



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

<<ΜΙΚΡΟΣΤΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ>>

**Μελέτη φωτοφυσικών ιδιοτήτων της ελεύθερης και της
έγκλειστης σε νανοσωματίδια Φθαλοκυανίνης Αλουμινίου,
καθώς και μελέτη της Φωτοδυναμικής δράσης της σε
καρκινικά κύτταρα**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΟΥ

Ζαβραδινού Παναγιώτη

Ακαδημαϊκός Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος
Αναπληρωτής καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Οκτώβρης 2016



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

<<ΜΙΚΡΟΣΤΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ>>

**Μελέτη φωτοφυσικών ιδιοτήτων της ελεύθερης και της
έγκλειστης σε νανοσωματίδια Φθαλοκυανίνης Αλουμινίου,
καθώς και μελέτη της Φωτοδυναμικής δράσης της σε
καρκινικά κύτταρα**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΟΥ

Ζαβραδινού Παναγιώτη

Ακαδημαϊκός Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος
Αναπληρωτής καθηγητής Ε.Μ.Π.

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την

Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος	Ευάγγελος Χριστοφόρου	Γιώργος Ματσόπουλος
Αναπληρωτής Καθηγητής	Καθηγητής	Αναπληρωτής Καθηγητής

Αθήνα 2016

Παναγιώτης Ζαβραδινός

© (2016) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights Reserved. Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Ευχαριστίες

Θέλω να ευχαριστήσω πρώτα από όλους τον επιβλέποντα της έρευνας αυτής, κ.Κώστα Πολιτόπουλο αναπληρωτή καθηγητή ΕΜΠ. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στην κ.Ελένη Αλεξανδράτου όπου με βάση την εμπειρία της στη έρευνα στη Φωτοδυναμική Θεραπεία μου παρείχε απaráμιλλη καθοδήγηση και βοήθεια. Ευχαριστώ πολύ, την επίκουρη καθηγήτρια κα. Αναστασία Δέτση καθώς και την Υποψήφια Διδάκτορα Ελένη Καβέτσου, του τμήματός Χημικών Μηχανικών, για την όμορφη συνεργασία μας στα εργαστήρια που με τη βοήθειά τους παρασκευάσαμε τα νανοσωματίδια. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα των Ηλεκτρολόγων Μηχανικών Κυριακή Σαμπάνη για την πολύτιμη βοήθειά της γύρω από την μικροσκοπία ατομικής δύναμης, AFM.

Περίληψη

Η παρούσα έρευνα έγινε με σκοπό τη μελέτη της αποτελεσματικότητας που έχει η ελεύθερη και η εγκλειστη σε νανοσωματίδια AICIPc, στη φωτοδυναμική θεραπεία. Λόγω της υδροφοβικότητας του μορίου της AICIPc, η χορήγησή της ως φωτοευαισθητοποιητή κατευθείαν στο κυκλοφοριακό σύστημα είναι προβληματική. Γι' αυτό, έγινε in vitro μελέτη φωτοδυναμικής θεραπείας σε κύτταρα προστάτη LnCap με ελεύθερη AICIPc και με AICIPc εγκλεισμένη σε πολυμερικά νανοσωματίδια (NPs) από polylactic acid (PLA) που παρασκευάστηκαν. Τα NPs παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο γαλακτοματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη, με τα παρακάτω χαρακτηριστικά: (i) μέγεθος 300-400 nm, (ii) αρνητικό zeta potential, (iii) PDI<0,3, (iv) ικανότητα εγκλεισμού 28 %. Μελετήθηκαν οι χαρακτηριστικοί φωτοφυσικοί παράμετροι της ελεύθερης AICIPc και της AICIPc σε NPs, όπως τα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού, η φωτολεύκανση, η δυνατότητα παραγωγής ROS και η τοξικότητα των NPs και της AICIPc. Τα NPs επέδειξαν την ίδια φωτοτοξικότητα απέναντι στα κύτταρα, όπως και η ελεύθερη AICIPc αλλά σε λιγότερο χρόνο επώασης (3 ώρες έναντι 24ώρες). Η φωτοτοξικότητα βελτιώνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή ή της δόσης του φωτός. Επίσης τα νανοσωματίδια επέδειξαν καλύτερη ικανότητα μεταφοράς του φωτοευαισθητοποιητή μέσα στα κύτταρα στην ίδια ώρα επώασης και πιθανή στόχευση των μιτοχονδρίων.

Λέξεις κλειδιά: φωτοδυναμική θεραπεία, φωτοευαισθητοποιητής, νανοσωματίδια, φάσμα απορρόφησης, Φθαλοκυανίνη, μεταφορά φαρμάκων

Abstract

The purpose of this research was to investigate the effectiveness of the free and encapsulated AICIPc into PLA nanoparticles in photodynamic therapy. Due to the hydrophobicity of the AICIPc molecule, its systemic administration as a photosensitizer is problematic. For this reason, an in vitro photodynamic study has been done in prostate LnCap cells, using free AICIPc and AICIPc encapsulated into polymeric nanoparticles (NPs) of polylactic acid (PLA) that were prepared. The NPs were prepared by the emulsification - evaporation of the solvent technique, with the following characteristics: (i) size of 300-400 nm, (ii) a negative zeta potential, (iii) PDI <0,3, (iv) encapsulation efficiency 28%. The characteristic photophysical parameters of free AICIPc and AICIPc in NPs were analyzed, such as absorption spectra and fluorescence, as well as the photobleaching, the ability of ROS generation and the toxicity of NPs and AICIPc. AICIPc loaded in polymeric nanoparticles and free AICIPc, exhibited the same phototoxicity but at different incubation time (3 hours versus 24 hours). Phototoxicity is improved by increasing the concentration of the photosensitizer or the light dose. Also nanoparticles exhibited better carrying capacity of the photosensitizer into the cells and possible mitochondria targeting at the same incubation time .

Keywords: Photodynamic therapy, photosensitizer, nanoparticles, absorption spectra, Phthalocyanine, drug delivery

Πίνακας περιεχομένων

A. Θεωρητικό μέρος	2
Κεφάλαιο 1. Φωτοδυναμική θεραπεία.....	3
1.1. Ιστορία της Φωτοδυναμικής θεραπείας	3
1.2. Αρχές Φωτοδυναμικής θεραπείας.....	3
1.3. Μηχανισμοί φωτοδυναμικής δράσης.....	5
1.4. Κυτταρικός θάνατος	6
1.5. Πηγές φωτός στη φωτοδυναμική θεραπεία	7
1.6. Διεσδυτικότητα του φωτός	8
1.7. Πλεονεκτήματα φωτοδυναμικής θεραπείας	8
Κεφάλαιο 2. Φωτοευαισθητοποιητές.....	10
2.1. Ιδιότητες ενός Καλού φωτοευαισθητοποιητή	10
2.2. Κατηγορίες και γενιές φωτοευαισθητοποιητών.....	10
2.3. Φθαλοκυανίνες και σχετικά συστατικά	12
2.4. Η Αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη (AICIPc).....	13
Κεφάλαιο 3. Νανοσωματίδια στην “πλοήγηση” φαρμάκων	15
3.1. Drug delivery - Πλεονεκτήματα των νανοσωματιδίων ως μεταφορείς φωτοευαισθητοποιητών.....	15
3.2. Νανοστρατηγικές και Είδη νανοσωματιδίων.....	16
3.3. Νανοσωματίδια βασισμένα σε πολυμερή.....	19
3.4. Polylactic acid – PLA	20
Κεφάλαιο 4. Πειραματικές διατάξεις	22
4.1. Διάταξη ελέγχου φωτολεύκανσης και παραγωγής ελευθέρων ριζών	22
4.2. Διάταξη Φωτοδυναμικής Θεραπείας.....	22
4.3. Φασματοφωτόμετρο απορρόφησης.....	23
4.4. Φασματοφωτόμετρο φθορισμού	24
4.5. Μικροσκόπιο Φθορισμού	25
4.6. Μικροσκόπιο ατομικής δύναμης	26
B. Πειραματικό μέρος.....	30
Κεφάλαιο 5. Φωτοφυσικές μελέτες της ελεύθερης AICIPc.....	31
5.1. Φάσματα απορρόφησης διαφορετικών συγκεντρώσεων AICIPc	31
5.2. Φάσματα απορρόφησης της AICIPc σε διαφορετικούς διαλύτες.....	32
5.3. Φάσματα φθορισμού διαφορετικών συγκεντρώσεων της AICIPc.....	32
Κεφάλαιο 6. Φασματοσκοπικές μελέτες φωτολεύκανσης της AICIPc.....	33

6.1.	Μελέτη της φωτολεύκανσης της AICIPc με βάση την απορρόφηση	34
6.2.	Μελέτη της φωτολεύκανσης με βάση το Φθορισμό	35
Κεφάλαιο 7.	Μελέτη της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών	36
7.1.	Ανίχνευση ROS με βάση φάσματα φθορισμού.....	36
7.2.	Ανίχνευση ROS με βάση φάσματα Απορρόφησης.....	39
Κεφάλαιο 8.	Διαδικασία εγκλεισμού- Σύνθεση νανοσωματιδίων PLA.....	42
8.1.	Σύνθεση νανοσωματιδίων	42
8.2.	Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων με zetasizer	43
8.3.	Υπολογισμός συγκέντρωσης AICIPc της διασποράς	44
8.4.	Freeze drying νανοσωματιδίων –διαδικασίες προς τελική μορφή νανοσωματιδίων	44
8.5.	Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων PLA με μικροσκοπία ατομικής δύναμης AFM	44
Κεφάλαιο 9.	Φωτοφυσικές μελέτες έγκλειστης AICIPc σε νανοσωματίδια PLA.	46
9.1.	Φάσματα απορρόφησης διαλύματος AICIPc+PLA NPs.....	46
9.2.	Φάσματα φθορισμού διαλύματος AICIPc+PLA NPs.....	46
Κεφάλαιο 10.	Μελέτη ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών της έγκλειστης AICIPc σε νανοσωματίδια PLA.....	48
10.1.	Ακτινοβολήση.....	48
Κεφάλαιο 11.	Έλεγχος Απελευθέρωσης φαρμάκου	49
Κεφάλαιο 12.	Κυτταρικές καλλιέργειες	50
12.1.	Πρωτόκολλο απόψυξης.....	50
12.2.	Πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας.....	50
12.3.	Πρωτόκολλο μέτρησης κυτταρικού αριθμού.....	51
12.4.	Πρωτόκολλο μεθόδου MTT.....	53
12.5.	Δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης MTT.....	54
Κεφάλαιο 13.	Έλεγχος τοξικότητας των νανοσωματιδίων	56
13.1.	Εισαγωγή νανοσωματιδίων στα κύτταρα	56
Κεφάλαιο 14.	Έλεγχος τοξικότητας φωτός	57
14.1.	Εισαγωγή κυττάρων σε τριβλία.....	57
14.2.	Ακτινοβολήση.....	57
14.3.	Έλεγχος Βιωσιμότητας - Διαδικασία MTT	57
Κεφάλαιο 15.	Φωτοδυναμική θεραπεία.....	58
15.1.	PDT με ελεύθερη Αλούμινο-χλώρο-Φθαλοκυανίνη	58
15.2.	PDT με εγκλεισμένη Αλούμινο-χλώρο-Φθαλοκυανίνη σε νανοσωματίδια PLA	59

Κεφάλαιο 16. Χωρικός εντοπισμός του Φαρμάκου στα κύτταρα	61
16.1. Χωρικός εντοπισμός ελεύθερης Φθαλοκυανίνης.....	62
16.2. Χωρικός εντοπισμός εγκλεισμένης σε νανοσωματίδια Φθαλοκυανίνης	62
C. Αποτελέσματα-Συμπεράσματα.....	64
Κεφάλαιο 17.....	65
Αποτελέσματα Φωτοφυσικών μελετών της ελεύθερης AICIPc.....	65
17.1. Φάσματα απορρόφησης διαφορετικών συγκεντρώσεων AICIPc.....	65
17.2. Φάσματα απορρόφησης της AICIPc σε διαφορετικούς διαλύτες.....	66
17.3. Φάσματα φθορισμού διαφορετικών συγκεντρώσεων της AICIPc.....	67
Κεφάλαιο 18.....	69
Φασματοσκοπικές μελέτες φωτολεύκανσης της AICIPc.....	69
18.1. Μελέτη της φωτολεύκανσης της AICIPc με βάση την απορρόφηση	69
18.2. Μελέτη της φωτολεύκανσης με βάση το Φθορισμό	71
Κεφάλαιο 19. Μελέτη της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών, της ελεύθερης Αλουμινο-χλωρο-Φθαλοκυανίνης	74
19.1. Ανίχνευση ROS με βάση φάσματα φθορισμού.....	74
19.2. Ανίχνευση ROS με βάση φάσματα Απορρόφησης.....	77
Κεφάλαιο 20. Διαδικασία εγκλεισμού - Σύνθεση νανοσωματιδίων PLA.....	80
20.1. Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων με zetasizer	80
20.2. Υπολογισμός συγκέντρωσης AICIPc της διασποράς και του ποσοστού εγκλεισμού	81
20.3. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων με μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM). 82	
Κεφάλαιο 21. Φωτοφυσικές μελέτες έγκλειστης AICIPc σε νανοσωματίδια PLA.	86
21.1. Φάσματα απορρόφησης διαλύματος AICIPc+PLA NPs.....	86
21.2. Σύγκριση με άλλες μελέτες	87
21.3. Φάσματα φθορισμού διαλύματος AICIPc+PLA NPs.....	88
Κεφάλαιο 22. Μελέτη ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών της έγκλειστης AICIPc σε νανοσωματίδια PLA.....	90
Κεφάλαιο 23. Απελευθέρωση φαρμάκου.....	92
Κεφάλαιο 24. Χωρικός εντοπισμός του Φαρμάκου στα κύτταρα	94
24.1. Χωρικός εντοπισμός της ελεύθερης Αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνης.....	94
24.2. Χωρικός εντοπισμός της εγκλεισμένης σε νανοσωματίδια Αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνης	95
Κεφάλαιο 25. Έλεγχος τοξικότητας των νανοσωματιδίων	98
Κεφάλαιο 26. Έλεγχος τοξικότητας φωτός	99
Κεφάλαιο 27. Αποτελέσματα Φωτοδυναμικής Θεραπείας	100

27.1.	PDT με ελεύθερη Αλούμινο-χλώρο-Φθαλοκυανίνη	100
27.2.	PDT με εγκλεισμένη Αλούμινο-χλώρο-Φθαλοκυανίνη σε νανοσωματίδια PLA 101	
Κεφάλαιο 28.	Συμπεράσματα	104

Εισαγωγή

Η Φωτοδυναμική θεραπεία σαν εναλλακτική μέθοδος θεραπείας βασισμένη στο φως στον φωτοευαισθητοποιητή και την παρουσία οξυγόνου, έχει χρησιμοποιηθεί κλινικά ως τεχνική αντιμετώπισης (με εφαρμογή laser) της ηλικιακής εκφύλισης ωχράς κηλίδας (η νόσος που επηρεάζει την κεντρική όραση και καθημερινές δραστηριότητες όπως διάβασμα και οδήγηση). Επίσης επιλέγεται σε περιστατικά κεντρικής ορώδους χοριοαμφιβληστροειδοπάθειας και υγρής ωχροπάθειας (π.χ. πολυποειδική χοριοειδοπάθεια) αλλά και σε κοσμετολογικές επεμβάσεις. Πειραματικά ερευνάται για εφαρμογή και θεραπεία σε δερματικούς καρκίνους αλλά και σε άλλου τύπου καρκινικούς ιστούς όπου είναι δυνατή η μεταφορά ακτινοβολίας (π.χ. με οπτική ίνα).

Στην παρούσα έρευνα μελετώνται οι δυνατότητες του φαρμάκου χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη για φωτοδυναμική θεραπεία αλλά κυρίως οι δυνατότητες της AlClPc εγκλεισμένης μέσα σε νανοσωματίδια PLA, όσον αφορά την δυνατότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών, την στοχευμένη και όσο το δυνατόν ελεγχόμενη χρονικά απελευθέρωση της φαρμακευτικής ουσίας, χωρίς βέβαια το σύστημα αυτό να είναι τοξικό για τα κύτταρα. Τα πειράματα γίνονται και για οργανικά διαλύματα αλλά και για κύτταρα.

Η εργασία χωρίζεται σε τρία μέρη Α, Β και C. Στο μέρος Α αναφέρεται σε βασικές έννοιες που πρέπει να γνωρίζει κανείς ώστε να μπορεί να παρακολουθήσει την έρευνα αυτή. Αναφέρονται επίσης χρήσιμες πληροφορίες για την Φωτοδυναμική Θεραπεία, τους φωτοευαισθητοποιητές και τα νανοσωματίδια που χρησιμοποιούνται στην PDT που αργότερα τις ερευνήθηκε στο πειραματικό μέρος. Το μέρος Β εξηγεί βήμα-βήμα τις διαδικασίες και τα πειράματα που έγιναν και στο μέρος C παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων και τα συμπεράσματά μας. Πιο συγκεκριμένα για το μέρος Β, αρχικά μελετώνται οι φωτοφυσικές ιδιότητες της ελεύθερης AlClPc (Χλωρο-αλούμινο Φθαλοκυανίνης) μέσα σε διαλύματα, όπως τα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού, επίσης μελετήθηκε η φωτολεύκανση και η ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών. Οι ίδιες μελέτες δέγιναν και για την έγκλειστη AlClPc σε νανοσωματίδια PLA στη συνέχεια. Εκτός από τις μελέτες της ελεύθερης και της έγκλειστης Φθαλοκυανίνης στα διαλύματα, έγιναν μελέτες και σε καρκινικά κύτταρα προσάτη για να διαπιστωθεί πως αυτή αποκρίνεται σε σχέση με αυτά. Ελέγχθηκε κατά πόσο η ελεύθερη και η έγκλειστη Φθαλοκυανίνη είναι τοξική για τα κύτταρα, πόσο τοξική είναι η ακτινοβολία από το κόκκινο laser για τα κύτταρα και τέλος έγινε φωτοδυναμική θεραπεία στα καρκινικά κύτταρα προσάτη LnCar με την Φθαλοκυανίνη Αλουμινίου και με τα νανοσωματίδια.

A. Θεωρητικό μέρος

Κεφάλαιο 1.

Φωτοδυναμική Θεραπεία

1.1. Ιστορία της Φωτοδυναμικής Θεραπείας

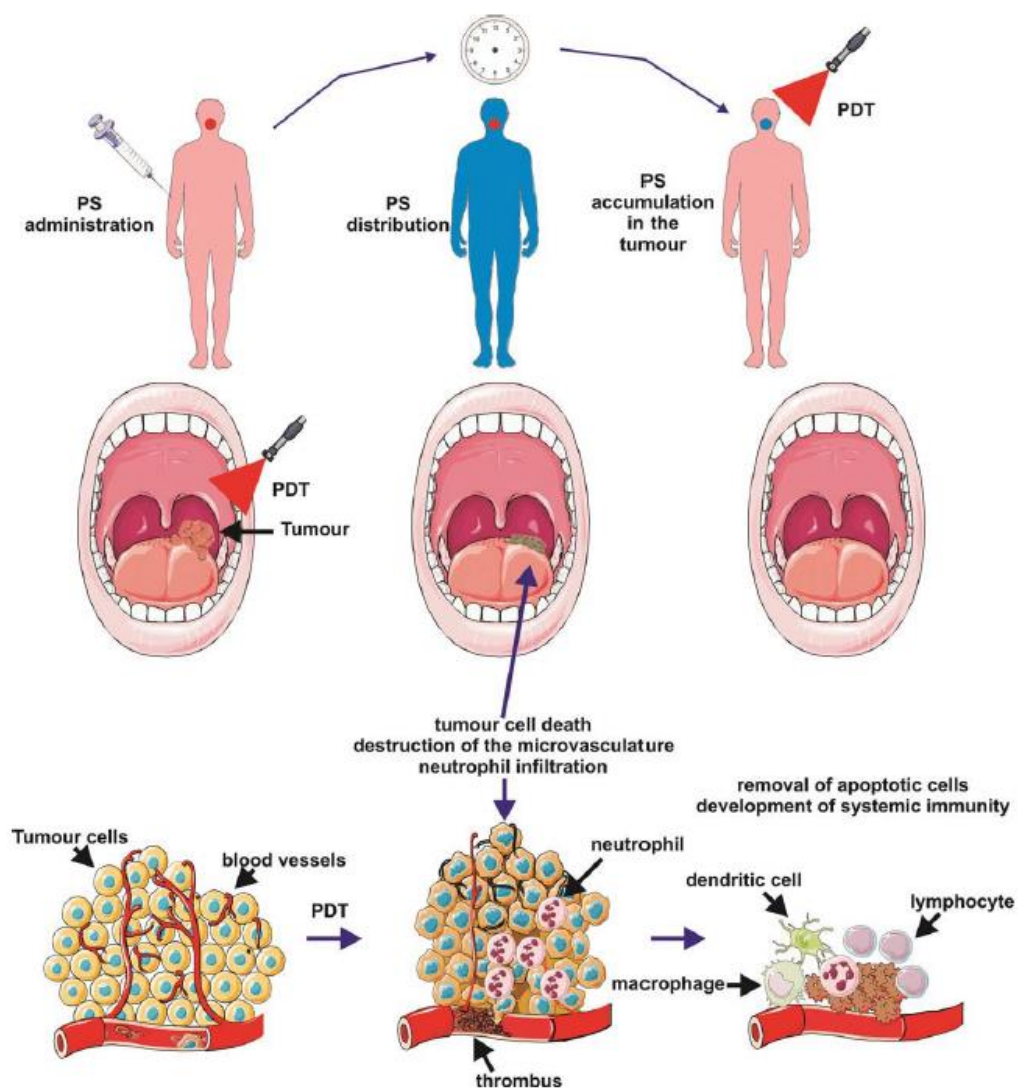
Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) είναι μία αναδυόμενη προσέγγιση για την θεραπεία των νεοπλασματικών και μη νεοπλασματικών ασθενειών. Βασίζεται στην ενεργοποίηση με μη ιοντίζουσα ακτινοβολία, συγκεκριμένων χημικών, που καλούνται φωτοευαισθητοποιητές και είναι εντοπισμένοι στους προς θεραπεία ιστούς. Μπορούμε να πούμε πως οι πρώτες καταγραφές για θεραπείες που εκμεταλλεύονταν ένα φωτοευαισθητοποιητή και μια πηγή φωτός για ιατρικά αποτελέσματα ήταν στην αρχαία Αίγυπτο και στην Ινδία. Χρονικά άνω των 3000 ετών αναφέρουν την τοπική εφαρμογή ουσιών από λαχανικά και άλλα φυτά, που σε συνδυασμό με την ηλιακή ακτινοβολία δημιουργούσαν αντιδράσεις στο δέρμα που μπορούσαν να προκαλέσουν μερική “θεραπεία” σε χρωματικές αλλοιώσεις του δέρματος, όπως την λεύκη.¹

Αν και η Φωτοδυναμική Θεραπεία έχει εξελιχθεί για κλινική εφαρμογή σχετικά πρόσφατα, οι βάσεις για την θεραπεία αυτή τέθηκαν στις αρχές του εικοστού αιώνα όταν ο Raab παρατήρησε ότι ορισμένα μήκη κύματος φωτός ήταν θανατηφόρα για ζώντες οργανισμούς (ragamecium) τα οποία είχαν εκτεθεί σε acridine και σε άλλες βαφές.² Τις παρατηρήσεις αυτές ακολούθησε η δουλειά των Von Tarpeiner και Jensionek στη χρήση τέτοιων βαφών τοπικά για την θεραπεία του καρκίνου του δέρματος.³ Η πιο ερευνημένη κλάση χημικών ενώσεων σήμερα στην PDT, οι *porphyrins*, ερευνήθηκαν από τους Meyer-Betz το 1913 για την συσσώρευση της *hematoporphyrin* και των παραγώγων της σε όγκους αρουραίων και την επίδραση της PDT έπειτα από συστηματική χορήγηση. Η PDT στην παρούσα μορφή της μπορεί να θεωρηθεί ότι ξεκίνησε από τις έρευνες των Lipson και Blades που διαπίστωσαν πως ο παράγοντας εντοπισμού της ουσίας στον καρκινικό όγκο, ήταν μια πρόσμιξη της *hematoporphyrin* και όχι η ουσία καθαυτή. Αυτό οδήγησε και στη σύνθεση του παραγώγου της *hematoporphyrin*, HPD. Στις μέρες μας, μεταξύ Ευρώπης και Ηνωμένων Πολιτειών έχουν εγκριθεί πέντε φωτοευαίσθητοι παράγοντες για τη θεραπεία μιας ποικιλίας ασθενειών. Τέλος αξίζει να σημειώσουμε ότι η PDT ήταν ο πρώτος συνδυασμός φαρμάκου-συσσκευής που εγκρίθηκε από την Αμερικάνικη υπηρεσία τροφίμων και φαρμάκων (FDA) σχεδόν πριν δύο δεκαετίες, μα παρ’ όλα αυτά παραμένει κλινικά υποχρησιμοποιούμενη.

1.2. Αρχές Φωτοδυναμικής Θεραπείας

Η Φωτοδυναμική Θεραπεία αποτελείται από τρία βασικά συστατικά : τον φωτοευαισθητοποιητή, το φως και το Οξυγόνο. Κανένα από τα τρία αυτά συστατικά δεν είναι από μόνο του τοξικό για τα κύτταρα, αλλά μαζί ξεκινούν μια φωτοχημική αντίδραση που κορυφώνεται με την παραγωγή ενός υψηλής δραστηριότητας προϊόντος που λέγεται μονήρες Οξυγόνο ($^1\text{O}_2$). Το μονήρες Οξυγόνο μπορεί να προκαλέσει σημαντική τοξικότητα

που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης.⁴ Οι αντικαρκινικές επιδράσεις της Φωτοδυναμικής θεραπείας προέρχονται από τρεις αλληλένδετους μηχανισμούς : την απευθείας τοξικότητα απέναντι στα καρκινικά κύτταρα του όγκου, την καταστροφή του αγγειακού συστήματος του όγκου και την επαγωγή μιας ισχυρής φλεγμονώδους αντίδρασης που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη συστημικής ανοσίας (Εικόνα 1).⁴ Η σχετική συνεισφορά αυτών των μηχανισμών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό στον τύπο και τη δόση του φωτοευαισθητοποιητή που χρησιμοποιείται, το χρόνο μεταξύ της χορήγησης του φαρμάκου και της έκθεσης στην ακτινοβολία, την ολική δόση ακτινοβολίας, την ισχύ της ακτινοβολίας, τα επίπεδα συγκέντρωσης οξυγόνου στον όγκο και άλλες μεταβλητές.



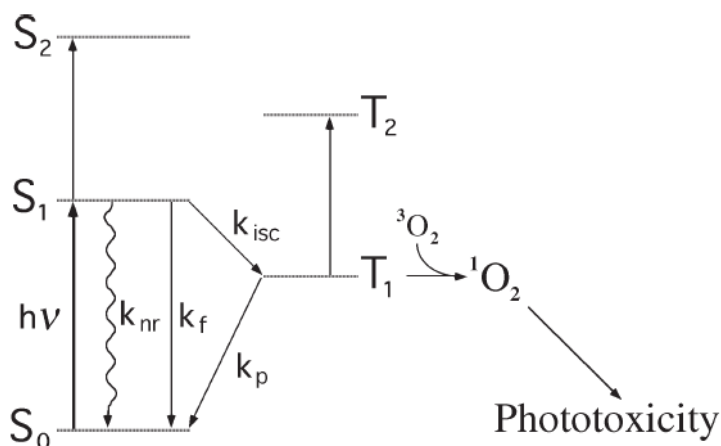
Εικόνα 1. Οι αρχές της Φωτοδυναμικής θεραπείας και οι μηχανισμοί καταστροφής των καρκινικών ιστών.⁴

Η PDT είναι μια διαδικασία δύο σταδίων. Μετά την χορήγηση ενός φωτοευαίσθητου φωτοευαισθητοποιητή, οι περιοχές του όγκου ακτινοβολούνται με φως κατάλληλου μήκους κύματος. Το φως αυτό μπορεί να φτάσει θεωρητικά σε οποιοδήποτε όργανο του σώματος με τη βοήθεια ελαστικής οπτικής ίνας (Εικόνα 1). Η επιλεκτικότητα επιτυγχάνεται λόγω της ικανότητας των φωτοευαισθητοποιητών να εγκαθίστανται αποκλειστικά στις νεοπλασματικές κακώσεις και παράλληλα στην ακριβή στόχευση των προς θεραπεία περιοχών.

1.3. Μηχανισμοί φωτοδυναμικής δράσης

Το πρώτο βήμα στη διαδικασία “φωτοευαισθητοποίησης” είναι η απορρόφηση ενός φωτονίου από τον φωτοευαισθητοποιητή στην βασική του κατάσταση και η μετάβασή του στην μικρού χρόνου ζωής διεγερμένη μονή (singlet) κατάσταση (Εικόνα 2). Η μονή κατάσταση υποπίπτει στην βασική κατάσταση, με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός με τη μορφή φθορισμού. Εναλλακτικά, μπορεί να μεταβεί μέσω εσωτερικής μετατροπής στην - πιο σταθερή - τριπλή διεγερμένη κατάσταση. Εκεί το ηλεκτρόνιο που μεταφέρεται σε υψηλότερη τροχιά, υφίσταται αναστροφή του spin του. Η τριπλή κατάσταση είναι επαρκώς μακρόβια ώστε να πάρει μέρος στις χημικές αντιδράσεις και επομένως η φωτοδυναμική δράση συμβαίνει κατά κύριο λόγο στην τριπλή κατάσταση.

Όταν το φως απορροφάται, η ενέργεια των απορροφούμενων φωτονίων κάνει το απορροφόν μόριο να διεγερθεί. Αυτή η ενέργεια διέγερσης μπορεί να μετατραπεί σε θερμότητα (κινητική ενέργεια) λόγω σύγκρουσης του διεγερμένου μορίου με τα γειτονικά του μόρια μέσω μη ακτινοβολιακής μετάβασης. Εναλλακτικά, μπορεί να επανεκπεμφθεί σαν φθορισμός. Στην Εικόνα 2 παρουσιάζονται σε απλό διάγραμμα Jablonski οι ηλεκτρονιακές ενεργειακές στάθμες μεταξύ των οποίων συμβαίνουν μεταβάσεις λόγω απορρόφησης υπεριώδους-ορατού φωτός ($\lambda=200-700$ nm).



Εικόνα 2. Διάγραμμα Jablonski- φωτοφυσικές αντιδράσεις διεγερμένου ατόμου φωτοευαισθητοποιητή.

Οι ηλεκτρονιακές στάθμες αναπαρίστανται σαν μονές καταστάσεις S₀, S₂ (singlet) και τις τριπλές καταστάσεις T₁ και T₂ (triplet). Με συμβατικές πηγές φωτός, η συνήθης

απορρόφηση του φωτός από κάποιο μόριο (πχ. χρωμοφόρο- φωτοευαίσθητοποιητή) περιλαμβάνει την διέγερση του μορίου από ένα φωτόνιο στην πρώτη διεγερμένη μονή στάθμη S_1 . Από αυτή τη κατάσταση το μόριο μπορεί να ξεκινήσει φωτοχημικές αντιδράσεις (εξαρτώμενες από την χημική του δομή) ή να κάνει μη-ακτινοβολιακή μετάβαση (Intersystem crossing) στην πρώτη τριπλή κατάσταση T_1 . Από την S_1 το διεγερμένο μόριο μπορεί επίσης να μεταβεί πίσω στην S_0 με μη-ακτινοβολιακή μετάβαση και να παράγει θερμότητα ή μπορεί να επανεκπέμψει ακτινοβολία ως φθορισμό, που αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς σκοπούς.

Έτσι λοιπόν υπάρχουν δύο τύποι φωτοδυναμικών αντιδράσεων, οι αντιδράσεις τύπου I και αντιδράσεις τύπου II.

Το μόριο στην τριπλή κατάσταση μπορεί είτε να μεταβεί στην βασική στάθμη με μη-ακτινοβολιακή μετάβαση, είτε να μεταφέρει την ενέργειά του στο μοριακό οξυγόνο (O_2), το οποίο έχει την ιδιαιτερότητα ότι είναι σε τριπλή κατάσταση στην βασική του στάθμη. Αυτή η διαδικασία οδηγεί στον σχηματισμό μονήρους οξυγόνου (1O_2) και η αντίδραση αυτή είναι γνωστή ως αντίδραση τύπου II. Η δε αντίδραση τύπου I συμβαίνει όταν το μόριο φωτοευαίσθητοποιητή αντιδράσει απευθείας με ένα οργανικό μόριο σε κυτταρικό επίπεδο, αναγκάζοντας ένα άτομο υδρογόνου ή ένα ηλεκτρόνιο να δημιουργήσει ελεύθερες ρίζες.^{5,6}

Αμφότερες οι αντιδράσεις τύπου I και τύπου II δημιουργούν οξειδωση των βιομορίων μέσα στα κύτταρα, αλλά το μονήρες οξυγόνο φαίνεται να είναι ο κύριος παράγοντας φωτοτοξικότητας στην Φωτοδυναμική θεραπεία.

1.4. Κυτταρικός θάνατος

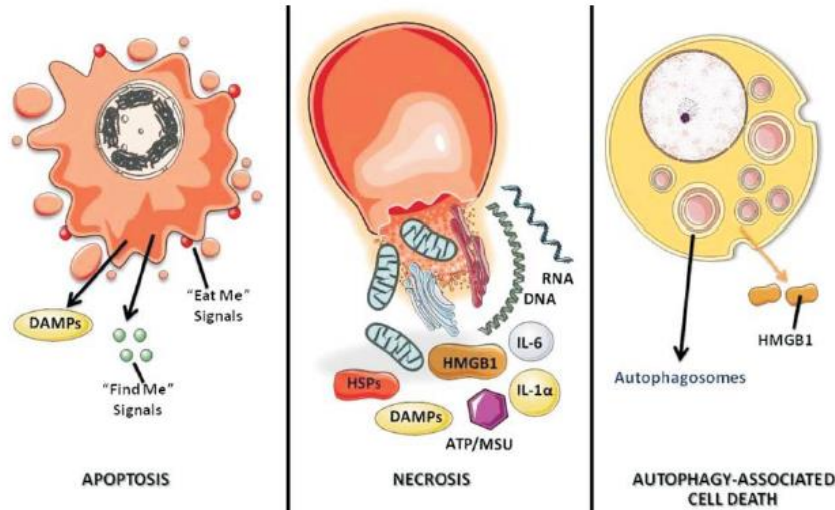
Η Φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να προκαλέσει τρία είδη κυτταρικού θανάτου: τον αποπτωτικό, νεκρωτικό και τον σχετιζόμενο με αυτοφαγία.

Η απόπτωση μορφολογικά χαρακτηρίζεται από συμπύκνωση χρωματινών, διάσπαση χρωμοσωμικού DNA σε ενδοπυρινοσωματικά θραύσματα, κυτταρική συρρίκνωση, διόγκωση της κυτταρικής μεμβράνης, και σχηματισμό αποπτωτικών σωμάτων χωρίς βλάβη της μεμβράνης του πλάσματος. Τυπικά τα αποπτωτικά κύτταρα απελευθερώνουν σήματα "βρές με" ή "φάε με" τα οποία χρειάζονται για την εκκαθάριση των υπολειπόμενων νεκρών κυττάρων από τα φαγοκύτταρα.

Η νέκρωση μορφολογικά χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία κενοτοπίων (κυτταρικά κενά) στο κυτταρόπλασμα, οίδημα και κατάρρευση της μεμβράνης του πλάσματος, με αποτέλεσμα μια φλεγμονώδη αντίδραση λόγω της απελευθέρωσης των κυτταρικών περιεχομένων και προφλεγμονωδών μορίων. Κλασικά, νέκρωση πιστεύεται ότι είναι το αποτέλεσμα παθολογικής προσβολής ή ότι προκαλείται από μία βιοενεργητική καταστροφή, εξάντληση της *adenosine triphosphate* (ATP) σε επίπεδο μη συμβατό με την επιβίωση του κυττάρου.

Αυτοφαγία χαρακτηρίζεται από μαζικό σχηματισμό κυτταρικών κενών στο κυτταρόπλασμα. Η αποδόμηση του αυτοφαγικού κυτταροπλάσματος απαιτεί το σχηματισμό μιας διπλής μεμβράνης, δομή που ονομάζεται ο *autophagosome*, η οποία απομονώνει κυτταροπλασματικά συστατικά, καθώς και οργανίδια και τα "οδηγεί" στα λυσοσώματα. Σε

ενήλικες οργανισμούς, η αυτοφαγία λειτουργεί ως μονοπάτι αυτο-πέψης προάγωντας την κυτταρική επιβίωση σε ένα δυσμενές περιβάλλον αλλά και ως μηχανισμός ελέγχου της ποιότητας αφού απομακρύνει τα κατεστραμμένα οργανίδια, τους τοξικούς μεταβολίτες, ή τους ενδοκυττάριους παθολόγους μικροοργανισμούς.⁴



Εικόνα 3. Τα τρία βασικά μονοπάτια κυτταρικού θανάτου.⁴

1.5. Πηγές φωτός στη φωτοδυναμική θεραπεία

Το φως ενεργοποίησης των φωτοευαίσθητοποιητών στη Φωτοδυναμική Θεραπεία, συνήθως παράγεται από lasers, ή σε μερικές περιπτώσεις λαμπτήρες ηλεκτρικού τόξου (arc lamps) ή από πηγές φθορισμού. Βέβαια τα laser χρησιμοποιούνται πιο πολύ χάρη στο μονοχρωματικό και σύμφωνο φως που παράγουν, το οποίο μπορεί να οδηγηθεί αποτελεσματικά με ίνες από quartz και να χρησιμοποιηθεί ως συσκευή φωτός για την Φωτοδυναμική θεραπεία αλλά και γενικότερα σε άλλες εφαρμογές.⁷

Αφού οι συσκευές laser καθαυτές αλλά και τα παρελκόμενά τους όπως ψυκτικές συσκευές, ή οι πηγές ισχύος τους, είναι θορυβώδης και ογκώδεις, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν κοντά στους ασθενείς. Γι' αυτό το φως μεταφέρεται με καλώδια οπτικών ινών στους χώρους θεραπείας και συχνά μέσω ενδοσκοπίου. Οι ίνες αυτές μπορούν εύκολα να συνδυαστούν με φακούς ή συστήματα φακών ή διαχύτες ώστε να έχουμε την καλύτερη δυνατή- κατά περίπτωση- ακτινοβολήση της προς θεραπεία περιοχής.

Για παράδειγμα, κοίλα σφαιρικά όργανα (όπως η ουροδόχος κύστη) μπορούν να φωτίζονται από μέσα με σφαιρικό διαχύτη, ενώ σωληνοειδή περιοχές (π.χ. οισοφάγος) μπορούν να φωτίζονται με κυλινδρικές ίνες διάχυσης διαφόρων μηκών.⁸

1.6. Διεισδυτικότητα του φωτός

Επιστήμονες όπως οι Svaasand, Bolin, Wilson και άλλοι^{9,10} έδειξαν ότι το φως με μήκος κύματος κοντά στα 800nm, περνά ως επι το πλείστον ελεύθερα μέσα από τους ιστούς. Αυτό μπορούμε να το διαπιστώσουμε εύκολα. Τοποθετώντας κανείς έναν φακό στο μάγουλό του ή στην άκρη ενός δακτύλου του, παρατηρεί ότι το φως διαπερνάει το μικρό πάχος αυτό των ιστών και μάλιστα φαίνεται κόκκινο στην εσωτερική επιφάνεια. Αυτό συμβαίνει λόγω της μεγαλύτερης διεισδυτικότητας του κόκκινου φωτός και όχι λόγω του αίματος όπως λανθασμένα αφήνεται να εννοηθεί πολλές φορές. Βέβαια το βάθος διείσδυσης εξαρτάται από τις οπτικές ιδιότητες των ιστών και το μήκος κύματος του φωτός, ουσιαστικά εξαρτάται από το ποσοστό διάχυσης του φωτός μέσα στους ιστούς.¹⁰ Όταν ένας αριθμός φωτονίων εισέρχονται στον ιστό, ένα τμήμα από αυτά ανακλάται από την επιφάνειά του, ενώ τα υπόλοιπα υφίστανται σκέδαση μέσα στον ιστό έως ότου είτε διαφύγουν, είτε απορροφηθούν από χρωμοφόρα (τα οποία μπορεί να είναι ενδογενή χρωμοφόρα μόρια του ιστού ή εξωγενή μόρια φωτοευαισθητοποιητών). Θεωρητικά μπορεί μερικά φωτόνια να περάσουν εξολοκλήρου τον ιστό, αλλά ο μικρός αριθμός τους καθιστά αδύνατη την ανίχνευσή τους (παρατήρησή τους). Τα μήκη κύματος που είναι μικρότερα από 800 nm σκεδάζονται πιο αποδοτικά από τα μακρομόρια διότι έχουν μέγεθος μικρότερο ή ίσο από αυτό των σωματιδίων. Ο συντελεστής εξασθένησης $\alpha(\text{cm}^{-1})$ περιγράφει την εκθετική μείωση ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος όταν αυτό διαπερνά έναν ιστό, ενώ είναι διαφορετικός για κάθε ιστό. Ο ρυθμός της ροής του φωτός σε βάθος "r" από σημειακή πηγή φωτός διαμέσου ενός όγκου μέσου που έχει την ιδιότητα να σκεδάζει, με συντελεστή εξασθένησης "α" δίνεται από την εξίσωση 1 η οποία προέρχεται από την θεωρία διάχυσης που περιγράφει αρκετά καλά τα πειραματικά δεδομένα.

$$\Psi = \Psi_0 \frac{e^{-\alpha r}}{r} \quad (1)$$

Ο Ρυθμός ροής μειώνεται εκθετικά με το βάθος. Έτσι μικρές αλλαγές στο συντελεστή εξασθένησης οδηγούν σε μεγάλες αλλαγές στον ρυθμό ροής με το βάθος. Ως εκ τούτου, είναι πλεονέκτημα να έχουμε φωτοευαισθητοποιητές που να απορροφούν κοντά στα 800 nm έτσι ώστε να μεγιστοποιείται το βάθος θεραπείας σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς.¹¹

1.7. Πλεονεκτήματα φωτοδυναμικής θεραπείας

Η PDT μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε πριν είτε μετά από χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ή χειρουργική επέμβαση χωρίς να διακυβεύεται η αποτελεσματικότητα αυτών των θεραπευτικών μεθόδων. Κανένας από τα κλινικά ελεγμένα PSs δεν συσσωρεύεται στους πυρήνες των κυττάρων, περιορίζοντας με αυτόν τον τρόπο καταστροφή στο DNA που θα μπορούσε να είναι καρκινογόνος ή να οδηγήσει σε ανάπτυξη ανθεκτικών κλώνων.

Εξάλλου, οι δυσμενείς επιδράσεις της χημειοθεραπείας και των ιοντιζουσών ακτινοβολιών απουσιάζουν. Επίσης η αντοχή του οργανισμού στις ακτινοβολίες ή στην χημειοθεραπεία δεν επηρεάζει την ευαισθησία στην φωτοδυναμική θεραπεία. Επίσης, τα εξαιρετικά

κοσμετικά αποτελέσματα της Φωτοδυναμικής Θεραπείας, την καθιστούν κατάλληλη για ασθενείς με δερματικούς καρκίνους. Δεν παρουσιάζονται σημαντικές αλλαγές στην θερμοκρασία των ιστών και η διατήρηση των συνδετικών ιστών οδηγεί σε ελάχιστη ίνωση, επιτρέποντας τη διατήρηση της λειτουργικής ανατομίας και της μηχανικής ακεραιότητας των κοίλων οργάνων που υποβάλλονται σε PDT.

Σε ασθενείς-κατόπιν επιλογής- με μη εγχειρήσιμους όγκους, όπου έχουν εξαντλήσει τις επιλογές άλλων θεραπειών, η PDT μπορεί να πετύχει βελτίωση της ποιότητας ζωής τους. Τέλος οι μόνες αρνητικές επιδράσεις της PDT σχετίζονται με τον πόνο κατά τη διάρκεια κάποιων πρωτόκολλων θεραπείας και η παραμένουσα φωτοευαισθησία του δέρματος η οποία όμως έχει καταστρατηγηθεί από νεότερους φωτοευαισθητοποιητικούς παράγοντες.

Κεφάλαιο 2.

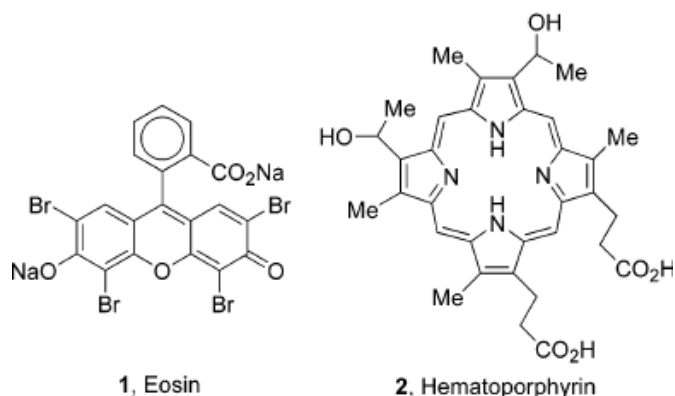
Φωτοευαισθητοποιητές

2.1. Ιδιότητες ενός Καλού φωτοευαισθητοποιητή

Στην ιατρική χημεία, το κρίσιμο στοιχείο σε όλες αυτές τις διαδικασίες είναι ο φωτοευαισθητοποιητής, ο οποίος πρέπει να είναι εντοπισμένος στη περιοχή της φωτοδυναμικής δράσης, να απορροφά τα κατάλληλα μήκη κύματος του φωτός, και να παράγει την επιθυμητή βιολογική απόκριση. Για τη θεραπεία του καρκίνου, ο ιδανικός φωτοευαισθητοποιητής πρέπει να πληροί τις ακόλουθες προϋποθέσεις: (1) να είναι χημικώς καθαρό και γνωστής σύνθεσης, (2) να έχει ελάχιστη τοξικότητα και να είναι μόνο κυτταροτοξικός με την παρουσία του φωτός, (3) να διατηρείται επιλεκτικά από τον ιστό-στόχο, (4) να αποβάλλεται γρήγορα από το σώμα για να παρέχει χαμηλή συστηματική τοξικότητα, (5) να έχει υψηλή κβαντική απόδοση για τη φωτοχημική εκδήλωση, η οποία είναι η παραγωγή μονήρους οξυγόνου ($^1\text{O}_2$) και (6) να έχουν ισχυρή απορρόφηση με υψηλό συντελεστή αποσβέσεως στην περιοχή 600-800 nm, όπου διείσδυση ιστού του φωτός είναι σε ένα μέγιστο και όπου τα μήκη κύματος του φωτός είναι ακόμα αρκετά ενεργητικά ώστε να παράγουν μονήρες οξυγόνο.¹² Τέλος, θα πρέπει να είναι φτηνή σχετικά ουσία, εύκολη στη σύνθεση και εμπορικά διαθέσιμη.

2.2. Κατηγορίες και γενιές φωτοευαισθητοποιητών

Οι φωτοευαισθητοποιητές διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: σε αυτούς που έχουν ως βάση την πορφυρίνη και σε αυτούς χωρίς πορφυρίνη. Οι φωτοευαισθητοποιητές που έχουν ως βάση την πορφυρίνη ταξινομούνται επίσης σε πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς. Η αιματοπορφυρίνη (Hp) είναι ένας πρώτης γενιάς φωτοευαισθητοποιητής, ο οποίος απομονώθηκε από την αιμογλοβίνη το 1841.^{5,13} Οι περιορισμοί ωστόσο που εμφάνισε αυτός ο πρώτος φωτοευαισθητοποιητής, δημιούργησε την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα, προκειμένου να βρεθούν νέες ουσίες με καλύτερες ιδιότητες και χαμηλότερες τοξικές παρενέργειες, οδηγώντας έτσι στη δεύτερη γενιά φωτοευαισθητοποιητών. Αυτοί οι τύποι φωτοευαισθητοποιητών, παρουσιάζουν μεγαλύτερη απορρόφηση σε μήκος κύματος 650 – 800nm, όπου η διείσδυση στον ιστό είναι βέλτιστη και έχουν υψηλότερους συντελεστές εξασθένισης της απορρόφησης στο κόκκινο, από ότι τα συστατικά πρώτης γενιάς.¹⁴ Η συσσώρευση τους στον ιστό είναι πολύ συντομότερη και συνεπώς η θεραπεία μπορεί να διεξαχθεί την ίδια μέρα με τη χορήγηση του φαρμάκου. Επιπλέον, οι φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς, επιδεικνύουν χαμηλότερη τοξικότητα αλλά δυστυχώς οι περισσότεροι από αυτούς είναι ακόμα πολύ υδροφοβικοί παράγοντες και εμφανίζουν χαμηλή επιλεκτικότητα ως προς τον όγκο. Έτσι, κατέστη απαραίτητη η ανάπτυξη ουσιών με βελτιωμένη ικανότητα παράδοσης (στα σημεία προς θεραπεία) και επιλεκτικότητας. Αυτά τα νέα φωτοευαισθητo-φάρμακα στοχεύουν επιλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση της συσσώρευσης στους υγιείς ιστούς.¹⁵ Η ανάπτυξη ασφαλών και ιδιαίτερα επιλεκτικών φωτοευαισθητοποιητικών παραγόντων αποτελεί το κύριο θέμα πολλών ερευνητικών προγραμμάτων σε εξέλιξη.¹³

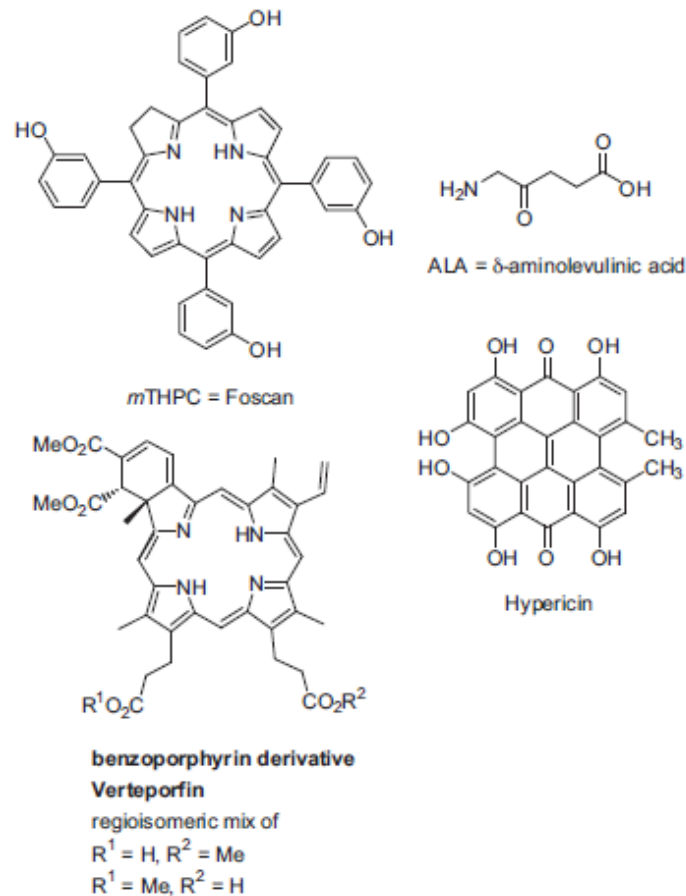


Εικόνα 4. Διαγράμματα των *Hematoporphyrin* και *Eosin*.

Η ανάπτυξη μη προφυρινούχων φωτοευαισθητοποιητών υστερεί σημαντικά έναντι των φωτοευαισθητοποιητών με βάση την πορφυρίνη. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί η *hypericin*, ένα φυσικό συστατικό που συναντάται στα φυτά *Hypericum* με απορρόφηση γύρω στα 590nm.¹³ Η ουσία αυτή, εμφανίζει υψηλή παραγωγή μονήρους οξυγόνου, ελάχιστη τοξικότητα απουσία φωτός και υψηλό βαθμό απομάκρυνσης από το σώμα μετά την χορήγηση. Άλλα παραδείγματα αποτελούν οι κατιονικοί φωτοευαισθητοποιητές (*methylene blue*, *cyanine dyes*, *rhodacyanine dyes*) που παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από 600nm.

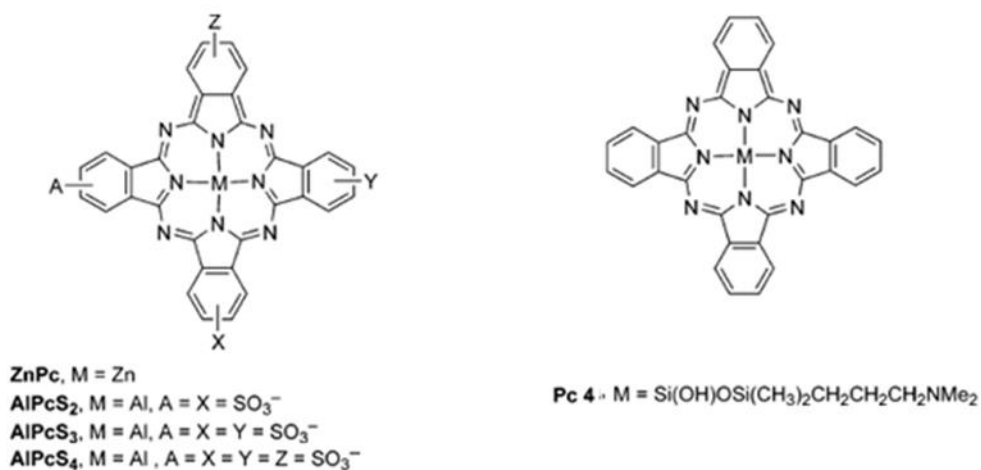
Ο πρώτος φωτοευαισθητοποιητής που εγκρίθηκε για κλινική χρήση ήταν η *PhotofrinR* (porfimer sodium) το 1993 στον Καναδά, η οποία εμφάνιζε απορρόφηση στα 625 – 630 nm, επιτρέποντας διείσδυση της θεραπευτικής PDT σε βάθος 5 – 10mm. Μέχρι σήμερα η *PhotofrinR*, έχει εγκριθεί στις περισσότερες χώρες για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου, όπως καρκίνο του οισοφάγου, επιφανειακό καρκίνο της κύστης, καρκίνο του πνεύμονα καθώς και για κακοήθεις και μη κακοήθεις ασθένειες του δέρματος. Παρόλα αυτά, παρουσιάζει περιορισμούς για τη χρήση στην PDT λόγω κακής υδατοδιαλυτότητας, παραμένουσας φωτοευαισθησίας και απουσίας απορρόφησης σε μεγάλα μήκη κύματος.

Λόγω των μειονεκτημάτων της *PhotofrinR*, έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός φωτοευαισθητοποιητών δεύτερης γενιάς όπως προαναφέρθηκε. Σε αντίθεση με αυτούς της πρώτης γενιάς, αυτοί παρασκευάζονται χημικά σαν καθαρά συστατικά με σταθερή σύσταση, έχουν ισχυρή απορρόφηση σε μεγάλα μήκη κύματος εύρους 650 – 800nm όπου έχουμε βέλτιστη διείσδυση στον ιστό, απομακρύνονται γρήγορα από τον ιστό και διαθέτουν μεγαλύτερους συντελεστές εξάλειψης απορρόφησης στο κόκκινο. Ένα τυπικό παράδειγμα φωτοευαισθητοποιητή δεύτερης γενιάς, αποτελεί η *5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin*, η οποία διαθέτει υψηλή κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρους οξυγόνου που ενεργοποιείται σε μήκος κύματος 652 nm. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα εις βάθος διείσδυση του φωτός πάνω από 1 cm και υψηλή επιλεκτικότητα ως προς τον όγκο. Ακτινοβολία με μήκος κύματος μεγαλύτερο από 850nm δεν χρησιμοποιείται, λόγω της χαμηλής του ενέργειας η οποία δεν επαρκεί για να ξεκινήσει η φωτοχημική αντίδραση.¹⁶



Εικόνα 5. Δομές ορισμένων φωτοευαίσθητοποιητών δεύτερης γενιάς.¹⁸

2.3. Φθαλοκυανίνες και σχετικά συστατικά



Εικόνα 6. . Διαγράμματα φθαλοκυανινών.¹⁶

Οι φθαλοκυανίνες όπως αυτές στην Εικόνα 6, απορροφούν πολύ έντονα στην κόκκινη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, με μέγιστο απορρόφησης στο παράθυρο 670-

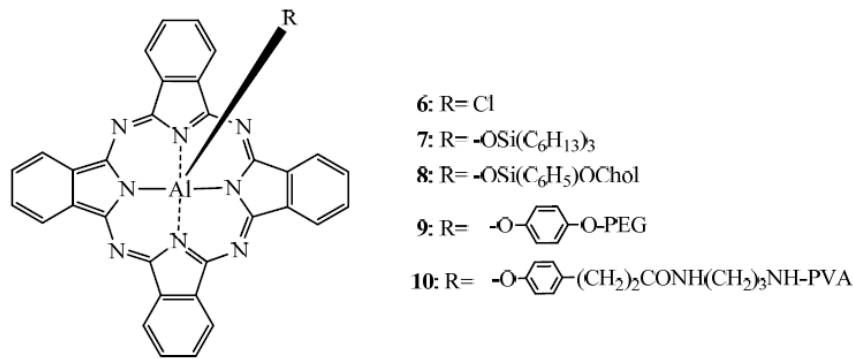
780 nm με τιμές μεγαλύτερες από $100000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.¹⁶ Τα μόρια αυτά παρασκευάζονται εύκολα, ενώ τα υδατοδιαλυτά παράγωγά τους μπορούν να παρασκευαστούν με *sulfonation* του πυρήνα της φθαλοκυανίνης.¹⁷ Οι φθαλοκυανίνες ψευδαργύρου, αργιλίου και πυρητίου είναι αποτελεσματικές γεννήτριες μονήρους οξυγόνου, με μακρόβιες τριπλές καταστάσεις που έχει διαπιστωθεί ότι είναι χρήσιμοι φωτοευαισθητοποιητές για χρήση σε Φωτοδυναμική Θεραπεία.¹⁸ Η φθαλοκυανίνη πυριτίου Pc4 ($\lambda_{\text{max}}=670 \text{ nm}$) χρησιμοποιείται σε διάφορα στάδια κλινικής αξιολόγησης για δερματικές ή υποδόριες κακώσεις που προέρχονται από μια ποικιλία συμπαγών όγκων.

Οι φθαλοκυανίνες και οι ναφθαλοκυανίνες παρασκευάζονται με “αναγωγικό *tetramerization*” των *phthalonitriles* και των *naphthalene-2,3-dinitriles* (ή αντίστοιχα μονομερή), αντίστοιχα. Ένα μέταλλο ή μεταλλικό άλας συμπεριλαμβάνεται στη μίξη των αντιδράσεων αφού χρησιμεύει ως πηγή ηλεκτρονίων. Οι μεταλλο-φθαλοκυανίνες και ειδικά το μίγμα χαλκού ήταν από τις πιο σημαντικές χρωστικές στο εμπόριο τη δεκαετία του 30.

2.4. Η Αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη (AICIPc)

Η αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη, AICIPc, είναι ένα παράγωγο των φθαλοκυανινών. Μπορεί να συντεθεί εύκολα άρα δεν έχει μεγάλο κόστος παραγωγής και είναι ένας εμπορικά διαθέσιμος φωτοευαισθητοποιητής. Ανήκει στους φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς. Το μόριό της όταν διεγερθεί από ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος μπορεί να παράξει ικανοποιητικό αριθμό ελευθέρων ριζών καθιστώντας την έτσι ιδιαίτερα τοξική για τα καρκινικά κύτταρα. Για τους παραπάνω λόγους θεωρείται ιδανικός φωτοευαισθητοποιητής για τη φωτοδυναμική θεραπεία. Παρόλα αυτά η χρήση της ως φωτοευαισθητοποιητής στην φωτοδυναμική θεραπεία βρίσκεται ακόμα σε πειραματικό στάδιο, αφού δεν έχει πάρει έγκριση από την Ευρωπαϊκή Ένωση για να χρησιμοποιηθεί κλινικά.

Σχετικά με την χημική μορφοποίηση των φωτοευαισθητοποιητών αυτών, η διαφοροποίηση των αξονικών υποκατάστατων είναι ένας άλλος τρόπος να διαμορφώνει τις φαρμακολογικές, φαρμακευτικές, καθώς και οπτικές ιδιότητες των Φθαλοκυανινών. 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 είναι στο κέντρο του μορίου το οποίο με τη σειρά του είναι συνδεδεμένο με ένα άτομο χλωρίου. Όπως επιβεβαιώθηκε από τον Chan et al., Ben Hur αρχικά αναφέρει ότι μια απλή Pc φέρει ένα χλώριο ως αντίθετο ιόν (Εικόνα 7) ήταν φωτοδυναμικά πιο ενεργή από σουλφονωμένα ομολογά της.¹⁹ Για την περαιτέρω βελτίωση αυτών των ενώσεων συστηματικές μελέτες με διαφορετικές μεταβολές των αξονικών υποκαταστατών έχουν γίνει. Decreau et al. ανέφεραν αύξηση της φωτοτοξικότητας με την αύξηση της υδροφοβικότητας των παραγώγων της AICIPc.²⁰

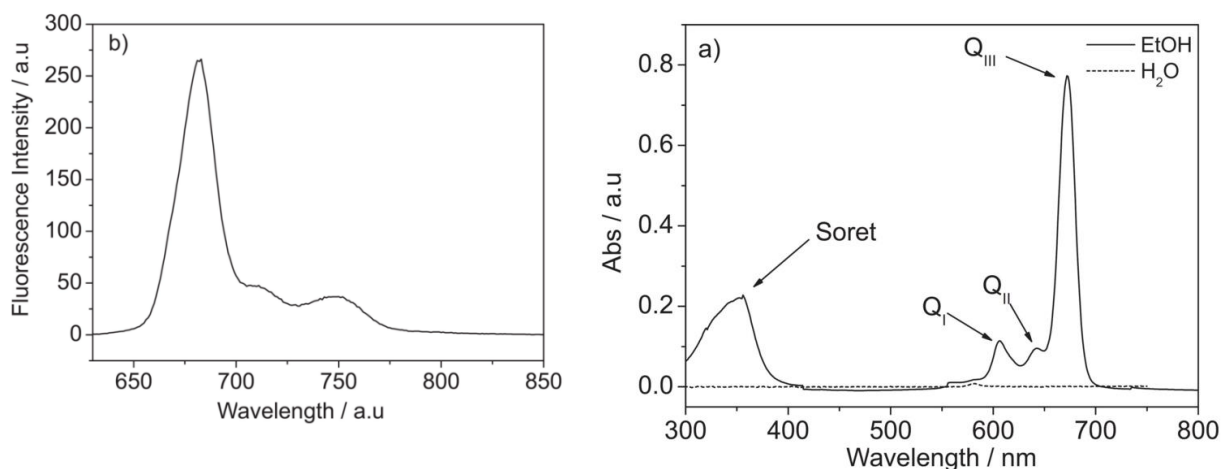


Εικόνα 7. Χημική δομή της AlPc 6-10.

Εκτός από τη χρήση των γαλακτωμάτων με βάση *Cremophor EL*, μερικές προσπάθειες έχουν αναφερθεί σχετικά με την σχηματοποίηση της AlClPc σε κατάλληλα οχήματα διανομής όπως πολυμερή ευαίσθητα στο pH μικκύλια με στόχο τη βελτίωση της φωτοδυναμικής δράσης της PDT βασισμένης στην AlClPc.

Η εγγενής μη-διαλυτότητα της AlClPc σε υδατικά μέσα ασφαλώς αντιπροσωπεύει ένα μειονέκτημα εάν είναι επιθυμητή η συστηματική χορήγηση του φαρμάκου. Ωστόσο, στην περίπτωση της τοπικής εφαρμογής, για τη θεραπεία του *non-melanoma* καρκίνου του δέρματος η συσσωμάτωση της φθαλοκυανίνης μπορεί να παρακαμφθεί με τη χρήση φαρμακευτικά αποδεκτών διαλυτών όπως DMSO, που από τη μια καθιστούν δυνατή τη διάλυση του φαρμάκου και επιπροσθέτως ενισχύουν την διαπερατότητα του δέρματος.²¹

Η Αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη παρουσιάζει υψηλό χρόνο ημιζωής στη τριπλή στάθμη (720 μs), ο οποίος οφείλεται στο άτομο του αλουμινίου, κβαντική απόδοση της τριπλής διεγερμένης κατάστασης $\Phi=0.2$ και κβαντική απόδοση της μονήρους κατάστασης οξυγόνου $\Phi=0,29$. Χάρη στο άτομο του αλουμινίου επίσης ο αριθμός των ελευθέρων ριζών που παράγονται κατά τη διάρκεια της Φωτοδυναμικής Θεραπείας είναι πολύ μεγάλος, καθιστώντας έτσι την Φθαλοκυανίνη ιδιαίτερα τοξική για τα καρκινικά κύτταρα.²² Όσον αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες της Αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνης, αυτή παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στην περιοχή του ερυθρού και συγκεκριμένα γύρω στα 680 nm. Μια δεύτερη κορυφή απορρόφησης παρουσιάζει στα 625 nm και μια τρίτη παρατηρείται στα 370 nm στη περιοχή του υπεριώδους.²³



Εικόνα 8. Φάσματα φθορισμού και απορρόφησης της AlClPc.

Κεφάλαιο 3.

Νανοσωματίδια στην “πλοήγηση” φαρμάκων

Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT), όπως είπαμε, είναι μια μη επεμβατική μέθοδος, η οποία στοχεύει στη θεραπεία ογκολογικών περιστατικών και βασίζεται στη χορήγηση μη τοξικών φωτοευαισθητοποιητικών φαρμάκων στο σώμα σε συνδυασμό με την ακόλουθη ακτινοβολή τους με μη επιβλαβείς δόσεις φωτός. Οι φωτοευαισθητοποιητές, μετά την ενεργοποίησή τους, μεταφέρουν ενέργεια στο μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα την παραγωγή ενεργών ειδών οξυγόνου, τα οποία με τη σειρά τους οδηγούν σε απόπτωση ή νέκρωση των κυττάρων. Η μέθοδος αυτή, αν και έχει βελτιώσει σημαντικά την ποιότητα αλλά και τον χρόνο ζωής πολλών καρκινοπαθών ασθενών, προσφέρει μεγάλες δυνατότητες για περαιτέρω βελτίωση. Σε συνδυασμό με την ανάπτυξη νέων φαρμάκων για εφαρμογή στην PDT, η χρήση φορέων στη νανοκλίμακα για τη μεταφορά των φωτοευαισθητοποιητών αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση, που μπορεί να βελτιώσει την αποδοτικότητα της φωτοδυναμικής δραστηριότητας και να υπερνικήσει αρκετές παρενέργειες που σχετίζονται με την κλασσική φωτοδυναμική θεραπεία. Στο παρόν κεφάλαιο, γίνεται αναφορά στις νανοϊατρικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται στη Φωτοδυναμική Θεραπεία καθώς και στους περιορισμούς που συναντώνται, ενώ επίσης δίνεται έμφαση στους διαφορετικούς τύπους νανοσωματιδίων που βρίσκουν εφαρμογή ως νανοφορείς των φωτοευαισθητοποιητών στα συστήματα χορήγησης φαρμάκων.

3.1. Drug delivery - Πλεονεκτήματα των νανοσωματιδίων ως μεταφορείς φωτοευαισθητοποιητών

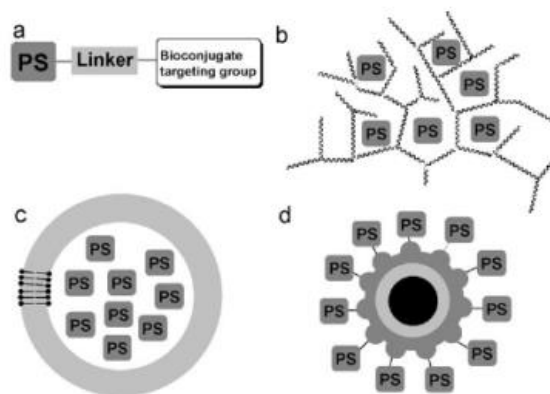
Ο όρος «drug delivery», αναφέρεται στις μεθόδους και τις διαδικασίες οι οποίες χρησιμοποιούνται, ώστε το φάρμακο με τον φωτοευαισθητοποιητή να φτάσει στο επιθυμητό σημείο του όγκου και να εναποθέσει των φωτοευαισθητοποιητή με την μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια και απόδοση στα κύτταρα, έχοντας τις ελάχιστες παρενέργειες για τα κύτταρα και κατ'επέκταση για τον οργανισμό.

Πιο συγκεκριμένα, το ιδανικό σύστημα χορήγησης των φαρμάκων θα πρέπει να είναι βιοδιασπώμενο, να έχει μικρές διαστάσεις (μέγεθος) και υψηλή ικανότητα φόρτωσης, να εμφανίζει ελάχιστη ανοσογονικότητα, να είναι μη τοξικό και να μη προκαλεί ανεπιθύμητες ενέργειες. Επίσης, θα πρέπει να μην παρουσιάζει παρατεταμένη παραμονή στην κυκλοφορία μέσα στο σώμα μετά από τη χορήγηση και να έχει την ελάχιστη τάση για αυτο-συσσωμάτωση, ενώ είναι σημαντικό η συσσώρευση να γίνεται επιλεκτικά στην απαιτούμενη περιοχή σε θεραπευτική συγκέντρωση, με ελάχιστη ή ακόμη και καθόλου πρόσληψη από τα παρακείμενα υγιή κύτταρα. Η χρήση φορέων φωτοευαισθητοποιητών που ανήκουν στην νανοκλίμακα, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση, η οποία παρέχει τη δυνατότητα βελτίωσης της απόδοσης της φωτοδυναμικής θεραπείας ενώ παράλληλα μπορεί να βοηθήσει ώστε να ξεπεραστούν πολλές παρενέργειες που σχετίζονται με την κλασσική εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Ειδικά η χρήση των υπαρχόντων φωτοευαισθητοποιητών σε συνδυασμό με τα νανοσωματίδια και το πέρασμα στην “Νανοϊατρική” αποτελεί μια ενδιαφέρουσα δυνατότητα ως προς τις παραπάνω απαιτήσεις. Η προσέγγιση αυτή, παρουσιάζει ήδη ελπιδοφόρα αποτελέσματα, τέτοια ώστε να μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Στο σημείο αυτό, πρέπει να δώσουμε ένα σύντομο ορισμό της Νανοιατρικής: Νανοιατρική, είναι η ιατρική εφαρμογή της νανοτεχνολογίας για τη διάγνωση και τη θεραπεία ανθρωπίνων ασθενειών. Χρησιμοποιεί κατά κανόνα ακριβώς σχεδιασμένα υλικά, γνωστά ως νανοσωματίδια, διαστάσεων της τάξης 1 – 100nm. Τα νανοσωματίδια διαθέτουν μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως μικρό μέγεθος, μεγάλο λόγο επιφάνειας προς όγκο και υψηλή χημική δραστικότητα, και οι οποίες χρησιμοποιούνται προκειμένου να ξεπεραστούν ορισμένοι περιορισμοί στους οποίους θα αναφερθούμε στη συνέχεια.

Ένας βασικός περιορισμός της φωτοδυναμικής θεραπείας, είναι η μικρή διαλυτότητα στον νερό που παρουσιάζουν οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές, καθώς και η τάση τους να δημιουργούν συσσωματώματα υπο φυσιολογικές συνθήκες. Τα νανοσωματίδια μπορούν να αυξήσουν τη διαλυτότητα των υδροφοβικών φαρμάκων και να προσφέρουν ιδιότητες υδροφιλικότητας και πρέποντος μεγέθους για τη συσσώρευσή τους μέσα στον καρκινικό ιστό, μέσω του φαινομένου EPR (*Enhanced permeability and retention effect*). Επιπλέον, η ικανότητα της επιλεκτικής συσσώρευσης μπορεί να βελτιωθεί με την τροποποίηση της επιφανειακής περιοχής, χρησιμοποιώντας άλλα συνδεδεμένα στοιχεία/προσδέτες (ligands) με τον υποδοχέα, προσφέροντας έτσι μια ελκυστική στρατηγική ώστε το φάρμακο να παρέχεται αποτελεσματικότερα στα καρκινικά κύτταρα και παράλληλα να κρατείται μακριά από τον υγιή ιστό ο οποίος είναι ευαίσθητος στην τοξική επίδραση. Επίσης, τα νανοσωματίδια μπορούν να παρατείνουν τον χρόνο ημιζωής παραμονής στην κυκλοφορία του αίματος, να ελαχιστοποιήσουν την αποδόμηση του φαρμάκου μετά την χορήγηση, να μειώσουν τις παρανέργειες και να αυξήσουν τη βιοσυμβατότητα των φαρμάκων.



Εικόνα 9. Νανοστρατηγικές για την τροποποίηση των φωτοευαισθητοποιητών

3.2. Νανοστρατηγικές και Είδη νανοσωματιδίων

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι τροποποίησης των φωτοευαισθητοποιητών, που έχουν ως στόχο τη βελτίωση της επίδρασης της φωτοδυναμικής θεραπείας. Μια στρατηγική, περιλαμβάνει την τροποποίηση αυτών με τον εγκλεισμό τους σε παράγοντες μεταφοράς,

όπως λιποσώματα, μικίλια, λιποσώματα με κεραμική βάση, νανοσωματίδια χρυσού, νανοσωματίδια πολυμερών και διάφορα άλλα, ενώ επίσης αρκετά πλεονεκτήματα εμφανίζει και η στρατηγική ενεργητικής στόχευσης.

3.2.1. Βιοδιασπώμενα και μη-βιοδιασπώμενα Νανοσωματίδια

Τα βιοδιασπώμενα και μη – βιοδιασπώμενα νανοσωματίδια τα οποία εγκλείουν φωτοευαισθητοποιητικά φάρμακα παρουσιάζουν μια ποικιλία από πλεονεκτήματα. Λόγω του μικρού τους μεγέθους δεν απομακρύνονται από το σώμα μέσω του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, οδηγώντας έτσι σε μεγαλύτερους χρόνους ημιζωής. Επίσης, διαθέτουν ισχυρή ικανότητα να προστατεύουν τους έγκλειστους παράγοντες, είναι συμβατά με βιολογικά συστήματα και η επιφάνειά τους μπορεί εύκολα να τροποποιηθεί με λειτουργικές ομάδες όπως αντισώματα ή άλλα συνδετικά στοιχεία, ώστε να βελτιωθεί η επιλεκτικότητα.

3.2.2. Nanodiamonds (ND)

Μια άλλη δυνατότητα είναι η χρήση των *nanodiamonds*. Αυτά είναι βιοσυμβατά μόρια, με ελάχιστη τοξικότητα ως προς τα κύτταρα και είναι εμπορικά διαθέσιμα ως νανοϋλικά άνθρακα με δομή διαμαντιού στη νανοκλίμακα, προσφέροντας αρκετές δυνατότητες στις ιατρικές εφαρμογές. Είναι κατάλληλα για ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκων, χάρη στην δυνατότητά τους να απελευθερώνουν αργά και σταθερά τις ουσίες, ενώ επίσης διαθέτουν ακριβή κατανομή σωματιδίων, μεγάλο λόγο επιφάνειας προς όγκο και ικανοποιητική χωρητικότητα για φόρτωση φαρμάκων. Επιπλέον, τα *nanodiamonds* είναι σταθερά στο νερό, πράγμα που τα καθιστά ένα πολλά υποσχόμενο και σημαντικό εργαλείο, υπό την προϋπόθεση βέβαια ότι ο χρόνος κατακράτησής τους δεν είναι μεγάλος.

3.2.3. Νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs)

Οι νανοσωλήνες άνθρακα αποτελούν επίσης μια ξεχωριστή δυνατότητα για χορήγηση φωτοευαισθητοποιητών στους απαιτούμενους ιστούς. Αυτές οι δομές προκύπτουν κατά τη δίπλωση φύλλων άνθρακα σε «κούφιους» σωλήνες, οι οποίοι μπορεί να είναι είτε μονού τοιχώματος (SWCNTs) είτε πολλαπλού τοιχώματος (MWCNTs). Είναι σημαντικό το γεγονός, ότι αφαιρούνται τάχιστα από το ανθρώπινο σώμα ενώ οι διαλυτοποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα δεν εμφανίζουν σημαντική κυτταροτοξικότητα. Επιπλέον, μπορούν να τροποποιηθούν με τέτοιον τρόπο, ώστε να μεταφέρουν δραστικές ουσίες ή ομάδες στόχευσης που μπορούν να συνδεθούν με ομοιοπολικούς δεσμούς. Οι νανοσωλήνες άνθρακα, απορροφούν φως στο εγγύς-υπέρυθρο και μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο μέσα στα ζώντα κύτταρα ως αποτέλεσμα της υπερβολικής τοπικής θέρμανσης. Ωστόσο, υπάρχουν αμφιβολίες για την μακροχρόνια χρήση τους, διότι μπορεί να αποτελέσουν κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου.

3.2.4. Νανοσωματίδια ενεργητικής στόχευσης

Ιδανικά, η PDT είναι μια μέθοδος που υπόσχεται επιλεκτικότητα μέσω της στοχευμένης απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή από τον όγκο και την περιορισμένη περιοχή ακτινοβολήσης. Ωστόσο, για εφαρμογές της PDT σε περίπλοκες ανατομικά περιοχές, η

περιορισμένη ακτινοβολήση δεν είναι εφικτή, οδηγώντας έτσι σε φωτοτοξικότητα των υγιών ιστών. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις παραμένουσας φωτοευαισθησίας στο δέρμα μετά την έκθεση στον ήλιο.²⁴ Τα στοχευμένα συστήματα χορήγησης φαρμάκων είναι μία από τις στρατηγικές που προτείνεται για τη λύση αυτών των προβλημάτων, υποβαθμίζοντας την μη εξειδικευμένη συσσώρευση του PS.

Η ενεργητική στόχευση, περιλαμβάνει τη στρατηγική της σύζευξης ενός συγκεκριμένου μορίου στην επιφάνεια ενός νανοσωματιδίου, ενισχύοντας έτσι την επιλεκτική τους αλληλεπίδραση με τα κύτταρα – στόχους που αναγνωρίζονται από ειδικούς «ανιχνευτές». Αν και τα μονοκλωνικά αντισώματα (MoAbs) έχουν λάβει τη μεγαλύτερη προσοχή, οι βιοχημικές, μεταβολικές και φυσιολογικές τροποποιήσεις των καρκινικών κυττάρων προσφέρουν μια πληθώρα άλλων δυνατικών στόχων προς εκμετάλλευση κατά την χορήγηση του PS. Τα στοχευμένα νανοσωματίδια παρέχουν αρκετά πλεονεκτήματα. Η τοπική εξειδίκευση αυξάνει την αποδοτικότητα και την αποτελεσματικότητα της PDT, συντελώντας σε χαμηλότερη δόση ακτινοβολήσης. Αντίθετα με άλλες στρατηγικές, όπως είναι η σύνδεση του φωτοευαισθητοποιητή με προσδέτες, τα στοχευμένα νανοσωματίδια μπορούν να παραδώσουν χιλιάδες μόρια του PS χρησιμοποιώντας λιγότερα μόρια προσδετών ανά νανοσωματίδιο, μειώνοντας έτσι σημαντικά το κόστος και την κατανάλωση χρόνου. Η στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων είναι μια υποσχόμενη στρατηγική για τη βελτίωση της αποδοτικότητας αλλά και της ασφάλειας του PS. Ωστόσο ένα δυναμικό μειονέκτημα της, σχετίζεται με αυτό που καλείται «*binding site barrier*», όπου σύμφωνα με την υπόθεση αυτή τα μακρομορία-προσδέτες θα μπορούσαν να παρεμποδιστούν από την διείσδυση τους στον όγκο μέσω της επιτυχούς τους σύνθεσης με τον ανιχνευτή στόχου.

3.2.5. Παθητικά νανοσωματίδια (παθητική στόχευση)

Τα παθητικά νανοσωματίδια είναι ουσίες, που λόγω του μικρού τους μεγέθους είναι ικανά να διεισδύουν και να συσσωρεύονται αυθόρμητα στις διάφορες βιολογικές περιοχές που χαρακτηρίζονται από ανώμαλες αγγειακές μεμβράνες, όπως σε στερεούς όγκους, μέσω του φαινομένου EPR. Το φαινόμενο αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι κάτω από ορισμένες συνθήκες, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση φλεγμονής που είναι χαρακτηριστική στους όγκους, η ενδοθηλιακή ευθυγράμμιση του τείχους των αιμοφόρων αγγείων, γίνεται πιο διαπερατή από ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι οποίες επιτρέπουν σωματίδια μεγέθους 200 - 800nm να συσσωρεύονται στο ενδιάμεσο διάστημα.²⁵

Αυτά τα νανοσωματίδια όταν φορτωθούν με φαρμακευτικούς παράγοντες, έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρουν το φορτίο τους στην περιοχή αυξημένης διαπερατότητας και να απελευθερώσουν το φάρμακο πολύ κοντά στο στόχο τους. Η στόχευση του όγκου που βασίζεται στο φαινόμενο EPR, απαιτεί τα φάρμακα να έχουν μεγάλη διάρκεια κυκλοφορίας, καθώς είναι απαραίτητο να παραμένουν στο κυκλοφοριακό σύστημα για εκτεταμένο χρόνο ώστε να παρέχουν αποτελεσματικό επίπεδο συσσώρευσης στην περιοχή – στόχο [25]. Συνεπώς, φαρμακευτικοί νανοφορείς μεγάλου χρόνου κυκλοφορίας, όπως τα λιποσώματα τα μικύλλια και τα πολυμερικά νανοσωματίδια, είναι ικανά να συσσωρεύονται στην παθολογική περιοχή μέσω του φαινομένου EPR και γι' αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως για την παράδοση φαρμάκων στον όγκο. Παρόλα αυτά, απαιτείται προσεκτικός έλεγχος, καθώς στην περίπτωση της PDT, κάτι τέτοιο μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα εμφάνιση μεγαλύτερης φωτοευαισθησίας.

3.2.6. Λιποσώματα

Τα λιποσώματα παρασκευάζονται τεχνητά στη νανοκλίμακα από φυσικά φωσφολιπίδια και χοληστερόλη και διαθέτουν σφαιρικό σχήμα. Ανακαλύφθηκαν το 1961 από τον Alec δ. Bangham, που μελετούσε τα φωσφολιπίδια και την πήξη του αίματος, και από τότε έχουν αποτελέσει πολύ χρήσιμα εργαλεία στη βιολογία, τη βιοχημεία, και την ιατρική.²⁶ Τα λιποσώματα μπορούν να εσωκλείσουν φάρμακα και να χρησιμοποιηθούν ως φορείς φαρμάκων για τον καρκίνο αλλά και για άλλες ασθένειες. Συνεπώς, τα λιποσώματα μέχρι στιγμής, έχουν μελετηθεί εντατικά για την χρήση τους ως φορείς φωτοευαισθητοποιητών .²⁷ Λόγω της δομής τους, η οποία αποτελείται από φωσφολιπίδια που διαθέτουν μια υδρόφιλη ομάδα – κεφαλή και δύο υδρόφοβες αλυσίδες, τα λιποσώματα έχουν τη δυνατότητα να εσωκλείουν τόσο υδρόφιλα όσο και υδρόφοβα φάρμακα.²⁸ Το λιπόσωμα απαρτίζεται από μία ή περισσότερες ομόκεντρες διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων με μια υδατική φάση στο εσωτερικό και ανάμεσα στις διπλοστοιβάδες. Οι διπλοστοιβάδες επίσης συχνά περιέχουν χοληστερόλη που χρησιμοποιείται για να ρυθμίσει τη ρευστότητα της μεμβράνης και να αυξήσει τη σταθερότητα, ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις μεμβράνης – πρωτεϊνών .

3.3. Νανοσωματίδια βασισμένα σε πολυμερή

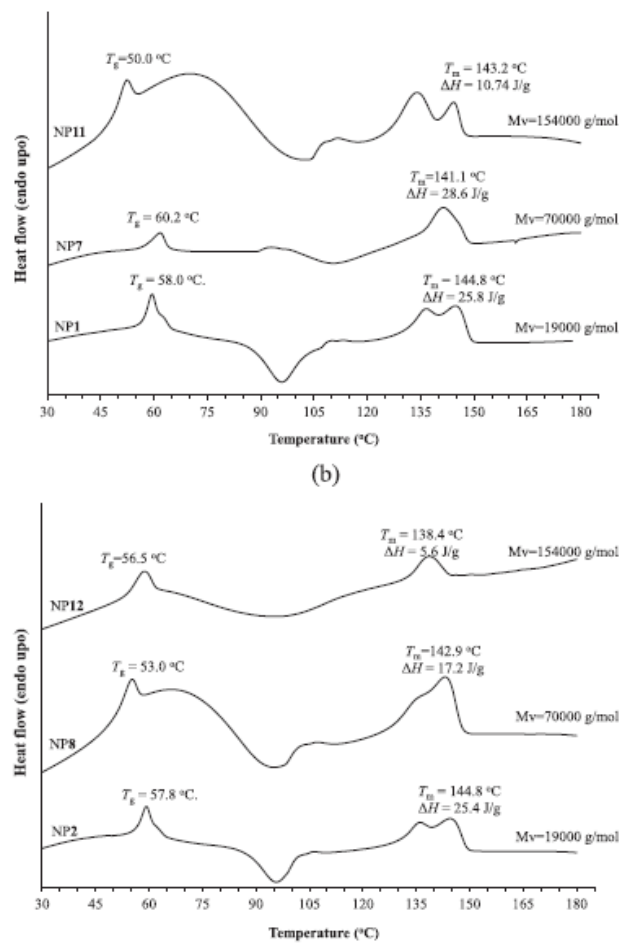
Τα νανοσωματίδια πολυμερών υλικών έχουν πρόσφατα αναδειχθεί ως ένα νέο και πολλά υποσχόμενο εργαλείο όσον αφορά την μεταφορά φαρμάκων στην PDT. Συγκριτικά με τα λιποσώματα, αναδεικνύονται ως ένα πιο ελκυστικό σύστημα μεταφοράς φαρμάκου, λόγω της υψηλής σταθερότητας και της ομοιόμορφης διασποράς σωματιδίων μικρού μεγέθους, η οποία συνεισφέρει στην μεταφορά τους μέσω του φαινομένου EPR, δηλαδή μέσω αυξημένης διαπερατότητας και κατακράτησης, ενώ εμποδίζει την αναγνώρισή τους από τα μακροφάγα και τις πρωτεΐνες με παρατεταμένο χρόνο κυκλοφορίας στο αίμα .²⁹

Επιπλέον, τα φάρμακα βασισμένα στα πολυμερή προσφέρουν διάφορα βασικά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τα μοριακά PDT φάρμακα, όπως τη δυνατότητα να μεταφέρουν μεγάλη ποσότητα του PS στην στοχευμένη περιοχή, ευελιξία ως προς την τροποποίηση της επιφάνειας για βελτίωση της αποδοτικότητας, την ικανότητα να παρεμποδίσουν την υποβάθμιση στο έμβιο βιολογικό περιβάλλον, καθώς και τη δυνατότητα να εμπλουτιστούν με πολλαπλά συστατικά όπως προσδέτες (ligands) και σκιαγραφικά (contrast agents). Αυτά τα πλεονεκτήματα έχουν την δυνατότητα να βελτιώσουν πολλές πτυχές της PDT, όπως την επιλεκτικότητα ως προς τον όγκο και την υδροφοβικότητα του PS. Επίσης, το μέγεθος των πολυμερικών νανοσωματιδίων τα καθιστά ένα εξαιρετικό εργαλείο για την παράδοση φαρμάκων. Ο καρκινικός ιστός, έχει ασυνήθιστα διαπερατά αιμοφόρα αγγεία και τα νανοσωματίδια κατά προτίμηση διαφεύγουν από το κανονικό αγγειακό σύστημα προς τον όγκο, όπου ακολούθως συγκρατούνται εκεί λόγω της κακής λεμφικής αποστράγγισης. Μια ποικιλία από πολυμερικά νανοσωματίδια έχει χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία PDT παραγόντων με διάφορες δομές. Σε αυτά περιλαμβάνονται συνθετικά πολυμερή, όπως *poly(lactide)poly(glycolide)* συμπολυμερή (PLGA), *N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide* συμπολυμερή (HPMA) και πολυακρυλαμίδιο (PAA). Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί και φυσικά πολυμερή τα οποία συντίθενται από

πολυσακχαρίτες, όπως η χιτοζάνη (chitosan) και το αλγινικό (alginate) αλλά και από πρωτεΐνες, όπως η αλβουμίνη και το κολλαγόνο.

3.4. Polylactic acid – PLA

Βιοσυμβατά πολυμερή μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή νανοσωματιδίων. Μεγάλη προσοχή δε, έχει δοθεί σε βιοδιασπώμενα πολυμερή όπως το *Polylactic acid* – PLA. Αυτά τα συνθετικά πολυμερή έχουν γίνει τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα και μελετούμενα βιοδιασπώμενα πολυμερή για φαρμακευτική χρήση χάρις την



Εικόνα 10. Καμπύλες Differential scanning calorimetry (DSC curves)

βιοσυμβατότητα και την ικανότητά τους για βιοδιάσπαση.³⁰ Τα νανοσωματίδια PLA έχουν χρησιμοποιηθεί σαν συστήματα μεταφοράς για *ferrocenyl tamoxifen*, *paclitaxel*, *indomethacin* και μαγνητικά νανοσωματίδια όπως και για την *hypericin*.³¹

Το PLA είναι ένας αλιφατικός πολυεστέρας με προσαρμοζόμενη ικανότητα δια υδρόλυση που έχει εγκριθεί από την Αμερικανική υπηρεσία τροφών και φαρμάκων (FDA), όπως και από τις Ευρωπαϊκές ρυθμιστικές αρχές. Αυτό αποσυντίθεται σε μη τοξικά προϊόντα με διάσπαση δεσμού εστέρα και εν συνεχεία μεταβολίζεται σε νερό και διοξείδιο του άνθρακα

με ρυθμό που φαίνεται να είναι πολύ μεγαλύτερος in vivo σε σχέση με in vitro τεστ σε ρυθμιστικά διαλύματα.³²

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για εγκλεισμό φαρμάκων σε βιοδιασπώμενο PLA και τα συμπολυμερή του. Το μέγεθος, η κατανομή του μεγέθους, το σχήμα και άλλες φυσικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων, επηρεάζονται από την τεχνική που χρησιμοποιείται για την παρασκευή τους. Βέβαια οι ιδιότητες αυτές εξαρτώνται και από άλλες παραμέτρους, όπως θερμοκρασία, πίεση, μοριακή μάζα του πολυμερούς και την ποσότητα της φορτωμένης ουσίας.³³

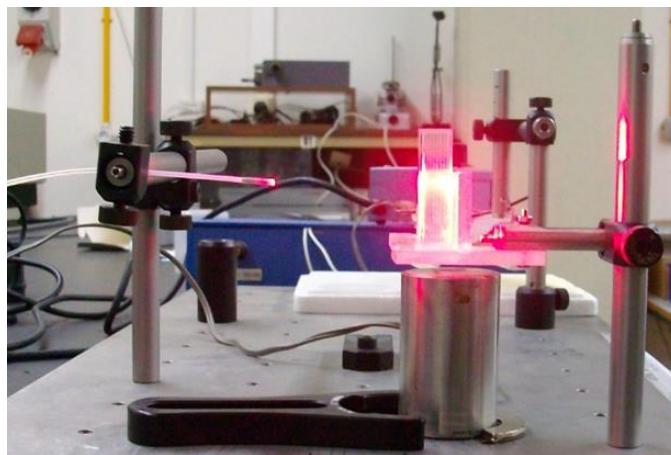
(32)

Κεφάλαιο 4.

Πειραματικές διατάξεις

4.1. Διάταξη ελέγχου φωτολεύκανσης και παραγωγής ελευθέρων ριζών

Η διάταξη αυτή αποτελείται από ένα διοδικό laser GCSLS-10-1500m ,μια οπτική ίνα που οδηγεί τη δέσμη με έναν διαχύτη κυκλικής συμμετρίας που τοποθετείται στη άκρη της οπτικής ίνας, καθώς και μια βάση για τις κυβέττες με μαγνητικό αναδευτήρα. Όλα τα παραπάνω βρίσκονται σε ειδική τράπεζα για οπτικά . Το μήκος κύματος του laser είναι 660 nm.



Εικόνα 11. Διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για έλεγχο της φωτολεύκανσης και της παραγωγής ελευθέρων ριζών

4.2. Διάταξη Φωτοδυναμικής Θεραπείας



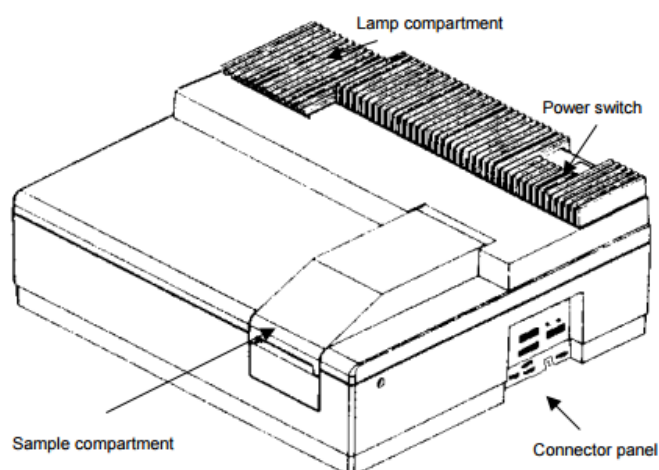
Εδώ χρησιμοποιήσαμε το ίδιο laser αλλά η οπτική ίνα τοποθετήθηκε κάθετα σε βραχίονα ώστε να φωτοβολεί τα τριβλία που τοποθετούνταν οριζόντια πάνω στην τράπεζα.

Εικόνα 12. Διάταξη Φωτοδυναμικής Θεραπείας

4.3. Φασματοφωτόμετρο απορρόφησης

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για λήψη φασμάτων απορρόφησης στη μελέτη αυτή ήταν το Lambda 35 UV/VIS Spectrometer της Perkin Elmer.

Το Lambda 35 είναι ευέλικτο φασματοόμετρο που λειτουργεί στην υπεριώδη (UV) και ορατή (VIS) περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Το φασματοόμετρο αυτό διαθέτει ένα σύστημα ολικής ανάκλασης διπλής δέσμης. Τα Lambda φασματοόμετρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως υποδεικνύεται από τις προδιαγραφές της απόδοσής τους. Η πολύ χαμηλή τιμή παρασιτικού φωτός παρέχει ένα ευρύ δυναμικό εύρος. Οι λάμπες Δευτερίου και Βολφραμίου- Αλογόνου επιτρέπουν εύκολη αντικατάστασή τους. Έχει διπλό διοδικό ανιχνευτή και μονοχρωμάτορα. Στην Εικόνα 13 φαίνονται τα βασικά του μέρη.

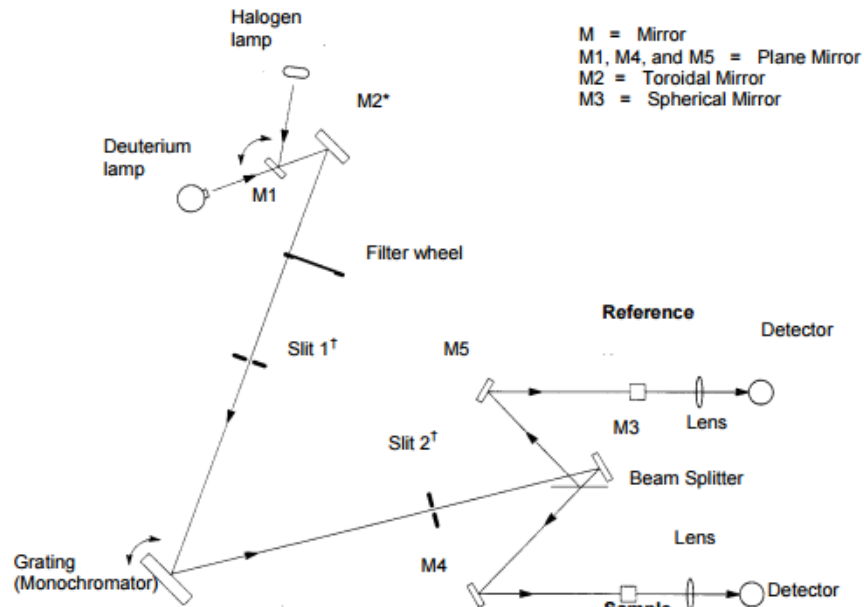


Εικόνα 13. Φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Lambda 35

Το εσωτερικό οπτικό σύστημα απεικονίζεται στην Εικόνα 14. Όλα τα οπτικά στοιχεία είναι επικαλυμμένα με διοξείδιο του πυριτίου για περισσότερη αντοχή. Στον μονοχρωμάτωρα χρησιμοποιείται ένα ολογραφικό στοιχείο. Αποτελείται από ένα κοίλο ολογραφικό πλέγμα με 1053 γραμμές/mm στο κέντρο του. Οι λάμπες Δευτερίου και Βολφραμίου- Αλογόνου που αναφέραμε καλύπτουν το παράθυρο μηκών κύματος που δουλεύει το φασματοφωτόμετρο. Έτσι για εργασία στην ορατή περιοχή, το κάτοπτρο M1 ανακλά την ακτινοβολία από την λάμπα αλογόνου στο κάτοπτρο M2. Την ίδια στιγμή το M1 μπλοκάρει την ακτινοβολία από τη λάμπα Δευτερίου.

Για τη λειτουργία στην περιοχή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), ο καθρέφτης M1 ανυψώνεται ώστε να επιτρέπει στην ακτινοβολία από τη λάμπα δευτερίου να χτυπήσει τον καθρέφτη- πηγή M2. Η Αλλαγή της πηγής είναι αυτόματη κατά τη διάρκεια της περιστροφής του μονοχρωμάτορα. Η ακτινοβολία από τον λαμπτήρα- πηγή ανακλάται από το κάτοπτρο- πηγή M2 μέσω μιας οπτικής ίνας στο φίλτρο. Ένας βηματικός κινητήρας κινεί τον τροχό φίλτρων ώστε να είναι σε συγχρονισμό με τον μονοχρωμάτορα. Ανάλογα με το μήκος κύματος που παράγεται, το κατάλληλο οπτικό φίλτρο βρίσκεται στη διαδρομή της

δέσμης ώστε να αποτελέσει ένα πρώιμο φίλτρο για την ακτινοβολία πριν από την είσοδό της στον μονοχρωμάτορα. Η αλλαγή φίλτρου γίνεται αυτόματα κατά τη διάρκεια της περιστροφής του μονοχρωμάτορα .

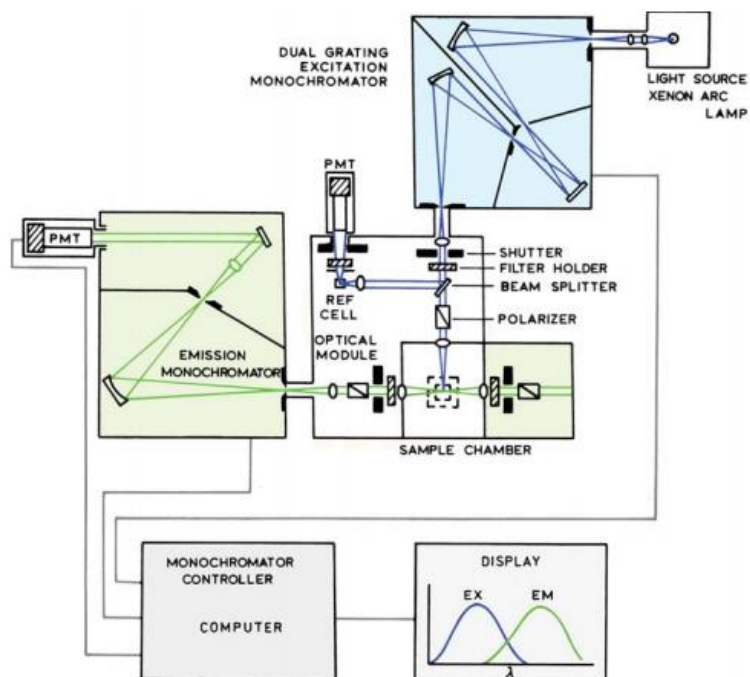


Εικόνα 14. Οπτική διαδρομή του φωτός στο φασματοφωτόμετρο απορρόφησης.

4.4. Φασματοφωτόμετρο φθορισμού

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για λήψη φασμάτων φθορισμού στη μελέτη αυτή ήταν το LS 45 Luminescence Spectrometer της Perkin Elmer.

Η συγκεκριμένη διάταξη μπορεί να ανιχνεύσει φθορισμό, φωσφορισμό, χημειο- ή βιοφωταύγεια. Η μέτρηση φασμάτων φθορισμού μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με συνεχή σάρωση σε όλο το εύρος των μηκών κύματος του οργάνου είτε σε επιλεγμένα μήκη κύματος. Το οπτικό σύστημα της συσκευής αποτελείται από δύο μονοχρωμάτωρες (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 σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η πηγή φωτός που χρησιμοποιείται για διέγερση είναι μια λυχνία Ξένου (Xenon flash tube) η οποία παράγει παλμούς μικρής χρονικής διάρκειας και μεγάλης έντασης. Στην επόμενη εικόνα φαίνεται η οπτική διαδρομή του φωτός σε ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο φθορισμού.



Εικόνα 15. Οπτική διαδρομή του φωτός στο φασματοφωτόμετρο φθορισμού.

4.5. Μικροσκόπιο Φθορισμού

Ο χωρικός εντοπισμός της φθαλοκυανίνης μέσα στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο φθορισμού BX50 της Olympus.



Εικόνα 16. Μικροσκόπιο Φθορισμού BX50 της Olympus.

Πιο συγκεκριμένα, η διάταξη οπτικής απεικονιστικής μικροσκοπίας φθορισμού η οποία χρησιμοποιείται αποτελείται από ένα μικροσκόπιο Olympus BX-50, οπτικό και φθορισμού, με φωτισμό πρόσπτωσης (epifluorescent microscope). Για τη διέγερση των δειγμάτων θα χρησιμοποιηθεί λυχνία υδραργύρου 100 W και κατάλληλα σετ οπτικών φίλτρων-κύβων. Οι κύβοι φθορισμού με τους οποίους είναι εξοπλισμένο το μικροσκόπιο καλύπτουν όλο το οπτικό φάσμα και είναι οι ακόλουθοι:

Στοιχεία κύβων του μικροσκοπίου φθορισμού Olympus BX-50.

Κωδικός Κύβου	Φίλτρο διέγερσης (ζωνοδιαβατό) (nm)	Διχρωμικό κάτοπτρο (nm)	Φίλτρο εκπομπής (υψιπερατό) (nm)
U-MWU	330-385	400	420
U-MWB	470-490	500	515
U-MWG	510-550	570	590

Επίσης για τη συλλογή των εικόνων φθορισμού θα χρησιμοποιηθούν ένας 20x UPlanFI (με αριθμητικό άνοιγμα $NA=0.50$) και ένας 40x UPlanFI ($NA=0.75$) αντικειμενικός φακός, με διορθώσεις για σφαιρικές και χρωματικές εκτροπές.

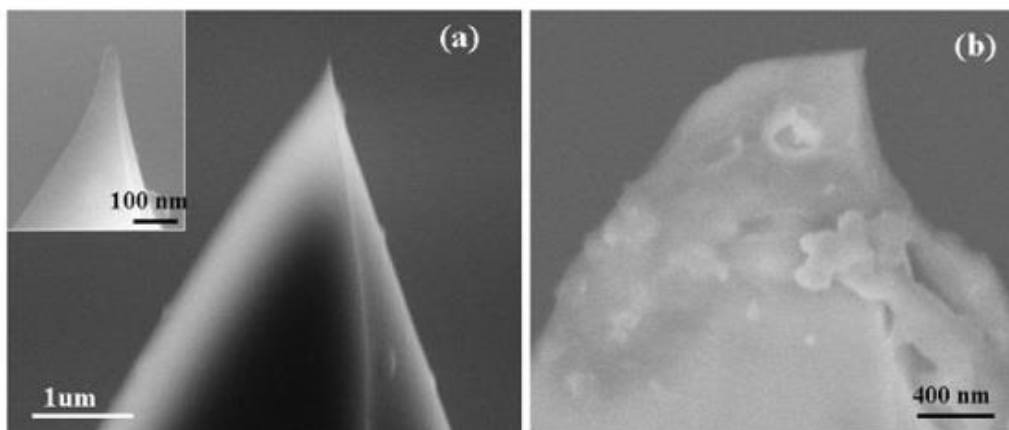
Η διάταξη είναι εφοδιασμένη με CCD camera (Olympus, XC30) ώστε η εικόνα του μικροσκοπίου να οδηγείται στον υπολογιστή και να αποθηκεύεται για περαιτέρω επεξεργασία και ανάλυση.

4.6. Μικροσκόπιο ατομικής δύναμης

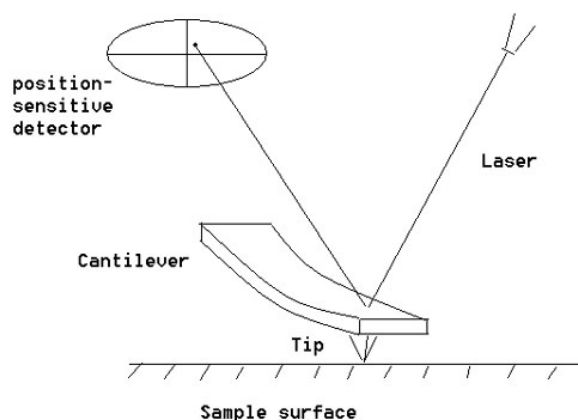
Το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (AFM) είναι ένα είδος μικροσκοπίου σάρωσης με πρόβολο (SPM). Τα SPMs έχουν σχεδιαστεί για τη μέτρηση τοπικών ιδιοτήτων, όπως το ύψος, την τριβή, τον μαγνητισμό, με έναν ανιχνευτή. Για την απόκτηση μιας εικόνας, το SPM σαρώνει με τον πρόβολο σε μια μικρή περιοχή του δείγματος, μετρώντας ταυτόχρονα τοπικές ιδιότητες.

Το AFM λειτουργεί με μέτρηση της δύναμης μεταξύ ενός προβόλου και του δείγματος. Κανονικά, ο πρόβολος έχει μία αιχμηρή άκρη (ακίδα), η οποία είναι μια πυραμίδα ύψους 3-6 μm με ακτίνα πέρατος 15-40nm (Εικόνα 17). Αν και η πλευρική ανάλυση του AFM είναι χαμηλή (~ 30 nm) λόγω της συνέλιξης, η κάθετη ανάλυση μπορεί να είναι μέχρι 0.1 nm.

Για να αποκτηθεί σωστή ανάλυση εικόνας, το AFM μπορεί γενικά να μετρήσει τις πλάγιες και τις κάθετες εκτροπές του προβόλου, χρησιμοποιώντας οπτικό σύστημα. Το οπτικό σύστημα αυτό λειτουργεί λαμβάνοντας την ανακλώμενη από τον πρόβολο δέσμη από ένα laser. Η ανακλώμενη δέσμη laser πέφτει πάνω σε έναν φωτοανιχνευτή που είναι χωρικά-ευαίσθητος και αποτελείται από τέσσερα τμήματα.



Εικόνα 17. Ακίδα του μικροσκοπίου καινούργια (a), ακίδα χρησιμοποιημένη (b).

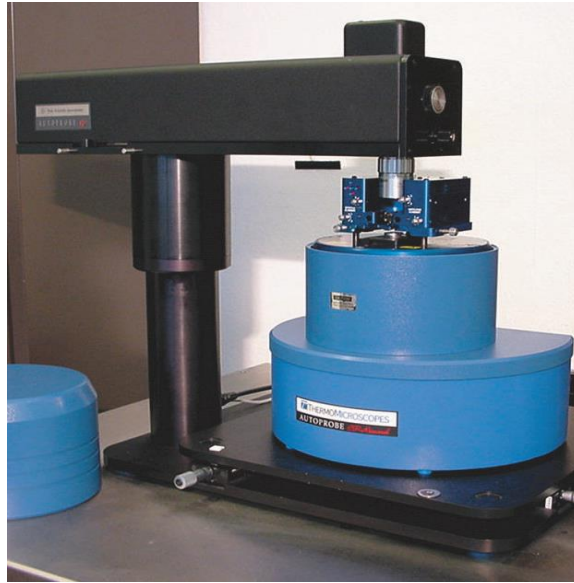


Εικόνα 18. Αρχή λειτουργίας του AFM.

Οι διαφορές μεταξύ των σημάτων στα τμήματα του φωτοανιχνευτή αποδεικνύουν την θέση της κηλίδας του laser στον ανιχνευτή και επομένως τις γωνιακές αποκλίσεις του προβόλου (Εικόνα 18).

Το AFM έχει δύο βασικές λειτουργίες, την Contact-mode και την Tapping-mode. Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε η Contact-mode ώστε να παρατηρηθούν και να απεικονιστούν τα νανοσωματίδια.

Στην Contact-mode το AFM χρησιμοποιεί την ανάδραση του δείγματος ώστε να ρυθμίσει την δύναμη στο δείγμα. Άρα το AFM όχι μόνο μετράει τη δύναμη από το δείγμα αλλά την ρυθμίζει επίσης επιτρέποντας έτσι την απόκτηση εικόνων και για πολύ χαμηλές δυνάμεις. Ο βρόχος ανάδρασης αποτελείται από το σωλήνα-σαρωτή που ελέγχει το ύψος της κορυφής, τον πρόβολο και τον οπτικό μοχλό, ο οποίος μετρά το τοπικό ύψος του δείγματος και ένα κύκλωμα ανατροφοδότησης που προσπαθεί να κρατήσει την εκτροπή του προβόλου σταθερή με ρύθμιση της τάσης που εφαρμόζεται στο σαρωτή.³⁴



Εικόνα 19. Το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης που χρησιμοποιήσαμε (CP II, Veeco Bruker, Santa Barbara).

Στην Εικόνα 19 φαίνεται το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης που χρησιμοποιήθηκε (CP II, Veeco Bruker, Santa Barbara). Διακρίνεται ο βραχίονας που φέρει πάνω του τον πρόβολο με την ακίδα, ενώ το μπλε σύστημα είναι το μέρος του εξοπλισμού που κινείται ώστε να γίνει η σάρωση. Η συσκευή αυτή είναι τοποθετημένη επάνω σε ειδική αντικραδασμική τράπεζα.

B. Πειραματικό μέρος

Κεφάλαιο 5.

Φωτοφυσικές μελέτες της ελεύθερης AlClPc

5.1. Φάσματα απορρόφησης διαφορετικών συγκεντρώσεων AlClPc

Στόχος εδώ είναι να παρατηρηθεί πως αλλάζει το φάσμα της Aluminum Phtalocyanine Chloride (AlClPc) σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεών της. Οι συγκεντρώσεις οι οποίες μελετήθηκαν είναι 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M.

Η φθαλοκυανίνη αυτή είχε τα εξής χαρακτηριστικά: dye content 85%, F.W.= 574.97

Από αυτή ζυγίστηκαν 3 mg και τη διαλύθηκαν σε 1.5 ml διαλύτη DMSO (Dimethyl sulfoxide). Έτσι παρασκευάστηκε το stock διάλυμά μας με συγκέντρωση $C=3.478 \times 10^{-3}$ M.

Βέβαια για την παραγωγή των επιθυμητών διαλυμάτων παρασκευάστηκε ενδιάμεσο διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-4} M. Το ενδιάμεσο αλλά και τα επόμενα διαλύματα παρασκευάστηκαν ως εξής:

Σύμφωνα με τον τύπο $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ όπου συνδέει τον αρχικό όγκο και συγκέντρωση ενός διαλύματος με τις τελικές τιμές τους, και ξέροντας ότι ο τελικός όγκος του διαλύματος κάθε φορά είναι ο επιθυμητός όγκος των 3 ml που είναι ο κατάλληλος όγκος αφού το διάλυμα προορίζεται για εισαγωγή σε κυβέττα και λήψη φάσματος, βρέθηκαν οι ζητούμενοι όγκοι για την παρασκευή των ενδιάμεσων διαλυμάτων.

Για το ενδιάμεσο διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-4} M, $V_1=86.256 \mu\text{L}$

Για το διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-5} M, $V_1=300 \mu\text{L}$

Για το διάλυμα συγκέντρωσης 5×10^{-6} M, $V_1=1500 \mu\text{L}$

Για το διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-6} M, $V_1=600 \mu\text{L}$

Για το διάλυμα συγκέντρωσης 5×10^{-7} M, $V_1=1500 \mu\text{L}$

Για το διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-7} M, $V_1=600 \mu\text{L}$

Για το διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-8} M, $V_1=1500 \mu\text{L}$

Και κάθε φορά φυσικά συμπληρώναμε το υπολειπόμενο όγκο ως τα 3 mL με DMSO.

Στη συνέχεια για την λήψη των φασμάτων τοποθετείτο κάθε φορά την κυβέττα με το διάλυμα στην ειδική εσοχή του φασματοφωτομέτρου του εργαστηρίου.

5.2. Φάσματα απορρόφησης της AICIPc σε διαφορετικούς διαλύτες

Σύμφωνα με τους υπολογισμούς και τη λογική της προηγούμενης ενότητας, μελετάται τώρα η απορρόφηση της ελεύθερης AICIPc, διαλυμένης σε διαφορετικό διαλύτη τη φορά. Έτσι λοιπόν διαλύθηκε η AICIPc σε νερό, αιθανόλη και DMSO. Η συγκέντρωση στην οποία επιλέχθηκε να μελετηθεί είναι 10^{-5} M.

5.3. Φάσματα φθορισμού διαφορετικών συγκεντρώσεων της AICIPc

Στην ενότητα αυτή μελετώνται τα φάσματα φθορισμού διαλυμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων σε AICIPc. Η AICIPc διαλύθηκε σε DMSO, ενώ οι συγκεντρώσεις που μελετώνται είναι 3×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-6} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M.

Για την απόκτηση των φασμάτων φθορισμού έπρεπε να διεγερθεί η AICIPc στο κατάλληλο μήκος κύματος ώστε να καταγραφεί ο μέγιστος δυνατός φθορισμός. Επομένως αρκεί να παρατηρηθεί το φάσμα απορρόφησης της AICIPc και να επισημανθεί που απορροφά το μέγιστο. Το μέγιστο απορρόφησης όπως ειπώθηκε και πριν είναι στα 677 nm, όμως δε χρησιμοποιήθηκε αυτό το μήκος κύματος διότι παρατηρήθηκε ότι υπάρχει αλληλοεπικάλυψη με την κορυφή φθορισμού στα 677 nm, επομένως ήταν αδύνατο να ξεχωριστούν τα σήματα. Η κορυφή στα 610 αποκλείστηκε για τον ίδιο λόγο. Αντί αυτού, προτιμήθηκε να διεγερθεί στα 360 nm που ήταν η αμέσως επόμενη σε ένταση κορυφή. Έτσι, όπως και στην προηγούμενη ενότητα, σύμφωνα με τη σχέση $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ παρασκευάστηκαν από το μητρικό (stock) διάλυμα AICIPc που είχε φυλαχθεί στην ψύξη, τα διαλύματα των επιθυμητών συγκεντρώσεων.

Τα φάσματα φθορισμού αναπαρίστανται στην ενότητα αποτελέσματα-συμπεράσματα.

Κεφάλαιο 6.

Φασματοσκοπικές μελέτες φωτολεύκανσης της AICIPc

Εισαγωγή

Η ανθεκτικότητα των βαφών γενικότερα στην καταστροφή τους από το φως έχει απασχολήσει από παλιά τους επιστήμονες και ειδικότερα τη βιομηχανία υφασμάτων. Το ξεθώριασμα των βαμμένων υφασμάτων με την έκθεσή τους στον ήλιο έχει καταγραφεί σε Ρωμαϊκά χρονικά. Από τότε έχει γίνει αρκετή πρόοδος όσον αφορά την φωτοκαταστροφή των βαφών. Οι μηχανισμοί ωστόσο που την προκαλούν δεν είναι απλοί, ενώ η φύση των φωτοπροϊόντων δεν καθορίζεται πάντοτε. Γενικά, έχει αναγνωριστεί ότι το οξυγόνο επιταχύνει τις διαδικασίες αυτές και έχει προταθεί ότι το οξυγόνο και σχετικά είδη (όπως μονήρες οξυγόνο) είναι υπεύθυνα για το ξεθώριασμα ορισμένων βαφών. Σήμερα λοιπόν, οι ιδιότητες αυτές σχετίζονται πλέον με μια πληθώρα επιστημονικών πεδίων από τις τεχνολογίες laser ως και την ιατρική.

Στη φωτοχημεία και τη φωτο-βιολογία ο όρος Φωτολεύκανση (photobleaching) χρησιμοποιείται ευρέως και ορίζει την απώλεια έντασης απορρόφησης ή φθορισμού που οφείλεται στο φως. Χάνεται δηλαδή σταδιακά, ανάλογα του χρόνου και της ισχύος ακτινοβολήσης, η ικανότητα για απορρόφηση του φωτοευαισθητοποιητή και άρα και για φθορισμό.

Υπάρχουν δύο τύποι μη αντιστρεπτής φωτολεύκανσης η οποία οδηγεί σε χημική αλλαγή ενός χρωμοφόρου (ή μορίου φωτοευαισθητοποιητή στην περίπτωση μας)³⁵:

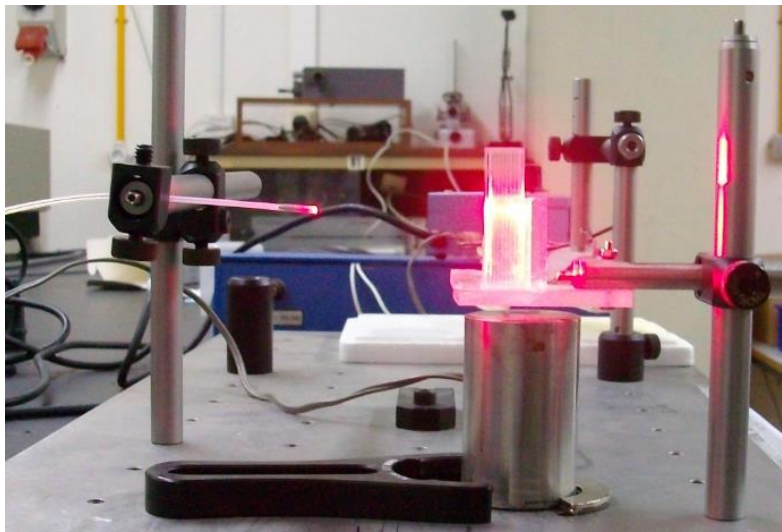
- i. Φωτοτροποποίηση (photomodification), όπου συμβαίνει απώλεια απορρόφησης και φθορισμού σε μερικά μήκη κύματος αλλά το χρωμοφόρο διατηρείται σε μια τροποποιημένη μορφή. Ενώ το αρχικό φάσμα ελαττώνεται, εμφανίζονται νέες κορυφές απορρόφησης.
- ii. Φωτολεύκανση (True photobleaching), όπου οι χημικές αλλαγές είναι ριζικές και σαν αποτέλεσμα, το αρχικό μόριο κατακερματίζεται σε θραύσματα τα οποία δεν έχουν πλέον ικανή απορρόφηση στο ορατό. Το δείγμα γίνεται ουσιαστικά άχρωμο εξ ου και "φωτολευκανση".

Φαίνεται πως όπου συμβαίνει φωτοτροποποίηση, συχνά εμφανίζεται παράλληλα και φωτολεύκανση (true photobleaching).

6.1. Μελέτη της φωτολεύκανσης της AICIPc με βάση την απορρόφηση

6.1.1. Ακτινοβολήση

Η ακτινοβολήση στο εργαστήριο έγινε με χρήση ενός diode-laser στα 660 nm. Η ένταση ακτινοβολίας ήταν στα 10 mW/cm^2 , στην επιφάνεια του δείγματος. Για να ρυθμιστεί αυτό, το ίδιο το laser ρυθμιζόταν σε ισχύ 7.09 mW , ώστε για την σταθερή απόσταση του δείγματος και για την επιφάνεια του φωτόμετρου που ήταν 0.709 cm^2 , η ένταση ακτινοβολίας σε αυτή να είναι 10 mW/cm^2 .



Εικόνα 20. Διάταξη ακτινοβολήσης με laser.

Στην Εικόνα 20 απεικονίζεται η διάταξη ακτινοβολήσης. Είναι ορατή η οπτική ίνα που μεταφέρει τη δέσμη φωτός από τη συσκευή laser, μπροστά από την κυβέττα με το δείγμα. Στην κυβέττα έχει τοποθετηθεί μικρό ειδικό μαγνητάκι, ενώ αυτή έχει τοποθετηθεί πάνω από κυλινδρικό αναδευτήρα (σε μικρή απόσταση) ο οποίος με τις δονήσεις του κάνει το μαγνητάκι να στριφογυρίζει αναδεύοντας έτσι το διάλυμα κατά την ακτινοβολήση. Την ώρα της ακτινοβολήσης φυσικά, ο θάλαμος με την τράπεζα παρέμενε σκοτεινός. Στην απόσταση αυτή που φαίνεται τοποθετήθηκε το φωτόμετρο για τη μέτρηση της επιθυμητής ισχύος.

Για διάλυμα ακτινοβολήσης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα AICIPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-5} M το οποίο παρασκευάστηκε με αραιώση του stock διαλύματος που είχαμε στην ψύξη, συγκέντρωσης $3.478 \times 10^{-3} \text{ M}$. Έγιναν συνολικά 15 ακτινοβολήσεις του δείγματος. Μέχρι τα 10 λεπτά γινόταν ακτινοβολήση ανά ένα λεπτό, ενώ από τα 10 μέχρι τα 20, γινόταν ανά δύο λεπτά. Μετά από κάθε ακτινοβολήση καταγράφαμε το φάσμα απορρόφησης του δείγματος με απευθείας μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο.

6.2. Μελέτη της φωτολεύκανσης με βάση το Φθορισμό

Περνώντας στην μελέτη της φωτολεύκανσης της AlClPc, χρησιμοποιήθηκαν αυτή τη φορά φάσματα φθορισμού. Οι ρυθμίσεις του laser έγιναν ίδιες με του προηγούμενου πειράματος, δηλαδή η ένταση ακτινοβολίας ήταν 10 mW/cm^2 , στην επιφάνεια του δείγματος. Για να ρυθμιστεί αυτό, το ίδιο το laser ρυθμιζόταν σε ισχύ 7.09 mW , ώστε για την σταθερή απόσταση του δείγματος και για την επιφάνεια του φωτόμετρου που ήταν 0.709 cm^2 , η ένταση ακτινοβολίας σε αυτή να είναι 10 mW/cm^2 .

Σαν διάλυμα ακτινοβολήσεως, παρασκευάστηκε διάλυμα AlClPc σε DMSO συγκέντρωσης $3 \times 10^{-7} \text{ M}$. Η παρασκευή του έγινε με αραιώση του stock (μητρικό) διαλύματος φθαλοκυανίνης.

Εδώ έγιναν 19 ακτινοβολήσεις, μέχρι τα 10 λεπτά ανα 1 λεπτό, μέχρι τα 20 ανα 2 λεπτά και μέχρι τα 45 ανά 5 λεπτά. Για την απόκτηση των φασμάτων έγινε διέγερση της AlClPc στο τοπικό μέγιστο απορρόφησής της στα 370 nm .

Κεφάλαιο 7.

Μελέτη της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών

Εισαγωγή

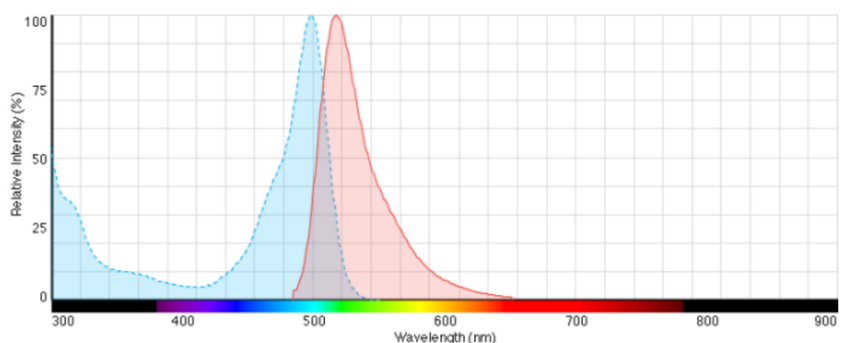
Στο κεφάλαιο αυτό, σκοπός είναι να μελετηθεί η δυνατότητα της AICIPc να παράξει ελεύθερες ρίζες (όπως μονήρες οξυγόνο). Τα ROS (reactive oxygen species) όπως ειπώθηκε έχουν σημαντικό ρόλο στην Φωτοδυναμική θεραπεία, αφού αυτά είναι που εντέλει σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα. Η ανίχνευσή τους είναι ιδιαίτερα δύσκολη αφού ο χρόνος ημιζωής των ROS σε υδατικά περιβάλλοντα, κυμαίνεται από μερικά nanoseconds σε λίγες ώρες. Σήμερα υπάρχει πληθώρα τρόπων ανίχνευσης που διακρίνονται αρχικά σε απευθείας ανίχνευση και έμμεση ανίχνευση.³⁶ Λόγω της μικρής διάρκειας ζωής και τις τυπικά χαμηλές συγκεντρώσεις των ROS σε υδατικά συστήματα, η άμεση παρατήρηση είναι δυνατή μόνο σε χρόνους τάξης μικρότερης του milisecond, με το σχετικά σταθερό $H_2 O_2$ να αποτελεί εξαίρεση. Έμμεσες μέθοδοι περιλαμβάνουν την αντίδραση ενός ROS με συγκεκριμένο μόριο ανιχνευτή για να αποδώσει ένα πιο σταθερό, μακρόβιο αναλύτη.³⁷

Ορισμένες σημαντικές πτυχές που πρέπει να εξετάσει κανείς όταν επιλέγει μια μέθοδο ανίχνευσης ROS είναι: (1) την ευαισθησία της μεθόδου (2) την επιλεκτικότητα και τη ειδικότητα της μεθόδου για τον αναλύτη που ενδιαφέρει και (3) την ικανότητα της μεθόδου να επιτρέπει μετρήσεις με αρκετά γρήγορο χρόνο ανάλυσής τους. Η εξειδίκευση ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των μεθόδων, και θα πρέπει να λαμβάνεται προσεκτικά υπόψη κατά την επιλογή μιας μεθόδου για ποσοτικό ή/και ποιοτικό προσδιορισμό των ROS. Επιπρόσθετα θέματα είναι η διαθεσιμότητα, η αξιοπιστία, η φορητότητα (για μελέτες πεδίου), το κόστος των αναγκαίων οργάνων, και σε ορισμένες περιπτώσεις, το κόστος των μορίων ανιχνευτή. Στους τελευταίους παράγοντες, οφείλεται σε μεγάλο βαθμό το ότι ένα μεγάλο μέρος της ανάπτυξης μεθόδων για ανάλυση ROS σε υδατικά περιβάλλοντα έχει επικεντρωθεί στην υπεριώδους (UV) /ορατής (VIS) ακτινοβολίας φασματοσκοπικές τεχνικές και στη χρήση σχετικά κοινών και επομένως χαμηλότερου κόστους μορίων ανιχνευτή.

7.1. Ανίχνευση ROS με βάση φάσματα φθορισμού

Στη έρευνα αυτή, χρησιμοποιήθηκαν φασματοσκοπικές τεχνικές για να ανιχνεύσουμε τα ROS. Στην ενότητα αυτή εξηγείται η φασματοσκοπική στρατηγική ανίχνευσης ROS με Φθορισμό.

Χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός ανιχνευτής H_2DCFDA (C6827 invitrogen) με φάσματα απορρόφησης και εκπομπής που φαίνονται στην Εικόνα 21. Η H_2DCFDA , SE (D2935) μπορεί επίσης να παρέχει εξωκυττάρια επισήμανση.



Εικόνα 21. Φάσματα απορρόφησης και εκπομπής του CM- H₂DCFDA

7.1.1. Παρασκευή διαλυμάτων ακτινοβόλησης

Για τη μελέτη παραγωγής ελευθέρων ριζών παρασκευάστηκαν συνολικά τρία διαλύματα προς ακτινοβόληση. Δύο διαλύματα AICl₃ σε PBS συγκεντρώσεων 1.50×10^{-6} M και 10^{-6} M αντίστοιχα, και ένα διάλυμα blank χωρίς φθαλοκυανίνη για να είναι δυνατή η σύγκριση και η εξαγωγή συμπερασμάτων.

Για την παρασκευή του διαλύματος ακτινοβόλησης χρειάστηκαν τρία “βοηθητικά” διαλύματα.

1. Το διάλυμα του CM-H₂DCFDA (stock)
2. Το διάλυμα NaOH, 4N
3. Το διάλυμα working

- Διάλυμα CM-H₂DCFDA (stock)

50 μg CM-H₂DCFDA (M.W.=577.8) διαλύθηκαν σε 1mL DMSO, δηλαδή το τελικό αποτέλεσμα ήταν διάλυμα συγκέντρωσης **87 μM**.

- Διάλυμα NaOH, 4N

1.6 g NaOH συν 8 mL απεσταγμένο νερό, μπήκαν σε ανάδευση. Έπειτα, προστέθηκαν στο διάλυμα και 2 mL απεσταγμένο νερό.

- Το διάλυμα working

Αναμίχθηκαν αρχικά 60 mL από το stock διάλυμα συν 20 mL από το NaOH-4N, και μετά προσθέτους 160 mL EtOH. Αυτό αποτελεί ένα διάλυμα συγκέντρωσης **22 μM**.

Είναι σημαντικό το working διάλυμα να αφεθεί για μισή ώρα στην άκρη ώστε να γίνει υδρόλυση του εστέρα από τη βάση (NaOH).

- Διάλυμα ακτινοβόλησης 1

Χρειάζεται το διάλυμα ακτινοβόλησης να έχει συγκέντρωση σε AICIPc 1.55×10^{-6} M . Για να πετύχει αυτό αναμίχθηκαν 70 μ L από το working, συν 450 mL AICIPC συγκέντρωσης 10^{-5} M, συν 2520 mL PBS.

Από το μητρικό διάλυμα της AICIPc $3,4785 \times 10^{-3}$ M, παρασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-5} M με τρεις διαδοχικές αραιώσεις. Οι δύο πρώτες αραιώσεις έγιναν σε διαλύτη DMSO, ενώ η τρίτη έγινε σε διαλύτη PBS.

Για το ενδιάμεσο διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-4} M, $V_1=86.256 \mu$ L

Για το ενδιάμεσο διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-5} M, $V_1=300 \mu$ L

Τέλος για το διάλυμα ακτινοβόλησης συγκέντρωσης 1.5×10^{-6} M, $V_1=450 \mu$ L

Συμπληρώθηκαν τώρα με 2520 μ L PBS, ώστε μαζί με τα 70 μ L από το working, ο τελικός όγκος διαλύματος να φτάνει 3 mL.

- Διάλυμα ακτινοβόλησης 2

Σύμφωνα με την δεύτερη παραπάνω αραιώση, μπορεί κανείς από το διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-4} M να πάρει 300 μ L και να τα αναμίξει με 2630 μ L PBS και 70 μ L διαλύματος working και να έχει έτσι το επιθυμητό διάλυμα.

- Διάλυμα blank

Στο διάλυμα αυτό αναμίχθηκαν 70 μ L από το διάλυμα working και 2930 PBS.

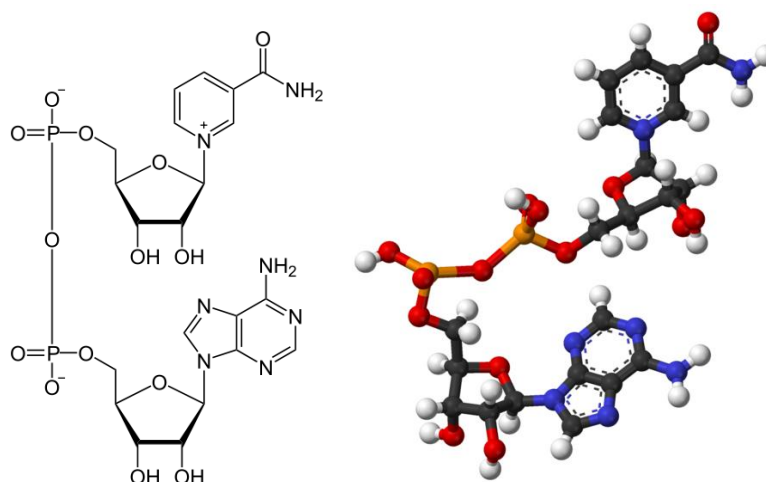
7.1.2. Ακτινοβόληση

Για την ακτινοβόληση χρησιμοποιήθηκε η ίδια συσκευή laser που χρησιμοποιήθηκε και για την μελέτη στη φωτολεύκανση. Η ισχύς του laser τέθηκε στα 7,09 mW, που αυτό σημαίνει ότι είχαμε ένταση ακτινοβολίας 10 mW/cm^2 στην επιφάνεια του δείγματος αφού η επιφάνεια του αισθητήρα που μετρούσε την ισχύ, ήταν 0.709 cm^2 . Η διάταξη ακτινοβόλησης είναι η ίδια όπως και στα πειράματα της φωτολεύκανσης (Εικόνα 20). Έγιναν 11 διαδοχικές ακτινοβολήσεις για τα τρία διαλύματα. Έγιναν δηλαδή δέκα ακτινοβολήσεις του ενός λεπτού και μία των πέντε λεπτών για κάθε διάλυμα. Αμέσως μετά από κάθε ακτινοβόληση, η κυβέττα με το δείγμα τοποθετούνταν στο φασματοφωτόμετρο για τη λήψη του φάσματος φθορισμού. Για το σκοπό αυτό τα δείγματα διεγέρθηκαν στα 490 nm αφού εκεί διεγείρεται η ουσία CM-H₂DCFDA.

7.2. Ανίχνευση ROS με βάση φάσματα Απορρόφησης

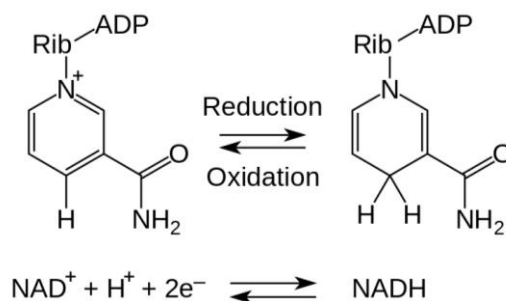
Για την ανίχνευση των ROS με απορρόφηση χρησιμοποιήσαμε το NADH.

Το NADH είναι ένα συνένζυμο απαραίτητο για τη καταλυτική αντίδραση ορισμένων ενζύμων. Έχει μοριακό βάρος $M.W.=709.4$. Η χημική δομή του NADH απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 22. Χημική δομή του NADH. 2D και 3D.

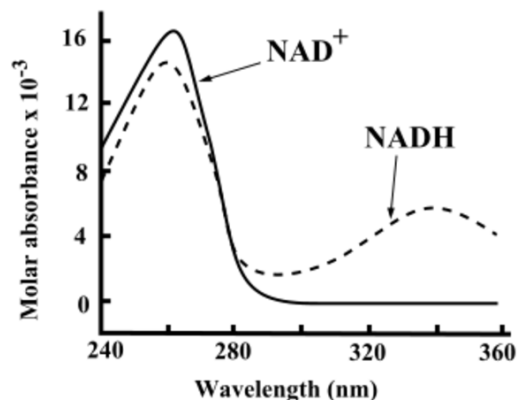
Το NAD^+ είναι ένας φορέας ιόντων υδριδίων, που σχηματίζει το NADH. Τον ιόν υδριδίου απομακρύνεται ενζυματικά από ένα μόριο υποστρώματος λόγω της δράσης των αφυδρογονασών. Αυτά τα ένζυμα καταλύουν την αντιστρεπτή μεταφορά ενός ιόντος υδριδίου από την αφυδρογονάσα προς το NAD^+ , σχηματίζοντας έτσι το NADH. Η αντίθετη διαδικασία πραγματοποιείται με την οξείδωση του NADH που προκαλεί τον σχηματισμό NAD^+ . Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί για παράδειγμα, αν το NADH βρεθεί σε περιβάλλον ελευθέρων ριζών. Στην Εικόνα 23. Διαδικασία σχηματισμού NADH από NAD^+ και αντιστρόφως.



Εικόνα 23. Διαδικασία σχηματισμού NADH

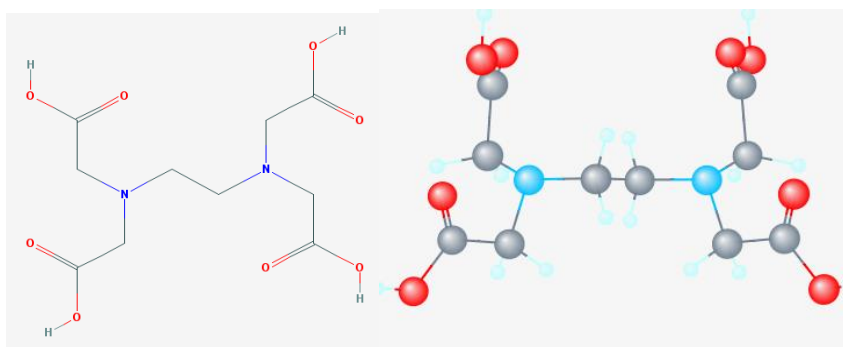
Εδώ θέλει κανείς να εκμεταλευτεί την οξείδωση του NADH, που μεταπίπτει σε NAD^+ . Η οξείδωση αυτή γίνεται με την ακτινοβόληση, αφού θεωρητικά η ακτινοβόληση του φωτοευαίσθητοποιητή γεννά ελεύθερες ρίζες οι οποίες οξειδώνουν το NADH. Αυτό ακριβώς φαίνεται στις καμπύλες της Εικόνα 24, δηλαδή η διαφορά στα φάσματα του NADH

και του NAD⁺ είναι που μας αποδεικνύει την ύπαρξη ελευθέρων ριζών. Συγκεκριμένα το NADH έχει δύο χαρακτηριστικές κορυφές στα 260 nm και τα 340 nm. Το οξειδωμένο NAD⁺ όμως, χάνει την κορυφή των 340 nm ενώ η κορυφή του στα 260 nm γίνεται μεγαλύτερη.



Εικόνα 24. Φάσματα απορρόφησης NADH και NAD⁺.

Συμπληρωματικά του NADH για τη σωστή συμπεριφορά του μέσα στα διαλύματα, χρησιμοποιήθηκε και το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, ευρέως γνωστό ως EDTA. Το EDTA είναι ένα αμινοπολυκαρβοξυλικό οξύ με χημικό τύπο C₁₀H₁₆N₂O₈ και μοριακό βάρος M.W.=292.24 g/mol. Πρόκειται για ένα άχρωμο κρυσταλλικό στερεό, ελαφρώς διαλυτό στο νερό. Χρησιμοποιείται συνήθως για να διαλύει άλατα. Η χημική δομή της ουσίας απεικονίζεται στην Εικόνα 25.



Εικόνα 25. Χημική δομή του EDTA .2D και 3D.

Η χρησιμότητα του EDTA προκύπτει λόγω του ρόλου του ως εξασοντωτή συνδέτη και χημικού παράγοντα, δηλαδή την ικανότητα του να “αποσπά” μεταλλικά ιόντα όπως Ca²⁺ και Fe³⁺. Εφόσον δεσμευτούν από το EDTA, τα μεταλλικά ιόντα παραμένουν στο διάλυμα, αλλά παρουσιάζουν μειωμένη αντιδραστικότητα.

7.2.1. Παρασκευή διαλυμάτων

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν τελικά για τις ακτινοβολήσεις ήταν δύο. Το ένα ήταν το blank AICIPc (σε DMSO) συγκέντρωσης 10⁻⁵ και το άλλο περιείχε 261.4 μL AICIPc, 67 μL NADH, 19 μL EDTA, φυσικά ίδιας συγκέντρωσης με το blank σε AICIPc.

NADH

Ζυγίστηκαν 3.2 mg NADH και τα διαλύθηκαν σε 1ml PBS. Το διάλυμα αυτό θα είναι το stock διάλυμα NADH συγκέντρωσης **4.5 mM**. Το διάλυμα χρειάζεται να έχει όγκο 3 mL και συγκέντρωση 100μM. Γι' αυτό 66.6 μL από το stock διάλυμα NADH και τα διαλύθηκαν σε PBS.

EDTA

Ζυγίστηκαν 6.8 mg EDTA και τα διαλύθηκαν σε 1.5 mL PBS. Έτσι αποκτήθηκε διάλυμα συγκέντρωσης EDTA **15.5 mM**. Η συγκέντρωση σε EDTA που χρειάζεται είναι ίση με 0.1 mM. Έτσι χρειάζονται τελικά 19.35 μL από το διάλυμα συγκέντρωσης 15.5 mM EDTA.

AlClPc

Από το stock διάλυμα AlClPc παρασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-4} M και από το τελευταίο χρειάστηκαν 261.4 μL AlClPc για την επιθυμητή συγκέντρωση 10^{-5} M σύμφωνα με τις πράξεις:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10^{-4} \times V_1 = 10^{-5} \times 3 \times 10^3 \rightarrow$$

$$\underline{V_1 = 300 \mu\text{L}}$$

7.2.2. Ακτινοβολήση

Έγιναν συνολικά δώδεκα ακτινοβολήσεις για το διάλυμα AlClPc+NADH+EDTA και μία ακτινοβολήση για το διάλυμα AlClPc με τα μέσα που περιγράφηκαν στην υποενότητα 7.1.2.

Κεφάλαιο 8.

Διαδικασία εγκλεισμού- Σύνθεση νανοσωματιδίων PLA

Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, υπάρχει η ανάγκη για βελτίωση του τρόπου διανομής των φαρμάκων-φωτοευαισθητοποιητών στην προς θεραπεία περιοχή. Για το σκοπό αυτό, στα επόμενα κεφάλαια θα μελετηθεί η συμπεριφορά του φωτοευαισθητοποιητή, όντας εγκλεισμένος σε νανοσωματίδια από PLA (Polylactic acid), τόσο μέσα σε διαλύματα, όσο και σε περιβάλλον κυττάρων LNCap. Το PLA έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές κλινικές μελέτες και έχει εγκριθεί από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) καθώς και από τις ευρωπαϊκές ρυθμιστικές αρχές.³⁸

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για εγκλεισμό φαρμάκων σε βιοδιασπώμενο PLA και τα συμπολυμερή του. Το μέγεθος, η κατανομή του μεγέθους, το σχήμα και άλλες φυσικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων, επηρεάζονται από την τεχνική που χρησιμοποιείται για την παρασκευή τους. Βέβαια οι ιδιότητες αυτές εξαρτώνται και από άλλες παραμέτρους, όπως θερμοκρασία, πίεση, μοριακή μάζα του πολυμερούς και την ποσότητα της φορτωμένης ουσίας.³⁹

8.1. Σύνθεση νανοσωματιδίων

Στη μελέτη αυτή τα νανοσωματίδια ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο “γαλακτοματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη” παρουσία ποσότητας AICIPc.⁴⁰

Το μίγμα αποτελείται από μια υδατική φάση και μια οργανική φάση. Το PLA διαλύθηκε σε ένα καθορισμένο όγκο ακετόνης, ώστε να επιτευχθεί μια συγκέντρωση 10 mg του πολυμερούς ανά χιλιοστόλιτρο διαλύτη. Το διάλυμα πολυμερούς στη συνέχεια αναμιγνύεται με ένα κατάλληλο όγκο διαλύματος AICIPc. Ακολούθως, το οργανικό διάλυμα εγχύθηκε σε ένα υδατικό διάλυμα (απιονισμένο νερό) από PVA 1% w / v. Το γαλάκτωμα αφέθηκε σε sonicator (υπέρηχοι) για 8 λεπτά σε amplitude της συσκευής στα 37%, ώστε να διαλυθούν τα συσσωματώματα και στη συνέχεια αφέθηκε όλη τη νύκτα στους 4 °C για την εξάτμιση του διαλύτη.

Υδατική φάση: Η υδατική φάση αποτελείται από 75 mL PVA (περιέχει H₂O και γαλακτοματοποιητή).

Οργανική φάση: η οργανική φάση αποτελείται από την ποσότητα PLA σύν 15 mL Ακετόνη, η οποία παίζει το ρόλο του διαλύτη για το PLA, την AICIPc και 4mL DMSO που είναι ο διαλύτης για την AICIPc.

Οι αναλογίες σύμφωνα με τη μεθοδολογία σύνθεσης των νανοσωματιδίων είναι

$$\frac{m_{PLA}}{m_{AICIPC}} = 5 \quad \text{και} \quad \frac{\text{οργανική φάση}}{\text{υδατική φάση}} = \frac{1}{5}$$

Επομένως ζυγίζοντας 153.3 mg PLA, χρειάζονται τότε 30.66 mg AICIPC. Ενώ για τα 75 mL PVA, χρειάζονται 15 mL ακετόνη. Τελικά ζυγίστηκαν 30.9 mg AICIPC και τα διαλύθηκαν σε 4.2 mL DMSO.

Ακολουθεί η διαδικασία ανάκτησης των νανοσωματιδίων με φυγοκέντριση.

Φυγοκέντριση

Στη συνέχεια, χρειάστηκε να φυγοκέντριση του διαλύματος ώστε να κρατηθούν μόνο τα νανοσωματίδια με την εγκλεισμένη πια φθαλοκυανίνη. Η φυγοκέντριση έγινε στις 12000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά. Για να εξασφαλιστεί δε, ότι ο όγκος της τελικής μας διασποράς περιέχει μόνο εγκλεισμένη στα νανοσωματίδια AICIPC και όχι ελεύθερη, χρειάστηκε να γίνουν τρία διαδοχικά “πλυσίματα”. Δηλαδή, μετά από την πρώτη φυγοκέντριση σε 8 erpendorf ο όγκος του υπερκειμένου αποθηκεύτηκε σε ψύξη για μετέπειτα υπολογισμούς ($V_1=250$ mL), και η εναπομείνασα διασπορά μοιράστηκε πάλι σε 8 erpendorf για δεύτερη φυγοκέντριση. Ο όγκος του δεύτερου υπερκειμένου ($V_2=217.5$ mL) φυλάχθηκε στην ψύξη, όπως και το τρίτο υπερκείμενο ($V_3=258$ mL). Ύστερα από τα τρία αυτά “πλυσίματα” ο όγκος της τελικής διασποράς ήταν $V_8= 35$ mL.

8.2. Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων με zetasizer

Η συσκευή zetasizer χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του μεγέθους, της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας των πρωτεϊνών, το δυναμικό ζήτα (zeta-potential) των κολλοειδών και των νανοσωματιδίων, και προαιρετικά τη μέτρηση της κινητικότητας των πρωτεϊνών και των *microrheology*-πρωτεϊνών και πολυμερών διαλυμάτων. Η υψηλή απόδοση του Zetasizer Nano ZS επιτρέπει επίσης τη μέτρηση του μοριακού βάρους και του δεύτερου συντελεστή virial .



Εικόνα 26. Zetasizer για μέτρηση του μεγέθους και zeta-potential των νανοσωματιδίων

Η σειρά Malvern Zetasizer μαλιστα, μετρά σωματίδια και μόρια μεγέθους (διαμέτρου) κάτω από ένα νανόμετρο έως μερικά microns χρησιμοποιώντας δυναμική σκέδαση φωτός, το δυναμικό ζήτα και την ηλεκτροφορητική κινητικότητα χρησιμοποιώντας ηλεκτροφορητική σκέδαση του φωτός (electrophoretic light scattering), και το μοριακό βάρος χρησιμοποιώντας στατική σκέδαση φωτός. Με τη συσκευή zetasizer είναι δυνατό να ελέγξουμε ιδιότητες των νανοδομών μας εκτός της διαμέτρου, όπως τη σταθερότητα τους, το zeta-potential και την ομοιογένειά τους μέσα στη διασπορά.⁴¹

Για την παρούσα μελέτη 29 μL από τη διασπορά με τα NPs και την AICIPc, διαλύθηκαν μέσα σε 298 μL νερού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε πίνακα στην ενότητα αποτελέσματα-συμπεράσματα.

Πρέπει να τονιστεί πως το zeta-potential είναι μια σημαντική παράμετρος στον χαρακτηρισμό της NPS, καθώς μετρά το φορτίο επιφάνεια και δίνει πληροφορίες για τη σταθερότητά τους σε ένα αιώρημα, υπό καθορισμένες συνθήκες.

8.3. Υπολογισμός συγκέντρωσης AICIPc της διασποράς

Το σκεπτικό εδώ είναι ότι αν πάρει κανείς τα φάσματα απορρόφησης δειγμάτων από τα τρία υπερκείμενα των τριών πλυσιμάτων, τότε από αυτά μπορεί σύμφωνα με την καμπύλη βαθμονόμησης για την AICIPc να υπολογίσει σε τι συγκέντρωση αντιστοιχούν. Από την συγκέντρωση μετά ευκολά βρίσκεται η μάζα της φθαλοκυανίνης που είναι διαλυμένη στο κάθε υπερκείμενο. Εάν τέλος αφαιρεθεί η συνολική μάζα φθαλοκυανίνης που βρίσκεται στα υπερκείμενα, από την αρχική μάζα που ζυγίστηκε, μένει η ποσότητα φθαλοκυανίνης που βρίσκεται στον γνωστό όγκο της διασποράς μας. Από εκεί λοιπόν υπολογίζεται με τον έμμεσο αυτό τρόπο η συγκέντρωση της φθαλοκυανίνης.

Αποκτήθηκαν λοιπόν δείγματα από κάθε υπερκείμενο και μετρήθηκαν τα φάσματα απορρόφησης τους. Τα μέγιστα απορρόφησης στην κορυφή των 678 nm όπως και οι λεπτομέρειες για τους όγκους που χρησιμοποιήθηκαν και οι υπολογισμοί παρατίθενται στον Πίνακα 2. Στον Πίνακα 3 δίνεται ο τελικός υπολογισμός της συγκέντρωσης AICIPc στη διασπορά.

8.4. Freeze drying νανοσωματιδίων –διαδικασίες προς τελική μορφή νανοσωματιδίων

Το freeze drying είναι μια διαδικασία αφυδάτωσης που χρησιμοποιείται συνήθως για να διατηρηθεί ένα φθαρτό υλικό ή να κάνει το υλικό πιο βολικό για τις μεταφορές. Το freeze drying δουλεύει παγώνοντας αρχικά το υλικό και στη συνέχεια με μείωση της πίεσης που το περιβάλλει απότομα για να επιτρέψει στο παγωμένο νερό που βρίσκεται μέσα στο υλικό να πάει κατευθείαν από τη στερεά στην αέρια φάση. Μετά από αυτή τη διαδικασία, 4.1 mg AICIPc είχαν πια εγκλειστεί μέσα σε 43.4 mg NPs-PLA, δηλαδή ένα ποσοστό εγκλεισμού 9.5 %.

8.5. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων PLA με μικροσκοπία ατομικής δύναμης AFM

Σκοπός είναι, χρησιμοποιώντας το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης να γίνει χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων που παρήχθησαν και αποθηκεύτηκαν σε ψύξη. Ιδιαίτερα με το AFM μας δίνεται η δυνατότητα για κατανόηση της μορφολογίας τους και πιο συγκεκριμένα της γεωμετρίας των νανοσωματιδίων αυτών και κυρίως του μεγέθους τους, πράγμα σημαντικό διότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων αλλά και το σχήμα παίζει καθοριστικό ρόλο για το κατά πόσον αυτά μπορούν να ελιχθούν μέσα στο ανθρώπινο σώμα και που μπορούν αυτά να εισχωρήσουν αλλά και από τι μπορούν να περάσουν ίσως απαραίτητα.

Η διαδικασία για τη χρήση του μικροσκοπίου ατομικής δύναμης είναι η εξής: λεπτό στρώμα από το προς εξέταση διάλυμα απλώνεται πάνω σε στρογγυλή επίπεδη μίκα (mica) ειδικής κατασκευής ώστε να εφαρμόζει στο μικροσκόπιο. Αφήνεται να στεγνώσει, να εξατμιστεί οποιοδήποτε υγρό (στη περίπτωση μας νερό) , διότι το AFM μπορεί να σαρώσει μόνο στερεά δείγματα.

8.5.1. Το δείγμα νανοσωματιδίων

Η τελική διασπορά νανοσωματιδίων με έγκλεισμένη Φθαλοκυανίνη, ήταν συγκέντρωσης 2×10^{-4} M. Η ποσότητα που απλώνεται στη μίκα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν λεπτή ενώ το διάλυμα να είναι αρκετά αραιό ώστε να μην γίνεται συνωστισμός των νανοσωματιδίων στην πλάκα, και να είναι έτσι εύκολα διακριτή η μορφολογία τους. Στη περίπτωση πυκνού δείγματος τα νανοσωματίδια “στριμώνονται”, ασκούν τάσεις δηλαδή μεταξύ τους με αποτέλεσμα η τελική εικόνα να βγαίνει αλλοιωμένη σε σχέση με αυτή ενός αραιού δείγματος με ελάχιστες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νανοσωματιδίων.

Έτσι, για να είναι αυτό δυνατό, 10 μ L από τη διασπορά αραιώθηκαν σε 10 mL νερού. Από αυτό το αραιωμένο διάλυμα λοιπόν, 5 μ L απλώθηκαν σε ομοιόμορφη στρώση επάνω στη μίκα. Αφού αφέθηκε 15 λεπτά επάνω στη μίκα για να εξατμιστεί το νερό, μετά ήταν δυνατό να αρχίσει η απόκτηση των εικόνων, σαρώνοντας κάθε φορά και σε πιο μικρή περιοχή.

Για την σάρωση του δείγματος χρησιμοποιήθηκε η contact-mode. Ξεκινώντας τη σάρωση από τα 5 μ m και φτάνοντας εως τα 2 μ m και το 1 μ m.

Κεφάλαιο 9.

Φωτοφυσικές μελέτες έγκλειστης AICIPc σε νανοσωματίδια PLA.

Επιβάλλεται για λόγους συνέπειας, η εγκλεισμένη φθαλοκυανίνη να μελετηθεί με τις ίδιες ακριβώς μεθόδους που μελετήθηκε και η ελεύθερη. Έτσι μπορεί να ανακαλυφθούν τυχόν διαφορές στη συμπεριφορά της.

9.1. Φάσματα απορρόφησης διαλύματος AICIPc+PLA NPs

9.1.1. Παρασκευή μητρικού (Stock) διαλύματος

Ζυγίστηκαν 1.5 mg νανοσωματίδια με έγκλειστη AICIPc. Όμως σε αυτή την μάζα, ποια είναι η ποσότητα καθαρής AICIPc ;

Στα 43.4 mg νανοσωματιδίων εγκλείστηκαν 4.1 mg AICIPc

Άρα στα 1.5 mg επομένως, βρίσκονται **141 μg AICIPc** .

Δηλαδή αν διαλυθούν σε 2 mL νερό , σύμφωνα με τον τύπο $n = m / M_r$ για τον αριθμό των moles της διαλυμένης ουσίας,

$$n = \frac{141 \times 10^{-6}}{574.97} = 0.245 \text{ moles}$$

Πρέπει να αναχθούν στη συνέχεια στα 1000 mL ώστε να βρεθεί η συγκέντρωση του stock διαλύματος NPs+AICIPc που παρασκευάστηκε: **C=122 μM**

Παρασκευή διαλυμάτων

Χρειάστηκε να παρασκευαστούν δύο διαλύματα συγκέντρωσης σε AICIPc 5μM . Στο ένα χρησιμοποιήθηκε νερό για διαλύτης, ενώ στο άλλο χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το DMSO. Για 3 mL διαλύματος ο υπολογισμός είναι κοινός για τα δύο διαλύματα:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$122 \times 10^{-6} \times V_1 = 5 \times 10^{-6} \times 3 \times 10^3 \rightarrow$$

$$\underline{V_1 = 123 \mu\text{L}}$$

Χρειάζονται επομένως 123 μL από το stock διάλυμα και 2877 μL διαλύτη αντίστοιχα ώστε το διάλυμα να έχει τελικό όγκο 3 mL.

9.2. Φάσματα φθορισμού διαλύματος AICIPc+PLA NPs

Για την απόκτηση του φάσματος φθορισμού των νανοσωματιδίων PLA με τη έγκλειστη φθαλοκυανίνη, χρησιμοποιήθηκε νερό για διαλύτης για το τελικό διάλυμα των 3mL που προοριζόταν για το φασματοφωτόμετρο. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν

συγκέντρωσης σε AICIPc 5μΜ. Για τα φάσματα φθορισμού έγινε διέγερση της ουσίας σε μήκος κύματος 370 nm.

Κεφάλαιο 10.

Μελέτη ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών της έγκλειστης AICIPc σε νανοσωματίδια PLA.

Σκοπός εδώ είναι να μελετηθεί κατά πόσον το διάλυμα νανοσωματιδίων PLA με έγκλειστη AICIPc έχει την ικανότητα να παράγει ελεύθερες ρίζες κατά την ακτινοβόλησή του.

Για την ανίχνευση των ROS χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που είναι βασισμένη στην απορρόφηση, η οποία αναλύθηκε στην ενότητα 7.2 και εκμεταλλεύεται την οξείδωση του NADH και τη μετατροπή του σε NAD⁺.

Η ακτινοβόληση έγινε με τη διάταξη που περιγράφεται και στο αντίστοιχο κεφάλαιο των πειραματικών διατάξεων δηλαδή με το ερυθρό laser. Η ισχύς του laser τέθηκε στα 7,07 mW, που αντιστοιχεί σε ένταση ακτινοβολίας 10 mW/cm².

Διάλυμα blank

Το διάλυμα blank που παρασκευάστηκε περιείχε 1 mg PLA NPs με έγκλειστη φθαλοκυανίνη, διαλυμένα σε 3000 μL νερού.

Διάλυμα ακτινοβόλησης

Για το διάλυμα ακτινοβόλησης, χρησιμοποιήθηκε το blank διάλυμα προσθέτοντάς του 67 μL NADH και 19 μL EDTA.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στη θεματική αποτελέσματα-συμπεράσματα στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

10.1. Ακτινοβόληση

Η ακτινοβόληση έγινε με την ίδια πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών της Φθαλοκυανίνης. Κάθε φορά το διάλυμα εισέρχονταν σε πλαστική κυβέττα μαζί με ένα μαγνητάκι για μαγνητική ανάδευση. Έγιναν συνολικά 13 ακτινοβολήσεις. Αρχικά έως τα 10 λεπτά το δείγμα ακτινοβολείτο ανά 1 λεπτό ενώ μετά μέχρι τα 20 λεπτά το δείγμα ακτινοβολείτο ανά 5 λεπτά.

Κεφάλαιο 11.

Έλεγχος Απελευθέρωσης φαρμάκου

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκε το κατά πόσο και με τι ρυθμό η Αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνη απελευθερώνεται από τα νανοσωματίδια τα οποία την μεταφέρουν, στο διάλυμα στο οποίο έχει διαλυθεί.

Στο εργαστήριο λοιπόν ζυγίστηκαν 0.4 mg AICIPc + NPs και διαλύθηκαν σε 3 mL νερού με σκοπό να βρεθεί η απελευθέρωση του φαρμάκου από τα νανοσωματίδια, στις τέσσερις πρώτες ώρες αλλά και μετά από ένα 24ωρο (συγκεκριμένα 27 ώρες). Αυτό πραγματοποιήθηκε, φυγοκεντρώντας ανα μια ώρα το διάλυμα και παίρνοντας το φάσμα του υπερκείμενου. Εκτός από το φάσμα του υπερκείμενου, αραιώνοντας κάθε φορά το διάλυμα με DMSO (δηλαδή 1500 μ L διαλύματος + 1500 μ L DMSO), ήταν δυνατή έτσι η απόκτηση και του φάσματος του αραιωμένου στη μισή συγκέντρωση διαλύματος. Ο λόγος που έγινε η αραιώση με DMSO ήταν να σπάσουν τα συσσωματώματα που δημιουργούνται μέσα στο νερό και έτσι να απελευθερωθεί εντέλει περισσότερη μάζα Φθαλοκυανίνης. Με τον τρόπο αυτό, εξασφαλίζεται σαφώς καλύτερη εικόνα για την απελευθέρωση του φαρμάκου. Μετά από 27 ώρες έγινε η ίδια διαδικασία πάλι, δηλαδή φυγοκέντριση, αραιώση με DMSO και λήψη φασμάτων.

Κεφάλαιο 12.

Κυτταρικές καλλιέργειες

Στο κεφάλαιο αυτό καταγράφονται τα πρωτόκολλα σύμφωνα με τα οποία πραγματοποιούνταν και γινόταν η διαχείριση των κυτταρικών καλλιεργειών καρκινικών κυττάρων προστάτη LNCaP.

12.1. Πρωτόκολλο απόψυξης

Διάλυμα ξεπλύματος κυττάρων μετά το ξεπάγωμα για αναστολή δράσης του DMSO

Για όγκο διαλύματος $V_{\text{τελ}}=10$ mL, χρειάζονται 9 mL PBS, 1 mL FBS (δηλαδή 10%) και 80 μ L αντιβιοτικό. **(διάλυμα 1)**

Πλήρες θρεπτικό μέσο

για τελικό όγκο $V_{\text{τελ}}=5$ mL, χρειαζόμαστε 4.5 mL RPMI, 0.5 mL FBS (δηλαδή 10%) και 40 μ L αντιβιοτικό. **(διάλυμα 2)**

- Βάζουμε ένα δοχείο ζέσεως με νερό μέσα στον κλίβανο. Όταν αποκτήσει τη θερμοκρασία του κλιβάνου, προσθέτουμε σε αυτό ένα φιαλίδιο με κύτταρα από το δοχείο του υγρού αζώτου ώστε να ξεπαγώσουν.
- Αφού ξεπαγώσουν, τα αδειάζουμε στο διάλυμα 1. Μετά κάνουμε δύο πλυσίματα στο μικρό φιαλίδιο. Κάνουμε 2-3 pipetting για να ομογενοποιηθεί το διάλυμα.
- Φτιάχνουμε ένα tube με νερό ίδιου όγκου για φυγοκέντριση.
- Φυγοκεντρούμε για 7 λεπτά
- Βάζουμε 3mL πλήρους θρεπτικού μέσου σε μια φλάσκα των 25 cm² για να προετοιμαστεί.
- Βγάζουμε από το tube το υπερκείμενο ώστε να μείνουν μόνο τα κύτταρα. Αυτό γίνεται με μια μόνο κίνηση. Αν υπάρξει παλινδρόμηση μπορεί να ξεκολλήσει το pellet με τα κύτταρα. Πετάμε το υπερκείμενο σε δοχείο απόρριψης.
- Στο tube με τα κύτταρα βάζουμε πλήρες θρεπτικό μέσο για να μην είναι εκτεθειμένα στον αέρα.
- Κάνουμε έντονη ανάδευση για να σπάσουν τα συσσωματώματα.
- Με την πιπέτα προσεκτικά τα βάζουμε στη φλάσκα.
- Για να κλείσουμε τη φλάσκα, αποστειρώνουμε μέσα έξω το στόμιό της.
- Παρατηρούμε τη φλάσκα στο μικροσκόπιο.
- Τέλος καθαρίζουμε το χώρο με ισοπροπανόλη και βάζουμε το UV σε λειτουργία για 30 λεπτά.

12.2. Πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας

Διάλυμα για αναστολή δράσης τριψύνης

για τελικό όγκο $V_{\text{τελ}}=5$ mL, χρειαζόμαστε 4.5 mL PBS, 0.5 mL FBS **(διάλυμα 3)**

(δηλαδή 10%) και 40 μ L αντιβιοτικό.

Διάλυμα για ξέπλυμα

για τελικό όγκο $V_{\text{τελ}}=10$ mL , χρειαζόμαστε 10 mL PBS και 80 μ L αντιβιοτικό.

(διάλυμα 4)

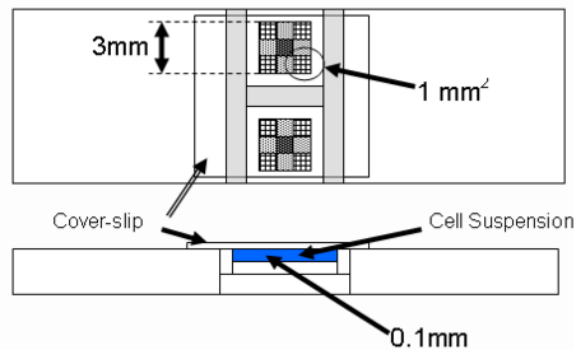
- Παρατηρούμε τη φιάσκα στο μικροσκόπιο
- Απορρίπτουμε το παλιό μέσο
- Ξεπλένουμε τη φιάσκα με 1 mL (2 mL για τη μεγάλη φιάσκα) από το διάλυμα 4
- Επανάληψη πλυσίματος
- Προσθέτουμε 1 mL τρυψίνης (2 mL για τη μεγάλη φιάσκα) για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα . ανακινούμε καλά μικρά κτυπήματα και περιμένουμε λίγο. Παρατηρούμε ότι ξεκόλλησαν.
- Προσθέτουμε 3 mL διαλύματος 3(6 mL για τη μεγάλη φιάσκα) . Ανακινούμε καλά .
- Το βάζουμε σε tube
- Προσθέτουμε 2 mL διαλύματος 3 στη φιάσκα και τα χύνουμε με πιπέτα και αυτά στο tube το οποίο έχει πιά 10 mL αναστολή τριψύνης, 2mL τριψύνης και τα κύτταρα.
- Τοποθετούμε στη φυγόκεντρο
- Φυγοκέντριση 7 λεπτά στις 60 στροφές/λεπτό
- Μέχρι να τελειώσει η φυγοκέντριση βάζω 10mL διάλυμα 2 στη μεγάλη φιάσκα. Τα υπόλοιπα 5 mL τα βάζουμε στο tube με τα κύτταρα
- Αν η φιάσκα χρησιμοποιηθεί ξανά την πλένουμε 2 φορές με το διάλυμα 4. Αλλιώς, ψεκάσουμε με ισοπροπανόλη μέσα- έξω και την απορρίπτουμε.
- Αφαιρούμε με τσιμπίδα το tube από τη φυγόκεντρο.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο με μια κίνηση . τις τελευταίες σταγόνες τις σκουπίζουμε με χαρτί.
- Βάζουμε 5 mL διάλυμα 2 μέσα στο tube.
- Έντονη ανάδευση με πιπέτα
- Σε κάθε μικρή φιάσκα βάζουμε 5mL διάλυμα 2 και τα κύτταρα (στη μεγάλη 15 mL).

12.3. Πρωτόκολλο μέτρησης κυτταρικού αριθμού

1. Μάζεμα των κυττάρων από τη φιάσκα

- Παρατηρούμε τη φιάσκα στο μικροσκόπιο
- Απορρίπτουμε το παλιό μέσο
- Ξεπλένουμε τη φιάσκα με 1 mL (2 mL για τη μεγάλη φιάσκα) από το διάλυμα 4.
- Επανάληψη πλυσίματος

- Προσθέτουμε 1 mL τριψύνης (2 mL για τη μεγάλη φιάσκα) για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα . Ανακινούμε καλά μικρά κτυπήματα και περιμένουμε λίγο. Παρατηρούμε ότι ξεκόλλησαν.
- Προσθέτουμε 3 mL διαλύματος 3(6 mL για τη μεγάλη φιάσκα) . Ανακινούμε καλά .
- Το βάζουμε σε tube
- Προσθέτουμε 2 mL διαλύματος 3 στη φιάσκα και τα χύνουμε με πιπέτα και αυτά στο tube το οποίο έχει πιά 10 mL αναστολή τριψύνης, 2mL τριψύνης και τα κύτταρα.
- Τοποθετούμε στη φυγόκεντρο.
- Φυγοκέντριση 7 λεπτά στις 60 στροφές/λεπτό
- Μετά τη φυγοκέντριση χύνουμε το υπερκείμενο και βάζουμε 10 mL διαλύματος 2 στο tube.
- Παίρνουμε 50 μ L από αυτό και τα βάζουμε μαζί με 200 μ L PBS.
- Από αυτά παίρνουμε 9 μ L και τα τοποθετούμε στον κυτταρομετρητή.

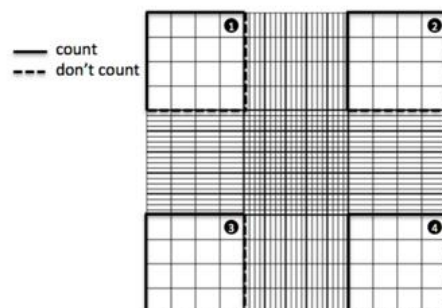


Εικόνα 27. Κυτταρομετρητής.

Αφού βρεθεί ο μέσος όρος, ο αριθμός των κυττάρων πια δίνεται από τον τύπο:

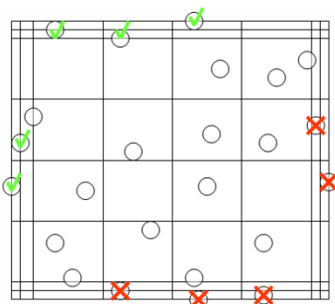
$$\#cells = 10000 \times 5 \times (\text{όγκος διαλύματος κυττάρων})$$

Στην εικόνα 29 απεικονίζεται όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο, το grid του κυτταρομετρητή. Αποτελείται από ένα σταυρό με πυκνές παράλληλες γραμμές, ενώ στις τέσσερις επιμέρους περιοχές -τέσσερις γωνίες- έχει 16 κουτάκια όπου σε αυτόν το χώρο μετράμε τα κύτταρα.



Εικόνα 28. Το πλέγμα για την μέτρηση των κυττάρων

Στην επόμενη εικόνα βλέπουμε με πράσινο “τικ” τα κύτταρα που πρέπει να συνυπολογίζονται στο μέτρημα και με “x” αυτά που δεν πρέπει.



12.4. Πρωτόκολλο μεθόδου MTT

Η δοκιμασία MTT είναι μια χρωματομετρική δοκιμασία για την αξιολόγηση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων. Τα εξαρτώμενα από το NAD(P)-H κυτταρικά ένζυμα οξειδοαναγωγάσης μπορεί, κάτω από ορισμένες συνθήκες, να αντανakλούν στον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων που υπάρχουν σε ένα δείγμα. Αυτά τα ένζυμα είναι ικανά να υποβιβάζουν την MTT χρωστική τετραζολίου, στην αδιάλυτη Φορμαζάνη που έχει χρώμα μοβ. Οπότε τα ζωντανά κύτταρα με ενεργό μεταβολισμό μπορούν να μετατρέπουν το MTT στη μοβ χρώματος φορμαζάνη, που είναι ένα προϊόν με μέγιστη απορρόφηση 570 nm. Όταν τα κύτταρα πεθαίνουν, χάνουν την ικανότητα να μετατρέπουν το MTT σε φορμαζάνη, έτσι η χρωματική αυτή διαφορά που παρουσιάζεται στα δείγματα, χρησιμεύει ως ένα χρήσιμο και βολικό δείκτη μόνο των βιώσιμων κυττάρων. Ο ακριβής κυτταρικός μηχανισμός της μετατροπής του MTT σε φορμαζάνη δεν είναι καλά κατανοητός, αλλά πιθανότατα περιλαμβάνει αντίδραση με NADH ή παρόμοιο αναγωγικό μόριο που μεταφέρει ηλεκτρόνια προς το MTT.⁴²

Η ποσότητα φορμαζάνης (προφανώς ευθέως ανάλογη προς τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων) μετράται εύκολα τελικά με καταγραφή των αλλαγών της απορρόφησης στα 570 nm χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο.

Δίνονται στη συνέχεια λεπτομέρειες για την παρασκευή του διαλύματος MTT καθώς και η διαδικασία που ακολουθείται βήμα-βήμα.

Διάλυμα MTT

5mg σκόνη MTT σε 1mL PBS

Διαλύτης MTT

Για 100 mL διαλύτη MTT θέλουμε, 89.18 mL ισοπροπανόλη, 10 mL Triton X, και 0.822 mL HCL.

- Για κάθε τριβλίο χρειάζομαι 130 μL διαλύματος MTT και 1170 μL PBS.
- Αφού απορρίψω το πλήρες θρεπτικό μέσο από το τριβλίο κάνω πλύσιμο με 1 mL PBS και εισάγω το παραπάνω διάλυμα.
- Επώαση στον κλίβανο για 3 ώρες
- Μετά την επώαση συλλέγω το υπερκείμενο των τριβλίων σε RIA και φυγοκεντρώ για 7 λεπτά.
- Βάζω 1 mL διαλύτη MTT σε κάθε τριβλίο (που περιέχουν κύτταρα που δεν έχουν ξεκολλήσει). Μόλις τελειώσει ή φυγοκέντρωση εισάγω σε κάθε RIA –αφού πετάξω το υπερκείμενο- 1 mL διαλύτη MTT.
- Αφού τώρα κάνουμε καλή ανάδευση με πιπέτα στα RIA και στα τριβλία, προσθέτουμε το περιεχόμενο των τριβλίων στα RIA, τα καλύπτουμε με καπάκια και τα φυλάμε στην ψύξη μέχρι τη μέτρηση των φασμάτων.
- Πριν τη μέτρηση κάνουμε πάλι φυγοκέντρωση και κρατάμε το υπερκείμενο.
- Μετρούμε τα φάσματα απορρόφησης.

12.5. Δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης MTT

Είναι χρήσιμο στις έρευνες που ο κυτταρικός αριθμός υπολογίζεται με χρήση φασμάτων απορρόφησης, να δημιουργείται μια σχέση μεταξύ του αριθμού του κυττάρων και της απορρόφησης ούτως ώστε να ξέρει κανείς για μια συγκεκριμένη τιμή απορρόφησης τι αριθμό κυττάρων έχει. Έτσι λοιπόν και εδώ σκοπός ήταν να παρασκευαστούν 6 τριβλία με έξι διαφορετικούς αριθμούς κυττάρων και εν συνεχεία να αποκτηθούν τα φάσματα απορρόφησης τους.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας, μαζεύονται κύτταρα από τη φλάσκα η οποία ήταν για επώαση στον κλίβανο. Στη συνέχεια σύμφωνα με το πρωτόκολλο μέτρησης κυττάρων, καταμετρούνται τα κύτταρα. Δηλαδή, μετά τη φυγοκέντρωση του περιεχομένου της φλάσκας, απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό και προστέθηκαν 10 mL πλήρες θρεπτικό μέσο στο tube με τα κύτταρα. Από αυτό τα 50 μL τοποθετήθηκαν σε ένα μικρό Eppendorf μαζί με 200 μL PBS. Αφού αναδεύτηκαν, από το τελευταίο διάλυμα, τα 9 μL τοποθετήθηκαν στον κυτταρομετρητή. Τέλος μετρήθηκαν στο μικροσκόπιο τα κύτταρα στα τέσσερα τεταρτημόρια του κυτταρομετρητή. Ο μέσος όρος κυττάρων ήταν 17.75 κύτταρα άρα σύμφωνα με τη γνωστή φόρμουλα:

Είχαμε $17.75 \times 10000 \times 5 \times 10 = 8875000$ κύτταρα στα 10 mL διαλύματος.

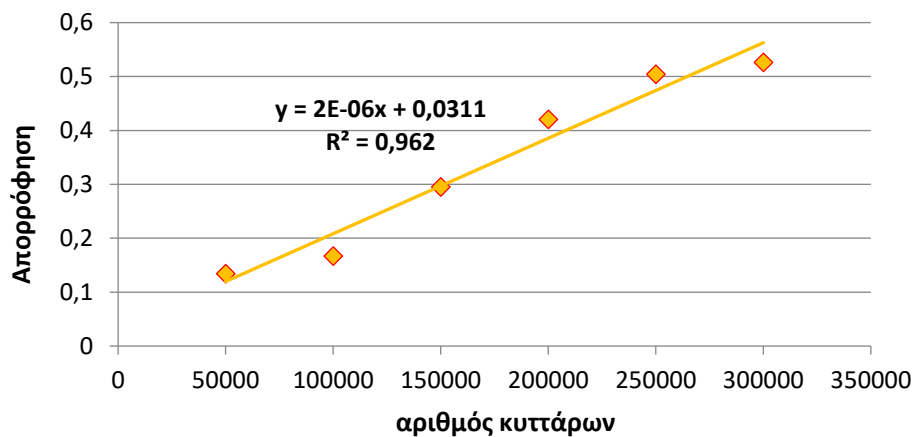
Τα 50.000, 100.000, 150.000, 200.000, 250.000 και 300.000 κύτταρα επομένως θα τα έχω στους όγκους 56 μL , 112 μL , 168 μL , 224 μL , 280 μL , και 336 μL αντίστοιχα σύμφωνα με την απλή αναλογική πράξη:

$$V = \frac{10 \times N_{cell}}{8.875.000}$$

Όπου N_{cell} ο αριθμός κάθε φορά των κυττάρων.

Εισήχθησαν λοιπόν οι έξι αυτοί όγκοι σε έξι τριβλία προσθέτοντας 2 mL πλήρες θρεπτικό μέσο και μπήκαν στον κλίβανο για 24 ώρες ώστε να κολλήσουν (επώαση).

Στη συνέχεια, σύμφωνα με το πρωτόκολλο MTT, μετά από τις 24 ώρες εισάγεται στα τριβλία το διάλυμα MTT αφού τα ξεπλυθούν πρώτα με 1 mL PBS και τα αφεθούν για επώαση 3 ώρες.



Εικόνα 29. Καμπύλη βαθμονόμησης

Η Εικόνα 29 δείχνει την καμπύλη βαθμονόμησης όπως υπολογίστηκε τελικά ύστερα από τις διαδικασίες που περιγράφηκαν. Στον κάθετο άξονα βρίσκεται η απορρόφηση ενώ στον οριζόντιο άξονα ο αριθμός κυττάρων, αυξανόμενου του αριθμού των κυττάρων παρατηρείται αύξηση και της απορρόφησης.

Κεφάλαιο 13.

Έλεγχος τοξικότητας των νανοσωματιδίων

Σκοπός του πειράματος αυτού είναι να διαπιστωθεί εάν και κατά πόσο τα νανοσωματίδια από PLA που παρασκευάστηκαν, όταν έρθουν σε επαφή με τα κύτταρα τα επηρεάζουν. Εννοώντας βέβαια τα νανοσωματίδια PLA χωρίς εγκλεισμένη ουσία μέσα, και φυσικά η παράμετρος που ενδιαφέρει περισσότερο είναι η ενδεχόμενη τοξικότητά τους απέναντι στα κύτταρα. Αυτός είναι πολύ βασικός έλεγχος διότι αργότερα στη Φωτοδυναμική Θεραπεία θα πρέπει η παράμετρος “τοξικότητα των νανοσωματιδίων” να έχει ήδη προσδιοριστεί, δηλαδή θα πρέπει να αποδειχτεί ότι η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων που έχει εισαχθεί στα κύτταρα δεν ευθύνεται για την τελική βιωσιμότητά τους.

13.1. Εισαγωγή νανοσωματιδίων στα κύτταρα

Έτσι λοιπόν θα πρέπει να εισαχθεί μια σειρά διαφορετικών συγκεντρώσεων νανοσωματιδίων στα κύτταρα και στη συνέχεια με έλεγχο με τη μέθοδο MTT να διαπιστωθούν τα ποσοστά βιωσιμότητας. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν οι εξής.:

Ακολουθήθηκε λοιπόν, το πρωτόκολλο μέτρησης κυττάρων που περιεγράφηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο ώστε να εισαχθούν σε 9 τριβλία, 500.000 κύτταρα στο κάθε ένα. Τα 3 από αυτά τα τριβλία προορίζονται για τη μια συγκέντρωση νανοσωματιδίων PLA, τα άλλα 3 τριβλία θα μπει μια δεύτερη συγκέντρωση νανοσωματιδίων και τα υπόλοιπα 3 τριβλία θα μείνουν μόνο με τα κύτταρα ώστε να υπάρχει ικανό μέτρο σύγκρισης. Αφού μπήκαν τα κύτταρα μέσα στα τριβλία, αφέθηκαν για 24 ώρες στον κλίβανο ώστε να κολλήσουν με πλήρες θρεπτικό μέσο.

Στη συνέχεια ζυγίστηκαν 1 mg νανοσωματίδια PLA και τα διαλύθηκαν σε μπάνιο υπέρυθρων σε 2 mL νερού. Μετά από 24 ώρες, έγινε εισαγωγή των συγκεντρώσεων νανοσωματιδίων 21 µg/mL και 42 µg/mL σε όλα τα τριβλία εκτός από τα τρία που τα αφήνουμε χωρίς φάρμακο για δείγμα αναφοράς. Δηλαδή, για τη σειρά 1 (42 µg/mL) διαλύθηκαν 500 µL NPs από το προηγούμενο διάλυμα σε 5.5 mL πλήρους θρεπτικού μέσου, ενώ για τη σειρά 2 (21 µg/mL), διαλύθηκαν 250 µL NPs σε 5.750 µL πλήρες θρεπτικό μέσο. Έτσι προστέθηκαν σε τρία τριβλία 2mL της σειράς 1 ανά τριβλίο και ίδια ποσότητα από τη σειρά 2 σε άλλα τρία τριβλία για την επώαση. Με το ερέθισμα αυτό αφέθηκαν τα κύτταρα άλλες 24 ώρες. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε η διαδικασία MTT με βάση το πρωτόκολλο που προαναφέρθηκε με σκοπό να διαπιστωθεί τελικά τι βιωσιμότητα είχαν τα κύτταρα λόγω του ερεθίσματος των νανοσωματιδίων.

Κεφάλαιο 14.

Έλεγχος τοξικότητας φωτός

Όπως σημειώθηκε και στο θεωρητικό μέρος, η Φωτοδυναμική Θεραπεία είναι ένας συνδυασμός φαρμάκου, φορέα μεταφοράς του και ακτινοβολίας. Σκοπός της θεραπείας είναι ο συνδυασμός αυτών των παραγόντων και μόνο να καταλήγει σε καταστροφή των κυττάρων. Σε καμία περίπτωση δεν είναι επιτρεπτό να καταστρέφονται τα κύτταρα με την παρουσία ενός μόνο παράγοντα από τους παραπάνω.

Έτσι, σκοπός στην ενότητα αυτή είναι η ακτινοβολήση των κυττάρων με ελεγχόμενη ισχύ ακτινοβολίας και να διαπιστωθεί ποιες εντάσεις ακτινοβολίας είναι καταστροφικές για τα κύτταρα και ποιες όχι. Η διάταξη που χρησιμοποιήσαμε για την ακτινοβολήση ήταν αυτή που περιγράφεται στην ενότητα 4.2. Το laser ρυθμίστηκε κατάλληλα κάθε φορά ώστε να δώσει ένταση ακτινοβολίας 6 mW/cm^2 και 9 mW/cm^2 .

14.1. Εισαγωγή κυττάρων σε τριβλία

Αρχικά πρέπει να τοποθετηθεί ίσος αριθμός κυττάρων σε όλα τα τριβλία. Ετοιμάστηκαν 9 τριβλία, τα 3 από τα οποία προορίζονταν για ακτινοβολήση με ακτινοβολίας 6 mW/cm^2 , τα άλλα 3 με ακτινοβολίας 9 mW/cm^2 και τα υπόλοιπα 3 τριβλία δεν ακτινοβολήθηκαν και αποτελούσαν το δείγμα αναφοράς μας. Αποφασίστηκε μετά από μια σειρά δοκιμών ότι ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων/τριβλίο είναι 200.000. Έτσι σύμφωνα με το πρωτόκολλο μέτρησης κυττάρων, εισήχθησαν 200.000 κύτταρα/τριβλίο και τα αφήθηκαν για 24ωρη επώαση.

14.2. Ακτινοβολήση

Μετά το εικοσιτετράωρο, απορρίφθηκε το παλιό πλήρες θρεπτικό μέσο και προστέθηκε στα κύτταρα 500 μL PBS στο κάθε ένα για την ακτινοβολήση. Τα τριβλία τοποθετούνταν ανά τρία για την ακτινοβολήση του κάθε λεπτού. Κατά την ακτινοβολήση αφαιρούνταν τα καπάκια για να αποφευχθούν ανεπιθύμητες ανακλάσεις και άλλες αλληλεπιδράσεις της ακτινοβολίας με το πλαστικό. Έγιναν ακτινοβολήσεις σε εντάσεις ακτινοβολίας 6 mW/cm^2 και 9 mW/cm^2 για 1, 2 και 3 λεπτά αντίστοιχα. Μετά την ακτινοβολήση αφαιρούνταν το PBS και γινόταν πρόσθεση 2 mL πλήρους θρεπτικού μέσου ανά τριβλίο για 24ωρη επώαση στον κλίβανο. Μετά τις 24 ώρες αυτές ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο MTT για να εξακριβωθεί το ποσοστό βιωσιμότητας.

14.3. Έλεγχος Βιωσιμότητας - Διαδικασία MTT

Όπως ειπώθηκε ακολουθείται εδώ το πρωτόκολλο MTT που περιεγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα ώστε να επισημανθεί πώς επηρέασε η ακτινοβολία τα κύτταρα, δηλαδή τι ποσοστό από αυτά επιβίωσε της ακτινοβολήσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο τρίτο μέρος της έρευνας, "αποτελέσματα-συμπεράσματα".

Κεφάλαιο 15.

Φωτοδυναμική Θεραπεία

Αφού μελετήθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια το φάρμακο, η Αλουμινο-Χλωρο-Φθαλοκυανίνη και η Αλουμινο-Χλωρο-Φθαλοκυανίνη εγκλεισμένη σε νανοσωματίδια PLA, η ακτινοβολία που θα χρησιμοποιηθεί και το πώς αυτά συμπεριφέρονται μέσα σε διαλύματα αλλά και μέσα σε κύτταρα, στο σημείο αυτό είναι γνωστά επαρκεί στοιχεία ώστε να γίνει Φωτοδυναμική Θεραπεία. Στο κεφάλαιο αυτό λοιπόν περιγράφεται η προετοιμασία των κυττάρων προς θεραπεία, η εισαγωγή του φαρμάκου σε αυτά και τέλος η διαδικασία ακτινοβολήσής τους και για τις δύο περιπτώσεις της ελεύθερης και της εγκλεισμένης Φθαλοκυανίνης.

15.1. PDT με ελεύθερη Αλούμινο-χλώρο-Φθαλοκυανίνη

15.1.1. Εισαγωγή κυττάρων σε τριβλία

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες κατάλληλος αριθμός κυττάρων ανά τριβλία για φωτοδυναμική θεραπεία είναι 200000. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο μέτρησης κυττάρων ετοιμάζονται 200000 κύτταρα ανά τριβλίο, σε 21 τριβλία. Πρόκειται να γίνει εισαγωγή δυο διαφορετικών συγκεντρώσεων Φθαλοκυανίνης 1 μ M και 1.5 μ M στα τριβλία. Από τα 21 τριβλία, τα 9 τριβλία χρειάζονται για τη συγκέντρωση 1 μ M (3 για κάθε λεπτό ακτινοβολήσης για 1,2 και 3 λεπτά), 9 για τη συγκέντρωση 1.5 μ M και τα 3 υπόλοιπα για τα δείγματα αναφοράς στα οποία δε θα μπει φάρμακο και δε θα ακτινοβοληθούν. Το δείγμα αναφοράς θεωρητικά αναμένεται -εφόσον δεν έρχονται σε επαφή με το φάρμακο αλλά ούτε ακτινοβολούνται - να μείνει σχετικά αμετάβλητο ως προς τον αριθμό των κυττάρων. Σε αυτή τη φάση τα τριβλία έμειναν για επώαση στον κλίβανο για 24 ώρες.

15.1.2. Εισαγωγή της AIClPc στα κύτταρα

Σύμφωνα με υπολογισμούς, σε κάθε τριβλίο μαζί με τα 2500 μ L πλήρους θρεπτικού μέσου, για την συγκέντρωση των 1 μ M μπήκαν και 13.5 μ L AIClPc από τη συγκέντρωση των 3.7 $\times 10^{-5}$ μ M. Αντίστοιχα για την συγκέντρωση των 1.5 μ M μπήκαν 20 μ L από τη συγκέντρωση των 3.7 $\times 10^{-5}$ μ M σε κάθε τριβλίο. Αφέθηκαν στη συνέχεια και πάλι τα τριβλία για επώαση στον κλίβανο για 24 ώρες.

15.1.3. Ακτινοβολήση

Η διαδικασία της ακτινοβολήσης των κυττάρων γίνεται αφού διακοπεί η επώαση των κυττάρων μαζί με την AIClPc μετά από 24 ώρες. Τέλος αφού γίνει η ακτινοβολήση, τα τριβλία με τα κύτταρα γυρνούν πίσω στον κλίβανο για άλλη μια 24ωρη επώαση, εως την τελική μέτρησή τους με τη μέθοδο MTT.

Πιο συγκεκριμένα, μόλις βγήκαν τα κύτταρα από τον κλίβανο απορρίφθηκε το παλιό πλήρες θρεπτικό μέσο και έγινε πλύσιμο του κάθε τριβλίου δύο φορές με 1mL PBS για να επιβεβαιωθεί ότι δεν έμεινε ελεύθερη ποσότητα του φαρμάκου γύρω από τα κύτταρα. Στη συνέχεια ακριβώς πριν την ακτινοβολήση προστέθηκαν 300 μ L PBS/τριβλίο ώστε να μην είναι εκτεθειμένα τα κύτταρα κατά την ακτινοβολήση.

Η ακτινοβολήση έγινε με βοήθεια της διάταξης laser που περιγράφεται στην ενότητα 4.2. Η ένταση ακτινοβολίας που επιλέχθηκε για την ακτινοβολήση σύμφωνα με το πείραμα light only- τοξικότητα του φωτός, ήταν 9 mW/cm². Εγιναν τρεις ακτινοβολήσεις –των 1,2 και 3 λεπτών- για κάθε συγκέντρωση ελεύθερης Φθαλοκυανίνης. Τα τριβλία τοποθετούνταν κάτω από τη δέσμη του laser ανα τρία. Μετά την ακτινοβολήση εισάγονταν 2200 μ L πλήρες θρεπτικό μέσο σε κάθε τριβλίο (σύνολο δηλαδή 2500 μ L διαλύματος) και στη συνέχεια τα τριβλία έμπαιναν και πάλι στον κλίβανο για 24 ώρες επώαση έως την διαδικασία MTT.

15.1.4. Έλεγχος Βιωσιμότητας κυττάρων

Ως συνήθως για να ελεγχθεί το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων ύστερα από μια διαδικασία που αυτά έχουν υποβληθεί (κάποιο ερέθισμα), ακολουθείται η μέθοδος MTT. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο MTT που αναλύεται στην ομώνυμη ενότητα. Εν συντομία, προστέθηκε το διάλυμα MTT στα κύτταρα και αφέθηκαν να επωαστούν με αυτό τρεις ώρες.

15.2. PDT με εγκλεισμένη Αλούμινο-χλωρο-Φθαλοκυανίνη σε νανοσωματίδια PLA

Σε αυτή την ενότητα σκοπός είναι να εφαρμοστεί η Φωτοδυναμική θεραπεία σε κύτταρα, χρησιμοποιώντας ως φάρμακο την Αλούμινο-χλωρο-Φθαλοκυανίνη εγκλεισμένη σε νανοσωματίδια PLA. Για να είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων της φωτοδυναμικής θεραπείας με την ελεύθερη Αλούμινο-χλωρο-Φθαλοκυανίνη, επιβάλλεται οι διαδικασίες καθώς και οι συνθήκες καθ' όλη την προετοιμασία για PDT να είναι ακριβώς ίδιες.

15.2.1. Εισαγωγή κυττάρων σε τριβλία

Σύμφωνα με τη διαδικασία που ακολουθήθηκε για την PDT με την ελεύθερη Φθαλοκυανίνη, κατάλληλος αριθμός κυττάρων ανά τριβλίο για φωτοδυναμική θεραπεία είναι 200000 και εδώ πρέπει αναγκαστικά να βάλουμε τον ίδιο. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο μέτρησης κυττάρων εισάγονται 200000 κύτταρα ανά τριβλίο, σε 21 τριβλία. Πρόκειται να εισαχθούν δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις Φθαλοκυανίνης 1 μ M και 1.5 μ M (εγκλεισμένης σε νανοσωματίδια PLA). Τα 9 τριβλία χρειάζονται για τη συγκέντρωση 1 μ M (3 για κάθε λεπτό ακτινοβολήσης για 1,2 και 3 λεπτά), 9 για τη συγκέντρωση 1.5 μ M και τα 3 υπόλοιπα για τα δείγματα αναφοράς στα οποία δε θα μπει φάρμακο και δε θα ακτινοβοληθούν. Το δείγμα αναφοράς θεωρητικά αναμένεται -εφόσον τα κύτταρα δεν έρχονται σε επαφή με το φάρμακο αλλά ούτε ακτινοβολούνται – να μείνει σχετικά

αμετάβλητο ως προς τον αριθμό των κυττάρων. Σε αυτή τη φάση τα τριβλία έμειναν για επώαση στον κλίβανο για 24 ώρες.

15.2.2. Εισαγωγή της εγκλεισμένης AICIPc σε νανοσωματίδια, στα κύτταρα

Κατασκευάζεται εδώ διάλυμα AICIPc εγκλεισμένης σε νανοσωματίδια PLA με διαλύτη νερό, συγκέντρωσης 165 μM (μητρικό διάλυμα). Σύμφωνα με υπολογισμούς, σε κάθε τριβλίο μαζί με τα 2500 μL πλήρους θρεπτικού μέσου, για την συγκέντρωση των 1 μM μήκαν και 15 μL μητρικού διαλύματος. Αντίστοιχα για την συγκέντρωση των 1.5 μM μήκαν 23 μL μητρικού διαλύματος σε κάθε τριβλίο. Αφέθηκαν στη συνέχεια και πάλι τα τριβλία για επώαση στον κλίβανο για 24 ώρες.

15.2.3. Ακτινοβόληση

Η διαδικασία της ακτινοβόλησης των κυττάρων γίνεται αφού διακοπεί η 24ωρη επώαση των κυττάρων μαζί με την AICIPc. Τέλος αφού γίνει η ακτινοβόληση, τα τριβλία με τα κύτταρα γυρνούν πίσω στον κλίβανο για άλλη μια 24ωρη επώαση, έως την τελική μέτρησή τους με τη μέθοδο MTT.

Πιο συγκεκριμένα, μόλις τα κύτταρα εξήλθαν από τον κλίβανο απορρίφθηκε το παλιό πλήρες θρεπτικό μέσο και έγινε πλύσιμο του κάθε τριβλίου δύο φορές με 1mL PBS ώστε να είναι σίγουρο ότι δεν έμεινε ελεύθερη ποσότητα του φαρμάκου γύρω από τα κύτταρα. Στη συνέχεια ακριβώς πριν την ακτινοβόληση προστέθηκε 300 μL PBS/τριβλίο ώστε να μην είναι εκτεθειμένα τα κύτταρα κατά την ακτινοβόληση.

Η ακτινοβόληση έγινε με βοήθεια της διάταξης laser που περιγράφεται στην ενότητα 4.2. Η ένταση ακτινοβολίας που επιλέχθηκε για την ακτινοβόληση σύμφωνα με το πείραμα light only- τοξικότητα του φωτός, ήταν 9 mW/cm^2 . Έγιναν τρεις ακτινοβολήσεις –των 1,2 και 3 λεπτών- για κάθε συγκέντρωση ελεύθερης Φθαλοκυανίνης. Τα τριβλία τοποθετούνταν κάτω από τη δέσμη του laser ανα τρία. Μετά την ακτινοβόληση προστέθηκαν 2200 μL πλήρες θρεπτικό μέσο σε κάθε τριβλίο (σύνολο δηλαδή 2500 μL διαλύματος) και εισάγονταν ξανά στον κλίβανο για 24 ώρες επώαση έως την διαδικασία MTT.

15.2.4. Έλεγχος Βιωσιμότητας κυττάρων

Όπως και στην προηγούμενη ενότητα, για την ελεύθερη Φθαλοκυανίνη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MTT για την ποσοτικοποίηση της βιωσιμότητας των κυττάρων, έτσι κάναμε και εδώ.

Κεφάλαιο 16.

Χωρικός εντοπισμός του Φαρμάκου στα κύτταρα

Είναι χρήσιμο να επιβεβαιωθεί που εντοπίζεται η Αλουμινο-χλωρο-Φθαλοκυανίνη , είτε αυτή είναι σε ελεύθερη μορφή είτε εγκλεισμένη σε νανοσωματίδια, μέσα και κοντά στα κύτταρα. Είναι χρήσιμο αφ' ενός διότι μια τέτοια εικόνα είναι μια ακόμα άμεση απόδειξη πως το φάρμακο έχει φτάσει και έχει εισβάλει μέσα στα κύτταρα, και αφ' ετέρου, διότι γίνεται αντιληπτό εάν το φάρμακο επηρεάζει τον πυρήνα του κυττάρου ή εάν έχει εναποτεθεί στα μιτοχόνδρια.

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια, τα οποία έχουν το χαρακτηριστικό ότι περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη. Μιτοχόνδρια απαντούν μόνο στα ευκαρυωτικά κύτταρα και αποκαλούνται συχνά "εργοστάσια του κυττάρου", επειδή τα ένζυμά τους διενεργούν τα στάδια του αερόβιου μεταβολισμού τα οποία αποδίδουν ενέργεια. Ευκαρυωτικά κύτταρα, που θα χάσουν τα μιτοχόνδριά τους, δεν μπορούν πλέον να αναζωογονηθούν.

Ίσως η πιο σημαντική λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι οι συνθέσεις της ATP(τρισφωρική αδενοσίνη) από ADP (δισφωρική αδενοσίνη) και του φωσφορικού άλατος όπου η ελεύθερη ενέργεια που απαιτείται για την εκτέλεση της αντίδρασης προέρχεται από την ενέργεια που απελευθερώνεται κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων σε οξυγόνο. Για να συμβεί η σύνθεση της ATP, είναι απαραίτητο τα μιτοχόνδρια να διατηρούν ένα όξινο εσωτερικό χώρο και ένα ηλεκτροχημικό δυναμικό κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης. Αυτό σημαίνει φυσικά πως τα οργανίδια αυτά θα πρέπει να έχουν την ικανότητα για επιλεκτικό έλεγχο της διείσδυσης των χημικών ουσιών που εισέρχονται σε αυτά. Αν χημικές ουσίες θα μπορούσαν να εισέλθουν ελεύθερα, τότε και οι δύο αυτές σημαντικές λειτουργίες θα απειλούνταν. Ωστόσο, μια τελευταία ανακάλυψη έδειξε πως τα μιτοχόνδρια συμβάλλουν στον αποπτωτικό θάνατο (προγραμματισμένος θάνατος κυττάρων). Φαίνεται όμως πως ορισμένα συστατικά που αυξάνουν την πιθανότητα διάτρησης της εξωτερικής μεμβράνης, μπορεί να οδηγήσουν στην απελευθέρωση της cytochrome c. Αυτό είναι και μια από της αιτίες πρόωρης ενεργοποίησης της αποπτωτικής οδού.⁴³

Επίσης, η γέννηση των ελευθέρων ριζών οδηγεί στην έννοια που ονομάζεται οξειδωτικό στρές.⁴⁴ Τα μιτοχόνδρια καταστρέφουν τις ελεύθερες ρίζες χρησιμοποιώντας τη βιταμίνη E, το ασκορβικό οξύ, το συνένζυμο Q 10, το κυτόχρωμα c και τη γλουταθειόνη ή ενζυματικώς με υπεροξειδική δισμουτάση, γλουταθειόνη, υπεροξειδάση και καταλάση. Εάν λοιπόν αυτό το αμυντικό σύστημα προσβληθεί, οι ελεύθερες ρίζες θα μπορέσουν να συσσωρευθούν στα μιτοχόνδρια.[43]

Γίνεται αντιληπτό επομένως γιατί είναι σημαντική η προσβολή των μιτοχονδρίων και γιατί ενδεχομένως να είναι θεμιτή η στόχευσή τους.

Το φάρμακο (ο φωτοευαισθητοποιητής) μπορεί να φθορίζει στο κόκκινο, επομένως εύκολα σε ένα μικροσκόπιο φθορισμού μπορούν εύκολα να διακριθούν οι περιοχές που βρίσκεται το φάρμακο.

16.1. Χωρικός εντοπισμός ελεύθερης Φθαλοκυανίνης

Αρχικά εισάγονται τα κύτταρα στα τριβλία για επώαση στον κλίβανο. Για τον χωρικό εντοπισμό ενδείκνυται τα κύτταρα μέσα στο τριβλίο να μην είναι πάρα πολλά, να μην είναι στρυμωγμένα, ώστε να είναι διακριτά. Επιλέχθηκε λοιπόν ο αριθμός 150000 κύτταρα ανά τριβλίο. Μαζί τοποθετήθηκε και μια ειδική καλυπτρίδα η οποία αργότερα θα χρησιμοποιηθεί για να παρατηρηθούν τα κύτταρα στο μικροσκόπιο. Αφού αφέθηκαν για 24 ώρες επώαση στον κλίβανο τα τριβλία, επόμενο βήμα ήταν η εισαγωγή της Φθαλοκυανίνης σε αυτά και συγκεκριμένα εισήχθησαν 1800 μL πλήρες θρεπτικό μέσο και 200 μL AlCl₃ συγκέντρωσης 3.7×10^{-6} M σε κάθε τριβλίο. Στη συνέχεια τα τριβλία έμειναν στον κλίβανο για τρίωρη επώαση. Στο πέρας του τρίωρου σύμφωνα με τα συμπεράσματά από προηγούμενες ενότητες, έχει γίνει η απελευθέρωση την φθαλοκυανίνης από τα νανοσωματίδια στα κύτταρα, άρα είναι δυνατός ο εντοπισμός της.

Στη συνέχεια, η καλυπτρίδα τοποθετήθηκε επάνω σε πλακίδιο μικροσκοπίου μαζί με 80 μL PBS.

16.2. Χωρικός εντοπισμός εγκλεισμένης σε νανοσωματίδια Φθαλοκυανίνης

Όπως και με την ελεύθερη Φθαλοκυανίνη, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία και εδώ με τις καλυπτρίδες με σκοπό να παρατηρηθεί και τελικά να εντοπιστεί η ακριβής θέση της φθαλοκυανίνης με το μικροσκόπιο φθορισμού μέσα στα κύτταρα. Εισάγεται και εδώ αναγκαστικά η ίδια συγκέντρωση Αλουμινο-Χλωρο-Φθαλοκυανίνης, 3.7×10^{-6} M. Οι εικόνες και τα συμπεράσματα παρατίθενται στην ενότητα συμπεράσματα-αποτελέσματα και στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

Σ. Αποτελέσματα- Συμπεράσματα

Κεφάλαιο 17.

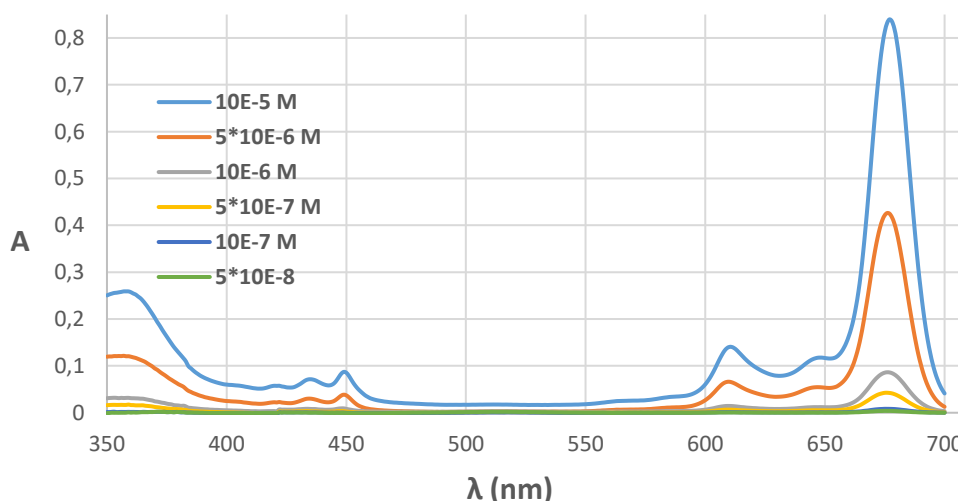
Αποτελέσματα Φωτοφυσικών μελετών της ελεύθερης AICIPc

17.1. Φάσματα απορρόφησης διαφορετικών συγκεντρώσεων AICIPc

Παρατίθενται εδώ τα φάσματα που έδωσε η ελεύθερη χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη σε διαλύματα με διαλύτη DMSO και η ανάλυσή τους.

Στην Εικόνα 30 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων AICIPc 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M. Οι καμπύλες παρουσιάζουν τέσσερις κύριες κορυφές στα 370 nm, 450 nm, 610 nm, και την κύρια και μεγαλύτερη στα 677 nm. Για μικρότερη συγκέντρωση φαρμάκου η καμπύλη απορρόφησης πέφτει ομοιόμορφα. Για συγκεντρώσεις της τάξης 10^{-7} και μικρότερες, η απορρόφηση είναι εξαιρετικά ασθενής.

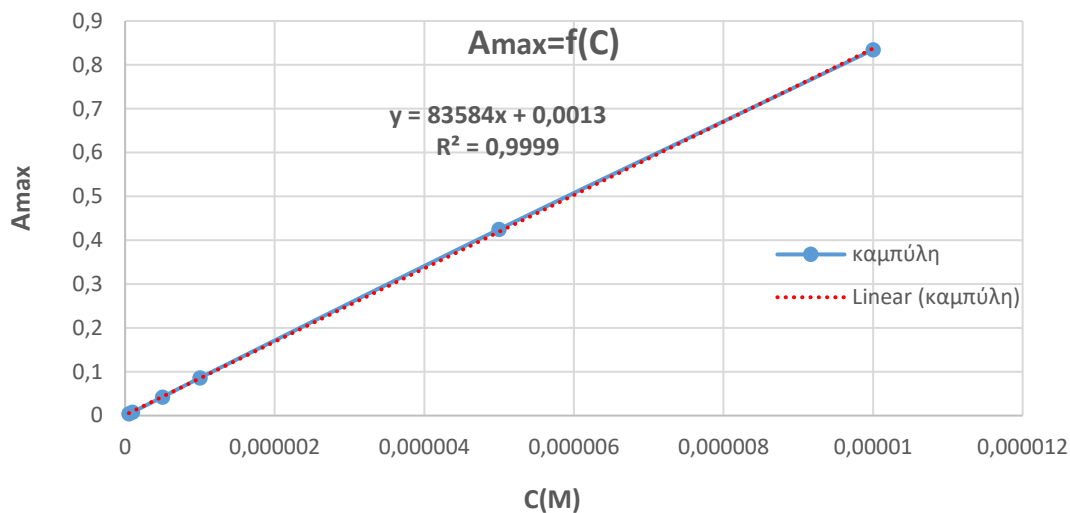
Παρατηρείται, πως το μέγιστο απορρόφησης μένει ανεξαρτήτως συγκέντρωσης της φθαλοκυανίνης, κοντά στα 677 nm. Τρεις ακόμα χαρακτηριστικές κορυφές παρουσιάζονται στο φάσμα, αυτή στα 370 nm, αυτή στα 450 nm και αυτή στα 610 nm όπως αναφέρθηκε. Οι κορυφές 610 και 677 nm είναι προφανώς στη περιοχή του ορατού στο ερυθρό και ανήκουν στην B-Band, ενώ η κορυφή των 370 nm όπως και η κορυφή στα 450 nm βρίσκονται στην περιοχή του μπλε-υπεριώδους, ή αλλιώς στη Soret Band όπως ονομάστηκε από τον Jacques-Louis Soret που την ανακάλυψε.



Εικόνα 30. Φάσματα διαφόρων συγκεντρώσεων AICIPc/DMSO.

Στην Εικόνα 31 φαίνεται η καμπύλη των μέγιστων απορροφήσεων σε μήκος κύματος 677 nm για διάφορες συγκεντρώσεις της AICIPc. Στον κάθετο άξονα είναι η απορρόφηση για τη κορυφή 677nm, που είναι και η μέγιστη στη περίπτωση των φασμάτων αυτών, ενώ στον

οριζόντιο άξονα βρίσκεται η συγκέντρωση του διαλύματος σε AICIPc. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η καμπύλη των απορροφήσεων και με κόκκινη διακεκομμένη γραμμή η γραμμική προσέγγιση. Όπως ήταν αναμενόμενο, για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε AICIPc η απορρόφηση είναι μεγαλύτερη. Παρατηρείται επίσης, πως η καμπύλη είναι σε πολύ καλή προσέγγιση, γραμμική ($R^2=0.9999$).



Εικόνα 31. Καμπύλη μέγιστων απορροφήσεων στα 677 nm για διάφορες συγκεντρώσεις AICIPc (γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης).

Η παραπάνω καμπύλη είναι μια γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης και θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια της έρευνας για προσδιορισμό συγκεντρώσεων από μετρήσεις απορρόφησης, σύμφωνα με την εξίσωση της γραμμικής προσέγγισης που φαίνεται στο γράφημα της εικόνας 32.

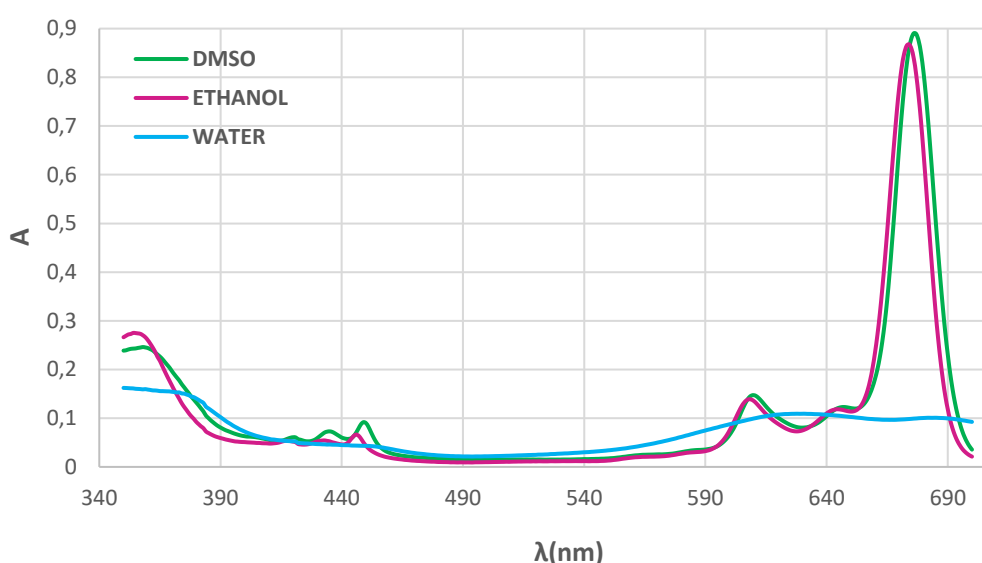
17.2. Φάσματα απορρόφησης της AICIPc σε διαφορετικούς διαλύτες

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκε η απορρόφηση της ελεύθερης AICIPc διαλυμένης σε διαφορετικό διαλύτη. Η AICIPc διαλύθηκε σε έναν πολικό και δύο οργανικούς διαλύτες, σε νερό, αιθανόλη και DMSO αντίστοιχα. Η συγκέντρωση η οποία επιλέχθηκε είναι 10^{-5} M.

Στην Εικόνα 32, φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης της AICIPc συγκέντρωσης 10^{-5} M σε διαφορετικούς διαλύτες. Με κόκκινο φαίνεται το φάσμα απορρόφησης της AICIPc διαλυμένης σε αιθανόλη, με πράσινο με διαλύτη DMSO και με μπλε με διαλύτη νερό. Η συμπεριφορά της φθαλοκυανίνης στην αιθανόλη και το DMSO δε φαίνεται να έχει σημαντικές διαφορές, οι καμπύλες απορρόφησης τους βρίσκονται πολύ κοντά με την καμπύλη για διαλύτη DMSO να είναι ελαφρώς ψηλότερα. Η καμπύλη απορρόφησης για την AICIPc με διαλύτη νερό, αντιθέτως παρουσιάζει πολύ μικρότερη απορρόφηση, ενώ δεν παρουσιάζει κορυφές.

Όσον αφορά στις καμπύλες για τους διαλύτες αιθανόλη και DMSO, παρατηρείται μόνο μια μετατόπιση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος των κορυφών 610 και 677 nm ιδιαίτερα, αλλά και ολόκληρου του φάσματος για την περίπτωση του DMSO σε σχέση με της αιθανόλης.

Το νερό, παρουσιάζει τη συμπεριφορά που φαίνεται στην Εικόνα 32, δηλαδή η απορρόφηση πέφτει σημαντικά, ενώ το μέγιστο της καμπύλης βρίσκεται κοντά στα 380 nm και οι κορυφές στα 610 και 677 nm χάνονται. Το νερό, λόγω συσσωματωμάτων που κάνει μέσα του η φθαλοκυανίνη ως υδρόφοβος φωτοευαίσθητοποιητής, αφήνει ουσιαστικά μικρότερη επιφάνεια (μάζα) της AlCIPc να απορροφήσει ακτινοβολία ούτως ώστε η απορρόφηση στην περίπτωση αυτή να πέφτει πολύ. Ενώ λοιπόν στους οργανικούς διαλύτες έχουμε διακριτές κορυφές με μικρό εύρος και ικανοποιητική απορρόφηση, στο νερό οι κορυφές εξαφανίζονται και η απορρόφηση πέφτει.

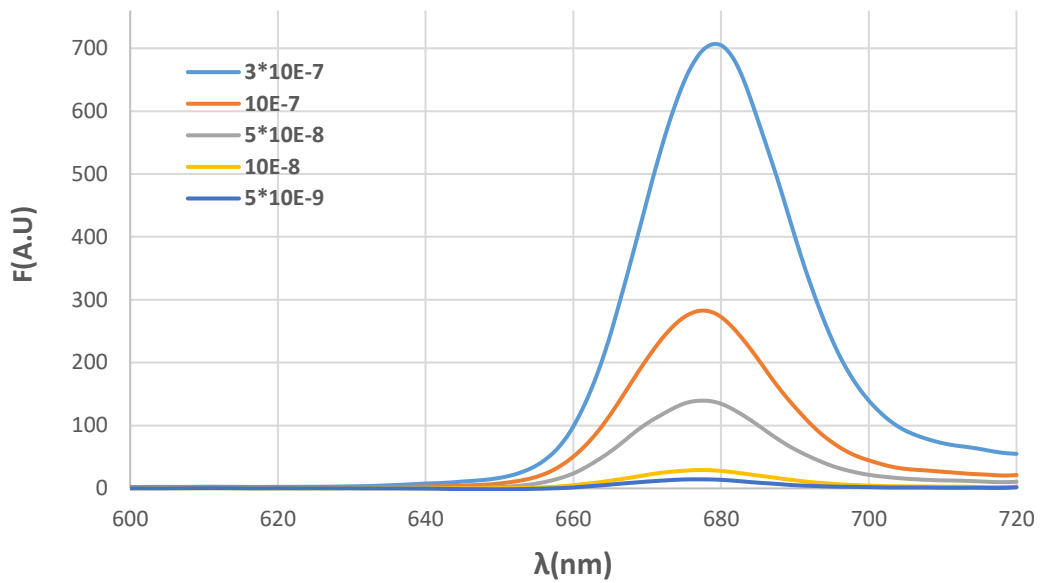


Εικόνα 32. Φάσματα απορρόφησης της AlCIPc συγκέντρωσης 10^{-5} M σε διαφορετικούς διαλύτες.

17.3. Φάσματα φθορισμού διαφορετικών συγκεντρώσεων της AlCIPc

Στην ενότητα αυτή μελετήθηκε η ικανότητα φθορισμού της AlCIPc για διαφορετικές συγκεντρώσεις και παρουσιάζονται τα αποτελέσματα καθώς και τα συμπεράσματά μας. Η AlCIPc διαλύθηκε σε DMSO, ενώ οι συγκεντρώσεις που μελετώνται είναι 3×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-6} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M. Η διέγερση του δείγματος έγινε με ρύθμιση του φασματοφωτομέτρου στα 360 nm.

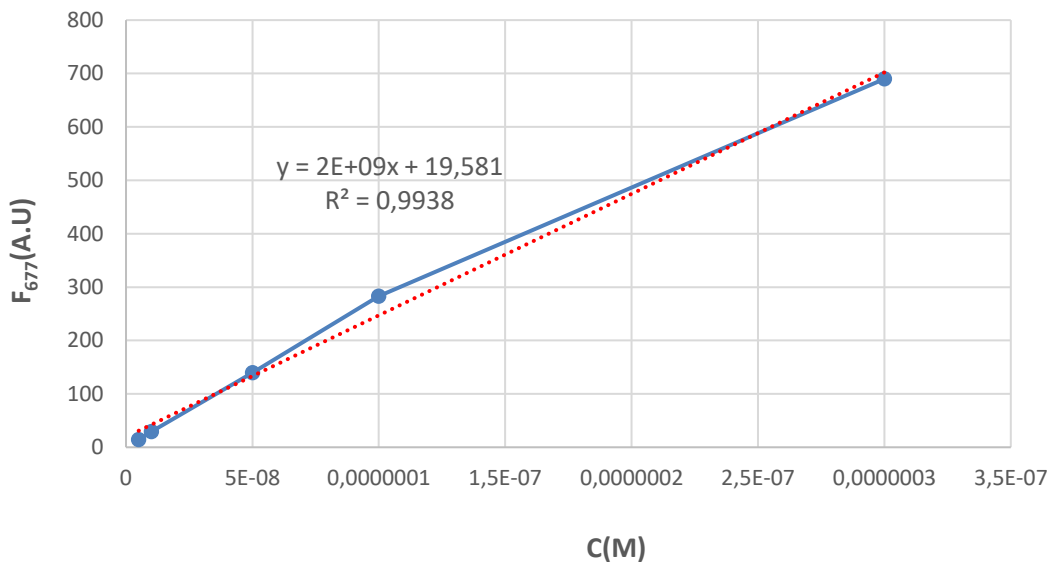
Στην Εικόνα 33 φαίνονται τα φάσματα φθορισμού της AlCIPc για τις πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Παρουσιάζουν μια μοναδική κορυφή σχετικά απότομη στα 677 nm που είναι και χαρακτηριστική του μορίου της. Για μικρότερες συγκεντρώσεις παρατηρείται πως ο φθορισμός πέφτει.



Εικόνα 33. Φάσματα φθορισμού για διάφορες συγκεντρώσεις AICIPc διαλυμένης σε DMSO, με διέγερση στα 360 nm.

Στην Εικόνα 34 φαίνεται η καμπύλη των τιμών φθορισμού σε μήκος κύματος 677 nm σε σχέση με τη συγκέντρωση. παρατηρούμε πως είναι σε πολύ καλή προσέγγιση γραμμική ($R^2=0,994$). Όπως ήταν αναμενόμενο, για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε AICIPc, το δείγμα φθορίζει περισσότερο. Παρατηρείται ακόμα πως η καμπύλη αυτή είναι σε πολύ καλή προσέγγιση γραμμική ($R^2=0,994$).

Η καμπύλη του σχήματος 35 και ιδιαίτερα η εξίσωση της γραμμικής καμπύλης που αναγράφεται επάνω στο γράφημα, χρησιμεύει στην εύρεση της συγκέντρωσης ενός αγνώστου συγκεντρώσεως διαλύματος, εάν φυσικά έχει μετρηθεί πρώτα ο φθορισμός του.



Εικόνα 34. Καμπύλη έντασης φθορισμού στα 677 nm για πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις AICIPc.

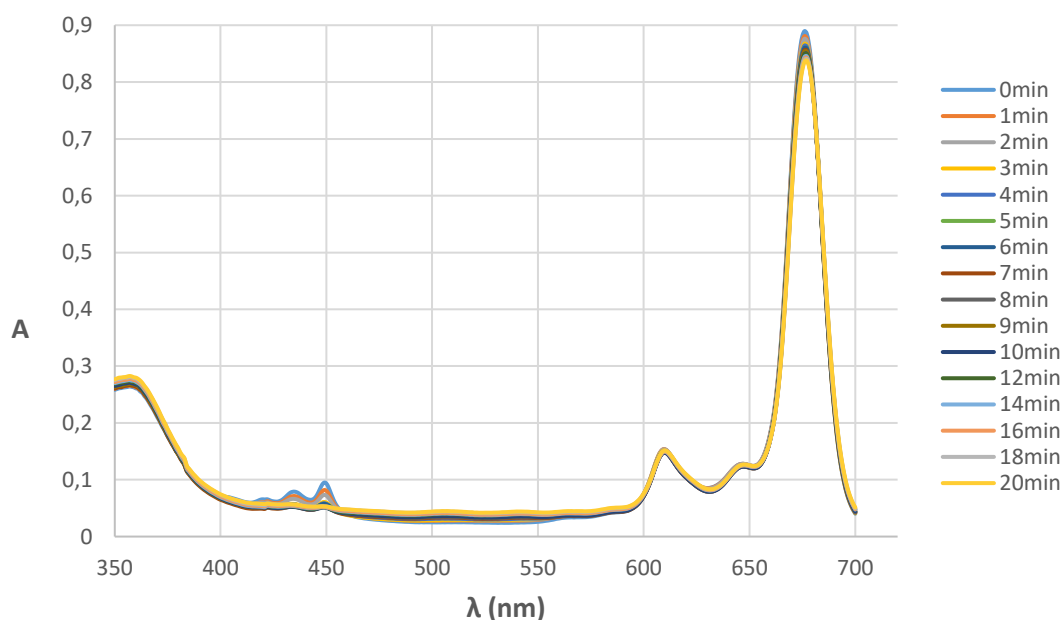
Κεφάλαιο 18.

Φασματοσκοπικές μελέτες φωτολεύκανσης της AICIPc

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα σχετικά με την μελέτη της φωτολεύκανσης της Αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνης. Όπως περιεγράφηκε στο πειραματικό μέρος, χρησιμοποιήθηκαν 2 μέθοδοι για τη μελέτη της φωτολεύκανσης. Η πρώτη χρησιμοποιεί την απορρόφηση της ουσίας ενώ η δεύτερη το φθορισμό της.

18.1. Μελέτη της φωτολεύκανσης της AICIPc με βάση την απορρόφηση

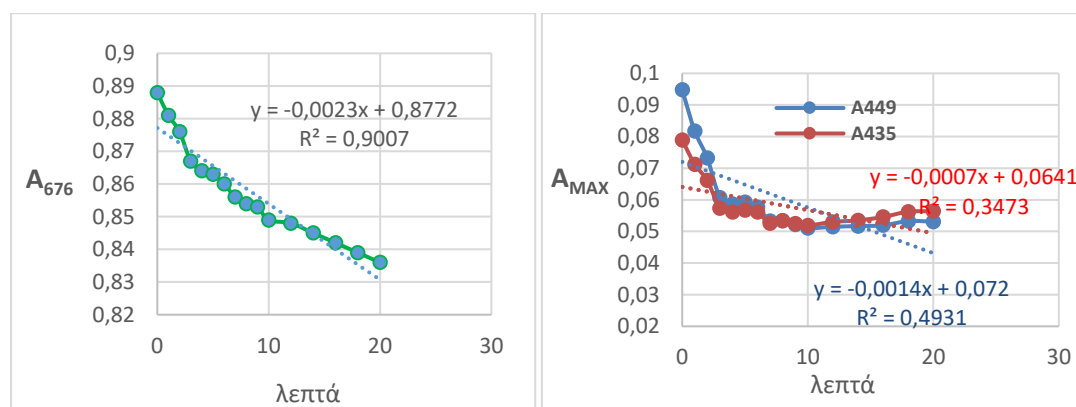
Για διάλυμα ακτινοβόλησης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα AICIPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-5} M το οποίο παρασκευάστηκε με αραιώση του μητρικού διαλύματος που είχαμε στην ψύξη, συγκέντρωσης 3.478×10^{-3} M. Έγιναν συνολικά 15 ακτινοβολήσεις του δείγματος. Η ένταση της ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκε στην επιφάνεια του δείγματος ήταν 10 mW/cm^2 . Μέχρι τα 10 λεπτά γινόταν ακτινοβόληση ανά ένα λεπτό, ενώ από τα 10 μέχρι τα 20, γινόταν ανά δύο λεπτά. Μετά από κάθε ακτινοβόληση καταγραφόταν το φάσμα απορρόφησης του δείγματος με απευθείας μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο. Τα φάσματα που προέκυψαν βρίσκονται στην Εικόνα 35.



Εικόνα 35. Φάσματα απορρόφησης της AICIPc συγκέντρωσης 10^{-5} M διαλυμένης σε DMSO για κάθε χρόνο ακτινοβόλησης- ένταση ακτινοβολίας 10 mW/cm^2 .

Η Εικόνα 35 απεικονίζει τα φάσματα απορρόφησης του δείγματος ύστερα από κάθε ακτινοβολία έως τα είκοσι λεπτά ακτινοβολίας. Το προφίλ της απορρόφησης είναι το χαρακτηριστικό της ουσίας, δηλαδή εμφανίζει τις γνωστές κορυφές με κύρια αυτή στα 677 nm. Όμως όσο το διάλυμα ακτινοβολείται περισσότερο χρόνο, η απορρόφηση σταδιακά μειώνεται. Το γεγονός αυτό γίνεται ορατό κυρίως στις κορυφές 450 nm και 677 nm και λιγότερο στην κορυφή 435 nm. Επομένως η πληροφορία που μπορεί να εξαχθεί από τις καμπύλες αυτές είναι ότι υπάρχει φωτολεύκανση της ουσίας με τη γενική έννοια. Δηλαδή η ενεργός ουσία (φθαλοκυανίνη) υφίσταται υποβάθμιση με το χρόνο ακτινοβολίας με αποτέλεσμα να απορροφά λιγότερο.

Πιο συγκεκριμένα σύμφωνα με τη θεωρία, το μόριο της AICIPc φαίνεται να έχει υποστεί φωτοτροποποίηση (photomodification) αφού παρουσίασε απώλεια απορρόφησης σε ορισμένα μήκη κύματος σε σχέση με το μη ακτινοβολημένο δείγμα. Στα είκοσι πρώτα λεπτά δηλαδή και με ένταση ακτινοβολίας στην επιφάνεια του δείγματος 10 mW/cm^2 , το μόριο του φωτοευαίσθητοποιητή διατηρείται σε μια τροποποιημένη μορφή χωρίς όμως να έχει χάσει την ικανότητά του να απορροφά. Εφόσον λοιπόν το χρωμοφόρο είναι δυνατό ακόμη να απορροφά στο ορατό, δεν έχει υποστεί Φωτολεύκανση (True photobleaching).



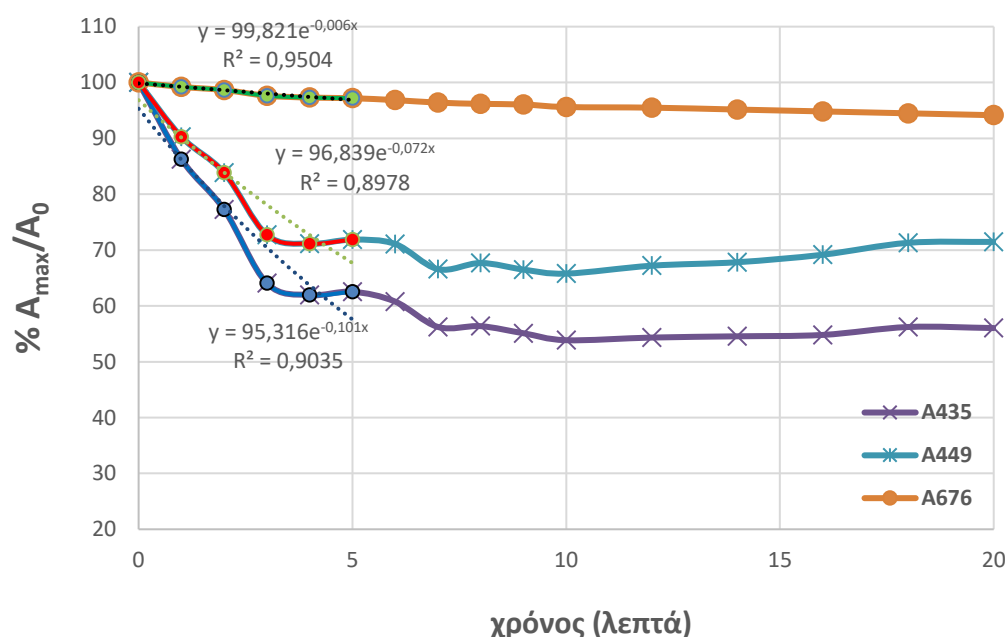
Εικόνα 36. Οι τιμές απορρόφησης της AICIPc για τις 15 ακτινοβολήσεις για τις τρεις χαρακτηριστικές κορυφές.

Στην Εικόνα 36, παρουσιάζονται οι καμπύλες απορρόφησης των τριών κύριων κορυφών του φάσματος της AICIPc, συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολίας. Αριστερά είναι η καμπύλη για την κορυφή 676 nm και δεξιά με μπλε η καμπύλη 449 nm ενώ με κόκκινο η καμπύλη 435 nm. Και οι τρεις παρουσιάζουν πτώση της απορρόφησης με το χρόνο ακτινοβολίας. Η κλίσεις των καμπυλών μέχρι τα 4 πρώτα λεπτά ακτινοβολίας είναι μεγάλες, ενώ μετά σχεδόν μηδενίζονται.

Στην Εικόνα 37 παρουσιάζεται η ποσοστιαία απορρόφηση ως προς το μη ακτινοβολημένο δείγμα, για τις τρεις προηγούμενες κορυφές, συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολίας. Αναγράφονται ακόμα και οι προσεγγιστικές εξισώσεις των καμπυλών για τα πρώτα πέντε λεπτά. Βάζοντας και τις τρεις καμπύλες απορρόφησης στο ίδιο διάγραμμα και υπολογίζοντας την ποσοστιαία απορρόφηση, η σύγκριση γίνεται πιο εύκολη. Παρατηρείται πτώση απορρόφησης για τις κορυφές 435 nm και 449 nm μόνο μέχρι το τέταρτο λεπτό. Από το πέμπτο λεπτό και έπειτα δεν παρατηρείται περαιτέρω μείωση. Για την καμπύλη στα 676 nm παρατηρείται σταθερή πτώση της απορρόφησης με πολύ μικρό ρυθμό μέχρι και το είκοστό λεπτό ακτινοβολίας. Μάλιστα μπορεί να σημειωθεί ότι η

απορρόφηση πέφτει εκθετικά στα πρώτα πέντε λεπτά, αφού όπως είναι ορατό, το εκθετικό μοντέλο ταιριάζει σε μεγάλο βαθμό στις καμπύλες μας ($R^2=90$).

Γίνεται ξεκάθαρο πως φωτοτροποποίηση (φωτολεύκανση) υπάρχει γενικά για την ουσία AlClPc και συμβαίνει έντονα στα πρώτα 5 λεπτά ακτινοβολήσης όπως υποδεικνύουν οι εικόνες 37 και 38.



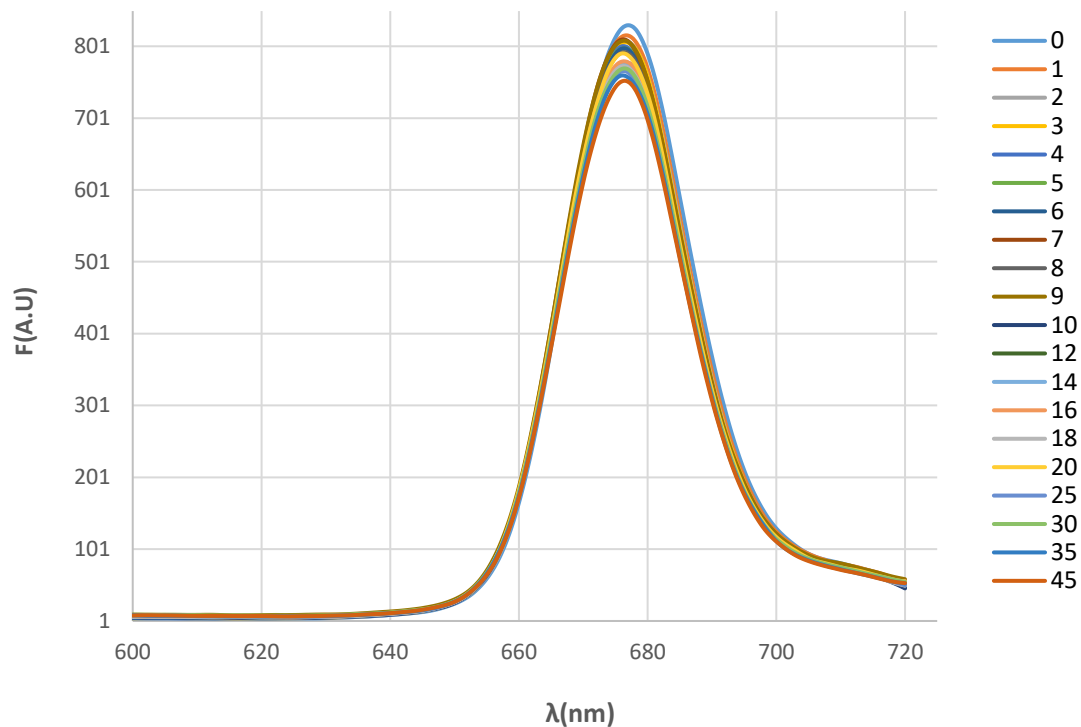
Εικόνα 37. Η ποσοστιαία απορρόφηση της AlClPc ως προς το μη ακτινοβολημένο δείγμα για κάθε κορυφή εκ των 435,449,676 nm συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης.

18.2. Μελέτη της φωτολεύκανσης με βάση το Φθορισμό

Στην ενότητα αυτή μελετήθηκε η φωτολεύκανση της ουσίας AlClPc με χρήση των φασμάτων φθορισμού της και παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής. Όπως συνέβη και στην απορρόφηση, έτσι και στον φθορισμό της AlClPc, αναμένεται μείωσή του με το χρόνο ακτινοβολήσης. Όπως αναφέρθηκε διεξοδικά και στο πειραματικό μέρος, εδώ έγιναν 19 ακτινοβολήσεις, μέχρι τα 10 λεπτά ανα 1 λεπτό, μέχρι τα 20 ανα 2 λεπτά και μέχρι τα 45 ανα 5 λεπτά που τα αντίστοιχα φάσματα φθορισμού βρίσκονται στην Εικόνα 38. Για την απόκτηση των φασμάτων η AlClPc διεγέρθηκε στο τοπικό μέγιστο απορρόφησής της στα 370 nm. Η ένταση ακτινοβολίας του laser ήταν 10 mW/cm^2 στην επιφάνεια του δείγματος, ενώ το διάλυμα που μελετήθηκε ήταν συγκέντρωσης $3 \times 10^{-7} \text{ M}$, AlClPc.

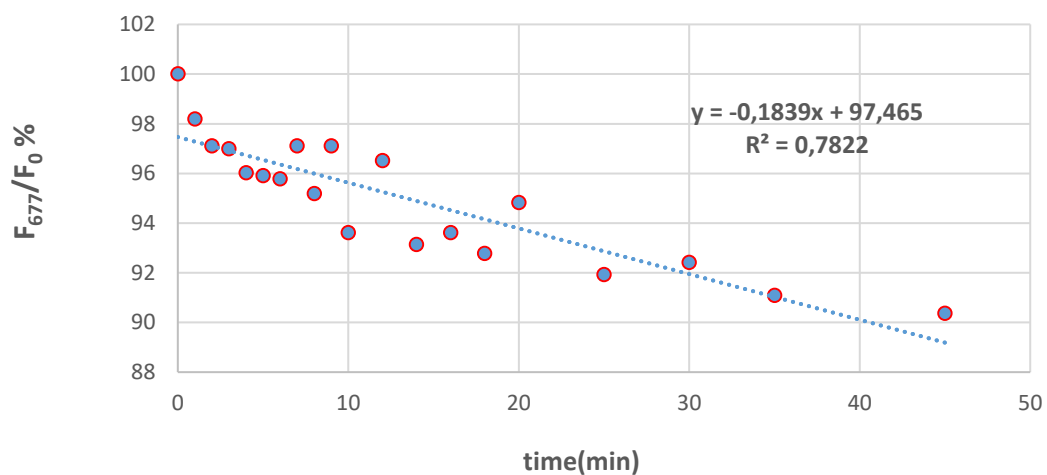
Στην Εικόνα 38 φαίνονται τα φάσματα φθορισμού της AlClPc για διέγερση στα 370 nm, για χρόνους ακτινοβολήσης έως και 45 λεπτά. Το προφίλ των φασμάτων φθορισμού ταιριάζει απόλυτα με το σύνηθες προφίλ για την AlClPc. Υπάρχει μια μοναδική κορυφή για όλους

τους χρόνους ακτινοβολήσης στα 677 nm, με την καμπύλη να πέφτει σε όλα τα μήκη κύματος με τον χρόνο ακτινοβολήσης.



Εικόνα 38. Φάσματα φθορισμού μετά από κάθε ακτινοβολήση, διαλύματος AICPCs/DMSO 3×10^{-7} M – διέγερση στα 370 nm.

Το γράφημα της Εικόνα 39 δίνει την ποσοστιαία μείωση του φθορισμού σε σχέση με το φθορισμό του μη ακτινοβολημένου δείγματος για την κορυφή των 677 nm συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης.



Εικόνα 39. Η ποσοστιαία μείωση του φθορισμού σε σχέση με την τιμή φθορισμού του μη ακτινοβολημένου δείγματος για την κορυφή των 677 nm, συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης.

Στο πρώτο δεκάλεπτο παρατηρείται μια μεγάλη πτώση στην τιμή φθορισμού. Την χρονική περίοδο αυτή ο φθορισμός πέφτει κατά 6.4 % σε σχέση με τον φθορισμό του μη ακτινοβολημένου δείγματος στην κορυφή 677nm. Ενώ μέχρι τα 45 λεπτά η συνολική πτώση της τιμής του φθορισμού είναι κατά 9.6 % της αρχικής τιμής. Δηλαδή από τα 10 λεπτά μέχρι τα 45 ο φθορισμός μειώνεται μόνο κατά 3.2 % της αρχικής του τιμής.

Συμπερασματικά, από τη μελέτη των φάσματος απορρόφησης της AICIPc σε 45 λεπτά ακτινοβολίας, το μόριο της Φθαλοκυανίνης τροποποιήθηκε καθώς ο φθορισμός μειώθηκε κυρίως στην κορυφή 677nm (φωτοτροποποίηση) . Το μόριο όμως δεν έχασε την ικανότητά του να φθορίζει μετά το πέρας των 45 λεπτών, άρα δε φωτοκαταστράφηκε (true photobleaching) τελείως.

Κεφάλαιο 19.

Μελέτη της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών, της ελεύθερης Αλουμινο-χλωρο-Φθαλοκυανίνης

Οι ελεύθερες ρίζες και η παραγωγή τους είναι ζωτικής σημασίας για την φωτοδυναμική θεραπεία, αφού χωρίς αυτές δε θα ήταν δυνατή οι καταστροφή των κυττάρων. Σε προηγούμενα κεφάλαια περιγράφηκε λεπτομερώς πως παρασκευάστηκαν διαλύματα που παρείχαν κατάλληλα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού για να επιβεβαιωθεί τυχόν παραγωγή ελευθέρων ριζών. Στον παρόν κεφάλαιο λοιπόν, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης για την ικανότητα της Χλωρο-αλούμινο-Φθαλοκυανίνης για παραγωγή ελευθέρων ριζών.

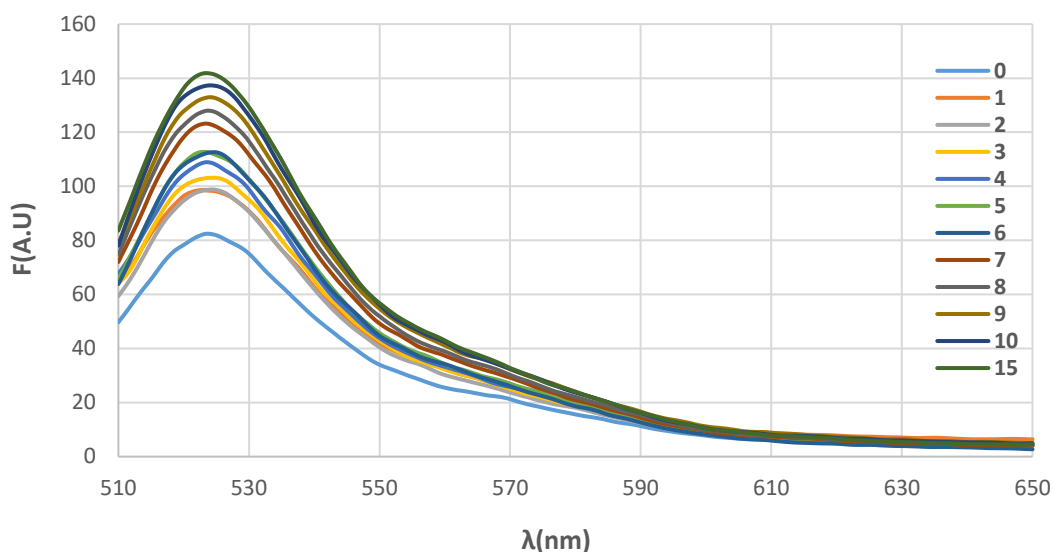
19.1. Ανίχνευση ROS με βάση φάσματα φθορισμού

Όπως εξηγήθηκε στο πειραματικό μέρος για τη μελέτη παραγωγής ελευθέρων ριζών παρασκευάστηκαν συνολικά τρία διαλύματα προς ακτινοβολήση. Έγιναν στη συνέχεια 11 διαδοχικές ακτινοβολήσεις για τα τρία διαλύματα. Έγιναν δηλαδή δέκα ακτινοβολήσεις του ενός λεπτού και μία των πέντε λεπτών για κάθε διάλυμα δηλαδή το blank (διάλυμα χωρίς AIClPc) και δύο διαλύματα AIClPc σε PBS συγκεντρώσεων 1.50×10^{-6} M και 10^{-6} M. Η ακτινοβολήση έγινε με το laser να είναι ρυθμισμένο ώστε η ένταση ακτινοβολίας στην επιφάνεια του δείγματος να είναι 10 mW/cm^2 . Αμέσως μετά από κάθε ακτινοβολήση, η κυβέττα με το δείγμα τοποθετούνταν στο φασματοφωτόμετρο για τη λήψη του φάσματος φθορισμού. Για το σκοπό αυτό τα δείγματα διεγέρθηκαν στα 490 nm αφού εκεί διεγείρεται η ουσία CM-H₂DCFDA.

Στην Εικόνα 40 απεικονίζονται τα φάσματα φθορισμού της CM-H₂DCFDA έως και για 15 λεπτά ακτινοβολήσης. Το διάλυμα αυτό αποτελείται κυρίως από PBS(2930 μl) και τα υπόλοιπα 70 μl περιέχουν την ουσία CM-H₂DCFDA, τον ιχνηθέτη φθορισμού μας. Τα φάσματα είναι πανομοιότυπα έχοντας μια μοναδική κορυφή, τη χαρακτηριστική της ουσίας CM-H₂DCFDA κοντά στα 525 nm όπως φαίνεται και στην εικόνα 22. Παρατηρείται αύξηση του φθορισμού με το χρόνο ακτινοβολήσης που είναι πιο αισθητή κοντά στην κορυφή. Το αποτέλεσμα αυτό είναι λογικό αφού όσο ακτινοβολείται το δείγμα τόσες περισσότερες ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται και ο μοριακός ανιχνευτής CM-H₂DCFDA τις "ανιχνεύει" και φθορίζει περισσότερο.

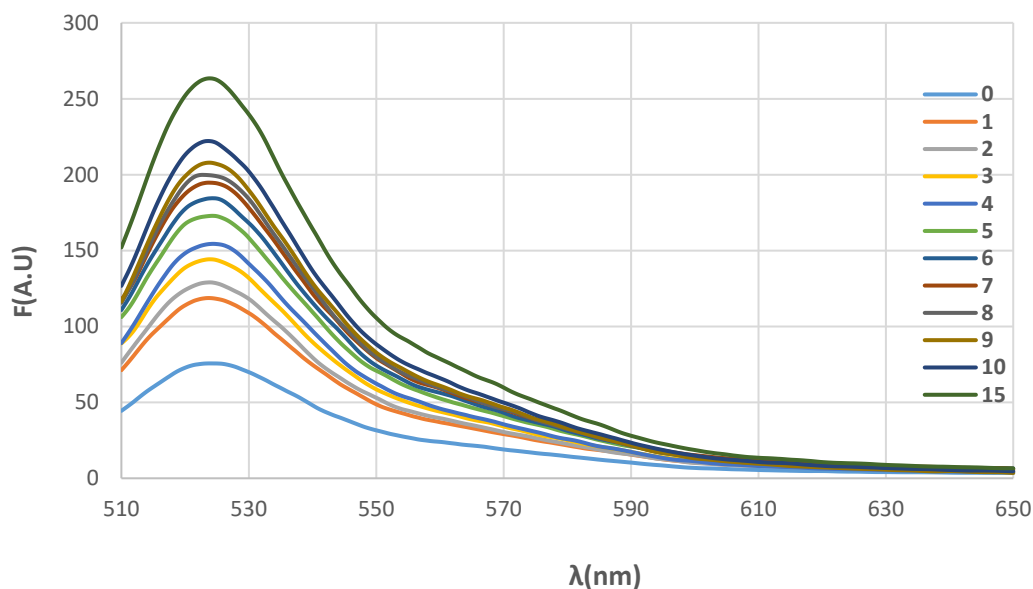
Η Εικόνα 41 δείχνει τα φάσματα φθορισμού του διαλύματος που περιέχει τη CM-H₂DCFDA αλλά και την AIClPc σε συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^{-6}$ M, έως και 15 λεπτά ακτινοβολήσης. Πάλι εμφανίζεται μια κορυφή στα 525 nm και ο φθορισμός αυξάνεται με το χρόνο ακτινοβολήσης.

Η Εικόνα 42, αντίστοιχα, απεικονίζει τα φάσματα φθορισμού του διαλύματος που περιέχει τη CM-H₂DCFDA αλλά και την AIClPc σε συγκέντρωση 10^{-5} M, έως και 15 λεπτά ακτινοβολήσης. Εμφανίζεται μια κορυφή στα 525 nm και ο φθορισμός αυξάνεται με το χρόνο ακτινοβολήσης.



Εικόνα 40. φάσματα φθορισμού για ακτινοβόληση διαλύματος blank (CM-H₂DCFDA+PBS) – διέγερση στα 490 nm.

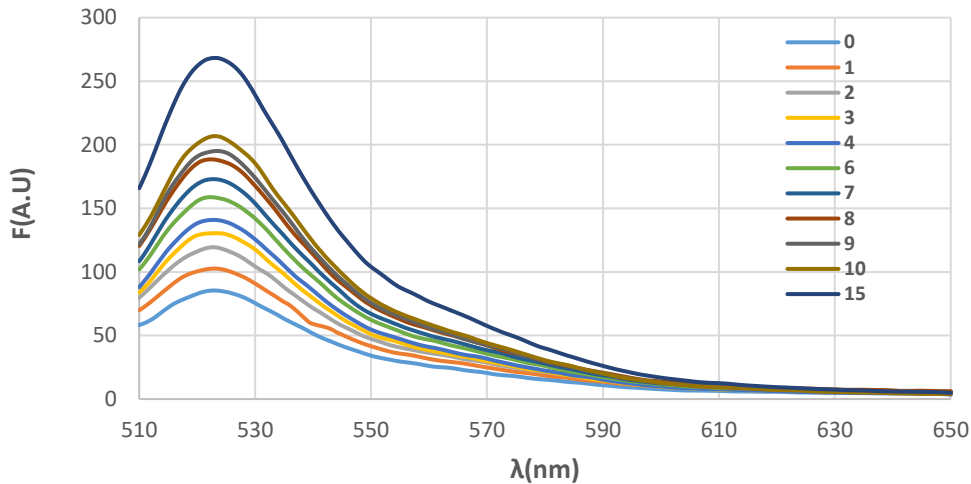
Όπως ήταν αναμενόμενο λοιπόν, φαίνεται στις εικόνες 41 και 42, πως ο φθορισμός αυξάνεται με το χρόνο ακτινοβόλησης αφού όλο και περισσότερες ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται με συνέπεια ο ιχνηθέτης φθορισμού να φθορίζει ολοένα και περισσότερο.



Εικόνα 41. Φάσματα φθορισμού διαλύματος CM-H₂DCFDA + AIClPc συγκέντρωσης 1,5*10E-6 M για ακτινοβολήσεις έως 15 λεπτά – διέγερση στα 490 nm.

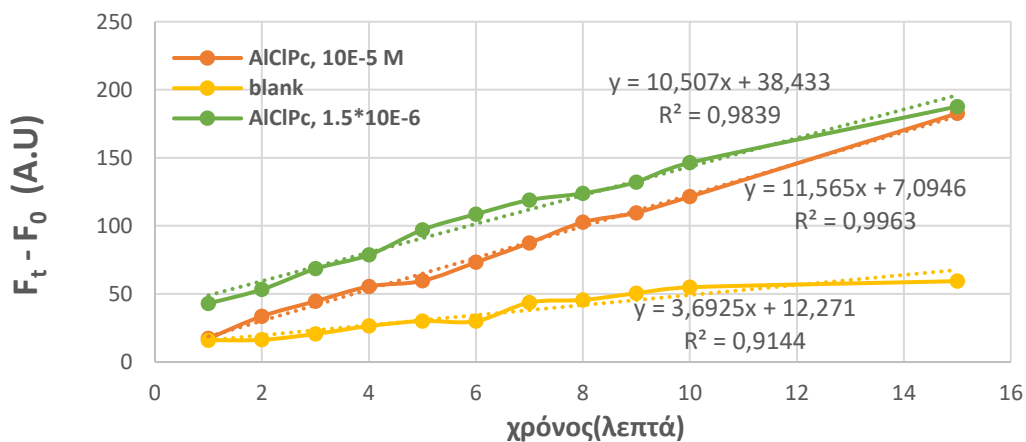
Αξίζει να σημειωθεί πως στις εικόνες 41 και 42 ο φθορισμός είναι πιο έντονος από αυτόν του διαλύματος blank στην εικόνα 40, ενώ για τα ίδια λεπτά ακτινοβόλησης, τα διαλύματα φτάνουν σε μεγαλύτερη ένταση φθορισμού. Επίσης η καμπύλη για το μηδενικό χρόνο

ακτινοβόλησης παρατηρείται πως είναι στο ίδιο επίπεδο (ίδια ένταση στο μέγιστο) και στις τρεις περιπτώσεις. Αυτό είναι λογικό διότι χωρίς ακτινοβόληση, το μόνο που υπάρχει είναι ο φθορισμός της CM-H₂DCFDA αφού διεγείρεται στο ίδιο μήκος κύματος και στις τρεις περιπτώσεις.



Εικόνα 42. Φάσματα φθορισμού διαλύματος CM-H₂DCFDA + AICPC συγκέντρωσης 10E-5 M για ακτινοβολήσεις έως 15 λεπτά – διέγερση στα 490 nm.

Για το λόγο αυτό και για να υπάρχει μια πιο ξεκάθαρη εικόνα, στην Εικόνα 43 παρατίθεται το γράφημα που παρουσιάζει για τα τρία διαλύματα που ακτινοβολήθηκαν τις εντάσεις φθορισμού στο μήκος κύματος 523 nm, έχοντας αφαιρέσει όμως την τιμή του φθορισμού του μη ακτινοβολημένου δείγματος στο ίδιο μήκος κύματος, συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης. Οπου F_t είναι η τιμή του φθορισμού στα 525 nm για κάθε χρόνο ακτινοβόλησης, και F_0 η τιμή του φθορισμού στο ίδιο μήκος κύματος για το μη ακτινοβολημένο δείγμα. Οι τρεις καμπύλες έχουν θετική κλίση, με τη καμπύλη της μεγαλύτερης συγκέντρωσης φθαλοκυανίνης 10^{-5} M να έχει ελαφρώς μεγαλύτερη κλίση από αυτή της μικρότερης συγκέντρωσης 1.5×10^{-6} M. Η καμπύλη του δείγματος χωρίς φθαλοκυανίνη έχει αισθητά μικρότερη κλίση ωστόσο από τις άλλες δύο καμπύλες.

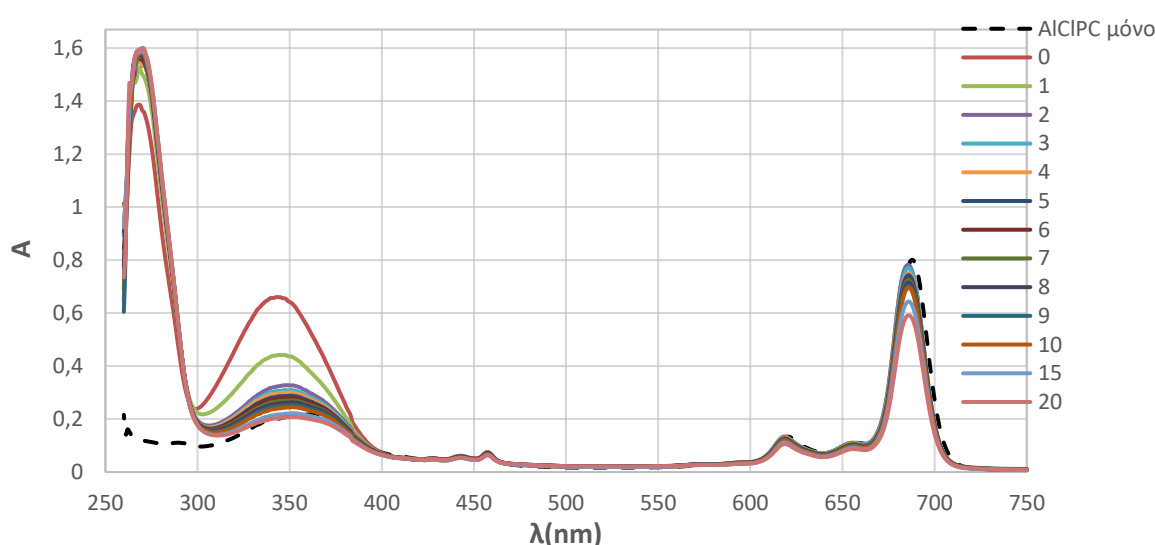


Εικόνα 43. Εντάσεις φθορισμού στο μήκος κύματος 523 nm, έχοντας αφαιρέσει την τιμή του φθορισμού του μη ακτινοβολημένου δείγματος στο ίδιο μήκος κύματος, συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης, για τα τρία διαλύματα.

Οι κλίσεις αυτές υποδεικνύουν τον ρυθμό παραγωγής ελευθέρων ριζών συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης. Συγκεκριμένα αποδεικνύεται πως ο ρυθμός παραγωγής ελευθέρων ριζών από μεγαλύτερη συγκέντρωση φθαλοκυανίνης είναι μεγαλύτερος από αυτόν μιας μικρότερης συγκέντρωσης.

19.2. Ανίχνευση ROS με βάση φάσματα Απορρόφησης

Το σκεπτικό εδώ είναι πως η ακτινοβόληση των διαλυμάτων παράγει ελεύθερες ρίζες, οι οποίες οξειδώνουν το NADH και το κάνουν NAD⁺. Διαβάζοντας λοιπόν την γνωστή συμπεριφορά των φασμάτων δημιουργούμενου NAD⁺ (Εικόνα 24), μπορούν να βγούν συμπεράσματα και να γίνει μια ποιοτική εκτίμηση έμμεσα για την παραγωγή των ελευθέρων ριζών.



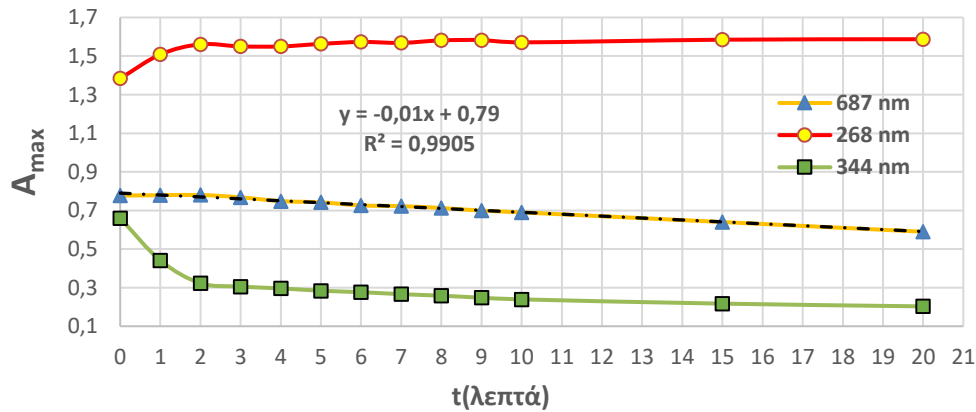
Εικόνα 44. Φάσματα απορρόφησης διαλύματος AICIPC+NADH+EDTA έως και 20 λεπτά ακτινοβόλησης.

Η Εικόνα 44 δείχνει τα φάσματα απορρόφησης του διαλύματος που περιέχει AICIPC, NADH και EDTA. Τα φάσματα παρουσιάζουν πέντε κορυφές. Από αυτές οι τρεις μικρότερες είναι οι χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης του μορίου της Φθαλοκυανίνης. Οι δε κορυφές στα 344 nm και στα 268 nm είναι οι χαρακτηριστικές κορυφές των NADH και NAD⁺.

Η διακεκομμένη καμπύλη στην Εικόνα 44, αντιστοιχεί στο blank διάλυμα. Συγκρίνοντας τα φάσματα της Εικόνα 44, παράγεται το συμπέρασμα ότι συμφωνούν με τη θεωρητική μορφή των φασμάτων της Εικόνα 24 όσον αφορά το NADH και το NAD⁺. Δηλαδή η κορυφή στα 344 nm όπως ήταν αναμενόμενο, πέφτει με το χρόνο ακτινοβόλησης ενώ η κορυφή στα 268 nm αυξάνεται με το χρόνο ακτινοβόλησης. Γίνεται κατανοητό πως στην κορυφή 268 nm η απορρόφηση αυξάνεται διότι η ακτινοβόληση δημιουργεί ουσιαστικά περισσότερο NAD⁺, ενώ η απορρόφηση στα 344 nm πέφτει διότι το NADH που απορροφά εκεί, σταδιακά γίνεται NAD⁺. Στη χαρακτηριστική κορυφή της AICIPC στα 677 nm, παρατηρείται σταδιακή πτώση με το χρόνο ακτινοβόλησης, φωτολύκανση της ουσίας, δηλαδή η AICIPC χάνει σταδιακά την ικανότητά της να απορροφά στο φάσμα αυτό.

Στο γράφημα της Εικόνα 45 αναπαρίστανται οι απορροφήσεις των τριών κορυφών 344 nm, 268 nm και 677 nm συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης. Με κίτρινο χρώμα φαίνεται ότι το μέγιστο απορρόφησης στα 687 nm φθίνει γραμμικά με το χρόνο ακτινοβόλησης. Με

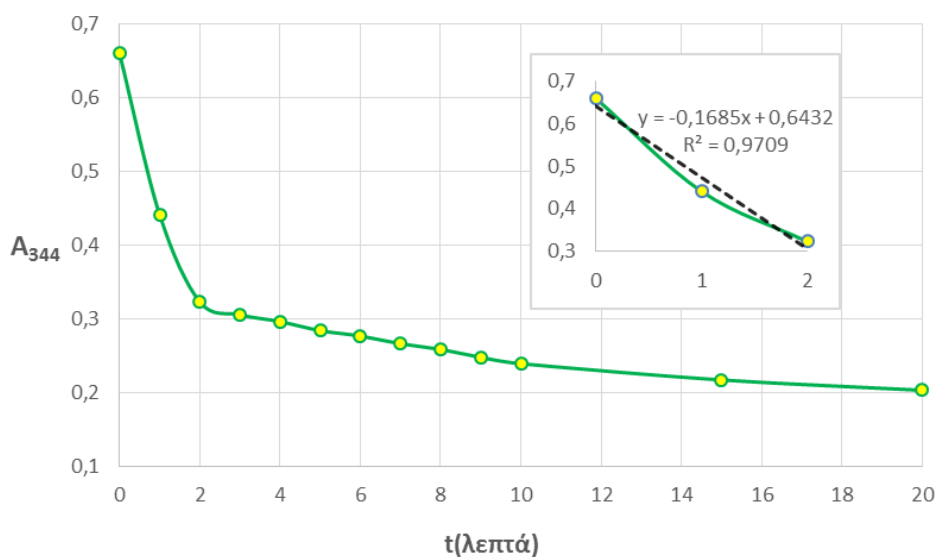
πράσινο φαίνεται η καμπύλη απορροφήσεων στην κορυφή 344 nm. Εδώ η μείωση είναι απότομη τα πρώτα 2 λεπτά ενώ μετά φθίνει με μικρή αρνητική κλίση. Παρομοίως και η κόκκινη καμπύλη των απορροφήσεων για την κορυφή 268 nm, έως τα 2 πρώτα λεπτά αυξάνεται απότομα και μετά παρουσιάζει πλατό. Εφόσον η συμπεριφορά αυτή οφείλεται στην οξείδωση του NADH και τη δημιουργία του NAD^+ , είναι λογικό η συμπεριφορά της πράσινης καμπύλης να ακολουθεί αντιστρόφως ανάλογα τη συμπεριφορά της κόκκινης.



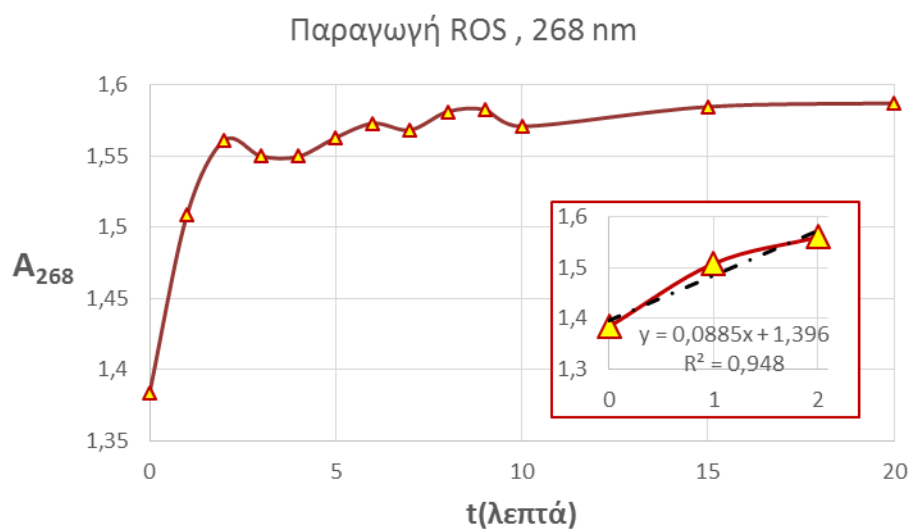
Εικόνα 45. Τιμές μέγιστης απορρόφησης για κάθε χρόνο ακτινοβολήσης στις τρεις επιμέρους κορυφές.

Στις Εικόνα 46, Εικόνα 47 φαίνεται καλύτερα η μείωση και η αύξηση της απορρόφησης για τις κορυφές 344 nm και 268 nm αντίστοιχα. Δίνεται επίσης και ένθετο γράφημα με την γραμμική προσέγγιση των καμπυλών στα δύο πρώτα λεπτά ακτινοβολήσης. Οι κλίσεις πράγματι είναι μεγάλες (αρνητική και θετική αντίστοιχα). Γίνεται αντιληπτό πως η παραγωγή των ελευθέρων ριζών συμβαίνει τα πρώτα 2 λεπτά κυρίως. Μετά από τα 2 πρώτα λεπτά ο ρυθμός παραγωγής τους μειώνεται σημαντικά.

Παραγωγή ROS, 344 nm



Εικόνα 46. Μέγιστα απορρόφησης στην κορυφή στα 344 nm συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης.



Εικόνα 47. Μέγιστα απορρόφησης στην κορυφή στα 268 nm συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολίας.

Κεφάλαιο 20.

Διαδικασία εγκλεισμού - Σύνθεση νανοσωματιδίων PLA

Σε προηγούμενο κεφάλαιο περιγράφηκε η διαδικασία και τις μεθόδους που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή των νανοσωματιδίων PLA και τον εγκλεισμό σε αυτά της AICIPc. Σε αυτό το κεφάλαιο, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του εγκλεισμού των νανοσωματιδίων και ο χαρακτηρισμός τους με διάφορες μεθόδους.

20.1. Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων με zetasizer

Στον επόμενο πίνακα (πίνακας 1) είναι καταχωρημένες τιμές χαρακτηριστικών των νανοσωματιδίων PLA όπως το ζητα-δυναμικό, το μέγεθος και το PDI όπως αυτά καταγράφηκαν από το σύστημα zetasizer.

Zeta-potential	size(nm)	PDI
-14,6	393,5	0,295
-14,4	379.5	0,243
-15,2	391.4	0,270

Πίνακας 1. Αποτελέσματα του zetasizer

Το μέγεθος είναι η πιο σημαντική παράμετρος στο χαρακτηρισμό ενός συστήματος νανοσωματιδίων, δεδομένου ότι επηρεάζει το προφίλ της απελευθέρωσης και το ρυθμό υποβιβασμού και είναι ένας καθοριστικός παράγοντας της πρόσληψης και της βιοκατανομής των νανοσωματιδίων. Η επιθυμητή τιμή μεγέθους εξαρτάται από το στοχευόμενο ιστό, αλλά συνήθως κυμαίνεται από 20 έως 500 nm, το μέγιστο. Το μέσο μέγεθος κοντά στα 400 nm καθιστά τα νανοσωματίδια PLA μεσαίου μεγέθους και ικανά για "πλοήγηση" των ουσιών μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό.

Το Zeta-Potential μας δίνει ουσιαστικά μια εικόνα για το πόσο σταθερά είναι τα νανοσωματίδια μέσα σε μια κolloειδή διασπορά και μετρά το επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων. Το αρνητικό φορτίο μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία των carboxyl-end ομάδων στη δομή του PLA.⁴⁵ Οι τιμές του ζήτα δυναμικού που καταγράφηκαν είναι λογικές και μαρτυρούν πως τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν είναι αρκετά σταθερά στη διασπορά.

Το PDI (Polydispersity index) είναι μέτρο της ετερογένειας των μεγεθών των μορίων ή νανοσωματιδίων σε ένα μείγμα. Γενικά εάν το PDI είναι μεγαλύτερο του 0.7 τότε το δείγμα θεωρείται ακατάλληλο διότι το μέγεθος της κατανομής των σωματιδίων είναι πολύ ευρύ, ενώ τιμή μικρότερη του 0,05 απαντάται σπανίως. Στην παρούσα μελέτη οι τιμές του PDI είναι αρκετά καλές κάτι που επιβεβαιώνει πως το δείγμα των νανοσωματιδίων είναι

ομοιογενές στο χώρο (άρα και ολόκληρη η διασπορά), όσον αφορά στο μέγεθος των νανοσωματιδίων.

20.2. Υπολογισμός συγκέντρωσης AICIPc της διασποράς και του ποσοστού εγκλεισμού

Στους επόμενους πίνακες κυρίως υπολογίζεται η συγκέντρωση της διασποράς AICIPc σε νανοσωματίδια PLA μέσω της απορρόφησης που είχαν τα τρία υπερκείμενα όπως εξηγήθηκε στο αντίστοιχο κεφάλαιο στο πειραματικό μέρος.

Πίνακας 2. Υπολογισμός μάζας φθαλοκυανίνης περιεχόμενης στα υπερκείμενα.

1ο υπερκείμενο 250 (ml)		C(M) A=150223 C + 0,0157	M ₀ (moles/L)	m (g/L)	m(g)
A	0,2044	1,256E-06	0,000151	0,0867	0,02167
V(μL)	25				
V _{dmsο} (μL)	2975				
2ο υπερκείμενο 217,5 (ml)		6,410E-07	3,21E-06	0,0018	0,0004
A	0,112				
V(μL)	600				
V _{dmsο} (μL)	2400				
3ο υπερκείμενο 258 (ml)		3,395E-08	2,55E-07	0,00015	3,78E-05
A	0,0208				
V(μL)	400				
V _{dmsο} (μL)	2600				

Τα μέγιστα απορρόφησης(A) στην κορυφή των 678 nm όπως και οι λεπτομέρειες για τους όγκους που χρησιμοποιήθηκαν και οι υπολογισμοί παρατίθενται στον Πίνακα 2. Οπου C(M) είναι οι συγκεντρώσεις σε AICIPc των υπερκειμένων, m(g/L) η μάζα AICIPc ανα λίτρο και m(g) η τελική μάζα της περιεχόμενης στο υπερκείμενο AICIPc σε γραμμάρια. Στο πεδίο με πράσινο χρώμα δίνεται την εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης με βάση την οποία υπολογίστηκε η συγκέντρωση, χρησιμοποιώντας την απορρόφηση που μετρήθηκε και καταγράφεται στον πίνακα αυτό. Το V(μL) είναι ο όγκος που προστέθηκε από το κάθε υπερκείμενο (μαζί με τον αντίστοιχο όγκο διαλύτη DMSO) στο δείγμα που παρασκευάστηκε για μέτρηση του φάσματος απορρόφησης.

Στον Πίνακα 3 δίνεται η αρχική μάζα AICIPc , η μάζα AICIPc που περιέχεται στα υπερκείμενα, η υπολειπόμενη μάζα AICIPc και ο τελικός υπολογισμός της συγκέντρωσης AICIPc στη διασπορά και του ποσοστού εγκλεισμού που υπολογίστηκε από τον παρακάτω τύπο.

$$EE = \frac{\text{total amount of compound} - (\text{non} - \text{encapsulated compound})}{\text{total amount of compound}}$$

Πίνακας 3. Υπολογισμός συγκέντρωσης AICIPc στη διασπορά.

$m_{\text{αρχικό}}$ (g)	$m_{\text{υπερκ.}}$ (g)	$m_{\text{υπολ.}}$ (g)	C(διασποράς)	E.E
0,0309	0,0221	0,0088	2,00E-04	0,2846

Παραθέτοντας στον Πίνακα 4, τα αποτελέσματα μελέτης⁴⁶ εγκλεισμού του φυσικού αντιοξειδωτικού aureusidin σε νανοσωματίδια PLA που έκαναν στο εργαστήριο οργανικής χημείας του τμήματος Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ, είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα ενδιαφέρουν τα μεγέθη PDI, PS (μέγεθος νανοσωματιδίων σε nm), Z-P(zeta-potential) και EE%(Encapsulation Efficiency).

Πίνακας 4.Αποτελέσματα μελέτης εγκλεισμού του φυσικού αντιοξειδωτικού aureusidin σε νανοσωματίδια PLA.[46]

NPs	\bar{M}_n (g/mol)	T (°C)	DL (%)	PS (nm)	PdI	Z-P (mV)	EE (%)
1	19,000	25	–	376.9 ± 10.1	0.273 ± 0.016	–7.0 ± 0.7	–
2	19,000	25	20	323.7 ± 3.5	0.167 ± 0.004	–12.3 ± 0.8	94.60
3	43,400	25	–	240.8 ± 0.3	0.108 ± 0.250	–2.0 ± 0.0	–
4	43,400	25	20	264.1 ± 5.5	0.128 ± 0.010	–6.6 ± 0.3	88.58
5	43,400	25	60	231.1 ± 3.6	0.288 ± 0.026	–3.5 ± 0.1	97.99
6	43,400	35	20	232.2 ± 7.9	0.123 ± 0.020	–6.6 ± 0.9	82.82
7	70,000	25	–	254.7 ± 1.1	0.213 ± 0.077	–7.9 ± 0.1	–
8	70,000	25	20	371.4 ± 12.9	0.264 ± 0.021	–13.1 ± 0.1	69.05
9	101,000	25	–	311.6 ± 6.1	0.279 ± 0.009	–16.5 ± 0.5	–
10	101,000	25	20	316.7 ± 5.4	0.274 ± 0.084	–18.7 ± 0.1	68.25
11	154,000	25	–	307.4 ± 13.6	0.227 ± 0.072	–13.3 ± 0.3	–
12	154,000	25	20	540.7 ± 9.8	0.248 ± 0.020	–15.2 ± 0.4	82.21

DL: drug loading, PS: particle size, PDI: polydispersity index, Z-P: Zeta potential, EE: encapsulation efficiency.

Οι τιμές του zeta-potential είναι πολύ κοντά με αυτές της παρούσας μελέτης για τα νανοσωματίδια PLA. Οι τιμές του PDI είναι επίσης πολύ κοντά στις τιμές για την παρούσα μελέτη. Το μέσο μέγεθος παρουσιάζεται και αυτό να συμφωνεί με το μέγεθος των νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν. Τα ποσοστά εγκλεισμού όμως είναι σημαντικά μεγαλύτερα. Αυτό ίσως οφείλεται στην διαφορετική ουσία προς εγκλεισμό.

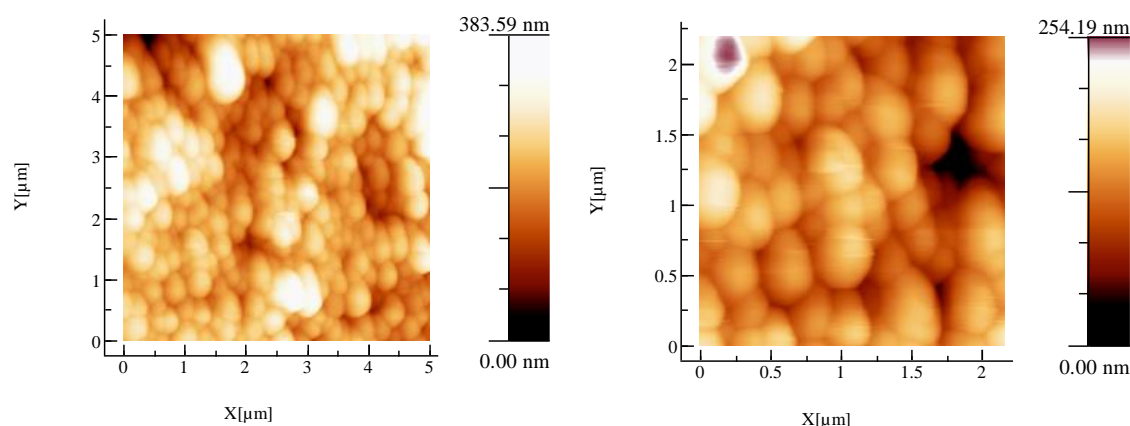
20.3. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων με μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM).

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού των νανοσωματιδίων με το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης.

Στην Εικόνα 48 και 50 παρουσιάζονται οι εικόνες των νανοσωματιδίων που αποκτήθηκαν με το AFM για περιοχές σάρωσης 5,2 και 1 μm αντίστοιχα. Η μπάρα δεξιά από κάθε εικόνα αντιπροσωπεύει το ύψος του δείγματος σε χρωματική κλίμακα, με μαύρο να είναι το χαμηλότερο και άσπρο το υψηλότερο σημείο. Για παράδειγμα, στην περιοχή σάρωσης 5x5

μm το ύψος του δείγματος που καταγράφηκε είναι 383 nm. Προσοχή, το ύψος του δείγματος διαφέρει από τη διάσταση του νανοσωματιδίου διότι υπάρχουν πιθανά ορισμένα στρώματα νανοσωματιδίων στο δείγμα και όχι ένα μόνο επίπεδο.

Στην εικόνα 49-α η εικόνα αντιστοιχεί στη σάρωση 5×5 nm και παρατηρείται μεγάλος αριθμός νανοσωματιδίων σε επαφή μεταξύ τους. Τα νανοσωματίδια φαίνονται να είναι κατά προσέγγιση σφαιρικά. Η εικόνα 49-β αντιστοιχεί στη σάρωση 2×2 nm. Τέλος η εικόνα 50 με 1×1 nm έχει στοχεύσει ουσιαστικά σε

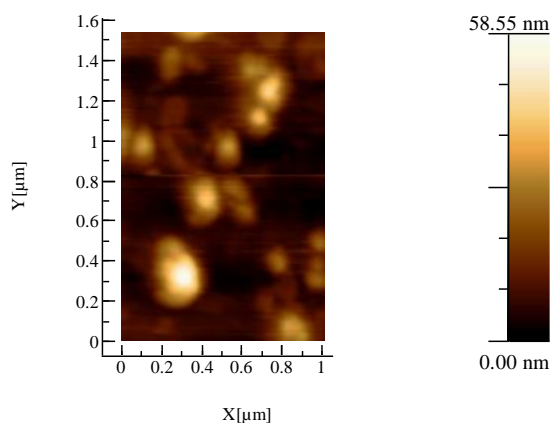


5 απομονωμένα νανοσωματίδια, που χωρίς τις μεταξύ τους τάσεις πια αποδεικνύεται πως είναι σφαιρικής δομής.

(α)

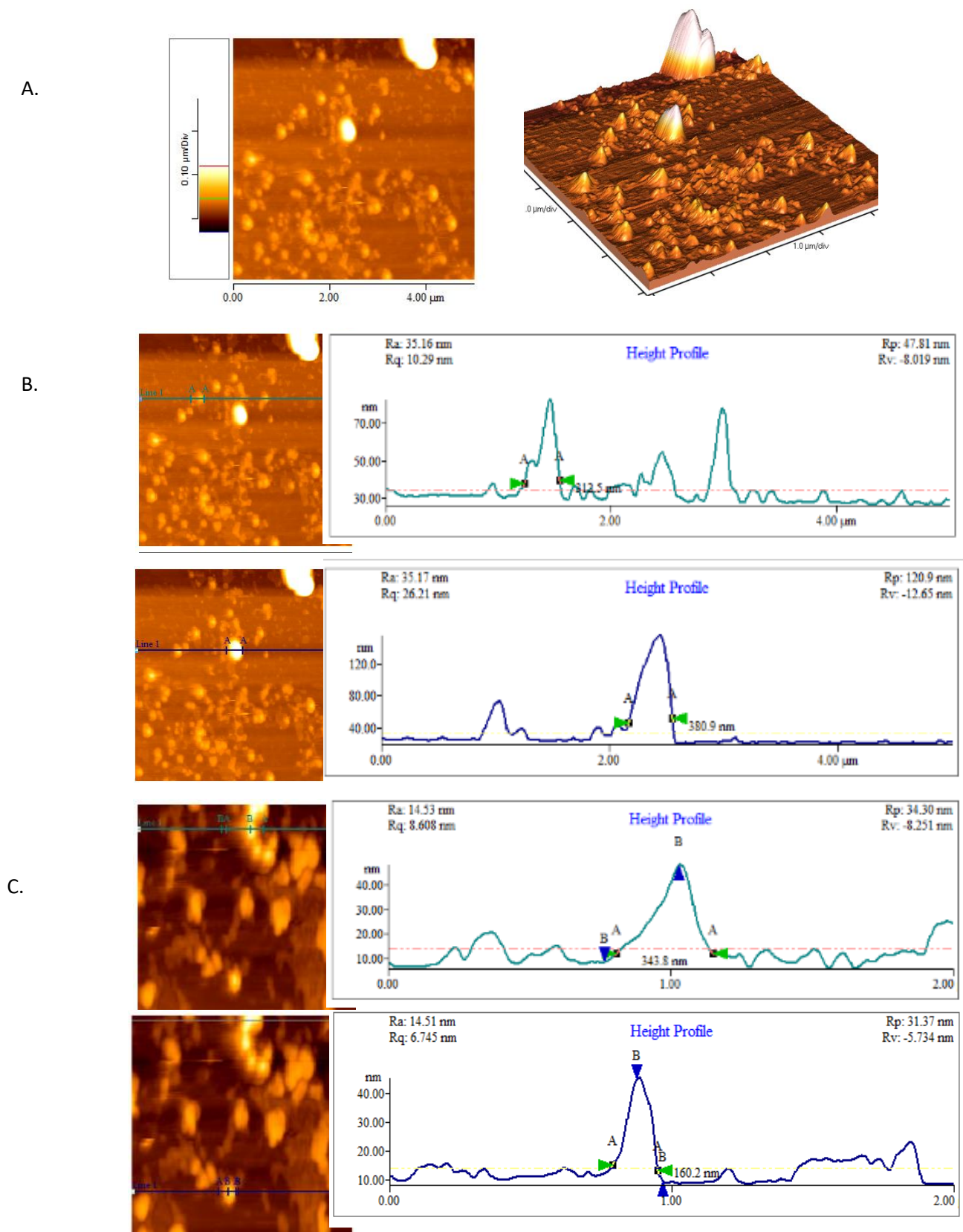
(β)

Εικόνα 48. Εικόνες νανοσωματιδίων από AFM. (α) σε κάδρο 5×5 nm και (β) σε κάδρο 2×2 nm.



Εικόνα 49. Εικόνα AFM νανοσωματιδίων σε περιοχή σάρωσης 1×1 nm.

Στην Εικόνα 50, δίνονται οι τοπογραφικές εικόνες AFM, νανοσωματιδίων PLA μαζί με τα αντίστοιχα διαγράμματα προφίλ ύψους. Στην ομάδα (A) φαίνονται οι 2D και 3D εικόνες για σάρωση επιφάνειας 4*4μm για ένα σημείο του δείγματος, στην ομάδα (B) για το ίδιο σημείο του δείγματος δίνεται η μέτρηση πάχους δύο διαφορετικών νανοσωματιδίων και στην ομάδα (C) δίνονται οι μετρήσεις πάχους νανοσωματιδίων για ένα διαφορετικό σημείο του δείγματος, επιφάνειας σάρωσης 2*2μm. Σε κάθε περίπτωση, αριστερά από το διάγραμμα προφίλ ύψους, φαίνεται στο σημείο σάρωσης του δείγματος, η ευθεία που έχει



Εικόνα 50. Τοπογραφικές εικόνες AFM, νανοσωματιδίων PLA μαζί με τα αντίστοιχα διαγράμματα προφίλ ύψους. (A) 2D και 3D εικόνα για σάρωση 4*4μm για ένα σημείο του δείγματος, (B) για το ίδιο σημείο μέτρηση πάχους δύο διαφορετικών νανοσωματιδίων. (C) μετρήσεις πάχους νανοσωματιδίων για διαφορετικό σημείο του δείγματος, σάρωση 2*2μm.

επιλεχθεί να υπολογιστεί για αυτή το προφίλ ύψους από το πρόγραμμα. Με πράσινο χρώμα φαίνονται επίσης οι κέρσορες επιλογής του πάχους πάνω στα διαγράμματα, ενώ με "AA" καταγράφονται και επάνω στην 2D εικόνα.

Τελικά τα νανοσωματίδια φαίνεται να έχουν μορφή κάψουλας, σχεδόν σφαιρικά με μια διάσταση 150-400 nm όπως υπολογίστηκε από το πρόγραμμα *image analysis 2.1* και φαίνεται στα προφίλ της Εικόνα 50, που βέβαια αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε συμφωνία με τα μεγέθη που έδωσε ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων με το zetasiser (≈ 390 nm).

Κεφάλαιο 21.

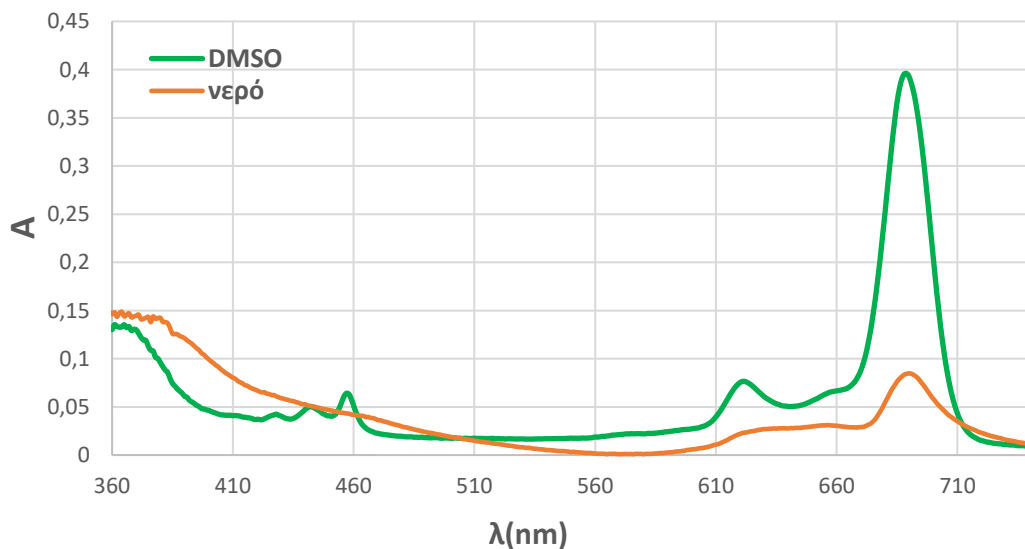
Φωτοφυσικές μελέτες έγκλειστης AICIPc σε νανοσωματίδια PLA.

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των φασματοσκοπικών μελετών της έγκλειστης AICIPc σε νανοσωματίδια PLA.

21.1. Φάσματα απορρόφησης διαλύματος AICIPc+PLA NPs

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των φασματοσκοπικών μελετών απορρόφησης της έγκλειστης AICIPc σε νανοσωματίδια PLA. Το φάρμακο διαλύθηκε σε νερό και σε DMSO και στις δύο περιπτώσεις παρασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 5μM.

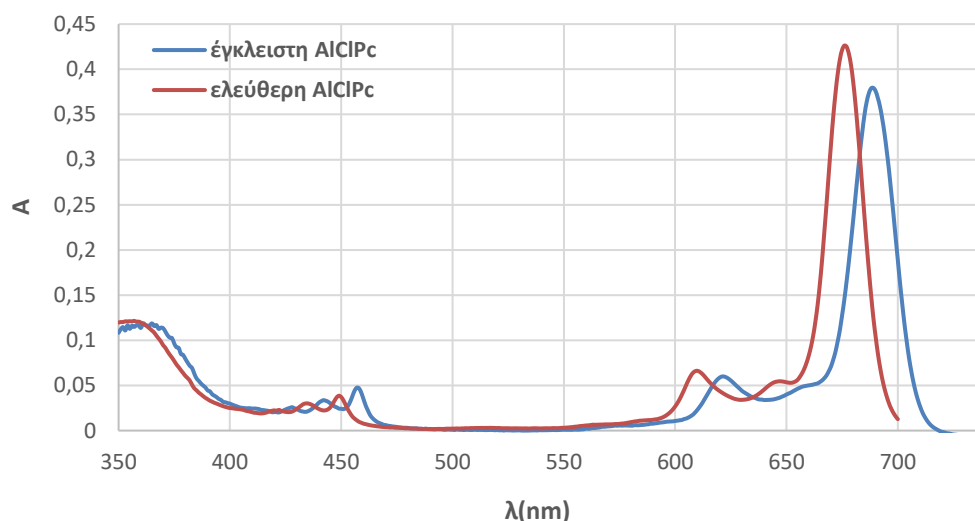
Στην Εικόνα 51 βρίσκονται τα φάσματα απορρόφησης των νανοσωματιδίων με την Φθαλοκυανίνη. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται το φάσμα για διαλύτη DMSO , ενώ με πορτοκαλί το φάσμα για διαλύτη νερό. Η απορρόφηση για το νερό είναι γενικά μικρότερη από ότι για το DMSO . Στη κορυφή 690 nm, η απορρόφηση με διαλύτη DMSO είναι αισθητά μεγαλύτερη από αυτή με διαλύτη νερό. Αντιθέτως στα μικρά μήκη κύματος (κατω από 500 nm) η απορρόφηση για το νερό υπερिशύχει. Η καμπύλη απορρόφησης για το νερό έχει χάσει επίσης τις περισσότερες κορυφές της. Η μόνη κορυφή που έχει επιβιώσει είναι στα 690 nm. Στο νερό από ότι φαίνεται και η έγκλειστη φθαλοκυανίνη δημιουργεί συσσωματώματα σαν υδρόφοβο μόριο, με αποτέλεσμα μικρότερη μάζα της φθαλοκυανίνης να απορροφά ακτινοβολία. Επομένως αυτός είναι ο λόγος που η απορρόφησή της μειώνεται.



Εικόνα 51. Φάσματα απορρόφησης PLA NPs+AICIPc συγκέντρωσης 5 μM διαλυμένα σε νερό(μπλέ) και σε DMSO (πράσινο).

Είναι χρήσιμο να συγκριθεί το φάσμα της ελεύθερης με αυτό της έγκλειστης φθαλοκυανίνης για την ίδια συγκέντρωση για λόγους συνέπειας των αποτελεσμάτων.

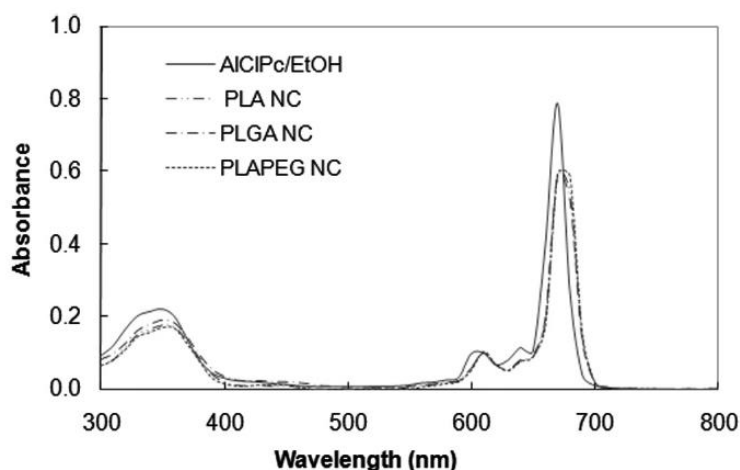
Στην Εικόνα 52 βρίσκονται τα φάσματα απορρόφησης ελεύθερης και έγκλειστης AICIPc συγκέντρωσης 5μM διαλυμένης σε DMSO. Με κόκκινο είναι η καμπύλη για την ελεύθερη φθαλοκυανίνη και με μπλε για την έγκλειστη. Παρατηρείται πως το φάσμα για την έγκλειστη φθαλοκυανίνη είναι ελαφρώς πιο κάτω από της ελεύθερης αλλά και μετακινημένο προς μεγαλύτερα μήκη κύματος.



Εικόνα 52. Φάσματα απορρόφησης ελεύθερης και έγκλειστης AICIPc συγκέντρωσης 5μM.

21.2. Σύγκριση με άλλες μελέτες

Παραθέτονται σε αυτή την ενότητα τα αποτελέσματα από από δύο ξένες μελέτες ^{47,48} που έχουν γίνει στο θέμα των φασμάτων ελεύθερης και έγκλειστης σε διάφορα είδη νανοσωματιδίων απο PLA.



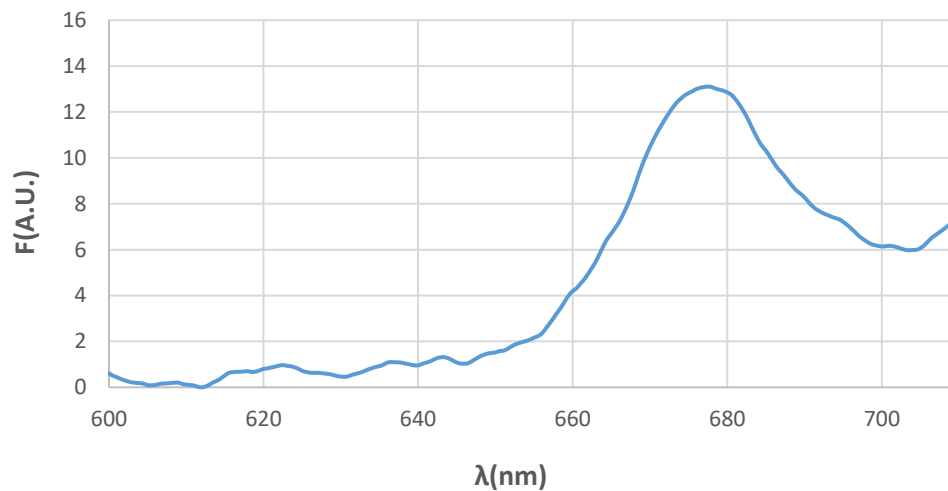
Εικόνα 53. Φάσματα απορρόφησης AICIPc και εγκλεισμένης AICIPc σε τρία είδη νανοκάψουλων PLA.[50]

Στην Εικόνα 53 φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης AICIPc και εγκλεισμένης AICIPc σε τρία είδη νανοκάψουλων PLA όπως πάρθηκαν από τη μελέτη[50]. Το φάσμα της εγκλειστης AICIPc είναι πιο χαμηλά από αυτό της ελεύθερης και επίσης παρουσιάζει μετατόπιση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος όπως ακριβώς και στην παρούσα μελέτη.

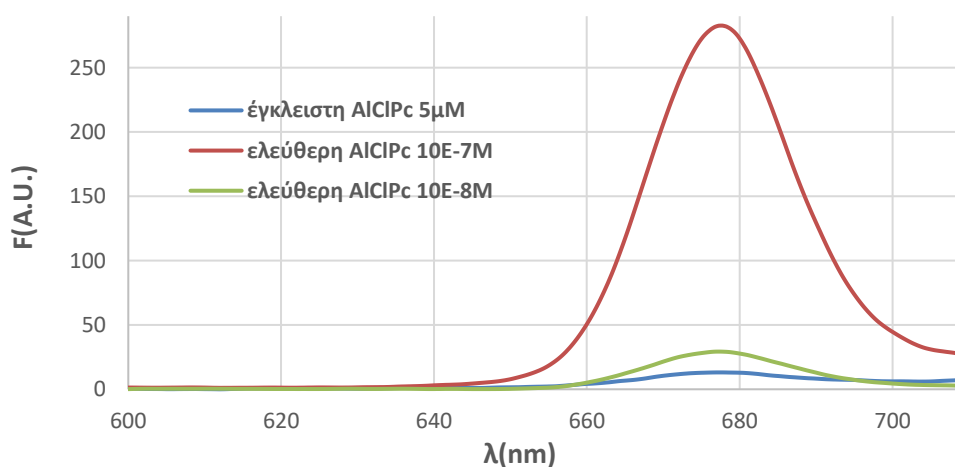
21.3. Φάσματα φθορισμού διαλύματος AICIPc+PLA NPs

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των φασματοσκοπικών μελετών φθορισμού της εγκλειστης AICIPc σε νανοσωματίδια PLA.

Στην Εικόνα 54 παρουσιάζεται το φάσμα φθορισμού του διαλύματος της εγκλειστης σε νανοσωματίδια PLA Φθαλοκυανίνης σε νερό. Η συγκέντρωση φθαλοκυανίνης που χρησιμοποιήθηκε είναι 5 μM . Η διέγερση έγινε στα 360 nm. Το φάσμα παρουσιάζει μια μοναδική κορυφή κοντά στα 680 nm.



Εικόνα 54. Φάσμα φθορισμού PLA NPs+AICIPc συγκέντρωσης 5 μM , διαλυμένα σε νερό.



Εικόνα 55. Φάσματα φθορισμού έγκλειστης AAICIPc/νερό (5 μM) και ελεύθερης (10^{-7} M και 10^{-8}M) AICIPc/DMSO, διέγερση στα 360 nm.

Η Εικόνα 55 δείχνει τα φάσματα φθορισμού έγκλειστης (5 μ M) και ελεύθερης (10⁻⁷ M και 10⁻⁸M) AICIPc, με διέγερση στα 360 nm. Η τιμή φθορισμού στην κορυφή 677 nm για την ελεύθερη φθαλοκυανίνη, ακόμα και για την πολύ μικρότερη συγκέντρωση 10⁻⁷M είναι κατά πολύ μεγαλύτερη αυτής της έγκλειστης με συγκέντρωση 5 μ M. Η τιμή αυτή όπως αναμένεται να είναι μεγαλύτερη από την τιμή της έγκλειστης φθαλοκυανίνης στα νανοσωματίδια. Η πολύ μεγάλη διαφορά τους όμως υποδεικνύει ότι δεν συνεισφέρει το μεγαλύτερο μέρος (μάζα) της έγκλειστης Φθαλοκυανίνης στο φάσμα αυτό.

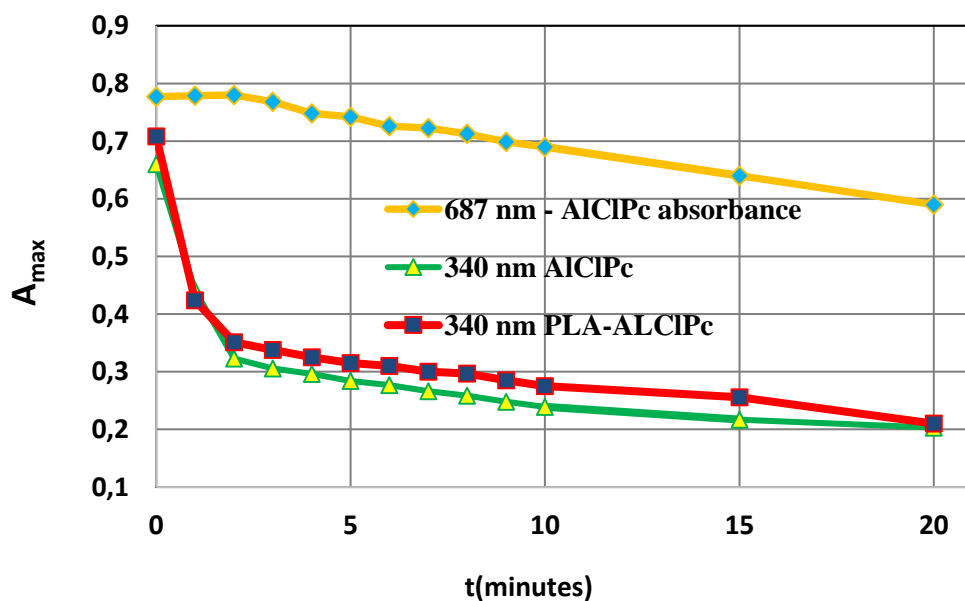
Κεφάλαιο 22.

Μελέτη ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών της έγκλειστης AICIPc σε νανοσωματίδια PLA.

Παρουσιάζονται σε αυτή την ενότητα τα αποτελέσματα της μελέτης της ικανότητας της έγκλειστης AICIPc σε νανοσωματίδια PLA για παραγωγή ελευθέρων ριζών. Όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση της ελεύθερης Φθαλοκυανίνης στην αντίστοιχη μελέτη για παραγωγή ελευθέρων ριζών, η ακτινοβολή των διαλυμάτων παράγει ελεύθερες ρίζες, οι οποίες οξειδώνουν το NADH και το κάνουν NAD⁺. Διαβάζοντας λοιπόν την γνωστή συμπεριφορά των φασμάτων του δημιουργούμενου NAD⁺, μπορεί να βγουν συμπεράσματα και να γίνει μια ποιοτική εκτίμηση έμμεσα για την παραγωγή των ελευθέρων ριζών.

Το δείγμα προς ακτινοβολή που παρασκευάστηκε περιείχε 1 mg PLA NPs με έγκλειστη φθαλοκυανίνη, 67 μL NADH και 19 μL EDTA, διαλυμένα σε 3000 μL νερού.

Η ακτινοβολή του δείγματος έγινε με το laser ρυθμισμένο σε ένταση ακτινοβολίας 10 mW/cm².



Εικόνα 56. Η απορρόφηση συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης της έγκλειστης AICIPc σε νανοσωματίδια PLA για την κορυφή 340 nm, της ελεύθερης AICIPc στο ίδιο μήκος κύματος και της ελεύθερης AICIPc στα 687 nm.

Στην Εικόνα 56 φαίνεται η απορρόφηση συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης της έγκλειστης AICIPc σε νανοσωματίδια PLA για την κορυφή 340 nm, της ελεύθερης AICIPc στο ίδιο μήκος κύματος και της ελεύθερης AICIPc στα 687 nm. Στην κορυφή 340 nm παρατηρείται πως η απορρόφηση και της ελεύθερης και της έγκλειστης AICIPc φθίνουν απότομα στα πρώτα δύο λεπτά ακτινοβολήσης και έπειτα φθίνουν με μικρότερο ρυθμό. Η απορρόφηση ωστόσο της έγκλειστης AICIPc είναι ελαφρώς μεγαλύτερη σε όλους τους χρόνους ακτινοβολήσης σε σχέση με αυτήν της ελεύθερης. Η απορρόφηση της ελεύθερης

AlClPc στην κορυφή 687 nm φθίνει από τα 2 λεπτά και έπειτα με μικρό ρυθμό, ενώ ως τα δύο λεπτά είναι σταθερή.

Αναφέρθηκε ξανά πως στην κορυφή 268 nm η απορρόφηση αναμένεται να αυξάνεται διότι η ακτινοβολία δημιουργεί ουσιαστικά περισσότερο NAD^+ , ενώ η απορρόφηση στα 344 nm αναμένεται αντίστοιχα να πέφτει διότι το NADH που απορροφά εκεί, σταδιακά γίνεται NAD^+ λόγω οξειδωσης από τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται. Αύτη ακριβώς η συμπεριφορά παρατηρείται εδώ στην κορυφή 340nm, άρα αποδεικνύεται πως ως τα δύο πρώτα λεπτά ακτινοβολίας η παραγωγή των ελευθέρων ριζών, που οφείλεται στην έγκλειστη AlClPc, είναι έντονη. Το γεγονός ότι η απορρόφηση της έγκλειστης AlClPc είναι ελαφρώς μεγαλύτερη σε όλους τους χρόνους ακτινοβολίας σε σχέση με αυτήν της ελεύθερης, αποδεικνύει πως η ελεύθερη φθαλοκυανίνη δημιουργεί περισσότερες ελεύθερες ρίζες από την έγκλειστη. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο ότι το PLA αποτρέπει την ακτινοβολία να έρθει σε επαφή με ένα μέρος της μάζας της φθαλοκυανίνης και κατ'επέκταση να δημιουργηθούν περισσότερες ελεύθερες ρίζες.

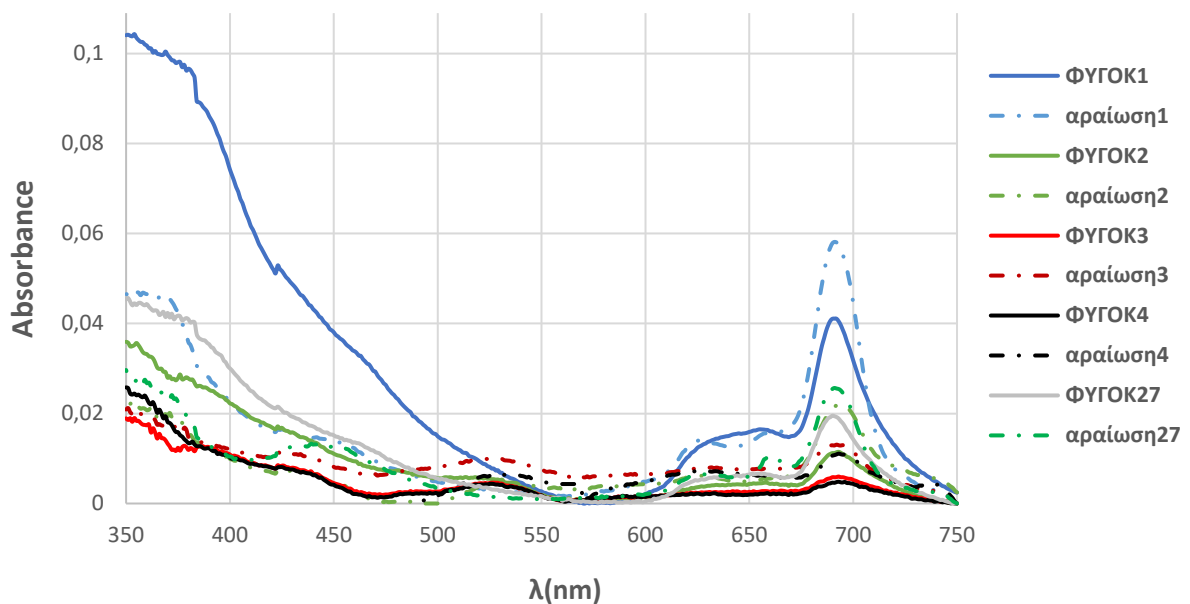
Όσον αφορά στην απορρόφηση της ελεύθερης AlClPc στην κορυφή των 687 nm, αυτό που παρατηρείται είναι προφανώς η φωτοτροποποίηση του μορίου της AlClPc με την ακτινοβολία, όπως εξηγήθηκε και στο αντίστοιχο κεφάλαιο της μελέτης της φωτολεύκανσης.

Κεφάλαιο 23.

Απελευθέρωση φαρμάκου

Παραθέτονται εδώ τα αποτελέσματα της μελέτης της απελευθέρωσης της Φθαλοκυανίνης από το νανοσωματίδια PLA.

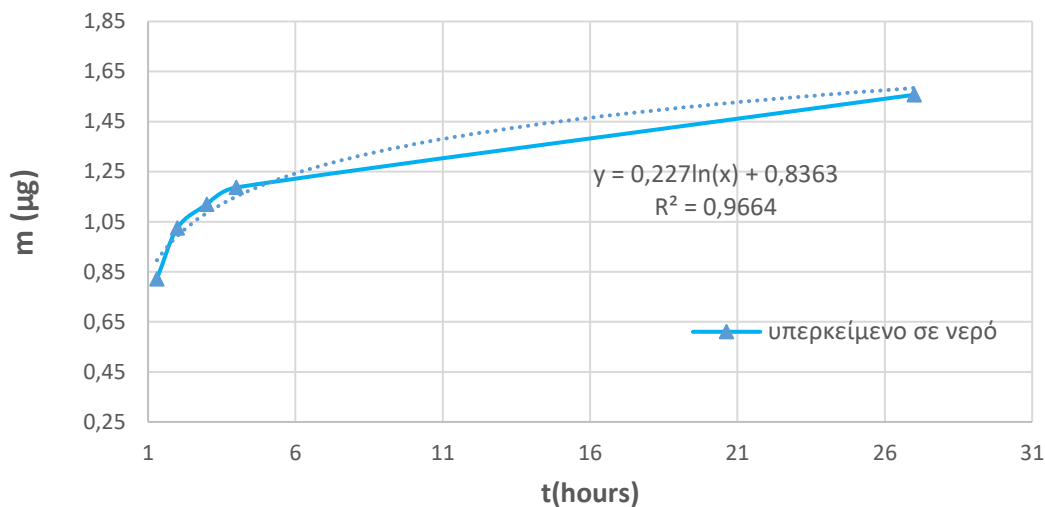
Στην Εικόνα 57 εμφανίζονται τα φάσματα του υπερκείμενου διαλύματος AICIPc+NPs (PLA) μετά από φυγοκέντριση καθώς και του αραιωμένου με DMSO διαλύματος, τις 4 πρώτες ώρες απελευθέρωσης της Φθαλοκυανίνης και έπειτα από 27 ώρες. Με διακεκομμένη γραμμή αναπαρίστανται τα φάσματα των αραιωμένων διαλυμάτων ενώ με συνεχή γραμμή αναπαρίστανται τα φάσματα των υπερκειμένων.



Εικόνα 57. Απελευθέρωση Φθαλοκυανίνης από νανοσωματίδια PLA σε διάλυμα νερού, έως και 27 ώρες.

Η αραιώση 1 αντιστοιχεί στην μία ώρα αναμονής, η αραιώση 2 στις δύο ώρες αναμονής κτλ. Τα φάσματα των διαλυμάτων με νερό ακολουθούν την ίδια συμπεριφορά που παρατηρήθηκε για διάλυση σε νερό και στα προηγούμενα κεφάλαια, δηλαδή στα μικρά μήκη κύματος ανεβαίνει απότομα η απορρόφηση σε σχέση με τα αντίστοιχα φάσματα διαλυμάτων σε DMSO. Η απορρόφηση στη κορυφή στα 690 nm για τα αραιωμένα διαλύματα είναι πιο έντονη από αυτή των μη αραιωμένων διαλυμάτων για την ίδια ώρα αναμονής. Μια εκτίμηση είναι ότι αυτό οφείλεται στο ότι το DMSO είναι ικανό να "σπάσει" τα συσσωματώματα που δημιουργεί η Φθαλοκυανίνη στο νερό, επομένως αυτομάτως μεγαλύτερη ποσότητα Φθαλοκυανίνης είναι δυνατό να απορροφήσει. Επίσης παρατηρείται πως όσο πειραίνεται η ώρα η απορρόφηση μειώνεται, εκτός για την περίπτωση των 27 ωρών όπου η απορρόφηση αυξάνεται λίγο.

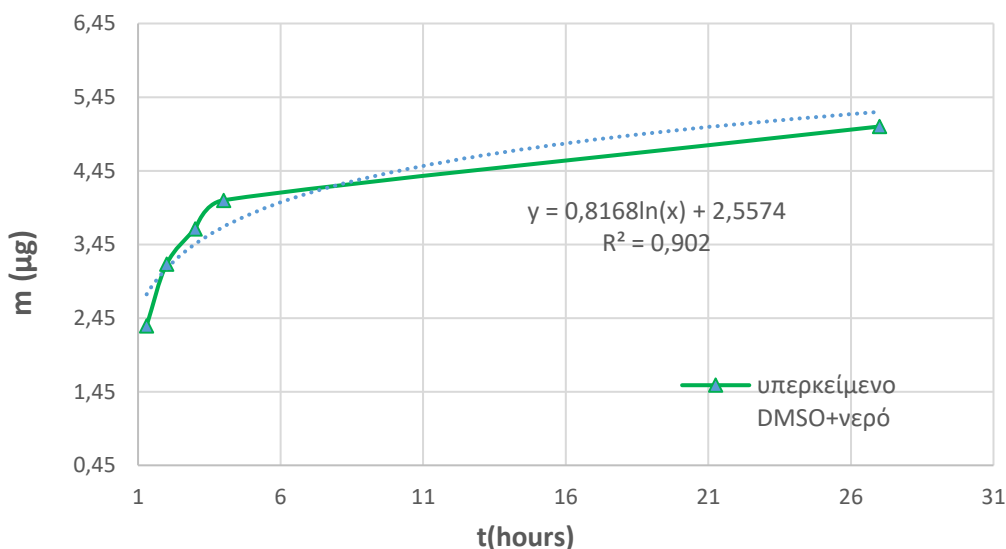
Στην Εικόνα 58 παρουσιάζεται η απελευθέρωση μάζας Φθαλοκυανίνης συναρτήσει του χρόνου διαλύματος σε νερό. Η καθαρή μάζα υπολογίστηκε από την εξίσωση ευθείας βαθμονόμησης της απορρόφησης της Φθαλοκυανίνης στην κορυφή 690 nm.



Εικόνα 58. Καμπύλη απελευθέρωσης μάζας AICIPc από τα νανοσωματίδια PLA στις 27 πρώτες ώρες, σε διάλυμα νερού.

Στην Εικόνα 59 παρουσιάζεται η απελευθέρωση μάζας Φθαλοκυανίνης συναρτήσει του χρόνου διαλύματος σε DMSO. Η καμπύλη για τη διάλυση σε DMSO είναι σαφώς πιο κατάλληλη για εξαγωγή περαιτέρω συμπερασμάτων αφού το DMSO διάλυσε τα συσσωματώματα και περισσότερη μάζα φθαλοκυανίνης μπορούσε έτσι να απορροφήσει, άρα έχουμε στατιστικά καλύτερο δείγμα.

Γίνεται αντιληπτό ότι κυρίως απελευθέρωση ουσίας έχουμε στις πρώτες 3 -4 ώρες. Μετά τις 4 ώρες ο ρυθμός απελευθέρωσης είναι πολύ μικρότερος, η καμπύλη φτάνει σε πλατό.



Εικόνα 59. Καμπύλη απελευθέρωσης μάζας AICIPc από τα νανοσωματίδια PLA στις 27 πρώτες ώρες, σε διάλυμα νερού αραιωμένου με DMSO.

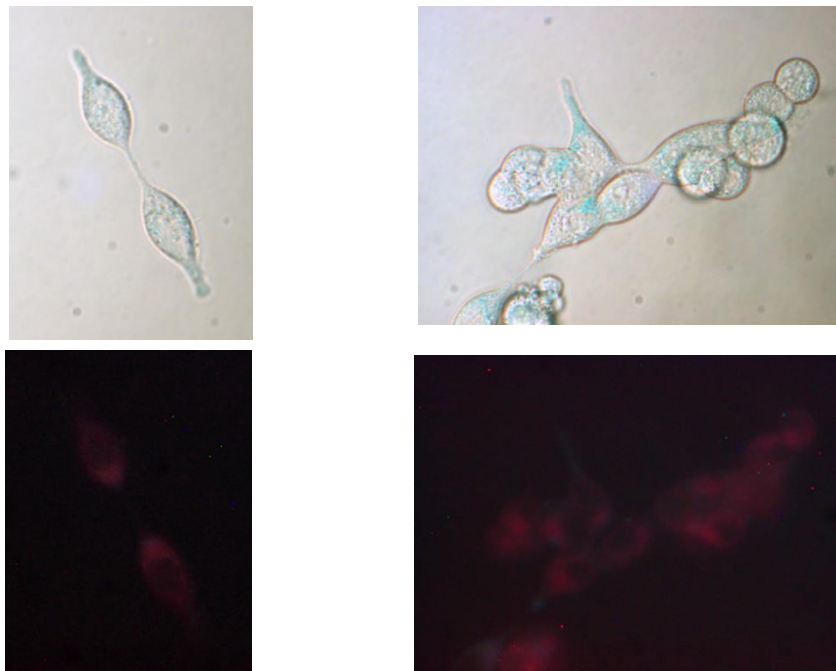
Κεφάλαιο 24.

Χωρικός εντοπισμός του Φαρμάκου στα κύτταρα

Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης του χωρικού εντοπισμού των νανοσωματιδίων μέσα στα κύτταρα, που παρατηρήθηκαν με το μικροσκόπιο φθορισμού. Είναι χρήσιμο να επιβεβαιωθεί που εντοπίζεται η Αλουμινο-χλωρο-Φθαλοκυανίνη, είτε αυτή είναι σε ελεύθερη μορφή είτε εγκλεισμένη σε νανοσωματίδια, μέσα και κοντά στα κύτταρα. Είναι χρήσιμο αφ' ενός διότι μια τέτοια εικόνα είναι μια ακόμα άμεση απόδειξη πως το φάρμακο έχει φτάσει και έχει εισβάλει μέσα στα κύτταρα, και αφ' ετέρου, διότι γίνεται αντιληπτό εάν το φάρμακο επηρεάζει τον πυρήνα του κυττάρου ή εάν έχει εναποτεθεί στα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια παίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του κυττάρου, οπότε όπως εξηγήθηκε στο κεφάλαιο 16 είναι θεμιτή η στόχευση των μιτοχονδρίων αφού βλάβη της λειτουργίας τους συνεπάγεται νέκρωση του κυττάρου.

24.1. Χωρικός εντοπισμός της ελεύθερης Αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνης

Στην Εικόνα 60 φαίνονται τα κύτταρα από το οπτικό μικροσκόπιο (επάνω) και από το μικροσκόπιο φθορισμού (κάτω). Στις κάτω εικόνες φθορισμού, με ρόζ φθορίζει η ελεύθερη Φθαλοκυανίνη η οποία είχε επωαστεί προηγουμένως με τα κύτταρα για 3 ώρες, και φαίνεται ότι έχει εισχωρήσει μέσα στα κύτταρα αλλά όχι μέσα στον πυρήνα του κυττάρου (μαύρη στρογγυλή περιοχή).

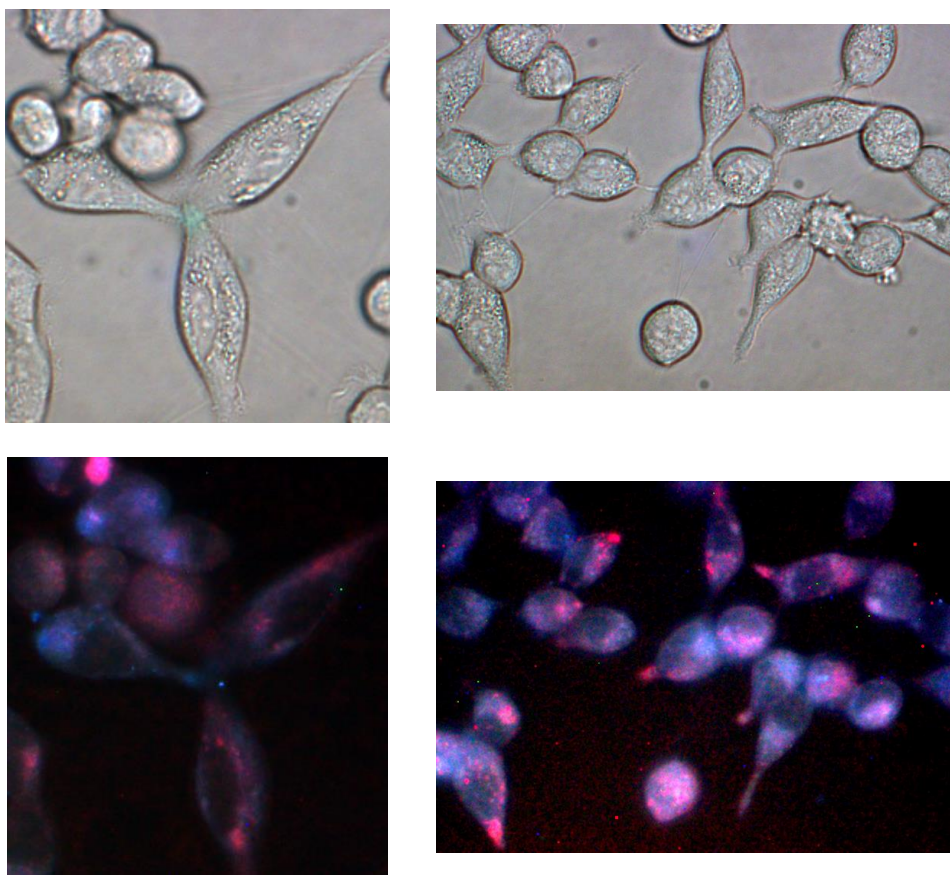


Η
Φθαλ Εικόνα 60. Επάνω: εικόνες από το οπτικό μικροσκόπιο. Κάτω: οι αντίστοιχες εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού.

οκυανίνη δε φαίνεται να έχει επηρεάσει δομικά τα κύτταρα. Εκτός από την συσσώρευση της περιμετρικά του πυρήνα των κυττάρων, υπάρχει ένδειξη πως μπορεί να έχει πάει και στα μιτοχόνδρια, ωστόσο χρειάζονται πιο εξειδικευμένες μελέτες για να διαπιστωθεί αυτό με σιγουριά.

24.2. Χωρικός εντοπισμός της εγκλεισμένης σε νανοσωματίδια Αλουμινο-χλωρο-φθαλοκυανίνης

Στην Εικόνα 61 δίνονται οι εικόνες των κυττάρων που περιέχουν AICIPc μέσα σε νανοσωματίδια PLA όπως παρατηρήθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο και μικροσκόπιο φθορισμού. Οι επάνω σε γκρι αποχρώσεις εικόνες προέρχονται από παρατήρηση με το οπτικό μικροσκόπιο ενώ οι κάτω εικόνες με παρατήρηση με το μικροσκόπιο φθορισμού. Στην εικόνα αυτή, οι αριστερά παρατηρήσεις είναι μετά από 3 ώρες επώασης των νανοσωματιδίων μέσα στα κύτταρα, ενώ, στα δεξιά είναι για παρατήρηση μετά από 3.5 ώρες επώασης. Η Φθαλοκυανίνη που έχει απελευθερωθεί πια από τα νανοσωματίδια PLA, φαίνεται πως εισχωρεί στα κύτταρα αλλά όχι και στον πυρήνα τους.



Εικόνα 61. Εικόνες κυττάρων από οπτικό μικροσκόπιο (επάνω), αντίστοιχες εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού (κάτω).

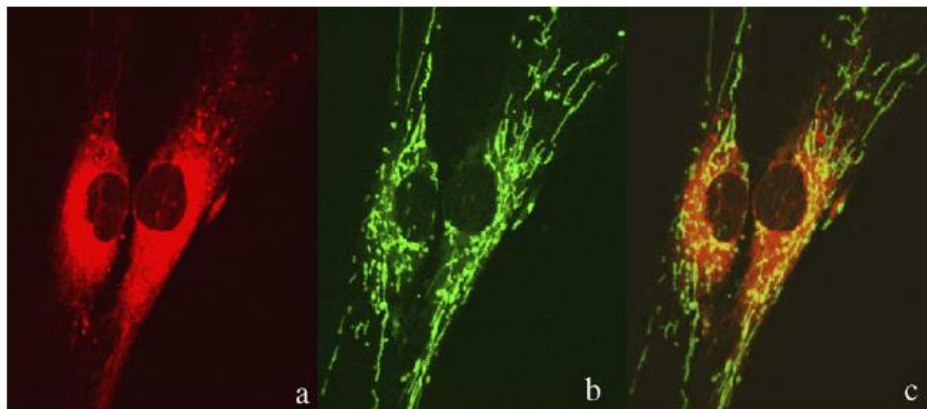
Ο χρόνος επώασης για τα νανοσωματίδια, επιλέχθηκε με βάση τη μελέτη απελευθέρωσης του φαρμάκου από αυτά που έγινε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Η μελέτη έδειξε πως ο κύριος όγκος του φαρμάκου απελευθερώνεται από τα νανοσωματίδια στις 3-4 πρώτες ώρες, επομένως ο χρόνος επώασης τέθηκε στις 3 και 3.5 ώρες.

Η έγκλειστη Φθαλοκυανίνη δε φαίνεται να έχει επηρεάσει δομικά τα κύτταρα όπως και η ελεύθερη. Εκτός από την συσσώρευση της περιμετρικά του πυρήνα των κυττάρων, υπάρχει και εδώ υποψία πως μπορεί να έχει πάει και στα μιτοχόνδρια.

Συμπερασματικά, και στις δύο περιπτώσεις του ελεύθερου και του έγκλειστου σε νανοσωματίδια φαρμάκου, αυτό έχει βρεθεί περιμετρικά του πυρήνα του κυττάρου και με μεγάλη πιθανότητα και στα μιτοχόνδρια. Αυτό είναι πολύ σημαντικό διότι τα ROS έχουν πολύ σύντομη διάρκεια ζωής, επομένως εάν ενδοκυτταρική εντόπιση του φαρμάκου βρίσκεται στον επιθυμητό στόχο (πχ στα μιτοχόνδρια), και όχι κάπου μακριά από αυτόν, υπάρχει έτσι μεγαλύτερη πιθανότητα για καταστροφή του στόχου.

Παρατηρείται μεγαλύτερος με διαφορά φθορισμός στις εικόνες της έγκλειστης Φθαλοκυανίνης και δεδομένου ότι χρησιμοποιήθηκε η ίδια συγκέντρωση AIClPc και ο ίδιος χρόνος επώασης, εξάγεται το συμπέρασμα πως με τα νανοσωματίδια, μεγαλύτερη ποσότητα AIClPc κατόρθωσε να εισχωρήσει μέσα στα κύτταρα .

Στη μελέτη⁴⁹ για το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την φθαλοκυανίνη ψευδαργύρου (ZnPc) παρατηρήθηκε πως το 80% του φαρμάκου εντοπίζεται στην περιοχή των μιτοχονδρίων, υποδεικνύοντας ότι μιτοχόνδρια είναι οι κύριοι στόχοι του οξειδωτικού στρες. Η παρατήρηση έγινε με συνεστιακή μικροσκοπία έχοντας επωάσει τα κύτταρα με το φάρμακο μαζί με έναν ανιχνευτή μιτοχονδρίων (MitoTracker Green).



Εικόνα 62. (a) εικόνα φθορισμού της ZnPc. Ex, 647 nm; Em, 680 DF 32. (b) εικόνα φθορισμού του MitoTracker Green. Ex, 488 nm; Em, 522 DF 35. (c) συγχώνευση των εικόνων πράσινου και κόκκινου φθορισμού. [49]

Στην Εικόνα 62 φαίνονται οι εικόνες πράσινου, κόκκινου φθορισμού και του συνδυασμού τους όπως παρατηρήθηκαν στη μελέτη[49]. Έχοντας επωάσει τα κύτταρα μαζί με το φάρμακο αλλά και μαζί με έναν κατάλληλο μοριακό ανιχνευτή για μιτοχόνδρια, γίνεται διακριτό πως το φάρμακο έχει εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια και όχι στον πυρήνα του κυττάρου. Το MitoTracker Green είναι μια πράσινη φθορίζουσα βαφή η οποία μαρκάρει τα

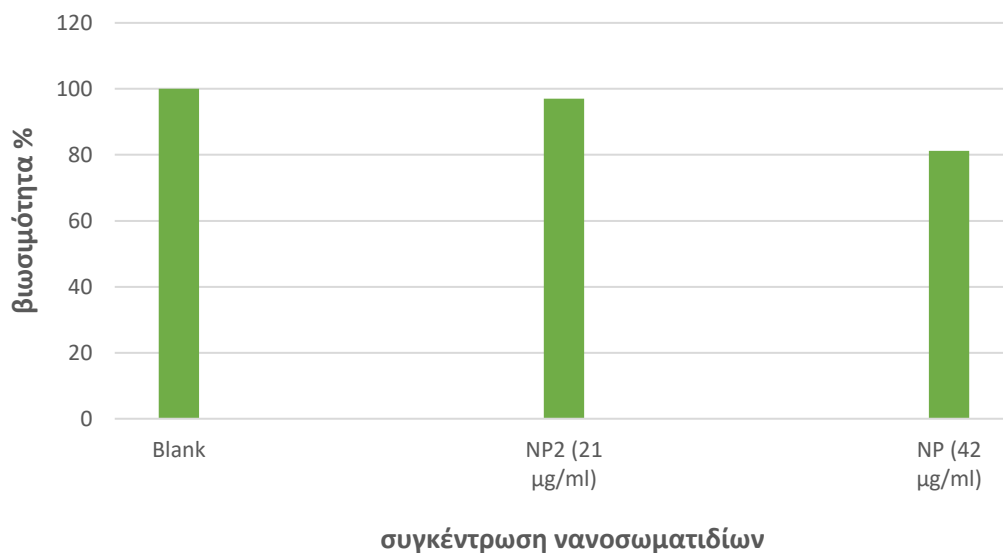
μιτοχόνδρια ανεξαρτήτως του δυναμικού της μεμβράνης τους, με αποτέλεσμα αυτά να φθορίζουν στο πράσινο όταν έρχονται σε επαφή με αυτό.

Κεφάλαιο 25.

Έλεγχος τοξικότητας των νανοσωματιδίων

Όπως αναλύθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, δοκιμάστηκαν δύο συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων σε επώαση με τα κύτταρα για να εξακριβωθεί εάν και κατά πόσο είναι τοξικά για αυτά. Στο διάγραμμα της Εικόνα 63 παρουσιάζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων συναρτήσει της συγκέντρωσης νανοσωματιδίων που έχει εισαχθεί σε αυτά.

Η συγκέντρωση νανοσωματιδίων των 21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ δε φαίνεται να επηρέασε τα κύτταρα, αφού το αποτέλεσμα δεν είναι στατιστικά σημαντικό σύμφωνα με το στατιστικό έλεγχο t-test (students test). Αντιθέτως η συγκέντρωση των 42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ φαίνεται να επηρεάζει τα κύτταρα τα οποία είχαν 80% βιωσιμότητα. Επόμενο είναι να επιλεγθούν στην έρευνα αυτή και συγκεκριμένα στα πειράματα φωτοδυναμικής θεραπείας συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων μικρότερες από 21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ώστε τα νανοσωματίδια από μόνα τους να μην αποτελούν κίνδυνο τοξικότητας για τα κύτταρα.



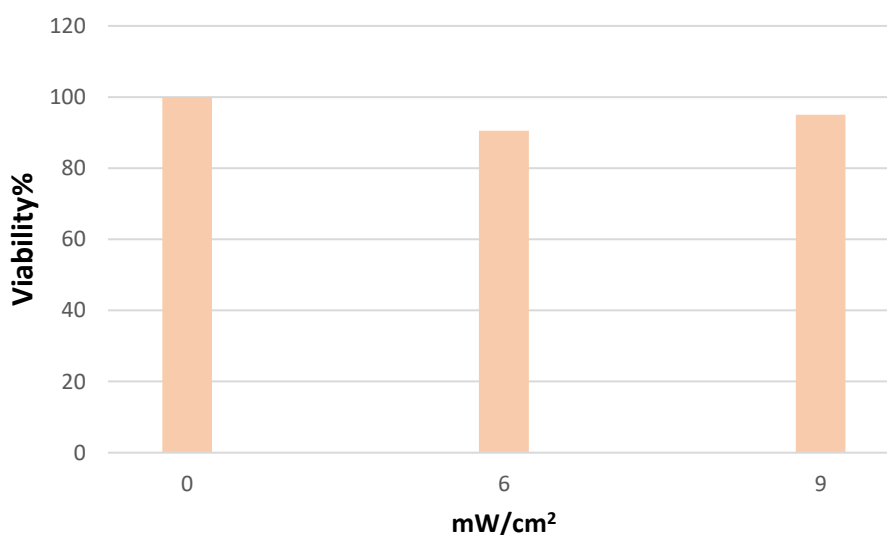
Εικόνα 63. Βιωσιμότητα κυττάρων συναρτήσει της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων που έχει εισαχθεί σε αυτά.

Κεφάλαιο 26.

Έλεγχος τοξικότητας φωτός

Αφού εξηγήθηκε η διαδικασία ακτινοβολήσης των κυττάρων σε προηγούμενο κεφάλαιο, εδώ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της ακτινοβολίας στα κύτταρα. Θα εξακριβωθεί δηλαδή κατά πόσον το φως είναι τοξικό για τα κύτταρα (σε τι βαθμό θανατώνει τα κύτταρα) με σκοπό να επιλεγεί στη συνέχεια της μελέτης μια ένταση φωτός για Φωτοδυναμική θεραπεία η οποία από μόνη της να μην είναι επιβλαβής για τα κύτταρα.

Στο διάγραμμα της Εικόνα 64 παρουσιάζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων συναρτήσει της έντασης ακτινοβολήσης για τρία λεπτά. Σύμφωνα με το πείραμα η ένταση ακτινοβολίας 6 mW/cm^2 και η ένταση ακτινοβολίας 9 mW/cm^2 δεν επηρέασαν τα κύτταρα, όπως φαίνεται στο ραβδόγραμμα. Αν και στο σχήμα φαίνεται να πέφτει η βιωσιμότητα των κυττάρων, σύμφωνα με το στατιστικό έλεγχο στη στάθμη σημαντικότητας 0.5, κανένα από τα δύο αποτελέσματα δεν είναι στατιστικά σημαντικό.



Εικόνα 64. Βιωσιμότητα των κυττάρων συναρτήσει της έντασης ακτινοβολήσης για τρία λεπτά.

Επομένως τα κύτταρα μπορούν να ακτινοβληθούν στη φωτοδυναμική θεραπεία με ένταση ακτινοβολίας 9 mW/cm^2 , αφού δε φαίνεται να είναι καθόλου επιβλαβής ως προς αυτά. Είναι δε μια ένταση η οποία σύμφωνα με την μελέτη μας για την παραγωγή ελευθέρων ριζών, μπορεί άνετα να παράγει ελεύθερες ρίζες. Με ένταση ακτινοβολίας 10 mW/cm^2 παραγωγή ελευθέρων ριζών ήταν ικανοποιητική.

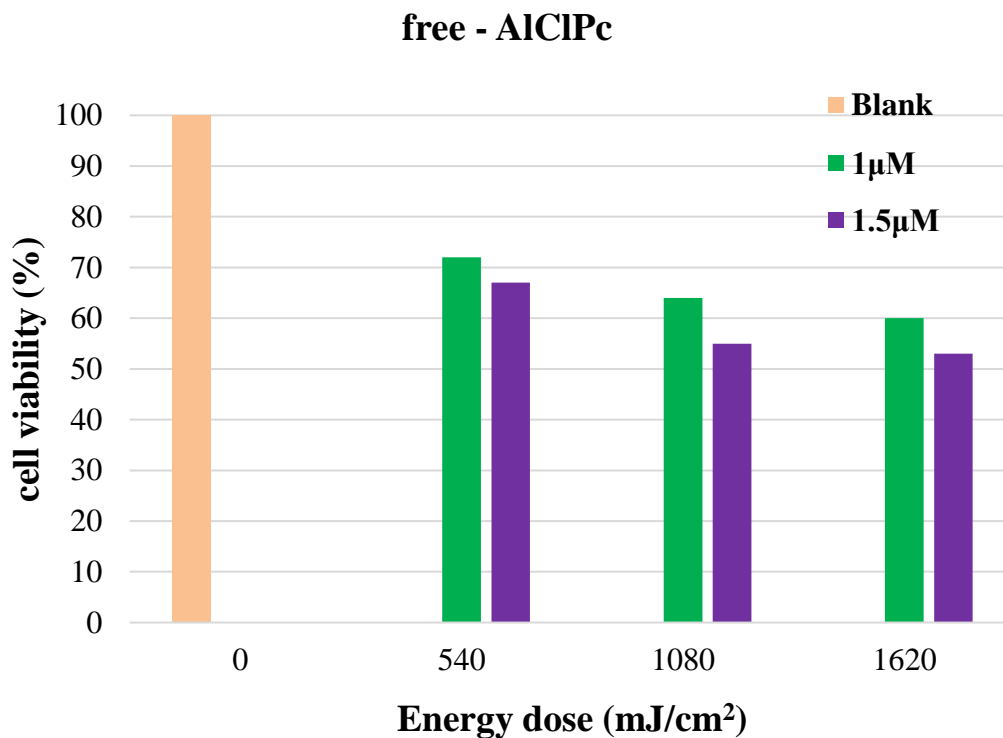
Κεφάλαιο 27.

Αποτελέσματα Φωτοδυναμικής Θεραπείας

27.1. PDT με ελεύθερη Αλούμινο-χλώρο-Φθαλοκυανίνη

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας σε καρκινικά κύτταρα LnCap χρησιμοποιώντας ως φωτοευαισθητοποιητή, ελεύθερη AlClPc. Τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με ένταση ακτινοβολίας 9 mW/cm^2 , για 1,2 και 3 λεπτά που σύμφωνα με υπολογισμούς δίνουν τις ενεργειακές δόσεις (ενέργεια) του παρακάτω ραβδογράμματος. Έγινε φωτοδυναμική θεραπεία για δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις AlClPc, 1 και 1.5 μM .

Στην Εικόνα 65 παρουσιάζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων ύστερα από Φωτοδυναμική θεραπεία συναρτήσει της ενεργειακής δόσης. Για τη συγκέντρωση του 1 μM παρατηρήθηκε βιωσιμότητα από 70 % έως και 60 %, ενώ για την συγκέντρωση 1.5 μM παρατηρήθηκε βιωσιμότητα μειωμένη γενικά λιγότερο από 10 ποσοστιαίες μονάδες. Για μεγαλύτερη δόση ενέργειας στα κύτταρα η βιωσιμότητα ήταν μικρότερη και για τις δύο συγκεντρώσεις.



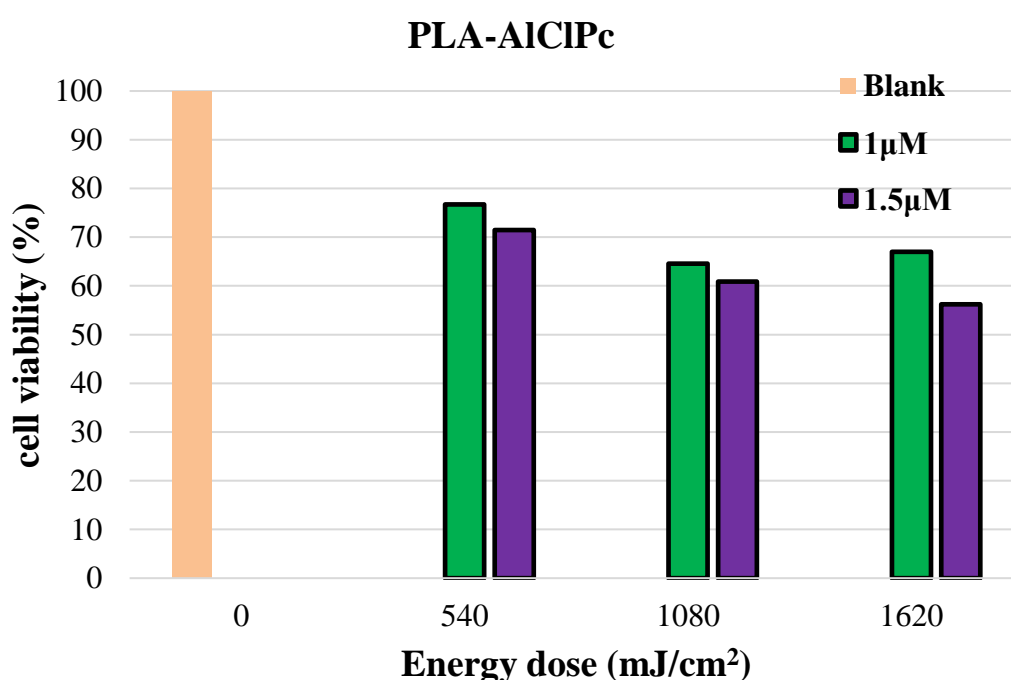
Εικόνα 65. Βιωσιμότητα κυττάρων ύστερα από Φωτοδυναμική θεραπεία συναρτήσει της ενεργειακής δόσης.

Συμπερασματικά η θανάτωση των κυττάρων με την ελεύθερη φθαλοκυανίνη ήταν κατά μέσο όρο 35%.

27.2. PDT με εγκλεισμένη Αλούμινο-χλώρο-Φθαλοκυανίνη σε νανοσωματίδια PLA

Παρουσιάζονται εδώ, τα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας σε καρκινικά κύτταρα LnCap χρησιμοποιώντας ως φωτοευαισθητοποιητή, εγκλεισμένη AIClPc σε νανοσωματίδια PLA. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία στη περίπτωση αυτή όπως και στην φωτοδυναμική θεραπεία με την ελεύθερη φθαλοκυανίνη. Χρησιμοποιήθηκε η ίδια ένταση ακτινοβολίας, 9 mW/cm^2 ενώ έγινε φωτοδυναμική θεραπεία για δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις AIClPc 1 και 1.5 μM .

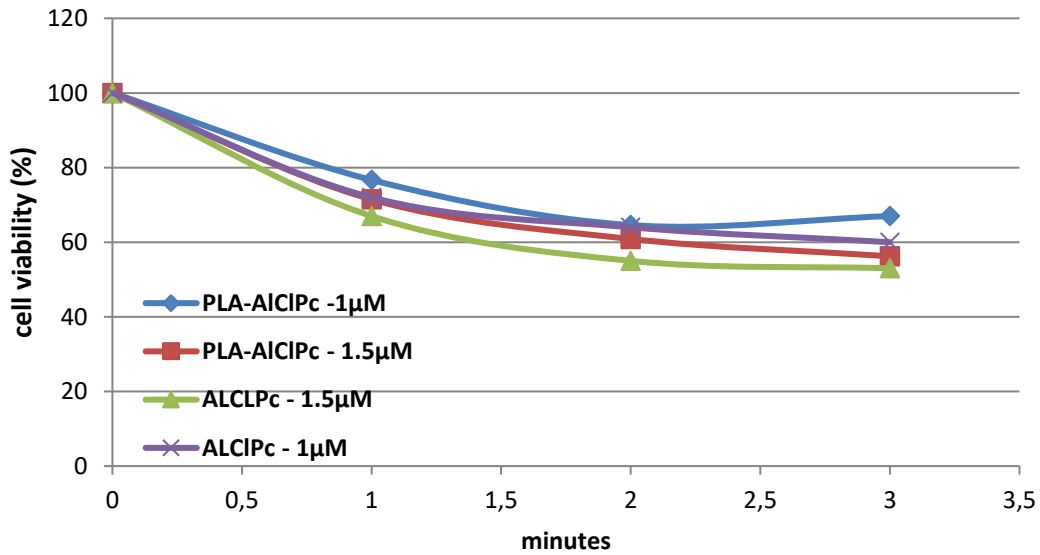
Στην Εικόνα 66 παρουσιάζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων ύστερα από Φωτοδυναμική θεραπεία με AIClPc εγκλεισμένη σε νανοσωματίδια PLA συναρτήσει της ενεργειακής δόσης.



Εικόνα 66. Βιωσιμότητα κυττάρων ύστερα από Φωτοδυναμική θεραπεία με AIClPc εγκλεισμένη σε νανοσωματίδια PLA συναρτήσει της ενεργειακής δόσης.

Τα ποσοστά βιωσιμότητας για τη συγκέντρωση 1 μM κυμαίνονται από 60% έως 80% , ενώ τα ποσοστά για την συγκέντρωση 1.5 μM από 50% έως 70%. Τελικά τα νανοσωματίδια δείχνουν μικρότερη θανάτωση των κυττάρων από ότι η ελεύθερη φθαλοκυανίνη, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης για ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών, όπου αποδείχτηκε πως η ικανότητα της ελεύθερης AIClPc είναι μεγαλύτερη από αυτή της εγκλεισμένης. Βέβαια οι διαφορές αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντικές επομένως η φωτοτοξικότητα της Φθαλοκυανίνης αλουμίνιου και των νανοσωματιδίων θεωρείται ίδια. Ωστόσο, η θνησιμότητα των κυττάρων που πέτυχε η φθαλοκυανίνη με τα νανοσωματίδια είναι ικανοποιητική και αξιοποιήσιμη.

Στην Εικόνα 67 φαίνονται τα ποσοστά βιωσιμότητας για ελεύθερη AICIPc και AICIPc σε νανοσωματίδια συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης. Το σχήμα αυτό βοηθάει για τη σύγκριση της βιωσιμότητας μεταξύ ελεύθερης και έγκλειστης φθαλοκυανίνης ίδιας όμως συγκέντρωσης. Στις περιπτώσεις λοιπόν και των δύο συγκεντρώσεων, τα νανοσωματίδια και η Φθαλοκυανίνη οδηγούν σε ίδια ποσοστά βιωσιμότητας των κυττάρων.



Εικόνα 67. Ποσοστά βιωσιμότητας για ελεύθερη AICIPc και AICIPc σε νανοσωματίδια συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης.

Κεφάλαιο 28.

Συμπεράσματα

Βάση των φασματοσκοπικών μελετών φωτολεύκανσης που έγιναν, διαπιστώνεται ότι φυσικά το μόριο του φωτοευαισθητοποιητή (AICIPc), με το χρόνο ακτινοβόλησης σταδιακά, χάνει την ικανότητά του να απορροφά και να φθορίζει στο ορατό. Όμως πρέπει να σημειωθεί πως στους χρόνους που χρησιμοποιήθηκαν για την φωτοδυναμική θεραπεία (έως 3 λεπτά ακτινοβόλησης) η φωτολεύκανση της ουσίας είναι ανεπαίσθητη και δεν επηρέασε τα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Μελετώντας τα φάσματα φθορισμού και απορρόφησης της Φθαλοκυανίνης αποδείχτηκε και στις δύο περιπτώσεις πως αυξάνοντας το χρόνο ακτινοβόλησης του διαλύματος, αυξάνεται και η παραγωγή ελευθέρων ριζών. Στην αντίστοιχη έρευνα για την περιορισμένη AICIPc σε νανοσωματίδια PLA, παρατηρήθηκε πως η παραγωγή ελευθέρων ριζών ακολουθεί την ίδια συμπεριφορά, όμως είναι πιο ασθενής από αυτή της ελεύθερης φθαλοκυανίνης.

Στα πειράματα για τον έλεγχο της απελευθέρωσης την AICIPc από τα νανοσωματίδια διαπιστώθηκε βέβαια πως σημαντική απελευθέρωση φαρμάκου γίνεται την πρώτη ώρα έως και την τέταρτη ώρα από την στιγμή της διάλυσης των νανοσωματιδίων στο νερό.

Στον χωρικό εντοπισμό της φθαλοκυανίνης μέσα στα κύτταρα που έγινε χρησιμοποιώντας το μικροσκόπιο φθορισμού, παρατηρήθηκε πως η ένταση φθορισμού ήταν αισθητά μεγαλύτερη για την εγκλεισμένη στα νανοσωματίδια Φθαλοκυανίνη. Αυτό σημαίνει πως τα νανοσωματίδια PLA είναι πιθανά ένα αποδοτικό μέσο για την μεταφορά της Φθαλοκυανίνης μέσα στα κύτταρα.

Στην φωτοδυναμική θεραπεία παρατηρήθηκε ικανοποιητική θανάτωση των κυττάρων από την ελεύθερη αλλά και από την εγκλειστη σε νανοσωματίδια AICIPc. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο μικρός χρόνος απελευθέρωσης του φαρμάκου από τα νανοσωματίδια PLA, 3-4 ώρες, τα καθιστούν καλό παράγοντα για φωτοδυναμική θεραπεία για δυο βασικούς λόγους. Πρώτον, το φάρμακο χρειάζεται να παραμείνει λίγο χρόνο στον ασθενή επομένως ο ασθενής δεν ταλαιπωρείται ψυχικά ή σωματικά αναμένοντας. Δεύτερον η μη παραμονή του ασθενούς στο νοσοκομείο ή στην κλινική, από την πρόσληψη του φαρμάκου μέχρι τη θεραπεία, συμφέρει οικονομικά και τον ασθενή και το αντίστοιχο ίδρυμα.

Επίσης δυο ακόμη θετικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων PLA, είναι από την μία το μικρό τους μέγεθος που ίσως τα καθιστά ευέλικτα σε πιθανή κλινική εφαρμογή τους και από την άλλη η μη τοξικότητά τους (τουλάχιστον για τα κύτταρα του προστάτη) κάτω από ένα όριο συγκέντρωσή τους. Συμπερασματικά, μπορεί να ειπωθεί πως τα νανοσωματίδια PLA φαίνεται να είναι κατάλληλα ως φορείς φαρμάκων για φωτοδυναμική θεραπεία και ιδιαίτερα για την AICIPc που μελετήθηκε εδώ.

Βιβλιογραφία

-
- ¹ Bethea, D.; B. Fullmer; S. Syed; G. Seltzer; J. Tiano; C. Rischko; L. Gillespie; D. Brown; F. P Gasparro "Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine". J. Dermatol. Sci. 19 (2): 78–88. (February 1999).
- ² Raab C. "Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusoria". Z Biol 1900;39:524–6.
- ³ Von Tappeiner HA, Jensionek A. "Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen". Münch Med Wochenschr 1903;47:2042–4.
- ⁴ P. Agostinis, K. Berg, Keith A. Cengel. "Photodynamic Therapy of Cancer: An Update", CA: A Cancer Journal for Clinicians, August 2011
- ⁵ PG.Calzavara-Pinton, M.Venturini, R.Sala, " Photodynamic therapy: update 2006/Part 1: Photochemistry and photobiology", JEADV 2007,21, 293–302 Journal compilation © 2007 European Academy of Dermatology and Venereology
- ⁶ TAYYABA H.,A.MOOR,B.ORTEL, " PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER", SECTION 11 / Principles of Radiation Oncology
- ⁷ IAN J. MACDONALD, THOMAS J. DOUGHERTY. " Basic principles of photodynamic therapy", Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, J. Porphyrins Phthalocyanines 2001; 5: 105–129
- ⁸ McCaughan JS. "Photodynamic therapy of endobronchial and esophageal tumors: an overview". J. Clin. Laser Med. Surg. 1997; 14: 223–233.
- ⁹ Bolin FP, Preuss LE, Cain BW. " A comparison of spectral transmittance for several mammalian tissues: effects at PRT frequencies. In Porphyrin Localization and Treatment of Tumors." Doiron DR, Gomer CJ. (eds.) Alan R Liss: New York, 1984; 211–225
- ¹⁰ Wilson BC, Jeeves WP, Lowe DM, Adam G. "Light propagation in animal tissues in the wavelength range 375–825 nanometers. In Porphyrin Localization and the Treatment of Tumors." Doiron DR, Gomer CJ. (eds.) Alan R, Liss: New York, 1984; 115–132.
- ¹¹ Wilkisch PA, Jacka F. "Studies of light propagation through tissue. In Porphyrin Localization and Treatment of Tumors." Doiron DR, Gomer CJ. (eds.) Alan R, Liss: New York, 1984; 149–161.
- ¹² Sharman, W. M.; Allen, C. M.; van Lier, J. E. "Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications." Drug Discovery Today 1999, 4, 507-517.
- ¹³ O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. "Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy." Photochem Photobiol 2009;85:1053–74.
- ¹⁴ Chen B, Pogue WB, Hasan T. " Liposomal delivery of photosensitizing agents." Expert Opin Drug Deliv 2005;2:477–87.
- ¹⁵ Josefsen LB, Boyle RW. "Photodynamic therapy: novel third generation photosensitizers one step closer? ", Br J Pharmacol 2008;154:1–3.

- ¹⁶ Michael R. Detty, Scott L. Gibson, St. J. Wagner, "Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy", *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004
- ¹⁷ Paquette, B.; Boyle, R. W.; Ali, H.; MacLennan, A. H.; Truscott, T. G.; van Lier, J. E. "Sulfonated phthalimidomethyl aluminum phthalocyanine: The effect of hydrophobic substituents on the in vitro phototoxicity of phthalocyanines."
- ¹⁸ Raymond Bonnett, "Photosensitizers of the Por-phy-rin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy" CHEMICAL SOCIETY REVIEWS. 1995
- ¹⁹ Chan, W.S.; Bresseur, N.; La, M.C.; Ouellet, R.; van Lier, J.E. "Efficacy and mechanism of aluminium phthalocyanine and its sulphonated derivatives mediated photodynamic therapy on murine tumours." *Eur. J. Cancer* **1997**, *33*, 1855-1859.
- ²⁰ Decreau, R.; Richard, M.J.; Julliard, M. "Photodynamic therapy against achromic M6 melanocytes: Phototoxicity of lipophilic axially substituted aluminum phthalocyanines and hexadecahalogenated zinc phthalocyanines". *J. Porphyr. Phthalocya.* **2001**, *5*, 390-396.
- ²¹ Williams, A.C.; Barry, B.W. "Penetration enhancers". *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 603-618.
- ²² Kai Liua, Yanhua Wanga, Jiannian Yaob, Yi Luoa, "Origin of the Q-band splitting in the absorption spectra of aluminum phthalocyanine chloride" *Chemical Physics Letters* Volume 438, Issues 1–3, 11 April 2007
- ²³ Bruno H. Vilsinska * , Adriana P. Gerolab , Évelin O. Lemosaa , Patrícia M. Barbosaa , Katieli S. S. Campanholia , Gabriel B. Césara , Noboru Hiokaa , Wilker Caetanoa, "SPECTROSCOPIC STUDY OF ALUMINUM PHTHALOCYANINE CHLORIDE (AIPcCl) IN HOMOGENEOUS AND MICRO-HETEROGENEOUS MEDIA CONSISTING OF P-123 AND F-127 POLYMERIC MICELLES", *Quím. Nova* vol.38 no.5 São Paulo June 2015
- ²⁴ Brown SB, Brown EA, Walker I. "The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment." *Lancet Oncol.* 2004, *5*, 497 – 508.
- ²⁵ Torchilin V. "Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect". *Adv Drug Deliv Rev* in press.
- ²⁶ Bangham AD. "A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids." *Nature* 1961, *192*, 1197 – 1198.
- ²⁷ Paszko E, Ehrhardt C, Senge MO, Kelleher DP, Reynolds JV. "Nanodrug applications in photodynamic therapy." *Photodiagnosis. Photodyn. Ther.* . 2011, *8*, 14 – 29.
- ²⁸ Kozłowska D, Foran P, MacMahon P, Shelly MJ, Eustace S, O' Kennedy R. "Molecular and magnetic resonance imaging: the value of immunoliposomes." *Adv. Drug Deliv. Rev.* . 2009, *61*, 1402 – 1411.
- ²⁹ Maisch T, Santarelli F, Schreml S, Babilas P, Szeimies RM. "Fluorescence induction of protoporphyrin IX by a new 5-aminolevulinic acid nanoemulsion used for photodynamic therapy in a full-thickness ex vivo skin model". *Exp. Dermatol.* . 2010, *19*, e302 – e305.
- ³⁰ Kumares S Soppimatha, Tejrjaj M Aminabhavia, Anandrao R Kulkarnia, Walter E Rudzinski b. "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices", *Journal of Controlled Release* Volume 70, Issues 1–2, 29 January 2001, Pages 1–20
- ³¹ Mariana V. SOARES, Cíntia M. LANZARINI, Daniely S. OLIVEIRA, Paulo R.S. RAMOS-JÚNIOR, Elizabete P. SANTOS & Eduardo RICCI-JÚNIOR, "Improving the Phototoxicity of the Zinc Phthalocyanine by

Encapsulation in Nanoparticles: Preparation, Characterization and Phototherapy Studies”, Latin American Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense) Lat. Am. J. Pharm. 29 (1): 5-12 (2010)

³² M. Roussaki a , A. Gaitanarou a , P.Ch. Diamanti b , S. Vouyiouka b , C. Papaspyrides b , P. Kefalas c, y , A. Detsi a, “ *Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles*”. Polymer Degradation and Stability 108 (2014)

³³ M. Li, O. Rouaud, D. Poncelet. “*Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches*”, Int J Pharm, 363 (2008), pp. 26–39

³⁴ www.nanoscience.gatech.edu/zlwang/research/afm

³⁵ Bonnett, R., Djelal, B.D., Hamilton, P.A., Martinez, G., Wierrani, F.J. *Photochem. Photobiol. B. Biol.* 1999, 53, 136-143

³⁶ Justina M. Burns, William J. Cooper, John L. Ferry. “ *Methods for reactive oxygen species (ROS) detection in aqueous environments* ”, Aquat Sci (2012) 74:683–734

³⁷ Yuan JC, Shiller AM, “*Determination of subnanomolar levels of hydrogen peroxide in seawater by reagent-injection chemiluminescence detection*”. (1999) Anal Chem 71(10):1975–1980

³⁸ Costa Lima S, Rodrigues V, Garrido J, Borges F, Kong Thoo Lin P, Cordeiro da Silva A. “*In vitro evaluation of bisnaphthalimidopropyl derivatives loaded into pegylated nanoparticles against Leishmania infantum protozoa*.” Int J Antimicrob Agents 2012;39:424e30

³⁹ M. Li, O. Rouaud, D. Poncelet. “*Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches*”, Int J Pharm, 363 (2008), pp. 26–39

⁴⁰ S. Costa Lima, V. Rodrigues, J. Garrido, F. Borges, P. Kong Thoo Lin, A. Cordeiro da Silva “*In vitro evaluation of bisnaphthalimidopropyl derivatives loaded into pegylated nanoparticles against Leishmania infantum protozoa*”, Int J Antimicrob Agents, 39 (2012), pp. 424–430

⁴¹ <http://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-z/>

⁴² T. Riss, R. Moravec, A. Niles, S. Duellman, H. Benink, T. Worzella, L. Minor. “*Cell Viability Assays*”. Assay Guidance Manual. 2013

⁴³ A. Mukhopadhyay, H. Weiner. “*Delivery of Drugs and Macromolecules to Mitochondria*”. Adv Drug Deliv Rev. 59(8): 729–738. 2007

⁴⁴ Trushina E, McMurray CT. “*Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases*.” Neuroscience. 2007;145:1233–1248

⁴⁵ Pool H, Quintanar D, Figueroa JD, Mano CM, Bechara JEH, Godínez LA, Mendoza S. “*Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles*.” Hindawi Publishing Corporation, J Nanomater 2012, Article ID 145380.

⁴⁶ M. Roussaki a , A. Gaitanarou a , P.Ch. Diamanti b , S. Vouyiouka b , C. Papaspyrides b , P. Kefalas c, y , A. Detsi a, “*Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles*”. Polymer Degradation and Stability 108 (2014) 182e187

⁴⁷ 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

⁴⁸ Yide Huang, Dongdong Ma, Sujuan Pan, Pingping Lin, Yao Lin, Hongqin Yang, Yiru Peng. " *Comparative study of aluminum phthalocyanine incorporating into two types of block copolymer: photo-physical property, size, and in vitro photodynamic therapy efficacy*". Journal of Nanoparticle Research, January 2015

⁴⁹ E. Alexandratou, D. Yova, S. Loukas, " *A confocal microscopy study of the very early cellular response to oxidative stress induced by zinc phthalocyanine sensitization*", Free Radical Biology & Medicine, 39, 1119-1127, 2005