



Áhrif kúrkúmíns til aukningar á næmi krabbameinsfrumna fyrir frumudeyðandi lyfjum

Karen Eva Halldórsdóttir

**Leiðbeinendur:
Helgi Sigurðsson
Finnbogi R. Þórmóðsson**

**Lokaverkefni til BS-gráðu
Læknadeild Háskóla Íslands
Heilbrigðisvísindasvið
1. júní 2012**



HÁSKÓLI ÍSLANDS

Áhrif kúrkúmíns til aukningar á næmi krabbameinsfrumna
fyrir frumdeyðandi lyfjum

Gamalgróið leyndarmál í nútíma vísindum

Karen Eva Halldórsdóttir

Lokaverkefni til BS-gráðu í læknisfræði

Leiðbeinendur: Helgi Sigurðsson

Finnbogi R. Þormóðsson

Læknadeild

Heilbrigðisvísindasvið Háskóla Íslands

1. júní 2012

Efnisyfirlit

Ágrip.....	3
Listi yfir skammstafanir	4
Inngangur	6
I. Kúrkúmín	6
I.1 Saga og uppruni:	6
I.2 Efnafræðileg bygging og leysanleiki:.....	7
I.3. Lífeðlisfræðilegir eiginleikar	8
I.4. Eituráhrif og rannsóknir í dýramódelum og einstaklingum.....	9
I.5. Kúrkúmín afleiður og ýmsar betrubætingar	10
I.6. Eiginleikar, sameindaskotmörk og æxlishamlandi áhrif	11
II. Lyfjanæmisprófanir	18
II.1. ATP-ljósnaemismælingar.....	20
II.2. Kúrkúmín og lyfjanæmi	21
III. Lyfin	22
Efniviður og aðferðir	23
2.1. Frumuræktun	23
2.2. Einangrun krabbameinsfrumna úr eggjastokkaæxli sjúklunga	23
2.3. Einangrun krabbameinsfrumna úr blöðruhálskirtilsæxli sjúklings	24
2.3. Blöndun kúrkúmín stofnlausnar	24
2.4. Lyfjablandanir fyrir lyfjanæmispróf.....	25
2.5. Uppsetning tilrauna	25
2.6. Lyfjanæmisprófun	26
2.7. Listi yfir efni, tæki og áhöld.....	27
Lausnir	27

Æti og sermi	27
Tæki og áhöld	28
Niðurstöður.....	29
Áhrif kúrkúmíns á DU-145 frumulínu	29
Áhrif kúrkúmíns á DU-145 til viðbótar krabbameinslyfjum	30
Áhrif kúrkúmíns á PC-3 frumulínu	31
Kúrkúmín með krabbameinslyfjum á PC-3 frumulínu	32
Áhrif kúrkúmíns krabbameinsfrumur úr eggjastokkum sjúklings	37
Umræður og ályktanir	38
Lokaorð	42
Þakkarorð	42
Heimildaskrá	43

Ágrip

Inngangur: Kúrkúmín, fjölfenól sameind sem er að finna í jarðstönglum *Curcuma longa* og virkasta efnið í túrmerik kryddi, býr yfir einstökum eiginleikum sem nýst geta við meðferð ýmissa sjúkdóma, þar á meðal við krabbameini. Það hefur reynst auka frumudrepandi áhrif krabbameinslyfja og þá aðallega með því að framkalla sjálfstýrðan frumudauða í fjöllyfjaónæmum krabbameinsfrumum. Markmið rannsóknarverkefnisins er að athuga áhrif kúrkúmíns á æxlisfrumur í rækt með eða án frumudeyðandi krabbameinslyfja á valdar frumulínur og frumur úr sjúklingum. Gerð verður grein fyrir ýmsum eiginleikum kúrkúmíns sem og rannsóknarvinnu á áhrifum þess til aukningar á næmi krabbameinsfrumna í rækt fyrir frumudeyðandi lyfjum.

Efniviður og aðferðir Notast var við tvær andrógen óháðar frumulínur úr blöðruhálskirtilsæxli, DU-145 og PC-3, auk ferskra eggjastokkaæxlisfrumna úr sjúklingi. Kúrkúmín var fengið frá Sigma og hefðbundin krabbameinslyf ásamt vökvásýni úr langt gengnu eggjastokkakrabbameini voru fengin frá Landspítala háskólasjúkrahúsi. Frumum var sáð á flata 96 holu bakka og baðaðar með mismunandi styrkjum kúrkúmíns með eða án mismunandi styrkja krabbameinslyfja. Að ákveðnum tíma liðnum var lífvænleiki frumna mældur í birtumæli sem byggir á efnahvarfi lúsiferín-lúsiferasa við ATP og sýnir nákvæmt ATP innihald frumna á tilteknum tímapunkti.

Niðurstöður Greinilegt er að kúrkúmín til viðbótar krabbameinslyfjum dragi úr lífvænleika frumulína og krabbameinsfrumna úr sjúklingi og auki þar með lyfjanæmi æxlisfrumna. Niðurstöðurnar staðfesta því niðurstöður fyrri rannsókna og sýna jafnframt fram á áhrif kúrkúmíns til aukningar lyfjanæmis eggjastokkaæxlisfrumna úr sjúklingi í rækt fyrir frumudeyðandi lyfjum.

Umræða og ályktanir Talið er að krabbameinsfrumur komi sér framhjá varnakerfi líkamans með því að hafa áhrif á margvíslegar boðleiðir sem gera þeim kleyft að lifa af. Þær ávinna sér þar að auki ónæmi gegn frumudeyðandi efnum og fjöllyfjaónæmar krabbameinsfrumur eru vandamál í almennri lyfjameðferð. Erfitt er að finna lyf sem hefur áhrif á fjölbreytt boðferli og er á sama tíma lyfjafræðilega öruggt og hefur engu náttúrulegu efni verið lýst sem hefur áhrif á jafnmargar og fjölbreytilegar boðleiðir og kúrkúmín. Eiginleikar þess, þá sérstaklega krabbameinshamlandi eiginleikar, eru því áhugaverðir til frekari rannsókna.

Listi yfir skammstafanir

AP-1 = Activator protein-1

ATP = Adenosine triphosphate

Bcl-2 = B-cell lymphoma 2

Bcl-xL = B-cell lymphoma-extra large

C_{\max} = Maximum concentration

CAM = Complete Assay Medium

COX-2 = Cyclooxygenase-2

CO₂ = Carbon Dioxide

CYP3A = Cytochrome P450 3a

DMSO = Dimethylsulfoxide

DNA = Deoxyribonucleic acid

EGF = Endothelial Growth Factor

EGFR = Epithelial growth factor receptor

EGCG = Epigallocatechin gallate

ELAM = Endothelial Leukocyte Adhesion Molecules

FBS = Fetal Bovine Serum

IKK = I κ B kinase

IL-1/IL-6 = Interleukin-1/Interleukin-6

iNOS = inducible Nitric Oxide Synthase

ICAM = Intercellular Adhesion Molecules

JNK = jun-N-terminal Kinase

LOX = Lipoxygenase

MAPK = Mitogen Activated Protein Kinase

MMP = Matrix Metalloproteinase

mTOR = Mammalian target of rapamycin

NF κ B = Nuclear factor kappa B

PBS = Phosphate Buffer Saline

PSA = Prostate Specific Antigen

PKB = Protein Kinase B (Akt)

RNA = Ribonucleic acid

RPMI = Roswell Park Memorial Institute

SLN = Solid Lipid Nanoparticle

STAT = Signal Transducers and Activators of Transcription

TCER = Tumor Cell Extraction Reagent

TNF- α = Tumor Necrosis Factor alpha VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

Inngangur

Kúrkúmín er náttúrulefni sem býr yfir einstökum eiginleikum sem nýst geta við meðferð langvinnra sjúkdóma, meðal annars krabbameins. Það hefur eitt og sér hamlandi áhrif á frumuskiptingu og útbreiðslu krabbameinsfrumna og hefur reynst þar að auki auka frumudrepandi áhrif krabbameinslyfja, einkum á æxlisfrumur sem myndað hafa með sér áunnið lyfjaónæmi. Kúrkúmín hefur áhrif á fjölda sameindaskotmarka innan frumna og hefur til að mynda öflug hindrunaráhrif á umritunarþáttinn NFκB sem talinn er vera eins konar lifunarþáttur í krabbameinsfrumum og koma í veg fyrir að þær gangist undir sjálfstýrðan frumudauða. Þannig eykur kúrkúmín næmi krabbameinsfrumna fyrir frumudeyðandi lyfjum og knýr þær áfram í sjálfstýrðan frumudauða. Markmið rannsóknarverkefnisins er að skoða áhrif kúrkúmíns á æxlisfrumur í rækt, bæði frumulínur og frumur úr sjúklingum. Gerð verður grein fyrir rannsóknarvinnu á áhrifum kúrkúmíns samhliða krabbameinslyfjum á lífvænleika æxlisfrumna sem og ýmsum eiginleikum sem kúrkúmín býr yfir.

1.I. Kúrkúmín

1.I.1 Saga og uppruni:

Kúrkúmín er náttúrulegt efni sem unnið er úr jarðstönglum fjölæru kryddplöntunnar *Curcuma longa* (Gullinrót).¹ Plantan er af engifersætt og verður um 80-120 cm á hæð, ber útstæð lauf og tregtlaga gul blóm. Jarðstönglar hennar eiga sér langa sögu í fornri læknisfræðilegri hefð Indlands sem kennd er við Ayurveda. Þegar þeir eru soðnir, hreinsaðir og þurrkaðir gefa þeir frá sér gult efni sem kallast túrmerik og gefur karrý sinn gula lit og sérstaka bragð. Túrmerik er bæði notað sem litarefni og bragðefni í matvælagæð og hefur einnig lengi verið notað sem húsráð til lækninga í Austurlöndum, meðal annars gegn kviðverkjum, öndunarferasýkingum, magasárum, liðtognunum, gigt og ýmsum bólgusjúkdómum, lifrar- og gallsjúkdómum, kinnholubólgu og útvortis meðhöndlun á sárum (**Mynd 1**). Almenn inntaka túrmeriks á þessum svæðum er um 1,5 g á dag, sem samsvarar um 100 mg kúrkúmíns.² Kúrkúmín er helsti efniþáttur túrmeriks og læknisfræðilega mikilvægasti hluti gullinrótarplöntu og býr meðal annars yfir öflugum bólguhamlandi eiginleikum.³

Krónískir sjúkdómar:

Herslismein
Nýrnasjúkdómar
Parkinson's
Flogaveiki
Sykursýki
Kransæðasjúkdómar
Beinþynning
MS
Liðagigt
Lungnasjúkdómar
Krabbamein
Psoriasis
Alzheimer's
HIV eftirmyndun

Annað:

Liðbólga
Magasár
Blæðingar
Blóðleysi
Sár
Skordýrabít
Augnsýkingar
Gallsteinar
Kláði
Hálsbólga
Ennisholubólga
Hósti
Kvef



Bólgujúkdómar:

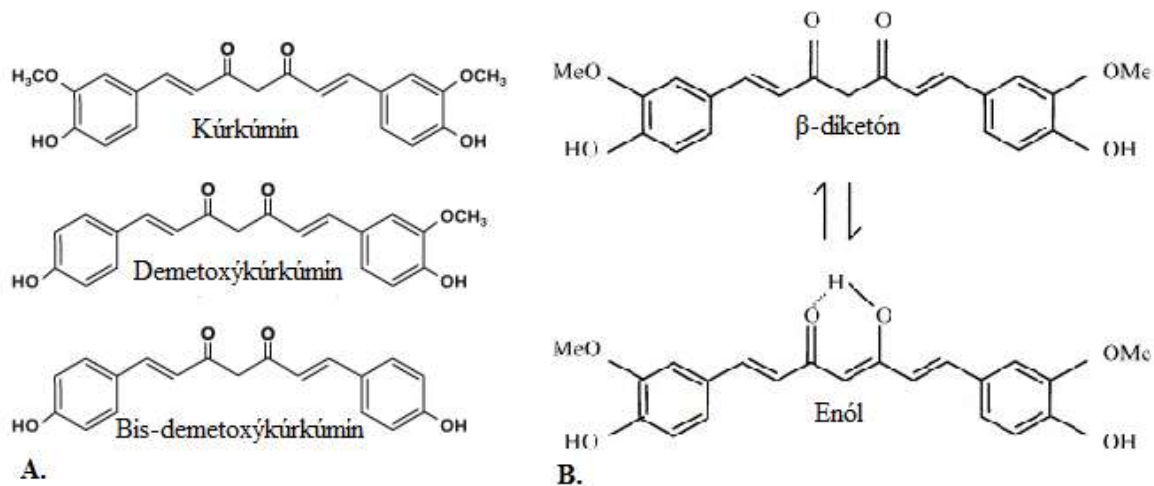
Brisbólga
Ofnæmi
Asthma
Hiti
Bólgujúkdómar í þörmum

Mynd 1. Dæmi um notkun kúrkúmíns í gegnum aldirnar og mögulega gagnsemi í ákveðnum sjúkdómum. Útbúin úr þremur yfirlitsgreinum.⁴⁻⁶

1.I.2 Efnafræðileg bygging og leysanleiki:

Kúrkúmín (1,7-bis-(4-hýdroxý-3-metoxýfenýl)-1,6-heptadíen-3,5-díón) er fjölfenól (e. polyphenol) samband sem er að finna í 2-5% af túrmeriki. Það var fyrst einangrað árið 1842 og sameindaformúlu þess, deferuloýlmetan, lýst árið 1910. Hún var svo staðfest árið 1913 þegar efnið var myndað í fyrsta sinn.³ Kúrkúmín hefur mólmassa 368,39 g/mól og bræðslumark er 183 °C. Það leysist illa upp í vatni en er betur leysanlegt í lífrænum leysi eins og etanóli, DMSO og aseton.¹

Auk kúrkúmíns inniheldur túrmerik aðrar gerðir kúrkúmínoíða; demetoxýkúrkúmín og bisdemetoxýkúrkúmín (**Mynd 2a**).⁷ Kúrkúmín er bis- α,β -ómettaður β -díketón og því hendir sameind sem til er á tveimur mismunandi formum; enól og β -díketón formi. Enól formið er stöðugra formið og ráðandi við basískar aðstæður, líklegast vegna H-tengis í miðju sameindarinnar (**Mynd 2b**). Það virkar sem rafeindagjafi og getur kúrkúmín sankað að sér sindurefnum (e. ROS scavenger) með því að losa þær til hvarfgjarnra súrefnisatóma.⁸ Bis-ketó formið er ráðandi í súrum og hlutlausum lausnum, við þær aðstæður sem kúrkúmín fer í gegnum frumhimnuna og brotnar kúrkúmín í 0,1 M fosfatbúffer við pH 7,2 og 37°C hratt niður í trans-6-(4'-hýdroxý-3'-metoxýfenýl)-2,4-díoxó-5-hexanal, ferúlik sýru, ferúóylmetan og vanillín. Það er hins vegar stöðugra og brotnar því hægar viður við súrar aðstæður eða í ræktunaræti sem inniheldur 10% kálfasermi, þar sem minna en 20% brotnar niður fyrsta klukkutímam.⁹



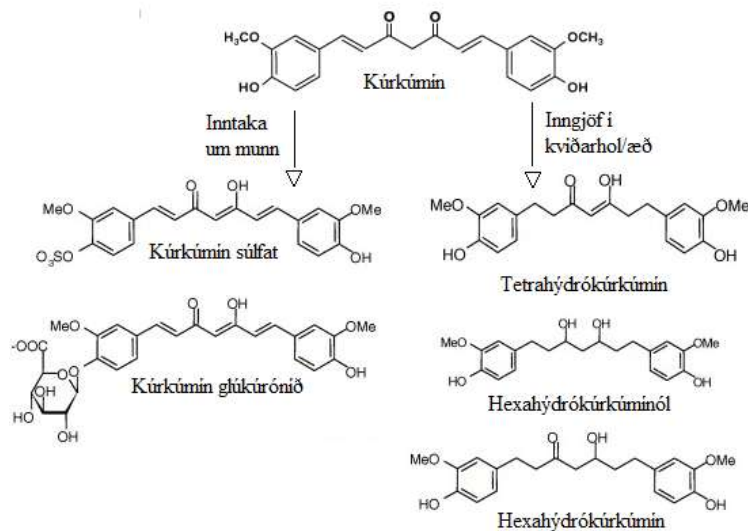
Mynd 2. A. Kúrkúmínóíðar í túrmerik. B. Mismunandi handhverfur kúrkúmíns (diferúoýlmetans)

1.I.3. Lífeðlisfræðilegir eiginleikar

Kúrkúmín hefur lítið aðgengi í líkamanum og sýna rannsóknir á frásogi kúrkúmíns, umbroti, dreifingu og útskilnaði fram á lélegt frásog, hratt umbrot og hraðan útskilnað úr líkamanum. Umbrot hefst strax í meltingarvegi með samtengingu við glúkúróníð og sulfat og halda skilvirk umbrot áfram við fyrstu umferð í lifur. Kúrkúmín er að mestu leyti samtengt glúkúróníð og sulfati í blóði (99%). Við inngjöf í kviðarhol eða bláæð afoxast kúrkúmín í tetrahýdrókúrkúmín, hexahýdrókúrkúmín og oktahýdrókúrkúmín (hexahýdrókúrkúmínól).

Mynd 3 sýnir helstu umbrotsefni kúrkúmíns.¹⁰ Flestar rannsóknir benda til minni virkni umbrotsefna kúrkúmíns og sýndu glúkúróníð samtengingar umbrotsefna minni vaxtarhamlandi áhrif.¹¹ Þó er líklegt að tetrahýdrókúrkúmín orsaki andoxunareiginleikar kúrkúmíns.¹² Fyrsta rannsókn á lyfjahvörfum kúrkúmíns var gerð í rottum árið 1978 þar sem 75% efnisins var skilið út með saur. Kúrkúmín fluttist gegn styrkhalla í gall við inngjöf í æð og brotnaði að mestu leyti niður innan 30 mínútna en sýndi aukinn blóðstyrk við inngjöf í kviðarhol.¹³ Blóðstyrkur virðist ekki breytast mikið þó skammtur sé aukinn og fannst einungis nanómólar styrkur í blóði þó skammtur hafi verið 50-faldaður.¹⁴ Sama á við um frásog, sem hélst óháð skammti milli 60-66% og héldust hlutföll umbrotsefna í vefjum auk þess tiltölulega stöðug.¹⁵ Aðgengi kúrkúmíns er þar að auki misjafnt milli manna og nagdýra þar sem hámarksblóðstyrkur í músum eftir inntöku 2 g/kg varð 3.67 μ M en eftir sambærilegan skammt í mönnum einungis 16.3 nM.¹⁶ Klínískar rannsóknir á aðgengi kúrkúmíns benda til þess að kúrkúmín nái mestum styrk innan meltingarvegar og hafa góðar klínískar niðurstöður fengist

hjá sjúklingum með ristilkrabbamein þar sem hámarksstyrkur í smáþörmum varð 300 nmól/g við inngjöf í kviðarhol.¹¹ Niðurstöður rannsókna á sjúklingum með ristilkrabbamein benda til að 3,6 g dagleg neysla kúrkúmíns nái mælanlegri þéttni í ristilvef og hafi lyfjafræðileg áhrif. Efnið dreifist þó lítið til annarra vefja og einungis nanómólar styrkir efnisins fundust í meinvarpandi ristilkrabbameinsfrumum í lifrarvef.¹⁷



Mynd 3. Helstu umbrotsefni kúrkúmíns

1.I.4. Eituráhrif og rannsóknir í dýramódelum og einstaklingum

Kúrkúmin er almennt talið öruggt í notkun og hefur verið samþykkt af Lyfja- og Matvælaeftirlitsstofnun Bandaríkjanna (Food and Drug Administration) sem GRAS efni (Generally Regarded As Safe). Rannsóknir á dýramódelum og í mönnum sýna kúrkúmin vera laust við eituráhrif og mjög öruggt jafnvel í háum skömmtum og er kúrkúmin notað sem fæðubótarefni í þónokkrum löndum.^{18,19} Sjúklingar sem neyttu 1,2-2,1 g kúrkúmíns daglega í 2-6 vikur fundu ekki fyrir neinum aukaverkunum og gegndi sömu um sjúklinga með illkynja breytingar eða krabbamein sem neyttu daglega allt upp í 8 g í þrjá mánuði.^{20,21} Þær aukaverkanir sem fundist hafa í nagdýrum eru magasár, en rottur mynduðu með sér magasár við kúrkúmin neyslu, þó það var ekki staðfest í öðrum rannsóknum.²² Aðrar aukaverkanir eru niðurgangur og ógleði auk þess sem hækkun fannst á alkalískum fosfatasa og laktat dehydrógenasa.²³ Kúrkúmin hindraði bæði virkni og tjáningu P-glykópróteins og CYP3A í rottum og getur því haft áhrif á hvarfefni þessara ensíma, svo sem celiprólól og mídazólam.²⁴ Þar að auki hindraði kúrkúmin samloðun blóðflagna utan líkamans og gæti því aukið

blæðingarhættu samhliða inntöku segavarnarlyfja.²⁵ Auk kúrkúmíns innihalda sum fæðubótarefni píperín sem eykur lífaðgengi og dregur úr útskilnaðarhraða kúrkúmíns. Píperín getur þó haft sömu áhrif á lyf sem tekin eru samhliða, þar á meðal própánólól og theóphyllín.²⁶ Klínískar rannsóknir á eiginleikum kúrkúmíns eru enn á byrjunarstigum og er áhersla nú að færast yfir á eiginleika kúrkúmíns við ákveðnum sjúkdómum svo sem illkynja mergæxli, ristilkrabbamein og bólgumiðlaðir sjúkdómar líkt og psoriasis og Alzheimer's.³

1.I.5. Kúrkúmín afleiður og ýmsar betrubætingar

Ýmsar hliðstæður kúrkúmíns hafa verið útbúnar til að bæta frásog og líffræðilega virkni innan líkamans og sýna þær áhrifaríkustu fram á 30-falt meiri hömlun á æxlisvöxt án skaðlegra áhrifa innan líkamans.²⁷ Ein sú áhrifaríkasta, EF-24, jók aðgengi í nagdýrum um 60% eftir inntöku og hafði aukin krabbameinshamlandi áhrif innan líkamans (e. in vivo) sem og utan líkamans (e. in vitro) án þess að skaðleg áhrif voru merkjanleg.²⁸ Piperine, plöntubasi sem gefur rammleikann í svörtum pipar og þekktur hindri glúkuronýleringar í lifur, hefur verið gefið samhliða kúrkúmíni til að auka lífaðgengi þess og jók samhliða inntaka bæði styrk kúrkúmíns og helmingunartíma í blóði. Aðgengi jókst um 154% í nagdýrum en um 2000% í mönnum (20 mg samhliða 2 g kúrkúmíns) án merkjanlegra aukaverkana.²⁹ Önnur efni svo sem genistein sem finnst í soja baunum og epigallocatechin-3-gallate (EGCG) sem er að finna í grænu tei hafa einnig reynst auka krabbameinshamlandi áhrif til viðbótar kúrkúmíni.^{30,31} Kúrkúmín getur þar að auki bundist ýmsum málum vegna fenól hópa sameindarinnar sem eykur aðgengi miðað við frítt kúrkúmín.³²

Vaxandi notkun nanótækni innan heilbrigðisgeirans hefur leitt til nýrra möguleika í lyfjapróun en með nanóögnum er hægt að auka vatnsleysni torleysanlegra fitusækinna lyfja, helmingunartíma í blóði og minnka niðurbrot innan líkamans.³³ Með inngreypingu kúrkúmíns í nanóagnir eykst stöðugleiki í blóði og aðgengi að krabbameinsfrumnum.³⁴ Sýklódextrín eru náttúrulegir hringlaga fásykrungar með vatnssækið ytra yfirborð en vatnsfælið holrúm í miðju sameindarinnar. Þeir geta því myndað vatnsleysanlegar fléttur með torleysanlegum efnum og auka vatnsleysni kúrkúmíns meira en 10.000 falt. Þar að auki minnkaði ljósniðurbrotshraði kúrkúmíns við alkalískar aðstæður og stöðugleiki jókst samanborið við kúrkúmín í lífrænum leysi.³⁵ Vaxandi áhugi er fyrir notkun nanótækni í flutningi kúrkúmíns en rannsóknir enn á byrjunarstigi og framþróunar má því vænta á næstu árum.¹⁰

Lípósóm eru góðar flutningsferjur fyrir torleysanleg lyf þar sem hægt er að innlima bæði vatnssæknar og fitusæknar sameindir auk þess sem þau takmarka eiturverkandi áhrif

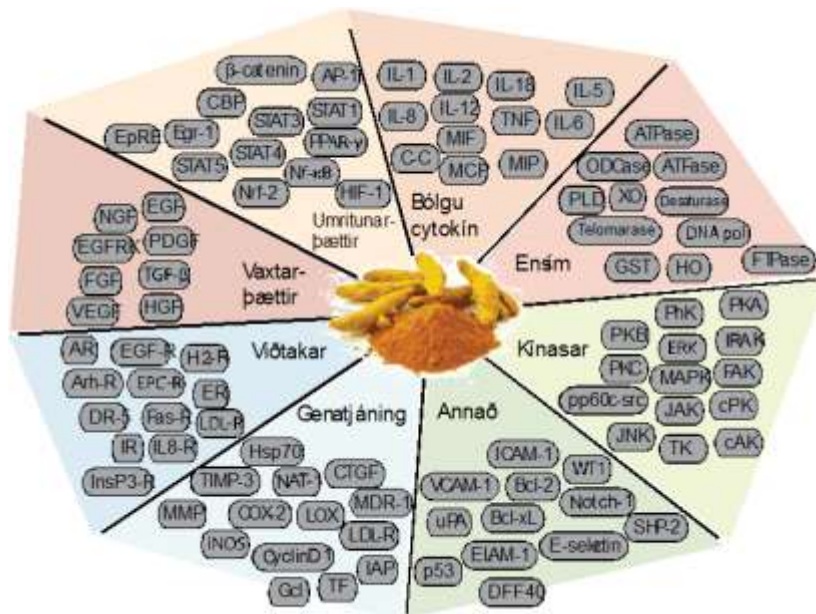
sumra lyfja án þess að skerða virkni þeirra.³⁶ Þó enn eigi eftir að staðfesta aukna virkni kúrkúmíns flutt með lípósómum reyndist það bæla niður krabbameinsvöxt í brisi og hamla nýæðamyndun.³⁷ Kúrkúmín og resveratról flutt með lípósómum hafði greinileg vaxtarhamlandi áhrif á blöðruhálskirtilsæxlisfrumur auk þess sem það örvaði sjálfstýrðan frumudauða.³⁸

Fitukirni og fosfólípíð samsetningar hafa reynst auka frásog náttúrulegra lyfja og því auka blóðstyrk og draga úr umbrotshraða.¹⁰ Við flutning með fitukirnum og fosfólípíðum jókst frásog kúrkúmíns um 9% utan líkama (e. in vitro) og helmingunartími lengdist um 60-falt miðað við kúrkúmín í lífrænum leysi.³⁹ Rannsóknir hafa sýnt fram á aukna vatnsleysni og aðgengi kúrkúmíns með fosfólípíðum í rottum.⁴⁰

1.I.6. Eiginleikar, sameindaskotmörk og æxlisamlandi áhrif

Þó meðferðareiginleikar kúrkúmíns hafi þekkt í Suður-Asíu í þúsundir ára er ekki svo langt síðan að margþættir eiginleikar þess fóru að vekja athygli á Vesturlöndum. Árið 1949 var sýnt fram á bakteríudrepandi eiginleika kúrkúmíns og árið 1995 tókst að sýna fram á bælandi áhrif á bólguhvetjandi umritunarþáttinn NFκB, sem gegnir lykilhlutverki í bólgusvörun.⁴¹ Á síðastliðnum árum hefur áhuginn aukist hratt og vaxandi og árið 2011 var búið að birta 4000 greinar um fjölmarga eiginleika þess sem gagnast við ýmsum sjúkdómum. Meðal helstu eiginleika má nefna andoxunar-, bólgusamlandi- og krabbameinshamlandi eiginleika auk þess sem sýnt hefur verið fram á örverusamlandi virkni, verndandi áhrif á lifur, í meltingarfærasjúkdómum, taugahrönnunarsjúkdómum og hjarta- og æðasjúkdómum.^{42,43}

Í dag er vitað að sjúkdómar orsakist af óreglu í genastjórnun og er talið að um 300-500 mismunandi gen stjórni hverjum og einum krónískum sjúkdómi. Rannsóknir hafa því beinst að þróunum lyfjaskotmarka á einstaka sameindir innan frumu, meðal annars Tumor necrosis factor (TNF), Cyclooxygenasi-2 (COX-2), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) og Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR).⁴⁴ Margþættir eiginleikar kúrkúmíns stafa af fjölda sameindaskotmarka innan frumu þar sem kúrkúmín binst allt að 33 mismunandi próteinum auk þess að bindast og hindra virkni ýmissa umritunarþátta, vaxtarþátta, cytokína, kínasa og annarra ensíma (**Mynd 4**).⁶ Kúrkúmín hindrar meðal annars virkjun umritunarþátta eins og Nuclear Factor kappa B (NF-κB), Activator Protein 1 (AP-1), Prótein kínasa B (Akt) og Signal Transducer Activator of Transcription (STAT) prótein sem eru mikilvægir í stjórnun genatjáningar sem stuðlar að æxlismyndun, bólguviðbrögðum, frumulifun, frumuútbreiðslu, íferð og nýæðamyndun.⁴⁵



Mynd 4. Helstu sameindaskotmörk kúrkúmíns. Byggð á mynd úr yfirlitsgrein Aggarwals.⁶

1.1.6.1. Hemill á bólguviðbrögð

Fjöldmargir langvinnir sjúkdómar orsakast af ójafnvægi í stjórnun á bólguviðbrögðum og hefur verið sýnt fram á að bólguástand gegni lykilhlutverki í krabbameinsmyndun.⁴⁶ Kúrkúmín hefur reynst búa yfir öflugum bólguhamlandi áhrifum og hindrar fjölmörg sameindaskotmörk sem miðla og taka þátt í bólguvörðun, svo sem NFκB og TNF-α. Umritunarþátturinn NFκB er yfirtjáður í fjölmörgum krabbameinsgerðum og virkjast m.a. af TNF-α og ýmsum frumuáreitum svo sem bakteríuafurðum, útfjólubláum geislum, ofnæmisvökum í umhverfi, tóbaksreyk, flestum bólgucytokínunum og öðrum sjúkdómsvaldandi þáttum.^{47,48} Við eðlilegar aðstæður er NFκB á óvirkjuðu formi í umfrymi tengdur hindrunarþættinum I-kappa B kínasa (IκB). Við virkjun brotnar hindrunarþátturinn niður og NF-κB flyst í kjarna þar sem það stýrir umritun yfir 200 gena sem taka þátt í frumuskiptingu, íferð, meinvörpum, lyfjaónæmi og bólgu. Flestum bólgumiðlurum er stýrt af NFκB og hefur því umritunarþátturinn og umritunargen verið tengd við flesta langvinna sjúkdóma.⁴⁹ Kúrkúmín hindrar virkjun NF-κB í bólguástandi með því að hindra niðurbrot IκB kínasa og dregur þannig úr tjáningu ýmissa NFκB umritunarstýrðra genamyndefna. Má þar nefna mikilvæga þætti í æxlisþróun svo sem B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Matrix metallópróteinasa-2 og Matrix metallópróteinasa-9 (MMP-2, MMP-9), TNF, cyclin D1, COX-2, inducible Nitric oxide synthasa (iNOS) og viðloðunarsameindir. Þar með dregur kúrkúmín úr frumuskiptingu, íferð og nýáðamyndun, stöðvar frumuhring og kallar fram sjálfstýrðan

frumudauða í æxlisfrumum.⁵⁰ Kúrkúmín hindrar ummyndun arakídón sýru (e. arachidonic acid) og dregur þar með úr tjáningu lipoxygenasa (LOX), COX-2 og nýmyndun prostaglandína.⁵¹

Meðal annarra bólgumiðlara sem kúrkúmín hefur áhrif á má nefna AP-1 og STAT-3 en stöðug virkjun þessara þátta hefur verið staðfest í ýmsum gerðum krabbameina.^{52,53} STAT-3 virkjast af IL-6 og örvar umritun próteina sem hamla sjálfstýrðum frumudauða og örva nýæðamyndun.⁵² Umritunarþátturinn AP-1 umritar gen sem stýra tjáningu ýmissa þátta sem tengjast ummyndun æxlisfrumna og framvindu. Hann er virkjaður af c-jun N-terminal kínasa (JNK) sem er einn af Mitogen-Activated Prótein Kínösum (MAPK) sem gegna mikilvægu hlutverki í frumuboðum. Kúrkúmín hindrar virkjun JNK vegna krabbameinsörvandi þátta og þar með AP-1.⁵⁴

1.1.6.2. Andoxunareiginleikar

Þónokkrar rannsóknir hafa sýnt fram á öfluga andoxunarvirkni kúrkúmíns. Kúrkúmín hindrar ensím sem mynda hvarfgjarnar súrefnissameindir (e. reactive oxygen species) og sankar einnig að sér slíkum sameindum.⁴⁵ Kúrkúmín eykur þar að auki virkni heme-oxygenasa-1 (HO-1) og verndar frumur, lípíð, hemóglóbín og kjarnsýrur fyrir oxunarskemmdum, en oxun lípíða er talið vera lykilskref við upphaf og framþróun ýmissa sjúkdóma.⁵⁵ Rannsóknir benda þó einnig til að kúrkúmín auki myndun hvarfgjarnra súrefnisatóma og knúi þannig fram sjálfstýrðan frumudauða.⁵⁶

1.1.6.3. Áhrif á sjálfstýrðan frumudauða

Sjálfstýrður frumudauði orsakast af lífeðlisfræðilegu áreiti og er nauðsynlegt ferli til að viðhalda frumujafnvægi. Þegar frumur ná ekki að ákveðnum stöðum frumuhingsins svo sem að mörkum G₁/S eða G₂/M fara viss boðferli af stað; umfrymið skreppur saman, frumukjarni þéttist, DNA tvístrast í sundur og fruman deyr.⁵⁷ Stjórnlaus frumufjölgun telst vera hámark illkynjanleika og geta gallar í sjálfstýrðum frumudauða átt sinn þátt í meinmyndun fjölbrigðilegra sjúkdóma, svo sem veirusýkinga, krabbameins og sjálfsofnæmissjúkdóma.⁵⁸ Stökkbreyttar frumur geta myndað með sér þol gegn sjálfstýrðum frumudauða með því að hindra þætti sem örva sjálfstýrðan frumudauða en auka tjáningu þátta sem hemja sjálfstýrðan frumudauða og þannig leiðir áframhaldandi fjölgun að lokum til æxlismyndunar.⁵⁹ Kúrkúmín hefur gagnstæð áhrif og bælir niður tjáningu hindrunarpróteina en eykur tjáningu próteina sem

örva sjálfstýrðan frumudauða. Að auki hindrar kúrkúmín sívirkjun NFκB og PI3K/AKT/mTOR boðleiðina, en yfirtjáning á þessum þáttum dregur úr sjálfstýrðum frumudauða.⁶⁰ Aðrar rannsóknir sýna þó að kúrkúmín komi í veg fyrir sjálfstýrðan frumudauða og þar sem það hindraði sjálfstýrðan frumudauða framkallaðan af nokkrum krabbameinslyfjum í brjóstakrabbameinsfrumulínum. Þó óvíst sé að inntaka kúrkúmíns næði nógu háum styrk í brjóstavef innan líkamans til að hamla áhrifum krabbameinslyfja er konum sem gangast undir lyfjameðferð við brjóstakrabbameini ráðlagt að forðast fæðubótarefni sem innihalda kúrkúmín.⁶¹

1.1.6.4. Vaxtarhamlandi áhrif

Vaxtarþættir og viðtakar eru nauðsynlegir fyrir eðlilegan frumuvöxt og skiptingu en óheft tjáning getur þó leitt til illkynja breytinga.⁶² Viðtaki vaxtarþáttar þekjufrumna (e. Endothelial growth factor receptor virkjast aðallega við tengingu bindils og fer þá keðjuverkun boðferla af stað.⁶³ Ýmsar gerðir krabbameinsfrumna sýna óhefta virkni EGFR boðleiðarinnar hefur sést hjá ýmsum gerðum krabbameinsfrumna og spilar hún sérstaklega mikilvægt hlutverk í frumufjölgun, úbtreiðslu, lifun, nýæðamyndun og íferð.⁶⁴ Með því að stilla af tjáningu og virkni ýmissa vaxtarþátta hindrar kúrkúmín frumufjölgun, frumuíferð og nýæðamyndun. Kúrkúmín bælir einnig niður tjáningu viðloðunarsameinda á frumuyfirborði sem gegna mikilvægu hlutverki í meinvörpun, svo sem Intercellular Adhesion Molecule I (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule I (VCAM-1) og Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule I (ELAM).⁶⁵ Kúrkúmín bælir þar að auki niður tjáningu cyclin D-1, sem yfirtjáður er í ýmsum krabbameinsfrumum, en cyclin D-1 er hraðatakmarkandi þáttur í G₁ fasa frumuhringins og nauðsynlegur til að frumur flytjist í G₁ yfir í S fasa.⁶⁶

1.1.6.5. Áhrif á nýæðamyndun og ífarandi æxlisvöxt

Nýæðamyndun er talin vera mikilvægt skref í æxlisvexti og meinvörpun. Kúrkúmín hefur bein hamlandi áhrif á nýæðamyndun með því að draga úr tjáningu Matrix metallópróteínasa (MMP) sem eru zink-háðir endopeptíðasar og eru yfirtjáðir í ýmsum krabbameinsfrumum þar sem þeir brjóta niður víska þætti utanfrumuefnis og taka þátt í íferð, nýæðamyndun og

meinvörpun æxlisfrumna.⁶⁷ Þar að auki dregur kúrkúmín úr tjáningu ýmissa vaxtarþátta sem örva nýæðamyndun, svo sem VEGF, fibroblast growth factor og EGF.⁶⁸

1.1.6.6. Kúrkúmín og ýmsir sjúkdómar

Þó krabbameinshamlandi áhrif kúrkúmíns séu hvað mest rannsökuð býr kúrkúmín yfir ýmsum eiginleikum sem nýtast við meðhöndlun annarra sjúkdóma. Túrmerik er sérstaklega þekkt fyrir sáragræðandi eiginleika og bæði dró úr sármyndun slímhúðar og hraðaði á sárgræðslu í músamódelum.^{69,70} Kúrkúmín hefur verndandi áhrif á meltingarkerfið og hindraði myndun magasára vegna álags, alkóhóls og bólgueyðandi verkjalyfja með því að styrkja slímþekju magaveggjarins.⁷¹ Kúrkúmín dró einnig úr lifrarskemmdum af völdum alkóhóls, kólesteról gallsteinamyndun og hafði verndandi áhrif gegn brisbólgu.⁷² Kúrkúmín lækkar kólesteról og þríglýseríð styrk í blóði og hefur því verndandi áhrif á hjarta- og æðakerfið. Það hindrar einnig samloðun blóðflagna og varnar segamyndun með því að örva prostacyclin myndun en hindra thromboxane myndun.⁷³ Kúrkúmín hefur reynst draga úr liðbólgu samfara barksterum hjá sjúklingum með iktsýki og minnka morgunstífleika.²⁰ Kúrkúmín hindrar eftirmyndun HIV veiru í gegnum hindrun á HIV-1 og HIV-2 próteasa.⁷⁴ Einnig reynist kúrkúmín draga úr einkennum MS bólgusjúkdóms í taugakerfi og myndun beta-amyloid (A β) próteina og skella í Alzheimer's sjúkdómi.⁷⁵

1.1.6.7. Krabbameinshamlandi áhrif

Kúrkúmín hefur reynst hindra framgang og lifun flestra gerða krabbameinsfrumna í rannsóknum utan líkamans (e. in vitro) og hefur áhrif á öll stig krabbameinsmyndunar, þar með talið ummyndun og upphaf, eflingu og framvindu auk íferðar, nýæðamyndunar og meinvarpamyndunar. Krabbameinshamlandi áhrif kúrkúmíns eru m.a. vegna beinna andoxunaráhrifa og getu til að sankna að sér sindurefnum. Þar að auki eykur kúrkúmín óbeint glutathione magn og flýtir fyrir afeitrun í lifur. Kúrkúmín dregur einnig úr bólguviðbrögðum og frumuskiptingum, hefur sáragræðandi og sársaukahamlandi eiginleika auk þess að hafa áhrif á ýmsa umritunarþætti, ensím, prótein kínasa, frumulifunarprótein, viðloðunarsameindir, vaxtarþætti, frumuhingsstýriprótein, chemokine, DNA, RNA og málmjónir svo eitthvað sé nefnt.¹ Krabbameinshamlandi áhrif kúrkúmíns sáust greinilega í magakrabbameinsfrumum og frumufjölgun minnkaði enn frekar þegar kúrkúmín var gefið til viðbótar 5-flúoróúracíl miðað við 5-flúoróúracíl eitt og sér.⁷⁶ Rannsóknir í dýramódelum hafa einnig sýnt fram á æxlishemjandi áhrif kúrkúmíns.¹ Þar sem notast var við frumulínur úr

blöðruhálskirtilskrabbameini auk æxlisfrumna úr krabbameini í eggjastokkum sjúklings við rannsóknarverkefnið er vert að fara nokkrum orðum um áhrif kúrkúmíns á þær gerðir krabbameins.



Mynd 5. Kúrkúmín hefur hamlandi áhrif á ýmsar gerðir krabbameina.

1.1.6.7.1. Krabbamein í blöðruhálskirtli

Blöðruhálskrabbamein er algengasta krabbameinið hjá karlmönnum í vestrænum ríkjum og önnur algengasta dánarorsök krabbameins í karlmönnum, næst á eftir lungnakrabbameini.⁷⁷ Aldurstöðluð nýgengi sjúkdómsins er mjög breytileg á milli heimshluta og er einna lægst í ýmsum Asíulöndum, þar sem árlega greinast innan við 10 tilfelli á 100.000 íbúa, en hæst á Vesturlöndum. Hér á landi greinast um 100 tilfelli miðað við 100.000 íbúa, en nýgengi er ennþá hærri á meðal svarta Ameríkana í Norður-Ameríku, þar sambærileg tala er 137 tilfelli. Meðalaldur sjúklunga við greiningu er um 71 ár hér á landi og eru 85% þeirra sem greinast eldri en 65 ára.⁷⁸ Orsök blöðruhálskirtilskrabbameins er að mestu leyti óljós en erfðir, aldur og sérstaklega umhverfisþættir eru taldir veigamestu áhættuþættirnir og má í því sambandi benda á að áhætta á krabbameinsmyndun eykst þegar Asíubúar flytja til N-Ameríku.⁷⁷ Meðferð og horfur fara að miklu leyti eftir stigi sjúkdómsins. Geislameðferð og skurðaðgerð gagnast vel við staðbundnu blöðruhálskirtilmeini en þessum meðferðum fylgja þó gjarnan aukaverkanir eins og þvagleki og getuleysi.⁷⁹ Krabbameinsfrumur eru gjarnan afar næmar fyrir karlhormóninu testósteróni og hefur hormónabælandi meðferð (androgen deprivation therapy) til viðbótar geislameðferð bætt horfur karlmannna með staðbundið krabbamein á háu stigi.⁸⁰

Þegar hormónabælandi meðferð skilar ekki tilætluðum árangri er gjarnan notast við ýmis krabbameinslyf. Yfirleitt svarar sjúkdómurinn lyfjameðferð með hamlandi áhrifum gegnum andrógen viðtakann vel í byrjun og virðist andrógen vera lifunarþáttur í krabbameinsvextinum. Við langtíma lyfjameðferð ávinnur sjúkdómurinn sér þó oftast mótstöðu gegn meðferðinni, til dæmis með stökkbreytingum í andrógen viðtakanum og þurfa þá æxlisfrumurnar ekki lengur á andrógenum að halda til að vaxa.⁸¹ Viðnámsmyndunin hefur verið tengd ýmsum umritunarþáttum sem virkjast m.a. af NFκB. Kúrúúmín hefur áhrif á frumuvöxt, boðleiðslu og umbreytingu andrógen háðruma (LNCaP) og androgen óháðruma frumulína með því að bæla niður virkjunarþætti og getur einnig verkað sem antagónisti á andrógen viðtakann. Meðal skotmarka kúrúúmins í blöðruhálskirtilsæxlismyndun eru yfirtjáning á lifunarpróteinum eins og Bcl-2, Bcl-xL og survivin, boð frá andrógen viðtakanum, EGFR, VEGF, IL-6, PSA, Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2), Cyclin D1, MMP-2, MMP-9, COX-2 og hindrun PI3K/Akt/mTOR boðleiðarinnar.⁸² Andrógen eru nauðsynleg fyrir eðlilegan vöxt og þroska blöðruhálskirtils en eru einnig talin vera mikilvægur þáttur í krabbameinsmyndun, bæði í upphafi og framvindu. Rannsókn auk þess sem rannsóknir sýna að andrógen viðtakinn geti virkjast í fjarveru andrógens af víxlverkun hjálparþátta svo sem AP-1 og NF-κB. Þónokkrar hliðstæður af kúrúúmini hafa verið útbúnar sem möguleg mótlyf andrógen viðtakans og sýndu fram á allt að 50-föld hindrunaráhrif á frumuvöxt andrógen háðra og óháðara krabbameinsfrumna.⁸³

1.1.6.7.2. Krabbamein í eggjastokkum

Krabbamein í eggjastokkum er eitt af algengustu krabbameinum meðal kvenna.⁷⁷ Þó ákveðnir þættir auka og draga úr líkum á krabbameinsmyndun eru orsakir að mestu leyti óljósar. Fjöldi egglosa er talinn vera mikilvægur þáttur og eru konur sem aldrei hafa orðið ófrískar í meiri áhættu. Konur sem hafa eignast mörg börn og konur sem hafa notað getnaðarvarnarpillur í langan tíma eru aftur á móti í minni áhættu. Erfðafræðilegir þættir skipta einnig máli og eru ákveðnar genabreytingar sameiginlegar með eggjastokkakrabbameini og brjóstakrabbameini og því samhengi þar á milli. Tíðni eggjastokkakrabbameins er einnig breytileg eftir landsvæðum. Það er algengt á Norðurlöndum, Póllandi og Bretlandi en hins vegar sjaldgæf í Afríku, Kína og Japan. Eggjastokkakrabbamein geta verið einkennalaus mjög lengi þar sem eggjastokkarnir eru lítil líffæri í kviðarholi og geta því æxlin vaxið talsvert áður en þau fara að þrýsta á aðlæg líffæri.⁸⁴ Þrátt fyrir framfarir og aukið framboð lyfjameðferða hafa lífslíkur ekki batnað í gegnum árin og er eggjastokkakrabbamein enn ein algengasta dánarorsök

illkynja kvensjúkdóma.⁸⁵ Fyrsti meðferðarkostur er lyfjameðferð með cisplatín eða karbóplatín auk taxana og skurðaðgerð og gefur jákvæða æxlissvörun hjá 70-80% sjúklinga. Hins vegar tekur krabbameinið sig upp aftur hjá flestum sjúklingum og eru fimm ára lífslíkur eftir endurkomu æxlisfrumna einungis 20-30% þar sem cisplatin-ónæmi er ein helsta dánarorsökin.⁸⁶ Umritunarpátturinn NF-κB er talinn segja til um framþróun sjúkdómsins og veita viðnám gegn sjálfstýrðum frumudauða af völdum cisplatíns og paklítaxels og dróst bæði úr æxlisvexti og nýæðamyndun með því að bæla niður NF-κB virkni í músamódelum.⁸⁷ Engin ein hentug meðferð finnst við krabbameini sem tekur sig upp að nýju heldur er fjöldi mismunandi lyfjameðferða notaður og fer svörun eftir því hvort platínú ónæmi sé til staðar eða ekki. Kúrkúmín dró verulega úr frumuskiptingu og jók næmi æxlisfrumna í eggjastokkum með því að auka tjáningu kaspasa-3 en draga úr tjáningu NF-κB og þannig kalla fram sjálfstýrðan frumudauða.⁸⁸

II. Lyfjanæmisprófanir

II.1. Áunnið lyfjaónæmi krabbameinsfrumna

Lyfjameðferðir valda almennum eiturverkunum á líkamann og hafa ýmis konar óþægilegar aukaverkanir í för með sér, svosem ógleði og uppköst, hármíssi, sáramyndun, mergbælingu, slímhúðarbólgu ofl.⁸⁹ Við ákvörðun á lyfjameðferð sjúklings er notast við niðurstöður klínískra rannsókna og reynslu á virkni krabbameinslyfja en hið dæmigerða krabbameinslyf hefur virkni í 60% tilvika. Hin 40% sem ekki svara meðferð mega því þola aukaverkanir sem lyfjameðferðinni fylgja án þess að hún skili árangri. Upplýsingar um virkni krabbameinslyfja miðast við stórt úrtak sjúklinga og gefa ekki fullnægjandi vísbendingar um árangur lyfjameðferðar. Sjúklingar með sömu sjúkdómsgreiningu sýna oft mismunandi svörun við sömu lyfjameðferð auk þess sem breytileikinn getur verið innan sama æxlis vegna erfðafræðilegrar misleitni æxlisfrumna. Ekki er að fullu vitað hvers vegna lyfjameðferðir verða gjarnan óskilvirkari eftir því sem lengra líður á meðferðina. Upphaf og þroskun æxlisvaxtar er margþrepa ferli sem felur í sér breytingar á erfðaeftni og virðast æxlisfrumur öðlast hæfni til að laga sig að breyttu umhverfi. Til að komast hjá ónæmismyndun eru fleiri en eitt lyf gefin samtímis og hefur fjöllyfja meðferð, sem beinist að mismunandi sameindaskotmörkum innan frumunnar, sýnt bestan árangur í krabbameinsmeðferð. Fjöllyfja

ónæmi er þó eitt helsta vandamál lyfjameðferðar þar sem krabbameinsfrumur spretta upp að nýju með áunnið þol gegn fjöllyfja meðferð. Slík æxli eiga það til að meinvarpast og eru algeng dánarsorsök sjúklinga.⁹⁰ Ýmis efnaferli valda stökkbreytingum sem auka lyfjaónæmi með því að óvirkja lyf og brjóta niður, draga úr aðgengi þeirra eða örva útflæði. Yfirtjáning á P-glýkópróteini, útflæðisdælu sem veldur ATP-háðuri útstreymisverkun lyfja, heldur lyfjastyrki fyrir neðan drápsgildi og dregur þar að auki úr kaspasa-3 virkjun, sem gegnir lykilhlutverki í sjálfstýrðum frumudauða. Lyf og önnur efni, líkt og kúrkúmín, sem knúa fram sjálfstýrðan frumudauða óháðan kaspasa virkjun gætu því dregið úr fjöllyfja ónæmismyndun.⁹¹

Lyfjanæmisprófanir byggjast á þeirri hugmynd að meta lyfjanæmi æxlisfrumna og svörun við ákveðnum frumudeyðandi efnun áður en lyfjameðferð er hafin. Þó hugmyndin sé almennt viðurkennt hafa þróanir á slíkum prófum ýmsa tæknilega erfiðleika í för með sér. Við framkvæmd lyfjanæmisprófs þarf að taka sýni úr æxlinu og einangra æxlisfrumur. Til að líkja eftir aðstæðum innan líkamans eru frumurnar ræktaðar í viðeigandi æti í hitaskáp við 37 °C og 5% CO₂. Þá eru frumurnar settar á lyfjabakka í ákveðinn tíma með þeim lyfjum sem prófa skal. Hægt er að fylgjast með hvaða ferlar innan frumurnar virkjast og með hvaða hætti. Að ákveðnum tíma liðnum eru frumur í bakkanum taldar og áhrif krabbameinslyfja metin út frá hlutfallslegu frumudrápi. Þannig má sjá hvaða lyf sýna mestu frumudrepani áhrifin og í hvaða lyfjastyrk og útiloka í leiðinni þau lyf sem krabbameinsfrumur svara lítið eða ekkert. Með lyfjanæmisprófunum er hægt að segja til um með 90% öryggi hvaða lyf muni ekki gagnast í lyfjameðferð og þannig spara sjúklingi þær aukaverkanir sem meðferðinni fylgja.⁹² Rannsókn frá 2010 sýnir einnig að efnahagslegur ávinningur af innleiðingu lyfjanæmisprófa geti verið talsverður.⁹³ Í lyfjanæmisprófunum er bæði stuðst við frumulínur og frumur úr sjúklingum. Frumulínur vaxa yfirleitt mun hraðar en upprunalega æxlið og reynast því vel í lyfjanæmisprófunum. Hins vegar líkjast þær ekki lengur upprunalegu æxlisfrumunum og hafa önnur ræktunarskilyrði. Hraður vöxtur þeirra getur einnig valdið eitúráhrifum og því er hætt við að niðurstöður séu ekki í klínískt sambærilegar við lyfjanæmi æxlisfrumna í líkamanum. Krabbameinsfrumur vaxa oftast óháð hver annarri innan æxlisins en frumulínur verða aftur á móti háðar vaxtarþáttum og deyja gjarnan þegar sermisæti er fjarlægð. Frumulínur líkjast ekki stofnfrumum í æxlinu sem verða ónæmar fyrir krabbameinslyfjum og eru líklegar til að koma aftur þegar meðferð, sem hélt sjúkdómnum niðri um tíma, er lokið. Niðurstöður rannsókna með frumulínum eru því oft ekki í samræmi við klínískar niðurstöður og ekki fullnægjandi einar og sér til að meta áhrif lyfja í klínískum rannsóknum. Niðurstöður rannsókna á æxlisfrumum sem fengnar eru með sýnatöku úr æxlinu hafa hins vegar samsvarað betur

klínískum niðurstöðum en þegar erfitt er að nálgast æxlisvef geta frumulínur hins vegar verið eini kosturinn. Þær hafa því enn mikilvægt gildi, sérstaklega fyrir lyfjafyrirtæki og aðra sem eiga erfitt með að nálgast frumur úr sjúklingum.⁹⁴

II.2. ATP-ljósnaemismælingar

Í lyfjanæmisprófunum utan líkamans er aðallega notast við þrjár mismunandi TCA aðferðir (Tumor Chemosensitivity Assays). ATP-TCA, eða ATP-efnaljómunaraðferð, er næm og nákvæm aðferð til að mæla lífvænleika frumna og byggist á ljómunarmælingum sem eru í beinu samhengi við innanfrumu ATP magn. Þegar borið er saman við niðurstöður klínískra rannsókna er 57-83% nákvæmni á lyfjanæmi og yfir 90% nákvæmni á lyfjaviðnámi. Tæknilegar takmarkanir hafa þó fylgt aðferðunum og skortir framvirkar slembirannsóknir til að sýna fram á virkni og hagkvæmni í notkun slíkra prófa í sjúklingsmeðferð.

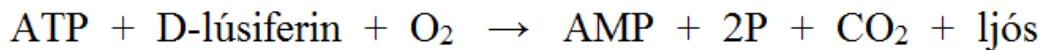
TCA-100 aðferðin, sem þróuð var af Peter Andreotti og Ian Cree, byggist á ræktun æxlisfrumna í sermislausu æti í 96 holu bakka í sex daga, en þannig má hindra að aðrar frumur sem yfirleitt fylgja krabbameinsfrumum frá sjúklingum, vaxi upp en með nokkra þætti eingöngu styðja við gang æxlisfrumna.⁹⁵ Frumulínur eru ræktaðar í þrjá sólarhringa þar sem ekki þarf að bíða eftir því að eðlilegar frumur hverfi. Fetal bovine serum (FBS), eða kálfasermi, eykur vöxt og lifun bæði illkynja og eðlilegra frumna í ræktun og breytir þar að auki lyfjavirkni. Í TCA-100 er notast við CAM ræktunaræti sem er hannað til að styðja vöxt æxlisfrumna en takmarka lifun eðlilegra frumna. Rannsóknir benda til þess að ræktunartími þurfi að vera 5-6 dagar svo hámarksvirkni krabbameinslyfja komi fram. ATP-TCA hefur fest sig í sessi sem ein efnilegasta lyfjanæmisprófunin í klínískri notkun fyrir brjóst- og eggjastokkakrabbamein.

Aðferðin mælir nákvæman fjölda æxlisfrumna, hvort sem þær eru í skiptingu eða ekki, og hægt er að nota allt niður í 39-78 frumur í hverjum brunni og prófa mörg lyf samtímis í mismunandi þynningum. Takmarkanir fyrri greiningartækja hafa meðal annars verið mikið frumumagn sem þarf í hverja mælingu.⁹⁶

Adenósín þrífosfat (ATP) er lífrænt efnasamband sem allar heilkjarna frumur nota við orkubúskap. Hver sameind inniheldur þrjá fosfathópa og felst efnaorkan í tengjum á milli hópanna. Sífelld er verið að mynda nýtt ATP og brjóta aftur niður. Mikil orka fer í að mynda tengin sem losnar aftur þegar sérstök ATPasa ensím brjóta þau niður, og nýta þau orkuna til að framkvæma vinnu. ATP styrkur er mjög stöðugur innan lifandi frumna en lækkar mjög hratt

innan frumunnar ef hún verður fyrir skaða og gefur því nákvæma mynd af starfshæfni og lífvænleika hennar.⁹⁷ Mæling innanfrumu ATP í TCA-100 prófinu byggist á ATPasa ensíminu lúsiferasa sem finnst í eldflugum. Lúsiferasi oxar próteinið D-lúsiferin fyrir tilstuðlan ATP en lúsiferin er náttúrulegt efni í eldflugum sem gefur frá sér ljós við oxun og er ljósmagnið í línulegu sambengi við ATP styrkinn (**Mynd 6**).⁹⁸ Með því að bæta D-lúsiferin og lúsiferasa í yfirmagni út í innanfrumuvökva krabbameinsfrumna má nýta allt ATP frumnanna í efnahvarfið. Ljósstyrkurinn sem myndast við hvarfið er mældur þar til gerðum birtumæli (Luminometer) en styrkleikinn endurspeglar orkuinnihald frumunnar á þeim tímapunkti. Samband innanfrumu ATP og birtusvarsins með lúsiferín-lúsiferasa hvarfinu er línulegt yfir stórt mælibil sem gerir þessa mæliaðferð bæði áreiðanlega og hentuga til mælingar á orkuinnihaldi mismunandi frumna.⁹⁹

lúsiferasi



Mynd 6. Hvarf lúsiferasa við ATP í viðurvist D-lúsiferíns

II.3. Kúrkúmín og lyfjanæmi

Rannsóknir sýna að kúrkúmín auki næmi krabbameinsfrumna fyrir frumudeyðandi áhrifum krabbameinslyfja með því að viðsnúa áunnu lyfjaónæmi sem frumur mynda með sér.⁸⁹ Talið er að kúrkúmín framkalli sjálfstýrðan frumudauða með bælingu á umritunarþættinum NFκB, sem tengdur hefur verið við myndun lyfjaónæmis. Frumudeyðandi áhrif paklítaxels jókst í æxlisfrumum í leghálsi miðað við paklítaxel eitt og sér með hindrun NFκB og Akt.¹⁰⁰ Rannsóknir á brjóstakrabbameinsfrumum sýndu að kúrkúmín hindraði paklítaxel-miðlaða NFκB virkjun og dró úr meinvarpamyndun í lungu.¹⁰¹ Þónokkrar rannsóknir sýna einnig fram á að kúrkúmín viðsnúi áunnu ónæmi gegn TRAIL-miðluðum sjálfstýrðum frumudauða sem blöðruhálskirtilskrabbameinsfrumur mynda gjarnan með sér með hindrun á NFκB.¹⁰² Með því að hindra NF-κB bælir kúrkúmín þar að auki niður tjáningu próteina og annarra þátta sem taka þátt í lifun og útbreiðslu æxlisfrumna.⁶⁰ Kúrkúmín jók næmi lyfjaónæmra æxlisfrumna í eggjastokkum fyrir cisplatín auk þess sem kúrkúmín knúði fram og formeðferð kúrkúmíns jók lyfja- og geislanæmi blöðruhálskirtilsæxlisfrumna.^{103,104}

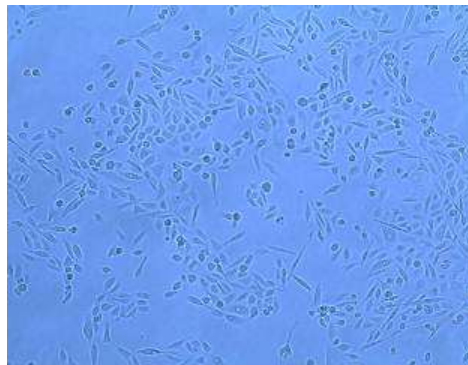
III. Lyfin

Í verkefninu var kúrkúmín prófað til viðbótar við nokkur frumudrepandi krabbameinslyf. Paklítaxel (Taxol®) binst β -túbúlíni á örþíplum og veldur samþættingu túbúlíns, stöðgar örþíplur og stöðvar frumuhring í G₂-M fasa.¹⁰⁵ Það er notað sérstaklega gegn langt komnu krabbameini í brjóstavef og eggjastokkum og hafa heildarlífslíkur kvenna með krabbamein í eggjastokkum batnað eftir að notkun paklítaxels hófst.¹⁰⁶ Paklítaxel hefur hins vegar skammtaháða eiturvirkni og leiðir að lokum til lyfjaónæmis með yfirtjáningu boðferla og próteina sem hamla sjálfstýrðum frumudauða. Rannsóknir benda einnig til þess að paklítaxel-stýrð virkjun á NF κ B miðli lifunarboðum sem sporna gegn sjálfstýrðum frumudauða.¹⁰⁷ Dócetaxel (Taxotere®) er annar taxani náskyldur paklítaxel og er eitt mikilvægasta lyfið gegn krabbameinsfrumum. Það verkar á sama hátt og hraðar samsöfnun túbúlíns í stöðugar örþíplur, hindrar sundurliðun þeirra og þar með frumuskiptingu.¹⁰⁸ Doxórúbisín (Adriamycin®) tilheyrir „anthrascyklínine“ flokki krabbameinslyfja, frumubælandi antibiotica. Virkni doxórúbisíns felst í DNA skemmd í G₂ frumufasa þannig DNA strendingur brotnar niður, afvindast af tóþóísómerasa II og veldur myndun frírra súrefnissindurefnaradikala.¹⁰⁹ Doxórúbisín sem greipt hefur verið inn í lípósóm (Doxil) er notað í meðferð gegn langt gengnu eggjastokkakrabbameini sem hefur komið aftur eftir lyfjameðferð með platínium lyfjum. Doxórúbisín hefur verið notað gegn blöðruhálskirtilsæxli sem ekki svarar hormónameðferð en vegna lítillar svörunar og aukaverkana er það ekki notað sem hefðbundin meðferð.¹¹⁰ Etopósíð hindrar tóþóísómerasa II sem veldur því að DNA strendingar brotna í G₂ frumufasa og fruman deyr. Það er notað til að meðhöndla krabbamein í blöðruhálskirtli, eggjastokkum og í fleiri gerðum.¹¹¹ Cisplatín er fyrsta platínium krabbameinslyfið en þau bindast DNA strendingum og valda krosstengingu, en við það fer fruman í sjálfstýrðan frumudauða. Samsett lyfjameðferð með cisplatin er ein helsta lyfjameðferð í mörgum krabbameinsgerðum. Í byrjun bregðast æxlisfrumur kröftuglega við platinium en mynda svo flestar með sér áunnið ónæmi í gegnum fjölda efnaferla.⁹⁵

1. Efniviður og aðferðir

2.1. Frumuræktun

DU-145 frumurnar fengust frosnar frá Rannsóknastofu í Stofnfrumufræðum við Lífvísindasetur Læknagarðs og voru þær því afþýddar í 37 °C heitu vatnsbaði áður en RPMI frumuæti með 10% FBS kálfasermi og 1% penicillin-streptomycin sýklalyfjum var bætt á, dropa fyrir dropa. Frumunum var þá sáð á 25 cm² ræktunarflöskur í hlutfallinu 1:6 og láttnar vaxa þrjá daga í senn í ræktunarskáp við 37 °C og 5% CO₂ þar til þær



Mynd 7. PC-3 æxlisfrumur í rækt

höfðu fest sig niður á botn ræktunarflasknanna og sýndu milli 70-90% þekju. Þá voru frumurnar skolaðar með sermislausu ræktunaræti og trypsíneraðar með 1 mL trypsíni til að losa þær af botninum. Trypsínið var látið standa á frumunum í 30 sekúndur en svo hellt af og frumurnar láttnar í ræktunarskáp í 10-12 mínútur, eða þar til þær höfðu losnað af botninum. Þá var RPMI frumuæti með 10% FBS kálfasermi og 1% penicillin-streptomycin sýklalyfjum bætt á og frumurnar taldar í sjálfvirkum teljara (TC-10 frá Bio-Rad) og síðan endursáð í hlutfallinu 1:3 í ræktunarflöskur til áframhaldandi ræktunar eða sáð í 96 holu ræktunarbakka til mælingar. Blöðruhálskirtilsæxlisfrumulínan PC-3 (**Mynd 7**) var fengin frá ECACC (European Collection of Cell Cultures) og kom ófrosin í æti frá fyrirtækinu. Voru þær láttnar vera í ræktunarskáp við 37 °C og 5% CO₂ yfir nótt áður en skipt var um æti og þær láttnar vaxa í 10% FBS kálfasermi og 1% penicillin-streptomycin sýklalyfjum í RPMI frumuæti þar til þær sýndu milli 0-90% þekju. Frumurnar voru þá trypsíneraðar af botninum á sama hátt og DU-145 og skipt á nýjar ræktunarflöskur í hlutfallinu 1:3.

2.2. Einangrun krabbameinsfrumna úr eggjastokkaæxli sjúklinga

Tveggja lítra ferskt vökvasýni úr langt gengnu eggjastokkakrabbameini var fengið frá kvennadeild Landspítala. Því var skipt niður á átta 50 mL flöskur í einu og spunnið niður í sjö mínútur við 300 x g. Þá var vökvanum hellt af og botnfallinu safnað saman. Með þessum hætti var öllum frumum úr vökvasýninu safnað saman í eina 50 mL flösku og leyst upp í

Þvottalausn sem samanstóð af RPMI 1640 stöðluðu æti (Gibco) viðbættu 10% kálfasermi (e. fetal bovine serum, FBS) og 1 % penicillin og streptomycin. Frumulausnin var látin rólega, dropa fyrir dropa, ofan á Histopaque-1077 lausn (Sigma) sem er eðlisþéttari svo frumurnar flutu ofan á. Þetta var sett í skilvindu við 400 x g í 30 mínútur. Við skilvindun höfðu rauð blóðkorn í lausninni farið gegnum Histopaque-1077 lausnina og myndað botnfall á botninum. Frumur sem ekki komust gegnum Histopaque-1077 sátu á skilum þess og frumulausnarinnar og samanstóðu af öðrum frumum en rauðum blóðkornum, en þær sátu á botninum. Þessu frumulagi var safnað saman og sett í nýja steríla túpu. 10 mL þvottalausn var bætt við og skilundin við 300 x g í sjö mínútur. Flotinu var hellt af og botnfall leyst aftur upp í 10 mL þvottalausn og skilundið á sama hátt. Botnfallið sem myndaðist var talið vera laust við Histopaque-1077 lausnina og því öruggt að leysa það upp í ræktunarlausn. Notað var sermislaust æti að viðbættum fitum og hormónum, en slíkt æti gerir krabbameinsfrumum kleyft að lifa, þar sem þær eru ekki háðar utanfrumuboðum um fjölgun, á meðan eðlilegar frumur deyja. Notast er við T25 ræktunarflöskur (Falcon) sem hafðar voru í 37°C hitaskáp með 5% CO₂.

2.3. Einangrun krabbameinsfrumna úr blöðruhálskirtilsæxli sjúklings

Lítið frumuskaf frá blöðruhálskirtilskrabbameini var fengið frá þvaggfæraskurðeild Landspítalans. Sýnið var skorið niður og geymt í kollagenasa lausn með penicillin-streptomycin sýklalyfjum yfir nótt. Æxlisfrumur voru svo einangraðar eftir staðlaðri aðferð frá Imgenex.¹¹² Frumutalning daginn eftir gaf $2,01 \cdot 10^4$ frumur/mL og í 6 mL voru þá 120.000 frumur. Þær voru spunnar niður í fimm mínútur samkvæmt aðferðarlýsingu og leystar upp í sérstöku æti sem ætlað er við frumurækt blöðruhálskirtilskrabbameinsfrumna úr sjúklingi og geymdar við 37°C og 5% CO₂.

2.3. Blöndun kúrkúmín stofnlausnar

100 g kúrkúmín (Sigma) var vigtað með sótthreinsaðri spatúlu á análýsuvog í sótthreinsaða Eppendorf túpu. Túpunni var lokað á meðan hún var færð inn í rætkunarskáp. Kúrkúmín var leyst upp í 1.36 mL DMSO svo lokastyrkur varð 200 μM ¹¹³. Lausnin var blönduð vel saman í hvirfli og geymd í Eppendorf túpunni við -80 °C. Hún var svo þynnt með DMSO í 20 μM

stofnlausn og geymd við -20°C. Var hún látin þiðna í ræktunarskáp fyrir tilraunir og varin frá ljósi með álpappír.

2.4. Lyfjablandanir fyrir lyfjanæmispróf

Krabbameinslyfin doxórúbisín, cisplatín, paklítaxel, dócetaxel og etóposíð voru fengin frá Landspítala háskólasjúkrahúsi. Við ákvörðun á lyfjastyrk hvers krabbameinslyfs var stuðst helmingunardrápsstyrk lyfjanna á tiltekna frumulínu sem fengnir voru frá birtum rannsóknum.¹¹⁴⁻¹¹⁹ Allt upp í tvöfaldir helmingunardrápsstyrkir voru prófaðir og annaðhvort raðþynnt niður eða hentugri gildi fundin út frá fjórfaldri lyfjalausn sem var blönduð í byrjun. Lyfjastyrkir með eggjastokkaæxlisfrumum úr sjúklingi miðuðust við hæsta lyfjastyrk í blóði eftir lyfjagjöf (e. peak plasma concentration, C_{max}) (**Mynd 8**). Lyfin voru blönduð í RPMI 1640 ræktunaræti sem innihélt 10% FBS og 1% penicillin og streptomycin.

Lyf	C_{max} (100% styrkur)
Cisplatin	3 µg/mL
Gemcitabine	12 µg/mL
Doxorubicin	0,5 µg/mL
Vincristine	0,4 µg/mL
Paclitaxel	13,6 µg/mL
Topotecan	0,75 µg/mL
5-fluorouracil	45 µg/mL

Mynd 8. Hámarksblóðstyrkir krabbameinslyfja í líkamanum (C_{max})

2.5. Uppsetning tilrauna

Útbúnir voru 96 holu ræktunarbakkar með 20.000 frumum í hverjum brunni fyrir DU-145 og æxlisfrumur úr sjúkling, en 10.000 og 5.000 frumur í hverjum brunni fyrir PC-3. Frumurnar voru taldar með sjálfvirkum frumuteljara sem notar útilokunaraðferð byggða á trypan bláum lit (trypan blue exclusion) og leystar upp í viðeigandi rúmmáli af æti svo jafnmargar frumur væru í öllum brunnum. Frumulínur voru látnar vaxa í bökkunum yfir nótt í ræktunarskáp við

37 °C og 5% CO₂ til að ná festingu við botninn. Stofnlausnir af hefðbundnum krabbameinslyfjum voru blandaðar sem innihéldu fjórfaldan hámarksstyrk. Lausnirnar voru raðþynntar á sér bakka sex sinnum áður en þær voru settar á frumur. Þar sem kúrkúmín var blandað með voru 50 µl settir af stofnlaus krabbameinslyfja settir í hvern brunn sem innihéldi að lokum 200 µl. Lyfjastyrkir fyrir eggjastokkaæxlisfrumur úr sjúklingi voru hámarksblóðstyrkir sem nást í lyfjameðferð. .

Fyrir hverja tilraun fyrir sig voru hafðir viðmiðunarbrunnar sem innihéldu jafnmargar frumur og lyfjabrunnarnir sem fengu að vera án alls áreitis (**Mynd 9**). Þannig mátti mæla ATP magn í heilbrigðri rækt af krabbameinsfrumum. Einnig voru gerðir brunnar sem innihéldu triton-X100 sápullausn sem drepur allar frumur. Ef ljós mældist af þessum brunnum þá var það bakgrunnsljós og gildið dregið frá öllum mælingunum til að sporna gegn skekkju. Frumulínur voru láttnar vaxa í þrjá daga en frumur úr sjúklingum voru láttnar vaxa í sex daga í ræktunarskáp við 37 °C og 5% CO₂.

100% frumudráp (MI)			
Lyf A	Lyf A + kúrkúmín (µM)	Lyf B	Lyf B + kúrkúmín (µM)
Raðþynning	Raðþynning	Raðþynning	Raðþynning
↓	↓	↓	↓
100% frumulifun (MO)			

Mynd 9. Dæmi um uppsetningu 96 holu lyfjanæmisbakka

2.6. Lyfjanæmisprófun

Notuð var TCER frumurofslausn sem hönnuð er af Prof. Ian Cree og inniheldur Triton X-100 og Ammóníum-meta-vanadat. Triton X-100 er ójónað yfirborðsvirkt efni sem sprengir göt á frumuhimnur og veldur hraðri nekrósu þannig að frumuinnihald lekur út.¹²⁰ Ammóníum-meta-vanadat óvirkjar ATPasa og varnar niðurbroti ATP meðan á mælingu stendur. 50 µL af TCER frumurofslausn var bætt út í hvern brunn og beðið í 15 mínútur meðan lausnin væri að virka. Því næst voru 50 µL af frumulausninni pípetteraðir upp og niður tvisvar til þrisvar

sinnum til að tryggja fullnægjandi samblöndun og færðir yfir á hvítan 96 holu bakka. 50 µL af lúsiferín-lúsiferasa lausn sem hafði lúsiferín og lúsiferasa í yfirmagni miðað við ATP magn 5000-20.000 frumna í rækt var svo bætt út í frumulausnina. Á meðan ATP magn frumulausnarinnar endist oxar lúsiferasinn lúsiferín og ljósmagnið sem myndast við hvarfið mælist í ljósmælinum. ATP magn frumurækta með lyfjalausnum og kúrkúmíni var borið saman við ATP magn frumurækta án þeirra til að finna hlutfall lifandi frumna. Niðurstöður voru reiknaðar út í Excel og notast við forritið SigmaPlot við tölfræði úrvinnslu.

2.7. Listi yfir efni, tæki og áhöld

Lausnir

- PBS (phosphate buffer saline, pH 7,4) frá Gibco
- Lúsiferín-lúsiferínasa lausn blönduð af starfsfólki ValaMed
- TCER (Tumor cell extraction reagent) lausn blönduð af starfsfólki ValaMed
- FBS (fetal bovine serum) frá Gibco
- Penicillin og streptomycin frá Gibco
- Dímetýlsúlfoxíð (DMSO) frá Gibco
- Kúrkúmín frá Sigma var leyst upp í DMSO blandað á rannsóknarstofu ValaMed
- Trypsín, Sigma-Aldrich
- Krabbameinslyfin Cisplatín (innrennslisstofn), Doxorúbisín, Paklítaxel, Etópósíð og Dócetaxel voru fengin frá Landspítala háskólasjúkrahúsi

Æti og sermi

- RPMI frumuæti (Roswell Park Memorial Institute) 1640 frá Gibco
- DMEM frumuæti (Dulbecco's modified Eagle medium) frá Gibco
- Histopaque frá Gibco
- Þynningarlausn. Blönduð af starfsfólki ValaMed
- Trypan blue lausn (0,4%) frá Sigma-Aldrich

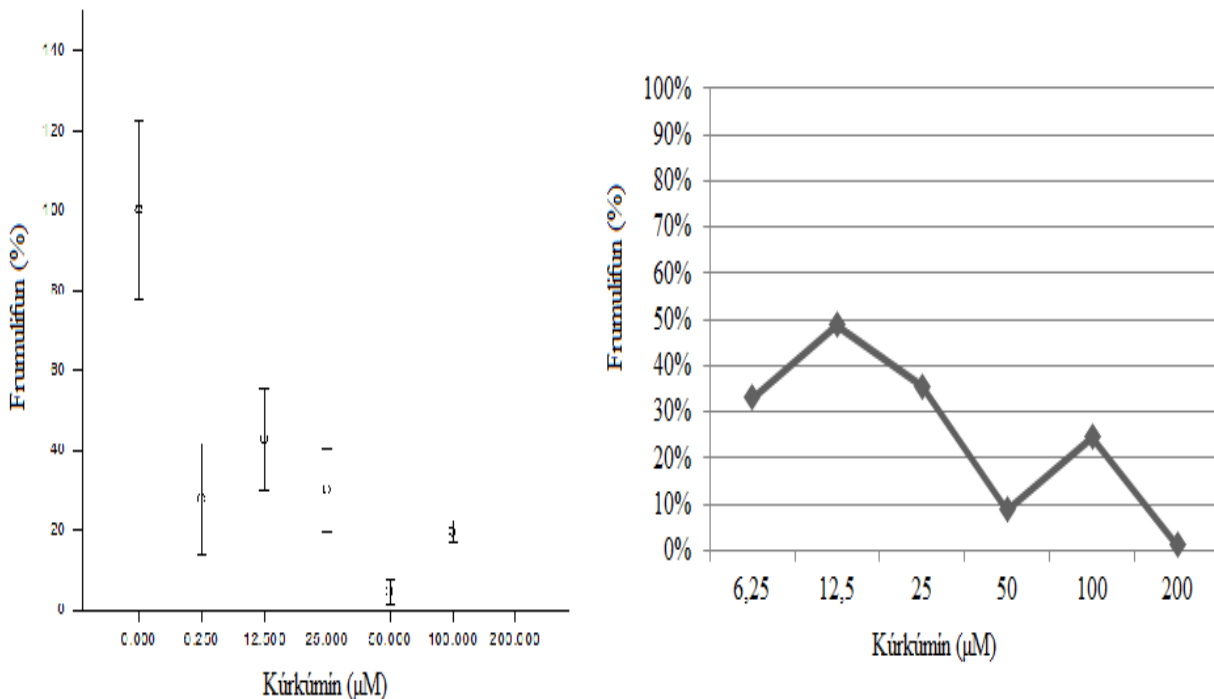
Tæki og áhöld

- Vinnsla á frumuræktum og vefjasýnum í Labcaire Vertical Laminar Flow rannsóknarskáp
- Ovation stafrænar pípettur og pípettuoddar frá VistaLab
- Pipetboy acu rafmagnspípetta
- TC10 sjálfvirkur frumuteljari á Bio-Rad talningarglerjum.
- Viðsnúin Olympus CK40 ljóssmásjá við frumuskoðun
- Leica myndavél
- 96 holu flatir ræktunarbakkar, 15 og 50 mL túbur og ræktunarflöskur frá Falcon
- 96 holu kúptir ræktunarbakkar frá Corning
- 10 og 25 mL glerpípettur og búbbulínur frá Sarstedt
- Orion L birtumælir frá Berthold Detection Systems GmbH var notaður við birtumælingar og gögn lesin var Simplicity 4.20 hugbúnaði.

2. Niðurstöður

2.1. Áhrif kúrkúmíns á DU-145 frumulínu

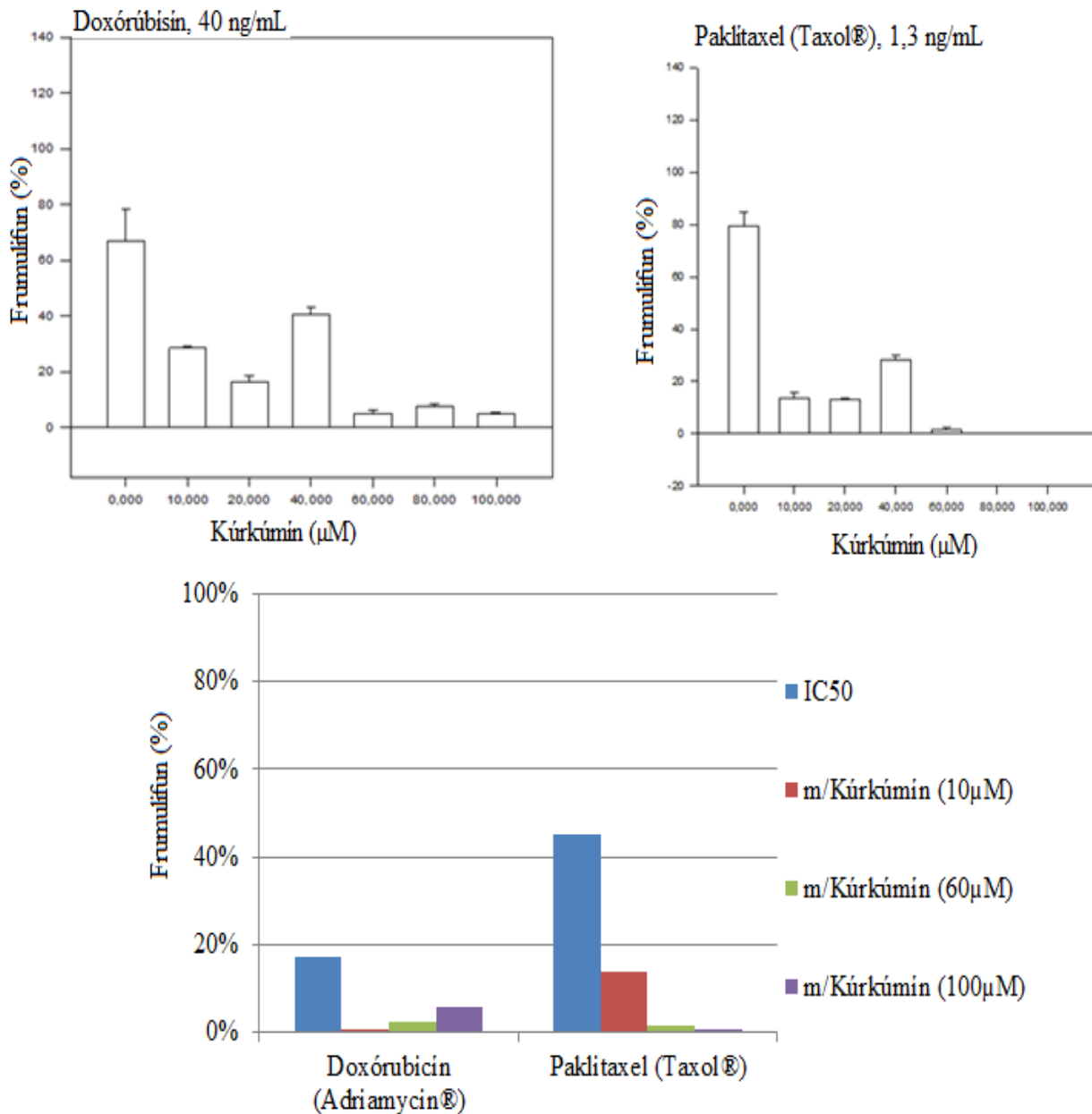
Kúrkúmín var prófað eitt og sér á DU-145 frumulínu í 200 μM styrk og svo raðþynnt niður. Marktækni var á 50 μM og 200 μM styrkjum en voru gildin of frábrugðin í öðrum styrkjum til að marktækni sást. Kúrkúmín dregur úr lífvænleika strax í 6 μM styrk miðað við viðmiðunargildi (**Mynd 10**). Þar sem Dímetýlsúlfoxíð (DMSO) er þekkt fyrir að hafa framkalla sjálfstýrðan frumudauða í frumurækt utan líkamans voru áhrif þess mæld ein og sér og reyndist það ekki hafa áhrif á frumulifun.¹²¹ Því má ætla að frumudrepani áhrif kúrkúmíns sem uppleyst er í DMSO stafi af eiginleikum kúrkúmíns.



Mynd 10. Áhrif kúrkúmíns (μM) á frumulifun DU-145. Til vinstri sést tölfræðileg úrvinnsla þar sem marktæk gildi fengust í 50 μM og 200 μM styrkjum.

3.1.2. Áhrif kúrkúmíns á DU-145 til viðbótar krabbameinslyfjum

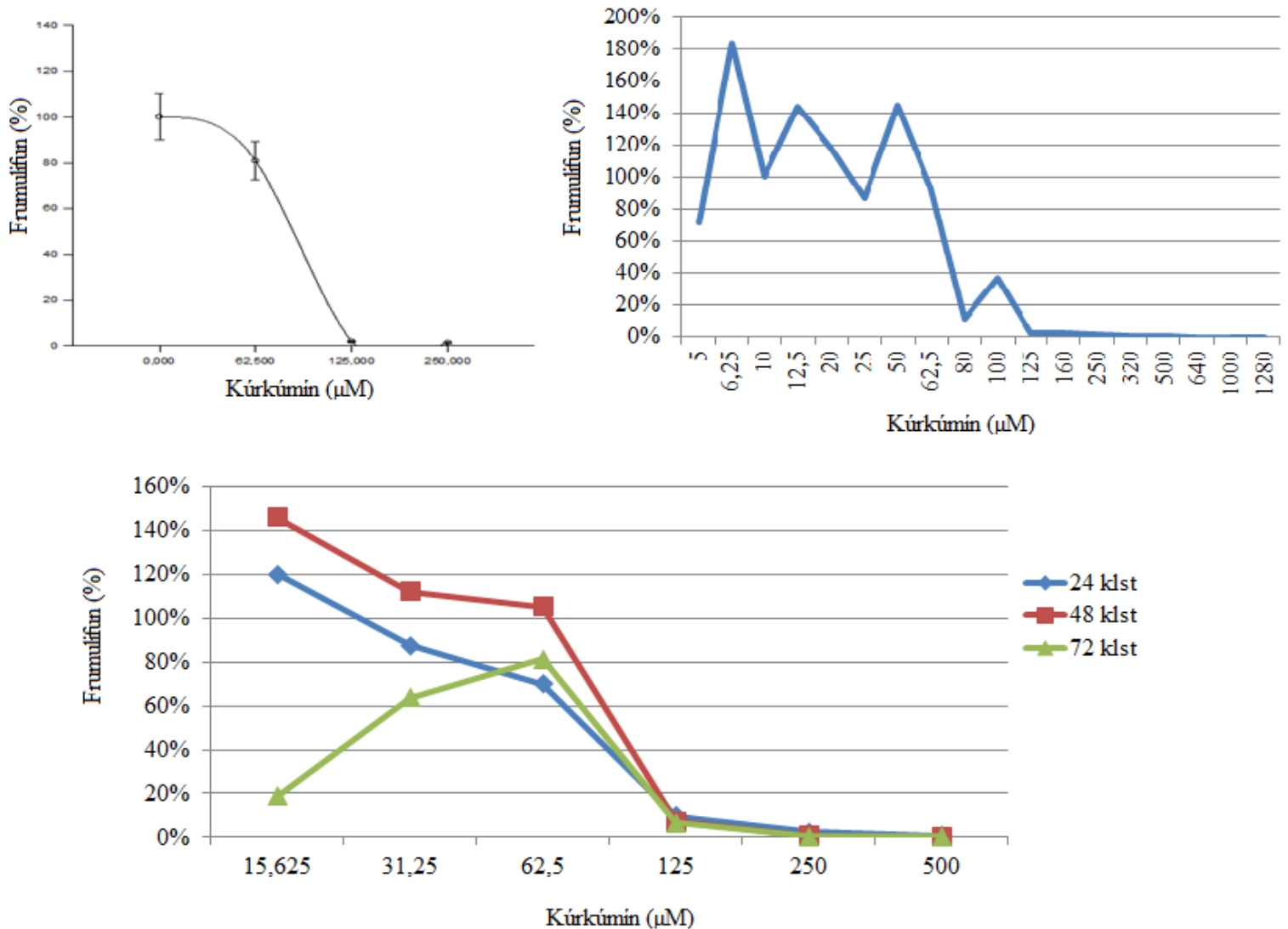
Mældir helmingunarstyrkir doxórúbisíns og paklítaxels úr birtum rannsóknum voru notaðir og áhrif kúrkúmíns til viðbótar við frumdrepani áhrif þeirra skoðuð á DU-145 frumulínu (**Mynd 11**).^{122,123}



Mynd 11. Áhrif kúrkúmíns (μM) á DU-145 til viðbótar doxórúbicín (IC₅₀), efri mynd til vinstri og paklítaxel (Taxol®, IC₅₀), efri mynd til hægri. Á neðri mynd má sjá áhrif kúrkúmíns í þremur mismunandi styrkjum samhliða IC₅₀ lyfjastyrkjum á DU-145 frumulínu.

2.2. Áhrif kúrkúmíns á PC-3 frumulínu®

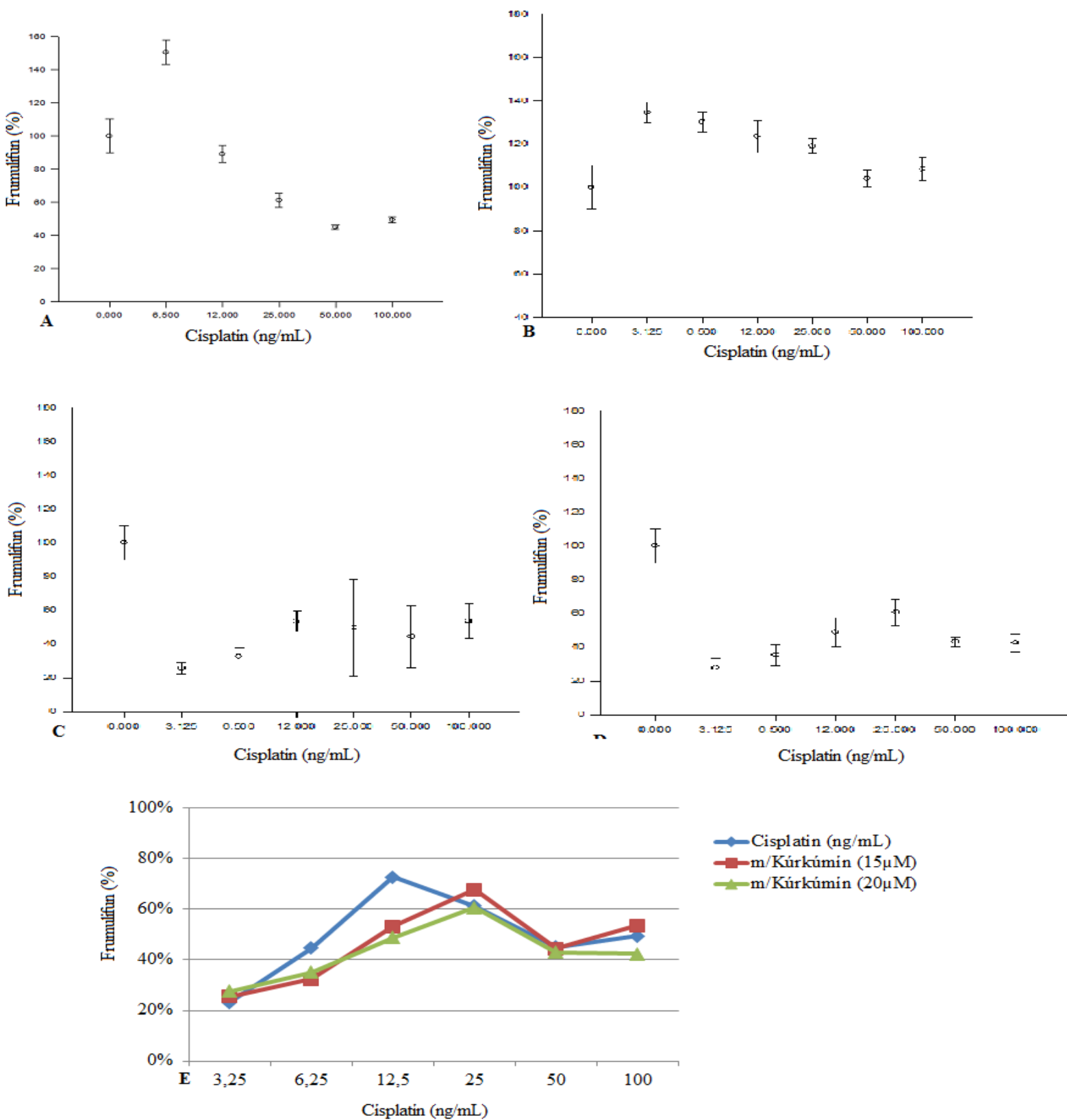
Mismunandi styrkir kúrkúmíns voru prófaðir á PC-3 frumulínu. Marktækni sást í styrkjum 0, 62,5, 125 og 250 μM styrkjum og sést hvernig frumulifun hrapar á milli 62,5 og 125 μM (Mynd 12).



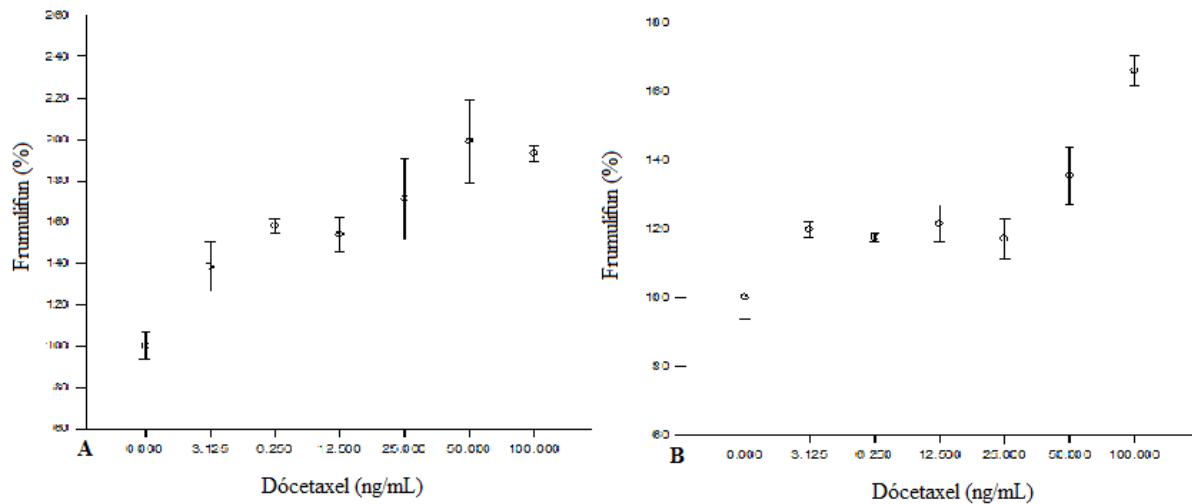
Mynd 12. Áhrif kúrkúmíns (μM) á frumulifun PC-3. Myndin efst til vinstri sýnir tölfræðina þar sem marktækni sást í öllum styrkjum. Myndin efst til hægri sýnir áhrif kúrkúmíns í mismiklum styrkjum á frumulifun PC-3. Neðri myndin sýnir tímaháð áhrif kúrkúmíns þar sem sést að í lágum styrkjum er kúrkúmin ekki að draga úr frumulifun fyrir en eftir 72 klst á meðan það orsakar svo til fullkomið frumudráp strax eftir 24 klst í hærri styrkjum.

2.2.1. Áhrif kúrkúmíns með krabbameinslyfjum á PC-3 frumulínu

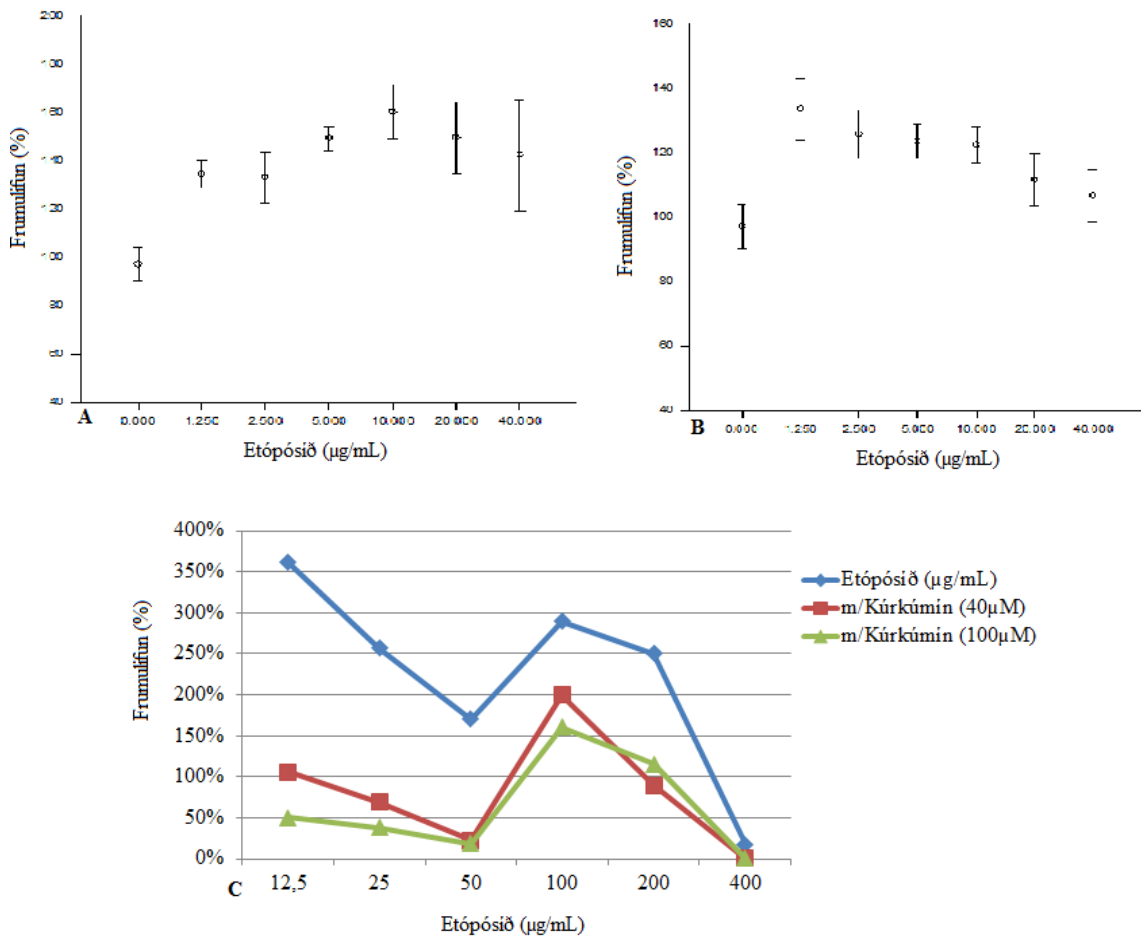
Skoðuð voru áhrif kúrkúmíns með völdum krabbameinslyfjum á PC-3 frumulínu. Lífvænleiki í brunnum sem innihéldu krabbameinslyf ásamt frumum og viðeigandi æti virtist hærri miðað við þá brunna sem einungis innihéldu frumur og viðeigandi æti, þ.e.a.s. krabbameinslyfin virtust vera að auka lífvænleika. Kúrkúmín minnkaði lífvænleika í öllum tilvikum (**Myndir 13-17**). Áhrif dímethýl-súlfoxíðs (DMSO) voru prófuð ein og sér og reyndist ekki vera að draga úr frumulifun.



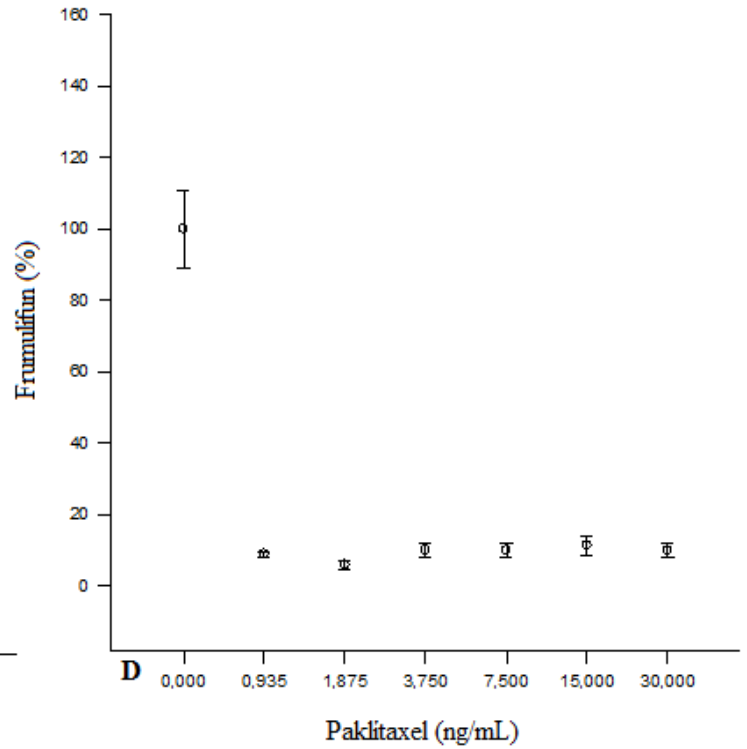
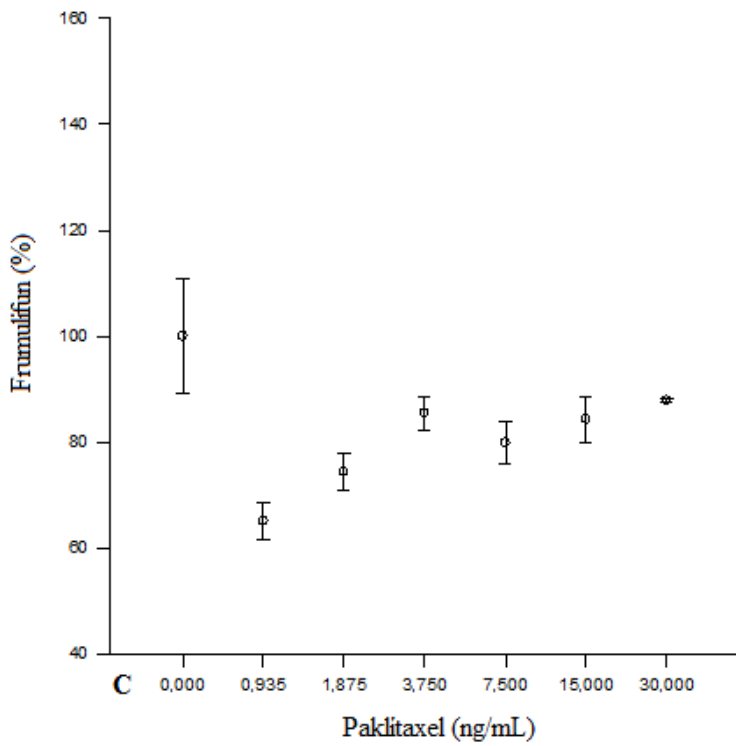
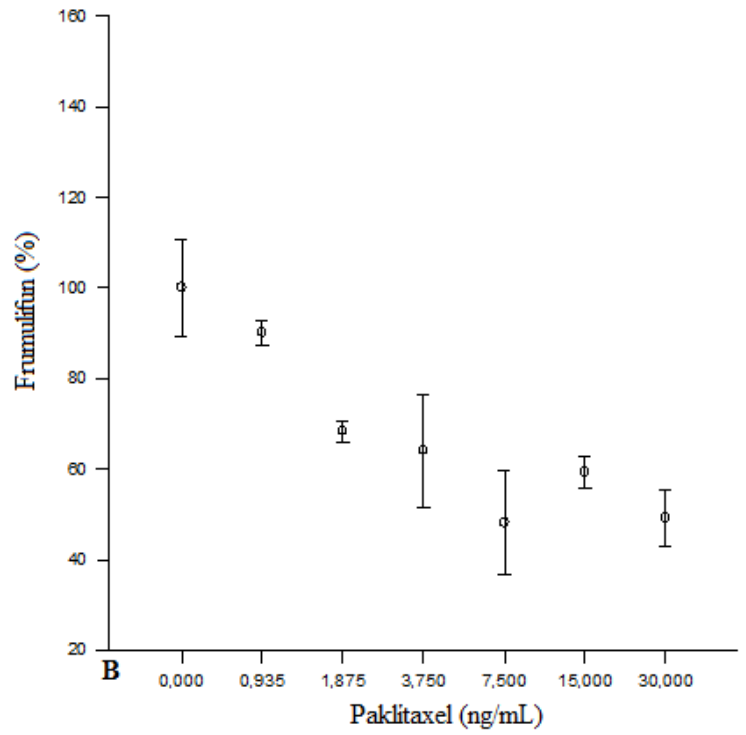
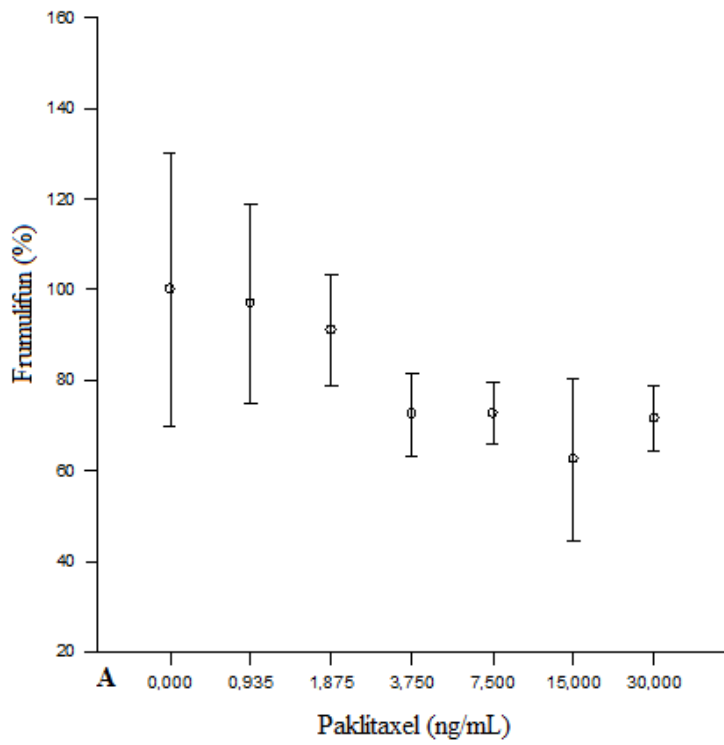
Mynd 13. A. Áhrif císplatíns raðþynningar á frumulifun PC-3. **B.** Áhrif císplatín raðþynningar ásamt 10 μM kúrkúminí á frumulifun PC-3. **C.** Áhrif císplatín raðþynningar ásamt 15 μM kúrkúminí á frumulifun PC-3. **D.** Áhrif císplatín raðþynningar ásamt 20 μM kúrkúminí á frumulifun PC-3. **E.** Viðbótar áhrif 15 μM og 20 μM kúrkúminí á frumulifun PC-3



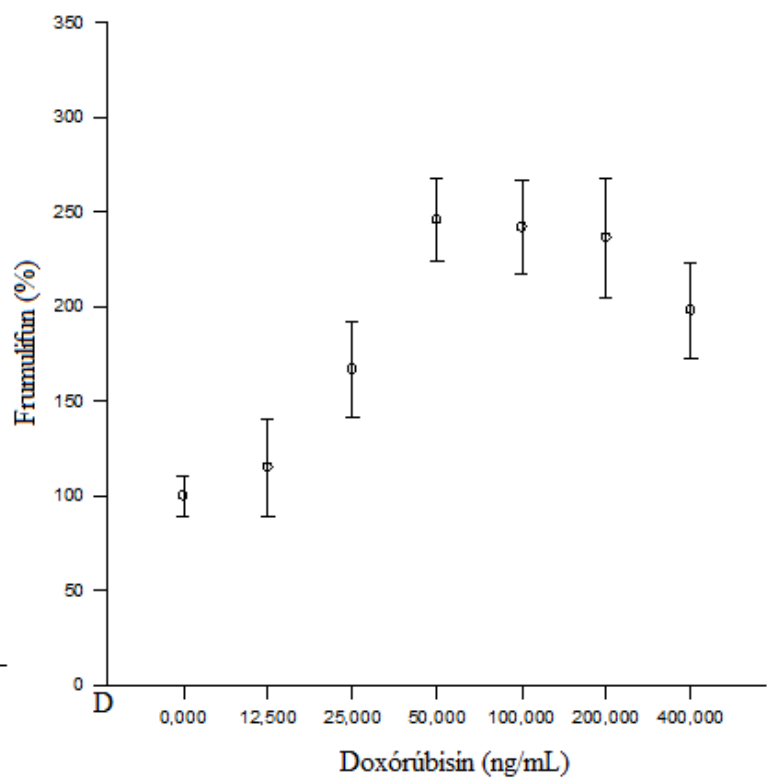
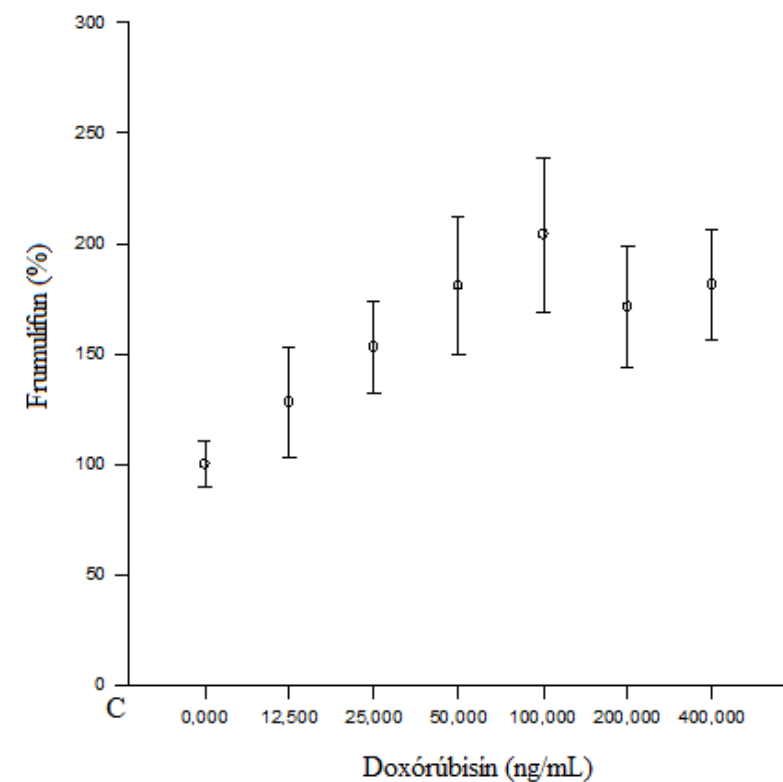
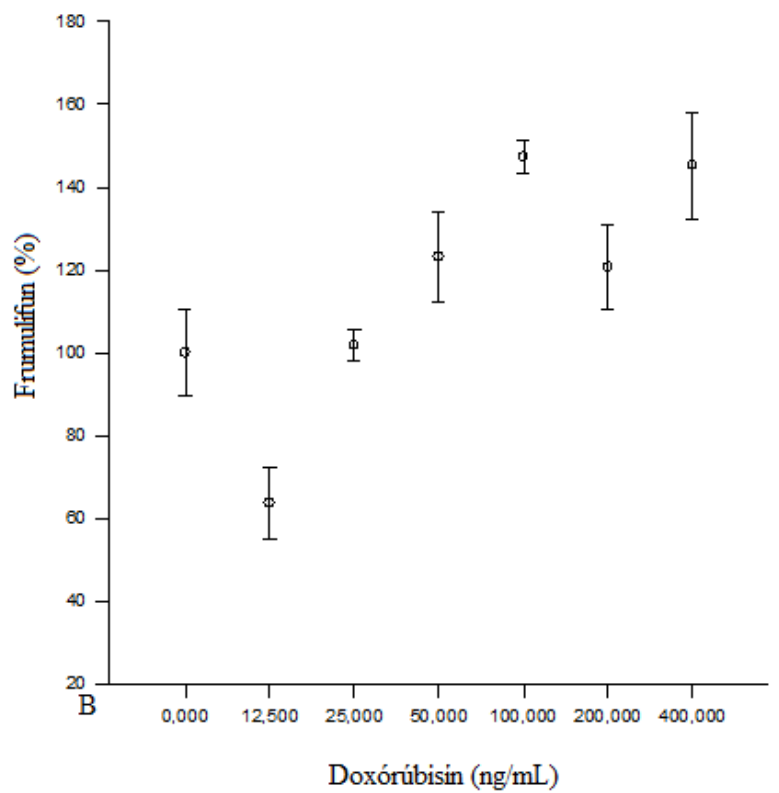
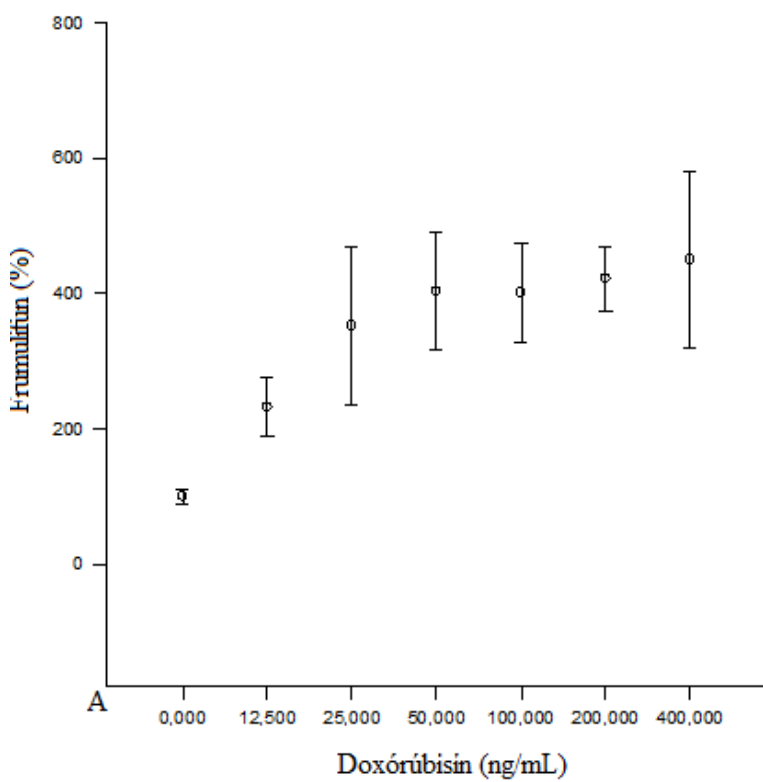
Mynd 14. A. Áhrif dócetaxel raðþynningar á frumulifun PC-3. B. Áhrif dócetaxel raðþynningar ásamt 20 μ M kúrkúmíni á PC-3.



Mynd 15. A. Áhrif Etoposíðs til viðbótar 20 μ M kúrkúmíns á frumulifun PC-3. B. Áhrif Etoposíðs til viðbótar 20 μ M kúrkúmíns ásamt 20 μ M kúrkúmíni á frumulifun PC-3. C. Áhrif kúrkúmíns (40 og 100 μ M) til viðbótar við frumudeyðandi áhrif etópósíðs á PC-3.



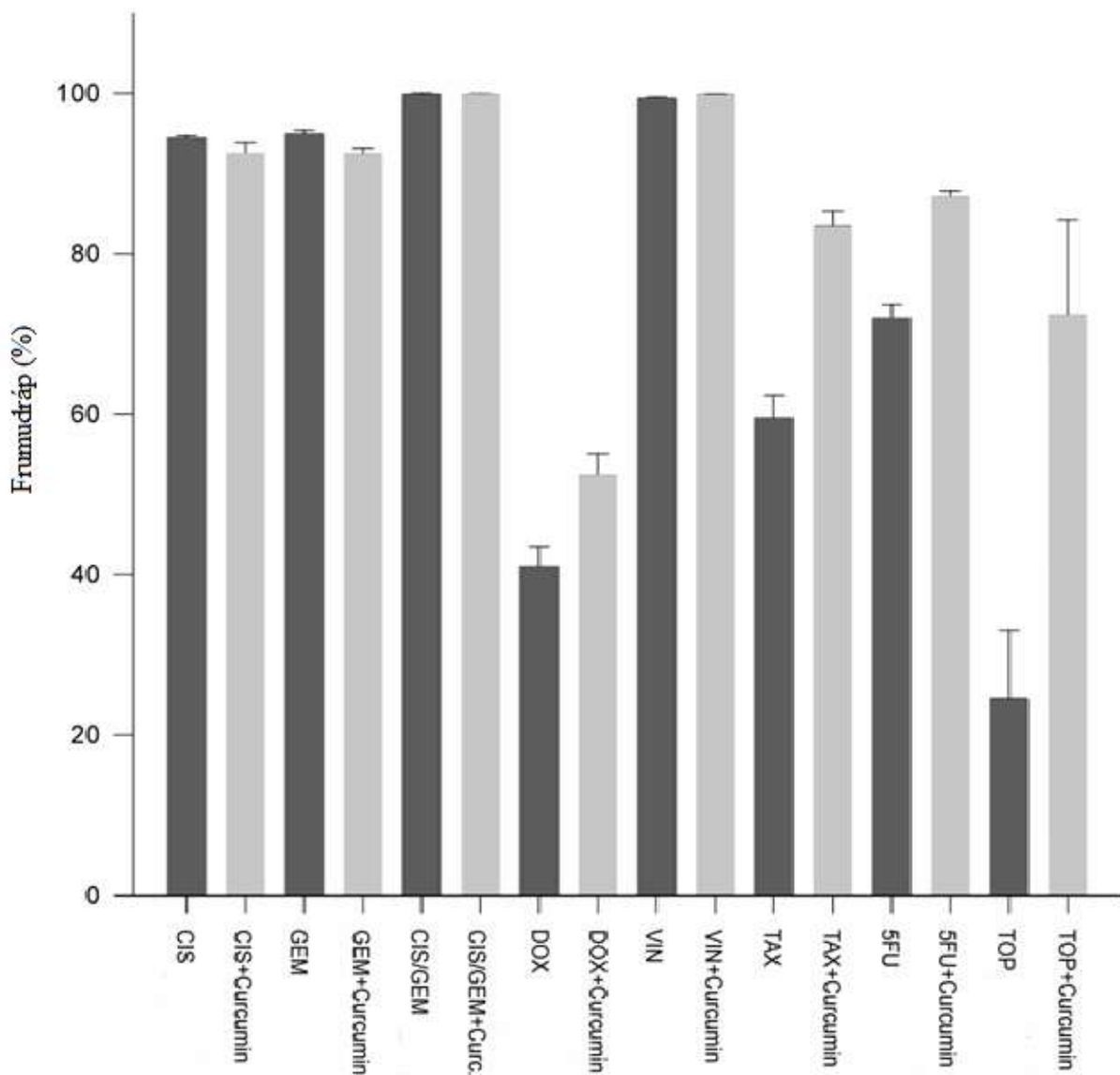
Mynd 16. A. Áhrif paklítaxel (Taxol®) raðþynninga á frumulifun PC-3. **B.** Áhrif paklítaxel (Taxol®) raðþynninga ásamt 20 μ M kúrkúmíni á frumulifun PC-3. **C.** Áhrif paklítaxel (Taxol®) raðþynninga á frumulifun PC-3. **D.** Áhrif paklítaxes (Taxol®) raðþynninga ásamt 100 μ M kúrkúmíni á frumulifun PC-3.



Mynd 17. A. Áhrif doxórúbisín raðþynninga á frumulífún PC-3. **B.** Áhrif doxórúbisín raðþynninga ásamt 10 μM kúrkúmíni á frumulífún PC-3. **C.** Áhrif doxórúbisín raðþynninga ásamt 15 μM kúrkúmíni á frumulífún PC-3. **D.** Áhrif doxórúbisín raðþynninga ásamt 20 μM kúrkúmíni á frumulífún PC-3.

2.3. Áhrif kúrkúmíns á ferskar eggjastokkaæxlisfrumur úr sjúklingi

20 μM af kúrkúmíni var bætt við 100% lyfjastyrk í blóði á ferskar eggjastokkaæxlisfrumur úr sjúklingi (**Mynd 18**). Líkt og sést á mynd 18 er kúrkúmín að auka frumudeyðandi áhrif krabbameinslyfja í þeim lyfjastyrkjum sem ekki ná að orsaka fullkomið frumudráp (doxórubicín, paklítaxel, 5-flúoróúracíl og tópótekan). Þegar lyfin ná svo til 100% frumudrápi (císplatín, gemcitabine, císplatín+gemcitabine og vinblastín) hefur kúrkúmín skiljanlega engin viðbótar áhrif.



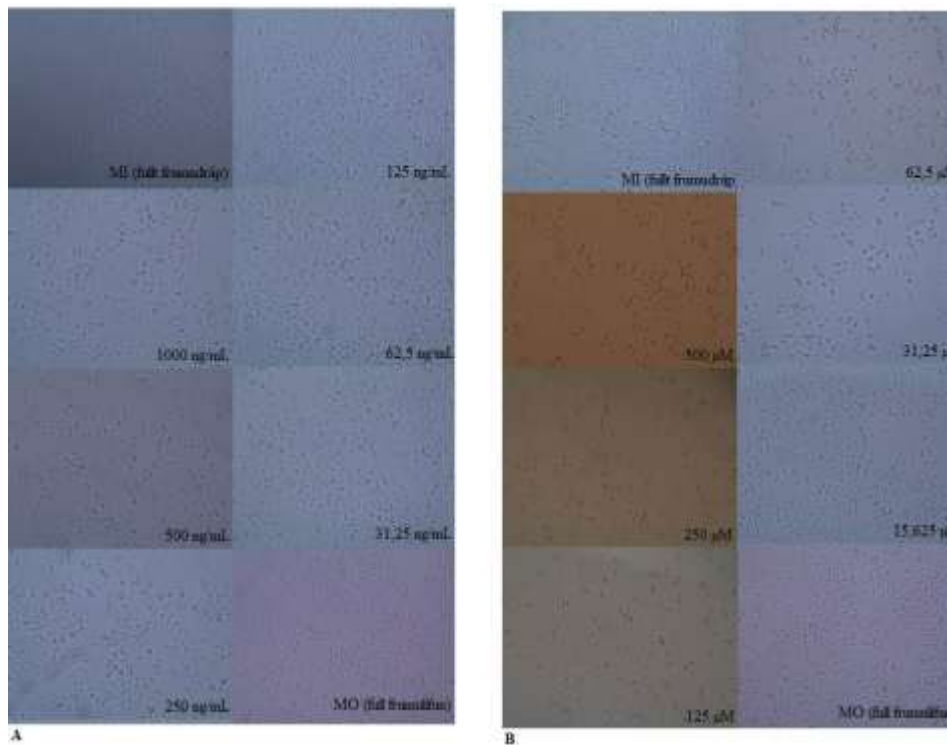
Mynd 18. Áhrif 20 μM kúrkúmíns til viðbótar krabbameinslyfjum á eggjastokkakrabbameinsfrumur úr sjúklingi.

Dökka línan sýnir áhrif krabbameinslyfja ein og sér en ljósa línan sýnir áhrif krabbameinslyfja ásamt 20 μM kúrkúmíni leystu upp í DMSO.

Umræður og ályktanir

Samkvæmt niðurstöðum rannsóknarinnar virðist kúrkúmín til viðbótar krabbameinslyfjum draga enn frekar úr lífvænleika æxlisfrumna miðað við krabbameinslyf ein og sér. Þegar DU-145 frumulínan átti í hlut sásti minni lífvænleiki strax við lága kúrkúmín styrki miðað við viðmiðunarbrunna. Hins vegar virtist kúrkúmín í lágum styrkjum auka lífvænleika PC-3 frumulínu þó svo dragist úr lífvænleika með hækkandi styrkjum kúrkúmíns. Áhrif kúrkúmíns á PC-3 frumulínu gefa þó ekki raunhæfa mynd hvorki af virkni kúrkúmíns né virkni krabbameinslyfja. Krabbameinslyf ein og sér virtust auka lífvænleika en kúrkúmín til viðbótar dró úr honum, þó ekki mikið neðan við 100%. 100% lífvænleiki miðast við það magn ATP sem mældist í viðmiðunarbrunnum eftir þrjá sólarhringa, þar sem ekkert var sett út á frumurækt. ATP-magn sem mælist í slíkum brunnum er greinilega ekki góð viðmiðun þar sem það sýnir ekki endilega hámarks lífvænleika PC3 æxlisfrumna við tilteknar aðstæður heldur sýndu óvenju lág gildi. Því fóru mörg lyfjagildi upp fyrir 100% þegar þau voru miðuð við viðmiðunarbrunna. TCA-100 aðferðin hefur aðallega verið notuð til að mæla lyfjanæmi ferskra æxlisfrumna úr brjóstavef eða eggjastokkum og ekki er vitað til þess að PC-3 frumulína hafi verið prófuð með þessari aðferð.⁹⁵ Því er ljóst að staðla þurfi TCA-100 aðferðina að PC-3 frumum til að fá marktækar niðurstöður, en ekki reyndist unnt að ljúka þeirri vinnu.

Ekki er ljóst hvers vegna lítið birtumagn mældist í viðmiðunarbrunnum, þar sem ekkert er sett út á æxlisfrumur, miðað við þá brunna þar sem þynningarstyrkir af krabbameinslyfjum voru settir út á. Krabbameinslyf hafa frumudrepani eiginleika og ættu því að ná að drepa flest allar frumur í rækt, sérstaklega þegar þau eru prófuð í tífoldum helmingunardrápsstyrk. Ein kenning óvenju lítils birtumagns í viðmiðunarbrunnum er að PC-3 frumur hafi náð að fjölga sér hindrunarlaust þar til þær höfðu þakið botn frumnanna, farið þá að losna af botninum og drepist. Eftir 72 klst í ræktunarskáp hafi því ekki jafnmargar verið lifandi og voru í byrjun. PC-3 frumur náðu að fjölga sér mjög hratt í ræktunarflöskum og því gæti verið að þær hafi verið búnar að ná þekju innan 72 klst. Hins vegar virtust frumurnar ekki vera búnar að þekja allan botninn þegar tekin var mynd af brunnum stuttu fyrir birtumælingu (**Mynd 19**). Einnig virtust vera færri frumur í brunnum með lyfjaraðþynningum heldur en í viðmiðunarbrunnum, þó svo ATP-birtumæling stuttu síðar hafi sýnt þvert á móti og mældist meiri lífvænleiki í lyfjaþynningarbrunnum. Fyrri rannsóknir með PC-3 frumulínu sýna fram á örugg frumudeyðandi áhrif þeirra krabbameinslyfja sem prófuð voru.



Mynd 19. A. Lífvænleiki PC-3 frumna í raðþynningarstyrkjum Etópósíðs eftir tæplega 72 klst. Einnig sést lífvænleiki frumna í Triton-X100 sápu og MO viðmiðunarbrunnur, sem einungis inniheldur frumur og ræktunaræti. **B.** Lífvænleiki PC-3 frumna í raðþynningarstyrkjum kúrkúmíns eftir tæplega 72 klst. Einnig sést lífvænleiki frumna í Triton-X100 sápu og MO viðmiðunarbrunnur, sem einungis inniheldur frumur og ræktunaræti.

Hvers vegna aukinn lífvænleiki mældist þegar krabbameinslyf voru sett út á frumurækt er því ekki að fullu ljóst. Í byrjun var miðað við mælda helmingunardrápsstyrki krabbameinslyfja sem fengust úr fyrri tilraunum og raðþynningarstyrkir valdir út frá þeim gildum. Þegar aukinn lífvænleiki mældist var prófað að auka raðþynningarstyrki um allt að tífalt ná fram frumudeyðandi áhrifum. Hins vegar jókst lífvænleiki þá enn frekar. Þá var aftur farið í styrki í kringum helmingunardrápsstyrki frá fyrri tilraunum en lífvænleikinn mældist þó enn yfir 100%. Dregin var sú ályktun að MO brunnar, sem einungis innihéldu frumur í RPMI æti með 10% FBS og 1% penicillin-streptómýcín, væru ekki hentug viðmið til að meta 100% lífvænleika. Áhugavert hefði verið að mæla ATP-magn í MO brunnum við útbúning lyfjabakka og miða það við 100% frumulifun. Önnur kenning er sú að það hafi verið of margar frumur í brunnum frá byrjun. Þar sem frumulínur eru næmari en ferskar æxlisfrumur úr sjúklingi fyrir frumudeyðandi lyfjum var almennt miðað við 10.000 frumur í hverjum brunni.⁹⁶ Þegar óvenju lítið magn ATP mældist í viðmiðunarbrunnum var prófað að setja 5000 frumur í hvern brunn. ATP gildin hækkuðu í einhverjum tilvikum en í öðrum tilvikum ekki. Það var því ekki hægt að sýna með skýrum hætti að frumulifun aukist þegar færri frumur

eru settar í hvern brunn. TCA-100 aðferðin miðast við að settar eru 20.000 í hvern brunn í mælingum á ferskum æxlisfrumum úr sjúklingi en vegna mikillar næmni aðferðarinnar er hægt að nota einungis 2000-5000 frumur í hverjum brunni í mælingum á frumulínum.⁹⁵ Þrátt fyrir að krabbameinslyf virtust vera að auka lífvænleika PC-3 dró strax úr þeim áhrifum þegar kúrkúmín var sett á til viðbótar sem bendir til að kúrkúmín sé að hafa hamlandi áhrif á krabbameinsfrumur.

Nú mætti spyrja hvers vegna ekki var stuðst við þær frumulínur sem áður hafa verið prófaðar með þessari aðferð, svosem MCF-7 frumulínu úr brjóstakrabbameini.⁹⁷ Kúrkúmín hefur reynst örva sjálfstýrðan frumudauða og auka lyfjanæmi MCF-7 fyrir ýmsum frumudeyðandi lyfjum.¹²⁴ Því hefði vissulega verið áhugavert að sjá hvort sömu niðurstöður fengjust með ATP-ljómunaraðferð (ATP-TCA) en ekki er vitað til þess að kúrkúmín hafi verið prófað til viðbótar krabbameinslyfjum á MCF-7 með ATP-TCA. PC-3 frumulína varð fyrir valinu þar sem kúrkúmín hefur reynst hafa öflug hamlandi áhrif á blöðruhálskirtilsæxlisfrumur og eru frekari rannsóknir á áhrifum kúrkúmíns á PC-3 áætlaðar í sumar.^{82,102} Þar að auki var áætlað að athuga áhrif kúrkúmíns á ferskar blöðruhálskirtilsæxlisfrumur úr sjúklingi og bera það saman við áhrif kúrkúmíns á frumulínur og blöðruhálskirtli. Lítið skaf úr blöðruhálskirtilsæxli var fengið frá þvagfæraskurðdeild Landspítala og ræktað upp í sérstöku frumuæti sem ætlað er ferskum blöðruhálskirtilsæxlisfrumum úr sjúkling. Eftir tvo daga í ræktunarskáp var hins vegar komin sýking í ræktunarflöskuna. Ræktunarætið innihélt sýklalyf en ekki sveppalyf og var því líklega um sveppasýkingu að ræða. Búið er að gera ráðstafanir til þess að sýni geti farið beint í lausn með sýkla- og sveppalyfjum á skurðstofunni. Frumutalning gaf þar að auki aðeins $2,01 \cdot 10^4$ frumur/mL og í 6 mL voru þá 120.000 frumur. Þetta eru mjög fáar frumur miðað við það sem búist var við og því ekki víst hvort þær hafi þolað einangrunar- og ræktunarskilyrðin. Ekki fengust fleiri sýni frá sjúklingum með blöðruhálskirtilskrabbamein á tímabilinu, en stefnt er að því að halda áfram prófunum í nánustu framtíð og athuga hvort rækta megi upp frumurnar.

Kúrkúmín var greinilega að auka frumudeyðandi áhrif hefðbundinna krabbameinslyfja á ferskar æxlisfrumur í eggjastokkum þar sem marktækur munur sást í öllum tilvikum nema þegar tóþótekan var prófað. Var þá einungis um tæknilega örðugleika við framkvæmd tilraunar að ræða þar sem of fáir brunnar voru mældir. Ekki er vitað til þess að rannsóknir á kúrkúmíni til viðbótar krabbameinslyfjum á æxlisfrumur úr langt komnu eggjastokkameini hafi verið gerðar og því hefði verið áhugavert að skoða áhrif kúrkúmíns á æxlisfrumurnar frekar, en ekki fengust fleiri sýni meðan á rannsóknartímabili stóð. Kúrkúmín verður þó notað

til frekari rannsókna í sumar til að fá betri sýn yfir frumudeyðandi áhrif þess á ferskar æxlisfrumur úr eggjastokkum. Þar sem ekki var stuðst við neinar fyrri rannsóknir var ekki ljóst hversu mikill styrkur kúrkúmíns hefði viðbótaráhrif á frumudeyðandi áhrif krabbameinslyfja heldur var notast við styrk sem hefur verið notaður í sambærilegum rannsóknum.¹²⁵⁻¹²⁷ Dæmi eru um rannsóknir sem nota styrki kúrkúmíns frá 1-50 μM og hefði því verið áhugavert að prófa fleiri styrki kúrkúmíns til að sjá hvaða styrkur hefði mestu áhrifin til viðbótar krabbameinslyfjum, en slíkar rannsóknir eru áformaðar. Þar sem krabbameinslyfin höfðu svo til 100% áhrif á frumudráp sáust eðlilega engin viðbótaráhrif þegar kúrkúmíni var bætt við en kúrkúmín gat hins vegar aukið frumudrepandi áhrif krabbameinslyfja til muna þegar þau náðu ekki frumudrápi ein og sér og hefur kúrkúmín hrein og bein mögnunaráhrif á verkun topotekans. Eins og áður sagði eru þær niðurstöður þó ekki marktækar sökum þess að aðeins var um tvo brunna að ræða í stað þriggja eins og áætlað var, en það var vegna þess að frumulausnin entist ekki á alla brunna bakkans. Sérstaklega er áhugavert að skoða nánar áhrif kúrkúmíns til viðbótar við topotekan á ferskar æxlisfrumur úr langt komnu eggjastokkameini. Topotekan er meðferðarmöguleiki við meinvarpandi eggjastokkakrabbameini sem bregst ekki lengur við meðferð með taxönum og platínum lyfjum. Topotekan hindrar topoisomerasa I og hefur auk þess hindrunaráhrif á HIF, sem er meðal sameindaskotmarka kúrkúmíns.¹²⁸ Ekki er þó ljóst hvernig kúrkúmín er að hafa áhrif í samblandi við topotekan. Auk þess að prófa fleiri kúrkúmín styrki hefði einnig verið áhugavert að prófa krabbameinslyfin í fleiri styrkjum, og þá sérstaklega þau sem náðu svo til fullkomnu frumudrápi, og skoða viðbótar áhrif kúrkúmíns með lægri styrkjum sem ekki næðu fullkomnu frumudrápi.

Vert er að minnast á að við fengum vökvásýni sem safnað var við skurðaðgerð á nýgreindu eggjastokkakrabbameini. Sömu aðferðir voru notaðar við einangrun og ræktun krabbameinsfrumna en hins vegar ræktuðust fáar sem engar frumur. Það bendir til að sú aðferð sem notuð er til einangrunar á vökvásýnum úr langt komnu eggjastokkakrabbameini henti ekki vökvásýnum sem safnað er við aðgerð. Hins vegar bærust ekki fleiri sýni á verkefnistímabilinu og því ekki hægt að segja til um ástæðu þess að frumur ræktuðust ekki. Má jafnvel vera að fáar frumur hafi fundist í sýninu. Þar sem einangrunaraðferðin byggist á því að illkynja frumur ræktist en að útiloka eðlilegar frumur er möguleiki að einungis eðlilegar frumur hafi verið í sýninu og því hafi ekkert ræktast. Þetta er eitthvað sem áhugavert væri að skoða nánar þar sem lyfjanæmisprófun væri sérstaklega hentug á meðan æxlið er staðbundið í eggjastokkum.

Rannsóknarverkefnið snerist að miklu leyti um þróunarvinnu á aðferðum og stendur sú vinna enn yfir þar ýmsar breytur þarf að skoða og lagfæra til að meta áhrif kúrkúmíns á

lyfjanæmi krabbameinsfrumna að fullu. Niðurstöðurnar benda þó vissulega til þess að vert er að rannsaka nánar áhrif kúrkúmíns á lyfjanæmi eggjastokkakrabbameinsfrumna úr sjúklingum og jafnvel á öðrum æxlisvefjum.

Lokaorð

Umfangsmiklar rannsóknir síðastliðnu áratugi hafa leitt í ljós að meinmyndun krabbameins og annarra langvinnra sjúkdóma byggist á fjölkerfa stökkbreytingum sem verða innan frumna líkamans. Því miða lyfjapróanir að notkun efna sem vinna á mörgum vígstöðvum innan frumna og hafa á sama tíma tiltölulega vægar aukaverkanir í för með sér. Vaxandi áhugi hefur verið á svokölluðum plöntuefnum (e. phytochemicals) og hafa flest þeirra reynst búa yfir krabbameinshamlandi eiginleikum með því að stöðva frumuhring og framkalla sjálfstýrðan frumudauða. Þar er kúrkúmín fremst meðal jafningja og hefur áhrif á fjölmörg sameindaskotmörk sem gegna lykilhlutverki í illkynja æxlismyndun. Rannsóknir á kúrkúmíni beinast nú að því að ná fram frumudrepandi áhrifum þess innan líkamans með því að draga úr niðurbroti og auka stöðugleika. Samkvæmt gagnagrunni Clinicaltrials.gov eru 31 klínískar rannsóknir í gangi um þessar mundir á krabbameinshamlandi áhrifum kúrkúmíns en eins og gildir um hvert annað efni úr náttúrunni þarf að rannsaka eiginleika þess og áhrif gaumgæfilega áður en tekin er upp almenn notkun í meðferðarskyni. Lofandi eiginleikar kúrkúmíns gefa þó góða von í krabbameinsrannsókum um mögulegt skotmark sem vinnur gegn æxlisfrumum á skilvirkan hátt.

Þakkarorð

Ég vil þakka leiðbeinendum mínum, Dr. Helga Sigurðssyni prófessor og Dr. Finnboga R. Þormóðssyni kærlega fyrir alla aðstoð, samstarf og gagnlegar ábendingar. Starfsfólk ValaMed fær kærar þakkir fyrir notkun á aðstöðu og búnaði. Jóni M. Einarssyni, Genís, vil ég einnig þakka fyrir aðstoð við tölfræðilega úrvinnslu.

Heimildaskrá

1. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer research* 2003;23:363-98.
2. Eigner D, Scholz D. *Ferula asa-foetida* and *Curcuma longa* in traditional medical treatment and diet in Nepal. *Journal of ethnopharmacology* 1999;67:1-6.
3. Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti F, Torti S. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2008;65:1631-52.
4. Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends in pharmacological sciences* 2009;30:85-94.
5. Mullaicharam A, Maheswaran A. *Pharmacological effects of curcumin*; 2012.
6. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Advances in experimental medicine and biology* 2007;595:1-75.
7. Tayyem RF, Heath DD, Al-Delaimy WK, Rock CL. Curcumin content of turmeric and curry powders. *Nutrition and Cancer* 2006;55:126-31.
8. Shen L, Ji HF. Theoretical study on physicochemical properties of curcumin. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 2007;67:619-23.
9. Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 1997;15:1867-76.
10. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular pharmaceutics* 2007;4:807-18.
11. Ireson C, Orr S, Jones DJ, et al. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Res* 2001;61:1058-64.
12. Osawa T, Sugiyama Y, Inayoshi M, Kawakishi S. Antioxidative activity of tetrahydrocurcuminoids. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 1995;59:1609-12.
13. Wahlstrom B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta pharmacologica et toxicologica* 1978;43:86-92.

14. Perkins S, Verschoyle RD, Hill K, et al. Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the min/+ mouse, a model of familial adenomatous polyposis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2002;11:535-40.
15. Ravindranath V, Chandrasekhara N. Metabolism of curcumin--studies with [³H]curcumin. *Toxicology* 1981;22:337-44.
16. Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos* 1999;27:486-94.
17. Garcea G, Jones DJ, Singh R, et al. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *British journal of cancer* 2004;90:1011-5.
18. Shankar TN, Shantha NV, Ramesh HP, Murthy IA, Murthy VS. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats, guineapigs & monkeys. *Indian journal of experimental biology* 1980;18:73-5.
19. Lao CD, Ruffin MT, Normolle D, et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC complementary and alternative medicine* 2006;6:10.
20. Deodhar SD, Sethi R, Srimal RC. Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane). *The Indian journal of medical research* 1980;71:632-4.
21. Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer research* 2001;21:2895-900.
22. Gupta B, Kulshrestha VK, Srivastava RK, Prasad DN. Mechanisms of curcumin induced gastric ulcer in rats. *The Indian journal of medical research* 1980;71:806-14.
23. Sharma RA, Euden SA, Platton SL, et al. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004;10:6847-54.
24. Zhang W, Tan TM, Lim LY. Impact of Curcumin-Induced Changes in P-Glycoprotein and CYP3A Expression on the Pharmacokinetics of Peroral Celiprolol and Midazolam in rats. *Drug Metab Dispos* 2007;35:110-5.
25. Shah BH, Nawaz Z, Pertani SA, et al. Inhibitory effect of curcumin, a food spice from turmeric, on platelet-activating factor- and arachidonic acid-mediated platelet aggregation through inhibition of thromboxane formation and Ca²⁺ signaling. *Biochem Pharmacol* 1999;58:1167-72.

26. Bano G, Raina RK, Zutshi U, Bedi KL, Johri RK, Sharma SC. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy volunteers. *European journal of clinical pharmacology* 1991;41:615-7.
27. Ohori H, Yamakoshi H, Tomizawa M, et al. Synthesis and biological analysis of new curcumin analogues bearing an enhanced potential for the medicinal treatment of cancer. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2563-71.
28. Preetha A, Banerjee R, Huilgol N. Tensiometric profiles and their modulation by cholesterol: Implications in cervical cancer. *Cancer Invest* 2007;25:172-81.
29. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PSSR. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med* 1998;64:353-6.
30. Verma SP, Salamone E, Goldin B. Curcumin and genistein, plant natural products, show synergistic inhibitory effects on the growth of human breast cancer MCF-7 cells induced by estrogenic pesticides. *Biochemical and biophysical research communications* 1997;233:692-6.
31. Balasubramanian S, Eckert RL. Green tea polyphenol and curcumin inversely regulate human involucrin promoter activity via opposing effects on CCAAT/enhancer-binding protein function. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:24007-14.
32. John VD, Kuttan G, Krishnankutty K. Anti-tumour studies of metal chelates of synthetic curcuminoids. *J Exp Clin Cancer Res* 2002;21:219-24.
33. Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic oncology* 2008;26:57-64.
34. Anand P, Nair HB, Sung B, et al. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. *Biochem Pharmacol* 2010;79:330-8.
35. Tonnesen HH, Masson M, Loftsson T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int J Pharm* 2002;244:127-35.
36. Clark AP. Liposomes as drug delivery systems. *Cancer Pract* 1998;6:251-3.
37. Li L, Braithe FS, Kurzrock R. Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. *Cancer* 2005;104:1322-31.
38. Narayanan NK, Nargi D, Randolph C, Narayanan BA. Liposome encapsulation of curcumin and resveratrol in combination reduces prostate cancer incidence in PTEN

- knockout mice. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2009;125:1-8.
39. Ma Z, Shayeganpour A, Brocks DR, Lavasanifar A, Samuel J. High-performance liquid chromatography analysis of curcumin in rat plasma: application to pharmacokinetics of polymeric micellar formulation of curcumin. *Biomedical chromatography : BMC* 2007;21:546-52.
 40. Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, Saha BP, Mukherjee PK. Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *Int J Pharm* 2007;330:155-63.
 41. Singh S, Aggarwal BB. Activation of Transcription Factor NF- κ B Is Suppressed by Curcumin (Diferuloylmethane). *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:24995-5000.
 42. Gupta SC, Patchva S, Koh W, Aggarwal BB. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2012;39:283-99.
 43. Srimal RC, Dhawan BN. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 1973;25:447-52.
 44. Aggarwal BB, Sethi G, Baladandayuthapani V, Krishnan S, Shishodia S. Targeting cell signaling pathways for drug discovery: an old lock needs a new key. *Journal of cellular biochemistry* 2007;102:580-92.
 45. Lin JK. Molecular targets of curcumin. *Advances in experimental medicine and biology* 2007;595:227-43.
 46. Funk JL, Oyarzo JN, Frye JB, et al. Turmeric extracts containing curcuminoids prevent experimental rheumatoid arthritis. *Journal of natural products* 2006;69:351-5.
 47. Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 2004;6:203-8.
 48. Ahn KS, Aggarwal BB. Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005;1056:218-33.
 49. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews Immunology* 2003;3:745-56.
 50. Shishodia S, Amin HM, Lai R, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem Pharmacol* 2005;70:700-13.

51. Rao CV. Regulation of COX and LOX by curcumin. *Advances in experimental medicine and biology* 2007;595:213-26.
52. Bharti AC, Donato N, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. *J Immunol* 2003;171:3863-71.
53. Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP Kinases Are Regulated. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:14843-6.
54. Chen YR, Tan TH. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene* 1998;17:173-8.
55. Balogun E, Hoque M, Gong P, et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *The Biochemical journal* 2003;371:887-95.
56. Bhaumik S, Anjum R, Rangaraj N, Pardhasaradhi BV, Khar A. Curcumin mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves the production of reactive oxygen intermediates. *FEBS letters* 1999;456:311-4.
57. Chen HW, Huang HC. Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *British journal of pharmacology* 1998;124:1029-40.
58. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-62.
59. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
60. Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB, Diederich M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 2008;76:1340-51.
61. Somasundaram S, Edmund NA, Moore DT, Small GW, Shi YY, Orlowski RZ. Dietary Curcumin Inhibits Chemotherapy-induced Apoptosis in Models of Human Breast Cancer. *Cancer Research* 2002;62:3868-75.
62. de Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, Baak JP. Expression of growth factors, growth factor receptors and apoptosis related proteins in invasive breast cancer: relation to apoptotic rate. *Breast Cancer Res Treat* 2001;66:201-8.
63. Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006;12:5268-72.

64. Astsaturov I, Cohen RB, Harari P. Targeting epidermal growth factor receptor signaling in the treatment of head and neck cancer. *Expert review of anticancer therapy* 2006;6:1179-93.
65. Gupta B, Ghosh B. Curcuma longa inhibits TNF-alpha induced expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells. *Int J Immunopharmacology* 1999;21:745-57.
66. Mukhopadhyay A, Banerjee S, Stafford LJ, Xia C, Liu M, Aggarwal BB. Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with down-regulation of cyclin D1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene* 2002;21:8852-61.
67. John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathology oncology research : POR* 2001;7:14-23.
68. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: An "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Letters* 2008;267:133-64.
69. Ukil A, Maity S, Karmakar S, Datta N, Vedasiromoni JR, Das PK. Curcumin, the major component of food flavour turmeric, reduces mucosal injury in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *British journal of pharmacology* 2003;139:209-18.
70. Sidhu GS, Singh AK, Thaloor D, et al. Enhancement of wound healing by curcumin in animals. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 1998;6:167-77.
71. Rafatullah S, Tariq M, Al-Yahya MA, Mossa JS, Ageel AM. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. *Journal of ethnopharmacology* 1990;29:25-34.
72. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": From kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 2008;75:787-809.
73. Ramirez-Tortosa MC, Mesa MD, Aguilera MC, et al. Oral administration of a turmeric extract inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999;147:371-8.
74. Sui Z, Salto R, Li J, Craik C, Ortiz de Montellano PR. Inhibition of the HIV-1 and HIV-2 proteases by curcumin and curcumin boron complexes. *Bioorg Med Chem* 1993;1:415-22.
75. Zhou HY, Beevers CS, Huang SL. The Targets of Curcumin. *Current Drug Targets* 2011;12:332-47.

76. Koo JY, Kim HJ, Jung KO, Park KY. Curcumin inhibits the growth of AGS human gastric carcinoma cells in vitro and shows synergism with 5-fluorouracil. *Journal of medicinal food* 2004;7:117-21.
77. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 2011;61:69-90.
78. Krabbamein á Íslandi. Upplýsingar úr Krabbameinsskrá fyrir tímabilið 1957-2006: Krabbameinsfélagið; 2008.
79. Anderson JF, Swanson DA, Levy LB, et al. Urinary Side Effects and Complications After Permanent Prostate Brachytherapy: The MD Anderson Cancer Center Experience. *Urology* 2009;74:601-5.
80. Bolla M, Collette L, Blank L, et al. Long-term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer (an EORTC study): a phase III randomised trial. *Lancet* 2002;360:103-6.
81. Kelly WK, Scher HI. Prostate specific antigen decline after antiandrogen withdrawal: the flutamide withdrawal syndrome. *The Journal of urology* 1993;149:607-9.
82. Aggarwal BB. Prostate cancer and curcumin: add spice to your life. *Cancer Biol Ther* 2008;7:1436-40.
83. Fuchs JR, Pandit B, Bhasin D, et al. Structure-activity relationship studies of curcumin analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2009;19:2065-9.
84. Hunn J, Rodriguez GC. Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clinical obstetrics and gynecology* 2012;55:3-23.
85. Oberaigner W, Minicozzi P, Bielska-Lasota M, et al. Survival for Ovarian Cancer in Europe: The across-country variation did not shrink in the past decade. *Acta Oncol* 2012;51:441-53.
86. Rocconi RP, Case AS, Straughn JM, Jr., Estes JM, Partridge EE. Role of chemotherapy for patients with recurrent platinum-resistant advanced epithelial ovarian cancer: A cost-effectiveness analysis. *Cancer* 2006;107:536-43.
87. Huang S, Robinson JB, Deguzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. *Cancer Res* 2000;60:5334-9.
88. Zheng LD, Tong QS, Wu CH. [Inhibitory effects of curcumin on apoptosis of human ovary cancer cell line A2780 and its molecular mechanism]. *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer* 2002;21:1296-300.

89. Goel A, Aggarwal BB. Curcumin, the Golden Spice From Indian Saffron, Is a Chemosensitizer and Radiosensitizer for Tumors and Chemoprotector and Radioprotector for Normal Organs. *Nutrition and Cancer-an International Journal* 2010;62:919-30.
90. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature reviews Cancer* 2002;2:48-58.
91. Johnstone RW, Cretney E, Smyth MJ. P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death. *Blood* 1999;93:1075-85.
92. Cree IA, Kurbacher CM. ATP-based tumor chemosensitivity testing: assisting new agent development. *Anti-cancer drugs* 1999;10:431-5.
93. Havrilesky LJ, Krivak TC, Mucenski JW, Myers ER. Impact of a chemoresponse assay on treatment costs for recurrent ovarian cancer. *American journal of obstetrics and gynecology* 2010;203:160 e1-7.
94. Cree IA, Andreotti PE. Measurement of cytotoxicity by ATP-based luminescence assay in primary cell cultures and cell lines. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 1997;11:553-6.
95. Andreotti PE, Cree IA, Kurbacher CM, et al. Chemosensitivity Testing of Human Tumors Using a Microplate Adenosine-Triphosphate Luminescence Assay - Clinical Correlation for Cisplatin Resistance of Ovarian-Carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:5276-82.
96. Andreotti PE, Linder D, Hartmann DM, Cree IA, Pazzagli M, Bruckner HW. TCA-100 Tumor Chemosensitivity Assay - Differences in Sensitivity between Cultured Tumor Cell Lines and Clinical Studies. *Journal of bioluminescence and chemiluminescence* 1994;9:373-8.
97. Kangas L, Gronroos M, Nieminen AL. Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents in vitro. *Med Biol* 1984;62:338-43.
98. Crouch SP. Biocompatibility testing using ATP bioluminescence. *Medical device technology* 2000;11:12-5.
99. Petty RD, Sutherland LA, Hunter EM, Cree IA. Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *Journal of bioluminescence and chemiluminescence* 1995;10:29-34.
100. Bava SV, Puliappadamba VT, Deepti A, Nair A, Karunagaran D, Anto RJ. Sensitization of taxol-induced apoptosis by curcumin involves down-regulation of

- nuclear factor-kappa B and the serine/threonine kinase Akt and is independent of tubulin polymerization. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:6301-8.
101. Aggarwal BB, Shishodia S, Takada Y, et al. Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005;11:7490-8.
 102. Deeb DD, Jiang H, Gao X, Divine G, Dulchavsky SA, Gautam SC. Chemosensitization of hormone-refractory prostate cancer cells by curcumin to TRAIL-induced apoptosis. *Journal of experimental therapeutics & oncology* 2005;5:81-91.
 103. Yallapu MM, Maher DM, Sundram V, Bell MC, Jaggi M, Chauhan SC. Curcumin induces chemo/radio-sensitization in ovarian cancer cells and curcumin nanoparticles inhibit ovarian cancer cell growth. *Journal of Ovarian Research* 2010;3.
 104. Piwocka K, Bielak-Mijewska A, Sikora E. Curcumin induces caspase-3-independent apoptosis in human multidrug-resistant cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002;973:250-4.
 105. Kumar N. Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action. *The Journal of biological chemistry* 1981;256:10435-41.
 106. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *The New England journal of medicine* 1996;334:1-6.
 107. Dong QG, Scwab GM, Fujioka S, et al. The function of multiple IkappaB : NF-kappaB complexes in the resistance of cancer cells to Taxol-induced apoptosis. *Oncogene* 2002;21:6510-9.
 108. Guerittevoegelein F, Guenard D, Lavelle F, Legoff MT, Mangatal L, Potier P. Relationships between the Structure of Taxol Analogs and Their Antimitotic Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 1991;34:992-8.
 109. Fornari FA, Randolph JK, Yalowich JC, Ritke MK, Gewirtz DA. Interference by Doxorubicin with DNA Unwinding in MCF-7 Breast-Tumor Cells. *Molecular Pharmacology* 1994;45:649-56.
 110. Petrioli R, Fiaschi AI, Francini E, Pascucci A, Francini G. The role of doxorubicin and epirubicin in the treatment of patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer treatment reviews* 2008;34:710-8.
 111. Hande KR. Etoposide pharmacology. *Seminars in oncology* 1992;19:3-9.

112. CELLnTEC. Prostate Epithelium cell Isolation.
113. Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr* 2010;103:1545-57.
114. Dhar S, Gu FX, Langer R, Farokhzad OC, Lippard SJ. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105:17356-61.
115. Elbayoumi TA, Torchilin VP. Enhanced cytotoxicity of monoclonal anticancer antibody 2C5-modified doxorubicin-loaded PEGylated liposomes against various tumor cell lines. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007;32:159-68.
116. Kojima K, Fujita Y, Nozawa Y, Deguchi T, Ito M. MiR-34a Attenuates Paclitaxel-Resistance of Hormone-Refractory Prostate Cancer PC3 Cells Through Direct and Indirect Mechanisms. *Prostate* 2010;70:1501-12.
117. Qi WX, Shen Z, Yao Y. Docetaxel-based therapy with or without estramustine as first-line chemotherapy for castration-resistant prostate cancer: a meta-analysis of four randomized controlled trials. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137:1785-90.
118. Song S, Wientjes MG, Gan Y, Au JL. Fibroblast growth factors: an epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97:8658-63.
119. van Brussel JP, van Steenbrugge GJ, Romijn JC, Schröder FH, Mickisch GHJ. Chemosensitivity of prostate cancer cell lines and expression of multidrug resistance-related proteins. *European Journal of Cancer* 1999;35:664-71.
120. Jones MN. Surfactants in membrane solubilisation. *Int J Pharm* 1999;177:137-59.
121. Vondráček J, Souček K, Sheard MA, et al. Dimethyl sulfoxide potentiates death receptor-mediated apoptosis in the human myeloid leukemia U937 cell line through enhancement of mitochondrial membrane depolarization. *Leukemia Research* 2006;30:81-9.
122. Al-Ghamdi SS. Time and dose dependent study of doxorubicin induced DU-145 cytotoxicity. *Drug Metab Lett* 2008;2:47-50.
123. Takeda M, Mizokami A, Mamiya K, et al. The establishment of two paclitaxel-resistant prostate cancer cell lines and the mechanisms of paclitaxel resistance with two cell lines. *Prostate* 2007;67:955-67.
124. Banerjee M, Singh P, Panda D. Curcumin suppresses the dynamic instability of microtubules, activates the mitotic checkpoint and induces apoptosis in MCF-7 cells. *The FEBS journal* 2010;277:3437-48.

125. Yallapu MM, Maher DM, Sundram V, Bell MC, Jaggi M, Chauhan SC. Curcumin induces chemo/radio-sensitization in ovarian cancer cells and curcumin nanoparticles inhibit ovarian cancer cell growth. *J Ovarian Res* 2010;3:11.
126. Kang HJ, Lee SH, Price JE, Kim LS. Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB in breast cancer cells and potentiates the growth inhibitory effect of paclitaxel in a breast cancer nude mice model. *The breast journal* 2009;15:223-9.
127. Du B, Jiang L, Xia Q, Zhong L. Synergistic inhibitory effects of curcumin and 5-fluorouracil on the growth of the human colon cancer cell line HT-29. *Chemotherapy* 2006;52:23-8.
128. Gore M, ten Bokkel Huinink W, Carmichael J, et al. Clinical evidence for topotecan-paclitaxel non--cross-resistance in ovarian cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2001;19:1893-900.