχυλίσματος (ME), του Εκχυλίσματος Πετρελαϊκού Αιθέρα (ΕΠΑ) καθώς και κλάσματα του Πολικού Μεθανολικού (ΠΜ) και του Μη Πολικού Μεθανολικού (ΜΠΜ) διαλύθηκαν σε DMSO πριν από την προσθήκη τους στα κύτταρα T24

και NBT-II, σε συγκέντρωση 6.5 mg/ml. Τα κλάσματα του ΕΠΑ (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) διαλύθηκαν επίσης σε DMSO πριν την χορήγησή τους στα T24 κύτταρα. Η επιλεγμένη δραστική συγκέντρωση του ΕΠΑ για το συγκριτικό πείραμα ήταν 6μg/ml. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε για κάθε κλάσμα υπολογίστηκε ως μέρος της συνολικής συγκέντρωσης του ΕΠΑ, αναλογικά με τη συμμετοχή κάθε κλάσματος στη συνολική μάζα που συλλέχτηκε μέσω της στήλης.

Τα κύτταρα έλαβαν κλάσματα ρυθμιστικού διαλύματος, ή ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε διάφορες ποσότητες σε μl/ml των παρασκευασμένων διαλυμάτων DMSO, με μέγιστο τα 6 μl/ml. Σαράντα οκτώ ώρες αργότερα ισόποση ποσότητα δειγμάτων προστέθηκαν πάλι. Η χορήγηση στα κύτταρα των 6 μl DMSO /ml μέσου χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου για όλα τα παραπάνω πειράματα.

Η υπερφορίνη διαλύθηκε σε μεθανόλη πριν την χορήγησή στα T24 κύτταρα με συγκέντρωση 1 mg/ml. Τα κύτταρα έλαβαν είτε κλάσματα από ρυθμιστικό διάλυμα, είτε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε διάφορες ποσότητες εκφρασμένες σε μl/ml του παρασκευασμένου μεθανολικού διαλύματος, με μέγιστη συγκέντρωση τα 5 μl/ml. Χορήγηση στα κύτταρα 5μl μεθανόλης / ml μέσου χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου σε αυτήν την περίπτωση.

Τα αποτελέσματα όλων των πειραμάτων εκφράστηκαν ως ποσοστό της μείωσης του αριθμού των κυτταρικών αποικιών, όταν συγκρίνονταν με τις ομάδες ελέγχου κάθε διαλύματος.

3.3.2. Δοκιμασία TUNEL

Οι πρώιμες διασπάσεις της αλυσίδας του DNA κατά την διαδικασία της απόπτωσης αποτιμήθηκαν την δοκιμασία TUNEL με την χρήση του ApopTagR Peroxidase In Situ Apoptosis Detection kit (Intergen, Serologicals company, USA). Επιτράπηκε στα T24 και στα NBT-II καρκινικά κύτταρα να αναπτυχθούν και να προσκολληθούν σε καλυπτρίδες. Κατόπιν συγκεντρώσεις εκχυλίσματος πετρελαϊκού αιθέρα από 3 έως 12 μg/ml προστέθηκαν σε κάθε κυτταρική σειρά. Σαράντα οκτώ ώρες αργότερα ισόποσες συγκεντρώσεις προστέθηκαν ξανά. Η δοκιμασία TUNEL διενεργήθηκε μετά από 6 ημέρες, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Ο αποπτωτικός δείκτης υπολογίστηκε σε όλη την επιφάνεια της καλυπτρίδας σε μεγέθυνση 400x. Ως αποπτωτικός δείκτης ορίστηκε το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων σε σχέση με το συνολικό αριθμό των κυττάρων.

Η ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς ανάμεσα στον κυτταρικό θάνατο και τα αποτελέσματα τις δοκιμασίας TUNEL διερευνήθηκε με την βοήθεια της ακριβής δοκιμασίας του Fisher (Fisher's exact test) χρησιμοποιώντας το λογισμικό SPSS 13.

3.4. Διερεύνηση φωτοδυναμικής δράσης του Πολικού Μεθανολικού Κλάσματος

3.4.1. Επίδραση μονοχρωματικού φωτός-λείζερ στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων T24 και RT4

3.4.1.1. Εκχύλισμα *Hypericum perforatum L.* και Photofrin®

Το ΠΜΚ παρασκευάστηκε από αποξηραμένο φυτό με τον τρόπο που έχει περιγραφεί προηγουμένως κεφάλαιο 3.2. Το Photofrin® (νατριούχος πορφιμερ (porfimer sodium), το οποίο το παρείχε η Axcan ScandiPharm Inc., Birmingham, AL, USA), ανασυστάθηκε με χρήση 5% υδατικού διαλύματος δεξτρόζης υπό χαμηλό φωτισμό και αποθηκεύτηκε στους -10 °C σε συνθήκες σκότους έως την χρήση του.

Προκειμένου να προσδιορίσουμε την κυτταροτοξική δράση του ΠΜΚ εκχυλίσματος κατά την φωτοδυναμική θεραπεία έναντι του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, κύτταρα T24 ή RT4 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI-1640 το οποίο εμπλουτίστηκε με 10% ορό εμβρύου μόσχου, 100 U/mL πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη 100 mg/ml και 2 mM, (όλα λήφθηκαν από την Gibco, Life technologies BRL), στους 37 °C σε 5% CO₂ και σε πλήρως υγραποιημένη ατμόσφαιρα.

3.4.1.2. Πηγές φωτός

Η πηγή ακτινοβολίας προέρχεται από λείζερ αντλίας χρωματογραφίας αργού (argon-pumped dye) (Kiton Red) (Lamda Plus, Conerent Inc., Mountain View, CA, USA). Το λείζερ χρησιμοποιήθηκε σε λειτουργία μονής γραμμής στα 630 nm μήκους κύματος, με την ακτίνα να κατευθύνεται, μέσω μίας οπτικής ίνας χαλαζία 200-μm, η οποία είχε προσαρμοστεί σε 0.5 μικροφακό (micro lens), στα πλακίδια κυτταρικής καλλιέργειας τα οποία περιείχαν τα προς ακτινοβολία κύτταρα.

3.4.1.3. Φωτοευαισθητοποίηση

Καρκινικά κύτταρα T24 ή RT4, 5×10^5 κύτταρα, τοποθετήθηκαν σε τριβλίο διαμέτρου 35mm, επιτρέποντάς τους να φτάσουν συρροή 75%. Στη συνέχεια προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ΠΜΚ ή 4μg/ml Photofrin® και η επώαση συνεχίστηκε στο σκοτάδι για 24 ώρες. Ακολούθησε αλλαγή του θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με δέσμη λέιζερ μήκους κύματος 630 nm ενέργειας 0, 1, 2, 4 και 8 J/cm². Η δέσμη του λέιζερ φωτός κατευθύνθηκε, μέσω ενός μικροφακού, έτσι ώστε να προσβάλλει ομοιόμορφα την φιάλη κυτταροκαλλιέργειας από κάτω. Ο φακός διέστειλε την διάμετρο της δέσμης στα 35 mm διάμετρο έτσι ώστε να καλύπτει πλήρως όλη την επιφάνεια. Το τριβλίο τοποθετήθηκε σε έναν πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο, έτσι ώστε να κατευθύνεται το δείγμα με σκοπό να πετύχουμε ομοιογενή έκθεση των κυττάρων στο λέιζερ κατά την διάρκεια της ακτινοβολήσης. Το συνολικό στήσιμο της πειραματικής διαδικασίας, εκτός από το λέιζερ, είχε τοποθετηθεί σε ένα ειδικό μεταλλικό κουτί, το οποίο επέτρεπε την παρατήρηση του ακτινοβολούμενου δείγματος και ταυτόχρονα παρακάλυε το σκεδαζόμενο φως του λέιζερ από την διάχυσή του στο περιβάλλον.

Μετά από επώαση των κυττάρων για 48ώρες, η βιωσιμότητα τους αποτιμήθηκε χρησιμοποιώντας την 3-(4,5 – διμεθυλθειαζολ-2)-2,5-διφαινυλτετραζόλιο του βρωμίου (MTT)) δοκιμασία (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) με την δοκιμασία ξηρής μείωσης. Το MTT διαλύθηκε σε PBS (0.01 M, pH 7.4) και προστέθηκε στα κύτταρα (1 mg/mL), και τα τριβλία επώαστηκαν στους 37°C για 4 ώρες. Το MTT αφαιρέθηκε προσεκτικά και οι κρύσταλλοι φαρμαζανης (formazan) που προέκυψαν διαλύθηκαν σε διάλυμα 100 mL of DMSO.

Η αρχή λειτουργίας της δοκιμασίας είναι ότι για τα περισσότερα ζώντα κύτταρα η μιτοχονδριακή δραστηριότητα είναι σταθερή και έτσι μία αύξηση ή μείωση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων είναι ευθέως ανάλογη γραμμικά με την μιτοχονδριακή δραστηριότητα. Η μιτοχονδριακή δραστηριότητα των κυττάρων αντικατοπτρίζεται από την μετατροπή του άλατος του MTT τετραζολίου σε κρύσταλλους φορμαζάνης οι οποίοι μπορούν να διαλυτοποιηθούν για ομοιογενή μέτρηση και εμφανίζουν πορφυρό χρώμα, με μια απορρόφηση στο 570nm. Όταν τα κύτταρα πεθαίνουν, τότε χάνουν την ικανότητα να μετατρέπουν το MTT σε φορμαζάνη, έτσι ο σχηματισμός του πορφυρού χρώματος χρησιμεύει ως ένας βολικός και χρήσιμος δείκτης των ζωντανών κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο οποιαδήποτε αύξηση ή μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων μπορεί να ανιχνευθεί μετρώντας τη συγκέντρωση φορμαζάνης μέσω της οπτικής αντανάκλασης σε οπτική πυκνότητα χρησιμοποιώντας ένα καταγραφέα στα 540 και 720nm.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκφράστηκαν ως το ποσοστά της μείωσης του αριθμού των κυτταρικών αποικιών, σε σύγκριση πάντα με το δείγμα αναφοράς ανά περίπτωση. Σε όλα τα πειράματα τα δείγματα ελέγχου επώαστηκαν με την ίδια ποσότητα διαλύματος φωτοευαισθητοποιητή αλλά δεν ακτινοβολήθηκαν με φως. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

3.4.1.4. Κυτταρομετρία ροής (FACS analysis)

Για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, T24 κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τριβλία διαμέτρου 10 εκ, με συγκέντρωση 2×10^6 κύτταρα/τριβλίο, όπως περιγράφηκε πιο πάνω. Πολικό Μεθανολικό Κλάσμα προστέθηκε, σε συγκέντρωση 60μg/ml, και η επώαση συνεχίστηκε στους 37 °C στο σκοτάδι για 24 ώρες πριν την ακτινοβολήση με λέιζερ μήκους κύματος 630 nm με ενέργεια 0 ή 4 J/cm². Μετά από επώαση 48 ωρών, κύτταρα που επέπλεαν ή είχαν προσκολληθεί συλλέχθηκαν μέσω θρυψινοποίησης, ομαδοποιήθηκαν, και εκπλύθηκαν τρεις φορές με παγωμένο PBS. Ένα κλάσμα των εκπλυμένων κυττάρων χρωματίστηκε με trypan blue και καταμετρήθηκε για να εκτιμηθεί η κυτταρική βιωσιμότητα. Τα κύτταρα προσαρμόστηκαν σε συγκέντρωση ενός εκατομμυρίου κυττάρων ανά ml και μονιμοποιήθηκαν με μία σχέση 2:1 (v/v) σε παγωμένη μεθανόλη κατά την διάρκεια της νύκτας. Στη συνέχεια βιάφτηκαν με propidium iodide (Sigma-Aldrich Ltd, St. Louis, MO, USA) παρουσία RNAσης. Η κατανομή του κυτταρικού κύκλου αναλύθηκε με την βοήθεια του EPICS XL-MCL κυτταροροόμετρου της Becton Dickinson (San Jose, CA, USA), και ένα ελάχιστο 5×10^3 κεχρωσμένων κυττάρων ανά τριβλίο και αναλύθηκαν για κάθε πειραματική διαδικασία. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του λογισμικού Cell – Quest cell cycle analysis software.

3.4.1.5. DNA κατάτμηση

Τα κύτταρα T24 ή τα RT-4 καλλιεργήθηκαν σε τριβλία 100mm, με μία συγκέντρωση 10^6 κυττάρων ανά τριβλίο, όπως περιγράφηκε πιο πάνω. Τα κύτταρα επώαστηκαν με 60 μg/ml ΠΜΚ ή 4 μg/ml Photofrin στο σκοτάδι για 24ώρες πριν την ακτινοβολήσή τους με φως λέιζερ, μήκους κύματος 630 nm, ισχύος είτε 0 είτε 8 J/cm². Τα κύτταρα συλλέχτηκαν μέσω απόξεσης, εκπλύθηκαν δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffer saline PBS) και φυγοκεντρήθηκαν. Η απομόνωση του

DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλου κιτ, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, (Oncogene Kit #AM41, EMD Biosciences, San Diego, CA, USA). Οι συγκεντρώσεις DNA προσδιορίστηκαν μέσω της φασματοσκοπίας απορρόφησης στα 280/260 nm. Απομονωμένα δείγματα DNA διαχωρίστηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε 1.5% γέλης αγαρόζης ενώ οι ζώνες ηλεκτροφόρησης οπτικοποιήθηκαν μέσω τιτλοφόρησης με βρομιούχου εθιδίου (ethidium bomite labeling) (EMD Biosciences, San Diego, CA). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν εδώ ανιχνεύουν κατακερματισμό του DNA σε αποπτωτικά κύτταρα.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές. Χρησιμοποιήθηκε το Student's test καθώς η ανάλυση παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας το λογισμικό SPSS 13. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής. Κάθε δείγμα ελέγχθηκε εις τριπλούν.

3.4.2. Με φωτοδιέγερση λευκού φωτός σε καρκινικά κύτταρα T24

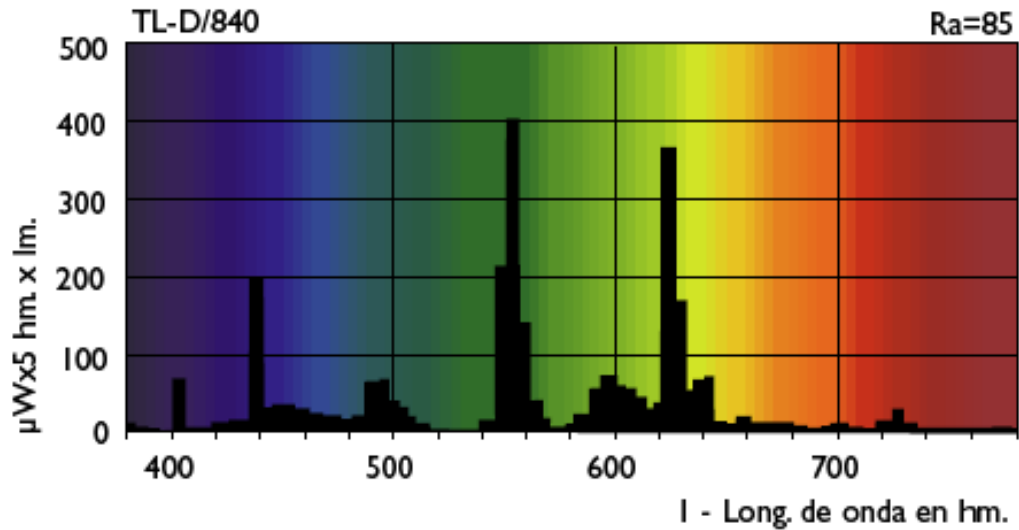
3.4.2.1. Καρκινικά κύτταρα

Χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα T24 υψηλού Grade μεταστατικού καρκίνου εκ μεταβατικού επιθηλίου. Η προέλευσή της κυτταρικής σειράς καθώς και ο τρόπος καλλιέργειας αυτής έχει περιγραφεί στο υποκεφάλαιο 6.3.1.1.2

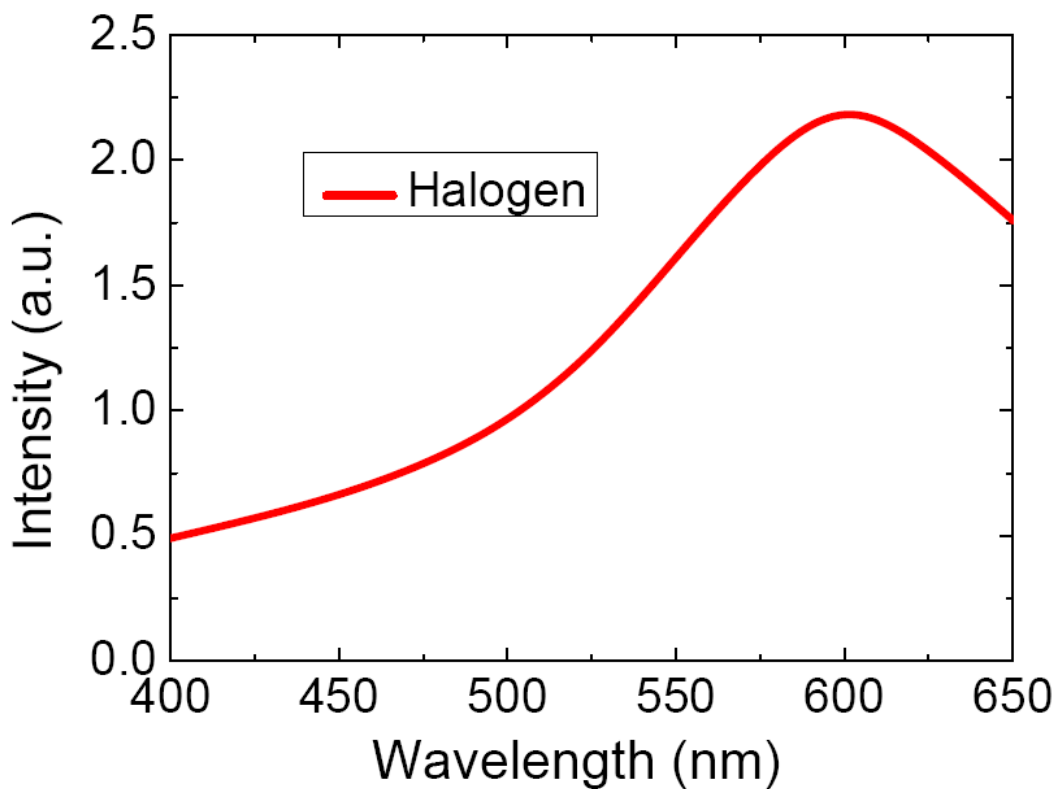
3.4.2.2. Πηγές φωτός

Για να διερευνήσουμε τη φωτοδυναμική δράση του ΠΜΚ μετά από διέγερση με λευκό φως χρησιμοποιήσαμε δύο πηγές φωτός με διαφορετικά χαρακτηριστικά εκπομπής Εικόνες 3 και 4 αντίστοιχα:

- I. **Λάμπα υδραργύρου χαμηλής πίεσης (TL-D Super 80 New generation, Philips)**
- II. **Πηγή αλογόνου της Storz 150W**



Εικόνα 3 Φάσμα εκπομπής της λάμπας υδραργύρου Philips TL-D/840. Σημειώνεται ασυνέχεια του φάσματος



Εικόνα 4 Φάσμα εκπομπής της λάμπας αλογόνου 150W που χρησιμοποιείται στην πηγή φωτισμού Karl Storz

Η χορήγηση του φωτός από την πηγή αλογόνου της Storz γινόταν μέσω καλωδίου οπτικών ινών (Karl Storz 81584 GW) το οποίο χρησιμοποιείται για την μεταφορά φωτός από την φωτεινή πηγή στην οπτική κατά των ουρολογικών επεμβάσεων. Το καλώδιο είχε σταθεροποιηθεί σε ύψος 15mm πάνω το ειδικό τριβλίο με την βοήθεια ειδικού τρίποδα συγκράτησης. Μεταξύ του τριβλίου και της οπτικής ίνας παρεμβάλλονταν μεταλλικό διάφραγμα το οποίο είχε διατομή 6.58mm, όση και η διατομή του κάθε φρεατίου του τριβλίου. Το τριβλίο μετακινούνταν έτσι ώστε η φωτεινή δέσμη να πέφτει αποκλειστικά σε ένα φρεάτιο κάθε φορά.

3.4.2.3. Φωτοεναισθητοποίηση και φωτοδιέγερση

Τα καρκινικά κύτταρα T24 επιστρώθηκαν στα ειδικά τριβλία των 96 φρεατίων, σε συγκέντρωση 2×10^4 κύτταρα /φρεάτιο και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο 0.1 mL DMEM (περιείχε 10% FBS και 1% διάλυμα πενικιλίνης / στρεπτομυκίνης). Την επόμενη ημέρα προστέθηκε είτε ΠΜΚ 40μg (1^η ομάδα) είτε ΠΜΚ 80μg (2^η ομάδα), ενώ ως ομάδα ελέγχου θεωρήθηκαν τα τριβλία που περιείχαν μόνο κύτταρα και θρεπτικό υλικό. Ο τελικός όγκος του θρεπτικού υλικού σε κάθε φρεάτιο, ανεξαρτήτως ομάδας, ήταν 0.1 mL. Μετά από επώαση 24ωρών στο σκοτάδι έγινε αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με 10% FCS και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Ακολούθησε φωτοδιέγερση με λευκό φως. Η ενέργεια που χορηγήθηκε και στις δύο ομάδες ΠΜΚ από την λάμπα υδραργύρου χαμηλής πίεσης ήταν 310, 620, 1240, 4650 J/cm², ενώ από την πηγή αλογόνου της Storz χορηγήθηκε ενέργεια 300, 600, 900 J/cm². Στις ομάδες ελέγχου ανά ομάδα ΠΜΚ, οι οποίες περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό, χορηγήθηκε η μέγιστη ενέργεια φωτός ανά είδος λάμπας, δηλαδή 4650 J/cm² από την λάμπα υδραργύρου χαμηλής πίεσης και 900 J/cm² από την πηγή αλογόνου.

3.4.2.4. Δοκιμασία MTT

Μετά από επώαση των κυττάρων για 48ώρες, η βιωσιμότητα τους αποτιμήθηκε χρησιμοποιώντας την 3-(4,5 - διμεθυλθειαζολ-2)-2,5-διφαινυλτετραζόλιο του βρωμίου (MTT) δοκιμασία (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Περιγραφή της δοκιμασίας γίνεται στο κεφάλαιο 6.3.1.1.4. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκφράστηκαν ως το ποσοστά της μείωσης του αριθμού των κυτταρικών αποικιών, σε σύγκριση πάντα με τις αποικίες αναφοράς ανά περίπτωση. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

3.4.2.5. Κυτταρομετρία ροής (FACS analysis)

Στα κύτταρα T24 χορηγήθηκε ΠΜΚ σε συγκεντρώσεις 10 µg/ml, 20 µg/ml και 40 µg/ml. Μετά από καλλιέργεια 24 ωρών, έγινε αλλαγή του μέσου και φωτοβολήθηκαν με 600 Joules/cm². Τα κύτταρα επώαστηκαν για 48ώρες και μετά πραγματοποιήθηκε η κυτταρομετρία ροής όπως περιεγράφηκε στο κεφάλαιο 6.3.1.1.5. Ως ομάδες αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία δεν υποβλήθηκαν σε έκθεση στο φως ή στο ΠΜΚ και έτερη ομάδα αναφοράς κύτταρα που φωτοβολήθηκαν με 600 Joules/cm² χωρίς χορήγηση ΠΜΚ.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές. Χρησιμοποιήθηκε το Student's test καθώς η ανάλυση παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας το λογισμικό SPSS 13. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής. Κάθε δείγμα ελέγχθηκε εις τριπλούν.

3.4.3. Εντόπιση του προκαλούμενου από την υπερικήνη φθορισμού μετά από έγχυση του Πολικού Μεθανολικού Κλάσματος του *Hypericum Perforatum L* σε φυσιολογικό ουροθήλιο θηλυκών αρουραίων Wistar

3.4.3.1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί αρουραίοι Wistar, βάρους 220 – 250 gr, οι οποίοι κρατήθηκαν κάτω από φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας, φωτός και υγρασίας. Όλες οι διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν στα πειραματόζωα ήταν σε συμφωνία με τις ρυθμίσεις και νόμους της χώρας και της Ευρωπαϊκής Ενώσεως. Τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 0.1 ml/100 g b.w. διαλύματος Κεταμίνης και Ξυλαζίνης (1.5 ml από 100 mg/ml Ξυλαζίνης και 10 ml από 100 mg/ml Κεταμίνης) και τοποθετήθηκαν σε ύπτια θέση σε ειδικό πάγκο εργασίας (animal board). Αμέσως μετά την αναισθησία ακολούθησε καθετηριασμός και κένωση της ουροδόχου κύστεως με φλεβοκαθετήρα 16 gauge. Τους χορηγήθηκε αντιβίωση αμοξυκιλίνης 25mg (1ml από διάλυμα 125mg/5ml Amoxil) πριν τη νάρκωση. Μετά την ανάνηψη τοποθετούνταν 5ml της ίδιας συγκέντρωσης σε 50ml νερού στο δοχείο το οποίο άλλαζε ανά 12ωρο για τέσσερις ημέρες.

3.4.3.2. Φωτοευαισθητοποιητής

Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ενδοκυστική έγχυση ΠΜΚ. Η παραγωγή του ΠΜΚ περιγράφεται στο κεφάλαιο 6.1.2.

3.4.3.3. Χορήγηση Φωτοευαισθητοποιητή

Το ακόλουθο πειραματικό μοντέλο εφαρμόστηκε στην προσπάθεια για αναγνώριση του συνδυασμού της ελάχιστης συγκέντρωσης και του ελάχιστου διαστήματος ενδοκυστικής παραμονής του ΠΜΚ έτσι ώστε να πετύχουμε ικανή ένταση φθορισμού της υπερικίνης για ανίχνευσή της στο τοίχωμα της ουροδόχου κύστεως.

Η πειραματική διαδικασία είχε σαν αφετηρία την μέγιστη συγκέντρωση ΠΜΕ, δηλαδή τα 36.5 mg/ml, τα οποία περιείχαν 500 μg/ml υπερικινών. Αποφασίστηκε ως μέγιστο διάστημα ενδοκυστικής παραμονής τα εξήντα λεπτά. Σε κάθε νέα ομάδα αρουραίων θα υπήρχε σταδιακή μείωση της ενδοκυστικής παραμονής του ΠΜΕ καθώς και μείωση της συγκέντρωσής του στα 250μg/ml υπερικινών ώστε να προκύψει ο ιδανικός συνδυασμός χαμηλής συγκέντρωσης χορηγούμενης ουσίας - βραχύτερης δυνατής ενδοκυστικής παραμονής του ΠΜΕ, ο οποίος συνδυασμός να παράγει ικανή ένταση φθορισμού.

Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ενδοκυστική έγχυση ΠΜΚ. Εξήντα θηλυκοί αρουραίοι χρησιμοποιήθηκαν χωρισμένοι, πέντε ανά ομάδα μελέτης. Μετά τον καθετηριασμό και την κένωση της ουροδόχου κύστης των αρουραίων, με φλεβοκαθετήρα 16 gauge, εγχύθηκε 0.2 ml διάλυμα ΠΜΚ το οποίο περιείχε είτε 500μg/ml είτε 250μg/ml υπερικινών. Η διάρκεια ενδοκυστικής παραμονής κυμαίνονταν από 15 λεπτά έως μία ώρα. Μετά την παρέλευση του χρονικού διαστήματος παραμονής, που αναλογούσε σε κάθε ομάδα μελέτης, οι κύστεις κενώθηκαν και εκπλύθηκαν δύο φορές, μέσω του καθετήρα, με φυσιολογικό ορό. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε ο καθετήρας.

3.4.3.4. Εντοπισμός της υπερικίνης στο τοίχωμα της ουροδόχου κύστεως

Τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν είτε άμεσα μετά το πέρας της έκπλυσης, είτε μετά από 1, 2, 4, 6 και 24 ώρες. Πέντε αρουραίοι αφέθηκαν ακέραιοι για να επιβιώσουν. Στους αρουραίους που θυσιάστηκαν, οι ουροδόχες κύστεις τους αφαιρέθηκαν, διανοίχτηκαν και άμεσα μονιμοποιήθηκαν σε ειδικό μέσο (Tissue Tek embedding medium, Miles Inc, Elkhart, IN), ενώ ακολούθησε βύθισή τους σε υγρό άζωτο. Με την βοήθεια του κρυστάτη

λήφθηκαν δύο συνεχόμενες τομές επί κατεψυγμένου υλικού (frozen sections) πάχους 3-μm έκαστη. Η πρώτη τομή εξετάστηκε με την βοήθεια του μικροσκοπίου φθορισμού και η δεύτερη τομή χρωματίστηκε με την βοήθεια αιματοξυλίνης και ηωσίνης.

Ο φθορισμός των υπερικινών, στο φυσιολογικό ουροθήλιο της ουροδόχου κύστεως, αξιολογήθηκε με την χρήση του μικροσκοπίου φθορισμού Axioscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Σε αυτό ο φωτισμός επιτυγχάνεται με την βοήθεια λάμπας υδραργύρου 100W, φέρει μία κάμερα Zeiss με Διάταξη Συζευγμένου Φορτίου (CCD, Charge Coupled Device) και η επεξεργασία των δεδομένων γίνεται με την βοήθεια του λογισμικού ISIS. Στο σύνολο περιλαμβάνονταν ζωνοπερατό (bandpass) φίλτρο διέγερσης στα 535/50 nm και ένα ζωνοπερατό φίλτρο εκπομπής στα 610/75 nm. Η ένταση του φθορισμού καταγράφονταν και οι απεικονίσεις αποθηκεύονταν και αναλύονταν άμεσα με το πρόγραμμα λογισμικού Quantity One software programm, Discovery Series, Bio-Rad company.

Οι μετρήσεις του φθορισμού της υπερικίνης, και κατ' επέκταση της συγκέντρωσής στο κυστικό τοίχωμα έγιναν με δύο μεθόδους:

1) Μετρήσεις της έντασης διέγερσης πραγματοποιήθηκαν κατά μήκος ευθείων γραμμών που τραβήχτηκαν, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να περιλαμβάνουν όλο το κυστικό τοίχωμα: το ουροθήλιο, τον αυλό της ουροδόχου και τον μυϊκό. Για αντικειμενικούς λόγους, σε κάθε τομή που μελετήθηκε στο μικροσκόπιο φθορισμού, τραβήχτηκαν από τρεις γραμμές, οι οποίες τέμνανε κάθετα τους ιστούς έτσι ώστε να περιλαμβάνουν περιοχές με υψηλές και χαμηλές εντάσεις. Για τη σύγκριση και παρουσίαση των πειραματικών αποτελεσμάτων συγκρίθηκαν οι μέσες τιμές αυτών. Απώτερος σκοπός ήταν να καταγραφούν κατά μήκος της γραμμής οι διαφορές στην ένταση φθορισμού της υπερικίνης μεταξύ των ανατομικών δομών του κυστικού τοιχώματος, καθώς και του αυλού τους, ώστε να αναδειχθεί τυχόν διάχυση της υπερικίνης από το ουροθήλιο προς το μυϊκό τοίχωμα όσο αυξάνεται η ενδοκυστική της παραμονή.

2) Μετρήθηκε συνολικά, δηλαδή στο σύνολο του εμβαδού, και η ένταση του φθορισμού μεταξύ των ανατομικών δομών της ουροδόχου, δηλαδή αυλός, ουροθήλιο και μυϊκός, καθέναν ξεχωριστά, ώστε οι διαφορές στη συγκέντρωση της υπερικίνης να αποτυπωθούν πιο αντικειμενικά.

Οι τιμές έντασης φθορισμού που θα προκύψουν από κάθε ανατομική δομή θα συγκριθούν μεταξύ τους. Ως τιμή αναφοράς θα είναι ο όποιος φθορισμός ανιχνευτεί στον αυλό της ουροδόχου, και αυτό γιατί θα έχει εκπλυθεί δύο φορές, όπως αναφέρεται

παραπάνω, και κατά συνέπεια θα έχει την ελάχιστη έως μηδενική συγκέντρωση υπερικίνης. Για τη σύγκριση και παρουσίαση των πειραματικών αποτελεσμάτων συγκρίθηκαν οι μέσες τιμές αυτών.

3.4.4. Αποτίμηση της φωτοδυναμικής δράσης του ΠΜΚ μετά από βραχεία ενδοκυστική έγχυση και φωτοδιέγερση με λευκό φως σε θηλυκούς αρουραίους Wistar

3.4.4.1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί αρουραίοι Wistar, βάρους 220 – 250 gr. Οι συνθήκες κράτησής τους, ο τρόπος αναισθησίας περιγράφονται στο κεφάλαιο 6.5.3.1. Αμέσως μετά την αναισθησία ακολούθησε καθετηριασμός και κένωση της ουροδόχου κύστεως με φλεβοκαθετήρα 16 gauge.

3.4.4.2. Φωτοευαισθητοποιητής

Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ενδοκυστική έγχυση ΠΜΚ. Η παραγωγή του ΠΜΚ περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.2. Η συγκέντρωση του ΠΜΚ που επιλέχθηκε ήταν 18,25 mg/ml τα οποία περιείχαν 250μg/ml υπερικινών. Μετά την κένωση της ουροδόχου, χορηγήθηκε 0,2 ml του παραπάνω διαλύματος μέσω του καθετήρα. Το διάλυμα παρέμεινε στην ουροδόχο κύστη για 15 λεπτά. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος η ουροδόχος κενώθηκε και εκπλύθηκε 2 φορές με ισόποσο φυσιολογικό ορό (0,2 ml). Η συγκέντρωση και το διάστημα ενδοκυστικής παραμονής του φωτοευαισθητοποιητή επιλέχτηκε βάση των προηγούμενων μελετών που έχουν αναφερθεί (Βλέπε αποτελέσματα 7.5.2).

3.4.4.3. Φωτοδυναμική θεραπεία

Για την φωτοδιέγερση χρησιμοποιήθηκε λευκό φως από πηγή αλογόνου της Storz 150W.

Αποφασίστηκε το φως να χορηγηθεί με δύο τρόπους:

1. Μετά από χειρουργική προσπέλαση (λαπαροτομία). Πραγματοποιήθηκε επιμήκης διάνοιξη της ουροδόχου κύστης και φωτοβολήθηκε μέσω του ειδικού καλωδίου οπτικών ινών, το οποίο χρησιμοποιείται για την μεταφορά φωτός από την φωτεινή πηγή στην οπτική κατά τις ενδοσκοπικές επεμβάσεις. Αμέσως μετά την νάρκωση των αρουραίων, το κοιλιακό τοίχωμα διανοίγεται με τομή 3εκ., στο υπογάστριο, ακριβώς

πάνω από την περιοχή της ουροδόχου κύστεως. Η ουροδόχος προσπελάστηκε, μετά από παρασκευή. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των διαστάσεων της κύστεως, δηλαδή μήκος, πλάτος και ύψος, μετά από πλήρωσή της με 0,2ml διαλύματος ΠΜΚ. Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν στο επόμενο βήμα. Μετά την ενδοκυστική παραμονή του ΠΜΚ για 15 λεπτά και την ακόλουθη έκπλυση της ουροδόχου, γίνεται επιμήκης διάνοιξη της με νυστέρι Nr15. Τοποθετήθηκαν οδηγά ράμματα 5.0 Nylon για την πληρέστερη έκπτυξη της. Ακολούθως, φωτοβολήθηκε, μέσω του ειδικού καλωδίου, από απόσταση 0,5cm, με ενέργεια 480 J/cm². Μετά το πέρας της φωτοδυναμικής θεραπείας η ουροδόχος αποκαταστάθηκε με διακεκομμένες ραφές Prolene 5.0. Έγινε αποκατάσταση του κοιλιακού τοιχώματος με διακεκομμένες ραφές Vicryl 3.0 ενώ το δέρμα συρράφτηκε με Rapid Vicryl 3.0. Οι αρουραίοι αφέθηκαν να ανανήψουν.

2. Το φως διοχετεύτηκε στην ουροδόχο κύστη μέσω μίας ειδικής οπτικής ίνας η οποία έφερε στο άκρο της σφαιρικό διαχυτή. Η πυκνότητα ενέργειας (Watts/cm²) του λευκού φωτός καταμετρήθηκε σε μία απόσταση 0,25 εκ. από τον διαχυτή, προσομοιάζοντας, με αυτό τον τρόπο, την απόσταση από το τοίχωμα της κύστεως. Η μέση διάμετρος της φυσιολογικής ουροδόχου κύστεως αρουραίου υπολογίστηκε σε πτωματικές κύστεις, μετά από πλήρη πλήρωση τους με 0,25 ml φυσιολογικού ορού, και βρέθηκε 0,5 εκ. Η ακτινοβολία της ουροδόχου γινόταν ως εξής: μετά την πλήρη είσοδό της στην ουροδόχο κύστη, δηλαδή έως να βρούμε αντίσταση, έλκονταν η ίνα 0,25 εκ. πίσω και ξεκινούσε η χορήγηση λευκού φωτός. Η ενέργεια που χορηγήθηκε και ο χρόνος που μεσολάβησε μετά την ΦΔΘ παρουσιάζονται στον πίνακα 11. Υπήρξε μία ομάδα αναφοράς τριών αρουραίων στην οποία χορηγήθηκε μόνο το μέγιστο της ενέργειας, δηλαδή 700 Joules/cm².

3.4.4.4. Ανίχνευση της απόπτωσης

Οι πρώιμες διασπάσεις της αλυσίδας του DNA αποτιμήθηκαν με την μέθοδο TUNEL χρησιμοποιώντας το ApopTag® Peroxidase In situ Apoptosis Detection kit (Integren, Serologicals Company, USA).

Για να προσδιορίσουμε το αποπτωτικό μονοπάτι το οποίο ενεργοποιείται υποβλήθηκαν οι παθολογοανατομικές καλύπτρες σε ανοσοϊστοχημική ανάλυση μετά από επεξεργασία με ειδικό αντίσωμα [BD Pharmingen™ Caspase-3 (Catalog Number 559565)], για την ανίχνευση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης κασπάσης 3. Το συγκεκριμένο εμφανίζει

αντιδραστικότητα τόσο σε ανθρώπινους ιστούς όσο και αρουραίων. Ως αποπτωτικά κύτταρα ορίστηκαν τα κύτταρα τα οποία ήταν μορφολογικά ακεραία, είχαν χρωματιστεί θετικά με την διαδικασία TUNEL (TUNEL-positive cells) ή κατά την μικροσκόπηση μετά από χρώση αιματοξυλίνης & ηωσίνης, είχαν χαρακτηριστικά απόπτωσης, δηλαδή κύτταρα με συμπυκνωμένη, υπερχρωματική, δίκην δακτυλίου, μηνοειδή ή δίκην χάνδρας χρωματίνη, η οποία μπορεί να περικλείεται από διαυγή άλω. Ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων καταγράφηκε με την βοήθεια αντικειμενικού φακού, μεγέθυνσης 40x, καταμετρώντας τα αποπτωτικά κύτταρα σε τουλάχιστον τρία οπτικά πεδία, τυχαίας επιλογής.

Ως αποπτωτικός δείκτης ορίστηκε το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων στο σύνολο των καταμετρημένων κυττάρων ανά οπτικό πεδίο. Ως σημείο επιτυχούς χρώσης (positive control) θεωρούνταν η ύπαρξη κεχρωσμένων λεμφαδένων. Για έλεγχο ανεπιτυχούς χρώσης (negative control) πραγματοποιούσαμε την μέθοδο TUNEL παραλείποντας, από την διαδικασία, το βήμα αντίδρασης TdT.

Για τη στατιστική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS (version 13.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3.4.5. Σε μοντέλο ορθότοπης εμφύτευσης καρκινικών κυττάρων εκ μεταβατικού επιθηλίου AY-27 σε θηλυκούς αρουραίους Wistar

3.4.5.1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί αρουραίοι Wistar, βάρους 220 – 250 gr. Οι συνθήκες κράτησής τους, ο τρόπος αναισθησίας περιγράφονται στο κεφάλαιο 6.5.3.1. Αμέσως μετά την αναισθησία ακολούθησε καθετηριασμός και κένωση της ουροδόχου κύστεως με φλεβοκαθετήρα 16 gauge.

3.4.5.2. Φωτοευαισθητοποιητής

Μετά την κένωση της ουροδόχου, χορηγήθηκε 0,2 ml του παραπάνω διαλύματος μέσω του καθετήρα. Το διάλυμα παρέμεινε στην ουροδόχο κύστη για 15 λεπτά. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος η ουροδόχος κενώθηκε και εκπλύθηκε 2 φορές με ισόποσο φυσιολογικό ορό (0,2 ml). Η συγκέντρωση και το διάστημα ενδοκυστεϊκής παραμονής του φωτοευαισθητοποιητή επιλέχτηκε βάση των προηγούμενων μελετών (Βλέπε αποτελέσματα 7.5.2).

3.4.5.3. Καρκινικά κύτταρα

Τα καρκινικά κύτταρα κυτταρική σειράς AY-27 προέρχονται από καρκίνο εκ μεταβατικού επιθηλίου αρουραίου ο οποίος προκλήθηκε με την χορήγηση N-(4-[5-nitro-2-furyl]-2-thiazolyl)formamide (FANFT). Τα κύτταρα προέρχονταν από τον κο Ron Moore, Edmonton Canada και ήταν μία ευγενική προσφορά του κυρίου Nseyo. Τα κύτταρα αναπτύσσονται ως μονοστιβο στους 37°C σε μία ατμόσφαιρα που περιείχε 5% CO₂ και 95% ατμοσφαιρικό αέρα μέσα σε θρεπτικό υλικό που περιείχε άλας του Earle και 2mM L-γλουταμίνη συμπληρωμένο με 10% (v/v) FCS, 1% αντιβιοτικό / αντιμυκητιασικό διάλυμα, 1% μη απαραίτητα αμινοξέα και 1% anti-PPLO παράγοντα.

3.4.5.4. Προετοιμασία των καρκινικών κυττάρων για εμφύτευση

Κύτταρα από τα ειδικά τριβλία εκπλένονταν με την χρήση PBS (pH 7.4), υποβάλλονταν σε θρυψινοποίηση (trypsin EDTA, Gibco) και συλλεγόταν μετά από φυγοκέντρηση. Τα κύτταρα καταμετρούταν με την χρήση ειδικού καταμετρητή (Coulter Electronic, UK) και μεταφέρονταν σε τριβλία.

3.4.5.5. Καρκινικό μοντέλο

Η τεχνική που εφαρμόστηκε έχει περιγραφεί αρχικά από τον Xia et al (277) και τροποποιήθηκε από τους Kamuhabwa et al (278). Εν συντομία, αφότου τα πειραματόζωα είχαν αναισθητοποιηθεί, βλέπε κεφάλαιο 6.5.3.1, εισήχθη ένας 16 G φλεβοκαθετήρας, όπως προηγουμένως περιγράφηκε. Το ουροθήλιο διασπάστηκε ήπια με την χρήση 0,4mL 0,1 N HCl. Το διάλυμα παρέμεινε για 15 δευτερόλεπτα στην ουροδόχο και εξουδετερώθηκε με την χρήση διαλύματος NaOH αντίστοιχης ποσότητας και συγκέντρωσης. Κατόπιν η κύστη εκπλύθηκε τρεις φορές με διάλυμα 0,5 ml PBS. Ενωίρημα AY-27 καρκινικών κυττάρων (1 x 10⁶ κύτταρα σε 0,5 ml διαλύματος, χρόνος μεταξύ της συλλογής των κυττάρων και ενοφθαλμισμού στην ουροδόχο < 1 ώρας), που καλλιεργήθηκαν δύο φορές, εγχύθηκε στην ουροδόχο μέσω του καθετήρα και παρέμεινε στην κύστη για τουλάχιστον 1 ώρα. Κατά το διάστημα αυτό ο αρουραίος υποβάλλονταν σε αλλαγή θέσεως ανά 15λεπτά για να εξασφαλιστεί η ομοιόμορφη έκθεση του κυστικού τοιχώματος στα καρκινικά κύτταρα. Μετά από αυτό το διάστημα ο καθετήρας αφαιρούταν και οι αρουραίοι αφήνονταν να ουρήσουν αυθόρμητα. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε

σε 20 θηλυκούς αρουραίους Wistar. Τα πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκαν για την φωτοδυναμική θεραπεία μετά από 10 ημέρες, διάστημα ικανό για να αναπτυχθούν τα καρκινικά κύτταρα.

3.4.5.6. Χορήγηση φωτοευαισθητοποιητή

Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ενδοκυστική έγχυση ΠΜΚ. Η παραγωγή του ΠΜΚ περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.2. Η συγκέντρωση του ΠΜΚ που επιλέχθηκε ήταν 18,25 mg/ml τα οποία περιείχαν 250μg/ml υπερικινών. Για τον σκοπό της μελέτης χορηγήθηκε ενδοκυστικά διάλυμα φυσιολογικού ορού με ΠΜΚ στην προαναφερθείσα συγκέντρωση. Η διαδικασία εφαρμόστηκε σε 10 πειραματόζωα. Μετά την αναισθητοποίηση και τον καθετηριασμό της ουροδόχου με την γνωστή διαδικασία εγχύθηκαν 0,5 ml ΠΜΚ. Η διάρκεια παραμονής του διαλύματος ήταν 15 λεπτά βάσει των προηγούμενων μας μετρήσεων. Με την παρέλευση του χρόνου οι κύστεις εκπλύθηκαν τρεις φορές μέσω του καθετήρα με φυσιολογικό ορό. Η κύστη πληρούταν με 0,5 ml NaCl για να επιτευχθεί διάταση αυτής. Ο καθετήρας μετά το πέρας της διαδικασίας αφαιρούνταν.

3.4.5.7. Φωτοδυναμική θεραπεία

Για την φωτοενεργοποίηση χρησιμοποιήθηκε μία πηγή πηγής αλογόνου της Storz 150W. Το φως χορηγούταν με την βοήθεια ειδικής οπτικής ίνας η οποία εισαγόταν δίκην καθετήρα στην κύστη αμέσως μετά την αφαίρεση του φλεβοκαθετήρα 16 gauge. Στην άκρη της οπτικής ίνας υπήρχε ειδικός σφαιρικός διαχυτής φωτός. Η ένταση του φωτός μετρήθηκε σε απόσταση 0,25 εκ. Η οπτική ίνα τοποθετούταν στο κέντρο της διατεταμένης ουροδόχου. Η χορηγούμενη ενέργεια ήταν 700 Joules/cm² βάσει των αποτελεσμάτων μας.

3.4.5.8. Ανίχνευση φωτοδυναμικής δράσης

Τριάντα ημέρες μετά την ακτινοβολία με λευκό φως οι αρουραίοι θυσιάστηκαν, αφαιρέθηκε η ουροδόχος κύστη τους, μονιμοποιήθηκε σε παραφίνη, κόπηκε σε τομές πάχους 3μm οι οποίες βάφτηκαν με ηωσίνη/αιματοξυλίνη. Τα παρασκευάσματα εκτιμήθηκαν από δύο παθολογοανατόμους που έχουν εξειδικευτεί στο ουροποιητικό.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Διερεύνηση της χημειοπροφυλακτικής – αντικαρκινικής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος του *Hypericum Perforatum* L. έναντι, προκαλούμενων από p.os. χορήγηση νιτροζαμίνης, ουροθηλιακών καρκίνων σε αρσενικά BULBc ποντίκια

4.1.1. Γενικές παρατηρήσεις επί των πειραματόζωων

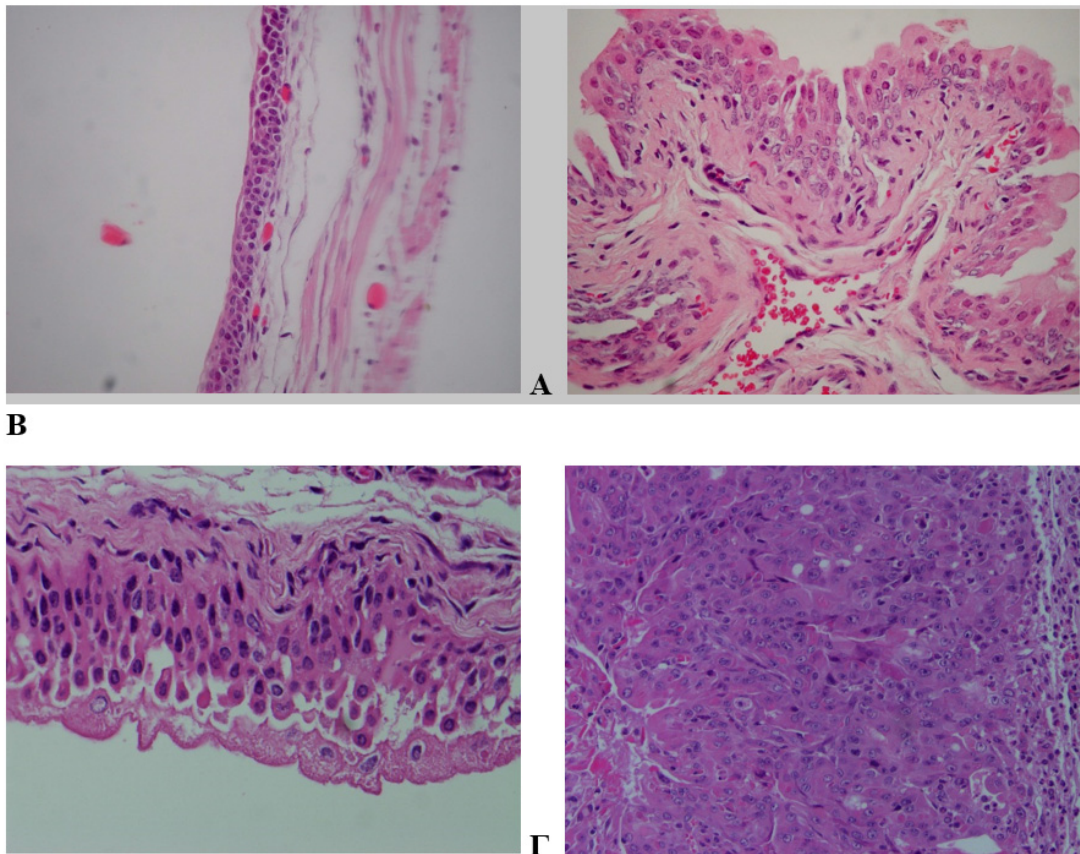
Όλα τα πειραματόζωα ανέχτηκαν καλώς την χορήγηση τόσο του υδατικού διαλύματος νιτροζαμίνης (OH-BBN) καθώς και του υδατικού διαλύματος του HP. Δεν υπήρξε διαφορά στην μέση καθημερινή κατανάλωση των δύο διαλυμάτων μεταξύ των ομάδων (5,1 – 5,3 ml/ημέρα/ποντίκι και 4.9 – 5.2 ml/ημέρα/ποντίκι αντίστοιχα).

4.1.2. Παθολογοανατομικά αποτελέσματα

Τα παθολογοανατομικά αποτελέσματα όλων των ομάδων παρουσιάζονται στον πίνακα 7. Τα ευρήματα μεταξύ των τριών ομάδων ήταν στατιστικώς σημαντικά (Pearson Chi Square $p= 0.008$). Στην ομάδα ελέγχου των ποντικίων (ομάδα 1) μόνο 3(11,5%) είχαν φυσιολογικό ουροθήλιο ενώ η επίπτωση σε παθολογικές αλλοιώσεις ήταν επίπεδη υπερπλασία 1(3,8%), θηλωματώδης υπερπλασία 7(26,9%), δυσπλασία 3(11,5%), καρκίνος 12(46,2%). Όταν δίδονταν το υδατικό εκχύλισμα του HP στις ενδιάμεσες ημέρες που δεν λάμβαναν τη νιτροζαμίνη (δεύτερη ομάδα) τότε τα παθολογοανατομικά αποτελέσματα είχαν ως εξής: φυσιολογικό ουροθήλιο 7(26,9%), επίπεδη υπερπλασία 3(11,5%), θηλωματώδης υπερπλασία 8(30,8%), δυσπλασία 5(19,2%), καρκίνος 3(11,5%). Η μείωση των καρκινωματοδών και προκαρκινωματοδών (δυσπλασία) αλλοιώσεων δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (Fisher's exact test $p= 0.093$). Στο 26,9% των ποντικίων της δεύτερης ομάδας υπήρχε φυσιολογικό ουροθήλιο σε αντίθεση το 11% της ομάδας ελέγχου. Στην τρίτη ομάδα όπου η χορήγηση του χημειοπροφυλακτικού έπονταν της χορήγησης του καρκινογόνου για 30 εβδομάδες τα αποτελέσματα ήταν: φυσιολογικό ουροθήλιο 10(38,5%), επίπεδη υπερπλασία 2(7,7%), θηλώδης υπερπλασία 7(26,9%), δυσπλασία 2(7,7%), καρκίνος 5(19,2%). Η μείωση των καρκινωματοδών και προκαρκινωματοδών (δυσπλασία) αλλοιώσεων ήταν οριακώς στατιστικώς σημαντική (Fisher's exact test $p= 0.048$). Γίνεται φανερό από τα παραπάνω ότι οι καρκινικές

Πίνακας 7 Επίπτωση των παθολογοανατομικών βλαβών στην ουροδόχο κύστη ανά ομάδα

		Φυσιολογικό ουροθήλιο	Υπερπλασία		Δυσπλασία	Καρκίνος	Σύνολο
			Επίπεδη	Θηλώδης			
Ομάδα 1	Μόνο νιτροζαμίνη	3 (11,5%)	1 (3,8%)	7 (26,9%)	3 (11,5%)	12 (46,2%)	26
Ομάδα 2	HP μαζί με νιτροζαμίνη $p=0.093$	7 (26,9%)	3 (11,5%)	8 (30,8%)	5 (19,2%)	3 (11,5%)	26
Ομάδα 3	HP μετά την νιτροζαμίνη $P=0.048$	10 (38,5%)	7 (26,9%)	2 (7,7%)	2 (7,7%)	5 (19,2%)	26



Εικόνα 5 Φωτογραφίες παθολογοανατομικών τομών από ουροδόχο κύστη αρσενικών BULBc επίμυων. Φυσιολογικό ουροθήλιο, μεγέθυνση 200x (Α), Θηλώδης υπερπλασία, μεγέθυνση 200x (Β), Δυσπλασία, μεγέθυνση 400x (Γ), Καρκίνος, μεγέθυνση 400x (Δ).

αλλοιώσεις ήταν περισσότερες στην τρίτη ομάδα από την δεύτερη (19,2% έναντι 11,5% αντίστοιχα). Επίσης οι δυσπλαστικές αλλοιώσεις ήταν πιο συχνές στην ομάδα 2 από την ομάδα 3 (19,2% έναντι 7.7% αντίστοιχα).

Για στατιστικούς λόγους τα παθολογοανατομικά ευρήματα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, μία με καλοήθειες αλλοιώσεις (φυσιολογικό ουροθήλιο, θηλωματώδης και επίπεδη υπερπλασία) και μία ομάδα με καρκινικές και προκαρκινικές αλλοιώσεις (δυσπλασία, καρκίνος). Τότε τα ευρήματα και από τις τρεις ομάδες εμφανιζόταν ως εξής: Ομάδα ελέγχου καλοήθειες αλλοιώσεις 11(42,3%) – κακοήθειες αλλοιώσεις 15(47,7%), Δεύτερη ομάδα καλοήθειες αλλοιώσεις 18(69,2%) – κακοήθειες αλλοιώσεις 8(30,8%), Τρίτη ομάδα καλοήθειες αλλοιώσεις 19(73,1%) – κακοήθειες αλλοιώσεις 7(26,9%). Ο πιθανός κίνδυνος (estimated risk) για ένα ποντίκι να μην του χορηγηθεί εκχύλισμα HP και να μην αναπτύξει καρκίνο ή προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις (συνεπώς να παραμείνει φυσιολογικό ή να εμφανίσει καλοήθειες αλλοιώσεις) ήταν 0.579 (95% CI: 0,349 - 0,960; Odds Ratio=0,270). Ενδεικτικές εικόνες των αλλοιώσεων του ουροθηλίου παρουσιάζονται στην εικόνα 5.

4.2. Αποτελέσματα εκχυλισμάτων και κλασμάτων των παρασκευασμάτων

- Μεθανολικό εκχύλισμα ME

Από την διαδικασία επεξεργασίας προέκυψαν 1,1 g εκχυλίσματος, απόδοση (yield) 11% (δηλαδή από 100 gr φυτού πήραμε 11 gr πούδρας).

- Εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα (ΕΠΑ)

Από την διαδικασία εκχύλισης προέκυψε 1.3 g εκχυλίσματος πετρελαϊκού αιθέρα (ΕΠΑ). Αυτό το εκχύλισμα αντιπροσωπεύει τη συνολική λιποφιλική μερίδα του φυτού, αποκτήθηκε με απόδοση 2% w/w μόνο. Το ΕΠΑ υποβλήθηκε σε περαιτέρω κλασματοποίηση και οι ποσότητες, των επτά κλασμάτων που προέκυψαν, καθώς και το ποσοστό που συνεισφέρουν στο σύνολο παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8 Κλάσματα Εκχυλίσματος Πετρελαϊκού Αιθέρα

Κλάσματα	Ποσότητα	Ποσοστό επί του συνόλου
ΕΠΑ 1	10mg	1%
ΕΠΑ 2	330mg	30.7%
ΕΠΑ 3	280mg	26.2%
ΕΠΑ 4	160mg	15%
ΕΠΑ 5	100mg	9.3%
ΕΠΑ 6	170mg	15.8%
ΕΠΑ 7	22mg	2%
Συνολική ποσότητα που συλλέχτηκε: 1072 mg/ml		

Με βάση τον ανωτέρω πίνακα οι συγκεντρώσεις των κλασμάτων του ΕΠΑ που χρησιμοποιήθηκαν στην διερεύνηση του πιο δραστικού συστατικού του φυτού στις καρκινικές σειρές NBT-II και T24 ήταν ΕΠΑ1 με 0.07 $\mu\text{g/ml}$, ΕΠΑ2 με 1.86 $\mu\text{g/ml}$, ΕΠΑ3 με 1.5 $\mu\text{g/ml}$, ΕΠΑ4 με 0.89 $\mu\text{g/ml}$, ΕΠΑ5 με 0.58 $\mu\text{g/ml}$, ΕΠΑ6 με 0.95 $\mu\text{g/ml}$, ΕΠΑ7 με 0.15 $\mu\text{g/ml}$ και συνολικό ΕΠΑ με 6 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.1. Προσδιορισμός υπερικίνης, ψευδοϋπερικίνης και υπερφορίνης στα υπέργεια τμήματα του υπέρεικου με RP-HPLC

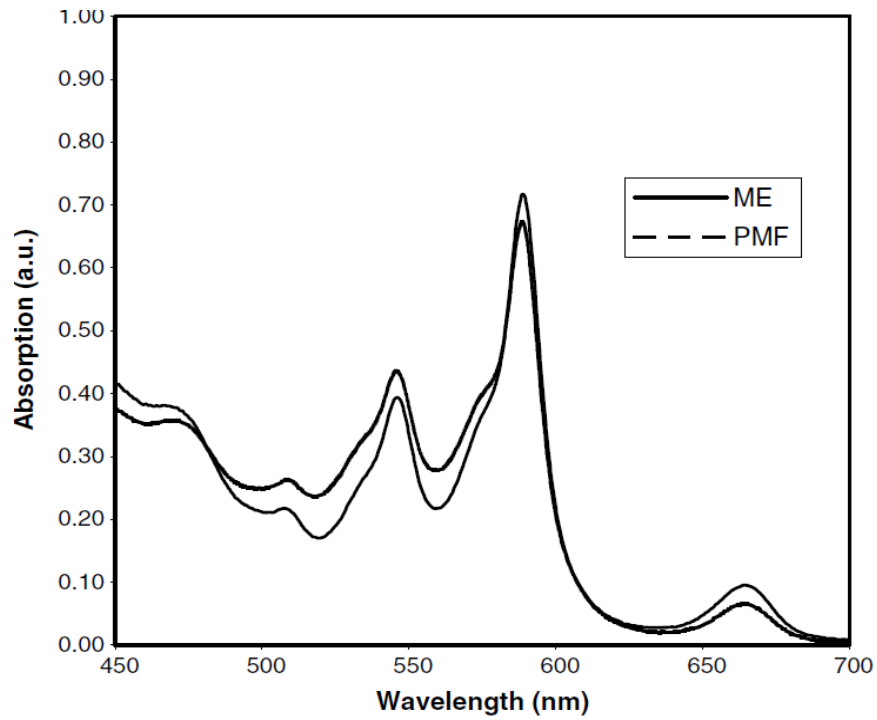
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των κύριων βιολογικών συστατικών του κάθε εκχυλίσματος και κλάσματος του φυτού μετρήθηκαν σε $\text{mg}/100\text{mg}$ εκχυλίσματος ή κλάσματος όπως φαίνονται στον Πίνακα 9.

Το ΠΜΚ έχει βελτιωμένες φυσικές ιδιότητες, δηλ. είναι μια καφέ, στεγνή πούδρα, αντίθετα με το ΜΕ το οποίο είναι μαύρο, ελαιώδες στερεό το οποίο δύσκολα μπορεί να το χειριστεί και να το επεξεργαστεί κάποιος. Το φάσμα απορρόφησης και φθορισμού της υπερικίνης παρουσιάζεται στο Γράφημα 2 & 5 αντίστοιχα. Το φάσμα απορρόφησης και φθορισμού του ΜΕ και του ΠΜΚ παρουσιάζονται στο Γράφημα 3 & 4 αντίστοιχα. Οι χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης της υπερικίνης στα 548nm και 590nm είναι οι μόνες κύριες που ανιχνεύθηκαν στα εκχυλίσματα. Η μικρή μπάνα που καταγράφεται στα 660nm οφείλεται στις χλωροφύλλες που περιέχονται στα εκχυλίσματα. Αυτά τα φάσματα υποδεικνύουν ότι τα κυριότερα φωτοευαίσθητοπιά συστατικά αυτών των εκχυλισμάτων, στο εύρος των 450 – 700nm, είναι κυρίως οι υπερικίνες.

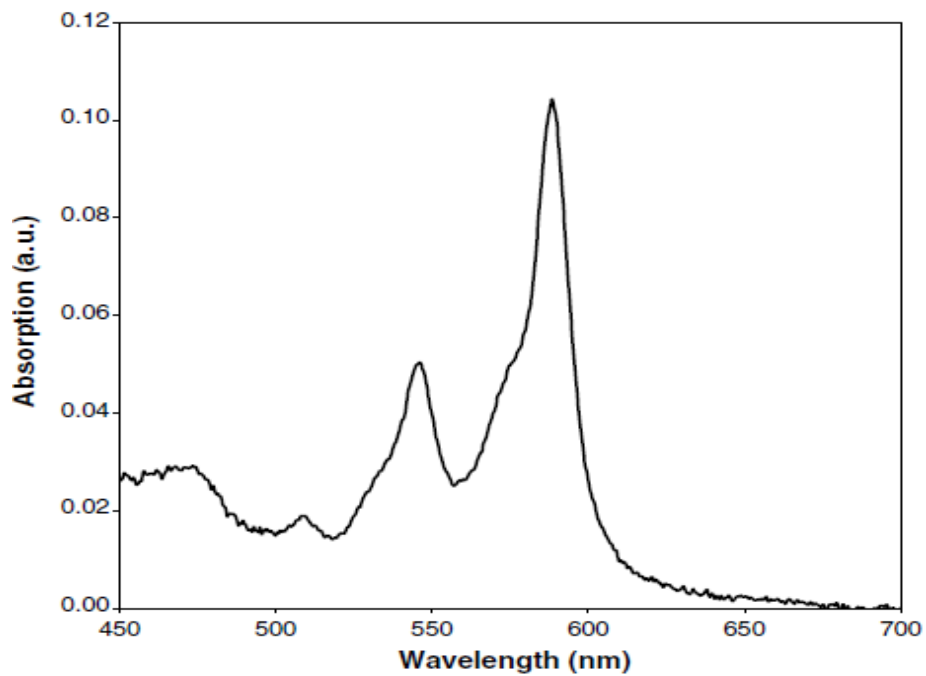
Πίνακας 9 Δράση των διαλυμάτων και μεθανολικών εκχυλισμάτων στις σειρές καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστεως

Εκχυλίσματα & Κλάσματα	% καθενός Συστατικού (w/w)						
	Υπερικίνες	Υπερικίνη	Ψευδοϋπερ.	Υπερφορίνη	Χλωρο- φύλλες.	Χλωρο- φύλλες α	Χλωρο- φύλλες b
Μεθανολικά παρασκευάσματα:							
ΜΕ	1.32	0.51	0.7	7.62	0.08	0.05	0.03
ΠΜΚ	1.37	0.57	0.64	2.52	0.12	0.08	0.04
ΜΠΜΚ	-	-	-	4.65	0.38	0.21	0.17
Παρασκευάσματα Πετρελαϊκού Αιθέρα:							
ΕΠΑ	-	-	-	18.9	0.01	0.01	-
ΕΠΑ2	-	-	-	0.054	0.1	0.04	0.06
ΕΠΑ3	-	-	-	3.3	0.02	0.01	0.01
ΕΠΑ4	-	-	-	16.9	0.15	0.06	0.09
ΕΠΑ5	-	-	-	19.6	0.03	0.01	0.02
ΕΠΑ6	-	-	-	17.9	0.50	0.04	0.06
ΕΠΑ7	-	-	-	2.5	0.01	-	0.01

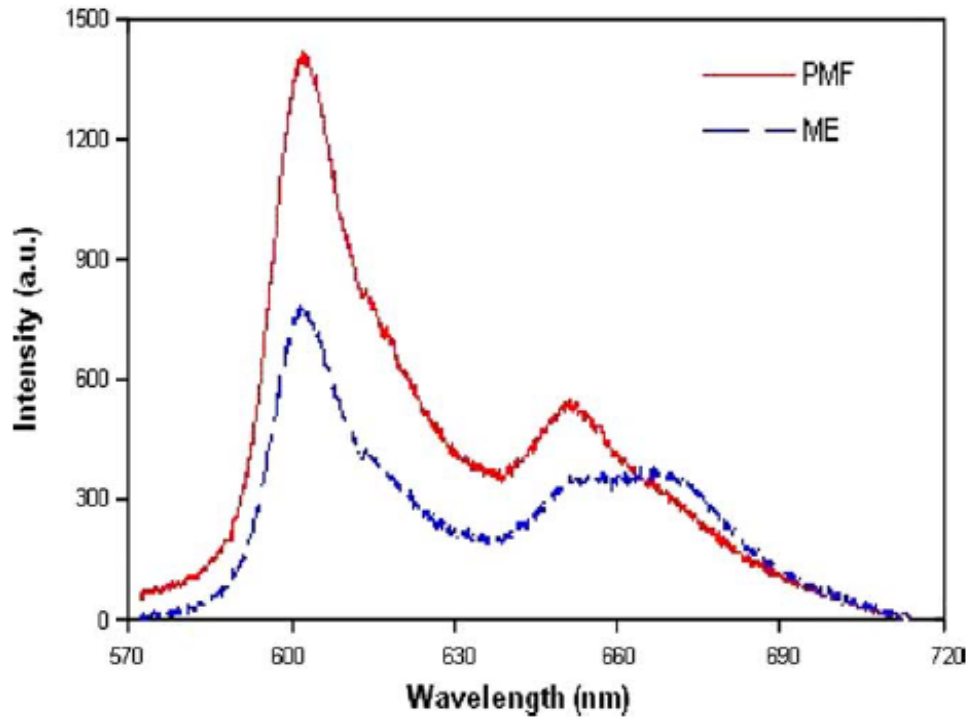
Οι χαρακτηριστικές κορυφές γύρω στα 595nm και στα 640nm (στην αιθανόλη) παρατηρούνται και στα δύο εκχυλίσματα. Παρόλα αυτά στο ΜΕ παρατηρείται μια επιπρόσθετη ζώνη φθορισμού γύρω στα 670nm αγνώστου προελεύσεως. Η ένταση φθορισμού του ΠΜΚ είναι διπλάσια της έντασης του ΜΕ. Παρόλο που η συγκέντρωση του ΠΜΚ σε υπερικίνη είναι μόνο 0.57%, η ένταση φθορισμού του φάσματος του ΠΜΚ στα 590nm είναι μόνο οκτώ (8) φορές μικρότερη συγκρινόμενη την ένταση φθορισμού της καθαρής υπερικίνης στο ίδιο μήκος κύματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αμφοτέρως περιπτώσεις ακτινοβολήθηκαν δείγματα της ίδιας συγκέντρωσης (0.33mg/ml).



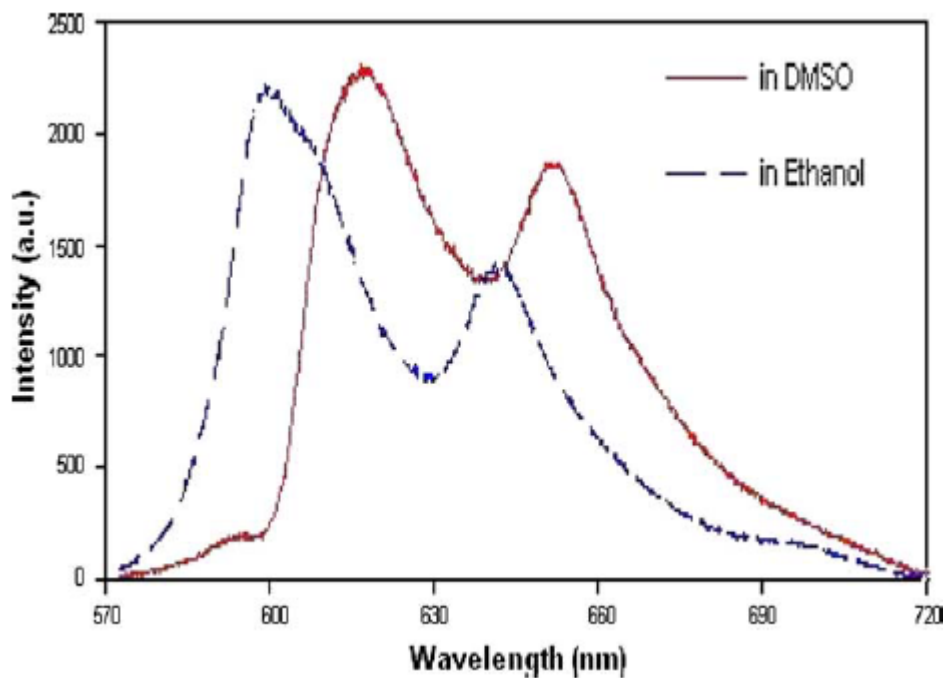
Γράφημα 2 Το φάσμα απορρόφησης των ME & ΠΜΚ σε μεθανόλη (1mg/ml το καθένα)



Γράφημα 3 Το φάσμα απορρόφησης της υπερίκινης σε μεθανόλη (0.002 mg/ml)



Γράφημα 4 Φάσμα φθορισμού του ΠΜΚ και του ΜΕ εκχυλισμάτων σε αιθανόλη, χρόνος συσσώρευσης 45ms (0.33 mg/ml το καθένα)



Γράφημα 5 Φάσμα φθορισμού της καθαρής υπερικίνης σε αιθανόλη και DMSO, χρόνος συσσώρευσης 10ms (0.33 mg/ml)

Αν λάβουμε υπόψη και τις φυσικές διαφορές μεταξύ των δύο σκευασμάτων, το ΠΜΚ είναι μια στεγνή πούδρα σε σχέση με το ελαιώδες στερεό ΜΕ, τότε το ΠΜΚ είναι ανώτερος φωτοευαισθητοποιητής. Βασιζόμενοι σε αυτά τα δεδομένα προκρίναμε το ΠΜΚ για την περαιτέρω διερεύνηση της φωτοδυναμικής δράσης.

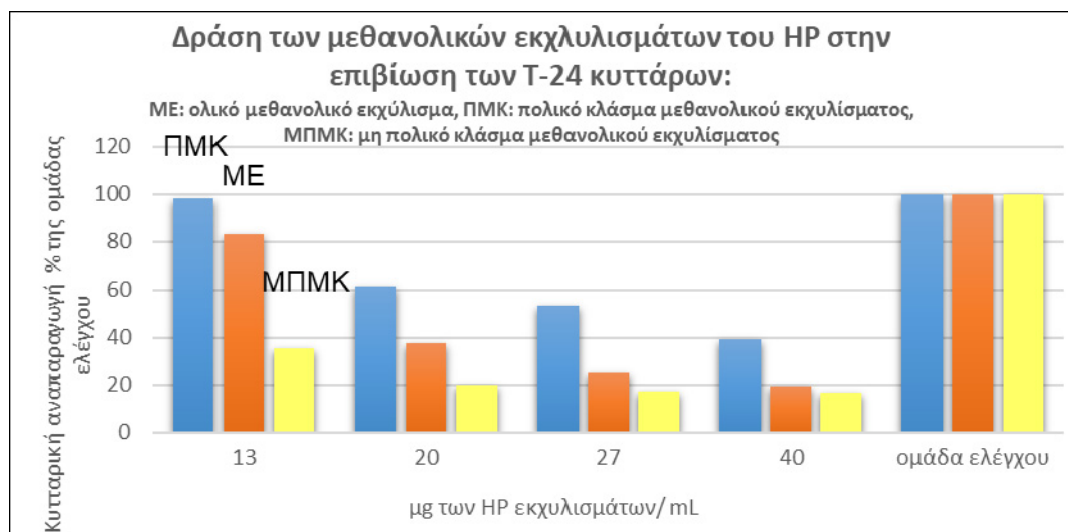
Η υπερικίνη και η ψευδοϋπερικίνη αναγνωρίστηκαν μόνο στα δύο εκχυλίσματα (ΜΕ και ΠΜΚ), όπως ήταν αναμενόμενο από τα αποτελέσματα των ολικών υπερικινών όπως παρουσιάστηκαν πιο πάνω. Η υπερφορίνη αναγνωρίστηκε σε όλα τα εκχυλίσματα και κλάσματα που εξετάστηκαν. Η συγκέντρωση της υπερφορίνης στο μεθανολικό εκχύλισμα ήταν 7.6%, ενώ στο εκχύλισμα του πετρελαϊκού αιθέρα ήταν σε αυξημένη συγκέντρωση, 18.9%, αύξηση κατά 147%. Το συνολικό ποσό των παραγώγων των ναφθοδιανθρονών (υπερικίνες), που εμπεριέχονται στο εκχύλισμα ΠΜΚ, που καταμετρήθηκε μέσω φασματοφωτομετρικής μεθόδου, ήταν 1.37% w/w. Το κυρίαρχο φθοροφόρο αυτών των παραγώγων, όπως καθορίστηκε από τον φθορισμό του, όπως και από το φάσμα απορρόφησής του, είναι η υπερικίνη, η οποία βρέθηκε σε μία περιεκτικότητα 0,57% w/w στο εκχύλισμα. Το ΠΜΚ παρουσιάζει ένα φάσμα απορρόφησης παρόμοιο με αυτό της υπερικίνης, με τις χαρακτηριστικές ζώνες στα 548 nm (ελάχιστο), και 590 nm (μέγιστο). Μία μικρή ζώνη στα 660 nm παρουσιάζεται λόγω των χλωροφυλλών που υπάρχουν μέσα στο εκχύλισμα.

4.2.2. Διερεύνηση του πιο δραστικού παραγώγου του φυτού σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστεως T24 και NBT-II σε συνθήκες σκότους

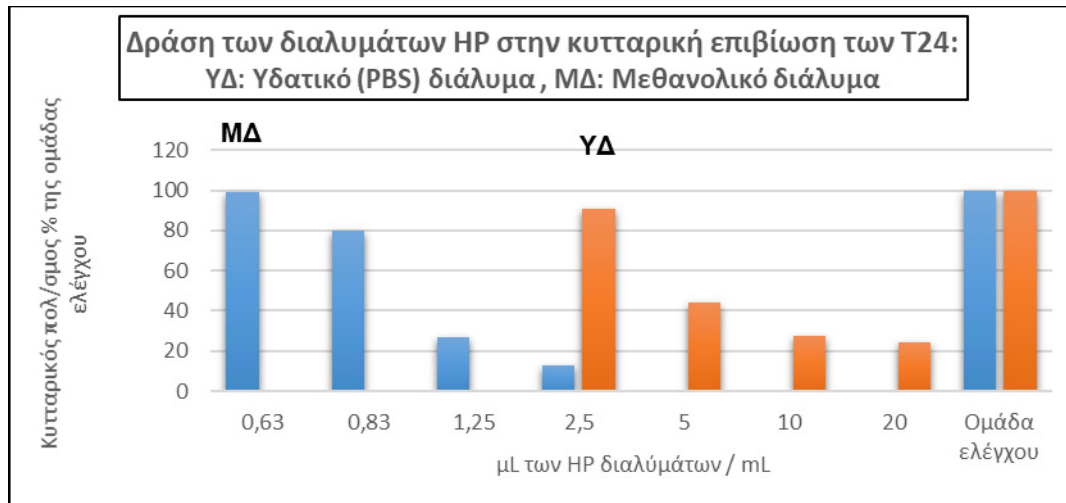
Η κατασταλτική δράση του υδατικού διαλύματος, των μεθανολικών διαλυμάτων, εκχυλισμάτων και κλασμάτων του *Hypericum Perforatum L* της Ηπείρου αποτιμήθηκε στην T24 καρκινική κυτταρική σειρά ουροδόχου κύστεως ανθρώπου.

Στο Γράφημα 6 παρουσιάζεται η επίδραση κυτταροτοξική δράση του Υδατικού Διαλύματος (ΥΔ) και του Μεθανολικού Διαλύματος (ΜΔ) στην ανάπτυξη των κυττάρων. Το ΜΔ ήταν πιο δραστικό από το ΥΔ, LC₅₀: 1.1 μL/mL έναντι 4.7 μL/mL αντίστοιχα.

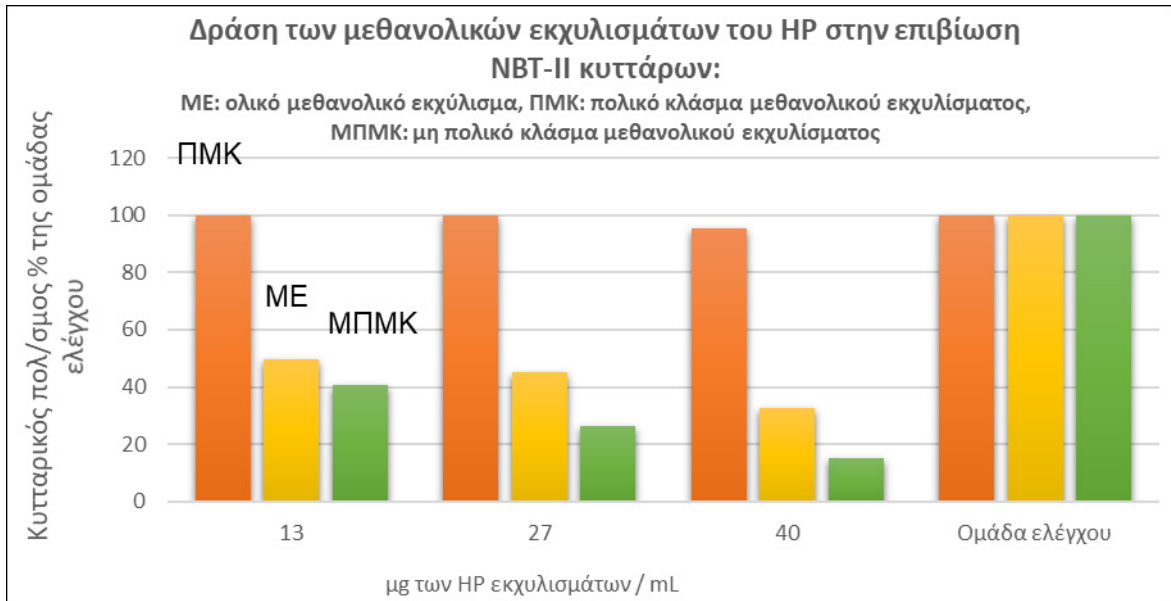
Η δράση του Μεθανολικού Εκχυλίσματος (ΜΕ) και των κλασμάτων του στην κυτταρική ανάπτυξη παρουσιάζονται στο Γράφημα 7. Το ΜΕ εμφάνισε αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων T24 με μία μέση θανατηφόρο δόση LC₅₀: 18 μg/mL. Από την κλασματοποίηση του ΜΕ προέκυψε ένα λιγότερο δραστικό κλάσμα, το



Γράφημα 6 Αντικαρκινική δράση των διαλυμάτων και εκχυλισμάτων του HP σε καρκινικά κύτταρα T24. Μεθανολικά Εκχυλίσματα HP. Η ομάδα ελέγχου για τα πειράματα ήταν 6μL DMSO/mL μέσου



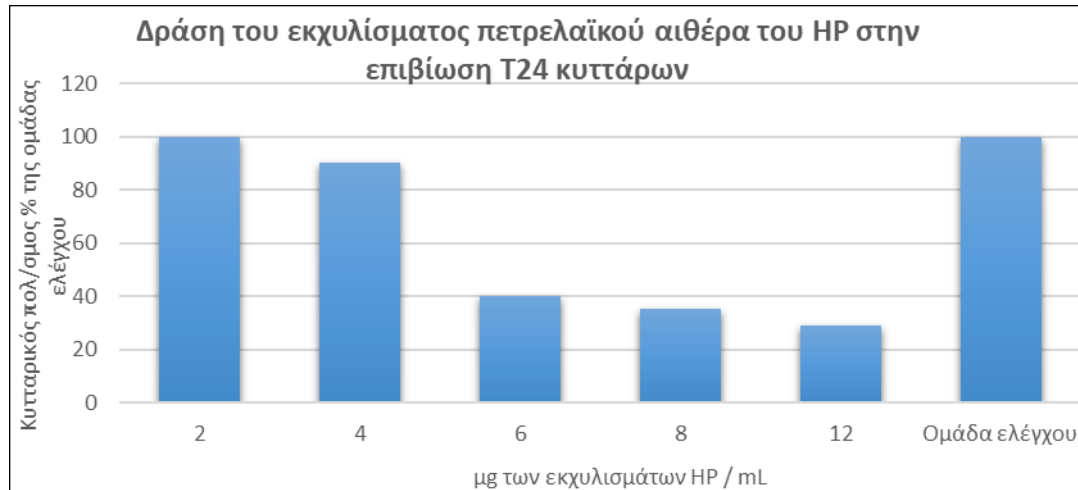
Γράφημα 7 Αντικαρκινική δράση των διαλυμάτων και εκχυλισμάτων του HP σε καρκινικά κύτταρα T24. Α Διαλύματα HP : Οι ομάδες ελέγχου είναι 1) για το Υδατικό Διάλυμα, 20μL PBS/mL μέσου, και για Μεθανολικό Διάλυμα, 5 μL μεθανόλης/ mL μέσου.



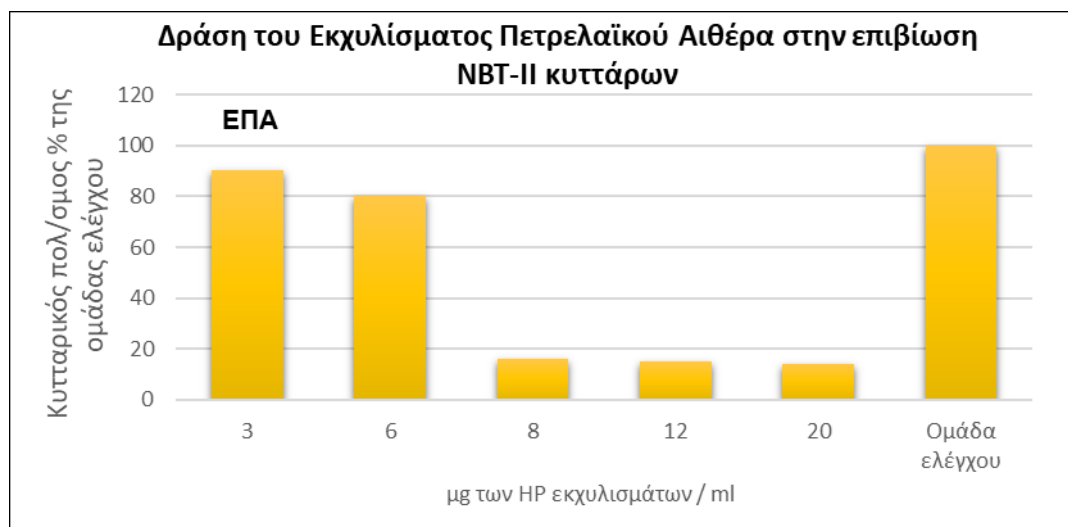
Γράφημα 8 Αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων HP σε NBT-II κύτταρα. Μεθανολικό Εκχύλισμα HP. Η ομάδα ελέγχου για τα ανωτέρω πειράματα έλαβε 6µL DMSO / mL μέσου.

Πολικό Μεθανολικό Κλάσμα (ΠΜΚ), με μέση θανατηφόρο δόση LC_{50} : 29 µg/mL, και ένα περισσότερο δραστικό κλάσμα, το Μη Πολικό Μεθανολικό Κλάσμα (ΜΠΜΚ), με μέση θανατηφόρο δόση LC_{50} : 10 µg/mL.

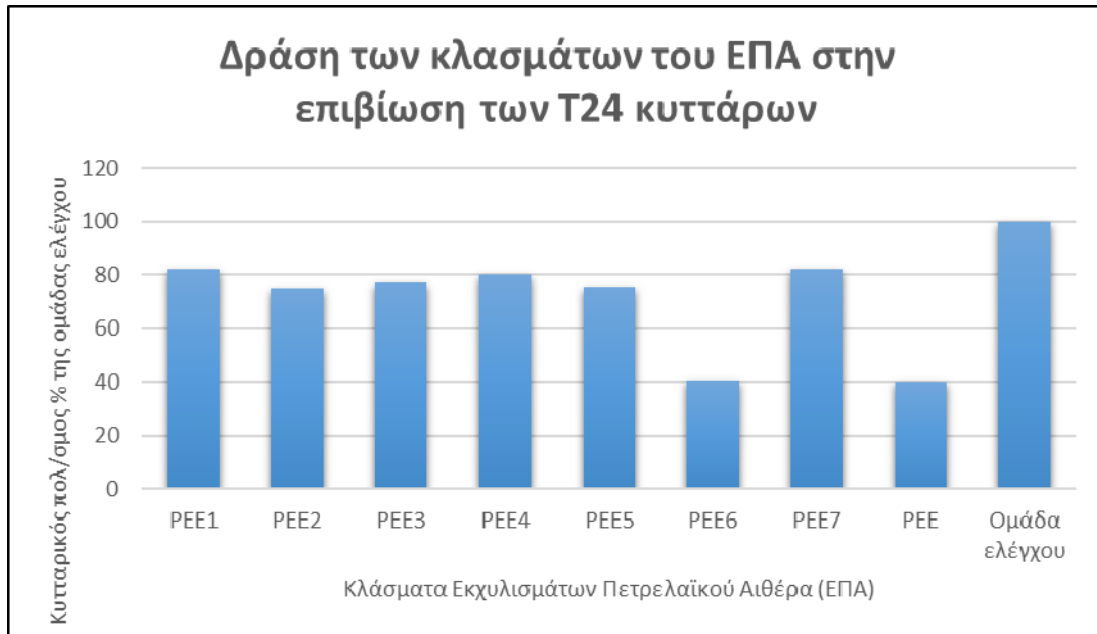
Η δράση του ME και των κλασμάτων του αποτιμήθηκε και στην κυτταρική σειρά NBT-II και αποτυπώνεται στο Γράφημα 8. Το LC_{50} για το ολικό μεθανολικό εκχύλισμα (ME) εκτιμήθηκε στα επίπεδα 13 µg/mL, του πολικού μεθανολικού κλάσματος (ΠΜΚ) σε επίπεδα > 40 µg/mL και τέλος για το μη πολικό μεθανολικό κλάσμα (ΜΠΜΚ) στα 10 µg/mL. Η δράση του ME, ΠΜΚ και του ΜΠΜΚ ακολουθεί παρόμοια τάση όσον αφορά την αναστολή της ανάπτυξης και στις δύο κυτταρικές σειρές, T24 και NBT-II. Η κυτταροτοξική δράση του Εκχυλίσματος Πετρελαϊκού Αιθέρα αξιολογήθηκε στις καρκινικές κυτταρικές σειρές T24 & NBT-II και παρουσιάζεται στα Γραφήματα 9 & 10. Η καρκινική κυτταρική σειρά T24 εμφάνισε μέση θανατηφόρο δόση LC_{50} 5 µg/mL, ενώ η καρκινική κυτταρική σειρά NBT-II μία μέση θανατηφόρο δόση LC_{50} 7 µg/mL. Και οι δύο κυτταρικές σειρές εμφάνισαν σημαντική κυτταροτοξική δράση στο 70% των κυττάρων σε μία συγκέντρωση 12 µg/mL.



Γράφημα 9 Αντικαρκινική δράση των διαλυμάτων και εκχυλισμάτων του HP σε καρκινικά κύτταρα T24 Εκχύλισμα Πετρελαϊκού Αιθέρα. Η ομάδα ελέγχου για τα πειράματα ήταν 6μL DMSO/mL μέσου



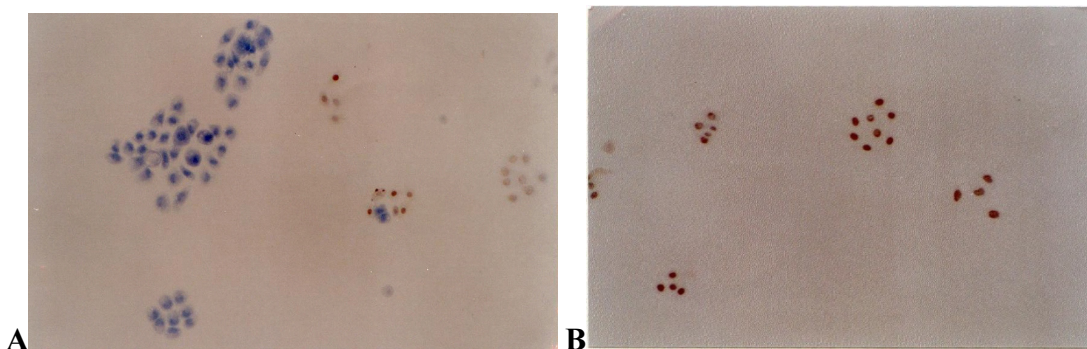
Γράφημα 10 Αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων HP σε NBT-II κύτταρα. Εκχύλισμα Πετρελαϊκού Αιθέρα. Η ομάδα ελέγχου για τα ανωτέρω πειράματα έλαβε 6μL DMSO / mL μέσου.



Γράφημα 11 Αντικαρκινική δραστηριότητα των κλασμάτων του πετρελαϊκού αιθέρα (ΕΠΑ) στα NBT-II. Η ομάδα ελέγχου ήταν 6μL του DMSO / mL μέσου.

Για να αναγνωριστεί το κλάσμα/ κλάσματα του ΕΠΑ, το/τα οποίο/α είναι υπεύθυνα για την κυτταροτοξική δράση, διασπάστηκε σε επτά κλάσματα, και αποτιμήθηκε η δράση τους στη T24 καρκινική κυτταρική σειρά (Γράφημα 11).

Ως ενεργή συγκέντρωση του ολικού ΕΠΑ, με βάση τα δεδομένα, θεωρήθηκε η δόση με την χαμηλότερη μέση θανατηφόρο δόση LC_{50} 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, από την στιγμή που εμφάνισε κυτταροτοξική δράση κατά 60%. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε κλάσμα, σχετίζονται αναλογικά με τη συμμετοχή του κάθε κλάσματος στη συνολική ποσότητα που συλλέχθηκε από τη χρωματογραφική στήλη (σε w/w). Οι συγκεντρώσεις όλων των κλασμάτων μαζί αθροιζόμενες φτάνουν τα 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, που είναι ίσο με τη συγκέντρωση του ολικού ΕΠΑ που χρησιμοποιήθηκε σε αυτό πειραματικό μέρος. Κατά αυτόν τον τρόπο η αντικαρκινική δραστηριότητα που παρατηρήθηκε σε κάθε κλάσμα είναι στην πραγματικότητα μέρος της συνολικής αντικαρκινικής δραστηριότητας που παρατηρείται από το ολικό ΕΠΑ. Από τα επτά δείγματα που δοκιμάστηκαν, μόνο το εκχύλισμα ΕΠΑ 6 παρουσίασε σημαντική αντικαρκινική δράση,

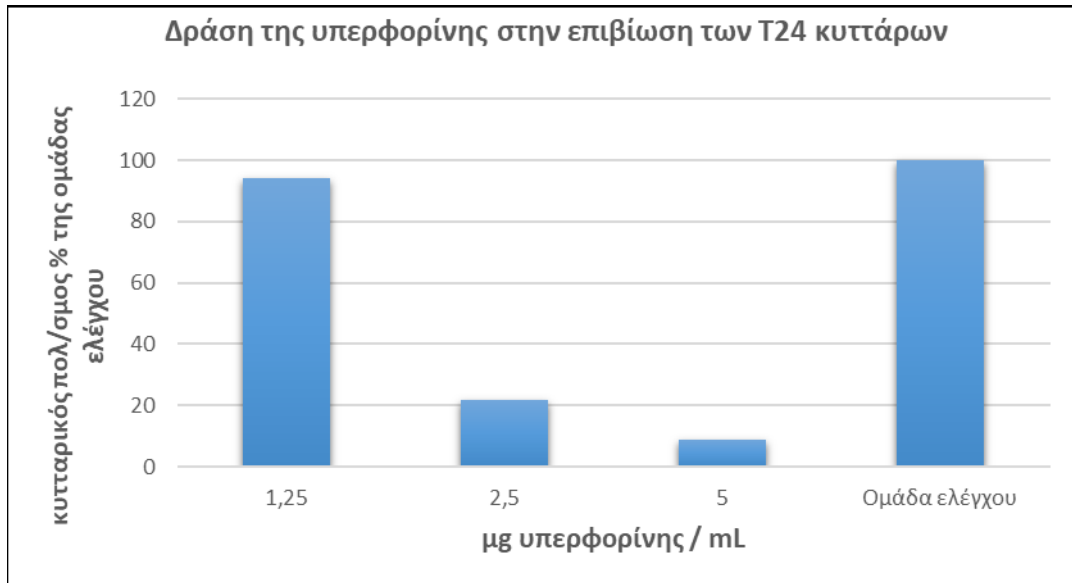


Εικόνα 6 Ανίχνευση της απόπτωσης σε NBT-II καρκινικά κύτταρα με την μέθοδο TUNEL. Αποπτωτικά κύτταρα εμφανίζονται με καφέ χρώση (A,B) και τα φυσιολογικά με μπλε (A).

της τάξεως του 60%, παρόμοια με την αντικαρκινική δράση του ολικού ΕΠΑ. Η ενεργή συγκέντρωση του ΕΠΑ 6 ήταν 0.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$, πολύ χαμηλότερη από την συγκέντρωση του ολικού ΕΠΑ, 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Καρκινικά κύτταρα NBT-II τα οποία χρωματίστηκαν με την μέθοδο TUNEL και οπτικοποιήθηκαν με μικροσκόπιο φωτός φαίνονται στην Εικόνα 6. Η σκούρα καφέ χρώση που παρατηρείται σε κύτταρα απεικονίζει αποπτωτικές διασπάσεις του DNA σε αυτά τα κύτταρα. Ο αποπτωτικός δείκτης στις καλυπτρίδες ελέγχου ήταν 0% ενώ ήταν 90% στα κύτταρα όπου χορηγήθηκε 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ συγκέντρωσης του ολικού ΕΠΑ, 20% όταν χορηγήθηκε 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ΕΠΑ και 10% όταν χορηγήθηκε 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ΕΠΑ. Καρκινικά κύτταρα T24 χρωματίστηκαν με την μέθοδο TUNEL και αξιολογήθηκαν με τον ίδιο τρόπο. Ο αποπτωτικός δείκτης ήταν 20% όταν χορηγήθηκαν 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ΕΠΑ, και 10% όταν χορηγήθηκε 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ΕΠΑ. Τα ποσοστά απόπτωσης που παρατηρήθηκαν συσχετίστηκαν απόλυτα ($p=0.000$) με τα ποσοστά κυτταρικού θανάτου με τις ίδιες συγκεντρώσεις που παρουσιάζονται στο Γράφημα 10, μία ένδειξη ότι η απόπτωση είναι το κύριο μονοπάτι, μέσω του οποίου το ΕΠΑ του φυτού, εισάγει τον κυτταρικό θάνατο.

Η άμεση συσχέτιση ανάμεσα στις διαφορετικές αντικαρκινικές ιδιότητες μεταξύ του μεθανολικού εκχυλίσματος ($LC_{50} = 29 \mu\text{g}/\text{mL}$) και του εκχυλίσματος του πετρελαϊκού αιθέρα ($LC_{50} = 5 \mu\text{g}/\text{mL}$), και οι διαφορές στη συγκέντρωσή τους υπερφορίνης, 7.6% έναντι 18.9%, μας οδήγησε στην διερεύνηση της δραστηριότητας μόνο της υπερφορίνης, με σκοπό να διαπιστώσουμε αν αυτό το συστατικό ήταν το κύριο αίτιο για αυτή τη διαφορά στην εμφάνιση της κυτταροτοξικότητας. Το αντιπολλαπλασιαστικό δυναμικό της καθαρής υπερφορίνης αξιολογήθηκε σε κύτταρα της καρκινικής σειράς T24. Όπως φαίνεται από το



Γράφημα 12 Αντικαρκινική δραστηριότητα των της υπερφορίνης στα T24. Η ομάδα ελέγχου ήταν 6μL του DMSO / mL μέσου

ανωτέρω Γράφημα 12, η υπερφορίνη προκάλεσε καταστολή του κυτταρικού πολ/σμου στο 80% των κυττάρων μόλις με μία συγκέντρωση 2.5 μg/mL. Η μέση θανατηφόρος δόση ήταν $LC_{50} = 1.9$ μg/mL. Το εύρος της ενεργούς συγκέντρωσης υπερφορίνης ήταν ανάμεσα 1.8 μg/mL και 5.0 μg/mL Η συγκέντρωση της υπερφορίνης του ολικού ΕΠΑ καθώς και του κλάσματος ΕΠΑ 6 που προκαλούσε θάνατο στο 50% των κυττάρων (LC_{50}) ήταν 0.9 μg/mL και 0.17 μg/mL αντίστοιχα. Και οι δύο αυτές συγκεντρώσεις είναι κατά πολύ χαμηλότερες από το δραστικό εύρος της υπερφορίνης (1.8 μg/mL έως 5.0 μg/mL).

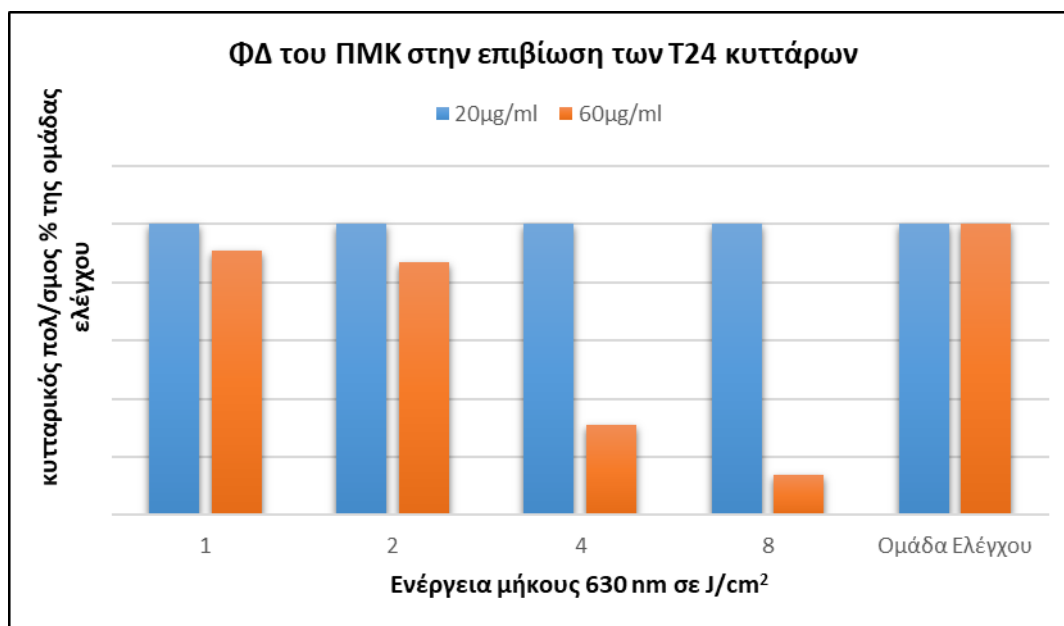
4.3. Διερεύνηση φωτοδυναμικής δράσης του Πολικού Μεθανολικού Κλάσματος *in vitro*

4.3.1. Έναντι καρκινικών κυττάρων T24 και RT4 μετά από φωτοδιέγερση με μονοχρωματικό φως – λέιζερ

Η φωτοευαισθητοποιητική ικανότητα του ΠΜΚ έναντι του ουροθηλιακού καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, αποτιμήθηκε στις καρκινικές κυτταρικές σειρές T24 & RT-4 ανθρώπινης ουροδόχου κύστεως εφαρμόζοντας φως λέιζερ μήκους κύματος 603 nm.

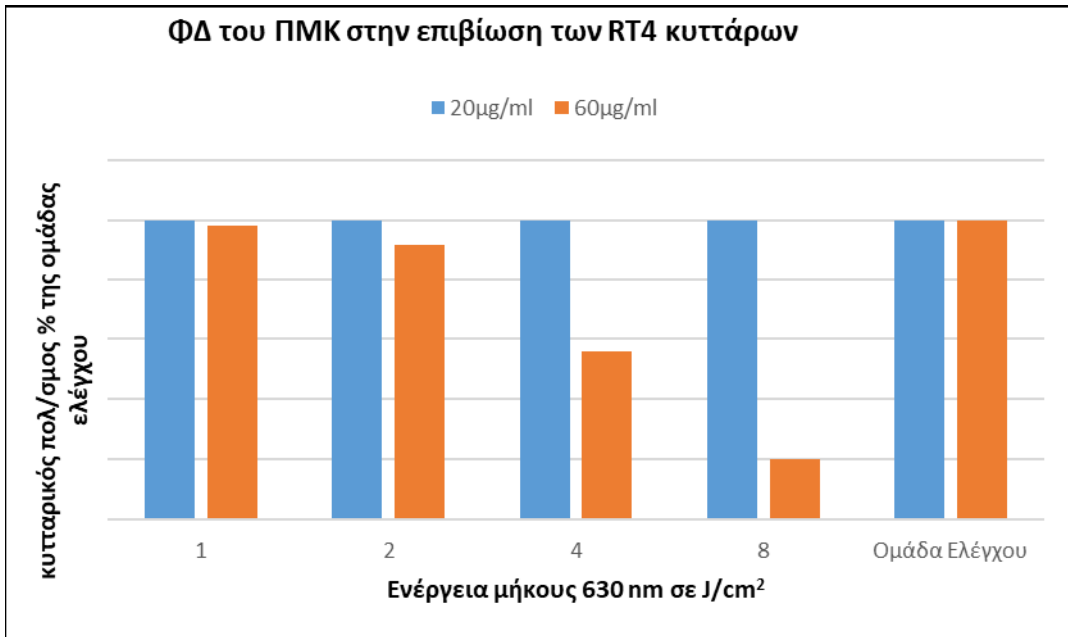
Το Γράφημα 13 παρουσιάζει τη δράση του ΠΜΚ έναντι T24 κυττάρων. Σε συγκέντρωση 20 $\mu\text{g/ml}$ δεν καταγράφηκε κυτταροτοξική δράση ακόμα και με μία δοσολογία ροής ακτινοβολίας 8 J/cm^2 . Η συγκέντρωση των 60 $\mu\text{g/ml}$ του εκχυλίσματος εμφανίστηκε ως η πιο αποτελεσματική δόση παρουσιάζοντας μία μέση θανατηφόρο δόση LC_{50} με δόση ροής ακτινοβολίας 3.6 J/cm^2 , ενώ παρουσίασε σημαντική κυτταροτοξικότητα, της τάξης του 86%, με ενέργεια 8 J/cm^2 .

Το Γράφημα 14 παρουσιάζει την δράση του ΠΜΚ έναντι RT-4 κυττάρων. Δεν παρατηρήθηκε καταστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων σε μία συγκέντρωση 20 $\mu\text{g/ml}$, ακόμα και όταν ακτινοβολήθηκαν με ενέργεια 8 J/cm^2 , εμφανίζοντας παρόμοια δράση όπως παρατηρήθηκε στα T24 στην ίδια συγκέντρωση. Στην συγκέντρωση των 60 $\mu\text{g/ml}$ επιτεύχθηκε μία μέση θανατηφόρο δόση LC_{50} με 4.5 J/cm^2 δόση ροής ακτινοβολίας, και σημαντική κυτταροτοξικότητα 80% με δόση ροής ακτινοβολίας 8 J/cm^2 .

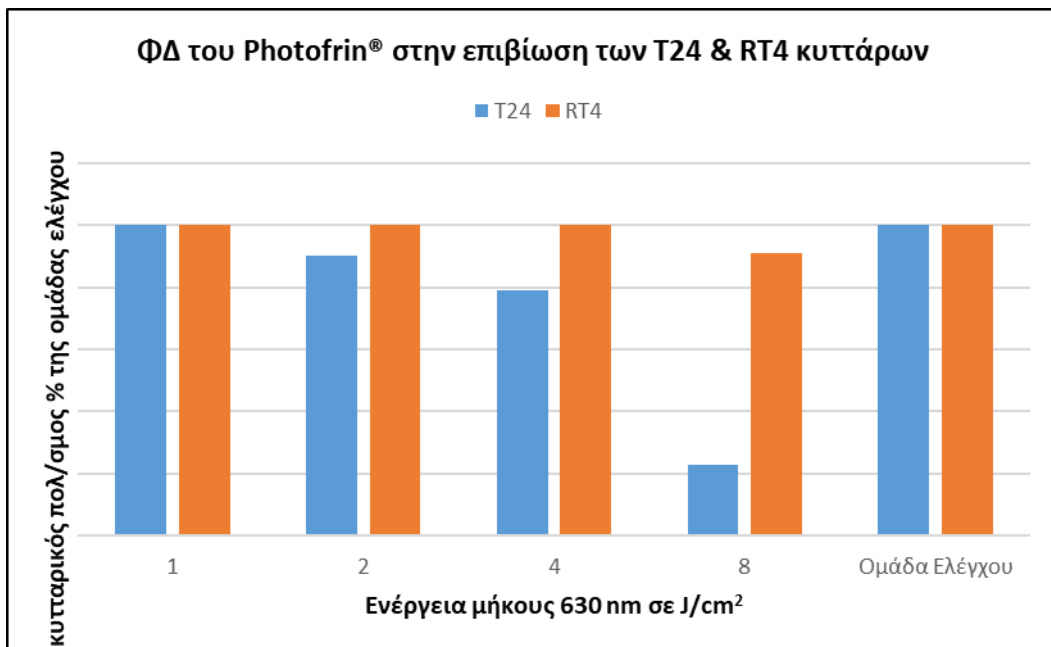


Γράφημα 13 Κυτταροτοξική δραστηριότητα του ΠΜΚ σε T24 κύτταρα. Οι ομάδες ελέγχου είναι επώαση με 20 $\mu\text{g/ml}$ και 60 $\mu\text{g/ml}$ χωρίς την έκθεση στο λέιζερ αντίστοιχα.

ΦΔ=Φωτοδυναμική Δράση



Γράφημα 14 Κυτταροτοξική δραστηριότητα του ΠΜΚ σε RT4 κύτταρα. Οι ομάδες ελέγχου είναι επώαση με 20 μg/ml και 60 μg / ml χωρίς την έκθεση στο λέιζερ αντίστοιχα. ΦΔ=Φωτοδυναμική Δράση.



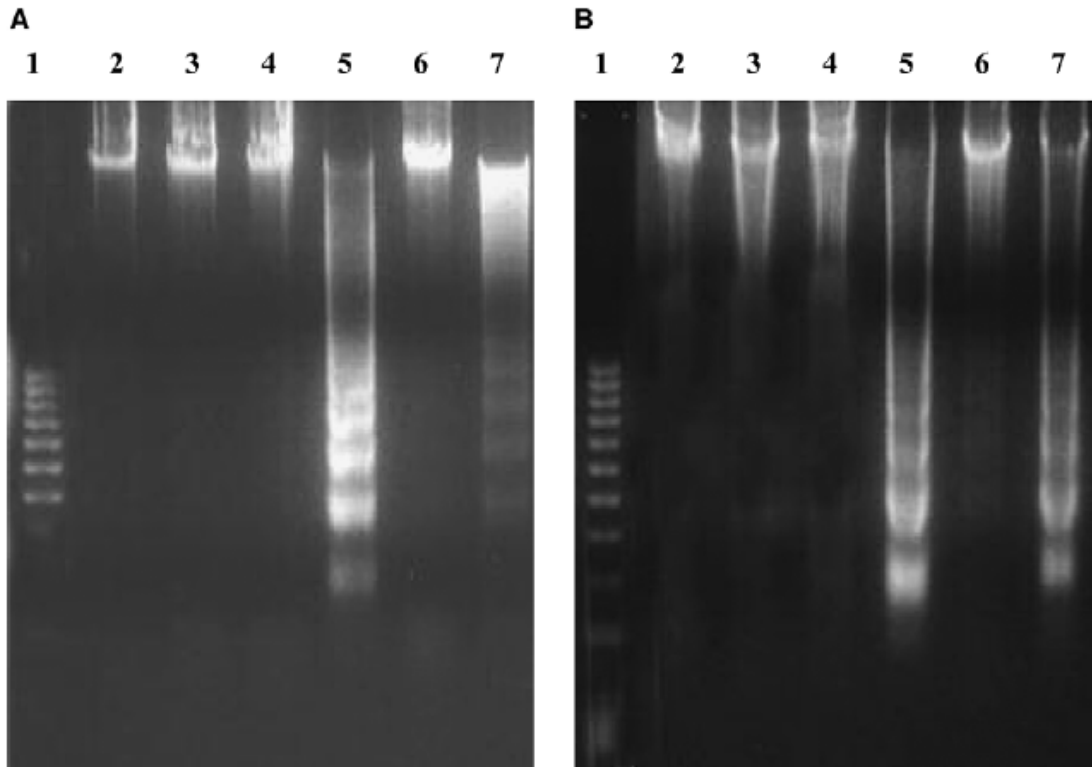
Γράφημα 15 Κυτταροτοξική δράση του Photofrin® (4 μg/ml) σε T24 και RT4 κύτταρα. Η ομάδα ελέγχου για τα πειράματα είναι επώαση με Photofrin® (4 μg/ml) χωρίς έκθεση στο λέιζερ. ΦΔ= Φωτοδυναμική Δράση

Πίνακας 10. Η δράση του ΠΜΚ στην απόπτωση και στα στάδια του κυτταρικού κύκλου σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστεως T24

ΠΜΚ (60μg.ml)	Laser (4 J/cm ²)	Απόπτωση (%) ± SE	Κατανομή κυττάρων (%) ± SE		
			G0/G1	S	G2/M
Ομάδα ελέγχου	-	3,3 ± 0,4	52	12 ± 0,6	32,7 ± 1,3
Ομάδα ελέγχου	+	4,2 ± 0,9	54	14,1 ± 0,8	27,7 ± 1,1
ΠΜΚ	-	17 ± 1,5	50	14 ± 1,6	19 ± 0,7
ΠΜΚ	+	43 ± 1,7	41	3,0 ± 0,4	17 ± 0,8

Προκειμένου να συγκρίνουμε την δράση του ΠΜΚ με αυτή της φωτοδυναμικής ουσίας που έχει εγκριθεί για κλινική χρήση, αποτιμήσαμε την δράση του Photofrin® έναντι των ίδιων κυτταρικών σειρών και κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην γραφική παράσταση 15. Η δόση των 4 μg/ml του Photofrin® επιλέχθηκε βάσει της μέγιστης ανεκτής δόσης του φαρμάκου η οποία χρησιμοποιείται σε κλινικές μελέτες σε ασθενείς με ανθιστάμενο στις ενδοκυτικές θεραπείες καρκίνο εκ μεταβατικού επιθηλίου της ουροδόχου κύστεως (279). Στα T24 καρκινικά κύτταρα το Photofrin® παρουσίασε μια ελάχιστη μέση θανατηφόρο δόση LC₅₀ στην δόση ροής φωτός 6 J/cm², και 77% κυτταροτοξικότητα με 8 J/cm², με μήκος κύματος στα 630 nm. Αντίθετα, η δράση του Photofrin® έναντι των RT-4 καρκινικών κυττάρων, ήταν χαμηλή πετυχαίνοντας κυτταροτοξικότητα σε λιγότερα από 9% των κυττάρων ακόμα και με δοσολογία ροής φωτός στα 8 J/cm².

Ο μηχανισμός της φωτοδυναμικής δραστηριότητας του ΠΜΚ ερευνήθηκε χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής καθώς και DNA laddering. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής παρουσιάζονται στον Πίνακα 10. Το ΠΜΚ μαζί με το λέιζερ φως εισήγαγαν σημαντική (40%) απόπτωση στα T24 κύτταρα. Μόνο το φως ή μόνο το ΠΜΚ είχαν πολύ μικρή αποπτωτική δράση στην ίδια κυτταρική σειρά (4% και 17% αντίστοιχα). Ο G0/G1 κυτταρικός κύκλος είχε μπλοκαριστεί στο 25% των κυττάρων και οι κυτταρικές

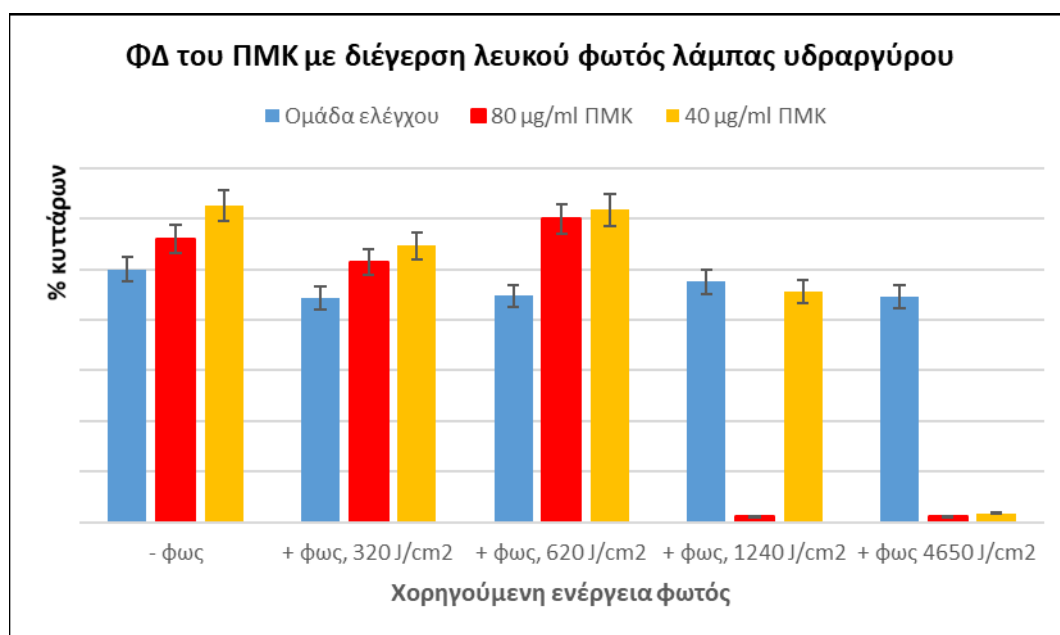


Εικόνα 7 Αποτελέσματα κατάτμησης DNA των ΠΜΚ (60μg/ml)/Photofrin® (4μg/ml) + 8 J/cm² φως λέιζερ 630nm σε T24 (A) και RT4 (B) κύτταρα. 1(δείκτης), 2(κοντρόλ), 3 (Photofrin®), 4(λέιζερ), 5(Photofrin® + λέιζερ), 6(ΠΜΚ), 7(ΠΜΚ + λέιζερ). Τα κοντρόλ είναι τα αντίστοιχα κύτταρα T24 ή RT4 μόνο.

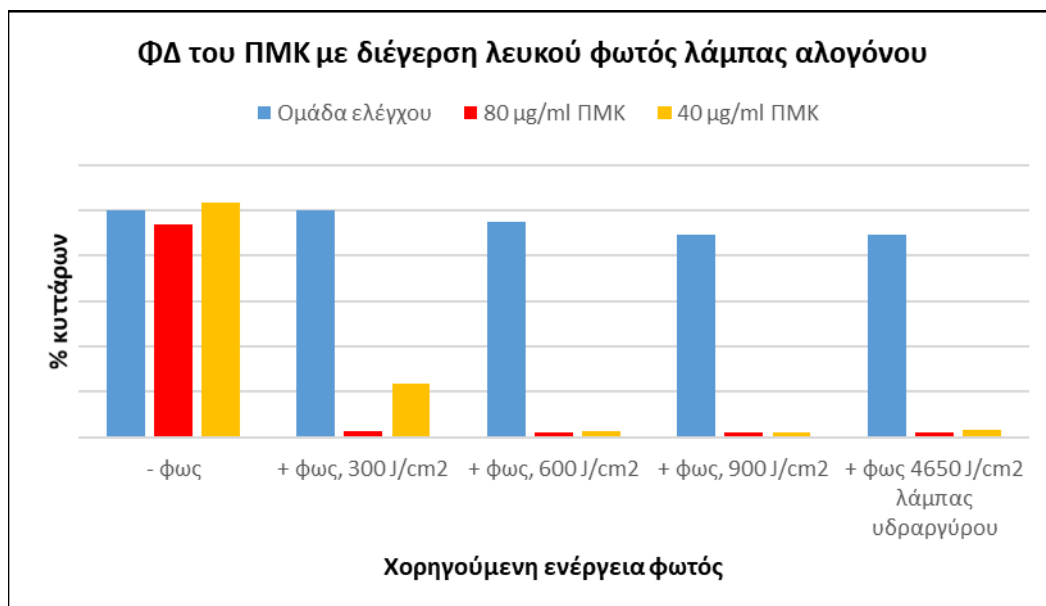
φάσεις G2/M κατά 38%. Ο κυριότερος αντίκτυπος παρατηρήθηκε στην S φάση η οποία είχε αδρανοποιηθεί / σταματήσει κατά 78% από την φωτοτοξική διαδικασία. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρατήρησης κατάτμησης του DNA (DNA laddering) με ΠΜΚ (60μg/ml) ή Photofrin® (4mg/ml) και ΦΔΘ (8 J/cm² φωτός 630nm) σε T24 και RT4 κύτταρα παρουσιάζονται στην Εικόνα 7. Προκλήθηκε κατάτμηση του DNA από το ΠΜΚ + φως λέιζερ και στις δύο κυτταρικές σειρές (γραμμή 7 στο A και B αντίστοιχα). Παρόμοια αποτελέσματα επιτεύχθηκαν και με το Photofrin® + λέιζερ (γραμμή 5 στο A και B αντίστοιχα). Αντίθετα κανένα από τα ΠΜΚ, Photofrin®, λέιζερ μόνο του δεν προκάλεσαν κατάτμηση του DNA (γραμμές 6,3,4 στο A και B αντίστοιχα).

4.3.2. Έναντι καρκινικών κυττάρων T24 μετά από φωτοδιέγερση με λευκό φως

Η φωτοδυναμική δράση του ΠΜΚ έναντι ουροθηλιακών καρκινικών κυττάρων μετά από διέγερση με λευκό φως, το οποίο εκπέμπεται από λαμπτήρα υδραργύρου, παρουσιάζεται στο γράφημα 16. Το ΠΜΚ παρουσιάζει σημαντική κυτταροτοξικότητα στη συγκέντρωση 80 $\mu\text{g/ml}$, 98% κυτταρικός θάνατος, όταν ακτινοβολείται με ενέργεια 1240 J/cm^2 . Όταν τα καρκινικά κύτταρα φωτοβολούνται με την ίδια ενέργεια, 1240 J/cm^2 , αλλά επωάζονται με την μισή δόση, 40 $\mu\text{g/ml}$, τότε η φωτοδυναμική κυτταροτοξική δράση είναι πολύ ασθενής, μόλις 8% κυτταρικού θανάτου. Για να επιτευχθεί ίδιας αποτελεσματικότητας κυτταροτοξικότητα, με αυτή της συγκέντρωσης των 80 $\mu\text{g/ml}$ ΠΜΚ, θα πρέπει τα καρκινικά κύτταρα, μετά από επώαση με 40 $\mu\text{g/ml}$, να φωτοβοληθούν με ενέργεια 4650 J/cm^2 .



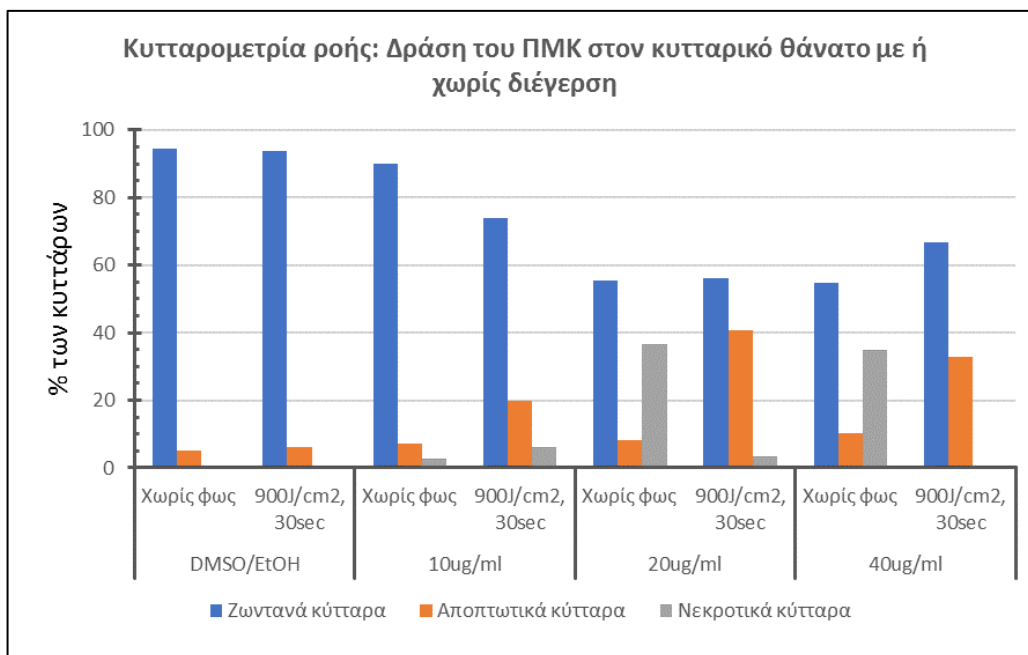
Γράφημα 16 Φωτοδυναμικής Δράσης (ΦΔ) του ΠΜΚ σε συγκεντρώσεις 40 $\mu\text{g/ml}$ και 80 $\mu\text{g/ml}$, μετά από φωτοβόληση με λευκός φως λάμπας υδραργύρου. Η ομάδα ελέγχου περιλαμβάνει κύτταρα σε θρεπτικό μέσο PBS μόνο.



Γράφημα 17 Φωτοδυναμικής Δράσης (ΦΔ) του ΠΜΚ σε συγκεντρώσεις 40 µg/ml και 80 µg/ml, μετά από φωτοβόληση με λευκός φως λάμπας αλογόνου. Η ομάδα ελέγχου περιλαμβάνει κύτταρα σε θρεπτικό μέσο PBS μόνο.

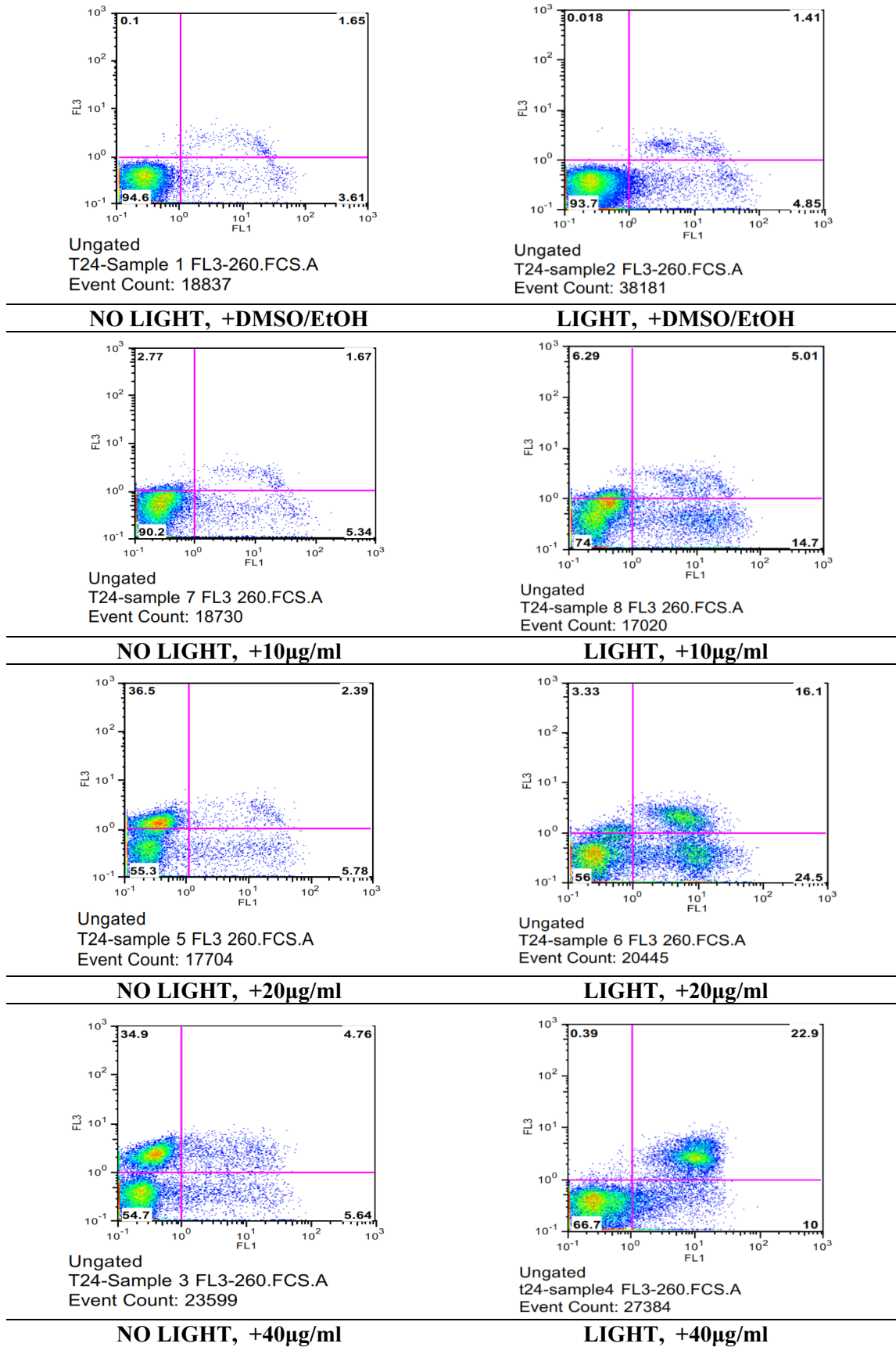
Η φωτοβόληση του ΠΜΚ με λευκό φως, το οποίο εκπέμπεται από λαμπτήρα αλογόνου, προκαλεί υψηλή κυτταροτοξικότητα με μικρότερες δόσεις ενέργειας. Όπως παρουσιάζεται στο Γράφημα 17, προκύπτουν υψηλά ποσοστά κυτταρικού θανάτου με σημαντικά μικρότερα ποσά χορηγούμενης ενέργειας. Το 98% των ουροθηλιακών καρκινικών κυττάρων καταστρέφεται με μία χορηγούμενη δόση των 300 J/cm² και συγκέντρωση 80 µg/ml ΠΜΚ, ενώ αντίστοιχη αποτελεσματικότητα παρουσιάζεται με ενέργεια λευκού φωτός 600 J/cm² και συγκέντρωση 40 µg/ml ΠΜΚ.

Αποτιμήθηκε η δράση στου ΠΜΚ στην κυτταρική επιβίωση, καθώς και το κύριο μονοπάτι, νέκρωση ή απόπτωση, με το οποίο εισάγει τον κυτταρικό θάνατο. Όπως γίνεται φανερό από το Γράφημα 18, ήδη με μια συγκέντρωση ΠΜΚ 10 µg/ml καταγράφεται, μετά από φωτοδιέγερση με 900 J/cm² με λευκό φως λάμπας αλογόνου, απόπτωση στο 23,6% των καρκινικών κυττάρων. Η αντικαρκινική δράση του ΠΜΚ είναι ισχυρή όσο αυξάνει η συγκέντρωσή του. Σε επώαση με 20 µg/ml και 40 µg/ml ΠΜΚ, χωρίς την φωτοδιέγερσή του, παρατηρείται σημαντική κυτταροτοξικότητα με κύριο μονοπάτι κυτταρικού θανάτου την νέκρωση, σε ποσοστό 36,5% και 34,7% αντίστοιχα. Η δραστηριότητα του ΠΜΚ μετά από ΦΔΘ με λευκό φως, διατηρείται σε υψηλά επίπεδα, αλλά ο κυτταρικός θάνατος



Γράφημα 18 Δράση του ΠΜΚ στην κυτταρική επιβίωση με την δοκιμασία της κυτταρομετρίας ροής (FACS). Ομάδα αναφοράς επώαση σε θρεπτικό μέσο PBS μόνο

επιτυγχάνεται μέσω της απόπτωσης, στο 40,6% και στο 32,94% των καρκινικών κυττάρων, σε δόσεις ΠΜΚ 20 $\mu\text{g/ml}$ και 40 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα. Στο Γράφημα 19 παρουσιάζεται η ανάλυση FACS με την αποτύπωση της κυτταροτοξικής δράσης διαφορετικών δόσεων ΠΜΚ (10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ και 40 $\mu\text{g/ml}$) χωρίς φως (ομάδα ελέγχου) είτε μετά από φωτοδιέγερση με λευκό φως ενέργειας 900 J / cm². Κουκίδες που κατανέμονται στο δεξιό – κάτω τεταρτημόριο αντιπροσωπεύουν κύτταρα που υπέστησαν νέκρωση ενώ κουκίδες που βρίσκονται στο αριστερό – άνω τεταρτημόριο αντιπροσωπεύουν κύτταρα που υπέστησαν απόπτωση.



Γράφημα 19 κυτταροτοξική δράση διαφορετικών δόσεων ΠΜΚ ± λευκό φως 900 J/cm²

4.4. In vivo πειράματα: Εντόπιση του προκαλούμενου από την υπερικίνη φθορισμού μετά από έγχυση του Πολικού Μεθανολικού Κλάσματος του *Hypericum Perforatum* L σε φυσιολογικό ουροθήλιο θηλυκών αρουραίων Wistar

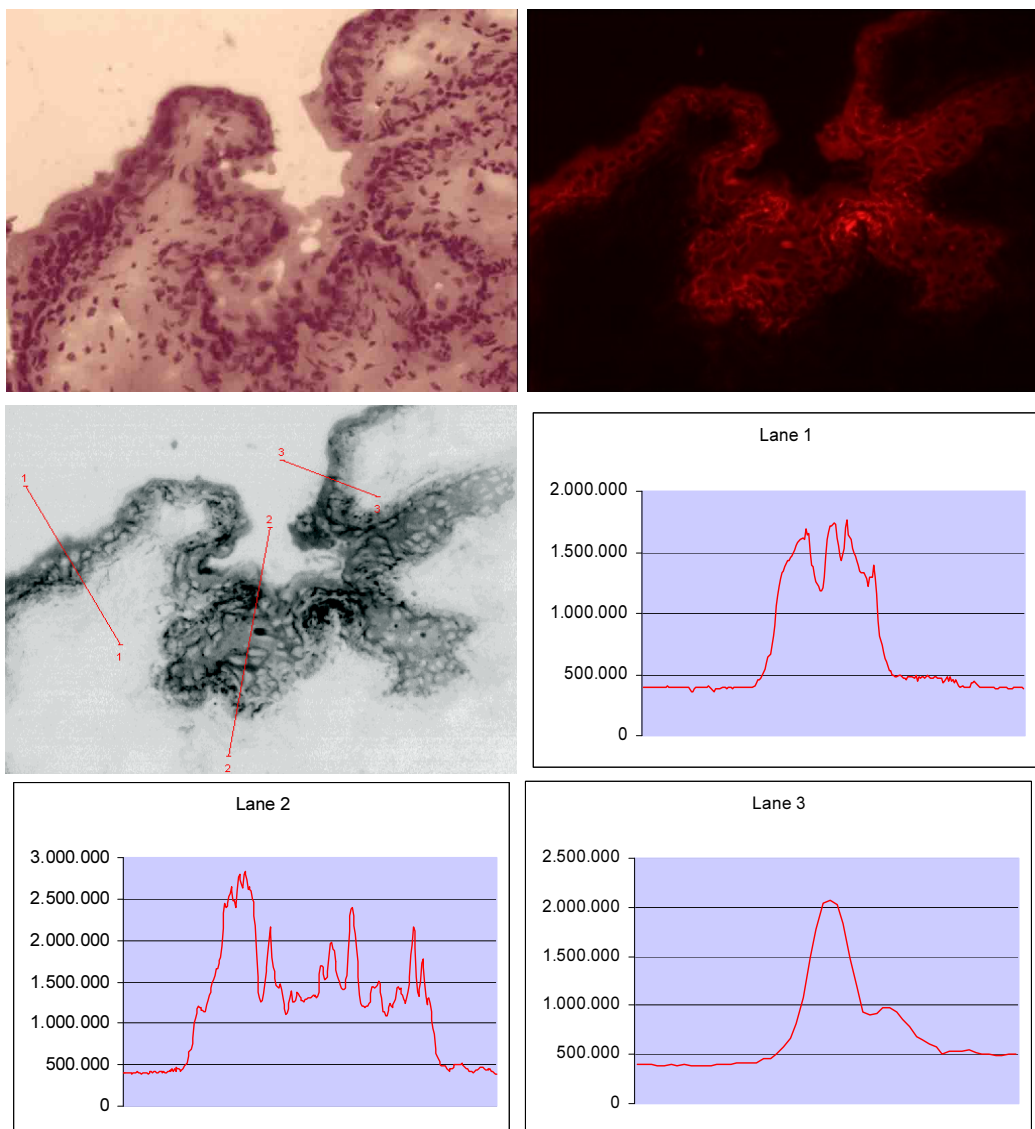
Η πειραματική διαδικασία είχε σαν αφετηρία την μέγιστη συγκέντρωση ΠΜΕ, δηλαδή τα 36.5 mg/ml, τα οποία περιείχαν 500 μg/ml υπερικινών με διάστημα ενδοκυστικής παραμονής τα εξήντα λεπτά, με σταδιακή μείωση του χορηγούμενου ενδοκυστικά ΠΜΕ στο μισό (18,25 mg/ml, δηλαδή 250 μg/ml) και σταδιακής μείωσης της ενδοκυστικής παραμονής. Σε όλες τις ομάδες των αρουραίων το ΠΜΚ εκδήλωνε ομοιόμορφη κατανομή στο ουροθήλιο, όπως αυτή προκύπτει από τις μετρήσεις της έντασης φθορισμού στο ουροθήλιο.

4.4.1. Μετρήσεις της έντασης διέγερσης (φθορισμού) του τοιχώματος μέσω εγκαρσίων γραμμών κατά μήκος του τοιχώματος

Στα αρχικά πειράματα μελετήθηκαν κυρίως κάποια συγκεκριμένα στοιχεία των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων του ΠΜΚ. Αυτές ήταν η ικανότητά του να φθορίζει, η απορρόφησή του από το ουροθήλιο ή τον μυϊκό, η κατανομή του και η απομάκρυνσή του.

Στις παθολογοανατομικές τομές τις ουροδόχου κύστεως στους αρουραίους που έλαβαν την μέγιστη συγκέντρωση (κορεσμένο διάλυμα) ΠΜΚ ενδοκυστική παραμονή εξήντα λεπτών και θανάτωση αμέσως μετά την έκπλυση του ΠΜΚ, διαπιστώθηκε ότι υπήρχε απορρόφηση από το ουροθήλιο (Εικόνα 8). Μάλιστα υπήρχε ομοιόμορφη κατανομή του σε αυτό, όπως φαίνεται από τα διαγράμματα της διακύμανσης της σχετικής έντασης της διέγερσης (φθορισμός), (Εικόνα 8-γραφήματα φθορισμού) όπως προέκυψαν από την ανάλυση κβαντισμού κατά μήκος των ευθείων γραμμών. Επιπλέον η ένταση φθορισμού του μυϊκού ήταν ίση με την ένταση που καταγράφονταν στον αυλό της κύστεως, όπου το ΠΜΚ είχε εκπλυθεί. Αυτό σήμαινε ότι η υπερικίνη του ΠΜΚ δεν διαχύθηκε από το ουροθήλιο στον μυϊκό. Επίσης δεν ανιχνεύθηκε φθορισμός στα αγγεία (αρτηρίες, φλέβες, λεμφαγγεία) του μυϊκού, αποκλείοντας έτσι την περίπτωση να έγινε κάθαρση της υπερικίνης μέσω των αγγείων (Εικόνα 8-γραφήματα φθορισμού).

Στις επόμενες ομάδες υπήρχε σταδιακή μείωση του ενδοκυστικού χρόνου παραμονής του ΠΜΚ καθώς και μείωση της δόσης στο μισό με απώτερο σκοπό να



Εικόνα 8. Συγκέντρωση ΠΜΚ 36,5 mg/ml, ενδοκυστική παραμονή 60 λεπτά, άμεση θανάτωση μετά την έκπλυση. Παθολογοανατομικές τομές ουροδόχου κύστεως αρουραίου με την διαδικασία της ταχείας βιοψίας Μεγέθυνση 200x.

Άνω αριστερά: Χρώση αιματοξυλίνης & ηωσίνης..

Άνω δεξιά: Μικροσκόπηση φθορισμού διαδοχικής τομής της προηγούμενης με την βοήθεια ζωνοπερατού (bandpass) φίλτρο διέγερσης στα 535/50 nm.

Μέση αριστερά: Κβαντική ανάλυση της έντασης διέγερσης (φθορισμού) τριών εγκαρσίων τομών 1,2 και 3. (Λογισμικό ISIS).

Υπόλοιπες εικόνες: Γραφήματα που αντιπροσωπεύουν τις διακυμάνσεις της σχετικής έντασης η οποία καταμετρήθηκε κατά μήκος των γραμμών (μετρημένες ως σχετικές μονάδες έντασης).

βρούμε την μικρότερο δυνατό χρονικό διάστημα παραμονής με την μικρότερη δοσολογία τα οποία θα παρήγαγαν παρόμοιας κλίμακας ένταση φθορισμού με την αρχική ομάδα (36.5 mg/ml ΠΜΚ - εξήντα λεπτά ενδοκυστικής παραμονής).

Οι τιμές έντασης της διέγερσης κατά μήκος ευθείων γραμμών, που διατρέχουν από τον αυλό έως και το μυϊκό τοίχωμα, και ο λόγος ανάμεσα στο ουροθήλιο, τον αυλό της ουροδόχου κύστεως και τον μυϊκό παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.

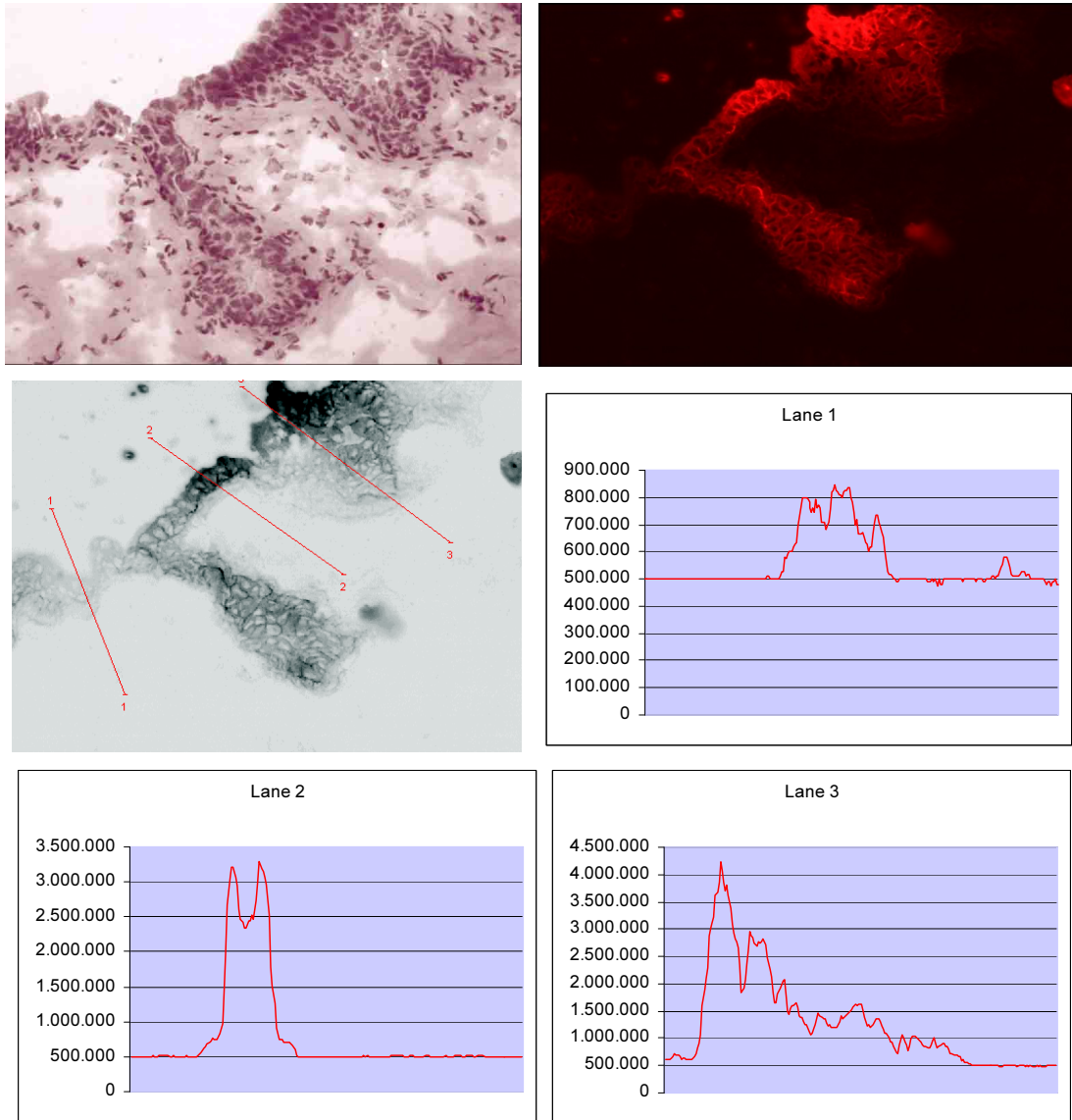
Από τις μετρήσεις φάνηκε πως η καταγραφόμενη ένταση φθορισμού της υπερικίνης παρέμενε σχετικά σταθερή παρόλο που πραγματοποιούνταν σταδιακή μείωση του ενδοκυστικού χρόνου παραμονής της καθώς και μείωση της συγκέντρωσής της στο ήμισυ. Όπως φαίνεται από τον πίνακα 11, εικόνες 8 & 9, τα 36,5 mg/ml ΠΜΚ με ενδοκυστική παραμονή 60 λεπτών παρήγαγαν παρόμοια ένταση φθορισμού με τα 18,25 mg/ml ΠΜΚ με δεκαπεντάλεπτη ενδοκυστική παραμονή, μέση τιμή έντασης 3815×10^3 έναντι 3675×10^3 . Ο λόγος φθορισμού ουροθηλίου / μυϊκού εκτεινόταν από 5/1 έως 11/1 κατά μήκος των ευθείων γραμμών, στα διάφορα δειγματοληπτικά σημεία των παρασκευασμάτων. Ο καταγραφόμενος φθορισμός του μυϊκού ήταν σε όλες τις περιπτώσεις ίσος με αυτόν που προέρχονταν από τον αυλό της ουροδόχου, δηλαδή πρακτικά μηδέν.

Η συγκέντρωση αυτή, (18,25 mg/ml ΠΜΚ περιέχουσα 250 μ g/ml υπερικινών) με παραμονή δεκαπέντε λεπτών στην ουροδόχο κύστη, εμφάνιζε ιδανικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες, δηλαδή μικρή συγκέντρωση – μικρή ενδοκυστική παραμονή – ικανή ένταση φθορισμού. Αποφασίστηκε αυτή ότι θα ήταν η **διαδικασία αναφοράς χορήγησης του φωτοευαισθητοποιητή** για να διερευνηθεί περαιτέρω η χρονική εξέλιξη των ποσοτικών και ποιοτικών μεταβολών της υπερικίνης καθώς τα φαρμακοδυναμικά αποτελέσματα αυτής στο ουροθήλιο, με ή χωρίς φωτοδιέγερση με λευκό φως.

Πίνακας 11 Εντάσεις φωτοδιέγερσης (φθορισμού) καταμετρημένες κατά μήκος εγκάρσιων γραμμών, σε ποικίλες δοσολογίες και ενδοκυτταρικής διάρκειας ενδοκυτταρικής παραμονής του ΠΜΚ, καθώς και σε ποικίλα χρονικά διαστήματα μετά την έκπλυση.

Δοσολογία ΠΜΚ mg/ml (υπερικίνες) µg/ml	Διάρκεια ενδοκυτταρικής παραμονής	Χρόνος θανάτωσης μετά την κένωση της κόσπεως	Λόγος έντασης Ουροθελίου / Μυϊκού Διακόμενου (μέση τιμή)	Λόγος έντασης Μυϊκού/ Αιολού ουροδόχου	Ένταση Ουροθελίου (X10 ³) Διακόμενου (μέση τιμή)	Ένταση Μυϊκού (X10 ³) Διακόμενου (μέση τιμή)	Ένταση Αιολού ουροδόχου (X10 ³) Διακόμενου (μέση τιμή)
36,5 (500)	Μία ώρα	Άμεσα	5/1 – 10/1 (7/1)	1/1	2500 – 7500 (3815)	500 – 750 (545)	500 – 750 (540)
36,5 (500)	Μισή ώρα	Άμεσα	5/1 – 8/1 (5,8/1)	1/1	2500 – 4600 (2930)	500 – 575 (506)	500 – 500 (500)
36,5 (500)	15 λεπτά	Άμεσα	5/1 – 8/1 (5,4/1)	1/1	2500 – 4800 (2786)	500 – 600 (516)	500 – 600 (516)
18,25 (250)	Μία ώρα	Άμεσα	5/1 – 11/1 (7,9/1)	1/1	1250 – 4400 (2686)	250 – 400 (340)	250 – 400 (340)
18,25 (250)	Μισή ώρα	Άμεσα	6.5/1 – 7.5/1 (7/1)	1/1	3250 – 4500 (3850)	500 – 600 (550)	500 – 600 (550)
18,25 (250)	15 λεπτά	Άμεσα	6/1 – 8/1 (7/1)	1/1	3000 – 4400 (3675)	500 – 550 (525)	500 – 550 (525)
18,25 (250)	15 λεπτά	Μία ώρα	4/1 – 6/1 (4,9/1)	1/1	3000 – 4800 (3836)	750 – 800 (783)	750 – 800 (783)
18,25 (250)	15 λεπτά	2 ώρες	3/1 – 4/1 (3,5/1)	1/1	2400 – 4000 (3150)	800 – 1000 (900)	800 – 1000 (900)
18,25 (250)	15 λεπτά	4 ώρες	2/1 – 3,5/1 (2,75/1)	1/1	1800 – 3500 (2475)	900 – 1000 (950)	900 – 1000 (950)
18,25 (250)	15 λεπτά	6 ώρες	1,2/1 – 3/1 (2/1)	1/1	720 – 3000 (1600)	600 – 1000 (800)	600 – 1000 (800)
18,25 (250)	15 λεπτά	24 ώρες	1/1	1/1	2,53 – 2,55 (2,54) Πρακτικά μηδέν	2,53 – 2,55 (2,54) Πρακτικά μηδέν	2,53 – 2,55 (2,54) Πρακτικά μηδέν

Σημειώνεται ο ιδανικός συνδυασμός συγκέντρωσης και ενδοκυτταρικής παραμονής είναι τα 18,25 mg/ml ΠΜΚ με 15 λεπτά ενδοκυτταρικής παραμονής (ροζ σήμανση), καθώς και ο σταθερός λόγος του αιολού/ μυϊκού σε όλες τις ομάδες (κίτρινη σήμανση).



Εικόνα 9 Συγκέντρωση ΠΜΚ 18,25 mg/ml, ενδοκυστική παραμονή 15 λεπτά, άμεση θανάτωση μετά την έκπλυση. Παθολογοανατομικές τομές ουροδόχου κύστεως αρουραίου με την διαδικασία της ταχείας βιοψίας Μεγέθυνση 200x.

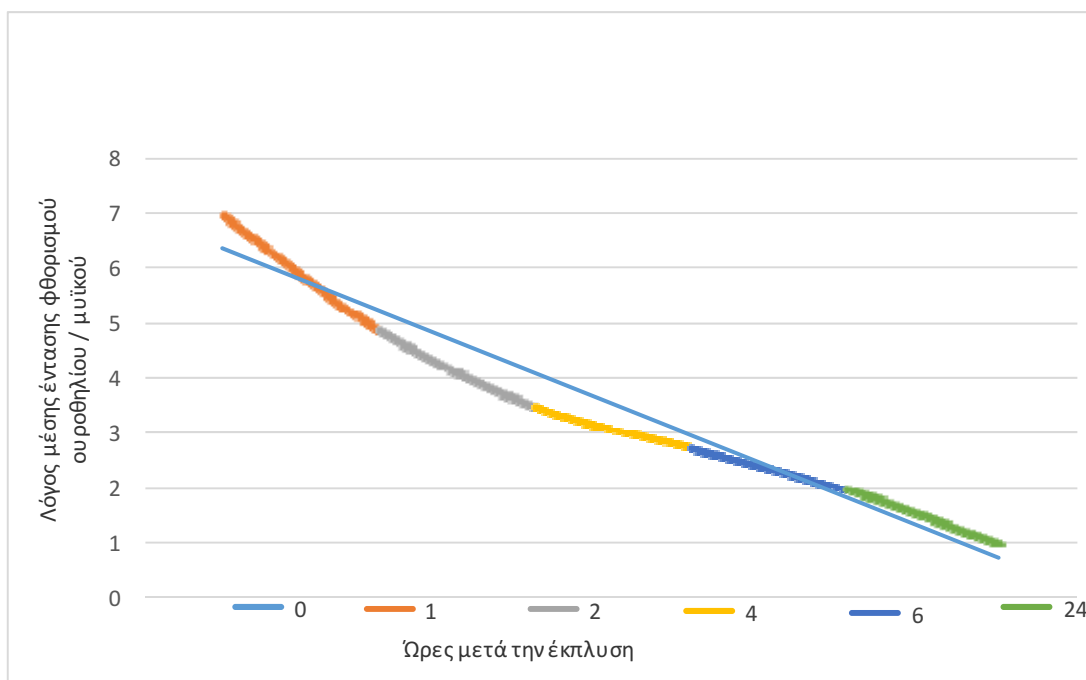
Άνω αριστερά: Χρώση αιματοξυλίνης & ηωσίνης..

Άνω δεξιά: Μικροσκόπηση φθορισμού διαδοχικής τομής της προηγούμενης με την βοήθεια ζωνοπερατού (bandpass) φίλτρο διέγερσης στα 535/50 nm.

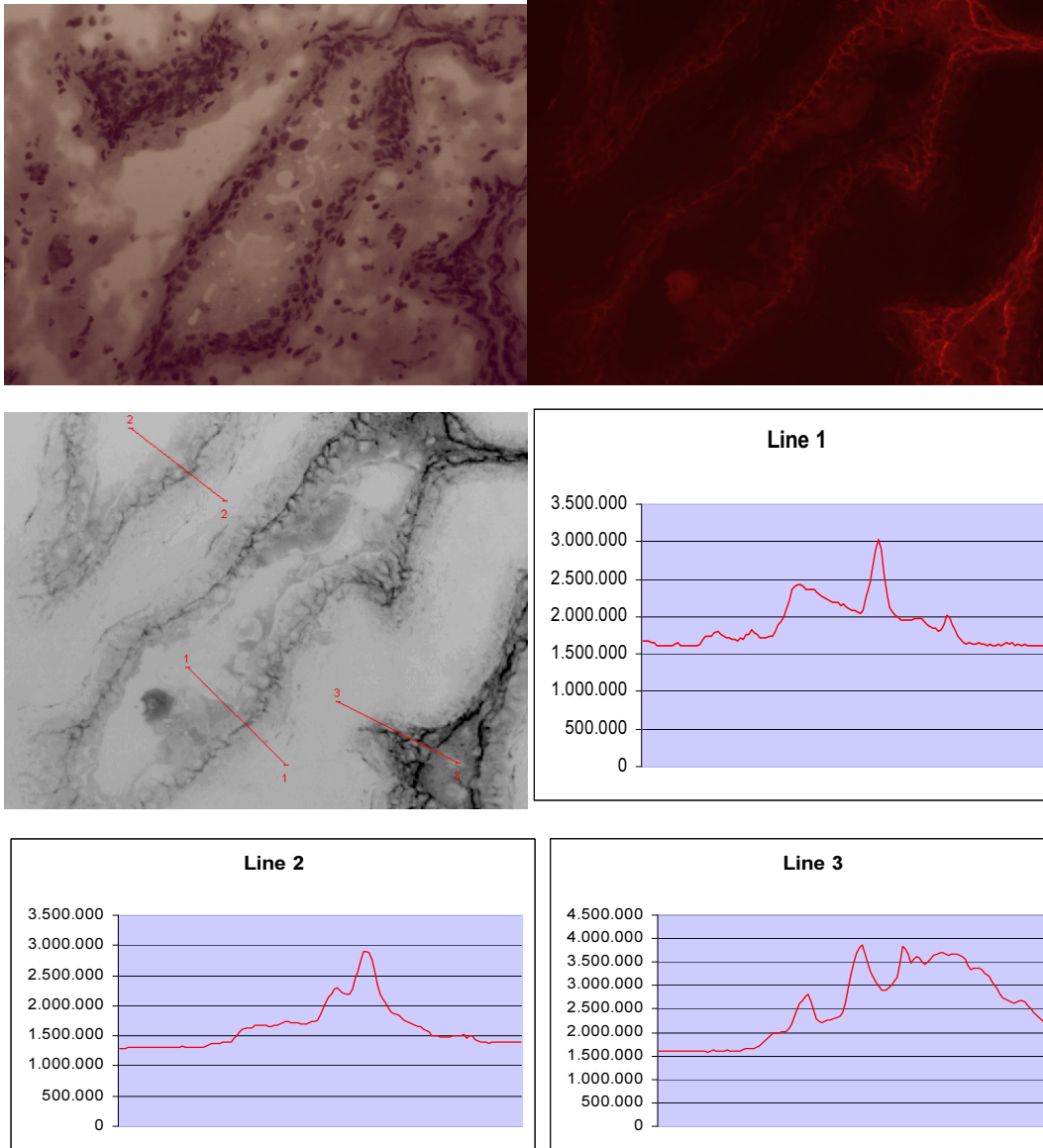
Μέση αριστερά: Κβαντική ανάλυση της έντασης διέγερσης (φθορισμού) τριών εγκαρσίων τομών 1,2 και 3. (Λογισμικό ISIS).

Υπόλοιπες εικόνες: Γραφήματα που αντιπροσωπεύουν τις διακυμάνσεις της σχετικής έντασης η οποία καταμετρήθηκε κατά μήκος των γραμμών (μετρημένες ως σχετικές μονάδες έντασης).

Οι τιμές έντασης της διέγερσης κατά μήκος ευθείων γραμμών, που διατρέχουν από τον αυλό έως και το μυϊκό τοίχωμα, και ο λόγος ανάμεσα στο ουροθήλιο, τον αυλό της ουροδόχου κύστεως και τον μυϊκό όπως καταγράφονταν στα διάφορα χρονικά διαστήματα μετά την έκπλυση του ΠΜΚ παρουσιάζονται στον πίνακα 11. Όπως προκύπτει η ένταση του φθορισμού του ουροθηλίου μειώνεται σταδιακά όσο μεγαλώνει το χρονικό διάστημα από την έκπλυση της ουροδόχου κύστεως. Το γράφημα 20 παρουσιάζει την μεταβολή του λόγου της έντασης φθορισμού μεταξύ ουροθηλίου και μυϊκού στον χρόνο. Έως και τις τέσσερις ώρες μετά την έκπλυση η παραγόμενη ένταση είναι ικανή με μέση τιμή 2475×10^3 σχετικές μονάδες, Εικόνα 10. Η τιμή της έντασης μειώνεται αρκετά στις έξι ώρες μετά την έκπλυση Εικόνα 11. Στις 24ώρες δεν καταγράφεται φθορισμός στο ουροθήλιο.



Γράφημα 20 Μεταβολή της λόγου έντασης φθορισμού ουροθηλίου / μυϊκού στον χρόνο



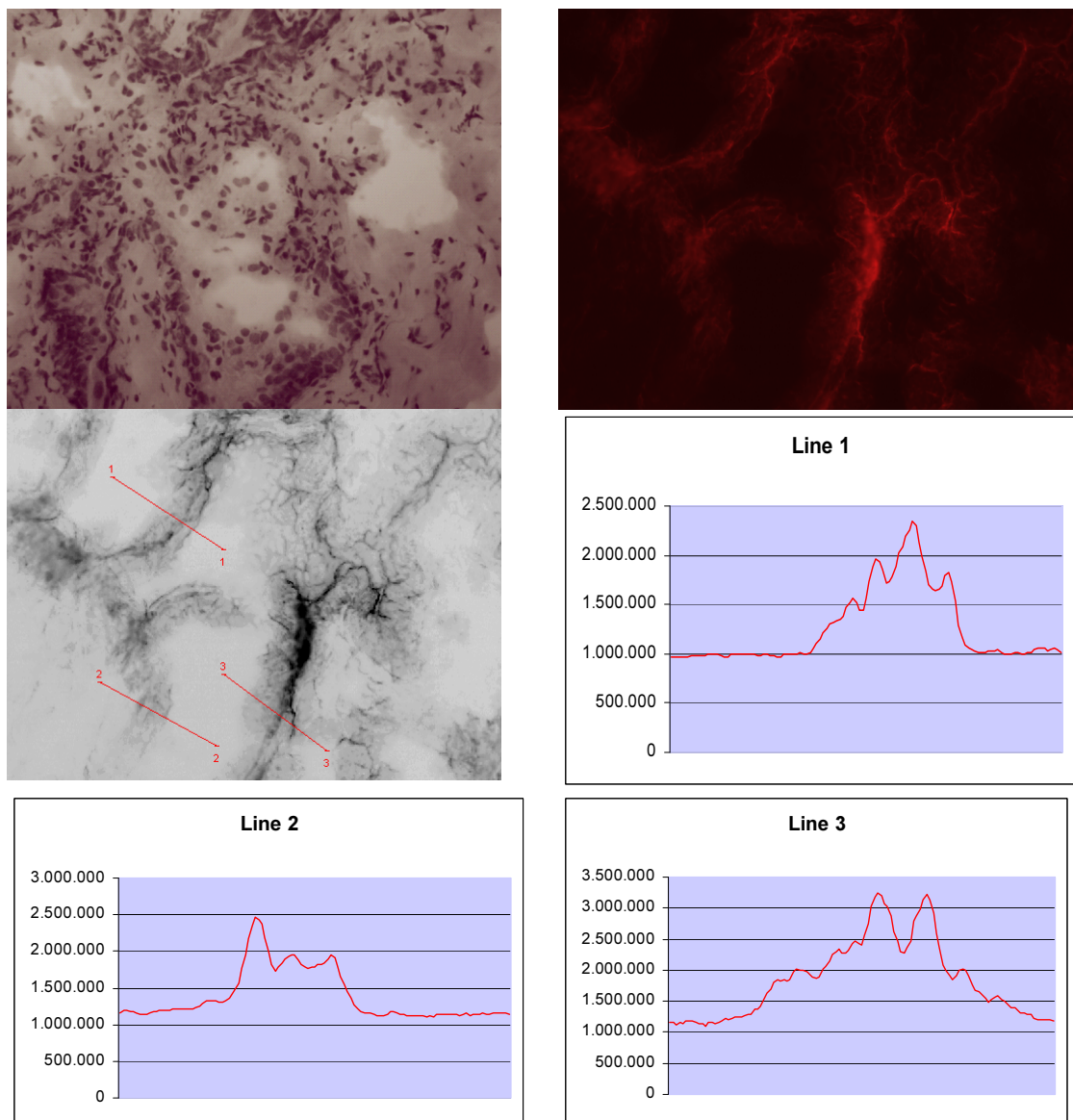
Εικόνα 10 Συγκέντρωση ΠΜΚ 18,25 mg/ml, ενδοκυστική παραμονή 15 λεπτά, θανάτωση 4 ώρες μετά την έκπλυση. Παθολογοανατομικές τομές ουροδόχου κύστεως αρουραίου με την διαδικασία της ταχείας βιοψίας. Μεγέθυνση 200x.

Άνω αριστερά: Χρώση αιματοξυλίνης & ηωσίνης..

Άνω δεξιά: Μικροσκόπηση φθορισμού διαδοχικής τομής της προηγούμενης με την βοήθεια ζωνοπερατού (bandpass) φίλτρο διέγερσης στα 535/50 nm.

Μέση αριστερά: Κβαντική ανάλυση της έντασης διέγερσης (φθορισμού) τριών εγκαρσίων τομών 1,2 και 3. (Λογισμικό ISIS).

Υπόλοιπες εικόνες: Γραφήματα που αντιπροσωπεύουν τις διακυμάνσεις της σχετικής έντασης η οποία καταμετρήθηκε κατά μήκος των γραμμών (μετρημένες ως σχετικές μονάδες έντασης).



Εικόνα 11 Συγκέντρωση ΠΜΚ 18,25 mg/ml, ενδοκυστική παραμονή 15 λεπτά, θανάτωση 6 ώρες μετά την έκπλυση. Παθολογοανατομικές τομές ουροδόχου κύστεως αρουραίου με την διαδικασία της ταχείας βιοψίας Μεγέθυνση 200x.

Άνω αριστερά: Χρώση αιματοξυλίνης & ηωσίνης..

Άνω δεξιά: Μικροσκόπηση φθορισμού διαδοχικής τομής της προηγούμενης με την βοήθεια ζωνοπερατού (bandpass) φίλτρο διέγερσης στα 535/50 nm.

Μέση αριστερά: Κβαντική ανάλυση της έντασης διέγερσης (φθορισμού) τριών εγκαρσίων τομών 1,2 και 3. (Λογισμικό ISIS).

Υπόλοιπες εικόνες: Γραφήματα που αντιπροσωπεύουν τις διακυμάνσεις της σχετικής έντασης η οποία καταμετρήθηκε κατά μήκος των γραμμών (μετρημένες ως σχετικές μονάδες έντασης).

Το μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθοδολογίας ήταν ότι οι μετρήσεις περιοριζόταν στα σημεία που τέμνονταν από τις γραμμές των εγκάρσιων τομών. Αυτές είχαν το πλεονέκτημα ανάδειξης των διαφορών της έντασης κατά μήκους μιας πιθανής διάχυσης της υπερικίνης στο χρόνο αλλά αδυνατούσαν να συλλάβουν το σύνολο του φθορισμού των δομών της ουροδόχου. Για να μην τεθεί θέμα αντικειμενικότητας των μετρήσεων, συγκρίθηκαν οι μέσες τιμές που προέκυψαν από το σύνολο της κάθε ανατομικής δομής στις ομάδες που υποβλήθηκαν στην **διαδικασία αναφοράς χορήγησης του φωτοευαισθητοποιητή** όπου μελετήθηκε η φαρμακοκινητική της υπερικίνης στο χρόνο.

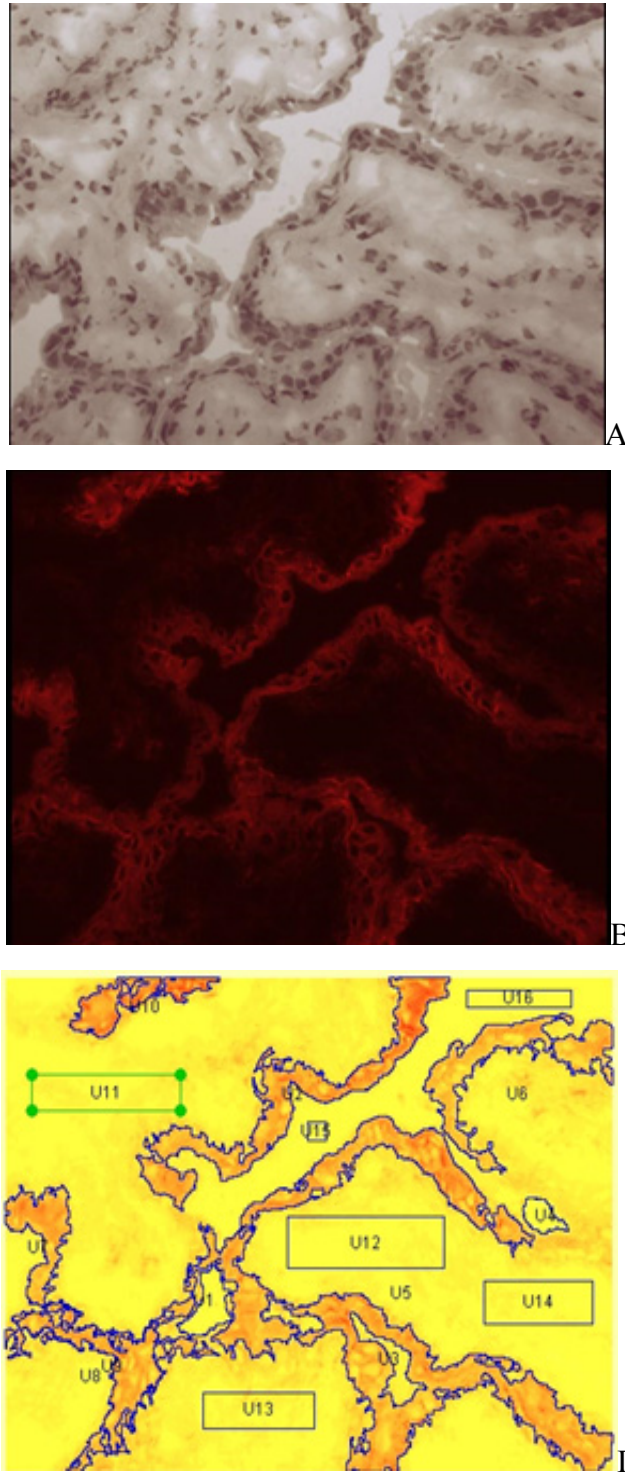
4.4.2. Μετρήσεις έντασης διέγερσης (φθορισμού) σε ολόκληρες της ανατομικές δομές του τοιχώματος της ουροδόχου

Επειδή τα παραπάνω ενθαρρυντικά αποτελέσματα έγιναν με την βοήθεια γραμμών, οπότε έγινε καταγραφή του φθορισμού μόνο κατά μήκους της γραμμής, αποφασίστηκε να γίνει καταμέτρηση του φθορισμού στην μεγαλύτερη δυνατή έκταση ανά ανατομική δομή ώστε να υπάρχει αντικειμενικότερη καταγραφή. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ολόκληρο το ουροθήλιο, τον αυλό και τον μυϊκό με την βοήθεια του ειδικού λογισμικού ISIS όπως εμφανίζονται στην Εικόνα 12.

Στον πίνακα 12 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές έντασης φθορισμού του ουροθηλίου, του αυλού και του μυϊκού όπως προέκυψαν από τις μετρήσεις. Ο αρχικός λόγος έντασης ουροθηλίου / μυϊκό από 3,363 στην άμεση θανάτωση μετά την έγχυση πέφτει στα 2,890 έξι ώρες μετά, παρουσιάζοντας μια μείωση της έντασης φθορισμού μόνο 14%.

Όταν απεικονίζεται η μεταβολή του λόγου της έντασης φθορισμού του μεταξύ ουροθηλίου και μυϊκού γίνεται φανερό ότι υπάρχει μια παρατεταμένη δράση της υπερικίνης στον χρόνο, με μικρές μεταβολές από την άμεση θανάτωση έως και τις έξι ώρες, όπως φαίνεται και από την γραμμή τάσης του Γραφήματος 21.

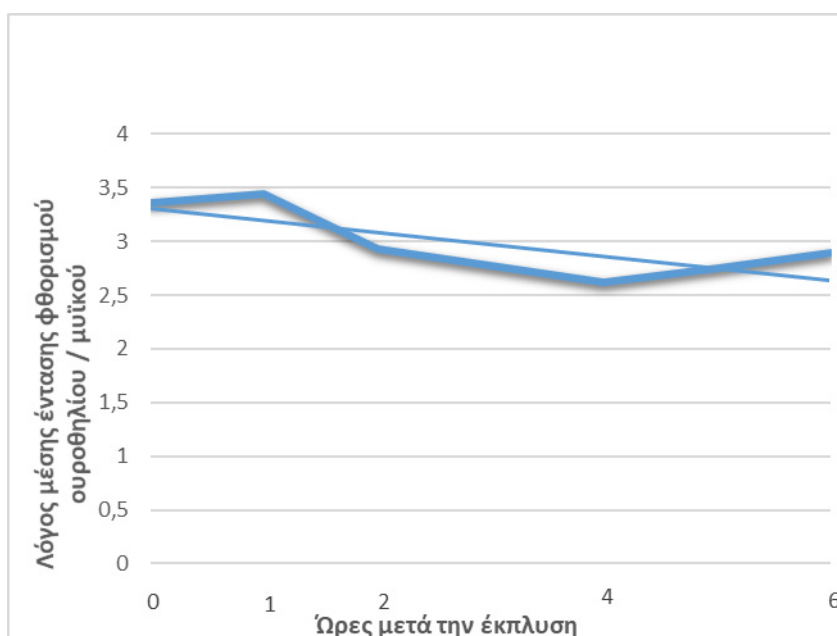
Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η ενδοκυστική παραμονή για 15 λεπτά της ουσίας έχει παρόμοια ένταση φθορισμού με την παραμονή μίας ώρας. Η ουσία μπορεί και φθορίζει 6 ώρες μετά την έκπλυσή της ενώ δεν διαπερνά την βασική μεμβράνη. Φαίνεται δηλαδή ότι η δεκαπεντάλεπτη ενδοκυστική παραμονή ΠΜΚ ακόμα και σε δόση 18,25 mg/ml, η οποία είναι η μισή της κορεσμένης δόσης, παράγει ικανό και παρατεταμένο φθορισμό στο ουροθήλιο.



Εικόνα 12 Συγκέντρωση ΠΜΚ 18,25 mg/ml, ενδοκυστική παραμονή 15 λεπτά, θανάτωση 6 ώρες μετά την έκπλυση. Παθολογοανατομικές τομές ουροδόχου κύστεως αρουραίου με την διαδικασία της ταχείας βιοψίας. Μεγέθυνση 200x. Α. Χρώση αιματοξυλίνης & ηωσίνης. Β. Μικροσκόπηση φθορισμού διαδοχικής τομής της προηγούμενης με την βοήθεια ζωνοπερατού (bandpass) φίλτρο διέγερσης στα 535/50 nm. Γ. Κβαντική ανάλυση. U1 – U10 ουροθήλιο, U11-U14 μυϊκός, U15-U16 αλός

Πίνακας 12 Εντάσεις φωτοδιέγερσης (φθορισμού) καταμετρημένες σε ολόκληρες τις ανατομικές δομές και σε ποικίλα χρονικά διαστήματα μετά την έκπλυση του ΠΜΚ 18,25 mg/ml μετά από παραμονή 15 λεπτών

ΦΔΘ Χρόνος θανάτωσης μετά την κένωση της ουροδόχου	Ένταση φθορισμού ουροθηλίου	Ένταση φθορισμού μυϊκού	Ένταση φθορισμού κοιλότητας ουροδόχου	Λόγος έντασης φθορισμού Ουροθηλίου / μυϊκού	Λόγος έντασης φθορισμού μυϊκού / κοιλότητας ουροδόχου
Άμεσα	370	110	113,38	3,363	1/1
Μία ώρα	620	180	190	3,444	1/1
2 ώρες	440	150	180	2,933	1/1
4 ώρες	550	210	250	2,619	1/1
6 ώρες	550	190	190	2,890	1/1
24 ώρες	0	0	0	0	0
Ομάδα αναφοράς Φως + NaCl	0	0	0	0	0
Ομάδα αναφοράς ΠΜΚ μόνο	Θυσιάστηκαν στο 24ωρο – καμία μεταβολή στο ουροθήλιο				



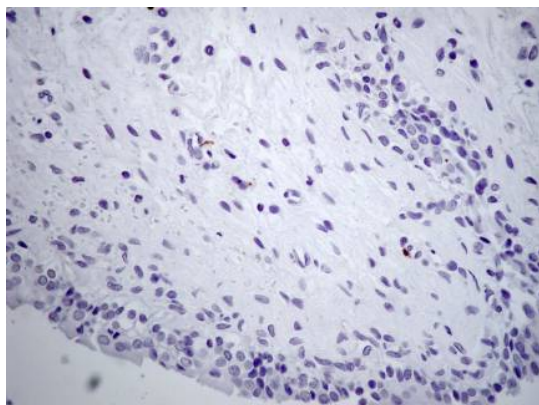
Γράφημα 21 Μεταβολή της λόγου έντασης φθορισμού ουροθηλίου / μυϊκού στον χρόνο

Αποφασίστηκε ΓΙΑ ΟΛΑ τα επόμενα πειράματα διερεύνησης της φωτοδυναμικής δράσης του ΠΜΚ να πραγματοποιηθούν με συγκέντρωση 18,25 mg/ml, που περιέχουν 250μg/ml υπερίκινης και 15λεπτη ενδοκυτική παραμονή.

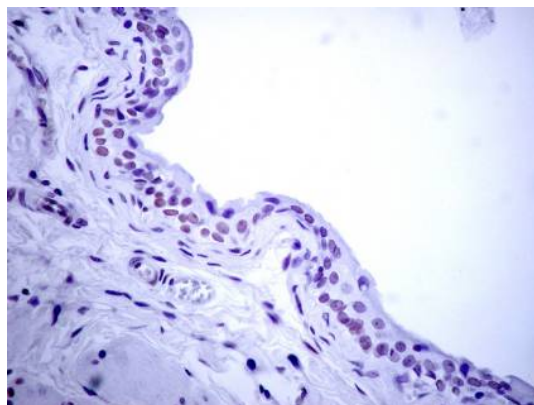
4.5. Αποτίμηση της φωτοδυναμικής δράσης του ΠΜΚ και φωτοδιέγερση με λευκό φως ποικίλης έντασης σε θηλυκούς αρουραίους Wistar

4.5.1. Χορήγηση λευκού φωτός σε διανοιγμένη ουροδόχο κύστη μετά από λαπαροτομία

Οι αρουραίοι θυσιάστηκαν μετά την πάροδο 10 ημερών από την ακτινοβολήσή τους με ένταση 420 J/cm^2 λευκού φωτός πηγής αλογόνου. Στην ομάδα που χορηγήθηκε ενδοκυτικά ΠΜΚ, συγκέντρωσης 18,25 mg/ml, με την δοκιμασία TUNEL διαπιστώθηκε ότι 13% των ουροθηλιακών κυττάρων εμφάνιζαν απόπτωση Πίνακας 13. Αυτή περιοριζόταν στα κύτταρα του ουροθηλίου και κατανέμονταν τυχαία σε όλες τις κυτταρικές στοιβάδες του ουροθηλίου (Εικόνα 13).



Εικόνα 13 Ομάδα αναφοράς (μόνο φως)
Μεγέθυνση 200x



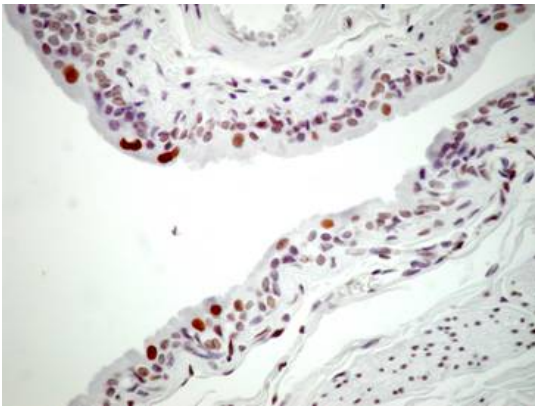
Εικόνα 14 Λευκό φως (420 J/cm^2) + ΠΜΚ
Μεγέθυνση 400x

Πίνακας 13 Αποπτωτικοί δείκτες ομάδας αναφοράς και κύστης η οποία έχει διανοιχθεί εγκάρσια και ακτινοβοληθεί με 420 J/cm^2

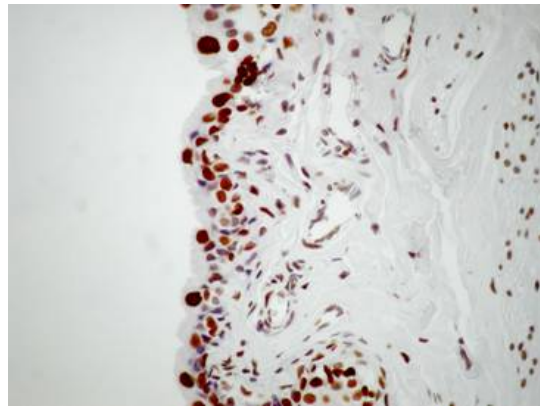
	Ομάδα αναφοράς (μόνο λευκό φως)	Λευκό φως + ΠΜΚ
Αποπτωτικός δείκτης	0,06%	13%

4.6. Ενδοκυστική χορήγηση λευκού φωτός με την βοήθεια οπτικής ίνας

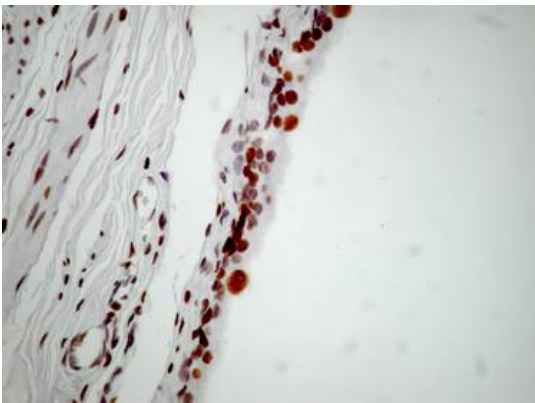
Η ικανότητα του ΠΜΚ να εισάγει απόπτωση μετά από φωτοβόληση με λευκό φως σε διανοιγμένη ουροδόχο κύστη μας οδήγησε στην διερεύνηση της αποτελεσματικότητάς του να εισάγει απόπτωση μετά από ενδοκυστική χορήγηση λευκού φωτός. Η χορηγούμενη δόση αυξάνονταν σταδιακά ανά ομάδα αρουραίων και αυτοί θυσιάζονταν στις 14 ημέρες μετά την ΦΔΘ. Τόσο το ποσοστό των κυττάρων θετικών στην TUNEL, και κατ' επέκταση ο αποπτωτικός δείκτης, όσο και αυτών με ενεργοποιημένη κασπάση 3 αυξάνονταν με την χορηγούμενη ενέργεια. Εικόνες 15, 16, 17 και 18. Στα 210 J/cm^2 ανήλθε στα 25%



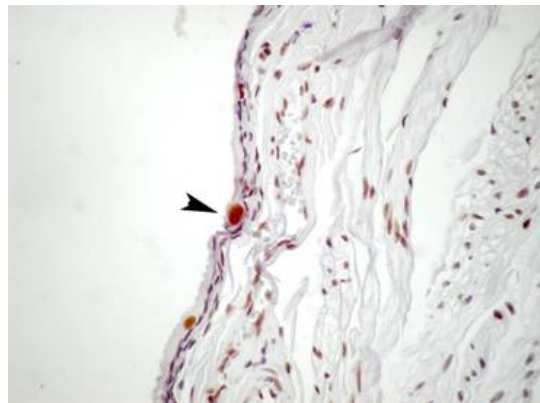
Εικόνα 15 PDT 110 J/cm^2 14 ημέρες μετά ΦΔΘ Apoptotic index TUNEL: 9% Μεγέθυνση 400x



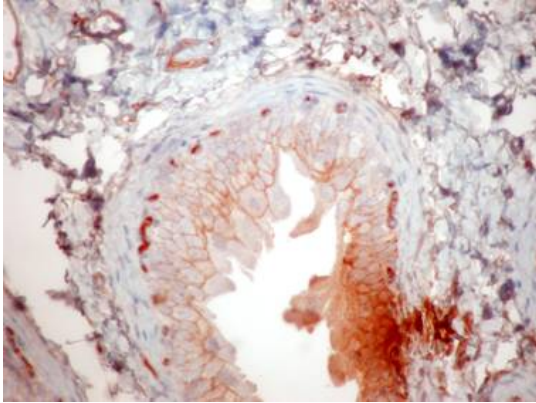
Εικόνα 16 PDT 210 J/cm^2 14 ημέρες μετά ΦΔΘ Apoptotic index TUNEL: 9% Μεγέθυνση 400x



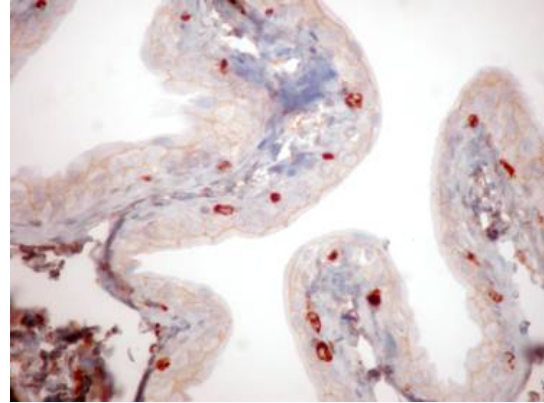
Εικόνα 17 PDT 350 J/cm^2 30 ημέρες μετά ΦΔΘ Apoptotic index TUNEL: 60% Μεγέθυνση 400x



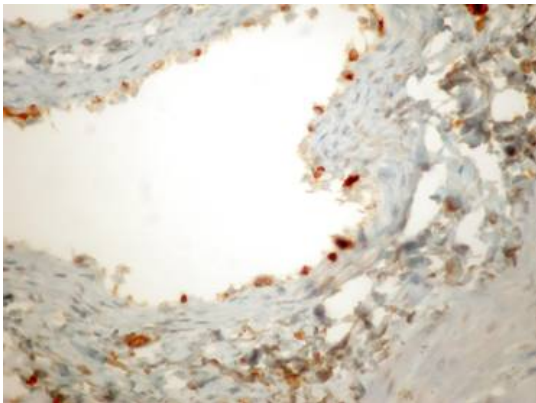
Εικόνα 18 PDT 700 J/cm^2 30 ημέρες μετά ΦΔΘ Apoptotic index TUNEL: 99% Μεγέθυνση 400x



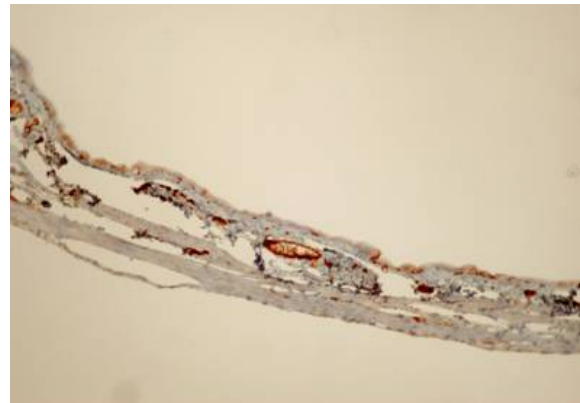
Εικόνα 19 PDT 110 J/cm² 14 ημέρες μετά
ΦΔΘ Αποπτοtic index: caspase act. 3%
Μεγέθυνση 10x40



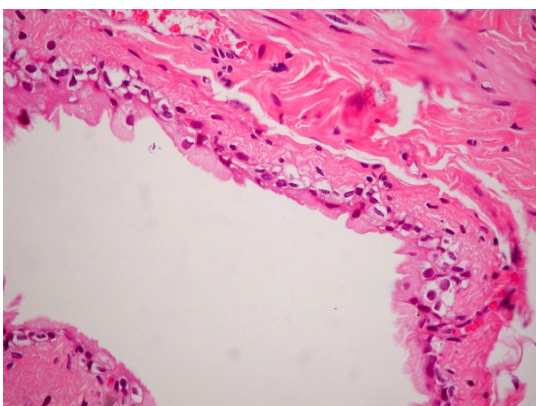
Εικόνα 20 PDT 210 J/cm² 14 ημέρες μετά
ΦΔΘ Αποπτοtic index caspase act. 9%
Μεγέθυνση 10x40



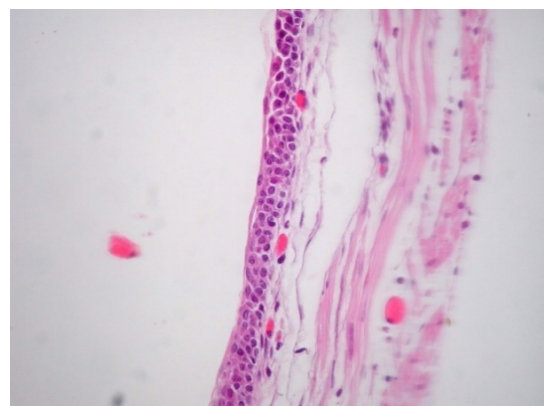
Εικόνα 21 PDT 350 J/cm² 30 ημέρες μετά
ΦΔΘ Αποπτοtic index caspase act. 25%
Μεγέθυνση 10x40



Εικόνα 22 PDT 700J/cm² 30 ημέρες μετά
ΦΔΘ Αποπτοtic index caspase act. 65%
Μεγέθυνση 10x40



Εικόνα 23 PDT 700J/cm² 90 ημέρες μετά
ΦΔΘ αναγεννημένο ουροθήλιο
Μεγέθυνση 10x40



Εικόνα 24 700J/cm² 90 ημέρες μετά
ΦΔΘ αναγεννημένο ουροθήλιο
Μεγέθυνση 10x40

των κυττάρων της δοκιμασίας TUNEL και 15% της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 Εικόνες 16 & 20. Στο σημείο αυτό αποφασίστηκε στις επόμενες αυξήσεις της χορηγούμενης ενέργειας να αυξηθεί και το διάστημα θυσίας των αρουραίων στις 30 ημέρες Εικόνες 17, 18, 21 και 22. Διαπιστώθηκε ότι χορηγώντας ενέργεια 700 J/cm² επιτυγχάνεται 100% απόπτωση των κυττάρων και απώλεια σχεδόν όλου του ουροθηλίου.(Εικόνες 18 & 22). Η παράθεση εικόνων γίνεται για να υπάρχει σύγκριση.

Το πείραμα με την χορηγούμενη ενέργεια των 700 J/cm² επαναλήφθηκε αλλά τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν στις 90 ημέρες όπου διαπιστώθηκε ότι σε όλα είχε αναγεννηθεί το ουροθήλιο, χωρίς να υπάρχει εικόνα φλεγμονής, ινικής ή ουλών γενικότερα Εικόνες 23 & 24. Τα αποτελέσματα από όλες τις ομάδες αρουραίων παρουσιάζονται συνοπτικά στο πίνακα 14

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα αποφασίστηκε η χορηγούμενη ενέργεια λευκού φωτός να είναι 700J/cm².

4.7. Μοντέλο ορθότοπης εμφύτευσης καρκινικών κυττάρων εκ μεταβατικού επιθηλίου AY-27 σε θηλυκούς αρουραίους Wistar

4.7.1. Μέτρηση απόπτωσης με την μέθοδο TUNEL

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν μετά 15λεπτη ενδοκυστική χορήγηση ΠΜΚ (18,25 mg/ml) και ακτινοβολήση λευκού φωτός 700J/cm². Στις πρώτες ομάδες των πειραματόζωων που θυσιάστηκαν διαπιστώθηκε πως υπήρχε μία αύξηση του αποπτωτικού δείκτη με το χρονικό διάστημα που παρήλθε από την εφαρμογή της ΦΔΘ. Μετρήσεις έγιναν στα σημεία των παθολογοανατομικών τομών όπου υπήρχαν όγκοι. Ο αποπτωτικός δείκτης αυξήθηκε σταδιακά από 9.08% όταν τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν στις 7 ημέρες από την ΦΔΘ, στο 13.28% στις 14 ημέρες και στο 16.12% στις 30 ημέρες Πίνακας15.

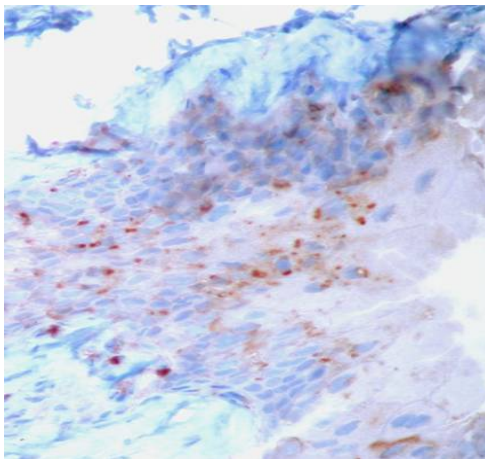
Πίνακας 14 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ομάδων ΦΔΘ. Στρογγυλοποίηση

Ουροθήλιο	Θεραπεία	Χορηγούμενη ενέργεια (Joules/cm ²)	Ημέρες μετά την PDT	Αποπτοτικό index % (SD)	
				TUNEL (SD)	Activated caspase 3 (SD)
Φυσιολογικό	ΦΔΘ	70	14	9,1% (1,1)	3,11% (0,72)
Φυσιολογικό	ΦΔΘ	110	14	9,14% (1,1)	3,14% (0,80)
Φυσιολογικό	ΦΔΘ	140	14	9,33% (1,78)	7,31% (1,15)
Φυσιολογικό	ΦΔΘ	210	14	25,45% (4,8)	15,31% (4,1)
Φυσιολογικό	ΦΔΘ	350	30	60,3% (14,05)	25,41% (11,54)
Φυσιολογικό	ΦΔΘ	700	30	Σχεδόν 100% Απώλεια του ουροθηλίου	Σχεδόν 100% Απώλεια του ουροθηλίου
Φυσιολογικό	Ομάδα αναφοράς, μόνο φως	700	30	0,6% (2,87)	0,6% (0,13)
Φυσιολογικό	Ομάδα αναφοράς, μόνο ΠΜΚ	0	7	0,75% (0,11)	0,75% (0,11)
Φυσιολογικό	Παραμένοντα μετά την ΦΔΘ	700	90	Αναγεννημένο ουροθήλιο χωρίς ουλές, ινική ή φλεγμονές	

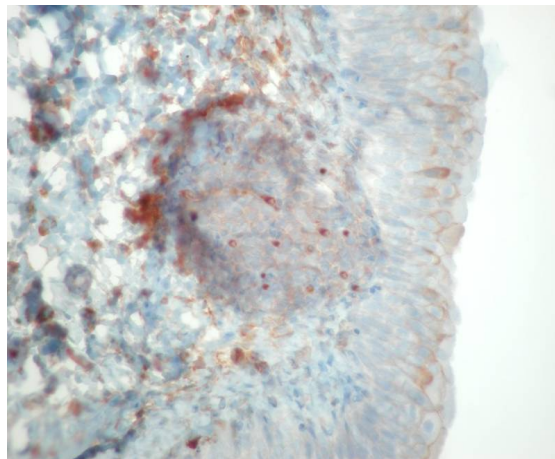
Καταγράφηκε μια σημαντική μείωση του μεγέθους των όγκων σε σχέση με την ομάδα αναφοράς, στην οποία καταγράφηκαν διηθητικοί όγκοι σε όλα τα πειραματόζωα, αλλά δεν υπήρχε εκρίζωση τους. Εικόνες 25 – 28

Πίνακας 15 Αποπτωτικός δείκτης στα χρονικά διαστήματα μετά την ΦΔΘ

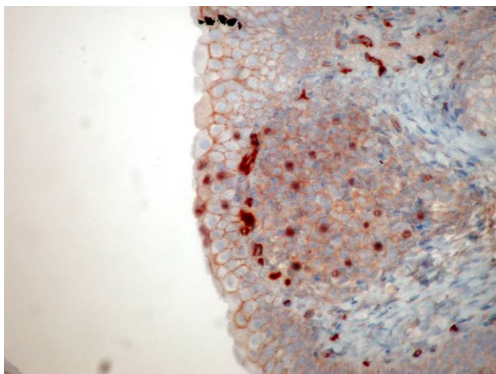
Ουροθήλιο	Θεραπεία	Ενέργεια ² (Joules/cm ²)	Διάστημα μετά ΦΔΘ	Αποπτotic index (SD)
AY-27	control	0	0	0.8%
AY-27	PDT	700	7	9.08% ± 0.88
AY-27	PDT	700	14	13.28% ±1.54
AY-27	PDT	700	30	16.12% ± 1.26



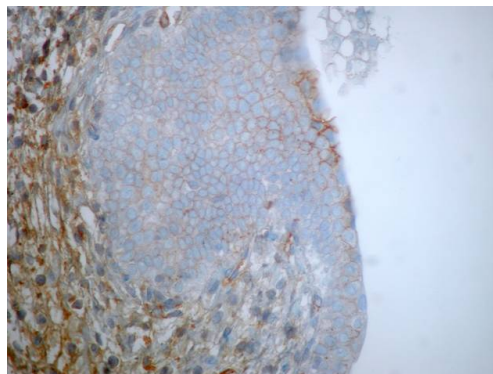
Εικόνα 25 AY-27, 7 ημέρες μετά ΦΔΘ Αποπτotic index **9.08%**
Μεγέθυνση 400x



Εικόνα 26 AY-27, 14 ημέρες μετά ΦΔΘ Αποπτotic index **13.28%**
Μεγέθυνση 400x



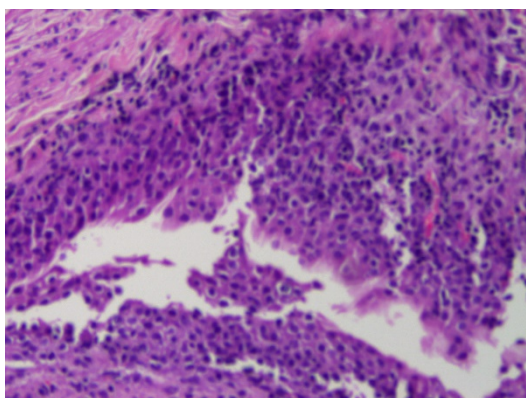
Εικόνα 27 AY-27, 30 ημέρες μετά ΦΔΘ Αποπτotic index **16.12%**
Μεγέθυνση 400x



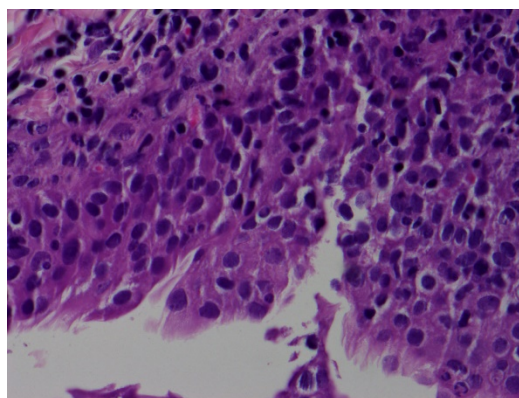
Εικόνα 28 AY-27, ομάδα ελέγχου Αποπτotic index 0.8%
Μεγέθυνση 400x

4.8. Φωτοδυναμική Θεραπεία μετά από τροποποίηση της καλλιέργεια κυττάρων και αύξηση της δόσης ΠΜΚ

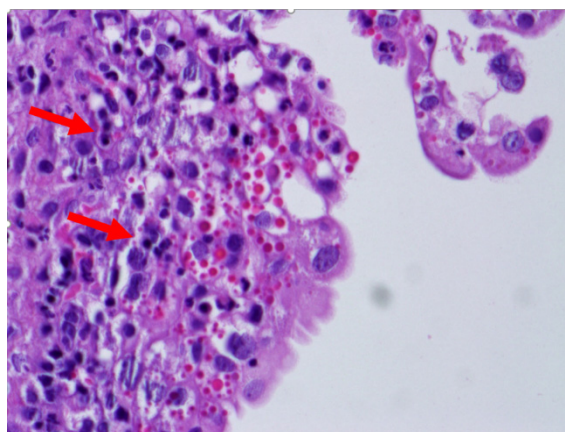
Επειδή στα προηγούμενα πειράματα οι όγκοι που προέκυψαν από το καρκινικό μοντέλο ήταν διηθητικοί, αποφασίστηκε να γίνει τροποποίηση στην καλλιέργεια των καρκινικών κυττάρων AY-27 ώστε να μειωθεί το καρκινικό τους δυναμικό. Αποφασίστηκε να καλλιεργηθούν διαδοχικά μόνο δύο φορές. Επίσης να αυξηθεί η φωτοδυναμική δράση της ΦΔΘ να αυξηθεί το χορηγούμενα ΠΜΚ από τα 18,25mg/ml στα 36.5mg/ml.



Εικόνα 29 Μεγάλου βαθμού δυσπλασία του ουροθηλίου. Χρώση αιματοξυλίνης / ηωσίνης. Μεγέθυνση 200x



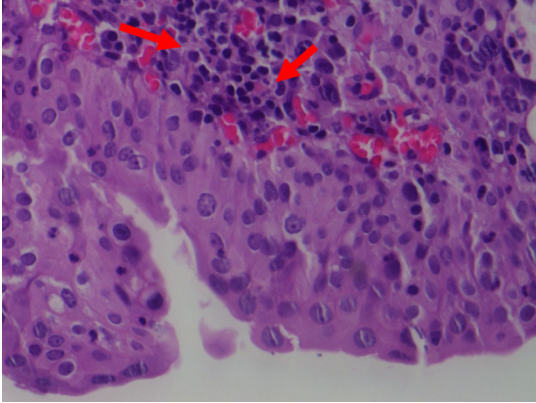
Εικόνα 30 Ίδια τομή με μεγέθυνση 400x



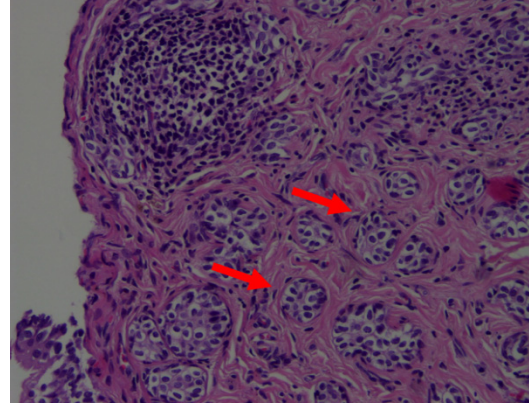
Εικόνα 31 Έντονη φλεγμονή (Βέλη). Χρώση αιματοξυλίνης / ηωσίνης. Μεγέθυνση 400x

Εικόνες από ουροδόχες κύστες αουραιών της ομάδας ελέγχου, που δεν υποβλήθηκαν σε έγχυση ΠΜΚ, οι οποίοι θυσιάστηκαν στις 30 ημέρες μετά την ακτινοβολήσή τους με λευκό φως και ενέργεια 700 J/cm^2

Παρατηρείται σοβαρή δυσπλασία DII στα όρια του in situ. Διακρίνεται φλεγμονώδη διήθηση ουροθηλίου και μυϊκού



Εικόνα 32 Μετρίου βαθμού δυσπλασία. Τα βέλη δείχνουν την φλεγμονώδη διήθηση. Χρώση αιματοξυλίνης / ηωσίνης. Μεγέθυνση 400x



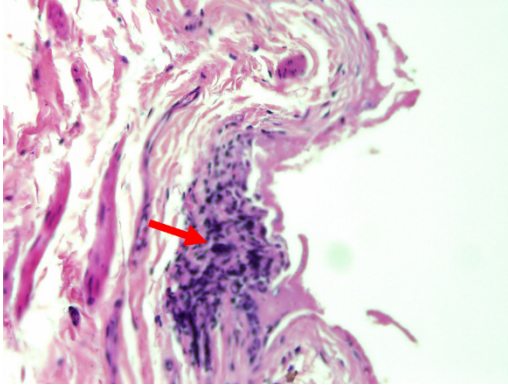
Εικόνα 33 Ιστολογική εικόνα κυστικής κυστίτιδας. Διακρίνονται εντός του χορίου οι νησίδες Von Brunns (βέλη). Χρώση αιματοξυλίνης / ηωσίνης. Μεγέθυνση 200x

Ουροδόχες κύστεις αρουραίων της ομάδας ελέγχου, δεν υποβλήθηκαν σε έγχυση ΠΜΚ, οι οποίοι θυσιάστηκαν στις 90 ημέρες μετά την ακτινοβολήσή τους με λευκό φως και ενέργεια 700 J/cm^2

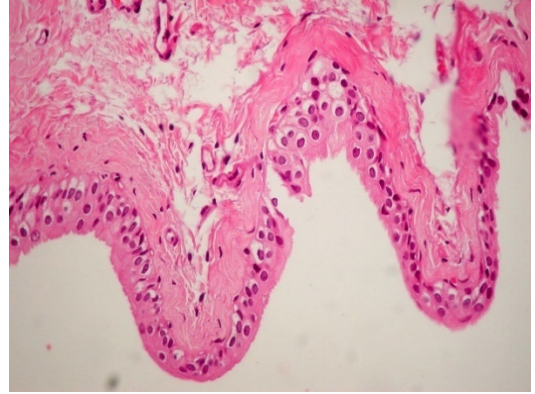
Σε όλα τα πειραματόζωα το οποία υποβλήθηκαν μόνο σε ακτινοβολήση παρατηρήθηκαν δυσπλαστικές αλλοιώσεις. Οι αρουραίοι της ομάδας ελέγχου (ακτινοβολήση χωρίς την χορήγηση ΠΜΚ) που θυσιάστηκαν στις 30 ημέρες μετά είχαν δυσπλαστικές αλλοιώσεις στο ουροθήλιο οι οποίες ανιχνεύονταν στις θέσεις όπου υπήρχε καταστροφή του ουροθηλίου. Επιπλέον παρατηρήθηκε έντονη διήθηση τόσο του ουροθηλίου όσο και του μυϊκού από φλεγμονώδη κύτταρα, πολυμορφοπύρρηνα και μονοκύτταρα. Εικόνες 29 - 31.

Τα πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου τα οποία θυσιάστηκαν στις 90 ημέρες μετά την χορήγηση του λευκού φωτός εμφάνισαν δυσπλασία στο ουροθήλιο και καταδύσεις αλλοιώσεων κυστικής κυστίτιδας (cystitis cystica) στον μυϊκό Εικόνες 32,33.

Οι ουροδόχες κύστεις των αρουραίων που υποβλήθηκαν σε φωτοδυναμική θεραπεία και θυσιάστηκαν στις 30 ημέρες είχαν πλήρη εξάλειψη του ουροθηλίου χωρίς την παρουσία φλεγμονής. Δεν παρατηρήθηκε κανένα δυσπλαστικό κύτταρο Εικόνα 34. Ενενήντα ημέρες μετά την φωτοενεργοποίηση του ΠΜΚ οι ουροδόχες κύστεις των πειραματόζωων είχαν αναγεννηθεί χωρίς την παρουσία ουλώδους ιστού. Εικόνα 35.



Εικόνα 34 Χρώση αιματοξυλίνης / ηωσίνης.
Μεγέθυνση 400x



Εικόνα 35 Χρώση αιματοξυλίνης / ηωσίνης.
Μεγέθυνση 400x

Ουροδόχος κύστη θηλυκών αρουραίων που υποβλήθηκαν σε ενδοκυστική χορήγηση ΠΜΚ και ΦΔΘ $700\text{J}/\text{cm}^2$

Εικόνα 34: 30 ημέρες μετά την ΦΔΘ. Απόπτωση του ουροθηλίου με αντίστοιχη επικάλυψη με ινική. Στο χόριο παρατηρείται εστιακά μέτριου βαθμού χρόνια φλεγμονή (βέλος)

Εικόνα 35: 90 ημέρες μετά την ΦΔΘ. Πλήρης αναγέννηση του ουροθηλίου.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά την διάρκεια των αιώνων η φύση μεριμνούσε όχι μόνο για την κάλυψη των βασικών αναγκών των ανθρώπων, αλλά και με την παροχή φαρμάκων για την πρόληψη – θεραπεία ενός ευρέως φάσματος παθήσεων. Υπάρχουν καταγραφές στην Μεσοποταμία, γύρω στα 2500 π.Χ., για χρήση περίπου 1000 ουσιών, φυτικής προέλευσης, για την αντιμετώπιση μια σειράς παθήσεων. Ο συνεχιζόμενος και ουσιαστικός ρόλος που παίζουν τα διάφορα φυτικά παράγωγα στην υγειονομική περίθαλψη πολλών διαφορετικών πολιτισμών έχει εκτενώς τεκμηριωθεί. (280).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.) εκτιμά ότι περίπου το 65% του παγκόσμιου πληθυσμού βασίζεται κυρίως σε παραδοσιακά φάρμακα φυτικής προέλευσης για την πρωτοβάθμια φροντίδα υγείας τους.

Τα φυτά έχουν μία μακρά ιστορία στην χρήση για την πρόληψη – αντιμετώπιση του καρκίνου. Ο Hartwell, στην ανασκόπησή του για τα φυτά που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του καρκίνου, απαριθμεί πάνω από 3000 φυτά που έχουν, σύμφωνα με τις αναφορές, χρησιμοποιηθεί για αυτόν το σκοπό (281). Η ανακάλυψη αρκετών αποτελεσματικών αντικαρκινικών παραγόντων, οι οποίοι είναι φυτικής προέλευσης, μπορεί να αποδοθεί, άμεσα ή έμμεσα, σε ένα ιστορικό χρήσης του σχετικού φυτού στην παραδοσιακή ιατρική. Ως παραδείγματα μπορούν να αναφερθούν τα αλκαλοειδή της βίνκα, βινμπλαστίνη και βινκριστίνη τα οποία προέρχονται από την μυρτιά της Μαγαδασκάρης *Catharanthus roseus* G. ή ο αμερικανικός μανδραγόρας ο οποίος χρησιμοποιούταν για την αντιμετώπιση του καρκίνου του δέρματος και από τον οποίο προέκυψε το χημειοθεραπευτικό ετοποσίδη (197).

Ενώ αιώνες χρήσης με τον παραδοσιακό τρόπο μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως τεκμήριο ότι ένα συγκεκριμένο φυτικό συστατικό είναι αποτελεσματικό ή ασφαλές, πολλά προβλήματα θα πρέπει να αντιμετωπιστούν καθώς αυτά τα συστατικά ενσωματώνονται στη σύγχρονη πρακτική.

Ένα πρόβλημα είναι ότι συστατικά που κάποτε χρησιμοποιούνταν για συμπτωματική αντιμετώπιση στην παραδοσιακή θεραπευτική τώρα χρησιμοποιούνται στις αναπτυγμένες χώρες ως μέρος προώθησης του υγιεινού τρόπου ζωής ή σε στρατηγικές πρόληψης νόσων, έτσι η βραχεία θεραπεία έχει αντικατασταθεί με χρόνια έκθεση. Αυτό

δεν σημαίνει ότι το φυτικό προϊόν δεν είναι ασφαλές αλλά ότι η ασφάλειά του στη σύγχρονη ιατρική πρακτική και φαρμακολογία, με την πληθώρα φαρμάκων για διάφορα νοσήματα που λαμβάνει ο ασθενής, δεν είναι δεδομένη.

Ένα δεύτερο πρόβλημα είναι ότι δεν έχουν γίνει δομημένες μελέτες για να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα των φυτικών σκευασμάτων. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική προσπάθεια τεκμηρίωσης της αποτελεσματικότητάς τους μέσα από πειραματικά και κλινικά δεδομένα.

Ένα από τα πιο δύσκολα ζητήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν, «μεταφράζοντας» και μεταφέροντας τις παραδοσιακές βοτανικές πρακτικές στη συμβατική «δυτική» ιατρική, είναι η εξατομίκευση των φαρμακευτικών συνταγών που περιέχουν πολλαπλά φυτικά και άλλα συστατικά. Για τον βοτανολόγο που βασίζεται στην αρχέγονη βοτανολογική παράδοση η τυποποίηση της παραγωγής του φυτικού σκευάσματος σημαίνει κατανόηση των συνθηκών ανάπτυξης/καλλιέργειας του φυτού, η χρονική στιγμή της συγκομιδής, ο τρόπος εκχύλισης ή άλλης διαδικασίας να μπορεί να προσφέρει αξιόπιστο, σε συγκέντρωση ουσιών, παρασκεύασμα. Όταν πρόκειται όμως για μαζική παραγωγή και για διανομή σε φαρμακεία ή υπεραγορές η τυποποίηση της διαδικασίας αναφέρεται στην εφαρμογή της επονομαζόμενης Πρακτικές Καλής Παρασκευής (205). Στις ΗΠΑ δεν είναι απαραίτητο τα προϊόντα που θεωρούνται ως συμπληρώματα διατροφής να παράγονται με βάση τον παραπάνω κανόνα με αποτέλεσμα να μην είναι εγγυημένη η ποιότητα του προϊόντος.

Τα φυσικά προϊόντα «ζουν και βασιλεύουν» καθώς είναι άμεση και έμμεση πηγή για εφαρμογή και ανάπτυξη φαρμάκων ενάντια σε όλες τις κατηγορίες ασθενειών. Το 28% όλων των νέων φαρμάκων που αναπτύχθηκαν από τον 1 Ιανουαρίου 1981 έως τις 30 Ιουνίου 2006 είναι είτε αμιγή φυτικά προϊόντα (23%), είτε με ελάχιστες τροποποιήσεις (5%), ενώ ένα ακόμα 24% είναι ισοεστέρες ή σκελετοί φυτικών προϊόντων. (209).

Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στην αναγνώριση διαιτητικών ή συνθετικών συστατικών με αντικαρκινικές ιδιότητες. Η δίαιτα του ανθρώπου περιέχει ένα σημαντικό αριθμό τόσο (προ)καρκινογόνων όσο και μία ποικιλία συστατικών τα οποία μπορεί να αναστείλουν τις μεταλλάξεις ή/και τις καρκινογενέσεις όπως έχει αποδειχθεί σε πειραματικά μοντέλα (122). Από επιδημιολογικές μελέτες προκύπτουν συνεχώς αυξανόμενα δεδομένα ότι δίαιτες πλούσιες σε λαχανικά, και φρούτα, ή φυτικές ίνες γενικότερα, μπορεί να μειώσουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, κυρίως καρκίνου του

γαστρεντερικού συστήματος (121). Στην περιοχή της Ηπείρου η χρήση του χελωνόχορτου ή βαλσάμου ή του *Hypericum Perforatum*, όπως είναι η επιστημονική του ονομασία, είναι διαδεδομένη για διάφορες φαρμακευτικές χρήσεις. Άρρωστοι της περιοχής της Ηπείρου με υποτροπές επιφανειακών όγκων της ουροδόχου κύστεως, οι οποίοι λαμβάνουν το συγκεκριμένο βότανο με δική τους πρωτοβουλία, δεν έχουν παρουσιάσει υποτροπή για μεγάλο χρονικό διάστημα σύμφωνα με τα στοιχεία της παρακολούθησης που διαθέτουμε. Αυτό ήταν το έναυσμα για τη σχεδίαση και πραγματοποίηση αυτής της διατριβής.

Για την διερεύνηση της πιθανής αντικαρκινικής – χημειοπροφυλακτικής ιδιότητας του υπέρικου, στη μορφή και τη συγκέντρωση που λάμβαναν οι ασθενείς, δηλαδή 75g αποξηραμένων ανθοφόρων βοστρύχων σε 4,5 L νερού που θερμαινόταν στο σημείο ζέσεως για 30 λεπτά., αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε ένα ζωικό καρκινικό πειραματικό μοντέλο το οποίο να προσομοιώνει το αντίστοιχο ανθρώπινο. Επίσης θα πρέπει η πρόκληση του καρκίνου να γίνεται με χημική ένωση, δηλαδή καρκινογόνο, ειδική για το όργανο στόχο, στην περίπτωση μας την ουροδόχο κύστη,

Τα ιδανικά πειραματόζωα είναι τα τρωκτικά, λόγω της ευκολίας αναπαραγωγής και συντήρησής τους καθώς και ότι έχουν κατώτερο ουροποιητικό που είναι παρόμοιο με το ανθρώπινο, ενώ τα νεοπλάσματα στις ουροδόχες κύστες τους είναι μορφολογικά παρόμοια (282). Από την άλλη στα περισσότερα είδη τρωκτικών ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως δεν είναι συχνός εκτός της περίπτωσης να εισαχθεί με την βοήθεια χημικών ή με άλλο τρόπο (283). Η παρουσία μη νεοπλαστικών ουροθηλιακών αλλοιώσεων, όπως φλεγμονή και υπερπλασία είναι επίσης ασυνήθης σε αυτά τα είδη (284). Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είδη είναι ποντίκια BALBC, C57BL και ICR είδη και αρουραίοι των ειδών Wistar, Sprague-Dawley και Fisher (285).

Αποφασίσαμε για την μελέτη της p.os. δράσης του υπέρικου να χρησιμοποιήσουμε τα BULBc ποντίκια γιατί εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους παρουσιάζουν ευκολία στην αναπαραγωγή και στη συντήρησή τους.

Η N-βουτύλ-ν-(4-υδροξυβουτύλ) νιτροζαμίνη (BBN) έχει καθιερωθεί ως ένα, ή το πιο κατάλληλο καρκινογόνο για την πρόκληση ουροθηλιακού καρκίνου στην ουροδόχο κύστη (286). Είναι μεταβολικό παράγωγο της διβουτυλνιτροσαμίνης (DBN) το οποίο βρίσκεται στον καπνό των τσιγάρων (287). Λόγω του μηχανισμού δράσης του το BBN θεωρείται γονοτοξικό ή DNA-αντιδραστικό καρκινογόνο (288), προκαλεί βλάβη του

ουροθελίου της ουροδόχου και επιλεκτικά εισάγει ουροθηλιακούς καρκίνους σε ποντικούς και αρουραίους (289). Δίνεται δια στόματος με την τροφή ή το νερό σε δοσολογίες που κυμαίνονται από 0.01 – 0.05% (290-292).

Η χορήγηση μέσω σιτίσεως απορρίφθηκε επειδή είναι εξαναγκαστική με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται πνευμονία από εισρόφηση λόγω καθετηριασμού της τραχείας. Μπορεί επίσης να παρουσιαστεί τραυματισμός οισοφάγου και ρήξη στομάχου, καθώς επίσης αγχώδεις διαταραχές εγκλεισμού, κυρίως με την επαναλαμβανόμενη χρήση. Όλες αυτές οι ανεπιθύμητες ενέργειες έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της νοσηρότητας και της θνητότητας των πειραματόζωων (293). Στην παρούσα μελέτη γίνεται φανερό ότι το υδατικό εκχύλισμα του HP χορηγούμενο σε BULBc αρσενικά ποντίκια που έχουν εκτεθεί σε καρκινογένεση με νιτροζαμίνη (OH-BBN) εισάγει στατιστικά σημαντική *in vivo* χημειοπροφυλακτική δράση. Το μοντέλο αυτό καρκινογένεσης έχει αναπτυχθεί από την ομάδα μας και είναι τροποποίηση ενός πειραματικού μοντέλου που έχει αναφερθεί από άλλους μελετητές. Η διαφορά έγκειται στο ότι εμείς δίνουμε το καρκινογόνο σε διπλάσια δόση (1000 ppm) μέρα παρά μέρα σε αντί για την μισή δόση (500 ppm) κάθε μέρα. Αυτό το μοντέλο εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη.

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως στα ποντίκια αναπτύσσεται σχετικά νωρίς μετά την έκθεση στην ουσία και μακροσκοπικές βλάβες παρατηρούνται μετά από 12 εβδομάδες έκθεσης σε BBN συγκέντρωσης 0.05%. Τα ποντίκια αναπτύσσουν δυσπλασία, με ή χωρίς υπερπλασία, καρκίνωμα *in situ* και διηθητικό καρκίνωμα. (285). Τα αποτελέσματα του δικού μας πειράματος δείχνουν ότι η χορήγηση υδατικού διαλύματος HP για 30 εβδομάδες μετά την χορήγηση του καρκινογόνου καταστέλλει στατιστικώς σημαντικά τον σχηματισμό κακοηθών αλλοιώσεων (δυσπλασιών και καρκίνων) στην ουροδόχο κύστη των ποντικίων. Η ανιχνευόμενη δυσπλασία είναι μία προκαρκινωματώδη κατάσταση. Παρόλα αυτά θα πρέπει να αναλογιστούμε ότι αν είχαμε αφήσει τα ποντίκια να επιβιώσουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα τότε είναι λογικό να συμπεράνουμε ότι αυτές θα εξελίσσονταν σε καρκίνο. Η στατιστική σημαντικότητα στην αναστολή κακοηθών αλλοιώσεων στην ομάδα 3, όπου η χημειοπροφύλαξη εφαρμόστηκε μετά την χορήγηση καρκινογόνου, σε σχέση με την ομάδα 2, όπου χημειοπροφύλαξη εφαρμόστηκε τη στιγμή που χορηγούνταν το καρκινογόνο, ίσως να οφείλεται στην μεγαλύτερη χρονική διάρκεια κατά την οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα HP (30 έναντι 6 εβδομάδων αντίστοιχα). Το εκχύλισμα είχε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα να αναπτύξει την χημειοπροφυλακτική του δράση.

Επειδή τα πειραματόζωα θανατώνονται σχετικά πρώιμα (στο τέλος του δεδομένου πειραματικού χρόνου) είναι νωρίς για να παρατηρηθούν μεταστάσεις (295). Σε ερευνητικές ομάδες με μεγάλες σειρές πειραμάτων, χρησιμοποιώντας BBN στο πόσιμο νερό και πειραματόζωα τρωκτικά, μόνο σε ένα ποντίκι βρέθηκαν μεταστάσεις μετά από χορήγηση BBN για 12 εβδομάδες (285). Παρόμοια η θνησιμότητα των πειραματοζώων ήταν πολύ χαμηλή (285) και οφείλονταν σε υδρονέφρωση. Στο δικό μας πείραμα δεν παρατηρήθηκε κανένα από τα παραπάνω.

Κατά την πορεία των *in vitro* πειραμάτων ποικίλα διαλύματα, εκχυλίσματα και κλάσματα του *Hypericum Perforatum L.* παρασκευάστηκαν και δοκιμάστηκαν έναντι δύο διαφορετικών καρκινικών κυτταρικών σειρών ουροδόχου κύστεως, μία ανθρώπινη, T24, και μία ζωική, NBT – II. Το Μεθανολικό Διάλυμα ήταν πιο δραστικό από το Υδατικό Διάλυμα, LC₅₀: 1.1 μL/mL έναντι 4.7 μL/mL αντίστοιχα όταν δοκιμάστηκε έναντι των T24 κυττάρων, Γράφημα 6. Από τη στιγμή που το μεθανολικό διάλυμα αποδείχθηκε πιο δραστικό από το υδατικό διάλυμα, συνεχίσαμε με την παρασκευή του μεθανολικού εκχυλίσματος το οποίο εμφάνισε μία μέση θανατηφόρο δόση LC₅₀ 13 μg/mL, όσον αφορά την κυτταρική σειρά T24, και μέση θανατηφόρο δόση LC₅₀ 18 μg/mL, την οποία παρουσίασε η NBT – II κυτταρική σειρά. Οι Hostanska και συνεργάτες αναφέρουν τιμές LC₅₀ αιθανολικών εκχυλισμάτων του *Hypericum Perforatum* ανάμεσα 1.9 μg/mL και 4.1 μg/mL. Οι διαφορές μεταξύ αυτών των τιμών και των αποτελεσμάτων, που προέκυψαν από τη δική μας πειραματική διαδικασία, πιθανώς να οφείλονται στις διαφορετικές επιδόσεις μεταξύ των κυτταρικών σειρών, τα επιμέρους χαρακτηριστικά των υποτύπων *Hypericum Perforatum* που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και μεταξύ των διαφορετικών διαδικασιών εκχύλισης (296). Διερευνώντας περαιτέρω την αντικαρκινικά δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος, το υποβάλαμε σε κλασματοποίηση. Από την περαιτέρω κλασματοποίηση του ME προέκυψε πως το λιποφιλικό κλάσμα συνέβαλε κατά κύριο λόγο στην κυτταροτοξική δραστηριότητα, σε σχέση με το λιπόφοβο κλάσμα.

Αυτή η παρατήρηση μας ώθησε να προχωρήσουμε στην παρασκευή και έλεγχο των εκχυλισμάτων του πετρελαϊκού αιθέρα. Το εκχύλισμα που παρασκευάστηκε αποδείχθηκε εξαιρετικά κυτταροτοξικό, ασκώντας πολύ μεγάλη κυτταροτοξική δράση στις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν. Οι LC₅₀ που καταγράφηκαν ήταν 5μg/mL, προκαλώντας προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και πιο συγκεκριμένα, απόπτωση. Από την κλασματοποίηση αυτού του εκχυλίσματος προέκυψαν επτά κλάσματα. Κάθε

κλάσμα δοκιμάστηκε για την κυτταροτοξική του δράση ξεχωριστά σε κύτταρα T24 καρκινικής κυτταρικής σειράς. Από τα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν αναγνωρίστηκε πως για την κύρια κυτταροτοξική δράση ευθύνεται το κλάσμα ΕΠΑ 6. Αυτό το κλάσμα παρουσίασε 60% κυτταροτοξικότητα σε μία πολύ μικρή συγκέντρωση της τάξης των 0.95 $\mu\text{g/mL}$. Τα υπόλοιπα κλάσματα παρουσίασαν πολύ μικρή έως και μηδενική αντικαρκινική δράση.

Έχοντας ως σκοπό να αναγνωρίσουμε το/τα συστατικά που είναι υπεύθυνα για την κυτταροτοξική δράση, τα κύρια βιολογικά δραστικά συστατικά του φυτού ποσοτικοποιήθηκαν σε κάθε παρασκεύασμα που αναφέρθηκε πιο πάνω. Ολικές χλωροφύλλες, χλωροφύλλη α και χλωροφύλλη β βρέθηκαν σε όλα τα εκχυλίσματα καθώς και στα κλάσματα του φυτού όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 9. Οι ολικές υπερικίνες, η υπερικίνη και η ψευδοϋπερικίνη βρέθηκαν σε επαρκείς ποσότητες μόνο στο μεθανολικό εκχύλισμα και στο πολικό του κλάσμα ΠΜΚ. Οι Hostanka et al, μελετώντας την καθαρή υπερικίνη και την καθαρή υπερφορίνη έναντι ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών, ανέφεραν ότι η κυτταροτοξική τους δράση είναι αποτέλεσμα συνέργειας, με αποτέλεσμα να κάνουν το *Hypericum Perforatum* μία ενδιαφέρουσα επιλογή για την αντιμετώπιση του καρκίνου (225). Επιπλέον έχει δειχθεί ότι η καθαρή υπερφορίνη είναι μία δραστική ουσία με αντικαρκινική δράση σε αρκετές καρκινικές σειρές (224).

Βασισμένοι στις παρατηρήσεις μας, όσον αφορά την δραστηριότητα του λιποφιλικού εκχυλίσματος (ΕΠΑ), των κλασμάτων του και των μεθανολικών παραγώγων του σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των συστατικών ουσιών που περιέχονται σε αυτά τα παρασκευάσματα συνάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα:

Τα δεδομένα που αφορούν την δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος, και τη συγκέντρωσή του σε ναφθοδιανθρόνες, θα μπορούσαν να μας οδηγήσουν στο συμπέρασμα ότι οι υπερικίνες παίζουν κάποιο ρόλο σε αυτή την αντικαρκινική δραστηριότητα. Παρόλα αυτά, το δεδομένο ότι το εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα (ΕΠΑ) έδειξε μία μεγάλη αντικαρκινική δράση χωρίς να περιέχει υπερικίνες, υποδεικνύει ότι ή συμμετοχή τους δεν είναι σημαντική. Αυτό γίνεται επίσης φανερό για το λιποφιλικό κλάσμα του μεθανολικού εκχυλίσματος (ΜΠΜΚ), το οποίο εμφανίζει αντικαρκινική δράση χωρίς να περιέχει υπερικίνες.

Τα δεδομένα που προκύπτουν από την δράση του εκχυλίσματος και των κλάσμάτων του πετρελαϊκού αιθέρα θα μπορούσαν να ενισχύσουν την ένδειξη ότι η υπερφορίνη δεν είναι μία από τις δραστικές ουσίες του φυτού, στην δραστικό εκχύλισμα που προέκυψε. Από τα δεδομένα του Πίνακα 9 και από το Γράφημα 11 γίνεται προφανές ότι παρόλο το ολικό εκχύλισμα ΕΠΑ και το κλάσμα ΕΠΑ 6 εμφανίζουν πολύ πιο σημαντικότερη αντικαρκινική δράση από τα άλλα κλάσματα, πχ ΕΠΑ 4 & ΕΠΑ 5, όλα εμπεριέχουν την ίδια συγκέντρωση υπερφορίνης, γύρω στο 18%. Η σκέψη ότι η υπερφορίνη δεν είναι μια από τις δραστικές ουσίες στο λιποφιλικό εκχύλισμα ενισχύεται από το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις υπερφορίνης στα ενεργά κλάσματα ολικού ΕΠΑ, και του πιο δραστικού του κλάσματος ΕΠΑ 6, είναι μόνο 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και 0.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αντίστοιχα, οι οποίες βρίσκονται κάτω από το δραστικό εύρος (1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) που παρουσίασε η καθαρή υπερφορίνη στην ίδια καρκινική σειρά όπως φαίνεται στο γράφημα 12.

Τα δεδομένα που αφορούν τις ολικές χλωροφύλλες, τις χλωροφύλλες α και β, σε όλα τα εκχυλίσματα και κλάσματα υποδηλώνουν ότι είναι παρόντα σε μικρές έως και πολύ μικρές συγκεντρώσεις σε όλα τα παρασκευάσματα. Η σχέση δράσης – συγκέντρωσης των χλωροφυλλών στα διάφορα παρασκευάσματα δείχνει ότι δεν υπάρχει, φαινομενικά, συμβολή αυτής της τάξης των συστατικών στην κυτταροτοξικότητα του λιποφιλικού εκχυλίσματος (Πίνακας 11 και Γράφημα 10).

Από τα παραπάνω δεδομένα γίνεται φανερό η ύπαρξη μιας άγνωστης ουσίας, με ισχυρή αντικαρκινική δράση, την οποία δεν καταφέραμε να αναγνωρίσουμε με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).

Στη συνέχεια διερευνήσαμε της φωτοφυσικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων του υπέρικου, συγκεκριμένα του Μεθανολικού Εκχυλίσματος (ΜΕ) και του Πολικού Μεθανολικού Κλάσματος (ΠΜΚ) συγκριτικά με την καθαρή υπερικίνη ώστε να αποτιμήσουμε την πιθανότητα χρήσης του ως φωτοευαισθητοποιητές. Τόσο το φάσμα απορρόφησης όσο και το φάσμα εκπομπής, δηλαδή φθορισμού των ΜΕ και ΠΜΚ, υποδεικνύουν ότι τα κύρια φωτοευαισθητοποιιά συστατικά των εκχυλισμάτων είναι οι υπερικίνες.

Η ένταση φθορισμού του ΠΜΚ είναι διπλάσια της έντασης του ΜΕ Γράφημα 4. Παρόλο που η συγκέντρωση του ΠΜΚ σε υπερικίνη είναι 0.57% μόνο, η ένταση φθορισμού του φάσματος του ΠΜΚ στα 590nm είναι μόνο οκτώ (8) φορές μικρότερη

συγκρινόμενη την ένταση φθορισμού της καθαρής υπερικίνης στο ίδιο μήκος κύματος (Σύγκριση Γραφημάτων 4 & 5). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αμφοτέρως τις περιπτώσεις ακτινοβολήθηκαν δείγματα της ίδιας συγκέντρωσης (0.33mg/ml). Αν λάβουμε υπόψη και τις φυσικές διαφορές μεταξύ των δύο σκευασμάτων, το ΠΜΚ είναι μια στεγνή πούδρα σε σχέση με το ελαιώδες στερεό ΜΕ το οποίο δύσκολα τμηματοποιείται σε δοσολογίες, τότε το ΠΜΚ είναι ανώτερος φωτοευαισθητοποιητής. Βασιζόμενοι σε αυτά τα δεδομένα προκρίναμε το ΠΜΚ για την περαιτέρω διερεύνηση της φωτοδυναμικής δράσης.

Η ΦΔΘ παραμένει τα τελευταία 30 χρόνια μια πολλά υποσχόμενη και ενδιαφέρουσα μέθοδος για την αντιμετώπιση του ανθρώπινου καρκίνου. Συνδυάζει έναν φωτοευαισθητοποιό παράγοντα, ο οποίος λαμβάνεται επιλεκτικά και κατακρατείται από τα καρκινικά κύτταρα, με μια δέσμη ορατού φωτός που εκπέμπεται σε ένα μήκος κύματος που ταιριάζει στο φάσμα απορρόφησης της ουσίας. Το μεγαλύτερο θελκτικό πλεονέκτημα της ΦΔΘ στην αντιμετώπιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως είναι η πιθανή δυνατότητα για καταστροφή και εκρίζωση μεγάλων επιφανειών παθολογικού ουροθηλίου χωρίς να βλάψουμε τον υποκείμενο εξωστήρα μυ.

Αποτιμήσαμε τη φωτοδυναμική δράση του Πολικού Μεθανολικού Κλάσματος (ΠΜΚ) σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστεως. Συγκεκριμένα την T24 και την RT4 οι οποίες διέφεραν στο στάδιο και στο grade. Η σειρά T24 προέρχεται από απόθεμα μεταστατικών λεμφαδένων υψηλού grade διηθητικού καρκίνου ουροδόχου κύστεως κατά τη στιγμή του χειρουργείου. Η σειρά RT4 προέρχεται από χαμηλού grade, μη μυοδιηθητικό ανθρώπινο καρκίνο ουροδόχου κύστεως τη στιγμή της διουρηθρικής εκτομής για τη διάγνωση και τη θεραπεία.

Παρόλο που το φάσμα απορρόφησης του ΠΜΚ εμφανίζει μέγιστο στα 590 nm, η φωτοδιέγερση πραγματοποιήθηκε με λέιζερ 630nm. Η επιλογή του συγκεκριμένου κύματος έγινε βάση των: 1) Διαθεσιμότητας στην αγορά τέτοιου μήκους λέιζερ τα οποία χρησιμοποιούνται με άλλους φωτοευαισθητοποιητές και 2) την χρήση αυτού του μήκους κύματος στη κλινικά εγκεκριμένη προς χρήση ουσία Photofrin[®] η οποία ήταν και η ουσία αναφοράς προς σύγκριση του ΠΜΚ. Η φωτοδιέγερση του ΠΜΚ, το οποίο είναι ένα φυτικό εκχύλισμα που περιέχει διάφορα φωτοευαισθητοποιήματα συστατικά (297) μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας ποικίλα μήκη κύματος φωτός. Έχει αναφερθεί φωτοτοξικότητα του ΠΜΚ έναντι HL-60 λευχαιμικών κυττάρων με την χρήση 5 λέιζερ στα 530nm (298).

Και στις δύο κυτταρικές σειρές, T24 και RT4, η ανταπόκριση στην ΦΔΘ με ΠΜΚ ήταν συγκρίσιμη, παρόλο που η φωτοτοξικότητα ήταν ελαφρώς αυξημένη στα T24 κύτταρα. Η αποτελεσματική δόση αποδείχθηκε ότι ήταν 60 $\mu\text{g/ml}$ ΠΜΚ και 8 J/cm^2 στα 630nm και για τις δύο κυτταρικές σειρές, με καταστολή της κυτταρικής ανάπτυξης που κυμαινόταν από 80% έως 86%. Με στανταρισμένη την δόση ΠΜΚ στα 60 $\mu\text{g/ml}$, 50% κυτταρικού θανάτου καταγράφηκε στα T24 και RT4 κύτταρα με 3.6 και 4.5 J/cm^2 αντίστοιχα. Η συγκέντρωση 20 $\mu\text{g/ml}$ του ΠΜΚ δεν ήταν δραστική και στις δύο κυτταρικές σειρές.

Κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες η δράση της ΦΔΘ με Photofrin[®] σε συγκέντρωση 4 $\mu\text{g/ml}$ σε αυτές τις δύο κυτταρικές σειρές ήταν αρκετά διαφορετική. Στα T24 κύτταρα το Photofrin[®] ήταν λιγότερο δραστικό σε σχέση με το ΠΜΚ παρουσιάζοντας ένα ποσοστό κυτταρικού θανάτου της τάξης του 77% με 8 J/cm^2 δόση ακτινοβολίας και 50% κυτταρικό θάνατο στα 6 J/cm^2 . Στα RT4 κύτταρα το Photofrin[®] παρουσίασε ελάχιστο κυτταρικό θάνατο ακόμα και στην μέγιστη ακτινοβολία, δηλαδή 9% κυτταρικό θάνατο με 8 J/cm^2 . Μια πιθανή εξήγηση της διαφορετικής επίδρασης του ΠΜΚ και του Photofrin[®] είναι ότι τα υψηλού grade T24 κύτταρα μπορεί να κατακρατούν μια σχετικά υψηλότερη συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή, είτε του ΠΜΚ είτε του Photofrin[®], αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την κυτταροτοξικότητα και την αποτελεσματικότητα της *in vitro* φωτοδυναμικής δράσης στα καλλιεργημένα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου. Μια σχετική κλινική παρατήρηση είναι το σταθερό εύρημα ότι το καρκίνωμα *in situ* εκ μεταβατικού επιθηλίου ανταποκρίνεται σε πολύ υψηλά ποσοστά την ΦΔΘ με Photofrin[®] (279).

Ο τύπος του κυτταρικού θανάτου, απόπτωση ή νέκρωση, που προκλήθηκε από το φωτοδιεγερμένο ΠΜΚ έχει μερικώς διασαφηνιστεί. Η απόπτωση είναι απαραίτητη κυτταρική διεργασία σε πολυκύτταρους οργανισμούς και φαίνεται να παίζει ένα ζωτικό ρόλο στην προκαλούμενη με ΦΔΘ κυτταροτοξικότητα και τον τοπικό έλεγχο του καρκίνου, ανεξάρτητα από τον φωτοευαισθητοποιητικό παράγοντα που μεσολαβεί για την φωτοδυναμική δράση. Τα αποτελέσματα από την κυτταρομετρία ροής και από τα πειράματα DNA laddering που πραγματοποιήθηκαν στις T24 και RT4 κυτταρικές σειρές ανέδειξαν ότι και οι δύο κυτταρικές σειρές παρουσίασαν αποπτωτική ανταπόκριση είτε με την ΠΜΚ-ΦΔΘ, είτε με την Photofrin[®] - ΦΔΘ. Φωτοενεργοποίηση της υπερικίνης, του φωτοευαισθητοποιητή που είναι το κύριο συστατικό του ΠΜΚ, έχει συσχετιστεί με την

απόπτωση σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και βραχύτερους χρόνους ακτινοβολήσης (299). Αυξάνοντας τη συγκέντρωση υπερικίνης ή τον χρόνο ακτινοβολήσης είχε ως αποτέλεσμα τον αυξημένο κυτταρικό θάνατο (299).

Στη συνέχεια, ακολουθήσαμε ένα διαφορετικό πρωτόκολλο για να αναλύσουμε περαιτέρω την επίδραση του ΠΜΚ στην επιβίωση των T24 κυττάρων σε καλλιέργεια μελετώντας την δράση του λευκού φωτός. Η επώαση των κυττάρων έγινε με συγκεντρώσεις ΠΜΚ 20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$ και 80 $\mu\text{g/ml}$. Υποβλήθηκαν σε ΦΔΘ με διαφορετικές εντάσεις λευκού φωτός χορηγούμενο από δύο διαφορετικού τύπου λαμπτήρες, μία λάμπα υδραργύρου (Philips TL-D/840) και μία λάμπα αλογόνου (150W τοποθετημένη σε πηγή Karl Storz) που χρησιμοποιείται κατά τις ενδοουρολογικές επεμβάσεις, κυρίως κυστεοσκοπήσεις.

Κυτταροτοξικότητα 98% παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση των 80 $\mu\text{g/ml}$ ΠΜΚ και χορήγηση ενέργειας 300 J/cm^2 από την λάμπα αλογόνου ενώ για να επιτευχθεί το ίδιο κυτταροτοξικό αποτέλεσμα με το λευκό φως της λάμπας υδραργύρου απαιτήθηκε ενέργεια 1240 J/cm^2 . Όταν χορηγήθηκε 40 $\mu\text{g/ml}$ ΠΜΚ η λάμπα αλογόνου προκαλούσε κυτταρικό θάνατο στο 78.2% των κυττάρων με ενέργεια 300 J/cm^2 ενώ με ενέργεια 600 J/cm^2 αυξάνονταν στο 98%. Για παρόμοια αποτελεσματικότητα με την λάμπα υδραργύρου θα έπρεπε να χορηγηθούν 4650 J/cm^2 Γραφήματα 16 και 17 αντίστοιχα. Η διαφορά στις χορηγούμενες ενέργειες αποτυπώνεται καλύτερα από το χρονικό διάστημα που χρειάζεται να επιτευχθούν αυτές. Έτσι τα 300 J/cm^2 της λάμπας αλογόνου επιτυγχάνονται σε χρόνο 15 sec ενώ τα 600 J/cm^2 σε 30sec. Αντίστοιχα η ενέργεια των 1240 J/cm^2 της λάμπας υδραργύρου παράγονται σε 8 λεπτά ενώ τα 4650 J/cm^2 σε 30 λεπτά! Η παρατηρούμενη διαφορά οφείλεται στο διαφορετικό φάσμα εκπομπής που έχουν οι λαμπτήρες (Εικόνες 3 & 4). Το φάσμα εκπομπής του λαμπτήρα αλογόνου είναι συνεχές (Εικόνα 4) και το μέγιστο, η κορυφή του, παρατηρείται στα 610 nm, ουσιαστικά ακολουθεί την πορεία του φάσματος της υπερικίνης Γράφημα 5. Αντίθετα το φάσμα εκπομπής της λάμπας υδραργύρου είναι ασυνεχές Εικόνα 3, με την ενέργεια να εκπέμπεται κυρίως στα 540nm, όπου το φάσμα απορρόφησης της υπερικίνης εμφανίζει μια μικρή κορυφή, καθώς και στα 650nm όπου η υπερικίνη δεν εμφανίζει καθόλου απορρόφηση.

Η χρήση κυτταρομετρίας ροής έδειξε ότι η παρουσία ΠΜΚ υπέρικου αρχίζει να γίνεται τοξική για τα κύτταρα από τα 20 $\mu\text{g/ml}$ χωρίς τη διέγερση με φως αυξάνοντας τον νεκρωτικό αριθμό των κυττάρων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η υπερικίνη, ένα από τα

κύρια συστατικά του βαλσαμόχορτου με φωτοδυναμική δράση ονομάζεται κυτταροτοξική χωρίς διέγερση, ωστόσο οι πειραματικές προσεγγίσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί (δοκιμασία MTT, μέτρηση κυττάρων) δεν διαχωρίζουν τη νέκρωση από την απόπτωση και την αναστολή του πολλαπλασιασμού (300, 301). Επιπλέον, στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ολικό ΠΜΚ υπέρικου, το οποίο περιέχει και άλλα συστατικά πέρα της υπερικίνης, όπως για παράδειγμα τα φλαβονοειδή που έχουν συνδεθεί επίσης με νέκρωση κυττάρων σε υψηλές συγκεντρώσεις. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η διέγερση του ΠΜΚ αυξάνει τον πληθυσμό των κυττάρων που ακολουθούν προγραμματισμένο θάνατο και απαλείφει τον νεκρωτικό πληθυσμό. Επομένως, η παρουσία υπέρικου και η φωτοδιέγερσή του, πιθανά ενεργοποιεί την αποπτωτική δράση της υπερικίνης οδηγώντας τα κύτταρα σε προγραμματισμένο θάνατο. Παρομοίως, έχει δειχθεί ότι σε καρκινικά κύτταρα ουροθηλίου η καθαρή υπερικίνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις 1-2 μ M προκαλεί απόπτωση μετά από φωτοδιέγερση, ενώ σε αυξημένες συγκεντρώσεις προκαλεί νέκρωση (249,267). Η λάμπα αλογόνου χρησιμοποιείται ως πηγή φωτισμού από αρκετές συσκευές φωτισμού για ενδοσκοπικές επεμβάσεις. Λόγω της υψηλής φωτοδυναμικής απόδοσής αυτής θα μπορούσε, με ενδοκυστική χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή ΠΜΚ, να χρησιμοποιηθεί για την φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Επιπρόσθετα η λάμπα αλογόνου στοιχίζει υποπολλαπλάσια από τις ήδη χρησιμοποιούμενες, στην καθημερινή πρακτική, πηγές λέιζερ. Στα επόμενα πειράματα προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε την πιθανότητα αν θα μπορούσε να λειτουργήσει ως αποτελεσματικός φωτοευαισθητοποιητής.

Αποτιμήσαμε την εντόπιση του ΠΜΚ στην φυσιολογική ουροδόχο κύστη αρουραίου, μέσω της εκπομπής φθορισμού του, σε μια προσπάθεια να ιχνηλατήσουμε μία πιθανή μελλοντική του χρήση στην φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Χρησιμοποιήσαμε τη μέγιστη συγκέντρωση του ΠΜΚ στον φυσιολογικό ορό καθώς και την ημίσεια δόση αυτής, σε θερμοκρασία δωματίου. Από τον πίνακα 11 γίνεται φανερό ότι δεν έχουν όλες οι περιοχές του ουροθηλιακού τοιχώματος την ίδια ένταση φθορισμού, με το εύρος των τιμών του λόγου ουροθήλιο/μυϊκό να κυμαίνεται από 5/1 έως 11/1. Το πιο σημαντικό ίσως είναι ότι η ένταση φθορισμού του μυϊκού είναι σε κάθε περίπτωση ίση με την ένταση που παρατηρείται στον αυλό της ουροδόχου, το οποίο λειτουργούσε σαν ομάδα ελέγχου, λόγω της εκ των πραγμάτων μηδενικής συγκέντρωσης υπερικίνης εξαιτίας της έκπλυσης που πραγματοποιήθηκε. Αυτό σηματοδοτεί την πιθανή μελλοντική χρήση του ΠΜΚ στην ΦΔΘ του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως,

προβαίνοντας στο λογικό συμπέρασμα ότι δεν θα υφίσταται μία βλάβη του μυϊκού κατά την ΦΔΘ, σε αντίθεση με το ουροθήλιο το οποίο θα μπορεί να αναγεννηθεί μετά την καταστροφή του σε λίγες εβδομάδες (1873,02).

Οι δόσεις καθαρής υπερικίνης που χρησιμοποιήθηκαν από τους Kamuhabwa και συνεργάτες, για παρόμοια μελέτη, συγκρινόμενες με αυτές που περιείχε το διάλυμα ΠΜΚ ήταν σημαντικά μικρότερες (4 και 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ σε σχέση με 250 και 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Η υψηλότερη συγκέντρωση υπερικινών στου εκχυλίσματος μπορεί να οδήγησε σε καλύτερη φωτοδυναμική δράση από την δράση που επιτεύχθηκε με την καθαρή υπερικίνη (278).

Διαφορές στην ένταση του φθορισμού ανάμεσα στα αποτελέσματά μας και σε αυτά που λήφθηκαν από τους Kamuhabwa και συνεργάτες (278) μπορούν να εξηγηθούν από τις λεπτότερες τομές στο δικό μας πείραμα (πάχους 3 μm έναντι 5 μm). Το ερώτημα εάν και πόσο παχύτερες παθολογοανατομικές τομές μπορεί να φθορίζουν με μεγαλύτερη ένταση από λεπτές έχει τεθεί ήδη από τις εργασίες των προαναφερθέντων ερευνητών.

Δύο επιπλέον πλεονεκτήματα του ΠΜΚ, έναντι της καθαρής υπερικίνης είναι η υψηλή διαλυτότητα στον φυσιολογικό ορό σε θερμοκρασία δωματίου, και η υψηλή ένταση φθορισμού εντοπισμένη μόνο στο ουροθήλιο μετά από μία ενδοκυστική παραμονή του φαρμάκου 15 λεπτών μόνο. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί από το Γράφημα 21, ο φθορισμός παραμένει σε υψηλά επίπεδα για τουλάχιστον μία ώρα μετά την έκπλυση της ουροδόχου ενώ ο φθορισμός παραμένει εμφανής έξι ώρες μετά. Μετά την παρέλευση εικοσιτετράωρου από την έκπλυση, δεν παρατηρείται φθορισμός ενώ το ουροθήλιο διατηρεί την φυσιολογική του δομή, όπως φαίνεται στις τομές αιματοξυλίνης & ηωσίνης.

Η φωτοδυναμική θεραπεία έχει προταθεί ως μία εναλλακτική θεραπεία για τους επιφανειακούς όγκους της ουροδόχου και κατά προτίμηση των πολυεστιακών και των καρκινωμάτων *in situ*. Με προσεκτικό χειρισμό της κατανομής του φωτός, θεραπευτικές δόσεις μπορούν να φτάσουν σε όλα τα σημεία του ουροθηλίου εξαλείφοντας έτσι την αναγκαιότητα να ορίσουμε επακριβώς τις πάσχουσες περιοχές (185,303.304).

Το περιορισμένο ενδιαφέρον στην εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας στην ουρολογία οφείλεται στις παρενέργειές της. Οι φωτοευαισθητοποιητές πρώτης γενιάς δεν αθροίζονταν με ικανοποιητική εκλεκτικότητα στους νεοπλασματικούς ιστούς και στο

ουροθίλιο εκθέτοντας έτσι τον εξωστήρα στην επιβλαβή, για αυτόν, δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας. Επίσης προκαλούσαν σημαντική φωτοευαισθησία του δέρματος λόγω της συστηματικής τους χορηγήσεως (182).

Όσον αφορά τους φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς οι οποίοι χορηγούνται ενδοκυτταρικά (ALA και τα παράγωγά του), παρόλο που δεν εισήγαγαν συστηματικές παρενέργειες προκαλούσαν βλάβες στην ουροδόχο εξαιτίας της σχετικής έλλειψης εκλεκτικότητας μεταξύ του ουροθιλίου και του εξωστήρα (305, 306).

Προκειμένου να επιλυθούν τα ανωτέρω προβλήματα νέοι φωτοευαισθητοποιητές διερευνήθηκαν. Η υπερικίνη είναι ένας ισχυρός φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς που υπάρχει στην φύση και προκάλεσε το ενδιαφέρον. Εφόσον η υπερικίνη είναι ένας ικανός και ασφαλής (252,307,308) φωτοευαισθητοποιητής, έχει την ικανότητα να φθορίζει και να αθροίζεται εκλεκτικά στις επιφανειακές στοιβάδες της ουροδόχου (265,309,310), η ουσία αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην φωτοδυναμική θεραπεία ανθρώπινων επιφανειακών όγκων ουροδόχου κύστεως αφού πραγματοποιηθούν επιπλέον μελέτες που θα αφορούν την ασφάλειά της.

Από την άλλη η υπερικίνη χαρακτηρίζεται από αρκετά μειονεκτήματα. Η σύνθεσή της είναι δύσκολη και ακριβή, είναι ασταθής σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στο φως. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C και στο σκοτάδι. Είναι αδιάλυτη στο νερό και στο πλάσμα. Θα πρέπει να αναπτυχθεί ειδικός μεταφορέας για την ενδοκυτταρική χορήγησή της. Οι λιποφιλικές της ιδιότητες κάνουν την ενδοφλέβια χορήγησή της προβληματική και την συστηματική της χρήση απαγορευτική.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν όλα τα παραπάνω εστιάσαμε τις έρευνές μας στην φυσική πηγή της υπερικίνης, συγκεκριμένα το *Hypericum Perforatum L.* Το ΠΜΚ που προέκυψε περιέχει υπερικίνες, έχει ισάξια αποτελεσματικότητα με τον φωτοευαισθητοποιητή που χρησιμοποιείται στην καθημερινή κλινική πρακτική, δηλαδή το Photofrin[®], φωτοδιεγείρεται με λευκό φως αλογόνου εμφανίζοντας αντικαρκινική δράση, χρειάζεται μόνο 15λεπτή ενδοκυτταρική παραμονή και δεν διαπερνά την βασική μεμβράνη του ουροθιλίου.

Το επόμενο βήμα ήταν να μελετήσουμε την φωτοδυναμική του δράση *in vivo*. Τα αποτελέσματα της φωτοενεργοποίησής του ΠΜΚ ύστερα από βραχεία (15 λεπτά) ενδοκυτταρική παραμονή του ήταν ενθαρρυντικά. Αρχικά προβήκαμε σε ΦΔΘ σε ανοιχτή

κύστη και διαπιστώσαμε ότι προκαλούσε απόπτωση στο φυσιολογικό ουροθήλιο με μια ενέργεια $420\text{J}/\text{cm}^2$. Συνεχίσαμε τα πειράματα αναπαριστώντας την καθημερινή κλινική πρακτική. Χορηγήσαμε αυξανόμενες ποσότητες ενέργειας ενδοκυστικά μετά από 15λεπτη ενδοκυστική παραμονή του ΠΜΚ. Διαπιστώσαμε ότι χορηγώντας μία ενέργεια $700\text{J}/\text{cm}^2$ 100% του ουροθηλίου είχε απόπτωση στις 30 ημέρες ενώ αναγεννήθηκε χωρίς την ανάπτυξη ουλώδους ιστού στις 90 ημέρες.

Λαμβάνοντας υπόψη την κατανομή του φθορισμού της υπερικίνης στον επιφανειακό καρκίνο (267) εφαρμόσαμε το μοντέλο εμφύτευσης καρκινικών κυττάρων AY-27 στην ουροδόχο κύστη αρουραίου το οποίο εισήγαγε πρώτος ο Xiao et al (277). Αναφέρεται ότι μιμείται τη συμπεριφορά του ανθρώπινου καρκίνου εκ μεταβατικού επιθηλίου και ανάλογα το ποσό των κυττάρων που εγχέεται και την χρονική στιγμή που τα πειραματόζωα θυσιάζονται αναπαράγονται όλα τα στάδια των επιφανειακών όγκων (277). Πιο σημαντικό είναι ότι αυτοί οι όγκοι αναπτύσσονται ενδοκυστικά (ορθοτοπικά) και άρχονται από το ουροθήλιο. Συνεπώς οι όγκοι αυτοί μπορούν να εκτεθούν απευθείας στην δράση αντικαρκινικών φαρμάκων στο φυσικό τους περιβάλλον. Αρκετές ομάδες υιοθέτησαν το παραπάνω μοντέλο αλλά εφαρμόζοντας κάθε μία την δικιά της τροποποίηση (268, 311-314). Οι διαφορές έγκειται κυρίως στον αριθμό των καρκινικών κυττάρων που εγχέονται, αλλά και ως προς το παθολογοανατομικό στάδιο των όγκων που δημιουργούνται. Ο Xiao et al (277) αναφέρει συγκεντρώσεις $1.0 - 3.0 \times 10^6$ κύτταρων και στάδια από δυσπλασία έως T2, η Kamuhabwa et al (266) αναφέρουν συγκέντρωση 1.0×10^6 κύτταρων και στάδια από δυσπλασία έως T2, και οι Hendricksen et al (314) χορηγώντας ίδια συγκέντρωση μόνο T1 και T2 όγκους, ενώ οι Gronlund – Pakkanen et al (313) με συγκέντρωση $0,45 \times 10^6$ κύτταρων επιτυγχάνει μόνο δυσπλασία και επιφανειακούς GrI-II όγκους. Οι διαφορές αυτές στα παθολογοανατομικά στάδια οφείλονται τόσο στη συγκέντρωση όσο και στην επιθετικότητα των εγχέομενων κυττάρων. Η τελευταία εξαρτάται από τα «περάσματα» in vitro, δηλ. τις επανακαλ/γίες (314). Όσο πιο πολλές επανακαλ/γίες τόσο πιο επιθετικά τα κύτταρα και τόσο πιο εύκολα ο όγκος γίνεται διηθητικός.

Επειδή η ομάδα μας ήθελε να αποφύγει την πιθανότητα δημιουργίας διηθητικών όγκων, οι οποίοι δεν είναι και ο στόχος της φωτοδυναμικής, μετά από επανειλημμένες προσπάθειες σε αρουραίους κατέληξε στην εμφύτευση κυττάρων AY-27 στη συγκέντρωση 1×10^6 τα οποία έχουν υποβληθεί σε μόνο δύο επανακαλλιέργειες για να

εξαλείψουμε την πιθανότητα δημιουργίας διηθητικών καρκίνων. Το μοντέλο οδηγεί στην δημιουργία δυσπλασίας η οποία με την πάροδο του χρόνου (90 ημέρες) φτάνει στα όρια του *in situ*.

Από τα αποτελέσματα της εργασίας γίνεται φανερό πως το ΠΜΚ ύστερα από βραχεία ενδοκυστική παραμονή, 15 λεπτά, και μετά από φωτοδιέγερση με ενέργεια 700 Joules/cm^2 προκαλεί απόπτωση όλου του ουροθηλίου, υγιούς και δυσπλαστικού, που γίνεται φανερή την 30^η ημέρα μετά την εφαρμογή της ΦΔΘ. Το ουροθήλιο αναγεννάτε την 90^η ημέρα χωρίς την ύπαρξη ουλώδους ιστού σε κανένα σημείο του. Στην ομάδα ελέγχου τις αντίστοιχες ημέρες όλοι οι αρουραίοι εμφάνισαν δυσπλασία, με έντονη συνοδό φλεγμονώδη διήθηση την 30^η ημέρα, ενώ την 90^η εκτός από την δυσπλασία παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις κυστικής κυστίτιδας.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το υδατικό διάλυμα, το οποίο παρασκευάστηκε με την μέθοδο που συστήνει η παραδοσιακή ιατρική, εμφάνισε στατιστικά σημαντική χημειοπροφυλακτική δράση όταν χορηγούνταν σε BULBc αρσενικά ποντίκια μετά την δράση των καρκινογόνων. Παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αναστολή σχηματισμού κακοηθών (δυσπλασιών και καρκινικών) αλλοιώσεων όταν χορηγείται για μεγάλο χρονικό διάστημα (30 εβδομάδες) μετά την δράση του καρκινογόνου. Χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να αναγνωρίσουμε την ιδανική χορήγηση (δοσολογία και διάστημα χορήγησης) του υδατικού εκχυλίσματος HP για πετύχουμε καλύτερη ακόμα χημειοπροφυλακτική δράση.

Κατά την πορεία των *in vitro* πειραμάτων ποικίλα διαλύματα, εκχυλίσματα και κλάσματα του *Hypericum Perforatum L.* παρασκευάστηκαν και δοκιμάστηκαν έναντι δύο διαφορετικών καρκινικών κυτταρικών σειρών ουροδόχου κύστεως, μία ανθρώπινη, T24, και μία ζωική, NBT – II. Τα πειραματικά μας δεδομένα υποδεικνύουν ότι η αντικαρκινική δραστηριότητα που παρατηρείται στις καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστεως επηρεάζεται, από μία ακόμα μη ταυτοποιημένη, λιποφιλική συστατική ουσία του φυτού. Το λιποφιλικό Εκχύλισμα Πετρελαϊκού Αιθέρα (ΕΠΑ) του φυτού παρουσιάζει ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση, συγκεκριμένα το 6 κλάσμα κατά σειρά εκχύλισης με μια $LC_{50} = 0.95 \mu\text{g/mL}$ σε καρκινικά κύτταρα T24 και NBT_II. Οι ναφθοδιανθρόνες δεν συνεισφέρουν σε αυτήν την δραστηριότητα. Όπως προκύπτει από τα πειραματικά δεδομένα για την υπερικίνη δεν εμφανίζει καμία αντιπολλαπλασιαστική δράση. Τα ίδια ισχύουν και για τις χλωροφύλλες του φυτού. Η υπερφορίνη, παρόλο που είναι μια λιποφιλική ουσία με, τεκμηριωμένα στην βιβλιογραφία, κυτταροτοξικές ιδιότητες, δεν φαίνεται να συνεισφέρει σημαντικά στην αντικαρκινική δραστηριότητα το λιποφιλικού εκχυλίσματος. Κατά την προσπάθεια να διαχωριστεί σε ενεργά συστατικά με την βοήθεια RP-HPLC διαπιστώθηκε ότι οι ουσίες ήταν άγνωστες και θα πρέπει να γίνει ταυτοποίησή τους σε ειδικά εργαστήρια. Επίσης τόσο το υδατικό όσο και οι άλλες μορφές οργανικών εκχυλισμάτων εμφάνισαν αντικαρκινική δράση στις παραπάνω καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Θα πρέπει να γίνει περαιτέρω έρευνα για να γίνει αναγνώριση του/των χημικού/κών συστατικών, ως αυτόνομες ουσίες, οι οποίες μπορεί να δρουν συνεργηστικά, που διαθέτουν τόσο σημαντική κυτταροτοξικότητα.

Από την κλασματοποίηση των διαλυμάτων προέκυψε το Πολικό Μεθανολικό Κλάσμα (ΠΜΚ). Το Πολικό Μεθανολικό Κλάσμα περιείχε υπερικίνη η οποία βρέθηκε σε μία περιεκτικότητα 0,57% w/w στο εκχύλισμα. Το ΠΜΚ παρουσιάζει ένα φάσμα απορρόφησης παρόμοιο με αυτό της Υπερικίνης. Στη συνέχεια διερευνήσαμε της φωτοφυσικές ιδιότητες του ΠΜΚ συγκριτικά με την καθαρή υπερικίνη ώστε να αποτιμήσουμε την πιθανότητα χρήσης του ως φωτοευαισθητοποιητή. Ως σημαντικά πλεονεκτήματα του ΠΜΚ, έναντι της καθαρής υπερικίνης, θα πρέπει να αναφερθούν η υψηλή διαλυτότητα του ΠΜΚ σε θερμοκρασία δωματίου, είναι σταθερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, δεν χρειάζεται ιδιαίτερη αποθήκευση και είναι ευδιάλυτο στον φυσιολογικό ορό. Το κόστος παρασκευής του υπολογίζεται στα 26 ευρώ το γραμμάριο. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά έρχονται σε αντίθεση με τις ιδιότητες και το κόστος της συνθετικής υπερικίνης που κυκλοφορεί στο εμπόριο.

Συγκρίναμε το ΠΜΚ, σε δοσολογίες 20 $\mu\text{g/ml}$ & 60 $\mu\text{g/ml}$, με το Photofrin[®], φωτοευαισθητοποιητή που έχει ένδειξη από το FDA για ΦΔΘ στην ουροδόχο κύστη στην μέγιστη κλινικά ανεκτή δόση 4 $\mu\text{g/ml}$ έναντι σειρών καρκινικών κυττάρων T24 & RT4. Το ΠΜΚ εμφανίζει ισχυρή φωτοδυναμική δράση μετά από διέγερση με λέιζερ και ενέργεια 8 J/cm^2 . Η συγκέντρωση των 60 $\mu\text{g/ml}$ του εκχυλίσματος εμφανίστηκε ως η πιο αποτελεσματική δόση με ενέργεια 8 J/cm^2 , με σημαντική κυτταροτοξικότητα της τάξης του 86%, στα T24 & 80% στα RT4. Το Photofrin, η ουσία αναφοράς, η οποία βρίσκεται σε κλινική εφαρμογή, εμφάνισε μόνο στα T24.

Στη συνέχεια κύτταρα T24 υποβλήθηκαν σε ΦΔΘ με διαφορετικές εντάσεις λευκού φωτός χορηγούμενο από δύο διαφορετικού τύπου λαμπτήρες, μία λάμπα υδραργύρου (Philips TL-D/840) και μία λάμπα αλογόνου (150W τοποθετημένη σε πηγή Karl Storz) που χρησιμοποιείται κατά τις ενδοουρολογικές επεμβάσεις, κυρίως κυστεοσκοπήσεις. Το ΠΜΚ εμφάνισε ισχυρή φωτοδυναμική αντικαρκινική δράση σε T24 μετά από διέγερση με λευκό φως. Εισήγαγε απόπτωση όταν χορηγήσαμε ενέργεια 1240 J/cm^2 και 4650 J/cm^2 με την λάμπα υδραργύρου σε συγκέντρωση 80 μg , ενώ με χορήγηση 900 J/cm^2 με την λάμπα αλογόνου είχαμε 100% κυτταρικό θάνατο (00% επιβίωση κυττάρων) σε συγκέντρωση 80 μg και σε συγκέντρωση 40 μg . Η παρατηρούμενη διαφορά οφείλεται στο διαφορετικό φάσμα εκπομπής που έχουν οι λαμπτήρες.

Η χρήση κυτταρομετρίας ροής έδειξε ότι η παρουσία ΠΜΚ υπέρικου αρχίζει να γίνεται τοξική για τα κύτταρα από τα 20μg/ml χωρίς τη διέγερση με φως αυξάνοντας τον νεκρωτικό αριθμό των κυττάρων ενώ η παρουσία υπέρικου και η φωτοδιέγερσή του, ενεργοποιεί την αποπτωτική δράση της υπερίκινης οδηγώντας τα κύτταρα σε προγραμματισμένο θάνατο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η διέγερση του ΠΜΚ αυξάνει τον πληθυσμό των κυττάρων που ακολουθούν προγραμματισμένο θάνατο και απαλείφει τον νεκρωτικό πληθυσμό.

Αποτιμήσαμε την εντόπιση του ΠΜΚ στην φυσιολογική ουροδόχο κύστη αρουραίου, μέσω της εκπομπής φθορισμού του, σε μια προσπάθεια να ιχνηλατήσουμε μία πιθανή μελλοντική του χρήση στην φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Προχωρήσαμε σε σειρά πειραμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις ΠΜΚ και βαθμιαία μειούμενα χρονικά διαστήματα ενδοκυστικής παραμονής. Προέκυψε ότι επιτυγχάνει υψηλές συγκεντρώσεις στο ουροθήλιο μετά από ενδοκυστική παραμονή μόνο 15 λεπτών, χωρίς να διαπερνά τη βασική μεμβράνη, να μην απορροφάτε από τον μυϊκό της ουροδόχου και κατ' επέκταση να μην εισέρχεται στην κυκλοφορία. Μπορεί να ανιχνευτεί έως και 6 ώρες μετά την ενδοκυστική έγχυση καθιστώντας το ιδανικό για κλινική χρήση ως φωτοευαίσθητοποιητή για φωτοδυναμική διάγνωση γιατί αφήνει ένα μεγάλο χρονικό περιθώριο από τη χορήγηση έως την κυστεοσκόπηση.

Το επόμενο βήμα ήταν να μελετήσουμε την φωτοδυναμική του δράση *in vivo*. Χορηγήσαμε αυξανόμενες ποσότητες ενέργειας ενδοκυστικά μετά από 15λεπτη ενδοκυστική παραμονή του ΠΜΚ. Διαπιστώσαμε ότι χορηγώντας μία ενέργεια 700J/cm² 100% του ουροθηλίου είχε απόπτωση στις 30 ημέρες ενώ αναγεννήθηκε χωρίς την ανάπτυξη ουλώδους ιστού στις 90 ημέρες. Παρουσιάζει ισχυρή φωτοδυναμική θεραπευτική δράση προκαλώντας πλήρη (100%) εξάλειψη επιφανειακών καρκινικών βλαβών αλλά και του φυσιολογικού ουροθηλίου σε πειραματικό μοντέλο ορθότοπης εμφύτευσης καρκινικών κυττάρων εκ μεταβατικού επιθηλίου AY-27 σε θηλυκούς αρουραίους Wistar στις 30 ημέρες μετά την θεραπεία μετά από βραχεία ενδοκυστική παραμονή (μόνο 15 λεπτά) και φωτοδιέγερση με ενέργεια 700Joules/cm². Το ουροθήλιο αναγεννάτε πλήρως, χωρίς την ύπαρξη ουλών, 90 ημέρες μετά την φωτοδυναμική θεραπεία. Επειδή το ΠΜΚ δεν εισέρχεται στον μυϊκό δεν προκαλεί ουλές ή φλεγμονώδεις αντιδράσεις.

Λαμβάνοντας υπόψη τα μοναδικά χαρακτηριστικά φωτοευαισθητοποίησης και αποτελεσματικότητας του Πολικού Μεθανολικού Κλάσματος του *Hypericum Perforatum* L., δηλαδή της διαλυτότητάς του σε φυσιολογικό ορό, χαμηλό κόστος παραγωγής, εύκολη παρασκευή και υψηλή του συγκέντρωση σε υπερικίνες, την εστιασμένη φωτοδυναμική δράση στο ουροθήλιο με την εξάλειψη των εμφυτευμένων καρκινικών κυττάρων χωρίς την καταστροφή του μυϊκού, την πλήρη αναγέννηση του φυσιολογικού ουροθηλίου χωρίς την ύπαρξη ουλών, θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω για την πιθανή του χρήση στην φωτοδυναμική θεραπεία στο επιφανειακό ουροθηλιακό καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η συστηματική και εις βάθος έρευνα της αντικαρκινικής (χημειοπροφυλακτικής) και διαγνωστικής δράσης του φυτού βαλσαμόχορτου γνωστού και ως *Hypericum Perforatum* (HP) κατά του καρκίνου της κύστης.

Το βαλσαμόχορτο λαμβάνεται στα πλαίσια της παραδοσιακής ηπειρώτικης ιατρικής με την μορφή υδατικού διαλύματος από μερίδα ασθενών διαγνωσμένων με μη μυοδιηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα ως αντικαρκινικό. Αποφασίσαμε να διερευνήσουμε την πιθανή αντικαρκινική δράση του βαλσαμόχορτου, στη συγκέντρωση που την λάμβαναν «παραδοσιακά» οι ασθενείς, σε πειραματικό μοντέλο που περιλάμβανε αρσενικά ποντίκια BULBe τα οποία εκτέθηκαν σε νιτροζαμίνη [N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (OH-BBN)] σε συγκέντρωση 1000ppm μέρα παρά μέρα για 6 εβδομάδες τα οποία θυσιάστηκαν μετά από 26 εβδομάδες. Τα ιστολογικά δεδομένα που προέκυψαν έδειξαν ότι το υδατικό διάλυμα ασκεί στατιστικώς σημαντική αντικαρκινική δράση (Fisher's exact test $p=0.048$) όταν χορηγείται για 26 εβδομάδες αφού επιδράσει ο καρκινογόνος παράγοντας. Η χορήγηση του εκχυλίσματος το διάστημα που λάμβαναν νιτροζαμίνη δεν εμφάνισε σημαντική αντικαρκινική δράση (Fisher's exact test $p=0.093$).

Στην συνέχεια προχωρήσαμε στην αναζήτηση του πιο δραστικού παραγώγου του φυτού, είτε με μορφή διαλυμάτων, είτε με την μορφή εκχυλισμάτων, είτε μετά από κλασματοποίηση. Η ανάλυση των συστατικών τους έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Η αντικαρκινική δράση αποτιμήθηκε σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστεως T24 και NBT-II σε συνθήκες σκότους. Η δραστηριότητα των εκχυλισμάτων του φυτού ήταν υδατικό εκχύλισμα < ολικό μεθανολικό εκχύλισμα (ME). Η δραστηριότητα του Μεθανολικού Εκχυλίσματος και των κλασμάτων του ήταν κατά αύξουσα δραστηριότητα Πολικό Μεθανολικό Κλάσμα (ΠΜΚ) < ολικό μεθανολικό εκχύλισμα (ME) < μη πολικό μεθανολικό κλάσμα (ΜΠΜΚ) < Εκχύλισμα Πετρελαϊκού Αιθέρα (ΕΠΑ). Η τάση παρέμεινε η ίδια και στις δύο κυτταρικές σειρές. Η κλασματοποίηση του ΕΠΑ, ώστε να αναζητηθεί το πιο δραστικό κλάσμα του, ανέδειξε το έκτο κατά σειρά κλασματοποίησης κλάσμα του (ΕΠΑ6) ως το πλέον δραστικό. Ουσιαστικά η αντικαρκινική δράση του ΕΠΑ οφειλόταν αποκλειστικά στο ΕΠΑ6, LC_{50} 0.9 $\mu\text{g/mL}$ και LC_{50} 0.17 $\mu\text{g/mL}$ αντίστοιχα. Στην αναζήτηση των συστατικών που ευθύνονται για την αντικαρκινική δράση διαπιστώθηκε

ότι αυτή δεν οφείλεται στην υπερφορίνη αλλά σε άγνωστες ουσίες οι οποίες δεν ήταν δυνατόν να ταυτοποιηθούν στην δεδομένη χρονική στιγμή. Η δοκιμασία TUNEL απέδειξε πως ο κυτταρικός θάνατος επέρχεται μέσω της απόπτωσης.

Από την φυσικοχημική ανάλυση των εκχυλισμάτων διαπιστώθηκε πως το ΠΜΚ, σε μορφή πούδρας, περιέχει υπερίκίνη σε συγκέντρωση 0.57% μόνο, είναι υδατοδιαλυτό, σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου καθιστώντας το ενδιαφέρον φωτοευαίσθητοποιητή για περαιτέρω μελέτη.

Προχωρήσαμε σε σύγκριση του ΠΜΚ, σε διάφορες συγκεντρώσεις, με την εγκεκριμένη από το FDA ουσία για την Φωτοδυναμική Θεραπεία (ΦΔΘ) του μη μυοδιηθητικού ουροθηλιακού καρκίνου της ουροδόχου, το Photofrin[®], στην μέγιστη κλινικά ανεκτή δόση, τα 4μg/ml έναντι T24 και RT4 καρκινικών κυττάρων ανθρώπινου ουροθηλίου. Το ΠΜΚ στη συγκέντρωση των 60 μg/mL, προκαλούσε κυτταρικό θάνατο στο 86% και στο 80% των T24 και RT4 καρκινικών κυττάρων αντίστοιχα. Το Photofrin[®] εμφάνισε κυτταρικό θάνατο στο 77% των T24 μόνο, ενώ είχε πολύ μικρή επίδραση στα RT4, θάνατος στο 9%. Χρησιμοποιώντας δοκιμασία MTT, με την κατάτμηση DNA και κυτταρομετρία ροής απόπτωση ως το κύριο μονοπάτι θανάτου, εμφανίστηκε θανάτωση στο 40% των κυττάρων, ενώ το 80% των κυττάρων είχε μπλοκαριστεί στην S φάση.

Το επόμενο βήμα ήταν να διερευνήσουμε την δραστικότητα του ΠΜΚ μετά από διέγερση με λευκό φως, χρησιμοποιώντας μία πηγή ψυχρού φωτισμού με λάμπα αλογόνου (Storz 482 Cold Light Fountain) και λάμπα υδραργύρου χαμηλής πίεσης Philips σε T24 κύτταρα. Για να επιτευχθεί 100% κυτταροτοξικότητα απαιτούνταν μόνο 300 J/cm² με χρήση της λάμπας αλογόνου αντίθετα με την λάμπα υδραργύρου που χρειαζόνταν 1240 J/cm² στη συγκέντρωση των 80 μg/mL. Οι διαφορές αποδόθηκαν στο φάσμα εκπομπής των πηγών.

Με βάση τα ως άνω θετικά αποτελέσματα *in vitro*, επεκτείναμε την έρευνά μας σε *in vivo* πειράματα με θηλυκά Wistar αρουραίους. Πειραματιζόμενοι με ποικίλες ενδοκυστικές δόσεις ΠΜΚ, με κλιμακούμενους χρόνους ενδοκυστικής παραμονής καταλήξαμε στα 18,25 mg/ml ΠΜΚ, περιέχει 250 μg/ml υπερίκινών) με παραμονή δεκαπέντε λεπτών στην ουροδόχο κύστη χωρίς να διαπερνά την βασική μεμβράνη, αφήνοντας Με βάση αυτό το σχήμα φωτοβολήσαμε με διάφορες ενέργειες λευκού φωτός (λάμπα αλογόνου) και θυσίασαμε τους αρουραίους σε ποικίλα διαστήματα μελετώντας

απόπτωση και κασπάση 3. Μετά από διέγερση του ΠΜΚ με 700 J/cm^2 στις 30 ημέρες είχαμε 100% απόπτωση του ουροθηλίου χωρίς την εμφάνιση φλεγμονής ή καταστροφής του μυϊκού. Το ουροθήλιο αναγεννάτε πλήρως, χωρίς την ύπαρξη ουλών, 90 ημέρες μετά την φωτοδυναμική θεραπεία. Προχωρήσαμε σε πειραματικό μοντέλο ορθότοπης εμφύτευσης ουροθηλιακών καρκινικών κυττάρων. Στην δοσολογία των 36.5 mg/ml του ΠΜΚ είχαμε πλήρη (100%) εξάλειψη επιφανειακών καρκινικών βλαβών αλλά και του φυσιολογικού ουροθηλίου στις 30 ημέρες μετά την θεραπεία. Το ουροθήλιο αναγεννάτε πλήρως, χωρίς την ύπαρξη ουλών, 90 ημέρες μετά την φωτοδυναμική θεραπεία.

Συμπερασματικά το εκχύλισμα του υπέρικου, στη δοσολογία που το λάμβαναν οι ασθενείς, παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική αντικαρκινική δράση όταν χορηγείται μετά την δράση του καρκινογόνου. Η αντικαρκινική δράση που παρατηρείται *in vitro* στο αποδίδεται σε άγνωστες, προς το παρόν ουσίες, που περιέχονται στο ΕΠΑ6. Το Πολικό Μεθανολικό Κλάσμα εμφανίζει σημαντική αντικαρκινική δράση τόσο *in vitro*, μετά από διέγερση με λευκό φως, όσο και *in vivo*, με πλήρη εξάλειψη των καρκινικών λαβών, χωρίς την εμφάνιση ουλών στην ουροδόχου κύστη με πλήρως αναγεννημένο του ουροθήλιο μετά από 90 ημέρες.

8. ABSTRACT

The use of aqueous extract of *Hypericum Perforatum* L. is popular between bladder cancer patients in the rural area of Epirus-Greece as complementary cancer chemopreventive medicine. We analyzed the chemical composition of the extract in order to identify the active components with the help of LC-ESI-MS. The possible chemopreventive effects of the aqueous extract were tested in a novel OH-BBN induced cancer model in male BULBc mice. Animals were divided in three groups of 26 animals each. Group 1 (control) was given 1000ppm OH-BBN in drinking water alternated with tap water every other day for 6weeks followed by 26week only tap water administration. Group 2 was given 1000ppm OH-BBN in drinking water alternated with aqueous HP extract every other day for 6weeks followed by 26week only tap water administration while Group 3 had the same administration regimen as Group 1 for the first 6weeks followed by 26week only aqueous HP extract. Hyperforin was identified as major constituent $2,36 \pm 0,03$ mg/g (flowering stem). Hypericin and pseudohypericin were at significantly lower concentration $0,09 \pm 0,03$ mg/g and $0,36 \pm 0,01$ mg/g (flowering stem) respectively. The aqueous HP extract administration during the exposure of the carcinogen (Group 2) showed no statistical benefit (Fisher's exact test $p=0.093$) resulting a 35,43% reduction, and reached statistical benefit in Group 3 (Fisher's exact test $p=0.049$) causing a 43,6% reduction in precancerous and cancer lesions respectively.

We have investigated the cytotoxic activity of the locally collected (Epirus region) *Hypericum perforatum* L. against cultured T24 and NBT-II bladder cancer cell lines. The lipophilic extract of the herb, prepared using petroleum ether, induced apoptosis displaying LC(50) values at concentrations as low as 4 and 5 microg/mL. A fraction of this extract displayed 60 % cell growth inhibition at a concentration of 0.95 microg/mL. Evaluating the importance of various biologically active components of the extract, it was found that hypericins (hypericin, pseudohypericin, etc.) were identified only in the methanolic (lipophobic) extract of the herb, and not in the active lipophilic extract. In addition, hyperforin concentrations in the lipophilic extract and its most active fraction, were 0.94 microg/mL, and 0.17 microg/mL, respectively, while the active cytotoxic concentration of pure hyperforin appeared in the range of 1.8 microg/mL - 5.0 microg/mL. Therefore, pure hyperforin does not seem to contribute significantly to the cytotoxicity activity. Chlorophylls were identified in low, not significantly different, concentrations in all

extracts and fractions and were not correlated to the biological activity. Owing to the combination of significant cytotoxic activity, natural abundance and low toxicity, the lipophilic extract of *Hypericum perforatum* holds the promise of being an interesting, new, antiproliferative agent against bladder cancer that deserves further investigation.

We continued to test the efficacy of PMF as a phototoxic agent against urinary bladder carcinoma has been studied using the T24 (high grade metastatic cancer), and RT4 (primary low grade papillary transitional cell carcinoma) human bladder cancer cells. Following cell culture incubation, PMF was excited using 630 nm laser light. The photosensitizer exhibited significant photocytotoxicity in both cell lines at a concentration of 60microg/ml, with 4-8 J/cm² light dose, resulting in cell destruction from 80% to 86%. At the concentration of 20microg/ml PMF was not active in either cell line. These results were compared with the results obtained in the same cell lines, under the same conditions with a clinically approved photosensitizer, Photofrin. Photofrin was used in the maximum clinically tolerable dose of 4microg/ml, and it was also excited with 630 nm laser light. In the T24 cell Photofrin exhibited slightly less photocytotoxicity, compared with PMF, resulting in 77% cell death with 8J/cm² light dose. However, against the RT4 cells Photofrin resulted in minimal cell death (9%) with even 8J/cm² light dose.

Assesing the photodynamic action of the *Hypericum perforatum* L. extract, mainly its polar methanolic fraction (PMF) has been substantiated. The herb contains a number of naphthodianthrone - photosensitizers mainly hypericin and pseudohypericin. The concentration of hypericins in PMF was found to be 1.37 %. The distribution of hypericins fluorescence in sections of normal rat bladder tissues after the intravesical instillation of the polar methanolic fraction of hypericum (PMF) was studied by the use of fluorescence microscopy. PMF was dissolved in normal saline containing 0.5 µg/ml concentration of hypericins, and was then instilled in rat bladder for 15, 30, 60 and 120 minutes respectively. PMF solutions were withdrawn, bladders were rinsed through the catheter with normal saline and rats were sacrificed. Bladders were then removed, cut open and immediately mounted in medium, and immersed in liquid nitrogen. Two consecutive 3-µm frozen sections were cut with a cryostat. The first section was examined by fluorescence microscopy and the second section was stained with hematoxylin and eosin. For fluorescence imaging the filter set used included a 535/50 nm bandpass excitation filter and a 610/75 nm emission filter. Fluorescence images were acquired and documented

using photography. Fluorescence could be detected in bladder samples after only 15 minutes of instillation with the above described solution. The urothelium / muscle fluorescence ratio ranged from 5/1 to 11/1 in various sites of the samples examined. No fluorescence originating from the muscle could be detected.

Investigating the Photodynamic Action of *Hypericum Perforatum L.* extract, mainly its Polar Methanolic Fraction (PMF), in an orthotopic rat bladder transitional cell tumor model in orthotopic transitional cell tumor model. : After a special procedure AY-27 cells, in a concentration 106 cells in 0,5 ml of PBS, were intravesically instilled in 20 female Wistar rats. After incubation time of 10 days there were divided in two groups. One was treated with 15 minutes intravesical instillation of PMF diluted in normal saline, containing 250mg/ml hypericins. The bladder was washed out with normal saline. An optic fiber was induced intravesically and Photodynamic Treatment with white light performed. The PMF was photoactivated with energy of 700 J/cm². The second group of animals served as control and underwent photoactivation with the same quantity of energy without PMF instillation. After 30 days 5 rats of each group were sacrificed, their bladders removed, cut in 3µm sections and stained with hematoxylin/eosin. The same procedure was followed for the rest of the animals 90 days after the PDT. The results were: Dysplasia was noted in the bladder of all untreated animals. Complete lack of urothelium was apparent 30 days after PDT. The urothelium was regenerated 90 days in all animals after PDT. None of the rats treated had dysplasia.

In conclusion: Hyperforin is the major active compound of the aqueous HP extract inhibiting significantly chemical carcinogenesis when it is given after the carcinogen exposure. ranging 27,86 ± 0.07 mg/g (flowering plant buds) to, ranging 0,53 ± 0,08 mg/g and 1,95 ± 0.05 mg/g (flowering plant buds) to. The presented data indicate that phloroglucinol derivatives are primarily responsible for the HP extract's cytotoxicity, and that HP induces significant chemopreventive action against OH-BBN-induced carcinogenesis in vivo when given after the administration of the carcinogen. The *Hypericum Perforatum L.* extract, mainly its Polar Methanolic Fraction, is a capable photosensitizer that deserves further evaluation for its use in PDT.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. PhD TWS. Langman's Medical Embryology. 6th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1990.
2. Persaud KLMaTVN. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. 6th ed. Philadelphia : Saunders; 1998.
3. De Lancey J. JGJ,CK,DJ. Gross Anatomy and Cell Biology of the Lower Urinary Tract. In Abrams Paul CLKS,WA. Incontinence: 2nd International Consultation on Incontinence. Paris: ICS; 2001.
4. Oelrich TM. The striated urogenital sphincter muscle in the female. The Anatomical record. 1983 Feb; 205(2): p. 223-232.
5. M. KWHB. Urinary Tract. In Marluce B. Comprenhesive Cytopathology. Philadelphia: W.B. Saunders; 1991. p. 445-476.
6. Ro JY, Ayala AG, el-Naggat A. Muscularis mucosa of urinary bladder. Importance for staging and treatment. The American journal of surgical pathology. 1987 Sep; 11(9): p. 668-673.
7. Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer Statistics, 2010. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2010 Jul; 60: p. 277-300.
8. Sharma S, Ksheersagar P, Sharma P. Diagnosis and treatment of bladder cancer. American family physician. 2009 Oct; 80(7): p. 717-723.
9. Ferlay J SH,BFFD. International Agency for Research on Cancer. [Online]. [cited 2013 5 25. Available from: HYPERLINK "http://globocan.iarc.fr " <http://globocan.iarc.fr> .
10. Chavan S, Bray F, Lortet-Tieulent J, et al. International Variations in Bladder Cancer Incidence and Mortality. European Urology. 2019 Mar; 66: p. 59-73.
11. Ferlay J, Randi G, Bosetti C, et al. Declining mortality from bladder cancer in Europe. BJU International. 2019 Mar; 101: p. 11-19.

12. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, et al. Bladder cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*. 2005 Dec; 66: p. 4-34.
13. Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, et al. Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer. *European Urology*. 2013 Feb; 63: p. 234-241.
14. Volanis D, Kadiyska T, Galanis A, et al. Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer. *Toxicology Letters*. 2010 Mar; 193: p. 131-137.
15. Horikawa Y, Gu J, Wu X. Genetic susceptibility to bladder cancer with an emphasis on gene–gene and gene–environmental interactions. *Current Opinion in Urology*. 2008 Sep; 18: p. 493-498.
16. Shirai T, Fradet Y, Huland H, et al. The etiology of bladder cancer--are there any new clues or predictors of behavior? *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 1995 Jun; 2 Suppl 2: p. 64-75.
17. Kiemeny LA, Thorlacius S, Sulem P, et al. Sequence variant on 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nature genetics*. 2008 Nov; 40: p. 1307-1312.
18. Kiemeny LA, Sulem P, Besenbacher S, et al. A sequence variant at 4p16.3 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nature genetics*. 2010 May; 42: p. 415-419.
19. Figueroa JD, Ye Y, Siddiq A, et al. Genome-wide association study identifies multiple loci associated with bladder cancer risk. *Human molecular genetics*. 2014 Mar; 23: p. 1387-1398.
20. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US); Office on Smoking and Health (US). *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General*. 5th ed. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention; 2010.
21. Weyer PJ, Cerhan JR, Kross BC, et al. Municipal drinking water nitrate level and cancer risk in older women: the Iowa Women's Health Study. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*. 2001 May; 12(3): p. 327-338.

22. Hoover R, Cole P. Population trends in cigarette smoking and bladder cancer. *American journal of epidemiology*. 1971 Nov; 94(5): p. 409-418.
23. Silverman DT DSML. Bladder cancer. In Schottenfeld D FJ. *Cancer epidemiology and prevention*. New York: Oxford University Press; 2006.
24. Thompson IM, Peek M, Rodriguez FR. The impact of cigarette smoking on stage, grade and number of recurrences of transitional cell carcinoma of the bladder. *The Journal of urology*. 1987 Mar; 137(3): p. 401-403.
25. Raitanen MP, Nieminen P, Tammela TL. Impact of tumour grade, stage, number and size, and smoking and sex, on survival in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *British journal of urology*. 1995 Oct; 76(4): p. 470-474.
26. Fleshner N, Garland J, Moadel A, et al. Influence of smoking status on the disease-related outcomes of patients with tobacco-associated superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer*. 1999 Dec; 86(11): p. 2337-2345.
27. McCormack VA, Agudo A, Dahm CC, et al. Cigar and pipe smoking and cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *International Journal of Cancer*. 2010 Feb; 127: p. 2402-2411.
28. Pitard A, Brennan P, Clavel J, et al. Cigar, pipe, and cigarette smoking and bladder cancer risk in European men. *Cancer causes & control : CCC*. 2001 Aug; 12(6): p. 551-556.
29. Wilhelm-Benartzi CS, Christensen BC, Koestler DC, et al. Association of secondhand smoke exposures with DNA methylation in bladder carcinomas. *Cancer Causes & Control*. 2011 Jun; 22: p. 1205-1213.
30. Alberg AJ, Kouzis A, Genkinger JM, et al. A Prospective Cohort Study of Bladder Cancer Risk in Relation to Active Cigarette Smoking and Household Exposure to Secondhand Cigarette Smoke. *American Journal of Epidemiology*. 2007 Jan; 165: p. 660-666.
31. Dietrich H, Dietrich B. Ludwig Rehn (1849-1930)--pioneering findings on the aetiology of bladder tumours. *World journal of urology*. 2001 Apr; 19(2): p. 151-153.

32. Samanic CM, Kogevinas M, Silverman DT, et al. Occupation and bladder cancer in a hospital-based case-control study in Spain. *Occupational and Environmental Medicine*. 2008 May; 65: p. 347-353.
33. Cumberbatch MGK, Cox A, Teare D, et al. Contemporary Occupational Carcinogen Exposure and Bladder Cancer. *JAMA Oncology*. 2015 Dec; 1: p. 1282.
34. Koutros S, Silverman DT, Baris D, et al. Hair dye use and risk of bladder cancer in the New England bladder cancer study. *International Journal of Cancer*. 2011 Aug; 129: p. 2894-2904.
35. Zhou J, Kelsey KT, Giovannucci E, et al. Fluid intake and risk of bladder cancer in the Nurses Health Studies. *International Journal of Cancer*. 2014 Feb; 135: p. 1229-1237.
36. Michaud DS, Kogevinas M, Cantor KP, et al. Total Fluid and Water Consumption and the Joint Effect of Exposure to Disinfection By-Products on Risk of Bladder Cancer. *Environmental Health Perspectives*. 2007 Nov; 115: p. 1569-1572.
37. Baris D, Waddell R, Freeman LEB, et al. Elevated Bladder Cancer in Northern New England: The Role of Drinking Water and Arsenic. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2016 May; 108.
38. Espejo-Herrera N, Cantor KP, Malats N, et al. Nitrate in drinking water and bladder cancer risk in Spain. *Environmental Research*. 2015 Feb; 137: p. 299-307.
39. Büchner FL, de-Mesquita HBB, Ros MM, et al. Variety in vegetable and fruit consumption and risk of bladder cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *International Journal of Cancer*. 2010 Oct; 128: p. 2971-2979.
40. Hotaling JM, Wright JL, Pocobelli G, et al. Long-Term Use of Supplemental Vitamins and Minerals Does Not Reduce the Risk of Urothelial Cell Carcinoma of the Bladder in the VITamins And Lifestyle Study. *Journal of Urology*. 2011 Apr; 185: p. 1210-1215.
41. Lotan Y, Goodman PJ, Youssef RF, et al. Evaluation of Vitamin E and Selenium Supplementation for the Prevention of Bladder Cancer in SWOG Coordinated SELECT. *Journal of Urology*. 2012 Jun; 187: p. 2005-2010.

42. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, et al. Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. *New England Journal of Medicine*. 2003 Apr; 348: p. 1625-1638.
43. Cook MB, McGlynn KA, Devesa SS, et al. Sex disparities in cancer mortality and survival. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2011 Aug; 20: p. 1629-1637.
44. Vaidya Anil, Soloway Marks, Hawke Chris, et al. De Novo Muscle Invasive Bladder Cancer: Is There A Change In Trend? *Journal of Urology*. 2001 Jan; 165: p. 47-50.
45. Cárdenas-Turanzas M, Cooksley C, Pettaway CA, et al. Comparative Outcomes of Bladder Cancer. *Obstetrics & Gynecology*. 2006 Jul; 108: p. 169-175.
46. Wolpert BJ, Amr S, Ezzat S, et al. Estrogen exposure and bladder cancer risk in Egyptian women. *Maturitas*. 2010 Dec; 67: p. 353-357.
47. May M, Stief C, Brookman-May S, et al. Gender-dependent cancer-specific survival following radical cystectomy. *World Journal of Urology*. 2011 Oct; 30: p. 707-713.
48. Research on TIA. Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter Pylori ORGANIZATION WORLD HEALTH, editor. Lyon: WORLD HEALTH ORGN; 1994.
49. Gouda I, Mokhtar N, Bilal D, et al. Bilharziasis and bladder cancer: a time trend analysis of 9843 patients. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. 2007 Jun; 19(2): p. 158-162.
50. Salem HK, Mahfouz S. Changing Patterns (Age, Incidence, and Pathologic Types) of Schistosoma-associated Bladder Cancer in Egypt in the Past Decade. *Urology*. 2012 Feb; 79: p. 379-383.
51. Abol-enein H. Infection: Is it a cause of bladder cancer? *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*. 2008 Jan; 42: p. 79-84.
52. Locke JR, Hill DE, Walzer Y. Incidence of squamous cell carcinoma in patients with long-term catheter drainage. *The Journal of urology*. 1985 Jun; 133(6): p. 1034-1035.

53. Chrouser K, Leibovich B, Bergstralh E, et al. Bladder cancer risk following primary and adjuvant external beam radiation for prostate cancer. *The Journal of urology*. 2005 Jul; 174(1): p. 107--110; discussion 110-1.
54. Nieder AM, Porter MP, Soloway MS. Radiation Therapy for Prostate Cancer Increases Subsequent Risk of Bladder and Rectal Cancer: A Population Based Cohort Study. *Journal of Urology*. 2008 Nov; 180: p. 2005-2010.
55. Zelefsky MJ, Housman DM, Pei X, et al. Incidence of Secondary Cancer Development After High-Dose Intensity-Modulated Radiotherapy and Image-Guided Brachytherapy for the Treatment of Localized Prostate Cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics*. 2012 Jul; 83: p. 953-959.
56. Vlaovic P, Jewett MAS. Cyclophosphamide-induced bladder cancer. *The Canadian journal of urology*. 1999 Apr; 6(2): p. 745-748.
57. MacKenzie T, Zens MS, Ferrara A, et al. Diabetes and risk of bladder cancer: evidence from a case-control study in New England. *Cancer*. 2011 Apr; 117: p. 1552-1556.
58. Mahul AB. AP110 Bladder Biopsy Pathology – Part 1. In *College of American Pathologists Annual Meeting Presentations 2004; 2004.*; Vancouver: College of American Pathologists. p. 1-11.
59. Meijden APM, Sylvester R, Oosterlinck W, et al. EAU Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Urothelial Carcinoma in Situ. *European Urology*. 2005 Sep; 48: p. 363-371.
60. Casey RG, Catto JWF, Cheng L, et al. Diagnosis and Management of Urothelial Carcinoma In Situ of the Lower Urinary Tract: A Systematic Review. *European Urology*. 2019 Mar; 67: p. 876-888.
61. Sauter G, Algaba F, Amin MB, et al. Non-invasive urothelial tumours. In Paul Kleihues LHS, editor. *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. Lyon,: IARCPress; 2004. p. 110=147.

62. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, et al. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. The American journal of surgical pathology. 1998 Dec; 22(12): p. 1435-1448.
63. Babjuk M, Böhle A, Burger M, et al. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. European Urology. 2019 Mar; 71: p. 447-461.
64. TNM Classification of Malignant Tumours: John Wiley & Sons; 2011.
65. MacLennan GT, Kirkali Z, Cheng L. Histologic Grading of Noninvasive Papillary Urothelial Neoplasms. European Urology. 2019 Mar; 51: p. 889-898.
66. May M, Brookman-Amisshah S, Roigas J, et al. Prognostic Accuracy of Individual Urologists in Noninvasive Urinary Bladder Carcinoma: A Multicentre Study Comparing the 1973 and 2004 World Health Organisation Classifications. European Urology. 2019 Mar; 57: p. 850-858.
67. Research on Can IA. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs: WORLD HEALTH ORGN; 2016.
68. Lamm D, Herr H, Jakse G, et al. Updated concepts and treatment of carcinoma in situ. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations. 1998 Jul; 4: p. 130-138.
69. Lamm DL. Carcinoma in situ. The Urologic clinics of North America. 1992 Aug; 19(3): p. 499-508.
70. Sylvester RJ, Meijden A, Witjes JA, et al. High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. Urology. 2019 Mar; 66: p. 90-107.
71. Hidas G, Pode D, Shapiro A, et al. The natural history of secondary muscle-invasive bladder cancer. BMC urology. 2013 May; 13: p. 23-23.
72. Ku JH, Kang M, Kim HS, et al. Lymph node density as a prognostic variable in node-positive bladder cancer: a meta-analysis. BMC Cancer. 2015 Jun; 15.

73. Hirao S, Hirao T, Marsit CJ, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 9q and p53 alterations in human bladder cancer. *Cancer*. 2019 Mar; 104: p. 1918-1923.
74. Abraham R. Chromosomal deletions in bladder cancer: shutting down pathways. *Frontiers in Bioscience*. 2007; 12: p. 826.
75. Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, et al. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene*. 2005 May; 24: p. 5218.
76. Ecke TH, Sachs MD, Lenk SV, et al. TP53 gene mutations as an independent marker for urinary bladder cancer progression. *International journal of molecular medicine*. 2008 May; 21(5): p. 655-661.
77. Gallucci M, Guadagni F, Marzano R, et al. Status of the p53, p16, RB1, and HER-2 genes and chromosomes 3, 7, 9, and 17 in advanced bladder cancer: correlation with adjacent mucosa and pathological parameters. *Journal of clinical pathology*. 2005 Apr; 58: p. 367-371.
78. Puzio-Kuter AM, Castillo-Martin M, Kinkade CW, et al. Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes & development*. 2009 Mar; 23: p. 675-680.
79. Garcia del Muro X, Torregrosa A, Muñoz J, et al. Prognostic value of the expression of E-cadherin and β -catenin in bladder cancer. *European Journal of Cancer*. 2019 Mar; 36: p. 357-362.
80. Koga F, Kawakami S, Fujii Y, et al. Impaired p63 Expression Associates with Poor Prognosis and Uroplakin III Expression in Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Clin Cancer Res*. 2003 Nov; 9: p. 5501.
81. Alkhateeb SS, Neill M, Bar-Moshe S, et al. Long-term prognostic value of the combination of EORTC risk group calculator and molecular markers in non-muscle-invasive bladder cancer patients treated with intravesical Bacille Calmette-Guérin. *Urology annals*. 2011; 3: p. 119-126.

82. McConkey DJ, Lee S, Choi W, et al. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2010 Jul; 28: p. 429-440.
83. Ramirez D, Gupta A, Canter D, et al. Microscopic haematuria at time of diagnosis is associated with lower disease stage in patients with newly diagnosed bladder cancer. *BJU international*. 2016 May; 117(5): p. 783-786.
84. Fosså SD, Ous S, Berner A. Clinical significance of the "palpable mass" in patients with muscle-infiltrating bladder cancer undergoing cystectomy after pre-operative radiotherapy. *British journal of urology*. 1991 Jan; 67(1): p. 54-60.
85. Hilton S, Jones LP. Recent Advances in Imaging Cancer of the Kidney and Urinary Tract. *Surgical Oncology Clinics of North America*. 2014 Oct; 23: p. 863-910.
86. Trinh TW, Glazer DI, Sadow CA, et al. Bladder cancer diagnosis with CT urography: test characteristics and reasons for false-positive and false-negative results. *Abdominal Radiology*. 2017 Jul; 43: p. 663-671.
87. Nolte-Ernsting C, Cowan N. Understanding multislice CT urography techniques: many roads lead to Rome. *European Radiology*. 2006 Sep; 16: p. 2670-2686.
88. Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, et al. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urologic oncology*. 2015 Feb; 33(2): p. 66.e25--66.e31.
89. Têtu B. Diagnosis of urothelial carcinoma from urine. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2009 Jun; 22 Suppl 2: p. S53--S59.
90. Soria F, Droller MJ, Lotan Y, et al. An up-to-date catalog of available urinary biomarkers for the surveillance of non-muscle invasive bladder cancer. *World journal of urology*. 2018 Dec; 36(12): p. 1981-1995.
91. Lotan Y, Shariat SF, Schmitz-Dräger BJ, et al. Considerations on implementing diagnostic markers into clinical decision making in bladder cancer. *Urologic oncology*. 2010; 28(4): p. 441-448.

92. Kurth KH, Schellhammer PF, Okajima E, et al. Current methods of assessing and treating carcinoma in situ of the bladder with or without involvement of the prostatic urethra. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 1995 Jun; 2 Suppl 2: p. 8-22.
93. Kramer MW, Altieri V, Hurle R, et al. Current Evidence of Transurethral En-bloc Resection of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer. *European urology focus*. 2017 Dec; 3(6): p. 567-576.
94. Anderson C, Weber R, Patel D, et al. A 10-Item Checklist Improves Reporting of Critical Procedural Elements during Transurethral Resection of Bladder Tumor. *The Journal of urology*. 2016 Oct; 196(4): p. 1014-1020.
95. Mariappan P, Zachou A, Grigor KM, Group EUO. Detrusor muscle in the first, apparently complete transurethral resection of bladder tumour specimen is a surrogate marker of resection quality, predicts risk of early recurrence, and is dependent on operator experience. *European urology*. 2010 May; 57(5): p. 843-849.
96. Baltacı S, Bozlu M, Yıldırım A, et al. Significance of the interval between first and second transurethral resection on recurrence and progression rates in patients with high-risk non-muscle-invasive bladder cancer treated with maintenance intravesical Bacillus Calmette-Guérin. *BJU international*. 2015 Nov; 116(5): p. 721-726.
97. Kausch I, Sommerauer M, Montorsi F, et al. Photodynamic diagnosis in non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and cumulative analysis of prospective studies. *European urology*. 2010 Apr; 57(4): p. 595-606.
98. Mowatt G, N'Dow J, Vale L, et al. Photodynamic diagnosis of bladder cancer compared with white light cystoscopy: Systematic review and meta-analysis. *International journal of technology assessment in health care*. 2011 Jan; 27(1): p. 3-10.
99. Sylvester RJ, Oosterlinck W, Witjes JA. The schedule and duration of intravesical chemotherapy in patients with non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review of the published results of randomized clinical trials. *European urology*. 2008 Apr; 53(4): p. 709-719.

100. Leow JJ, Martin-Doyle W, Rajagopal PS, et al. Adjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer: a 2013 updated systematic review and meta-analysis of randomized trials. *European urology*. 2014 Jul; 66(1): p. 42-54.
101. Lamm DL. BCG in perspective: advances in the treatment of superficial bladder cancer. *European urology*. 1995; 27 Suppl 1: p. 2-8.
102. Bretton PR, Herr HW, Kimmel M, et al. The response of patients with superficial bladder cancer to a second course of intravesical bacillus Calmette-Guerin. *The Journal of urology*. 1990 Apr; 143(4): p. 710--2; discussion 712-3.
103. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001 Feb; 19(3): p. 666-675.
104. Mari A, Kimura S, Foerster B, et al. A systematic review and meta-analysis of lymphovascular invasion in patients treated with radical cystectomy for bladder cancer. *Urologic oncology*. 2018 Jun; 36(6): p. 293-305.
105. Poulsen AL, Horn T, Steven K. Radical cystectomy: extending the limits of pelvic lymph node dissection improves survival for patients with bladder cancer confined to the bladder wall. *The Journal of urology*. 1998 Dec; 160(6 Pt 1): p. 2015--9; discussion 2020.
106. Bladder Cancer WHO(CC, Hautmann RE, Abol-Enein H, Hafez K, Haro I, Mansson W, et al. Urinary diversion. *Urology*. 2007 Jan; 69(1 Suppl): p. 17-49.
107. Kamat AM, Gee JR, Dinney CPN, et al. The case for early cystectomy in the treatment of nonmuscle invasive micropapillary bladder carcinoma. *The Journal of urology*. 2006 Mar; 175(3 Pt 1): p. 881-885.
108. Piet AHM, Hulshof MCCM, Pieters BR, et al. Clinical results of a concomitant boost radiotherapy technique for muscle-invasive bladder cancer. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft. [et al]*. 2008 Jun; 184(6): p. 313-318.

109. Ghoneim MA, Abdel-Latif M, el-Mekresh M, et al. Radical cystectomy for carcinoma of the bladder: 2,720 consecutive cases 5 years later. *The Journal of urology*. 2008 Jul; 180(1): p. 121-127.
110. Chang SS, Hassan JM, Cookson MS, et al. Delaying radical cystectomy for muscle invasive bladder cancer results in worse pathological stage. *The Journal of urology*. 2003 Oct; 170(4 Pt 1): p. 1085-1087.
111. Sylvester RJ, Meijden APM, Oosterlinck W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *European urology*. 2006 Mar; 49(3): p. 466--5; discussion 475-7.
112. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *International journal of cancer*. 2000 Apr; 86(2): p. 289-294.
113. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, et al. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*. 2003; 21(18): p. 1315-1330.
114. Silverman DT, Levin LI, Hoover RN, et al. Occupational risks of bladder cancer in the United States: I. White men. *Journal of the National Cancer Institute*. 1989 Oct; 81(19): p. 1472-1480.
115. Silverman DT, Levin LI, Hoover RN. Occupational risks of bladder cancer in the United States: II Nonwhite men. *Journal of the National Cancer Institute*. 1989 Oct; 81(19): p. 1480-1483.
116. Chiou HY, Chiou ST, Hsu YH, et al. Incidence of transitional cell carcinoma and arsenic in drinking water: a follow-up study of 8,102 residents in an arseniasis-endemic area in northeastern Taiwan. *American journal of epidemiology*. 2001 Mar; 153(5): p. 411-418.
117. Lamm SH, Engel A, Kruse MB, et al. Arsenic in drinking water and bladder cancer mortality in the United States: an analysis based on 133 U.S. counties and 30 years of observation. *Journal of occupational and environmental medicine*. 2004 Mar; 46(3): p. 298-306.

118. Ward MH, Cantor KP, Riley D et al. Nitrate in public water supplies and risk of bladder cancer. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*. 2003 Mar; 14(2): p. 183-190.
119. Lamm DL, Riggs DR, Shriver JS, et al. Megadose vitamins in bladder cancer: a double-blind clinical trial. *The Journal of urology*. 1994 Jan; 151(1): p. 21-26.
120. Michaud DS, Spiegelman D, Clinton SK, et al. Prospective study of dietary supplements, macronutrients, micronutrients, and risk of bladder cancer in US men. *American journal of epidemiology*. 2000 Dec; 152(12): p. 1145-1153.
121. Beisel WR, Edelman R, Nauss K, et al. Single-nutrient effects on immunologic functions. Report of a workshop sponsored by the Department of Food and Nutrition and its nutrition advisory group of the American Medical Association. *JAMA*. 1981 Jan; 245(1): p. 53-58.
122. Alpha-Tocopherol BCCPSG. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *The New England journal of medicine*. 1994 Apr; 330(15): p. 1029-1035.
123. Steinmaus CM, Nuñez S, Smith AH. Diet and bladder cancer: a meta-analysis of six dietary variables. *American journal of epidemiology*. 2000 Apr; 151(7): p. 693-702.
124. Castela JE, Yuan JM, Gago-Dominguez M, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and bladder cancer prevention. *British journal of cancer*. 2000 Apr; 82(7): p. 1364-1369.
125. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, et al. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *The New England journal of medicine*. 2005 Mar; 352(11): p. 1092-1102.
126. Bianchi GD, Cerhan JR, Parker AS, et al. Tea consumption and risk of bladder and kidney cancers in a population-based case-control study. *American journal of epidemiology*. 2000 Feb; 151(4): p. 377-383.

127. Xu GP, Song PJ, Reed PI. Effects of fruit juices, processed vegetable juice, orange peel and green tea on endogenous formation of N-nitrosoproline in subjects from a high-risk area for gastric cancer in Moping County, China. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*. 1993 Jul; 2(4): p. 327-335.
128. Nagano J, Kono S, Preston DL, et al. Bladder-cancer incidence in relation to vegetable and fruit consumption: a prospective study of atomic-bomb survivors. *International journal of cancer*. 2000 Apr; 86(1): p. 132-138.
129. Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clinical Endoscopy*. 2013; 46: p. 24.
130. Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2009 Jul; 96: p. 1-8.
131. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part two--cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2005 Mar; 2: p. 1-23.
132. Nowak-Stepniowska A, Pergoł P, Padzik-Graczyk A. [Photodynamic method of cancer diagnosis and therapy--mechanisms and applications]. *Postepy biochemii*. 2013; 59(1): p. 53-63.
133. Luksiene Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*. 2003; 39(12): p. 1137-1150.
134. Juzeniene A, Moan J. The history of PDT in Norway. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2007 Mar; 4: p. 3-11.
135. Fonseca SM, Pina J, Arnaut LG, et al. Triplet-State and Singlet Oxygen Formation in Fluorene-Based Alternating Copolymers. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006 Apr; 110: p. 8278-8283.

136. Kessel D, Oleinick NL. Photodynamic Therapy and Cell Death Pathways. In *Methods in Molecular Biology*.: Humana Press; 2010. p. 35-46.
137. Plaetzer K, Kiesslich T, Verwanger T, et al. The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview. *Medical Laser Application*. 2003 Jan; 18: p. 7-19.
138. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2007 Sep; 1776: p. 86-107.
139. Mehraban N, Freeman H. Developments in PDT Sensitizers for Increased Selectivity and Singlet Oxygen Production. *Materials*. 2015 Jul; 8: p. 4421-4456.
140. Von Tappeiner H. Ueber wirkung der photodynamischen (fluorescierenden) Stoffe auf Protozoan und Enzyme. *Dtsch Arch Klin Med*. 1904; 80: p. 427-487.
141. Tappeiner H, Jodlbauer A. Die sensibilisierende Wirkung fluorescierender Substanzen: Gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung: aus dem pharmakologischen Institute der K. Universität München: Verlag von FCW Vogel; 1907.
142. Moan J, Steen HB, Feren K, et al. Uptake of hematoporphyrin derivative and sensitized photoinactivation of C3H cells with different oncogenic potential. *Cancer letters*. 1981; 14: p. 291-296.
143. Witjes JA, Douglass J. The role of hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy in bladder cancer. *Nature Reviews Urology*. 2007; 4: p. 542.
144. Frampton JE, Plosker GL. Hexyl aminolevulinate in the detection of bladder cancer: profile report. *BioDrugs*. 2006; 20: p. 317-320.
145. Schmidbauer J, Witjes F, Schmeller N, et al. Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy. *The Journal of urology*. 2004; 171: p. 135-138.
146. D'Hallewin MA, Bezdetnaya L, Guillemin F. Fluorescence detection of bladder cancer: a review. *European urology*. 2002; 42: p. 417-425.

147. Fotinos N, Campo MA, Popowycz F, et al. 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: Characteristics, application and perspectives. *Photochemistry and photobiology*. 2006; 82: p. 994-1015.
148. Grossman HB, Gomella L, Fradet Y, et al. A phase III, multicenter comparison of hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy and white light cystoscopy for the detection of superficial papillary lesions in patients with bladder cancer. *The Journal of urology*. 2007; 178: p. 62-67.
149. Jocham D, Witjes F, Wagner S, et al. Improved detection and treatment of bladder cancer using hexaminolevulinate imaging: a prospective, phase III multicenter study. *The Journal of urology*. 2005; 174: p. 862-866.
150. Blum HF. *Photodynamic action and diseases caused by light*. 1941.
151. Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochemistry and photobiology*. 1991 Apr; 53(4): p. 549-553.
152. Dougherty Thomasj. A Brief History of Clinical Photodynamic Therapy Development at Roswell Park Cancer Institute. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. 1996 Oct; 14: p. 219-221.
153. Nyman ES, Hynninen PH. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. 2004 Jan; 73(1-2): p. 1-28.
154. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*. 2016 Feb; 473: p. 347-364.
155. Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2010 Jun; 7: p. 61-75.
156. Kessel D, Woodburn K, Henderson BW, et al. Sites of photodamage in vivo and in vitro by a cationic porphyrin. *Photochemistry and photobiology*. 1995 Nov; 62(5): p. 875-881.

157. Kessel D, Woodburn K, Gomer CJ, et al. Photosensitization with derivatives of chlorin p6. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. 1995 Apr; 28(1): p. 13-18.
158. Berg K, Moan J. Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer. *Photochemistry and photobiology*. 1997 Mar; 65(3): p. 403-409.
159. Moan J, Berg K, Kvam E, et al. Intracellular localization of photosensitizers. *Ciba Foundation symposium*. 1989; 146: p. 95--107; discussion 107-11.
160. Marchetti P, Hirsch T, Zamzami N, et al. Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1996 Dec; 157(11): p. 4830-4836.
161. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, et al. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *The Journal of experimental medicine*. 1996 Oct; 184(4): p. 1331-1341.
162. Gomer CJ, Ferrario A, Rucker N, et al. Glucose regulated protein induction and cellular resistance to oxidative stress mediated by porphyrin photosensitization. *Cancer research*. 1991 Dec; 51(24): p. 6574-6579.
163. Gomer CJ, Ryter SW, Ferrario A, et al. Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins. *Cancer research*. 1996 May; 56(10): p. 2355-2360.
164. Gollnick SO, Liu X, Owczarczak B, et al. Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy in vivo. *Cancer research*. 1997 Sep; 57(18): p. 3904-3909.
165. Henderson BW, Vaughan L, Bellnier DA, et al. Photosensitization of murine tumor, vasculature and skin by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin. *Photochemistry and photobiology*. 1995 Oct; 62(4): p. 780-789.
166. Star WM, Marijnissen HP, Berg-Blok AE, et al. Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. *Cancer research*. 1986 May; 46(5): p. 2532-2540.

167. Roberts D, Cairnduff F, Driver I, et al. Tumor vascular shutdown following photodynamic therapy based on polyhematoporphyrin or 5-aminolevulinic Acid. *International journal of oncology*. 1994 Oct; 5(4): p. 763-768.
168. Chen Q, Chen H, Hetzel FW. Tumor oxygenation changes post-photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology*. 1996 Jan; 63(1): p. 128-131.
169. Korbely M. Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *Journal of clinical laser medicine & surgery*. 1996 Oct; 14(5): p. 329-334.
170. Cuenco GM, Knisely TL, Averboukh L, et al. Induction of glucose regulatory proteins in tumor cells after treatment with a benzophenothiazine analogue. *Photochem Photobiol*. 1997; 65: p. 19S.
171. Agarwal ML, Larkin HE, Zaidi SI, et al. Phospholipase activation triggers apoptosis in photosensitized mouse lymphoma cells. *Cancer research*. 1993 Dec; 53(24): p. 5897-5902.
172. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. 1997 May; 39(1): p. 1-18.
173. Yamamoto N, Hooper JK, Yamamoto N, et al. Tumoricidal capacities of macrophages photodynamically activated with hematoporphyrin derivative. *Photochemistry and photobiology*. 1992 Aug; 56(2): p. 245-250.
174. Qin B, Selman SH, Payne KM, et al. Enhanced skin allograft survival after photodynamic therapy. Association with lymphocyte inactivation and macrophage stimulation. *Transplantation*. 1993 Dec; 56(6): p. 1481-1486.
175. Nseyo UO, Whalen RK, Duncan MR, et al. Urinary cytokines following photodynamic therapy for bladder cancer a preliminary report. *Urology*. 1990; 36: p. 167-171.
176. Gomer CJ. Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology*. 1991 Dec; 54(6): p. 1093-1107.

177. Lamm DL, Stogdill VD, Stogdill BJ, et al. Complications of bacillus Calmette-Guerin immunotherapy in 1,278 patients with bladder cancer. *The Journal of urology*. 1986; 135: p. 272-274.
178. Hudson MA. When intravesical measures fail. Indications for cystectomy in superficial disease. *The Urologic clinics of North America*. 1992 Aug; 19(3): p. 601-609.
179. Kelly JF, Snell ME. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *The Journal of urology*. 1976; 115: p. 150-151.
180. Hisazumi H, Miyoshi N, Naito K, et al. Whole bladder wall photoradiation therapy for carcinoma in situ of the bladder: a preliminary report. *The Journal of urology*. 1984 May; 131(5): p. 884-887.
181. Prout GR, Lin CW, Benson R, et al. Photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative in the treatment of superficial transitional-cell carcinoma of the bladder. *The New England journal of medicine*. 1987 Nov; 317(20): p. 1251-1255.
182. Shumaker BP, Hetzel FW. Clinical laser photodynamic therapy in the treatment of bladder carcinoma. *Photochemistry and photobiology*. 1987 Nov; 46(5): p. 899-901.
183. Harty JJ, Amin M, Wieman TJ, et al. Complications of whole bladder dihematoporphyrin ether photodynamic therapy. *The Journal of urology*. 1989 Jun; 141(6): p. 1341-1346.
184. Windahl T, Lofgren LA. Two Years' Experience with Photodynamic Therapy of Bladder Carcinoma. *British Journal of Urology*. 2019 Apr; 71: p. 187-191.
185. Kriegmair M, Baumgartner R, Lumper W, et al. Early clinical experience with 5-aminolevulinic acid for the photodynamic therapy of superficial bladder cancer. *British Journal of Urology*. 2019 Apr; 77: p. 667-671.
186. Nseyo UnyimeO, DeHaven Jean, Dougherty ThomasJ, et al. Photodynamic therapy (PDT) in the treatment of patients with resistant superficial bladder cancer: a long term experience. *Journal of clinical laser medicine & surgery*. 1998; 16: p. 61-68.

187. Steinbach P, Wedmgandt H, Baumgartner R, et al. Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer protoporphyrin ix following exposure to 5-aminolevulinic acid. *Photochemistry and Photobiology*. 2019 Apr; 62: p. 887-895.
188. Shi-Chung C, MacRobert Alexander J, Bown Stephen G. Photodynamic Therapy on Rat Urinary Bladder with Intravesical Instillation of 5-Aminolevulinic Acid: Light Diffusion and Histological Changes. *Journal of Urology*. 2019 Apr; 155: p. 1749-1753.
189. Kriegmair M, Stepp H, Steinbach P, et al. Fluorescence Cystoscopy following Intravesical Instillation of 5-Aminolevulinic Acid: A New Procedure with High Sensitivity for Detection of Hardly Visible Urothelial Neoplasias. 1995..
190. Stenzl A, Eder I, Kostron H, et al. Electromotive diffusion (EMD) and photodynamic therapy with δ -aminolaevulinic acid (δ -ALA) for superficial bladder cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1996; 36: p. 233-236.
191. Shackley DC, Briggs C, Gilhooley A, et al. Photodynamic therapy for superficial bladder cancer under local anaesthetic. *BJU International*. 2019 Apr; 89: p. 665-670.
192. Peng Q, Berg K, Moan J, et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochemistry and photobiology*. 1997; 65: p. 235-251.
193. Datta SN, Loh CS, MacRobert AJ, et al. Quantitative studies of the kinetics of 5-aminolaevulinic acid-induced fluorescence in bladder transitional cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. 1998 Oct; 78: p. 1113-1118.
194. Butler MS, Newman DJ. Mother Nature's gifts to diseases of man: the impact of natural products on anti-infective, anticholestemics and anticancer drug discovery. In Herrling PL, Matter A, editors. *Natural Compounds as Drugs*. Basel: Birkhaeuser; 2008. p. 1-45.
195. U.S. National Library of Medicine. Medieval Manuscripts. [Online].; 2013 [cited 2015 Μάρτιος 23]. Available from: HYPERLINK "https://www.nlm.nih.gov/hmd/medieval/credits.html" <https://www.nlm.nih.gov/hmd/medieval/credits.html> .

196. Tyler V. Herbal medicine: From the past to the future. Public Health Nutrition. 2000: p. 447-452.
197. King SR. CRC Ethnobotany Desk Reference. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 1998.
198. Moerman DE. Medicinal plants of native America. 1st ed. Ann ARbor: Museum of Anthropology, Univrsity of Michigan; 1986.
199. Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, et al. Medicinal Plants in therapy. Bulletin of the World Health Organization. 1985: p. 965-981.
200. Fabricant DS, Farnsworth NR. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. Environmental Health Perspectives. 2001: p. 69-75.
201. Ekor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and chalenges in monitoring safety. Frontiers in Pharmacology. 2014 January: p. 1-10.
202. Μυτάκης Μ. Η εθνοφαρμακολογία του υπερικού. [Online].; 2002. Available from: HYPERLINK http://www.iama.gr/ethno/Hypericum_files/2Hypericum_Mitakis%20Manolis.pdf .
203. Kolaci M. Τα είδη του Hypericum. [Online].; 2007 [cited 2007 Μάρτιος. Available from: HYPERLINK http://www.iama.gr/ethno/Hypericum_files/4Hypericum_Kolaci%20Mikaela.pdf .
204. Hobbs C. Christopher Hobbs. [Online].; 1994. Available from: HYPERLINK <https://www.christopherhobbs.com/library/articles-on-herbs-and-health/st-johns-wort-ancient-herbal-protector/> .
205. Wichtl M. Wichtl- Teedrogen und Phytopharmaka. 6th ed. Blaschek W, editor. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2016.
206. European Medicines Agency - Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). European Medicines Agency. [Online].; 2009 [cited 2009 November 12. Available from: HYPERLINK https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-community-herbal-monograph-hypericum-perforatum-l-herba-traditional-use_en.pdf .

207. Linde K, Gilbert R, Mulrow CD, et al. St John's wort for depression-an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. *BMJ*. 1996 August: p. 253-258.
208. Kasper S, Dienel A. Cluster analysis of symptoms during antidepressant treatment with Hypericum extract in mildly to moderately depressed out-patients. A meta-analysis of data from three randomized, placebo-controlled trials. *Psychopharmacology*. 2002 September: p. 301-308.
209. Gaster B, Horoyd J. St John's wort for depression: a systematic review. *Arch Intern Med*. 2000 January: p. 152-156.
210. European Medicines Agency COMMITTEE ON HERBAL MEDICINAL PRODUCTS (HMPC). European Medicines Agency. [Online].; 2008 [cited 2008 November 6. Available from: [HYPERLINK
https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/draft-community-herbal-monograph-hypericum-perforatum-l-herba-first-version_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/draft-community-herbal-monograph-hypericum-perforatum-l-herba-first-version_en.pdf) .
211. Nahrstedt A, Butterweck V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of Hypericum perforatum L. *Pharmacopsychiatry*. 1997 September: p. 129-134.
212. Mueller WE, Singer A, Wonnemann M. Hyperforin--antidepressant activity by a novel mechanism of action. *Pharmacopsychiatry*. 2011 July: p. 98-102.
213. Singer A, Wonnemann M, Mueller WE. Hyperforin, a Major Antidepressant Constituent of St. John's Wort, Inhibits Serotonin Uptake by Elevating Free Intracellular Na⁺. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1999 September: p. 1363-1368.
214. Butterweck V, Petereit F, Winterhoff H, et al. Solubilized hypericin and pseudohypericin from Hypericum perforatum exert antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Medica*. 1998 May: p. 291-294.
215. Butterweck V, Jurgeliemk G, Nahrstedt A, et al. Flavonoids from Hypericum perforatum show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Medica*. 2000 February: p. 3-6.

216. Tatsis EC, Boeren S, Exarchou V, et al. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry*. 2007 Feb; 68: p. 383-393.
217. Gurevich IA, Dobryin VN, Kolosov MN. Hyperforin an antibiotic from *Hypericum perforatum* L.. *Antibiotiki*. 1971 June: p. 510-513.
218. Orth HC, Rentel C, Schmidt PC. Isolation, purity analysis and stability of hyperforin as a standard material from *Hypericum perforatum* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1999 February: p. 193-200.
219. Chatterjee SS, Noldner M, Koch E, et al. Antidepressant activity of hypericum perforatum and hyperforin: the neglected possibility. *Pharmacopsychiatry*. 1998 June: p. 7-15.
220. Butterweck V, Christoffel V, Nahrstedt A, et al. Step by step removal of hyperforin and hypericin: activity profile of different *Hypericum* preparations in behavioral models. *Life Sciences*. 2003 June: p. 627-639.
221. Vandenberghe A, Zanoli P, Puia G, et al. Evidence that total extract of *Hypericum perforatum* affects exploratory behavior and exerts anxiolytic effects in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2000 April: p. 527-633.
222. Wright CW, Gott M, Grayson B, et al. Correlation of hyperforin content of *Hypericum perforatum* (St John's Wort) extracts with their effects on alcohol drinking in C57BL/6J mice: a preliminary study. *Journal of Psychopharmacology*. 2003 December: p. 403-408.
223. Schempp CM, Pelz K, Wittmer A, et al. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *The Lancet*. 1999 June: p. 2129.
224. Albert D, Zuendorf I, Dingermann T, et al. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochemical Pharmacology*. 2002 December: p. 1767-1775.

225. Schempp CM, Kirkin V, Simon-Haarhaus B, et al. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene*. 2002 February: p. 1242-1250.
226. Hostanska K, Reichling J, Bommer S, et al. Hyperforin a constituent of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2003 July: p. 121-132.
227. Park J. Is the excited state H_i-atom transfer in hypericin concerted? *Photochem. Photobiol*. 2011 73: p. 105-109.
228. Rowe D. Photosensitization Problems in Livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 1989: p. 301-323.
229. Lavie G, Mazur Y, Lavie D, et al. The chemical and biological properties of hypericin—a compound with a broad spectrum of biological activities. *Medicinal Research Reviews*. 1995: p. 111-119.
230. Falk H, Schmitzberger W. On the nature of "soluble" hypericin in *Hypericum* species. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly*. 1992 Aug 01; 123: p. 731-739.
231. Delaey EM, Kamuhabwa AR, Vandenbogaerde AL, et al. Photocytotoxicity of Protohypericin after Photoconversion to Hypericin. *Planta Med*. 31.1; 65: p. 719-722.
232. Southwell IA, Bourke CA. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). *Phytochemistry*. 2001; 56: p. 437-441.
233. Schempp CM, Müller K, Winghofer B, et al. Single-Dose and Steady-State Administration of *Hypericum perforatum* Extract (St John's Wort) Does Not Influence Skin Sensitivity to UV Radiation, Visible Light, and Solar-Simulated Radiation. *Archives of Dermatology*. 2001 Apr; 137: p. 512-513.
234. Kubin A, Wierrani F, Burner U, et al. Hypericin - The Facts About a Controversial Agent. *Current Pharmaceutical Design*. 2005 Jan; 11: p. 233-253.

235. Brockmann H, Haschad MN, Maier K, et al. Uber das Hypericin, den photodynamisch wirksamen Farbstoff aus *Hypericum perforatum*. Die Naturwissenschaften. 1939 Aug; 27: p. 550-550.
236. Brockmann H, Falkenhausen EHF, Dorlars A. Die Konstitution des Hypericins. Die Naturwissenschaften. 1950; 37: p. 540-540.
237. Freeman D, Frolow F, Kapinus E, et al. Acidic properties of hypericin and its octahydroxy analogue in the ground and excited states. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1994;(7): p. 891-892.
238. English DS, Doyle RT, Petrich JW, et al. Subcellular Distributions and Excited-State Processes of Hypericin in Neurons. Photochemistry and Photobiology. 2008 Jan; 69: p. 301-305.
239. Sattler S, Schaefer U, Schneider W, et al. Binding, Uptake, and Transport of Hypericin by Caco-2 Cell Monolayers. Journal of Pharmaceutical Sciences. 1997 Oct; 86: p. 1120-1126.
240. Siboni G, Weitman H, Freeman D, et al. The correlation between hydrophilicity of hypericins and helianthrone: internalization mechanisms, subcellular distribution and photodynamic action in colon carcinoma cells. Photochemical & Photobiological Sciences. 2002 Jun; 1: p. 483-491.
241. Buytaert E, Callewaert G, Hendrickx N, et al. Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. The FASEB Journal. 2006 Apr; 20: p. 756-758.
242. Galanou MC, Theodossiou TA, Tsiourvas D, et al. Interactive Transport, Subcellular Relocation and Enhanced Phototoxicity of Hypericin Encapsulated in Guanidinylated Liposomes via Molecular Recognition. Photochemistry and Photobiology. 2008 Jun;; p. ?--?
243. Ali SM, Olivo M. Bio-distribution and subcellular localization of Hypericin and its role in PDT induced apoptosis in cancer cells. International journal of oncology. 2002 Sep; 21(3): p. 531-540.

244. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011; 61: p. 250-281.
245. Diwu Z, Lown JW. Photosensitization with anticancer agents 17. EPR studies of photodynamic action of hypericin: Formation of semiquinone radical and activated oxygen species on illumination. *Free Radical Biology and Medicine*. 1993; 14: p. 209-215.
246. Hadjur C, Richard MJ, Parat MO, et al. Photodynamically induced cytotoxicity of hypericin dye on human fibroblast cell line MRC5. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1995; 27: p. 139-146.
247. Delaey E, Vandenberghe A, Merlevede W, et al. Photocytotoxicity of hypericin in normoxic and hypoxic conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2000 Jun; 56: p. 19-24.
248. Thomas C, Pardini RS. Oxygen dependence of hypericin-induced phototoxicity to emt6 mouse mammary carcinoma cells. *Photochemistry and Photobiology*. 1992 Jun; 55: p. 831-837.
249. Thomas C, MacGill RS, Miller GC, et al. Photoactivation of hypericin generates singlet oxygen in mitochondria and inhibits succinoxidase. *Photochemistry and Photobiology*. 1992 Jan; 55: p. 47-53.
250. Theodossiou TA, Noronha-Dutra A, Hothersall JS. Mitochondria are a primary target of hypericin phototoxicity: Synergy of intracellular calcium mobilisation in cell killing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2006; 38: p. 1946-1956.
251. Du HY, Olivo M, Mahendran R, et al. Hypericin photoactivation triggers down-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression in well-differentiated human nasopharyngeal cancer cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007 Mar 23; 64: p. 979.
252. Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T, et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *The EMBO Journal*. 2012 Jan; 31: p. 1062-1079.

253. Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, et al. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2002 Mar; 34(3): p. 221-241.
254. Agostinis P, Assefa Z, Vantieghem A, et al. Apoptotic and anti-apoptotic signaling pathways induced by photodynamic therapy with hypericin. *Advances in Enzyme Regulation*. 2000 Jun; 40: p. 157-182.
255. Ali SM, Olivo M. Mechanisms of action of phenanthroperylenequinones in photodynamic therapy (review). *International journal of oncology*. 2003 Jun; 22(6): p. 1181-1191.
256. Vandebogaerde AL, Delaey EM, Vantieghem AM, et al. Cytotoxicity and antiproliferative effect of hypericin and derivatives after photosensitization. *Photochemistry and photobiology*. 1998 Jan; 67(1): p. 119-125.
257. Srivastava M, Ahmad N, Gupta S, et al. Involvement of Bcl-2 and Bax in photodynamic therapy-mediated apoptosis. Antisense Bcl-2 oligonucleotide sensitizes RIF 1 cells to photodynamic therapy apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2001 May; 276(18): p. 15481-15488.
258. Vantieghem A, Xu Y, Declercq W, et al. Different pathways mediate cytochrome c release after photodynamic therapy with hypericin. *Photochemistry and photobiology*. 2001 Aug; 74(2): p. 133-142.
259. Vantieghem A, Assefa Z, Vandenaabeele P, et al. Hypericin-induced photosensitization of HeLa cells leads to apoptosis or necrosis. Involvement of cytochrome c and procaspase-3 activation in the mechanism of apoptosis. *FEBS letters*. 1998 Nov; 440(1-2): p. 19-24.
260. Johnson SAS, Pardini RS. Antioxidant Enzyme Response to Hypericin in EMT6 Mouse Mammary Carcinoma Cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 1998; 24: p. 817-826.
261. VanderWerf QM, Saxton RE, Chang A, et al. Hypericin: A New Laser Phototargeting Agent for Human Cancer Cells. *The Laryngoscope*. 1996 Apr; 106: p. 479-483.

262. Jendželovská Z, Jendželovský R, Kuchárová B, et al. Hypericin in the Light and in the Dark: Two Sides of the Same Coin. *Frontiers in Plant Science*. 2016; 7: p. 560.
263. Alecu M, Ursaciuc C, Hălălău F, et al. Photodynamic treatment of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma with hypericin. *Anticancer research*. 1998; 18(6B): p. 4651-4654.
264. Kacerovská D, Pizinger K, Majer F, et al. Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with topical hypericum perforatum extract--a pilot study. *Photochemistry and photobiology*. 2008; 84(3): p. 779-785.
265. Rook AH, Wood GS, Duvic M, et al. A phase II placebo-controlled study of photodynamic therapy with topical hypericin and visible light irradiation in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2010 Dec; 63(6): p. 984-990.
266. D'Hallewin MA, De Witte PA, Waelkens E, et al. Fluorescence detection of flat bladder carcinoma in situ after intravesical instillation of hypericin. *The Journal of urology*. 2000 Aug; 164(2): p. 349-351.
267. Kamuhabwa AR, Agostinis P, D'Hallewin MA, et al. Photodynamic activity of hypericin in human urinary bladder carcinoma cells. *Anticancer research*. 2000; 20(4): p. 2579-2584.
268. Kamuhabwa AAR, Cosserat-Gerardin I, Didelon J, et al. Biodistribution of hypericin in orthotopic transitional cell carcinoma bladder tumors: Implication for whole bladder wall photodynamic therapy. *International Journal of Cancer*. 2001 Dec; 97: p. 253-260.
269. Kamuhabwa AAR, Roskams T, DHallewin MA, et al. Whole bladder wall photodynamic therapy of transitional cell carcinoma rat bladder tumors using intravesically administered hypericin. *International Journal of Cancer*. 2003 Sep; 107: p. 460-467.
270. Senthil V, Longworth JW, Ghiron CA, et al. Photosensitization of aqueous model systems by hypericin. *Biochimica et biophysica acta*. 1992 Jan; 1115(3): p. 192-200.

271. Liebes L, Mazur Y, Freeman D, et al. A method for the quantitation of hypericin, an antiviral agent, in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*. 1991 May; 195(1): p. 77-85.
272. Wirz A, Meier B, Sticher O. Absorbance data of hypericin and pseudohypericin used as reference compounds for medicinal plant analysis. *Die Pharmazie*. 2001 Jan; 56(1): p. 52-57.
273. Falk H, Meyer J. On the homo- and heteroassociation of hypericin. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly*. 1994 Jun 01; 125: p. 753-762.
274. Kubin A, Loew H, Burner U, et al. How to make hypericin water-soluble. *Die Pharmazie*. 2008 May; 63: p. 263-9.
275. Straub M, Russ D, Horn T, et al. A Phase IIA Dose-Finding Study of PVP-Hypericin Fluorescence Cystoscopy for Detection of Nonmuscle-Invasive Bladder Cancer. *Journal of Endourology*. 2015 Feb; 29: p. 216-222.
276. Yang M, Tanaka T, Hirose Y, et al. Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary-bladder carcinogenesis in male ICR mice. *International journal of cancer*. 1997 Nov; 73(5): p. 719-724.
277. World Health Organization. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants - Volume 2 Zhang X, editor.: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
278. Xiao Z, McCallum TJ, Brown KM, et al. Characterization of a novel transplantable orthotopic rat bladder transitional cell tumour model. *British journal of cancer*. 1999; 81: p. 638.
279. Kamuhabwa A, Roskams T, Baert L, et al. Microscopic quantification of hypericin fluorescence in an orthotopic rat bladder tumor model after intravesical instillation. *International Journal of Oncology*. 2003 Apr.
280. Nseyo UO, Shumaker B, Klein EA, et al. Photodynamic therapy using porfimer sodium as an alternative to cystectomy in patients with refractory transitional cell carcinoma in situ of the bladder. Bladder Photofrin Study Group. *The Journal of urology*. 1998 Jul; 160(1): p. 39-44.

281. King SR. CRC Ethnobotany Desk Reference By Timothy Johnson. CRC Press, Boca Raton, FL. 1999. ix + 121 lpp. 21.5 × 27.5 cm. 149.95. ISBN 0-8493-1187-X. J. Nat. Prod. 2000 Jan; 63: p. 171-171.
282. Hartwell JL. Plants used against cancer: a survey: Quarterman Publications; 1982.
283. Arentsen HC, Hendricksen K, Oosterwijk E, et al. Experimental rat bladder urothelial cell carcinoma models. *World Journal of Urology*. 2009 Jun; 27: p. 313-317.
284. Clayson DB, Fishbein L, Cohen SM. Effects of stones and other physical factors on the induction of rodent bladder cancer. *Food and Chemical Toxicology*. 1995 Sep; 33: p. 771-784.
285. Oliveira PA, Colaço A, De La Cruz LP, et al. Experimental bladder carcinogenesis-rodent models. *ExpOncol*. 2006: p. 2-11.
286. Vasconcelos-Nóbrega C, Colaço A, Lopes C, et al. Review: BBN as an urothelial carcinogen. *In vivo (Athens, Greece)*. 2012; 26(4): p. 727-739.
287. Druckrey H, Preussmann R, Ivankovic S, et al. Selektive Erzeugung von Blasenkrebs an Ratten durch Dibutyl- und N-Butyl-N-butanol(4)-nitrosamin. *Zeitschrift für Krebsforschung*. 1964 Jul; 66: p. 280-290.
288. Slocum SL, Kensler TW. Nrf2: control of sensitivity to carcinogens. *Archives of Toxicology*. 2011 Apr; 85: p. 273-284.
289. Cohen SM, Ohnishi T, Clark NM, et al. Investigations of Rodent Urinary Bladder Carcinogens: Collection, Processing, and Evaluation of Urine and Bladders. *Toxicol Pathol*. 2019 May; 35: p. 337-347.
290. Yamamoto K, Nakata D, Tada M, et al. A functional and quantitative mutational analysis of p53 mutations in yeast indicates strand biases and different roles of mutations in DMBA-and BBN-induced tumors in rats. *International journal of cancer*. 1999; 83: p. 700-705.
291. Ito N, Shirai T, Fukushima S, et al. Dose-response study of urinary bladder carcinogenesis in rats by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1984 Jul; 108: p. 169-173.

292. Ohtani M, Kakizoe T, Nishio Y, et al. Sequential Changes of Mouse Bladder Epithelium during Induction of Invasive Carcinomas by *N*-Butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Cancer Res.* 1986 Apr; 46: p. 2001.
293. Wanibuchi H, Wei M, Salim EI, et al. Inhibition of rat urinary bladder carcinogenesis by the antiangiogenic drug TNP-470. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP.* 2006; 7(1): p. 101-107.
294. Hoggatt F, Hoggatt, Honerlaw, et al. A Spoonful of Sugar Helps the Medicine Go Down: A Novel Technique to Improve Oral Gavage in Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.* 2010 MAI: p. 2010.
295. Atcha Z, Rourke C, Neo AH, et al. Alternative method of oral dosing for rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS.* 2010 May; 49: p. 335-343.
296. Boorman GA, Wood M, Fukushima S. Tumours of the urinary bladder. IARC scientific publications. 1994;: p. 383.
297. Hostanska K, Reichling J, Bommer S, et al. Aqueous ethanolic extract of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) induces growth inhibition and apoptosis in human malignant cells in vitro. *Die Pharmazie.* 2002 May; 57(5): p. 323-331.
298. Skalkos D, Gioti E, Stalikas CD, et al. Photophysical properties of *Hypericum perforatum* L. extracts--novel photosensitizers for PDT. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology.* 2006 Feb; 82: p. 146—151.
299. Kapsokalyvas D, Dimitriou H, Skalkos D, et al. Does *Hypericum perforatum* L. extract show any specificity as photosensitizer for HL-60 leukemic cells and cord blood hemopoietic progenitors during photodynamic therapy? *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology.* 2005 Sep; 80: p. 208—216.
300. Kamuhabwa AR, Agostinis PM, D'Hallewin MA, et al. Cellular Photodestruction Induced by Hypericin in AY-27 Rat Bladder Carcinoma Cells. *Photochemistry and Photobiology.* 2019 Mar; 74: p. 126-132.

301. Gyenge EB, Forny P, Lüscher D, et al. Effects of hypericin and a chlorin based photosensitizer alone or in combination in squamous cell carcinoma cells in the dark. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2012 Dec; 9: p. 321-331.
302. Berlanda J, Kiesslich T, Engelhardt V, et al. Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2010 Sep; 100: p. 173-180.
303. Pope AJ, Bown SG. The Morphological and Functional Changes in Rat Bladder Following Photodynamic Therapy with Phthalocyanine Photosensitization. *Journal of Urology*. 1991 May; 145: p. 1064-1070.
304. D'Hallewin MA, Baert L, Marijnissen JP, et al. Whole bladder wall photodynamic therapy with in situ light dosimetry for carcinoma in situ of the bladder. *The Journal of urology*. 1992 Oct; 148(4): p. 1152-1155.
305. Kriegmair M*, Waidelich R, Lumper W, et al. Integral Photodynamic Treatment of Refractory Superficial Bladder Cancer. *Journal of Urology*. 1995 Oct; 154: p. 1339-1341.
306. Chang SC, Buonaccorsi G, MacRobert AJ, et al. 5-Aminolevulinic acid (ALA)-induced protoporphyrin IX fluorescence and photodynamic effects in the rat bladder: an in vivo study comparing oral and intravesical ALA administration. *Lasers in surgery and medicine*. 1997; 20(3): p. 254-264.
307. Staveren HJ, Beek JF, Verlaan CWJ, et al. Comparison of Normal Piglet Bladder Damage after PDT with Oral or Intravesical Administration of ALA. *Lasers in Medical Science*. 2002 Oct; 17: p. 238-245.
308. Meruelo D, Lavie G, Lavie D. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988; 85: p. 5230-5234.
309. Okpanyi SN, Lidzba H, Scholl BC, et al [Genotoxicity of a standardized Hypericum extract]. *Arzneimittel-Forschung*. 1990 Aug; 40: p. 851—855.

310. DHallewin MA, Kamuhabwa AR, Roskams T, et al. Hypericin-based fluorescence diagnosis of bladder carcinoma. *BJU International*. 2002 May; 89: p. 760-763.
311. Pytel A, Schmeller N. New aspect of photodynamic diagnosis of bladder tumors: fluorescence cytology. *Urology*. 2002 Feb; 59(2): p. 216-219.
312. Asanuma H, Arai T, Seguchi K, et al. Successful diagnosis of orthotopic rat superficial bladder tumor model by ultrathin cystoscopy. *The Journal of urology*. 2003; 169: p. 718-720.
313. El Khatib S, Didelon J, Leroux A, et al. Kinetics, biodistribution and therapeutic efficacy of hexylester 5-aminolevulinate induced photodynamic therapy in an orthotopic rat bladder tumor model. *The Journal of urology*. 2004 Nov; 172(5 Pt 1): p. 2013-2017.
314. Grönlund-Pakkanen S, Wahlfors J, Talja M, et al. The effect of photodynamic therapy on rat urinary bladder with orthotopic urothelial carcinoma. *BJU international*. 2003; 92: p. 125-130.
315. Hendricksen K, Molkenboer-Kuenen J, Oosterwijk E, et al. Evaluation of an orthotopic rat bladder urothelial cell carcinoma model by cystoscopy. *BJU International*. 2008 Apr; 101: p. 889-893.
316. How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis of Smoking-Attributable Disease, A Report of the Surgeon General: Agency, Healthcare Research and Quality; 2011.
317. Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, et al. A Genetic Explanation of Slaughter's Concept of Field Cancerization. *Cancer Res*. 2003 Apr; 63: p. 1727.
318. Chai H, Brown RE. Field Effect in Cancer-An Update. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. Autu; 39: p. 331-337.
319. Dakubo GD, Jakupciak JP, Birch-Machin MA, et al. Clinical implications and utility of field cancerization. *Cancer Cell International*. 2007; 7: p. 2.
320. Höglund M. Bladder cancer, a two phased disease? *Seminars in Cancer Biology*. 2007 Jun; 17: p. 225-232.

321. Kompier LC, Lurkin I, Aa MNM, et al. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA Mutations in Bladder Cancer and Their Potential as Biomarkers for Surveillance and Therapy. *PLOS ONE*. 2010 Nov; 5: p. e13821.
322. Palou J, Sylvester RJ, Faba OR, et al. Female Gender and Carcinoma In Situ in the Prostatic Urethra Are Prognostic Factors for Recurrence, Progression, and Disease-Specific Mortality in T1G3 Bladder Cancer Patients Treated With Bacillus Calmette-Guérin. *European Urology*. 2019 Mar; 62: p. 118-125.
323. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953 Sep; 6(5): p. 963-968.
324. Sun CH, Pan CC, Ho DMT, et al. Prognostic Significance of the 2004 WHO/ISUP Classification for Prediction of Recurrence, Progression, and Cancer-Specific Mortality of Non-Muscle-Invasive Urothelial Tumors of the Urinary Bladder: A Clinicopathologic Study of 1,515 Cases. *ajcp*. 3/31; 133: p. 788-795.
325. Mandhani A, Muruganandham K. Lymphadenectomy in bladder cancer: What should be the extent? *Indian Journal of Urology*. 2010; 26: p. 448.
326. Naselli A, Hurle R, Paparella S, et al. Role of Restaging Transurethral Resection for T1 Non-muscle invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *European urology focus*. 2018 Jul; 4(4): p. 558-567.
327. Ok JH, Meyers FJ, Evans CP. Medical and surgical palliative care of patients with urological malignancies. *The Journal of urology*. 2005 Oct; 174(4 Pt 1): p. 1177-1182.
328. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*. 2018 Aug; 174(4): p. 1033.
329. Rosevear HM, Lightfoot AJ, Birusingh KK, et al. Factors affecting response to bacillus Calmette-Guérin plus interferon for urothelial carcinoma in situ. *The Journal of urology*. 2011 Sep; 186(3): p. 817-823.

330. Shelley MD, Wilt TJ, Court J, et al. Intravesical bacillus Calmette-Guérin is superior to mitomycin C in reducing tumour recurrence in high-risk superficial bladder cancer: a meta-analysis of randomized trials. *BJU international*. 2004 Mar; 93(4): p. 485-490.
331. Trialists IC, National Cancer Research Institute Bladder Cancer Clinical Studies Group) MRCABCWP, Research EO, Cancer Genito-Urinary Tract Cancer Group T, Group ABCS, Canada Clinical Trials Group NCI, et al. International phase III trial assessing neoadjuvant cisplatin, methotrexate, and vinblastine chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: long-term results of the BA06 30894 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011 Jun; 29(16): p. 2171-2177.
332. Colombel M, Soloway M, Akaza H, et al. Epidemiology, Staging, Grading, and Risk Stratification of Bladder Cancer. *European Urology Supplements*. 2008 Oct; 7: p. 618-626.
333. Spikes JD. The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in the health sciences. In.: Springer; 1985. p. 209-227.
334. Urdang G. *Pharmacopoeia Iondinensis of 1618*. 1st ed. Madison: State historical society of Wisconsin; 1944.
335. Hobbs C. St. John's Wort: A Review. [Online].; 1998. Available from: HYPERLINK <https://www.christopherhobbs.com/library/articles-on-herbs-and-health/st-johns-wort-a-review/> .
336. Anliker S. Paracelsus. [Online].; 2017. Available from: HYPERLINK " <https://www.paracelsus-magazin.ch/en/paracelsus-medicine/paracelsus-remedies-2/> .
337. Anticarcinogenic Activity of Green Tea Polyphenols. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 1993 Jun.
338. Hostanska K, Reichling J, Bommer S, et al. Hyperforin a constituent of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human

- malignant cell lines. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2003 Jul; 56(1): p. 121-132.
339. Schempp CM, Kirkin V, Simon-Haarhaus B, et al. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene*. 2002 Feb; 21: p. 1242.
340. Kamuhabwa A, Agostinis P, Ahmed B, et al. Hypericin as a potential phototherapeutic agent in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2004; 3: p. 772.
341. Kamuhabwa AAR, Mavungu JDD, Baert L, et al. Determination of hypericin in human plasma by high-performance liquid chromatography after intravesical administration in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005 Apr; 59: p. 469-474.
342. World Health Organization. *Herba Hyperici*. In Zhang X. WHO monographs on selected medicinal plants.; 2004. p. 149-171.

