



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

**Φωτοφυσικές ιδιοότητες της Χλωροαλούμινο Φθαλοκυανίνης (AlClPc) και
μελέτη της Φωτοδυναμικής Δράσης in vitro
σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΓΕΩΡΓΙΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΕΝΗΣ

ΦΥΣΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΠΑΤΡΩΝ

Επιβλέπουσα:
Διδώ Γιόβα, Ομότιμη Καθηγήτρια ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ 2015



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

**Φωτοφυσικές ιδιοότητες της Χλωροαλούμινο Φθαλοκυανίνης (AlClPc) και
μελέτη της Φωτοδυναμικής Δράσης in vitro
σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΓΕΩΡΓΙΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΕΝΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Διδώ Γιόβα, Ομότιμη Καθηγήτρια ΕΜΠ

Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΜΠ

Μιχαήλ Ράλλης, Επίκουρος Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α

ΑΘΗΝΑ 2015

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Η/Υ Ε.Μ.Π υπό την επίβλεψη της διευθύντριας του εργαστηρίου καθηγήτριας κ. Διδούς Γιόβα.

Θα ήθελα πρώτα από όλα να ευχαριστήσω την διευθύντρια κ.Διδώ Γιόβα για την δυνατότητα και την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την παρούσα διπλωματική εργασία. Χωρίς την εμπιστοσύνη της δεν θα μπορούσα να κάνω πράξη ένα μέρος από το όνειρο και το πάθος που τρέφω για την έρευνα.

Ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη και τις θερμές μου ευχαριστίες οφείλω στην ουσιαστική επιβλέπουσα της εργασίας μου κ. Αλεξανδράτου Ελένη για την συνεργασία μας. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την ενθάρρυνση, την εμπύχωση και την υποστήριξη που μου έδειξε. Η συμβολή της ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου. Η καθοδήγησή της καθ' όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας ήταν ουσιαστική και καταλυτική αφού χωρίς αυτή δεν θα μπορούσαν να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα και οι δυσκολίες που παρουσιάστηκαν.

Ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, τον κ. Πολιτόπουλο Κων/νο, τον κ. Θύμη Σπύρο και τους υποψήφιους διδάκτορες Σάντυ, Γιώργο, Στέλιο, Τάσο, Κατερίνα και Μαρία για το εξαιρετικά φιλικό κλίμα που δημιούργησαν. Οι ώρες που χρειάστηκε να αφιερώσω για να φέρω εις πέρας την εργασία μου ήταν πολλές και η όμορφη παρέα τους τις έκανε ιδιαίτερα ευχάριστες.

Στους φίλους μου που με στήριξαν και με ενθάρρυναν ψυχολογικά, ένα ευχαριστώ δεν είναι αρκετό για να τους δείξω την ευγνωμοσύνη που τους οφείλω. Χωρίς την Μαργαρίτα, την Νατάσα, την Έφη και τον Σωτήρη δεν θα τα είχα καταφέρει. Η ενθάρρυνσή τους, η κατανόηση και η υποστήριξη που μου έδειξαν και συνεχίζουν να μου δείχνουν με συγκινεί ιδιαίτερα. Σε στιγμές δύσκολες που όλα φάνταζαν μάταια, αυτοί ήταν εκεί για να μου δίνουν δύναμη, θάρρος και κουράγιο.

Τα λόγια δεν είναι αρκετά για να εκφράσω τις ευχαριστίες, την αγάπη και όλα όσα οφείλω στην οικογένειά μου. Πρώτα στον πατέρα μου, ο οποίος μπορεί να μην βρίσκεται κοντά μας όμως είναι πάντα δίπλα μας, ένα τεράστιο ευχαριστώ για την αγάπη και πίστη που μου έδειχνε. Στην μητέρα μου που τα τελευταία χρόνια στέκεται ως μάνα και πατέρας στο πλάι μου. Στον αδερφό μου, που χωρίς αυτόν δεν θα είχα πραγματοποιήσει το μεταπτυχιακό αυτό. Χωρίς αυτούς δεν θα είχα καταφέρει να ξεπεράσω τις τόσες δυσκολίες που συνάντησα, ειδικά τα τελευταία 7 χρόνια. Πάντα δίπλα μου να μου θυμίζουν την αγάπη τους και την εμπιστοσύνη

τους σε μένα με τη στήριξή τους, την κατανόηση και τη συμπαράστασή τους.
Παράλληλα με το ευχαριστώ και ένα συγγνώμη για όσες φορές τους απογοήτευσα.

Περίληψη

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί ένα από τα πιο συχνά εμφανιζόμενα είδη καρκίνου στους άντρες την σημερινή εποχή. Πρόκειται για ένα είδος καρκίνου που δεν εμφανίζει καθόλου συμπτώματα στα πρώτα στάδια της νόσου με αποτέλεσμα να μην είναι ανιχνεύσιμος παρά στα τελικά στάδια αυτής. Για την αντιμετώπισή του εφαρμόζονται διάφορες θεραπευτικές μέθοδοι όπως η χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία, η προστατεκτομή και άλλες. Πρόκειται για θεραπείες οι οποίες όχι μόνο είναι ιδιαίτερα επώδυνες για τον ασθενή αλλά μετά το πέρας αυτών η λειτουργία του προστατικού αδένου δεν αποκαθίσταται πλήρως. Η ανάγκη για απαλλαγή από τις παρενέργειες που σχετίζονται με τις παραπάνω συμβατικές θεραπευτικές μεθόδους οδήγησε στην αναζήτηση νέων θεραπειών. Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μια από αυτές.

Η φωτοδυναμική είναι μια καινοτόμος ελάχιστα επεμβατική μέθοδος. Βασίζεται στην συνδυασμένη δράση τριών στοιχείων: του φωτός, ενός φωτοευαισθητοποιητή και του οξυγόνου. Η νέκρωση του καρκινικού ιστού επιτυγχάνεται από τις ελεύθερες ρίζες και το δραστικό μονήρες οξυγόνο που προκύπτουν από τις φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου I και II αντίστοιχα. Οι φωτοευαισθητοποιητές είναι φυσικές ή χημικές ουσίες που απορροφούν ορατή ακτινοβολία και ενεργοποιούν τις φωτοχημικές αντιδράσεις τύποι I και II. Πολλοί διαφορετικοί φωτοευαισθητοποιητές έχουν μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί με το πέραςμα των χρόνων.

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη της αποτελεσματικότητας της φωτοδυναμικής θεραπείας ενάντια στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη (LNCaP) με φωτοευαισθητοποιητή την χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη, AICIPc. Η AICIPc είναι ένας φωτοευαισθητοποιητής 2^{ης} γενιάς, ο οποίος έχει δώσει ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποτελέσματα σε κλινικές έρευνες διαφόρων ειδών καρκίνου. Για πρώτη φορά στην εργασία αυτή μελετήθηκε η δράση της ενάντια στον καρκίνο του προστάτη.

Αρχικά μελετήθηκαν οι φωτοφυσικές ιδιότητες της φθαλοκυανίνης. Συλλέχθηκαν τα φάσματα απορρόφησης της ουσίας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και σε διαφορετικούς διαλύτες και υπολογίστηκε ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης ε. Επίσης συλλέχθηκαν τα φάσματα φθορισμού της ουσίας σε ένα εύρος συγκεντρώσεων. Σημαντικό κομμάτι της εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της ικανότητας της AICIPc να παράγει ελεύθερες ρίζες. Για την μελέτη αυτή καθώς και για τις φωτοδυναμικές μελέτες δημιουργήθηκε στο εργαστήριο ειδική διάταξη ακτινοβολίας των διαλυμάτων της φθαλοκυανίνης με laser μήκους κύματος 660 nm. Η ικανότητα της AICIPc να παράγει ελεύθερες ρίζες συγκρίθηκε με τον βασικό

ανταγωνιστή της, την φθαλοκυανίνη ψευδαργύρου ZnPC. Τα πειράματα κατέδειξαν πιο δραστικό φωτοευαισθητοποιητή την AlClPC.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η δράση της AlClPC σε κυτταρικό επίπεδο. Αρχικά εξετάστηκε η βιοτοξικότητα της φθαλοκυανίνης απουσία φωτός αλλά και του φωτός ακτινοβολήσης απουσία φωτοευαισθητοποιητή, ώστε να προσδιοριστούν οι συνθήκες εκείνες, συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιητή και ισχύς ακτινοβολήσης, οι οποίες από μόνες τους να μην επηρεάζουν την κυτταρική βιωσιμότητα. Προσδιορίστηκαν επίσης η μέγιστη συγκέντρωση της ουσίας στα LNCaP κύτταρα αλλά και ο χρόνος στον οποίο αυτή παρατηρείται.

Το τελευταίο μέρος της διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η φωτοδυναμική θεραπεία στα LNCaP κύτταρα. Στα πειράματα αυτά τα κύτταρα επώαστηκαν με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις της AlClPC, τις 0.5 μM και 1 μM . Ο χρόνος επώασης ήταν σταθερός στις 24 ώρες ενώ οι συνθήκες ακτινοβολήσης ήταν 6 mW/cm^2 και οι χρόνοι ακτινοβολήσης 60, 120 και 180 sec με συνολικές δόσεις ενέργειας 360, 720 και 1080 mJ/cm^2 αντίστοιχα. Οι μελέτες φωτοδυναμικής θεραπείας έδειξαν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της φωτοευαίσθητης ουσίας κατάφερε να μειώσει την βιωσιμότητα των κυττάρων. Πιο αποτελεσματικός αποδείχθηκε ο συνδυασμός των 1 μM φθαλοκυανίνης με δόση ενέργειας τα 1080 mJ/cm^2 . Χάρη σε αυτά ο κυτταρικός θάνατος κατάφερε να αγγίξει το 22%.

Συνοψίζοντας, η αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη ελέγχθηκε και τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι πρόκειται για έναν ικανό φωτοευαισθητοποιητή με ένα πολλά υποσχόμενο μέλλον για την φωτοδυναμική θεραπεία.

Abstract

Prostate cancer is one of the most frequently occurring cancers among men nowadays. This type of cancer does not show any symptoms in its early stages and as a result it is detectable only in the final stages. For its treatment, a number of different methods such as chemotherapy, radiotherapy, prostatectomy and others, are applied. These methods are not only very painful for the patient but also the function of the prostate gland is not fully established at the end. The need to overcome these side effects led to the research of new therapies. Photodynamic therapy is one of them.

Photodynamic therapy is an innovative minimally invasive method. It is based on the combined action of three elements: light, a photosensitizer and oxygen. The necrosis of the tumor tissue is obtained by the free radicals and the reactive singlet oxygen generated by the photochemical reactions of type I and II respectively. The photosensitizers are natural or chemical substances that absorb visible radiation and trigger photochemical reactions of types I and II. Many different photosensitizers have been studied and used over the years.

The purpose of this thesis is to study the effectiveness of aluminophthalocyanine, AlClPc photodynamic therapy against the prostate cancer LNCaP cells. The AlClPc is a second generation photosensitizer which has given particularly good results in clinical studies of various cancer types. For the first time, in this master thesis, its effects against prostate cancer were studied.

First, the photophysical properties of phthalocyanine were studied. For this reason, the absorption spectra of AlClPc were acquired at different concentrations in different solvents and the molar absorption coefficient ϵ was calculated. Also the fluorescence spectra of AlClPc were obtained in a range of concentrations. Another task of this research was the study of AlClPc's ability to produce free radicals. For this study and for the experiments of the photodynamic therapy, a special irradiation system was developed in the laboratory. The ability of AlClPc to produce free radicals was compared with the ability of zinc phthalocyanine ZnPc, its main competitor. The experiments demonstrated aluminophthalocyanine as the most potent photosensitizer.

Subsequently the effect of AlClPc at the cellular level was studied. Firstly the biotoxicity of phthalocyanine alone in the absence of light and of light irradiation only in the absence of photosensitizer, was examined to identify those conditions in which, concentration of photosensitizer and irradiation power, alone do not affect cell viability. The maximum uptake of AlClPc in the LNCaP cells and the time at which this occurs were also determined.

The final part of this thesis was the experiments of photodynamic therapy in LNCaP cells. In these experiments the cells were incubated with two different concentrations of AlClPc, 0.5 μM and 1 μM . The incubation time was stable at 24 hours. The power irradiation was 6 mW/cm^2 , the irradiation time was 60, 120 and 180 sec and the total energy doses 360, 720 and 1080 mJ/cm^2 . The photodynamic therapy studies showed that the increase of photosensitizer's concentration was able to reduce cell viability. The combination of 1 μM AlClPc and the energy dose of 1080 mJ/cm^2 was proved more effective reducing cell viability by 22%.

To sum up, alumino-chloro-phthalocyanine photodynamic efficiency was tested in LNCaP prostate cancer cell line and the results showed that it can be considered as a capable photosensitizer with a very promising future for the photodynamic therapy.

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες	i
Περίληψη	iii
Abstract	v
Πίνακας περιεχομένων	1
Κατάλογος Σχημάτων	5
Κατάλογος Πινάκων	8
Κεφάλαιο 1: Ο ΠΡΟΣΤΑΤΗΣ	9
1.1 Ο προστάτης.....	10
1.2 Παθήσεις του προστάτη.....	11
1.3 Καρκίνος του προστάτη.....	12
1.4 Ανάγκη εμφάνισης νέας θεραπευτικής διαδικασίας.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	19
2.1 Εισαγωγή - Ιστορική αναδρομή.....	20
2.2 Βασικές αρχές φωτοδυναμικής θεραπείας.....	22
2.3 Μηχανισμοί φωτοδυναμικής δράσης.....	23
2.3.1 Φαινόμενα που ακολουθούν την απορρόφηση φωτός από τα χρωμοφόρα μόρια.....	23
2.4 Φάσματα διέγερσης και εκπομπής.....	26
2.5 Φωτοφυσικός μηχανισμός της Φωτοδυναμικής θεραπείας.....	28
2.6 Μονοπάτια κυτταρικού θανάτου μετά τη φωτοδυναμική δράση.....	32
2.7 Συστήματα laser στη Φωτοδυναμική Θεραπεία.....	34
2.8 Δοσιμετρία.....	39
2.8.1 Βάθος διείσδυσης.....	39
2.8.2 Παλμική και συνεχής ακτινοβολία.....	39
2.8.3 Δόση ενέργειας.....	39
2.9 Πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας.....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΕΣ	41
3.1 Οι φωτοευαίσθητοποιητές και τα χαρακτηριστικά τους.....	42
3.2 Κατηγορίες φωτοευαίσθητοποιητών.....	45
3.2.1 Γενιές φωτοευαίσθητοποιητών.....	45

3.2.2 Οικογένειες φωτοευαισθητοποιητών.....	46
3.3 Φωτοευαισθητοποιητές 3 ^{ης} Γενιάς	54
3.3.1 Νανοδομημένα ως φορείς μεταφοράς φωτοευαισθητοποιητών.....	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΛΟΥΜΙΝΟ-ΧΛΩΡΟ-ΦΘΑΛΟΚΥΑΝΙΝΗ, AICIPc	61
4.1 Η αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη AICIPc.....	62
4.2 Χαρακτηριστικά του μορίου της AICIPc.....	62
4.3 Η αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη ως φωτοευαισθητο-ποιητής.....	65
4.3.1 Μελέτες της αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνης σε επίπεδο κυττάρων	65
4.3.2 Μελέτες της αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνης σε επίπεδο όγκου.	71
4.3.3 Κλινικές μελέτες της αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνης.....	74
4.4 Εξαγωγή συμπερασμάτων από τις ερευνητικές εργασίες.	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ	77
5.1 Σκοπός της πειραματικής μελέτης.....	78
5.2 Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης	79
5.3 Φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού	81
5.4 Μικροσκοπική διάταξη.....	83
5.5 Συστήματα laser στη Φωτοδυναμική Θεραπεία.....	84
5.5.1 Πειραματική διάταξη laser παραγωγής ελευθέρων ριζών	87
5.5.2 Πειραματική διάταξη laser φωτοδυναμικής θεραπείας.....	88
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ	91
6.1 Μεθοδολογία απόψυξης κυτταρικής σειράς LNCaP.....	92
6.2 Μεθοδολογία ανακαλλιέργειας κυτταρικής σειράς LNCaP.....	92
6.3 Μεθοδολογία κατάψυξης κυτταρικής σειράς LNCaP.	93
6.4 Μεθοδολογία μέτρησης κυτταρικού αριθμού στο μικροσκόπιο.....	93
6.5 Παρασκευή διαλύματος φωτοευαισθητοποιητή για την επώαση των κυττάρων.	95
6.6 Μεθοδολογία επώασης των κυττάρων με την ελεύθερη AICIPc.....	95
6.7 Μεθοδολογία εξαγωγής του φωτοευαισθητοποιητή από τα κύτταρα	95
6.8 Διαδικασία ποσοτικοποίησης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή.....	96
6.8.1 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς.....	96
6.8.2 Ποσοτικοποίηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή.....	97
6.9 Μέτρηση παραγωγής ελευθέρων ριζών των φωτοευαίσθητων ουσιών AICIPc και ZnPc με τη βοήθεια του ιχνηθέτη φθορισμού CM-H2 DCFDA.	98
6.9.1 Παρασκευή των διαλυμάτων	99

6.9.2 Διαδικασία ακτινοβολήσης	100
6.10 Επώαση κυττάρων LNCaP σε τριβλία με πλήρες θρεπτικό μέσο.....	100
6.11 Πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας – βιοχημικός έλεγχος MTT.....	100
6.11 Πρωτόκολλο μελέτης επίδρασης της ελεύθερης AICIPc στη βιωσιμότητα των κυττάρων.....	102
6.12 Πρωτόκολλο μελέτης επίδρασης φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων	103
6.13 Πρωτόκολλο μελέτης φωτοδυναμικής δράσης της ελεύθερης χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων	104
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7:ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	105
7.1 Φωτοφυσικές μελέτες φωτοευαισθητοποιητή.....	106
7.1.1 Φάσματα απορρόφησης φωτοευαισθητοποιητή	106
7.1.2 Συμπεράσματα που προκύπτουν από τα φάσματα απορρόφησης της φθαλοκυανίνης AICIPc.....	109
7.1.3 Φάσματα φθορισμού φωτοευαισθητοποιητή	111
7.1.4. Συμπεράσματα που προκύπτουν από τα φάσματα φθορισμού της φθαλοκυανίνης AICIPc.....	113
7.2 Μετρήσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών των φθαλοκυανίνων AICIPc και ZnPC.....	113
7.2.1 Αποτελέσματα μέτρησης παραγωγής ελευθέρων ριζών των δύο φθαλοκυανίνων.	114
7.2.2 Συμπεράσματα ως προς την παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	117
7.3 Μελέτες προσδιορισμού ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της AICIPc στα LNCaP κύτταρα.	117
7.3.1 Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επώαστηκαν με την AICIPc για διαφορετικούς χρόνους επώασης.....	118
7.3.2 Αποτελέσματα υπολογισμού ενδοκυττάριας συγκέντρωσης AICIPc	119
7.3.3 Συμπεράσματα	122
7.4 Μελέτη επίδρασης της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων απουσία φωτός.	122
7.5 Μελέτη επίδρασης φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων	124
7.6 Μελέτη φωτοδυναμικής δράσης AICIPc στη βιωσιμότητα των κυττάρων	125
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8:ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	129
8.1 Εισαγωγικά.....	130
8.2 Συμπεράσματα	130
8.2.1 Φωτοφυσικές ιδιότητες AICIPc.....	130
8.2.2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών	132

8.2.3 Υπολογισμός ενδοκυττάριας συγκέντρωσης AICIPc.....	133
8.2.4 Επίδραση της φθαλοκυανίνης στη βιωσιμότητα των LNCaP κυττάρων απουσία φωτός	133
8.2.5 Επίδραση του φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων	134
8.2.6 Φωτοδυναμική δράση.....	134
8.3 Η AICIPc ως φωτοευαισθητοποιητής	134
8.4 Συζήτηση-Προοπτικές.....	135
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	139

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1.1: Ο προστάτης αδένας και η θέση του στο ανθρώπινο σώμα σε οβελιαία κατανομή.....	10
Σχήμα 1.2: Μετωπιαία διατομή του προστάτη όπου διακρίνεται και ο καρκινικός όγκος.	13
Σχήμα 1.3: Το ειδικό προστατικό αντιγόνο στην περίπτωση υγιούς και καρκίνου του προστάτη.....	14
Σχήμα 2.1: Ιστορία της Φωτοδυναμικής θεραπείας (1900- Παρόν)	21
Σχήμα 2.2: Στάδια εφαρμογής φωτοδυναμικής θεραπείας (α) χορήγηση φωτοευαισθητοποιητή (β) επιλεκτική συγκέντρωσή του στον καρκινικό όγκο (γ) ακτινοβολήση του καρκινικού όγκου και διέγερση του φωτοευαισθητοποιητή (δ) περίοδος φωτοευαισθησίας (ε) νέκρωση του καρκινικού όγκου, πλήρης ίαση	22
Σχήμα 2.3: Διάγραμμα Jablonski των κατωτέρων ενεργειακών επιπέδων και ενδομοριακών διεγέρσεων ενός οργανικού μορίου με βάση την απορρόφηση φωτός.	24
Σχήμα 2.4: Μετατόπιση Stoke's.....	27
Σχήμα 2.5: Η διέγερση του χρωμοφόρου με τρία διαφορετικά μήκη κύματος (EX 1, EX 2, EX 3) δεν μεταβάλλει το σχήμα του φάσματος εκπομπής αλλά προκαλεί διακυμάνσεις στην ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού (EM 1, EM 2, EM 3) το οποίο αντιστοιχεί στο μέγεθος του φάσματος διέγερσης	28
Σχήμα 2.6: Φωτοδυναμική θεραπεία και φωτοφυσικοί μηχανισμοί.....	29
Σχήμα 2.7: Οι δύο τύποι αντιδράσεων της φωτοδυναμικής θεραπείας.....	30
Σχήμα 2.8: Αντιδράσεις τύπου I.....	30
Σχήμα 2.9: Μονοπάτια κυτταρικού θανάτου	33
Σχήμα 2.10: Ενεργειακές ζώνες ημιαγωγού	36
Σχήμα 2.11: Λειτουργία της επαφής p-n. Υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου τα ηλεκτρόνια που πλεονάζουν στην πλευρά n κινούνται προς το θετικό πόλο (προς τα αριστερά) και οι οπές που πλεονάζουν στην πλευρά p κινούνται προς τα δεξιά.	37
Σχήμα 2.12: Ποιοτικό διάγραμμα εξάρτησης εκπομπής φωτονίων από διερχόμενο ρεύμα διόδου.....	38
Σχήμα 3.1: Δομή Photofrin.....	46
Σχήμα 3.2: Δομή ALA.....	47
Σχήμα 3.3: Δομή Verteporfin.....	48
Σχήμα 3.4: Δομή m-THPC.....	49
Σχήμα 3. 5: Δομή Purpurin	50
Σχήμα 3. 6: Δομή Lutrin.....	51
Σχήμα 3. 7: Δομή Tookad	51
Σχήμα 3. 8: Δομή (α) μεταλλοφθαλοκυανίνης και (β) ναφθαλοκυανίνης	52
Σχήμα 3. 9: Δομή Photosens.....	53

Σχήμα 3.10: Ενδεικτικά είδη νανοσωματιδίων α) νανοσωλήνας άνθρακα β) φουλερένιο γ) λιπόσωμα δ) μικκύλιο ε) δενδριμερές	58
Σχήμα 4.1: (α) Το μόριο της φθαλοκυανίνης και (β) το μόριο της αλουμινο-χλωροφθαλοκυανίνης.....	63
Σχήμα 4. 2: Τα 3 διμερή της αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνης	63
Σχήμα 4.3: Φασματικά χαρακτηριστικά της αλουμινο-χλωροφθαλοκυανίνης (α) Φάσμα απορρόφησης και (β) Φάσμα φθορισμού	64
Σχήμα 4.4: Μηχανισμός παραγωγής ανιόντων $AlCl^-$ κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης.....	64
Σχήμα 5.1: Το οπτικό διάγραμμα του οργάνου και η πορεία της φωτεινής δέσμης ..	79
Σχήμα 5.2: Οπτικό διάγραμμα διάταξης μέτρησης φθορισμού	81
Σχήμα 5.3: Φάσμα εκπομπής λυχνίας ξένου	82
Σχήμα 5.4: Σύνθετο μικροσκόπιο.....	84
Σχήμα 5.5: Καμπύλη βαθμονόμησης του laser.....	85
Σχήμα 5.6: Γραφική παράσταση τάσης-μήκους κύματος.....	86
Σχήμα 5.7: Φωτογραφική απεικόνιση της διάταξης παραγωγής ελευθέρων ριζών που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο	88
Σχήμα 5.8: Φωτογραφική απεικόνιση της διάταξης της φωτοδυναμικής θεραπείας που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο	89
Σχήμα 6.1: Πλακίδιο Neubauer.....	94
Σχήμα 6.2: Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης- έντασης φθορισμού της φθαλοκυανίνης.....	97
Σχήμα 6.3: (α): Ο ιχνηθέτης φθορισμού 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester,(CM- H_2 DCFDA). (β) : Φάσμα απορρόφησης και εκπομπής φθορισμού του ίδιου ιχνηθέτη.	98
Σχήμα 6.4: Καμπύλη βαθμονόμησης βιοχημικού ελέγχου εκτίμησης βιωσιμότητας MTT	102
Σχήμα 7.1: Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων $AlClPc$ σε DMSO.....	107
Σχήμα 7.2: Διάγραμμα έντασης απορρόφησης- συγκέντρωσης της $AlClPc$	108
Σχήμα 7.3: Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων $AlClPc$ συγκέντρωσης $5 \times 10^{-6} M$ σε DMSO, EtOH και H_2O	109
Σχήμα 7.4: Φάσματα έντασης φθορισμού της $AlClPc$ με μήκος κύματος διέγερσης 370nm.	112
Σχήμα 7.5: Διάγραμμα έντασης φθορισμού- συγκέντρωσης της $AlClPc$	112
Σχήμα 7.6: Φάσματα έντασης φθορισμού της ουσίας CM- H_2 DCFDA στο διάλυμα αναφοράς για χρόνο ακτινοβολήσης 10 λεπτά	114
Σχήμα 7.7: Φάσματα έντασης φθορισμού του διαλύματος CM- H_2 DCFDA – $ZnPc$ για χρόνο ακτινοβολήσης 10 λεπτά.....	115
Σχήμα 7.8: Φάσματα έντασης φθορισμού του διαλύματος CM- H_2 DCFDA – $AlClPc$ για χρόνο ακτινοβολήσης 10 λεπτά.....	115
Σχήμα 7.9: Διάγραμμα έντασης φθορισμού-χρόνου για τα 3 διαλύματα	116

Σχήμα 7.10: Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επώαστηκαν με 0.5μM AICIPc, για διαφορετικούς χρόνους επώασης με διέγερση στα 370 nm.	118
Σχήμα 7.11: Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επώαστηκαν με 1μM AICIPc, για διαφορετικούς χρόνους επώασης με διέγερση στα 370 nm.....	118
Σχήμα 7.12: Φάσματα φθορισμού της φθαλοκυανίνης AICIPc σε διαλύτη ισοπροπανόλη- Triton X.....	119
Σχήμα 7.13: Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης- έντασης φθορισμού της AICIPc. .	120
Σχήμα 7.14: Ενδοκυττάρια συγκέντρωση AICIPc σε κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με 0.5 μM και 1 μM AICIPc για 1, 3, 6, 24 και 48 h.....	121
Σχήμα 7.15: Ενδοκυττάρια συγκέντρωση AICIPc σε κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με 0.5 μM και 1 μM AICIPc για 1, 3, 6, 24 και 48 h.....	121
Σχήμα 7.16: Διάγραμμα συγκέντρωσης AICIPc– βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων, μετά από 24h επώασης με την φθαλοκυανίνη	123
Σχήμα 7.17: Διάγραμμα ισχύος ακτινοβολήσης- βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων για ακτινοβολήση 60 sec.....	125
Σχήμα 7.18: Διάγραμμα δόσης ενέργειας – βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων τα οποία επώαστηκαν για 24h με 0.5μM AICIPc	126
Σχήμα 7.19: Διάγραμμα δόσης ενέργειας - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων τα οποία επώαστηκαν για 24h με 1μM AICIPc	127
Σχήμα 7.20: Διάγραμμα δόσης ενέργειας - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων τα οποία επώαστηκαν για 24h με 0.5 και 1μM AICIPc	128
Σχήμα 8. 1: Βάθος διείσδυσης φωτεινής ακτινοβολίας στο δέρμα για τα διάφορα μήκη κύματος της ακτινοβολίας	131

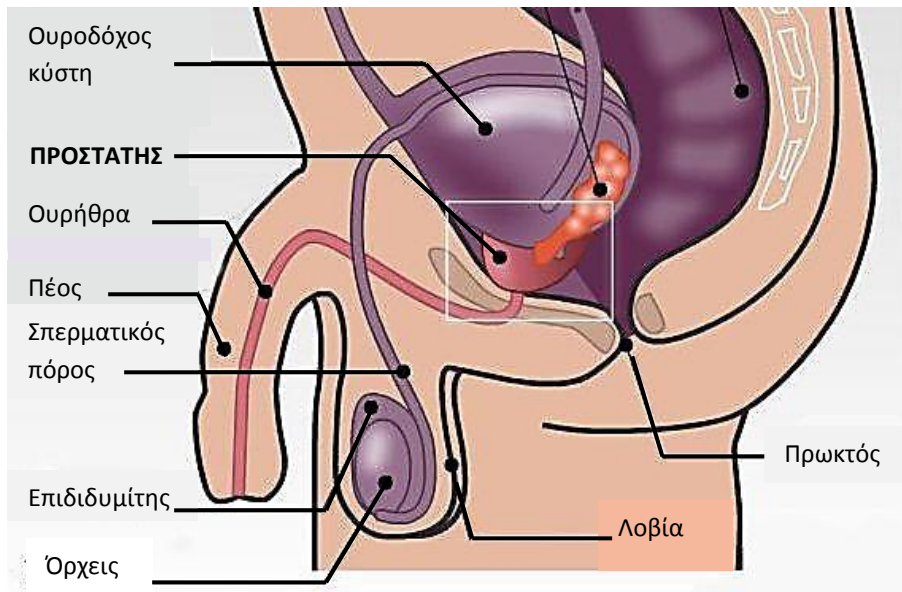
Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 3. 1: Συγκεντρωτικός πίνακας φωτοευαισθητοποιητών και χαρακτηριστικών τους.....	54
Πίνακας 4. 1: Ποσοστά βιωσιμότητας των κυττάρων μετά την Φωτοδυναμική Θεραπεία	68
Πίνακας 4. 2: Οι απαιτούμενες δόσεις ενέργειας που οδηγούν σε ποσοστό κυτταρικού θανάτου 90%.....	71
Πίνακας 4. 3: Πλήρης υποχώρηση κατά τη διάρκεια και μετά την Φωτοδυναμική Θεραπεία	72
Πίνακας 5. 1: Χαρακτηριστικά διοδικού laser GCSLS -10 -1500m.....	85
Πίνακας 5. 2: Βασικά χαρακτηριστικά οπτικής ίνας για το σύστημα ακτινοβολήσης κυττάρων και την παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	86
Πίνακας 5. 3: Χαρακτηριστικά ενεργόμετρου	87
Πίνακας 7. 1: Μέγιστα απορρόφησης AlClPc συγκέντρωσης 5×10^{-6} M και οι αντίστοιχοι μοριακοί συντελεστές απορρόφησης στους τρεις διαφορετικούς διαλύτες.....	110

Κεφάλαιο 1: Ο ΠΡΟΣΤΑΤΗΣ

1.1 Ο προστάτης

Ο προστάτης είναι ένας μικρός αδένας με διαστάσεις 3x4 cm και βάρος 10-20 γραμμάρια σε σχήμα κάστανου και αποτελεί το μεγαλύτερο επικουρικό αδένου του γεννητικού συστήματος του άνδρα. Βρίσκεται ακριβώς κάτω από την ουροδόχο κύστη και πάνω από το τελικό τμήμα του εντέρου, το ορθό. Πάνω από τον προστάτη βρίσκονται οι σπερματοδόχες κύστες, όργανα επίσης του αναπαραγωγικού συστήματος.



Σχήμα 1.1: Ο προστάτης αδένος και η θέση του στο ανθρῶπινο σώμα σε οβελιαία κατανομή

Ο προστάτης είναι ένα όργανο μικτής ιστολογίας, αποτελούμενο από αδενικό (που καταλαμβάνει το 70% του αδένου) και ινομυώδες στρώμα (καταλαμβάνει το υπόλοιπο 30% του αδένου). Εξωτερικά, περιβάλλεται από ένα ινομυώδες περίβλημα που επεκτείνεται εσωτερικά και δημιουργεί θυλάκους. Αυτό είναι το στηρικτικό στρώμα του προστάτη. Μέσα, υπάρχουν τα αδενίδια, από όπου παράγεται το προστατικό υγρό που αποθηκεύεται στον αδένου και εξωθείται κατά την εκσπερμάτιση μέσω μυϊκών συσπάσεων του προστάτη προς την ουρήθρα. Τη στιγμή εκείνη, κλείνει ο αυχένος της κύστης, ώστε το σπέρμα να μη φύγει προς τη κύστη. Μέσα από τον προστάτη, διέρχονται οι εκσπερματιστικοί πόροι, για να καταλήξουν στο σπερματικό λοφίδιο, ένα έπαρμα της ουρήθρας, όπου εκβάλλουν.

Ο προστάτης περιβάλλει κυκλοτερώς το τελικό τμήμα της ουρήθρας που λέγεται γι' αυτό προστατική ουρήθρα και εκτείνεται από το σπερματικό λοφίδιο, μέχρι τον αυχένα της ουροδόχου κύστης. Ανάλογα με τη σύστασή του, ο προστάτης χωρίζεται σε ζώνες:

- Η μεταβατική ζώνη περιβάλλει την ουρήθρα κοντά στην κύστη και είναι αυτή που υπερτρέφεται στην καλοήγη υπερπλασία του προστάτη.
- Η κεντρική ζώνη εκτείνεται πίσω και κάτω από τη μεταβατική και περικλείει τους εκσπερματιστικούς πόρους.
- Η περιφερική ζώνη εκτείνεται περιφερικά από τις προηγούμενες προς το έντερο, από όπου ξεκινά περίπου το 80% των καρκίνων του προστάτη.
- Και τέλος, η ινομύδης ζώνη βρίσκεται πρόσθια και επάνω από την ουρήθρα. ^[1]

1.2 Παθήσεις του προστάτη

Τα κυριότερα προβλήματα που παρουσιάζει ο προστάτης είναι η φλεγμονή (προστατίτιδα), η υπερτροφία ή καλοήγη υπερπλασία και η κακοήγη υπερπλασία (καρκίνος).

Η **προστατίτιδα** είναι μία φλεγμονή ή μικροβιακή λοίμωξη του προστάτη. Υπολογίζεται ότι τουλάχιστον οι μισοί άνδρες θα παρουσιάσουν τουλάχιστον ένα επεισόδιο προστατίτιδας στη ζωή τους. Αν προσβληθεί κάποιος από προστατίτιδα, δεν αυξάνεται η πιθανότητα να παρουσιάσει κάποια άλλη νόσο του προστάτη. Δεν είναι μεταδοτική προς τη σύντροφο, καλό όμως είναι να αποφεύγονται οι επαφές κατά την οξεία φάση ή έξαρση της νόσου.

Μια άλλη πάθηση που αν και εξελίσσεται αργά επηρεάζει την ποιότητα ζωής του άνδρα και την σεξουαλικότητά του είναι η **καλοήγη υπερπλασία του προστάτη**. Ο προστάτης έχει μικρό μέγεθος κατά τη γέννηση αλλά κατά την εφηβεία μεγαλώνει γρήγορα. Στους περισσότερους άνδρες μετά το 50ο έτος της ηλικίας ο προστάτης προοδευτικά υπερτρέφεται κάτω από την επίδραση μίας ορμόνης (της λεγόμενης ανδρικής ορμόνης) της τεστοστερόνης. Καθώς ο αδένας του προστάτη περιβάλλει την ουρήθρα, η μεγέθυνσή του σταδιακά προκαλεί στένωση στην ουρήθρα. Με τον χρόνο η ροή των ούρων μπορεί να παρεμποδίζεται με την πιθανότητα να μην απομακρύνεται όλη η ποσότητα ούρων. Όσα παραμένουν λιμνάζουν στην κύστη κάνοντας τον άντρα επιρρεπή στις λοιμώξεις, τη δημιουργία πέτρας στα νεφρά ή νεφρική ανεπάρκεια. ^[2,3]

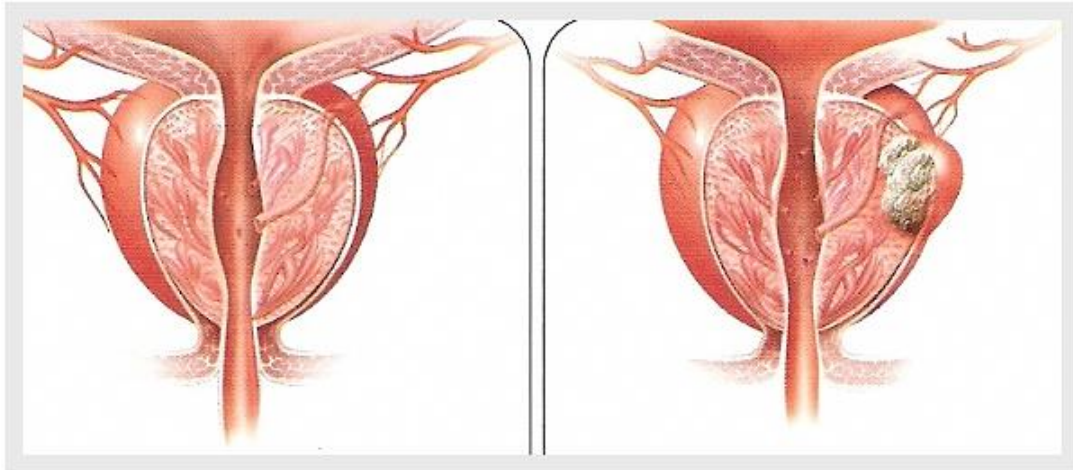
Ο **καρκίνος του προστάτη** είναι ο συχνότερος καρκίνος στους άντρες και η δεύτερη σε συχνότητα αιτία θανάτου από καρκίνο (μετά τον καρκίνο του πνεύμονα) στους άντρες. Η έγκαιρη διάγνωση όμως είναι εφικτή, αρκεί κάθε άντρας να ευαισθητοποιηθεί γι' αυτό. Και αυτό, γιατί η πάθηση δεν δίνει κανένα σύμπτωμα στα αρχικά στάδια, όπου η νόσος είναι αντιμετωπίσιμη. Έτσι, η διάγνωση γίνεται μόνο με τον ετήσιο προληπτικό έλεγχο.

Για την αντιμετώπιση των παραπάνω παθήσεων, εφαρμόζεται η μερική ή πλήρης χειρουργική αφαίρεση του προστάτη. Σε σοβαρότερες καταστάσεις αφαιρείται ολόκληρος ο αδένας, οι εκσπερματικοί πόροι και τη τελική μοίρα του σπερματικού πόρου με αποτέλεσμα την αδυναμία εκσπερμάτισης. Τα προβλήματα που συνοδεύουν στις παραδοσιακές τεχνικές αντιμετώπισης των παθήσεων του προστάτη αφορούν ανωμαλίες στην ούρηση και ανικανότητα.

1.3 Καρκίνος του προστάτη

Ο καρκίνος του προστάτη είναι ο συχνότερος σε εμφάνιση μη δερματικός τύπος καρκίνου στους άνδρες του δυτικού κόσμου. Στις ΗΠΑ ένας στους έξι με επτά άνδρες θα διαγνωσθεί με καρκίνο του προστάτη στην πορεία της ζωής του. Η Αμερικανική Εταιρεία Καρκίνου (American Cancer Society, ACS) υπολογίζει ότι 186.320 νέες περιπτώσεις καρκίνου του προστάτη διαγνώστηκαν στις ΗΠΑ το 2008. Περισσότερες από 90% των περιπτώσεων των νεοδιαγνωσμένων καρκίνων του προστάτη αφορά εντοπισμένη και περιορισμένη νόσο στο εν λόγω όργανο. Σχεδόν ένας στους έξι με επτά άνδρες θα διαγνωσθεί με καρκίνο του προστάτη κατά την διάρκεια της ζωής του αλλά μόνο ένας άνδρας από τους 34 με καρκίνο του προστάτη θα πεθάνει από αυτή την νόσο. Περισσότεροι από 1,8 εκατομμύρια άνδρες είναι επιζήσαντες από καρκίνο του προστάτη στις ΗΠΑ. Για τον γενικό πληθυσμό, ένας άνδρας έχει 17% πιθανότητες να νοσήσει από καρκίνο του προστάτη στην διάρκεια της ζωής του και 3% πιθανότητες να πεθάνει από αυτόν. Τα μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης της νόσου απαντώνται στις χώρες του Δυτικού κόσμου (Αμερική, Δυτική Ευρώπη, Αυστραλία) ενώ τα χαμηλότερα στην Ασία.

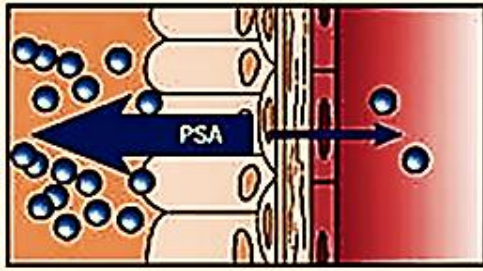
Ο καρκίνος του προστάτη είναι η ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων στον αδένα αυτόν. Τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται πιο γρήγορα και πιο άναρχα από τα φυσιολογικά κύτταρα με έντονη χωροεπεκτατική τάση. Έτσι δημιουργούνται οι καρκινικοί όγκοι. Η ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη είναι βραδεία και περνούν πολλά χρόνια για να δώσει κλινικά συμπτώματα και μεταστάσεις. Γι αυτό η έγκαιρη διάγνωση στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του καρκίνου είναι σωτήρια και η θεραπευτική αντιμετώπιση είναι επιτυχής σε πολύ υψηλά ποσοστά. Όταν ο καρκίνος του προστάτη δεν εντοπισθεί έγκαιρα τότε ο καρκίνος επεκτείνεται σε γειτονικούς ιστούς και τα καρκινικά κύτταρα μεταφέρονται σε άλλα σημεία του σώματος (κάνουν μεταστάσεις). [2]



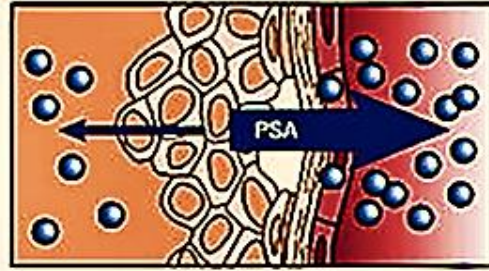
Σχήμα 1. 2: Μετωπιαία διατομή του προστάτη όπου διακρίνεται και ο καρκινικός όγκος.

Τα αίτια του προστατικού καρκίνου παραμένουν άγνωστα. Κλινικές μελέτες δείχνουν μία αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης προστατικού καρκίνου με την πάροδο της ηλικίας. Είναι πιθανή επίσης μια γενετική προδιάθεση στην ανάπτυξη του προστατικού καρκίνου. Άνδρες με συγγενή πρώτου βαθμού με προστατικό καρκίνο έχουν 2-8% μεγαλύτερο κίνδυνο να τον αναπτύξουν και αυτοί, από ότι ο γενικός πληθυσμός. Έχουν επίσης μελετηθεί περιβαλλοντικοί και διαιτητικοί παράγοντες, η επαγγελματική απασχόληση, κοινωνικοοικονομική στάθμη, διάφοροι λοιμωξιόγονοι παράγοντες και οι σεξουαλικές συνήθειες, χωρίς όμως να έχουν βρεθεί επαρκή στοιχεία για κανέναν από αυτούς. ^[4]

Η συντριπτική πλειοψηφία των προστατικών καρκίνων σε πρώιμα στάδια (ενδοπροστατική βλάβη) δεν προκαλεί καθόλου συμπτώματα, η διάγνωσή τους δε είναι τυχαία, μετά από έλεγχο του ειδικού προστατικού αντιγόνου (P.S.A.) ή από δακτυλική εξέταση. Τα πρώτα συμπτώματα της νόσου είναι ουρολογικές διαταραχές και αύξηση των επιπέδων του PSA ειδικά όταν υπάρχει καρκίνος. [4] Με την υιοθέτηση του βιοχημικού ελέγχου προσδιορισμού του PSA, προηγμένων τεχνικών βιοψίας και απεικονιστικών τεχνικών (MRI), έγινε εφικτή η έγκαιρη διάγνωση του καρκινικού όγκου στον προστάτη σε αρχικό στάδιο.



A. Φυσιολογικός προστάτης
Φυσιολογικές κυτταρικές, δομές συγκρατούν το PSA μέσα στον αδένα.



B. Καρκίνος προστάτη
Αποδιοργάνωση των δομών του αδένα και αύξηση του PSA στο αίμα.

Σχήμα 1. 3: Το ειδικό προστατικό αντιγόνο στην περίπτωση υγιούς και καρκίνου του προστάτη.

Ο καρκίνος του προστάτη είναι ένας ιδιότυπος τύπος καρκίνου. Μπορεί να διατηρηθεί σε ανενεργή μορφή για πολλά χρόνια, έως ότου πυροδοτηθεί η ταχύτατη ανάπτυξή του η οποία συνήθως ακολουθείται από μετάσταση του καρκίνου στα οστά. Η θεραπεία που ακολουθείται για την αντιμετώπισή του καθορίζεται από παράγοντες όπως το στάδιο της νόσου, η ηλικία και το προσδόκιμο ζωής του ασθενούς. [3]

Όταν ο καρκίνος του προστάτη είναι εντοπισμένος και περιορισμένος μόνο στον προστάτη υπάρχουν πέντε διαθέσιμες επιλογές θεραπείας για τον ασθενή: [4]

- Ενεργός παρακολούθηση μόνο
- Αφαίρεση του προστάτη (ριζική προστατεκτομή)
- Ακτινοβολία του προστάτη είτε με εξωτερική ακτινοβολήση είτε μ' εμφύτευση ραδιενεργών κόκκων (βραχυθεραπεία)
- Κρυοθεραπεία (Πάγωμα του προστάτη)
- Ορμονική θεραπεία, η οποία δεν είναι θεραπευτική και συχνά συνδυάζεται με ακτινοβολία ή κρυοθεραπεία
- Χημειοθεραπεία

Η συνήθης αγωγή που συστήνεται στους ασθενείς είναι η **ενεργός παρακολούθηση** της εξέλιξης της νόσου και αφορά στην μέτρηση των επιπέδων του PSA, σε απεικόνιση του καρκινικού όγκου μέσω υπερήχων ή ακτινογραφιών σε τακτά χρονικά διαστήματα. Η ενεργός παρακολούθηση αποσκοπεί στο να ελαχιστοποιήσει τις επεμβατικές θεραπείες. Συστήνεται σε ασθενείς που έχουν σοβαρά προβλήματα υγείας ή σε ασθενείς προχωρημένης ηλικίας ειδικά όταν ο

καρκίνος είναι ενδοπροστατικός, αναμένεται να έχει αργή εξέλιξη στον χρόνο και δεν προκαλεί συμπτώματα. Αποτελείται από απλή παρακολούθηση της τιμής του P.S.A. και δακτυλική εξέταση κάθε 6 μήνες. Η ενεργός παρακολούθηση δεν έχει κλινικές παρενέργειες αφού δεν αποτελεί από μόνη της θεραπεία. Για τον λόγο αυτό υπάρχει ο κίνδυνος ανάπτυξης του καρκίνου ανάμεσα στις διαδοχικές ιατρικές επισκέψεις. [4]

Όταν διαπιστωθεί αλλαγή στις συνήθειες για τον κάθε ασθενή τιμές τότε ακολουθείται μια από τις κλασικές θεραπείες για την αντιμετώπιση του καρκινικού όγκου, **ολική εκτομή (προστατεκτομή) του προστατικού αδένου, ακτινοθεραπεία ή βραχυθεραπεία.** Συνήθως προτιμάται η **ολική εκτομή του αδένου.** Για τον εντοπισμένο καρκίνο του προστάτη η ριζική προστατεκτομή θεωρείται η οριστική λύση πλήρους θεραπείας του καρκίνου αφαιρώντας τον. Η ριζική προστατεκτομή περιλαμβάνει την αφαίρεση ολόκληρου του προστάτη με την κάψα του και τις σπερματοδόχες κύστες. Η ανικανότητα και η ακράτεια αποτελούν τις πιο συχνά εμφανιζόμενες παρενέργειες της ριζικής προστατεκτομής. [4,5]

Η **ακτινοθεραπεία** μπορεί να εφαρμοστεί με δυο τεχνικές. Ραδιενεργές κάψουλες εισάγονται μέσα στον προστάτη, **βραχυθεραπεία,** ή μια εξωτερική ραδιενεργός δέσμη κατευθύνεται στον αδένου. Όταν ο καρκίνος του προστάτη είναι εντοπισμένος η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιείται εναλλακτικά αντί της χειρουργικής θεραπείας. Η εξωτερική ακτινοβολία χρησιμοποιείται επίσης συχνά για την θεραπεία καρκίνου του προστάτη, ο οποίος έχει επεκταθεί τοπικά στην πύελο τόσο πολύ που είναι αδύνατον να αφαιρεθεί χειρουργικά αλλά δεν υπάρχει ένδειξη εξάπλωσης στους λεμφαδένες. Στους άνδρες με προχωρημένη νόσο η ακτινοθεραπεία συμβάλει στην στην μείωση του μεγέθους του όγκου και στην ανακούφιση του πόνου. Είναι σημαντικό να τονισθεί ότι η ακτινοβολία προκαλεί μακροχρόνια βλάβη των νεύρων και σημαντικών ιστών που συμβάλουν στην σεξουαλική λειτουργία. Πολλοί ασθενείς που υποβάλλονται σε εξωτερική ακτινοβολία ή βραχυθεραπεία παρουσιάζουν στυτική δυσλειτουργία (περισσότεροι από 50%). Σε πολλούς επίσης ακτινοβολημένους ασθενείς χορηγείται ορμονοθεραπεία, η οποία έχει μία άμεση αρνητική επίδραση στην σεξουαλική λειτουργία. [4,5]

Η **κρυοθεραπεία** χρησιμοποιούσε παλιότερα υγρό άζωτο για να παγώνει και να σκοτώνει τα καρκινικά προστατικά κύτταρα. Σήμερα χρησιμοποιούνται αργόν και ήλιον, δύο “ευγενή” αέρια, που μπορούν ταυτόχρονα να παγώνουν αλλά και να θερμαίνουν τον προστάτη, κάνοντας την κρυοθεραπεία από την μια μεριά πιο αποτελεσματική αλλά και από την άλλη λιγότερο νοσογόνο (με λιγότερες επιπλοκές). Ειδικές βελόνες τοποθετούνται σε συγκεκριμένες θέσεις στον προστάτη διαμέσου του περινέου (περιοχή ανάμεσα στους όρχεις και τον πρωκτό). Τα υγρά ρέουν μέχρι την μύτη των βελονών σχηματίζοντας μπάλες πάγου που παγώνουν τα καρκινικά προστατικά κύτταρα και καθώς τα κύτταρα κρυσταλλώνονται “σκάνε” και

καταστρέφονται. Η διαδικασία διαρκεί περίπου 2 ώρες χρειάζεται αναισθησία (είτε γενική είτε επισκληρίδια) και ο ασθενής μένει για 1 με 2 ημέρες στο νοσοκομείο. Συνήθως οι παρενέργειες που συμβαίνουν οφείλονται σε βλάβες του γειτονικού υγιούς ιστού κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Η σοβαρότητα και η συχνότητα των παρενεργειών σε μεγάλο βαθμό επηρεάζονται από την σχετική υγεία του ασθενή καθώς και από το στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο καρκίνος. Έτσι ορισμένοι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν: οίδημα στην περιοχή των γεννητικών οργάνων, ερεθισμό κατά την ούρηση, αιματουρία ακόμα και απόφραξη της ουρήθρας και των ουροφόρων οδών. [4,5]

Η **ορμονοθεραπεία** καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα κόβοντας την παροχή των ανδρικών ορμονών όπως της τεστοστερόνης, η οποία προωθεί την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη. Ο ορμονικός έλεγχος μπορεί να επιτευχθεί είτε με την χειρουργική επέμβαση αφαιρώντας τους όρχεις (το κύριο όργανο παραγωγής τεστοστερόνης) είτε με φάρμακα και ενέσεις. Η ορμονοθεραπεία σκοπεύει στα καρκινικά κύτταρα που έχουν ξεφύγει μακριά από τον προστάτη και επομένως έξω από το θεραπευτικό πεδίο των τοπικών θεραπειών όπως είναι το χειρουργείο και η ακτινοθεραπεία. Η ορμονοθεραπεία είναι επίσης βοηθητική στην ανακούφιση των επώδυνων και πιεστικών συμπτωμάτων του προχωρημένου καρκίνου του προστάτη. Παραπέρα, η ορμονοθεραπεία μελετάται και σαν τρόπος αναστολής εξάπλωσης του καρκίνου προτού κάνει μεταστάσεις. Αν και η ορμονοθεραπεία δεν μπορεί να θεραπεύσει τον καρκίνο, μπορεί όμως να τον συρρικνώσει ή να φρενάρει την εξέλιξη της προχωρημένης νόσου για αρκετά χρόνια, χωρίς να την σταματά τελείως. Μερικές από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες παρενέργειες που σχετίζονται με την ορμονοθεραπεία είναι: δυσκοιλιότητα ή διάρροια, ναυτία, απώλεια ή μείωση της όρεξης, ζάλη ή πονοκέφαλος, οίδημα (γυναικομαστία) ή ευαισθησία στο στήθος, προβλήματα ύπνου, ανικανότητα ή μείωση της σεξουαλικής επιθυμίας. [4,5]

Η **χημειοθεραπεία** χρησιμοποιείται, όταν πλέον τα καρκινικά κύτταρα αποκτήσουν αντοχή στην ορμονοθεραπεία. Η νόσος σε αυτό το στάδιο είναι προχωρημένη και υπάρχουν μεταστάσεις στα οστά με πόνους. Η χημειοθεραπεία δεν είναι πολύ αποτελεσματική, για να δοθεί σε πρώιμο στάδιο. Σε αρρώστους με προχωρημένη όμως νόσο, είναι χρήσιμη, τόσο για την παράταση της ζωής όσο και για τη μείωση του πόνου στα οστά. Σε κάποιες περιπτώσεις, μπορεί να συνδυαστεί με εξωτερική ακτινοβολία στα σημεία των οστών όπου υπάρχει έντονος πόνος. Τα φάρμακα που χορηγούνται, σήμερα, έχουν μικρότερη τοξικότητα συγκριτικά με τα παλιότερα, και οι ασθενείς τα ανέχονται σχετικά καλά. Δυστυχώς όμως, η χημειοθεραπεία δεν μπορεί να εστιάσει σε κάποια συγκεκριμένη περιοχή του σώματος. Όλα τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα του σώματος συνεπώς επηρεάζονται, προκαλώντας μια σειρά από παρενέργειες. Η πιο εμφανής παρενέργεια της χημειοθεραπείας σχετίζεται με την απώλεια μαλλιών. Ο τύπος του

φαρμάκου, η δόση και η διάρκεια της θεραπείας μπορεί να προκαλέσουν επίσης προβλήματα γονιμότητας σε μερικούς ασθενείς που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία. Άλλες παρενέργειες αναφέρονται σε διάρροια, ναυτία, έμετο, απώλεια όρεξης, και δυσκοιλιότητα. Τέλος, η χημειοθεραπεία καταστρέφει τα λευκά αιμοσφαίρια, καταστέλλοντας έτσι την άμυνα του οργανισμού, και το σώμα γίνεται πιο ευάλωτο σε μολύνσεις. Οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν ρίγη, πυρετό, δύσπνοια, και ρινική συμφόρηση. [4,6,7]

1.4 Ανάγκη εμφάνισης νέας θεραπευτικής διαδικασίας

Οι παρενέργειες που συνοδεύουν τις κλασικές θεραπείες δε είναι αμελητέες και επηρεάζουν σημαντικά την ψυχολογία του ασθενούς. Οι παρενέργειες οφείλονται στις βλάβες που υφίστανται οι παρακείμενες στον προστατικό αδένα υγιείς δομές, κυρίως η κύστη, η ουρήθρα και δομές που σχετίζονται με τον αναπαραγωγικό μηχανισμό. Επιπλέον το κόστος των θεραπειών αυτών είναι αρκετά υψηλό. Αναγκαία είναι λοιπόν η εφαρμογή μιας θεραπείας όπου θα επιτυγχάνεται εξάλειψη του καρκινικού όγκου αλλά και ταυτόχρονα θα παραμένει λειτουργικός ο προστατικός αδένας με στόχο την ελαχιστοποίηση των ενοχλητικών και επώδυνων για την ποιότητα ζωής του ασθενούς παρενεργειών. Οποιαδήποτε καινούρια θεραπεία θα πρέπει να εκπληρώνει τα παραπάνω κριτήρια. [4,8,9]

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η φωτοδυναμική θεραπεία. Αυτή ικανοποιεί όλες τις προϋποθέσεις για να εφαρμοστεί στην περίπτωση του καρκίνου του προστάτη. Η φωτοδυναμική θεραπεία πλεονεκτεί σε σχέση με τις παραδοσιακές αντικαρκινικές θεραπείες όπως η χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία ή η χειρουργική αφαίρεση του καρκινικού όγκου, κυρίως γιατί δεν συνοδεύεται από σοβαρές για την ποιότητα ζωής του ασθενούς παρενέργειες. Η θεραπεία μπορεί να εστιαστεί ακριβώς στον καρκινικό όγκο καθώς το φως μπορεί να καθοδηγηθεί μέσα σε αυτόν. Με τον τρόπο αυτό ακτινοβολείται μόνο ο καρκινικός όγκος και όχι οι παρακείμενοι υγιείς ιστοί. [8]

Ο προστάτης είναι ένα ελκυστικό όργανο για την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας:

- Ο καρκίνος του προστάτη είναι ο δεύτερος σε εμφάνιση καρκίνος στους άνδρες της καυκάσιας φυλής.
- Οι συμβατικές θεραπείες συνοδεύονται με σοβαρότατες παρενέργειες στην ποιότητα ζωής του ασθενούς.
- Υπάρχει η τεχνογνωσία από τη βραχυθεραπεία για την τοποθέτηση και εισαγωγή στον προστάτη οπτικών ινών μεταφοράς του φωτός διέγερσης.

- Η πλειοψηφία των ασθενών πάσχει από χωρικά εντοπισμένο καρκινικό όγκο.
- Η φωτοδυναμική θεραπεία, λόγω της εγγενούς της επιλεκτικότητας, διατηρεί τη λειτουργικότητα του αδένου καθώς δεν βλάπτει μη παθολογικές δομές [8]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

2.1 Εισαγωγή - Ιστορική αναδρομή

Οι θεραπευτικές ιδιότητες του φωτός είχαν ανακαλυφθεί από την αρχαιότητα. Οι αρχαίοι πολιτισμοί των Ινδών και των Αιγυπτίων, συνδυάζοντας τα βότανα και την ηλιακή ακτινοβολία, κατάφεραν να θεραπεύσουν δερματικές ασθένειες όπως η λεύκη και η ψωρίαση ενώ οι αρχαίοι Έλληνες πρώτοι εισήγαγαν τον όρο ηλιοθεραπεία. Όμως δεν ήταν παρά τον τελευταίο αιώνα όπου η χρήση του φωτός για την αντιμετώπιση ασθενειών έκανε την επανεμφάνισή της.

Το 1903 απονέμεται στον Niels Finzen το βραβείο Νόμπελ για την εργασία του στη φωτοθεραπεία (Σχήμα 2.1). Η χρήση ενός εφαρμοζόμενου παράγοντα φωτοευαισθητοποίησης σε συνδυασμό με το φως για τη θεραπεία μιας νόσου μπορεί να αποδοθεί στον Raab, που ως φοιτητής ιατρικής ρίχνοντας κατά λάθος ισχυρό φως σε καλλιέργεια μονοκύτταρων μικροοργανισμών *Paramecium* που επώαζονταν με τη χρωμοφόρα ουσία ακριδίνη, οδήγησε στην καταστροφή τους. Ο Raab και οι καθηγητές του Jodlbauer, Jesionick και Von Tarpeiner ανακάλυψαν ότι η ουσία ακριδίνη είναι φωτοευαισθητοποιητικός παράγοντας (Σχήμα 2.1). Εξήγησαν και επινόησαν τον όρο φωτοδυναμική αντίδραση και τελικά, από τις αρχές του 1900 εισήγαγαν την φωτοδυναμική θεραπεία για την αντιμετώπιση δερματικών όγκων με άριστα μάλιστα αποτελέσματα. Όμως αυτή η θεραπεία δεν απευθυνόταν σε ένα ευρύ ακροατήριο και παρά τις συνεχείς ανακαλύψεις και βελτιώσεις σε επίπεδο φωτοευαισθητοποιητών, χάθηκε για πολλές δεκαετίες.

Στη δεκαετία του 1950 και του 1960 πραγματοποιήθηκαν πολλές μελέτες *in vivo* αναδεικνύοντας την σπουδαιότητα της αιματοπορφυρίνης ως μέσο διάγνωσης του καρκίνου. Επίσης τα συνεχή ερευνητικά πειράματα αποκάλυψαν την εξάρτηση της φωτοδυναμικής αντίδρασης από το οξυγόνο και το φως. Στα 1970 ο Thomas Dougherty τυχαία τοποθέτησε μια κυτταρική καλλιέργεια, η οποία περιείχε φωτοευαισθητοποιητικούς παράγοντες, κοντά στα παράθυρα του εργαστηρίου του, και παρατήρησε σημαντικό κυτταρικό θάνατο. Η μελέτη του πάνω στον παράγοντα που προκάλεσε τον κυτταρικό θάνατο έδειξε ότι ήταν η πορφυρίνη. Η συστηματική προσπάθεια του Tom Dougherty οδήγησε στην γνωστοποίηση της φωτοδυναμικής θεραπείας στο παγκόσμιο κοινό στα τέλη της δεκαετίας του 1970 και αρχές του 1980, αλλά και την έγκριση της πορφυρίνης για την εμπορική διάθεσή της ως φωτοευαισθητοποιητής. Για προσπάθειές του, ο Δρ Dougherty αναφέρεται και ως ο πατέρας της φωτοδυναμικής θεραπείας. ^[10,11,12]

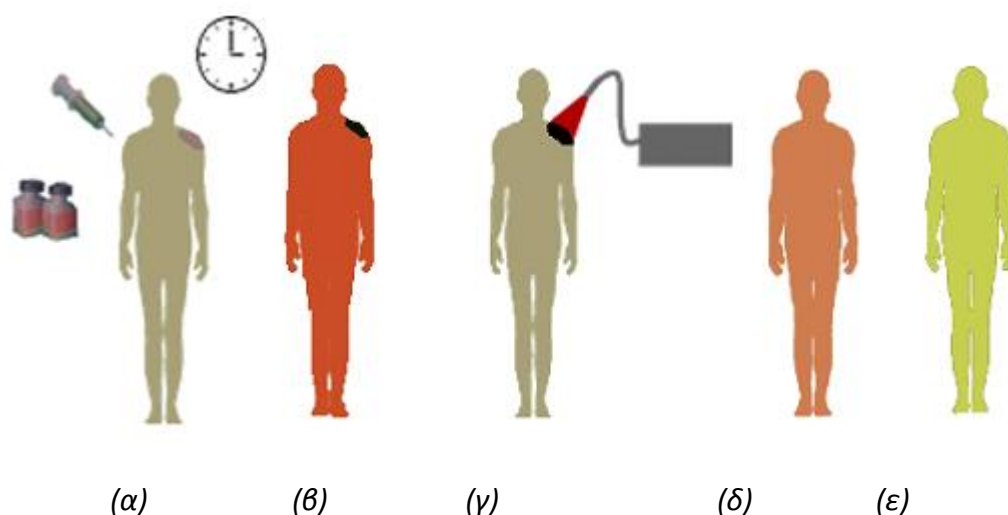
Σχήμα 2. 1: Ιστορία της Φωτοδυναμικής Θεραπείας (1900- Παρόν)



2.2 Βασικές αρχές φωτοδυναμικής θεραπείας

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μια σχετικά σύγχρονη τεχνική αντιμετώπισης καρκινικών όγκων αλλά και άλλων μη κακοηθών όγκων και ασθενειών. Η φωτοδυναμική θεραπεία αποτελεί συνδυασμό τριών βασικών παραγόντων : του φωτός, του φωτοευαισθητοποιητή και του οξυγόνου. Κανένας από τους παράγοντες αυτούς αν δράσει μόνος του δεν είναι τοξικός για τα καρκινικά κύτταρα, η συνδυασμένη όμως δράση τους επιφέρει τη νέκρωσή τους. Η φωτοευαίσθητη ουσία ή φωτοευαισθητοποιητής είναι ένα εξωγενές χρωμοφόρο το οποίο έχει την ιδιότητα να κατακρατείται επιλεκτικά από τους πάσχοντες ιστούς.

Η φωτοδυναμική θεραπεία θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μία διαδικασία τεσσάρων σταδίων (Σχήμα 2.2). Αρχικά η φωτοευαίσθητη ουσία χορηγείται στον ασθενή. Η χορήγηση της ουσίας είναι είτε συστηματική είτε τοπική (επάλειψη στον όγκο). Μετά την πάροδο κατάλληλου χρονικού διαστήματος από τη χορήγησή του στον ασθενή, αφού δηλαδή ο φωτοευαισθητοποιητής έχει συγκεντρωθεί σε μεγάλο βαθμό στους πάσχοντες ιστούς, οι ιστοί αυτοί ακτινοβολούνται με οπτική ακτινοβολία κατάλληλων φασματικών χαρακτηριστικών. Με αυτόν τον τρόπο προκαλείται ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή η οποία σημαίνει την έναρξη μιας σειράς φωτοχημικών αντιδράσεων, τα προϊόντα των οποίων προκαλούν σημαντικές βλάβες σε συστατικά, λειτουργίες, οργάνια και μεμβράνες των μη υγιών κυττάρων, οδηγώντας τα τελικά σε νέκρωση. [13]



Σχήμα 2.2: Στάδια εφαρμογής φωτοδυναμικής θεραπείας (α) χορήγηση φωτοευαισθητοποιητή (β) επιλεκτική συγκέντρωσή του στον καρκινικό όγκο (γ) ακτινοβολία του καρκινικού όγκου και δέγερση του φωτοευαισθητοποιητή (δ) περίοδος φωτοευαισθησίας (ε) νέκρωση του καρκινικού όγκου, πλήρης ίαση

2.3 Μηχανισμοί φωτοδυναμικής δράσης

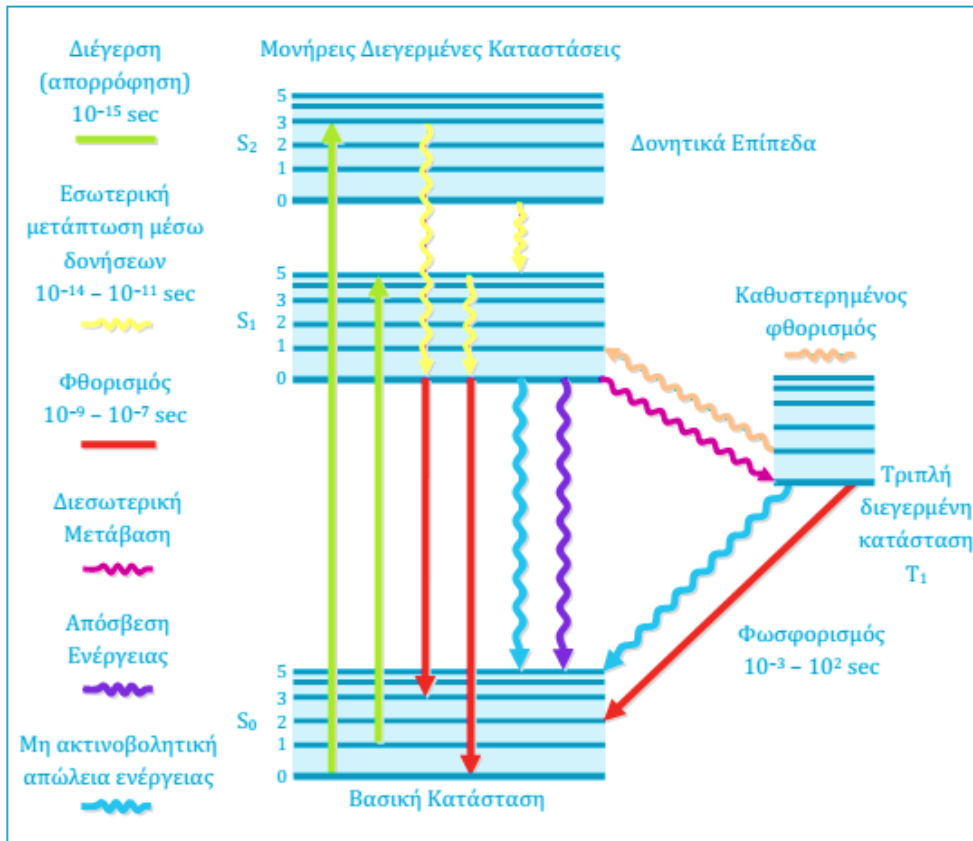
2.3.1 Φαινόμενα που ακολουθούν την απορρόφηση φωτός από τα χρωμοφόρα μόρια.

Χρωμοφόρα ονομάζονται τα μόρια τα οποία απορροφούν κάποια μήκη κύματος του ορατού φωτός, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα να τα θεωρούμε έγχρωμα συστατικά. Πολλές φορές ο ορισμός επεκτείνεται για τη UV και τη IR ακτινοβολία.

Κάθε μόριο κατέχει μία σειρά ενεργειακών σταθμών και μπορεί να μεταβεί από μία χαμηλότερη σε μία υψηλότερη στάθμη με την απορρόφηση κβάντου φωτεινής ακτινοβολίας, ίσης ενέργειας με τη διαφορά των δύο ενεργειακών επιπέδων. Σε κάθε ηλεκτρονιακή στάθμη αντιστοιχεί ένα πλήθος δονητικών καταστάσεων. Η πολλαπλότητα M μιας στάθμης, που εκφράζει την τροχιακή στροφορμή, σχετίζεται με το συνολικό spin στις στάθμης S μέσω της σχέσης $M=2S+1$. Έτσι στην περίπτωση ενός πολυατομικού μορίου του οποίου τα ηλεκτρόνια βρίσκονται σε ζεύγη με αντιπαράλληλα spin το συνολικό spin είναι 0 και η πολλαπλότητά του ίση με 1. Αυτή η κατάσταση ονομάζεται μονήρης (singlet). Όταν το spin στις ηλεκτρονίου αντιστραφεί, τότε στην κατάσταση αυτή υπάρχουν δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με παράλληλα spin και ολικό spin 1 άρα η πολλαπλότητα στις στάθμης είναι 3. Αυτή η ηλεκτρονιακή στάθμη καλείται τριπλή (triplet).

Στη σταθερή τους κατάσταση, τα περισσότερα μόρια βρίσκονται στη μονήρη κατάσταση (singlet state) S_0 . Η βασική αυτή στάθμη χαρακτηρίζεται από τη μικρότερη δυνατή ενέργεια που μπορεί να έχει το μόριο. Αυτό επιτυγχάνεται όταν όλα τα ηλεκτρόνια είναι συζευγμένα και έχουν αντιπαράλληλα spins. Δεν υπάρχει δηλαδή ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Η τριπλή κατάσταση είναι για τα περισσότερα μόρια μία ασταθής κατάσταση στην οποία μεταβαίνουν όταν διεγερθούν και η οποία χαρακτηρίζεται από δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια τα οποία έχουν παράλληλα spins. Το οξυγόνο αποτελεί εξαίρεση των παραπάνω, όντας μία από τις σπάνιες ενώσεις οι οποίες στη βασική τους κατάσταση βρίσκονται στην τριπλή στάθμη, ενώ όταν διεγερθούν μεταβαίνουν στην πολύ βασική για τη φωτοδυναμική θεραπεία μονήρη κατάσταση.

Μετά την απορρόφηση ενός φωτονίου (διαδικασία που ολοκληρώνεται σε χρόνο της τάξεως των 10^{-15} sec) από το μόριο του χρωμοφόρου, ακολουθεί μετάβασή του στην πρώτη ή δεύτερη ηλεκτρονιακή κατάσταση ανάλογα με το εάν το φωτόνιο ανήκε στην περιοχή της ορατής ή της υπεριώδους ακτινοβολίας (Σχήμα 2.3).



Σχήμα 2. 3: Διάγραμμα Jablonski των κατώτερων ενεργειακών επιπέδων και ενδομοριακών διεγέρσεων ενός οργανικού μορίου με βάση την απορρόφηση φωτός.

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

- **Εσωτερική μετατροπή:** το μόριο μπορεί από τη διεγερμένη κατάσταση, να μεταπηδήσει σε ένα κοντινό δονητικό επίπεδο της βασικής ενεργειακής κατάστασης. Η ενέργεια χάνεται χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας μέσω δονητικής αποδιέγερσης.
- **Εσωτερική μετάπτωση: $S^* \rightarrow T^*$:** το διεγερμένο ηλεκτρόνιο μπορεί να μεταβεί, εάν είναι ενεργειακά δυνατό, από τη μονήρη (S^*) στην πρώτη διεγερμένη τριπλή στάθμη (T^*). Η μετάβαση από τη βασική στην τριπλή

διεγερμένη είναι απαγορευμένη (πολύ απίθανη). Σε αντιδιαστολή, η μετάπτωση από τη μονήρη στην τριπλή διεγερμένη στάθμη είναι περισσότερο πιθανή, αφού η ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της T^* είναι μικρότερη αυτής της S^* . Στη συνέχεια, το μόριο μπορεί να επανέλθει άμεσα στη βασική κατάσταση (S_0) αφού η επιστροφή στη βασική μέσω της S^* προϋποθέτει την πρόσληψη ενέργειας από το περιβάλλον (περίπτωση καθυστερημένου φθορισμού). Η άμεση επιστροφή στην βασική κατάσταση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας είτε με εκπομπή ακτινοβολίας, οπότε και έχουμε το φαινόμενο του φωσφορισμού. Εφόσον η πιθανότητα αντίστροφης μετάβασης από τη διεγερμένη μονήρη στάθμη είναι μικρή, η διεγερμένη τριπλή στάθμη είναι συνήθως μεγάλης διάρκειας (από msec έως λεπτά). Η σχετικά μεγάλη παραμονή των μορίων σε αυτή την κατάσταση τα καθιστά πιο επιρρεπή σε διαδικασίες αποδιέγερσης χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας.

- **Μεταφορά ενέργειας μέσω κρούσεων:** αν το διεγερμένο μόριο συγκρουστεί με άλλο μόριο που βρίσκεται σε χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο, τότε η ενέργεια μπορεί να μεταφερθεί σε αυτό το μόριο χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως απόσβεση φθορισμού.
- **Μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού:** η ενέργεια αυτή μπορεί να μεταφερθεί σε άλλο μόριο χωρίς επαφή μέσω μιας σύζευξης διπόλου-διπόλου ανάμεσα στα μόρια. Αν και αυτή η σύζευξη μειώνεται ανάλογα με την έκτη δύναμη της απόστασης ανάμεσα στα μόρια, στα βιολογικά συστήματα μπορεί να επιτευχθεί ικανοποιητική μεταφορά ενέργειας για αποστάσεις μέχρι και 5 nm. Το μόριο που δέχεται την ενέργεια, πρέπει να έχει και μια κατάλληλη ενεργειακή δομή. Το φαινόμενο αυτό είναι μια παραλλαγή μιας απόσβεσης φθορισμού.
- **Φωτοχημική αντίδραση:** Η ενέργεια αυτή μπορεί να επάγει μια χημική αντίδραση, δηλαδή τη δημιουργία ενός νέου είδους μορίου. Η ενέργεια καταναλώνεται κατά τη διάρκεια αυτών των ενώσεων, που έχουν διαφορετικές ιδιότητες φθορισμού από τις αρχικές.
- **Εκπομπή φθορισμού:** το μόριο μπορεί να μεταβεί σε ένα διεγερμένο δονητικό επίπεδο στη βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση, με εκπομπή ενός φωτονίου. Η ενέργεια του φωτονίου και άρα το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, καθορίζεται από την ενεργειακή διαφορά μεταξύ της διεγερμένης και του δονητικού επιπέδου της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η διάρκεια ζωής του φθορισμού είναι της τάξης των nsec.

Κατόπιν, μέσω απόσβεσης και χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας, το μόριο επιστρέφει στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο στις βασικής κατάστασης. Εξαιτίας της απώλειας ενέργειας κατά την παραμονή του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, η εκπεμπόμενη ενέργεια (φθορισμός) είναι χαμηλότερου μήκους κύματος σε σχέση με την απορροφηθείσα ενέργεια. Το φάσμα φθορισμού (η κατανομή της έντασης της ακτινοβολίας φθορισμού για κάθε μήκος κύματος), εκφράζει τις διαφορετικές πιθανές μεταβάσεις από τη μονήρη διεγερμένη κατάσταση στα διάφορα δονητικά επίπεδα της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η σχετική πιθανότητα να συμβεί κάποια από τις πιθανές διαδρομές διαφέρει από μόριο σε μόριο και εξαρτάται, όχι μόνο από τη δομή του, αλλά και από το τοπικό του περιβάλλον. [14,15,16]

2.4 Φάσματα διέγερσης και εκπομπής

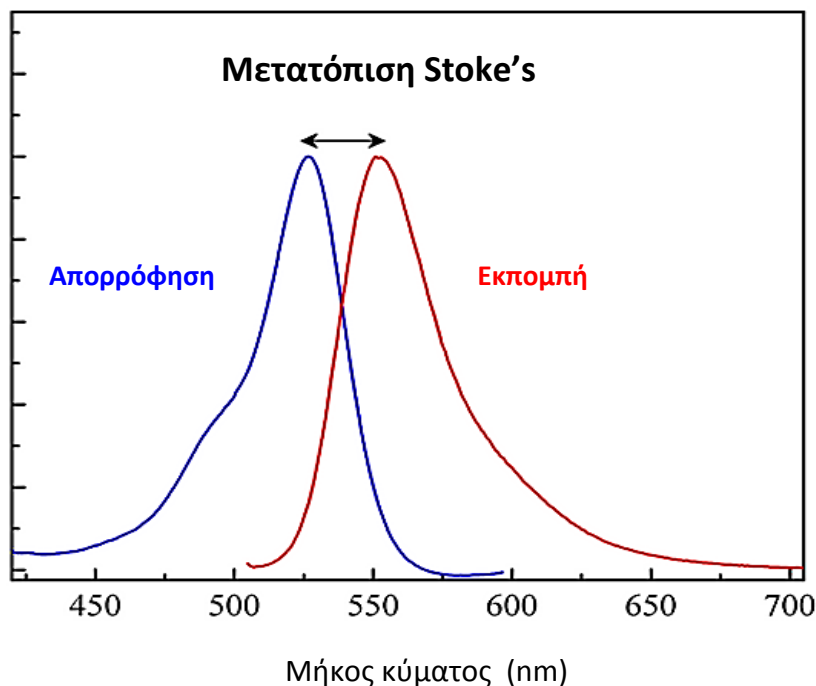
Φάσμα διέγερσης: Το φάσμα διέγερσης εκφράζει τη σχετική απόδοση των διαφόρων μηκών κύματος διεγείρουσας ακτινοβολίας στο να προκαλέσουν φθορισμό. Η εξέταση του φάσματος διέγερσης κάθε μορίου, δείχνει τις θέσεις του φάσματος απορρόφησης, οι οποίες μπορούν να επάγουν εκπομπή φθορισμού. Γενικά η υψηλότερη κορυφή μήκους κύματος του φάσματος διέγερσης είναι αυτή που επιλέγεται για τη διέγερση του δείγματος.

Όταν ένα μόριο του χρωμοφόρου φθορισμού μεταπίπτει από τη διεγερμένη κατάσταση στη βασική, εκπέμπεται φως σε χαρακτηριστικό μήκος κύματος. Η ενέργεια του εκπεμπόμενου φωτονίου ($h\nu_{em}$) ισούται με τη διαφορά της ενέργειας ανάμεσα στις δύο ενεργειακές καταστάσεις και η διαφορά αυτή καθορίζει το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας (λ_{em}).

$$\lambda_{cm} = \frac{hc}{E_{cm}}$$

όπου E_{cm} η ενεργειακή διαφορά ανάμεσα στις δύο ενεργειακές καταστάσεις κατά την εκπομπή του φωτός, h η σταθερά του Planck και c η ταχύτητα του φωτός.

Συνεπώς επειδή υπάρχει απώλεια ενέργειας το μήκος κύματος του εκπεμπόμενου φθορισμού θα είναι πάντα μεγαλύτερο από το μήκος κύματος του φωτός που προκάλεσε τη διέγερση του μορίου. Η διαφορά αυτή ανάμεσα στο μήκος κύματος που αντιστοιχεί στη μέγιστη εκπομπή και σε αυτό που αντιστοιχεί στη μέγιστη απορρόφηση ονομάζεται μετατόπιση Stokes και δηλώνει την ενέργεια η οποία χάνεται κατά την παραμονή του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, πριν επιστρέψει στη βασική (Σχήμα 2.4).

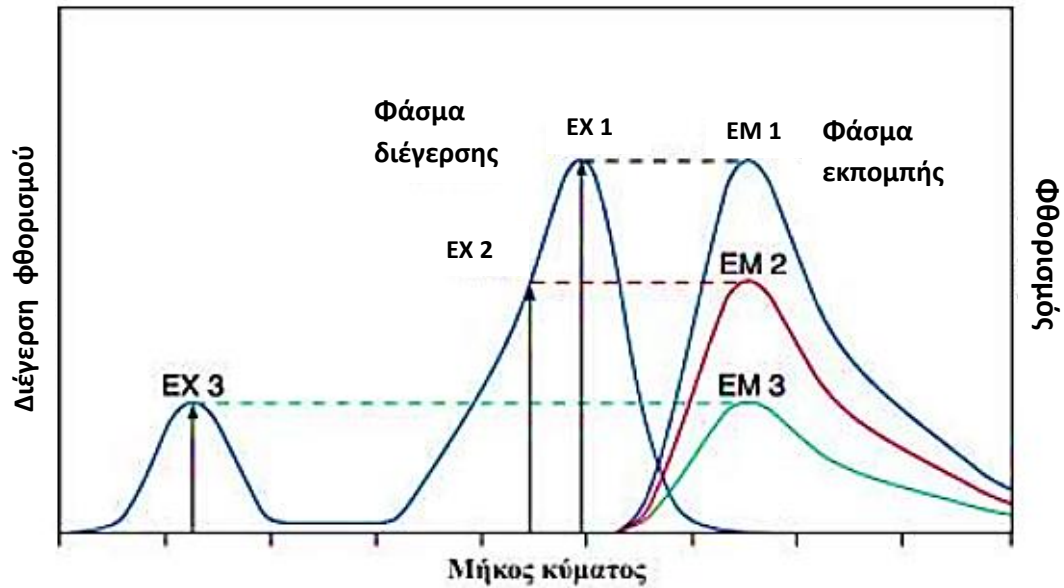


Σχήμα 2. 4: Μετατόπιση Stoke's

Φάσμα εκπομπής: Το φάσμα εκπομπής εκφράζει την κατανομή της έντασης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας στα διάφορα μήκη κύματος, που επάγεται για ένα μήκος κύματος διέγερσης. Το φάσμα εκπομπής οφείλεται στην επανεκπομπή της ακτινοβολίας που απορροφήθηκε από το μόριο.

Φάσμα φθορισμού: Το φάσμα φθορισμού, εκφράζει τις διαφορετικές πιθανές μεταβάσεις από τη μονήρη διεγερμένη κατάσταση στα διάφορα δονητικά επίπεδα της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η σχετική πιθανότητα να συμβεί κάποια από τις πιθανές διαδρομές διαφέρει από μόριο σε μόριο και εξαρτάται όχι μόνο από τη δομή του, αλλά και από το τοπικό του περιβάλλον.

Η ένταση του φθορισμού αντίθετα εξαρτάται από το μήκος κύματος της διέγερσης. Αν για παράδειγμα το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης είναι διαφορετικό από αυτό που αντιστοιχεί στο μέγιστο απορρόφησης, λιγότερη ενέργεια θα απορροφηθεί από το μόριο και επομένως λιγότερη ενέργεια θα εκπεμφθεί. Συνεπώς όλα τα μήκη κύματος του φάσματος απορρόφησης μπορούν να διεγείρουν το μόριο και να επάγουν φθορισμό. Η κορυφή του φθορισμού θα είναι πάντα στο ίδιο μήκος κύματος αλλά η ένταση του θα διαφέρει ανάλογα με την ένταση της απορρόφησης (Σχήμα 2.5). ^[14,17]

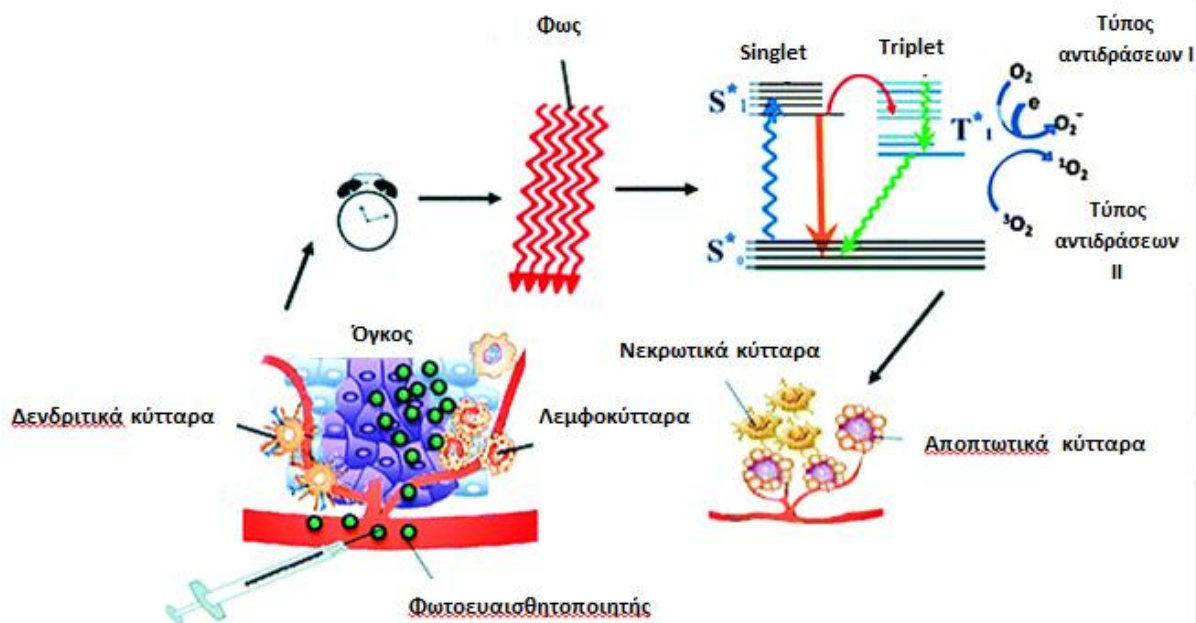


Σχήμα 2. 5: Η διέγερση του χρωμοφόρου με τρία διαφορετικά μήκη κύματος (EX 1, EX 2, EX 3) δεν μεταβάλλει το σχήμα του φάσματος εκπομπής αλλά προκαλεί διακυμάνσεις στην ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού (EM 1, EM 2, EM 3) το οποίο αντιστοιχεί στο μέγεθος του φάσματος διέγερσης

2.5 Φωτοφυσικός μηχανισμός της Φωτοδυναμικής θεραπείας

Η απορρόφηση του φωτός από τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή αποτελεί την αρχή των φωτοφυσικών και φωτοχημικών αντιδράσεων που εμπλέκονται στη φωτοδυναμική θεραπεία. Τα φωτόνια που απορροφώνται πρέπει να έχουν επαρκή ενέργεια για να προκαλέσουν την διέγερση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή. Ενέργεια που ικανοποιεί την προϋπόθεση αυτή βρίσκεται στην περιοχή του υπεριώδους, του ορατού ή του εγγύς υπέρυθρου. Ακτινοβολία μικρότερου μήκους κύματος είναι ιονίζουσα, ενώ μεγαλύτερου μήκους κύματος είναι ανεπαρκής για να προκαλέσει ηλεκτρονική διέγερση. ^[18]

Μετά από την απορρόφηση φωτός κατάλληλου μήκους κύματος, το μόριο του φωτοευαισθητοποιητή διεγείρεται σε δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης μονήρους στάθμης και καταλήγει τελικά στο χαμηλότερο ενεργειακά δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης στάθμης. Από εκεί, το μόριο του φωτοευαισθητοποιητή είτε θα αποδιεγερθεί πίσω στη βασική είτε θα μεταβεί στην τριπλή T_1 στάθμη. Μιας και η μετάβαση $T_1 \rightarrow S_0$ είναι κβαντομηχανικά απαγορευμένη, η τριπλή στάθμη έχει μεγάλη διάρκεια ζωής (μs) και έτσι μπορεί να αλληλεπιδράσει με το βιολογικό μέσο εντός του οποίου εντοπίζεται ο φωτοευαισθητοποιητής (Σχήμα 2.6). ^[19,20]

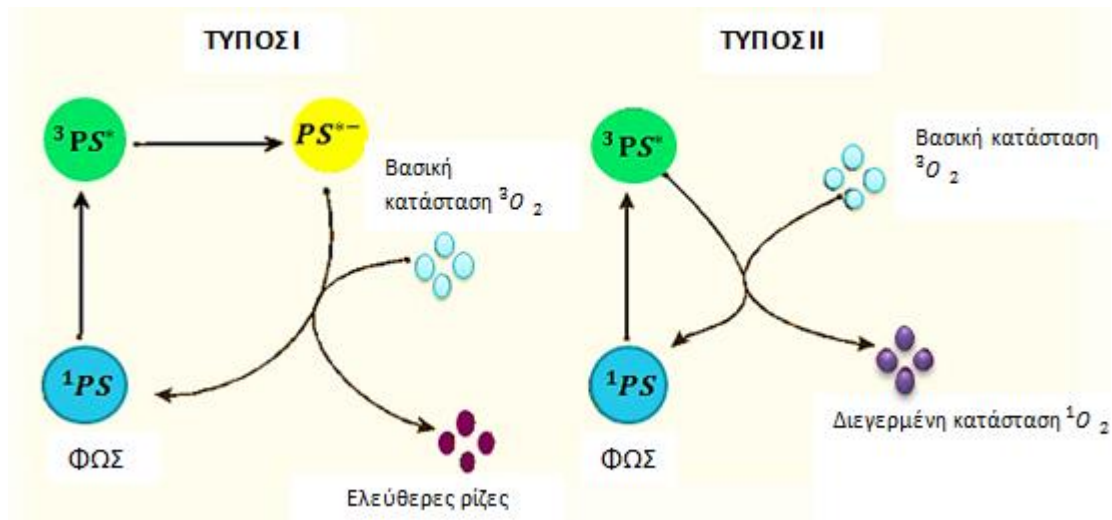


Σχήμα 2. 6: Φωτοδυναμική θεραπεία και φωτοφυσικοί μηχανισμοί.

Αναλυτικότερα, το διεγερμένο μόριο του φωτοευαισθητοποιητή που βρίσκεται στην τριπλή διεγερμένη στάθμη μπορεί να αντιδράσει με το υπόστρωμα και να δεχτεί ή να δώσει ένα ηλεκτρόνιο, ή να μεταφέρει την ενέργειά του σε μοριακό οξυγόνο. [21] Στην πρώτη περίπτωση θα «εμπλακεί» σε ένα μηχανισμό παραγωγής ελευθέρων ριζών (αντιδράσεις τύπου I), ενώ στη δεύτερη σε ένα μηχανισμό παραγωγής μονήρους οξυγόνου (αντιδράσεις τύπου II). Οι δύο τύποι αντιδράσεων I και II περιγράφονται στο Σχήμα 2.7. [22,23]

Αντιδράσεις τύπου I

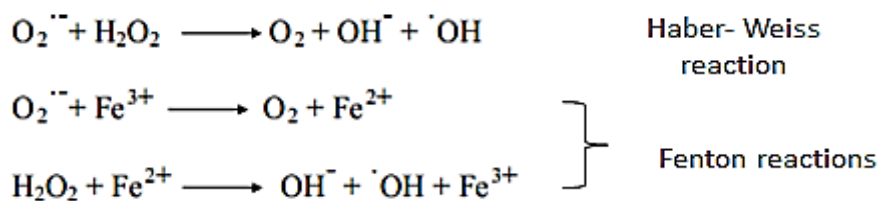
Ο μηχανισμός αντιδράσεων τύπου I περιλαμβάνει είτε εξαγωγή ενός ατόμου υδρογόνου είτε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων ανάμεσα στο διεγερμένο, στην τριπλή διεγερμένη στάθμη, μόριο του φωτοευαισθητοποιητή ($^3P^*$) και το υπόστρωμα S (μια κυτταρική μεμβράνη ή κάποιο μόριο). Οι αντιδράσεις αυτές οδηγούν στο σχηματισμό ζευγών ουδέτερων ή ιοντικών ριζών (ελεύθερες ρίζες). [13,18]



Σχήμα 2. 7: Οι δύο τύποι αντιδράσεων της φωτοδυναμικής θεραπείας

Γενικά, η διέγερση του φωτοευαισθητοποιητή στην διεγερμένη τριπλή κατάσταση και η μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου από μια κατελιημμένη σε μια μη κατελιημμένη ενεργειακή στάθμη, οδηγεί στον σχηματισμό ενός ζεύγους ηλεκτρονίου- οπής. Έτσι το διεγερμένο μόριο μπορεί να αλληλεπιδράσει με κάποιο μόριο στη βασική κατάσταση και να δημιουργηθούν με αυτό τον τρόπο ζεύγη ανιονικών και κατιονικών ριζών. Οι οξειδωμένες μορφές του φωτοευαισθητοποιητή και του υποστρώματος που προκύπτουν, μπορούν να αντιδράσουν με το μοριακό οξυγόνο, O_2 . Μεταφορά ηλεκτρονίου μεταξύ των αντιδρώντων κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων οδηγεί στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου όπως: το ανιόν του υπεροξειδίου (O_2^{2-}), το υδροξύλιο (OH^-) και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). [19,21,22]

Το υδροξύλιο προκύπτει από την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με το ανιόν υπεροξειδίου (Haber - Weiss αντίδραση) ή το κατιόν του σιδήρου (Fenton reactions). Οι αντιδράσεις Fenton είναι πολύ σημαντικές καθώς σε όλα τα βιολογικά συστήματα περιέχεται κάποιο ποσοστό σιδήρου ή άλλων μετάλλων τα οποία μπορούν να δράσουν ως καταλύτες για να παραχθεί το υδροξύλιο, το οποίο παγιδεύεται στο εσωτερικό των κυττάρων και ταχύτατα να οξειδώσει ένα μεγάλο αριθμό βιομορίων. [21,22,23]



Σχήμα 2. 8: Αντιδράσεις τύπου I

Αντιδράσεις τύπου II

Ο μηχανισμός αντιδράσεων τύπου II, αφορά τη μεταφορά ενέργειας από τον διεγερμένο στην τριπλή διεγερμένη στάθμη φωτοευαισθητοποιητή στο μοριακό οξυγόνο. Προϊόν της αντίδρασης αυτής είναι το μονήρες οξυγόνο, μια διεγερμένη κατάσταση του οξυγόνου. Το μοριακό οξυγόνο, που η βασική του κατάσταση είναι η τριπλή διεγερμένη, μέσω κρούσεων με τον διεγερμένο φωτοευαισθητοποιητή, διεγείρεται και παράγεται έτσι το μονήρες οξυγόνο. Λόγω της υψηλής δραστηριότητάς του, το μονήρες οξυγόνο μπορεί να αντιδράσει με ένα μεγάλο αριθμό βιολογικών υποστρωμάτων, προκαλώντας οξειδωτική βλάβη και κυτταρικό θάνατο. [13,18,20]

Η αντίδραση του μονήρους οξυγόνου με τα λιπίδια της μεμβράνης, πρωτεΐνες, ή νουκλεϊκά οξέα οδηγούν σε ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, οι ζωτικές πρωτεΐνες παύουν να είναι λειτουργικές και το DNA παθαίνει ανεπανόρθωτη βλάβη. Αυτές οι αλλοιώσεις οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. [13]

Η υψηλή αντιδραστικότητα του μονήρους οξυγόνου οδηγεί σε πολύ μικρό χρόνο ημιζωής (10 έως 320 ns) και πολύ μικρή ακτίνα δράσης (10 με 55 nm). Κατά συνέπεια η πρόκληση φωτοδυναμικής βλάβης εντοπίζεται πολύ κοντά στη θέση όπου βρίσκεται ο φωτοευαισθητοποιητής. Για τον λόγο αυτό είναι σημαντική η γνώση της υποκυττάριας κατανομής του φωτοευαισθητοποιητή. [20,21,22]

Η πολυπλοκότητα του βιολογικού περιβάλλοντος, όπως επίσης και η αβεβαιότητα σχετικά με τον εντοπισμό του φωτοευαισθητοποιητή στους ιστούς και τα κυτταρικά συστατικά, σε συνδυασμό με διακυμάνσεις στη συγκέντρωση του οξυγόνου στους ιστούς αλλά και στα κύτταρα, καθιστούν αδύνατο να προβλέψουμε ποιος μηχανισμός αντιδράσεων θα επικρατήσει κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας. Το ποσοστό με το οποίο θα συμμετέχουν οι αντιδράσεις τύπου I ή τύπου II στο τελικό κυτταροτοξικό αποτέλεσμα εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως:

- Το είδος του φωτοευαισθητοποιητή
- Το είδος του ιστού ή των κυττάρων
- Το pH
- Τη συγκέντρωση οξυγόνου

Συνήθως η αποτελεσματικότητα των αντιδράσεων τύπου I είναι μεγαλύτερη σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου και υψηλής συγκέντρωσης υποστρώματος, σε αντίθεση με τις αντιδράσεις τύπου II που κυριαρχούν σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου. Μάλιστα κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας έχει παρατηρηθεί ότι ο μηχανισμός I τείνει να αντικαταστήσει τον μηχανισμό II καθώς η συγκέντρωση του οξυγόνου μειώνεται

κάτω από μια κρίσιμη τιμή. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι οι αντιδράσεις τύπου I ευνοούνται περισσότερο σε πολικά περιβάλλοντα ενώ αυτές του τύπου II σε λιπόφιλα. [18,20]

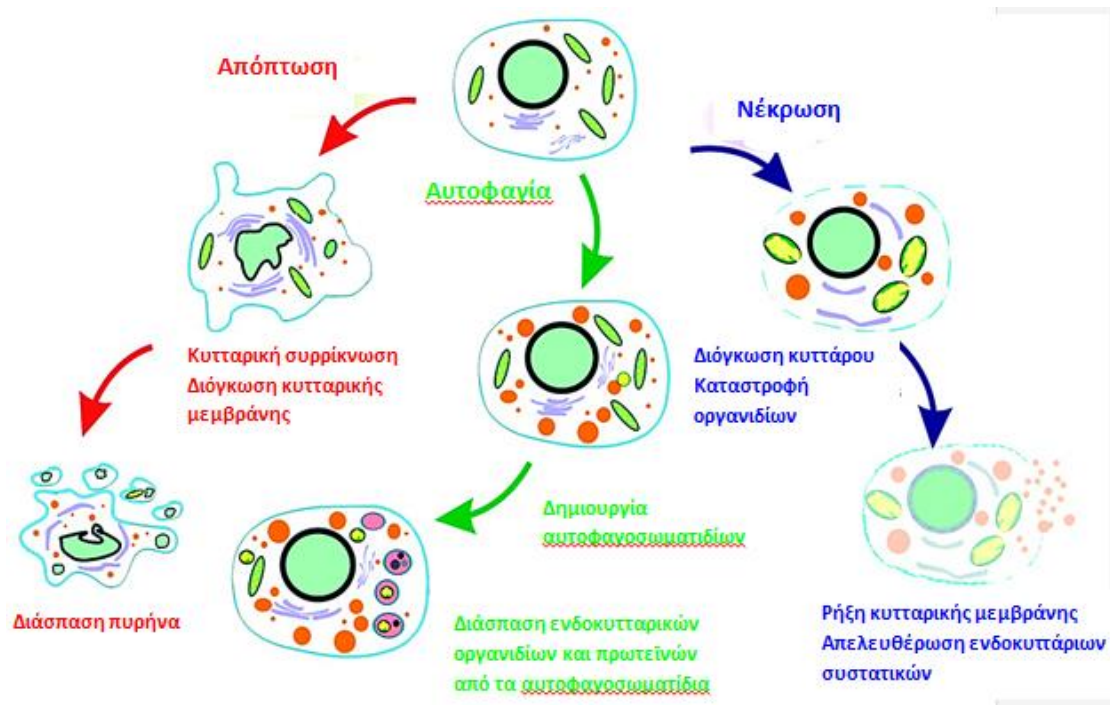
Παρόλο που οι μηχανισμοί της φωτοδυναμικής θεραπείας δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως, είναι γενικά αποδεκτό ότι το μονήρες οξυγόνο που παράγεται από την αντίδραση τύπου II είναι κυρίως υπεύθυνο για τον κυτταρικό θάνατο. Όμως και οι δύο τύποι αντιδράσεων συνεισφέρουν σημαντικά στην καταστροφή των καρκινικών όγκων.

2.6 Μονοπάτια κυτταρικού θανάτου μετά τη φωτοδυναμική δράση

Η έκταση της κυτταροτοξικότητας αλλά και το είδος του κυτταρικού θανάτου μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία σε επίπεδο οργανισμού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Το αποτέλεσμα της φωτοδυναμικής δράσης καθορίζεται από τους παρακάτω παράγοντες:

1. Το είδος του κυττάρου
2. Το είδος του φωτοευαισθητοποιητή, η συγκέντρωσή του και το σημείο χωρικού εντοπισμού του στο κύτταρο κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης
3. Η ενέργεια της δέσμης ακτινοβολήσης, ο τρόπος ακτινοβολήσης, ο χρόνος που μεσολαβεί από τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή μέχρι την έκθεσή του στο φως
4. Το είδος του καρκινικού ιστού και η οξυγόνωσή του

Με βάση τους παραπάνω παράγοντες της φωτοδυναμικής δράσης, μπορούμε να διακρίνουμε τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς καταστροφής των καρκινικών κυττάρων: την απόπτωση, τη νέκρωση και την αυτοφαγία/αυτοφαγοκυττάρωση. Η διάκριση αυτή βασίζεται στις διαφορές που εμφανίζουν οι μορφολογικές, βιοχημικές και μοριακές αλλαγές τις οποίες υφίστανται τα κύτταρα κατά το θάνατό τους. [18,24]



Σχήμα 2. 9: Μονοπάτια κυτταρικού θανάτου

Απόπτωση

Ο μηχανισμός της απόπτωσης είναι μια φυσιολογική κυτταρική λειτουργία για τον οργανισμό και την επιβίωσή του. Η απόπτωση χαρακτηρίζεται μορφολογικά από τα εξής χαρακτηριστικά: αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού Ca^{+2} , συμπίκνωση της χρωματίνης στον πυρήνα, διάσπαση του χρωμοσωμικού DNA νουκλεοσωματιδιακά κλάσματα, κυτταρική συρρίκνωση, διόγκωση της κυτταρικής μεμβράνης και σχηματισμό αποπτωτικών σωμάτων χωρίς ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης. [13,18,25] Τυπικά τα αποπτωτικά κύτταρα απελευθερώνουν σήματα «Βρες με» και «Φάε με» ζητώντας την εκκαθάρισή τους από τα φαγοκύτταρα. Με τον τρόπο αυτό αποτρέπεται η δημιουργία φλεγμονής και δεν επηρεάζονται τα γειτονικά κύτταρα. Σε βιοχημικό επίπεδο ειδικά ένζυμα, οι κασπάσες, ενεργοποιούν την διαδικασία της απόπτωσης [26,27]

Νέκρωση

Η νέκρωση αποτελεί έναν διαφορετικό τρόπο κυτταρικού θανάτου. Πρόκειται για μια βίαιη, γρήγορη και μη προγραμματισμένη διαδικασία που αφορά εκτεταμένους κυτταρικούς πληθυσμούς. Συνήθως προκαλείται από υπερβολική δόση κυτταροτοξικών παραγόντων. [13,18] Η νέκρωση μορφολογικά χαρακτηρίζεται από διόγκωση του κυτταροπλάσματος, καταστροφή των οργανιδίων και ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης οδηγώντας σε απελευθέρωση των ενδοκυττάρων συστατικών. Συνήθως δημιουργείται και φλεγμονή στην περιοχή. Πιστεύεται ότι αποτελεί συνέπεια παθολογικών αιτιών όπως αύξηση της ενδοκυττάριας

συγκέντρωσης του Ca^{+2} και μείωση της ουσίας adenosine triphosphate (ATP). Βιοχημικά κατά τη νέκρωση παρατηρείται μη ενεργοποίηση της κασπάσης, απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και καταστροφή του DNA. [25,28]

Αυτοφαγία/Αυτοφαγοκυττάρωση

Η έκθεση των κυττάρων στη φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί επίσης να οδηγήσει στην διέγερση της διαδικασίας της αυτοφαγίας. Η αυτοφαγία αποτελεί ένα λυσοσωμικό μονοπάτι που οδηγεί στην αποδόμηση και την ανακύκλωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών και των οργανιδίων. Η αυτοφαγία μπορεί να έχει τόσο κυτταροπροστατευτικό όσο και αντίθετο ρόλο για την επιβίωση του κυττάρου. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να απομακρύνει ελαττωματικά οργανίδια και τοξικούς ή παθογόνους παράγοντες εξασφαλίζοντας έτσι την επιβίωση του κυττάρου, ενώ σε δυσμενείς συνθήκες για το κύτταρο προκαλεί κυτταρικό θάνατο διασπώντας τα ζωτικά οργανίδια του. [13,18,25]

Έρευνες έχουν δείξει ότι οι φωτοευαίσθητοποιητές που συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια επάγουν κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, ενώ αυτοί που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη οδηγούν στην νέκρωση. Επίσης η συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι σημαντική αφού μεγάλη συγκέντρωσή της προκαλεί βίαιο θάνατο μέσω νέκρωσης και χαμηλότερες συγκεντρώσεις αυτής, απόπτωση. Σημαντικό ρόλο παίζει και η ένταση της ακτινοβολίας κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας. Χαμηλότερες δόσεις ενέργειας επάγουν αποπτωτικό θάνατο, ενώ υψηλότερες τον μηχανισμό της νέκρωσης. Τέλος ο μηχανισμός της φαγοκυττάρωσης είναι πιο έντονος όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των ελεύθερων ριζών που υπάρχουν στο περιβάλλον του κυττάρου.

2.7 Συστήματα laser στη Φωτοδυναμική Θεραπεία

Οι πηγές φωτός που επιλέγονται είναι οι λυχνίες και τα lasers, με τα τελευταία να κυριαρχούν. Η νέα γενιά lasers που έχει φέρει επανάσταση στην Ιατρική είναι τα διοδικά lasers ή lasers ημιαγωγών (diode lasers). Αυτά διαθέτουν το μέγιστο πλεονέκτημα των πολύ μικρών τους διαστάσεων. Για το λόγο αυτό έχουν τη δυνατότητα να ενσωματώνονται εύκολα σε συστήματα οπτικών ινών (fibers) τα οποία αποτελούν όπως γνωρίζουμε σήμερα τα κατ' εξοχήν μέσα οπτικής διάδοσης πληροφοριών. Το «ενεργό» τους μέσο είναι ένας ημιαγωγικός κρύσταλλος, εξαιρετικά μικρού μεγέθους, που βασίζεται κυρίως στο GaAs και σε παρόμοιες ουσίες. Το πιο σημαντικό, παρέχουν τη δυνατότητα εκπομπής διαφορετικών μηκών κύματος, από ορατά μέχρι και υπέρυθρα, ανάλογα με το είδος της διόδου που χρησιμοποιείται.

Τα lasers ημιαγωγών (ή διοδικά Laser) έχουν γενικά μικρή ισχύ (μέχρι μερικές δεκάδες mW) και ως εκ τούτου συγκαταλέγονται κυρίως στην κατηγορία των μαλακών lasers. Στις χαμηλές αυτές ισχύεις η ακτινοβολία τους:

1. Δεν προκαλεί ούτε θερμότητα, ούτε κάποιες μακροχημικές ή ανατομικές μεταβολές στους ιστούς.
2. Είναι δυνατό να βοηθήσει τις δραστηριότητες των κυττάρων και την ενδοκυτταρική επικοινωνία.
3. Επιδρά θετικά στο ανοσοποιητικό σύστημα, με αποτέλεσμα να παρατηρείται αύξηση της ενδογενούς θεραπευτικής ικανότητας του οργανισμού. [29,30]

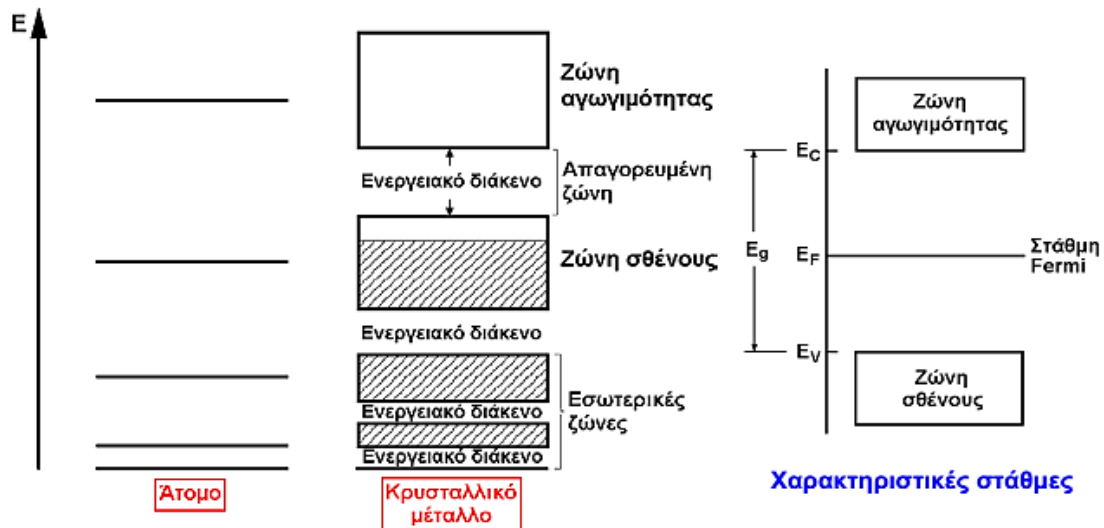
Αρχή λειτουργίας

Τα διοδικά laser, ή laser ημιαγωγών, είναι παρόμοια με τα υπόλοιπα στο γεγονός ότι πρέπει να δημιουργηθεί αναστροφή πληθυσμών μεταξύ κβαντικών ενεργειακών σταθμών για να προκληθεί δράση laser. Διαφέρουν ωστόσο σημαντικά ως προς την αρχή λειτουργίας τους καθώς εκμεταλλεύονται τις ιδιότητες των ημιαγωγών και των διόδων για να παράξουν φως.

Ενεργειακές ζώνες και αντιστροφή πληθυσμών σε ημιαγωγούς

Τα ημιαγωγικά υλικά χαρακτηρίζονται από υψηλής κανονικότητας πλεγματικές δομές ατόμων ή ιόντων με τέσσερα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα. Σε θερμοκρασία κοντά στο απόλυτο μηδέν τα υλικά αυτά βασικά χαρακτηρίζονται από ομοιοπολικούς δεσμούς και είναι μονωτές. Στις υψηλότερες θερμοκρασίες οι θερμικές δονήσεις μπορούν να σπάσουν τους δεσμούς και τα ελεύθερα κινούμενα ηλεκτρόνια προσδίδουν αγωγιμότητα.

Στα στερεά οι διακριτές ενεργειακές στάθμες που απαντώνται σε μεμονωμένα άτομα διαπλατώνονται σε ζώνες, εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων των ατόμων στο πλέγμα του ημιαγωγού. Το ενδιαφέρον περιορίζεται στις δυο εξωτερικές ενεργειακές ζώνες, τη ζώνη σθένους και τη ζώνη αγωγιμότητας. Σε έναν ημιαγωγό σε θερμική ισορροπία, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, η ζώνη σθένους είναι πλήρης με ηλεκτρόνια ενώ η ζώνη αγωγιμότητας κενή. Οι δυο ζώνες χωρίζονται από μια απαγορευμένη ενεργειακή περιοχή, ενεργειακό χάσμα (απαγορευμένη ζώνη), έτσι πολύ λίγα ηλεκτρόνια μπορούν να υπερπηδήσουν το χάσμα σε κανονικές συνθήκες και να γίνουν φορείς αγωγιμότητας.



Σχήμα 2. 10: Ενεργειακές ζώνες ημιαγωγού

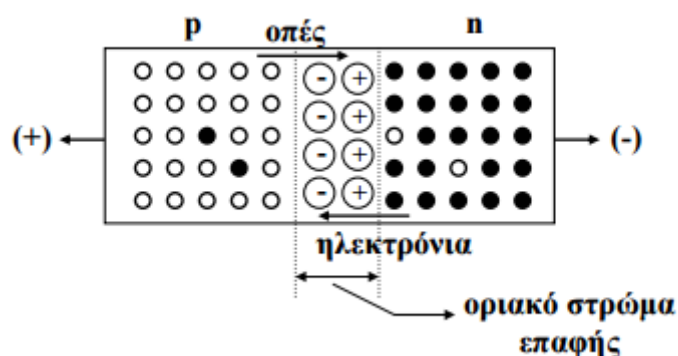
Όταν ένα δέσμιο ηλεκτρόνιο στην ζώνη σθένους προωθείται στη ζώνη αγωγιμότητας για να γίνει ένας κινούμενος φορέας αρνητικού φορτίου, αφήνει μια κενή θέση στη ζώνη σθένους η οποία καλείται οπή. Η οπή μπορεί να γεμίσει με ηλεκτρόνια σθένους από άλλες θέσεις. Έτσι η οπή μπορεί να διαδίδεται και θεωρείται ένας κινούμενος φορέας θετικού φορτίου. Όταν ένα από τα ηλεκτρόνια της ζώνης αγωγιμότητας μεταπηδά στην ζώνη σθένους γεμίζοντας μια οπή, εκπέμπεται ένα φωτόνιο με ενέργεια ίση με την ενέργεια του ενεργειακού χάσματος (ακτινοβολία επανασύνδεσης). Όταν ο ημιαγωγός τοποθετηθεί σε κατάλληλο οπτικό αντηχείο η ακτινοβολία επανασύνδεσης ενισχύεται διαδοχικά παράγοντας φως laser. Δράση laser προκαλείται από την αναστροφή πληθυσμών μεταξύ του κάτω μέρους της ζώνης αγωγιμότητας και του πάνω μέρους της ζώνης σθένους. Για να επιτευχθεί αναστροφή πληθυσμών είναι αναγκαία η δημιουργία ικανού αριθμού ελεύθερων ηλεκτρονίων στη ζώνη αγωγιμότητας με αντίστοιχες οπές στη ζώνη σθένους.

Οι ημιαγωγοί δεν είναι απαραίτητο να έχουν ίσο αριθμό οπών και ηλεκτρονίων. Ημιαγωγοί όπου τα περισσότερα από τα πλεονάζοντα ηλεκτρόνια διεγείρονται στην ζώνη αγωγιμότητας δημιουργώντας μια πλειοψηφία αρνητικά φορτισμένων φορέων, χαρακτηρίζονται ως ημιαγωγοί τύπου n. Αντίθετα, οι ημιαγωγοί που η πλειονότητα των κενών θέσεων των δεκτών γεμίζουν με ηλεκτρόνια που εξάγονται από τη ζώνη σθένους δημιουργώντας συγχρόνως μια πλειοψηφία θετικά φορτισμένων φορέων, ονομάζονται ημιαγωγοί τύπου p. [31.32]

Δίοδος επαφής p-n

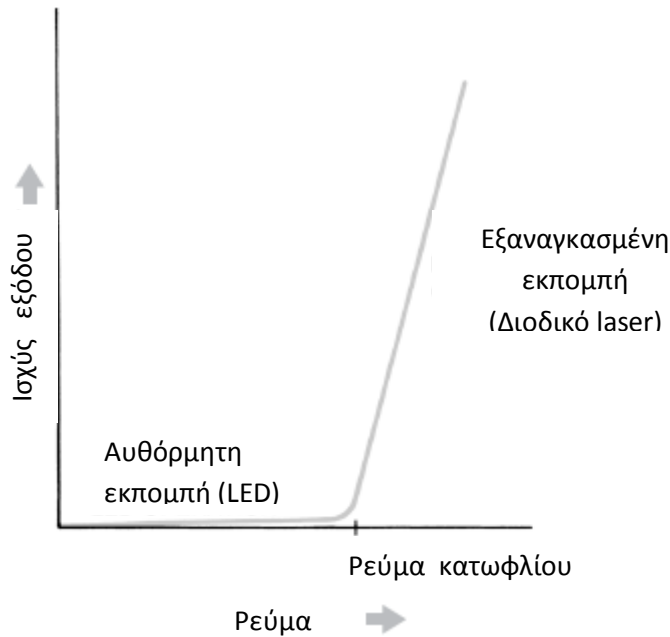
Βάση για την ανάπτυξη των διοδικών lasers αποτελούν οι δίοδοι τύπου p-n. Πρόκειται για δυο ημιαγωγούς, έναν ημιαγωγό τύπου p και έναν ημιαγωγό τύπου n οι οποίοι έχουν έρθει σε επαφή.

Όταν ένας ημιαγωγός τύπου p έλθει σ' επαφή με έναν ημιαγωγό τύπου n, τότε κατά μήκος μιας στενής περιοχής της επαφής των δυο ημιαγωγών που καλείται οριακό στρώμα επαφής και είναι της τάξης 1 – 2 μm , παρατηρείται διάχυση ηλεκτρονίων και οπών (Σχήμα 2.11).



Σχήμα 2. 11: Λειτουργία της επαφής p-n. Υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου τα ηλεκτρόνια που πλεονάζουν στην πλευρά n κινούνται προς το θετικό πόλο (προς τα αριστερά) και οι οπές που πλεονάζουν στην πλευρά p κινούνται προς τα δεξιά.

Τα ηλεκτρόνια προέρχονται από τα πλεονάζοντα ηλεκτρόνια της πλευράς n, ενώ οι οπές προέρχονται από την πλευρά p. Με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, η παροχή των ηλεκτρονίων είναι συνεχής και η διάχυση αυτή συντηρείται. Όμως κατά μήκος του οριακού στρώματος της επαφής τα ηλεκτρόνια επανασυνδέονται με τις οπές. Με κάθε επανασύνδεση ηλεκτρονίου – οπής, ελευθερώνεται ενέργεια υπό μορφή φωτονίων. Στην περίπτωση αυτή η επαφή p-n λειτουργεί ως φωτοεκπέμπουσα δίοδος ή LED. Το φαινόμενο όμως της εκπομπής αρχίζει να αλλάζει μορφή αν με τη βοήθεια της εξωτερικής πηγής αρχίζουμε να αυξάνουμε το ρεύμα των εγχεόμενων ηλεκτρονίων στην p- περιοχή. Πράγματι τότε η εκπομπή των φωτονίων αρχίζει να γίνεται εξαναγκασμένη επειδή λόγω της μεγάλης πυκνότητας, τα ήδη εκπεμπόμενα φωτόνια προλαβαίνουν και προτρέπουν σε επανασύνδεση ζεύγη ηλεκτρονίων οπών.



Σχήμα 2. 12: Ποιοτικό διάγραμμα εξάρτησης εκπομπής φωτονίων από διερχόμενο ρεύμα διόδου.

Η επιπλέον αύξηση της πυκνότητας του ρεύματος των εγχεόμενων ηλεκτρονίων, θα έχει σαν αποτέλεσμα η εκπομπή των φωτονίων να είναι ολοκληρωτικά σχεδόν εξαναγκασμένη (Σχήμα 2.12). Η πολλαπλή επίσης διαδρομή των φωτονίων διαμέσου της επαφής p-n λόγω της μεγάλης ανακλαστικότητας των άκρων της, θα έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ενίσχυσης του παραγόμενου συμφώνου πλέον φως σε τέτοιο βαθμό ώστε υπερτερώντας των φαινομένων της απορρόφησης, της σκέδασης και των απωλειών στα παράπλευρα τοιχώματα, από την διόδο να προκύπτει μία δέσμη laser με αρκετά μεγάλο βαθμό συμφωνίας. ^[30]

Διοδικά Lasers

Στα lasers ημιαγωγών χρησιμοποιείται ως ενεργό υλικό το οριακό στρώμα της επαφής p-n δυο ημιαγωγών. Για να χρησιμοποιηθεί μια τέτοια επαφή για δράση laser, πρέπει να συνυπάρχουν και οι άλλες απαιτήσεις, δηλαδή η οπτική ανάδραση, η άντληση και η αναστροφή πληθυσμών. Το οπτικό αντηχείο δημιουργείται στην κρυσταλλοδίοδο με την κατάλληλη λείανση των τερματικών επιφανειών της επαφής p-n, ώστε αυτές ν' αντιστοιχούν σε οπτικά επίπεδες επιφάνειες που σε συνδυασμό με τους υψηλούς δείκτες διάθλασης των υλικών των ημιαγωγών να δημιουργούνται ικανοποιητικές ανακλάσεις. Η άντληση επιτυγχάνεται με την εφαρμογή τάσης ορθής πόλωσης στην ημιαγωγό διάταξη και έτσι έχουμε διαρκή επαναφορά ηλεκτρονίων αγωγιμότητας στην πλευρά n με ταυτόχρονη αναστροφή πληθυσμών κατά μήκος του οριακού στρώματος της επαφής. Η αναστροφή πληθυσμών, όπως περιγράφηκε νωρίτερα, πραγματοποιείται μεταξύ των ενεργειακών ζωνών ακτινοβολίας εξαρτάται από το εύρος E_g του ενεργειακού χάσματος ^[30]

2.8 Δοσιμετρία

2.8.1 Βάθος διείσδυσης

Το περιορισμένο βάθος διείσδυσης του φωτός κατά τη διάρκεια της θεραπείας θεωρείται από πολλούς ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας. Για την περιοχή του κόκκινου φωτός, εμπειρικοί κανόνες αναφέρουν ότι το βάθος θεραπείας κυμαίνεται μεταξύ 2 και 5 mm. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που όχι μόνο το μικρό βάθος διείσδυσης δεν αποτελεί πρόβλημα αλλά επιβάλλεται. Μικρό βάθος διείσδυσης για παράδειγμα επιβάλλεται όταν πρόκειται να θεραπευτούν *in situ* καρκίνοι κοιλοτήτων όπως π.χ της ουροδόχου κύστης ή του παχέως εντέρου. Σε αυτές τις περιπτώσεις εάν η ακτινοβολία διεισδύσει σε μεγάλο βάθος μπορούν να προκληθούν σοβαρές βλάβες όπως καταστροφή του τοιχώματος των οργάνων ή/και η συστολή του οργάνου.

Ανάλογα με τον ιστό το βάθος στο οποίο παρατηρούνται φωτοδυναμικές δράσεις μπορεί να μειώνεται σημαντικά και λόγω σκέδασης ή λόγω επιφανειακής μόνο απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή.

2.8.2 Παλμική και συνεχής ακτινοβολία

Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν πως τα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής είναι πολύ καλύτερα αν αντί για συνεχή χρησιμοποιηθεί παλμική ακτινοβολία ή διακοπτόμενη ακτινοβολία. Οι περισσότεροι αποδίδουν τα βελτιωμένα αποτελέσματα στο ότι στο χρόνο μεταξύ δύο παλμών ή δύο ακτινοβολήσεων ο ιστός προλαβαίνει να αναπληρώσει το οξυγόνο το οποίο έχει καταναλωθεί από τις δράσεις που προκλήθηκαν από τον πρώτο παλμό. Ο χρόνος αυτός στην περίπτωση που δεν έχουν υποστεί κάποια βλάβη τα αγγεία είναι ίσος με το χρόνο που απαιτείται για τη διάχυση του οξυγόνου από τα τριχοειδή στα κύτταρα ή στην περίπτωση που το αγγειακό σύστημα έχει υποστεί συστολή ο χρόνος που απαιτείται προκειμένου να πάρουν τα αγγεία τις φυσιολογικές τους διαστάσεις.

Ένα άλλο στοιχείο το οποίο πρέπει να επιλεγεί για τους ίδιους λόγους πολύ προσεκτικά είναι η ακτινοβολία (fluence rate). Μαθηματικά μοντέλα που αφορούν την κατανάλωση οξυγόνου θεωρούν ότι με ακτινοβολήσεις μεγαλύτερες των $50\text{mW}/\text{cm}^2$ η κατανάλωση του οξυγόνου είναι τόσο γρήγορη που η θεραπεία γίνεται μη αποτελεσματική.

2.8.3 Δόση ενέργειας

Η συνολική ενέργεια που έχει τελικά δοθεί στον ιστό δίνεται από το γινόμενο της ακτινοβολίας επί τον συνολικό χρόνο ακτινοβολίας:

$$\text{Συνολική δόση ενέργειας (J/cm}^2\text{)} = \text{Ισχύς (mW/cm}^2\text{)} \times \text{χρόνος θεραπείας (sec)}$$

Η συνολική δόση ενέργειας ποικίλει ανάλογα με τον όγκο, τον φωτοευαισθητοποιητή και την πηγή που θα χρησιμοποιηθεί στην περίπτωση που αυτή δεν είναι laser από 30-540 (J/cm^2). [14.33]

2.9 Πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας

Τα κύρια πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας έναντι των άλλων συμβατικών θεραπειών για τον καρκίνο είναι:

- ✓ Η ικανότητά της στην επιλεκτική καταστροφή των όγκων.
- ✓ Η πολύ χαμηλή συστηματική τοξικότητα της (η οποία οφείλεται στο γεγονός ότι οι φωτοευαισθητοποιητές ενεργοποιούνται μόνο παρουσία φωτός).
- ✓ Τα υψηλά αισθητικά αποτελέσματα που εμφανίζει (ελάχιστη δερματική βλάβη, μικρή ή καθόλου ουλή) τα οποία είναι συχνά καλύτερα σε σχέση με τις συμβατικές θεραπείες.
- ✓ Η έλλειψη σημαντικής θνησιμότητας που να συνδέεται με τη φωτοδυναμική θεραπεία τόσο για τους ασθενείς όσο και για το ιατρικό προσωπικό.
- ✓ Η θεραπεία μπορεί να επαναληφθεί όσες φορές χρειαστεί αφού δεν υπάρχουν σοβαρές παρενέργειες.
- ✓ Δεν χρειάζεται αναισθησία αν ο όγκος είναι εύκολα προσβάσιμος.
- ✓ Το κόστος της είναι μικρό.
- ✓ Μπορεί να επαναληφθεί όσες φορές κρίνεται απαραίτητο χωρίς να υπάρχει ο κίνδυνος αύξησης της τοξικότητας (εν αντιθέσει με την ακτινοθεραπεία).

Τα βασικότερα μειονεκτήματά της είναι δύο: Η αδυναμία μεταφοράς της φωτεινής ακτινοβολίας σε όλα τα σημεία του ανθρώπινου οργανισμού με αποτέλεσμα οι εφαρμογές της να είναι ακόμα περιορισμένες σε όγκους οργάνων εύκολα προσβάσιμων. Επίσης η παραμένουσα φωτοευαισθησία που προκαλείται στο δέρμα μετά τη θεραπεία, εξαιτίας της οποίας οι ασθενείς θα πρέπει να προφυλάσσονται από το έντονο φως για αρκετές εβδομάδες. [14.34.35]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΕΣ

3.1 Οι φωτοευαισθητοποιητές και τα χαρακτηριστικά τους

Οι φωτοευαισθητοποιητές είναι φυσικές ή συνθετικές ενώσεις ικανές να απορροφούν φως ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος και να ενεργοποιούν τις κυτταροτοξικές αντιδράσεις τύπου I και II. Αυτό όμως δεν συνεπάγεται ότι όλα τα μόρια που απορροφούν φως μπορούν να χαρακτηριστούν φωτοευαισθητοποιητές. Τα χαρακτηριστικά που πρέπει να πληρεί μία ένωση προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως φωτοευαισθητοποιητής μπορούν να διακριθούν στις παρακάτω κατηγορίες:

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά [14.36.37]

- ♣ Χημική καθαρότητα. Τα παράγωγα της αιματοπορφυρίνης ακόμα και στην «καθαρή μορφή» τους είναι πολύπλοκο μείγμα ολιγομερών. Ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να έχει συγκεκριμένη χημική σύσταση καθώς αυτό κάνει περισσότερο εύκολες τις μελέτες του μεταβολισμού και της φαρμακοκινητικής του.
- ♣ Μεγάλο μοριακό συντελεστή απορρόφησης στην περιοχή του κόκκινου. Απορρόφηση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σημαίνει μεγαλύτερο βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας στον ιστό. Αυτό είναι σημαντικό για δύο λόγους. Πρώτον γιατί μπορεί να καταστραφεί μεγαλύτερο μέρος του όγκου σε κάθε θεραπεία γεγονός το οποίο συνεπάγεται λιγότερη ταλαιπωρία για τον ασθενή, και δεύτερον γιατί εάν το βάθος διείσδυσης είναι μεγάλο μπορούν να αντιμετωπιστούν και μη επιφανειακοί όγκοι.
- ♣ Μικρό μοριακό συντελεστή απορρόφησης στην UV περιοχή. Εάν ο φωτοευαισθητοποιητής παρουσιάζει σημαντική απορρόφηση στην UV περιοχή τότε είναι πιθανό ο ασθενής να παρουσιάσει προβλήματα φωτοευαισθησίας αν εκτεθεί στην ηλιακή ακτινοβολία και εφόσον ο φωτοευαισθητοποιητής δεν έχει ακόμη απομακρυνθεί από τους δερματικούς ιστούς.
- ♣ Μικρή τάση για σχηματισμό συσσωματωμάτων σε υδατικό περιβάλλον. Οι φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι είναι υδατοδιαλυτοί είναι πιο εύκολο να χορηγηθούν στην κλινική πράξη. Επίσης θα πρέπει να είναι δυνατή η είσοδος τους στο εσωτερικό των κυττάρων διαμέσου των λιπιδίων της μεμβράνης. Επομένως, ιδανικά θα πρέπει να είναι και υδρόφοβες ουσίες. Για να συνδυαστούν τα δύο αυτά χαρακτηριστικά, η διαλυτότητα στο νερό και η υδροφοβικότητα, θα πρέπει η ουσία να είναι αμφίφιλη.
- ♣ Φωτοσταθερότητα. Οι φωτοευαισθητοποιητές θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα ανθεκτικοί στη φωτοκαταστροφή και στην οξειδωση τόσο από το μονήρες

οξυγόνο όσο και από τα υπόλοιπα δραστικά είδη τα οποία δημιουργούνται στο σημείο της φωτοδυναμικής δράσης. Οι φωτοσταθεροί φωτοευαισθητοποιητές είναι προτιμητέοι καθώς μπορούν να ακτινοβολούνται για μεγάλο χρόνο χωρίς να αλλοιώνονται οι φωτοδυναμικές τους ιδιότητες.

Φωτοφυσικά χαρακτηριστικά [14.36.37]

- ❖ Μεγάλος χρόνος ζωής της τριπλής διεγερμένης κατάστασης. Όταν η τριπλή διεγερμένη κατάσταση του μορίου έχει μεγαλύτερο χρόνο ζωής αυξάνεται η πιθανότητα μεταφοράς της ενέργειάς του σε κάποιο άλλο μόριο, όπως για παράδειγμα το οξυγόνο.
- ❖ Ικανοποιητική παραγωγή ελευθέρων ριζών και μονήρους οξυγόνου. Το χαρακτηριστικό αυτό καθορίζεται από την κβαντική απόδοση της ουσίας στην παραγωγή μονήρους οξυγόνου, Φ_{Δ} .

Φαρμακολογικά χαρακτηριστικά [14.36.37]

- ❖ Ικανοποιητική και επιλεκτική συγκέντρωση σε καρκινικούς όγκους σε σχέση με τους υγιείς. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι σημαντικό καθώς το σημαντικότερο πλεονέκτημα της Φωτοδυναμικής Θεραπείας είναι να προκαλέσει ικανοποιητική νέκρωση των όγκων με τις ελάχιστες δυνατές βλάβες στους παρακείμενους ιστούς.
- ❖ Γρήγορη αποδέσμευση από τους υγιείς ιστούς συνεπάγεται αύξηση της επιλεκτικότητας αλλά και μείωση της φωτοευαισθησίας σε περίπτωση που ο φωτοευαισθητοποιητής παρουσιάζει σημαντική απορρόφηση στην UV περιοχή.
- ❖ Έλλειψη τοξικότητας απουσία φωτός (dark toxicity). Ο φωτοευαισθητοποιητής δεν πρέπει να είναι τοξικός χωρίς την προηγούμενη ενεργοποίησή του από φως κατάλληλου μήκους κύματος.
- ❖ Φθορισμός. Καθώς ο φωτοευαισθητοποιητής συγκεντρώνεται επιλεκτικά στους καρκινικούς ιστούς, εάν είναι φθορίζον μόριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη διάγνωση του καρκίνου.

Φωτοθεραπευτικά χαρακτηριστικά [14.36.37]

- ❖ Ικανοποιητική νέκρωση των κακοηθειών. Ο ιδανικός φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να εμφανίζεται με μεγάλη συγκέντρωση στους καρκινικούς ιστούς ενώ σε μικρή στους υγιείς. Ακόμη θα πρέπει να γίνεται γρήγορη επούλωση πιθανών καταστροφών υγιών ιστών.
- ❖ Χαμηλή παραμένουσα φωτοευαισθησία. Το βασικότερο μειονέκτημα της Φωτοδυναμικής Θεραπείας στην παρούσα της μορφή είναι η παραμένουσα φωτοευαισθησία που εμφανίζει ο ασθενής. Αυτό μπορεί να διαρκέσει αρκετές εβδομάδες μειώνοντας την ποιότητα ζωής του ασθενή. Ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει επομένως να εξασφαλίζει ελάχιστη συγκέντρωση στο δέρμα ώστε να αποφεύγεται η δερματική φωτοευαισθησία.

Φωτοκαταστροφή (Photobleaching)

Το φαινόμενο της φωτοκαταστροφής ή φωτολεύκανσης (photobleaching ή bleaching) παρατηρείται όταν ένα χρωμοφόρο χάσει μόνιμα την ικανότητά του να φθορίζει εξαιτίας της χημικής βλάβης και τροποποίησης της χημικής δομής του από το φως.

Τα μόρια κατά τη διέγερσή τους από τη βασική στη μονήρη διεγερμένη στάθμη και κατόπιν κατά τη μετάβασή τους στην τριπλή διεγερμένη στάθμη αλληλεπιδρούν με μόρια του περιβάλλοντός τους με αποτέλεσμα να υφίστανται μη αναστρέψιμες τροποποιήσεις στη χημική τους δομή. Ο μέσος αριθμός κύκλων διέγερσης εκπομπής πριν την φωτολεύκανση του μορίου εξαρτάται από τη χημική δομή και το τοπικό περιβάλλον. Ορισμένα χρωμοφόρα καταστρέφονται σχεδόν αμέσως, ενώ άλλα πραγματοποιούν χιλιάδες κύκλους πριν την φωτοκαταστροφή τους.

Η φωτοκαταστροφή του χρωμοφόρου συμβαίνει μετά από τον παρατεταμένο φωτισμό του στο μήκος κύματος διέγερσής του. Χαρακτηρίζεται από την μείωση στην ένταση απορρόφησης ή φθορισμού σε κάποιο μήκος κύματος και την εμφάνιση νέων φασματικών ζωνών υποδεικνύοντας έτσι τη δημιουργία νέων χημικών μορίων που δεν παρουσιάζουν τις ίδιες οπτικές ιδιότητες με το αρχικό μόριο. Οι φθορές που πραγματοποιούνται στους φωτοευαισθητοποιητές είναι μη αντιστρέψιμες με αποτέλεσμα να χάνουν την φωτοδυναμική τους δράση. [21.38.39.40]

3.2 Κατηγορίες φωτοευαισθητοποιητών

Οι φωτοευαισθητοποιητές μπορούν να χωριστούν σε κατηγορίες ανάλογα με την γενιά, την χημική σύσταση ή ακόμα και με βάση τον καρκινικό στόχο τον οποίο έχουν. Η πληθώρα των συστημάτων ταξινόμησης δείχνει κυρίως τις διαφορές μεταξύ των επιστημόνων και των κλινικών γιατρών. [36]

3.2.1 Γενιές φωτοευαισθητοποιητών

Η 1^η γενιά των φωτοευαισθητοποιητών αναπτύχθηκε κατά την δεκαετία του 1970 και στις αρχές του 1980 και περιλαμβάνει την αιματοπορφυρίνη και τα παράγωγα αυτής. Οι ουσίες αυτές παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στα 630 nm με αποτέλεσμα το βάθος διείσδυσης στον καρκινικό όγκο να είναι μικρό. Χαρακτηρίζονται από χαμηλή επιλεκτικότητα στους καρκινικούς όγκους και μικρή κβαντική απόδοση, ενώ η εξαιρετικά αργή απομάκρυνσή τους από τον οργανισμό έχει ως συνέπεια μεγάλη περίοδο φωτοευαισθησίας. Τέλος εμφανίζονται δυσκολίες κατά τη σύνθεσή τους καθώς πρόκειται για πολύπλοκα μόρια. [41]

Οι επιστήμονες θέλοντας να βελτιώσουν τα χαρακτηριστικά των φωτοευαισθητοποιητών της 1^{ης} γενιάς και ειδικά την παραμένουσα φωτοευαισθησία, τη χαμηλή απορρόφηση στην ερυθρή περιοχή του ορατού φάσματος, καθώς επίσης και τη πολύπλοκη σύνθεση αυτών, δημιούργησαν τους φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς. Οι καινούργιες ουσίες που αναπτύχθηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1980, είναι «καθαρές» ουσίες γεγονός που διευκολύνει την παραγωγή τους σε μεγάλη κλίμακα. Παρουσιάζουν μεγάλους συντελεστές απορρόφησης και μεγαλύτερη κβαντική απόδοση. Επίσης εμφανίζουν κορυφή απορρόφησης στο κόκκινο (600-700 nm) ή στο εγγύς υπέρυθρο (700-850 nm) γεγονός που αυξάνει το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας στον όγκο. [41,42] Παρά τη βελτίωση των χαρακτηριστικών τους και οι φωτοευαισθητοποιητές της γενιάς αυτής εμφανίζουν μικρή επιλεκτικότητα στους καρκινικούς όγκους και παρατεταμένη φωτοευαισθησία αν και αποβάλλονται ταχύτερα από τον οργανισμό. Οι φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς περιλαμβάνουν τις προφυρίνες, τα παράγωγα χλωρινών, τα παράγωγα βενζοχλωρινών, τις πουρπουρίνες, τις φθαλοκυανίνες, τις ναφθαλοκυανίνες και τις βακτηριοχλωρίνες.

Η 3^η γενιά φωτοευαισθητοποιητών αποτελείται από τους φωτοευαισθητοποιητές πρώτης και δεύτερης γενιάς οι οποίοι είναι προσδένονται ή είναι εγκλεισμένοι σε μόρια-μεταφορείς. Σκοπός της 3^{ης} γενιάς είναι η πιο επιλεκτική στόχευση και συγκέντρωσή τους στους καρκινικούς όγκους. [36,37]

Κάποιες φορές υπάρχει η εντύπωση ότι η δεύτερη γενιά των φωτοευαισθητοποιητών είναι καλύτερη από την πρώτη. Η εντύπωση αυτή όμως είναι λανθασμένη. Αν και οι φωτοευαισθητοποιητές της 2^{ης} γενιάς εμφανίζονται βελτιωμένοι, δεν εφαρμόζονται κλινικά. Επομένως δεν μπορούν να

πραγματοποιηθούν συγκριτικές κλινικές μελέτες μεταξύ αυτών των φωτοευαισθητοποιητών που να επιβεβαιώνουν τον παραπάνω ισχυρισμό. [32]

3.2.2 Οικογένειες φωτοευαισθητοποιητών

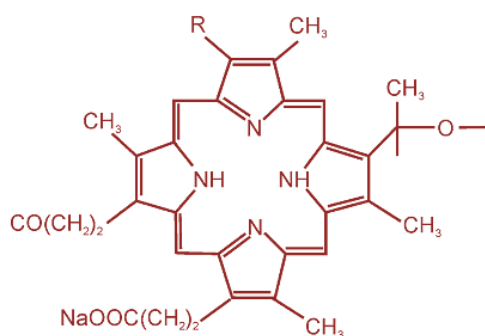
Οι φωτοευαισθητοποιητές ανάλογα με την χημική τους σύσταση ταξινομούνται σε τρεις μεγάλες οικογένειες: τις πορφυρίνες, τις χλωρίνες και τις χρωστικές. Η πρώτη οικογένεια των πορφυρινών περιλαμβάνει τα παράγωγα της αιματοπορφυρίνης. Στη δεύτερη οικογένεια, την οικογένεια των χλωρινών, ανήκουν φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι είναι παράγωγα της χλωροφύλλης ή έχουν παρόμοια χημική σύσταση με αυτή. Σε αυτήν περιλαμβάνονται και οι πουρίνες, προϊόντα αποδόμησης της χλωροφύλλης. Τέλος οι φθαλοκυανίνες και οι ναφθαλοκυανίνες απαρτίζουν την οικογένεια των χρωστικών.

Παρακάτω περιγράφονται οι φωτοευαισθητοποιητές που έχουν πάρει έγκριση και χρησιμοποιούνται σε κλινικές μελέτες.

3.2.2.1 Οικογένεια πορφυρινών

i. Photofrin I, II

Ο πρώτος φωτοευαισθητοποιητής που δοκιμάστηκε κλινικά ήταν ένα μίγμα παραγώγων αιματοπορφυρίνης, η Photofrin I (Σχήμα 3.1). Η Photofrin ήταν ένα μίγμα πορφυρινών το οποίο καθαρίστηκε στοιχειωδώς προκειμένου να απομονωθεί από αυτό το μίγμα το πιο ενεργό κλάσμα με τις επιθυμητές ιδιότητες (Photofrin II). Παρόλα αυτά η Photofrin παραμένει ακόμα ένα μίγμα μονομερών, διμερών και ολιγομερών της αιματοπορφυρίνης καθώς και των αντίστοιχων εστέρων και αιθέρων αυτών των ενώσεων.



Σχήμα 3. 1: Δομή Photofrin

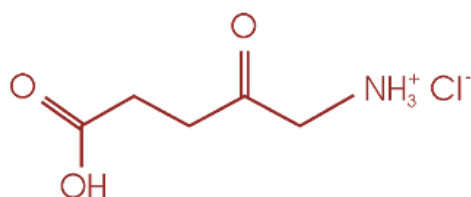
Το φάσμα απορρόφησης της Photofrin παρουσιάζει πέντε κορυφές απορρόφησης με την ισχυρότερη απορρόφηση στα 400 nm και την ασθενέστερη στα 630 ή 625 nm in vivo. Έχει συντελεστή μοριακής απορρόφησης $\epsilon \sim 3000 M^{-1}cm^{-1}$ και χαμηλή κβαντική απόδοση. Αν και στα 630 nm απορρόφηση είναι μικρή, αυτό είναι το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται τόσο πειραματικά όσο και κλινικά, αφού σε αυτό το μήκος κύματος η διεισδυτικότητα της ακτινοβολίας στον ιστό είναι καλή

ενώ επίσης για μήκη κύματος 650-800 nm μπορεί να επιτευχθεί νέκρωση των κυττάρων. Το φως των 625 nm μπορεί να διεισδύσει σε μήκος 5-10 mm στον ιστό, ανάλογα και με τη συγκέντρωση της φωτοευαισθητοποιού ουσίας σε αυτόν, με ένταση ικανή να προκαλέσει τις επιθυμητές φωτοδυναμικές αντιδράσεις. Πολύ επίπεδοι επίσης όγκοι μπορεί να θεραπευτούν με ακτινοβολία στα 514 nm , μήκος κύματος το οποίο μειώνει τον κίνδυνο νέκρωσης των γειτονικών υγιών ιστών οργάνων με λεπτές μεμβράνες όπως ο οισοφάγος και η ουροδόχος κύστη.

Στην κλινική εφαρμογή της, αυτή χορηγείται στα 2-5 mg/kg και η διέγερση πραγματοποιείται 48 ώρες μετά με δόσεις ενέργειας 100-200 J/cm² ή 200—300 J/cm² αν η οπτική ίνα διαθέτη διαχύτη. Η Photofrin έχει χρόνο ημίσειας απομάκρυνσης από το πλάσμα 12-22 ώρες και χρόνο απομάκρυνσης 5-6 ημέρες. Πάντως η κατακράτηση της Photofrin από το δέρμα, τους καρκινικούς όγκους και τους μυς έχει πολύ μεγαλύτερη διάρκεια ενώ οι συγκεντρώσεις της στο ήπαρ, τη σπλήνα και τους νεφρούς είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τις αντίστοιχες των όγκων οποιαδήποτε χρονική στιγμή μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Το σημαντικότερο μειονέκτημα της Photofrin είναι η παρατεταμένη φωτοευαισθησία που προκαλείται στο δέρμα μετά τη θεραπεία, εξαιτίας της οποίας οι ασθενείς πρέπει να προφυλάσσονται από το έντονο φως για 6-12 εβδομάδες. Η Photofrin χρησιμοποιείται κλινικά σε όλο τον κόσμο για την αντιμετώπιση πρώιμων και ύστερων σταδίων του καρκίνου του πνεύμονα, του καρκίνου του οισοφάγου, του καρκίνου της ουροδόχου κύστης και ενάντια πρώιμων σταδίων του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. [36.37.41.43]

ii. 5-Αμινολεβουλινικό οξύ (ALA)

Ο πιο γνωστός φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς είναι το 5-Αμινολεβουλινικό οξύ (Σχήμα 3.2) το οποίο είναι μια πρόδρομη ένωση της πρωτοπορφυρίνης IX (Pp IX) στη μεταβολική πορεία της αίμης.



Σχήμα 3. 2: Δομή ALA

Υπό κανονικές συνθήκες, η βιοσύνθεση της Pp IX από το μεταβολισμό περιορίζεται σε μικρές ποσότητες ακατάλληλες για τη φωτοδυναμική θεραπεία. Αν όμως επιπλέον ποσότητα ALA χορηγηθεί στον ασθενή, οι αντιδράσεις ελέγχου της παραγωγής Pp IX παρακάμπτονται και Pp IX μπορεί να συσσωρευτεί στα αντίστοιχα σημεία. Αν και η Pp IX δεν έχει σημαντικές διαφορές από τα συστατικά της Photofrin

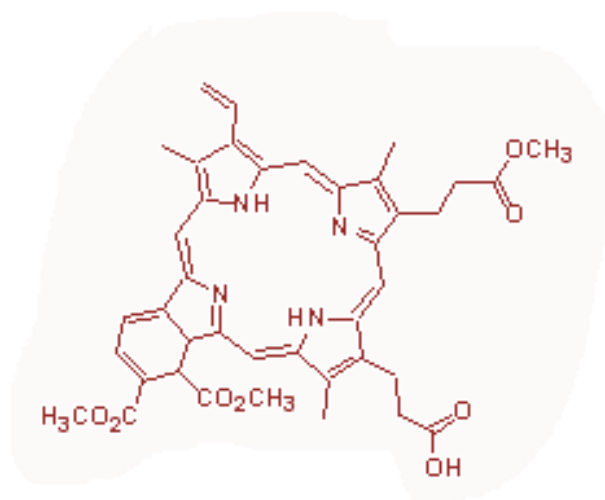
αναφορικά με το φάσμα της, η θεραπεία με ALA παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της θεραπείας με Photofrin για αρκετές μορφές καρκίνου όπως καρκίνο του δέρματος, επιφανειακό καρκίνο ουροδόχου κύστης και του οισοφάγου, στις οποίες η χορήγηση μπορεί να γίνει τοπικά ή ενδοκυστεϊκώς.

Με τη χρήση του ALA έχει σημειωθεί επιτυχία της τάξης του 90% στη θεραπεία δερματικών καρκίνων με άριστα κοσμετολογικά αποτελέσματα. Η τοπική χορήγηση του ALA όμως επιτρέπεται σε καρκίνους με μέγιστο βάθος 3 mm αφού έχει μέγιστο απορρόφησης στα 635 nm και άρα μικρό βάθος διείσδυσης στον ιστό. Για μεγαλύτερα βάθη η χορήγηση δεν μπορεί να γίνει τοπικά. Στοματική πρέπει να είναι επίσης η χορήγηση για καρκίνους της στοματικής κοιλότητας και του πεπτικού συστήματος. Για επιφανειακούς καρκίνους (1-2 mm) το ALA είναι ο καλύτερος φωτοευαισθητοποιητής που διατίθεται αυτή τη στιγμή. Για βαθύτερους καρκινικούς όγκους (3-10 mm) είναι απαραίτητοι φωτοευαισθητοποιητές που ενεργοποιούνται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, προκειμένου να αποφευχθούν μεγάλοι χρόνοι ακτινοβολήσης και να επιτευχθούν καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα. Συνήθως στις κλινικές εφαρμογές πραγματοποιείται επάλειψη της καρκινικής περιοχής με αλοιφή που περιέχει 20% ALA και 4 ώρες μετά η περιοχή ακτινοβολείται με ενέργεια $150 J/cm^2$. [36.37.41.43]

iii. Παράγωγα βενζοπορφυρίνης (BPD)

Η Verteporfin (εμπορική ονομασία Visudyne) είναι παράγωγο της βενζοπορφυρίνης (Σχήμα 3.3). Επειδή πρόκειται για μία αδιάλυτη ουσία, στις κλινικές εφαρμογές χρησιμοποιείται εγκλεισμένη σε λιποσώματα.

Το μέγιστο απορρόφησής της εντοπίζεται γύρω στα 690 nm, έχει συντελεστή μοριακής απορρόφησης $\epsilon \sim 3.4 \times 10^4 M^{-1}cm^{-1}$ και κβαντική απόδοση $\phi_{\Delta}=0.7$ σε μεθανόλη.



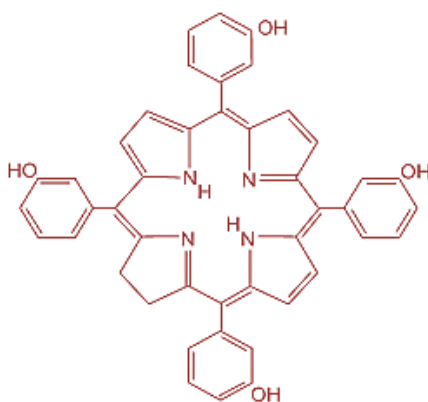
Σχήμα 3. 3: Δομή Verteporfin

Ο φωτοευαισθητοποιητής αυτός παρουσιάζει ταχεία συσσώρευση στον καρκινικό όγκο, ενώ η παραμένουσα φωτοευαισθησία είναι της τάξης μερικών ημερών. Κλινικά χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της εκφύλισης της ωχράς κηλίδας. 6mg/kg χορηγούνται ενδοφλέβια στον ασθενή 30 λεπτά πριν την ακτινοβολήση με δόση ενέργειας 100 J/cm^2 . [36.37.43]

3.2.2.2 Οικογένεια χλωρινών

i. Temoporfin

Η 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροχλωρίνη (m-THPC) (Σχήμα 3.4) γνωστή και ως Temoporfin ή με την εμπορική ονομασία Foscan είναι ένας από τους πλέον αποδοτικούς φωτοευαισθητοποιητές.



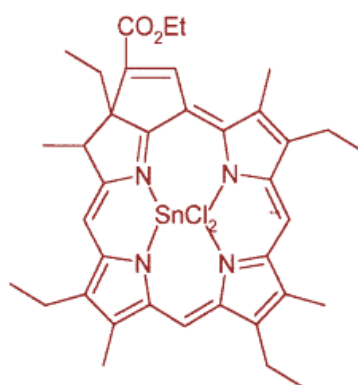
Σχήμα 3. 4: Δομή m-THPC

Με μέγιστο απορρόφησης στα 652 nm, εξασφαλίζει μεγαλύτερο βάθος διείσδυσης στον καρκινικό όγκο. Έχει συντελεστή μοριακής απορρόφησης $\epsilon \sim 30000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ και κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρους οξυγόνου $\phi_{\Delta}=0.4$ σε DMSO. Παρά τη μικρή κβαντική απόδοση, η Temoporfin παρουσιάζει μεγάλη αποδοτικότητα στη φωτοδυναμική χάρη στη μεγάλη ικανότητά της να προκαλεί φωτοκυτταροτοξικές αντιδράσεις. Σε σύγκριση με την Photofrin, είναι 100 φορές πιο αποδοτική στις ίδιες πειραματικές συνθήκες (δόση φωτοευαισθητοποιητή και ενέργειας). [44]

Στις κλινικές εφαρμογές χορηγείται ενδοφλέβια στη δόση των 0.15 mg/kg. Η ακτινοβολήση πραγματοποιείται στα 652 nm συνήθως 24-98 ώρες μετά την χορήγηση του φαρμάκου με δόση ενέργειας $10-20 \text{ J/cm}^2$. Αυτό επιτρέπει την αρκετά γρήγορη θεραπεία που διαρκεί ίσως μερικά λεπτά το πολύ. Ωστόσο κατά τη διάρκεια της θεραπείας ο ασθενής μπορεί να βιώσει έντονο πόνο. Εφαρμόζεται σε καρκίνους δέρματος, πνεύμονα, οισοφάγου και ιδιαίτερα σε όγκους κεφαλής και λαιμού. [21.37.44]

ii. Purpurin

Η tin-ethyl-etiorpurpurin (SnET2, Purlytin) (Σχήμα 3.5) είναι παράγωγο της χλωροφύλλης. Πρόκειται για ένα καθαρό μόριο το οποίο όμως είναι αδιάλυτο στο νερό. Για να χρησιμοποιηθεί ως φωτοευαισθητοποιητής στην Φωτοδυναμική Θεραπεία εγκλείεται αναγκαστικά σε λιποσώματα.



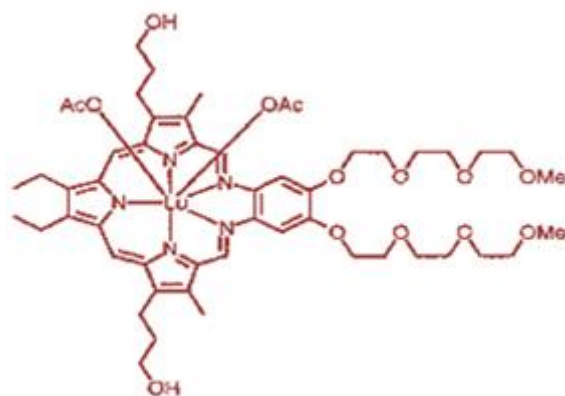
Σχήμα 3. 5: Δομή Purpurin

Παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 660 nm εξασφαλίζοντας έτσι μεγάλο βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας στον οργανισμό. Ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης της ουσίας είναι $\epsilon \sim 26400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Για την κλινική θεραπεία η ποσότητα της Purpurin που εισάγεται στον οργανισμό είναι 1.2 mg/kg 24 ώρες πριν την ακτινοβολήση με δόση ενέργειας 200 J/cm^2 . Εφαρμόζεται με επιτυχία ενάντια στο σάρκωμα Karosi και στον καρκίνο του μαστού. Ο πόνος κατά τη διάρκεια της θεραπείας είναι ανύπαρκτος όμως αλλεργικές αντιδράσεις έχουν παρατηρηθεί. [36.37.45.46]

iii. Lutrin

Ο φωτοευαισθητοποιητής Lutetium Texaphyrin (Lu-Tex, Lutrin) (Σχήμα 3.6) ανήκει στους φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς. Πρόκειται για μια υδατοδιαλυτή ουσία με μεγάλη επιλεκτικότητα στον καρκινικό όγκο.

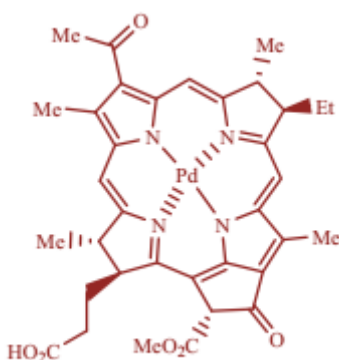


Σχήμα 3. 6: Δομή Lutrin

Ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης είναι $\epsilon \sim 42000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και το μέγιστο απορρόφησης παρουσιάζεται στα 732 nm επιτυγχάνοντας έτσι μεγάλο βάθος διείσδυσης. Μεγάλος αριθμός ελεύθερων ριζών μπορεί να παραχθεί μετά την ακτινοβόληση η οποία και έχει μικρή διάρκεια, ενώ η παραμένουσα φωτοευαισθησία ελαχιστοποιείται το αμέσως επόμενο 24ωρο. Στην κλινική πράξη χορηγούνται 0.5-5 mg/kg 3 έως 24 ώρες πριν την ακτινοβόληση με δόση ενέργειας 150 J/cm^2 συνήθως. Η δράση της έχει μελετηθεί ενάντια στον καρκίνο του προστάτη και του μαστού. [36.41.47]

iv. Tookad

Ο palladium bacteriorheophorbide α (Tookad) (Σχήμα 3.7) είναι ένας λιπόφιλος φωτοευαισθητοποιητής με ταχύτατη αποδέσμευση από τον οργανισμό άρα και ελάχιστη παραμένουσα φωτοευαισθησία.

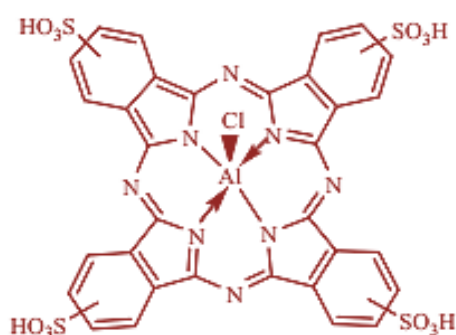


Σχήμα 3. 7: Δομή Tookad

Έχει μέγιστο απορρόφησης στα 763 nm, μεγάλο συντελεστή μοριακής απορρόφησης $\epsilon \sim 88500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και μεγάλη κβαντική απόδοση οξυγόνου σε οργανικό διαλύτη. Ένα πρωτόκολλο για κλινική εφαρμογή της ουσίας στην Φωτοδυναμική Θεραπεία περιλαμβάνει χορήγηση 2- 6 mg/kg περίπου 10-20 λεπτά

υποκαταστατών. Σύγχρονες εργασίες διερευνούν τα δομικά χαρακτηριστικά των φθαλοκυανινών, σε σχέση με τη δραστηκότητά τους στη φωτοδυναμική θεραπεία. Μέχρι σήμερα, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως τα σουλφονικά παράγωγα των φθαλοκυανινών και μάλιστα η υποκατάσταση σουλφονικών ομάδων στα δακτύλιο των φθαλοκυανινών προσδιορίζει τη διαλυτότητά τους, τον αριθμό των περιφερειακών φορτίων και την επακόλουθη κυτταρική πρόσληψη ή/και επιλεκτική κατακράτηση από τον όγκο. [14.36.42]

Από την ομάδα των φθαλοκυανινών η φωτοευαίσθητη ουσία που έχει πάρει έγκριση για κλινική εφαρμογή είναι η Photosens (Sulfonated Aluminum Phtalocyanine) (Σχήμα 3.9).



Σχήμα 3. 9: Δομή Photosens

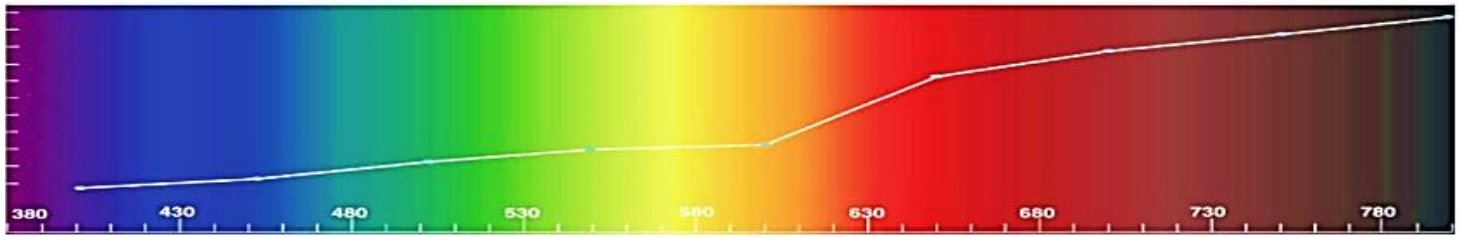
Η Photosens (Photosense, $AlPcS_4$) είναι ένα διάλυμα απεσταγμένου νερού αλάτων νατρίου σουλφονωμένης φθαλοκυανίνης αλουμινίου που παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 675 nm. Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης είναι $\epsilon \sim 200000 M^{-1}cm^{-1}$.

Στην κλινική πράξη χορηγούνται στον ασθενή 0.5-2 mg/kg 24 ώρες πριν την ακτινοβολήση με δόση ενέργειας $200 J/cm^2$. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική ενάντια σε δερματικούς καρκίνους, καρκίνο του μαστού, του πνεύμονα, της κεφαλής, του λαιμού και άλλων. Ωστόσο η παραμένουσα φωτοευαίσθησία του δέρματος αποτελεί σημαντικό πρόβλημα αφού ο ασθενής θα πρέπει να μην εκτεθεί στο ηλιακό φως για 6-10 εβδομάδες μετά τη θεραπεία [36.41.51.52]

Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα χαρακτηριστικά των παραπάνω φωτοευαίσθητοποιητών.

Πίνακας 3. 1: Συγκεντρωτικός πίνακας φωτοευαισθητοποιητών και χαρακτηριστικών τους

Βάθος διείσδυσης (nm)



Φωτοευαισθητοποιητής	Photofrin	ALA	Foscan	Purlityn	Photosens	Visudyne	Lutrin	Tookad
Μήκος κύματος απορρόφησης nm	630	635	652	660	675	690	732	763
Μοριακός συντελεστής απορρόφησης $M^{-1}cm^{-1}$	1170	<5000	30000	26400	200000	35000	42000	88500
Δόση χορήγησης mg/kg	2	τοπική 20% ALA	0.15	1.2	0.5-2	6	0.6-7.2	2-4
Δόση ενέργειας J/cm^2	150	150	10	200	200	100	120	360

3.3 Φωτοευαισθητοποιητές 3ης Γενιάς

Αν και έχουν αναπτυχθεί πολλοί φωτοευαισθητοποιητές, λίγοι έχουν φτάσει στο επίπεδο των κλινικών δομικών και έχουν πάρει έγκριση να κυκλοφορούν εμπορικά για τη φωτοδυναμική θεραπεία συγκεκριμένων καρκινικών τύπων. Η χαμηλή επιλεκτικότητα στους καρκινικούς όγκους σε σχέση με τους υγιείς ιστούς, η μικρή κβαντική απόδοση και η απορρόφηση σε χαμηλά μήκη κύματος, αλλά κυρίως ο μεγάλος χρόνος συγκέντρωσης σε εξωτερικά όργανα του σώματος, το δέρμα και τα μάτια, που οδηγεί σε παρατεταμένη φωτοευαισθησία, έχουν περιορίσει την εφαρμογή της φωτοδυναμικής.

Οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές είναι υδρόφοβα μόρια και συσσωματώνονται εύκολα σε υδατικά μέσα. Η υδροφοβικότητα οδηγεί σε ισχυρές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή οι οποίες επηρεάζουν τις φωτοφυσικές (μείωση κβαντικής απόδοσης μονήρους οξυγόνου), χημικές (μείωση της διαλυτότητάς τους) και βιολογικές τους ιδιότητες. Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια να αλλοιώνονται οι φωτοφυσικές αλλά και φαρμακολογικές και φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες. Επιπλέον είναι αναγκαίο οι φωτοευαισθητοποιητές να συγκεντρώνονται επιλεκτικά στους καρκινικούς όγκους για να αποφεύγεται παράπλευρες φθορές (για παράδειγμα βλάβη των γειτονικών υγιών ιστών σε περίπτωση που το φως πέσει και σε αυτούς). Κυρίως όμως για να προλαμβάνεται η σοβαρότερη παρενέργεια της φωτοδυναμικής, η παραμένουσα φωτοευαισθησία.

Οι 3ης γενιάς φωτοευαισθητοποιητές έρχονται για να διευρύνουν τις δυνατότητες των φωτοευαισθητοποιητών της 2ης γενιάς. Στην περίπτωση αυτή δεν μιλάμε για καινούργια μόρια που ανακαλύπτονται ή συντίθεται αλλά για την πρόσδεση ή ενσωμάτωση υπαρχόντων, πολλά υποσχόμενων φωτοευαισθητοποιητών σε νανοσωματιδιακά συστήματα μεταφοράς.

3.3.1 Νανοσωματίδια ως φορείς μεταφοράς φωτοευαισθητοποιητών

Σωματίδια διαστάσεων 1-100 nm, καλούνται νανοσωματίδια. Χάρη στις μοναδικές τους ιδιότητες, όπως το μικρό τους μέγεθος, η μεγάλη επιφάνεια σε σχέση με τη μάζα τους καθώς και η υψηλή δραστηριότητα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται, χρησιμοποιούνται ως φορείς μεταφοράς φαρμάκων με στόχο τη μέγιστη θεραπευτική αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Τα νανοσωματίδια μπορούν να αυξήσουν τη διαλυτότητα των υδρόφοβων ουσιών σε υδατικά μέσα, να παρατείνουν τον χρόνο ημιζωής τους στην κυκλοφορία του αίματος, να αποτρέψουν τη διάσπαση του φαρμάκου αμέσως μετά τη χορήγηση του και να ελαχιστοποιήσουν τις παρενέργειες. Μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να παρουσιάζουν μεγάλη επιλεκτικότητα στον στόχο, με ελάχιστη συγκέντρωση του φαρμάκου σε περιοχές που δεν ενδιαφέρουν. Εμφανίζουν μικρή τοξικότητα, καλύτερη βιοσυμβατότητα και ασφάλεια. Το μέγεθός τους βοηθά την επιλεκτική συγκέντρωσή τους σε παθολογικές περιοχές, όπως είναι και οι καρκινικοί όγκοι. Στις περιοχές αυτές το ελαττωματικό αγγειακό σύστημα προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων σε συστατικά και σωματίδια ορισμένου, μικρού, μεγέθους τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν διαπερνούν τα αγγεία. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ενισχυμένη διαπερατότητα και κατακράτηση (enhanced permeability and retention effect (EPR)). Το μέγεθος των πόρων στους καρκινικούς όγκους ποικίλει από 100 έως 780 nm επιτρέποντας την άμεση συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στον καρκινικό ιστό.

Ο εγκλεισμός του φωτοευαισθητοποιητή σε νανοσωματίδια είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος που οδηγεί στην βελτιστοποίηση της βιοδιαθεσιμότητάς του και της συγκέντρωσής του στον καρκινικό όγκο. Τα νανοσωματίδια μπορούν να αυξήσουν τη διαλυτότητα, σε υδατικά μέσα, των υδρόφοβων φωτοευαισθητοποιητών παρέχοντας τα πλεονεκτήματα των υδρόφιλων μορίων. Επιπλέον, αποτρέποντας τη συσσωμάτωση των μορίων, σε συνδυασμό με το φαινόμενο της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης, μπορούν να αυξήσουν την επιλεκτική συγκέντρωση των φωτοευαισθητοποιητών στον καρκινικό όγκο. Η επιλεκτική συγκέντρωση μπορεί περαιτέρω να ενισχυθεί, προσθέτοντας εξειδικευμένους συνδέτες στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, οι οποίοι στοχεύουν συγκεκριμένους υποδοχείς των καρκινικών όγκων αγνοώντας τους υγιείς ιστούς. Οι διαφορές (ανατομικές, φυσιολογικές, βιοχημικές) στο μικροαγγειακό σύστημα ανάμεσα σε καρκινικές και μη καρκινικές περιοχές έχουν χρησιμοποιηθεί στο σχεδιασμό και στην ανάπτυξη συστημάτων στοχευμένης μεταφοράς και στην ενίσχυση της επιλεκτικότητας και της εξειδίκευσης των φωτοευαισθητοποιητών.

Ιδανικά ένα νανοσωματίδιο θα πρέπει να είναι βιοδιασπώμενο, να έχει μικρό μέγεθος και μεγάλη χωρητικότητα, να προκαλεί ελάχιστη ανοσογονικότητα και να μην παρουσιάζει καμία τοξικότητα ή παρενέργεια. Ακόμη να παρουσιάζει μεγάλους χρόνους ημιζωής στην κυκλοφορία του αίματος μετά τη χορήγησή του και ελάχιστη τάση για σχηματισμό συσσωματωμάτων. Ειδικά τα νανοσωματίδια μεταφοράς φωτοευαισθητοποιητών θα πρέπει να ενθυλακώνουν τον φωτοευαισθητοποιητή χωρίς να μειώνουν ή να αλλοιώνουν τις φωτοφυσικές του ιδιότητες και να εξασφαλίζουν μεταφορά των μορίων του χωρίς τη συσσωμάτωσή τους. Κυρίως όμως το σύστημα μεταφοράς θα πρέπει να εξασφαλίζει την επιλεκτική συγκέντρωσή των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή στον καρκινικό όγκο με ταυτόχρονη ελάχιστη (ιδανικά μηδενική) συγκέντρωση σε υγιείς ιστούς.

Η μεγαλύτερη πρόκληση και ταυτόχρονα πρόβλημα στο σχεδιασμό και στη σύνθεση νανοσωματιδιακών συστημάτων μεταφοράς είναι η ταχύτατη καταστροφή τους από τους μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού. Συνήθως τα νανοσωματιδιακά συστήματα εγχέονται ενέσιμα στον οργανισμό και διαχέονται σε αυτόν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Τα φαγοκύτταρα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος είναι ο πρώτος αμυντικός μηχανισμός που ενεργοποιείται απέναντι στον εισβολέα και το πρώτο εμπόδιο που πρέπει να αντιμετωπίσουν τα νανοσωματίδια. Δύο επιπλέον αμυντικοί μηχανισμοί είναι τα μονοκύτταρα του φαγοκυτταρικού συστήματος και τα εξειδικευμένα μακροφάγα κύτταρα στους νεφρούς και στο σπλήνα. Οι μηχανισμοί αυτοί μειώνουν δραματικά την αποδοτικότητα των συστημάτων μεταφοράς. [53.54.55.56]

Διάφορα νανοσωματιδιακά συστήματα μεταφοράς φωτοευαισθητοποιητών, επιτυχημένα ή λιγότερο αποτελεσματικά, έχουν αναπτυχθεί. Λιποσώματα, μικκύλια

από συνθετικά αμφίφιλα πολυμερή, νανοσωματίδια χρυσού, πολυμερών ή κεραμικών βρίσκονται ανάμεσα στα συστήματα μεταφοράς που έχουν αναπτυχθεί.

i. **Κβαντικές τελείες (Quantum dots):** πρόκειται για μια νέα κατηγορία συστημάτων μεταφοράς. Οι κβαντικές τελείες είναι νανοκρύσταλλοι ημιαγωγών μεγέθους 1-6 nm. Χαρακτηρίζονται από υψηλή φωτοφωταύγεια, κβαντική απόδοση, υψηλή φωτοσταθερότητα και έχουν σταθερή σύνθεση. Η σύνθεσή τους είναι απλή και το κόστος παραγωγής μικρό. Με την απουσία φωτός είναι μη τοξικές για τον οργανισμό όμως η ενεργοποίησή τους από την υπεριώδη ακτινοβολία τα καθιστά ιδιαίτερος κυτταροτοξικά. Ωστόσο, βασικό πρόβλημα αποτελεί η χαμηλή τους διαλυτότητα σε υδάτινο περιβάλλον όμως τα τελευταία χρόνια σημαντικές αλλαγές στη σύνθεσή τους έχουν βελτιώσει την διαλυτότητά τους.

Το χαρακτηριστικό των κβαντικών τελειών που εκμεταλλεύεται η ιατρική, ειδικά για θεραπεία ενάντια στον καρκίνο, είναι η ικανότητα που έχουν να διαδίδουν το φως με καλύτερο και πιο στοχευμένο τρόπο στην περιοχή δράσης τους. Έτσι στην Φωτοδυναμική Θεραπεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να αντιμετωπιστεί η μικρή διείσδυση του φωτός στους ιστούς και η καλύτερη ενεργοποίηση του φωτοευαίσθητοποιητή.

Παρόλα αυτά η εφαρμογή τους στην Φωτοδυναμική Θεραπεία παραμένει σε πειραματικό στάδιο. Ο λόγος είναι το κύριο συστατικό τους, το σεληνίδιο του καδμίου (CdSe). Τα ιόντα καδμίου Cd^{2+} που απελευθερώνονται είναι ιδιαίτερα τοξικά για τον οργανισμό, ειδικά αν παραμένουν για αρκετές ώρες σε αυτόν. [54.55.57]

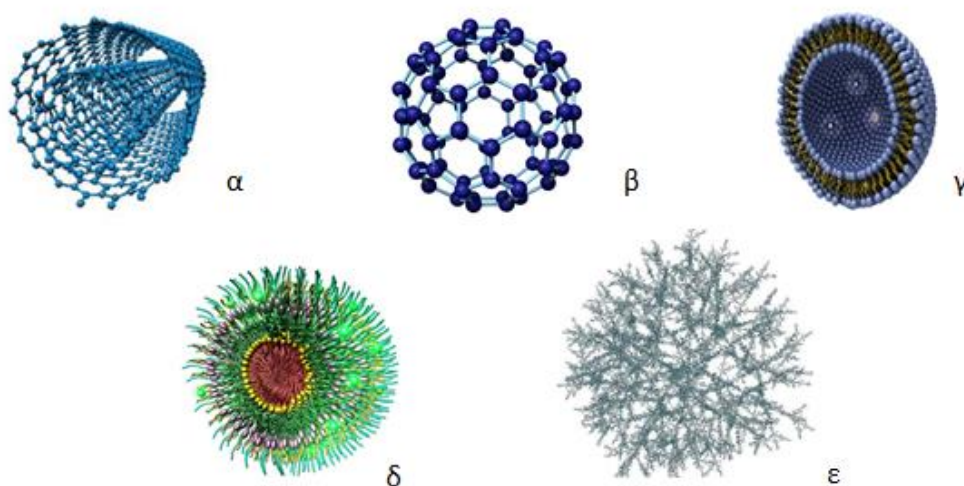
ii. **Φουλερένια (Fullerenes):** Τα φουλερένια είναι δομές ατόμων άνθρακα, σχήματος σφαιρικού, ελλειψοειδούς ή σωλήνα (Σχήμα 3.10β). Απορροφούν την ορατή ακτινοβολία, χαρακτηρίζονται από υψηλή απόδοση τριπλέτας και μπορούν να παράξουν ικανοποιητικό αριθμό ελευθέρων ριζών όταν διεγερθούν με ακτινοβολία. Τα τελευταία χρόνια αποτελούν σημαντικό εργαλείο της Φωτοδυναμικής Θεραπείας αφού το ενεργό οξυγόνο που παράγεται από την διέγερσή τους μπορεί και εξουδετερώνει τα καρκινικά κύτταρα.

Παρόλα αυτά, δύο χαρακτηριστικά τους αποτελούν εμπόδιο στην χρήση των φουλερενίων σε βιολογικά συστήματα. Η μικρή διαλυτότητα που παρουσιάζουν σε υδάτινο περιβάλλον εμποδίζει την σωστή κυκλοφορία τους στον οργανισμό και την συσσώρευσή τους στον καρκινικό όγκο. Ακόμα το γεγονός ότι η απορρόφηση των φουλερενίων είναι υψηλή στην UVA και μπλε περιοχή του φάσματος, εκεί όπου το βάθος διείσδυση του φωτός στους ιστούς είναι μικρό, περιορίζει τα αποτελέσματα της Φωτοδυναμικής Θεραπείας. Η χαμηλή διαλυτότητα αντιμετωπίζεται τροποποιώντας την δομή της επιφάνειάς τους με πολυ (αιθυλενογλυκόλη) (PEG),

ενώ προσπάθειες γίνονται για την δημιουργία φουλερενίων που θα απορροφούν ισχυρά στην ερυθρή και εγγύς υπέρυθρη περιοχή του φάσματος. [57]

iii. **Νανοσωλήνες άνθρακα (Carbon nanotubes, CNTs):** Οι νανοσωλήνες άνθρακα αποτελούν μια άλλη κατηγορία φορέων φωτοευαισθητοποιητών. Αυτές οι δομές συντίθενται με έλαση φύλλων άνθρακα σε κοίλους σωλήνες ενός μόνο τοιχώματος, διπλού τοιχώματος ή πολλαπλών τοιχωμάτων (Σχήμα 3.10α). Οι νανοσωλήνες άνθρακα απορροφούν φως στην εγγύς υπέρυθρη περιοχή και μπορούν να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο μέσα σε ζωντανά κύτταρα λόγω της υπερβολικής τοπικής θέρμανσης.

Λόγω της μεγάλης επιφάνειας που διαθέτουν, διάφορα μόρια όπως φάρμακα, πεπτίδια, και νουκλεϊκά οξέα μπορούν να ενσωματωθούν κατά μήκος του νανοσωλήνα, επιτρέποντας σε αυτούς να διασχίσουν την κυτταρική μεμβράνη με ενδοκύτωση ή ακόμα και να αναγνωρίζουν τα καρκινικά κύτταρα μέσα στον οργανισμό. Απομακρύνονται ταχέως από τον οργανισμό και δεν εμφανίζουν σημαντική κυτταροτοξικότητα. Ωστόσο, η μακράς διάρκειας εφαρμογή τους είναι αμφίβολη, δεδομένου ότι μπορεί να αποτελέσουν αιτία εμφάνισης καρκίνου. Επί του παρόντος, η γνώση για την αποτελεσματικότητα των νανοσωλήνων στην Φωτοδυναμική Θεραπεία είναι περιορισμένη. Περαιτέρω έρευνα σχετικά με το φαρμακολογικές και τοξικολογικές ιδιότητες των νανοσωλήνων είναι αναγκαία. [55,57]



Σχήμα 3. 10: Ενδεικτικά είδη νανοσωματιδίων α) νανοσωλήνας άνθρακα β) φουλερένιο γ) λιπόσωμα δ) μικκύλιο ε) δενδριμερές

iv. **Λιποσώματα (liposomes):** Τα λιποσώματα είναι κολλοειδής σφαιρικές δομές λιπιδικών διπλοστοιβάδων στο εσωτερικό των οποίων εγκλείεται μέρος του υδάτινου μέσου στο οποίο διασπείρονται (Σχήμα 3.10γ). Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 20nm έως μερικές δεκάδες μm. Παρασκευάζονται από φυσικά και συνθετικά μόρια λιπιδίων, συνηθέστερα είναι τα φωσφολιπίδια και λιγότερο η χοληστερόλη και αυτή τους η σύνθεση τα καθιστά ιδιαίτερα βιοσυμβατούς και βιοδιασπώμενους νανομεταφορείς.

Η αξία των λιποσωμάτων οφείλεται στον τρόπο παρασκευής τους. Τα λιποσώματα φτιάχνονται από συστατικά φυσικής προέλευσης τα οποία σχηματίζουν δομή λιπιδικής διπλοστοιβάδας, η οποία είναι σχεδόν όμοια με τις φυσικές μεμβράνες των κυττάρων. Τα λιποσώματα κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθός τους, τον τρόπο παρασκευής τους, τη σύνθεση και τον τρόπο στόχευσής τους. [55.57.58.59]

v. **Μικκύλια (micelles):** Τα μικκύλια είναι σφαιρικά μακρομοριακά συμπλέγματα που σχηματίζονται αυθόρμητα όταν τα αμφίφιλα συμπολυμερή αναμιγνύονται σε ένα υδατικό περιβάλλον (Σχήμα 3.10δ). Οι υδρόφοβες ομάδες του πολυμερικού συσσωματώματος ενώνονται για να σχηματιστεί ο πυρήνας του μικκυλίου, ενώ η υδρόφιλη ομάδα σχηματίζει ένα ενυδατωμένο κέλυφος γύρω από τον υδρόφοβο πυρήνα.

Πολυμερικά μικύλλια έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά υδρόφοβων φωτοευαισθητοποιητών, οι οποίοι είναι ενθυλακωμένοι στον υδρόφοβο πυρήνα. Κατά την επαφή τους με τα καρκινικά κύτταρα, τα μικκύλια διαπερνούν την μεμβράνη όπου εκεί οι υδρόφοβες ουρές βγαίνουν προς το εξωτερικό του πολυμερούς απελευθερώνοντας έτσι την δραστική ουσία. [57.58]

vi. **Δενδριμερή (dendrimers):** Τα δενδριμερή είναι σφαιρικά πολυμερή μόρια με υψηλές διακλαδώσεις (Σχήμα 3.10ε). Αποτελούνται από δύο διαφορετικά μονομερή- ένα αντιδραστικό αμινοξύ και ένα ακριλικό οξύ- και συναρμολογούνται σε βήματα. Χαρακτηρίζονται από συστηματική ανάπτυξη γύρω από ένα σημείο αναφοράς, τον πυρήνα, μέσω διακλαδώσεων.

Συνήθως ο φωτοευαισθητοποιητής συνδέεται στην περιφέρεια των διακλαδώσεων ή είναι εγκλεισμένος στον πυρήνα του δενδριμερούς. Η δομή των δενδριμερών καθιστά τα δενδριτικά πολυμερή πιο κατάλληλα για την μεταφορά φαρμάκων από ότι τα γραμμικά μόρια. [57.58]

vii. **Συνθετικά πολυμερή** όπως το aliphatic polylactide (PLA), το polyglycolide (PGA), και το συμπολυμερές τους poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) χρησιμοποιούνται συχνά ως φορείς μεταφοράς των φωτοευαισθητοποιητών λόγω

των ιδιοτήτων τους, όπως η καλή βιοσυμβατότητα, η βιοαποικοδομησιμότητα, η βιοαπορροφησιμότητα και η μηχανική αντοχή. [57.58]

***ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΛΟΥΜΙΝΟ-ΧΛΩΡΟ-
ΦΘΑΛΟΚΥΑΝΙΝΗ, AlCl₃***

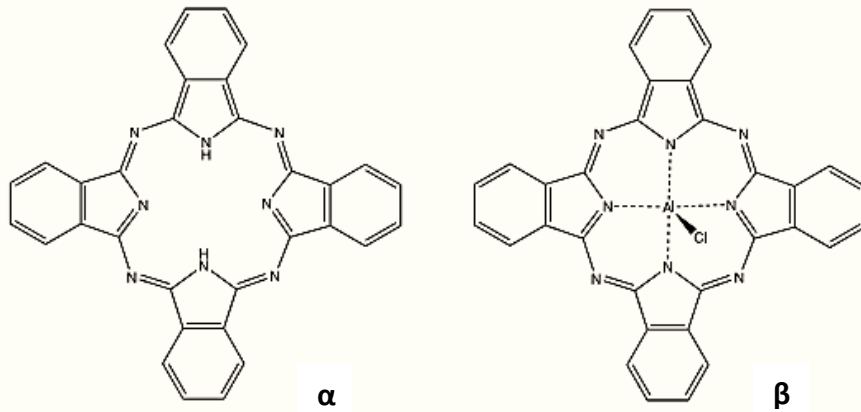
4.1 Η αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη AIClPc

Τα παράγωγα των φθαλοκυανίνων (Pc) χάρη στις ιδιαίτερες ιδιότητες που έχουν, χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία και την ιατρική την τελευταία δεκαετία. Η έντονη απορρόφηση φωτός στην περιοχή του ερυθρού και ο έντονος φθορισμός που παρουσιάζουν, τις καθιστά εξαιρετικούς φωτοευαίσθητοποιητές στην Φωτοδυναμική Θεραπεία (PDT). Χάρη στην υψηλή χημική και θερμική σταθερότητα των μορίων τους βρίσκουν εφαρμογή στην βιομηχανία ως βαφές, σε χημικούς αισθητήρες, υγρούς κρυστάλλους, ως καταλύτες αλλά και στην παρασκευή φωτοβολταϊκών κελιών.

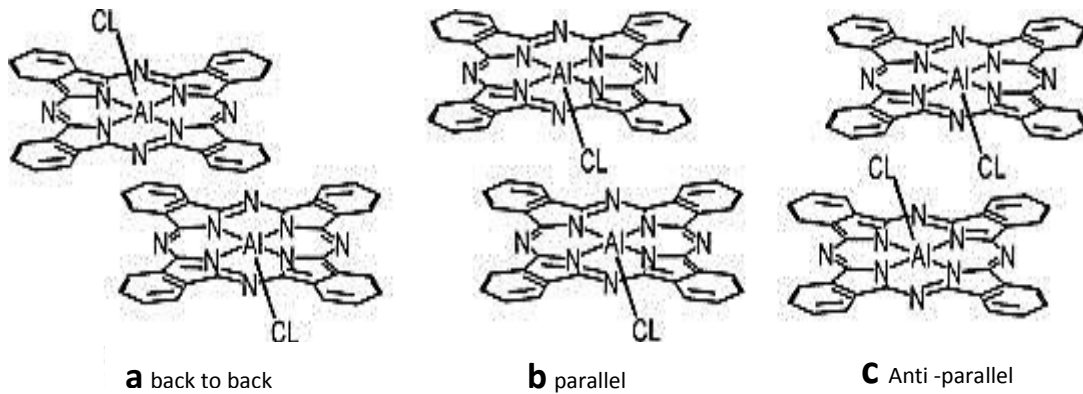
Η αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη, AIClPc, είναι ένα παράγωγο των φθαλοκυανίνων. Μπορεί να συνθεθεί εύκολα, άρα δεν παρουσιάζει μεγάλο κόστος παραγωγής και είναι ένας εμπορικά διαθέσιμος φωτοευαίσθητοποιητής. Ανήκει στους φωτοευαίσθητοποιητές της δεύτερης γενιάς. Το μόριό της όταν διεγερθεί με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος μπορεί να παράξει μεγάλο αριθμό ελευθέρων ριζών καθιστώντας την έτσι ιδιαίτερα τοξική για τα καρκινικά κύτταρα. Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά την καθιστούν ιδανικό φωτοευαίσθητοποιητή για την Φωτοδυναμική Θεραπεία. Παρόλα αυτά η χρήση της ως φωτοευαίσθητοποιητής στην Φωτοδυναμική Θεραπεία βρίσκεται ακόμα σε πειραματικό στάδιο αφού δεν έχει πάρει έγκριση από την Ευρωπαϊκή Ένωση για να χρησιμοποιηθεί κλινικά. [52]

4.2 Χαρακτηριστικά του μορίου της AIClPc

Το μόριο της αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνης παράγεται από το μόριο της φθαλοκυανίνης όπου τα ενδοκυκλικά άτομα του υδρογόνου έχουν αντικατασταθεί από ένα άτομο αλουμινίου. Το άτομο του αλουμινίου βρίσκεται στο κέντρο του μορίου το οποίο με τη σειρά του είναι συνδεδεμένο με ένα άτομο χλωρίου (Σχήμα 4.1). Η δομή αυτή καθιστά το μόριο ιδιαίτερα σταθερό χωρίς να μεταβάλλεται υπό την επίδραση υψηλών θερμοκρασιών ή μαγνητικού πεδίου. Συναντάται σε τρεις μορφές διμερών μορίων χωρίς να μεταβάλλονται οι φωτοφυσικές και φωτοχημικές της ιδιότητες (Σχήμα 4.2).



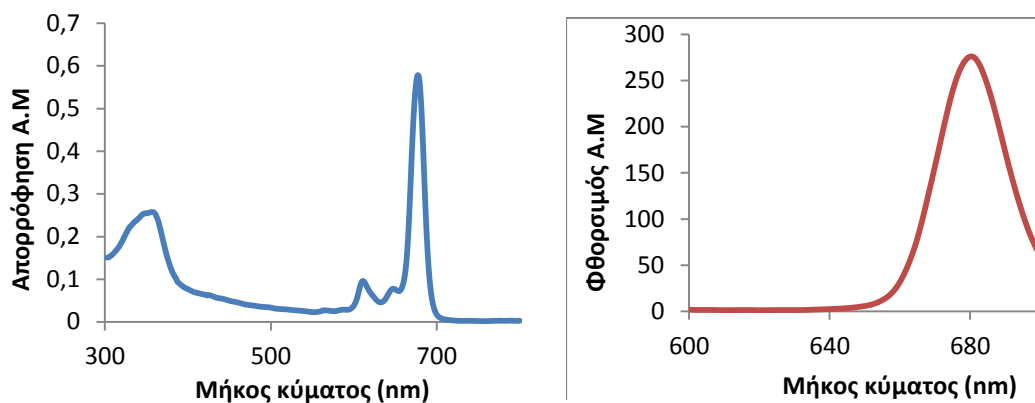
Σχήμα 4. 1: (α) Το μόριο της φθαλοκυανίνης και (β) το μόριο της αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνης



Σχήμα 4. 2: Τα 3 διμερή της αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνης

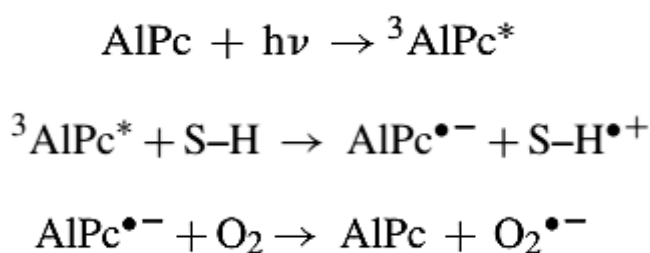
Η αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη παρουσιάζει υψηλό χρόνο ημιζωής στην τριπλή στάθμη ($\sim 720 \mu\text{s}$), ο οποίος οφείλεται στο άτομο του αλουμινίου, κβαντική απόδοση της τριπλής διεγερμένης κατάστασης $\Phi_t=0.20$ και κβαντική απόδοση της μονήρους κατάστασης οξυγόνου $\Phi_\Delta=0.29$. Χάρη στο άτομο του αλουμινίου επίσης ο αριθμός των ελευθέρω ριζών που παράγονται κατά τη διάρκεια της Φωτοδυναμικής Θεραπείας είναι πολύ μεγάλος, καθιστώντας έτσι τη φθαλοκυανίνη ιδιαίτερα τοξική για τα καρκινικά κύτταρα. [60.61]

Όσον αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες της αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνης, αυτή παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στην περιοχή του ερυθρού και συγκεκριμένα γύρω στα 680nm (Q band). Μια δεύτερη κορυφή απορρόφησης παρατηρείται στα 625nm ενώ η τρίτη κορυφή σημειώνεται γύρω 370nm, δηλαδή στην περιοχή του υπεριώδους (B band) (Σχήμα 4.3.α). Το μέγιστο της έντασης φθορισμού παρατηρείται γύρω στα 680nm (Σχήμα 4.3.β). [60.61.62]



Σχήμα 4. 3: Φασματικά χαρακτηριστικά της αλουμινο-χλωροφθαλκυανίνης (α) Φάσμα απορρόφησης και (β) Φάσμα φθορισμού

Πειράματα έχουν δείξει ότι τα φάσματα απορρόφησης, διέγερσης και φθορισμού της φθαλοκυανίνης στον ίδιο διαλύτη δεν μεταβάλλονται με την επίδραση μαγνητικού πεδίου δίνοντας έτσι τη δυνατότητα συνδυασμού της Φωτοδυναμικής Θεραπείας με την μέθοδο της Υπερθερμίας για καλύτερη αντιμετώπιση του καρκίνου. Όμως έχει παρατηρηθεί μείωση στο μέγιστο απορρόφησης της φθαλοκυανίνης στην περιοχή του ορατού (Q band) κατά την ακτινοβόλησής της χωρίς αλλά και με την επίδραση μαγνητικού πεδίου. Αιτία είναι η μετατροπή των μορίων της φθαλοκυανίνης σε ανιόντα κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης δηλαδή η φωτοκαταστροφή (photobleaching) που υφίσταται το μόριό της. Αυτά με τη σειρά τους αντιδρώντας με τα μόρια του υποστρώματος και με το μοριακό οξυγόνο οδηγούν στην εμφάνιση του μηχανισμού Τύπου I της Φωτοδυναμικής Θεραπείας (Σχήμα 4.4). Ταυτόχρονη παρουσία των δύο μηχανισμών οδηγούν στην μείωση της έντασης απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή και επηρεάζουν την φωτοδυναμική του δράση. [61]



Σχήμα 4. 4: Μηχανισμός παραγωγής ανιόντων AlCl^- κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης

Τέλος, όπως έχει αναφερθεί και στο προηγούμενο κεφάλαιο, η AlClPc ως φθαλοκυανίνη είναι ένα υδρόφοβο μόριο. Έτσι η παρουσία της σε υδατικό περιβάλλον οδηγεί σε συσσωμάτωση (aggregation) των μορίων της, η οποία και μειώνει την φωτοδυναμική της δράση. Αυτό συμβαίνει γιατί τα συσσωματώματα δε

διατηρούν τα φωτοφυσικά χαρακτηριστικά του φωτοευαισθητοποιητή στη μονομερή του μορφή, με αποτέλεσμα η κβαντική απόδοση μονήρους οξυγόνου άρα και η φωτοδυναμική δράση να μειώνονται δραματικά. Επιπλέον τα συσσωματώματα αλλάζουν και τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες του φωτοευαισθητοποιητή καθώς και τον τρόπο πρόσληψής του από τα κύτταρα. Για να μπορέσουν λοιπόν να πραγματοποιηθούν πειράματα *in vivo*, και να εισαχθεί η φωτοευαίσθητη ουσία στον οργανισμό, εγκλείεται σε φορείς μεταφοράς όπως π.χ τα λιποσώματα. Σημαντική όμως είναι και η συγκέντρωση της AlClPc στα διαλύματα που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, για την αποφυγή του φαινομένου της συσσωμάτωσης. Για την ελεύθερη μορφή της φθαλοκυανίνης συνήθως επιλέγονται συγκεντρώσεις διαλυμάτων μικρότερες των 10^{-5} M. Όταν η φθαλοκυανίνη είναι εγκλεισμένη στους φορείς μεταφοράς της, τότε οι απαιτούμενες συγκεντρώσεις είναι ακόμα πιο μικρές αφού ο χώρος στον οποίο κινείται το μόριο της ουσίας είναι ακόμα πιο περιορισμένος. Πειράματα έχουν δείξει ότι ο εγκλεισμός της AlClPc με συγκέντρωση της τάξης των 10^{-6} M σε φορείς μεταφοράς όπως τα λιποσώματα μικρών (small unilamellar vesicles, SUV) και μεγάλων διαστάσεων (large unilamellar vesicles, LUV) οδηγεί σε συσσωμάτωση. [63.64]

4.3 Η αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη ως φωτοευαισθητοποιητής

Σκοπός της ενότητας αυτής είναι η βιβλιογραφική επισκόπηση των ερευνητικών εργασιών που έχουν πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας την αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη ως φωτοευαισθητοποιητή. Τα πειράματα που αναφέρονται παρακάτω, περιγράφουν την διαδικασία της Φωτοδυναμικής Θεραπείας αρχικά σε επίπεδο κυττάρου αλλά και στη συνέχεια σε επίπεδο όγκου. Επίσης περιγράφονται και δύο ερευνητικές εργασίες όπου η αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη εφαρμόζεται ως φωτοευαισθητοποιητής σε κλινική έρευνα. Η φωτοευαίσθητη ουσία, AlClPc, χρησιμοποιείται στην ελεύθερη μορφή της αλλά και εγκλεισμένη σε φορείς μεταφοράς όπως τα λιποσώματα.

4.3.1 Μελέτες της αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνης σε επίπεδο κυττάρων

Η ενότητα αυτή αναφέρει τα *in vitro* πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί από τους ερευνητές με την φθαλοκυανίνη ως φωτοευαισθητοποιητή στην ελεύθερη μορφή της όσο και εγκλεισμένη σε φορείς μεταφοράς.

- *Η AlClPc ως φωτοευαισθητοποιητής στην ελεύθερη μορφή της.*

Οι *Wilson και al* [65] μελέτησαν την φωτοδυναμική δράση της AlClPc σε κύτταρα μηνιγγιώματος. Το συγκεκριμένο είδος καρκίνου, το μηνιγγίωμα, εμφανίζεται συχνά και καθώς η αφαίρεση του όγκου δεν είναι πάντα εφικτή, κρίνεται αναγκαία η εύρεση μια καινούργιας θεραπευτικής μεθόδου. Η Φωτοδυναμική Θεραπεία

αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη επιλογή. Στην έρευνα αυτή, τα υπό μελέτη καρκινικά κύτταρα επώαστηκαν για 16 ώρες με 0.02mM AICIPc. Αρχικά, θέλοντας να βρουν ποιο είναι το κατάλληλο μήκος κύματος για την ακτινοβόληση των κυττάρων, οι ερευνητές πραγματοποίησαν ακτινοβολήσεις όπου παρέμεναν σταθερά η ισχύς της ακτινοβολίας στα $140mW/cm^2$ και ο χρόνος ακτινοβολίας που ήταν 1 λεπτό. Τα μήκη κύματος της ακτινοβολίας μεταβάλλονταν από τα 600nm έως τα 860nm με βήμα 5nm. Από τα πειράματα αυτά εξήχθησαν τα εξής: Τα κατάλληλα μήκη κύματος για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων κυμάνθηκαν από τα 670 έως τα 680 nm, με καταλληλότερο αυτό των 670nm. Στα μήκη αυτά παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό κυτταρικού θανάτου. Για μήκη κύματος 610nm, 640nm και 655nm παρατηρήθηκε επίσης κυτταρικός θάνατος αλλά σε μικρότερο ποσοστό. Τέλος παρατήρησαν ότι ακτινοβολία με μήκος κύματος άνω των 700nm δεν οδήγησε σε καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Τα συμπεράσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με το φάσμα απορρόφησης του μορίου της φθαλοκυανίνης αφού στα μήκη κύματος όπου παρατηρήθηκε κυτταρικός θάνατος, σε αυτά απορροφά το μόριό της. Στη συνέχεια ερευνήθηκαν τόσο η επίδραση της μεταβολής του χρόνου έκθεσης των κυττάρων στην ακτινοβολία όσο και η επίδραση της ισχύος ακτινοβολίας σε αυτά. Τα καρκινικά κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με ακτινοβολία μήκους κύματος 670nm και ισχύ $140mW/cm^2$ για χρόνους 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180 και 300 δευτερόλεπτα ενώ για τα πειράματα όπου η ισχύς ακτινοβολίας άλλαζε ($10 - 140mW/cm^2$), ο χρόνος ακτινοβολίας και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας παρέμειναν σταθερά (1 λεπτό και 670nm αντίστοιχα). Τα πειράματα έδειξαν ότι ακτινοβολία μικρότερη των 35 sec επέφερε αμελητέο κυτταρικό θάνατο ενώ έκθεση άνω των 120 sec δεν επέφερε επιπλέον θάνατο. Στα 120 sec το ποσοστό των νεκρών κυττάρων έφτασε μέχρι και το 90%. Όσον αφορά την ισχύ της δέσμης ακτινοβολίας, δόσεις ισχύος χαμηλότερες των $70mW/cm^2$ δεν οδήγησαν σε σημαντικό ποσοστό κυτταρικού θανάτου (μέχρι 10%), ενώ δόσεις μεγαλύτερες από $85mW/cm^2$ δεν επέφεραν επιπλέον κυτταρικό θάνατο (ανώτατο ποσοστό θανάτου 50%). Τέλος με τη βοήθεια της συνεστιακής μικροσκοπίας διαπιστώθηκε ότι η AICIPc κατανεμήθηκε στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων.

Η φωτοδυναμική δράση της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης μελετήθηκε και από τους Ben-Hur και al ^[66] σε δύο διαφορετικά είδη κυττάρων. Στο ένα πείραμά τους, κύτταρα N2-Psi2 από ποντίκια επώαστηκαν με 1μM φθαλοκυανίνη και ακτινοβολήθηκαν με ακτινοβολία ισχύος $200W/m^2$ για 1, 2 και 3 λεπτά. Μελετώντας το ποσοστό των κυττάρων που επέζησαν, διαπίστωσαν ότι ήδη από το πρώτο λεπτό της ακτινοβολίας αυτό μειώθηκε στο 15% ενώ στο δεύτερο έφτασε σχεδόν στο 0,1% επαληθεύοντας και την ισχυρή φωτοδυναμική δράση της AICIPc. Σε επόμενο πείραμα με ινοβλάστες κινέζικων χάμστερ σειράς V79, τα κύτταρα

επώαστηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας σε συγκεντρώσεις φθαλοκυανίνης από 0,4 – 1,0 μM δίνοντας ανάλογα αποτελέσματα.

Οι *Silva de Paula και al.*, [67] χρησιμοποίησαν ανθρώπινους ινοβλάστες, και αφού τους επώασαν με 10μM φθαλοκυανίνη για 4 ώρες, τους ακτινοβόλησαν με δόσεις ακτινοβολίας τριών διαφορετικών ενεργειών $140\text{mJ}/\text{cm}^2$, $3\text{J}/\text{cm}^2$ και $10\text{J}/\text{cm}^2$. Τοξικότητα της φθαλοκυανίνης δεν παρατηρήθηκε χωρίς την οπτική ενεργοποίησή της. Η ακτινοβόληση των επωασμένων κυττάρων με την ενέργεια των $140\text{mJ}/\text{cm}^2$ μείωσε την βιωσιμότητα αυτών κατά 58,7%, ενώ με τις ενέργειες των $3\text{J}/\text{cm}^2$ και $10\text{J}/\text{cm}^2$ μειώθηκε παραπάνω φτάνοντας στα 33,3% και 15% αντίστοιχα δίνοντας και πάλι εντυπωσιακά αποτελέσματα.

Τέλος, οι *N Brasseur και al.* [68] για την *in vitro* έρευνά τους, επώασαν με την χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη κύτταρα της σειράς EMT-6 τα οποία προέρχονταν από όγκο μαστού αναπτυγμένο σε ποντίκια. Η συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας ήταν 1μM και οι ώρες επώασης που δοκιμάστηκαν, 1 και 24 ώρες. Η δόση ενέργειας που κατάφερε να οδηγήσει σε θάνατο το 90% των κυττάρων ήταν $13,5\text{J}/\text{cm}^2$ για την μία ώρα επώασης, ενώ για τις 24 ώρες η απαιτούμενη ενέργεια μειώθηκε στα $4,5\text{J}/\text{cm}^2$.

- Η AICIPc ως φωτοευαίσθητοποιητής εγκλεισμένη σε φορείς μεταφοράς

Η ομάδα των *Tarajos και al.* [69] πραγματοποίησαν την έρευνά τους σε κύτταρα που προέρχονταν από καρκίνωμα του στόματος, συγκεκριμένα σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα. Ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου επιλέχθηκε γιατί είναι ένας από τους 10 συχνότερα εμφανιζόμενους στον άνθρωπο και οι παραδοσιακές θεραπείες δημιουργούν παρενέργειες επηρεάζοντας σημαντικά την ποιότητα ζωής του ασθενούς. Ως φορέας μεταφοράς της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης χρησιμοποιήθηκαν λιποσώματα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με AICIPc συγκέντρωσης 5μM για 30 λεπτά. Το μήκος κύματος της ακτινοβολίας ήταν 670nm, ο χρόνος ακτινοβόλησης 5 λεπτά με ισχύ $40\text{mW}/\text{cm}^2$ και ενέργεια $25\text{J}/\text{cm}^2$. Δύο ώρες μετά την PDT, το ποσοστό κυτταρικού θανάτου έφτασε το 80% ενώ μόνο το 6% των κυττάρων επέζησε από την Φωτοδυναμική. Επιπλέον, 24 ώρες μετά την PDT το ποσοστό των κυττάρων που επέζησαν μειώθηκε στο 100%. Στα κύτταρα τα οποία δέχθηκαν την επίδραση μόνο του φωτός ή μόνο της AICIPc παρατηρήθηκε αμελητέο ποσοστό κυτταρικού θανάτου υποδεικνύοντας έτσι τη μη τοξικότητα της φθαλοκυανίνης απουσία φωτός αλλά και του laser μόνο. Τα κύτταρα που δέχθηκαν φωτοδυναμική θεραπεία οδηγήθηκαν σε θάνατο μέσω του μηχανισμού της νέκρωσης. Σε αυτά, σχεδόν το 70% του DNA ήταν κατακερματισμένο όπως και η κυτταρική μεμβράνη με το κυτταρόπλασμα. Αντίθετα ούτε η παρουσία της φθαλοκυανίνης αλλά ούτε και η ακτινοβόληση με το laser δεν επέφεραν καμία αλλαγή στην μορφολογία των κυττάρων ενώ καμία μεταβολή στα χρωμοσώματα

των κυττάρων δεν παρατηρήθηκε σε καμία περίπτωση. Τελικά τα αποτελέσματα απέδειξαν πως η φθαλοκυανίνη εμφανίζει μεγάλη τοξικότητα στο συγκεκριμένο είδος κυττάρων και αποτελεί ισχυρό όπλο της Φωτοδυναμικής Θεραπείας.

Οι *Silva de Paula και al* ^[67] εκτός από τη συμπεριφορά της ελεύθερης AICLPc μελέτησαν επίσης την συμπεριφορά της φθαλοκυανίνης στην Φωτοδυναμική Θεραπεία εγκλεισμένη σε πολυμερή νανοσωματίδια. Τα τέσσερα νανοσωματίδια που δημιουργήθηκαν ήταν τα PLA NS, PLGA NC, PLA NC και PLA-PEG NC. Σε αυτά, η συγκέντρωση της φθαλοκυανίνης ήταν 10μM. Οι δόσεις ενέργειας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν $140\text{mJ}/\text{cm}^2$, $3\text{J}/\text{cm}^2$ και $10\text{J}/\text{cm}^2$. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εγκλεισμένη φθαλοκυανίνη είχε παρόμοια αποτελεσματικότητα με την ελεύθερη μορφή της (Πίνακας 4.1).

Πίνακας 4. 1: Ποσοστά βιωσιμότητας των κυττάρων μετά την Φωτοδυναμική Θεραπεία

Ενέργεια ακτινοβολήσης	Ελεύθερη AICLPc	PLA NC	PLA NS	PLGA NC	PLA-PEG NC
$140\text{mJ}/\text{cm}^2$	58.7%	51.3%	41.3%	57.5%	46.4%
$3\text{J}/\text{cm}^2$	33.3%	12.9%	15.5%	13.7%	11.3%
$10\text{J}/\text{cm}^2$	15%	13.5%	15.2%	18.4%	13.5%

Συγκεκριμένα, για ενέργεια ακτινοβολήσης $140\text{mJ}/\text{cm}^2$, τα κύτταρα που επώαστηκαν με το νανοσωματίδιο PLGA NC είχαν σχεδόν το ίδιο ποσοστό βιωσιμότητας με αυτά που είχαν επωαστεί με την ελεύθερη φθαλοκυανίνη. Για τα υπόλοιπα τρία νανοσωματίδια, PLA NC, PLA NS και PLA-PEG NC, το ποσοστό βιωσιμότητας ήταν ακόμα μικρότερο. Για ενέργεια $3\text{J}/\text{cm}^2$ το ποσοστό των κυττάρων που επέζησαν της Θεραπείας ήταν πιο χαμηλό από αυτό της ελεύθερης AICLPc. Για ενέργεια $10\text{J}/\text{cm}^2$, τα ποσοστά ήταν παρόμοια τόσο στην ελεύθερη μορφή της AICLPc όσο και στην εγκλεισμένη. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων δείχνει ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στη φωτοτοξική επίδραση AICLPc εγκλεισμένης σε διαφορετικές συνθέσεις νανοσωματιδίων με μεγάλες δόσεις ακτινοβολίας. Η δόση $3\text{J}/\text{cm}^2$ ήταν αρκετή ώστε να μειώσει δραστικά την βιωσιμότητα των κυττάρων για όλα τα νανοσωματίδια. Ο εγκλεισμός του ευαισθητοποιητή στα νανοσωματίδια βελτίωσε την δραστικότητά του και παρουσίασε καλύτερες βιολογικές ιδιότητες για πειράματα in vitro.

Οι *Maria Maftoum-Costa και al* ^[70] μελέτησαν την συμπεριφορά των μιτοχονδρίων, του ενδοπλασματικού δικτύου και της πρωτεΐνης actin μετά την Φωτοδυναμική Θεραπεία με λιποσωμική χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη σε ανθρώπινα καρκινικά HeLa κύτταρα. Οποιαδήποτε βλάβη στα οργανίδια αυτά οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο γι αυτό και η μελέτη για τυχόν αλλαγές σε αυτά μετά την Φωτοδυναμική Θεραπεία κρίνεται αναγκαία. Οι ερευνητές μετά την επώαση

των κυττάρων με 5mM λιποσωμικής φθαλοκυανίνης για 1 ώρα, τα ακτινοβόλησαν στην συνέχεια με ακτινοβολία μήκους κύματος 670nm, ενέργεια δόσης $4,5J/cm^2$ και ισχύ $45 mW/cm^2$. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την Φωτοδυναμική Θεραπεία, μελέτησαν την επίδρασή της στα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και στη μορφή της πρωτεΐνης. Με την βοήθεια της μικροσκοπίας φθορισμού παρατήρησαν ότι τα ακτινοβολημένα κύτταρα παρουσίασαν υπερπολωμένα μιτοχόνδρια στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα και διαχεόμενο φθορισμό σε όλο το κυτταρόπλασμα. Επίσης μεταβολές και αλλοιώσεις εμφανίστηκαν και στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπως και στην δομή της πρωτεΐνης. Οι αλλοιώσεις αυτές προμηνύουν κυτταρικό θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης. Η παρούσα μελέτη απέδειξε ότι το συνδυασμένο αποτέλεσμα της λιποσωμικής AICPc και του κόκκινου φωτός στην κυτταρική σειρά HeLa οδηγούν στην απώλεια της βιωσιμότητας αυτών.

Η ομάδα των *Paulo F. Longo και al* ^[71] χρησιμοποίησαν κατιονικά λιποσώματα της φθαλοκυανίνης για πειράματα in vitro αλλά και για κλινική έρευνα η οποία θα περιγραφεί σε ξεχωριστή ενότητα. Για την in vitro εκτίμηση της AICPc χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια τερηδόνας, βλαστικά κύτταρα οδοντικού πολτού και ινοβλάστες από ποντίκια σειράς NIH-3T3. Τα βακτήρια και τα βλαστικά κύτταρα οδοντικού πολτού επώαστηκαν με 5μM λιποσωμική φθαλοκυανίνη για χρόνους 5, 15 και 30 λεπτά ενώ τα κύτταρα της σειράς NIH-3T3 επώαστηκαν μόνο για 5 λεπτά με την φωτοευαίσθητη ουσία. Οι δόσεις ενέργειας της ακτινοβολίας ήταν $6.85J/cm^2$, $20.57J/cm^2$ και $61,71 J/cm^2$ με αντίστοιχους χρόνους ακτινοβόλησης 9, 3 και 1 λεπτά. Η ισχύς παρέμεινε σταθερή στα $114mW/cm^2$. Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις τους, τα κατιονικά λιποσώματα αλληλεπίδρασαν ισχυρά τόσο με τα βακτήρια όσο και με τις άλλες δύο σειρές κυττάρων μέσα στα 5 πρώτα λεπτά της επώασης. Όμως η Φωτοδυναμική Θεραπεία αποδείχτηκε ισχυρή μόνο για τα βακτήρια όπου ο πληθυσμός τους μειώθηκε σημαντικά σε ποσοστό 82%, ενώ οι δύο σειρές των κυττάρων δεν οδήγησαν σε ικανοποιητικά ποσοστά κυτταρικού θανάτου αφού το ποσοστό του κυμάνθηκε μεταξύ 10 και 20%.

Σε επόμενο πείραμα η ομάδα των *Marcelo de Castro Pazos και al*, ^[72] θέλοντας να μελετήσουν αν τα κύτταρα που επιζούν της Φωτοδυναμικής Θεραπείας μπορούν να δημιουργήσουν και πάλι κάποιον όγκο, επώασαν με λιποσωμική φθαλοκυανίνη συγκέντρωσης 5μM υγιή κύτταρα EC που προέρχονταν από αορτή κουνελιού καθώς και τα αντίστοιχα καρκινικά αυτών, EJ-gas-EC. Τα κύτταρα αφού επώαστηκαν για 40 λεπτά με τον φωτοευαίσθητοποιητή, ακτινοβολήθηκαν με ακτινοβολία ενέργειας 100, 200 και $300mJ/cm^2$ για χρόνους 3 λεπτά και 44 sec, 7 λεπτά και 28 sec και 11 λεπτά και 12 sec αντίστοιχα. Κύτταρα που είχαν επωαστεί μόνο με λιποσώματα ή είχαν ακτινοβοληθεί μόνο δεν εμφάνισαν μεταβολή στον αριθμό τους. Αντίθετα αυτά που υπέστησαν την Φωτοδυναμική δράση της φθαλοκυανίνης εμφάνισαν ποσοστό κυτταρικού θανάτου μέχρι και 50% με τα καρκινικά κύτταρα να σημειώνουν μικρότερο ποσοστό επιβίωσης. Τέλος παρατηρήσεις που σημειώθηκαν

στα επιζήσαντα κύτταρα έδειξαν μορφολογικές αλλαγές αλλά και αλλαγές στην λειτουργία τους που διαφέρουν από αυτές των μη ακτινοβολημένων. Οι αλλαγές αυτές είναι πιθανόν να εμποδίζουν τα κύτταρα να επανέλθουν σε κανονικό πολλαπλασιασμό μειώνοντας έτσι σημαντικά την πιθανότητα επανεμφάνισης του καρκίνου.

Οι *Marta S. T. Rocha και al.* [73] θέλησαν να μελετήσουν τη δραστικότητα της λιποσωμικής φθαλοκυανίνης σε καρκινικά κύτταρα μαστού που είχαν αναπτυχθεί σε σκύλο. Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τον συχνότερα εμφανίσιμο καρκίνο στα θηλαστικά γι αυτό και επιλέχθηκε. Για τον λόγο αυτό καλλιέργησαν δυο σειρές κυττάρων, τα καρκινικά και ινοβλάστες σειράς NIH 3T3. Και για τις δύο σειρές κυττάρων οι πειραματικές συνθήκες ήταν ίδιες. Τα κύτταρα επώαστηκαν με λιποσωμική AICIPc συγκέντρωσης 2.5μM για 30 λεπτά στο σκοτάδι. Η ακτινοβόληση πραγματοποιήθηκε με πηγή φωτός LED ($\lambda=660\text{ nm}$) για χρονικό διάστημα 5 λεπτών με ισχύ 75-78mW/cm² και δόση ενέργειας 10J/cm². Από το τεστ βιωσιμότητας που πραγματοποιήθηκε μετά την Φωτοδυναμική Θεραπεία προέκυψε ότι το ποσοστό των κυττάρων που επέζησαν στην ομάδα PDT ήταν σαφώς μικρότερο από αυτό των άλλων ομάδων. Τα καρκινικά κύτταρα και στην μελέτη αυτή υπέστησαν το μεγαλύτερο ποσοστό θανάτου φτάνοντας μέχρι και το 80%. Ο κυτταρικός θάνατος προήλθε κυρίως μέσω του μηχανισμού της νέκρωσης, ενώ το ποσοστό των κυττάρων που ακολούθησαν το μονοπάτι της απόπτωσης ήταν αμελητέο σε όλες τις ομάδες. Στα κύτταρα που δέχθηκαν μόνο την επίδραση του φωτός ή μόνο την επίδραση της φθαλοκυανίνης δεν παρατηρήθηκε κυτταρικός θάνατος επιβεβαιώνοντας την μη τοξικότητα της φθαλοκυανίνης απουσία φωτός αλλά και του laser μόνο. Τα κύτταρα που δέχθηκαν Φωτοδυναμική θεραπεία και επέζησαν, παρουσίασαν κυτταρικό εκφυλισμό. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, η χλωροαλουμινο-φθαλοκυανίνη μπορεί να χαρακτηριστεί ισχυρός φωτοευαισθητοποιητής ενάντια στα καρκινικά κύτταρα του μαστού.

Σε επόμενη μελέτη, οι ερευνητές *P.A. Barbugli και al.* [74] ασχολήθηκαν με το μελάνωμα, ένα είδος καρκίνου του δέρματος πολύ επιθετικό και με ιδιαίτερη αντίσταση στην χημειοθεραπεία. Τρία είδη καρκινικών κυττάρων που αντιστοιχούν σε τρεις διαφορετικές φάσεις της ανάπτυξης του συγκεκριμένου καρκίνου χρησιμοποιήθηκαν. Τα WM1552C και WM278 (υπεύθυνα για την ανάπτυξη και τη μορφολογία του καρκινικού όγκου) και τα WM1617 (υπεύθυνα για την μετάσταση). Η εγκλεισμένη σε λιποσώματα φθαλοκυανίνη, συγκέντρωσης 0,29μg/ml, επώαστηκε για 3 ώρες με τα κύτταρα και στην συνέχεια αυτά ακτινοβολήθηκαν με ακτινοβολία μήκους κύματος $\lambda=675\text{nm}$ για ενέργειες 70, 140 και 700mJ/cm². Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι η συγκέντρωση της λιποσωμικής φθαλοκυανίνης που απορρόφησαν τα κύτταρα ήταν 30ng/ml και για τα 3 είδη αυτών. Η φθαλοκυανίνη εντοπίστηκε στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων χωρίς να έχει εισέλθει στον πυρήνα τους. Η δόση ενέργειας των 700mJ/cm² αποδείχτηκε

η πιο αποτελεσματική μειώνοντας στο ελάχιστο το μέγεθος των κυττάρων WM1552C και WM278, ενώ περιόρισε και την δράση των μεταστατικών κυττάρων και την μη επανεμφάνισή τους δύο βδομάδες μετά την ακτινοβολήση.

Τέλος στο πείραμα των *N Brasseur και al.*, [68] οι ερευνητές για να λύσουν το πρόβλημα της υδροφοβικότητας που χαρακτηρίζει τις φθαλοκυανίνες και κατά συνέπεια της AICPC, δημιούργησαν δύο πολυμερη-φορείς μεταφοράς για την φωτοευαίσθητη ουσία. Τα πολυμερή PEG και PVA περιείχαν την αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη σε συγκέντρωση 1μM. Τα κύτταρα EMT-6 επώαστηκαν με τους φορείς για 1 και 24 ώρες. Οι δόσεις ενέργειας της ακτινοβολίας που οδήγησαν σε κυτταρικό θάνατο σε ποσοστό 90% για τους δύο φορείς μεταφοράς δίνονται στον Πίνακα 4.2:

Πίνακας 4. 2: Οι απαιτούμενες δόσεις ενέργειας που οδηγούν σε ποσοστό κυτταρικού θανάτου 90%.

Φορείς μεταφοράς	PEG		PVA	
	1h	24h	1h	24h
Χρόνος επώασης (h)	1h	24h	1h	24h
Ενέργεια (J/cm^2)	36	6	36	8.5

Η απαιτούμενη ενέργεια της ακτινοβολίας για να επιτευχθεί το ίδιο ποσοστό θανάτου με την φθαλοκυανίνη στην ελεύθερη μορφή της, ήταν $13,5J/cm^2$ για την μία ώρα επώασης και $4,5J/cm^2$ για τις 24 ώρες. Συγκρίνοντας τις δόσεις ενέργειας της ελεύθερης φθαλοκυανίνης με τις αντίστοιχες για την εγκλεισμένη μετά την επώαση της μιας ώρας, παρατηρείται ότι η ελεύθερη φθαλοκυανίνη απαιτεί έως και 3 φορές λιγότερη ενέργεια, ενώ και οι 3 μορφές της μετά από την επώαση των 24 ωρών μπορούν να χαρακτηριστούν ιδιαίτερα τοξικές για τα κύτταρα.

4.3.2 Μελέτες της αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνης σε επίπεδο όγκου.

Στην ενότητα αυτή παρατίθεται η βιβλιογραφική επισκόπηση για τις in vivo μελέτες με την χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη τόσο σε ελεύθερη μορφή τόσο και εγκλεισμένη σε φορείς μεταφοράς.

- Πειράματα in vivo με τον φωτοευαίσθητοποιητή σε ελεύθερη μορφή.

Στην εργασία των *Maria Kyriazi και al.* [75] μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα της Φωτοδυναμικής Θεραπείας με AICPC μη μελανωματικού του καρκίνου του δέρματος. Η φωτοευαίσθητη ουσία εφαρμόστηκε τοπικά στους όγκους και στην συνέχεια ακολούθησε ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 670nm. Πιο αναλυτικά,

φαρμακοκινητικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν για να μελετηθεί το μέγιστο βάθος διείσδυσης της φθαλοκυανίνης στον καρκινικό όγκο αλλά και στους υγιείς ιστούς ενώ μετρήθηκε και η μέγιστη συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας που απορροφήθηκε από τον όγκο. Για τις μελέτες αυτές, διάλυμα AICIPc (0.7% w/v) εφαρμόστηκε για 1 έως 6 ώρες σε όγκους οι οποίοι είχαν αναπτυχθεί σε ποντίκια. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στους υγιείς ιστούς μακριά από την περιοχή εφαρμογής της AICIPc δεν ανιχνεύθηκε η φωτοευαίσθητη ουσία, υποδηλώνοντας ότι η τοπική εφαρμογή της δεν αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης γενικευμένης φωτοευαισθησίας ή τοξικότητας. Επίσης η AICIPc απορροφήθηκε 40 φορές περισσότερο από τους καρκινικούς όγκους σε σχέση με τους υγιείς ιστούς, ενώ διείσδυσε 25 φορές πιο βαθιά στον όγκο σε σχέση με το υγιές δέρμα. Η μέγιστη συγκέντρωση της AICIPc (12.6 ng/mg ιστού) παρατηρήθηκε 6 ώρες μετά την εφαρμογή της. Στη συνέχεια διεξήχθη Φωτοδυναμική Θεραπεία χρησιμοποιώντας επτά διαφορετικούς συνδυασμούς των θεραπευτικών παραμέτρων (ισχύς και δόση ενέργειας, Πίνακας 4.3).

Ο συνδυασμός ισχύος $75mW/cm^2$ και ενέργειας $150J/cm^2$ αποδείχθηκε ο πιο αποτελεσματικός. Οδήγησε σε πλήρη υποχώρηση του όγκου σε ποσοστό 60% των ποντικών, εξαιρετικής αισθητικά αποτελέσματα και καθυστέρηση ανάπτυξης καινούργιων όγκων.

Πίνακας 4. 3: Πλήρης υποχώρηση κατά τη διάρκεια και μετά την Φωτοδυναμική Θεραπεία

Ομάδα	Είδος Θεραπείας	Ισχύς (mW/cm^2)	Ενέργεια (J/cm^2)	Πλήρης υποχώρηση	Πλήρης υποχώρηση	Πλήρης υποχώρηση
				7 ημέρες μετά την πρώτη ακτινοβολήση (%)	7 ημέρες μετά την δεύτερη ακτινοβολήση (%)	14 ημέρες μετά την δεύτερη ακτινοβολήση(%)
1	Καμία	-	-	0	0	0
2	AICIPc	-	-	0	0	0
3	PDT	100	75	0	0	0
4	PDT	100	150	0	0	20
5	PDT	100	250	0	0	20
6	PDT	75	100	0	20	20
7	PDT	75	150	60	60	60
8	PDT	50	100	20	20	20
9	PDT	50	150	20	20	20

Η δράση της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης ως φωτοευαίσθητοποιητής σε in vivo πειράματα μελετήθηκε και από τους *N Brasseur και al* [68]. Οι όγκοι στα πειραματόζωα προέρχονταν από δύο είδη καρκινικών κυττάρων, τα EMT-6 κύτταρα μαστού και τα Colo-26 κύτταρα από αδενοκαρκίνωμα του παχέως εντέρου. 24 ώρες μετά την εισαγωγή του φωτοευαίσθητοποιητή στον οργανισμό των ποντικών, οι όγκοι ακτινοβολήθηκαν με ακτινοβολία συνολικής ισχύος $200mW/cm^2$ και ενέργεια

$400J/cm^2$. Πλήρης υποχώρηση των EMT-6 όγκων παρατηρήθηκε σε ποσοστό 75% των ποντικών, ενώ το ποσοστό πλήρους υποχώρησης για τους όγκους Colo-26 δεν ξεπέρασε το 30%. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αργή ανάπτυξη νέων όγκων Colo-26 στα μη θεραπευμένα ποντίκια σε σχέση με αυτά που δεν είχαν υποβληθεί στην Φωτοδυναμική Θεραπεία. Τέλος, το μόνο μειονέκτημα που σημειώθηκε ήταν η έντονα αυξημένη κατακράτηση της φθαλοκυανίνης από το ήπαρ του ζώου, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε ηπατική δυσλειτουργία και τοξικότητα.

- *Πειράματα in vivo με τον φωτοευαισθητοποιητή εγκλεισμένο σε φορείς μεταφοράς.*

Στην εργασία των *João Paulo Figueiró Longo και al.* [71] περιγράφεται η αποτελεσματικότητα της λιποσωμικής AICIPc στη μελέτη της Φωτοδυναμικής Θεραπείας κατά του καρκίνου του στόματος και συγκεκριμένα του τύπου Ehrlich. Το είδος του καρκίνου αυτού αναπτύσσεται στην γλώσσα. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν 16 πειραματόζωα τα οποία χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες: Ομάδα ακτινοβολήσης με laser στα 670nm και δόση ενέργειας $100J/cm^2$, ομάδα AICIPc όπου στα πειραματόζωα χορηγήθηκαν 40μl λιποσωμικής φθαλοκυανίνης, ομάδα PDT όπου εφαρμόστηκε στα ποντίκια η φωτοδυναμική θεραπεία (εισαγωγή 40μl της φωτοευαίσθητης ουσίας και ακτινοβολήση με ενέργεια $100J/cm^2$) και τέλος η ομάδα αναφοράς. Τα αποτελέσματα της Φωτοδυναμικής Θεραπείας ήταν πολύ ενθαρρυντικά καθώς μόλις 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση του όγκου, παρατηρήθηκε νέκρωση αυτού σε ποσοστό 90%. Μικρό ποσοστό νέκρωσης (15%) παρατηρήθηκε και στην ομάδα AICIPc, ενώ στην ομάδα που υπέστη μόνο ακτινοβολήση δεν παρατηρήθηκε υποχώρηση των όγκων.

Τέλος, στην δημοσίευση των *N Brasseur και al* [68] μελετήθηκε η συνδυασμένη δράση της εγκλεισμένης φθαλοκυανίνης στα δύο πολυμερή PEG και PVA και του φωτός σε in vivo πειράματα. Όπως έχει αναφερθεί και στην προηγούμενη ενότητα, αναπτύχθηκαν δύο ειδών καρκινικοί όγκοι, οι EMT-6 και Colo-26 στα πειραματόζωα. Στην συνέχεια, αυτοί ακτινοβολήθηκαν με ακτινοβολία συνολικής ισχύος $200mW/cm^2$ και ενέργεια $400J/cm^2$, 24 ώρες μετά την εισαγωγή του φωτοευαισθητοποιητή στον οργανισμό των ζώων. Μετά το πέρας της Φωτοδυναμικής Θεραπείας οι ερευνητές οδηγήθηκαν στις εξής παρατηρήσεις: Το είδος του καρκινικού όγκου που αποδείχθηκε πιο ευάλωτο στην Φωτοδυναμική Θεραπεία ήταν το αποτελούμενο από τα καρκινικά κύτταρα EMT-6. Σε ποσοστό 75% των ζώων που υποβλήθηκαν στην PDT, οι όγκοι υποχώρησαν πλήρως. Για τον καρκινικό όγκο Colo-26 το ποσοστό ήταν 30%. Επίσης παρατηρήθηκε μεγάλη καθυστέρηση δημιουργίας καινούργιων όγκων και για τα δύο είδη καρκίνου. Ο φορέας μεταφοράς PEG όμως κατακρατήθηκε σε πολύ μεγάλο ποσοστό από τα ζωτικά όργανα του ζώου όπως το ήπαρ και τη σπλήνα δίνοντας έτσι δείγματα τοξικότητας. Ακόμα παρατηρήθηκαν και κάποιες βλάβες στους μύες των ποδιών

των ποντικιών. Ο φορέας μεταφοράς PVA, έχοντας το πλεονέκτημα της χαμηλότερης κατακράτησής του από τη σπλήνα και το ήπαρ, αλλά και μικρότερη συχνότητα εμφάνισης βλάβης στους υγιείς ιστούς των ζώων, αποδείχθηκε ο πιο αποτελεσματικός και βιοσυμβατός φορέας μεταφοράς της φθαλοκυανίνης.

4.3.3 Κλινικές μελέτες της αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνης.

Η αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη έχει χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες από δύο ερευνητικές ομάδες. Η ομάδα των *Joao Paulo Longo και al.* ^[71] προσπάθησαν να αναπτύξουν ένα κλινικό πρωτόκολλο Φωτοδυναμικής Θεραπείας με την φθαλοκυανίνη εγκλεισμένη σε κατιονικά λιποσώματα κατά βακτηριδίων που προκαλούν τερηδόνα. Η επόμενη ομάδα των *Seguier και al.* ^[76] αξιολόγησαν την επίδραση της φωτοδυναμικής θεραπείας (PDT) σε φλεγμονή που είχε επηρεάσει το δίκτυο κολλαγόνου σε άτομα με προχωρημένο στάδιο χρόνιας περιοδοντίτιδας. Χρησιμοποίησαν ως φορέα μεταφοράς της φθαλοκυανίνης αλοιφή που περιείχε νανοσωματίδια με την AICIPc στο εσωτερικό τους.

Αναλυτικά η κλινική μελέτη των *Joao Paulo Longo και al* ^[71] περιελάμβανε δέκα ασθενείς, παιδιά και ενήλικες, οι οποίοι είχαν αναπτύξει κοιλότητες στα δόντια τους λόγω των βακτηριδίων τερηδόνας. Στις κοιλότητες αυτές έγινε επικάλυψη με 0.5 ml από διάλυμα λιποσωμικής AICIPc συγκέντρωσης 5 μM για 5 λεπτά. Η πλεονάζουσα ποσότητα του φωτοευαισθητοποιητή αφαιρέθηκε με νερό και στη συνέχεια οι κοιλότητες ακτινοβολήθηκαν με ακτινοβολία συνολικής ισχύος $250\text{mW}/\text{cm}^2$ για 3 λεπτά. Σύγκριση των δειγμάτων που είχαν παρθεί από τις κοιλότητες πριν και μετά τη Φωτοδυναμική Θεραπεία έδειξαν μείωση των βακτηριδίων σε ποσοστό 82%. Αξίζει να σημειωθεί ότι κανένας από τους ασθενείς που υπέστη την συγκεκριμένη θεραπεία δεν εμφάνισε παρενέργειες κατά τη διάρκεια και μετά το πέρας αυτής.

Στην κλινική μελέτη των *Seguier και al.*, ^[76] δεκαέξι ασθενείς, 10 άντρες και 6 γυναίκες ηλικίας 50 έως 65 ετών, παρουσίασαν δύο δόντια με χρόνια προχωρημένη περιοδοντίτιδα και σημαντική κινητικότητα αυτών. Η ομάδα θέλοντας να δει αν η Φωτοδυναμική Θεραπεία θα μπορούσε να βοηθήσει στην μείωση των κυττάρων που προκαλούν φλεγμονή στις προβληματικές περιοχές, χρησιμοποίησε την φθαλοκυανίνη ως φωτοευαισθητοποιητή. Στο ένα δόντι εφαρμόστηκε η Φωτοδυναμική Θεραπεία ενώ το άλλο δόντι χρησιμοποιήθηκε για σύγκριση 7 μέρες μετά την θεραπεία. Συγκεκριμένα στο υπό θεραπεία δόντι έγιναν 3 επαλείψεις με τον φωτοευαισθητοποιητή. Οι επαλείψεις είχαν διαφορά 5 λεπτών μεταξύ τους και μετά το πέρας αυτών, πραγματοποιήθηκε η ακτινοβολία με ακτινοβολία ισχύος $0.5\text{W}/\text{cm}^2$ για 40 sec περιμετρικά του δοντιού. Η συγκέντρωση της φθαλοκυανίνης στον φορέα μεταφοράς ήταν $0.05\text{mg}/\text{ml}$. Τα αποτελέσματα μετά την θεραπεία και την σύγκριση με το δόντι που δεν είχε υποστεί θεραπεία, έδειξαν μείωση του πληθυσμού των κυττάρων που είναι υπεύθυνα για την φλεγμονή καθιστώντας την

Φωτοδυναμική Θεραπεία ένα σημαντικό όπλο απέναντι στην αντιμετώπιση των φλεγμονών και της περιοδοντίτιδας σε αντίθεση με τις ήδη υπάρχουσες επώδυνες θεραπείες. Τέλος, κανένας από τους ασθενείς που συμμετείχαν στην έρευνα αυτή δεν παρουσίασαν παρενέργειες κατά τη διάρκεια ή και μετά το πέρας της θεραπείας.

4.4 Εξαγωγή συμπερασμάτων από τις ερευνητικές εργασίες.

Από όλα τα παραπάνω πειράματα μπορούν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα:

- Η αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη σε όλες τις ερευνητικές εργασίες που πραγματοποιήθηκαν, δεν παρουσίασε τοξικότητα χωρίς την ενεργοποίησή της από φως (dark toxicity) ούτε στην ελεύθερη μορφή της αλλά ούτε και εγκλεισμένη σε φορείς μεταφοράς.
- Εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα των κυττάρων χωρίς να εισέρχεται στον πυρήνα.
- Η φθαλοκυανίνη εγκλεισμένη σε φορείς μεταφοράς απαιτεί ακτινοβολία μεγαλύτερης ισχύος και ενέργειας σε σχέση με την ελεύθερη μορφή της.
- Εμφανίστηκε ιδιαίτερα δραστική ενάντια στα καρκινικά κύτταρα με τα ποσοστά κυτταρικού θανάτου να φτάνουν μέχρι και το 80% μέσω του μηχανισμού της νέκρωσης.
- Όσα κύτταρα κατάφεραν να επιζήσουν της Φωτοδυναμικής Θεραπείας, παρουσίασαν σημαντικές αλλοιώσεις στην μορφολογία τους οι οποίες προμήνυαν αποπτωτικό θάνατο.
- Όσον αφορά τα αποτελέσματα της Φωτοδυναμικής Θεραπείας σε καρκινικούς όγκους που αναπτύχθηκαν σε ζώα, σημειώθηκαν ποσοστά πλήρους υποχώρησης των όγκων από 60% έως και 90%. Σε όσα ζώα δεν παρατηρήθηκε πλήρης υποχώρηση αυτών, σημειώθηκε πολύ αργή ανάπτυξη νέων όγκων.
- Τα αισθητικά αποτελέσματα της Θεραπείας στην προβληματική περιοχή ήταν εξαιρετικά.
- Μπορεί στις κλινικές μελέτες η Φωτοδυναμική Θεραπεία με την AICIPc ως φωτοευαίσθητοποιητή να μην εφαρμόστηκε σε καρκινικούς όγκους, όμως αποδείχτηκε ιδιαίτερα τοξική απέναντι στα βακτήρια που προκαλούν τερηδόνα και περιοδοντίτιδα.

Από τα παραπάνω συμπεράσματα η αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη αποδεικνύεται ένας πολύ ισχυρός φωτοευαισθητοποιητής με μεγάλη κυτταροτοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα. Είτε εγκλεισμένη σε λιποσώματα ή νανοσωματίδια, είτε με την ελεύθερη μορφή της μπορεί να οδηγήσει σε υψηλά ποσοστά κυτταρικού θανάτου. Δεν εμφανίζει τοξικότητα αν δεν ενεργοποιηθεί μέσω ακτινοβολήσης, οπότε δεν κινδυνεύουν να υποστούν βλάβες οι υγιείς ιστοί και τα ζωτικά όργανα των οργανισμών. Τέλος, σημαντική είναι και η δράση της ενάντια σε βακτήρια που προκαλούν τερηδόνα και περιοδοντίτιδα, δύο πολύ συχνά εμφανιζόμενες και δύσκολα αντιμετωπίσιμες παθήσεις των δοντιών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

5.1 Σκοπός της πειραματικής μελέτης

Στην φωτοδυναμική θεραπεία χρησιμοποιούνται αρκετοί φωτοευαισητοποιητές, οι οποίοι διαφέρουν ως προς τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητές τους. Πριν την χρήση της φωτοευαίσθητης ουσίας στην θεραπεία, αναγκαίος κρίνεται ο πλήρης προσδιορισμός των φωτοφυσικών ιδιοτήτων της. Αρχικά μελετάται η συμπεριφορά της ουσίας σε διαλύματα και στη συνέχεια πραγματοποιούνται πειράματα σε κύτταρα και τέλος σε ζωντανούς οργανισμούς.

Στην παρούσα εργασία η φωτοευαίσθητη ουσία που χρησιμοποιήθηκε είναι η αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη. Στόχος της διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της δραστηριότητας της συγκεκριμένης φθαλοκυανίνης ενάντια στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη LNCaP. Αναλυτικά πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω μελέτες:

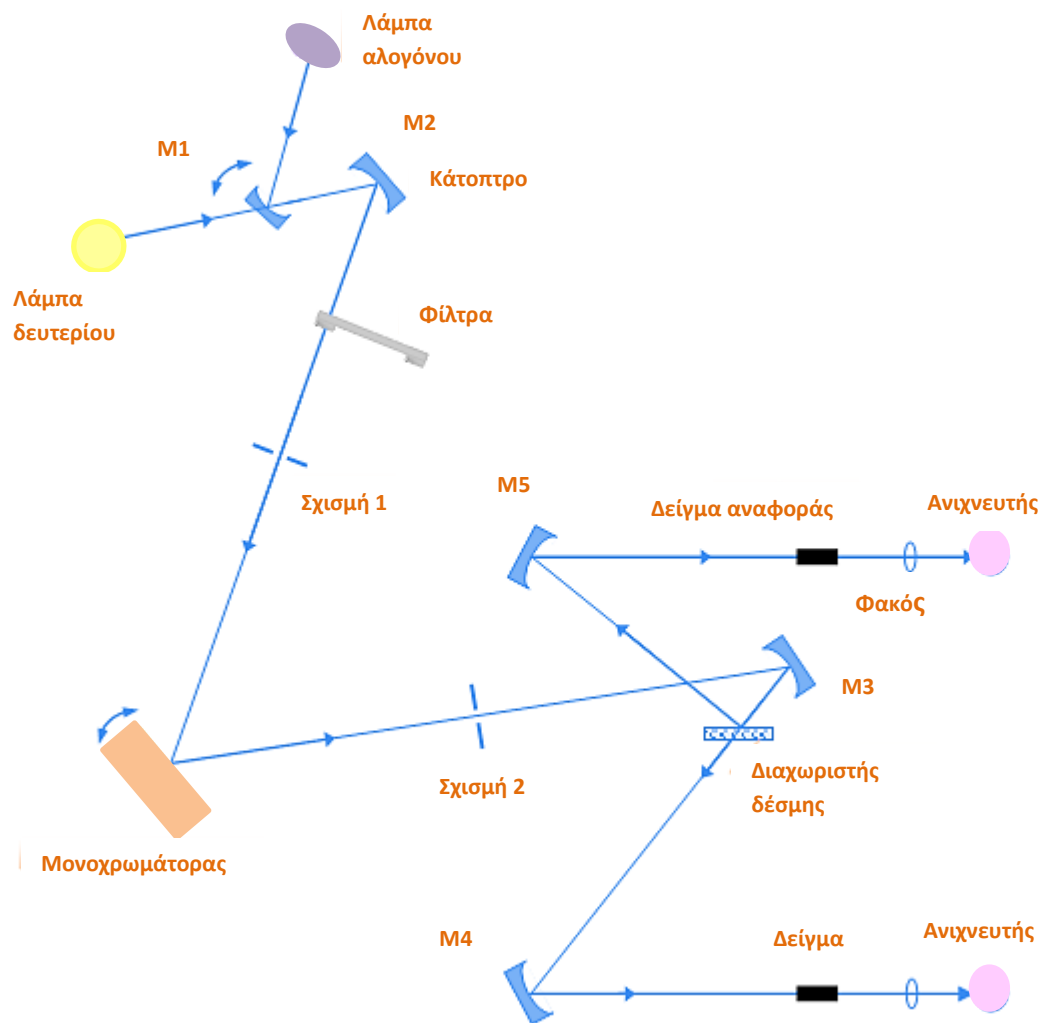
- Μελέτη της συμπεριφοράς της απορρόφησης που παρουσιάζουν τα διαλύματα της φθαλοκυανίνης σε ένα εύρος συγκεντρώσεων
- Μελέτη της απορρόφησης των διαλυμάτων της AICIPc σε διαφορετικούς διαλύτες
- Μελέτη της ικανότητας φθορισμού της φθαλοκυανίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις
- Μελέτη της ικανότητας των διαλυμάτων της φωτοευαίσθητης ουσίας ως προς την παραγωγή ελευθέρων ριζών και σύγκριση αυτής με τον κύριο ανταγωνιστή της, την φθαλοκυανίνη ψευδαργύρου, ZnPc
- Προσδιορισμός της μέγιστης ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φωτοευαισητοποιητή στα LNCaP κύτταρα καθώς και του χρόνου στον οποίο αυτή πραγματοποιείται
- Μελέτη της επίδρασης της φθαλοκυανίνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων απουσία φωτός (dark toxicity)
- Μελέτη της επίδρασης του φωτός στην βιωσιμότητα των κυττάρων απουσία φθαλοκυανίνης
- Μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης της AICIPc

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζονται όλες οι πειραματικές διατάξεις που χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη των παραπάνω πειραματικών διαδικασιών.

5.2 Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης

Για τη μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων του φωτοευαισθητοποιητή καταγράφησαν τα σήματα απορρόφησης των διαλυμάτων του. Για την λήψη και την καταγραφή των φασμάτων απορρόφησης, χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική συσκευή Lambda 35, UV/VIS Spectrometer, Perkin Elmer.

Το οπτικό διάγραμμα του οργάνου και η πορεία της φωτεινής δέσμης φαίνονται στο Σχήμα 5.1



Σχήμα 5. 1: Το οπτικό διάγραμμα του οργάνου και η πορεία της φωτεινής δέσμης

Το συγκεκριμένο όργανο διαθέτει δύο φωτεινές πηγές. Μία λυχνία δευτερίου, η οποία εκπέμπει στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος (200-400nm), και μία λυχνία αλογόνου, η οποία εκπέμπει στην ορατή και κοντινή υπέρυθρη περιοχή (350-900nm). Για την λειτουργία του φασματοφωτόμετρου στην υπέρυθρη περιοχή, το κάτοπτρο M1 ανασηκώνεται προκειμένου να επιτρέψει τη διέλευση φωτός. Όταν η

ακτινοβολία προέρχεται από τη λυχνία αλογόνου, το κάτοπτρο M1 επανέρχεται στη θέση του προκειμένου το φως της πηγής να ανακλαστεί και να οδηγηθεί στο κάτοπτρο M2. Η φωτεινή δέσμη ανακλάται από το κάτοπτρο M2 και οδηγείται σε έναν τροχό φίλτρων. Ανάλογα με την περιοχή μήκους κύματος, ο τροχός αυτός περιστρέφεται ώστε να παρεμβληθεί στην πορεία της δέσμης το κατάλληλο φίλτρο που θα φιλτράρει τη δέσμη πριν αυτή εισέλθει στον μονοχρωμάτορα. Στη συνέχεια, η δέσμη περνά μέσα από τη σχισμή 1, σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα, και προσπίπτει στο μονοχρωμάτορα. Ο μονοχρωμάτορας είναι συγχρονισμένος με τον τροχό φίλτρων και κινούνται μέσω ενός βηματικού κινητήρα. Η δέσμη φωτός του εξεταζόμενου μήκους κύματος θα περάσει από τη σχισμή εξόδου 2 και θα προσπέσει σε ένα νέο κάτοπτρο M3 που θα την οδηγήσει σε ένα διαχωριστή δέσμης. Το 50 % της ακτινοβολίας ανακλάται από το διαχωριστή δέσμης και οδηγείται προς το κάτοπτρο M5, ενώ το υπόλοιπο 50 % περνά προς το κάτοπτρο M4. Η δέσμη από το κάτοπτρο M5 θα οδηγηθεί στο δείγμα αναφοράς. Το μέρος της δέσμης που θα περάσει από το δείγμα αναφοράς μέσω φακού εστίασης θα οδηγηθεί στη φωτοδίοδο. Με παρόμοιο τρόπο, η δέσμη από το κάτοπτρο M4 θα οδηγηθεί στο δείγμα και από εκεί, μέσω φακών, στη φωτοδίοδο. [77]

Διαχείριση σήματος

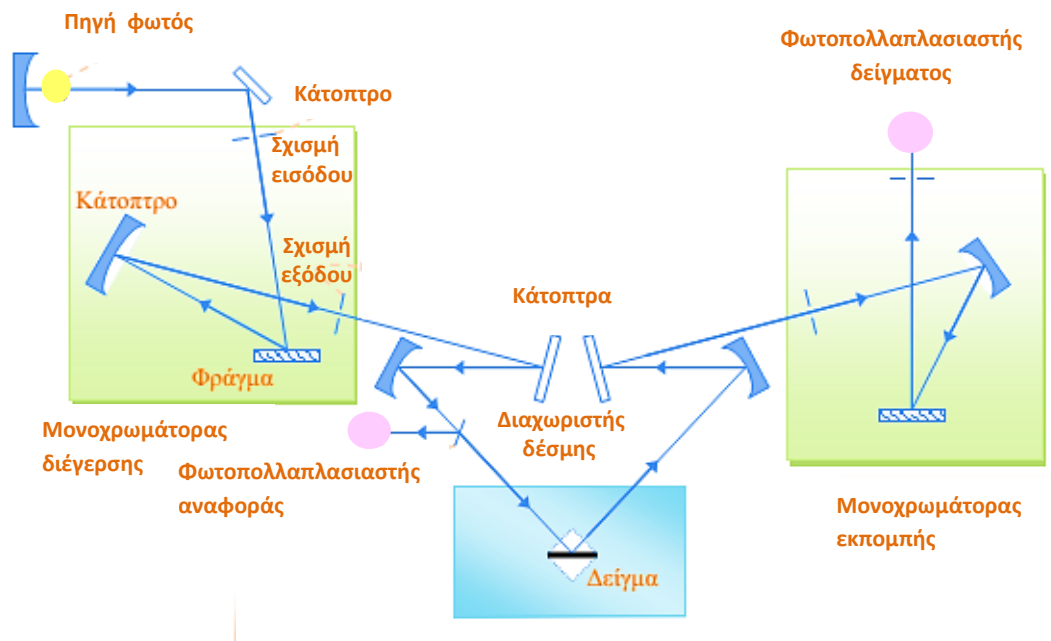
Ο έλεγχος του φασματοφωτόμετρου πραγματοποιείται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή, με την χρήση του λογισμικού πακέτου UV WinLab. Μέσω του λογισμικού αυτού, προσφέρεται η δυνατότητα ρύθμισης κάποιων παραμέτρων που επηρεάζουν τόσο τη μέθοδο φασματομετρίας όσο και το φασματοφωτόμετρο. Η απόκριση του φασματοφωτόμετρου σε αυτές τις αλλαγές είναι άμεση. Ορισμένες από τις παραμέτρους αυτές είναι οι εξής:

- Η επιλογή μηκών κύματος στα οποία θα παρθεί το φάσμα, η ταχύτητα σάρωσης και το πλάτος της σχισμής του μονοχρωμάτορα.
- Η ικανότητα μηδενισμού του σήματος που οφείλεται στο διαλύτη και το θόρυβο του φασματοφωτόμετρου μέσω της επιλογής Autozero. Έτσι τα φάσματα που προκύπτουν αναφέρονται μόνο στην απορρόφηση που οφείλεται στη συγκέντρωση των ουσιών του δείγματος και όχι του μέσου στο οποίο έχουν διαλυθεί και το θόρυβο του φασματοφωτόμετρου.
- Η εξομάλυνση (smoothing) και γενικά η επεξεργασία των καμπυλών-φασμάτων που προκύπτουν.
- Η δυνατότητα άμεσης εξαγωγής της συγκέντρωσης των διαφόρων ουσιών που υπάρχουν στα δείγματα μέσω καμπυλών απορρόφησης των δειγμάτων αναφοράς. [78]

5.3 Φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού

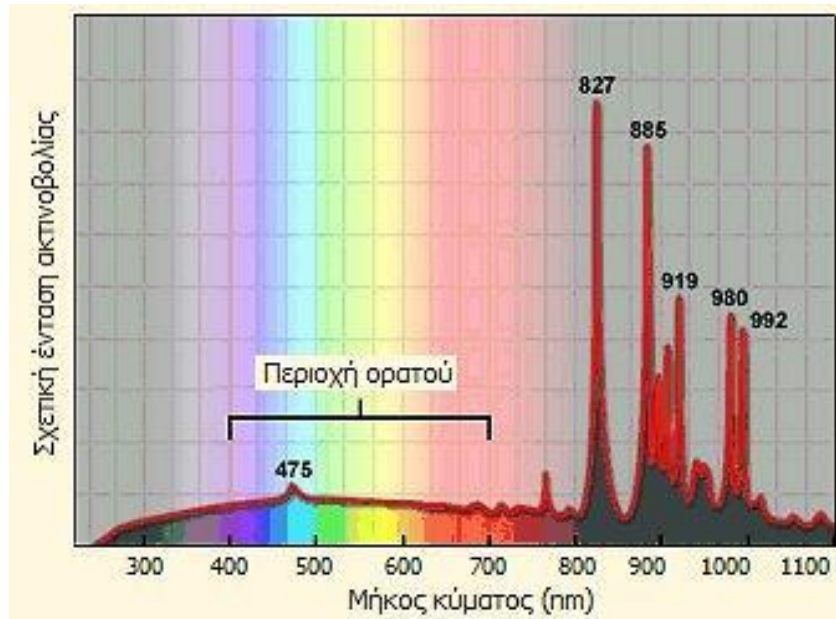
Εκτός από την μελέτη των φασμάτων απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή, πάρθηκαν και τα φάσματα της έντασης φθορισμού σε διαφορετικούς διαλύτες για την μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων του. Επίσης και για το πειραματικό κομμάτι υπολογισμού της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή στα καρκινικά κύτταρα LNCaP, χρησιμοποιήθηκε διάταξη φασματοσκοπίας φθορισμού. Συγκεκριμένα για τα παραπάνω πειράματα χρησιμοποιήθηκε η διάταξη φθορισμού LS 45 Luminescence Spectrometer, Perkin Elmer.

Η συγκεκριμένη διάταξη μπορεί να ανιχνεύσει φθορισμό, φωσφορισμό, χημειο- ή βιο-φωταύγεια. Η μέτρηση σημάτων φθορισμού από τη συγκεκριμένη διάταξη μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε για συνεχή σάρωση σε όλο το εύρος των μηκών κύματος του οργάνου (ή σε μέρος αυτής της περιοχής) είτε σε επιλεγμένα μήκη κύματος.



Σχήμα 5. 2: Οπτικό διάγραμμα διάταξης μέτρησης φθορισμού

Το οπτικό σύστημα της διάταξης (Σχήμα 5.2) αποτελείται από δύο μονοχρωμάτορες (διέγερσης και εκπομπής), μια σειρά από κάτοπτρα και δύο φωτοπολλαπλασιαστές (δείγματος και αναφοράς). Τα σήματα από τους δύο ανιχνευτές επεξεργάζονται από τα ηλεκτρονικά του οργάνου και μπορούν να παρατηρηθούν στην οθόνη ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή. Η πηγή φωτός διέγερσης είναι μια λυχνία ξένου (Xenon flash tube), η οποία παράγει παλμούς μικρής χρονικής διάρκειας και μεγάλης έντασης.



Σχήμα 5. 3: Φάσμα εκπομπής λυχνίας ξένου

Η ακτινοβολία από τη λυχνία ξένου, με τη βοήθεια κατόπτρων εστιάζεται στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα διέγερσης, ο οποίος περιλαμβάνει φράγμα 1440 γραμμών/mm και σφαιρικό κάτοπτρο για τη σωστή κάλυψη του φράγματος από τη φωτεινή δέσμη. Από τη σχισμή εξόδου εξέρχεται το μονοχρωματικό φως, σε συγκεκριμένη στενή φασματική περιοχή, με κεντρικό μήκος κύματος που καθορίζεται από τη γωνιακή θέση σάρωσης του φράγματος περίθλασης, που ελέγχεται από βηματικό κινητήρα (stepping motor). Η μονοχρωματική δέσμη διέγερσης προσπίπτει με τη βοήθεια κατόπτρων στο δείγμα υπό γωνία 45° . Παράλληλα, μέσω ενός διαχωριστή δέσμης (beam splitter), ένα μικρό μέρος από τη δέσμη διέγερσης εστιάζεται στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς. Για τη διόρθωση της απόκρισης του φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς, χρησιμοποιείται καμπύλη αναφοράς ροδαμίνης, η οποία είναι αποθηκευμένη στο όργανο και διατηρεί σχεδόν σταθερή τη κβαντική απόδοση για απορρόφηση σε μήκη κύματος από 230 έως 630 nm και εκπομπή στα 650 nm.

Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το δείγμα, σε γωνία 90° ως προς τη δέσμη διέγερσης, εστιάζεται από κάτοπτρα στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής, ο οποίος περιλαμβάνει οπτικό φράγμα περίθλασης 1200 γραμμών/mm και σφαιρικό κάτοπτρο. Η στενή φασματική περιοχή που εξέρχεται από τη σχισμή εξόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής-η κίνηση του φράγματος του οποίου επίσης ελέγχεται από βηματικό κινητήρα-αναλύεται τελικά από φωτοπολλαπλασιαστή.

Οι μονοχρωμάτορες μπορούν να σαρώνουν ανεξάρτητα είτε συνδυαστικά και για εύρος πεδίου, το οποίο κυμαίνεται για μεν το μονοχρωμάτορα διέγερσης από 200 έως 800 nm , για δε το μονοχρωμάτορα εκπομπής από 200 έως 900 nm. Επίσης

υπάρχει η δυνατότητα σύγχρονης σάρωσης, με σταθερή διαφορά μήκους κύματος διέγερσης και εκπομπής.

Το εύρος της σχισμής αποτελεί σημαντική παράμετρο που καθορίζει τη διακριτική ικανότητα της διάταξης (στο συγκεκριμένο όργανο και οι δύο σχισμές έχουν εύρος 10 nm). Βελτίωση της διακριτικής ικανότητας επιτυγχάνεται με την ελάττωση του εύρους της σχισμής. Στην περίπτωση αυτή όμως παρουσιάζεται το μειονέκτημα μείωσης του φωτός που είτε διεγείρει το δείγμα είτε συλλέγεται για καταγραφή. Ως ανιχνευτές χρησιμοποιούνται φωτοπολλαπλασιαστές λόγω της ευαισθησίας και της γρήγορης απόκρισης τους. [79]

Διαχείριση σήματος

Όταν το όργανο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση φθορισμού, για κάθε κύκλο συλλογής δεδομένων εκτελούνται τέσσερις ολοκληρώσεις. Δύο ολοκληρώσεις του σήματος που προέρχεται από τον φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς και δύο για το σήμα του φωτοπολλαπλασιαστή δείγματος. Οι ολοκληρώσεις αυτές πραγματοποιούνται σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα ως προς την τελευταία αναλαμπή της λυχνίας ξένου. Οι δεύτερες ολοκληρώσεις πραγματοποιούνται στους δύο φωτοπολλαπλασιαστές για τη συλλογή του σήματος υποβάθρου (σήμα που παράγεται όταν δεν προσπίπτει φως στη φωτοκάθοδο του φωτοπολλαπλασιαστή, dark current), το οποίο και αφαιρείται από τα σήματα εξόδου των φωτοπολλαπλασιαστών. Τα σήματα που λαμβάνονται από τους φωτοπολλαπλασιαστές ενισχύονται και έπειτα ψηφοποιούνται. Έπειτα σχηματίζεται ο λόγος του σήματος από το φωτοπολλαπλασιαστή δείγματος ως προς το αντίστοιχο αναφοράς, για τη βελτίωση του λόγου σήματος προς θόρυβο και για τη διόρθωση λόγω διακυμάνσεων στην εκπομπή της πηγής φωτισμού. Στη συνέχεια πολλαπλασιάζεται το σήμα με την καμπύλη διόρθωσης της ροδαμίνης που είναι αποθηκευμένη στο όργανο, για τη διόρθωση της φασματικής απόκρισης των φωτοπολλαπλασιαστών και την απόκριση διέλευσης του διαχωριστή δέσμης.

Ο έλεγχος του φασματοφωτόμετρου πραγματοποιείται και εδώ μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή, με την χρήση του λογισμικού πακέτου FL WinLab. Όπως και με το λογισμικό του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης, έτσι και με το λογισμικό αυτό, προσφέρεται η δυνατότητα ρύθμισης κάποιων παραμέτρων που επηρεάζουν τόσο τη μέθοδο φασματομετρίας όσο και το φασματοφωτόμετρο. Έτσι δίνεται η δυνατότητα επιλογής του εύρους των μηκών κύματος που θα παρθεί το φάσμα, η επιλογή του μήκους κύματος διέγερσης της εκάστοτε ουσίας αλλά και η δυνατότητα επεξεργασίας των καμπυλών-φασμάτων που προκύπτουν. [80]

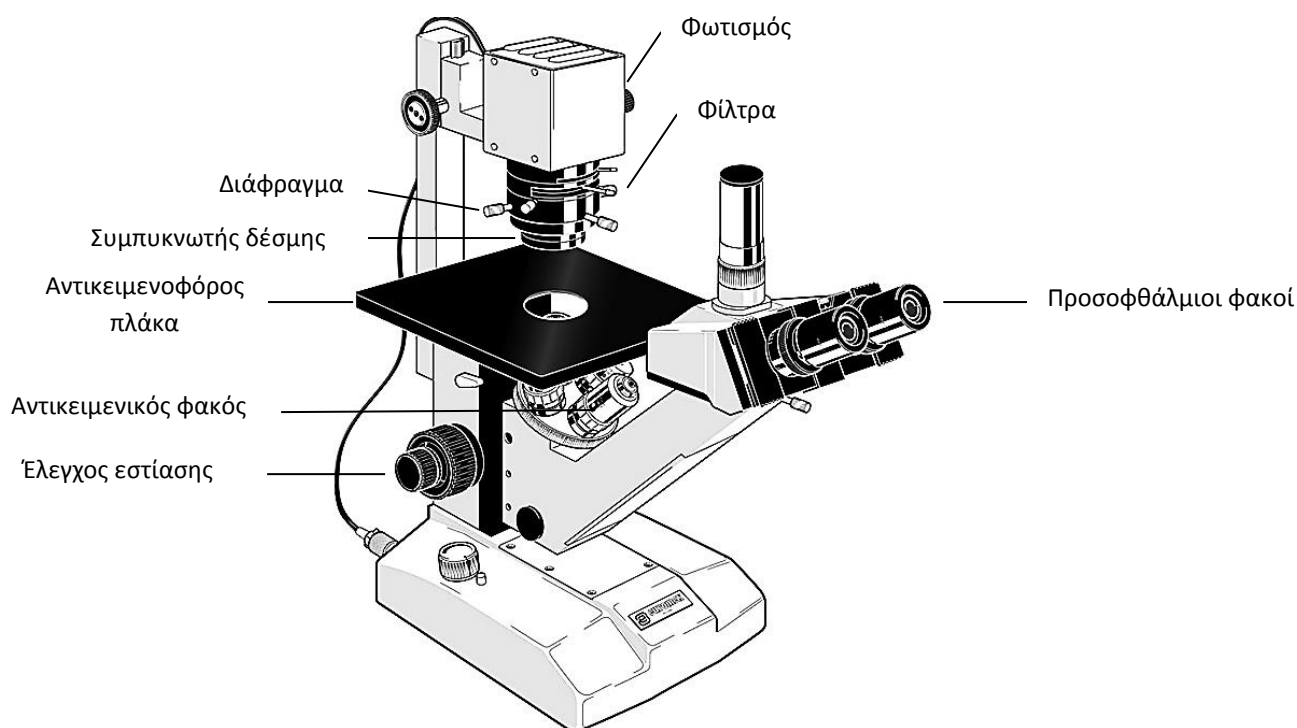
5.4 Μικροσκοπική διάταξη

Για τη μελέτη κυτταρικών καλλιιεργειών χρησιμοποιείται ανάστροφο μικροσκόπιο. Το κοινό μικροσκόπιο δεν είναι χρήσιμο, διότι αδυνατεί να εστιάσει λόγω των

διαθλάσεων που προκαλεί στις φωτεινές ακτίνες το θρεπτικό μέσο. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στον πυθμένα του τριβλίου ή της φλάσκας, όπου καλλιεργούνται, με αποτέλεσμα να γίνονται ορατά με το ανάστροφο μικροσκόπιο.

Η αρχή λειτουργίας του ανάστροφου μικροσκοπίου είναι η ίδια με του κοινού μικροσκοπίου, με τη διαφορά ότι το φως έρχεται από πάνω, και ο αντικειμενικός φακός βρίσκεται κάτω από το δείγμα. Έτσι ο παρατηρητής βλέπει την κάτω επιφάνεια του αντικειμένου.

Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται τα οπτικά και μηχανικά χαρακτηριστικά ενός σύνθετου ανάστροφου μικροσκοπίου.



Σχήμα 5. 4: Σύνθετο μικροσκόπιο

Για την παρατήρηση των κυττάρων στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκε το ανάστροφο μικροσκόπιο φωτισμού διέλευσης Unitron MiC-1317 με πηγή φωτισμού λάμπα αλογόνου, το οποίο είναι εξοπλισμένο με μεγεθυντικούς φακούς 10x, 20x και 40x.

5.5 Συστήματα laser στη Φωτοδυναμική Θεραπεία

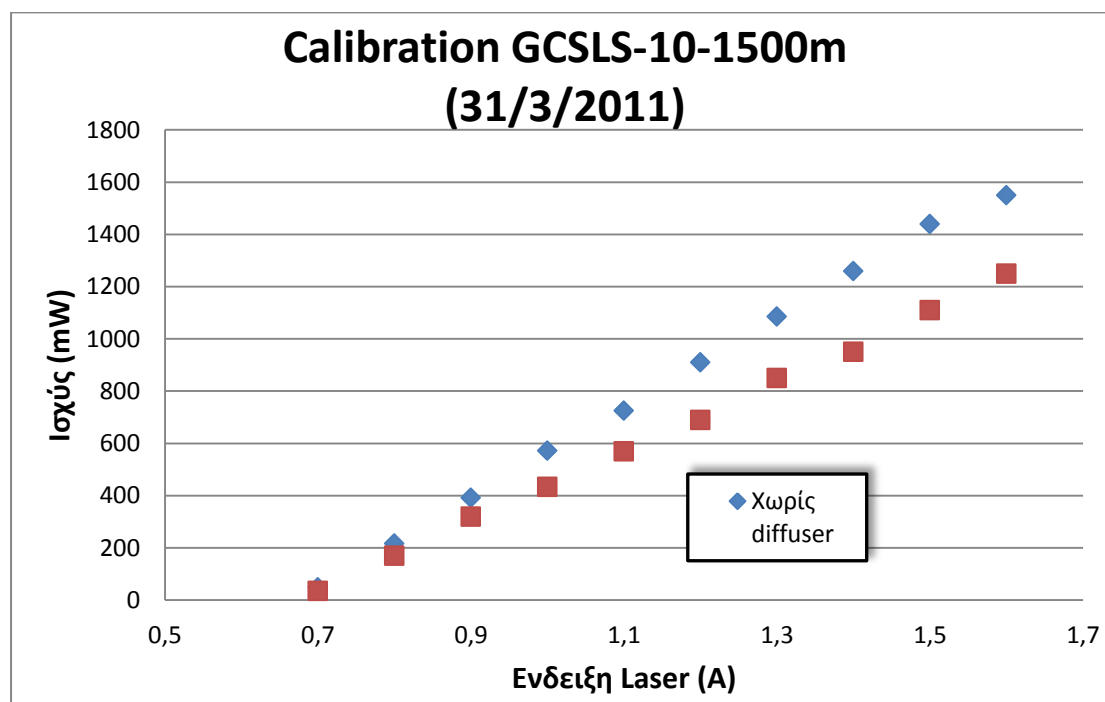
Η επιλογή των πηγών φωτός που χρησιμοποιούνται στην Φωτοδυναμική Θεραπεία καθορίζεται από δύο κύριους παράγοντες: το φάσμα απορρόφησης του φωτοευαίσθητοποιητή και το μήκος κύματος και το βάθος διείσδυσης του φωτός.

Στην σειρά πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκε το διοδικό laser GCSLS -10 -1500m. Σε αυτό είχε ενσωματωθεί οπτική ίνα με διαχύτη κυκλικής συμμετρίας στο άκρο της. Το μήκος κύματος του εκπεμπόμενου φωτός είναι 660 nm. Στον Πίνακα 5.10 παρατίθενται τα χαρακτηριστικά του laser GCSLS -10 -1500m.

Πίνακας 5. 1: Χαρακτηριστικά διοδικού laser GCSLS -10 -1500m.

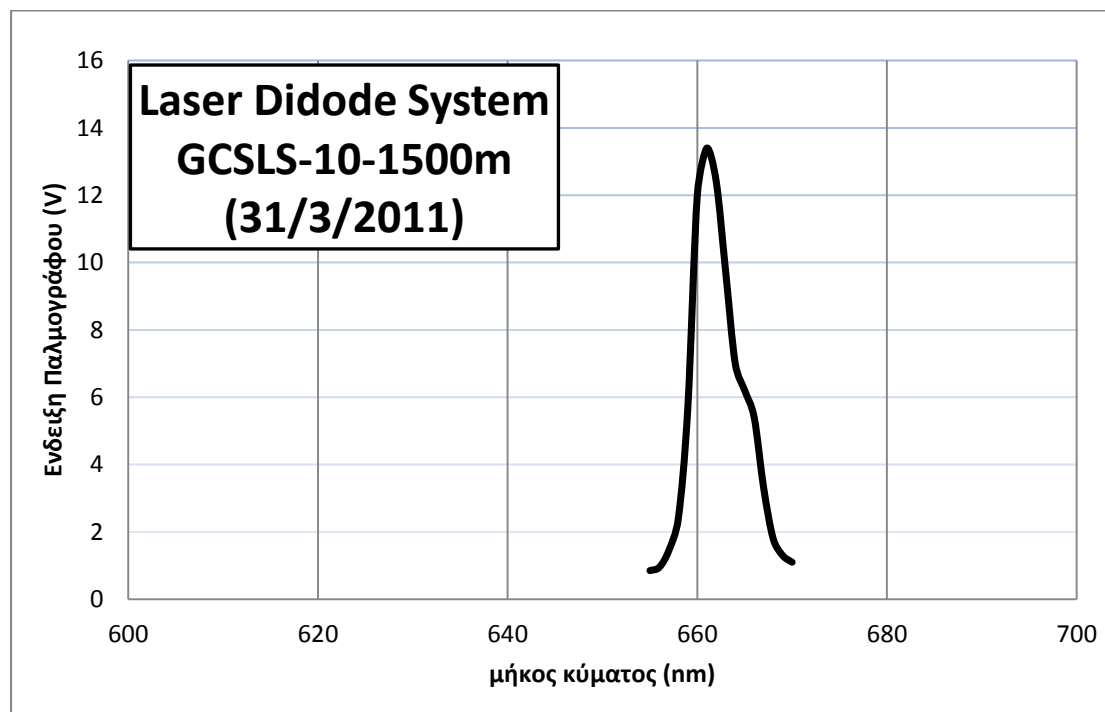
Χαρακτηριστικά	Τιμή
Μήκος κύματος	660 nm
Τρόπος Λειτουργίας	Συνεχές
Εύρος ρεύματος λειτουργίας	0-164 A
Θερμοκρασία λειτουργίας περιβάλλοντος	10-30 C ^o
Θερμοκρασία λειτουργίας LD	20 C ^o
Θερμοκρασία συναγερμού LD	22 C ^o

Στο σχήμα 5.5 παρουσιάζεται η γραφική παράσταση της ισχύος του laser συναρτήσει του ρεύματος η οποία αποτελεί την καμπύλη βαθμονόμησης του laser. Η γραφική παράσταση περιέχει δύο καμπύλες βαθμονόμησης, μία όταν στην οπτική ίνα είναι τοποθετημένος ο διαχύτης και μία καμπύλη χωρίς διαχύτη. Παρατηρούμε ότι το laser ξεκινά να εκπέμπει φως μετά τα 0.7 A ενώ φτάνει σε μέγιστη ισχύ στα 1600 mW.



Σχήμα 5. 5: Καμπύλη βαθμονόμησης του laser.

Στο σχήμα 5.6 δίνεται η γραφική παράσταση της τάσης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που εκπέμπεται. Παρατηρούμε ότι το μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής του laser είναι στα 660 nm, πολύ κοντά με το μέγιστο απορρόφησης της AICIPc.



Σχήμα 5. 6: Γραφική παράσταση τάσης-μήκους κύματος

Στον Πίνακα 5.2 δίνονται τα βασικά τεχνικά χαρακτηριστικά της ίνας που ήταν συνδεδεμένη στο laser.

Πίνακας 5. 2: Βασικά χαρακτηριστικά οπτικής ίνας για το σύστημα ακτινοβολήσης κυττάρων και την παραγωγή ελευθέρων ριζών

Χαρακτηριστικό	Τιμή
Υλικό	QUARTZ
Διάμετρος	600 μm
Αριθμητικό άνοιγμα	0.37
Οπτικός προσαρμογέας	SMA 905

Στην έξοδο της ίνας ήταν προσαρμοσμένος ένας διαχύτης κυκλικής συμμετρίας. Επειδή κατά τη μεταφορά της ακτινοβολίας μέσω της ίνας υπάρχει μία σημαντική μείωση της ισχύος, η ισχύς μετρούνταν και μετά την έξοδο της από το διαχύτη της ίνας. Η ισχύς εξόδου ρυθμιζόταν από το σύστημα του διοδικού laser παρακολουθώντας τις ενδείξεις του ενεργόμετρου ώστε να είναι η κατάλληλη κάθε φορά ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες. Το άκρο της ίνας στηρίζονταν σε μία στερεοτακτική διάταξη που επέτρεπε την τρισδιάστατη κίνησή της έτσι ώστε να είναι κάθετη στα υπό ακτινοβολία κύτταρα και η απόστασή της να είναι τόση ώστε η φωτεινή κηλίδα που δημιουργεί να έχει κατάλληλη ακτίνα ώστε να καλύπτει επαρκώς τα 3 τριβλία.

Η πραγματική ισχύς εξόδου μετριόταν μέσω ενεργόμετρου. Τα βασικά τεχνικά χαρακτηριστικά του ενεργόμετρου παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.3.

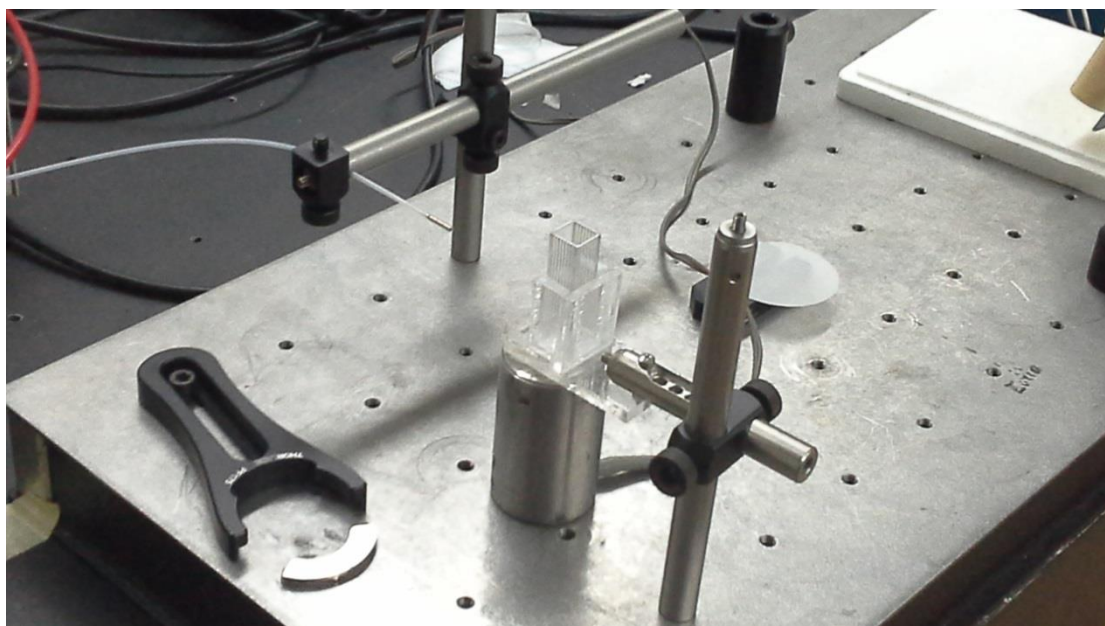
Πίνακας 5. 3: Χαρακτηριστικά ενεργόμετρου

Χαρακτηριστικό	Τιμή
Μήκη κύματος	0.19 – 20 μm
Διάμετρος	16 mm
Κλίμακες Ισχύος	10W/5W/0.5W
Όριο ισχύος/cm^2	30KW/cm^2
Επίπεδο θορύβου	1 mW
Ακρίβεια	$\pm 3\%$
Χρόνος απόκρισης	0.8s
Κλίμακες Ενέργειας	2J/200mJ

5.5.1 Πειραματική διάταξη laser παραγωγής ελευθέρων ριζών

Η πειραματική διάταξη για την παραγωγή των ελευθέρων ριζών των δύο φθαλοκυανίνων παρουσιάζεται στο σχήμα 5.7. Η διάταξη αποτελείται από το διοδικό laser GCSLS -10 -1500m και ένα σύστημα ελέγχου της ισχύος εξόδου. Το μήκος κύματος του φωτός που εκπέμπει το laser είναι 660 nm. Στο laser είναι συνδεδεμένη μια οπτική ίνα η οποία στο άκρο της περιέχει διαχύτη. Η κυβέττα που περιέχει τα υπό ακτινοβολία διαλύματα των φθαλοκυανίνων, είναι τοποθετημένη σε σταθερή απόσταση από το άκρο της ίνας. Η ακτινοβολία πραγματοποιείται με ομοιογενή κατανομή του φωτός στο δείγμα. Η κυβέττα τοποθετήθηκε πάνω σε βάση η οποία αποτελείται από μαγνητικό αναδευτήρα που ενεργοποιεί μαγνήτη ο

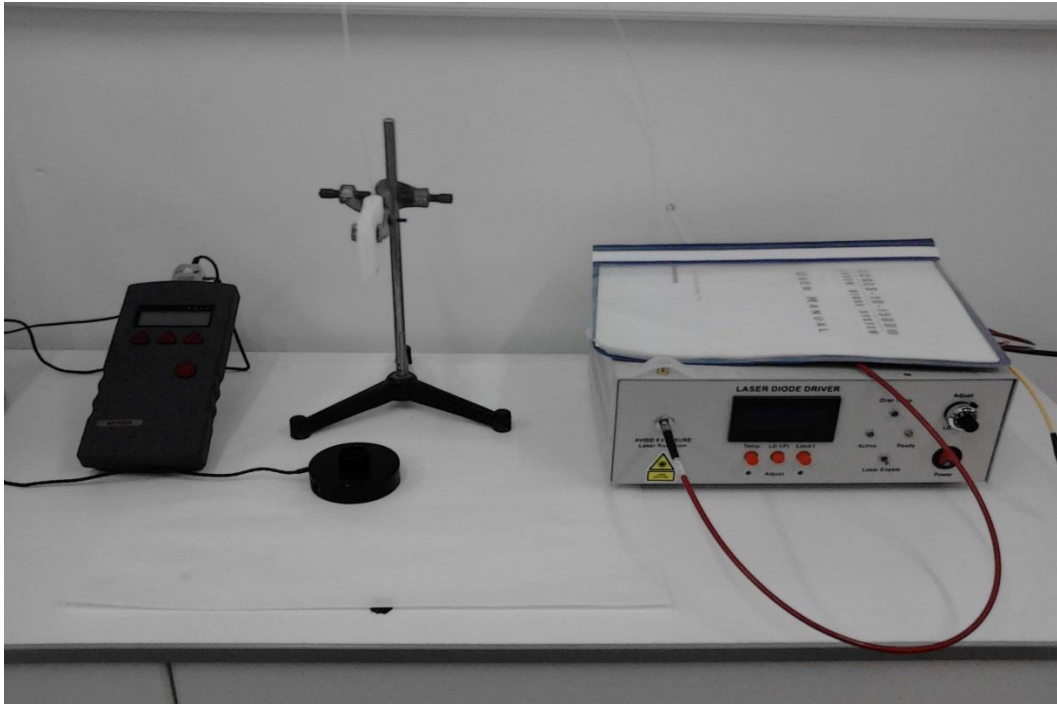
οποίος εισάγεται στο διάλυμα ώστε αυτό να αναδεύεται και να μην παρατηρούνται καθιζήσεις των παραγόμενων φωτοπροϊόντων.



Σχήμα 5. 7: Φωτογραφική απεικόνιση της διάταξης παραγωγής ελευθέρων ριζών που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο

5.5.2 Πειραματική διάταξη laser φωτοδυναμικής θεραπείας

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της φωτοδυναμικής θεραπείας αποτελείται από το ίδιο laser και το σύστημα μέτρησης της ισχύος. Η διάταξη είναι διαφορετική και δίνεται στο Σχήμα 5.9. Τα τριβλία ακτινοβολούνται ανά τριάδες και το μέγεθος του αποτυπώματος του laser ρυθμίζεται ώστε να περιέχονται σε αυτό όλα τα τριβλία. Και εδώ η ακτινοβολήση πραγματοποιείται με ομοιογενή κατανομή του φωτός στα δείγματα.



Σχήμα 5. 8: Φωτογραφική απεικόνιση της διάταξης της φωτοδυναμικής θεραπείας που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ

6.1 Μεθοδολογία απόψυξης κυτταρικής σειράς LNCaP

Για την καλλιέργεια των καρκινικών κυττάρων LNCaP χρησιμοποιείται πλήρες θρεπτικό μέσο (ΠΘΜ), δηλαδή θρεπτικό μέσο RPMI 1640, (LGC Standards), εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοδιού FBS (Invitrogen) και 0.1% Antibiotic-Antimitotic (Gibco).

Τα LNCaP κύτταρα διατηρούνται σε ειδικά φιαλίδια κρυοδιατήρησης (σε 1 ml πλήρους θρεπτικού μέσου με 50 μl DMSO) κατεψυγμένα σε υγρό άζωτο μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Το φιαλίδιο με τα κατεψυγμένα κύτταρα αφήνεται στον κλίβανο επώασης για περίπου 5 min μέχρις ότου ξεπαγώσει. Αμέσως μόλις ξεπαγώσει το περιεχόμενο του φιαλιδίου ξεπλένεται με διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος PBS εμπλουτισμένο με 10% FBS. Στη συνέχεια το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 1200 rpm για 7 min. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και γίνεται πολύ καλό pipetting με τη χρήση πλήρους θρεπτικού μέσου ώστε να σπάσουν τα συσσωματώματα των κυττάρων που προέκυψαν από τη φυγοκέντρηση και να προκύψουν μεμονωμένα κύτταρα. Στη συνέχεια τα κύτταρα τοποθετούνται σε φλάσκα (Corning) των 25cm² η οποία περιέχει πλήρες θρεπτικό μέσο. Τέλος, ελέγχεται η φλάσκα στο οπτικό μικροσκόπιο και αφήνεται στον κλίβανο να επωαστεί για τουλάχιστον 24h χωρίς να κουνηθεί, καθώς με οποιαδήποτε κίνηση της φλάσκας δημιουργούνται συσσωματώματα και δεν αναπτύσσονται τα κύτταρα.

6.2 Μεθοδολογία ανακαλλιέργειας κυτταρικής σειράς LNCaP.

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται όταν η πληρότητα σε κύτταρα στην επιφάνεια της φλάσκας υπερβαίνει το 70%. Η διαδικασία ανακαλλιέργειας έχει ως εξής: Αρχικά αφαιρείται το πλήρες θρεπτικό μέσο από το εσωτερικό της φλάσκας πολύ προσεκτικά ώστε να μην αποκολληθούν τα κύτταρα και γίνονται με προσοχή δύο ξεπλύματα με διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος PBS εμπλουτισμένο με αντιβιοτικό (1ml κάθε φορά). Μέσω του ξεπλύματος απομακρύνονται πιθανά αιωρούμενα συσσωματώματα που έχουν αποκολληθεί και τα οποία μπορεί να μολύνουν την καλλιέργεια σε επόμενο στάδιο. Ακολούθως εισάγεται 1ml από το ένζυμο τρυψίνη (Trypsin – EDTA solution, Sigma) το οποίο προκαλεί την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας. Η παραμονή της τρυψίνης δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 2-3 λεπτά γιατί προκαλεί τοξικότητα στα κύτταρα. Μετά το πέρας του χρόνου αυτού παρατηρείται στο μικροσκόπιο η αποκόλληση των κυττάρων. Όταν αυτά έχουν αποκολληθεί, τότε προστίθενται συνολικά 5ml διαλύματος αναστολής της τρυψίνης ώστε να ανασταλλεί η δράση της. Το διάλυμα αυτό περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα PBS εμπλουτισμένο με 10% FBS και εισάγεται σε δύο δόσεις ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή συλλογή των κυττάρων από τη φλάσκα. Το διάλυμα με τα κύτταρα μετά τη συλλογή του, εισάγεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και ακολουθεί η φυγοκέντρησή του για 7 min

στις 1200 grm. Το υπερκείμενο διάλυμα από κάθε σωλήνα απορρίπτεται και σε κάθε σωλήνα εισάγεται μικρή ποσότητα πλήρους θρεπτικού μέσου ώστε να πραγματοποιηθεί η συλλογή των κυττάρων έπειτα από ripetting. Τέλος μετά από πολύ καλό ripetting, τα κύτταρα εισάγονται σε μεγάλη φλάσκα 75cm^2 με 15 ml πλήρους θρεπτικού μέσου. Η φλάσκα παρατηρείται στο μικροσκόπιο και εισάγεται στον κλίβανο όπου ακολουθεί η επώαση των κυττάρων.

Σημείωση: Οι όγκοι των διαλυμάτων που περιγράφονται αναφέρονται σε κυτταρική καλλιέργεια εντός φλάσκας 25cm^2 . Για καλλιέργεια σε φλάσκες των 75cm^2 , οι όγκοι που χρησιμοποιούνται είναι τριπλάσιοι. Εξαιρείται το διάλυμα αναστολής της δράσης της τρυψίνης όπου ο όγκος του είναι διπλάσιος.

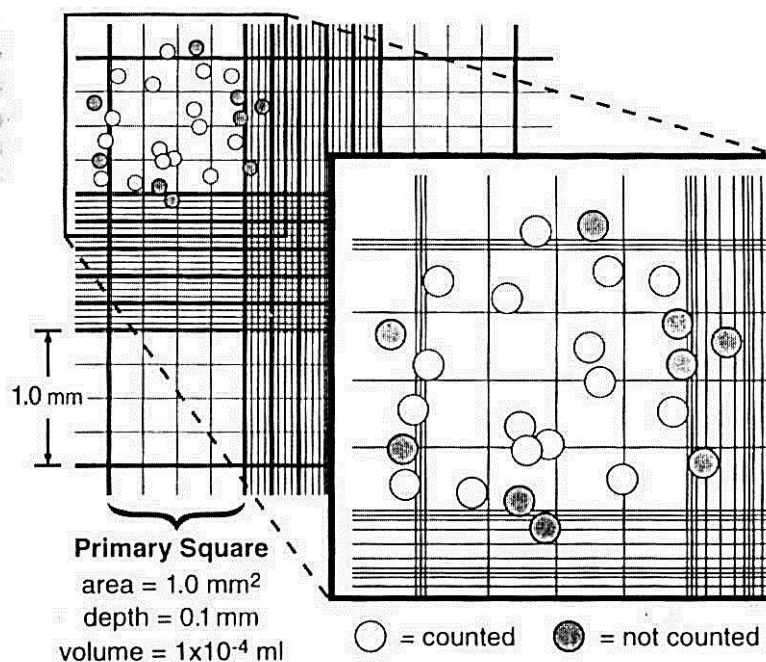
6.3 Μεθοδολογία κατάψυξης κυτταρικής σειράς LNCaP.

Η διατήρηση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα επιτυγχάνεται με την αποθήκευσή τους σε υγρό άζωτο όπου η θερμοκρασία ανέρχεται στους -196°C . Η κατάψυξη γίνεται σταδιακά ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός κρυστάλλων νερού στο εσωτερικό των κυττάρων και να ελαχιστοποιηθεί το σοκ που θα υποστούν τα κύτταρα από τη διαφορά θερμοκρασίας. Τα κύτταρα αφού αποκολληθούν από τη φλάσκα με τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγούμενα, μεταφέρονται σε κατάλληλο φιαλίδιο για διατήρηση σε υγρό άζωτο. Συνήθως ο αριθμός των κυττάρων που καταψύχονται σε κάθε φιαλίδιο είναι 5×10^6 κύτταρα σε 1 ml εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου. Σε κάθε φιαλίδιο προστίθενται 50 μl παράγοντα διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Το DMSO αποτρέπει το σχηματισμό κρυστάλλων νερού στο εσωτερικό των κυττάρων κατά την ψύξη. Με την προσθήκη DMSO ξεκινά άμεσα η διαδικασία της κατάψυξης ώστε να μην προκληθεί τοξικότητα στα κύτταρα στη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα η κατάψυξη γίνεται σταδιακά, έτσι το φιαλίδιο εισάγεται αρχικά σε υπερκαταψύκτη (-80°C) όπου και παραμένει για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Στη συνέχεια τοποθετείται σε δοχείο με υγρό άζωτο (-196°C) όπου και μπορεί να παραμείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα.

6.4 Μεθοδολογία μέτρησης κυτταρικού αριθμού στο μικροσκόπιο

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιείται με χρήση του αιματοκυτταρόμετρου (πλακίδιο) Neubauer (Σχήμα 6.1). Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Κάθε μια από αυτές έχει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm. Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2,5 μm, που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του εάν τα κύτταρα θα θεωρηθούν ότι βρίσκονται μέσα ή έξω από πλέγμα. Επίσης κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των

κυττάρων. Από τα 9 κύρια τετράγωνα, μόνο τα 4 που βρίσκονται στις γωνίες του τετράγωνου πλέγματος χρησιμοποιούνται για την μέτρηση των κυττάρων. Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0.1 mm χαμηλότερα από δύο «ράχες» στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια.



Σχήμα 6. 1: Πλακίδιο Neubauer

Για να διευκολυνθεί η διαδικασία της μέτρησης, λόγω του μεγάλου αριθμού κυττάρων περιέχονται στο ΠΘΜ, πραγματοποιείται αραιώση σε ένα μικρό και αντιπροσωπευτικό όγκο κυττάρων. Σε 50μl κυττάρων έγινε προσθήκη 200μl PBS (αραιώση 1 : 5). Αφού μετρηθούν τα κύτταρα που περιέχονται στα 4 τετράγωνα στα γωνίες του πλακιδίου, υπολογίζεται ο μέσος όρος των κυττάρων.

Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων προκύπτει ως εξής:

Συνολικός αριθμός κυττάρων = Μέσος όρος μετρούμενων κυττάρων x10.000 x αριθμός αραιώσης x αρχικός όγκος διαλύματος που περιέχονται τα κύτταρα.

6.5 Παρασκευή διαλύματος φωτοευαισθητοποιητή για την επώαση των κυττάρων.

Ο φωτοευαισθητοποιητής AICIPc βρίσκεται σε μορφή σκόνης. Για να είναι εφικτή η χρήση του, διαλύεται αρχικά σε 1,5 ml αιθανόλης και 0,5 ml DMSO σε συγκέντρωση $6 \times 10^{-4} \text{M}$. Η AICIPc διαλύεται σε μεγαλύτερη ποσότητα αιθανόλης ώστε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο τοξικότητας στα κύτταρα. Με κατάλληλη αραιώση του μητρικού διαλύματος με χρήση ΠΘΜ ως διαλύτη, προκύπτουν οι συγκεντρώσεις 0,5μM και 1μM της AICIPc στις οποίες πραγματοποιείται και η επώαση των κυττάρων.

6.6 Μεθοδολογία επώασης των κυττάρων με την ελεύθερη AICIPc.

Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκαν 5 διαφορετικοί χρόνοι επώασης 1, 3, 6, 24 και 48 ώρες με τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, 0,5μM και 1μM της ελεύθερης AICIPc. Για την διαδικασία της επώασης των κυττάρων για κάθε συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιητή και χρόνου επώασης χρησιμοποιείται μια φλάσκα των 25cm^2 . Αφού αφαιρεθεί το πλήρες θρεπτικό μέσο από τη φλάσκα και ξεπλυθεί, προστίθενται 5ml πλήρους θρεπτικού μέσου εμπλουτισμένου με την αντίστοιχη συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή. Οι φλάσκες αφήνονται στον κλίβανο για 1, 3, 6, 24 ή 48h. Όλες οι διαδικασίες μετά την εισαγωγή του φωτοευαισθητοποιητή πραγματοποιούνται καλύπτοντας τις φλάσκες με αλουμινόχαρτο ώστε να αποφευχθεί η διέγερση του φωτοευαισθητοποιητή από το φως. Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης των κυττάρων με τον φωτοευαισθητοποιητή ακολουθεί η εξαγωγή του από αυτά.

Σημείωση: Σε κάθε φλάσκα φροντίζουμε να έχουμε γνωστό αριθμό κυττάρων. Αυτός είναι 700000 κύτταρα/φλάσκα.

6.7 Μεθοδολογία εξαγωγής του φωτοευαισθητοποιητή από τα κύτταρα

Για να εξαχθεί ο φωτοευαισθητοποιητής από τα κύτταρα ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης απορρίπτεται το πλήρες θρεπτικό μέσο που περιέχει τον φωτοευαισθητοποιητή. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις, 1 ml ανά πλύση, με διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος PBS εμπλουτισμένο με 10% αντιβιοτικό. Ακολούθως αποκολλούνται τα κύτταρα με 1 ml τρυψίνη, προσθέτοντας μετά άλλα 5 ml διαλύματος αναστολής της τρυψίνης. Το υγρό με τα κύτταρα συλλέγεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες όπου και φυγοκεντρείται για 7 min στις 1200 rpm. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, απορρίπτεται το υπερκείμενο και ακολουθούν ακόμα 2 φυγοκεντρήσεις με 3 ml PBS. Αφού τελειώσουν οι φυγοκεντρήσεις, τα κύτταρα συλλέγονται σε 1 ml PBS, μετρούνται και

φυγοκεντρούνται για τελευταία φορά. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και στον δοκιμαστικό σωλήνα εισάγονται 3 ml διαλύματος λύσης των κυττάρων το οποίο αποτελείται από ισοπροπανόλη και 10% Triton X. Γίνεται πολύ καλό pipetting ώστε να διαλυθούν τα συσσωματώματα των κυττάρων και το διάλυμα λύσης να καταστρέψει την κυτταρική μεμβράνη ώστε να απελευθερωθεί ο φωτοευαισθητοποιητής. Τα διαλύματα αποθηκεύονται σε σκούρα μπουκαλάκια (για να αποφευχθεί η διέγερση της AICIPc) και σφραγίζονται με parafilm αφού η ισοπροπανόλη είναι αρκετά πτητική. Τέλος τοποθετούνται στο ψυγείο μέχρι να πραγματοποιηθεί η μέτρηση της έντασης φθορισμού.

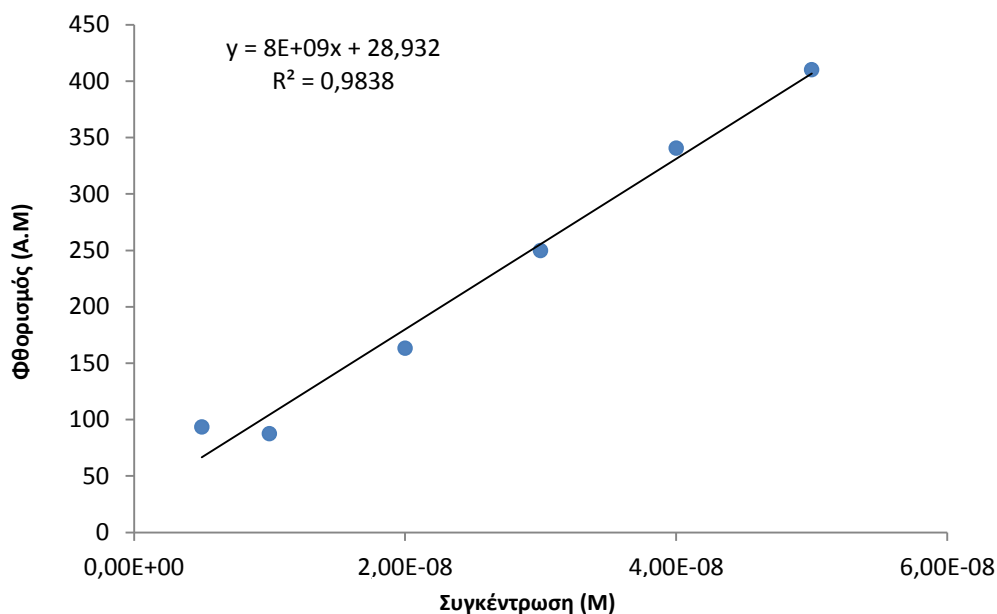
6.8 Διαδικασία ποσοτικοποίησης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή.

Για την διαδικασία ποσοτικοποίησης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή, αρχικά είναι αναγκαία η δημιουργία μιας καμπύλης αναφοράς συγκέντρωσης- έντασης φθορισμού της φθαλοκυανίνης.

6.8.1 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Για την δημιουργία της καμπύλης αναφοράς δημιουργούνται διαλύματα της φθαλοκυανίνης σε διαλύτη Ισοπροπανόλη- Triton X (10%) και στη συνέχεια μετράται ο φθορισμός αυτών. Για την παρούσα καμπύλη παρασκευάστηκαν διαλύματα που περιείχαν την φωτοευαίσθητη ουσία σε συγκεντρώσεις από 1×10^{-8} M έως 5×10^{-8} M. Η καμπύλη αναφοράς δίνεται στο Σχήμα 6.2.

Η καμπύλη αναφοράς είναι ιδιαίτερα σημαντική. Χάρη σε αυτήν, η ένταση φθορισμού που θα μετρηθεί από τα διαλύματα που έχουν προκύψει από την επώαση των κυττάρων με την φθαλοκυανίνη, θα αντιστοιχηθεί σε μία συγκεκριμένη συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή. Η συγκέντρωση αυτή αντιστοιχεί στην απορροφηθείσα συγκέντρωση της φθαλοκυανίνης από τα κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να προσδιοριστεί η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας.



Σχήμα 6. 2: Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης- έντασης φθορισμού της φθαλοκυανίνης.

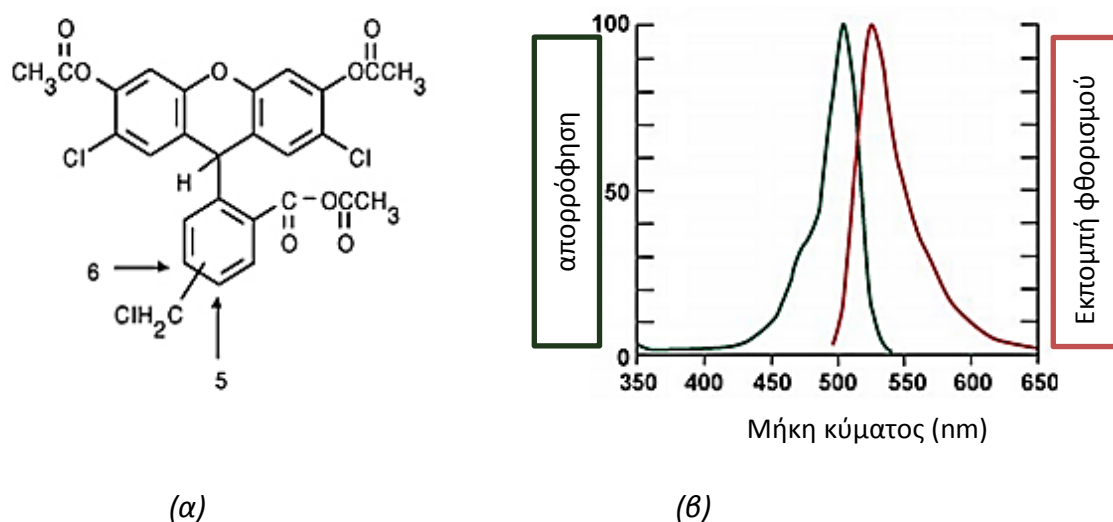
6.8.2 Ποσοτικοποίηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή.

Τα διαλύματα που προέκυψαν από την εξαγωγή του φωτοευαισθητοποιητή από τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 1200 rpm για 7 min. Στην συνέχεια συλλέγεται το υπερκείμενο αφού αυτό είναι το προς μέτρηση διάλυμα. Είναι σημαντικό σε κάθε διάλυμα που θα μετρηθεί η ένταση φθορισμού του, να υπάρχει η ίδια συνεισφορά κυττάρων. Έτσι σε κάθε διάλυμα υπολογίζεται συνεισφορά 30000 κυττάρων / ml σε 3 ml διαλύτη (ισοπροπανόλη και 10% Triton X). Σε κάθε διάλυμα μετράται η ένταση φθορισμού. Απαραίτητο είναι να μετρηθεί και ένα διάλυμα μόνο με τον διαλύτη για να εντοπιστεί τυχόν φθορισμός του και στη συνέχεια να αφαιρεθεί από την ένταση φθορισμού των διαλυμάτων που περιέχουν τον φωτοευαισθητοποιητή.

Η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης πραγματοποιείται ως εξής: Εφόσον βρισκόμαστε στην γραμμική περιοχή της έντασης φθορισμού, δηλαδή στην περιοχή όπου η ένταση έχει γραμμική σχέση με την συγκέντρωση, η ένταση του φθορισμού θα αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση. Από την καμπύλη αναφοράς και χρησιμοποιώντας της σχέση που περιγράφει την συγκεκριμένη γραμμική σχέση, $y = 8E+09x + 28,932$ υπολογίζεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της φθαλοκυανίνης στα κύτταρα.

6.9 Μέτρηση παραγωγής ελευθέρων ριζών των φωτοευαίσθητων ουσιών AlClPc και ZnPc με τη βοήθεια του ιχνηθέτη φθορισμού CM-H₂ DCFDA.

Στις πειραματικές μελέτες χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης φθορισμού η ουσία 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester, CM-H₂DCFDA, η οποία είναι ένα παράγωγο χλωρομεθυλίου της ουσίας H₂DCFDA (Σχήμα 6.2(α)). Η CM-H₂DCFDA έχει τη δυνατότητα να εισέρχεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου, να ανιχνεύει και να αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες στο εσωτερικό αυτού. Η H₂DCFDA, άρα και η CM-H₂DCFDA, δεν είναι φθορίζουσες ουσίες. Ενδοκυττάρια όμως, με τη βοήθεια των εστερασών, μπορούν να μετατραπούν σε ισχυρές φθορίζουσες ουσίες και έτσι να ανιχνευτούν.



Σχήμα 6. 3: (α): Ο ιχνηθέτης φθορισμού 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester,(CM-H₂DCFDA). (β): Φάσμα απορρόφησης και εκπομπής φθορισμού του ίδιου ιχνηθέτη.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, η ουσία δεν χρησιμοποιήθηκε σε κύτταρα αλλά σε διάλυμα φωτοευαίσθητοποιητή- ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Στην περίπτωση αυτή, πρέπει να πραγματοποιηθεί αρχικά η υδρόλυση του εστέρα με τη χρήση βάσης όπως το NaOH ώστε να μετατραπεί ο ιχνηθέτης φθορισμού στην φθορίζουσα μορφή του. Στη συνέχεια ακολούθησε η παρασκευή διαλυμάτων που περιείχαν την υδρολυμένη ουσία και γνωστές συγκεντρώσεις φθαλοκυανινών, διαλυμένα σε PBS. Το διάλυμα αυτό ακτινοβολήθηκε από διοδικό laser ώστε να διεγερθεί η φθαλοκυανίνη, να παραχθούν ελεύθερες ρίζες οι οποίες θα αντιδρούσαν με τον υδρολυμένο εστέρα, θα τον οξειδώσουν με αποτέλεσμα την αύξηση στο φθορισμό του ιχνηθέτη. Τέλος συλλέχθηκαν τα φάσματα φθορισμού των παραπάνω διαλυμάτων.

Η διέγερση της ουσίας πραγματοποιείται στα 490 nm με μήκη κύματος εκπομπής φθορισμού μεταξύ 510 nm-650 nm (Σχήμα 6.2(β)).

Η ακριβής πειραματική διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω και χωρίζεται σε 2 μέρη.

A) Παρασκευή των διαλυμάτων και B) Διαδικασία ακτινοβολήσης.

6.9.1 Παρασκευή των διαλυμάτων

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα μητρικά διαλύματα των φθαλοκυανίνων AlClPc και ZnPc. Το μητρικό διάλυμα της φθαλοκυανίνης ZnPc είχε συγκέντρωση 1.5×10^{-4} (0.0007 gr ZnPc σε 8 ml Dimethylformamide, (DMF)). Το μητρικό διάλυμα της φθαλοκυανίνης AlClPc παρασκευάστηκε διαλύοντας 0.0007 gr AlClPc σε 1,5 ml αιθανόλης και 0,5 ml DMSO δίνοντας συγκέντρωση 6×10^{-4} M.

Στη συνέχεια παρασκευάστηκε μητρικό διάλυμα της ουσίας CM- H_2 DCFDA συγκέντρωσης 0.87 μM (50 μg CM- H_2 DCFDA διαλύθηκαν σε 1 ml DMSO) το οποίο και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη αμέσως μετά την παρασκευή του. Ακολούθως παρασκευάστηκε το διάλυμα υδρόλυσής της. Για τον σκοπό αυτό διαλύθηκαν 1.6 gr NaOH σε 10 ml H_2O δίνοντας διάλυμα 4N. Επειδή η αντίδραση είναι εξώθερμη και υπάρχει κίνδυνος υπερθέρμανσης, η προσθήκη της στο H_2O πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Πρώτα διαλύθηκε σε 8 ml H_2O και μετά προστέθηκαν και τα υπόλοιπα 2 ml. Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, το διάλυμα αναδευόταν συνεχώς για να υπάρξει ομοιόμορφη κατανομή της θερμότητας.

Το επόμενο βήμα αφορούσε στην υδρόλυση της ουσίας από το NaOH. Για το σκοπό αυτό, 15 μl από το διάλυμα της CM- H_2 DCFDA σε DMSO και 5 μl από το διάλυμα υδρόλυσης (NaOH - H_2O) διαλύθηκαν σε 40 μl EtOH. Προέκυψε διάλυμα συγκέντρωσης 0,22 μM. Για να πραγματοποιηθεί η υδρόλυση του εστέρα το διάλυμα αφέθηκε σε σκοτεινό μέρος για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Τελικό βήμα ήταν η παρασκευή του διαλύματος ακτινοβολήσης το οποίο περιείχε 35 μl από την υδρολυμένη ποσότητα του εστέρα μαζί με 100 μl από τα διαλύματα των φθαλοκυανίνων με συγκέντρωση 5×10^{-5} M, διαλυμένα σε 2865 μl PBS. Το τελικό διάλυμα είχε όγκο 3 ml. Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι πολύ σημαντικό ο διαλύτης του διαλύματος που φωτοβολείται να είναι PBS. Αυτό ερμηνεύεται ως εξής: Στο διάλυμα υδρόλυσης του εστέρα περιέχονται OH^- , ρίζες οι οποίες πρέπει να «αδρανοποιηθούν» αφού ο εστέρας πρέπει να αντιδράσει μόνο με τις ελεύθερες ρίζες οι οποίες θα προκύψουν από την διέγερση της εκάστοτε φθαλοκυανίνης. Η «αδρανοποίηση» αυτών των ριζών πραγματοποιείται από το ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Αν δεν χρησιμοποιηθεί PBS, θα υπάρξει πολύ γρήγορα κορεσμός στο φάσμα φθορισμού της CM- H_2 DCFDA που θα οδηγήσει σε λάθος πειραματικά συμπεράσματα. Πέρα από τα διαλύματα των φθαλοκυανινών, παρασκευάστηκαν και διαλύματα αναφοράς που περιείχαν 35 μl CM- H_2 DCFDA σε 3 ml PBS.

6.9.2 Διαδικασία ακτινοβολήσης

Πριν από την έναρξη ακτινοβολήσης πάρθηκαν τα αρχικά φάσματα έντασης φθορισμού τόσο για τα διαλύματα των φθαλοκυανινών, όσο και για τα διαλύματα αναφοράς. Στην συνέχεια τα διαλύματα ακτινοβολούνταν με ακτινοβολία ισχύος 10 mW/cm^2 για συνολικά 10 λεπτά. Κάθε ένα λεπτό, η ακτινοβολήση σταματούσε και παίρνονταν το αντίστοιχο φάσμα έντασης φθορισμού. Το μήκος κύματος του φωτός ακτινοβολήσης που χρησιμοποιείται είναι 660 nm. Τέλος η ακτινοβολήση έγινε με ομοιογενή κατανομή του φωτός στο δείγμα.

6.10 Επώαση κυττάρων LNCaP σε τριβλία με πλήρες θρεπτικό μέσο

Η διαδικασία που ακολουθείται για την επώαση των κυττάρων στα τριβλία αναφέρεται παρακάτω:

Αρχικά πραγματοποιείται η συλλογή των κυττάρων μιας φλάσκας με τη συνήθη διαδικασία. Στη συνέχεια ακολουθεί η μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο και εισάγονται σε κάθε τριβλίο 200.000 κύτταρα. Το κάθε τριβλίο θα περιέχει συνολικά 2,5ml πλήρους θρεπτικού μέσου με κύτταρα. Για να επιτευχθεί ικανοποιητική διασπορά των κυττάρων στην επιφάνεια του τριβλίου αρχικά εισάγεται ένα μέρος πλήρους θρεπτικού μέσου και στη συνέχεια η υπόλοιπη ποσότητα του πλήρους θρεπτικού μέσου που περιέχει τα κύτταρα. Τέλος ελέγχεται η διασπορά των κυττάρων ενδεικτικά σε μερικά από τα τριβλία με χρήση του μικροσκοπίου και όλα τα τριβλία εισάγονται στον κλίβανο όπου παραμένουν για επώαση μία ημέρα (24h).

6.11 Πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας - βιοχημικός έλεγχος MTT

Για τη μέτρηση της βιωσιμότητας ή του αριθμού των κυττάρων χρησιμοποιείται ευρέως ο βιοχημικός έλεγχος βιωσιμότητας MTT (3-(4,5-διμεθυλοδιαζόλη-2)-2,5-διφαινυλοτετραζολικού βρωμιδίου bromide, Sigma).

Το αντιδραστήριο MTT χρωματίζει μόνο τα υγιή κύτταρα ή κύτταρα τα οποία βρίσκονται στα πρώτα στάδια της απόπτωσης. Πιο συγκεκριμένα, οι μιτοχονδριακές δεϋδρογενάσες των ζώντων κυττάρων αντιδρούν με το MTT και σχηματίζουν μωβ κρυστάλλους formazan. Οι κρύσταλλοι αυτοί διαλύονται σε οξιμισμένη ισοπροπανόλη δίνοντας ένα μωβ διάλυμα, του οποίου η απορρόφηση μετράται φωτομετρικά στα 550 – 570 nm. Τα νεκρά κύτταρα δεν έχουν μιτοχονδριακή δραστηριότητα και άρα δεν μπορούν να παράξουν κρυστάλλους formazan.

Το πρωτόκολλο εφαρμογής του ελέγχου MTT είναι το εξής: Αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα της χρωστικής MTT το οποίο αποτελείται από 5 mg σκόνης MTT διαλυμένα σε 1 ml PBS. Από αυτό, σε κάθε τριβλίο εισάγονται 130 μl αραιωμένα σε 1170 μl PBS αφού πριν αφαιρεθεί το ΠΘΜ που περιέχεται σε αυτά. Τα τριβλία παραμένουν στον κλίβανο για επώαση για χρονικό διάστημα τριών

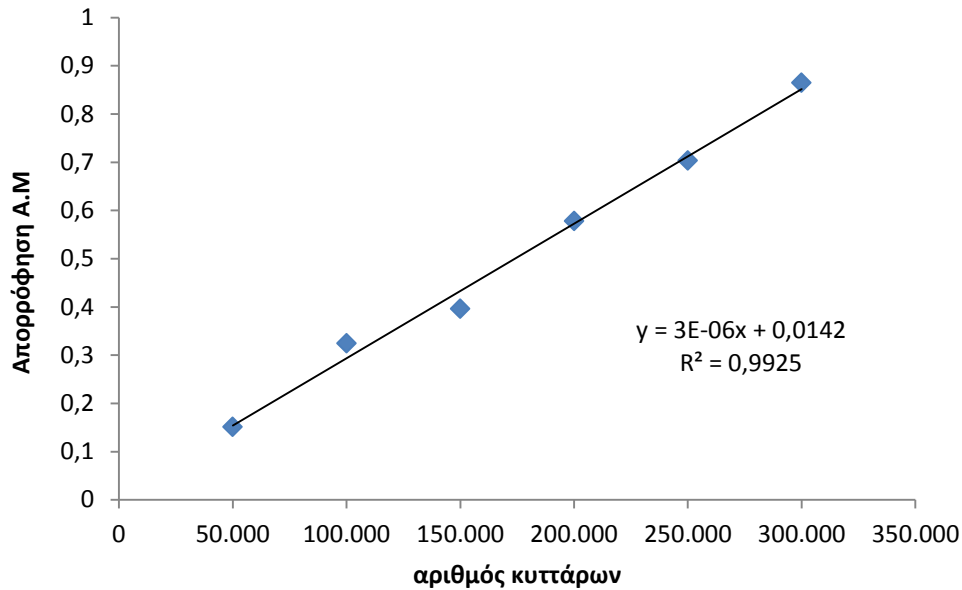
ωρών. Με το πέρας της επώασης και αφού εξαχθούν τα τριβλία από τον κλίβανο, είναι εμφανής ο σχηματισμός των μωβ κρυστάλλων που αναφέρθηκαν παραπάνω. Ο χρωματισμός αυτός (μακροσκοπικά) αποτελεί δείκτη της βιωσιμότητας των κυττάρων στο τριβλίο. Όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση του χρώματος, τόσο το επίπεδο βιωσιμότητας των κυττάρων παραμένει υψηλό. Στη συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό από τα τριβλία το οποίο φυγοκεντρείται για 7 λεπτά στις 1200 rpm. Μετά την φυγοκέντρησή του, αφού απορριφθεί το υπερκείμενο, εισάγεται 1 ml διαλύτη στο κυτταρικό ίζημα ώστε να λυθούν τα κύτταρα. Επίσης εισάγεται 1 ml διαλύτη και στα κύτταρα που έχουν παραμείνει κολλημένα σε κάθε τριβλίο. Τέλος έπειτα από ελαφρύ pipetting εντός τριβλίου, πραγματοποιείται η συλλογή των λυμένων κυττάρων στα σωληνάκια. Αυτά επικαλύπτονται με parafilm και αποθηκεύονται εντός ψυγείου μέχρι την μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο.

Σημείωση: Ο διαλύτης του MTT που χρησιμοποιείται για την λύση των κυττάρων αποτελείται από 89.178 ml ισοπροπανόλη, 10 ml Triton X και 0.822 ml HCl.

Πριν την συλλογή των φασμάτων απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο, τα σωληνάκια φυγοκεντρούνται για 7 λεπτά στις 1200 rpm. Το υπερκείμενο εισάγεται στην κυψελίδα (ο όγκος του υγρού είναι περίπου 2 ml) ενώ προστίθεται ακόμα 1 ml διαλύτη MTT. Τα φάσματα που συλλέγονται περιλαμβάνουν μήκη κύματος από 350 έως 700 nm. Από κάθε φάσμα αφαιρείται η απορρόφηση στα 690 nm (θόρυβος υποβάθρου) από την απορρόφηση στα 565nm (μέγιστο απορρόφησης των κρυστάλλων formazan). Για να είναι εφικτή η επαναληψιμότητα των μετρήσεων και για να μπορεί να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων είναι ιδιαίτερα σημαντικό να διατηρούνται σταθερές οι συνθήκες της μεθόδου.

Αναγκαία είναι η καμπύλη βαθμονόμησης MTT. Πρόκειται ουσιαστικά για την καμπύλη αναφοράς απορρόφησης – αριθμού κυττάρων όπου χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί ο αριθμός των κυττάρων που έχουν επιβιώσει από τις διάφορες διεργασίες.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την κατασκευή της καμπύλης ήταν η εξής: Γνωστός αριθμός κυττάρων κάθε φορά τοποθετήθηκε σε τριβλία για επώαση 24 ωρών. Συγκεκριμένα ετοιμάστηκαν τριβλία των 50000, 100000, 150000, 200000, 250000 και 300000 κυττάρων. Μετά το τέλος της επώασης εφαρμόστηκε ο έλεγχος MTT και μετρήθηκε η απορρόφηση με το φασματοφωτόμετρο. Τέλος κατασκευάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης απορρόφηση - αριθμού κυττάρων η οποία παρουσιάζεται παρακάτω.



Σχήμα 6. 4: Καμπύλη βαθμονόμησης βιοχημικού ελέγχου εκτίμησης βιωσιμότητας MTT

Παίρνοντας το μέγιστο της έντασης απορρόφησης από το κάθε φάσμα και χρησιμοποιώντας την μαθηματική σχέση της γραφικής παράστασης, $y = 3E-06x + 0,0142$ υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων που έχουν επιβιώσει από την κάθε διεργασία.

6.11 Πρωτόκολλο μελέτης επίδρασης της ελεύθερης AICIPc στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μελέτη της Φωτοδυναμικής Θεραπείας με την χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη, κρίθηκε αναγκαίο να εξασφαλιστεί ότι ο φωτοευαισθητοποιητής σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, δεν ήταν τοξικός στα κύτταρα. Δηλαδή, ότι ο φωτοευαισθητοποιητής στις συγκεντρώσεις αυτές δεν επάγει κυτταρικό θάνατο απουσία φωτός διέγερσης. Για το λόγο αυτό τα κύτταρα της καρκινικής σειράς LNCaP, επώαστηκαν με μια σειρά συγκεκριμένων συγκεντρώσεων AICIPc και μετρήθηκε η βιωσιμότητά τους με το βιοχημικό έλεγχο μέτρησης βιωσιμότητας MTT.

Η διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Με διαδοχικές αραιώσεις του μητρικού διαλύματος σε πλήρες θρεπτικό μέσο, προέκυπταν τα διαλύματα πλήρους θρεπτικού μέσου-φωτοευαισθητοποιητή με τα οποία επωάζονταν τα κύτταρα.

Συγκεκριμένα πριν την εισαγωγή του διαλύματος επώασης, από τα τριβλία που περιείχαν τα κύτταρα απορρίφθηκε το παλιό θρεπτικό μέσο και πραγματοποιήθηκε μια πλύση με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS εμπλουτισμένο με αντιβιοτικό. Στη

συνέχεια προστέθηκε το πλήρες θρεπτικό μέσο που περιείχε τον φωτοευαισθητοποιητή. Συγκεκριμένα τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με 1μM, 2μM και 3μM ελεύθερης AICIPc. Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης, απορρίφθηκε το πλήρες θρεπτικό μέσο με τον φωτοευαισθητοποιητή και εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο του βιοχημικού ελέγχου μέτρησης βιωσιμότητας MTT με στόχο την εκτίμηση της κυτταρικής θνησιμότητας που προκαλείται από την επώαση με τον φωτοευαισθητοποιητή. Σε κάθε συνθήκη αντιστοιχούσαν 3 τριβλία για λόγους επαναληψιμότητας.

6.12 Πρωτόκολλο μελέτης επίδρασης φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Η κυτταροτοξικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας οφείλεται στον συνδυασμό τριών παραγόντων, του φωτός, του φωτοευαισθητοποιητή και του οξυγόνου. Ο κάθε ένας παράγοντας δεν θα πρέπει από μόνος του να είναι τοξικός. Εντοπίζοντας τις συγκεντρώσεις της φθαλοκυανίνης που δεν είναι τοξικές για τα κύτταρα, αναγκαίος είναι ο προσδιορισμός της κατάλληλης δόσης ενέργειας φωτός διέγερσης, ώστε και το φως να μην είναι από μόνο του καταστροφικό για τα κύτταρα.

Εκτός από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης σημαντικά μεγέθη αποτελούν ο ρυθμός ροής ισχύος ακτινοβολίας (fluence rate, mW/cm^2) και η συνολική δόση ενέργειας (total energy dose, mJ/cm^2). Ο ρυθμός ροής ισχύος ακτινοβολίας προκύπτει από την ισχύ της ακτινοβολίας διέγερσης στην έξοδο του διαχύτη στο άκρο της οπτικής ίνας η οποία μεταφέρει το φως διέγερσης διαιρούμενης με το εμβαδό της επιφάνειας του σένσορα στην επιφάνεια ακτινοβόλησης. Η συνολική δόση ενέργειας προκύπτει ως το γινόμενο της ακτινοβόλησης επί τη χρονική διάρκεια ακτινοβόλησης.

Η ισχύς φωτός διέγερσης στην έξοδο του διαχύτη της οπτικής ίνας ρυθμιζόταν ώστε η ροή ισχύς να είναι $3mW/cm^2$, $6mW/cm^2$ και $9mW/cm^2$. Ο χρόνος ακτινοβόλησης που ελέγχθηκε ήταν τα 60 sec. Επομένως οι συνολικές δόσεις ενέργειας ήταν 180, 360 και $540mJ/cm^2$.

Η πειραματική διαδικασία ακτινοβόλησης είχε ως εξής: Από τα τριβλία απορριπτόταν το πλήρες θρεπτικό μέσο και ακολουθούσε μια πλύση των κυττάρων με 1 ml ρυθμιστικό διάλυμα PBS εμπλουτισμένο με αντιβιοτικό. Στη συνέχεια για να προφυλαχτούν τα κύτταρα από την επίδραση του περιβάλλοντος 300 μl PBS προσθέτονταν στο τριβλίο. Ακολουθούσε η ακτινοβόληση των κυττάρων. Τέλος προσθέτονταν 2.2 ml πλήρες θρεπτικό μέσο στα τριβλία και τα κύτταρα επωάζονταν για 24h μέσα στον κλίβανο. Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης εφαρμόζονταν ο βιοχημικός έλεγχος βιωσιμότητας MTT. Σε κάθε συνθήκη αντιστοιχούσαν 3 τριβλία για λόγους επαναληψιμότητας.

6.13 Πρωτόκολλο μελέτης φωτοδυναμικής δράσης της ελεύθερης χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Προκειμένου να μελετηθεί η φωτοδυναμική δράση της AICIPc ακολουθήθηκε η εξής μεθοδολογία: LNCaP κύτταρα, 500000 κύτταρα/τριβλίο, επώαστηκαν για 24h σε τριβλία με εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο. Ακολούθως αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και στα κύτταρα προστέθηκε φρέσκο διάλυμα θρεπτικού μέσου – φωτοευαισθητοποιητή. Οι συγκεντρώσεις της ελεύθερης φθαλοκυανίνης ήταν 0.5μM και 1μM, οι οποίες προέκυψαν με διαδοχικές αραιώσεις του μητρικού διαλύματος, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Ο χρόνος επώασης με τον φωτοευαισθητοποιητή ήταν 24 h. Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης το διάλυμα επώασης απορριπτόταν και γίνονταν δυο πλύσεις των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα PBS εμπλουτισμένο με αντιβιοτικό, προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα φωτοευαισθητοποιητή – μέσου. Στη συνέχεια ελάχιστο PBS προσθέτονταν στα τριβλία (300μl) για να προστατεύσει τα κύτταρα από το στρες της έκθεση στο περιβάλλον και ακολουθούσε η ακτινοβόλησή τους, όπως περιγράφηκε προηγούμενα. Η ακτινοβόληση ήταν 6 mW/cm² και οι χρόνοι ακτινοβόλησης 60, 120, και 180 s, συνεπώς συνολικές δόσεις ενέργειας 360, 720 και 1080 mJ/cm² αντίστοιχα. Με το πέρας της ακτινοβόλησης φρέσκο εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο προσθέτονταν στα τριβλία και τα κύτταρα επέστρεφαν στον επωαστικό κλίβανο όπου και διατηρούνταν για 24 h. Κατόπιν ακολουθούσε η μέτρηση της βιωσιμότητας με τον βιοχημικό έλεγχο MTT. Σε κάθε συνθήκη αντιστοιχούσαν 3 τριβλία για λόγους επαναληψιμότητας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

7.1 Φωτοφυσικές μελέτες φωτοευαισθητοποιητή

7.1.1 Φάσματα απορρόφησης φωτοευαισθητοποιητή

Στο υποκεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των φωτοφυσικών μελετών της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης, AlClPc. Πρόκειται για φθαλοκυανίνη, η οποία είναι φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς και θεωρείται πιο αποτελεσματικός σε σχέση με τα παράγωγα της αιματοπορφυρίνης.

Στο πρώτο στάδιο των φωτοφυσικών μελετών της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης καταγράφονται τα φάσματα απορρόφησης της σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες, δύο οργανικούς, το δι-μεθυλ-σουλφοξείδιο (DMSO) και την αιθανόλη (EtOH) αλλά και σε ένα πολικό διαλύτη, το νερό (H_2O).

Για την μελέτη της συμπεριφοράς της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης στους διαλύτες, πρώτα παρασκευάστηκε μητρικό διάλυμα του φωτοευαισθητοποιητή σε DMSO, συγκέντρωσης 10^{-3} M. Το μητρικό αυτό διάλυμα φυλάχθηκε σε θερμοκρασία 4-8°C και σε απόλυτο σκοτάδι για να αποφευχθεί η διέγερση της ουσίας από το φως. Με βάση το διάλυμα αυτό και με συνεχείς αραιώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα φωτοευαισθητοποιητή σε DMSO συγκεντρώσεων 10^{-7} , 5×10^{-7} , 10^{-6} , 5×10^{-6} M. Επίσης παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 5×10^{-6} M σε αιθανόλη και νερό ώστε να πραγματοποιηθεί σύγκριση της απορρόφησης της φθαλοκυανίνης σε διαφορετικούς διαλύτες.

Τα φάσματα απορρόφησης καταγράφηκαν με χρήση της φασματοφωτομετρικής διάταξης απορρόφησης. Τα υπό μέτρηση διαλύματα, τοποθετούνταν σε πλαστικές κυβέττες απορρόφησης των 3 ml κατάλληλες για την σάρωση. Πριν την μέτρηση των διαλυμάτων, καταγραφόταν το φάσμα του εκάστοτε διαλύτη για την αποφυγή σφαλμάτων. Στη συνέχεια λαμβάνονταν τα φάσματα τόσο στην περιοχή του υπεριώδους όσο και στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (300-800 nm). Κατά τη διάρκεια όλων των μετρήσεων η ταχύτητα σάρωσης παρέμεινε σταθερή στα 480 nm/min με βήμα 1nm.

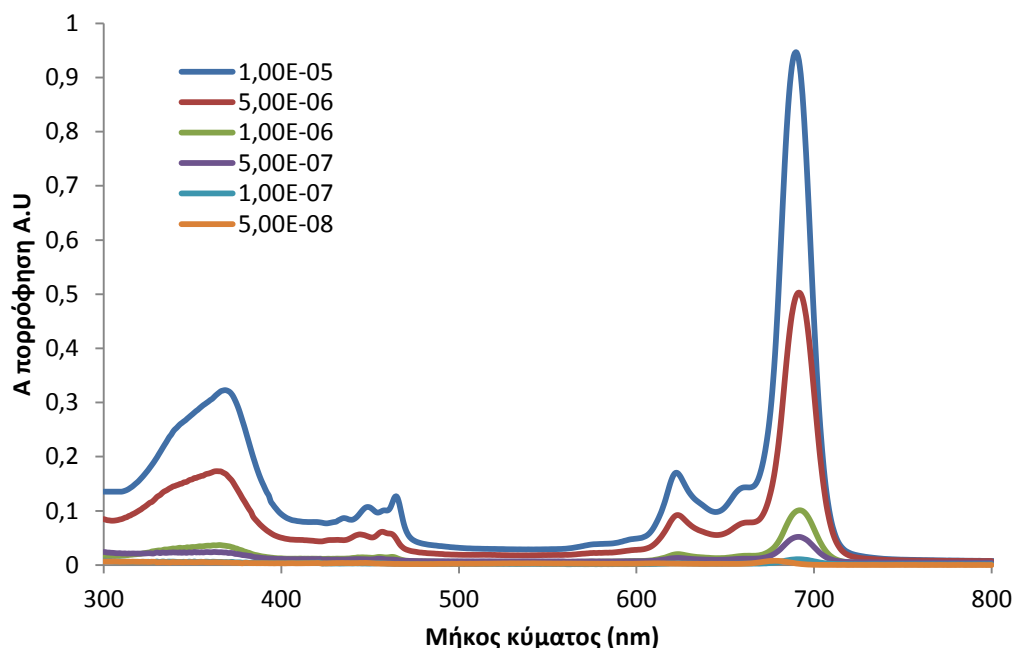
Η ακριβής διαδικασία περιγράφεται παρακάτω:

- ❖ Τοποθέτηση στο φασματοφωτόμετρο ενός ζεύγους όμοιων κυβεττών οι οποίες περιείχαν τον εκάστοτε διαλύτη ώστε να καταγραφεί το σήμα απορρόφησης του διαλύτη αλλά και του θορύβου του οργάνου.
- ❖ Λήψη του φάσματος του διαλύτη στην περιοχή μηκών κύματος από 300- 800 nm. Το φάσμα αυτό χρησιμοποιούταν κάθε φορά ως σήμα μηδενισμού.
- ❖ Αντικατάσταση της μιας κυβέττας που περιείχε το διαλύτη με αυτή που περιείχε το προς εξέταση διάλυμα.

- ❖ Σάρωση μεταξύ των μηκών κύματος που έχουν αναφερθεί παραπάνω ώστε να προκύψει το φάσμα απορρόφησης του διαλύματος.

Η διαδικασία επαναλαμβανόταν τρεις φορές για κάθε διάλυμα και τα τελικά φάσματα προέκυπταν από τον μέσο όρο της απορρόφησης του διαλύματος σε κάθε μήκος κύματος. Ακολουθούν τα αποτελέσματα.

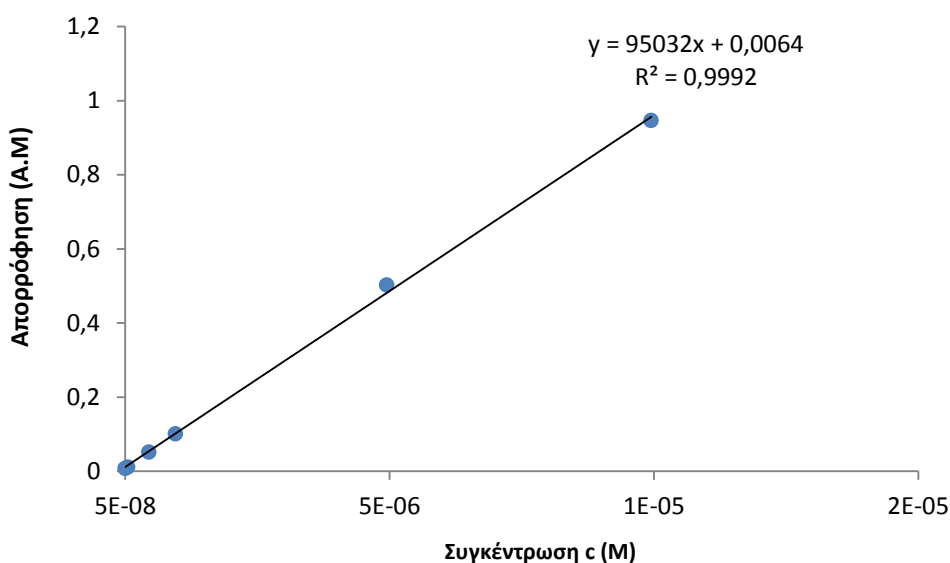
Αρχικά στο σχήμα 7.1 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης της φθαλοκυανίνης σε διαλύτη DMSO για διαφορετικές συγκεντρώσεις. Όπως προκύπτει από την γραφική παράσταση της έντασης της απορρόφησης συναρτήσει του μήκους κύματος της ακτινοβολίας, η ένταση της απορρόφησης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της φθαλοκυανίνης στο διάλυμα. Όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα, τόσο πιο έντονη απορρόφηση δίνει.



Σχήμα 7. 1: Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων AICIPc σε DMSO

Στη συνέχεια, στο σχήμα 7.2 δίνεται το διάγραμμα της έντασης απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης. Τα δύο μεγέθη χαρακτηρίζονται από γραμμική σχέση μεταξύ τους όπως προκύπτει και από τη γραμμική προσέγγιση ($R^2 = 0.9992$). Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του φωτοευαίσθητοποιητή στο διάλυμα, τόσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση. Αυτό προκύπτει και από το σχήμα 7.1 όπως έχει αναφερθεί παραπάνω. Από την καμπύλη και την μαθηματική σχέση που την περιγράφει, μπορεί να βρεθεί η συγκέντρωση της ουσίας σε άγνωστα διαλύματα αλλά το πιο σημαντικό, μπορεί να υπολογιστεί η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της φθαλοκυανίνης σε πειράματα επώασης κυττάρων με την ουσία. Επίσης από την

κλίση της καμπύλης και τον νόμο του Beer υπολογίζεται και το ϵ , ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης.

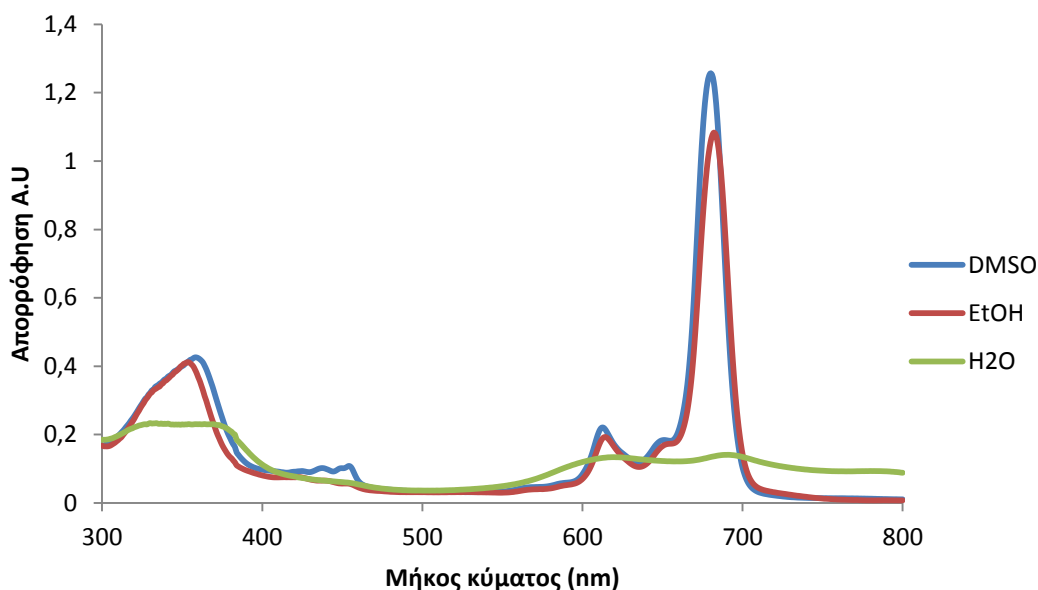


Σχήμα 7. 2: Διάγραμμα έντασης απορρόφησης- συγκέντρωσης της AICIPc

Ο νόμος του Beer δίνεται από τη σχέση $A=\epsilon \times b \times c$, όπου A η απορρόφηση της ουσίας (M) , ϵ ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης, c η συγκέντρωση του διαλύματος και b το πάχος της κυβέττας σε cm.

Τέλος το σχήμα 7.3 παρουσιάζει τα φάσματα απορρόφησης της φθαλοκυανίνης σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες, την αιθανόλη, το δι-μεθυλ-σουλφοξείδιο και το νερό. Η συγκέντρωση της AICIPc και στα τρία διαλύματα είναι σταθερή και ίση με 5×10^{-6} M.

Παρατηρώντας τα φάσματα και στους τρεις διαλύτες, προκύπτει ότι η φθαλοκυανίνη διατηρεί το χαρακτηριστικό της φάσμα μόνο στους οργανικούς διαλύτες. Στον πολικό διαλύτη, το νερό, η μορφή του φάσματος αλλάζει τελείως. Επίσης η ένταση της απορρόφησης της ουσίας εξαρτάται από τον διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένη ακόμα και όταν η συγκέντρωση των διαλυμάτων είναι ίδια.



Σχήμα 7. 3: Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων AICIPc συγκέντρωσης $5 \times 10^{-6} M$ σε DMSO, EtOH και H_2O

7.1.2 Συμπεράσματα που προκύπτουν από τα φάσματα απορρόφησης της φθαλοκυανίνης AICIPc.

Με βάση τα φάσματα απορρόφησης της AICIPc από το σχήμα 7.1 μπορούμε να εξαγάγουμε τα εξής συμπεράσματα. Όσον αφορά στην μορφολογία του φάσματος της φθαλοκυανίνης, η χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη παρουσιάζει τρεις κορυφές απορρόφησης. Οι δύο κορυφές σημειώνονται στην ορατή περιοχή της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Συγκεκριμένα η πιο υψηλή κορυφή εμφανίζεται στην περιοχή του ερυθρού γύρω στα 685 nm (Q-Band ή Soret band) και η δεύτερη στα 625 nm. Η τρίτη κορυφή εμφανίζεται στην περιοχή του υπεριώδους, στα 370 nm (B-Band). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι με βάση την θέση των κορυφών μπορούμε να επιλέξουμε το κατάλληλο μήκος της ακτινοβολίας με το οποίο θα ενεργοποιήσουμε την φθαλοκυανίνη στην φωτοδυναμική θεραπεία. Επίσης η ένταση της απορρόφησης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ουσίας στο διάλυμα.

Από τα φάσματα απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή στους τρεις διαφορετικούς διαλύτες (Σχήμα 7.3) μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι η μορφή του φάσματος απορρόφησης της φθαλοκυανίνης διαφέρει σημαντικά για οργανικούς και πολικούς διαλύτες. Έτσι, ενώ στους οργανικούς διαλύτες οι κορυφές απορρόφησης είναι ευκρινείς και έχουν μικρό πλάτος, στο νερό δεν ισχύει αυτό και οι κορυφές παρουσιάζονται διευρυμένες με μεγάλο πλάτος που φτάνει μέχρι και τα 100 nm. Η διαφορά αυτή οφείλεται στο φαινόμενο της συσσωμάτωσης (aggregation).

Η συσσωμάτωση είναι ένα μη επιθυμητό φαινόμενο το οποίο και εμφανίζεται όταν η ουσία διαλύεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε υδατικά διαλύματα. Όντας υδρόφοβος φωτοευαισθητοποιητής, η AICIPc όταν βρεθεί σε υδατικό περιβάλλον δημιουργεί συσσωματώματα και έτσι η τοπική συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα γίνεται αρκετές τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη σε σχέση με ένα ομοιογενές περιβάλλον. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τόσο την μείωση της απορρόφησης όσο και τη μείωση της αποδοτικότητας της ουσίας. Το φαινόμενο της συσσωμάτωσης είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του διαλύματος. Όσο πιο μικρές συγκεντρώσεις έχουμε, τόσο μειώνεται η συσσωμάτωση.

Όσον αφορά τα φάσματα της φθαλοκυανίνης στους δύο οργανικούς διαλύτες διαπιστώνεται ότι το φάσμα μπορεί να διατηρεί την χαρακτηριστική μορφή του, Όμως οι τρεις κορυφές απορρόφησης δεν εμφανίζονται στα ίδια μήκη κύματος αλλά υπάρχει μια μικρή μετατόπιση του φάσματος στην αιθανόλη σε σχέση με αυτό στο DMSO ενδεχομένως λόγω διαφοράς στο pH. Επίσης ανάλογα με τον διαλύτη που διαλύεται η ουσία, η ένταση της απορρόφησης για σταθερή συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή μεταβάλλεται. Έτσι στον διαλύτη DMSO η AICIPc παρουσιάζει μεγαλύτερη ένταση απορρόφησης σε σχέση με την αιθανόλη. Ακόμα ο πίνακας 7.1 δίνει τον μοριακό συντελεστή απορρόφησης και για τους τρεις διαλύτες στο μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης.

Πίνακας 7. 1: Μέγιστα απορρόφησης AICIPc συγκέντρωσης 5×10^{-6} M και οι αντίστοιχοι μοριακοί συντελεστές απορρόφησης στους τρεις διαφορετικούς διαλύτες.

AICIPc		
διαλύτης	λ_{max} (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)
DMSO	683	246000
EtOH	685	212000
H ₂ O	690	27510

Τέλος από το Σχήμα 7.3 φαίνεται ότι επαληθεύεται ο νόμος του Beer σύμφωνα με τον οποίο η ένταση της απορρόφησης μεταβάλλεται γραμμικά με την συγκέντρωση του διαλύματος. Η επαλήθευση του νόμου είναι πολύ σημαντική στα πειράματα καθώς αν δεν υπάρχει η γραμμική σχέση μεταξύ των δύο μεγεθών, δεν είναι εφικτός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της φθαλοκυανίνης σε άγνωστης συγκέντρωσης διαλύματα επομένως και ο υπολογισμός της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή σε πειράματα επώασης κυττάρων με αυτόν. Επίσης η γραμμικότητα αυτή αποδεικνύει την μη συσσωμάτωση της φθαλοκυανίνης στα υπό εξέταση διαλύματα.

7.1.3 Φάσματα φθορισμού φωτοευαισθητοποιητή

Για την περαιτέρω φωτοφυσική μελέτη της φθαλοκυανίνης ελήφθησαν και τα φάσματα φθορισμού της ουσίας σε DMSO. Για την λήψη των φασμάτων, τα διαλύματα μεταγγίζονταν σε κυβέττες φθορισμού των 3 ml και γινόταν μηδενισμός του σήματος λόγω του φθορισμού του διαλύτη αλλά και του θορύβου του οργάνου. Η ταχύτητα σάρωσης ήταν σταθερή στα 480 nm/min και το εύρος των μηκών κύματος από 600-710 nm.

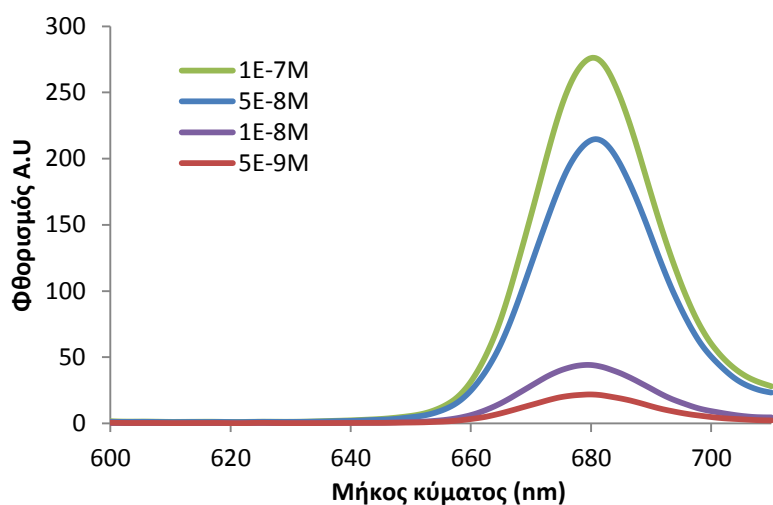
Βασική προϋπόθεση για την λήψη των φασμάτων ήταν η επιλογή του κατάλληλου μήκους κύματος διέγερσης της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης. Οι τρεις κορυφές απορρόφησης εμφανίζονται στα 691 nm, 625 nm και 370 nm. Άρα ένα από αυτά τα μήκη κύματος είναι το πιο κατάλληλο. Από τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- ❖ Η κορυφή φθορισμού παρουσιάζεται στα 680 nm.
- ❖ Τα 691 nm δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήκος κύματος διέγερσης γιατί βρίσκονται πολύ κοντά με την κορυφή φθορισμού και θα ήταν αδύνατος ο διαχωρισμός των σημάτων.

Επομένως επιλέξαμε για διέγερση το μήκος κύματος που αντιστοιχεί στην αμέσως μεγαλύτερη κορυφή απορρόφησης, δηλαδή τα 370 nm.

Για τους παραπάνω λόγους το μήκος κύματος που χρησιμοποιήθηκε για την διέγερση της φθαλοκυανίνης ήταν τα 370 nm.

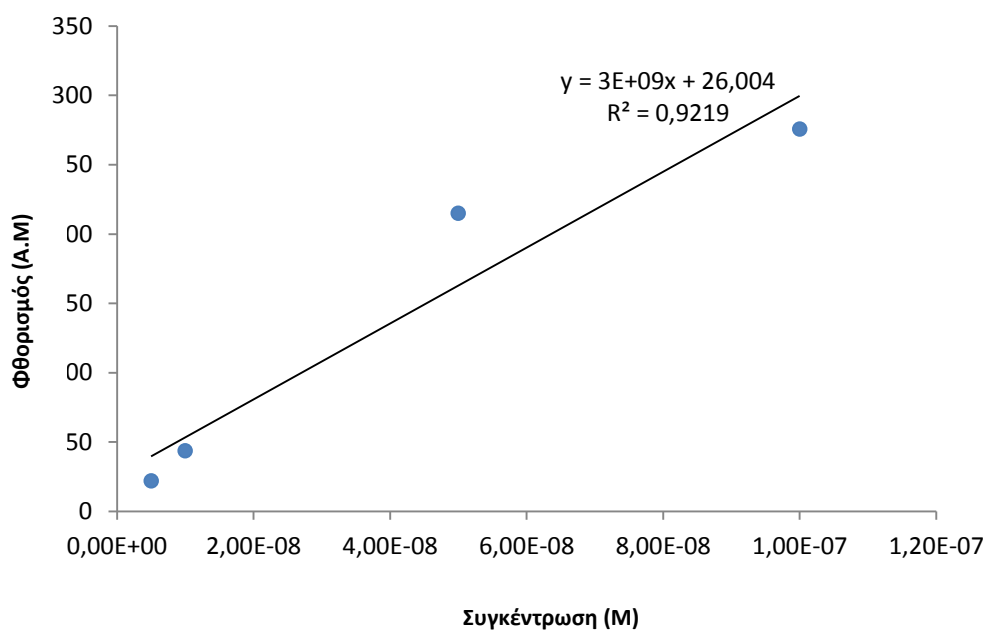
Με βάση το μητρικό διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-3} M σε διαλύτη DMSO και με συνεχείς αραιώσεις παρασκευάστηκαν τα υπό μέτρηση διαλύματα σε DMSO συγκεντρώσεων 10^{-7} , 5×10^{-8} , 10^{-8} και 5×10^{-9} M. Η διαδικασία επαναλαμβανόταν τρεις φορές για κάθε διάλυμα και τα τελικά φάσματα προέκυπταν από τον μέσο όρο της απορρόφησης του διαλύματος σε κάθε μήκος κύματος. Τα φάσματα φθορισμού δίνονται στο σχήμα 7.4.



Σχήμα 7. 4: Φάσματα έντασης φθορισμού της AIClPC με μήκος κύματος διέγερσης 370nm.

Όπως φαίνεται και στο σχήμα 7.4, η κορυφή του φθορισμού σημειώνεται στα 680 nm. Η φθαλοκυανίνη παρουσιάζει έντονο φθορισμό, ενώ ακόμα και στις πιο μικρές συγκεντρώσεις, όπως στα 5×10^{-9} M το σήμα του φθορισμού είναι ανιχνεύσιμο. Τέλος η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του φωτοευαίσθητοποιητή στο διάλυμα .

Στο σχήμα 7.5 δίνεται η γραφική παράσταση της έντασης φθορισμού σε σχέση με την συγκέντρωση της φθαλοκυανίνης. Η σχέση των δύο μεγεθών είναι γραμμική ($R^2 = 0.92$) για την περιοχή των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν.



Σχήμα 7. 5: Διάγραμμα έντασης φθορισμού- συγκέντρωσης της AIClPC

7.1.4. Συμπεράσματα που προκύπτουν από τα φάσματα φθορισμού της φθαλοκυανίνης AICIPc.

Συμπερασματικά από τα δύο διαγράμματα των σχημάτων 7.4 και 7.5 προκύπτουν τα εξής: το μέγιστο της έντασης φθορισμού για την χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη σημειώνεται στα 680 nm. Για το εύρος συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκε, το σήμα φθορισμού είναι γραμμικά ανάλογο της συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή. Κατά συνέπεια αντίστοιχα διαγράμματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καμπύλες αναφοράς στις *ex vivo* φαρμακοκινητικές μελέτες προκειμένου να προσδιορίσουν τη συγκέντρωση άγνωστων διαλυμάτων ή και την συγκέντρωση της φθαλοκυανίνης που έχει απορροφηθεί από τα κύτταρα. Συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10^{-6} M δεν χρησιμοποιήθηκαν καθώς παρουσιαζόταν κορεσμός στο φάσμα της έντασης φθορισμού. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η φθαλοκυανίνη δίνει υψηλό σήμα φθορισμού, επιτρέποντας την χρήση της ουσίας όχι μόνο ως φωτοευαισθητοποιητή στην φωτοδυναμική θεραπεία αλλά και στην φωτοδυναμική διάγνωση.

7.2 Μετρήσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών των φθαλοκυανίνων AICIPc και ZnPc.

Η φωτοδυναμική δράση του κάθε φωτοευαισθητοποιητή βασίζεται στην ικανότητά του να παράγει ελεύθερες ρίζες. Αναγκαία κρίνεται η μελέτη της ικανότητας της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης να παράγει ελεύθερες ρίζες αλλά και η σύγκρισή της με κάποια άλλη παρόμοια φωτοευαίσθητη ουσία. Ο φωτοευαισθητοποιητής που θα χρησιμοποιηθεί για την σύγκριση της AICIPc είναι η φθαλοκυανίνη ψευδαργύρου.

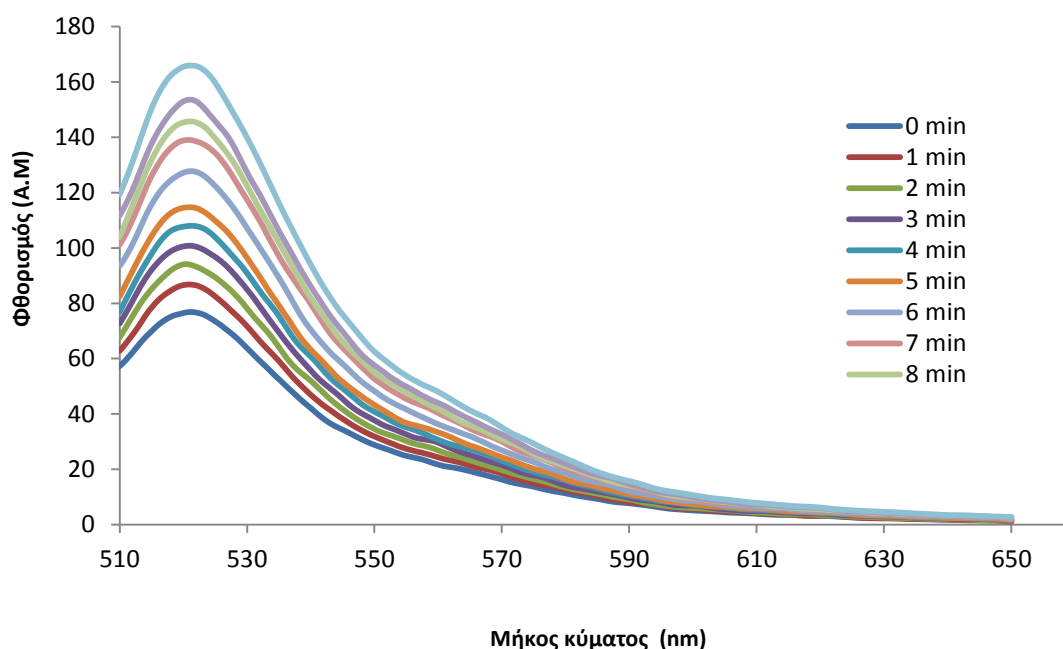
Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων παρασκευάστηκαν τρία διαφορετικά διαλύματα, τα οποία και ακτινοβολήθηκαν ανά ένα λεπτό κάθε φορά και για συνολική διάρκεια ακτινοβολήσης τα 10 λεπτά. Η ισχύς ακτινοβολήσης ήταν σταθερή στα 10 mW/cm^2 . Μετά από κάθε λεπτό λαμβανόταν το φάσμα φθορισμού της CM- H_2 DCFDA ώστε να καταγραφεί η παραγωγή ελευθέρων ριζών. Το ένα διάλυμα αποτελούσε το διάλυμα αναφοράς το οποίο περιείχε μόνο τον ιχνηθέτη φθορισμού (εστέρας) διαλυμένο σε PBS (35 μ l CM- H_2 DCFDA σε 3 ml PBS). Τα άλλα δύο διαλύματα περιείχαν 35 μ l CM- H_2 DCFDA + 100 ml AICIPc συγκέντρωσης 5×10^{-5} M /100 ml ZnPc συγκέντρωσης 5×10^{-5} M + 2900 μ l PBS αντίστοιχα.

Αρχικά πραγματοποιούταν η ακτινοβολήση και η καταγραφή των φασμάτων φθορισμού του διαλύματος αναφοράς ώστε να είναι γνωστή η ένταση φθορισμού του ιχνηθέτη σε κάθε λεπτό ακτινοβολήσης και να αναδειχθεί η επίδραση της ακτινοβολήσης στο φθορισμό του ιχνηθέτη φθορισμού. Ακολουθούσε η ακτινοβολήση και η καταγραφή φασμάτων φθορισμού των διαλυμάτων που περιείχαν τις φθαλοκυανίνες. Από το φάσμα φθορισμού της κάθε φθαλοκυανίνης

αφαιρούνται το αντίστοιχο φάσμα φθορισμού του εστέρα ώστε να προκύψει ο φθορισμός που οφειλόταν μόνο στην παραγωγή των ελευθέρων ριζών από τις φθαλοκυανίνες. Η συνολική διάρκεια της ακτινοβολήσης ήταν 10 λεπτά. Τα διαλύματα ακτινοβολούνταν στις κυβέττες φθορισμού. Ως μήκος κύματος διέγερσης επιλέχθηκαν τα 490 nm, μέγιστο απορρόφησης της CM-H₂DCFDA και η συλλογή του φάσματος πραγματοποιήθηκε μεταξύ 510 και 650 nm.

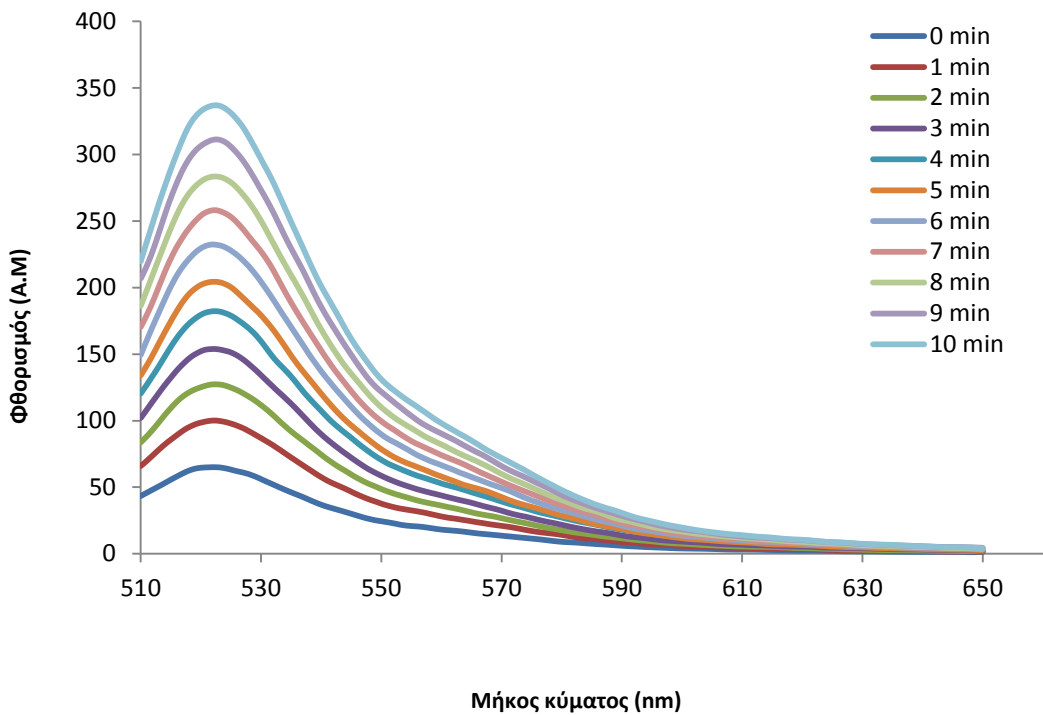
7.2.1 Αποτελέσματα μέτρησης παραγωγής ελευθέρων ριζών των δύο φθαλοκυανίνων.

Στο σχήμα 7.6 παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού της ουσίας CM-H₂DCFDA για τα 10 λεπτά της ακτινοβολήσης. Όπως προκύπτει από αυτό η ένταση φθορισμού του ιχνηθέτη αυξάνει όσο αυξάνεται ο χρόνος ακτινοβολήσης. Η αύξηση της έντασης φθορισμού όμως είναι αρκετά μικρή αφού μετά το πέρας των 10 λεπτών της ακτινοβολήσης ο φθορισμός έχει αυξηθεί μόλις κατά 90 A.M.

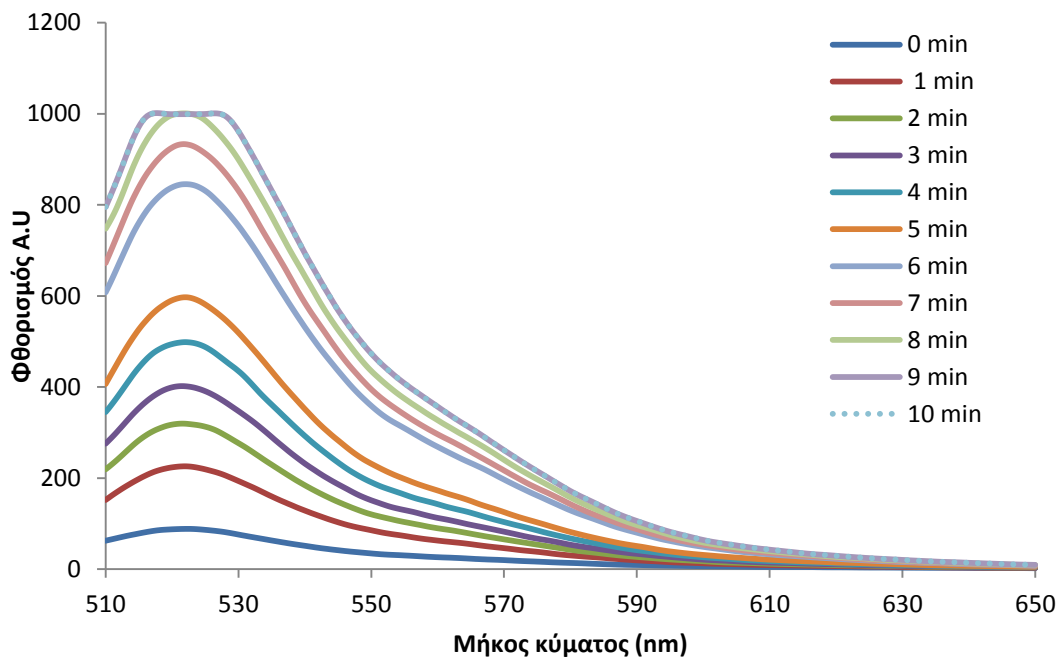


Σχήμα 7. 6: Φάσματα έντασης φθορισμού της ουσίας CM-H₂DCFDA στο διάλυμα αναφοράς για χρόνο ακτινοβολήσης 10 λεπτά

Στα σχήματα 7.7 και 7.8 δίνονται τα φάσματα φθορισμού της CM-H₂DCFDA μετά από ακτινοβολήση των διαλυμάτων των φθαλοκυανίνων και την παραγωγή ελευθέρων ριζών.



Σχήμα 7. 7: Φάσματα έντασης φθορισμού του διαλύματος $CM-H_2DCFDA - ZnPc$ για χρόνο ακτινοβολήσης 10 λεπτά



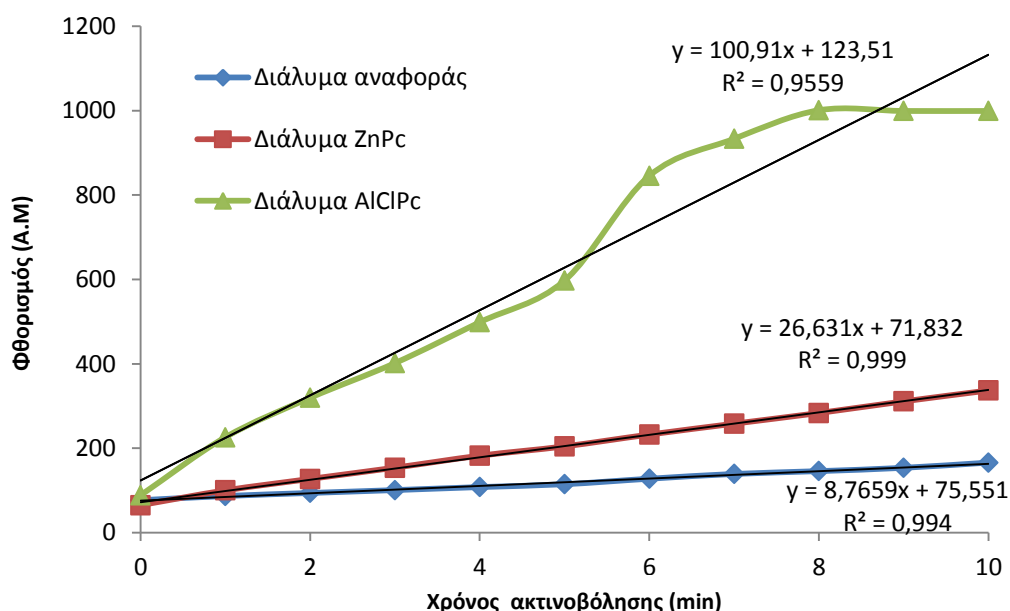
Σχήμα 7. 8: Φάσματα έντασης φθορισμού του διαλύματος $CM-H_2DCFDA - AlClPc$ για χρόνο ακτινοβολήσης 10 λεπτά

Όπως προκύπτει από τα δύο παραπάνω σχήματα και για τις δύο φθαλοκυανίνες παρουσιάζεται αύξηση της έντασης φθορισμού όσο αυξάνει ο χρόνος

ακτινοβόλησης. Αυτό οφείλεται στις ελεύθερες ρίζες οι οποίες παράγονται από την ακτινοβόληση των διαλυμάτων.

Αύξηση της έντασης φθορισμού παρατηρείται και για τις δύο φθαλοκυανίνες, ZnPc και AlClPc, σε σύγκριση με το διάλυμα αναφοράς. Τον μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης παρουσιάζει η AlClPc αφού από το πρώτο κίονας λεπτό της ακτινοβόλησης η ένταση φθορισμού είναι τριπλάσια αυτής χωρίς ακτινοβόληση ενώ το φάσμα παρουσιάζει κορεσμό από το ένατο λεπτό της ακτινοβόλησης και μετά. Η φθαλοκυανίνη ψευδαργύρου δεν παρουσιάζει τόσο έντονη αύξηση της έντασης φθορισμού αφού μετά από 10 λεπτά ακτινοβόλησης ο φθορισμός που παράγεται αντιστοιχεί σε φθορισμό της AlClPc για ακτινοβόληση 2 λεπτών.

Τέλος, το διάγραμμα του Σχήματος 7.9 παρουσιάζει τη σχέση έντασης φθορισμού-χρόνου ακτινοβόλησης και για τα τρία διαλύματα.



Σχήμα 7. 9: Διάγραμμα έντασης φθορισμού-χρόνου για τα 3 διαλύματα

Για το διάλυμα αναφοράς η αύξηση του φθορισμού είναι μικρή ενώ από το όγδοο λεπτό και μετά τείνει να σταθεροποιηθεί. Για την άλλη φθαλοκυανίνη ZnPc, ο φθορισμός αυξάνεται αλλά με μικρότερο ρυθμό σε σχέση με την χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη. Η σχέση μεταξύ των δύο μεγεθών, της έντασης φθορισμού και του χρόνου ακτινοβόλησης, φαίνεται να είναι γραμμική για την περίπτωση της ZnPc. Η ίδια γραμμική σχέση ισχύει και για την AlClPc αν και μετά το ένατο λεπτό της ακτινοβόλησης δεν μπορούμε να βγάλουμε κάποιο συμπέρασμα αφού παρουσιάζεται κορεσμός στο φάσμα της.

7.2.2 Συμπεράσματα ως προς την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Όπως αναμενόταν, η φωτοευαίσθητη ουσία CM- H_2 DCFDA παρουσιάζει φθορισμό χωρίς να ακτινοβοληθεί το διάλυμα στο οποίο περιέχεται (Σχήμα 7.6). Όταν ξεκινά η ακτινοβολή και για όσο χρονικό διάστημα διαρκεί, η ένταση του φθορισμού αυξάνεται με μικρό ρυθμό γεγονός το οποίο οφείλεται σε οξείδωση της ουσίας από το περιβάλλον. Αντίθετα στα διαλύματα που περιέχουν τις δύο φθαλοκυανίνες, η αύξηση της έντασης του φθορισμού είναι πιο έντονη καθώς ως γνωστό οι φθαλοκυανίνες μετά την ακτινοβολή τους με φως στα 660 nm παράγουν ελεύθερες ρίζες. Συγκρίνοντας τα φάσματα φθορισμού των δύο φθαλοκυανίνων, AICIPc και ZnPC (Σχήματα 7.7 και 7.8κ), παρατηρούμε ότι το διάλυμα της AICIPc παρουσιάζει πολύ πιο έντονο φθορισμό σε σχέση με την ZnPC. Η αύξηση της έντασης φθορισμού υποδηλώνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών από την φωτοευαίσθητη ουσία. Όσο μεγαλύτερος είναι ο ρυθμός αύξησης του φθορισμού τόσο περισσότερες ελεύθερες ρίζες παράγονται και τόσο καλύτερη φωτοδυναμική δράση παρουσιάζει ο φωτοευαισθητοποιητής. Από τις δύο φθαλοκυανίνες πιο δραστική αποδεικνύεται η χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη.

7.3 Μελέτες προσδιορισμού ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της AICIPc στα LNCaP κύτταρα.

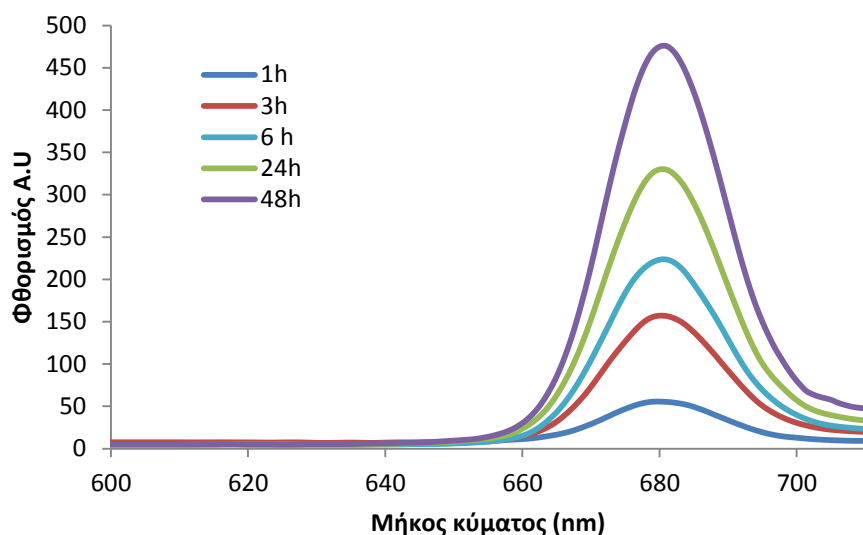
Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή εξαρτάται τόσο από την αρχική συγκέντρωση επώασης όσο και από τον χρόνο επώασης των κυττάρων με τον φωτοευαισθητοποιητή.

Τα κύτταρα LNCaP επώαστηκαν με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις της φθαλοκυανίνης για 1,3,6,24 και 48 ώρες. Οι αρχικές συγκεντρώσεις επώασης ήταν 0.5 μ M και 1 μ M. Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης εξήχθη ο φωτοευαισθητοποιητής από τα κύτταρα, όπως αναλυτικά περιγράφεται στην ενότητα 6.7 και έγινε μέτρηση του σήματος φθορισμού με τη φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού.

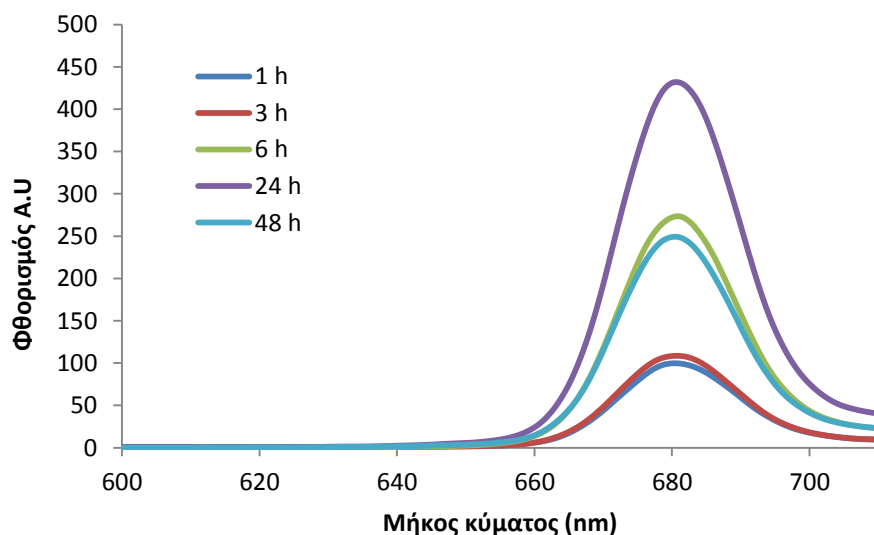
Κάθε διάλυμα μεταγγιζόταν σε κυβέττα φθορισμού των 3 ml. Η μέτρηση της έντασης φθορισμού με τη φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού γινόταν με διέγερση στα 370 nm και η συλλογή του φάσματος φθορισμού στα 600-710 nm. Η ταχύτητα της σάρωσης διατηρείτο σταθερή σε όλη τη διάρκεια των μετρήσεων και σε όλες τις πειραματικές συνθήκες στα 480 nm/min. Κάθε μέτρησης προηγείτο ο μηδενισμός του σήματος λόγω φθορισμού του διαλύτη καθώς και του θορύβου του οργάνου. Με τον τρόπο αυτό για κάθε συγκέντρωση επώασης προέκυπταν τα φάσματα έντασης φθορισμού ανάλογα με το χρόνο επώασης.

7.3.1 Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επώαστηκαν με την AICIPc για διαφορετικούς χρόνους επώασης

Τα φάσματα εκπομπής φθορισμού κυττάρων τα οποία επώαστηκαν με 0.5 μM και 1 μM AICIPc για 1,3,6,24 και 48 ώρες παρουσιάζονται αντίστοιχα στα Σχήματα 7.10 και 7.11.



Σχήμα 7. 10: Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επώαστηκαν με 0.5 μM AICIPc , για διαφορετικούς χρόνους επώασης με διέγερση στα 370 nm.



Σχήμα 7. 11: Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επώαστηκαν με 1 μM AICIPc , για διαφορετικούς χρόνους επώασης με διέγερση στα 370 nm.

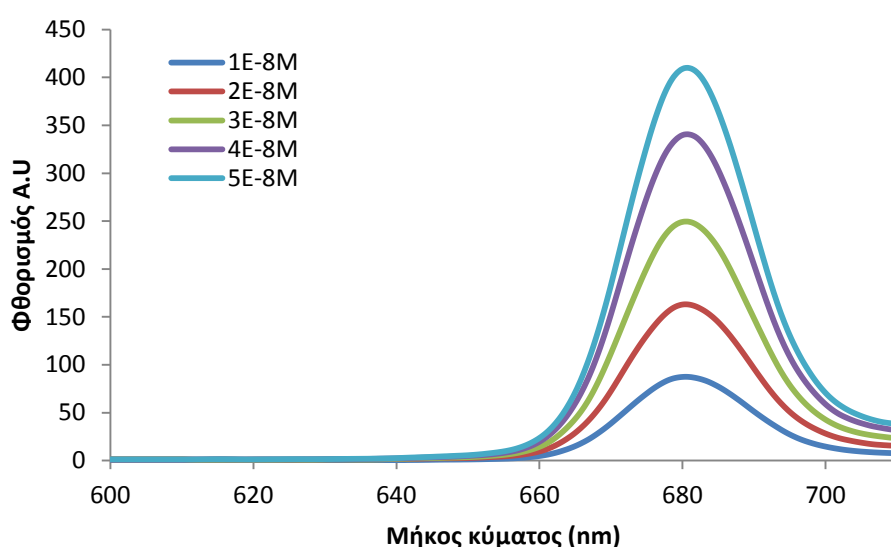
Όπως προκύπτει από αυτά, σε όλες τις πειραματικές συνθήκες τα φάσματα έντασης φθορισμού διατηρούν τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματος φθορισμού της AICIPc με μέγιστο εκπομπής φθορισμού στα 680 nm. Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης επώασης.

Από την επώαση των κυττάρων με την AICIPc συγκέντρωσης 0.5 μM (Σχήμα 7.10), παρατηρείται αύξηση της έντασης φθορισμού όσο μεγαλώνει ο χρόνος επώασης. Καθώς η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή συμπεραίνεται πως όλο και περισσότερη ποσότητα φθαλοκυανίνης απορροφάται από τα κύτταρα. Ακόμα και στις 48 ώρες, οι φωτοφυσικές ιδιότητες του φωτοευαισθητοποιητή διατηρούνται, δίνοντας μάλιστα υψηλό σήμα φθορισμού.

Όσον αφορά την επώαση με την φθαλοκυανίνη συγκέντρωσης 1 μM (Σχήμα 7.11), η ένταση του σήματος φθορισμού αυξάνεται καθώς ο χρόνος επώασης αυξάνεται από τη 1 ώρα μέχρι τις 24 ώρες. Περαιτέρω ωστόσο αύξηση του χρόνου επώασης, 48 ώρες, προκαλεί μείωση της έντασης του εκπεμπόμενου φθορισμού. Καθώς η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή συμπεραίνεται πως στις 48 ώρες λιγότερη ποσότητα φωτοευαισθητοποιητή ήταν συγκεντρωμένη στα κύτταρα σε σχέση με την επώαση διάρκειας 24 ωρών.

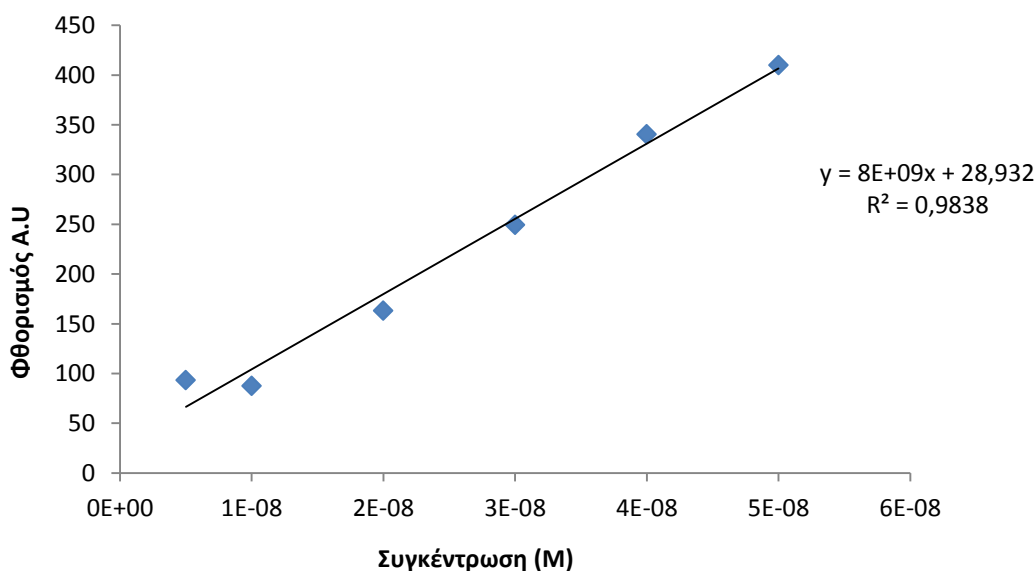
7.3.2 Αποτελέσματα υπολογισμού ενδοκυττάριας συγκέντρωσης AICIPc

Για τον υπολογισμό της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της φθαλοκυανίνης είναι αναγκαία η δημιουργία μιας καμπύλης αναφοράς μεταξύ της έντασης φθορισμού διαλυμάτων AICIPc και της συγκέντρωσης αυτών. Για την δημιουργία της καμπύλης αυτής παρασκευάστηκαν διαλύματα της φθαλοκυανίνης σε διαλύτη Ισοπροπανόλης- Triton X (10%) συγκεντρώσεων $1 \times 10^{-8}\text{M}$ έως $5 \times 10^{-8}\text{M}$. Πάρθηκαν τα φάσματα φθορισμού των διαλυμάτων (Σχήμα 7.12) και κατασκευάστηκε στη συνέχεια η ζητούμενη καμπύλη.



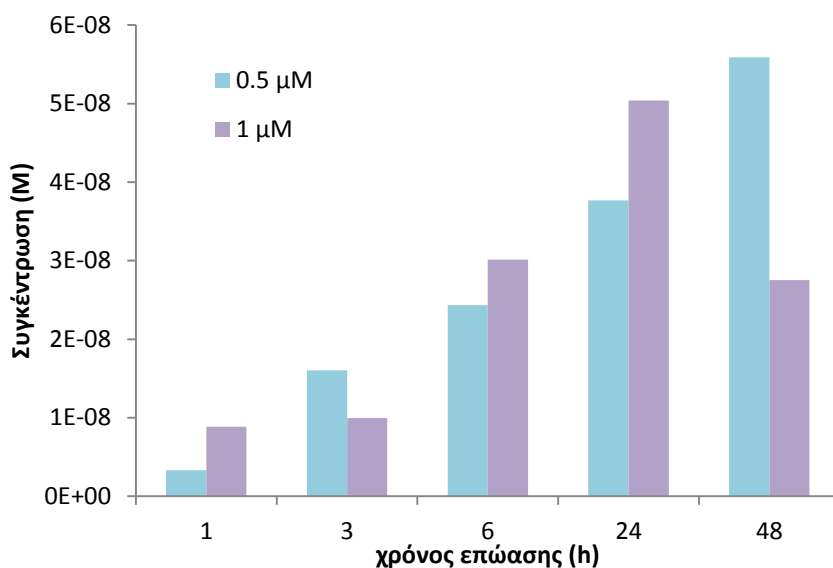
Σχήμα 7. 12: Φάσματα φθορισμού της φθαλοκυανίνης AICIPc σε διαλύτη ισοπροπανόλης- Triton X.

Παίρνοντας την μέγιστη ένταση φθορισμού στα 680 nm από το κάθε φάσμα του Σχήματος 7.12 και κάνοντας την γραφική παράσταση αυτής συναρτήσεως των αντίστοιχων συγκεντρώσεων δημιουργήθηκε η καμπύλη του Σχήματος 7.13.

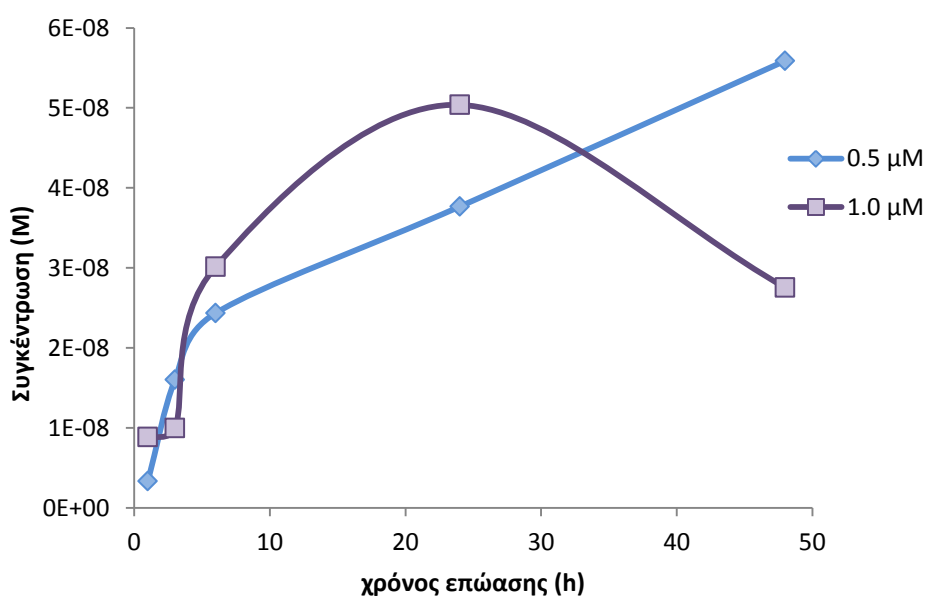


Σχήμα 7. 13: Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης- έντασης φθορισμού της AICIPc.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 7.13 είμαστε στην γραμμική περιοχή της συνάρτησης ένταση φθορισμού – συγκέντρωση ($R^2=0.9838$). Οπότε από την ένταση φθορισμού στα 680 nm των φασμάτων φθορισμού (Σχήματα 7.10 και 7.11) και την μαθηματική σχέση που περιγράφει την καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης της AICIPc (Σχήμα 7.13) μπορεί να υπολογιστεί η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της φθαλοκυανίνης για κάθε πειραματική συνθήκη. Βάση των τιμών που προέκυψαν, κατασκευάστηκαν τα παρακάτω διαγράμματα ενδοκυττάριας συγκέντρωσης AICIPc ως προς το χρόνο επώασης.



Σχήμα 7. 14: Ενδοκυττάρια συγκέντρωση AICIPc σε κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με 0.5 μM και 1 μM AICIPc για 1, 3, 6, 24 και 48 h.



Σχήμα 7. 15: Ενδοκυττάρια συγκέντρωση AICIPc σε κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με 0.5 μM και 1 μM AICIPc για 1, 3, 6, 24 και 48 h.

Από τα διαγράμματα των σχημάτων 7.14 και 7.15 επιβεβαιώνονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τα φάσματα φθορισμού.

Για την επώαση των κυττάρων με φθαλοκυανίνη συγκέντρωσης 0.5 μM, πράγματι παρατηρείται αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της ουσίας με την αύξηση του χρόνου επώασης. Η μέγιστη συγκέντρωση της AICIPc σημειώνεται στις 48 ώρες επώασης και είναι ίση με $5.6 \times 10^{-8} \text{M}$.

Η επώαση των κυττάρων με AICIPc συγκέντρωσης 1μM παρουσιάζει την μέγιστη ενδοκυττάρια συγκέντρωση στις 24 ώρες (5.04×10^{-8} M). Μετά από τις 24 ώρες η ενδοκυττάρια συγκέντρωση μειώνεται αρκετά, στα 2.8×10^{-8} M. Η μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης καθώς ο χρόνος επώασης ξεπερνά τις 24 ώρες μπορεί να οφείλεται τόσο σε αποβολή των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή από το κύτταρο όσο και σε συσσωμάτωση των μορίων της AICIPc ενδοκυττάρια με αποτέλεσμα να μειώνονται οι φωτοδυναμικές ιδιότητες του φωτοευαισθητοποιητή.

7.3.3 Συμπεράσματα

Από τις δύο συγκεντρώσεις της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης, αυτή των 0.5 μM παρουσιάζει καλύτερη απορρόφηση από τα καρκινικά κύτταρα αφού ακόμα και μετά από 48 ώρες επώασης των κυττάρων με αυτήν, ο φωτοευαισθητοποιητής ούτε αποβάλλεται από τα κύτταρα αλλά ούτε και δημιουργούνται συσσωματώματα της ουσίας ενδοκυττάρια. Επίσης το σήμα φθορισμού που δίνει είναι υψηλό και συγκρίσιμο με το σήμα φθορισμού της μεγαλύτερης συγκέντρωσης 1μM. Αυτό που έχει ιδιαίτερη σημασία είναι ότι η μικρότερη συγκέντρωση της φθαλοκυανίνης έχει την ικανότητα να προκαλέσει την ίδια ή ακόμα και καλύτερη φωτοδυναμική δράση σε σχέση με την υψηλότερη συγκέντρωση άρα μειώνεται ο κίνδυνος της παραμένουσας φωτοευαισθησίας.

Ψάχνοντας τον βέλτιστο χρόνο επώασης των κυττάρων στον οποίο θα πραγματοποιηθεί στην συνέχεια η φωτοδυναμική θεραπεία καταλήγουμε στα εξής: Οι χρόνοι επώασης των 1, 3 και 6 ωρών αποκλείονται γιατί δεν παρατηρείται σε αυτές η μέγιστη ενδοκυττάρια συγκέντρωση. Επίσης ο χρόνος των 48 ωρών απορρίπτεται και για τις δύο συγκεντρώσεις της ουσίας. Για την συγκέντρωση των 0.5μM, παρότι παρατηρείται η μέγιστη ενδοκυττάρια συγκέντρωση της φθαλοκυανίνης στα κύτταρα, οι 48 ώρες δεν αποτελούν ιδανικό χρόνο επώασης στις κλινικές εφαρμογές. Για την συγκέντρωση των 1μM, η μεταβολή των φωτοφυσικών ιδιοτήτων της φθαλοκυανίνης μείωσαν την φωτοδυναμική της δράση. Από όλα τα παραπάνω, ο πλέον κατάλληλος χρόνος επώασης αποδεικνύεται αυτός των 24 ωρών.

7.4 Μελέτη επίδρασης της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων απουσία φωτός.

Προκειμένου να μελετηθούν οι φωτοδυναμικές ιδιότητες της AICIPc κρίθηκε αναγκαίο να εξασφαλιστεί ότι η φθαλοκυανίνη, σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, δεν ήταν τοξική για τα κύτταρα. Δηλαδή, η επώαση των κυττάρων με αυτή δεν επάγει κυτταρικό θάνατο απουσία φωτός διέγερσης. Για το λόγο αυτό κύτταρα της καρκινικής σειράς LNCaP, τα οποία καλλιεργήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε, επώαστηκαν με μια σειρά συγκεκριμένων συγκεντρώσεων χλωρο-

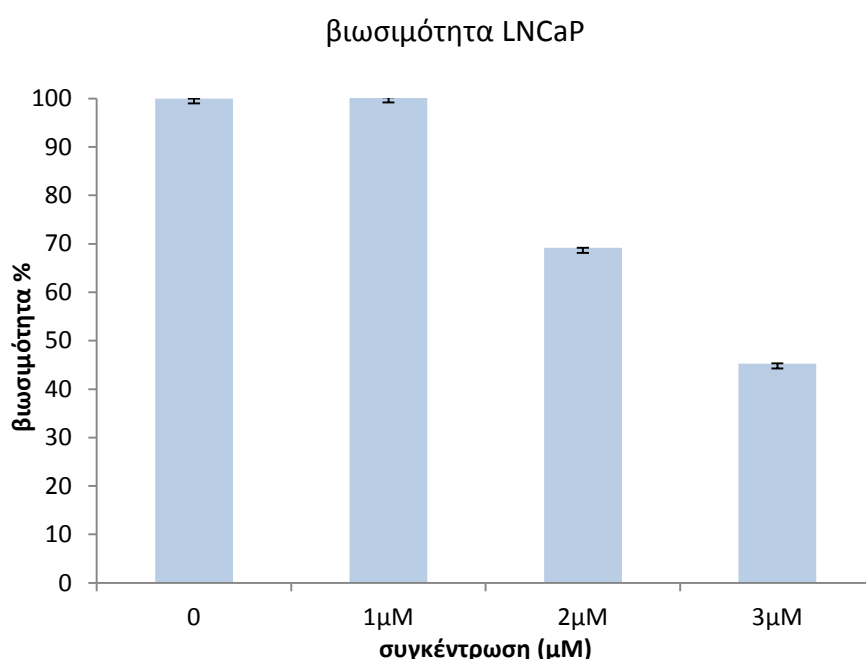
αλουμινο-φθαλοκυανίνης και μετρήθηκε η βιωσιμότητά τους με το βιοχημικό έλεγχο μέτρησης βιωσιμότητας MTT.

Η διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Αρχικά παρασκευάστηκε το μητρικό διάλυμα της φθαλοκυανίνης συγκέντρωσης $6 \times 10^{-4} \text{M}$. Με διαδοχικές αραιώσεις του διαλύματος σε πλήρες θρεπτικό μέσο προέκυπταν τα διαλύματα πλήρους θρεπτικού μέσου-φωτοευαισθητοποιητή με τα οποία επώαζονταν τα κύτταρα.

Συγκεκριμένα, LNCaP κύτταρα επώαστηκαν με 1,2 και 3 μM AICIPc για 24 ώρες. Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης απορρίφθηκε το πλήρες θρεπτικό μέσο με τον φωτοευαισθητοποιητή και εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο του βιοχημικού ελέγχου βιωσιμότητας MTT με στόχο την εκτίμηση της κυτταρικής θνησιμότητας που προκαλείται από την επώαση με τον φωτοευαισθητοποιητή.

Όλες οι μετρήσεις γίνονταν τρεις φορές. Στατιστικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε βάση της μεθόδου Student's t test, ώστε να διαπιστωθούν τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των παρατηρήσεων. Στο διάγραμμα του σχήματος 7.16 παρουσιάζεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων.



Σχήμα 7. 16: Διάγραμμα συγκέντρωσης AICIPc– βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων, μετά από 24h επώασης με την φθαλοκυανίνη

Από τις μετρήσεις βιωσιμότητας προκύπτει ότι η φθαλοκυανίνη παρουσιάζει κυτταροτοξικότητα για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 1 μM . Η συγκέντρωση των 2 μM μειώνει την βιωσιμότητα των κυττάρων κατά 30%, ενώ για την συγκέντρωση των 3 μM η βιωσιμότητα δεν ξεπερνά το 45%. Άρα για την μελέτη της

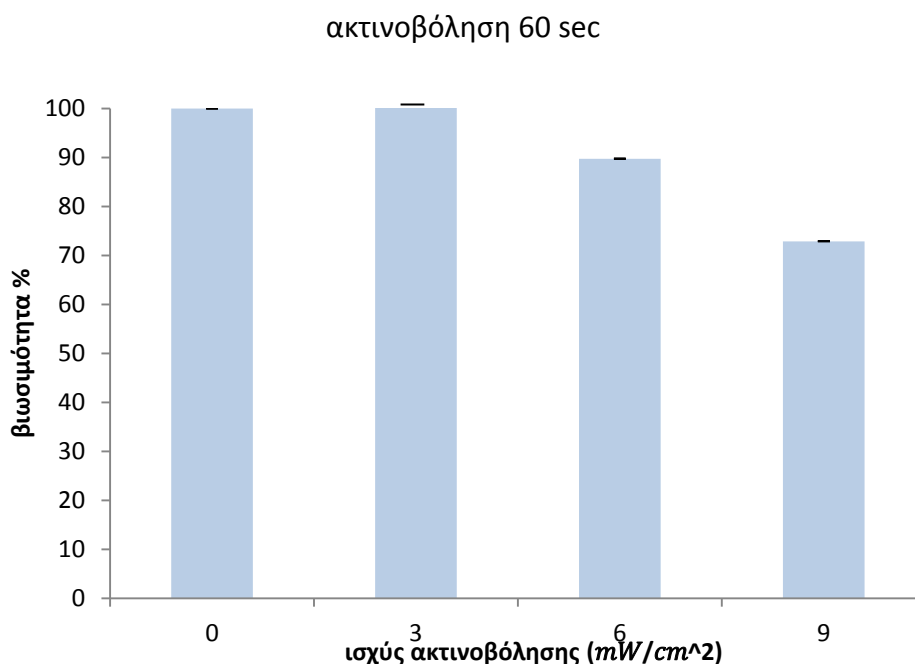
φωτοδυναμικής δράσης της AICIPc κατάλληλη συγκέντρωση αποτελεί η 1μM καθώς και συγκεντρώσεις μικρότερες αυτής. Για τον λόγο αυτό επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 0.5 και 1μM.

7.5 Μελέτη επίδρασης φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Το επόμενο βήμα είναι η μελέτη επίδρασης του φωτός στην βιωσιμότητα των κυττάρων. Είναι αναγκαίο να προσδιοριστεί η κατάλληλη δόση ενέργειας φωτός διέγερσης η οποία δεν οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικές ισχύς του φωτός διέγερσης, 3 mW/cm^2 , 6 mW/cm^2 και 9 mW/cm^2 . Ο χρόνος ακτινοβόλησης ήταν 60 sec και οι δόσεις ενέργειας, 180, 360 και 540 mJ/cm^2 .

Η διαδικασία ακτινοβόλησης περιελάμβανε τα εξής βήματα: Επώαση των κυττάρων σε τριβλία για 24 ώρες. Στην συνέχεια απορριπτόταν το θρεπτικό μέσο και ελάχιστα μl PBS προσθέτονταν στα κύτταρα για να προφυλαχθούν από την επίδραση του περιβάλλοντος. Τέλος ακολουθούσε η ακτινοβόληση των κυττάρων στις προαναφερθείσες συνθήκες. Στη συνέχεια φρέσκο εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο προσθέτονταν στα τριβλία και ακολουθούσε επώαση των κυττάρων για 24 ώρες. Με τη ολοκλήρωση του χρόνου αυτού γινόταν η μέτρηση βιωσιμότητας με τον βιοχημικό έλεγχο MTT. Σε κάθε συνθήκη αντιστοιχούσαν 3 τριβλία για λόγους επαναληψιμότητας Στατιστικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε βάση της μεθόδου Student's t test, ώστε να διαπιστωθούν τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των παρατηρήσεων

Στο σχήμα 7.17 παρουσιάζεται το διάγραμμα συνολικής δόσης ενέργειας – βιωσιμότητας.



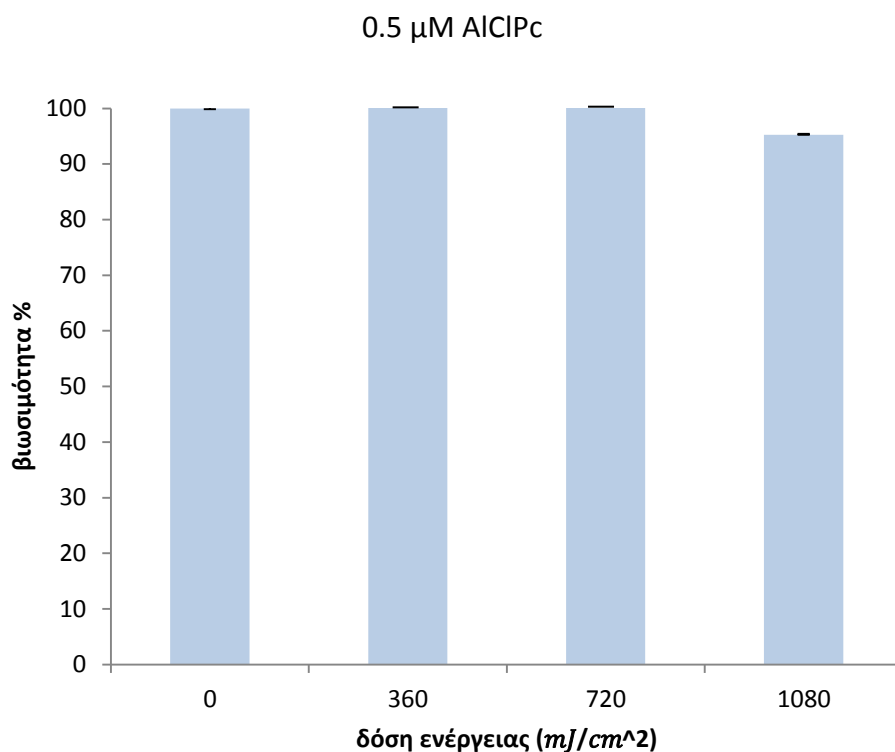
Σχήμα 7. 17: Διάγραμμα ισχύος ακτινοβολήσης- βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων για ακτινοβολήση 60 sec.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που δίνονται στο διάγραμμα, η ισχύς των 3 mW/cm^2 δεν προκάλεσε κυτταρικό θάνατο. Με τα 6 mW/cm^2 η βιωσιμότητα μειώθηκε ελάχιστα, 10%, ποσοστό το οποίο δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Αντίθετα με την ισχύ των 9 mW/cm^2 το ποσοστό κυτταρικού θανάτου έφτασε το 30%. Συνεπώς για τις μελέτες της φωτοδυναμικής δράσης επιλέχθηκε ακτινοβολήση 6 mW/cm^2 .

7.6 Μελέτη φωτοδυναμικής δράσης AlClPc στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Η μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης της χλωρο-αλουμινο-φθαλκυανίνης πραγματοποιήθηκε για τις δύο συγκεντρώσεις, 0.5 μM και 1 μM , της ουσίας. Η ισχύς ακτινοβολήσης ήταν 6 mW/cm^2 και οι χρόνοι ακτινοβολήσης 60, 120 και 180 sec με συνολικές δόσεις ενέργειας 360, 720 και 1080 mJ/cm^2 αντίστοιχα.

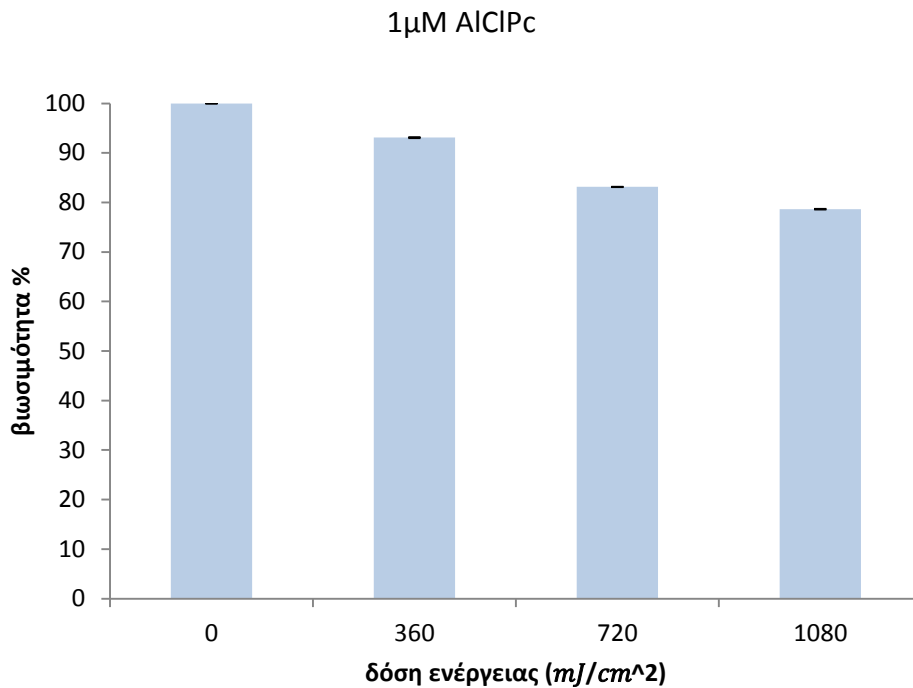
Σε κάθε συνθήκη αντιστοιχούσαν 3 τριβλία για λόγους επαναληψιμότητας. Στα διαγράμματα παρατίθεται η μέση τιμή των τριών μετρήσεων κάθε συνθήκης και η αντίστοιχη τυπική απόκλιση, ποσοστιαία ως προς τη βιωσιμότητα της ομάδας ελέγχου. Στατιστικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε βάση της μεθόδου Student's t test, ώστε να διαπιστωθούν τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των παρατηρήσεων. Τα αποτελέσματα δίνονται στα διαγράμματα των σχημάτων 7.18 και 7.19



Σχήμα 7. 18: Διάγραμμα δόσης ενέργειας – βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων τα οποία επώαστηκαν για 24h με 0.5 μ M AICPc

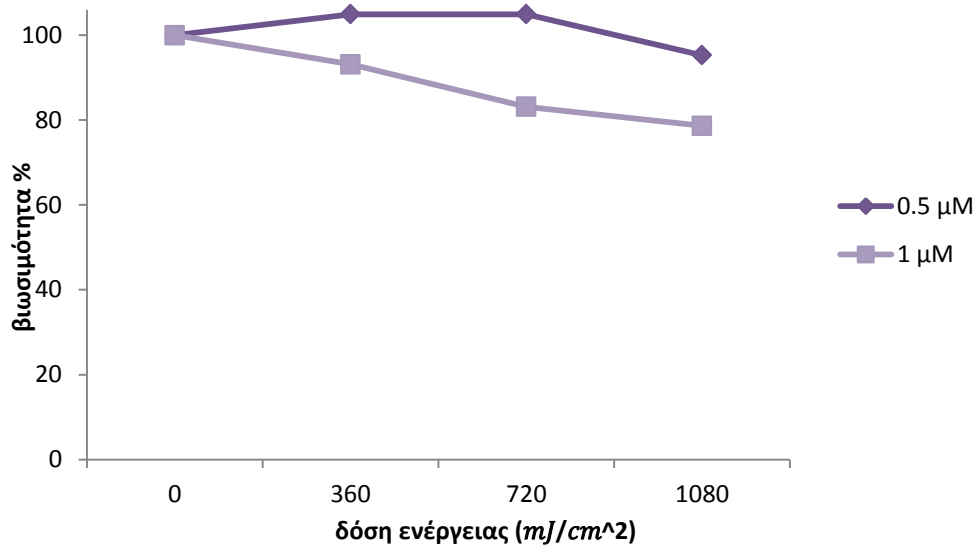
Επώαση με 0.5 μ M AICPc δεν προκάλεσε σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Οι ενέργειες των 360 και 720 mJ/cm^2 δεν προκάλεσαν κυτταρικό θάνατο ενώ η ενέργεια των 1080 mJ/cm^2 μείωσε μόνο 5% την βιωσιμότητα των κυττάρων, ποσοστό το οποίο δεν είναι στατιστικά σημαντικό.

Όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με 1 μ M AICPc (Σχήμα 7.19) ο κυτταρικός θάνατος ενισχύθηκε. Η μικρότερη δόση ενέργειας, 360 mJ/cm^2 , κατάφερε να μειώσει τον πληθυσμό των κυττάρων μόνο 7%, κάτι το οποίο δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Αντίθετα οι δύο άλλες δόσεις ενέργειας αύξησαν την κυτταρική θνησιμότητα. Η ενέργεια των 720 mJ/cm^2 μείωσε την βιωσιμότητα των κυττάρων στο 83% ενώ η πιο μεγάλη ενέργεια, αυτή των 1080 mJ/cm^2 , αποδείχθηκε πιο ισχυρή με την βιωσιμότητα να είναι 78%.



Σχήμα 7. 19: Διάγραμμα δόσης ενέργειας - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων τα οποία επώαστηκαν για 24h με 1μM AICIPc

Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της φωτοευαίσθητης ουσίας για τις ίδιες συνθήκες ακτινοβολήσης, ισχύς και χρόνος ακτινοβολήσης, οδηγεί σε μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου. Πιο αποτελεσματική δόση ενέργειας αποδείχτηκε αυτή των $1080 mJ/cm^2$. Αντίθετα η πιο μικρή δόση ενέργειας, τα $360 mJ/cm^2$, δεν κατάφεραν να μειώσουν σημαντικά την βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων για καμία από τις δύο συγκεντρώσεις της φθαλοκυανίνης. Άρα πιο αποτελεσματικός συνδυασμός συγκέντρωσης της AICIPc και δόσης ενέργειας αποτελεί η συγκέντρωση των $1\mu M$ και τα $1080 mJ/cm^2$. Χάρη σε αυτά ο κυτταρικός θάνατος κατάφερε να αγγίξει το 22% (Σχήμα 7.20).



Σχήμα 7. 20: Διάγραμμα δόσης ενέργειας - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων τα οποία επώαστηκαν για 24h με 0.5 και 1μM AIClPc

***ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ &
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ***

8.1 Εισαγωγικά

Ο καρκίνος του προστάτη είναι ο συχνότερος καρκίνος στους άντρες και η δεύτερη σε συχνότητα αιτία θανάτου από καρκίνο (μετά τον καρκίνο του πνεύμονα) σε αυτούς. Πρόκειται για ένα είδος καρκίνου που αν αντιμετωπιστεί στα πρώτα στάδια ανάπτυξης μπορεί να ιαθεί ακόμα και 100%. Όντας όμως μια ιδιότυπη μορφή καρκίνου, μπορεί να διατηρηθεί σε ανενεργή μορφή για πολλά χρόνια έως ότου πυροδοτηθεί η ταχύτερη ανάπτυξή του. Σαν αποτέλεσμα, οι θεραπείες αντιμετώπισής του (ολική εκτομή του αδένου, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, κ.α) είναι ιδιαίτερα επώδυνες και επηρεάζουν σημαντικά την ποιότητα ζωής του ασθενούς. Αναγκαία κρίνεται λοιπόν η εμφάνιση μιας θεραπείας που θα εξαλείφει τον καρκινικό όγκο και ταυτόχρονα ο προστατικός αδένου θα παραμένει λειτουργικός. Χαρακτηριστικό παράδειγμα θεραπείας με τα παραπάνω χαρακτηριστικά αποτελεί η φωτοδυναμική θεραπεία.

Η φωτοδυναμική είναι μια επιλεκτική και αποτελεσματική θεραπεία για την αντιμετώπιση καρκινικών όγκων και άλλων ασθενειών. Βασίζεται στη συνδυασμένη δράση τριών στοιχείων: του φωτός, του φωτοευαισθητοποιητή και του οξυγόνου, κάθε ένα από τα οποία μεμονωμένο και στις δόσεις στις οποίες εφαρμόζεται κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία δεν είναι τοξικά για τον οργανισμό. Η επαγομένη από τη φωτοδυναμική θεραπεία κυτταροτοξικότητα προκαλείται από τη συνδυασμένη δράση των τριών αυτών στοιχείων μέσω δυο τύπων φωτοχημικών αντιδράσεων, των αντιδράσεων τύπου I και των αντιδράσεων τύπου II. Από τις αντιδράσεις τύπου I παράγονται ελεύθερες ρίζες ενώ από τις τύπου II το δραστικό μονήρες οξυγόνο. Τα οξειδωτικά παράγωγα και των δύο τύπων αντιδράσεων οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων ενεργοποιώντας τους μηχανισμούς νέκρωσης του καρκινικού ιστού.

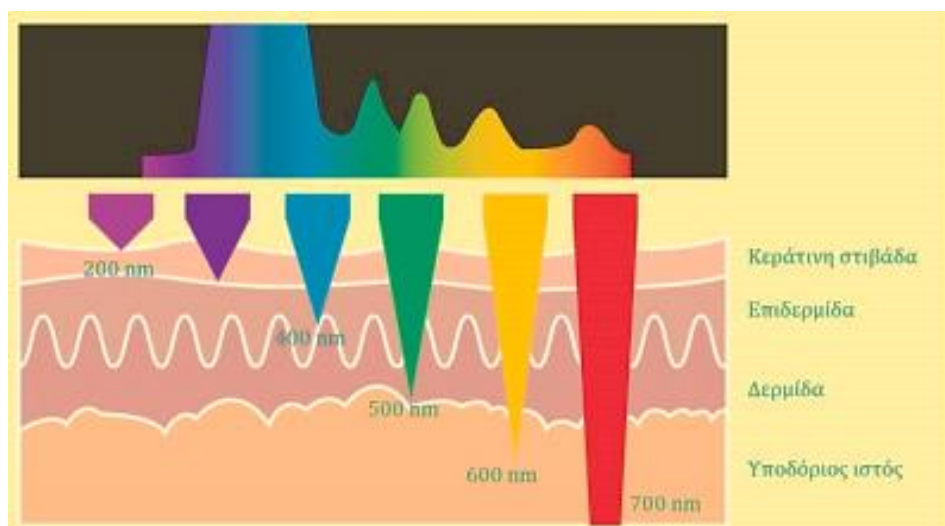
Οι φωτοευαισθητοποιητές που χρησιμοποιούνται είναι φυσικές ή συνθετικές ενώσεις ικανές να απορροφούν φως ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος και να ενεργοποιούν τις κυτταροτοξικές αντιδράσεις τύπου I και II. Οι ουσίες αυτές μπορούν να χωριστούν σε κατηγορίες ανάλογα με την γενιά, την χημική σύσταση κ.α. Στην παρούσα εργασία, η φωτοευαίσθητη ουσία που χρησιμοποιήθηκε ήταν η χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη, AICIPc, ένας φωτοευαισθητοποιητή 2^{ης} γενιάς.

8.2 Συμπεράσματα

8.2.1 Φωτοφυσικές ιδιότητες AICIPc

Όπως προκύπτει από την ενότητα 7.1 η χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη απορροφά ισχυρά στην περιοχή του ερυθρού, συγκεκριμένα γύρω στα 685 nm, ενώ άλλες δύο κορυφές απορρόφησης παρατηρούνται στα 625 nm και 370 nm (περιοχή υπεριώδους). **Η έντονη απορρόφηση της φθαλοκυανίνης στο ερυθρό, την καθιστά κατάλληλη ως φωτοευαισθητοποιητή για την φωτοδυναμική θεραπεία.** Στην φωτοδυναμική, η φωτοευαίσθητη ουσία που χρησιμοποιείται απαιτείται να

απορροφά φως αφού η αποτελεσματικότητα της θεραπείας εξαρτάται κατά πολύ από την ικανότητα απορρόφησης που παρουσιάζει. **Το γεγονός ότι η AICIPc απορροφά έντονα στην περιοχή του ερυθρού επιτρέπει την μεγαλύτερη και καλύτερη αλληλεπίδραση του φωτός με το δέρμα και τους ιστούς καθώς το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας σε αυτά τα μήκη κύματος να αυξάνεται στο μέγιστο (Σχήμα 8.1) βοηθώντας την αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας. Έτσι η AICIPc μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φωτοευαισθητοποιητής για την αντιμετώπιση όχι μόνο επιφανειακών αλλά και εσωτερικών όγκων.**



Σχήμα 8. 1: Βάθος διείσδυσης φωτεινής ακτινοβολίας στο δέρμα για τα διάφορα μήκη κύματος της ακτινοβολίας

Από την μελέτη απορρόφησης της φθαλοκυανίνης σε διαφορετικούς διαλύτες, δύο οργανικούς το DMSO και ην EtOH, και έναν πολικό, το νερό, διαπιστώθηκε ότι η **χαρακτηριστική μορφή του φάσματος απορρόφησης διατηρείται μόνο στους οργανικούς διαλύτες**. Στον πολικό διαλύτη, η μορφή του φάσματος αλλοιώθηκε και η χαρακτηριστική κορυφή της φθαλοκυανίνης εξαφανίστηκε. Επίσης το μέγιστο απορρόφησης παρουσίασε σημαντική μείωση σε σχέση με το μέγιστο απορρόφησης στην αιθανόλη ή το DMSO. **Η μείωση αυτή στο μέγιστο απορρόφησης οφείλεται στο φαινόμενο της συσσωμάτωσης. Η φθαλοκυανίνη ως υδρόφοβο μόριο όταν βρεθεί σε υδατικό περιβάλλον συσσωματώνεται με αποτέλεσμα τόσο την μείωση της απορρόφησης όσο και την μείωση της αποδοτικότητας της ουσίας**

Η συσσωμάτωση των μορίων της φθαλοκυανίνης που παρατηρείται στα υδατικά μέσα εμποδίζει την κυκλοφορία και την απορρόφηση της ουσίας από τα κύτταρα τόσο στα in vivo πειράματα αλλά και στις κλινικές εφαρμογές. Χρήσιμη και αναγκαία αποδεικνύεται λοιπόν η ενθυλάκωση της φθαλοκυανίνης σε φορείς μεταφοράς ώστε να αντιμετωπιστεί το φαινόμενο της συσσωμάτωσης.

Από τις αντίστοιχες φασματοφωτομετρικές μελέτες φθορισμού της ενότητας 7.1 προέκυψε ότι **η φθαλοκυανίνη όταν διεγερθεί με ακτινοβολία μήκους κύματος 370 nm η εκπέμπει φθορισμό στο ορατό φάσμα (κορυφή φθορισμού στα 680 nm).** Επίσης η εκπεμπόμενη ένταση φθορισμού βρέθηκε ανάλογη με την συγκέντρωση της ουσίας στα υπό εξέταση διαλύματα. **Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι η φθαλοκυανίνη δίνει υψηλό σήμα φθορισμού, επιτρέποντας την χρήση της ουσίας όχι μόνο ως φωτοευαισθητοποιητή στην φωτοδυναμική θεραπεία αλλά και στην φωτοδυναμική διάγνωση καρκινικών ιστών.**

8.2.2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Στην ενότητα 7.2 μελετήθηκε η ικανότητα της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης να παράγει ελεύθερες ρίζες μετά την ακτινοβόλησή της και πραγματοποιήθηκε σύγκριση της AICIPc με τον βασικό ανταγωνιστή της, την φθαλοκυανίνη ψευδαργύρου ZnPc.

Έπειτα από ακτινοβόληση των δύο φθαλοκυανινών με ακτινοβολία μήκους κύματος 660 nm και μετρώντας την ένταση του φθορισμού του φθορίζοντα ιχνηθέτη που καταγράφει την παραγωγή των ελευθέρων ριζών, παρατηρήθηκε ότι και οι δύο φθαλοκυανίνες από το πρώτο λεπτό της ακτινοβόλησης ξεκινούν να παράγουν ελεύθερες ρίζες. Αυτό συμπεραίνεται από το γεγονός ότι η ένταση του φθορισμού αρχίζει να αυξάνει υποδηλώνοντας έτσι την παραγωγή των ριζών από τις φωτοευαίσθητες ουσίες. **Οι δύο ουσίες AICIPc και ZnPC όπως προκύπτει δεν παράγουν με τον ίδιο ρυθμό τις οξειδωτικές ρίζες. Μεγαλύτερη παραγωγή ριζών παρατηρήθηκε από την AICIPc** όπου από το όγδοο λεπτό της ακτινοβόλησης και μετά, η αύξηση του φθορισμού ήταν τόσο έντονη οδηγώντας σε κορεσμό του σήματος του φασματοφωτομέτρου φθορισμού. Αντίθετα για την φθαλοκυανίνη ZnPc, η αύξηση του φθορισμού δεν ήταν τόσο έντονη υποδηλώνοντας αρκετά μικρότερη παραγωγή ελευθέρων ριζών .

Σύμφωνα με το κεφάλαιο 3, η βασική ιδιότητα του φωτοευαισθητοποιητή είναι η παραγωγή των οξειδωτικών ριζών. Από την ικανότητα αυτή εξαρτάται άμεσα η φωτοδυναμική του δράση. **Από την μελέτη μας και οι δύο φθαλοκυανίνες πληρούν το χαρακτηριστικό αυτό καθώς παράγουν ελεύθερες ρίζες.** Όμως ο ρυθμός παραγωγής τους δεν είναι ίδιος και για τα δύο ουσίες. Μεγαλύτερο ρυθμό παρουσιάζει η AICIPc αφού ο ρυθμός αύξησης του φθορισμού της fluorescein (που είναι ανάλογος της παραγωγής ελευθέρων ριζών) είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό της ZnPc. **Όμως όσο μεγαλύτερος είναι ο ρυθμός παραγωγής ελευθέρων ριζών, τόσο πιο πολλές ρίζες παράγονται οπότε τόσο καλύτερη είναι η φωτοδυναμική δράση που παρουσιάζουν οι φωτοευαισθητοποιητές. Με βάση τα παραπάνω καλύτερος και δραστικότερος φωτοευαισθητοποιητής αποδεικνύεται η χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη.**

8.2.3 Υπολογισμός ενδοκυττάριας συγκέντρωσης AICIPc

Πριν μελετηθεί η φωτοδυναμική δράση της φθαλοκυανίνης, μελετήθηκε η ικανότητα απορρόφησης της ουσίας από τα καρκινικά κύτταρα και η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή της σε αυτά. Ως γνωστόν η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή εξαρτάται τόσο από την αρχική συγκέντρωση επώασης όσο και από τον χρόνο επώασης των κυττάρων με τον φωτοευαισθητοποιητή. Η συγκεκριμένη μελέτη είναι αναγκαία καθώς διαπιστώνουμε αν ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί να απορροφηθεί από τα κύτταρα, και αν ναι σε ποιες συγκεντρώσεις. Επίσης χρησιμοποιώντας διαφορετικούς χρόνους επώασης της φωτοευαισθητικής ουσίας με τα κύτταρα διαπιστώνεται ο βέλτιστος χρόνος επώασης, ώστε η συγκέντρωση της ουσίας να είναι μέγιστη, δηλαδή ο χρόνος που θα χρησιμοποιηθεί στην διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Στις μελέτες της παρούσας εργασίας οι δύο αρχικές συγκεντρώσεις της φθαλοκυανίνης που χρησιμοποιήθηκαν για την επώαση των κυττάρων ήταν 0.5 μM και 1 μM ενώ οι χρόνοι επώασης 1, 3, 6, 24 και 48 ώρες. **Από τις δύο παραπάνω συγκεντρώσεις, την καλύτερη απορρόφηση από τα καρκινικά κύτταρα παρουσίασε αυτή των 0.5 μM .** Τα κύτταρα δεν την απέβαλλαν οκόμα και μετά από τις 48 ώρες επώασης της με αυτά όπως συνέβη με την φθαλοκυανίνη συγκέντρωσης 1 μM . Επίσης δεν παρατηρήθηκε συσσωμάτωση των μορίων της φθαλοκυανίνης ενδοκυττάρια. **Αυτό που έχει ιδιαίτερη σημασία είναι ότι η μικρότερη συγκέντρωση της φθαλοκυανίνης έχει την ικανότητα να προκαλέσει την ίδια ή ακόμα και καλύτερη φωτοδυναμική δράση σε σχέση με την υψηλότερη συγκέντρωση άρα μειώνεται ο κίνδυνος της παραμένουσας φωτοευαισθησίας.**

Ο βέλτιστος χρόνος επώασης των κυττάρων με την φωτοευαισθητή ουσία αποδεικνύεται αυτός των 24 ωρών. Οι μικρότερες ώρες επώασης 1, 3, και 6 ώρες αποκλείονται γιατί δεν παρατηρείται η μέγιστη ενδοκυττάρια συγκέντρωση της ουσίας για καμία αρχική συγκέντρωση επώασης της AICIPc ενώ οι 48 ώρες δεν αποτελούν ιδανικό χρόνο για κλινικές εφαρμογές.

8.2.4 Επίδραση της φθαλοκυανίνης στη βιωσιμότητα των LNCaP κυττάρων απουσία φωτός

Πριν τις μελέτες της φωτοδυναμικής θεραπείας, είναι αναγκαίο να προσδιοριστεί αν η φθαλοκυανίνη στις συγκεντρώσεις που θα χρησιμοποιηθεί στην φωτοδυναμική και χωρίς να διεγερθεί από φως είναι τοξική για τον οργανισμό, τους ιστούς και τα κύτταρα σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες. Όπως έχει αναφερθεί και στην ενότητα 3.1, η φωτοευαισθητή ουσία δεν θα πρέπει να είναι τοξική για τον οργανισμό χωρίς να διεγερθεί με κατάλληλη ακτινοβολία. Αν η προϋπόθεση αυτή δεν πληρείται, βλάβες μπορούν να σημειωθούν στους υγιείς ιστούς και τα όργανα επιβαρύνοντας έτσι την υγεία του ασθενούς.

Από τις πειραματικές μελέτες που διεξήχθησαν στην εργασία, οι μελέτες βιωσιμότητας της φθαλοκυανίνης απουσία φωτός στα κύτταρα απέδειξαν ότι **η φθαλοκυανίνη είναι ιδιαιτέρως τοξική για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 1 μM** . Οι συγκεντρώσεις της φθαλοκυανίνης που επιλέξαμε ήταν αυτές που αναφέρθηκαν παραπάνω, οι 0.5 μM και 1 μM .

8.2.5 Επίδραση του φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Πέρα από την μελέτη τοξικότητας της φθαλοκυανίνης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα προσδιορισμού της ισχύος ακτινοβολήσης που δεν επιδρά στην βιωσιμότητα των κυττάρων. Όπως η φθαλοκυανίνη, έτσι και η δόση φωτός από μόνη της δεν θα πρέπει να οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο.

Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικές ισχύς του φωτός διέγερσης, 3 mW/cm^2 , 6 mW/cm^2 και 9 mW/cm^2 . Ο χρόνος ακτινοβολήσης ήταν 60 sec και οι δόσεις ενέργειας, 180, 360 και 540 mJ/cm^2 . **Οι μελέτες βιωσιμότητας ΜΤΤ ανέδειξαν ως καταλληλότερη ισχύ ακτινοβολήσης αυτή των 6 mW/cm^2 .**

8.2.6 Φωτοδυναμική δράση

Έχοντας προσδιορίσει τις συνθήκες επώασης της φθαλοκυανίνης με τα κύτταρα και την κατάλληλη ισχύ ακτινοβολήσης, πραγματοποιήθηκαν οι μελέτες φωτοδυναμικής θεραπείας. Οι συγκεντρώσεις επώασης της AICIPc που επιλέχθηκαν ήταν 0.5 μM και 1 μM . Η ισχύς ακτινοβολήσης ήταν 6 mW/cm^2 και οι χρόνοι ακτινοβολήσης 60, 120 και 180 sec με συνολικές δόσεις ενέργειας 360, 720 και 1080 mJ/cm^2 αντίστοιχα. **Τα αποτελέσματα της μελέτης απέδειξαν ότι η μικρότερη συγκέντρωση επώασης, τα 0.5 μM , ανεξάρτητα από την ενέργεια ακτινοβολήσης, δεν οδήγησε σε κυτταρικό θάνατο. Αντίθετα η αύξηση της συγκέντρωσης της φωτοευαίσθητης ουσίας κατάφερε να μειώσει την βιωσιμότητα των κυττάρων. Πιο αποτελεσματικός αποδείχθηκε ο συνδυασμός των 1 μM φθαλοκυανίνης με δόση ενέργειας τα 1080 mJ/cm^2 . Χάρη σε αυτά ο κυτταρικός θάνατος κατάφερε να αγγίξει το 22%.** Από τα παραπάνω αποδεικνύεται ότι **η AICIPc μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φωτοευαίσθητοποιητής στην προσπάθεια εφαρμογής της φωτοδυναμικής θεραπείας ενάντια στον καρκίνο του προστάτη.**

8.3 Η AICIPc ως φωτοευαίσθητοποιητής

Μια σύνοψη της παρούσας διπλωματικής εργασίας μας βοηθά να διαπιστώσουμε αρχικά αν η χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη ικανοποιεί τις προϋποθέσεις ώστε να χαρακτηριστεί ως φωτοευαίσθητοποιητής και στη συνέχεια αν η δράση της ενάντια στον καρκίνο του προστάτη και συγκεκριμένα στα LNCaP κύτταρα είναι αποτελεσματική. Επίσης εντοπίζονται τα σημεία που χρήζουν περαιτέρω μελέτης.

Συνολικά παρατηρούμε ότι η φθαλοκυανίνη AICIPc ικανοποιεί τα εξής βασικά χαρακτηριστικά των φωτοευαίσθητοποιητών:

- Η ενεργοποίησή της πραγματοποιείται επιλεκτικά με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος ενώ διεγείρεται με ευκολία
- Απορροφά σημαντικά σε μήκη κύματος του ορατού φάσματος και μάλιστα στο ερυθρό επιτυγχάνοντας το μέγιστο βάθος διείσδυσης στον δερματικό ιστό
- Εκπέμπει επαρκή φθορισμό στην ορατή περιοχή του φάσματος, ιδιότητα χρήσιμη για την φωτοδυναμική διάγνωση
- Παράγει ικανοποιητικές ελεύθερες ρίζες μέσω των οποίων καταστρέφονται οι καρκινικοί ιστοί και κύτταρα. Συγκρινόμενη με τον βασικό της ανταγωνιστή την ZnPc, αποδεικνύεται μια πολύ δραστική φωτοευαίσθητη ουσία

Η ιδιότητα της φθαλοκυανίνης που έρχεται σε αντίθεση με τα βασικά χαρακτηριστικά ενός φωτοευαίσθητοποιητή είναι η χαμηλή διαλυτότητα που παρουσιάζει στα υδατικά διαλύματα. Τα συσσωματώματα των μορίων που δημιουργούνται μειώνουν σε σημαντικό βαθμό την φωτοδυναμική δράση της φθαλοκυανίνης.

Όσον αφορά την φωτοδυναμική δράση της ενάντια στα LNCaP κύτταρα σημειώνονται τα εξής:

- Οι συγκεντρώσεις της AlClPc που δεν προκαλούν κυτταρικό θάνατο χωρίς την ενεργοποίησή της από ακτινοβολία πρέπει να είναι μικρότερες των 1μM
- Η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή της στα κύτταρα κρίνεται ικανοποιητική και ικανή να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο
- Ο κυτταρικός θάνατος μετά την φωτοδυναμική θεραπεία αγγίζει το 22%

8.4 Συζήτηση-Προοπτικές

Τα τελευταία χρόνια η φωτοδυναμική θεραπεία αρχίζει να εφαρμόζεται όλο και πιο συχνά ενάντια στον καρκίνο είτε ως μια εναλλακτική θεραπεία είτε σε συνδυασμό με τις έως τώρα αντικαρκινικές θεραπείες. Οι φωτοευαίσθητοποιητές πολλοί, αν και ελάχιστοι είναι αυτοί που έχουν πάρει έγκριση για τις κλινικές εφαρμογές. Η χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο φωτοευαίσθητοποιητή ο οποίος αν και εφαρμόζεται μόνο σε πειραματικό στάδιο

ακόμα, ήδη έχει δείξει την αποτελεσματική του δράση ενάντια στον καρκίνο (Κεφάλαιο 4).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν αρχικά οι φωτοφυσικές ιδιότητες της φθαλοκυανίνης και στη συνέχεια η φωτοδυναμική της δράση σε επίπεδο κυττάρων (in vitro). Η AICIPc χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ενάντια στον καρκίνο του προστάτη και συγκεκριμένα στα LNCaP κύτταρα. Επόμενα βήματα –στόχοι σε επίπεδο κυττάρων από την παρούσα εργασία θα μπορούσαν να αποτελέσουν τα εξής:

- Μελέτη της επιλεκτικότητας της φωτοευαίσθητης ουσίας στα υγιή και καρκινικά κύτταρα. Η φθαλοκυανίνη θα πρέπει να συσσωρεύεται αποκλειστικά και μόνο από τους πάσχοντες ιστούς και κύτταρα και όχι σε υγιείς ιστούς και όργανα
- Υπολογισμός του χρόνου αποδέσμευσης της φθαλοκυανίνης από τους υγιείς ιστούς. Είναι απαραίτητο η ουσία να αποδεσμεύεται γρήγορα από τους υγιείς ιστούς ώστε να μην ενεργοποιείται από το ηλιακό φως, μειώνοντας έτσι την παραμένουσα φωτοευαισθησία

Στη συνέχεια σειρά έχουν οι μελέτες σε ζώα (πειράματα in vivo). Αναγκαία είναι η εύρεση και βελτιστοποίηση των κατάλληλων παραμέτρων της μεθόδου (δόση φωτοευαισθητοποιητή, χρόνος επώασης, χρόνος και δόση ακτινοβολήσης) ώστε να προκύψουν τα μέγιστα δυνατά αποτελέσματα στους ζωντανούς οργανισμούς. Εξονυχιστικά οφείλει να εξεταστεί και η παραμένουσα φωτοευαισθησία στα ζώα καθώς αυτή αποτελεί το κυριότερο μειονέκτημα της μεθόδου.

Έντονο ενδιαφέρον παρουσιάζει όμως και ο εγκλεισμός της φθαλοκυανίνης σε διάφορους φορείς μεταφοράς ώστε να ξεπεραστεί το φαινόμενο της συσσωμάτωσης των μορίων στην φθαλοκυανίνη σε υδατικά διαλύματα. Στην συγκεκριμένη εφαρμογή θα πρέπει να μελετηθούν και πάλι οι φωτοφυσικές μελέτες της ουσίας ώστε να διαπιστωθεί αν η φθαλοκυανίνη διατηρεί τα χαρακτηριστικά της ή επηρεάζεται από το περιβάλλον στο οποίο είναι εγκλεισμένη. Στην συνέχεια θα ακολουθήσουν οι μελέτες σε επίπεδο κυττάρου και ζωντανών οργανισμών.

Τέλος η παρούσα εργασία κατέδειξε την δυνατότητα της φθαλοκυανίνης να χρησιμοποιηθεί και στην μέθοδο της φωτοδυναμικής διάγνωσης. Επομένως ενδιαφέρον παρουσιάζει η διερεύνηση της επιλεκτικότητας της ουσίας ανάμεσα σε υγιή και καρκινικά κύτταρα ή ακόμα και ιστούς.

Κρίνοντας από τα παραπάνω αλλά και από την μέχρι τώρα προσφορά της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης στην έρευνα κατά του καρκίνου δεν μπορεί να παραβλεφθεί ότι ο συγκεκριμένος φωτοευαισθητοποιητής είναι ικανός να συνεισφέρει σημαντικά και ουσιαστικά στην φωτοδυναμική θεραπεία.

Βιβλιογραφία

- 1) Χαράλαμπος Ν. Δεληβελιώτης «Ουρολογία», εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης , σελ 495-511
- 2) Bocker - Denk - Heitz «Παθολογική ανατομική», τόμος ΙΙΙ, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης, σελ 1335-1340
- 3) Θεραπευτική κλινική πανεπιστημίου Αθηνών παθολογικός τομέας ΠΓΝ "Αλεξάνδρα" «Θεραπευτική των συχνότερων νοσημάτων εσωτερικής παθολογίας» εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης, σελ 355-357
- 4) <http://www.prostate-cancer.com>
- 5) <http://www.iatronet.gr>
- 6) <http://www.poulakis-urology.com>
- 7) Robbins & Contran «Παθολογοανατομική βάση των νοσημάτων με στοιχεία παθογένειας» τόμος 2 , εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης , σελ 1397-1405
- 8) Herbert Lepor «Vascular Targeted Photodynamic Therapy for Localized Prostate Cancer.» *Rev Urol. 2008 Fall; 10(4): 254–261.*
- 9) Liu T, Wu LY, Choi JK, Berkman CE. «Targeted photodynamic therapy for prostate cancer: Inducing apoptosis via activation of the caspase-8/-3 cascade pathway.» *Int J Oncol. 2010 Apr;36(4):777-84.*
- 10) M.D Daniell, J.S Hill Higg «A history of photodynamic therapy.» *Aust N Z J Surg. 1991 May;61(5):340-8.*
- 11) Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. «The History of Photodetection and Photodynamic Therapy.» *Photochem Photobiol. 2001 Nov;74(5):656-69.*
- 12) Νιαβή Σταυρούλα «Ανάπτυξη πρωτότυπης διάταξης με συστοιχία LED για τη φωτοδυναμική θεραπεία του ακτινωτού σώματος» Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία στο Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Οπτική & Όραση» Πανεπιστήμιο Κρήτης, 2014

- 13) Pawel Mroz, Anastasia Yaroslavsky, Gitika B Kharkwal, Michael R Hamblin «Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer.» *Cancers* 2011, 3(2), 2516-2539
- 14) Μετρήσεις και έλεγχοι στην Βιοϊατρική τεχνολογία, Εργαστηριακός Οδηγός 7^{ου} εξαμήνου, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
- 15) Wesley M. Sharman, Cynthia M. Allen and Johan E. Van Lier «Role of Activated Oxygen Species in Photodynamic Therapy.» *Methods Enzymol.* 2000;319:376-400.
- 16) Bhattar Swaminath L. «Fluorescence polynuclear aromatic hydrocarbons and dyes in aqueous micellar solution.» Διδακτορική διατριβή, Department of Chemistry Shivaji University, 2009
- 17) Εργαστηριακός οδηγός του μαθήματος «Introduction to Bioanalytical Chemistry» Τμήμα Χημείας, University of California
- 18) Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. «Photodynamic Therapy of Cancer: An Update.» *CA Cancer J Clin.* 2011 Jul-Aug;61(4):250-81
- 19) Fisher WG, Partridge WP Jr, Dees C, Wachter EA. «Simultaneous Two-Photon Activation of Type-I Photodynamic Therapy Agents» *Photochem Photobiol.* 1997 Aug;66(2):141-55.
- 20) Soumya Mitra «Photodynamic Therapy: Biophysical Mechanisms and Molecular Responses» Doctor of Philosophy thesis, Department of Biochemistry and Biophysics School of Medicine and Dentistry University of Rochester, New York, 2004
- 21) Dzmitry Kachatkou «Photophysical and photobiological characteristics of liposomal forms of mTHPC» Doctor of Philosophy thesis, 2009, Ecole Doctorale «Biologie Santé Environnement», Université Henri Poincaré–Nancy
- 22) Rosenkranz AA, Jans DA, Sobolev AS. «Targeted intracellular delivery of photosensitizers.» *Immunol Cell Biol.* 2000 Aug;78(4):452-64.

- 23) Peter R. Ogilby «Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun» *Chem. Soc. Rev.*, 2010,39, 3181-3209
- 24) Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. «Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT» *J. Photochem Photobiol B.* 2009 Jul 17;96(1):1-8
- 25) Angela Chiaviello, Ilaria Postiglione, Giuseppe Palumbo «Targets and Mechanisms of Photodynamic Therapy in Lung Cancer Cells: A Brief Overview» *Cancers (Basel).* 2011 Mar; 3(1): 1014–1041.
- 26) Luksiene Z «Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment» *Medicina (Kaunas).* 2003;39(12):1137-50
- 27) Nowis D, Makowski M, Stokłosa T, Legat M, Issat T, Gołab J. «Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy» *Acta Biochim Pol.* 2005;52(2):339-352
- 28) Castano A.P, Demidova T, Hamblin M. «Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death» *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* (2005)2, 1—23
- 29) Ε.Β Βανίδης «Εργαστηριακή Οπτική: Παραγωγή, Ανάλυση και Ανίχνευση του φωτός, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 2006
- 30) «Εφαρμογές της Διόδου Laser GaAlAs στην αισθητική και φυσικοθεραπεία» Εργαστηριακός οδηγός εργαστηρίου αισθητικής, Τμήμα Αισθητικής και Κοσμητολογίας, ΤΕΙ Αθηνών
- 31) Σημειώσεις του μαθήματος «Εφαρμογές προηγμένων Υλικών» Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
- 32) Πέτρος Περσεφόνης «Laser, φυσική και τεχνολογία» Εκδόσεις Παπασωτηρίου, σελ 241-248
- 33) R. Sroka, W. Beyer, M. Krug, A. Noack, E. Unsöld, C. Ell «Systems for light application and dosimetry in photodynamic therapy.» *J Photochem Photobiol B.* 1996;36:153-156.

- 34) Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. «Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm.» *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(15):1627-1637
- 35) Paszko E, Ehrhardt C, Senge MO, Kelleher DP, Reynolds JV «Nanodrug applications in photodynamic therapy.» *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2011 Mar;8(1):14-29.
- 36) Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu XH, Childs CJ, Sibata CH. «Photosensitizers in clinical PDT.» *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2004 May;1(1):27-42.
- 37) Allison RR, Sibata CH «Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review.» *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010 Jun;7(2):61-75.
- 38) Lichtman J, Conchello JA «Fluorescence microscopy» *Nature Methods.* 2005, Vol 2, No 12, 910-919
- 39) Bonnett R, Gabriel Martinez G, «Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy.» *Tetrahedron* 2001,57,9513-9547
- 40) <http://micro.magnet.fsu.edu/>
- 41) Ormond A. Freeman S. H. «Dye sensitizers for Photodynamic Therapy.» *Materials* 2013, 6(3), 817-840
- 42) Spikes JD. « Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors.» *Photochem. Photobiol.* 1986 Jun;43(6):691-699
- 43) Yano S. , Hirohara S., Obata M., Hagiya Y., Ogura, S.-I, Ikeda, A, Kataoka, H, Tanaka, M, Joh, T. «Current states and future views in photodynamic therapy» *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 2011,12(1),46– 67
- 44) Yow CM1, Chen JY, Mak NK, Cheung NH, Leung AW. «Cellular uptake, subcellular localization and photodamaging effect of Temoporfin (mTHPC) in nasopharyngeal carcinoma cells: comparison with hematoporphyrin derivative.» *Cancer Lett.* 2000 Sep 1;157(2):123-31.
- 45) Pogue BW, Redmond RW, Trivedi N, Hasan T. «Photophysical Properties of Tin Ethyl Etiopurpurin I (SnET₂,) and Tin Octaethylbenzochlorin (SnOEBC) in

- Solution and Bound to Albumin.» *Photochem Photobiol.* 1998 Dec;68(6):809-15.
- 46) Pogue BW, Ortel B, Chen N, Redmond RW, Hasan T.A «Photobiological and Photophysical-based Study of Phototoxicity of Two Chlorins» *Cancer Res.* 2001 Jan 15;61(2):717-24.
- 47) Young SW, Woodburn KW, Wright M, Mody TD, Fan Q, Sessler JL, Dow WC, Miller RA. «Lutetium Texaphyrin (PCI-0123): A Near-Infrared, Water-Soluble Photosensitizer.» *Photochem Photobiol.* 1996 Jun;63(6):892-7.
- 48) Azzouzi AR, Barret E, Moore CM, Villers A, Allen C, Scherz A, Muir G, de Wildt M, Barber NJ, Lebdai S, Emberton M. «Tookad: Soluble vascular-targeted photodynamic (VTP) therapy: determination of optimal treatment conditions and assessment of effects in patients with localised prostate cancer.» *BJU Int.* 2013 Oct;112(6):766-74.
- 49) Zheng Huang «A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy.» *Technol Cancer Res Treat.* 2005 Jun; 4(3): 283–293.
- 50) Zheng Huang, Qun Chen, Nadira Trncic, Susan M. LaRue, Pierre-Hervé Brun, Brian C. Wilson, Howard Shapiro, Fred W. Hetzel «Effects of Pd-bacteriopheophorbide (TOOKAD) -Mediated Photodynamic Therapy on Canine Prostate Pretreated with Ionizing Radiation.» *Radiat Res.* 2004 Jun; 161(6): 723–731
- 51) Jiang Z, Shao J, Yang T, Wang J, Jia L. «Pharmaceutical development, composition and quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy» *J Pharm Biomed Anal.* 2014 Jan;87:98-104
- 52) Sekkat N, Van den Bergh H, Nyokong T, Lange N «Like a Bolt from the Blue: Phthalocyanines in Biomedical Optics» *Molecules* 2012, 17(1), 98-144
- 53) Πετρή Ασπασία «Διερεύνηση μηχανισμών συνδυαστικής δράσης φωτός, φωτοευαίσθητων ουσιών & αντιοξειδωτικών σε μοντέλα νεοπλασιών με ανάπτυξη οπτικών μεθόδων» Διδακτορική διατριβή, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2013

- 54) Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. «Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm» *Adv Drug Deliv Rev.* 2008 Dec 14;60(15):1627-37
- 55) Paszko E, Ehrhardt C, Senge MO, Kelleher DP, Reynolds JV. «Nanodrug applications in photodynamic therapy.» *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2011 Mar;8(1):14-29
- 56) Bechet D, Couleaud P, Frochot C, Viriot ML, Guillemin F, Barberi-Heyob M. «Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents.» *Trends Biotechnol.* 2008 Nov;26(11):612-21
- 57) Wen-Tyng Li «Nanoparticles for Photodynamic Therapy» Handbook of Biophotonics Vol.2: Photonics for Health Care
- 58) Konan YN, Gurny R, Allémann E «State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy.» *J Photochem Photobiol B.* 2002 Mar;66(2):89-106
- 59) Derycke AS, de Witte PA «Liposomes for photodynamic therapy.» *Adv Drug Deliv Rev.* 2004 Jan 13;56(1):17-30
- 60) Ricarda EF, Riechers E «High-resolution spectroscopy in superfluid helium droplets: Investigation of vibrational fine structures in electronic spectra of phthalocyanine and porphyrin derivatives» Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας και Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Regensburg, 2011
- 61) Kai Liu, Yanhua Wang, Jiannian Yao, Yi Luo «Origin of the Q-band splitting in the absorption spectra of aluminum phthalocyanine chloride» *Chemical Physics Letters* 438,2007, 36–40
- 62) Mopelola Idowu, Tebello Nyokong «Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminum phthalocyanines in the presence of magnetic fluid.» *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2007; 188(2):200-206
- 63) S. Dhami, D. Phillips «Comparison of the photophysics of an aggregating and non-aggregating aluminium phthalocyanine system incorporated into unilamellar vesicles.» *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 100 (1996) 77-84

- 64) S.M.T. Nunes, F.S. Sguilla, A.C. Tedesco «Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives.» *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2004) 37: 273-284
- 65) Andrew C. Wilson, Gregory M. Malham, Raewyn J. Thomsen, John D. Harvey, Bruce C. Baguley «Determination of the activation spectrum of aluminium phthalocyanine chloride against cultured meningioma cells using a tunable laser.» *Journal of Clinical Neuroscience* 1996, 3 (3) :252-256
- 66) E. Ben-Hur, R. C. Hoeben, H. Van Ormondt, T. M. A. R. Dubbelman, J. Van Steveninck «Photodynamic inactivation of retroviruses by phthalocyanines: the effects of sulphonation, metal ligand and fluoride.» *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*, 13 (1992) 145-152
- 67) Carina Silva de Paula, Antonio Cláudio Tedesco, Fernando Lucas Primo, José Mário Carneiro Vilela, Margareth Spangler Andrade, Vanessa Carla Furtado Mosqueira, «Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: Photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro.» *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 49 (2013) 371–381
- 68) N Brasseur, R Ouellet, C La Madeleine, JE van Lier «Water-soluble aluminium phthalocyanine–polymer conjugates for PDT: photodynamic activities and pharmacokinetics in tumour-bearing mice.» *British Journal of Cancer*(1999) 80(10), 1533–1541
- 69) Tapajós EC, Longo JP, Simioni AR, Lacava ZG, Santos MF, Morais PC, Tedesco AC, Azevedo RB «In vitro photodynamic therapy on human oral keratinocytes using chloroaluminum-phthalocyanine» *Oral Oncol.* 2008 Nov;44(11):1073-9
- 70) Maíra Maftoum-Costa, Karina Teixeira Naves, Alexandre Lima Oliveira, Antonio Cláudio Tedesco, Newton Soares da Silva, Cristina Pacheco-Soares «Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior after PDT with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells.» *Cell Biology International* 05/2008; 32(8):1024-8.
- 71) Longo JP, Lozzi SP, Simioni AR, Morais PC, Tedesco AC, Azevedo RB. «Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors.» *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 94 (2009) 143–146

- 72) Pazos Mde C, Ricci R, Simioni AR, Lopes CC, Tedesco AC, Nader HB. «Putative role of heparan sulfate proteoglycan expression and shedding on the proliferation and survival of cells after photodynamic therapy.» *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(6):1130-41
- 73) Rocha MS, Lucci CM, Longo JP, Galera PD, Simioni AR, Lacava ZG, Tedesco AC, Azevedo RB. «Aluminum-Chloride-Phthalocyanine Encapsulated in Liposomes: Activity Against Naturally Occurring Dog Breast Cancer Cells.» *J Biomed Nanotechnol.* 2012 Apr;8(2):251-7.
- 74) Barbugli P.A., Alves C.P., Espreafico E.M., Tedesco A.C. «Intracellular uptake of liposomal chloroaluminum phthalocyanine and this antitumor activity on 3D melanoma cell culture.» *Melanoma Research:* 2010,20,45
- 75) Kyriazi M, Alexandratou E, Yova D, Rallis M, Trebst T. «Topical photodynamic therapy of murine non-melanoma skin carcinomas with aluminum phthalocyanine chloride and a diode laser: pharmacokinetics, tumor response and cosmetic outcomes.» *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2008 Apr;24(2):87-94
- 76) Séguier S, Souza SL, Sverzut AC, Simioni AR, Primo FL, Bodineau A, Corrêa VM, Coulomb B, Tedesco AC. «Impact of photodynamic therapy on inflammatory cells during human chronic periodontitis.» *J Photochem Photobiol B.* 2010 Dec 2;101(3):348-54.
- 77) Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer User's Guide
- 78) Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer UV Winlab Software User's Guide
- 79) Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer User's Guide
- 80) Perkin-Elmer FL Winlab Software User's Guide