



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ

ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

**Ανάπτυξη μεθόδων / τεχνικών για τη δοσιμετρία
στη στοχευμένη φωτοδυναμική θεραπεία**

Καρελιώτης Γεώργιος

Διδακτορική Διατριβή

Επιβλέπουσα

**Μακροπούλου – Λουκογιαννάκη Μυρσίνη
Ομότιμη Καθηγήτρια ΕΜΠ**

Αθήνα, 2021



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2014-2020
ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Μακροπούλου - Λουκογιαννάκη Μυρσίνη

Ομότιμη Καθηγήτρια της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών
Επιστημών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου

Γεωργακίλας Αλέξανδρος

Καθηγητής της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών
του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου

Ευσταθόπουλος Ευστάθιος

Καθηγητής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού
Πανεπιστημίου Αθηνών

Παπαγιάννης Αλέξανδρος

Καθηγητής της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών
του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου

Κόντος Αθανάσιος

Αναπληρωτής Καθηγητής της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και
Φυσικών Επιστημών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου

Τσιγαρίδας Γεώργιος

Επίκουρος Καθηγητής της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών
Επιστημών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου

Μπουζιώτη Πηνελόπη

Ερευνήτρια Α του Ινστιτούτου Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και
Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών
Επιστημών «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών

Τομέας Φυσικής

Εργαστήριο «Οπτοηλεκτρονικής, Laser και Εφαρμογών τους»

[Ομάδα Ανάπτυξης και Εφαρμογών Laser](#)

Ηρώων Πολυτεχνείου 9

15780 - Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου

Αθήνα, Ελλάς



NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF ATHENS



SCHOOL OF APPLIED MATHEMATICAL
AND PHYSICAL SCIENCES
DEPARTMENT OF PHYSICS

Development of methods / techniques for dosimetry in targeted photodynamic therapy

Kareliotis Georgios

Doctoral Thesis

Supervisor
Makropoulou – Loukogiannaki Mersini
Emeritus Professor NTUA

Athens, 2021



Operational Programme
Human Resources Development,
Education and Lifelong Learning
Co-financed by Greece and the European Union



This research is co-financed by Greece and the European Union (European Social Fund- ESF) through the Operational Programme «Human Resources Development, Education and Lifelong Learning» in the context of the project “Strengthening Human Resources Research Potential via Doctorate Research” (MIS-5000432), implemented by the State Scholarships Foundation (IKY).

Examination Committee:

Makropoulou - Loukogiannaki Myrsini

Emeritus Professor at School of Applied Mathematical and Physical Sciences of National Technical University of Athens

Georgakilas Alexandros

Professor at School of Applied Mathematical and Physical Sciences of National Technical University of Athens

Efstathopoulos Efstathios

Professor at Medical School of National and Kapodistrian University of Athens

Papayannis Alexandros

Professor at School of Applied Mathematical and Physical Sciences of National Technical University of Athens

Kontos Athanassios

Associate Professor at School of Applied Mathematical and Physical Sciences of National Technical University of Athens

Tsigaridas Georgios

Assistant Professor at School of Applied Mathematical and Physical Sciences of National Technical University of Athens

Bouziotis Penelope

Research Director at Institute of Nuclear & Radiological Sciences and Technology, Energy & Safety of National Centre for Scientific Research "DEMOKRITOS"

National Technical University of Athens
School of Applied Mathematical and Physical Sciences
Department of Physics
Laboratory of Optoelectronics, Lasers and their Applications
[Laser Development and Applications Team](#)
9, Ir. Politechniou Str.
15780 - Zografou Campus
Athens, Greece

Στους γονείς μου...

“The only thing that can be predicted is the probability of different events.”
Richard P. Feynman

Page intentionally left blank

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διεξαγωγή μίας διδακτορικής έρευνας καθώς και η συγγραφή της αντίστοιχης διατριβής, αποτελεί μία εξαιρετικά παραγωγική και ευχάριστη περίοδο στην ακαδημαϊκή πορεία κάθε ατόμου. Ταυτόχρονα όμως, μπορεί να παρουσιάσει κατά διαστήματα ιδιαίτερες προκλήσεις και δυσκολίες, ποικίλης φύσεως. Για την υπέρβαση αυτών, διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο όχι μόνο η «στενή» ερευνητική ομάδα αλλά και ένα ευρύτερο σύνολο ανθρώπων, η συμβολή των οποίων οφείλει να αναγνωρισθεί.

Επομένως, το πρώτο μεγάλο «ευχαριστώ» ανήκει δικαιωματικά στην επιβλέπουσα Καθηγήτρια της παρούσας διατριβής, την κυρία Μυρσίνη Μακροπούλου. Από τα πρώτα ακαδημαϊκά βήματα του γράφοντος έως και το παρόν πόνημα, προσέφερε γενναιόδωρα γνώσεις, συμβουλές, παρότρυνση, υποστήριξη και όποια έμπρακτη βοήθεια θα μπορούσε ένας νέος ερευνητής να φανταστεί.

Ακολουθώς, οφείλει να αναγνωρισθεί η συνεισφορά των άλλων δύο μελών της συμβουλευτικής επιτροπής της παρούσας έρευνας, των Καθηγητών Αλέξανδρου Γεωργακίλα και Ευστάθιου Ευσταθόπουλου, οι οποίοι με προθυμία προσέφεραν κάθε χρειαζόμενη βοήθεια.

Από τις ευχαριστίες δεν θα μπορούσαν να λείπουν οι Ομ. Καθ. Αλέξανδρος Σεραφετινίδης, Καθ. Αλέξανδρος Παπαγιάννης, Αν. Καθ. Αθανάσιος Κόντος, Επ. Καθ. Γεώργιος Τσιγαρίδας καθώς και ο Χρήστος Γεμεντζής, μέλος Ε.ΔΙ.Π. του ΕΜΠ. Η πρόθυμη καθοδήγηση και βοήθειά τους επηρέασε καταλυτικά το τελικό αποτέλεσμα.

Ένα «ευχαριστώ» είναι λίγο για την M.Sc, Ph.D, PdF Φαρμακοποιό του Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός» Μαρία Παπαχρίστου. Με πάντα καλή διάθεση και προθυμία συνέβαλε σημαντικά στην παρούσα έρευνα. Το ίδιο ισχύει και για την Ερευνήτρια Α' του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» Πηνελόπη Μπουζιώτη καθώς και για τον Τεχνικό Σταύρο Ξανθόπουλο, χωρίς την βοήθεια των οποίων η πραγματοποίηση του *in vivo* πειράματος δεν θα ήταν εφικτή.

Σε κάθε περίπτωση, η συμβολή των συνεργατών και συναδέλφων Ελένης Δρακάκη Ph.D, Ελίνας Σπυράτου Ph.D, Ιωάννας Τρέμη Υ.Δ., Ιωάννη Τσιλικά Υ.Δ., Σοφίας Λιόση M.Sc. και Μαριλένας Κάλκου ήταν εξαιρετικής σημασίας.

Ξεχωριστή αναφορά αξίζει και στη φαρμακευτική εταιρεία ΦΑΡΜΑΣΕΡΒ-ΛΙΛΛΥ καθώς, χωρίς τη γενναιόδωρη προσφορά σκευασμάτων της, η *in vivo*

μελέτη δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί. Ταυτόχρονα, το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών – ΙΚΥ, μέσω της χορηγηθείσας υποτροφίας του, συνέβαλε καταλυτικά στην παρούσα έρευνα.

Τέλος, το μεγαλύτερο και θερμότερο «ευχαριστώ» οφείλει να ειπωθεί στην οικογένειά μου. Τα άτομα του στενού μου περιβάλλοντος, μηδενός εξαιρουμένου, πίστεψαν και στήριξαν με κατανόηση, υπομονή, επιμονή, ηρεμία και αγάπη, ένα προς ένα, όλα τα βήματα αυτής της πορείας. Με τον ένα ή τον άλλο τρόπο βρίσκονται και θα βρίσκονται πάντα πίσω από κάθε σελίδα αυτής της διατριβής.

Γ. Καρελιώτης
Αθήνα, Ιούνιος 2021

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματεύεται την ανάπτυξη μεθοδολογιών για τη δοσιμετρία στη φωτοδυναμική θεραπεία (ΦΔΘ), είτε αυτή εφαρμόζεται ως μονοθεραπεία, είτε εφαρμόζεται εντός ενός συνδυαστικού θεραπευτικού σχήματος. Εστιάζει στην υφιστάμενη ανάγκη εξατομικευμένης αντιμετώπισης της νόσου του καρκίνου, σε επίπεδο ασθενούς. Προκειμένου να καταστεί αυτό εφικτό, απαιτείται η ανάπτυξη υπολογιστικών μεθόδων, οι οποίες, μετά την *in situ* δοκιμή τους σε εργαστηριακό περιβάλλον, δοκιμάζονται σε *in vivo* συνθήκες. Άλλωστε, ζώντας στην εποχή της τέταρτης βιομηχανικής επανάστασης, όπου ο ψηφιακός κόσμος διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο, η υπολογιστική μοντελοποίηση της έρευνας καλείται να γίνει το πρώτο βήμα κάθε πειραματικής μελέτης.

Σήμερα, η βιοφωτονική και η νανοτεχνολογία διαδραματίζουν εξέχοντες ρόλους στη διαφορική απεικόνιση, στο σχεδιασμό της στοχευμένης ΦΔΘ καθώς και στη δοσιμετρία της. Παγκοσμίως αλλά και στη χώρα μας, οι προοπτικές δείχνουν ένα συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη διάδοση της ΦΔΘ, με επιταχυνόμενες προσπάθειες για την επιστημονική τεκμηρίωση των πρωτοκόλλων θεραπείας και δοσιμετρίας της. Η ίδια η φύση της ΦΔΘ, η οποία στηρίζεται σε φαινόμενα οπτικής, βιοφωτονικής, μοριακής φυσικής, φαρμακοκινητικής, κυτταροβιολογίας και ιατρικής φυσικής, ανεβάζει τον πήχη της δυσκολίας της εξατομικευμένης δοσιμέτρησης του φαινομένου.

Ως εκ τούτου, το παρόν πόνημα ξεκινά εισάγοντας τον αναγνώστη στη διαχρονική προσπάθεια αντιμετώπισης του καρκίνου. Εν συνέχεια, παρουσιάζεται η ΦΔΘ, ένας από τους λίγους μη-επεμβατικούς τρόπους αντιμετώπισης της νόσου. Δίνονται στοιχεία για τους τρεις θεμέλιους λίθους της, δηλαδή τη μονοχρωματική μη-ιονίζουσα ακτινοβολία, τη φωτοευαισθητοποιό ουσία και το οξυγόνο. Παράλληλα, αναλύονται τόσο τα πλεονεκτήματα όσο και τα μειονεκτήματα της μεθόδου. Προς αντιμετώπιση του βασικότερου εξ αυτών, το οποίο είναι το περιορισμένο βάθος δράσης, προτείνεται η ενίσχυση του θεραπευτικού αποτελέσματος υπό ένα συνδυαστικό σχήμα θεραπείας, μέσω της προσθήκης νανοδομών. Επομένως, παρεμβάλλεται ένα σύντομο τρίτο κεφάλαιο, αφιερωμένο στη, βασιζόμενη σε νανοσωματίδια, φωτοθερμική θεραπεία. Το τέταρτο κεφάλαιο ολοκληρώνει το απαιτούμενο θεωρητικό υπόβαθρο, αναλύοντας θέματα που άπτονται της δοσιμετρίας της ΦΔΘ. Εν

συνεχεία, παρουσιάζεται διεξοδικά ο κώδικας «PDT Simulator» που αναπτύχθηκε για την υπολογιστική προσομοίωση της φωτοδυναμικής δράσης στην περιοχή του όγκου και πέριξ αυτής. Αποτελείται από μικρότερους αλγόριθμους, οι οποίοι υλοποιούνται στο περιβάλλον του προγράμματος «Matlab». Αυτοί υπολογίζουν και παρουσιάζουν μέσω χρωματικών χαρτών, βασικά δοσιμετρικά μεγέθη σχετιζόμενα με τη δέση φωτός, όπως τη συγκέντρωση της φωτοευαισθητοποιού ουσίας, του οξυγόνου αλλά και την επαγόμενη καταστροφή του όγκου – στόχου. Επιπροσθέτως, δίνεται και ένα παράδειγμα εφαρμογής του κώδικα για την πληρέστερη κατανόησή του. Το κεφάλαιο έξι που ακολουθεί είναι αφιερωμένο στην κατασκευή προσομοιωτών βιολογικών ιστών από γέλη αγαρόζης και στη μελέτη φωτοθερμικών φαινομένων. Μοντελοποιούνται από απλές έως και σύνθετες / ρεαλιστικές γεωμετρίες, οι οποίες αναπαριστούν όγκους που έχουν ενεθεί με διαλύματα νανοσωματιδίων και ακτινοβολούνται με δέσμες laser. Τα εξαχθέντα αποτελέσματα είναι απαραίτητα για την παραμετροποίηση και έλεγχο του κώδικα που παρουσιάζεται στο κεφάλαιο επτά. Σε αυτό, αναλύεται η ανάπτυξη μίας εύχρηστης εφαρμογής, υπό το όνομα «Thermal Effects Simulator». Στηρίζεται στη χρήση του προγράμματος «COMSOL Multiphysics» και μοντελοποιεί τα επαγόμενα φωτοθερμικά φαινόμενα, μετά την ακτινοβολήση ζώου (μύος) που φέρει καρκινικό όγκο, είτε πρόκειται περί φωτοδυναμικής είτε περί φωτοθερμικής θεραπείας. Το επόμενο κατά σειρά κεφάλαιο παρουσιάζει την *in silico* αλλά και *in vivo* εφαρμογή ΦΔΘ σε μύες, δίνοντας έμφαση στη δοσιμετρία του φαινομένου, υπό το πρίσμα της δέσμης ακτινοβολήσης. Με βάση τα αποτελέσματα που προκύπτουν σχεδιάζεται, μοντελοποιείται, εκτελείται και σχολιάζεται, στο κεφάλαιο εννέα, μία βελτιστοποιημένη, συνδυαστική εκδοχή της προαναφερθείσας μελέτης, μέσω της χρήσης των υπολογιστικών μεθόδων που αναπτύχθηκαν κατά τη διεξαχθείσα έρευνα. Επιπροσθέτως, παρουσιάζεται μία διάταξη φωτοδυναμικής και φωτοθερμικής θεραπείας, με έμφαση στη φορητότητα. Τέλος, στο κεφάλαιο δέκα παρατίθενται τα συμπεράσματα της παρούσας διατριβής καθώς και οι μελλοντικοί στόχοι. Αξίζει να σημειωθεί πως μετά τη βιβλιογραφία ακολουθεί εντός παραρτήματος, ένα σύντομο δείγμα της απόδοσης στα ελληνικά, του μοναδικού πλήρους και διεθνώς αναγνωρισμένου πρωτοκόλλου φωτοδυναμικής θεραπείας, όπως και ο κώδικας «PDT Simulator» που αναπτύχθηκε.

Όπως προκύπτει από την παρούσα έρευνα, η δοσιμετρία της ΦΔΘ, αν και ιδιαίτερος πολύπλοκη, δύναται να προσεγγιστεί με τη βοήθεια υπολογιστικών

μεθόδων. Η χρήση δέσμης ακτινοβολήσης κατάλληλου μήκους κύματος, είναι καθοριστικής σημασίας για την ενεργοποίηση της φωτοευαισθητοποιού ουσίας και την εκκίνηση κυτταροτοξικών φαινομένων. Μάλιστα, ακόμα και αυξημένοι χρόνοι θεραπείας δεν μπορούν να αντισταθμίσουν πλήρως μία πιθανώς μη-κατάλληλη επιλογή πηγής φωτός. Όσον αφορά παράπλευρα θερμικά φαινόμενα, επαγόμενα από την ακτινοβολήση κατά τη ΦΔΘ, αυτά μπορούν να θεωρηθούν αμελητέα. Αναφορικά με τη δράση της θεραπείας, αν και εξαιρετικά εντοπισμένη, αποτελεί ταυτόχρονα και την αχίλλειο πτέρνα της καθότι, υπό επιφανειακή ακτινοβολήση του όγκου, οι εν τω βάθει περιοχές αυτού σαφώς υποδοσιάζονται. Μάλιστα, η επιπρόσθετη ύπαρξη υποξικών περιοχών υποβαθμίζει έτι περαιτέρω το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Προς ενίσχυση του τελευταίου μπορεί να εφαρμοστεί επικουρικά φωτοθερμική θεραπεία, μέσω της χρήσης νανοσωματιδίων, λόγω του μεγαλύτερου βάθους δράσης της και της απουσίας εξάρτησής της από το διαθέσιμο οξυγόνο. Σε κάθε περίπτωση, τα θερμικά φαινόμενα δεν έχουν τον ίδιο τοπικό χαρακτήρα. Επομένως, ο πολύ προσεκτικός ορισμός των παραμέτρων της φωτοθερμικής θεραπείας είναι εκ των ουκ άνευ. Μόνο τότε, μπορεί να αντιμετωπιστεί η περιφέρεια του όγκου, χωρίς βλαπτικά αποτελέσματα για τους περίξ υγιείς ιστούς.

Συμπερασματικά, ο κώδικας «PDT Simulator» και η εφαρμογή «Thermal Effects Simulator» που αναπτύχθηκαν, φαίνεται πως είναι σε θέση να προσομοιώσουν επιτυχώς τη συνδυαστική φωτοδυναμική και φωτοθερμική θεραπεία, προφυλάσσοντας από φαινόμενα υπέρ- ή υποδοσιασμού. Μετά την κλινική επιβεβαίωσή τους, δύναται να αποτελέσουν ένα ιδιαίτερος χρήσιμο εργαλείο στα χέρια του ιατρού και του φυσικού ιατρικής, για το σχεδιασμό, τη δοσομέτρηση της θεραπείας καθώς και την πρόγνωση του θεραπευτικού αποτελέσματος.

Page intentionally left blank

ABSTRACT

This doctoral thesis regards the development of methodologies for the dosimetry of photodynamic therapy (PDT), whether it is applied as a monotherapy or as a part of a combined treatment scheme. It focuses in the current need for patient-based, personalized cancer treatment. In order to achieve the aforementioned, the development of computational methods, which will be *in situ* tested in laboratorial environment before their *in vivo* application, is imperative. After all, living in the fourth industrial revolution era, where the digitalized reality plays a prominent role, computational modeling is supposed to be the very first step of any experimental study.

Today, biophotonics and nanotechnology are crucial in differential imaging and also in the design and dosimetry of targeted PDT. Globally and in our country, the prospects show an ever-increasing interest in the dissemination of PDT, with accelerating efforts for the scientific documentation of its treatment and dosimetry protocols. The very nature of PDT, which is based on phenomena of optics, biophotonics, molecular physics, pharmacokinetics, cytobiology and medical physics, raises the bar of individualized dosimetry.

Therefore, this manuscript begins by introducing the reader to the timeless effort to treat cancer. Afterwards, PDT is introduced, one of the few non-invasive ways to treat the disease. Information is given for its three cornerstones, namely monochromatic non-ionizing radiation, photosensitizer and oxygen. At the same time, both the advantages and the disadvantages of the method are analyzed. Focusing on the most important of the latter, which is the limited treatment depth, it is proposed to enhance the therapeutic outcome under a combinational treatment scheme, by adding nanostructures. Therefore, a short third chapter is devoted to nanoparticle-based photothermal therapy. The fourth chapter completes the required theoretical background, by analyzing issues related to the PDT dosimetry. Next follows the detailed presentation of the "PDT Simulator" code that has been developed for the computational simulation of photodynamic action in and around the tumor area. It consists of shorter algorithms, implemented in the environment of the "Matlab" software. These, calculate and present through color maps, basic dosimetric values, related to the light beam, such

as the photosensitizer and oxygen concentration as well as the induced tumor destruction. In addition, an example of the application of the code is given for its comprehensive understanding. The following chapter is dedicated to the construction of agar-based biological tissue phantoms and the study of photothermal phenomena. They are modeled from simple to complex / realistic geometries, which represent tumors injected with nanoparticle solutions and irradiated with laser beams. The extracted results are necessary for the configuration and confirmation of the code presented in chapter seven, where the development of a user-friendly application, called "Thermal Effects Simulator", is presented, based on the use of the "COMSOL Multiphysics" software. It models the induced photothermal phenomena, after the irradiation of an animal (mouse) that has a cancerous tumor, whether it is subjected to photodynamic or photothermal treatment. The next chapter presents the *in silico* and *in vivo* application of PDT in mice, with emphasis on the dosimetry of the phenomenon, from a radiation beam perspective. Based on the results obtained, an optimized and combinational version of the aforementioned study is designed, modeled, executed and discussed, in chapter nine, using the computational methods developed during this research. Moreover, a photodynamic and photothermal therapy set-up is presented, with emphasis on portability. Finally, chapter ten presents the conclusions of the present study as well as the future objectives. It is worth mentioning that the references section is followed by an appendix, where a brief sample of the Greek translation of the only complete and internationally accepted photodynamic therapy protocol, as well as the developed "PDT Simulator" code are presented.

According to the present study, PDT dosimetry, although particularly complex, can be assessed with the aid of computational methods. The use of a beam of appropriate wavelength is crucial for the activation of the photosensitizer molecules and the initiation of cytotoxic effects. In fact, even increased treatment times cannot fully counteract a potentially unsuitable light source choice. Regarding the potential thermal side effects of radiation during a PDT session, they can be considered negligible. As for the PDT action, although extremely localized, it is at the same time its Achilles heel, since deep areas are clearly underdosed, under superficial-based tumor irradiation. In fact, the additional existence of hypoxic areas further

degrades the therapeutic effect. To enhance the latter, photothermal therapy can be auxiliary applied, through the use of nanoparticles, due to its greater depth of action and its absence of dependence on available oxygen. However, the thermal phenomena are not highly localized and therefore, the very careful choice of their parameters is crucial. Only under these circumstances can the periphery of the tumor be treated without damaging the surrounding healthy tissues.

In conclusion, the developed "PDT Simulator" code and the "Thermal Effects Simulator" application, seem to be able to successfully simulate the combination of photodynamic and photothermal therapy, protecting against over- or underdosing. Once clinically confirmed, they could be a particularly useful tool in the hands of physicians and medical physicists, for treatment planning and dosimetry as well as for estimating the therapeutic outcome.

Page intentionally left blank

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	I
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	III
ABSTRACT	VII
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	XI
ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	XV
ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	XVII
ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΕΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	XIX
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	XXI
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Καρκίνος.....	1
1.2 Ιστορική αναδρομή.....	2
1.3 Σύγχρονη αντιμετώπιση του καρκίνου	3
1.4 Στόχος της παρούσας έρευνας.....	4
ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	7
2.1 Εισαγωγικά στοιχεία	7
2.2 Ιστορική αναδρομή.....	8
2.3 Φωτοδυναμική θεραπεία ή ακτινοθεραπεία;	9
2.4 Πηγές φωτός.....	11
2.5 Φωτοευαισθητοποιές ουσίες	13
2.6 Οξυγόνο και παραγωγή κυτταροτοξικών μορίων	15
2.7 Διαδικασίες κυτταρικού θανάτου στη ΘΔΦ.....	18
2.8 Ενίσχυση του θεραπευτικού αποτελέσματος στη ΦΔΘ	20
ΦΩΤΟΘΕΡΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	21
3.1 Εισαγωγικά στοιχεία	21
3.2 Νανοσωματίδια	23
3.3 Πλασμονικά φαινόμενα	24
3.4 Διαδικασίες κυτταρικού θανάτου στην ΠΦΘΘ	25
ΔΟΣΙΜΕΤΡΙΑ ΣΤΗ ΦΔΘ	31
4.1 Εισαγωγή	31
4.2 Φυσικά μεγέθη και ορολογία	33
4.3 Αντιμετώπιση λεπτών επιφανειακών και εν τω βάθει όγκων	36
4.4 Δοσιμετρικές μέθοδοι.....	39
4.5 Μέτρηση επιπέδων οξυγόνου.....	41

4.6 Υπολογισμός επιπέδων οξυγόνου	42
ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΣΤΗ ΦΔΘ	47
5.1 Εισαγωγή	47
5.2 Ανάπτυξη κώδικα	48
5.2.1 Κατασκευή γεωμετρίας	49
5.2.2 Υπολογισμός βασικών παραμέτρων της ΦΔΘ.....	53
5.2.3 Υπολογισμός νέκρωσης.....	56
5.2.4 Υπολογισμός παραμέτρων.....	57
5.2.5 Αντίστροφοι υπολογισμοί.....	58
5.2.6 Υπολογισμός χρόνου ακτινοβόλησης.....	60
5.3 Ποιότητα προσομοίωσης και πλήθος φωτονίων.....	62
5.4 Εφαρμογή του κώδικα	65
5.4.1 Γεωμετρία και παράμετροι.....	65
5.4.2 Αποτελέσματα	67
ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ ΟΜΟΙΩΜΑΤΩΝ.....	71
6.1 Εισαγωγικά στοιχεία	71
6.2 Υλικά και μέθοδοι	71
6.2.1 Νανοσωματίδια.....	71
6.2.2 Πηγές φωτός	73
6.2.3 Μέτρηση θερμοκρασίας.....	73
6.2.4 Μέτρηση ενέργειας / ισχύος	74
6.2.5 Διάμετρος δέσμης.....	75
6.3 Πειράματα Φάσης I	76
6.3.1 Εισαγωγή	76
6.3.2 Κατασκευή ομοιωμάτων.....	77
6.3.3 Ακτινοβόληση ομοιωμάτων.....	80
6.3.4 Αποτελέσματα	81
6.4 Πειράματα Φάσης II	85
6.4.1 Εισαγωγή	85
6.4.2 Κατασκευή ομοιωμάτων.....	85
6.4.3 Ακτινοβόληση ομοιωμάτων.....	90
6.4.4 Αποτελέσματα	92
ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΠΦΘΘ	95
7.1 Εισαγωγή	95
7.2 Υπολογιστική μελέτη υπερθερμίας	96

7.3 Ο ρόλος της γεωμετρίας	100
7.4 Ο ρόλος του μεγέθους του πλέγματος	106
7.5 Ο ρόλος της δέσμης.....	110
<i>In vivo & in silico</i> ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	115
8.1 Εισαγωγή	115
8.2 Υλικά και μέθοδοι	117
8.3 Σύνομη περιγραφή του πρωτοκόλλου	122
8.4 Υπολογιστική προσομοίωση	124
8.4.1 Φωτοδυναμική δράση ΦΔΘ	124
8.4.2 Φωτοθερμική δράση ΦΔΘ	128
8.5 Αποτελέσματα	131
8.6 Συμπεράσματα	139
8.7 Παρατηρήσεις - Σημεία προς βελτίωση.....	144
<i>In silico</i> ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	147
9.1 Εισαγωγή	147
9.2 Υπολογιστική προσομοίωση ΦΔΘ	147
9.2.1 Φωτοδυναμική δράση ΦΔΘ	150
9.2.2 Φωτοθερμική δράση ΦΔΘ	152
9.3 Υπολογιστική προσομοίωση ΠΦΘΘ	155
9.4 Αποτελέσματα	160
9.5 Συμπεράσματα	167
9.6 Παρατηρήσεις	170
9.7 Διάταξη <i>in vivo</i> ακτινοβολήσης	172
ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....	175
10.1 Συμπεράσματα.....	175
10.2 Μελλοντικοί στόχοι.....	182
ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	187
Α' ΑΑΡΜ – REPORT Νο .88 - ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ.....	217
Β' ΚΩΔΙΚΑΣ	225
Β. Κώδικες Matlab	225
Β.1 Parameters.m.....	225
Β.2 Statistics.m.....	226
Β.3 Spatial_distributions.m.....	227
Β.4 Correction_algorithm.m.....	232
Β.5 Fixed_1O2_algorithm.m	234

B.6 Time_calculator.m.....237

ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Ακολουθεί το ευρετήριο εικόνων της παρούσας διατριβής. Καθότι η πλειοψηφία των λεζαντών είναι εκτενής, εδώ εμφανίζεται μόνο η αντίστοιχη πρώτη σειρά.

Εικόνα 1. Τμήμα του παπύρου Edwin Smith	2
Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της δράσης της ΦΔΘ.	7
Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση του νεκρωτικού πυρήνα	11
Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση οπτικής ίνας.....	13
Εικόνα 5. Βασικοί πυλώνες ιδιοτήτων της ιδανικής φωτοευαισθητοποιού	15
Εικόνα 6. Διάγραμμα Jablonski της παραγωγής του μονήρους οξυγόνου.....	18
Εικόνα 7. Διάφοροι τύποι νανοδομών..	24
Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση της ταλάντωσης του ηλεκτρονιακού.	25
Εικόνα 9. (α) Φάσμα εκπομπής προ ΠΦΘΘ σε μύες, με άμεση έγχυση.....	27
Εικόνα 10. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα που εξάγονται	52
Εικόνα 11. Χρονική μεταβολή της οξυγόνωσης (g vs time).....	55
Εικόνα 12. Διάγραμμα ροής του αλγόριθμου «Fixed_1O2_algorithm.m»..	60
Εικόνα 13. Σύγκριση του ρυθμού ροής της διαδιδόμενης ακτινοβολίας.....	63
Εικόνα 14. Χωρική αναπαράσταση της κατανομής που προκύπτει	64
Εικόνα 15. (α) Εγκάρσια τομή της υπό μελέτη δομής	67
Εικόνα 16. (α) Χωρική κατανομή της συγκέντρωσης του μονήρους οξυγόνου... ..	69
Εικόνα 17. Σχέση μεταξύ της ελάχιστης αρχικής συγκέντρωσης.....	70
Εικόνα 18. Υδατικά διαλύματα νανοσωματιδίων χρυσού.	72
Εικόνα 19. Αντιπροσωπευτική εικόνα της διάταξης παρακολούθησης.	74
Εικόνα 20. Αντιπροσωπευτική εικόνα της διάταξης μέτρησης της ενέργειας.....	75
Εικόνα 21. Φωτογραφική αποτύπωση δέσμης για τη μετέπειτα επεξεργασία ...	76
Εικόνα 22. Η ενεργός περιοχή (που περιείχε τις νανοδομές) ομοιωμάτων	77
Εικόνα 23. Ο δεύτερος τύπος ομοιωμάτων	78
Εικόνα 24. (a, b) Ο τρίτος τύπος ομοιώματος που κατασκευάστηκε.....	80
Εικόνα 25. Διάταξη ακτινοβόλησης ομοιώματος	81
Εικόνα 26. Θερμοκρασιακή μεταβολή κατά την ακτινοβόληση ομοιώματος.....	82
Εικόνα 27. Σύγκριση της θερμοκρασιακής μεταβολής.....	83
Εικόνα 28. Μετρήσεις μεγάλης διάρκειας (long time measurements).	84
Εικόνα 29. Κατασκευή ρεαλιστικών καλούπιων για αναπαράσταση μυός.....	87
Εικόνα 30. Δοκιμαστικό καλούπι κυβικής δομής.	88

Εικόνα 31. Σύγκριση της δυνατότητας άρτιας εξαγωγής του ομοιώματος.....	89
Εικόνα 32. Εποπτική εικόνα του συνόλου των καλουπιών.....	90
Εικόνα 33. Η διάταξη της ακτινοβολήσης.....	91
Εικόνα 34. Διαδικασία παρασκευής και ακτινοβολήσης ομοιώματος μυός	92
Εικόνα 35. Σύγκριση της θερμοκρασιακής μεταβολής.....	93
Εικόνα 36. Ανάδειξη της σημασίας της σωστής επιλογής μήκους κύματος.....	94
Εικόνα 37. Το περιβάλλον εργασίας (a) του COMSOL Multiphysics.....	97
Εικόνα 38. (a) Χωρική αναπαράσταση της γεωμετρίας προς προσομοίωση	100
Εικόνα 39. Σύγκριση μεταξύ της προσομοιούμενης γεωμετρίας	102
Εικόνα 40. Σύγκριση των πειραματικών αποτελεσμάτων (experimental)	103
Εικόνα 41. Σύγκριση της θερμοκρασιακής μεταβολής.....	105
Εικόνα 42. Αναπαράσταση της επιρροής του μεγέθους του πλέγματος.....	107
Εικόνα 43. Σύγκριση διαφορετικών πλεγμάτων (meshes)	109
Εικόνα 44. Σύγκριση διαφορετικών αναπαραστάσεων δέσμης	111
Εικόνα 45. (a) Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τη βαθμονόμηση	119
Εικόνα 46. Φωτογραφία της πειραματικής διάταξης.	120
Εικόνα 47. Η πειραματική διάταξη: (a) Σχηματική αναπαράσταση των.....	121
Εικόνα 48. Αποτύπωση (snapshot) του παραθύρου αλληλεπίδρασης.....	130
Εικόνα 49. (a) Εγκάρσια τομή της γεωμετρίας (simulated model)	132
Εικόνα 50. (a) Σύγκριση των τιμών του $[^1\text{O}_2]_{rx}$ που παράγεται.....	134
Εικόνα 51. Τα φάσματα φθορισμού της περιοχής του όγκου	136
Εικόνα 52. Μεταβολή (%) της καρκινικής περιοχής	137
Εικόνα 53. (a) Μέτρηση των διαστάσεων του όγκου	138
Εικόνα 54. (a) Μέγιστη καταγραφόμενη θερμοκρασία	139
Εικόνα 55. Απλοποιημένη τρισδιάστατη αναπαράσταση.....	154
Εικόνα 56. Συγκριτική μελέτη της εξάρτησης της ανόδου της μέσης	159
Εικόνα 57. Αποτελέσματα της υπολογιστικής προσομοίωσης της $\Phi\Delta\Theta$	161
Εικόνα 58. Αποτελέσματα της μελέτης της θερμοκρασιακής ανόδου	163
Εικόνα 59. Θερμοκρασιακή άνοδος μετά από ΠΦΘΘ	165
Εικόνα 60. Υπολογιστική προσομοίωση της ΠΦΘΘ.....	166
Εικόνα 61. Μεγεθυμένη εικόνα της συνολικής νεκρωτικής περιοχής	167
Εικόνα 62. Χρονική συνεισφορά της $\Phi\Delta\Theta$ (PDT) και της ΠΦΘΘ (PPTT)	171
Εικόνα 63. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ενδεικτικού εξοπλισμού.....	174
Εικόνα 64. Σχηματική αναπαράσταση της ενίσχυσης της $\Phi\Delta\Theta$	184

ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.	Διαδικασίες και μηχανισμοί θανάτου στη ΦΔΘ.....	19
Πίνακας 2.	<i>In vivo</i> μελέτες συνδυασμού ΦΔΘ και ΠΦΘΘ.....	29
Πίνακας 3.	Παράμετροι που διέπουν τις φωτοχημικές εξισώσεις.....	42
Πίνακας 4.	Οπτικές και φωτοχημικές παράμετροι του μοντέλου nBCC.....	66
Πίνακας 5.	Σύγκριση των μέγιστων θερμοκρασιών και χρόνων εκτέλεσης για τα βέλτιστα μοντέλα.....	105
Πίνακας 6.	Συνεισφορά της πυκνότητας πλέγματος στην προσομοίωση.....	108
Πίνακας 7.	Πρωτόκολλο ακτινοβολήσης για κάθε ζώο.....	123
Πίνακας 8.	Οπτικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν στην προσομοίωση.....	125
Πίνακας 9.	Φωτοχημικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν στην προσομοίωση.....	127
Πίνακας 10.	Οπτικές και θερμικές ιδιότητες των ιστών για την εφαρμογή.....	129
Πίνακας 11.	Τα δεκαπέντε σενάρια θεραπείας.....	131
Πίνακας 12.	Μάζα εξαθθέντων όγκων.....	138
Πίνακας 13.	Τιμές βασικών παραμέτρων <i>in vivo</i> μελετών ΦΔΘ με βερτεπορφίνη σε μύες.....	149
Πίνακας 14.	Οπτικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν στην προσομοίωση.....	151
Πίνακας 15.	Φωτοχημικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν στην προσομοίωση.....	152
Πίνακας 16.	Τιμές βασικών παραμέτρων <i>in vivo</i> μελετών ΠΦΘΘ σε μύες.....	156

Page intentionally left blank

ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΕΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ALA	-	Aminolevulinic acid
AuNP	-	Gold nanoparticle
AuNR	-	Gold nanorod
FWHM	-	Full width at half maximum
IR	-	Infrared
MAL	-	Methyl aminolevulinate
nBCC	-	Nodular basal cell carcinoma
NIR	-	Near-infrared
PDT	-	Photodynamic therapy
PEG	-	Polyethylene glycol
PTT	-	Photothermal therapy
PpIX	-	Protoporphyrin IX
PPTT	-	Plasmonic photothermal therapy
RIF	-	Radio-induced fibrosarcoma
SOL	-	Singlet oxygen luminescence
SmPC	-	Summary of Product Characteristics
VIS	-	Visible
ΠΦΘΘ	-	Πλασμονική φωτοθερμική θεραπεία
ΦΔΘ	-	Φωτοδυναμική θεραπεία
ΦΘΘ	-	Φωτοθερμική θεραπεία

Page intentionally left blank

Από τη διεξαγωγή της έρευνας για την παρούσα διδακτορική διατριβή προέκυψαν οι παρακάτω δημοσιεύσεις:

Σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά με κριτές

1. «Assessing temperature increase during photodynamic therapy: a simulation model», G. Kareliotis, M. Kalkou, G. Tsigaridas, M. Makropoulou and A.A. Serafetinides, *Journal of Physics: Conference Series*, Vol. 1859 012048, 2021
2. «Theoretical study of laser-based phototherapies' improvement via upconverting nanoparticles», E. Spyratou, G. Kareliotis, M. Makropoulou, E. Efstathopoulos and A.A. Serafetinides, *Journal of Physics: Conference Series*, Vol. 1859 012043, 2021
3. «Combined radiation strategies for novel and enhanced cancer treatment», G. Kareliotis, I. Tremi, M. Kaitatzi, E. Drakaki, A.A. Serafetinides, M. Makropoulou and A.G. Georgakilas, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 96, 9, p. 1087-1103, 2020
4. "Non-ionizing, laser radiation in Theranostics: The need for dosimetry and the role of Medical Physics", M. Makropoulou, G. Kareliotis, E. Spyratou, E. Drakaki, A.A. Serafetinides and E. Efstathopoulos, *Physica Medica*, Vol. 63, p. 7-18, 2019
5. «Computational study of necrotic areas in rat liver tissue treated with photodynamic therapy», G. Kareliotis, M. Papachristou, D. Priftakis, I. Datsaris and M. Makropoulou, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Vol. 192, p. 40-48, 2019
6. «Assessment of singlet oxygen dosimetry concepts in photodynamic therapy through computational modeling», G. Kareliotis, S. Lioffi and M. Makropoulou, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Vol. 21, p. 224-233, 2018

Σε διεθνή αποθετήρια

- «Photodynamic therapy of 4T1 tumors in NOD-SCID mice», G. Kareliotis, S. Xanthopoulos, E. Drakaki, M. Papachristou, I. Datseris, P. Bouziotis and M. Makropoulou, *Cornell University (arXiv.org)*, p. 1-14, 2020
<http://arxiv.org/abs/2008.03537>

Μεταφράσεις

- «AAPM Report 88 (2005) - Photodynamic Therapy Dosimetry - Greek Translation», Task Group 5 - General Medical Physics Committee of the Science Council, μετάφραση στα ελληνικά: Καρελιώτης Γ. & Μακροπούλου Μ., 2018, http://www.physics.ntua.gr/~ola/publications/AAPM_Report_88.pdf

Προφορικές παρουσιάσεις/ ομιλίες/ posters

1. «Ασφαλής Χρήση των Laser στην Ιατρική Φυσική», Γ. Καρελιώτης, Προσκεκλημένη Ομιλία, *18^ο Πανελλήνιο συνέδριο της Ένωσης Ελλήνων Φυσικών: Σύγχρονη Φυσική και Μεγάλα Επιτεύγματα, Έρευνα - Τεχνολογία - Καινοτομία - Εκπαίδευση*, Ερέτρια, 25-27/09/2020
2. «Assessing temperature increase during photodynamic therapy: a simulation model», G. Kareliotis, M. Kalkou, G. Tsigaridas, M. Makropoulou and A.A. Serafetinides, Poster, *21st International Conference and School on Quantum Electronics: Laser Physics and Applications*, Bulgaria (web hosted), 21-24/09/2020
3. «Theoretical study of laser-based phototherapies' improvement via upconverting nanoparticles», E. Spyratou, G. Kareliotis, M. Makropoulou, E. Efsthathopoulos and A.A. Serafetinides, Poster, *21st International Conference and School on Quantum Electronics: Laser Physics and Applications*, Bulgaria (web hosted), 21-24/09/2020
4. «Θέματα Σχετικά με την Ασφαλή Χρήση των Laser», Γ. Καρελιώτης, Ομιλία, *Εκπαιδευτικά διαδικτυακά σεμινάρια HELSOLA 2019*, 29/11/2019

5. «Υποσχόμενες εφαρμογές των lasers στην θεραπεία του καρκίνου», Γ. Καρελιώτης, Ομιλία, Εκπαιδευτική ημερίδα: *Η χρήση των lasers στην ιατρική – κλινικές εφαρμογές και ασφαλής λειτουργία, Διεθνής Ημέρα Ιατρικής Φυσικής 2018*, Αθήνα, 24/11/2018
6. «Computational study of necrotic radius in photodynamic therapy and monitoring with PET/CT», G. Kareliotis, D. Priftakis, M. Papachristou, I. Datsaris and M. Makropoulou, Poster, Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, October 13 – 17, 2018 Düsseldorf, Germany. (Book of Abstracts: *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, Vol. 45, 1–844 (2018))

Επιπροσθέτως του ανωτέρω θέματος της παρούσας διδακτορικής έρευνας, εντός όμως του ευρύτερου αντικειμένου της δοσομετρίας ακτινοβολίας σε ιατρικές εφαρμογές, προέκυψαν οι παρακάτω δημοσιεύσεις:

1. «X-ray radiation affects the protection filter of yellow-tinted acrylic hydrophobic intraocular lenses against harmful UV-A and blue light», E. Spyratou, I. Antonakos, G. Kareliotis, C. Bacharis and E. Efstathopoulos, *Hellenic Journal of Radiology (Accepted for publication)*
2. «The facts and myths for the use of lasers in orthopaedics surgery», S. Angelis, M. Kaitatzi, G. Kareliotis, A. Tsiotsias, S. Maris, D. Filippou and M. Makropoulou, *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*, 31(2):55–69, 2021
3. «Laser-intraocular lenses interaction: Aspects to consider for *in situ* vision correction», G. Kareliotis, E. Drakaki, C. Bacharis, M. Makropoulou and A.A. Serafetinides, *New Frontiers in Ophthalmology*, Vol. 6, p. 1-9, 2020
4. «Non-ablative ultra-pulsed laser interaction with intraocular lenses for refractive power modification», C. Bacharis, E. Drakaki, G. Kareliotis, E. Chalkiadaki, Z. Vlachopoulou, K. Moutzouris, Sp. Koutsoumpos, I. Tsilikas, G. Sianoudis, M. Makropoulou and A.A. Serafetinides, Oral presentation, *23rd Winter Meeting of the European Society of Cataract and Refractive Surgeons (ESCRS)*, Athens, 16/2/2019

5. «The effect of ionizing radiation on the UV-blue light protection filter of intraocular lenses», E. Spyratou, G. Kareliotis, J. Antonakos, K. Platoni, C. Bacharis, M. Makropoulou, A.A. Serafetinides and E. Efstathopoulos, Oral presentation, *23rd Winter Meeting of the European Society of Cataract and Refractive Surgeons (ESCRS)*, Athens, 16/2/2019

6. «Non-ablative laser interaction with intraocular lenses as the standpoint for *in situ* vision correction», M. Makropoulou, I. Tsilikas, G. Kareliotis, E. Zois, C. Bacharis, G. Sianoudis and A.A. Serafetinides, Poster, *20th International Conference and School on Quantum Electronics: Laser Physics and Applications*, Nessebar, Bulgaria, 17-21/09/2018

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καρκίνος

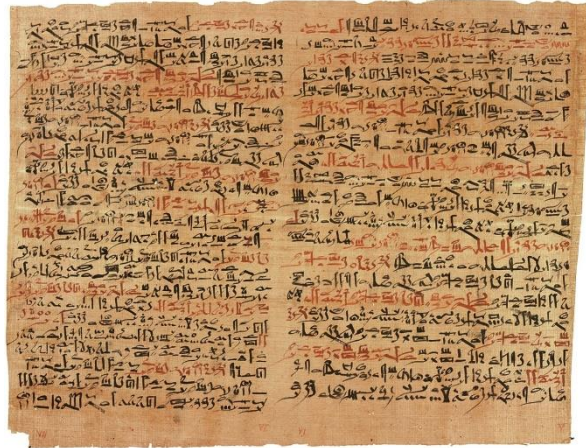
Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις βασικές αιτίες θανάτου σε ολόκληρη την υφήλιο, με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization – WHO), να κάνει λόγο για 9,6 εκατομμύρια θανάτους μόνο το 2018 [1]. Πρόκειται για μία σύνθετη νόσο, η οποία παρουσιάζει μεταβλητότητα ως προς τη θνητότητα μεταξύ των χωρών και των τύπων της. Στις περισσότερες αναπτυγμένες κοινωνίες η θνητότητα μειώνεται, κυρίως λόγω της πρόληψης, της έγκαιρης διάγνωσης και των νέων θεραπειών. Αντιθέτως, στις υπόλοιπες χώρες τα ποσοστά θανάτων αυξάνονται ή στην καλύτερη περίπτωση παραμένουν σταθερά, για πολλούς τύπους καρκίνου [1].

Τι είναι όμως ο καρκίνος; Ένας ευρύς και ίσως γενικός ορισμός, είναι η «μη φυσιολογική και άναρχη ανάπτυξη των κυττάρων». Στην πραγματικότητα όμως ο καρκίνος είναι μια ιδιαίτερος σύνθετη ασθένεια ή όπως αναφέρεται και βιβλιογραφικά, ένα σύνολο ασθενειών [2]. Μπορεί να παρουσιαστεί σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος, να «εισβάλλει» σε γειτονικούς ιστούς και μέσω της αιματικής κυκλοφορίας να δημιουργήσει δευτερογενείς εστίες (μεταστάσεις). Οι καρκινικοί όγκοι εξαρτώνται άμεσα από την καλή οξυγόνωση και την επαρκή προμήθειά τους σε θρεπτικά στοιχεία [3,4]. Διακρίνονται από την έντονη και άναρχη αγγειογένεση προκειμένου να καλύψουν τις μεταβολικές τους ανάγκες και μάλιστα, όταν αναπτυχθούν σε μεγάλη κλίμακα, το κέντρο τους μεταπίπτει σε νεκρωτικό (necrotic) και υποξικό (hypoxic) [5,6]. Όσον αφορά τη διαχρονική αναζήτηση περί της αιτίας ή των αιτιών του καρκίνου, αυτή ξεπερνά τους στόχους της παρούσας διατριβής και ο αναγνώστης παραπέμπεται στο αναλυτικό άρθρο του Clarke Brian Blackadar [7] καθώς και στην πρόσφατη έκθεση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας «Cancer research for cancer prevention» [1]. Η τελευταία μάλιστα παρουσιάζει ιδιαίτερο

ενδιαφέρον, καθότι συζητά ξεχωριστά όχι μόνο τα δημογραφικά δεδομένα αλλά και τους παράγοντες κινδύνου για κάθε μορφή καρκίνου.

1.2 Ιστορική αναδρομή

Η πρώτη επίσημα καταγεγραμμένη περίπτωση καρκίνου χρονολογείται στο ~1600 π.Χ., στην περιοχή της αρχαίας Αιγύπτου, όπως αναφέρεται στον πάπυρο Edwin Smith. Πρόκειται για ένα αρχαίο έγγραφο που ανακαλύφθηκε σε τάφο στην περιοχή της Θήβας (Αιγύπτου) και πωλήθηκε το 1862 στον έμπορο Edwin Smith (βλ. **εικόνα 1**). Ο Smith τον είχε στην κατοχή του έως τον θάνατό του το



Εικόνα 1. Τμήμα του παπύρου Edwin Smith που φυλάσσεται στην Ιατρική Ακαδημία της Νέας Υόρκης (πηγή: wikipedia.org).

1906, όπου και δωρίθηκε στο μουσείο «New-York Historical Society». Το 1930 μεταφράστηκε από τον αιγυπτιολόγο James Henry Breasted, ο οποίος εξέφρασε την άποψη πως το έγγραφο είναι αντίγραφο άλλου, αρχαιότερου αιγυπτιακού εγχειριδίου χειρουργικής τραυμάτων [8,9]. Ανάμεσα στις 48 περιπτώσεις τραυμάτων, πληγών και κακώσεων, περιγράφεται και μία περίπτωση όγκου στην άνω θωρακική περιοχή (περίπτωση No. 45), σχήματος σφαίρας, χαμηλότερης θερμοκρασίας από το υπόλοιπο σώμα, που πιστεύεται πως είναι και η πρώτη καταγεγραμμένη περίπτωση κακοήθειας. Παρόλα αυτά, ο όρος «καρκίνος» αποδίδεται στον Ιπποκράτη και τη σχολή του, όπου χρησιμοποιούνταν για την περιγραφή οιδημάτων και ελκών που δεν επουλώνονταν, ενώ όρος «καρκίνωμα» χρησιμοποιούνταν για τις περιπτώσεις κακοήθειας [10]. Τέλος, όσον αφορά τον όρο «όγκος», αυτός αποδίδεται στον Γαληνό [11].

Αν και οι καρκινικοί όγκοι κάνουν την εμφάνισή τους από την εποχή των δεινοσαύρων [12], την πρώτη φυσική απόδειξη κακοήθους όγκου σε πρόγονο του ανθρώπου αποτελεί ένα τμήμα 5^{ου} μεταταρσίου (hominin metatarsal specimen - SK 7923), που ανακαλύφθηκε στο σπήλαιο Swartkrans της Νοτίου Αφρικής. Χρονολογείται 1,6 με 1,8 εκατομμύρια χρόνια πριν και πρόκειται για

περίπτωση οστεοσαρκώματος [13]. Παρόλο που υπάρχει μία αναφορά ευρημάτων για έναν θάνατο από καρκίνο πριν από 4500 χρόνια [14], ο πρώτος επιστημονικά αποδεδειγμένος θάνατος που αποδίδεται σε συγκεκριμένη μορφή καρκίνου στον άνθρωπο, συνέβη στην περιοχή της Σιβηρίας 2700 χρόνια πριν. Πρόκειται για την περίπτωση ενός βασιλιά, ηλικίας 40 έως 50 χρονών, ο οποίος έπασχε από καρκίνο του προστάτη (πρωτογενής όγκος) που προκάλεσε οστικές μεταστάσεις στο σύνολο σχεδόν του σώματός του [15].

Όσον αφορά τις προσπάθειες αντιμετώπισης της ασθένειας, η προσέγγιση της σχολής του Ιπποκράτη ανέφερε την αποφυγή χειρουργικής αφαίρεσης όγκων χωρίς εξελκώσεις, όμως με την πάροδο των αιώνων και την εξέλιξη της χειρουργικής επιστήμης από τους Ρωμαίους, η αφαίρεση των όγκων κατέστη πιο προσφιλή επιλογή. Η κατάσταση άλλαξε δραστικά στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, με την ανακάλυψη των ακτίνων-Χ και των ραδιενεργών στοιχείων του ουρανίου, του ραδίου και του πολωνίου. Έτσι, τον Ιούλιο του 1896 στη Λυών της Γαλλίας, ο Victor Desreignes ανέφερε την πρώτη επίσημη χρήση ακτινοβολίας (ακτίνων-Χ) για την αντιμετώπιση καρκίνου του στομάχου [16]. Αναφορικά με τις προσπάθειες ίασης με χημικό τρόπο (χημειοθεραπεία), αυτές έχουν τις ρίζες τους στο κοινώς επονομαζόμενο «αέριο της μουστάρδας», το οποίο αναπτύχθηκε το 1860 από τον Frederick Guthrie [17] και η αντικαρκινική του χρήση μελετήθηκε στα μέσα της δεκαετίας του 1930 [18]. Σε αυτό το σημείο ο ενδιαφερόμενος αναγνώστης παραπέμπεται στα άρθρα των Παπαβραμίδου και Faguet [19,20], για μια ολοκληρωμένη παρουσίαση της διαχρονικής εξέλιξης των θεραπειών.

1.3 Σύγχρονη αντιμετώπιση του καρκίνου

Για την αντιμετώπιση του καρκίνου υπάρχει πλέον πληθώρα επιλογών, κάθε μία από τις οποίες έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της. Στις συμβατικές τεχνικές συγκαταλέγονται η χειρουργική εκτομή του όγκου, η χρήση συστημικά διαχεόμενων χημικών ουσιών (χημειοθεραπεία) και η συμβατική ακτινοθεραπεία, η οποία αποτελεί μη-επεμβατική μέθοδο καταστροφής του όγκου με χρήση ακτίνων υψηλής ενέργειας -Χ ή -γ. Σήμερα, η χειρουργική προσέγγιση με εκτομή του όγκου θεωρείται πως από μόνη της ίσως να μην είναι επαρκής, όταν δύναται να εφαρμοστεί, καθώς δεν μπορεί να αποκλειστεί η παράλειψη / αδυναμία αφαίρεσης του συνόλου της κακοήθειας.

Ένα τέτοιο γεγονός, μπορεί να οδηγήσει σε υποτροπή, ενώ και η ίδια η φύση της επεμβατικής διαδικασίας σε μετάσταση λόγω των τομών και της διαφυγής καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία [21]. Όσον αφορά τη χημειοθεραπεία, το μεγαλύτερο μειονέκτημά της είναι τα προβλήματα τοξικότητας που προκαλεί λόγω της συστημικής της δράσης [22].

Τα τεχνολογικά άλματα των τελευταίων δεκαετιών έχουν επιτρέψει την ανάπτυξη νέων μεθόδων για την αντιμετώπιση του καρκίνου, όπως η ορμονοθεραπεία, η ανοσοθεραπεία, στοχευμένες μορφές ακτινοθεραπείας (π.χ. στερεοτακτική ακτινοχειρουργική - stereotactic body radiosurgery - SBRT, πρωτονική θεραπεία - proton therapy) και η υπερθερμία, η οποία στοχεύει στην επιλεκτική καταστροφή όγκων μέσω της ανόδου της θερμοκρασίας τους.

Η εφεύρεση των laser από τον Theodore Harold Maiman το 1960, που επέτρεψε την παραγωγή μονοχρωματικών (ενός μήκους κύματος) δεσμών φωτός, οδήγησε στην ανάπτυξη μίας εναλλακτικής θεραπείας, της φωτοδυναμικής θεραπείας. Η φωτοδυναμική θεραπεία (ΦΔΘ) αποτελεί μία μη-επεμβατική μέθοδο αντιμετώπισης περιπτώσεων κακοήθειας, αλλά και άλλων παθήσεων, με χρήση μη-ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Αξιοποιεί την αλληλεπίδραση φωτός (συνήθως laser) με κατάλληλες φαρμακευτικές ουσίες για την οξειδωση και επιλεκτική καταστροφή όγκων-στόχων, ενώ η σημασία της είναι μεγάλη, ιδίως για επιφανειακούς όγκους, όπως ο καρκίνος του δέρματος.

Όλες οι παραπάνω θεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν πολλά πλεονεκτήματα αλλά και σε αρκετές περιπτώσεις σημαντικά μειονεκτήματα. Έτσι, το παρόν και το μέλλον της μάχης για την αντιμετώπιση του καρκίνου υποδεικνύει τη χρήση σύνθετων θεραπευτικών σχημάτων, με τη συνδυασμένη εφαρμογή μεθόδων αλλά και της νανοτεχνολογίας. Μέσω αυτής της προσέγγισης, μπορούν να αξιοποιηθούν τα πλεονεκτήματα κάθε μεθόδου, εξαλείφοντας σε μεγάλο βαθμό τα μειονεκτήματα που μπορεί να έχει. Σε αυτό το σημείο, ο ενδιαφερόμενος αναγνώστης παραπέμπεται στη διεθνή βιβλιογραφία για μια πλήρη ανάλυση των ανωτέρω [23–25].

1.4 Στόχος της παρούσας έρευνας

Το «Άγιο Δισκοπότηρο» στην έρευνα κατά του καρκίνου είναι η εύρεση μίας θεραπείας (ή ενός θεραπευτικού σχήματος), η οποία θα είναι σε θέση να αντιμετωπίσει με μόνιμο τρόπο την ασθένεια, προφυλάσσοντας παράλληλα τους

υγείς ιστούς. Λόγω της ιδιαίτερης φύσης του καρκίνου, προκειμένου να επιτευχθεί το ανωτέρω, η όποια θεραπεία θα πρέπει να είναι εξατομικευμένη, στοχευμένη και πλήρως δοσιμετρημένη. Παρότι η φωτοδυναμική θεραπεία χρησιμοποιείται σε παγκόσμιο αλλά και εθνικό επίπεδο, η δοσιμετρία του φωτός αλλά και του φωτοευαισθητοποιού παράγοντα παραμένει βασισμένη σε εμπειρικά (και απλουστευτικά) πρωτόκολλα. Αυτά μάλιστα, δεν εξατομικεύονται με βάση τη φαρμακοκινητική και τη βιοδιασπορά της φωτοευαισθητοποιού ουσίας, τις οπτικές ιδιότητες των ιστών και την οξυγόνωσή τους, ενέχοντας έτσι κίνδυνο υπέρ- ή υποδοσιασμού [23].

Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη την έλλειψη δυνατότητας ανάδρασης στις περιορισμένες υπολογιστικές προσομοιώσεις που υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία, καθώς και την πολύπλοκη δοσιμετρία που βασίζεται σε εμπειρικά και όχι πρόσφατα πρωτόκολλα, βασικός σκοπός της παρούσας διδακτορικής έρευνας ήταν η ανάπτυξη υπολογιστικών και πειραματικών μεθόδων δοσιμετρίας στη ΦΔΘ. Οι συγκεκριμένες επιδιώκουν τη στοχευμένη, μη-επεμβατική θεραπεία επιφανειακών συμπαγών όγκων ή εσωτερικών όγκων σε ενδοσκοπικά προσβάσιμες περιοχές, με βιοφωτονικές τεχνικές. Καθώς όμως τα σύγχρονα επιστημονικά δεδομένα καταδεικνύουν την ανάγκη συνδυασμού θεραπευτικών σχημάτων, μελετήθηκε επιπροσθέτως η ενίσχυση του θεραπευτικού αποτελέσματος της ΦΔΘ μέσω υπερθερμίας σε ένα καινοτόμο, *in silico*, συνδυαστικό πείραμα.

Προκειμένου να μη χρησιμοποιηθούν άσκοπα πειραματόζωα αλλά και να εξοικονομηθούν οικονομικοί και χρονικοί πόροι, η αλληλουχία της υλοποίησης μίας πειραματικής μεθόδου (πρέπει να) ξεκινά με τον *in silico* σχεδιασμό, προσομοίωση και έλεγχο του πειράματος, καθώς και με εξομοιώσεις με χρήση ομοιωμάτων. Μόνο κατά την τελευταία φάση και εφόσον είναι απαραίτητο, πρέπει να περνά σε *in vivo* διαδικασίες. Ακόμα και τότε, ακολουθώντας τα προστάγματα και τις οδηγίες περί δεοντολογίας για τη χρήση πειραματόζωων, το πλήθος αυτών δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τον απαραίτητο αριθμό προκειμένου να μπορούν να εξαχθούν αξιόπιστα συμπεράσματα. Επιπλέον, ειδικότερα σε ένα ταχέως μεταβαλλόμενο ερευνητικό περιβάλλον λόγω της πανδημίας του COVID-19, οι εξελιγμένες πλέον υπολογιστικές προσομοιώσεις αποτελούν μέρος της σύγχρονης επιστημονικής διαδικασίας, ιδιαίτερα αν η έρευνα πρέπει να γίνει μακριά από το εργαστήριο ή το νοσοκομείο. Έτσι, η παρούσα έρευνα στηρίχθηκε πρωτίστως σε *in silico* σχεδιασμό και υλοποίηση των πειραμάτων και μόνο κατά το τελικό στάδιο έγιναν δοκιμές σε ζώα (μύες).

Όπως είναι γνωστό, οι μύες με καρκινικό όγκο αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο στην έρευνα των θεραπευτικών προσεγγίσεων του καρκίνου. Ειδικά μάλιστα σε περιπτώσεις υποδόριας (subcutaneous) ανάπτυξης των όγκων, η απλότητα της μεθόδου πρόκλησής τους, η αναπαραγωγιμότητά τους, η ομοιογένειά τους (από ιστολογική άποψη) καθώς και η σχετική ευκολία εντοπισμού τους και εκτίμησης των διαστάσεών τους [26,27], καθιστούν το παραπάνω μοντέλο ιδανικό για χρήση *σε in vivo* μελέτες.

Προφανώς, υπήρξε συμμόρφωση ως προς τη συνθήκη της αιτιολόγησης της επιλογής των διαδικασιών και μεθόδων, με βάση τους στόχους των πρωτοκόλλων της έρευνας, τη συνήθη επιστημονική πρακτική και την εφαρμογή της αρχής της αντικατάστασης, μείωσης και βελτίωσης των διαδικασιών (3Rs), όπως άλλωστε απαιτείται και από το [άρθρο 3 του ΠΔ 56/2013](#). Έτσι, έγιναν οι προβλεπόμενες διαδικασίες κατάθεσης αιτήσεων προς την Επιτροπή Αξιολόγησης Πρωτοκόλλων, τη Διεύθυνση Αγροτικής και Κτηνιατρικής Πολιτικής και το Τμήμα Υγείας Ζώων και Κτηνιατρικής Αντίληψης Φαρμάκων (ΚΑΦΕ) της Περιφέρειας (Αίτηση Αδειοδότησης Πρωτοκόλλου - άρθρα 35 έως και 44 του ΠΔ 56/2013 και αντίστοιχη Μη Τεχνική Περίληψη Πρωτοκόλλου).

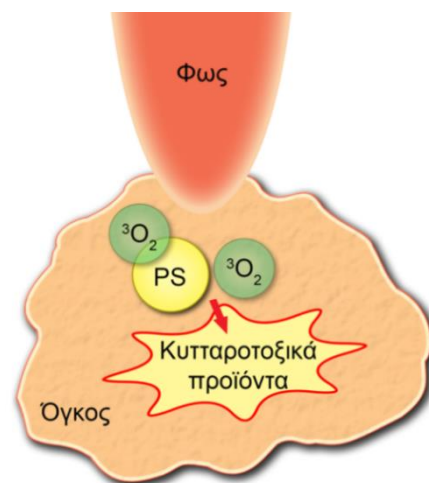
Τέλος, πρέπει να σημειωθεί η συνειδητή επιλογή της συγγραφής της παρούσας διατριβής στην ελληνική γλώσσα, παρόλο το περιορισμένο αναγνωστικό κοινό που αυτή συνεπάγεται. Αυτή η κίνηση θεωρήθηκε σωστή προς την κατεύθυνση του εμπλουτισμού της εγχώριας βιβλιογραφίας. Καθώς όμως η διεθνώς αποδεκτή επιστημονική γλώσσα είναι η αγγλική, λήφθηκε μέριμνα ώστε οι σημαντικοί όροι και τα γραφήματα να παρουσιάζονται (και) με τη διεθνή ορολογία τους.

ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

2.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Η φωτοδυναμική θεραπεία (photodynamic therapy - PDT) είναι μια φωτοενεργοποιούμενη χημειοθεραπεία, στην οποία μία φωτοευαισθητοποιός ουσία (photosensitizing agent) (βιβλιογραφικά απαντάται και ως φωτοευαισθητοποιητής, photosensitizer - PS), που έχει συσσωρευτεί μέσα στα κύτταρα, ενεργοποιείται μετά από ακτινοβολήση με κατάλληλο φως προκαλώντας οξειδωτικές βλάβες (βλ. **εικόνα 2**). Παρότι απαιτεί τη χορήγηση φαρμακευτικής ουσίας, σε αντίθεση με την παραδοσιακή χημειοθεραπεία που έχει συστημικό αποτέλεσμα, η ΦΔΘ έχει εντοπισμένη δράση. Υπό αυτήν την έννοια, θεωρείται περισσότερο ως μία χειρουργική ή ακτινοβολητική τεχνική, παρά ως χημειοθεραπεία [28]. Σήμερα εφαρμόζεται με έγκριση στον καρκίνο του δέρματος (παγκοσμίως), της κεφαλής και του τραχήλου (Ευρώπη), του πνεύμονα (Αμερική, Καναδά, Ιαπωνία, Γερμανία, Γαλλία, Ολλανδία), της ουροδόχου κύστης (Καναδά) και του χοληφόρου πόρου (orphan status in EU/USA) [29–31].

Στόχος της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι η καταστροφή παθολογικών δομών, αξιοποιώντας την ταυτόχρονη δράση τριών βασικών «εργαλείων». Αυτά είναι η φωτοευαισθητοποιός ουσία, μονοχρωματική ακτινοβολία (συνήθως laser) και μοριακό οξυγόνο (molecular oxygen), που με τη σειρά τους ορίζουν τα τρία βασικά στάδια της θεραπείας. Στο πρώτο στάδιο ο φωτοευαισθητοποιός παράγοντας μεταφέρεται στον όγκο-στόχο. Στο δεύτερο στάδιο, ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος,



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της δράσης της ΦΔΘ.

παραγόμενη από laser ή από άλλες μονοχρωματικές πηγές φωτός (π.χ. φωτοδιόδους - LED) αλληλεπιδρά με την φωτοευαίσθητη ουσία διεγείροντάς την, εκκινώντας το τρίτο και καθοριστικό στάδιο που είναι η καταστροφή του όγκου-στόχου, μέσω της παραγωγής οξειδωτικών ριζών.

2.2 Ιστορική αναδρομή

Η χρήση φωτός για τη θεραπεία δερματικών, μεταβολικών (ραχίτιδας) αλλά και ψυχικών παθήσεων ήταν γνωστή σε αρχαίους πολιτισμούς, όπως αυτοί των Αιγυπτίων, των Ελλήνων, των Ινδών και των Κινέζων [32]. Η συστηματική όμως χρήση του συνδυασμού φωτός και ουσιών για θεραπευτικούς λόγους έχει τις ρίζες της στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, όταν ο Oscar Raab παρατήρησε πως υπήρχε η δυνατότητα θανάτωσης πρωτόζωων (παραμηκίων) με συνδυασμό φωτός, ακριδίνης και άλλων χρωστικών [33,34]. Το 1903 η ομάδα του Hermann von Tarpeiner παρατήρησε ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε δερματικές παθήσεις και κονδυλώματα, μετά από την ενεργοποίηση χρωστικών, όπως η ηωσίνη και η φλουορεσκεΐνη, με φως [35]. Ο Hermann von Tarpeiner ήταν μάλιστα εκείνος που ανέδειξε την αναγκαιότητα της παρουσίας οξυγόνου στη φωτοδυναμική θεραπεία αλλά και που εισήγαγε τον όρο «φωτοδυναμική» το 1907 [32,36,37]. Παρόλο που μία πενταετία αργότερα άρχισε να μελετάται η χρήση της αιματοπορφυρίνης [38], χρειάστηκε να περάσουν περίπου σαράντα χρόνια για να αυξηθεί το ενδιαφέρον για τον φθορισμό των πορφυρινών [39]. Έπειτα, το 1960, η ομάδα του Lipson απέδειξε τον αποτελεσματικό εντοπισμό όγκων με χρήση μείξης παραγώγων της αιματοπορφυρίνης (hematoporphyrin derivative - HPD) [40]. Η πρώτη φωτοευαίσθητοποιός ουσία για φωτοδυναμική θεραπεία που έλαβε έγκριση κλινικής χρήσης ήταν η φωτοφρίνη (Photofrin®) το 1993 στον Καναδά (για καρκίνο της ουροδόχου κύστης), το 1994 στην Ιαπωνία και στην Ευρώπη (Ολλανδία, για καρκίνο του πνεύμονα και του οισοφάγου) και το 1995 στις Η.Π.Α. (για καρκίνο του οισοφάγου).

Παρόλη όμως τη μακρά πορεία της φωτοδυναμικής θεραπείας, ασφαλείς και δραστικές τεχνικές της κατοχυρώθηκαν μόλις στις αρχές του 1990 [32,41,42]. Από τότε έχει χρησιμοποιηθεί στην ογκολογία για τη θεραπεία του καρκίνου, καθώς και για τη θεραπεία πολλών άλλων παθήσεων, όπως εκφύλιση της ωχράς κηλίδας (οφθαλμική πάθηση), δερματολογικές βλάβες ή εξεργασίες (π.χ. ακμή [43]), αιμαγγειώματα (port wine stain αγγειώματα), σκληροδερμία

[44], οξυτενή κονδυλώματα [45], ανθεκτικές στα αντιβιοτικά λοιμώξεις [46] κ.ά. Στη δερματολογία, η φωτοδυναμική θεραπεία χρησιμοποιείται για τη θεραπεία νεοπλασιών του δέρματος αλλά και αρκετών καλοηθών δερματοπαθειών.

2.3 Φωτοδυναμική θεραπεία ή ακτινοθεραπεία;

Ιδιαίτερη μνεία αξίζει να δοθεί στη θεμελιώδη διαφορά μεταξύ της φωτοδυναμικής θεραπείας και της ακτινοθεραπείας καθώς συχνά, λανθασμένα, αντιμετωπίζονται υπό το ίδιο πρίσμα. Παρότι και οι δύο στηρίζονται στη χρήση ακτινοβολίας, αυτή για τη μεν ακτινοθεραπεία είναι ιοντιζουσα, ενώ για τη δε φωτοδυναμική θεραπεία είναι μη-ιοντιζουσα. Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο ακτινοβολιών με την ύλη είναι διαφορετικός, καθόσον αφορά φωτόνια διαφορετικού μήκους κύματος και ενέργειας. Για το εύρος των ενεργειών που χρησιμοποιούνται στην ακτινοθεραπεία (ακτίνες-X, ενέργειας συνήθως από 6 έως 20 MV), ο κύριος μηχανισμός είναι το φαινόμενο Compton [47]. Αντιθέτως, όταν μια δέσμη στο ορατό (visible - VIS) ή υπέρυθρο (infrared - IR) φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας αλληλεπιδρά με έναν ιστό μπορούν να λάβουν χώρα διάφορα φαινόμενα (και μάλιστα συνήθως συμβαίνει κάποιος συνδυασμός τους), όπως ανάκλαση, διάθλαση, διάχυση, απορρόφηση αλλά μέχρι και μη γραμμικά οπτικά φαινόμενα [48]. Ακόμα και στην περίπτωση που τα προηγούμενα κατηγοριοποιηθούν σε διαδικασίες απορρόφησης (όπου η προσπίπτουσα ενέργεια απορροφάται) και διαδικασίες σκέδασης (όπου δεν απορροφάται αλλά αλλάζει πορεία), γίνεται εύκολα κατανοητή η αυξημένη πολυπλοκότητα στην υπολογιστική προσομοίωσή τους. Αν λάβει δε κανείς υπόψη πως τα παραπάνω μεταβάλλονται ανάλογα με το είδος του ιστού και το μήκος κύματος (λ) με το οποίο αυτός ακτινοβολείται, καθώς και ότι στη ΦΔΘ πρέπει να δοσιμετρηθεί τόσο η φωτοευαισθητοποιός ουσία όσο και το μοριακό οξυγόνο σε επίπεδο κυττάρων (βλ. **Κεφάλαιο 4 - Δοσιμετρία**), η αυξημένη δυσκολία της δοσιμετρίας στη φωτοδυναμική θεραπεία είναι αυταπόδεικτη.

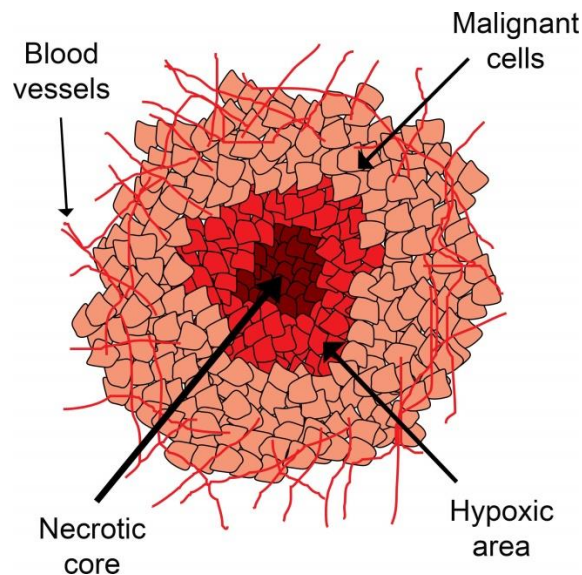
Όσον αφορά μία σύντομη σύγκριση των δύο μεθόδων, η χρήση μη-ιοντιζουσας ακτινοβολίας αυτομάτως αποτελεί ένα πρώτο πλεονέκτημα υπέρ της φωτοδυναμικής θεραπείας, καθώς προστατεύει τους υγιείς ιστούς που συναντά από οποιαδήποτε μεταλλαξιογόνο επίδραση. Τα επόμενα πλεονεκτήματα της μεθόδου απορρέουν από τη διεισδυτικότητα της κάθε δέσμης ακτινοβολίας. Οι

δέσμες που παράγονται από τους γραμμικούς επιταχυντές και χρησιμοποιούνται στην ακτινοθεραπεία είναι έντονα διεισδυτικές, σε αντίθεση με τις δέσμες φωτός της φωτοδυναμικής θεραπείας που έχουν πολύ περιορισμένο βάθος διείσδυσης. Ενδεικτικά, αναφέρεται πως προκειμένου να «σταματήσει» μια δέσμη ακτίνων-Χ απαιτούνται αρκετές δεκάδες εκατοστά σκυροδέματος, ενώ για μια δέσμη laser αρκούν λίγα μόλις χιλιοστά μαλακού ιστού. Αυτομάτως γίνεται κατανοητό, πως η δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας εστιάζεται σε σαφώς καθορισμένες περιοχές, με μηδενική επίδραση στους πέριξ υγείς ιστούς [23]. Αντιθέτως, ακόμα και οι νέες τεχνικές ακτινοθεραπείας (π.χ. SBRT) αποδίδουν δόση σε αυτούς, αν και πολύ μικρότερη από τις κλασσικές τεχνικές ακτινοθεραπείας [49]. Επιπροσθέτως, λόγω της αυξημένης διεισδυτικότητας των δεσμών που παράγονται στην ακτινοθεραπεία, απαιτούνται ογκώδεις και δαπανηρές θωρακίσεις του χώρου, ενώ ακόμα και οι ίδιες οι μονάδες των γραμμικών επιταχυντών έχουν αυξημένο κόστος προμήθειας και ανάγκες συντήρησης. Προκειμένου να δοθεί μία αίσθηση του κόστους αγοράς ενός laser για ΦΔΘ και ενός γραμμικού επιταχυντή, αναφέρεται πως απαιτούνται περί τα 3.000 – 6.000 € για το πρώτο και 3.000.000 € για τον δεύτερο, αντίστοιχα. Τέλος, λόγω της χρήσης μη-ιονιζουσας ακτινοβολίας, η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς θεωρητικό περιορισμό στο πλήθος των επαναλήψεων της στον ίδιο ασθενή.

Στον αντίποδα, ο κύριος περιορισμός της ΦΔΘ είναι το περιορισμένο βάθος διείσδυσης (δ), που μπορεί να αντιμετωπιστεί (μερικώς) με χρήση μηκών κύματος στην περιοχή του υπεριώθρου και (δραστικώς) με πολλαπλούς ενδοϊστικούς εφαρμογείς [34]. Προφανώς, με εξαίρεση τη μεταφορά του φωτός ενδοκοιλιακά με ενδοσκοπία, η ενδοϊστική χρήση απαλείφει σε ένα βαθμό τον μη-επεμβατικό χαρακτήρα της μεθόδου. Επιπροσθέτως, η έλλειψη ακριβούς και στοχευμένης / εξατομικευμένης δοσιμετρίας της, καθώς θα πρέπει να συνδυαστούν δεδομένα για τρία δυναμικά μεγέθη (φως, φωτοευαισθητοποιός ουσία και οξυγόνο) [50], όπως επίσης και η δυσκολία επαναληψιμότητάς της χωρίς πρωτύερο επαναϋπολογισμό της δοσιμετρίας (για τον ίδιο λόγο με αυτόν που προαναφέρθηκε), αποτελούν επιπλέον δυσκολίες. Η τελευταία όμως και, ίσως μεγαλύτερη, δυσκολία είναι η υποξικότητα του όγκου.

Καθώς οι μεταβολικές ανάγκες των καρκινικών όγκων είναι ιδιαίτερα αυξημένες, στο κέντρο τους βρίσκεται ένα σύνολο νεκρών κυττάρων που συνιστούν τον νεκρωτικό πυρήνα (necrotic core), ο οποίος περιβάλλεται από

μία υποξική περιοχή (hypoxic area) (βλ. **εικόνα 3**). Η υποξία (έλλειψη επαρκούς οξυγόνωσης) διαδραματίζει καιρίο ρόλο στην προσπάθεια αντιμετώπισης του καρκίνου, καθώς συνδέεται με τη δυσκολία της έναρξης αποπτωτικών διαδικασιών [51,52]. Προκειμένου να δοθεί μία αίσθηση της ποσότητας οξυγόνου που υπάρχει σε έναν φυσιολογικό ιστό (normoxic conditions), αυτή κυμαίνεται μεταξύ του 4 και 10%, ενώ σε έναν υποξικό στο ~0,3% [53,54]. Η υποξία, όπως και η έναρξη διαδικασιών επιδιόρθωσης βλαβών στο μόριο του DNA, συνδέεται με τη δημιουργία ακτινοάντοχων όγκων, μειώνοντας δραματικά την απόκρισή τους στη θεραπεία [55,56]. Η ακτινοευαίσθητοποίηση επομένως των καρκινικών δομών αποτελεί συχνό στόχο σε θεραπείες όπως η φωτοδυναμική και η ακτινοθεραπεία.



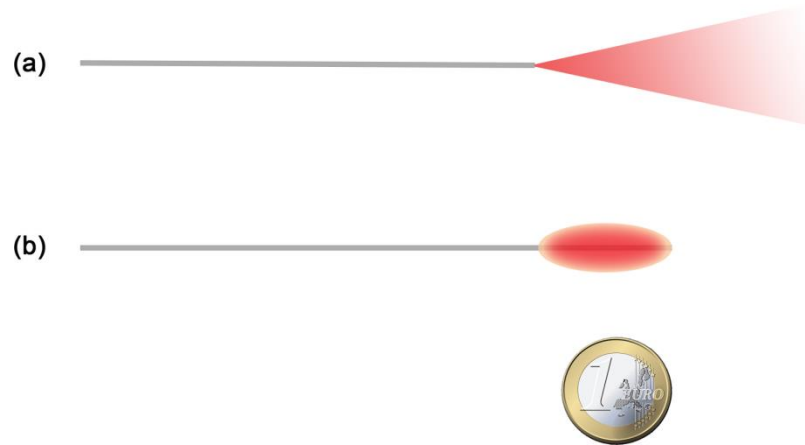
Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση του νεκρωτικού πυρήνα (necrotic core) και της υποξικής περιοχής (hypoxic area) που αναπτύσσονται στους καρκινικούς όγκους. Τα κακοήγη κύτταρα (malignant cells) τροφοδοτούνται από την άναρχη νεοαγγείωση (blood vessels). *Reprinted with permission from “Kareliotis G., Tremi I., et al., Combined radiation strategies for novel and enhanced cancer treatment, Int. J. Radiat. Biol, 2020; 96(9): 1087-1103”. Copyright © 2020, Taylor & Francis.*

2.4 Πηγές φωτός

Αναφορικά με το μήκος κύματος της δέσμης φωτός που θα χρησιμοποιηθεί, αυτό καθορίζεται με βάση δύο κυρίως παράγοντες. Ο πρώτος είναι η σύμπτωση που πρέπει να υπάρχει μεταξύ αυτού και του φάσματος απορρόφησης των φωτοευαίσθητων ουσιών, καθώς ακόμα και μικρές αποκλίσεις μπορούν να

οδηγήσουν σε ανεπαρκή απορρόφησή του και άρα να επηρεάσουν το τελικό θεραπευτικό αποτέλεσμα. Ακόμη, καθοριστικό ρόλο παίζει το βάθος διείσδυσης της δέσμης στους ιστούς, το οποίο αυξάνει για μεγαλύτερα μήκη κύματος. Καθότι όμως το οπτικό παράθυρο των βιολογικών ιστών βρίσκεται στην περιοχή μηκών κύματος των 630 με 800 nm, οι χρησιμοποιούμενες πηγές φωτός θα πρέπει να εκπέμπουν και αυτές στο προαναφερθέν φάσμα [34]. Σε αντίθετη περίπτωση, η απορρόφηση του φωτός από τα μόρια του νερού και τα χρωμοφόρα μόρια (όπως η αιμοσφαιρίνη) καθώς και οι αυξημένες σκεδάσεις, μειώνουν σημαντικά το βάθος διείσδυσης του φωτός στους ιστούς. Για παράδειγμα, για την αντιμετώπιση της ακτινικής κεράτωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί μικρό μήκος κύματος (στην περιοχή του μπλε), καθώς λόγω της επιφανειακής εξάπλωσης της νόσου απαιτείται μικρό βάθος διείσδυσης. Αξίζει μάλιστα να σημειωθεί πως οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιοί παράγοντες εμφανίζουν πολλαπλές κορυφές στο φάσμα απορρόφησής τους. Παρόλα αυτά, για την ακτινοβόλησή τους επιλέγεται μήκος κύματος που να αντιστοιχεί σε εκείνη την κορυφή που είναι πιο κοντά στο υπέρυθρο, αλλά προσφέρει ταυτόχρονα επαρκή απορρόφηση. Προκειμένου να δοθεί στον αναγνώστη μία αίσθηση των μηκών κύματος που χρησιμοποιούνται, αναφέρεται πως στη δερματολογία, δέσμη φωτός με $\lambda = 700$ nm θεωρείται ικανοποιητική αφού διαπερνά τα ανώτερα στρώματα της επιδερμίδας ενώ, ταυτόχρονα, οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιοί παράγοντες απορροφούν έντονα στην περιοχή των 630 (Photofrin®) με 732 nm (Lu – Tex®) [30].

Γενικά, η περιοχή ενδιαφέροντος μπορεί να ακτινοβοληθεί είτε επιφανειακά, είτε ενδοκοιλιακά, είτε ενδοϊστικά. Ειδικά για την εκ των έσω ακτινοβόληση, καταλυτικό ρόλο παίζουν οι μικρές διαστάσεις των οπτικών ινών και των διαχυτών φωτός που έχουν αναπτυχθεί (βλ. **εικόνα 4**). Το πόσο σημαντική είναι η κατάλληλη επιλογή του μήκους κύματος που θα χρησιμοποιηθεί, φαίνεται από το γεγονός ότι το βάθος νέκρωσης ($Z_{necrosis}$) εξαρτάται λογαριθμικά από όλους τους παράγοντες που υπεισέρχονται στον υπολογισμό του, εκτός από το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας, από το οποίο εξαρτάται γραμμικά [28]. Επομένως, αν κάποιος ήθελε να διπλασιάσει το βάθος μίας θεραπείας, θα αρκούσε να επιλέξει ένα μήκος κύματος στο οποίο η ακτινοβολία έχει διπλάσια διεισδυτικότητα. Αντιθέτως, για να πετύχει το ίδιο αποτέλεσμα αλλάζοντας οποιαδήποτε άλλη παράμετρο (π.χ. χρόνο θεραπείας, συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιού ουσίας κτλ) θα έπρεπε να αυξήσει την τιμή της κατά περίπου 7,4 φορές [57].



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση οπτικής ίνας **(a)** με επίπεδο γυμνό άκρο (flat-cut) και **(b)** με προσαρμοσμένο κυλινδρικό διαχύτη, που εκπέμπουν σε ερυθρό μήκος κύματος. Στο κάτω μέρος της εικόνας εμφανίζεται και ένα κέρμα, για να δοθεί μία αίσθηση του μεγέθους των γεωμετριών.

Τέλος, το βάθος διείσδυσης του φωτός και άρα η επιλογή της κατάλληλης πηγής για την ακτινοβολή εξαρτάται και από την οξυγόνωση του όγκου-στόχου. Σε μελέτη των Nielsen *et al.*, αναφορικά με το βέλτιστο μήκος κύματος σε βασικοκυτταρικά καρκινώματα (BCC), παρατηρήθηκε ότι στα 630 nm το βάθος διείσδυσης του φωτός μέσα στον όγκο εξαρτάται έντονα από το ποσοστό οξυγόνωσης του αίματος. Μάλιστα, η απόδοση της μεθόδου για καλά οξυγονωμένα οζώδη καρκινώματα (με πάχος μικρότερο από 2 mm), διέφερε κατά μία τάξη μεγέθους από ότι για καρκινώματα με ελλιπή οξυγόνωση. Αντίθετα, για μικρότερα μήκη κύματος στην περιοχή του υπεριώδους ($\lambda = 390$ nm), το βάθος διείσδυσης δεν εμφάνισε εξάρτηση από την οξυγόνωση του αίματος [58].

2.5 Φωτοευαισθητοποιές ουσίες

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, η φωτοευαισθητοποιός ουσία είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη φωτοδυναμική δράση καθώς και την παρουσία οξυγόνου. Σήμερα, υπάρχουν διαθέσιμοι αρκετοί τέτοιοι παράγοντες, με την πλειοψηφία τους να παρουσιάζει μέγιστα απορρόφησης στην περιοχή των 630 – 760 nm [30,59]. Η εισαγωγή τους γίνεται είτε συστηματικά (π.χ. ενδοφλεβίως), είτε τοπικώς (σε ενέσιμη μορφή ή σε μορφή αλοιφής). Ο δε χρόνος που μεσολαβεί μέχρι την ακτινοβολή και παίζει καθοριστικό ρόλο στη βιοκατανομή τους,

εξαρτάται από τις φαρμακολογικές του ιδιότητες καθώς και από το είδος της βλάβης και μπορεί να κυμαίνεται από λίγες ώρες (π.χ. Verteporfin - Visudyne®) έως και 2 ημέρες (HPD - Photofrin®).

Το κατά πόσο η φωτοευαισθητοποιός ουσία είναι λιπόφιλη ή όχι καθορίζει την εντόπισή της και άρα το είδος της κυτταρικής βλάβης που θα προκαλέσει. Εάν είναι λιπόφιλη συγκεντρώνεται κυρίως στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων και του κυτταροπλάσματος [60] καθώς και στο ενδοπλασματικό δίκτυο, προκαλώντας απόπτωση. Εάν είναι υδρόφιλη συσσωρεύεται στα λυσοσώματα όπου, προσξενώντας βλάβες, επάγει νέκρωση. Παρόλα αυτά, σε επίπεδο μορίου DNA, η πιθανότητα για μεταλλαξιγόνο δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα, λόγω της μικρής ακτίνας δράσης των παραγόμενων ουσιών (0,01 – 65 μm) [30,50].

Οι φωτοευαισθητοποιές ουσίες κατηγοριοποιούνται σε τρεις γενεές. Οι πρώτης γενεάς παράγοντες, όπως το Photofrin®, παρουσίαζαν το σημαντικό μειονέκτημα της παρατεταμένης φωτοευαισθησίας του ασθενούς μετά το πέρας της θεραπείας (λόγω μεγάλου χρόνου απομάκρυνσης από τον οργανισμό), καθώς και την ανάγκη ακτινοβόλησης με φως μικρού μήκους κύματος (άρα και περιορισμένης διεισδυτικότητας). Και οι δύο παραπάνω περιορισμοί άρτηκαν σε μεγάλο βαθμό με την έλευση των φωτοευαισθητών παραγόντων δεύτερης γενεάς. Σε αυτούς ανήκουν φαρμακευτικές ουσίες όπως τα Visudyne®, Temoporfin® και ATMPn [61]. Οι τρίτης γενεάς παράγοντες, που είναι ακόμα υπό ανάπτυξη, παρουσιάζουν σημαντικά εντοπισμένη συγκέντρωση της ουσίας εντός της καρκινικής περιοχής και ισχυρή πρόσδεση με τα κακοήθη κύτταρα.

Σε κάθε περίπτωση, το ζητούμενο για τη βελτιστοποίηση μίας ουσίας για χρήση στη φωτοδυναμική θεραπεία είναι να ικανοποιεί πέντε προϋποθέσεις (βλ. **εικόνα 5**): i) να συγκεντρώνεται επιλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα, ούτως ώστε να είναι εντοπισμένη / στοχευμένη η φωτοδυναμική δράση· ii) να μπορεί να απομακρύνεται γρήγορα από τον οργανισμό, προς αποφυγή φωτοευαισθησίας και φαρμακοτοξικότητας· iii) να παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης εντός του οπτικού παραθύρου των ιστών αλλά μετατοπισμένο προς το κοντινό υπέρυθρο (near infrared – NIR) φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, προκειμένου να υπάρχει αυξημένο βάθος θεραπείας· iv) να υπάρχει πηγή φωτός που να εκπέμπει δέσμη στο ανωτέρω μήκος κύματος και αν όχι να είναι εφικτή η κατασκευή της και v) να είναι κατά προτίμηση

υδρόφιλη, για λόγους ευκολίας στη χορήγησή της μέσω της κυκλοφορίας του αίματος κατά την κλινική χρήση [62].



Εικόνα 5. Βασικοί πυλώνες ιδιοτήτων της ιδανικής φωτοευαισθητοποιού ουσίας. NIR: κοντινό υπέρυθρο.

2.6 Οξυγόνο και παραγωγή κυτταροτοξικών μορίων

Το οξυγόνο διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό των κυττάρων. Απορροφάται από τον ατμοσφαιρικό αέρα με τη βοήθεια των πνευμόνων και μεταφέρεται στα κύτταρα μέσω των ερυθροκυττάρων και πιο συγκεκριμένα της αιμοσφαιρίνης, μίας πρωτεΐνης που λόγω των μορίων αίμης που περιέχει μπορεί να συνδέεται ισχυρά με τα μόρια του οξυγόνου. Η οξυγόνωση κάθε οργάνου εξαρτάται από τη λειτουργικότητα και τις μεταβολικές του ανάγκες και διαταράσσεται σε σημαντικό βαθμό όταν υπάρχουν παθολογικές καταστάσεις [63]. Παράδειγμα αποτελεί η υποξική περιοχή των καρκινικών όγκων που αναφέρθηκε παραπάνω.

Στην καταστροφή του όγκου-στόχου κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία συνεισφέρουν δύο κυτταροτοξικοί μηχανισμοί: η παραγωγή μονήρους οξυγόνου (1O_2) και η παραγωγή ελευθέρων ριζών (όπως ανιόντα υπεροξειδίου, υδροξυλικές ρίζες και υπεροξειδίου του υδρογόνου) [50]. Τόσο το μονήρες οξυγόνο, όσο και οι ελεύθερες ρίζες (άτομα ή μόρια ηλεκτρικά ουδέτερα, με ίσους αριθμούς πρωτονίων και ηλεκτρονίων αλλά με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο εξωτερικής στιβάδας) είναι χημικώς εξαιρετικά δραστικά. Το μονήρες οξυγόνο,

που είναι και το κύριο παράγωγο που ενδιαφέρει στη φωτοδυναμική θεραπεία, αντιδρά άμεσα με τα ηλεκτρόφιλα βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες, τα ακόρεστα λιπίδια, τα νουκλεϊκά οξέα κ.ά. [64].

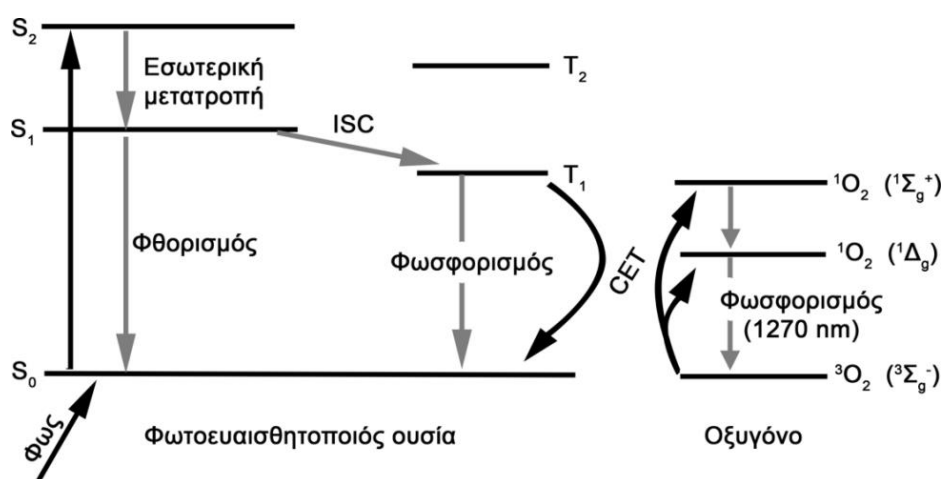
Η χρήση ακτινοβολίας laser είναι καθοριστικής σημασίας καθώς, λόγω της μονοχρωματικότητάς της, μπορεί να διεγείρει αποδοτικά τα μόρια της φωτοευαισθητοποιού ουσίας (συμπίπτοντας με το φάσμα απορρόφησής τους). Η αποδιέγερσή τους παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια σε οργανικά μόρια και σε μόρια οξυγόνου για την εκκίνηση κυτταροτοξικών φαινομένων, που οδηγούν σε νέκρωση ή απόπτωση των παθολογικών κυττάρων καθώς και σε καταστροφή της μικροκυκλοφορίας στη νεοαγγείωση του όγκου [65]. Στην **εικόνα 6** αποδίδεται σχηματικά ο μηχανισμός της φωτοδυναμικής δράσης με τη βοήθεια του διαγράμματος Jablonski. Συγκεκριμένα, κατά την ακτινοβολήση του όγκου-στόχου, η ενέργεια της απορροφούμενης ακτινοβολίας διεγείρει τα μόρια της φωτοευαισθητοποιού ουσίας, από τη βασική ενεργειακή τους στάθμη (S_0) σε κάποια διεγερμένη, ανάλογα με το προσπίπτον μήκος κύματος. Αφού τα μόρια μεταπέσουν με διαδικασίες εσωτερικής μετατροπής στη στάθμη S_1 , μπορούν πλέον να επανέλθουν στη στάθμη S_0 , με μη-ακτινοβολητικές διαδικασίες ή εκπέμποντας ακτινοβολία φθορισμού¹, χαρακτηριστική για τον κάθε φωτοευαισθητοποιό παράγοντα. Μάλιστα, με χρήση κατάλληλων ανιχνευτών (π.χ. διατάξεων CCD πυριτίου) και φασματοσκοπικών μεθόδων, γνωρίζοντας το μήκος κύματος φθορισμού της φωτοευαισθητοποιού ουσίας που έχει χρησιμοποιηθεί, δύναται να εντοπιστεί έμμεσα και η καρκινική περιοχή. Εναλλακτικά (βλ. **εικόνα 6**), μεταβαίνουν σε μία μετασταθή κατάσταση με διασυστηματική μετάβαση (intersystem crossing), την τριπλέτα T_1 η οποία έχει και μεγαλύτερο χρόνο ζωής. Από εκεί μπορούν να αποδιεγερθούν στη στάθμη S_0 , με την περίσσεια ενέργειας να εκπέμπεται ως ακτινοβολία φωσφορισμού, είτε να μεταφέρεται σε γειτονικά μόρια δημιουργώντας ρίζες και ιόντα που με τη σειρά τους αντιδρούν με μόρια οξυγόνου (μηχανισμός Τύπου I). Στην περίπτωση όμως που η τριπλέτα είναι κατελιημμένη, μπορούν να διεγείρουν

¹ Τα περισσότερα μόρια που έχουν ζυγό αριθμό ηλεκτρονίων, διατεταγμένων κατά ζεύγη αντιπαράλληλων spin, δίνουν συνήθως διεγέρσεις σε απλές καταστάσεις, χωρίς τα ηλεκτρόνια να μεταβάλλουν το spin τους. Υπάρχει όμως και η σπάνια περίπτωση της διέγερσης από τη βασική S_0 στην τριπλά διεγερμένη T_1 κατάσταση, όπου το spin γίνεται παράλληλο. Από την πρώτη διαδικασία προκύπτει εκπομπή βραχύβιων φωτονίων (της τάξης των ns) που ονομάζονται φωτόνια φθορισμού, ενώ από τη δεύτερη εκπομπή μακροβιότερων (της τάξης των μs) και μεγαλύτερου μήκους κύματος φωτονίων που ονομάζονται φωτόνια φωσφορισμού.

απευθείας γειτονικά μόρια οξυγόνου μέσω φαινομένων συντονισμού (μηχανισμός Τύπου II). Το κύριο αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας είναι η παραγωγή δραστικών μορίων οξυγόνου (reactive oxygen species – ROS). Το βασικό είδος ROS (καθότι παράγεται και υπεροξείδιο του οξυγόνου O_2^-) είναι μόρια οξυγόνου που βρίσκονται στη χαμηλότερη διεγερμένη ηλεκτρονιακή τους στάθμη, δηλαδή μονήρες οξυγόνο (1O_2). Αυτά αποδιεγείρονται εκπέμποντας χαρακτηριστική ακτινοβολία με μήκος κύματος $\lambda = 1270$ nm, η οποία είναι ανιχνεύσιμη για χρόνο που εξαρτάται από το υλικό του μέσου [34,64–66]. Η παραπάνω διαδικασία έχει μεγάλη πιθανότητα να συμβεί, καθότι είναι επιτρεπόμενη από άποψη διατήρησης της ιδιοστροφορμής (spin allowed) αλλά και επειδή τα ενεργειακά επίπεδα T_1 και 1O_2 είναι συγκρίσιμα [67].

Σε αυτό το σημείο αξίζει να τονιστεί πως το μόριο του οξυγόνου αποτελεί μία εξαίρεση στον κανόνα πως η χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη ενός μορίου είναι μονήρης (singlet state), καθώς στην περίπτωση του είναι κατάσταση τριπλέτας (triplet ground state). Κατά τη διεγερσή του από τη βασική κατάσταση (3O_2) μπορεί να μεταβεί είτε στη μονήρη (1O_2) κατάσταση ($^1\Sigma_g^+$), είτε στην ενεργειακά χαμηλότερη ($^1\Delta_g$). Αν και οι δύο καταστάσεις είναι εφικτές, στο ~90% των περιπτώσεων η ($^1\Sigma_g^+$) είναι η επικρατούσα [67]. Παρόλα αυτά, καθώς ο χρόνος ζωής της είναι της τάξης των ps και επειδή αποδιεγείρεται με σχεδόν 100% αποδοτικότητα στην κατάσταση ($^1\Delta_g$), μπορεί να θεωρηθεί πως η φωτοδυναμική δράση προέρχεται πρακτικά από μονήρες οξυγόνο σε στάθμη ($^1\Delta_g$).

Αντικείμενο έρευνας αποτελεί και ο χρόνος ζωής του μονήρους οξυγόνου. Αν και παλαιότερες μελέτες τον κατέτασσαν στην κλίμακα των δεκάδων ή λίγων εκατοντάδων ns [68–70], νεότερες μελέτες όπως αυτές των Hatz *et al.* αναφέρουν χρόνους ζωής της τάξης των ~3 μs (για ενυδατωμένα και μεταβολικά ενεργά κύτταρα) [71,72]. Αναφορικά με την ενδοκυτταρική ακτίνα δράσης του, αυτή υπολογίζεται σε περίπου 100 nm, με τον ενδοκυτταρικό συντελεστή διάχυσης να είναι της τάξης των $2 - 4 \cdot 10^{-6}$ cm²/s [72], γεγονός που καθιστά την φωτοδυναμική ως μία, δυνητικά, άκρως στοχευμένη θεραπεία. Τέλος, πρέπει να τονιστεί ότι όταν διενεργούνται *in vitro* πειράματα θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η συγκέντρωση του περιβάλλοντος σε οξυγόνο (που είναι της τάξης του 19,95%), καθώς είναι πολύ πιθανό να υπάρχει υπερεκτίμηση των επιπέδων του σε σχέση με αυτά που πραγματικά υπάρχουν στο κυτταρικό περιβάλλον [63].



Εικόνα 6. Διάγραμμα Jablonski της παραγωγής του μονήρους οξυγόνου, όπου φαίνεται η διασυστηματική μετάβαση (intersystem crossing - ISC) και η μεταφορά ενέργειας μέσω φαινομένων συντονισμού (collisional energy transfer - CET).

2.7 Διαδικασίες κυτταρικού θανάτου στη ΘΔΦ

Η καταστροφή των καρκινικών όγκων στη φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να συμβεί μέσω τριών διαδικασιών: της απευθείας καταστροφής των καρκινικών κυττάρων (direct cell damage), της καταστροφής του αγγειακού τους δικτύου (vascular shutdown) και της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού (activation of immune response) [73]. Κάθε μία από τις παραπάνω μπορεί να οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς, όπως η νέκρωση (necrosis), η απόπτωση (apoptosis) και η αυτοφαγία (autophagy) [73,74], οι οποίοι συνοψίζονται στον **πίνακα 1**. Το ποια από τις παραπάνω διαδικασίες και με ποιον τρόπο θα προκαλέσει τον κυτταρικό θάνατο δεν μπορεί να καθοριστεί με σαφήνεια καθώς εξαρτάται από πληθώρα παραμέτρων όπως, το είδος της φωτοευαισθητοποιού ουσίας, την περιοχή συγκέντρωσής της, τον τύπο των καρκινικών κυττάρων, τον ρυθμό ροής ακτινοβολίας και τη διάρκεια εφαρμογής της θεραπείας [73–78]. Ένα ενδιαφέρον παράδειγμα προκύπτει από τη μελέτη των *Amo et al.* [79], αναφορικά με τη συγκέντρωση του αμινολεβουλινικού οξέος (aminolevulinic acid – ALA), το οποίο είναι μία από τις πιο διαδεδομένες φωτοευαισθητοποιές ουσίες. Πιο συγκεκριμένα, όταν τα παράγωγά του συγκεντρώνονται κυρίως στα μιτοχόνδρια επάγονται αποπτωτικές διαδικασίες, ενώ όταν διαχέονται σε άλλα κυτταρικά οργανίδια, όπως το κυτταρόπλασμα, νεκρωτικές.

Όσον αφορά λεπτομέρειες για την κάθε διαδικασία, ο αναγνώστης παραπέμπεται σε εξειδικευμένα άρθρα κυτταρικής βιολογίας [80–86]. Για λόγους όμως αρτιότητας και πληρότητας της παρούσας διατριβής ακολουθεί μία σύντομη περιγραφή του κάθε μηχανισμού, με βάση τις παραπάνω αναφορές.

Η απόπτωση αποτελεί έναν πολύ σύνθετο και πολυδιάστατο μηχανισμό προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, που συμβαίνει και υπό φυσιολογικές συνθήκες σε κάθε κύτταρο. Μπορεί να πυροδοτηθεί είτε μέσω της ενεργοποίησης συγκεκριμένων πρωτεϊνών - υποδοχέων θανάτου (death receptors) είτε μέσω της μιτοχονδρικής απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c (cytochrome c). Και οι δύο διαδικασίες τελικώς ενεργοποιούν κασπάσες (όπως οι -3, -6 και -7), δηλαδή πρωτεΐνες που παίζουν κεντρικό ρόλο στη μεταβίβαση των αποπτωτικών σημάτων, οδηγώντας στην αποδόμηση του κυττάρου. Μάλιστα, η αντίσταση στις αποπτωτικές διαδικασίες είναι ένας γνωστός παράγοντας ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων.

Πίνακας 1. Διαδικασίες και μηχανισμοί θανάτου στη ΦΔΘ.

Διαδικασία	Οργανίδιο	Μηχανισμός
Απευθείας καταστροφή κυττάρων	Μιτοχόνδρια	Απόπτωση
	Κυτταρόπλασμα	Αυτοφαγία
	Ενδοπλασματικό δίκτυο	Νέκρωση
Καταστροφή αγγειακού δικτύου	Κυτταρική μεμβράνη	Απόπτωση
	-	Νέκρωση
	-	Αυτοφαγία
Ενεργοποίηση ανοσοποιητικού συστήματος	T - λεμφοκύτταρα	Απόπτωση

Πηγή: αναφορά [73].

Η νέκρωση αποτελεί μία διαδικασία μη-προγραμματισμένου και μη-ελεγχόμενου κυτταρικού θανάτου, η οποία συνήθως δε συνδέεται με την ενεργοποίηση κασπασών (π.χ. μία εξαίρεση είναι η πυρόπτωση). Κύριο χαρακτηριστικό της είναι η διόγκωση κυτταρικών οργανιδίων και η απώλεια ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Μπορεί δε να διακριθεί σχετικά εύκολα από την απόπτωση, με βάση μορφολογικά κριτήρια, μέσω τεχνικών μικροσκοπίου ή κυτταρομετρίας ροής [87].

Εκτός από τους παραπάνω μηχανισμούς, πρόσφατες μελέτες αναφέρουν πως μπορεί να υπάρξει ένας ακόμη, ο οποίος έχει χαρακτηριστικά τόσο της νέκρωσης όσο και της απόπτωσης και ονομάζεται προγραμματισμένη νέκρωση (regulated necrosis) [74]. Μπορεί να ενεργοποιηθεί από διάφορα ερεθίσματα μέσω των αντίστοιχων διαδικασιών, όπως η νεκρόπτωση, ο παρθάνατος, η φερρόπτωση, η πυρόπτωση κ.ά. Ειδικά για την περίπτωση της φωτοδυναμικής θεραπείας, ο παρθάνατος διαδραματίζει τον σημαντικότερο ρόλο, καθώς πυροδοτείται μεταξύ άλλων από βλάβες στο μόριο του DNA, προερχόμενες από κυτταροτοξικά προϊόντα, όπως αυτά που παράγονται από τη φωτοδυναμική δράση [88,89].

2.8 Ενίσχυση του θεραπευτικού αποτελέσματος στη ΦΔΘ

Παρόλα τα πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας, οι αδυναμίες της που πηγάζουν από την ίδια τη φύση της μεθόδου επηρεάζουν το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Προκειμένου να ενισχυθεί το τελευταίο, η τάση στις πρόσφατες μελέτες είναι να συνδυάζουν δύο ή και περισσότερες μεθόδους σε ένα ευρύτερο θεραπευτικό σχήμα, με τη χρήση νανοσωματιδίων για την επίτευξη υπερθερμίας να είναι μία από αυτές [23,90–92]. Τα δύο σημαντικότερα εμπόδια κατά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι το περιορισμένο βάθος διείσδυσης της δέσμης φωτός και η υποξία. Η χρήση νανοσωματιδίων που απορροφούν στο υπέρυθρο τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος για την τοπική αύξηση της θερμοκρασίας, όπως επίσης και για τη στοχευμένη και αποδοτικότερη μεταφορά της φωτοευαισθητοποιού ουσίας στον καρκινικό όγκο, αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη λύση στο παραπάνω πρόβλημα, όπως φαίνεται και στο επόμενο κεφάλαιο.

ΦΩΤΟΘΕΡΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

3.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Ως φωτοθερμική θεραπεία μπορεί να οριστεί η θεραπευτική προσέγγιση που βασίζεται στην απορρόφηση ενέργειας ακτινοβολίας από έναν καρκινικό ιστό, με αποτέλεσμα την άνοδο της θερμοκρασίας του, την επαγωγή αποπτωτικών ή νεκρωτικών διαδικασιών και, ως φυσικό επακόλουθο, την καταστροφή του [93,94]. Ο κλινικός όρος που αφορά τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων με τον παραπάνω τρόπο είναι αυτός της «υπερθερμίας». Αν και σπάνια χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία, η υπερθερμία έχει συμπεριληφθεί από το 2013 στις οδηγίες του National Comprehensive Cancer Network (NCCN) ως επιλογή για την αντιμετώπιση της επανεμφάνισης καρκίνου του μαστού [23]. Η αντιμετώπιση καρκινικών αλλοιώσεων με τον παραπάνω τρόπο δεν αποτελεί επίτευγμα των τελευταίων δεκαετιών. Μάλιστα, υπάρχουν αναφορές από το 1700 π.Χ. αναφορικά με τη χρήση θερμότητας για την αντιμετώπιση καρκίνου του μαστού [95], ενώ και ο Ιπποκράτης αναγνώριζε τη θεραπευτική δύναμη της θερμότητας (*«ουκ ιήται, πυρ ιήται· όσα δε πυρ ουκ ιήται ταύτα κρη νομίζειω ανίητα»*). Το γεγονός που έδωσε νέα ώθηση στη χρήση της υπερθερμίας, ιδιαίτερα στην ακτινοθεραπεία, είναι η δυνατότητα χρήσης μονοχρωματικής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Οι συμβατικές πηγές θερμότητας που έχουν χρησιμοποιηθεί στην υπερθερμία περιλαμβάνουν ραδιοκύματα, μικροκύματα, υπερήκους καθώς και δέσμες στο ορατό και υπέρυθρο φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας [93,96]. Εγγενές εμπόδιο στην εφαρμογή της αποτελούν οι σχετικά χαμηλές τιμές απορρόφησης ενέργειας από τους ιστούς και κυρίως η αδυναμία πλήρως εντοπισμένης δράσης [96]. Για την ενίσχυση της φωτοαπορρόφησης έχουν χρησιμοποιηθεί συνθετικές οργανικές ενώσεις χρωστικών, όπως για παράδειγμα το πράσινο της ινδοκυανίνης, πορφυρίνες κ.ά., οι οποίες όμως δεν καθιερώθηκαν σε κλινικό επίπεδο λόγω της ταχείας φωτολευκανσής τους [93].

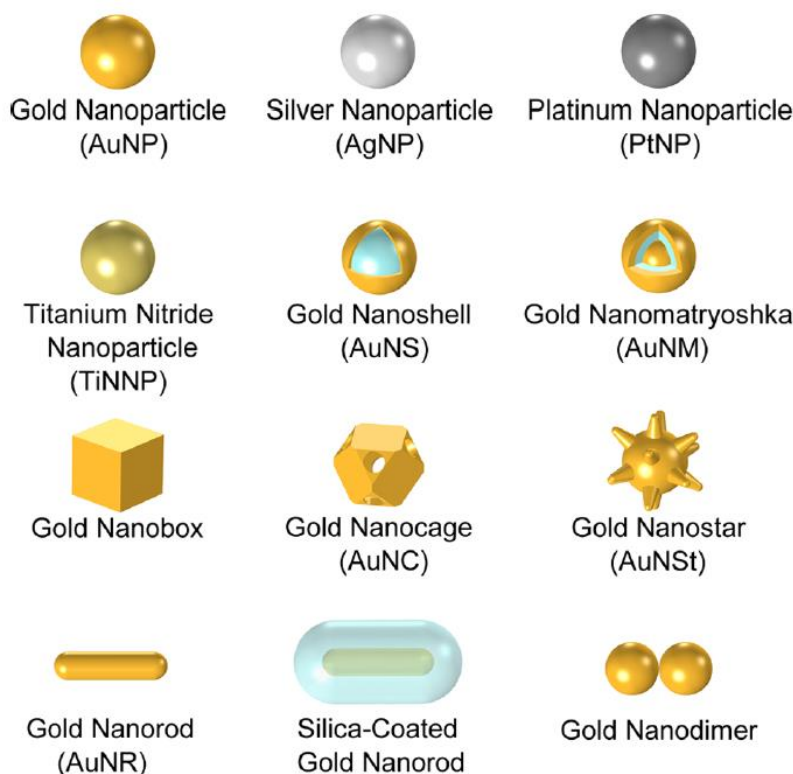
Το τεχνολογικό άλμα που έφερε η έλευση της νανοτεχνολογίας επηρέασε καταλυτικά και τη φωτοθερμική θεραπεία, καθώς η χρήση νανοδομών (κυρίως χρυσού) μπορεί να προκαλέσει σημαντική και κυρίως τοπική άνοδο της θερμοκρασίας, μέσω πλασματικών φαινομένων (βλ. παρακάτω) [96]. Μάλιστα, μία επιχειρούμενη σύγκριση μεταξύ των συντελεστών απορρόφησης και σκέδασης των νανοσωματιδίων (nanoparticles - NPs) και συμβατικών φωτοευαισθητοποιών χρωστικών, όπως εκείνες που προαναφέρθηκαν, καταδεικνύει τιμές που διαφέρουν τρεις με πέντε τάξεις μεγέθους [93,97]. Ως εκ τούτου, η εξέλιξη της φωτοθερμικής θεραπείας σε πλασματική φωτοθερμική θεραπεία (ΠΦΘΘ) φαντάζει αναμενόμενη, αν όχι επιβεβλημένη, με την πρώτη χρήση νανοσωματιδίων χρυσού στη φωτοθερμική θεραπεία να καταγράφεται το 2003 [98,99]. Η ίδια η φύση της ΠΦΘΘ αποτελεί και το συγκριτικό πλεονέκτημά της, καθώς επιτρέπει τη σχετικά επιλεκτική καταστροφή των καρκινικών ιστών, ενώ ταυτόχρονα οι πέριξ υγιείς ιστοί παραμένουν προστατευμένοι [23]. Στο παραπάνω συντελεί και η αγγείωση του όγκου, καθότι στους φυσιολογικούς ιστούς τα αιμοφόρα αγγεία διαστέλλονται προκειμένου να διαχυθεί η θερμότητα και να ψυχθεί ο θερμαινόμενος ιστός, ενώ στους καρκινικούς ιστούς συμβαίνει το ακριβώς αντίθετο [94]. Όσον αφορά τα μειονεκτήματα της μεθόδου, αυτά πηγάζουν κυρίως από την ίδια τη φύση του φωτός καθώς το περιορισμένο βάθος διείσδυσής του περιορίζει το βάθος θεραπείας. Όπως και στη φωτοδυναμική θεραπεία βέβαια, αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρήση οπτικών ινών και ενδοϊστικών εφαρμογών, μειώνοντας όμως έτσι τον μη-επεμβατικό χαρακτήρα της μεθόδου. Αναφορικά με τη συστημική τοξικότητα, στη βιβλιογραφία οι απόψεις διίστανται, αν και πιθανολογείται πως αυτή προκαλείται περισσότερο από την επικάλυψη που φέρουν οι νανοδομές [100], παρά από τον χρυσό (Au) από τον οποίο συνήθως κατασκευάζονται (που είναι βιοσυμβατός). Επιπροσθέτως, το μέγεθός τους φαίνεται να παίζει ρόλο καθώς από αυτό εξαρτάται εάν θα μπορούν να διέλθουν από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Έτσι, καθόσον η διάμετρος των νανοδομών που συνηθέστερα χρησιμοποιούνται στην ΠΦΘΘ είναι άνω των 20 nm, αυτά δεν διέρχονται από τον προαναφερθέντα αλλά μπορούν να συγκεντρωθούν, πέραν της καρκινικής περιοχής, στο ήπαρ και στον σπλήνα [99]. Αναφορικά με την αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με το ανοσοποιητικό σύστημα, υπάρχει πληθώρα διαδικασιών, ο σχολιασμός των οποίων είναι πέρα από τα πλαίσια της παρούσας διατριβής. Παρόλα αυτά, ο ενδιαφερόμενος αναγνώστης

παραπέμπεται στα ενδιαφέροντα άρθρα των Δημητρίου, Zolnik και Liu για περισσότερες λεπτομέρειες [101–103].

Σημείο κλειδί για την επίτευξη επιτυχούς φωτοθερμικής θεραπείας, αποτελεί ο ακριβής έλεγχος της θερμοκρασιακής μεταβολής στην καρκινική περιοχή. Μολονότι η δημιουργία εντοπισμένων βαθμίδων θερμότητας δύναται να οδηγήσει σε νεκρωτικές και αποπτωτικές διαδικασίες, μπορεί υπό προϋποθέσεις να οδηγήσει και στο ακριβώς αντίθετο αποτέλεσμα [104]. Όσον αφορά τις επιδιωκόμενες τιμές θερμοκρασίας, η βιβλιογραφική έρευνα δείχνει πως αυτές δεν μπορούν να οριστούν αυστηρά. Για παράδειγμα, οι τιμές που αναφέρονται ως επιθυμητές είναι άνω της φυσιολογικής θερμοκρασίας του ανθρώπινου σώματος, στην περιοχή των 42 με 45°C [105–107]. Από την άλλη, ειδικά για μελέτες που αναφέρονται σε μύες, υπάρχει ακόμα μεγαλύτερη απόκλιση, καθώς αναφέρουν τιμές της τάξης των 38°C [98,108], ενώ άλλες προτείνουν πως ο στόχος θα πρέπει να είναι η επίτευξη θερμοκρασιών μεταξύ 46 και 50°C, ακόμα και 63°C [108–110].

3.2 *Νανοσωματίδια*

Σε αναλογία με τη φωτοδυναμική θεραπεία, όπου καταλυτικό ρόλο παίζει η φωτοευαισθητοποιός ουσία, η ύπαρξη νανοσωματιδίων στον παθολογικό ιστό αποτελεί προϋπόθεση για την ΠΦΘΘ. Τα νανοσωματίδια, όπως αναφέρει και το όνομά τους, είναι δομές νανομετρικής κλίμακας, οι οποίες απαντώνται σε διάφορα σχήματα, μεγέθη και υλικά κατασκευής. Όσον αφορά το σχήμα τους, μπορεί να είναι νανοσφαίρες (nanospheres), νανοκύβοι (nanocubes), νανοδίσκοι (nanodisks), νανοράβδοι (nanorods), νανοκελύφη (nanoshells), νανοκλωβοί (nanocages), νανοαστέρια (nanostars), νανοσωλήνες (nanotubes) κ.ά. (βλ. **εικόνα 7**). Προκειμένου να αναπτυχθούν πλασματικά φαινόμενα, η επιφάνειά τους θα πρέπει να είναι μεταλλική και κατά προτίμηση χρυσή (λόγω της μεγάλης αποδοτικότητας και βιοσυμβατότητας του χρυσού). Για να δοθεί μία αίσθηση του είδους που συνήθως χρησιμοποιείται στην ΠΦΘΘ, αναφέρεται πως αυτά είναι νανοκελύφη χρυσού με πυρήνα πυριτίας, συνολικής διαμέτρου περί τα 100 nm και με πάχος κελύφους της τάξης των 15 nm [94].



Εικόνα 7. Διάφοροι τύποι νανοδομών. *Reprinted (adapted) with permission from “Jauffred L., Akbar Samadi A., Henrik Klingberg H., et al, Plasmonic Heating of Nanostructures, Chemical Reviews, 2019; 119(13): 8087-8130”. Copyright © 2019, American Chemical Society.*

Αναφορικά με το μήκος κύματος που προτιμάται για την ακτινοβόλησή τους, αυτό καθορίζεται από πληθώρα παραγόντων (βλ. παρακάτω). Σε κάθε περίπτωση όμως, θα πρέπει να είναι στην περιοχή του θεραπευτικού οπτικού παραθύρου των ιστών, δηλαδή στο ερυθρό – κοντινό υπέρυθρο. Σε αυτή την περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, οι μαλακοί ιστοί και κυρίως το αίμα παρουσιάζουν ελάχιστη απορρόφηση και άρα η δέσμη φωτός έχει μέγιστη διεισδυτικότητα [111].

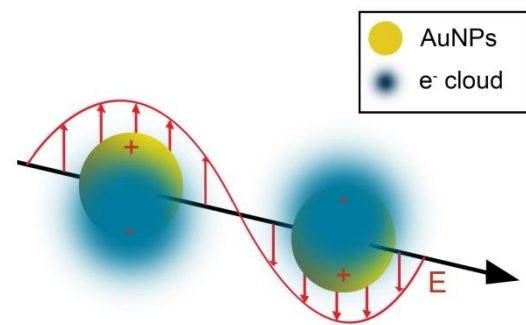
3.3 Πλασμονικά φαινόμενα

Όπως προαναφέρθηκε, ένας πολύ αποτελεσματικός τρόπος για να αυξηθεί τοπικά η θερμοκρασία μίας ακτινοβολούμενης περιοχής είναι η προσθήκη νανοδομών. Όταν μια δέσμη φωτός προσπέσει σε ένα μεταλλικό νανοσωματίδιο, ένα μέρος των φωτονίων της θα απορροφηθεί από αυτό και ένα άλλο θα σκεδαστεί. Και τα δύο φαινόμενα μαζί αποτελούν τον λόγο απώλειας ενέργειας

της δέσμης κατά την αλληλεπίδραση. Η συνεισφορά των δύο διαδικασιών μπορεί να υπολογιστεί με βάση τη θεωρία της σκέδασης Mie [112], αν και για να δοθεί μία περιληπτική περιγραφή, αναφέρεται πως για μικρά σωματίδια επικρατεί το φαινόμενο της απορρόφησης, ενώ με αύξηση του μεγέθους τους αυξάνεται η συνεισφορά της σκέδασης [113].

Εφόσον τα νανοσωματίδια είναι μεταλλικά, μικρού μεγέθους και το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός κατάλληλο, λαμβάνουν χώρα πλάσμασικά φαινόμενα και, πιο συγκεκριμένα, δημιουργούνται εντοπισμένα επιφανειακά πλάσμωνα συντονισμού (localized surface plasmon resonance - LSPR) [114].

Το παραπάνω προκαλείται από την έντονη απορρόφηση του προσπίπτοντος φωτός από τα ηλεκτρόνια σθένους του μετάλλου, γεγονός που οδηγεί στη σύμφωνη ταλάντωσή τους γύρω από τη μεταλλική επιφάνεια [23]. Το μήκος κύματος που συμβαίνει ο εντοπισμένος πλάσμασικός συντονισμός καθώς και το εύρος αυτού (bandwidth), σχετίζεται με το πραγματικό και το φανταστικό μέρος της διηλεκτρικής σταθεράς του μετάλλου, αντίστοιχα. Το φαινόμενο πρακτικά εξαρτάται από παράγοντες που επηρεάζουν την επιφανειακή πυκνότητα ηλεκτρονίων, όπως για παράδειγμα το σχήμα του νανοσωματιδίου, το μέγεθός του και η διηλεκτρική σταθερά του μετάλλου και του περιβάλλοντος μέσου [93,115]. Έτσι, οι νανοσφαίρες χρυσού, ασημιού και χαλκού εμφανίζουν LSPR στο ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, ενώ τα νανοκελύφη παρουσιάζουν μετατόπιση προς το ερυθρό (red shift).



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση της ταλάντωσης του ηλεκτρονιακού νέφους, λόγω συντονισμού με την ηλεκτρική συνιστώσα του προσπίπτοντος κύματος. *Reprinted with permission from “Kareliotis G., Tremi I., et al., Combined radiation strategies for novel and enhanced cancer treatment, Int. J. Radiat. Biol, 2020; 96(9): 1087-1103”.* Copyright © 2020, Taylor & Francis.

3.4 Διαδικασίες κυτταρικού θανάτου στην ΠΦΘΘ

Κατά την ακτινοβόληση ενός ιστού που περιέχει νανοδομές, με κατάλληλο μήκος κύματος για την επίτευξη υπερθερμίας, βιβλιογραφικά αναφέρονται

κυρίως δύο πιθανές οδοί κυτταρικού θανάτου σε μελέτες με ζώα (οι οποίες συνυπάρχουν σε διαφορετικά ποσοστά [116]). Η θέρμανση σε τιμές περί των 44°C για κάποια λεπτά της ώρας (η βιβλιογραφία ποικίλει σημαντικά ως προς αυτό [104,116,117]) προκαλεί αποπτωτικές διαδικασίες, ενώ σε περίπτωση που ξεπεραστούν οι 46°C θεωρείται πως επέρχεται νεκρόπτωση [118] ή νέκρωση [99]. Κάποιες ερευνητικές ομάδες [99,119] αναφέρουν πως ο πρώτος μηχανισμός υπερθερμίας μπορεί να θεωρηθεί προτιμητέος, καθόσον η απόπτωση δεν προκαλεί φλεγμονή της περιοχής, αν και θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ο παρατεταμένος χρόνος θεραπείας που επιτρέπει μεγαλύτερη θερμική διάχυση στους γύρω ιστούς. Επιπροσθέτως, ορισμένες πρωτεΐνες μπορούν να καταστούν ανενεργές λόγω της αποπτωτικής διαδικασίας, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αντοχής του όγκου στη θεραπεία [120]. Στον αντίποδα, υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν τη νέκρωση ως καλύτερη επιλογή, ιδίως στην περίπτωση συμπαγών καρκίνων [120], καθότι δεν υφίσταται ο ανωτέρω κίνδυνος ενώ επίσης αναμένεται ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, λόγω της προκαλούμενης φλεγμονής [96,109,120]. Σε κάθε περίπτωση, το ποιος μηχανισμός θα επικρατήσει μπορεί να οριστεί σχετικά εύκολα, με την κατάλληλη ρύθμιση της συγκέντρωσης των νανοδομών, του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας και του χρόνου ακτινοβολήσης. Σε αυτήν την κατεύθυνση υπάρχουν μελέτες οι οποίες με μαθηματικό / υπολογιστικό τρόπο προσομοιώνουν τη συνεισφορά της κάθε διαδικασίας [96,121]. Όσον αφορά τους υπολογισμούς για τα ανωτέρω φαινόμενα υπερθερμίας στην παρούσα έρευνα, αυτοί έγιναν μέσω της εξίσωσης του Arrhenius [122]:

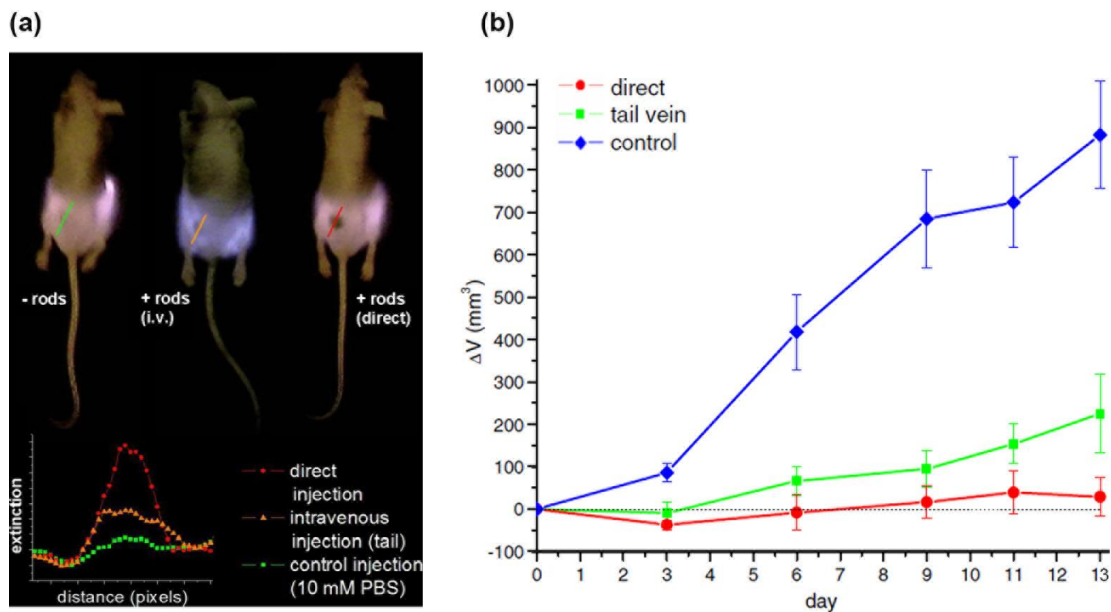
$$\frac{\partial a}{\partial t} = (1 - a)^n \cdot A \cdot \exp\left(-\frac{\Delta E}{R \cdot T}\right) \quad (1)$$

όπου, a είναι ο δείκτης βλάβης, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων (J/(K·mol)), T η θερμοκρασία του ιστού (K), A ο παράγοντας συχνότητας (s⁻¹) και ΔE η ενέργεια ενεργοποίησης αντιδράσεων για μη αναστρέψιμες βλάβες (J/mol). Αξίζει να σημειωθεί πως οι τιμές των δύο τελευταίων παραμέτρων εξαρτώνται από το είδος του υπό ακτινοβολήση ιστού. Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί η **εξίσωση (1)** πρέπει πρώτα να προσομοιωθεί η κατανομή της θερμικής ενέργειας στον ιστό, το οποίο γίνεται μέσω της εξίσωσης κατανομής της βιοθερμότητας (bioheat transfer equation) [122–124]:

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} + \nabla \mathbf{q} = \rho_b C_{p,b} \omega_b (T_b - T) + Q_{met} \quad (2)$$

όπου, ρ είναι η πυκνότητα του ιστού (kg/m^3), C_p η ειδική θερμοχωρητικότητα του ιστού υπό σταθερή πίεση ($\text{J}/(\text{kg}\cdot\text{K})$), q η ροή θερμότητας (αγωγής) (W/m^2), ρ_b η πυκνότητα του αίματος (kg/m^3), $C_{p,b}$ η ειδική θερμοχωρητικότητα του αίματος υπό σταθερή πίεση ($\text{J}/(\text{kg}\cdot\text{K})$), ω_b ο ρυθμός αιματικής διήθησης (s^{-1}), T_b η αρτηριακή θερμοκρασία του αίματος (K) και Q_{met} η μεταβολική πηγή θερμότητας (W/m^2).

Ανεξάρτητα από τον μηχανισμό που λαμβάνει χώρα, το θεραπευτικό αποτέλεσμα καθορίζεται από πληθώρα παραγόντων. Πέραν από τους προφανείς, όπως η συγκέντρωση των νανοδομών, ο ρυθμός ροής της ακτινοβολίας, η διάρκεια της θεραπείας κ.ά., σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και ο τρόπος χορήγησης των νανοσωματιδίων. Στην περίπτωση χρήσης σε πειραματόζωα, π.χ. σε μύες, αυτός μπορεί να είναι είτε μέσω της άμεσης έγχυσης τους στην περιοχή του όγκου (intratumoral injection) είτε πέριξ του όγκου (peritumoral injection) είτε ενδοφλεβίως (intravenous injection) από την ουραία φλέβα, με τον πρώτο να φαίνεται πως οδηγεί σε καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα [98,125,126] (βλ. **εικόνα 9**).



Εικόνα 9. (a) Φάσμα εκπομπής προ ΠΦΘΘ σε μύες, με άμεση έγχυση νανοράβδων (direct injection) και ενδοφλέβια έγχυση (intravenous injection), ενώ υπήρχε και ομάδα ελέγχου που δεν έλαβε νανοσωματίδια (control). (b) Μεταβολή του όγκου της καρκινικής περιοχής με την πάροδο των ημερών, σε σχέση με τους προαναφερθέντες τρόπους χορήγησης. *Reprinted from Cancer Letters, Vol 269(1), Dickerson E., Dreaden E., Huang X., et al., Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal*

therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice, Pages No. 57 - 66, Copyright © 2008, with permission from Elsevier.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως λόγω της πρόσφατης ανάπτυξης της ΠΦΘΘ, και επειδή τα δεδομένα της μεθόδου προέρχονται από μελέτες με μεγάλη διαφοροποίηση ως προς τη μεθοδολογία τους και άρα και προς τα αποτελέσματά τους [99], η δοσιμετρία της δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί προς το παρόν υπό μία ενιαία προσέγγιση. Σε κάθε περίπτωση, αν και η διαθέσιμη βιβλιογραφία είναι φτωχή σε κλινικές δοκιμές, τα πειραματικά αποτελέσματα από μελέτες είναι αρκετά ενθαρρυντικά. Κάποιες από τις παραπάνω παρουσιάζονται στον **πίνακα 2** που ακολουθεί.

Πίνακας 2. *In vivo* μελέτες συνδυασμού ΦΔΘ και ΠΦΘΘ.

Κυτταρική σειρά	Τύπος νανοδομών	Φωτοευαισθητοποιός ουσία	Παράμετροι ακτινοβολήσης	Αποτελέσματα	Ref.
B78H1	AuNPs	C11Pc-Np samples in Cremophor emulsion	600–700 nm 175 mW·cm ⁻² 15 min	Επιβράδυνση ρυθμού αύξησης όγκου: 5 ημέρες	[127]
SCC7	AuNR	Al(III) phthalocyanine chloride tetrasulfonic acid (AlPcS ₄)	ΠΦΘΘ: 810 nm, 3,82 mW·cm ⁻² , 1 min ΦΔΘ: 670 nm, 331 mW·cm ⁻² , 3 min	Μείωση ανάπτυξης όγκου: 95%	[128]
EMT6	GO/AuNS-PEG	chlorine e6 (Ce6)	660 nm 3 W·cm ⁻² 10 min	Πλήρης εξάλειψη όγκου	[129]
MDA-MB-435	AuNS-PEG	chlorine e6 (Ce6)	671 nm 1 W·cm ⁻² 6 min	Ποσοστό μείωσης όγκου: 60% (μετά 14 ημερών)	[130]
MDA-MB-435	AuNPs	chlorine e6 (Ce6)	671 nm 2 W·cm ⁻² 6 min	Ποσοστό μείωσης όγκου: 30% (μετά 14 ημερών)	[131]
MCF-7	AuNR-HA	5-aminolevulinic acid (ALA)	ΠΦΘΘ: 808 nm, 2 W·cm ⁻² , 5 min ΦΔΘ: 635 nm, 0,5 W·cm ⁻² , 5 min	Πλήρης εξάλειψη όγκου	[108]
A-431	AuNRs	chlorine e6 (Ce6)	ΠΦΘΘ: 808 nm, 1 W·cm ⁻² , 10 min ΦΔΘ: 660 nm, 0,5 W·cm ⁻² , 10 min	Πλήρης εξάλειψη όγκου	[132]
4T1	AuMSNRs	chlorine e6 (Ce6)	660 nm 1 W·cm ⁻² 5 min	Ποσοστό επιβίωσης: 70% (μετά 40 ημερών)	[133]

Συντομογραφίες: AuNPs – νανοσωματίδια χρυσού, AuNRs – νανοράβδοι χρυσού, AuNCs – νανοκλωβοί χρυσού, AuNS – νανοστέρια χρυσού, PEG – πολυαιθυλενογλυκόλη, GO – οξειδίο του γραφενίου, HA – υαλουρονικό οξύ, AuMSNRs – νανοσωματίδια χρυσού μεσοπορώδους πυριτίας

Page intentionally left blank

ΔΟΣΙΜΕΤΡΙΑ ΣΤΗ ΦΔΘ

4.1 Εισαγωγή

Σε κάθε θεραπεία για τον καρκίνο, πρωταρχικός στόχος είναι ο έλεγχος της νόσου και η καταστροφή των κακοηθών κυττάρων. Συνήθως, αύξηση της δόσης (είτε πρόκειται για φαρμακευτική ουσία είτε για ακτινοβολία) συνεπάγεται μεγιστοποίηση της αντικαρκινικής δράσης. Παρόλα ταύτα, καθώς οι καρκινικοί ιστοί γειτνιάζουν με υγιείς, υφίσταται μία λεπτή γραμμή μεταξύ της εκτεταμένης καταστροφής των μεν και της ελάχιστης των δε. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτή η ισορροπία, είναι απαραίτητη η εκ των προτέρων δοσιμετρία του θεραπευτικού σχήματος. Μάλιστα, πρόκειται ίσως περισσότερο περί ακροβασίας παρά ισορροπίας, καθότι μικρές φαινομενικά αποκλίσεις στις τιμές των μεγεθών που εφαρμόζονται μπορούν να οδηγήσουν σε μη επιθυμητά αποτελέσματα, που μπορούν ακόμα και να κοστίσουν τη ζωή του ασθενούς (π.χ. λόγω αποτυχίας ελέγχου της νόσου ή καταστροφής γειτνιαζόντων κρίσιμων οργάνων). Στα πρώτα στάδια κλινικής εφαρμογής της φωτοδυναμικής θεραπείας, οι προσπάθειες δοσιμέτρησης βασιζόνταν σε εμπειρικά πρωτόκολλα. Στηρίζονταν στη χρήση μεγεθών όπως η χορηγούμενη δόση της φωτοευαισθητοποιού ουσίας, η δόση του προσπίπτοντος φωτός και το χρονικό διάστημα που μεσολαβούσε από τη χορήγηση της ουσίας έως την ακτινοβολήση. Τα περισσότερα κλινικά πρωτόκολλα χρησιμοποιούν ακόμα και σήμερα μόνο αυτές τις τρεις παραμέτρους για τον υπολογισμό των θεραπευτικά αποτελεσματικών δόσεων, παρά το γεγονός ότι αυτές παρέχουν μόνο μερική πληροφορία για την πραγματική φωτοδυναμική δράση.

Αναλογιζόμενος κανείς τους βασικούς πυλώνες της φωτοδυναμικής δράσης, μπορεί να κατανοήσει πως η δοσιμετρία της ΦΔΘ στηρίζεται στην επιμέρους δοσιμετρία του προσπίπτοντος φωτός, της φωτοευαισθητοποιού ουσίας και του μοριακού οξυγόνου. Όσον αφορά την προσπίπτουσα δέσμη, αυτή, όπως αναφέρθηκε και στο **Κεφάλαιο 2**, μπορεί να αλληλεπιδράσει με την έμβια ύλη

με ποικίλους τρόπους. Μία από την πληθώρα παραμέτρων που πρέπει να ληφθούν υπόψη, είναι για παράδειγμα ο τύπος του δέρματος που ακτινοβολείται. Πιο συγκεκριμένα, η διάδοση της δέσμης εντός αυτού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις ανομοιογένειες που συναντά ως προς τον δείκτη διάθλασης (n), ο οποίος με τη σειρά του διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα δομικά στοιχεία (π.χ. ίνες κολλαγόνου, χρωμοφόρες πρωτεΐνες κ.ά.) [134]. Αυτή η διαφοροποίηση σχετίζεται άμεσα, όχι μόνο με την χρωματική απόχρωση του δέρματος (κλίμακα Fitzpatrick), την ύπαρξη τριχών και την πιθανή εφίδρωση αλλά και με το μήκος κύματος, την ενέργεια / ισχύ, τη διάμετρο και το προφίλ της δέσμης [134,135]. Η δοσιμετρία της φωτοευαίσθητοποιού ουσίας καθορίζεται κυρίως από τη φαρμακοκινητική της και τις φωτοχημικές της ιδιότητες, ενώ για το μοριακό οξυγόνο πρέπει να ληφθεί υπόψη η χωρική κατανομή της συγκέντρωσής του καθώς και η δυνατότητα αναπλήρωσής του. Δυστυχώς, η άναρχη ανάπτυξη της νεοαγγείωσης του όγκου δυσχεραίνει επιπλέον τη δυνατότητα θεωρητικών υπολογισμών ακριβείας, αναφορικά με την απορρόφηση του φαρμάκου αλλά και την οξυγόνωση της περιοχής. Ο πήξης της δυσκολίας για συνολική δοσιμετρία τίθεται ακόμα υψηλότερα, εάν ληφθεί υπόψη η διαφοροποίηση των καρκινικών όγκων και του αγγειακού τους δικτύου από τύπο σε τύπο καρκίνου και από ασθενή σε ασθενή αλλά, κυρίως το γεγονός πως και τα τρία βασικά μεγέθη που προαναφέρθηκαν, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και μεταβάλλονται με την πάροδο του χρόνου.

Στο καθιερωμένο σύστημα σχεδιασμού στην ακτινοθεραπεία με ιοντίζουσα ακτινοβολία, η απορροφούμενη δόση (ακτινοβολίας) δεν έχει μόνο ένα σαφή ορισμό, αλλά συσχετίζεται επίσης με την προκύπτουσα βιολογική δράση. Αντιθέτως, στη ΦΔΘ δεν υπάρχει ένας γενικά αποδεκτός ορισμός της δόσης ακτινοβολίας, ούτε προφανώς και του τρόπου υπολογισμού της. Επομένως, η κλινική εφαρμογή της μεθόδου γίνεται με βάση πρωτόκολλα, που συνήθως καθορίζονται στο φύλλο οδηγιών της φωτοευαίσθητης ουσίας που θα χρησιμοποιηθεί ή από τον κατασκευαστή της συσκευής ακτινοβολήσης. Προφανώς, ο παραπάνω τρόπος εφαρμογής απέχει αρκετά από την έννοια της δοσιμετρίας και παρασάγγας από την εξατομίκευση της μεθόδου με βάση την κλινική εικόνα του εκάστοτε ασθενούς. Στον αντίποδα, η λανθασμένη δοσιμετρία στη ΦΔΘ μπορεί να οδηγήσει σε φωτοευαίσθησία του δέρματος, με εμφάνιση παροδικού ερυθήματος ή / και οιδήματος στη θέση της ακτινοβολήσης. Επίσης μπορεί να προκληθεί αίσθηση πόνου, καύσου, νυγμών ή κνησμού ενώ σπανιότερα προκαλεί μεταφλεγμονώδη υπό- ή

υπερμελάγχρωση και αλλεργική εξ επαφής δερματίτιδα [50,136]. Σε περίπτωση ακτινοβολήσης εν τω βάθει όγκων, καθώς εφαρμόζεται ενδοϊστικά, τα παραπάνω φαινόμενα εκλείπουν, με την προσοχή να στρέφεται στην προστασία των υγιών ιστών πέριξ του όγκου.

4.2 Φυσικά μεγέθη και ορολογία

Για τη δοσιμετρία της φωτοδυναμικής θεραπείας χρησιμοποιούνται ποσότητες που σχετίζονται κυρίως με τη δέση του laser και ορίζονται σύμφωνα με τις εκθέσεις υπ' αριθμ. 57 και 88 της Αμερικάνικης Ένωσης Φυσικών Ιατρικής (American Association of Physicists in Medicine - AAPM) «Recommended Nomenclature for Physical Quantities in Medical Applications of Light» και «Photodynamic Therapy Dosimetry», του 1996 και 2005 αντίστοιχα [28,137]. Η τελευταία, είναι και η έκθεση που πρόσφατα προτάθηκε από την Ένωση Φυσικών Ιατρικής Ελλάδας (ΕΦΙΕ) ως πρωτόκολλο κλινικής δοσιμετρίας της ΦΔΘ. Μάλιστα, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής και κατόπιν σχετικής άδειας από την AAPM, η ανωτέρω μεταφράστηκε / αποδόθηκε στα ελληνικά (ενώ έγινε και ταυτόχρονη διόρθωση κάποιων αριθμητικών παροραμάτων) και βρίσκεται πλέον αναρτημένη στην ιστοσελίδα της Ομάδας Ανάπτυξης και Εφαρμογών Laser, του Τομέα Φυσικής, του ΕΜΠ (<http://www.physics.ntua.gr/~ola/pages/reports.html>). Με οδηγό τις παραπάνω εκθέσεις, ακολουθεί μία σύντομη περιγραφή των σημαντικότερων φυσικών μεγεθών, για την αρτιότερη κατανόηση της συνέχειας της παρούσας διατριβής.

- **Ενέργεια ακτινοβολίας (radiant energy - Q):** Η συνολική ενέργεια που εκπέμπεται, μεταφέρεται ή απορροφάται με τη μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Μονάδες στο S.I.: J.
- **Ισχύς ακτινοβολίας (radiant power - P):** Η ισχύς που εκπέμπεται, μεταφέρεται ή απορροφάται με τη μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Μονάδες στο S.I.: W.
- **Πυκνότητα ενέργειας (energy fluence - H_0):** Η συνολική ενέργεια από την ακτινοβολία που προσπίπτει σε μία στοιχειώδη σφαίρα (που περιέχει το

σημείο ενδιαφέροντος), προς την ενεργό διατομή της σφαίρας. Οι μονάδες στο S.I. είναι J/m^2 , αλλά στη ΦΔΘ χρησιμοποιούνται συνηθέστερα τα J/cm^2 . Η πυκνότητα ενέργειας είναι το ολοκλήρωμα στο χρόνο του ρυθμού ενεργειακής ροής.

- **Έκθεση σε ακτινοβολία (radiant exposure - H):** Η ενέργεια ακτινοβολίας που προσπίπτει στην απειροελάχιστη επιφάνεια στοιχείου (που περιέχει το σημείο ενδιαφέροντος), διαιρούμενη με το εμβαδόν του στοιχείου αυτού. Οι μονάδες στο S.I. είναι J/m^2 , αλλά στη ΦΔΘ χρησιμοποιούνται συνηθέστερα τα J/cm^2 . Η έκθεση σε ακτινοβολία είναι το ολοκλήρωμα (ως προς το χρόνο) της πυκνότητας προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο όρος «πυκνότητα ενέργειας» που έχει χρησιμοποιηθεί γι' αυτή την ποσότητα πρέπει να αποφεύγεται. Η έκθεση σε ακτινοβολία καθορίζεται στη ΦΔΘ θεωρώντας επιφανειακή ακτινοβολήση.
- **Ρυθμός ενεργειακής ροής (energy fluence rate - E_0):** Ο λόγος της συνολικής ισχύος που προσπίπτει σε μία στοιχειώδη σφαίρα (που περιέχει το σημείο ενδιαφέροντος), προς την ενεργό διατομή της σφαίρας. Μπορεί επίσης να οριστεί ως το ολοκλήρωμα της ακτινοβολήσης για στερεά γωνία 4π . Οι μονάδες στο S.I. είναι W/m^2 , αλλά στη ΦΔΘ χρησιμοποιούνται συνηθέστερα τα mW/cm^2 , λόγω του μεγέθους της προς ακτινοβολήση γεωμετρίας. Ο ρυθμός ενεργειακής ροής, ο οποίος για λόγους ευχρηστίας απαντάται και ως «ρυθμός ροής», είναι η θεμελιώδης παράμετρος στη δοσομετρία της ΦΔΘ καθώς καθορίζει το τοπικό ποσοστό αλληλεπίδρασης των φωτονίων. Μπορεί να μετρηθεί χρησιμοποιώντας εξειδικευμένο ανιχνευτή ισοτροπικής απόκρισης.
- **Πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας (irradiance - E)²:** Η ισχύς ακτινοβολίας που προσπίπτει στην απειροελάχιστη επιφάνεια στοιχείου

² Επιλέγεται ο όρος «πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας» για να αποδώσει τον όρο «irradiance», ο οποίος κατά το ΦΕΚ 145 (01/09/2010) αποδίδεται ως «ακτινοβολισμός ή πυκνότητα ισχύος». Η ευρωπαϊκή οδηγία Directive 2006/25/EC - Artificial optical radiation, στην οποία έχει βασιστεί το παραπάνω ΦΕΚ, αναφέρει τον όρο «irradiance or power density», κάτι που όμως είναι σε αντίθεση με τα πρωτόκολλα της AAPM (No. 57 και No. 88), όπως φαίνεται και στον αντίστοιχο ορισμό.

(που περιέχει το σημείο ενδιαφέροντος), διαιρούμενη με το εμβαδόν του στοιχείου αυτού. Οι μονάδες στο S.I. είναι W/m^2 , αλλά στη ΦΔΘ χρησιμοποιούνται συνηθέστερα τα mW/cm^2 . Αξίζει να σημειωθεί πως η πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας και ο ρυθμός ενεργειακής ροής έχουν τις ίδιες μονάδες (ισχύς ανά μονάδα επιφάνειας), αλλά δεν είναι η ίδια ποσότητα. Η πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας ορίζεται για μία συγκεκριμένη επιφάνεια, ενώ ο ρυθμός ενεργειακής ροής μπορεί να οριστεί και να μετρηθεί στον ελεύθερο χώρο ή στο εσωτερικό ενός αντικειμένου. Όροι όπως η πυκνότητα ισχύος, πυκνότητα ροής και ένταση, οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί για να περιγράψουν την πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας, θα πρέπει να αποφεύγονται.

Όσον αφορά την αλληλεπίδραση των φωτονίων της προσπίπτουσας δέσμης με την ύλη ορίζονται οι ποσότητες:

- **Συντελεστής απορρόφησης (absorption coefficient - μ_a):** Η πιθανότητα να απορροφηθεί ένα φωτόνιο που διανύει μία απειροελάχιστη απόσταση, προς αυτή την απόσταση. Οι μονάδες του μεγέθους στο S.I. είναι m^{-1} , αλλά στη ΦΔΘ χρησιμοποιούνται συνηθέστερα τα cm^{-1} ή ακόμα και τα mm^{-1} .
- **Συντελεστής σκέδασης (scattering coefficient - μ_s):** Η πιθανότητα να σκεδαστεί ένα φωτόνιο που διανύει μία απειροελάχιστη απόσταση. Μονάδες στο S.I.: m^{-1} .
- **Ολικός συντελεστής εξασθένησης (total attenuation coefficient - μ_t):** Το άθροισμα των συντελεστών απορρόφησης και σκέδασης. Μονάδες στο S.I.: m^{-1} . Ο παραπάνω συντελεστής συναντάται και ως συντελεστής απόσβεσης (extinction coefficient).
- **Παράμετρος ανισοτροπίας (anisotropy parameter - g):** Η μέση τιμή των συνημιτόνων των γωνιών σκέδασης. Για ιστροπική σκέδαση ισχύει πως $g = 0$. Στους περισσότερους μαλακούς ιστούς, όπου επικρατεί η σκέδαση προς τα εμπρός, ισχύει ότι $g > 0,9$.
- **Συντελεστής μεταφοράς σκέδασης (transport scattering coefficient - μ'_s):** Ο ενεργός συντελεστής ιστροπικής σκέδασης, που δίνεται ως $\mu'_s = (1 - g)\mu_s$

και που συχνά αναφέρεται και ως μειωμένος συντελεστής σκέδασης (reduced scattering coefficient).

- **Μέση ελεύθερη διαδρομή (mean free path - mfp):** Η μέση απόσταση που διανύει ένα φωτόνιο μέχρις ότου αλληλεπιδράσει με την ύλη. Ισούται με $1/\mu_t$ και οι μονάδες του στο S.I. είναι: m.
- **Ενεργός συντελεστής εξασθένισης (effective attenuation coefficient - μ_{eff}):** Σε μία πληθώρα συνθηκών ακτινοβολήσης η πυκνότητα ενέργειας μειώνεται εκθετικά με την απόσταση από την πηγή, εφόσον οι μετρήσεις γίνουν επαρκώς μακριά από αυτή και τα όρια του ιστού. Σε αυτή την περίπτωση ισχύει ότι: $H_0 \propto \exp(-\mu_{eff} \cdot r)$, όπου r η απόσταση. Οι μονάδες στο S.I. είναι τα m^{-1} , αλλά στη ΦΔΘ χρησιμοποιούνται συνηθέστερα τα cm^{-1} ή mm^{-1} .
- **Βάθος οπτικής διείσδυσης (optical penetration depth - δ):** Το αντίστροφο του μ_{eff} , που συχνά αναφέρεται και ως μήκος διάχυσης. Οι μονάδες του στο S.I. είναι: m.

Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό, η επαρκής κατανόηση των παραπάνω μεγεθών είναι απολύτως αναγκαία προκειμένου να μπορέσει να αναπτυχθεί και να εφαρμοστεί ένα πρωτόκολλο δοσιμετρίας του φωτός στη ΦΔΘ, ως ένα πρώτο βήμα προς μία συνολική δοσιμετρία της φωτοδυναμικής δράσης. Η σημασία τους καθίσταται ακόμα περισσότερο βαρύνουσα, αν αναλογιστεί κανείς πως η έκθεση Νο. 88 της AAPM, προτείνει την μέτρηση της εξόδου της φωτεινής πηγής σε εβδομαδιαία βάση και την επαναβαθμονόμησή της μετά από κάθε συνεδρία ΦΔΘ [28].

4.3 Αντιμετώπιση λεπτών επιφανειακών και εν τω βάθει όγκων

Σύμφωνα με την έκθεση Νο. 88 της AAPM, μία σημαντική διαφοροποίηση της δοσιμετρίας στη φωτοδυναμική θεραπεία είναι αυτή μεταξύ της αντιμετώπισης λεπτών επιφανειακών και εν τω βάθει όγκων. Στην πρώτη και απλούστερη περίπτωση, που ο όγκος έχει πάχος της τάξης των μm , τα περισσότερα προσπίπτοντα φωτόνια τον διαπερνούν, αλλά και αλληλεπιδρούν με αυτόν καθώς οπισθοσκεδάζονται από βαθύτερα στρώματα ιστού, με τελικό αποτέλεσμα

την ομοιόμορφη ακτινοβόλησή του. Μπορεί να οριστεί ένα κατώφλι συγκέντρωσης οξειδωτικών γεγονότων που απαιτούνται ώστε να επέλθει κυτταρικός θάνατος ως εξής:

$$R_{th} = E \cdot k_s \cdot t \cdot b \cdot \varepsilon \cdot [S] \cdot \Phi \cdot f \quad (3)$$

όπου:

R_{th} : είναι η συγκέντρωση (M) οξειδωτικών ριζών που «επιτίθενται» στην περιοχική ενδιαφέροντος,

E : είναι η πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας στην επιφάνεια του ιστού (W/cm^2) (για μονοδιάστατο μοντέλο ευρείας δέσμης),

k_s : είναι ο συντελεστής οπισθοσκέδασης λόγω ανακλάσεων από υποκείμενους ιστούς,

t : είναι ο χρόνος έκθεσης στην ακτινοβολία (s),

b : είναι ο παράγοντας μετατροπής λ/hc (photons/J) (λ : είναι το μήκος κύματος, h : είναι η σταθερά του Planck και c : είναι η ταχύτητα του φωτός),

ε : είναι ο συντελεστής απόσβεσης της φωτοευαισθητοποιού ουσίας ($cm^{-1} \cdot M^{-1}$),

$[S]$: είναι η συγκέντρωση της φωτοευαισθητοποιού ουσίας (M),

Φ : είναι η κβαντική απόδοση για τη μετατροπή της ενεργοποιημένης ουσίας σε οξειδωτικές ρίζες, η οποία συνήθως εξαρτάται από τη συγκέντρωση του διαλυμένου στα κύτταρα οξυγόνου,

f : είναι το κλάσμα των παραγόμενων οξειδωτικών ριζών, οι οποίες προσβάλλουν τον κυτταρικό χώρο ενδιαφέροντος.

Από τους παραπάνω παράγοντες, μόνο οι E , k_s , t , b και ε αφορούν τη δοσιμετρία της ακτινοβολίας (οπτική δοσιμετρία), δηλαδή τη συνολική ποσότητα ακτινοβολίας που απορροφήθηκε από τη φωτοευαισθητοποιού ουσία, που είναι και η ποσότητα που απασχολεί περισσότερο τους φυσικούς ιατρικής. Η *in vivo* δοσιμετρία είναι επίσης εφικτή, μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού και λαμβάνει υπόψη της τη συγκέντρωση της φωτοευαισθητοποιού ουσίας στον όγκο-στόχο. Ο συνδυασμός των δύο παραπάνω ποσοτήτων εισάγει την έννοια της δόσης κατωφλίου (D_{th}), πάνω από την οποία επέρχεται η πλήρης καταστροφή των κυττάρων στόχων. Η D_{th} , η οποία είναι συνάρτηση της οξυγόνωσης, δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη [28].

Σε περίπτωση όμως που ο όγκος-στόχος είναι μεγαλύτερου πάχους (συνήθως εν τω βάθει (π.χ. καρκίνος του οισοφάγου, ήπατος κτλ), το βάθος διείσδυσης της δέσμης παίζει σημαντικό ρόλο. Για τη δοσιμετρία της φωτοδυναμικής δράσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία εξίσωση παρόμοια με

αυτή του λεπτού επιφανειακού όγκου, αφού όμως πρώτα διορθωθεί για τη γεωμετρία της δέσμης (παράλληλη, σφαιρική ή κυλινδρική δέσμη), όπως φαίνεται παρακάτω.

$$R_{th} = H_0(z, r \text{ ή } \rho) \cdot t \cdot b \cdot \varepsilon \cdot [S] \cdot \Phi \cdot f,$$

$$H_0(z, r \text{ ή } \rho) = \begin{cases} E \cdot k_s \cdot e^{-z_{necrosis}/\delta} & , \text{ παράλληλη δέσμη} \\ E \cdot k_s \cdot e^{-z_{necrosis}/\delta} / r & , \text{ σφαιρική δέσμη} \\ E \cdot k_s \cdot e^{-z_{necrosis}/\delta} / \sqrt{\rho} & , \text{ κυλινδρική δέσμη} \end{cases} \quad (4)$$

όπου:

$H_0(z, r \text{ ή } \rho)$: είναι η πυκνότητα ενέργειας σε βάθος z από την ακτινοβολούμενη επιφάνεια,

δ : είναι το ενεργό βάθος διείσδυσης (όπου ο ρυθμός ροής του φωτός έχει μειωθεί στο $1/e$ ή 37% της αρχικής του τιμής),

r : είναι η ακτίνα, μετρούμενη από το κέντρο της σφαιρικής δέσμης,

ρ : είναι η ακτίνα, μετρούμενη από τον κεντρικό άξονα της κυλινδρικής δέσμης.

Όπως είναι προφανές, επιλύοντας την παραπάνω εξίσωση ως προς $z_{necrosis}$ μπορεί να υπολογιστεί το βάθος μέχρι το οποίο επιτυγχάνεται καταστροφή του ιστού.

Η ανάγκη για στοχευμένη και εξατομικευμένη δοσιμετρία γίνεται εύκολα αντιληπτή, αν αναλογιστεί κανείς το πλήθος των μεταβλητών που αγνοούνται, καθώς η ποσότητα που μετράται και ελέγχεται στην κλινική πράξη είναι το γινόμενο $E \cdot t$. Παράδειγμα αποτελεί ο συντελεστής οπισθοσκέδασης (που μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 1 και 4), η συγκέντρωση της φωτοευαισθητοποιού ουσίας (που μπορεί να διαφέρει ακόμα και κατά $\pm 50\%$ μεταξύ διαφορετικών ασθενών), η συγκέντρωση του οξυγόνου (που με τη σειρά της επηρεάζει την κβαντική απόδοση καθώς και διακυμάνσεις στην προσβολή των κυττάρων-στόχων από τις οξειδωτικές ρίζες [28]. Προκειμένου να διασφαλιστεί ότι το γινόμενο $E \cdot t$ είναι επαρκές για τον έλεγχο της νόσου και πως η θεραπεία δεν υποβαθμίζεται από όλες τις παραπάνω πιθανές διακυμάνσεις, επιλέγεται η τιμή του να μην ισούται, αλλά να υπερβαίνει τις τιμές κατωφλίου που καθορίζονται από κλινικές μελέτες [28]. Μάλιστα, αξίζει να αναφερθεί ότι το πρωτόκολλο της AAPM [28] έχει σηριχθεί στην απλουστευτική παραδοχή της ύπαρξης

σταθερής και επαρκούς οξυγόνωσης, κάτι που όμως δεν ισχύει λόγω μεταβολών στην αιμάτωση κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας και της υποξικής περιοχής του όγκου [135,138]. Ως εκ τούτου, όπως αναφέρεται ρητώς και στο ίδιο το πρωτόκολλο, κατά το σχεδιασμό ενός αξιόπιστου πρωτοκόλλου ΦΔΘ η δοσιμετρία του οξυγόνου θα πρέπει να ληφθεί υπόψη, για παράδειγμα μέσα από τη συνεχή φασματική παρακολούθηση της οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης, που όμως σε συνθήκες θεραπείας είναι αρκετά δύσκολη. Υποδοσιασμός της περιοχής ενδιαφέροντος μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα αναφορικά με την ανταπόκριση της νόσου στη θεραπεία, γεγονός που θα επηρεάσει καταλυτικά επόμενες κλινικές αποφάσεις (πέρα από το κόστος σε χρόνο και χρήματα για τον ασθενή και το νοσηλευτικό κέντρο).

4.4 Δοσιμετρικές μέθοδοι

Τρεις μεγάλες κατηγοριοποιήσεις της δοσιμετρίας είναι η ρητά εκφρασμένη (explicit), η έμμεσα υπολογιζόμενη (implicit) και η άμεση (direct) δοσιμετρία [139–142]. Η πρώτη πραγματοποιείται μετρώντας άμεσα μεγέθη σχετικά με τη ΦΔΘ, όπως τις παραμέτρους της ακτινοβολίας, του φωτοευαισθητοποιού παράγοντα και τη συγκέντρωση του οξυγόνου ή τουλάχιστον αυτές που οριοθετούν τον αποτελεσματικό έλεγχο της νόσου, με μη-επεμβατικό τρόπο. Αυτά τα μεγέθη εισάγονται σε μοντέλα που εκτιμούν την παραγωγή του μονήρους οξυγόνου. Ένα από τα σημαντικά μειονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ φωτός, φωτοευαισθητοποιού ουσίας και οξυγόνου (π.χ. η καταστροφή μορίων του φωτοευαισθητοποιητή λόγω φωτοχημικών φαινομένων) είναι ένα δυναμικό μέγεθος που μπορεί να διαφέρει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ εφαρμογών της ΦΔΘ και που δεν επιτρέπει την ακριβή και πλήρη δοσιμετρία της [139].

Στην έμμεσα υπολογιζόμενη δοσιμετρία χρησιμοποιείται η μέτρηση κάποιας αντιπροσωπευτικής παραμέτρου, ενδεικτικής της ανταπόκρισης του όγκου στη ΦΔΘ, όπως η μείωση του επαγόμενου φθορισμού της φωτοευαισθητοποιού ουσίας. Βασική διαφορά της από την ρητά εκφρασμένη είναι η εισαγωγή μεγεθών που συνεισφέρουν μη γραμμικά στην εναποτιθέμενη δόση, όπως ο κερματισμός και ο ρυθμός δόσης της ακτινοβολίας, η συγκέντρωση της φωτοευαισθητοποιού ουσίας στο αγγειακό σύστημα σε σχέση με το παρέγχυμα του όγκου, εντοπιζόμενα φαινόμενα σε κυτταρικό επίπεδο

αλλά και η συνολική ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού στις τοπικές βλάβες λόγω εφαρμογής της φωτοδυναμικής θεραπείας [143].

Ο τρίτος τρόπος δοσιμέτρησης (άμεσος) στηρίζεται στην άμεση μέτρηση του μονήρους οξυγόνου, μέσα από τη χαρακτηριστική ακτινοβολία των 1270 nm που εκπέμπει (singlet oxygen luminescence – SOL). Το πλεονέκτημά της είναι η χρήση (μέτρηση) ενός μόνο μεγέθους. Μάλιστα, έχει δειχθεί ότι το άθροισμα των φωτονίων από τον φθορισμό του μονήρους οξυγόνου (cumulative SOL photon count – cSOL) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης του θεραπευτικού αποτελέσματος τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*, καθώς ο κυτταρικός θάνατος σχετίζεται άμεσα με το cSOL [141]. Επίσης, όπως αναφέρεται σε άρθρο των Jarvi *et al.* [139], για δεδομένο τύπο κυττάρων και γεωμετρίας του μετρητικού συστήματος, υπάρχει η δυνατότητα κατασκευής της καμπύλης της σχέσης του ανιχνευόμενου μονήρους οξυγόνου και του θεραπευτικού αποτελέσματος (dose-response curve) (π.χ. του κλάσματος επιβίωσης των κυττάρων, σε σχέση με την ποσότητα cSOL ή την πυκνότητα ενέργειας), η οποία είναι μάλιστα ανεξάρτητη από τη δόση ακτινοβολίας, τη συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιού παράγοντα και της οξυγόνωσης. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι η δυσκολία μέτρησης του σήματος SOL, λόγω της μικρής πιθανότητας εκπομπής του, του μικρού χρόνου ζωής του μονήρους οξυγόνου σε βιολογικούς ιστούς, του υψηλού λόγου σήματος προς θόρυβο και της αδυναμίας χρήσης οπτικών ινών, σε συνδυασμό με τη χαμηλή κβαντική απόδοση και το υψηλό κόστος των διαθέσιμων φωτοπολλαπλασιαστών κοντινού υπερύθρου [139–141]. Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα την αξιοποίηση εναλλακτικών πηγών πληροφορίας, όπως το σήμα φθορισμού / φωσφορισμού των κυττάρων και του φωτοευαισθητοποιητή.

Σήμερα, η δοσιμετρία που γίνεται σε εργαστήρια φωτοδυναμικής θεραπείας είναι επικεντρωμένη στην ποσοτικοποίηση του προσπίπτοντος στον ιστό φωτός, της ποσότητας της φωτοευαισθητοποιού ουσίας που εναποτίθεται σε αυτόν και του χρόνου έκθεσης στην ακτινοβολία [139]. Από τα παραπάνω μπορεί να υπολογιστεί η συνολική ποσότητα της ουσίας που ενεργοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης. Με βάση αυτή ορίζεται η φωτοδυναμική δόση, ως ο αριθμός των φωτονίων που απορροφώνται από τη φωτοευαισθητοποιού ουσία ανά γραμμάριο ιστού (ph/g) [144], χωρίς όμως να λαμβάνεται υπ' όψη η κβαντική απόδοση των οξειδωτικών ριζών ή η επίδραση που έχει σε αυτές η παρουσία του οξυγόνου, αλλά ούτε και ο λόγος των ριζών που οξειδώνουν την περιοχή ενδιαφέροντος. Σημαντικό βήμα ως προς την αρτιότερη δοσιμετρία της

ΦΔΘ είναι η εισαγωγή μαθηματικών προσομοιώσεων αλλά και η πειραματική επιβεβαίωσή τους, ούτως ώστε το θεραπευτικό αποτέλεσμα να είναι προβλέψιμο με έναν επιστημονικά τεκμηριωμένο τρόπο. Μάλιστα, λόγω της πολυπλοκότητάς τους, η χρήση υπολογιστών αυξημένης ισχύος κρίνεται απαραίτητη για την ολοκλήρωση των σχετικών υπολογισμών, σε κλινικά αποδεκτούς χρόνους [142]. Παράδειγμα των ανωτέρω αποτελεί η οπτική δοσιμετρία που περιλαμβάνει τον υπολογισμό και τη μέτρηση της χωρικής / χρονικής κατανομής του φωτός, λόγω της οπτικής απορρόφησης και των ιδιοτήτων της σκέδασης (δεδομένου ότι η ανομοιογένεια των βιολογικών δομών μπορεί να προκαλέσει απλή ή πολλαπλή σκέδαση). Με αυτόν τον τρόπο δύναται να υπολογιστεί η συνολική ποσότητα της φαρμακευτικής ουσίας που ενεργοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης. Όσον αφορά τη διαφορετική πρόσληψη του φωτοευαισθητοποιητή μεταξύ διαφορετικών ασθενών (αλλά και στο εσωτερικό του ίδιου του όγκου-στόχου) η τάση των σύγχρονων μελετών είναι να επικεντρώνονται σε *in situ* μετρήσεις του επαγόμενου από τη φωτοευαισθητοποιητικό ουσία φθορισμού [143].

4.5 Μέτρηση επιπέδων οξυγόνου

Η πιθανότητα απαιτητικότερη, ως προς τη μέτρησή της, συνιστώσα της ΦΔΘ είναι η συγκέντρωση του οξυγόνου. Η συγκεκριμένη υπόκειται σε μεγάλες μεταβολές σε μικροσκοπικό επίπεδο αλλά και σε διακυμάνσεις λόγω φωτολευκανσης³, κατά τη διάρκεια της θεραπείας [145,146], σε βαθμό που είναι δύσκολο να ανακτηθούν αρκετές πληροφορίες για την επαρκή εκτίμηση του συνόλου των ετερογενειών της περιοχής ενδιαφέροντος [147]. Οι προσπάθειες για τη μέτρηση των επιπέδων του οξυγόνου επικεντρώνονται στην έμμεση μέτρησή του, όπως π.χ. μέσα από τα επίπεδα κορεσμού της οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης (sO_2), τα επίπεδα κατανάλωσης οξυγόνου σε σχέση με το μεταφερόμενο (που εκφράζεται μέσα από τη μερική του πίεση (pO_2)) και άλλων παραμέτρων της οξυγόνωσης. Η ανίχνευση υποξικών περιοχών μπορεί να γίνει με χρήση ουσιών που λειτουργούν ως υποξικοί δείκτες. Παράδειγμα αποτελούν παράγωγα των νιτροϊμιδαζολών που ενίονται στον ασθενή πριν τη χειρουργική εκτομή του όγκου [63]. Κύριο μειονέκτημα αυτής

³ Φωτολευκανση (photobleaching): Μη αναστρέψιμη απώλεια απορρόφησης και εκπομπής φωτός λόγω φωτοχημικών διεργασιών.

της μεθόδου είναι η επεμβατικότητα της, λόγω της ανάγκης διενέργειας ιστολογικής εξέτασης.

Τα τελευταία χρόνια έχουν καταβληθεί προσπάθειες για τη μέτρηση των επιπέδων του οξυγόνου στις περιοχές ενδιαφέροντος με χρήση μη επεμβατικών απεικονιστικών τεχνικών. Μετρήσεις του εκπεμπόμενου από τη φωτοευαισθητοποιού ουσία φθορισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη τοπικών μεταβολών της οξυγόνωσης, αλλά μόνο σε επιφανειακό επίπεδο ή για απεικόνιση της διάχυσής του [148,149]. Προσπάθειες δοσιμετρίας γίνονται και μέσω της ποσοτικοποίησης του φθορισμού του μονήρους οξυγόνου [65] και μάλιστα υπάρχουν προτάσεις για καθιέρωση της μεθόδου ως μεθόδου εκλογής (gold standard) [139].

4.6 Υπολογισμός επιπέδων οξυγόνου

Η αυξημένη δυσκολία της *in situ* μέτρησης των επιπέδων του κυτταροτοξικού μονήρους οξυγόνου οδήγησε στην ανάπτυξη υπολογιστικών μεθόδων προσδιορισμού του. Με μία απλή βιβλιογραφική αναζήτηση μπορεί κανείς να συναντήσει αρκετές σχετικές μελέτες [142,150–154], οι οποίες αντιμετωπίζουν τη δοσιμετρία του φαινομένου υπό διαφορετικό πρίσμα και με διαφορετική μεθοδολογία. Στις περισσότερες από αυτές, όπως και στην παρούσα διδακτορική έρευνα, ο μηχανισμός της ΦΔΘ που λαμβάνεται υπόψη είναι ο Τύπου II, δηλαδή της απευθείας αλληλεπίδρασης των μορίων της φωτοευαισθητοποιού ουσίας με τα γειτνιάζοντα μόρια οξυγόνου. Οι παράμετροι που υπεισέρχονται στους υπολογισμούς του παραπάνω φαινομένου είναι πολυάριθμοι, με τιμές συχνά μη διαθέσιμες για το είδος του υπό προσομοίωση μοντέλου [30,142]. Οι πιο σημαντικές από αυτές τις παραμέτρους παρατίθενται στον **πίνακα 3**.

Πίνακας 3. Παράμετροι που διέπουν τις φωτοχημικές εξισώσεις.

Παράμετρος ^a	Ορισμός
$k_0, k_a (s^{-1})$	Ρυθμός απορρόφησης φωτονίων από τη φωτοευαισθητοποιού ουσία σε σχέση με τη συγκέντρωση αυτής

$k_1, k_{os} (\mu M^{-1} s^{-1})$	Ρυθμός διαμοριακής αντίδρασης των δραστικών μορίων οξυγόνου και του μονήρους οξυγόνου με τη φωτοευαισθητοποιό ουσία (όταν αυτή βρίσκεται στη βασική της κατάσταση)
$k_2, k_{ot} (\mu M^{-1} s^{-1})$	Ρυθμός διαμοριακής αποδιέγερσης της φωτοευαισθητοποιού ουσίας από το μοριακό οξυγόνο (όταν αυτή βρίσκεται στην κατάσταση τριπλέτας)
$k_3, k_f (s^{-1})$	Ρυθμός αποδιέγερσης της φωτοευαισθητοποιού ουσίας από την πρώτη διεγερμένη στη βασική κατάσταση
$k_4, k_p (s^{-1})$	Ρυθμός αποδιέγερσης της φωτοευαισθητοποιού ουσίας από την κατάσταση τριπλέτας στη βασική
$k_5, k_{isc} (s^{-1})$	Ρυθμός διασυστηματικής μετάβασης της φωτοευαισθητοποιού ουσίας από την πρώτη διεγερμένη στην κατάσταση τριπλέτας
$k_6, k_d (s^{-1})$	Ρυθμός αποδιέγερσης του μονήρους οξυγόνου σε μοριακό
$k_7, k_{oa} (\mu M^{-1} s^{-1})$	Ρυθμός διαμοριακής αντίδρασης των δραστικών μορίων οξυγόνου και του μονήρους οξυγόνου (για μηχανισμό Τύπου I και II, αντίστοιχα) με το βιολογικό υπόστρωμα
$k_8, k_{ta} (\mu M^{-1} s^{-1})$	Ρυθμός διαμοριακής αντίδρασης της φωτοευαισθητοποιού ουσίας από την κατάσταση τριπλέτας με το βιολογικό υπόστρωμα (για μηχανισμό Τύπου I)
f, S_{Δ}	Κλάσμα αντιδράσεων της φωτοευαισθητοποιού ουσίας (όταν αυτή βρίσκεται στην κατάσταση τριπλέτας) για την παραγωγή μονήρους οξυγόνου
$g (\mu M s^{-1})^b$	Μέγιστος μακροσκοπικός ρυθμός παροχής οξυγόνου
$\delta (\mu M)$	Διόρθωση χαμηλής συγκέντρωσης
$\varepsilon (cm^{-1} \mu M^{-1})$	Συντελεστής απόσβεσης φωτοευαισθητοποιού ουσίας
$\eta (cm^2 mW^{-1} s^{-1} \mu M^{-1})$	Ρυθμός κατανάλωσης υποξικών αντιδράσεων

σ (μM^{-1})	Ειδικός λόγος φωτολεύκανσης
ξ ($cm^2 mW^{-1} s^{-1}$)	Ειδικός ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου
β (μM)	Συγκέντρωση κατωφλίου αποδιέγερσης οξυγόνου

^a Οι δέκα πρώτες παράμετροι παρατίθενται με τους δύο συνηθέστερους τρόπους συμβολισμού τους. Οι τέσσερις τελευταίες είναι συνάρτηση των πρώτων οκτώ ($k_0 - k_8$).

^b Στην παρούσα διατριβή αναφέρεται με τον όρο «οξυγόνωση».

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των εμπλεκόμενων παραγόντων κατά τη διάρκεια της ΦΔΘ περιγράφεται με ένα σύνολο οκτώ κύριων αλληλεπιδρώντων διαφορικών εξισώσεων (ο ενδιαφερόμενος αναγνώστης παραπέμπεται στο άρθρο των Kim *et al.* [30]). Υπό τη θεώρηση κάποιων βασικών παραδοχών, οι παραπάνω μπορούν να απλοποιηθούν στο σύστημα των διαφορικών **εξισώσεων (5 - 8)** [142], που είναι και αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή. Η πρώτη παραδοχή είναι η αγνόηση της διάχυσης του οξυγόνου στα τριχοειδή αγγεία (μακροσκοπικό μοντέλο), που συνεπάγεται και τη σταθερή συγκέντρωση του μοριακού οξυγόνου (ακόμα και αν «καταναλώνεται» για τη δημιουργία του μονήρους). Η δεύτερη αφορά τη συγκέντρωση της φωτοευαισθητοποιού ουσίας, η οποία, όπως και στην κλινική πράξη, θεωρείται πως έχει σχετικά χαμηλές τιμές. Τότε και, καθώς το μονήρες οξυγόνο διαχέεται σε απόσταση μικρότερη των 100 nm [69,70], τα μόριά του έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αλληλεπιδράσουν με το «πατρικό» μόριο της φωτοευαισθητοποιού ουσίας, παρά με κάποιο γειτονικό [142]. Λόγω του προαναφερθέντος, ο ρυθμός φωτολεύκανσής της εξαρτάται μόνο από τον ρυθμό παραγωγής του μονήρους οξυγόνου [30]. Η τρίτη προϋπόθεση είναι η χρονική διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας, η οποία θα πρέπει να είναι το λιγότερο της τάξης των δευτερολέπτων ώστε να υπερβαίνει κατά πολύ τον χρόνο των μοριακών αλληλεπιδράσεων (βλ. το διάγραμμα Jablonski της **εικόνας 6**).

$$\mu_{\alpha} E_0 - \nabla \left(\frac{1}{3\mu'_s} \nabla E_0 \right) = S_t, \quad (5)$$

$$\frac{d[S_0]}{dt} + \left(\xi \sigma \frac{E_0 ([S_0] + \delta) [^3O_2]}{[^3O_2] + \beta} \right) [S_0] = 0, \quad (6)$$

$$\frac{d[{}^3O_2]}{dt} + \left(\xi \frac{E_0[S_0]}{[{}^3O_2] + \beta} \right) [{}^3O_2] - g \left(1 - \frac{[{}^3O_2]}{[{}^3O_2]_0} \right) = 0, \quad (7)$$

$$\frac{d[{}^1O_2]_{rx}}{dt} - f \left(\xi \frac{E_0[S_0][{}^3O_2]}{[{}^3O_2] + \beta} \right) = 0. \quad (8)$$

Στις παραπάνω εξισώσεις ο όρος « S_t » είναι ο παράγοντας της πηγής (source term), ο οποίος εξαρτάται από τη γεωμετρία του προβλήματος και βιβλιογραφικά απαντάται ως « S ». Παρουσιάζεται εδώ διαφορετικά, προκειμένου να μην υπάρξει σύγχυση με τη συγκέντρωση της φωτοευαισθητοποιού ουσίας $[S]$.

Η πρώτη από τις εξισώσεις, η οποία περιγράφει τη χωρική κατανομή του ρυθμού ροής ακτινοβολίας (E_0), μπορεί να επιλυθεί ξεχωριστά από τις υπόλοιπες τρεις. Αυτές περιγράφουν τη χρονική μεταβολή της (αρχικής) συγκέντρωσης της φωτοευαισθητοποιού ουσίας $[S_0]$, του μοριακού $[{}^3O_2]$ και του μονήρους οξυγόνου που οδηγεί σε οξειδωτικές βλάβες $[{}^1O_2]_{rx}$. Επομένως, υπάρχει η δυνατότητα χρησιμοποίησης διάφορων τρόπων υπολογισμού του E_0 , όπως για παράδειγμα μέσω της θεωρίας διάχυσης ή μέσω υπολογιστικών Monte Carlo προσομοιώσεων (βλ. **Κεφάλαιο 5**) [155,156]. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν εισάγονται στο σύστημα των **εξισώσεων (6 - 8)**, η επίλυση του οποίου οδηγεί στον υπολογισμό της χωρικής κατανομής των παραπάνω βασικών φωτοδυναμικών μεγεθών [142]. Αυτή είναι και η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την υπολογιστική προσομοίωση της φωτοδυναμικής θεραπείας στην παρούσα διατριβή.

Page intentionally left blank

ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΣΤΗ ΦΔΘ

5.1 Εισαγωγή

Με μία απλή βιβλιογραφική έρευνα μπορεί κανείς να αντιληφθεί πως το μεγαλύτερο πλήθος υπολογιστικών προσομοιώσεων στη ΦΔΘ αφορά περιπτώσεις καρκίνου του δέρματος. Το δέρμα, αποτελώντας το εξωτερικό σύνορο του σώματος, είναι εκ φύσεως εκτεθειμένο σε πληθώρα παραγόντων, πολλοί από τους οποίους θεωρούνται ή και είναι αποδεδειγμένα καρκινογενείς. Σύμφωνα με τα νεότερα δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, δεκαπέντε διαφορετικοί εξωγενείς παράγοντες ενοχοποιούνται για την πρόκληση καρκίνου του δέρματος [1], ανάμεσα στους οποίους βρίσκονται οι «συνήθεις ύποπτοι» (π.χ. υπεριώδης ακτινοβολία, αλκοολούχα ποτά) αλλά και λιγότερο γνωστοί (π.χ. αζαθειοπρίνη, που χρησιμοποιείται σε σκευάσματα που χορηγούνται για ανοσοκαταστολή [157]).

Σύμφωνα με την ίδια έκθεση, ο πιο απλός και αποτελεσματικός τρόπος μείωσης της πιθανότητας εμφάνισης δερματικών καρκινικών αλλοιώσεων είναι ο περιορισμός της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία. Δεν είναι τυχαίο άλλωστε πως η εκλαϊκευμένη φράση «το μαύρισμα δεν είναι υγιές» τείνει να ακούγεται σε κάθε συνέδριο αναφορικά με την υπεριώδη ακτινοβολία και πως, σύμφωνα με μονογραφίες τις IARC, οι συσκευές μαυρίσματος κατατάσσονται στις καρκινογενείς για τους ανθρώπους συσκευές [1]. Το συγκεκριμένο φάσμα μπορεί να προκαλέσει άμεσες αλλά και έμμεσες βλάβες στην έλικα του DNA, πυροδοτώντας καρκινογενετικούς μηχανισμούς όπως μεταλλάξεις, φλεγμονές και ανοσοκαταστολή.

Οι δερματικές κακοήθειες είναι από τις συχνότερα και ολόένα και αυξανόμενα εμφανιζόμενες περιπτώσεις καρκίνου. Ταυτόχρονα όμως είναι και από εκείνες με την καλύτερη πρόγνωση. Σημαντικό ρόλο σε αυτό διαδραματίζει η σχετικά έγκαιρη διάγνωση λόγω της θέσης τους, καθώς στον αντίποδα πολλοί εσωτερικοί καρκίνοι γίνονται αντιληπτοί μόνο όταν εμφανιστούν συμπτώματα,

όπου τότε μπορεί να έχει προχωρήσει σημαντικά η σταδιοποίηση της νόσου. Οι βασικότεροι τύποι δερματικού καρκίνου είναι το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (basal cell carcinoma, BCC), το οποίο μπορεί να είναι είτε επιφανειακό (superficial) είτε οζώδες (nodular), το καρκίνωμα του πλακώδους επιθηλίου (γνωστό και ως «ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα», squamous cell carcinoma, SCC) και το κακοήθες μελάνωμα (malignant melanoma).

Η αντιμετώπιση δερματικών καρκινικών αλλοιώσεων ήταν από τις πρώτες εφαρμογές της ΦΔΘ, καθώς από το 1978 χρησιμοποιείται πειραματικώς για δερματικούς καρκίνους με laser χρωστικών [158]. Απόρροια αυτού, είναι η σχετική πληθώρα δεδομένων των παραμέτρων που αφορούν τον ιστό (μηχανικές και οπτικές ιδιότητες), τη φωτοευαισθητοποιό ουσία (οπτικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες), καθώς και τις παραμέτρους της θεραπείας (μήκος κύματος φωτεινής πηγής, ρυθμός ροής ακτινοβολίας, χρόνος έκθεσης κ.ά.). Λόγω των ανωτέρω και της σχετικά απλής, σε σύγκριση με περιπτώσεις εσωτερικών καρκίνων, γεωμετρίας, η υπολογιστική μελέτη που διεξήχθη στην παρούσα διατριβή είχε ως αφετηρία τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου.

5.2 Ανάπτυξη κώδικα

Στην έρευνα που διεξήχθη, δόθηκε ιδιαίτερο βάρος στην ανάπτυξη κώδικα που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την *in silico* προσομοίωση / μελέτη της φωτοδυναμικής θεραπείας. Ο κώδικας που αναπτύχθηκε, υπό το όνομα «PDT Simulator», οδήγησε σε δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά και συνέδρια [135,159–161] και μπορεί να χωριστεί σε τρία κύρια, αλληλεπιδρώντα μέρη. Κατά το πρώτο σκέλος κατασκευάζεται η προς μελέτη γεωμετρία. Στη συνέχεια υπολογίζεται η χωρική κατανομή των θεμελιωδών παραγόντων που λαμβάνουν μέρος στη ΦΔΘ, με χρήση των **εξιιώσεων (6 - 8)**. Τέλος, εκτιμάται η νεκρωτική περιοχή που θα προκύψει από τη φωτοδυναμική δράση. Εδώ, πρέπει να σημειωθεί πως ο όρος νέκρωση αναφέρεται στον θάνατο των καρκινικών κυττάρων, ανεξαρτήτως της οδού (π.χ. νέκρωση, απόπτωση κτλ) που θα ακολουθηθεί. Όλα τα παραπάνω αφορούν μία εγκάρσια τομή της προς μελέτη γεωμετρίας (στην παρούσα διατριβή διέρχεται από το κέντρο του όγκου) και υλοποιούνται μέσα από αρχεία τύπου .m (.m scripts) στο περιβάλλον του Matlab® (The MathWorks, Inc., Natick, MA, US).

5.2.1 Κατασκευή γεωμετρίας

Η δομή της προς ακτινοβολήση γεωμετρίας είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη χωρική κατανομή του ρυθμού ροής της διαδιδόμενης ακτινοβολίας εντός αυτής. Επομένως, στην παρούσα μελέτη, ο ορισμός της πρώτης (δηλαδή της γεωμετρίας) έγινε μέσα από τα αρχεία καθορισμού της δεύτερης. Όπως είναι γνωστό, οι Monte Carlo μοντελοποιήσεις υπολογίζουν τη διαδρομή του κάθε φωτονίου εντός ενός μέσου, λαμβάνοντας υπόψη τους την πυκνότητα πιθανότητας σκέδασής του και την αντίστοιχη γωνία. Μάλιστα, ειδικά για μικρές αποστάσεις από την πηγή ($< 17 \text{ mm}$), υπερτερούν σημαντικά από τα θεωρητικά μοντέλα διάχυσης, τα οποία οδηγούν σε υποεκτίμηση της πυκνότητας προσπίπτουσας ακτινοβολίας [57]. Έτσι, αποτελούν τη βέλτιστη επιλογή (gold standard) για την προσομοίωση της πορείας μίας δέσμης εντός ενός ιστού (ή ενός συνόλου ιστών) [57,162] και επομένως, αυτή η μέθοδος ακολουθήθηκε και στην παρούσα έρευνα. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι Monte Carlo κώδικες «MCML» (Monte Carlo for Multi-Layered media) v.1.2.2, των Lihong Wang και Steven Jacques και «mcxyz.c» των Steven Jacques, Ting Li και Scott Prah. Πρόκειται για ελεύθερους προς χρήση αλγόριθμους, που προσομοιώνουν τη διάδοση του φωτός σε ετερογενείς ιστούς, σε τρεις διαστάσεις. Είναι διαθέσιμοι από την ιστοσελίδα <https://omlc.org/index.html> του Oregon Medical Laser Center. Οι αλγόριθμοι αυτοί, οι οποίοι εκτελέστηκαν μέσω του περιβάλλοντος του Matlab, αν και προσομοιώνουν κατά βάση τα ίδια μεγέθη, έχουν δομικές διαφορές και διαφορετική μεθοδολογία κατά την εκτέλεσή τους. Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη την τροποποίησή τους για τις ανάγκες των πειραμάτων της παρούσας έρευνας, επιλέχθηκε να παρουσιαστούν ξεχωριστά, για την πληρέστερη κατανόησή τους. Τέλος, για να δοθεί μια αίσθηση της πολυπλοκότητας των μεθόδων, αναφέρεται πως μόνο το φυλλάδιο οδηγιών (manual) του κώδικα «MCML» έχει έκταση 183 σελίδων.

5.2.1.1 Monte Carlo for Multi-Layered media

Ο αλγόριθμος «MCML» προσομοιώνει τη χωρική κατανομή της πυκνότητας ισχύος μίας δέσμης που διαπερνά έναν ιστό. Ο εικονικός ιστός αποτελείται από παράλληλα επίπεδα άπειρων x - y διαστάσεων και διαφορετικών οπτικών ιδιοτήτων, κάθετα στον άξονα z ' z , που ακτινοβολούνται από δέσμη διαδιδόμενη

στον άξονα αυτό. Ο χρήστης καθορίζει το είδος του κάθε ιστού έμμεσα, μέσω του συντελεστή απορρόφησης, του συντελεστή σκέδασης, του παράγοντα ανισοτροπίας και του δείκτη διάθλασης. Επιπλέον, μπορεί να καθορίσει τη χωρική διακριτική ικανότητα της προσομοίωσης επιλέγοντας κατάλληλο μέγεθος για το κάθε στοιχείο όγκου (voxel), το πάχος του ιστού, καθώς και την ακρίβεια, μέσω του πλήθους των χρησιμοποιούμενων φωτονίων. Ακολουθεί μία σύντομη και απλουστευμένη περιγραφή των βημάτων χρήσης του:

1. Ο χρήστης κατασκευάζει τον προς ακτινοβόληση ιστό, καθορίζοντας το πάχος του κάθε «στρώματος», το μέγεθος των στοιχειωδών τμημάτων (volume pixels - voxels), τις οπτικές ιδιότητες (που αναφέρθηκαν παραπάνω) και το πλήθος των φωτονίων (οι μονάδες για όλα τα παραπάνω είναι σε cm ή παράγωγα αυτών, εκτός από τον συντελεστή ανισοτροπίας και τον δείκτη διάθλασης που είναι καθαροί αριθμοί). Τα προαναφερθέντα αποθηκεύονται σε ένα .mci (txt) αρχείο το οποίο λειτουργεί ως είσοδος για τον εκτελέσιμο κώδικα «mcm1.exe».
2. Με χρήση του κώδικα «Conv.exe», ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να μετασχηματίσει τα παραγόμενα αποτελέσματα ορίζοντας τη δέσμη φωτός ως προς το είδος της (π.χ. επίπεδη ή γκαουσιανή), την ακτίνα της και την ισχύ / ενέργειά της.

5.2.1.2 MCxyz

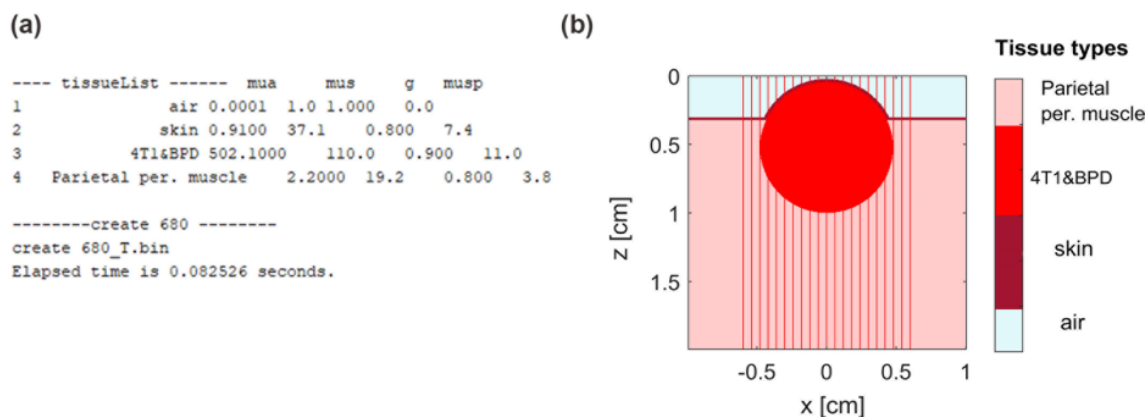
Στον κώδικα «mcxyz.c» το προς ακτινοβόληση δείγμα είναι κύβος, αποτελούμενος από voxels, με διαστάσεις που καθορίζονται από τον χρήστη. Το πλεονέκτημα του συγκεκριμένου αλγόριθμου είναι η δυνατότητα (μετά από κατάλληλη τροποποίηση) απεικόνισης οπτικών ανομοιογενειών, σε επίπεδο voxel. Έτσι, ο χρήστης μπορεί για παράδειγμα να εισάγει στιβάδες διαφορετικών ιστών καθώς και δομών (π.χ. αιμοφόρα αγγεία, όγκους κτλ) και να μελετήσει τη χωρική κατανομή της σχετικής πυκνότητας ισχύος σε όλη τη γεωμετρία. Ο κώδικας αποτελείται από πέντε υπο-αρχεία, τέσσερα τύπου .m και ένα τύπου .c. Τα πρώτα αφορούν τον καθορισμό παραμέτρων μέσω χρήσης προγραμμάτων όπως το Matlab, ενώ το .c χρησιμοποιείται μέσω οποιουδήποτε compiler. Τα βήματα που απαιτούνται για τη χρήση του είναι:

1. Στο αρχείο «MakeTissueList.m» ο χρήστης προσθέτει τα είδη των ιστών που θα χρειαστούν. Πρέπει να εισάγει τις βασικές οπτικές τους ιδιότητες,

όπως τον συντελεστή απορρόφησης, τον συντελεστή σκέδασης και τον παράγοντα ανισοτροπίας. Θα πρέπει να αντιστοιχούν στο μήκος κύματος που θα έχει η υπό προσομοίωση δέσμη και να είναι εκφρασμένα σε cm^{-1} , εκτός από το g που είναι καθαρός αριθμός. Σε περίπτωση που το πλήθος των υπό δημιουργία ιστών είναι μεγαλύτερο του 9, θα πρέπει να αλλαχθεί και ο χάρτης χρωμάτων, αφού έχει σχεδιαστεί να αναπαριστά έως 9 διαφορετικούς ιστούς. Το αρχείο αυτό δε χρειάζεται να εκτελεστεί καθώς καλείται αυτόματα από το αρχείο «MakeTissue.m» (βλ. παρακάτω). Σε περίπτωση όμως που ο χρήστης θελήσει να το εκτελέσει, θα πρέπει να ορίσει (στις πρώτες γραμμές του κώδικα) το μήκος κύματος της προσομοίωσης. Αξίζει να σημειωθεί πως αυτός ο ορισμός δεν λείπει στην πρώτη περίπτωση (της έμμεσης εκτέλεσης μέσω του «MakeTissue.m»), αλλά γίνεται αυτόματα μέσα από το τελευταίο αρχείο.

2. Στο αρχείο «MakeTissue.m» καθορίζονται οι βασικές παράμετροι του πειράματος, όπως το μήκος κύματος της δέσμης, η ακτίνα της, το είδος της (επίπεδη, γκαουσιανή, σημειακή ιστροπική κτλ), η θέση της πηγής, το μέγεθος του ιστού, η χωρική διακριτική ικανότητα (μέσω του μεγέθους και του πλήθους των voxels), το εάν η δέσμη θα διαφεύγει στα όρια του ιστού, στην άνω επιφάνεια ή εάν θα «εγκλωβίζεται» στο εσωτερικό του καθώς και η διάρκεια εκτέλεσης του κώδικα Monte Carlo (και άρα το πλήθος των φωτονίων). Κατά την εκτέλεση του συγκεκριμένου αρχείου καλείται το «MakeTissueList.m» όπου και χρησιμοποιείται η τιμή του μήκους κύματος που έχει καθορίσει ο χρήστης. Αξίζει να αναφερθεί πως ο πρωτότυπος κώδικας του «MakeTissue.m» προέβλεπε την ύπαρξη αιμοφόρου αγγείου, με προσανατολισμό παράλληλο με τον άξονα $y'y$. Το αντίστοιχο τμήμα του κώδικα τροποποιήθηκε κατάλληλα ώστε να μπορεί να προσομοιώνει καρκινικό όγκο κυλινδρικού σχήματος, με άξονα τον $z'z$, είτε σφαιρικού σχήματος, ανάλογα με τις ανάγκες της εκάστοτε προσομοίωσης. Για την απεικόνιση των νέων δομών χρειάστηκε επίσης να γραφεί νέο τμήμα κώδικα. Το αρχείο, μετά την εκτέλεσή του, επιστρέφει σε μορφή πίνακα τις οπτικές ιδιότητες του κάθε ιστού που χρησιμοποιείται στην προσομοίωση, τη διάρκειά της καθώς και την τομή της γεωμετρίας (βλ. **εικόνα 10**). Σε αυτό το σημείο χρειάστηκε επίσης να προστεθεί νέο τμήμα κώδικα, ώστε να προβάλλεται και δεύτερη εικόνα, με την τομή της

γεωμετρίας στο επίπεδο y-z (ο αρχικός κώδικας παράγει εικόνα μόνο στο επίπεδο x-z).



Εικόνα 10. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα που εξάγονται κατά την εκτέλεση του αρχείου «MakeTissue.m» για την περίπτωση ΦΔΘ 4T1 όγκου με βερτεπορφίνη (4T1 & BPD). (a) Οι οπτικές παράμετροι και η διάρκεια εκτέλεσης της προσομοίωσης και (b) η τομή του ιστού στο επίπεδο x-z (καθώς η δομή έχει σφαιρική συμμετρία, δεν παρουσιάζεται η αντίστοιχη τομή του επιπέδου y-z). Οι κάθετες γραμμές ερυθρού χρώματος αντιπροσωπεύουν την πορεία διάδοσης της δέσμης.

3. Το αρχείο «mcxyz.c» που δημιουργείται με τα παραπάνω βήματα γίνεται compile (με χρήση προγραμμάτων όπως το «Microsoft Visual Studio»), παράγοντας το αρχείο «*_F.bin» (όπου * είναι το όνομα που δίνει ο χρήστης), το οποίο και περιέχει την πληροφορία της χωρικής κατανομής του ρυθμού ροής ανά μονάδα ισχύος ($\text{mW} \cdot \text{cm}^{-2} / \text{mW delivered}$). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας του compile ο αλγόριθμος επιστρέφει ως έξοδο και τον αριθμό των φωτονίων που συμμετέχουν στη Monte Carlo προσομοίωση (π.χ. $N_{\text{photons}} = 5449090$ for simulation time = 5.00 min).

Για τη διαδικασία του compile τα βήματα είναι (για υπολογιστή με λειτουργικό σύστημα «Windows»):

- Εκκίνηση της γραμμής εντολών «Developer Command Prompt» από τη γραμμή αναζήτησης του περιβάλλοντος των Windows (εντολή «cmd»). Σημειώνεται πως το ανωτέρω διαφέρει από το «Command Prompt» που υπάρχει προεγκατεστημένο στα Windows και θα πρέπει να εγκατασταθεί ξεχωριστά.

- Μετάβαση στη θέση «directory» (εντολή «cd») που είναι αποθηκευμένα τα αρχεία, π.χ.: `cd e:\My Documents\In vivo`
 - Compile του αρχείου .c (εντολή «cl»), πχ: `cl mcxyz.c`
 - Εκτέλεση του αρχείου .exe που παράγεται από το προηγούμενο βήμα με είσοδο «input» τα αρχεία «name_H.mci» και «name_T.bin», π.χ.: `mcxyz 4T1`
4. Με χρήση του αρχείου «LookMCxyz.m» παράγονται δύο εικόνες που αναπαριστούν τη γεωμετρία του ιστού και τη δέσμη (ο χρήστης μπορεί να εισάγει όσες «συνιστώσες» της δέσμης επιθυμεί για λόγους απεικόνισης) καθώς και ο χάρτης της χωρικής κατανομής του ρυθμού ροής ακτινοβολίας, ανά μονάδα ισχύος.

5.2.2 Υπολογισμός βασικών παραμέτρων της ΦΔΘ

Για την προσομοίωση της φωτοδυναμικής δράσης αναπτύχθηκε κώδικας (PDT Simulator), ο οποίος υπολογίζει πρωταρχικά τη χωρική και χρονική κατανομή της συγκέντρωσης του μοριακού και του μονήρους οξυγόνου καθώς και της φωτοευαισθητοποιού ουσίας. Ο κώδικας αυτός, ο οποίος εκτελείται στο περιβάλλον του Matlab, στηρίζεται στην επίλυση του συστήματος των διαφορικών εξισώσεων που διέπουν τη φωτοχημική δράση της ΦΔΘ Τύπου II.

Ακολουθεί η παρουσίαση των επιμέρους αρχείων του κώδικα που αναπτύχθηκε, με γνώμονα τη σειρά που απαιτείται να εκτελεστούν από τον χρήστη. Ο πλήρης κώδικας των σημαντικότερων εξ' αυτών παρατίθεται στο παράρτημα «B' ΚΩΔΙΚΑΣ», στο τέλος της διατριβής.

Το πρώτο βήμα είναι η συμπλήρωση του αρχείου «Parameters.m», το οποίο αποτελεί τη βάση δεδομένων με τις αρχικές τιμές της ακτινοβολήσης που επιθυμεί ο χρήστης. Σε αυτό ορίζονται: ο χρόνος ακτινοβολήσης (σε s), η ισχύς της πηγής (σε mW), η ελάχιστη συγκέντρωση μονήρους οξυγόνου για να επέλθει νέκρωση ($[^1O_2]_{rx,sh}$, σε μM), η αρχική συγκέντρωση του μοριακού και του μονήρους οξυγόνου ($[^3O_2]_0$ και $[^1O_2]_{rx,0}$, αντίστοιχα, επίσης σε μM), η αρχική τιμή της οξυγόνωσης (g_0 , σε $\mu M/s$) καθώς και οι φωτοχημικές παράμετροι της φωτοευαισθητοποιού ουσίας. Στις τελευταίες συμπεριλαμβάνονται οι σταθερές: «ξ» (σε $cm^2/mW \cdot s$), «σ» (σε μM^{-1}), «δ» (σε μM), «β» (σε μM) και «f» (αδιάστατο

μέγεθος). Επίσης, ορίζεται το βήμα αύξησης του $[^3\text{O}_2]_0$ για τον κώδικα «Fixed_1O2_algorithm.m» (βλ. παρακάτω).

Επόμενο βήμα είναι η εκτέλεση του αρχείου «Spatial_distributions.m». Το συγκεκριμένο αρχείο χρησιμοποιείται για την κατασκευή των χαρτών χωρικής κατανομής της συγκέντρωσης του μοριακού και του μονήρους οξυγόνου, της φωτοευαισθητοποιού ουσίας και της νεκρωτικής περιοχής. Επίσης, αποδίδει την τιμή του μέγιστου βάθους νέκρωσης και της οριζόντιας νέκρωσης (για κυλινδρικές δομές ταυτίζεται με την ακτίνα νέκρωσης) (βλ. παρακάτω).

Να σημειωθεί πως, καθόσον οι τιμές του ρυθμού ροής που προκύπτουν από τον κώδικα «mcxyz.c» είναι σε μονάδες αντίστροφης επιφάνειας (cm^{-2}), απαιτείται η αναγωγή τους σε mW/cm^{-2} , το οποίο γίνεται πολλαπλασιάζοντας κάθε στοιχείο του πίνακα F_{zx} (ή αντίστοιχα του F_{zy}) με την τιμή της ισχύος που έχει ορίσει ο χρήστης (μέσω του αρχείου «Parameters.m»). Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως η ορθότητα της παραπάνω διαδικασίας επιβεβαιώθηκε από έναν εκ των δημιουργών του κώδικα «mcxyz.c», τον Καθ. Steven Jacques του Tufts University, μέσα από σχετική αλληλογραφία.

Στην περίπτωση που ο κώδικας προσομοιώνει θεραπεία με χρήση φωτοευαισθητοποιού ουσίας σε μορφή κρέμας ή γέλης, λαμβάνεται υπόψη και η μεταβολή στη συγκέντρωσή της με το βάθος, καθώς αυτή απορροφάται από την εξωτερική δερματική επιφάνεια. Θεωρώντας ότι το φαινόμενο ακολουθεί το νόμο της εκθετικής εξασθένησης και, για συγκεκριμένη τιμή της σταθεράς εξασθένησης (b) [150,163], υπολογίζεται η τιμή της συγκέντρωσης της ουσίας σε κάθε βάθος.

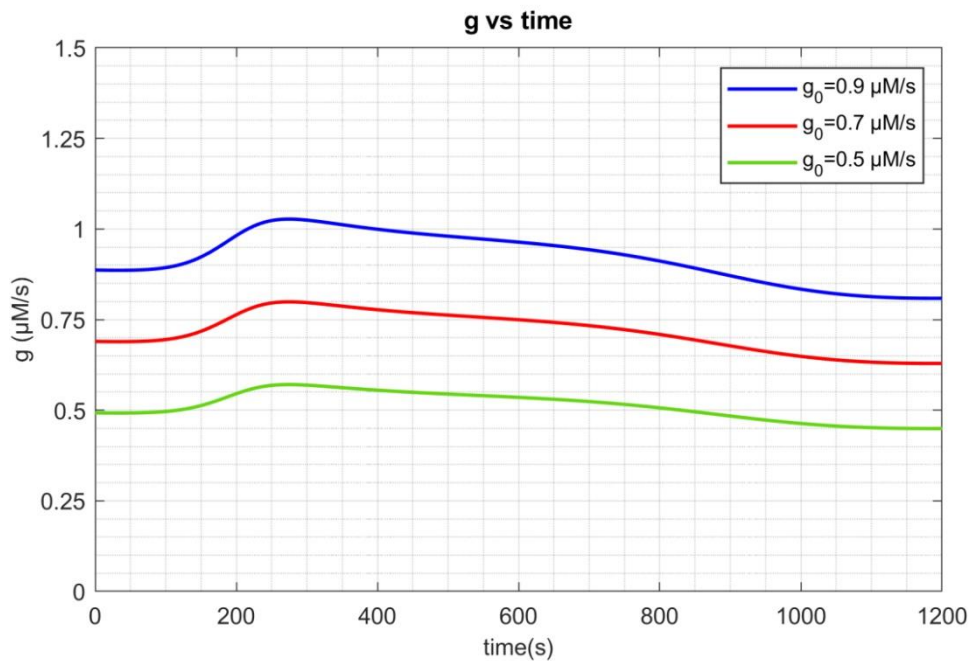
Μία ακόμη παράμετρος που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι η οξυγόνωση της καρκινικής περιοχής, η οποία διαδραματίζει καίριο ρόλο για την πρόγνωση της θεραπείας καθώς, όπως έχει τονιστεί και προηγουμένως, η επάρκεια σε μοριακό οξυγόνο είναι αναγκαία συνθήκη για τη ΦΔΘ. Εξ' όσων γνωρίζουμε, η μόνη σχέση που εμφανίζεται στη διεθνή βιβλιογραφία να περιγράφει τη μεταβολή της οξυγόνωσης συναρτήσει του χρόνου κατά τη διάρκεια της ΦΔΘ, είναι η εξίσωση που αναφέρεται σε δύο άρθρα (του 2015 και 2016) της ομάδας της R. Penjweini [138,164]. Για την εξαγωγή της χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα (best fit) από μελέτη του 2005 των Yu *et al.* [165], η οποία αναφερόταν σε C3H μύες που υποβλήθηκαν σε ΦΔΘ (με φως σε $\lambda = 630 \text{ nm}$) με την ουσία φωτοφρίνη, για την αντιμετώπιση επαγόμενου από ακτινοβολία ινοσαρκώματος. Η εν λόγω σχέση περιγράφεται από την εξίσωση που συνδέει την οξυγόνωση $g(t)$ με το χρόνο ακτινοβολήσης (t) και με την αρχική τιμή της g_0 :

$$g(t) = g_0 \frac{0,99t_n^4 + 1,09t_n^3 + 0,05t_n^2 + 0,18t_n + 0,32}{t_n^4 + 1,16t_n^3 + 0,18t_n^2 + 0,24t_n + 0,31}, \quad (9)$$

$$\text{όπου, } t_n = \frac{t - 750}{6321}.$$

Η παραπάνω σχέση οδηγεί σε χρονική διακύμανση της οξυγόνωσης της περιοχής, η οποία απεικονίζεται στην **εικόνα 11**. Όπως γίνεται αντιληπτό από το συγκεκριμένο γράφημα, στο οποίο έχουν συμπεριληφθεί για λόγους σύγκρισης τρεις συνήθεις τιμές της αρχικής τιμής της παροχής οξυγόνου (g_0), αύξηση αυτής οδηγεί σε εντονότερες διακυμάνσεις. Επιπροσθέτως, καταδεικνύεται πως κατά το χρονικό διάστημα 1 – 4 min (κατά προσέγγιση) η οξυγόνωση παρουσιάζει αυξητική τάση, για να καλύψει την κατανάλωση του μοριακού οξυγόνου λόγω της φωτοδυναμικής δράσης. Εν συνεχεία, ακολουθεί φθίνουσα πορεία μέχρι το 18^ο λεπτό, όπου πλέον σταθεροποιείται κοντά στην αρχική της τιμή. Για μεγαλύτερες τιμές χρόνου η τιμή του g αυξάνει, όμως τόσο μεγάλες χρονικές διάρκειες δεν απαντώνται σε συνεδρίες ΦΔΘ.

Παρόλα ταύτα, καθώς κατά τη χρήση της παραπάνω σχέσης υπεισέρχονται πολλές σταθερές, ο προσδιορισμός των οποίων έχει στηριχθεί σε καθαρά πειραματικά δεδομένα, προτείνεται η χρήση της μόνο για παρόμοιο τύπο καρκίνου και παραμέτρους ακτινοβόλησης.



Εικόνα 11. Χρονική μεταβολή της οξυγόνωσης (g vs time), για τρεις τυπικές αρχικές τιμές της οξυγόνωσης (g_0). Αύξηση αυτών οδηγεί σε εντονότερη διακύμανση της οξυγόνωσης.

Αξίζει να σημειωθεί πως η παραπάνω θεώρηση δεν δύναται να προσομοιώσει τη χωρική κατανομή της μεταβολής της οξυγόνωσης, λόγω της υποξικής περιοχής του καρκινικού όγκου [23]. Για το σκοπό αυτό, θεωρήθηκε πως η οξυγόνωση στο κέντρο του όγκου ήταν πρακτικά μηδενική, μέσω του αντίστοιχου μηδενισμού της. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε, μετά από διαδοχικές δοκιμές, ήταν η:

$$g(x, z) = g_0 + \left(\frac{-0,8}{\sqrt{\pi/2}} \right) \cdot \exp \left(-5 \cdot \left(\frac{r}{0,2} \right)^2 \right) \quad (10)$$

όπου, $g(x, z)$ η οξυγόνωση στην τυχαία θέση (x, z) , g_0 η αντίστοιχη τιμή στην κανονικά οξυγονούμενη περιφέρεια του όγκου και r η ακτινική απόσταση από το κέντρο του όγκου. Προφανώς, αν και η **σχέση (9)** όσο και η **(10)** εμπεριέχουν αρκετές παραδοχές (π.χ. οι τιμές των σταθερών στη **σχέση (10)** έχουν βελτιστοποιηθεί για $g_0 = 0,7 \mu\text{M/s}$), η ταυτόχρονη χρήση τους δεν είναι εφικτή για προγραμματιστικούς λόγους. Παρόλα ταύτα, η ύπαρξη υποξικής περιοχής στον όγκο θεωρείται ιδιαίτερης σημασίας και επομένως, η αντίστοιχη εξίσωση έχει ληφθεί υπόψη στους αλγόριθμους του κώδικα «PDT Simulator».

5.2.3 Υπολογισμός νέκρωσης

Παρόλο που ο αλγόριθμος υπολογισμού της νεκρωτικής περιοχής είναι ενσωματωμένος στο αρχείο «Spatial_distributions.m», παρουσιάζεται ξεχωριστά για λόγους καλύτερης κατανόησής του. Προκειμένου να υπολογιστεί το μέγιστο βάθος νέκρωσης και η μέγιστη οριζόντια νέκρωση, ο χρήστης πρέπει να ορίσει στο αρχείο «Parameters.m» μία τιμή κατωφλίου για τη συγκέντρωση του μονήρους οξυγόνου ($[^1\text{O}_2]_{rx,th}$). Όταν ξεπεραστεί αυτή η τιμή θεωρείται πως επέρχεται νέκρωση. Ο αυστηρός καθορισμός της δεν είναι εύκολος, καθώς προκύπτει από *in vivo* μελέτες, διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του καρκινικού όγκου, ενώ σε γενικές γραμμές κυμαίνεται μεταξύ 0,5 και 1 mM (βλ. § [5.4.1 Γεωμετρία και παράμετροι](#)). Η τιμή που θα οριστεί διαδραματίζει καιρίο ρόλο για το αποτέλεσμα της προσομοίωσης, αφού για να επιτευχθούν υψηλές τιμές $[^1\text{O}_2]_{rx,th}$ θα πρέπει να είναι αυξημένες οι τιμές είτε της πυκνότητας ισχύος, είτε του χρόνου ακτινοβολήσης, είτε συνδυασμός τους, αυξάνοντας όμως τη συνολική δόση που δέχεται ο ασθενής.

Για τον υπολογισμό της νεκρωτικής περιοχής ο αλγόριθμος αρχικά ελέγχει τις τιμές του δισδιάστατου διανύσματος της χωρικής κατανομής του $[^1O_2]_{rx}$ και κατασκευάζει ένα νέο διάνυσμα (necromap). Σε αυτό, κάθε κελί παίρνει την τιμή «0» (και θεωρείται νεκρό) εάν η συγκέντρωση του μονήρους οξυγόνου υπερβαίνει την τιμή κατωφλίου και «1» εάν δεν την υπερβαίνει. Εν συνεχεία, υπολογίζει το βάθος νέκρωσης βρίσκοντας τη μέγιστη γραμμή του necromap στην οποία εντοπίζεται η τιμή «0» (και άρα το κελί αντιστοιχεί σε νεκρωτική περιοχή) και πολλαπλασιάζοντάς τη επί το πάχος του στοιχειώδους μήκους – κελιού (dz). Με αντίστοιχο τρόπο υπολογίζεται και η οριζόντια νέκρωση, με τη διαφορά της κατάλληλης μετατροπής του μήκους ώστε να έχει αρχή το κέντρο της δέσμης (λόγω της αξονικής συμμετρίας κατά μήκος του άξονα $z'z$).

Επιπροσθέτως, ο αλγόριθμος εκτιμά το ποσοστό νέκρωσης του όγκου. Πιο συγκεκριμένα, εκμεταλλεύεται τη χωρική αντιστοιχία των κελιών σε νεκρά ή ζωντανά και υπολογίζει το αντίστοιχο ποσοστό. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως έχει ληφθεί μέριμνα ούτως ώστε ο χρήστης να μπορεί να καθορίζει το μέγεθος της περιοχής προς μελέτη. Με αυτόν τον τρόπο, μπορούν να εξοικονομηθούν υπολογιστικοί πόροι αλλά και να επικεντρωθεί η προσομοίωση σε συγκεκριμένη περιοχή του όγκου ή ακόμα και της ευρύτερης γεωμετρίας (π.χ. ώστε να λάβει υπόψη πιθανή νέκρωση του πέριξ υγιή ιστού). Τα αποτελέσματα επιστρέφονται στον χρήστη με την παρακάτω μορφή (οι αριθμητικές τιμές είναι ενδεικτικές):

$$\text{Necrosis depth (z axis)} = 0.21\text{cm}$$

$$\text{Horizontal necrosis (x axis)} = 0.23\text{cm}$$

$$\text{Death percentage (\%)} = 27\%$$

5.2.4 Υπολογισμός παραμέτρων

Επιπροσθέτως του βασικού κώδικα που προαναφέρθηκε, αναπτύχθηκε ο αλγόριθμος «Correction_algorithm.m», προκειμένου να μπορέσουν να προσεγγιστούν οι τιμές παραμέτρων που είναι είτε δύσκολο είτε πρακτικά αδύνατο να μετρηθούν με ακρίβεια, κατά την έναρξη μίας συνεδρίας φωτοδυναμικής θεραπείας. Παράδειγμα τέτοιων τιμών είναι η αρχική τιμή της συγκέντρωσης του μοριακού οξυγόνου ($[^3O_2]_0$), της φωτοευαισθητοποιού ουσίας ($[S]_0$) και της παροχής οξυγόνου (g_0). Ένα από τα πλεονεκτήματα του κώδικα είναι πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον προσδιορισμό των

φωτοχημικών και φωτοβιολογικών παραμέτρων της φωτοευαισθητοποιού ουσίας. Πρέπει όμως να σημειωθεί πως η ακρίβεια των αποτελεσμάτων του αλγόριθμου καθορίζεται από το πλήθος των άγνωστων μεταβλητών.

Βασικό στοιχείο του κώδικα είναι η προσπάθεια σύγκλισης των υπολογισμένων τιμών του βάθους νέκρωσης (ή της οριζόντιας νέκρωσης) με τις αντίστοιχες, πειραματικά μετρούμενες τιμές. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό χρησιμοποιείται ένας βρόχος επανάληψης, μέσα στον οποίο επιλύεται το σύστημα των τριών φωτοχημικών εξισώσεων και, μέσω της χωρικής κατανομής του $[^1O_2]_{rx}$ που προκύπτει, υπολογίζεται το βάθος νέκρωσης. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου η υπολογιζόμενη τιμή του βάθους νέκρωσης γίνει μεγαλύτερη ή ίση της μετρούμενης. Σε κάθε επανάληψη η υποβελτιστοποίηση παράμετρος αυξάνεται κατά ένα σταθερό ποσοστό της αρχικής τιμής της. Το ποσοστό αυτό και άρα η ακρίβεια της μεθόδου, καθορίζεται από τον χρήστη. Υπάρχει η δυνατότητα του ταυτόχρονου υπολογισμού περισσότερων της μίας παραμέτρων, προφανώς όμως σε βάρος της ακρίβειας των υπολογιζόμενων τιμών.

5.2.5 Αντίστροφοι υπολογισμοί

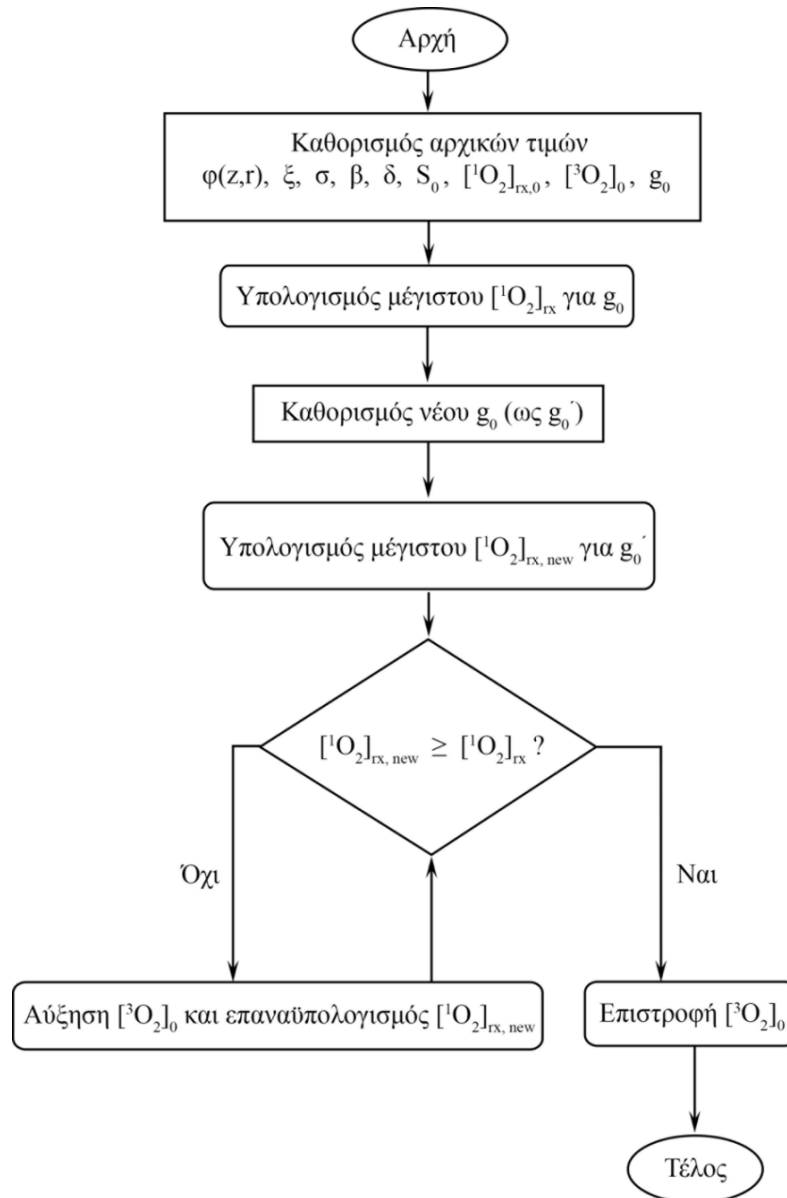
Με βάση τους παραπάνω αλγόριθμους, αναπτύχθηκε ένας ακόμα (Fixed_1O2_algorithm.m), αντίστροφων υπολογισμών. Πιο συγκεκριμένα, αυτός υπολογίζει την ελάχιστη απαιτούμενη αρχική συγκέντρωση του μοριακού οξυγόνου προκειμένου να μπορεί να διατηρηθεί τουλάχιστον σταθερή η συγκέντρωση του μονήρους, ενώ έχει μειωθεί η οξυγόνωση (υποξία).

Ο χρήστης θέτει μία αρχική τιμή μοριακού οξυγόνου και οξυγόνωσης, βάσει των οποίων υπολογίζεται η αρχική τιμή του μονήρους οξυγόνου. Εν συνεχεία, καθορίζει τη νέα, μειωμένη τιμή της οξυγόνωσης και ο αλγόριθμος εκτελεί ένα βρόχο υπολογισμών. Σε κάθε επανάληψη υπολογίζει τη νέα συγκέντρωση του μονήρους οξυγόνου $[^1O_2]_{rx,new}$, έως ότου αυτή γίνει τουλάχιστον ίση με την αρχική (βλ. **εικόνα 12**).

Προκειμένου να αυξηθεί η ταχύτητα των υπολογισμών, ο αλγόριθμος σε κάθε επανάληψη αυξάνει αρχικά την τιμή του $[^3O_2]_0$ με διευρυμένο βήμα (mol_step), το οποίο μπορεί να καθοριστεί από τον χρήστη. Όταν η τιμή του $[^1O_2]_{rx,new}$ γίνει ίση ή ξεπεράσει εκείνη που αντιστοιχούσε σε μη μειωμένη οξυγόνωση, ξεκινά ένας υπο-βρόχος βελτιστοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, η

τελευταία χρησιμοποιούμενη τιμή του $[^3O_2]_o$ μειώνεται όσο και το βήμα, και η προηγούμενη διαδικασία επαναλαμβάνεται με νέο μικρότερο βήμα (`omol_step_opt`) έως ότου να ικανοποιηθεί η συνθήκη $[^1O_2]_{rx,new} \geq [^1O_2]_{rx}$.

Σημαντικό πλεονέκτημα του παραπάνω αλγόριθμου είναι η πλήρης ευελιξία του. Παραδείγματος χάρη, υπάρχει η δυνατότητα του αυτοματοποιημένου υπολογισμού της ελάχιστης αρχικής συγκέντρωσης μοριακού οξυγόνου που απαιτείται για ένα εύρος τιμών οξυγόνωσης. Επιπροσθέτως, καθώς οι παράμετροι $[^3O_2]_o$, g_o , έχουν παρόμοια βαρύτητα στην επίλυση του αλγόριθμου, ο χρήστης δύναται να τον επαναπρογραμματίσει ώστε να εκτελεί την αντίστροφη διαδικασία. Με άλλα λόγια, μπορεί να υπολογίσει την τιμή της οξυγόνωσης που απαιτείται, ενώ επικρατούν υποξικές αρχικές συνθήκες, ώστε να διατηρηθεί σταθερή η συγκέντρωση του μονήρους οξυγόνου, καθιστώντας τον ένα ιδιαίτερος χρήσιμο εργαλείο για τη δοσιμετρία της ΦΔΘ.



Εικόνα 12. Διάγραμμα ροής του αλγόριθμου «Fixed_1O2_algorithm.m». Τα ορθογώνια παραλληλόγραμμα αντιστοιχούν σε εντολές – τιμές που πρέπει να καθορίσει ο χρήστης. Τα παραλληλόγραμμα με τις στρογγυλεμένες γωνίες αντιπροσωπεύουν τους υπολογισμούς που εκτελεί ο κώδικας και ο ρόμβος τη σύγκριση βάσει της οποίας οι υπολογισμοί συνεχίζονται ή τερματίζονται.

5.2.6 Υπολογισμός χρόνου ακτινοβόλησης

Ένας ακόμη υπο-κώδικας που αναπτύχθηκε είναι ο «Time_calculator.m». Σκοπός του είναι να επιτρέπει την εκ των προτέρων γνώση του χρόνου ακτινοβόλησης που θα απαιτηθεί, προκειμένου να επιτευχθεί ένα μέγιστο βάθος νέκρωσης. Χρησιμοποιεί τις παραμέτρους που ορίζονται στο αρχείο

«Parameters.m» καθώς και τον χάρτη (Tzx) του είδους του ιστού που αντιστοιχεί σε κάθε σημείο.

Εντός του αρχείου, ο χρήστης ορίζει το επιθυμητό μέγιστο βάθος νέκρωσης (*znecr*) καθώς και τον μέγιστο αποδεκτό χρόνο ακτινοβολήσης (*tmax*). Εδώ αξίζει να σημειωθεί πως οι μεταβλητές παρατίθενται με το όνομά τους, όπως αυτό εμφανίζεται στον κώδικα. Εν συνεχεία, ο αλγόριθμος μετατρέπει το *znecr* σε γραμμή (για τους διοδιάστατους χάρτες), φροντίζοντας βέβαια για τις απαραίτητες στρογγυλοποιήσεις. Κατόπιν, σαρώνει τη συγκεκριμένη γραμμή έως ότου συναντήσει κελί που αντιστοιχεί σε καρκινικό ιστό και με αυτόν τον τρόπο καθορίζει το κελί στο οποίο θα διεξαχθούν οι υπολογισμοί. Αξίζει να σημειωθεί πως προκειμένου οι υπολογισμοί να μη γίνουν σε κελί πάνω στη διεπιφάνεια υγιούς – καρκινικού ιστού (λόγω μεγαλύτερης αβεβαιότητας των αποτελεσμάτων), ο αλγόριθμος μετατοπίζει το κελί ενδιαφέροντος κατά τρεις θέσεις (αυθαίρετα επιλεγμένο βήμα) προς το κέντρο του όγκου. Το συγκεκριμένο βήμα κρίθηκε ως επαρκές, αφού δεν είναι ούτε υπερβολικά μικρό ώστε να βρίσκεται στην διεπιφάνεια, ούτε υπερβολικά μεγάλο ώστε να απομακρύνεται από την περιοχή ενδιαφέροντος. Επόμενο βήμα είναι ο υπολογισμός του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας, της οξυγόνωσης καθώς και της συγκέντρωσης της φωτοευαισθητοποιού ουσίας στο κελί ενδιαφέροντος.

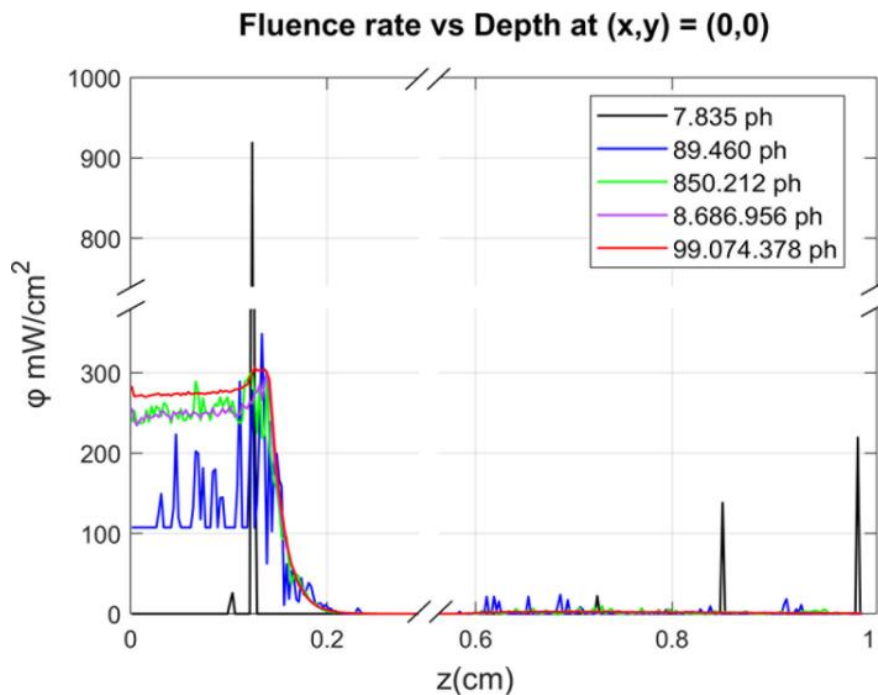
Για να μπορέσει να επιλυθεί το σύστημα των τριών διαφορικών εξισώσεων (6 - 8) που διέπουν τη ΦΔΘ, πρέπει να οριστεί ένα χρονικό διάστημα με τουλάχιστον μία ενδιάμεση τιμή. Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η αποδοτικότητα (και άρα να ελαχιστοποιηθούν οι υπολογιστικές απαιτήσεις) του κώδικα, ο μέγιστος επιτρεπόμενος χρόνος ακτινοβολήσης κατατμείται σε τέσσερα διαστήματα ίσης διάρκειας ($tmax/4$), με το ελάχιστο δυνατό βήμα στο κάθε ένα ($tmax/8$). Στη συνέχεια υπολογίζεται η μέγιστη συγκέντρωση του μονήρους οξυγόνου στο κελί ενδιαφέροντος, σε κάθε ένα από τα τέσσερα προαναφερθέντα διαστήματα. Ακολούθως, εντοπίζεται το χρονικό διάστημα κατά το οποίο επετεύχθη η υπέρβαση της τιμής κατωφλίου ($[^1O_2]_{rx,th}$) και επαναυπολογίζεται σε αυτό η ($[^1O_2]_{rx}$), με βήμα 10 s. Η ακρίβεια του υπολογισμού μπορεί να αυξηθεί ακόμα και στο 1 s, παρόλα ταύτα θεωρείται άσκοπη η υπολογιστική επιβάρυνση (αρκεί να ληφθεί υπόψη πως οι κλινικά εφαρμοζόμενοι χρόνοι είναι της τάξης των 10 min). Τέλος, σε περίπτωση που δεν δύναται να ικανοποιηθεί η συνθήκη $[^1O_2]_{rx} \geq [^1O_2]_{rx,th}$, επιστρέφεται το παρακάτω μήνυμα: «*The requested necrotic depth cannot be achieved at the specified time scale*».

5.3 Ποιότητα προσομοίωσης και πλήθος φωτονίων

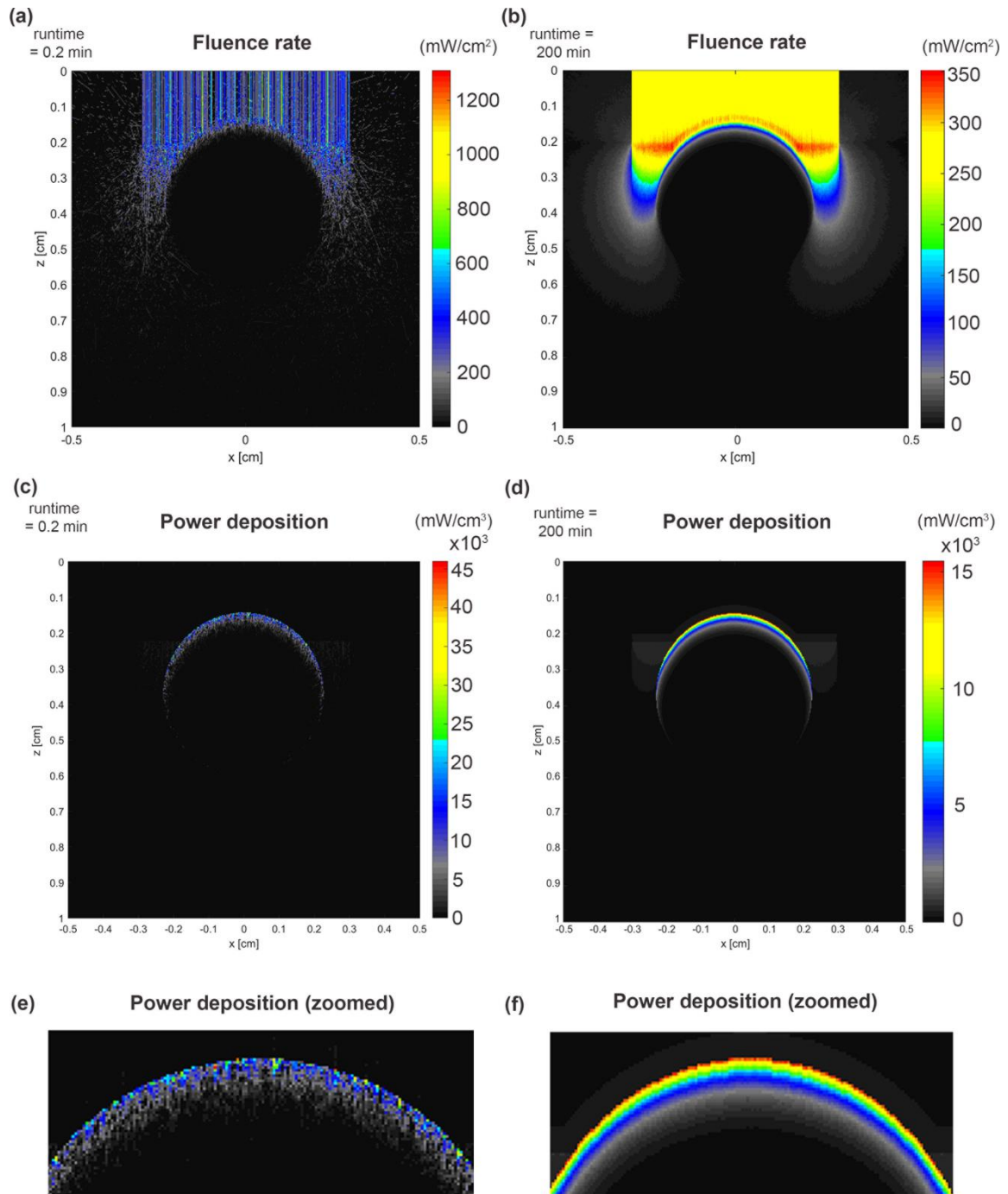
Όπως είναι γνωστό, ο κώδικας Monte Carlo στηρίζεται στη προσομοίωση της διαδρομής ενός φωτονίου, από τη στιγμή που αυτό παράγεται (ή αλλιώς «γεννιέται» όπως αναφέρεται στη διεθνή ορολογία) μέχρι την απορρόφησή του (ή αντιστοίχως το «θάνατό του»). Η προσομοίωση αναπαριστά το μέγεθος του βήματος που θα προλάβει να εκτελέσει το κάθε φωτόνιο προτού σκεδαστεί, τη γωνία σκέδασης (ανά συμβάν σκέδασης) και την τελική διαφυγή ή απορρόφησή του από το μέσο, δηλαδή τους διάφορους ιστούς στην περίπτωση που εδώ μελετάται. Οι παραπάνω παράμετροι καθορίζονται από τις οπτικές ιδιότητες του μέσου και επομένως, με όσο μεγαλύτερη ακρίβεια αυτές καθοριστούν, τόσο πιο κοντά στην πραγματικότητα θα είναι το αποτέλεσμα της προσομοίωσης. Επίσης, ο κώδικας Monte Carlo στηρίζεται σε συναρτήσεις πυκνότητας πιθανοτήτων. Φυσικό επακόλουθο αυτού είναι πως, όσο μεγαλύτερο είναι το πλήθος των προς μελέτη φωτονίων, τόσο ακριβέστερα θα είναι τα αποτελέσματα, καθώς θα μειώνεται το στατιστικό σφάλμα. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως η υπολογιστική ισχύς καθορίζει το κατά πόσον είναι εφικτή η εκτέλεση προσομοιώσεων που απαιτούν ιδιαίτερα αυξημένο όγκο υπολογισμών, λόγω του αυξημένου πλήθους των φωτονίων. Επιπροσθέτως και εφόσον η μνήμη RAM του υπολογιστή επιτρέπει την εκτέλεση της προσομοίωσης, ο χρόνος που θα απαιτηθεί για την ολοκλήρωσή της μπορεί να αποτελέσει ανασταλτικό παράγοντα για την ένταξή της σε επίπεδο κλινικής πράξης.

Με αφορμή τα παραπάνω, ελέγχθηκε η ακρίβεια των προσομοιώσεων που παράγονται. Εκτελέστηκε επομένως ο αλγόριθμος που αναπτύχθηκε για διάφορες τιμές χρόνου, στην περίπτωση της ΦΔΘ καρκίνου του μαστού (4T1 όγκος). Ο ενδιαφερόμενος αναγνώστης παραπέμπεται στο **Κεφάλαιο 8**, για περαιτέρω πληροφορίες για τη συγκεκριμένη καρκινική σειρά, την προς αναπαράσταση γεωμετρία και τις οπτικές της ιδιότητες. Ο σφαιρικός όγκος απεικονίζεται ως εγκάρσια τομή στο επίπεδο x-z και η δέσμη προσπίπτει από το άνω μέρος του όγκου (ταξιδεύοντας κατά μήκος του άξονα z'z). Ορίζοντας τη χρονική διάρκεια της προσομοίωσης καθορίζεται και ο αριθμός των φωτονίων. Στο παράδειγμα που ακολουθεί έχουν επιλεγεί, για λόγους απεικόνισης, τιμές χρόνου $t = 0,2 \text{ min}$ και $t = 200 \text{ min}$, οι οποίες αντιστοιχούν σε 89.460 και 99.074.378 φωτόνια, αντίστοιχα. Όπως φαίνεται από τις **εικόνες 13 και 14 (a, b)**, ο αριθμός των φωτονίων δεν επηρεάζει μόνο τη χωρική ποιότητα της αναπαράστασης αλλά κυρίως την ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Είναι

χαρακτηριστικό πως, στην περίπτωση των 89.460 φωτονίων, η πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας στην άνω επιφάνεια της γεωμετρίας διαφέρει τοπικά ακόμα και περισσότερο από 100% από την υπολογιζόμενη με τα 99.074.378 φωτόνια (η τιμή της οποίας είναι σε συμφωνία με τη θεωρητικά αναμενόμενη). Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υπό- ή υπερεκτίμηση της εναποτιθέμενης ενέργειας στην περιοχή, επηρεάζοντας σημαντικά τη δοσιμετρία τόσο της ΦΔΘ, όσο και της ΠΦΘΘ. Η μεγάλη σημασία της κατάλληλης επιλογής του πλήθους των φωτονίων φαίνεται και στο γράφημα της **εικόνας 13**. Είναι χαρακτηριστικό πως επιλογή σύντομων χρόνων προσομοίωσης και άρα μικρού πλήθους φωτονίων, οδηγεί σε μη-αμελητέες διακυμάνσεις του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας που διαδίδεται κατά μήκος του άξονα z ' z . Ακόμα ενδεικτικότερη του φαινομένου είναι η εμφάνιση κορυφών (spikes), που είναι προφανώς ψευδείς καθότι παρουσιάζονται σε βάθη κατά πολύ μεγαλύτερα του βάθους διείσδυσης της δέσμης και με υψηλές τιμές.



Εικόνα 13. Σύγκριση του ρυθμού ροής της διαδιδόμενης ακτινοβολίας εντός ιστού για διάφορες τιμές φωτονίων. Όσο μεγαλύτερο είναι το πλήθος αυτών, τόσο πιο ομαλή είναι η μορφή της καμπύλης, με λιγότερες αυξομειώσεις και με τιμές που προσεγγίζουν τις θεωρητικά αναμενόμενες. (Σημείωση: η δέσμη συναντά τη διεπιφάνεια αέρα – δέρματος στα 0,14 cm).



Εικόνα 14. Χωρική αναπαράσταση της κατανομής που προκύπτει από 89.460 φωτόνια: (a) του ρυθμού ροής της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και (c) της απορροφούμενης ισχύος (power deposition). Η εικόνα (e) είναι η μεγέθυνση (zoom) της εικόνας (c). Οι εικόνες (b), (d) και (f) προκύπτουν από τις αντίστοιχες προσομοιώσεις για 99.074.378 φωτόνια.

5.4 Εφαρμογή του κώδικα

Παρακάτω ακολουθεί ένα παράδειγμα εφαρμογής του αναπτυχθέντος κώδικα, για λόγους εποπτικής παρουσίασης αυτού. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η περίπτωση οζώδους βασικοκυτταρικού καρκινώματος (nodular basal cell carcinoma, nBCC) σε C3H μύες. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε *in silico*, σε desktop υπολογιστή με επεξεργαστή Intel® Core™ i7-4790 @ 3.60 GHz, μνήμη RAM 16 GB και σκληρό δίσκο Samsung SSD 860 QVO. Ο χρόνος εκτέλεσης του κώδικα για την προσομοίωση της θεραπείας κυμάνθηκε από μερικά λεπτά έως και μισή ώρα, ανάλογα με τη ζητούμενη προς υπολογισμό παράμετρο.

5.4.1 Γεωμετρία και παράμετροι

Ο προσομοιούμενος ιστός ήταν κυβικού σχήματος, με ακμή ~ 1 cm. Τα πρώτα (άνω) 100 μm αντιστοιχούσαν σε επιδερμικό ιστό, τα επόμενα 0,15 cm στη στοιβάδα της δερμίδας, ενώ στη συνέχεια ακολουθούσε υποδόριος λιπώδης ιστός. Η καρκινική αλλοίωση ήταν σχήματος σφαίρας, ακτίνας 0,25 cm, με την άνω επιφάνειά της να βρίσκεται σε βάθος 90 μm , στη θέση (0,0,0) (βλ. **εικόνα 15**). Η ακτινοβολήση, διάρκειας 20 min, έγινε με επίπεδη κυλινδρική δέσμη ακτίνας 0,3 cm και μήκους κύματος $\lambda = 633$ nm, που προσέπιπτε κάθετα στην επιδερμίδα και ο κεντρικός της άξονας συνέπιπτε με τον άξονα z'z. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως θεωρήθηκε η ύπαρξη ενός λεπτού (πάχους 100 μm) στρώματος αέρα ανάμεσα στην πηγή φωτός και στον ιστό.

Ως φωτοευαίσθητοποιός ουσία επιλέχθηκε το αμινολεβουλινικό οξύ (ALA) καθώς είναι γνωστές οι φωτοχημικές και φωτοβιολογικές παράμετροί του [30], οι οποίες, μαζί με τις υπόλοιπες χρησιμοποιούμενες παραμέτρους, παρουσιάζονται στον **πίνακα 4**. Αξίζει να αναφερθεί πως στην παρούσα προσομοίωση χρησιμοποιήθηκε ο κώδικας «mcxyz.c», για χρόνο εκτέλεσης 20 min (4.489.887 φωτόνια).

Για τον υπολογισμό της νεκρωτικής περιοχής έγινε η θεώρηση πως όταν η συγκέντρωση του μονήρους οξυγόνου υπερβαίνει τα 0,7 mM επέρχεται νέκρωση. Σύμφωνα με το άρθρο των Zhu *et al.* του 2014 [151], η τιμή κατωφλίου ώστε να μειωθεί το κλάσμα επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων κατά 1/e (σε μελέτη επαγόμενου από ακτινοβολία ινοσαρκώματος, radio-induced fibrosarcoma - RIF) υπολογίζεται στα 0,5 mM, ενώ παλαιότερες

μελέτες το κατέτασαν στα 0,83 mM [166]. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί πως σε γράφημα που παρατίθεται στην εκτενή ανασκόπηση των Kim *et al.* του 2017 [30], φαίνεται πως τιμές για το $[^1O_2]_{rx}$ άνω του 1 mM οδηγούν σε δείκτη ίασης (cure index – C.I.) άνω του 0,8. Αναφορικά με τον παράγοντα ανισοτροπίας g_f , θεωρήθηκε ίσος με 0,8 για όλους τους ιστούς.

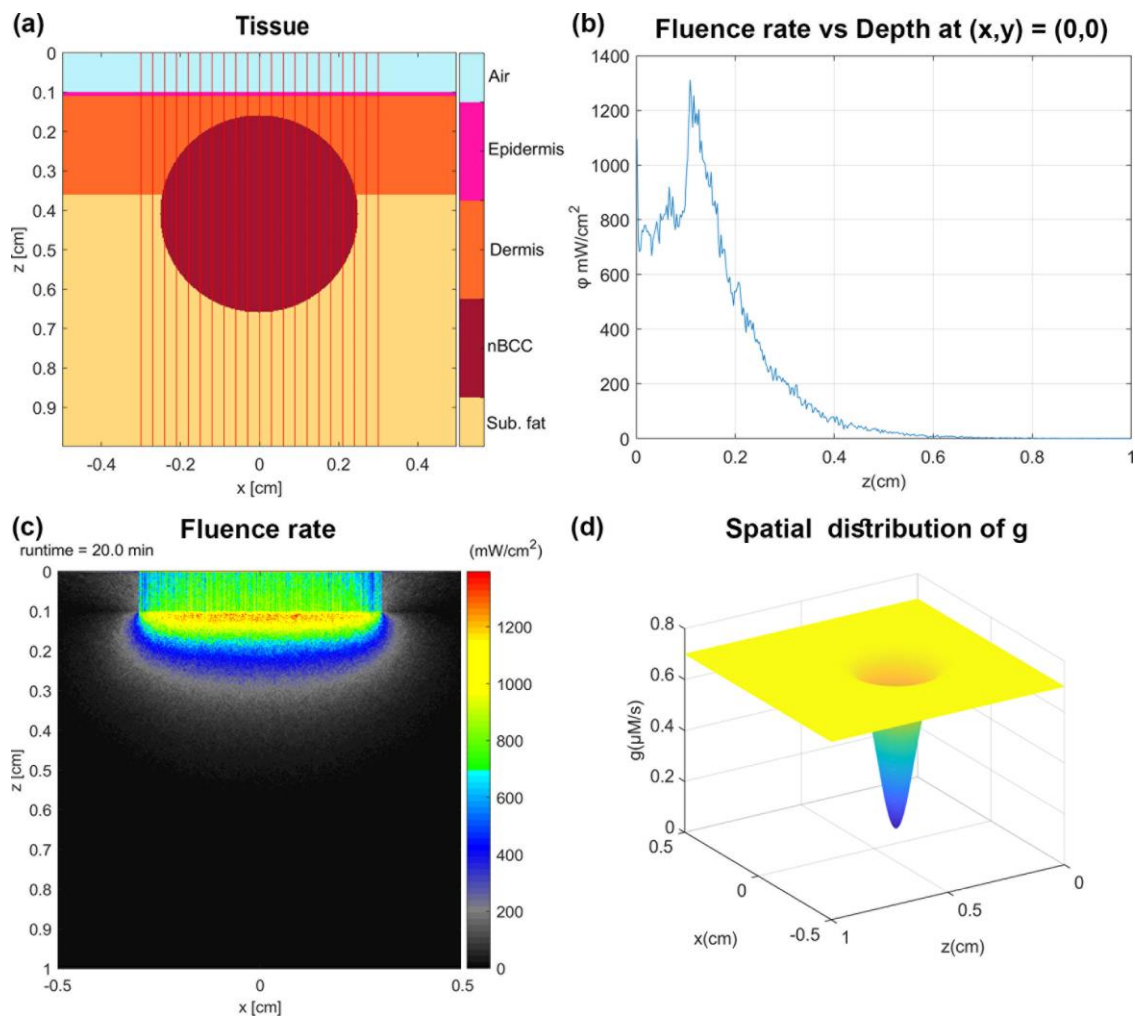
Πίνακας 4. Οπτικές και φωτοχημικές παράμετροι του μοντέλου nBCC.

Οπτικές παράμετροι			Φωτοχημικές παράμετροι	
Στρώμα	Παράμετρος	Τιμή (cm ⁻¹)	Παράμετρος	Τιμή
Επιδερμίδα	μ_a	2,35	ϵ	0,003 (cm ⁻¹ ·μM ⁻¹)
	μ_s	215,5	ξ	$3,7 \cdot 10^{-3}$ (cm ² ·mW ⁻¹ ·s ⁻¹)
			σ	$9 \cdot 10^{-5}$ (μM ⁻¹)
Όγκος nBCC	μ_a	1,17	β	11,9 (μM)
	μ_s	113,4	δ	33 (μM)
			g	0,7 (μM·s ⁻¹)
Δερμίδα	μ_a	1,27	$[^3O_2]_0$	80 (μM)
	μ_s	147,5	$[^1O_2]_{rx,0}$	0
			$[S]_{surf}$	7 (μM)
Υποδόριο λίπος	μ_a	1,23	φ^a	~150 (mW·cm ⁻²)
	μ_s	112,5		

^a Στην επιφάνεια του ιστού.

5.4.2 Αποτελέσματα

Με χρήση του αλγόριθμου αρχικά κατασκευάστηκε η προς ακτινοβολήση γεωμετρία (βλ. **εικόνα 15 (a)**). Στη συγκεκριμένη εικόνα μάλιστα διακρίνονται και οι κάθετες ερυθρές γραμμές που αντιπροσωπεύουν τη διαδιδόμενη δέσμη (το πλήθος τους είναι τυχαίο). Επίσης, υπενθυμίζεται πως, καθώς το μοντέλο παρουσιάζει συμμετρία, το επίπεδο που αναπαραστάθηκε (και στο οποίο έγιναν οι υπολογισμοί) ήταν το x - z .

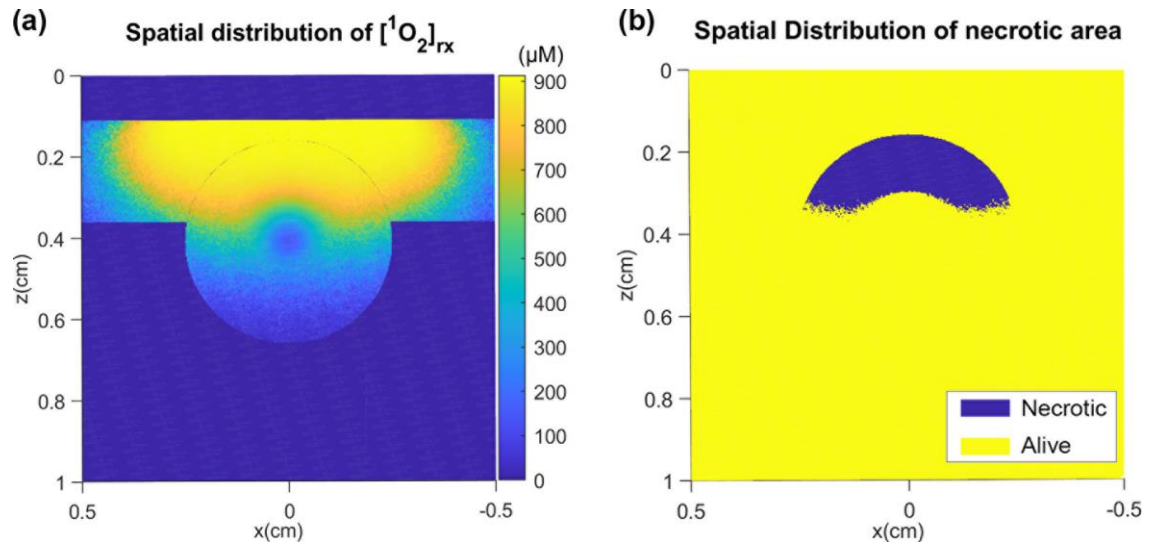


Εικόνα 15. **(a)** Εγκάρσια τομή της υπό μελέτη δομής. Η δέσμη του laser διαδίδεται κάθετα και αναπαρίσταται από τις παράλληλες κάθετες γραμμές ερυθρού χρώματος (το πλήθος τους είναι τυχαίο). Λόγω συμμετρίας της δομής, η αντίστοιχη τομή κατά το επίπεδο y - z είναι ίδια, επομένως και παραλείπεται. Οι τιμές που φαίνονται στο χρωματικό χάρτη αντιστοιχούν στον αέρα (air), στην επιδερμίδα (epidermis), στη δερμίδα (dermis), στο οζώδες βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (nBCC) και στον υποδόριο λιπώδη ιστό (sub. fat). **(b)** Ρυθμός ροής κατά μήκος του άξονα z ' z , στον κεντρικό άξονα

του όγκου. Χωρική κατανομή (c) του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας για την τομή της εικόνας (a) και (d) της οξυγόνωσης.

Εν συνεχεία υπολογίστηκε ο ρυθμός ροής κατά μήκος του άξονα $z'z$, στον κεντρικό άξονα του όγκου, καθώς και η χωρική κατανομή του ρυθμού ροής και της οξυγόνωσης (βλ. **εικόνα 15 (b), (c) και (d)**, αντίστοιχα). Όπως φαίνεται από τις **εικόνες 15 (b) και (c)**, η συνεισφορά των οπισθοσκεδαζόμενων φωτονίων από τον δερματικό ιστό είναι σημαντική για το συνολικό ρυθμό ροής της διαδιδόμενης ακτινοβολίας, αν και πρόκειται για αρκετά εντοπισμένο φαινόμενο. Όσον αφορά την **εικόνα 15 (d)**, αυτή δρα περισσότερο ως οδηγός για τον ορισμό της εξίσωσης που αφορά τη μεταβολή της οξυγόνωσης, λόγω της υποξικής περιοχής. Με χρήση του κώδικα «Statistics.m» που αναπτύχθηκε παρατηρείται πως η μέση τιμή του ρυθμού ροής σε όλο τον όγκο ήταν $123,2 \text{ mW/cm}^2$ και η αντίστοιχη μέση τιμή πυκνότητας ενέργειας $147,9 \text{ J/cm}^2$. Σύμφωνα με τον κώδικα «Time_calculator.m», για την επίτευξη μέγιστου βάθους νέκρωσης της τάξης των $0,32 \text{ cm}$ απαιτούνται 1160 s (εξού και επιλογή των 1200 s ως χρόνο θεραπείας).

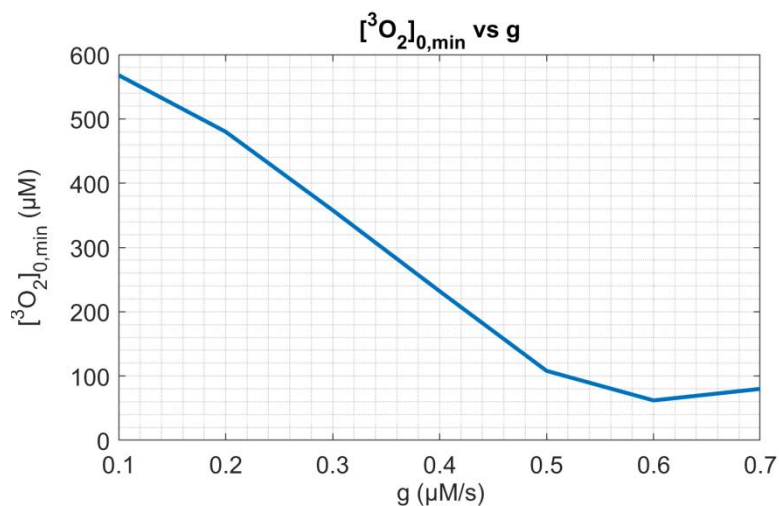
Τα παραπάνω αξιοποιούνται από τον αναπτυχθέντα κώδικα ώστε να υπολογιστούν τα νεκρωτικά αποτελέσματα, τα οποία είναι σε συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία [167]. Η αποτύπωση της νεκρωτικής περιοχής (βλ. **εικόνα 16 (b)**) είναι σε συμφωνία με τη χωρική κατανομή της συγκέντρωσης του παραγόμενου μονήρους οξυγόνου (βλ. **εικόνα 16 (a)**), το οποίο με τη σειρά του είναι σε συμφωνία με τη χωρική κατανομή του ρυθμού ροής της διαδιδόμενης δέσμης και της οξυγόνωσης (βλ. **εικόνα 15 (c) και (d)**, αντίστοιχα). Για το παραπάνω παράδειγμα, οι υπολογιζόμενες μέγιστες τιμές νέκρωσης κατά τους άξονες $x'x$ και $z'z$ ήταν $0,48$ και $0,37 \text{ cm}$, αντίστοιχα.



Εικόνα 16. (a) Χωρική κατανομή της συγκέντρωσης του μονήρους οξυγόνου. **(b)** Χωρική αναπαράσταση της νεκρωτικής περιοχής (necrotic area), με μπλε χρώμα. Οι σχετικοί υπολογισμοί γίνονται μόνο εντός του όγκου, προς εξοικονόμηση υπολογιστικών πόρων.

Με βάση τον αλγόριθμο «Fixed_1O2_algorithm.m» και τις παραμέτρους του παραπάνω παραδείγματος σχεδιάστηκε η γραφική παράσταση της **εικόνας 17**. Βάσει αυτής μπορεί να εκτιμηθεί η ελάχιστη αρχική συγκέντρωση του μοριακού οξυγόνου $[^3O_2]_{0,min}$ που πρέπει να υπάρχει στην περιοχή του όγκου, σε περίπτωση μεταβολής της οξυγόνωσης, ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση του μονήρους οξυγόνου ίση με 700 μM . Επομένως, με χρήση αυτής της καμπύλης, μπορούν να βελτιστοποιηθούν οι παράμετροι *in vivo* εφαρμογής της φωτοδυναμικής θεραπείας. Για παράδειγμα, σε περίπτωση μειωμένης αιματικής ροής και άρα χαμηλής οξυγόνωσης του όγκου, η συγκέντρωση του οξυγόνου στην περιοχή μπορεί να αυξηθεί με εξωτερική παρέμβαση (π.χ. μέσω της χρήσης υπερβαρικών θαλάμων [168]) και έτσι να διασφαλιστεί το επιδιωκόμενο θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί πως για την κατασκευή της συγκεκριμένης καμπύλης, χρειάστηκε τροποποιηθεί ελαφρώς ο αλγόριθμος «Fixed_1O2_algorithm.m». Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η θεώρηση της μείωσης της οξυγόνωσης μέσω της **σχέσης (10)**, επομένως για κάθε βήμα του βρόχου επανάληψης των υπολογισμών αυτή θεωρήθηκε σταθερή στο χώρο και στο χρόνο.



Εικόνα 17. Σχέση μεταξύ της ελάχιστης αρχικής συγκέντρωσης μοριακού οξυγόνου $[^3O_2]_{0,min}$ και της οξυγόνωσης, για την επίτευξη συγκεκριμένης συγκέντρωσης μονήρους οξυγόνου ($[^1O_2]_{rx} = 700 \mu M$), μετά από ακτινοβόληση για 1200 s.

Τέλος, πρέπει να τονιστεί πως, παρόλο που οι παραπάνω υπολογισμοί έχουν ως αφετηρία Monte Carlo προσομοιώσεις, τα αποτελέσματα που παράγουν πρέπει να αντιμετωπίζονται με κριτικό πνεύμα. Για παράδειγμα, για τον υπολογισμό του μέγιστου βάθους νέκρωσης, ο αλγόριθμος σαρώνει τον διδιάστατο πίνακα τιμών της συγκέντρωσης του μονήρους οξυγόνου. Στόχος του είναι η ανεύρεση της θέσης του πιο απομακρυσμένου από την επιφάνεια κελιού, όπου η τιμή του μονήρους οξυγόνου υπερβαίνει αυτή του κατωφλίου νέκρωσης. Προφανώς, οι τιμές που παράγονται είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων, όπως το πλήθος των υπό μελέτη φωτονίων. Αυξημένες τιμές αυτού οδηγούν μεν σε σημαντικά καλύτερη δειγματοληψία, αλλά η χωρική κατανομή τους παραμένει μία στατιστικά υπολογιζόμενη ποσότητα. Επομένως, γίνεται αντιληπτό πως τα εξαγόμενα αποτελέσματα αποσκοπούν στο να αποκομίζεται μία αρκετά καλή εκτίμηση και όχι ένα απόλυτο συμπέρασμα.

ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ ΟΜΟΙΩΜΑΤΩΝ

6.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Δεδομένης της αναγκαιότητας ενίσχυσης του θεραπευτικού αποτελέσματος της ΦΔΘ με την επιπρόσθετη εφαρμογή υπερθερμίας [23], μελετήθηκε η φωτοθερμική αλληλεπίδραση μονοχρωματικής ακτινοβολίας με προσομοιωτές ιστών στους οποίους είχαν εισαχθεί νανοδομές, ως ένα προπαρασκευαστικό (preliminary) στάδιο πριν τη διεξαγωγή *in vivo* πειραμάτων σε μύες. Πιο συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν ομοιώματα ιστών στα οποία διασκορπίστηκαν σε όλο τον όγκο τους νανοσωματίδια χρυσού, αναπαριστώντας ιστό υπό / προς θεραπεία. Αυτά, είτε ακτινοβολήθηκαν μόνα τους είτε ενσωματώθηκαν σε μεγαλύτερα ομοιώματα (τα οποία δεν περιείχαν νανοσωματίδια), ώστε να προσομοιωθεί και ο περίξ υγιής ιστός. Τα μοντέλα που προέκυψαν ακτινοβολήθηκαν για ποικίλες τιμές πυκνότητας προσπίπτουσας ακτινοβολίας / πυκνότητας ενέργειας, με διάφορες συγκεντρώσεις νανοδομών και πηγές φωτός. Όσον αφορά τα πειράματα που διεξήχθησαν, αυτά κατηγοριοποιούνται σε πειράματα Φάσης I και II, βάσει της ρεαλιστικότητας του μοντέλου.

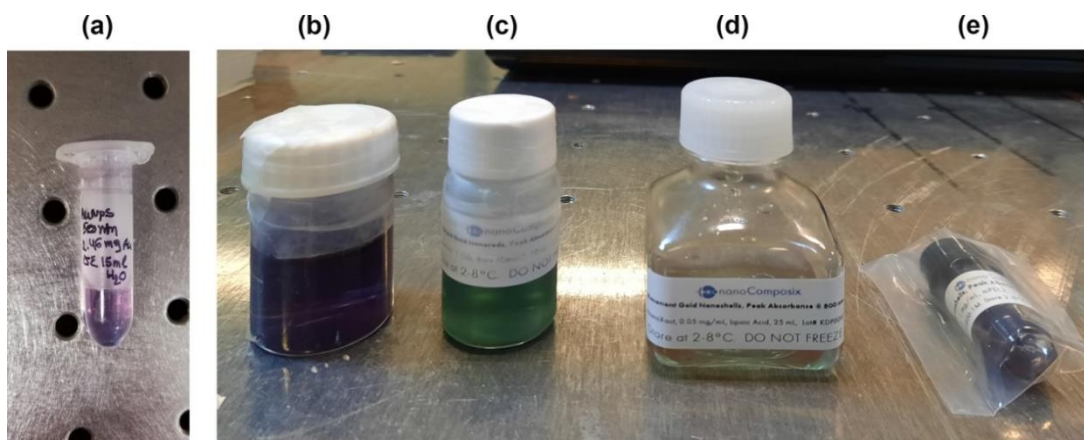
6.2 Υλικά και μέθοδοι

6.2.1 Νανοσωματίδια

Για την παρούσα διδακτορική έρευνα χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω νανοδομές (βλ. **εικόνα 18**):

1. Σφαιρικά νανοσωματίδια χρυσού με επικάλυψη διοξειδίου του τιτανίου (AuTiO_2), περιεκτικότητας σε χρυσό 97% w/w, διαμέτρου 7 nm και $\lambda_{max} = 524$ nm (παραγωγή: Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ευγενική προσφορά του Αν. Καθ. Ιωάννη Λυκάκη).

- ii. Σφαιρικά νανοσωματίδια χρυσού σε υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης 0,164 mg/ml, με διάμετρο 50 nm και $\lambda_{max} = 532$ nm (παραγωγή: Τμήμα Επιστήμης των Υλικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, ευγενική προσφορά του Αν. Καθ. Βασιλείου Γεωργακίλα).
- iii. Νανοράβδοι χρυσού σε υδατικό διάλυμα (Milli-Q water), με πυρήνα πυριτίας και επικάλυψη κιτρικού οξέως (GRCN660 NanoXact™, NanoComposix, San Diego, CA, US), μεγάλης διαμέτρου (σύμφωνα με μετρήσεις TEM) $41,3 \pm 5,3$ nm, μικρής διαμέτρου (σύμφωνα με μετρήσεις TEM) $15,7 \pm 0,9$ nm, συγκέντρωσης (Calc'd) $3,35 \cdot 10^{11}$ σωματίδια/mL, μάζας χρυσού 0,032 mg/mL, με $\lambda_{max} = 665$ nm (@ $OD_{max} = 1,04$).
- iv. Σφαιρικά νανοκελύφη χρυσού σε υδατικό διάλυμα (Milli-Q water), με πυρήνα πυριτίας και επικάλυψη λιποϊκού οξέως (GSLN800 NanoXact™, NanoComposix, San Diego, CA, US), συνολικής διαμέτρου (σύμφωνα με μετρήσεις TEM) 163 ± 24 nm, διαμέτρου πυρήνα (σύμφωνα με μετρήσεις TEM) 119 ± 6 nm, συγκέντρωσης (Calc'd) $1,9 \cdot 10^9$ σωματίδια/mL, μάζας χρυσού 0,051 mg/mL, με $\lambda_{max} = 772$ nm (@ $OD_{max} = 1,34$).
- v. Σφαιρικά νανοκελύφη χρυσού σε υδατικό διάλυμα (Milli-Q water), με πυρήνα πυριτίας και επικάλυψη πολυαιθυλενογλυκόλης (JSD0035 NanoXact™, NanoComposix, San Diego, CA, US), συνολικής διαμέτρου (σύμφωνα με μετρήσεις TEM) 151 ± 8 nm, διαμέτρου πυρήνα (σύμφωνα με μετρήσεις TEM) 119 ± 5 nm, συγκέντρωσης (Calc'd) $6,1 \cdot 10^{10}$ σωματίδια/mL, μάζας χρυσού 1,08 mg/mL, με $\lambda_{max} = 811$ nm (@ $OD_{max} = 29,92$).



Εικόνα 18. Υδατικά διαλύματα νανοσωματιδίων χρυσού: (a, b) εργαστηριακά παρασκευασμένα (πρόκειται για τα υπ' αριθμ. i και ii της ανωτέρω λίστας) και (c - e) εμπορικά διαθέσιμα (πρόκειται για τα υπ' αριθμ. iii έως v της ανωτέρω λίστας).

6.2.2 Πηγές φωτός

Για την ακτινοβολήση των ομοιωμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω πηγές φωτός:

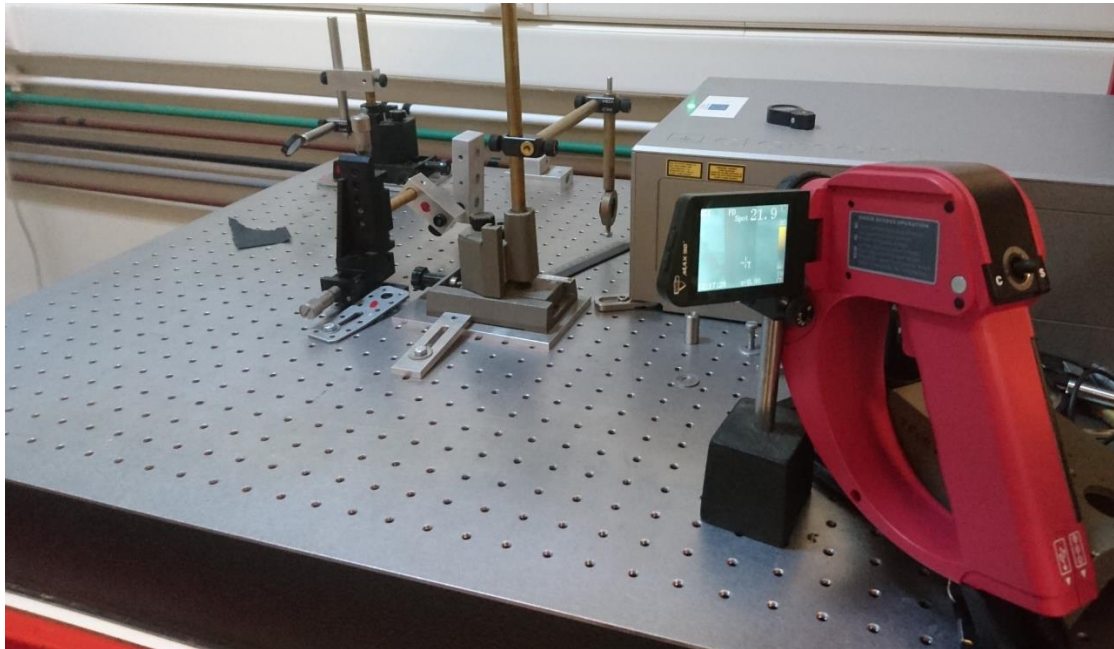
- Παλμικό Ti:Sapphire femtosecond laser (fs) (Spectra-Physics – element™ 100 250, Santa Clara, CA, US) με μήκος κύματος $\lambda = 807$ nm, εύρος ζώνης (*FWHM*) ≈ 14 nm, επαναληπτικότητα $f = 85$ MHz, διάρκεια παλμού $dt \approx 48$ fs, μέση ισχύ $P_{AVG} = 360$ mW και διάμετρο δέσμης ($1/e^2$) < 2 mm.
- Διοδικό laser συνεχούς λειτουργίας (CW) (RLTMDL-808-1W, Roithner Lasertechnik GmbH, Vienna, Austria) με μήκος κύματος $\lambda = 808 \pm 3$ nm, ισχύ $P = 1,12$ W $\pm 0,16\%$ και ελλειπτική δέσμη $\sim 5 \times 8$ mm.
- Διοδικό laser συνεχούς λειτουργίας (MRL-I-660, Changchun New Industries Optoelectronics Tech.Co., Ltd, Changchun, P.R. China) με μήκος κύματος $\lambda = 660$ nm, μέγιστη ισχύ $P = 180$ mW, ελλειπτική δέσμη $\sim 5 \times 8$ mm και με δυνατότητα πρόσδεσης οπτικής ίνας στην έξοδό του.
- Παλμικό Q-switched Nd:YAG (Litron Nano L 200-10, Warwickshire, UK) με: μήκος κύματος $\lambda = 1024$ nm και αρμονικές έως και τα 266 nm, επαναληπτικότητα $f \leq 100$ Hz, διάρκεια παλμού $dt = 6$ ns (για $\lambda = 1064$ nm), ενέργεια παλμού $Q = 34,8$ mJ (για $\lambda = 532$ nm, $V = 900$ V και $f = 10$ Hz) και διάμετρο δέσμης 5 mm.

6.2.3 Μέτρηση θερμοκρασίας

Η μέτρηση της επαγόμενης αύξησης της θερμοκρασίας έγινε μέσω:

- Θερμικής κάμερας (ICI – ToughCam EL S, Infrared Cameras Inc., Beaumont, Texas, US) με ακρίβεια $\Delta T = \pm 2^\circ\text{C}$ ή $\pm 2\%$ της ένδειξης (αναλόγως του ποια τιμή ήταν υψηλότερη), θερμική ευαισθησία $0,12^\circ\text{C}$ (στους 30°C), εύρος φάσματος $7,2 - 13,5$ μm , εύρος θερμοκρασιών -20°C έως $+350^\circ\text{C}$ και χωρική διακριτική ικανότητα $1,3$ mrad.
- Θερμικής κάμερας (TG267, Flir, Systems, Inc) με ακρίβεια $\Delta T = \pm 1,5^\circ\text{C}$ (για θερμοκρασίες μεταξύ των 50 και 100°C) και $\pm 3^\circ\text{C}$ (για θερμοκρασίες μεταξύ των -25 και 50°C καθώς και 100 και 380°C), ενώ η θερμική της ευαισθησία ήταν $< 0,2^\circ\text{C}$.

Σε όλα τα πειράματα δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στη μηχανική σταθερότητα της διάταξης μέτρησης, καθώς η περιοχή της θερμοκρασιακής αύξησης ήταν μικρών διαστάσεων και επομένως εύκολο να υπάρξει αποεστίαση. Παράδειγμα μίας εκ των διατάξεων φαίνεται στην **εικόνα 19**.



Εικόνα 19. Αντιπροσωπευτική εικόνα της διάταξης παρακολούθησης της θερμοκρασίας του δείγματος μέσω θερμικής κάμερας.

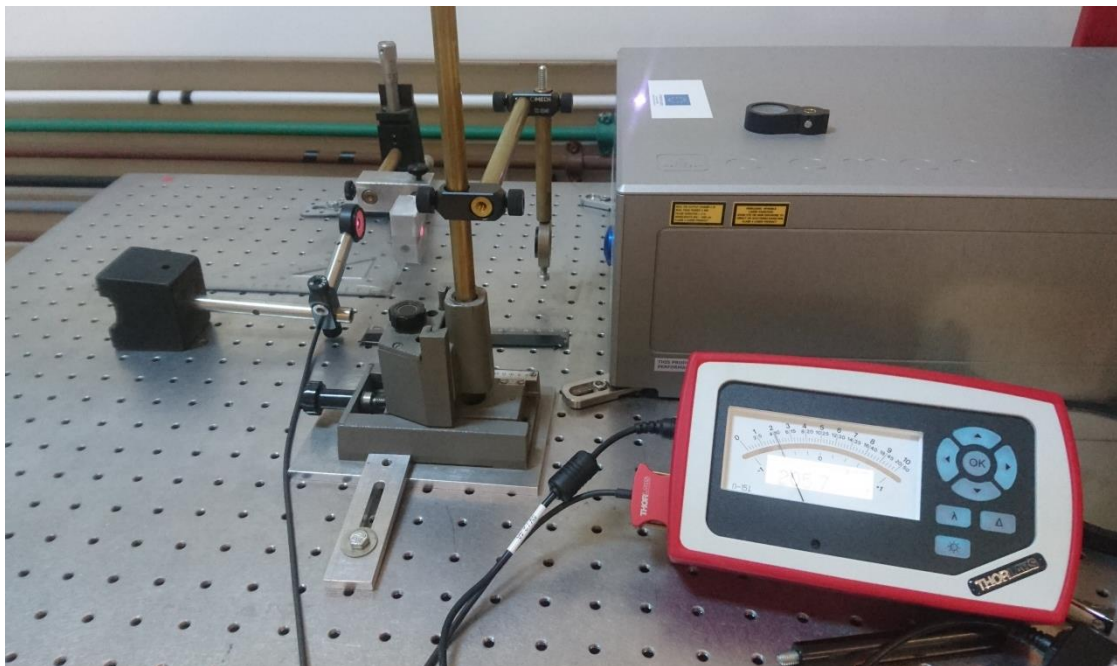
6.2.4 Μέτρηση ενέργειας / ισχύος

Για τη μέτρηση της ισχύος εξόδου των laser συνεχούς λειτουργίας και της ενέργειας των laser παλμικής λειτουργίας χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

- Για τη μέτρηση της ισχύος του femtosecond laser καθώς και του διοδικού laser συνεχούς λειτουργίας (MRL-I-660), χρησιμοποιήθηκε ισχυόμετρο PM100A (ThorLabs, Germany), με κεφαλή φωτοδιόδου πυριτίου (Si photodiode detector) (S121C, ThorLabs, Germany), διακριτικής ικανότητας 10 nW, γραμμικότητας $\pm 0,5\%$ και αβεβαιότητας $\pm 3\%$ (στην περιοχή των μηκών κύματος ενδιαφέροντος). Το ίδιο ισχυόμετρο χρησιμοποιήθηκε και για τις μετρήσεις με το διοδικό laser συνεχούς λειτουργίας (RLTMDL-808-1W), όμως με τη θερμική κεφαλή S415C (ThorLabs, Germany), διακριτικής ικανότητας 100 μ W, γραμμικότητας $\pm 0,5\%$ και αβεβαιότητας $\pm 5\%$ (στην περιοχή των μηκών κύματος

ενδιαφέροντος). Αξίζει να σημειωθεί πως, παρόλο που το femtosecond laser είναι παλμικό, χρησιμοποιήθηκε το ισχυόμετρο και όχι το ενεργόμετρο για τη μέτρηση της εξόδου του, λόγω της πολύ υψηλής επαναληπτικότητάς του.

- Για τη μέτρηση της ενέργειας του παλμικού Nd:YAG laser χρησιμοποιήθηκε ενεργόμετρο (Nova, Ophir, Israel), με πυροηλεκτρικές κεφαλές (PE50-DIF-V2 ROHS και PE25BB-S-DIF, Ophir, Israel) με διακριτική ικανότητα 50 και 200 μJ , αντίστοιχα, γραμμικότητα $\pm 2\%$ και αβεβαιότητα $\pm 2\%$ (στην περιοχή των μηκών κύματος ενδιαφέροντος).



Εικόνα 20. Αντιπροσωπευτική εικόνα της διάταξης μέτρησης της ενέργειας εξόδου του laser.

6.2.5 Διάμετρος δέσμης

Για την εκτίμηση της διαμέτρου της δέσμης μετρήθηκε το αποτύπωμά της σε μαύρο χαρτόνι, με τη βοήθεια συστήματος μικροσκοπίου με σταυρόνημα και δυνατότητα μικρομετρικών μετακινήσεων. Σε όσες περιπτώσεις η δέσμη δεν προκαλούσε κάποια ορατή αλλοίωση, πάρθηκαν φωτογραφίες κατά την πρόσπωσή της σε μαύρο χαρτόνι και αναλύθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ (1.50i – National Institutes of Health, US). Πιο συγκεκριμένα, αφού οι φωτογραφίες μετατράπηκαν σε νέες, με αποχρώσεις του

γκρι, υπολογίστηκε το ήμισυ στο μισό του μεγίστου (Full Width at Half Maximum – FWHM) του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας.

Όπως είναι γνωστό, στην περίπτωση των γκαουσιανών δεσμών, η ακτίνα (w) της δέσμης υπολογίζεται κυρίως στην περιοχή που ο ρυθμός ροής της ακτινοβολίας έχει μειωθεί είτε στο μισό (FWHM) είτε στο $1/e^2$ (~13,5%) της μέγιστης τιμής της. Τα παραπάνω μεγέθη συνδέονται μέσω της σχέσης:

$$2w = \frac{FWHM\sqrt{2}}{\sqrt{\ln 2}} = 1,699 \cdot FWHM, \quad (11)$$

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το ευρέως αποδεκτό $1/e^2$, που χρησιμοποιείται από τους οργανισμούς American National Standard και Federal Aviation Administration, εκτός εάν αναφέρεται κάτι διαφορετικό κατά περίπτωση. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως, σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης (International Organization for Standardization - ISO), η διάμετρος δέσμης ορίζεται μέσω του $D4\sigma$, που ισούται με το τετραπλάσιο της τυπικής απόκλισης της κατανομής του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας, κατά μήκος του κύριου και δευτερεύοντος άξονά της. Για ιδανικές γκαουσιανές δέσμες, οι διάμετροι που ορίζονται με το $1/e^2$ και το $D4\sigma$ ταυτίζονται [169–171].

6.3 Πειράματα Φάσης I

6.3.1 Εισαγωγή

Η πρώτη φάση των πειραμάτων της παρούσας ενότητας λειτούργησε ως προπαρασκευαστικό στάδιο και περιελάμβανε την ακτινοβολή απλών γεωμετριών. Αυτές αναπαριστούσαν καρκινική περιοχή στην οποία συγκεντρώνονταν τα νανοσωματίδια, η οποία περιβαλλόταν από υγιή ιστό.

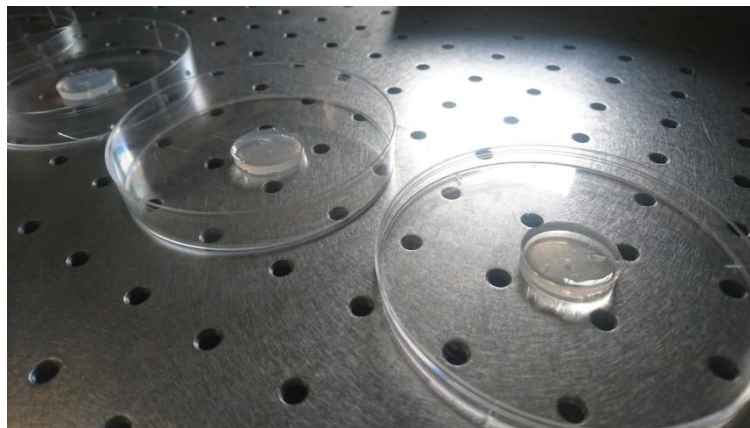


Εικόνα 21. Φωτογραφική αποτύπωση δέσμης για τη μετέπειτα επεξεργασία της και μέτρηση της διαμέτρου της.

6.3.2 Κατασκευή ομοιωμάτων

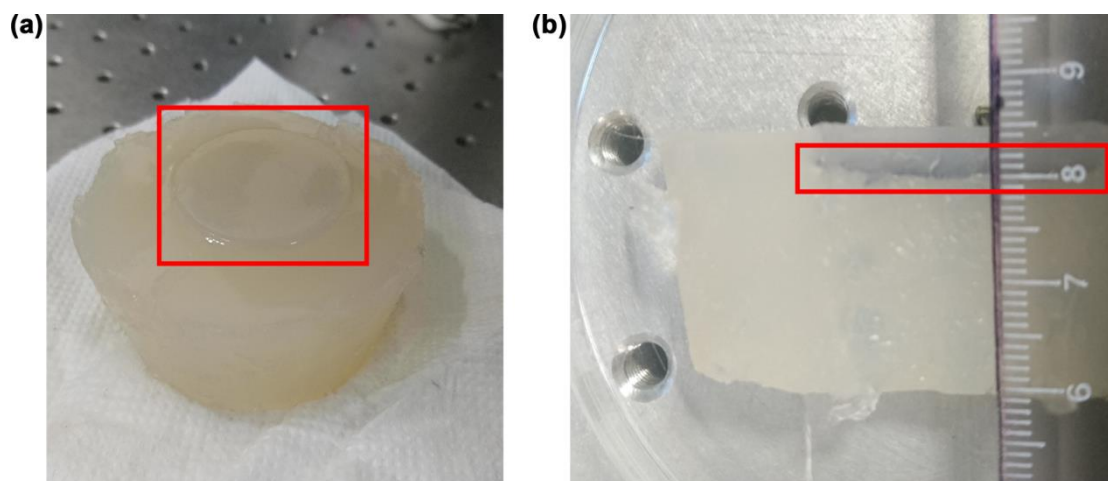
Ως γνωστόν, οι μαλακοί ιστοί αποτελούνται από πολύ υψηλά ποσοστά νερού (π.χ. για τον άνθρωπο και για τον αρουραίο ποσοστά άνω του 60% [172]), επομένως η χρήση νερού ως κύριο συστατικό για την κατασκευή ομοιωμάτων είναι μια βιβλιογραφικά συνηθισμένη επιλογή [173,174]. Ως εκ τούτου, για την κατασκευή των ομοιωμάτων χρησιμοποιήθηκε μόνο νερό και σκόνη αγαρόζης.

Πιο συγκεκριμένα, για την κατασκευή της ενεργού περιοχής (που περιείχε νανοδομές) θερμάνθηκε απεσταγμένο νερό (όγκου $V = 3 \text{ ml}$) έως τους $\sim 95 \text{ }^\circ\text{C}$, περιέχοντας άγαρ σε περιεκτικότητα 2% w/v. Σε αυτό προστέθηκαν σφαιρικά νανοσωματίδια χρυσού (AuTiO_2) και το παχύρευστο υλικό χυτεύθηκε σε πλαστική κυλινδρική μήτρα, με επιφάνεια βάσης $7,1 \text{ cm}^2$ και ύψος $0,5 \text{ cm}$. Αφού το ομοίωμα ψύχθηκε και έλαβε στερεή μορφή, αφαιρέθηκε από τη μήτρα και τοποθετήθηκε στο κέντρο πλαστικού τρυβλίου (βλ. **εικόνα 22**), το οποίο εν συνεχεία πληρώθηκε με υδατικό διάλυμα σκόνης αγαρόζης, περιεκτικότητας επίσης 2% w/v. Το τελικό αποτέλεσμα ήταν η δημιουργία μίας ενεργού περιοχής που περιείχε τις νανοδομές και στην οποία προσέπιπτε η δέση του laser, αναπαριστώντας την υπό θεραπεία περιοχή. Αυτή περιβαλλόταν από το ίδιο υλικό, με τη διαφορά της έλλειψης νανοσωματιδίων, που δρούσε ως ο πέριξ υγιής ιστός. Αξίζει να αναφερθεί πως η διαδικασία παρουσίασε το σημαντικό μειονέκτημα της μηχανικής καταπόνησης του ομοιώματος κατά την εξαγωγή του καθώς και της αδυναμίας στήριξής του σε σύστημα με δυνατότητα μικρομετακινήσεων. Παρόλα αυτά, όσα ομοιώματα εξήχθησαν ακέραια χρησιμοποιήθηκαν για την ακτινοβόληση.



Εικόνα 22. Η ενεργός περιοχή (που περιείχε τις νανοδομές) ομοιωμάτων που κατασκευάστηκαν σε πλαστικές μήτρες εντός τρυβλίων, προτού πληρωθούν με υδατικό διάλυμα αγαρόζης.

Ένας δεύτερος τύπος ομοιωμάτων κατασκευάστηκε με τον ίδιο τρόπο, αναφορικά με το τμήμα που περιείχε τις νανοδομές. Η διαφορά έγκειτο στο γεγονός πως, προκειμένου να υπάρχει επαφή με το υδατικό διάλυμα αγαρόζης, με την πλευρική επιφάνεια αλλά και με την κάτω βάση του κυλίνδρου, η ενεργός περιοχή ενσωματώθηκε στην άνω επιφάνεια κόλουρου κώνου, ύψους 2,5 cm, μεγάλης διαμέτρου 6,0 cm και μικρής διαμέτρου 5,2 cm, όπως φαίνεται και στην **εικόνα 23**.



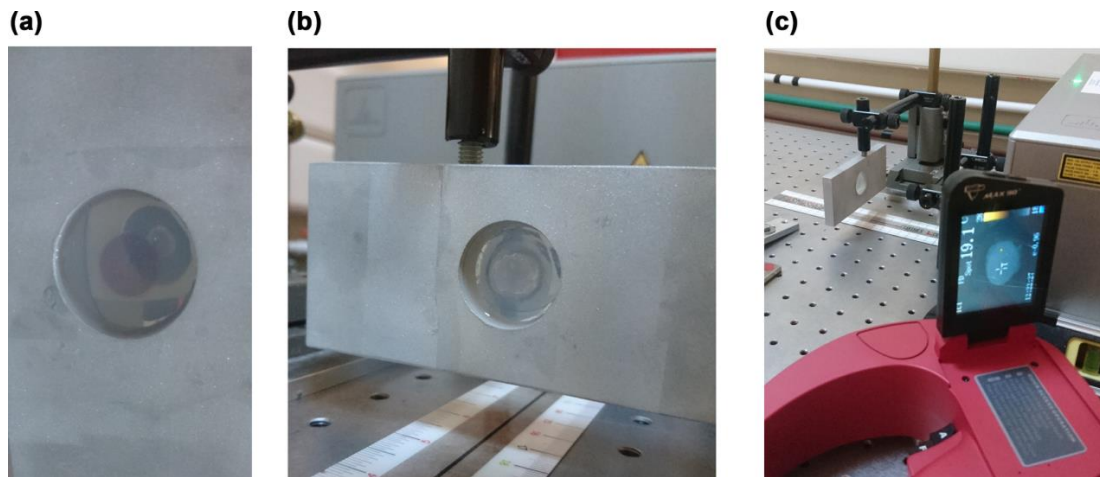
Εικόνα 23. Ο δεύτερος τύπος ομοιωμάτων. **(a)** Διακρίνεται η ενεργός περιοχή στην άνω επιφάνεια του κόλουρου κώνου (εντός ερυθρού πλαισίου). **(b)** Εγκάρσια τομή του ίδιου ομοιώματος. Όπως είναι ορατό και δια γυμνού οφθαλμού, οι νανοδομές έχουν κατακαθίσει στο κάτω τμήμα της ενεργούς περιοχής (επισημαίνονται εντός ερυθρού πλαισίου).

Ο τρίτος τύπος ομοιωμάτων περιελάμβανε δύο υπο-τύπους ενεργού περιοχής, έναν με νανοσωματίδια χρυσού με επικάλυψη διοξειδίου του τιτανίου και έναν με νανοσφαιρίδια χρυσού. Ο πρώτος υπο-τύπος κατασκευάστηκε με θέρμανση απεσταγμένου νερού 1 ml έως τους ~ 95 °C μαζί με άγαρ σε περιεκτικότητα 2% w/v. Ακολούθησε η προσθήκη σφαιρικών νανοσωματιδίων χρυσού (με επικάλυψη διοξειδίου του τιτανίου) και το παχύρευστο υλικό χύθηκε σε μεταλλική κυλινδρική μήτρα (αλουμίνιο αεροπορικού τύπου), κατασκευασμένη για τις ανάγκες του πειράματος, με επιφάνεια βάσης ~ 1 cm² και ύψος 1 cm. Η ενεργός περιοχή του δεύτερου υπο-τύπου, που κατασκευάστηκε σε ίδια μήτρα, είχε όγκο 0,3 ml (σχηματίζοντας κύλινδρο με ακτίνα βάσης 0,56 cm και ύψος $\sim 0,3$ cm) και περιεκτικότητα σε άγαρ 1,4% w/v. Σχετικά με την περιεκτικότητα των νανοσφαιριδίων Au, το φιαλίδιο με τις

νανοδομές είχε παραχθεί από 2,46 mg Au σε 15 ml H₂O (άρα η περιεκτικότητά του ήταν 0,164 mg/ml). Παίρνοντας 1 ml από το διάλυμα (άρα 0,164 mg Au) και θερμαίνοντάς το με τη διαδικασία του μπεν-μαρί (Bain-Marie) έως ότου μείνουν 0,1 ml, θεωρώντας ότι εξατμίστηκε μόνο νερό, είχαμε τελικώς 0,164 mg Au σε 0,1 ml διαλύματος. Σε αυτά προκειμένου να στερεοποιηθούν, προστέθηκαν 0,2 ml νερού που περιείχε άγαρ (2% w/v). Επομένως το τελικό διάλυμα είχε περιεκτικότητα σε νανοδομές 0,55 mg/ml. Μάλιστα, το υδατικό διάλυμα νανοσωματιδίων που χρησιμοποιήθηκε προσέδωσε ιώδες χρώμα, χαρακτηριστικό του μεγέθους τους [175].

Και στις δύο προαναφερθείσες περιπτώσεις, μετά την ψύξη της ενεργού περιοχής, αυτή αφαιρέθηκε από τη μήτρα και τοποθετήθηκε στο κέντρο παρόμοιου καλουπιού, αλλά διπλάσιας διαμέτρου. Εν συνεχεία, το κενό ανάμεσα στο πρώτο ομοίωμα (που περιείχε τα νανοσωματίδια) και τα τοιχώματα της νέας μήτρας πληρώθηκε από υδατικό διάλυμα αγαρόζης 2% w/v (χωρίς νανοδομές) που είχε παρασκευασθεί με την προαναφερθείσα διαδικασία. Προκειμένου να μην υπάρξει διαρροή του υλικού, η κάτω βάση του κυλίνδρου είχε κλειστεί με τη βοήθεια αντικειμενικού πλακιδίου που είχε προηγουμένως καθαριστεί με αλκοόλη, το οποίο αφαιρούνταν μετά τη στερεοποίηση του ομοιώματος. Με αυτόν τον τρόπο το δείγμα αποκτούσε επίπεδη επιφάνεια προς ακτινοβόληση και ταυτόχρονα ήταν «διαμπερές», παρέχοντας τη δυνατότητα μέτρησης του ρυθμού ροής της διερχόμενης ακτινοβολίας. Τα ανωτέρω φαίνονται και στην **εικόνα 24**.

Πρέπει να σημειωθεί πως λόγω της μικρής διαμέτρου του ομοιώματος, τα μεταλλικά τοιχώματα ήταν σχετικά κοντά στη δέσμη του laser. Επομένως, η επιφάνεια του μετάλλου είχε υποστεί κατάλληλη διεργασία (υαλοβολή με οξείδια του πυριτίου) προκειμένου να καταστεί τραχιά, για την αποφυγή ανακλάσεων.



Εικόνα 24. (a, b) Ο τρίτος τύπος ομοιώματος που κατασκευάστηκε. Στο κέντρο διακρίνεται η «ενεργός» περιοχή του που περιέχει νανοσφαίρες χρυσού των 50 nm και είναι ιώδους χρώματος. (c) Το ομοίωμα κατά την ακτινοβολήσή του με femtosecond laser.

6.3.3 Ακτινοβολήση ομοιωμάτων

Για την ακτινοβολήση των ομοιωμάτων, αυτά τοποθετήθηκαν έναντι της κεφαλής του εκάστοτε laser, σε κατάλληλη απόσταση ώστε να επιτυγχάνεται η επιθυμητή πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Λήφθηκε επίσης μέριμνα ούτως ώστε να είναι εφικτή η οπτική επαφή μεταξύ της περιοχής ακτινοβολήσης και του αισθητήρα υπερύθρων της θερμικής κάμερας (βλ. εικόνα 25). Επιπροσθέτως, τοποθετήθηκαν προστατευτικά παραπετάσματα από φελιζόλ επενδυμένο με μαύρο χαρτόνι, πίσω από το ομοίωμα, για προστασία από τη δέσμη. Κατά την αρχή του κάθε πειράματος λαμβάνονταν τρεις μετρήσεις της θερμοκρασίας με κλειστό το laser και ο μέσος όρος τους χρησιμοποιούνταν ως αρχική τιμή T_0 (τη χρονική στιγμή $t_0 = 0$).

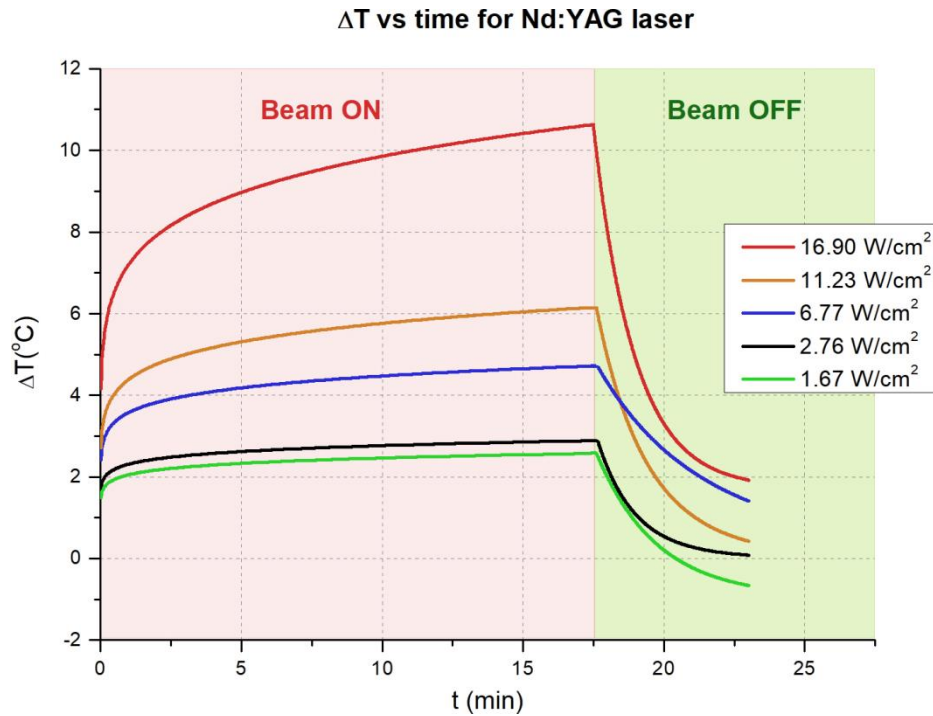


Εικόνα 25. Διάταξη ακτινοβολήσης ομοιώματος (επισημαίνεται εντός ερυθρού πλαισίου) με το Nd:YAG laser, η κεφαλή του οποίου διακρίνεται στο δεξιό μέρος της εικόνας. Στην κεντρική περιοχή φαίνεται η θερμική κάμερα.

6.3.4 Αποτελέσματα

Για τα ομοιώματα του πρώτου τύπου (που ακτινοβολήθηκαν εντός πλαστικού τρυβλίου) παρατηρήθηκε αλλοίωση του πλαστικού κατά την ακτινοβολήση. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα η καταγραφόμενη άνοδος της θερμοκρασίας να οφείλεται κυρίως στην αλληλεπίδραση της δέσμης με το πλαστικό και όχι με τα νανοσωματίδια και επομένως, οι αντίστοιχες μετρήσεις δεν συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα διατριβή. Το παραπάνω γεγονός επιβεβαιώθηκε με τη χρήση του δεύτερου τύπου ομοιωμάτων υπό τις ίδιες συνθήκες, τα οποία ήταν αυξημένου πάχους και δεν παρουσίασαν αντίστοιχη θερμοκρασιακή άνοδο.

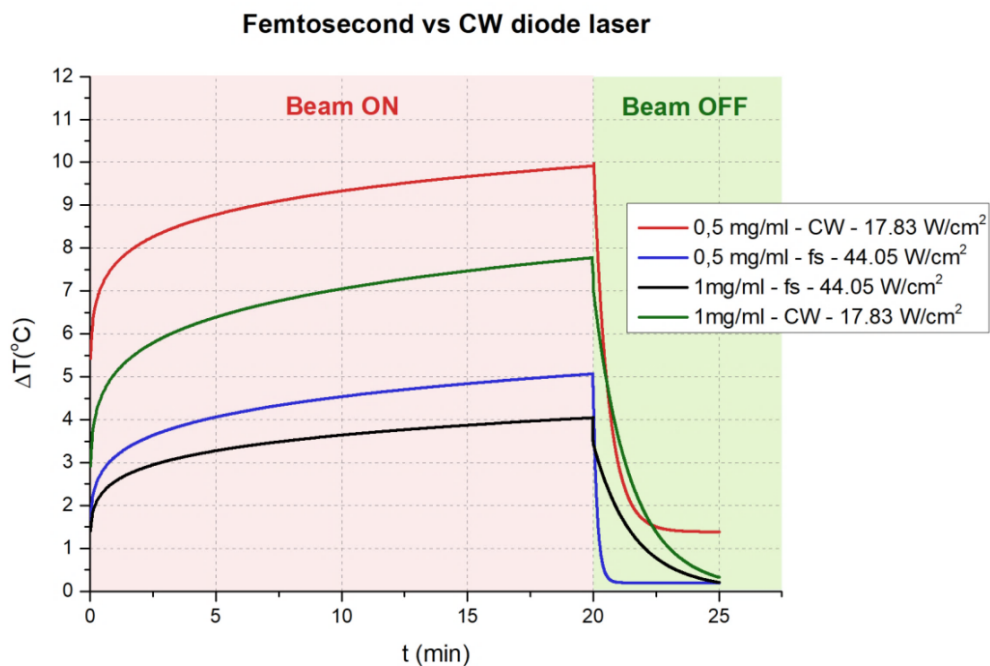
Στα γραφήματα της **εικόνας 26** παρουσιάζεται η επίδραση της πυκνότητας προσπίπτουσας ακτινοβολίας σε ομοίωμα του τρίτου τύπου. Το ομοίωμα περιείχε νανοσωματίδια AuTiO_2 (συγκέντρωσης $0,9 \text{ mg/ml}$) και ακτινοβολήθηκε με τη 2^η αρμονική ($\lambda = 532 \text{ nm}$) του Nd:YAG laser ($f = 10 \text{ Hz}$). Όπως διακρίνεται από τις σχετικές καμπύλες, κατά τη διάρκεια της 17λεπτης ακτινοβολήσης η θερμοκρασία βρισκόταν σε συνεχή άνοδο, η οποία παρουσίαζε λογαριθμική συμπεριφορά. Εν συνεχεία, με το κλείσιμο του laser, το ομοίωμα άρχισε να επιστρέφει στην αρχική του θερμοκρασία με εκθετικό τρόπο, σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [104]. Όπως αναμενόταν, μεγαλύτερες τιμές πυκνότητας προσπίπτουσας ακτινοβολίας οδήγησαν σε υψηλότερη θερμοκρασιακή άνοδο. Για $E < 3 \text{ W/cm}^2$, η μετρούμενη άνοδος της θερμοκρασίας ήταν οριακά άνω του ορίου ακρίβειας της θερμικής κάμερας.



Εικόνα 26. Θερμοκρασιακή μεταβολή κατά την ακτινοβολήση ομοιώματος με νανοσωματίδια AuTiO_2 (συγκέντρωσης 0,9 mg/ml), για διάφορες τιμές πυκνότητας προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Πηγή φωτός ήταν η 2^η αρμονική ($\lambda = 532$ nm) του Nd:YAG laser, επαναληπτικότητα 10 Hz.

Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκαν αρκετές ομάδες μετρήσεων αναφορικά με την ακτινοβολήση νανοσωματιδίων με δέσμες laser διαφορετικού μήκους κύματος από το μέγιστο απορρόφησης αυτών αλλά και διαφορετικού τρόπου λειτουργίας. Ως παράδειγμα παρατίθεται η περίπτωση ακτινοβολήσης ομοιώματος με νανοσωματίδια AuTiO_2 με δέσμες στα 807 και 808 nm, από παλμικό και συνεχές laser, αντίστοιχα (βλ. **εικόνα 27**). Η μετρούμενη θερμοκρασιακή άνοδος μετά από 15 min ακτινοβολήσης με το femtosecond laser ήταν της τάξης των 4 και 5°C, για ομοιώματα συγκέντρωσης 1 και 0,5 mg/ml, αντίστοιχα (η αντιστροφή στο αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε αποδόθηκε στην ανομοιογένεια των ομοιωμάτων). Πιο συγκεκριμένα, η τοπικά αυξημένη πυκνότητα των νανοσωματιδίων οδηγεί σε τοπική μεταβολή της κατανομής του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου (λόγω πλασματικών φαινομένων), γεγονός που έχει αντίκτυπο στη συνολικά απορροφούμενη ενέργεια. Θεωρητικά, όσο η συγκέντρωσή τους αυξάνεται, αυξάνεται και η απορρόφηση της ενέργειας της διαδιδόμενης δέσμης, με φυσικό επακόλουθο την άνοδο της καταγραφόμενης θερμοκρασίας. Για μεγαλύτερες τιμές συγκέντρωσης, η μείωση του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας της δέσμης λόγω απορρόφησης

οδηγεί σε φαινόμενα κορεσμού ενώ, για ακόμα υψηλότερες τιμές, η μικρή απόσταση μεταξύ των νανοσωματιδίων οδηγεί σε φαινόμενα προάσπισης (shielding) στο διαδιδόμενο πεδίο, με αποτέλεσμα τη μείωση της συνολικά απορροφούμενης ενέργειας. Μάλιστα, το παραπάνω φαίνεται να επιβεβαιώνεται μέσω προπαρασκευαστικών προσομοιώσεων που έχουν λάβει χώρα στον Τομέα Φυσικής του ΕΜΠ (εκτός της παρούσας έρευνας), από τον Επ. Καθ. Γεώργιο Τσιγαρίδα. Αντιθέτως, ακτινοβολήση με τη 2^η αρμονική ($\lambda = 532 \text{ nm}$) του Nd:YAG laser οδήγησε σε θερμοκρασιακή άνοδο της τάξης των $10,5^\circ\text{C}$ καθώς ήταν σε συμφωνία με το φάσμα απορρόφησης των νανοδομών. Προς αποφυγή παράθεσης παρόμοιων μετρήσεων, ο αναγνώστης παραπέμπεται και στα γραφήματα της **εικόνας 26**. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως η χρήση ταχέων και υπερταχέων παλμών θα πρέπει να γίνεται με προσοχή, καθώς μπορούν να προκαλέσουν μεταβολές στο σχήμα των νανοσωματιδίων και άρα στις ιδιότητές τους [176].

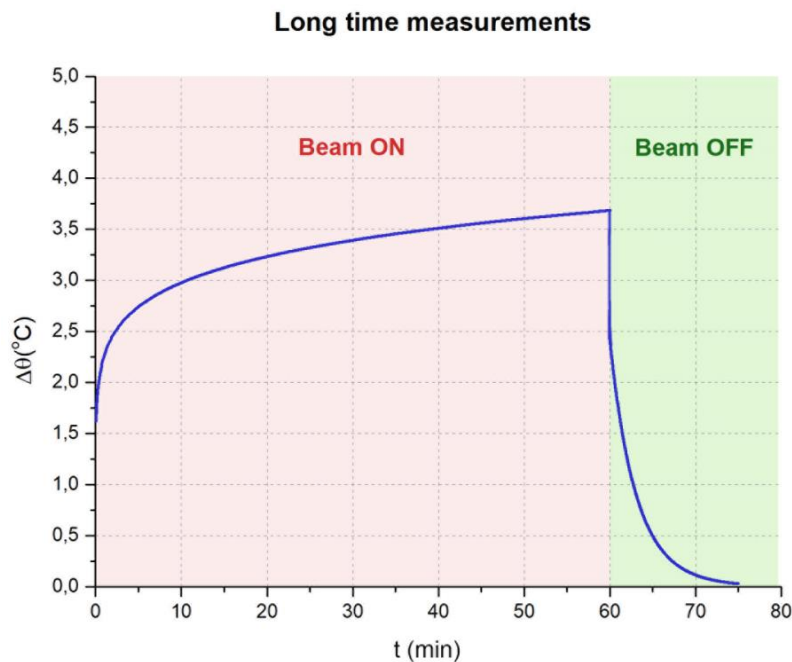


Εικόνα 27. Σύγκριση της θερμοκρασιακής μεταβολής κατά την ακτινοβολήση ομοιώματος με νανοσωματίδια AuTiO_2 , για το ίδιο μήκος κύματος δέσμης. Χρησιμοποιήθηκε το συνεχές (CW) διοδικό laser RLTM DL-808-1W ($\lambda = 808 \text{ nm}$) και το παλμικό (fs) femtosecond laser ($\lambda = 807 \text{ nm}$).

Επίσης, ελέγχθηκε κατά πόσο μία πιθανή μεταβολή στην επαναληπτικότητα του laser μπορεί να αντισταθμίσει την ασυμφωνία μεταξύ

του μήκους κύματος της δέσμης και της κορυφής απορρόφησης των νανοδομών. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της 1^{ης} αρμονικής του Nd:YAG laser ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) στις νανοδομές AuTiO₂, για τιμές επαναληπτικότητας 3 και 5 Hz. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κρίθηκαν ως μη αξιολογήσιμα καθότι η μετρούμενη διακύμανση της θερμοκρασίας ήταν μικρότερη από την ακρίβεια της θερμικής κάμερας με την οποία πραγματοποιήθηκε η μέτρηση (ως εκ τούτου τα αντίστοιχα γραφήματα δεν συμπεριλήφθηκαν). Παρόλα ταύτα, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα της μεγάλης σημασίας της συμφωνίας μήκους κύματος της δέσμης με το φάσμα απορρόφησης των νανοδομών.

Τέλος, όσον αφορά τη διάρκεια των παραπάνω μετρήσεων, αυτή υπερβαίνει αρκετά τον αναμενόμενο χρόνο της φωτοθερμικής θεραπείας των *in vivo* μελετών, επιλέχθηκε όμως να μελετηθεί για λόγους πληρότητας της διατριβής. Σε κάθε περίπτωση, η επίδραση του χρόνου ακτινοβολήσης στη θερμοκρασιακή άνοδο φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 28, για την περίπτωση της ακτινοβολήσης με το femtosecond laser. Σύμφωνα με αυτό, καταδεικνύεται η σημαντικότητα της συνεισφοράς των πρώτων λεπτών της ακτινοβολήσης, καθόσον εντός των 5 πρώτων λεπτών η θερμοκρασία καταγράφει το 75% της συνολικής ανόδου της.



Εικόνα 28. Μετρήσεις μεγάλης διάρκειας (long time measurements) για την ακτινοβολήση ομοιώματος που περιείχε νανοσφαίρες χρυσού, συγκέντρωσης 0,55

mg/ml, με femtosecond laser ($E = 17,82 \text{ W/cm}^2$). Τα πρώτα 5 min της ακτινοβόλησης η θερμοκρασία έχει ανέλθει στο 75% της μέγιστης τιμής της.

6.4 Πειράματα Φάσης II

6.4.1 Εισαγωγή

Προκειμένου να συλλεχθούν δεδομένα από ρεαλιστικότερες γεωμετρίες ομοιωμάτων, πραγματοποιήθηκε και μία δεύτερη φάση πειραμάτων. Απώτερος σκοπός τους ήταν η χρήση τους για τη δοσιμετρία *in vivo* μελετών.

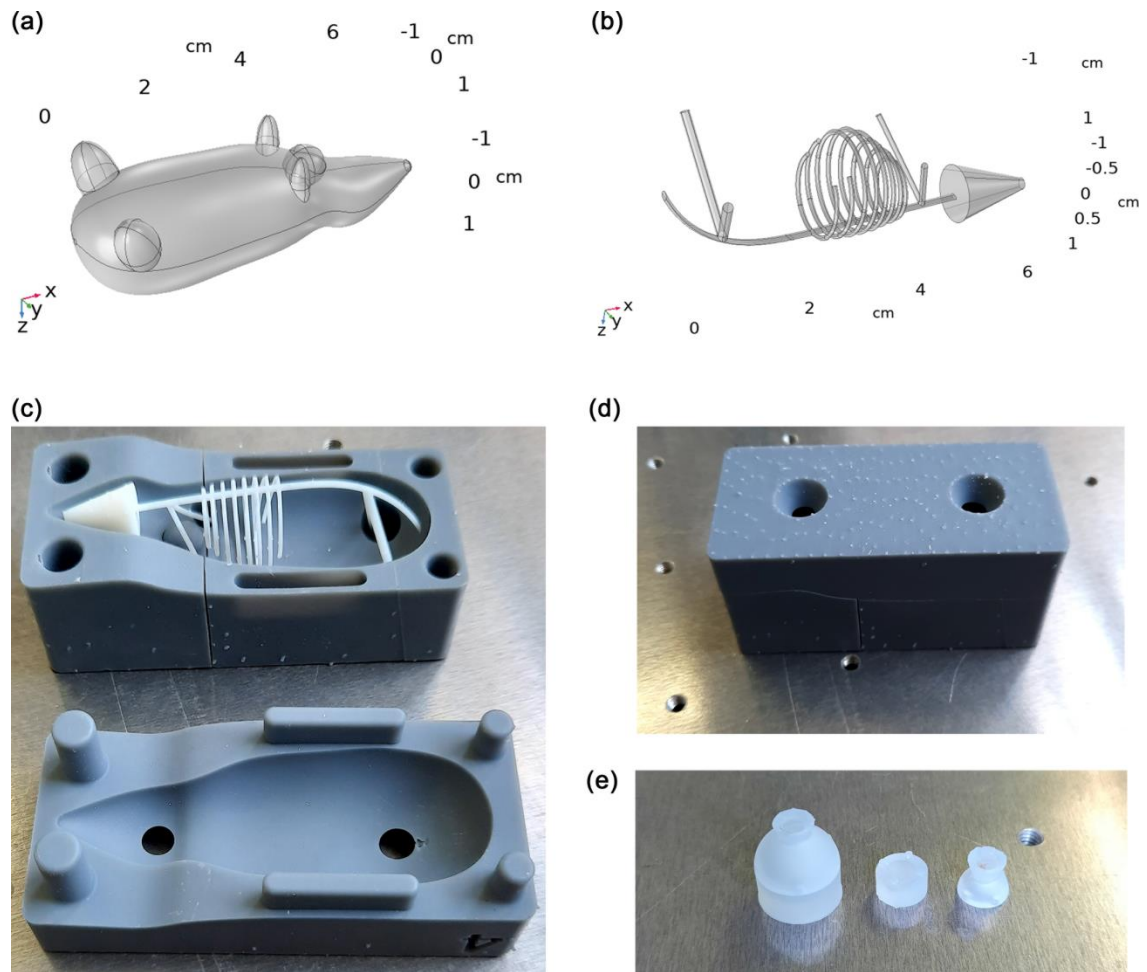
6.4.2 Κατασκευή ομοιωμάτων

Αρχικά, η προς αναπαράσταση γεωμετρία σχεδιάστηκε στο COMSOL Multiphysics (για περισσότερες πληροφορίες αναφορικά με το εν λόγω λογισμικό, ο αναγνώστης παραπέμπεται στο επόμενο κεφάλαιο). Αφορούσε μυσ σε ρεαλιστική κλίμακα, που αποτελούνταν από τον σκελετό του (ουρά, σπονδυλική στήλη, πλευρές, κρανίο και άκρα), τους οφθαλμούς, τη μύτη, τα ώτα, τον καρκινικό όγκο και τον κορμό με τα άκρα του. Τόσο ο κορμός, το κρανίο, ο όγκος και τα άκρα, όσο και η ουρά καλύπτονταν από δέρμα. Για τη σχεδίαση του κορμού χρησιμοποιήθηκαν ελλείψεις, διαφορετικών διαστάσεων και θέσεων στο επίπεδο, οι οποίες ενώθηκαν με τη μέθοδο «loft». Όσον αφορά τους οφθαλμούς, τη μύτη και τον όγκο, σχεδιάστηκαν ως σφαίρες, ενώ τα ώτα ως ελλείψεις. Αναφορικά με τα οστά, το κρανίο αναπαραστάθηκε από έναν κόλουρο κώνο, οι πλευρές ως ελλείψεις και τα άκρα ως επιμήκεις κύλινδροι. Η σπονδυλική στήλη και η ουρά χαράχθηκαν ως καμπύλες στο επίπεδο x-y. Εν συνεχεία, στην άκρη κάθε καμπύλης και με κέντρο αυτή, σχεδιάστηκε κύκλος στο επίπεδο x-z. Με τη μέθοδο «sweep» ο κύκλος σάρωσε την καμπύλη έως το άλλο άκρο της, σχηματίζοντας τη σπονδυλική στήλη και την ουρά, αντίστοιχα. Με την παραπάνω κατασκευαστική μεθοδολογία προκύπτουν εσωτερικά σημεία επικάλυψης των δομών κατά την ενοποίησή τους, τα οποία αφαιρέθηκαν απενεργοποιώντας τη λειτουργία «keep input objects». Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως στην αναζήτηση που πραγματοποιήθηκε σε βάσεις δεδομένων τρισδιάστατων ψηφιακών δομών (π.χ. GrabCAD), τα διαθέσιμα ρεαλιστικά μοντέλα για μύες και κυρίως για το σκελετό τους ήταν εξαιρετικά περιορισμένα. Όσον αφορά χρήση παρόμοιων μοντέλων σε επιστημονικά

άρθρα, αυτά είναι είτε υπεραπλουστευτικά [177] είτε προέρχονται από δεδομένα που έχουν ληφθεί με απεικονιστικές τεχνικές ζωντανών μυών [178].

Εν συνεχεία, σε συνεννόηση με το μηχανουργείο που ανέλαβε την κατασκευή των καλουπιών, η γεωμετρία απλοποιήθηκε προκειμένου να είναι πιο εφικτή η τρισδιάστατη εκτύπωσή της. Ως εκ τούτου, αφαιρέθηκε το δέρμα, η ουρά, οι οφθαλμοί, τα ότα και το κάτω τμήμα των άκρων, ενώ η όλη γεωμετρία μεγεθύνθηκε κατά ποσοστό της τάξης του 10%. Η δομή που προέκυψε (βλ. **εικόνα 29 (a)**) αφαιρέθηκε από το εσωτερικό ορθογώνιου παραλληλογράμμου, ώστε να δημιουργηθεί το καλούπι (βλ. **εικόνα 29 (c)**), στο άνω τμήμα του οποίου υπήρχαν δύο οπές (βλ. **εικόνα 29 (d)**) για την πλήρωσή του με το επιθυμητό υλικό. Όσον αφορά τον σκελετό, αυτός χωρίστηκε από την υπόλοιπη γεωμετρία (βλ. **εικόνα 29 (b)**), προκειμένου να κατασκευαστεί από ρητίνη λευκού χρώματος, με την τεχνική τρισδιάστατης εκτύπωσης SL (stereolithography), ώστε να προσομοιώνει τα οστά.

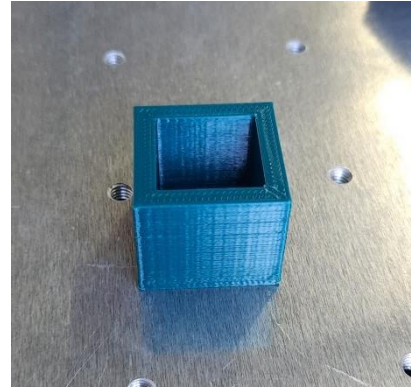
Πέραν της ρεαλιστικότητας του μοντέλου, ιδιαίτερη μέριμνα δόθηκε και στη δυνατότητα αναπαράστασης καρκινικού όγκου, στον οποίο έχουν εγχυθεί νανοδομές. Προκειμένου να υπάρχει διαφορετική συγκέντρωση νανοσωματιδίων στην περιοχή του όγκου και στο υπόλοιπο σώμα, ο όγκος κατασκευάστηκε ως ξεχωριστή δομή. Στην περιοχή ανάμεσα στα μπροστά άκρα και στο λαιμό του ομοιώματος του κορμού, δημιουργήθηκε μια κοιλότητα σχήματος ημισφαιρίου, στην οποία τοποθετούνταν σε δεύτερο χρόνο η σφαίρα γέλης αγαρόζης που περιείχε τις νανοδομές. Για την παρασκευή της σχεδιάστηκε και εκτυπώθηκε με την τεχνική SL κυλινδρική μήτρα, αποτελούμενη από άνω και κάτω μέρος, στο εσωτερικό της οποίας υπήρχε σφαιρική οπή όγκου 0,9 ml. Για την πλήρωσή της με γέλη αγαρόζης, δημιουργήθηκε κατάλληλη οπή στο άνω τμήμα του κυλίνδρου (βλ. **εικόνα 29 (e)**).



Εικόνα 29. Κατασκευή ρεαλιστικών καλουπιών για αναπαράσταση μυός με όγκο στο κάτω μέρος του λαιμού του. **(a)** Το εξωτερικό περίβλημα, όπως σχεδιάστηκε στο COMSOL Multiphysics. Ακριβώς μπροστά από τα δύο μπροστινά άκρα διακρίνεται ο σφαιρικός όγκος. **(b)** Ο σκελετός του μυός που αποτελούνταν από τα βασικά δομικά οστά, όπως σχεδιάστηκε στο COMSOL Multiphysics. **(c)** Το εκτυπωμένο (από τρισδιάστατο εκτυπωτή) καλούπι ανοικτό, με το σκελετό στη θέση του. Περιμετρικά διακρίνεται ο μηχανισμός ταιριάσματος / στήριξης του άνω και κάτω τμήματος του καλουπιού. **(d)** Το καλούπι κλειστό. Στο άνω μέρος του διακρίνονται οι οπές πλήρωσής του. **(e)** Καλούπια κατασκευής σφαιρικών όγκων. Το αριστερά είναι κλειστό, ενώ δίπλα του διακρίνεται ίδιου τύπου, αλλά μικρότερου μεγέθους, ανοικτό καλούπι.

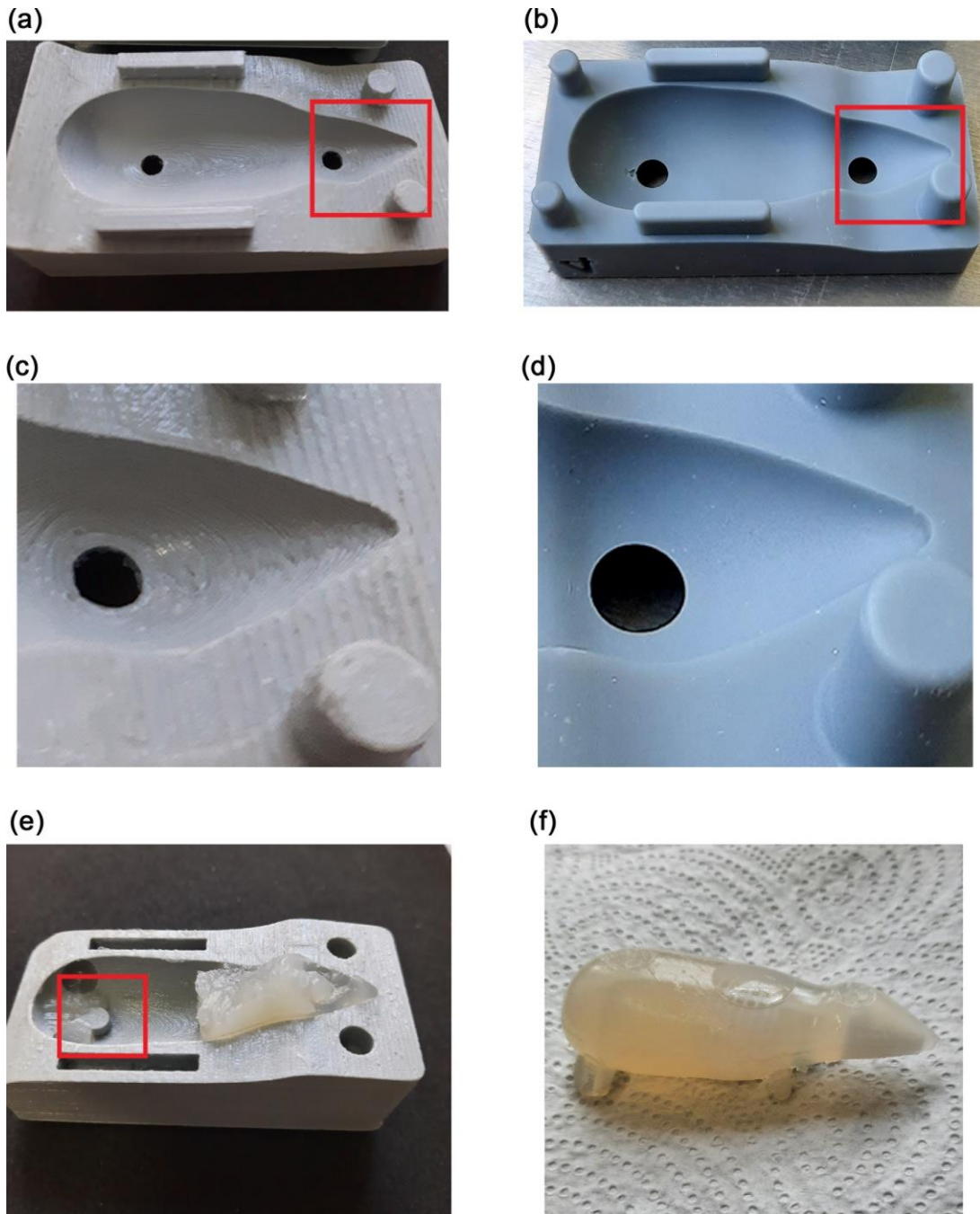
Για την επιλογή του υλικού και της μεθόδου κατασκευής των καλουπιών, πριν το τελικό στάδιο κατασκευής τους, πραγματοποιήθηκαν μελέτες στατικότητας, στεγανότητας, αντοχής στη θερμότητα (το διάλυμα αγαρόζης εγχύνεται σε θερμοκρασία άνω των 50°C) και αρτιότητας κατά την εξαγωγή του ομοιώματος. Έτσι, αρχικά κατασκευάστηκε μία απλή κυβική δομή (βλ. **εικόνα 30**) με την τεχνική FDM (fused deposition modeling) και θερμοπλαστικό νήμα

PLA (polylactic acid), η οποία αποδείχθηκε επαρκώς στατική, στεγανή και θερμοάντοχη, αλλά, λόγω της μη λείας επιφάνειάς της, το ομοίωμα δεν μπορούσε να εξαχθεί ακέραιο. Η επόμενη δοκιμή έγινε με το ρεαλιστικό μοντέλο που περιγράφηκε ανωτέρω (χωρίς την 10% μεγέθυνση). Εκτυπώθηκε με την τεχνική FDM και θερμοπλαστικό νήμα PLA. Για την ευκολότερη εξαγωγή του ομοιώματος, είχαν ενσωματωθεί στο κάτω τμήμα του δύο



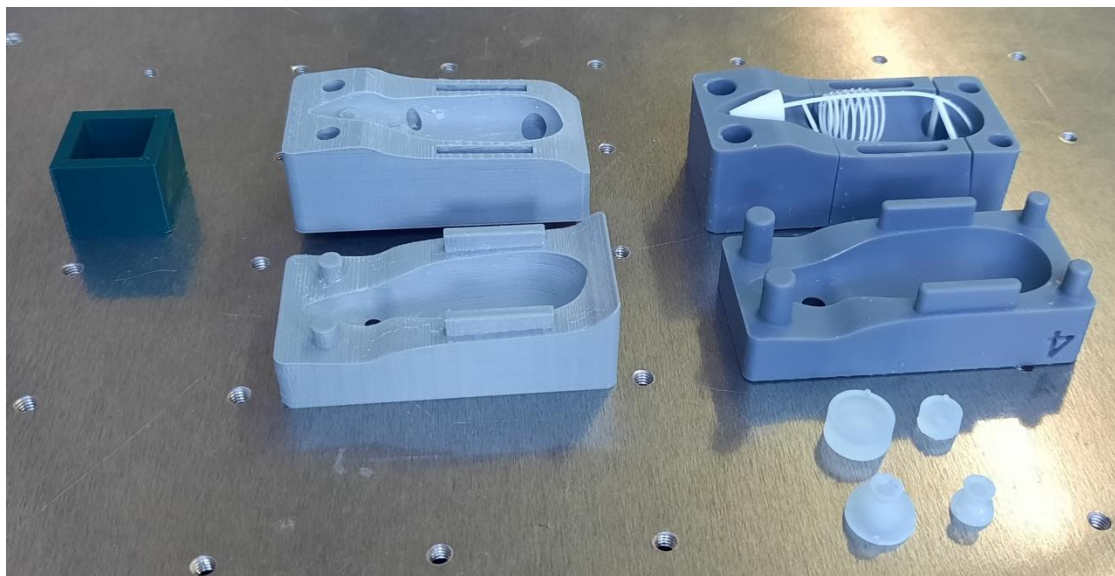
Εικόνα 30. Δοκιμαστικό καλούπι κυβικής δομής.

κυλινδρικά έμβολα με δυνατότητα κατακόρυφης μετακίνησης, τα οποία το πίεζαν από την κάτω πλευρά του (στην κοιλιακή περιοχή και στην περιοχή του λαιμού). Όπως αποδείχθηκε, το συγκεκριμένο καλούπι ήταν στατικά επαρκές και θερμοάντοχο. Παρόλα ταύτα, παρουσίαζε διαρροή υλικού από την περιοχή των εμβόλων καθώς και αυξημένη δυσκολία απόσπασης του ομοιώματος (λόγω της μη-λείας επιφάνειάς του). Επιπροσθέτως, λόγω της περιορισμένης μηχανικής αντοχής της γέλης αγαρόζης, η πίεση από τα έμβολα προκάλεσε τη θραύση του ομοιώματος (βλ. **εικόνα 31 (e)**). Ως εκ τούτου, εγκαταλείφθηκε η ιδέα χρήσης κατακόρυφων κυλίνδρων για την εξαγωγή του ομοιώματος και αντί αυτών, το κάτω τμήμα του νέου καλουπιού χωρίστηκε σε δύο μέρη (βλ. **εικόνα 29 (c)**). Επίσης, καθώς παρατηρήθηκε δυσκολία κατά την εξαγωγή των άκρων, η όλη γεωμετρία μεγεθύνθηκε κατά 10% για ενίσχυση της μηχανικής της αντοχής. Πέρα των ανωτέρω, το τελευταίο καλούπι κατασκευάστηκε (βλ. **εικόνες 29 και 31 (b, d)**) με διαφορετική τεχνική, προς μείωση της τραχύτητας της εσωτερικής επιφάνειας. Η τεχνική ήταν η SL, ενώ χρησιμοποιήθηκε ρητίνη, κατάλληλη για τη χύτευση ομοιωμάτων πλαστικού και σιλικόνης. Το τελικό καλούπι κρίθηκε κατάλληλο προς χρήση καθώς συνδύαζε την απαραίτητη μηχανική αντοχή, στεγανότητα, θερμοαντοχή και ακεραιότητα του εξαχθέντος ομοιώματος. Το σύνολο των κατασκευασθέντων καλουπιών φαίνεται στην **εικόνα 32**.



Εικόνα 31. Σύγκριση της δυνατότητας άρτιας εξαγωγής του ομοιώματος σε σχέση με το είδος του καλούπιού. Το άνω τμήμα καλούπιού εκτυπωμένο με την τεχνική **(a)** FDM (fused deposition modeling) και θερμοπλαστικό νήμα PLA (polylactic acid) και **(b)** SL (stereolithography) και ρητίνη, κατάλληλης για τη χύτευση ομοιωμάτων πλαστικού και σιλικόνης. **(c, d)** Μεγέθυνση των, επισημασμένων με πλαίσιο ερυθρού χρώματος, περιοχών των εικόνων **(a, b)** αντίστοιχα. **(e)** Ανεπιτυχής προσπάθεια εξαγωγής του ομοιώματος που κατασκευάστηκε με το καλούπι της εικόνας **(a)**, σε αντίθεση με την εύκολη και άρτια εξαγωγή **(f)** με τη χρήση του καλούπιού της εικόνας **(b)**. Στην εικόνα **(e)** διακρίνεται εντός πλαισίου ερυθρού χρώματος το έμβολο για την αφαίρεση του ομοιώματος.

Αναφορικά με τη διαδικασία παρασκευής του διαλύματος αγαρόζης στα ανωτέρω, ακολουθήθηκαν οι ίδιες διαδικασίες με τα πειράματα της Φάσης Ι. Κύρια διαφορά ήταν η συνεχής ανάδευση του διαλύματος με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα Vortex, μετά την απομάκρυνσή του από το μπεν-μαρί (βλ. **εικόνα 34 (b)**). Η ανάδευση διαρκούσε όσο το διάλυμα ήταν αρκετά παχύρρευστο προκειμένου να μπορεί να χυτευθεί εντός του καλουπιού, αλλά ταυτόχρονα όχι τόσο υδαρές ώστε τα νανοσωματίδια να συγκεντρωθούν στο κάτω μέρος του. Η θερμοκρασία, στην οποία ικανοποιούνταν οι παραπάνω δύο προϋποθέσεις, ήταν στο εύρος 45 – 50°C.

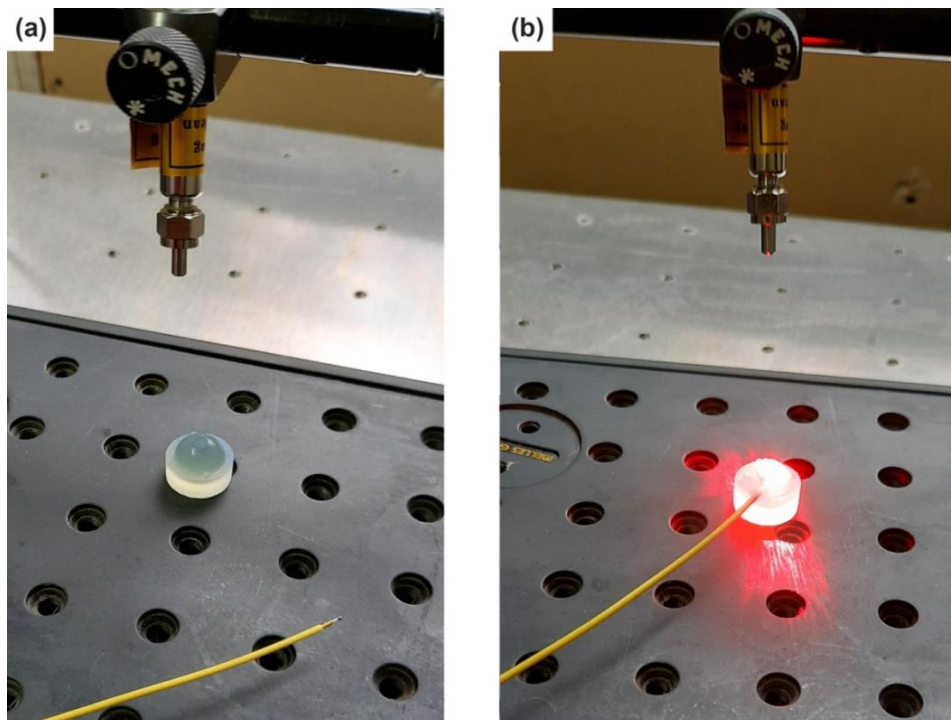


Εικόνα 32. Εποπτική εικόνα του συνόλου των καλουπιών που κατασκευάστηκαν για τις ανάγκες της Φάσης II της μελέτης.

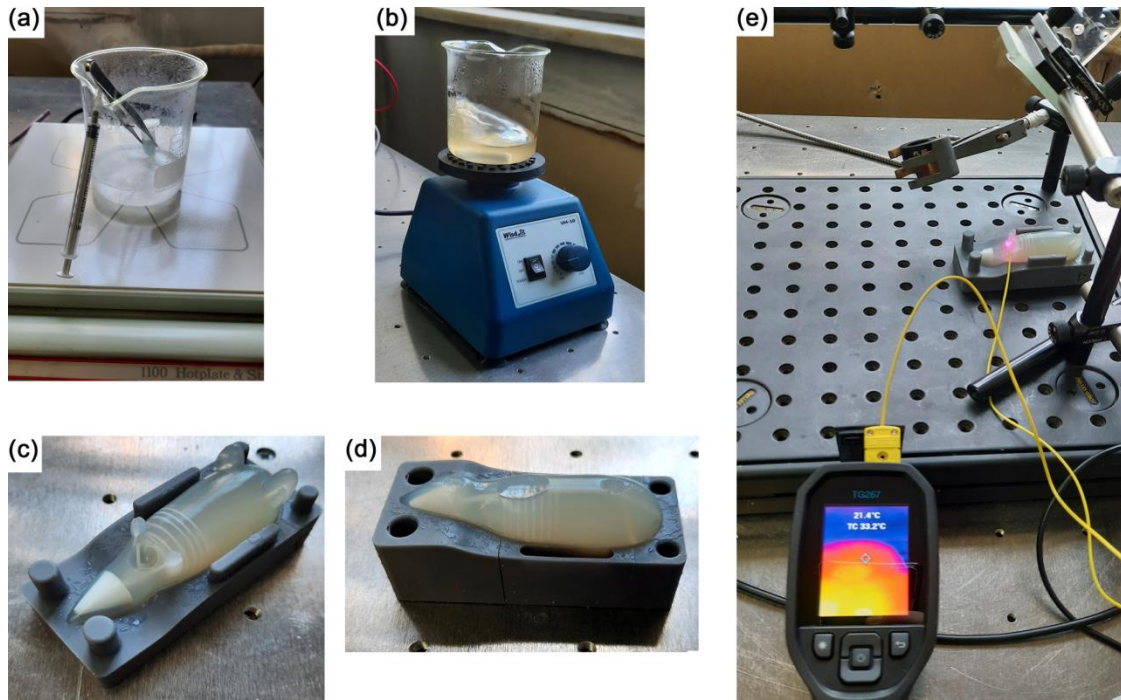
6.4.3 Ακτινοβολήση ομοιωμάτων

Για τη μελέτη της θερμοκρασιακής ανόδου κατά την ακτινοβολήση του ομοιώματος χρησιμοποιήθηκαν οι διατάξεις που φαίνονται στις **εικόνες 33 και 34 (e)**. Η πρώτη περίπτωση αφορούσε ακτινοβολήση μόνο της σφαίρας εντός του κάτω τμήματος του καλουπιού της ενώ η δεύτερη ακτινοβολήση μετά την ενσωμάτωσή της στον κορμό του ομοιώματος. Οι ακτινοβολήσεις έγιναν με τα διοδικά laser MRL-I-660 και RLTM DL-808-1W (βλ. § [6.2.2 Πηγές φωτός](#)). Όσον αφορά το πρώτο, η δέσμη του laser οδηγήθηκε μέσω οπτικής ίνας στην προς ακτινοβολήση περιοχή, με την πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας

να ορίζεται στα 127 και 229 mW/cm². Αντιθέτως, στην περίπτωση του laser των 808 nm, καθώς η έξοδος του ήταν ελεύθερη, χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο κάτοπτρο για την οδήγηση της δέσμης στην περιοχή του όγκου. Η πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας ήταν 0,4 και 4 W/cm², αντίστοιχα. Ο χρόνος ακτινοβολήσης σε όλες τις περιπτώσεις ήταν 6 min, ενώ η καταγραφή της θερμοκρασίας συνεχίστηκε για επιπλέον 2 min, προκειμένου να μελετηθεί και η θερμική αποκατάσταση του ομοιώματος. Για τις συγκεκριμένες μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν τα νανοκελύφη χρυσού GSLN800 NanoXact™ και οι νανοράβδοι GRCN660 NanoXact™ (βλ. § [6.2.1 Νανοσωματίδια](#)). Ο κορμός και ο σφαιρικός όγκος κατασκευάστηκαν με γέλη αгарόζης, περιεκτικότητας 2% w/v. Αναφορικά με τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στην σφαιρική περιοχή, ήταν 0,05 και 0,032 mg/ml για τις νανοσφαίρες και για τις νανοράβδους, αντίστοιχα. Η μέτρηση της θερμοκρασίας έγινε με χρήση του αισθητήρα / θερμοζεύγους της θερμικής κάμερας (Flir), ο οποίος είχε τοποθετηθεί λίγο πιο πάνω από το κέντρο της σφαίρας. Η θερμοκρασία περιβάλλοντος και στα δύο πειράματα ήταν 20°C.



Εικόνα 33. Η διάταξη της ακτινοβολήσης. Στο κέντρο διακρίνεται η σφαίρα γέλης αгарόζης μέσα (από τη μέση της και κάτω) στη μήτρα εποξικής ρητίνης. Το κίτρινο καλώδιο, στην άκρη του οποίου διακρίνεται το θερμοζεύγος, συνδέεται με τη θερμική κάμερα. (a) Το laser των 660 nm εκτός λειτουργίας και (b) το laser σε λειτουργία.

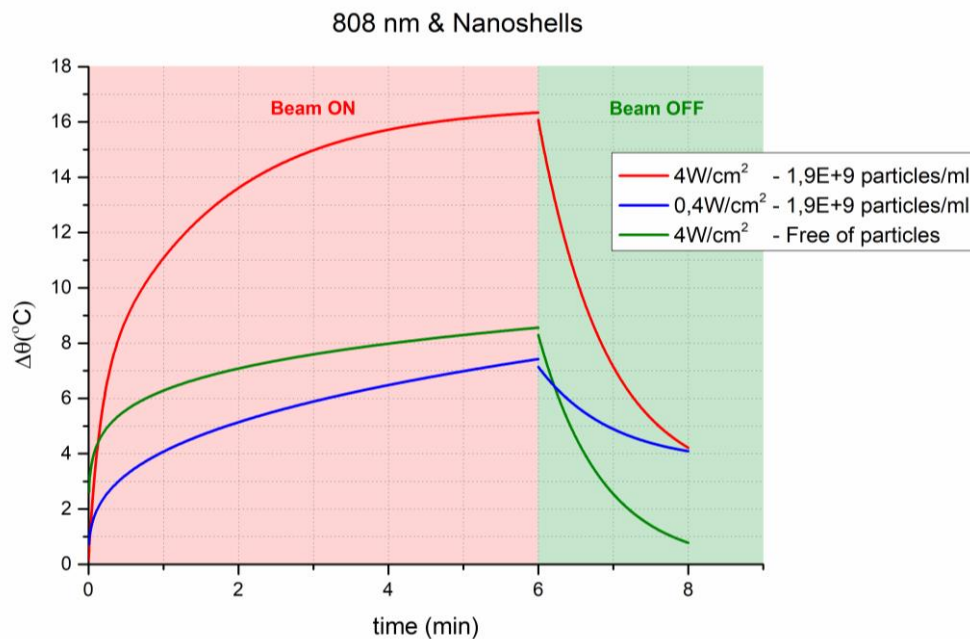


Εικόνα 34. Διαδικασία παρασκευής και ακτινοβόλησης ομοιώματος μυός. **(a)** Θέρμανση υδατικού διαλύματος νανοσωματιδίων με αгарόζη εντός σωληναρίου Eppendorf, με τη διαδικασία του μπεν-μαρι (Bain-Marie), για την κατασκευή του σφαιρικού όγκου. **(b)** Παρασκευή του υδατικού διαλύματος αгарόζης για το σώμα του μυός. Εδώ φαίνεται η ανάδυσή του με αναδευτήρα Vortex καθώς ψύχεται, προκειμένου να παραμείνει ομοιογενές. **(c)** Το ομοίωμα του μυός που κατασκευάστηκε, εντός του καλουπιού του, σε ύπτια θέση. Διακρίνεται στο εσωτερικό του ο σκελετός του καθώς και η θέση τοποθέτησης της σφαίρας του όγκου (στην περιοχή μεταξύ κεφαλής και θώρακα). **(d)** Πρηγής θέση του ομοιώματος. Στο άνω τμήμα του θώρακα φαίνεται το αποτέλεσμα ύπαρξης εγκλωβισμένου θύλακα αέρα. **(e)** Η διάταξη ακτινοβόλησης. Η δέση του laser κατευθυνόταν στο ομοίωμα μέσω κατόπτρου (άνω δεξιά τμήμα της εικόνας). Η μέτρηση της θερμοκρασίας στην περιοχή του όγκου γινόταν μέσω θερμοζεύγους που είχε εισαχθεί στο κέντρο του, το οποίο ήταν συνδεδεμένο με την αντίστοιχη θερμική κάμερα.

6.4.4 Αποτελέσματα

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της ακτινοβόλησης περιοχής που περιείχε νανοσωματίδια (προσομοιώνοντας καρκινικό ιστό) και περιοχής άνευ νανοδομών (που προσομοίωνε υγιή ιστό), με διάφορες τιμές πυκνότητας προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Πιο συγκεκριμένα και, όπως αναμενόταν, η μεγαλύτερη άνοδος παρουσιάστηκε για το συνδυασμό υψηλής ισχύος – συγκέντρωσης νανοδομών (καμπύλη ερυθρού χρώματος στην **εικόνα**

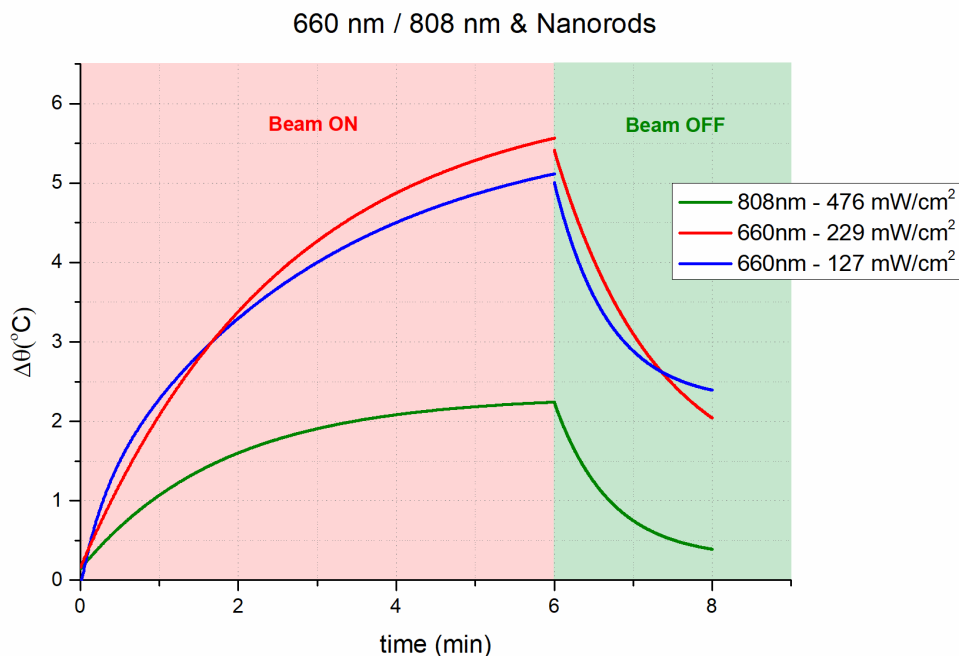
35). Μεταξύ των σεναρίων υψηλής τιμής πυκνότητας προσπίπτουσας ακτινοβολίας αλλά άνευ παρουσίας νανοδομών και το αντίστροφο (καμπύλες πράσινου και μπλε χρώματος στην **εικόνα 35**, αντίστοιχα), το δεύτερο παρουσίασε την μεγαλύτερη θερμοκρασιακή άνοδο. Η παρατήρηση αυτή καταδεικνύει τη δυνατότητα θέρμανσης βιολογικών δομών και χωρίς τη χρήση νανοσωματιδίων. Άλλωστε, είναι γνωστή η φωτοθερμική δράση των laser, με εφαρμογές π.χ. στη φυσιοθεραπεία. Παρόλα αυτά όμως, το παραπάνω αποτέλεσμα πρέπει να σχολιαστεί και από μία διαφορετική οπτική γωνία, για την αποφυγή ανεπιθύμητων βλαπτικών μεταβολών. Πιο συγκεκριμένα, η παρατηρούμενη διαφορά στην άνοδο της θερμοκρασίας είναι μικρότερη των 2°C (αύξηση της τάξης του 18%, κατά το 6^ο λεπτό), ενώ για να επιτευχθεί απαιτείται δεκαπλάσια πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας (αύξηση 900%). Πέραν τούτου, αξίζει να σημειωθεί πως η αύξηση της ισχύος της δέσμης μπορεί να προκαλέσει θερμικές αλλοιώσεις στο δέρμα που καλύπτει τον ακτινοβολούμενο όγκο, γεγονός που πρέπει να ληφθεί υπόψη [179].



Εικόνα 35. Σύγκριση της θερμοκρασιακής μεταβολής μεταξύ περιοχής με και χωρίς την ύπαρξη νανοδομών (1,9E+9 particles/ml και Free of particles, αντίστοιχα), καθώς και μεταξύ διαφορετικών πυκνοτήτων προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Για τις συγκεκριμένες παραμέτρους, η αύξηση της ισχύος αποδεικνύεται αποδοτικότερη επιλογή.

Σε αυτή, τη δεύτερη φάση των πειραμάτων ακτινοβόλησης, επαναλήφθηκε η μελέτη της σύμπτωσης του μήκος κύματος της προσπίπτουσας δέσμης με το

φάσμα διέγερσης των νανοδομών. Όπως φαίνεται και από τα αντίστοιχα γραφήματα της εικόνας 36, η χρήση του κατάλληλου laser για την ακτινοβολήση είναι καθοριστικής σημασίας. Πιο συγκεκριμένα, ακτινοβολήση με δέσμη στα 660 nm και 229 mW/cm^2 οδηγεί σε περισσότερο από διπλάσια άνοδο της θερμοκρασίας (κατά το 6^ο λεπτό), σε σχέση με δέσμη στα 808 nm, παρόλη τη διπλάσια πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας της τελευταίας. Τέλος, με βάση τα εξαχθέντα αποτελέσματα και, λαμβάνοντας υπόψη το μεγαλύτερο βάθος διείσδυσης των 808 nm, τα (συγκεκριμένα) νανοκελύφη κρίνονται καταλληλότερα από τις αντίστοιχες νανοράβδους για *in vivo* πειράματα.



Εικόνα 36. Ανάδειξη της σημασίας της σωστής επιλογής μήκους κύματος της προσπίπτουσας δέσμης κατά την ακτινοβολήση δομής που περιέχει νανοσωματίδια. Οι καμπύλες ερυθρού και μπλε χρώματος δεν είναι συνεχείς (στο 6^ο λεπτό) καθώς προκύπτουν από τη χάραξη των βέλτιστων καμπυλών πριν και μετά το 6^ο λεπτό.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΠΦΘΘ

7.1 Εισαγωγή

Όπως προαναφέρθηκε, το θεραπευτικό αποτέλεσμα της φωτοδυναμικής θεραπείας μπορεί να ενισχυθεί με τη συνδυαστική δράση της πλασμονικής φωτοθερμικής θεραπείας. Για τη μελέτη του παραπάνω φαινομένου στην παρούσα έρευνα, επιστρατεύτηκαν πέραν των *in situ* μετρήσεων (βλ. π.χ. **Κεφάλαιο 6**) και υπολογιστικές μέθοδοι. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το COMSOL Multiphysics® (Stockholm, Sweden) και το Matlab® (The MathWorks, Inc., Natick, MA, US).

Όσον αφορά το πρώτο, πρόκειται για ένα πρόγραμμα που εξειδικεύεται στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυσικών φαινομένων (όπως άλλωστε δηλώνει και το όνομά του), μέσω της μεθόδου των πεπερασμένων στοιχείων (Finite Element Modeling – FEM), ενώ τυγχάνει μεγάλης αναγνώρισης, ιδιαίτερα στο πεδίο της εφαρμοσμένης μηχανικής. Οι υπολογισμοί εκτελούνται σε γεωμετρία που κατασκευάζει ο χρήστης, μέσω βασικών γεωμετρικών στερεών και καμπύλων στις τρεις διαστάσεις. Για τη μελέτη του κάθε φαινομένου, όπως για παράδειγμα η διάδοση μίας δέσμης φωτός ή η θέρμανση μίας δομής, χρησιμοποιούνται τα αντίστοιχα «υπο-προγράμματα» (modules), στα οποία ορίζονται οι εξισώσεις που διέπουν το κάθε φαινόμενο, οι αρχικές συνθήκες, οι αλληλεπιδρούσες δομές κ.ά.

Όσον αφορά το Matlab, χρησιμοποιήθηκε ο κώδικας «MCmatlab», ο οποίος αναπτύχθηκε από την ομάδα του Anders Kragh Hansen [180] και παρέχεται ελεύθερα προς χρήση (open-source code) από την ιστοσελίδα <https://gitlab.gbar.dtu.dk/biophotonics/MCmatlab>. Ο κώδικας χρησιμοποιεί τη μέθοδο Monte Carlo καθώς και τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων, προκειμένου να μοντελοποιήσει τη διάδοση δέσμης φωτός εντός βιολογικών

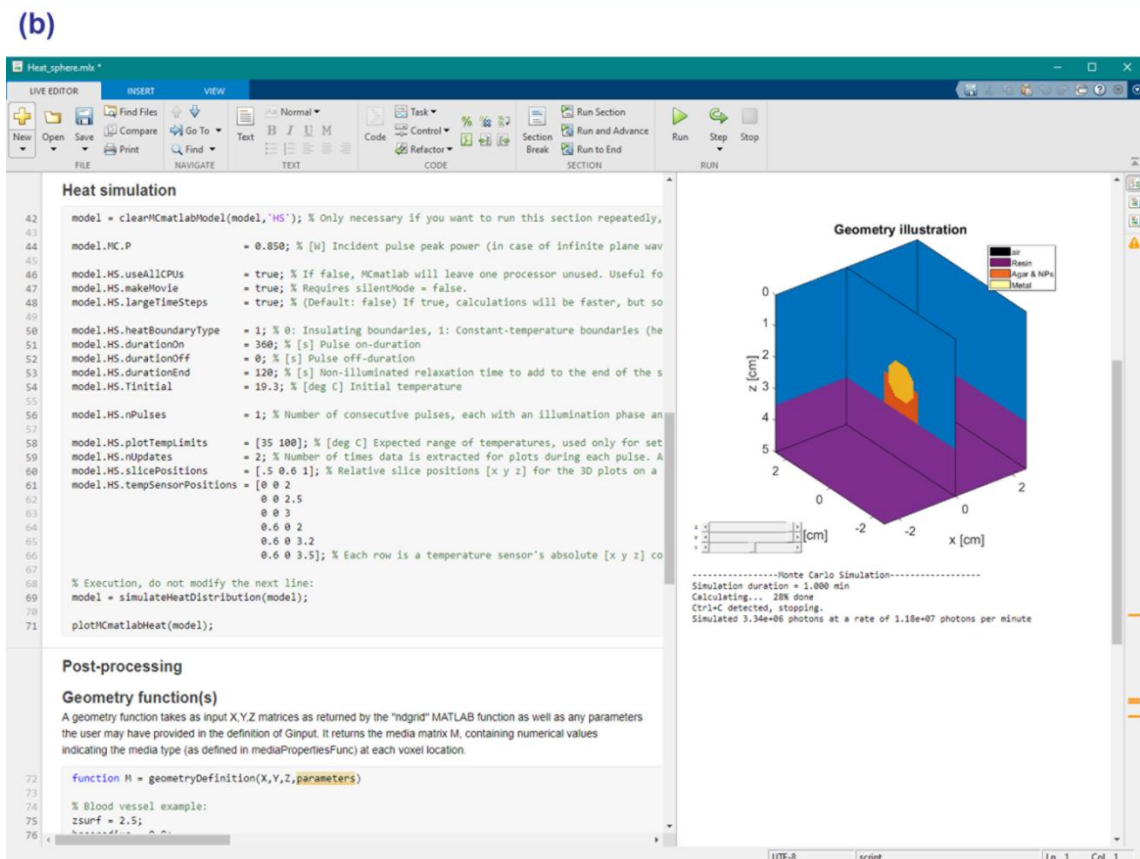
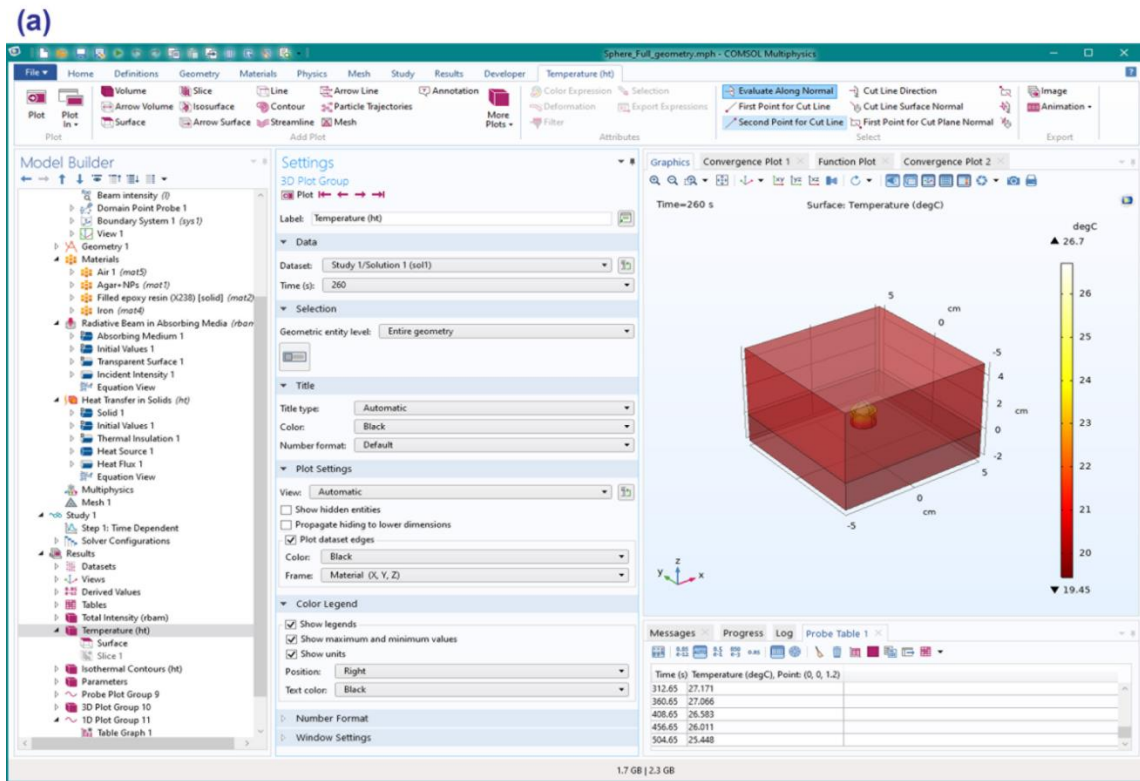
ιστών και να υπολογίσει τα φωτοθερμικά αποτελέσματα που προκύπτουν. Μάλιστα, όντας παρόμοιας φιλοσοφίας με τον κώδικα «Mcsxyz», προσφέρεται για την παράλληλη χρήση στη συνολική μοντελοποίηση της ενίσχυσης της φωτοδυναμικής θεραπείας μέσω υπερθερμίας.

Στόχος του παρόντος κεφαλαίου είναι να εισάγει τον αναγνώστη στις δύο προαναφερθείσες μεθόδους μοντελοποίησης των φωτοθερμικών φαινομένων, με ελαφρά έμφαση στο COMSOL Multiphysics, για λόγους που θα παρουσιαστούν στη συνέχεια. Επιπροσθέτως, παρατίθενται σημεία στα οποία πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή κατά τη χρήση των παραπάνω μεθόδων.

7.2 Υπολογιστική μελέτη υπερθερμίας

Στην **εικόνα 37** που ακολουθεί, φαίνεται το περιβάλλον εργασίας για το COMSOL Multiphysics και αντίστοιχα για το «MCmatlab», για την εκτέλεση των συγκεκριμένων προσομοιώσεων.

Στις προσομοιώσεις του παρόντος κεφαλαίου με το COMSOL Multiphysics, χρησιμοποιήθηκαν τα modules «Radiative Beam in Absorbing Media» και «Heat Transfer in Solids». Το πρώτο επικεντρώνεται στη διάδοση δέσμης φωτός εντός δομών και το δεύτερο στην ανάπτυξη και διάχυση της θερμότητας που επάγεται από την προαναφερθείσα δέσμη. Αναφορικά με το «MCmatlab», για την εκτέλεση του κώδικα χρειάστηκε να τροποποιηθεί κατάλληλα το αρχείο «BloodVessel.m», το οποίο και δίνεται από το ίδιο το πρόγραμμα ως παράδειγμα. Ο κώδικας τροφοδοτείται με τα στοιχεία της ακτινοβολίας και της αντίστοιχης γεωμετρίας του ιστού. Σαν αποτέλεσμα δίνει την αναπαράσταση της ακτινοβολούμενης δομής, τις οπτικές και θερμικές ιδιότητες των ιστών που χρησιμοποιήθηκαν, την κανονικοποιημένη κατανομή του ρυθμού ροής της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, την κανονικοποιημένη απορροφούμενη ενέργεια, την κανονικοποιημένη ένταση εκπεμπόμενης ακτινοβολίας από την άνω επιφάνεια της δομής, τη χρονική εξέλιξη της θερμοκρασιακής μεταβολής, τη θέση των σημείων στα οποία έχουν τοποθετηθεί εικονικοί αισθητήρες θερμοκρασίας και τη γραφική παράσταση της μεταβολής της θερμοκρασίας σε κάθε έναν από αυτούς.



Εικόνα 37. Το περιβάλλον εργασίας (a) του COMSOL Multiphysics και (b) του «MCmatlab», για την κατασκευή της ίδιας δομής (πρόκειται για υπολογιστική αναπαράσταση της εικόνας 33).

Καθώς το πρόγραμμα COMSOL Multiphysics λαμβάνει υπόψη του την αλληλεπίδραση διαφορετικών δομών, είναι αυτονόητο πως η αύξηση του πλήθους αυτών οδηγεί μεν σε πιο ρεαλιστική απεικόνιση, ταυτόχρονα όμως αυξάνει και τους βαθμούς ελευθερίας του συστήματος. Επομένως, εάν δεν είναι πλήρως γνωστές οι τιμές των φυσικών ιδιοτήτων όλων των δομών, υπεισέρχονται σημαντικές πηγές σφάλματος που οδηγούν σε αποκλίσεις από το πραγματικό, πειραματικό μοντέλο.

Προς μελέτη των ανωτέρω προσομοιώθηκε αρχικά η ακτινοβολήση της σφαίρας αγαρόζης (βλ. § [6.4.3 Ακτινοβολήση ομοιομάτων](#)). Οι βασικές οπτικές και θερμικές ιδιότητες των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αυτές που ήταν προεγκατεστημένες για τα υλικά (αέρας και σίδηρος) στη βιβλιοθήκη του COMSOL Multiphysics. Για τις τιμές των παραμέτρων που αφορούν το άγαρ χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από τις αναφορές [181,182]. Για τη βάση εποξικής ρητίνης, η οποία εκτυπώθηκε με 3D εκτυπωτή για της ανάγκες της παρούσας έρευνας, δεν ήταν διαθέσιμες οι τιμές των ιδιοτήτων της. Επομένως, σε συνεννόηση με το μηχανουργείο που ανέλαβε την κατασκευή των καλουπιών, επιλέχθηκε ως αντιπροσωπευτικότερη επιλογή από τη βιβλιοθήκη υλικών η ρητίνη «filled epoxy resin (X238)». Οι ιδιότητές της εμπλουτίστηκαν (καθώς ήταν ελλιπείς για την εκτέλεση των συγκεκριμένων modules) σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [183–185].

Όσον αφορά τις ιδιότητες της σφαίρας αγαρόζης μετά την προσθήκη των νανοσωματιδίων, για τη συνολική θερμική αγωγιμότητα k_{eff} και την ειδική θερμοχωρητικότητα υπό σταθερή πίεση $c_{p,eff}$ χρησιμοποιήθηκε ο τύπος που προτείνεται από τους Warriar και Javidi [186,187], με βάση τη θεωρία των Landau και Lifshitz [188]:

$$\blacksquare \quad k_{eff} = k_{np} \cdot f + k_{ag} \cdot (1 - f) \quad (12)$$

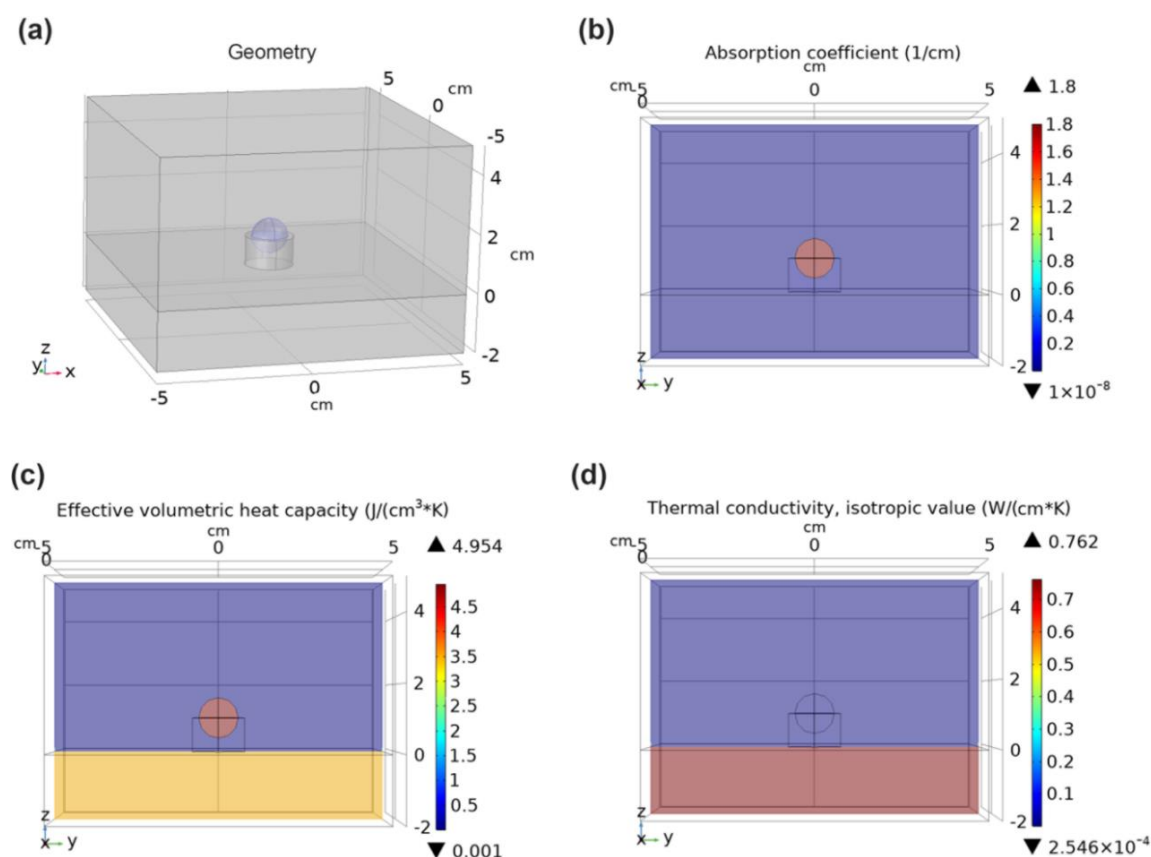
$$\blacksquare \quad c_{p,eff} = c_{np} \cdot f + c_{ag} \cdot (1 - f) \quad (13)$$

όπου, k_{np} η θερμική αγωγιμότητα των νανοσωματιδίων, k_{ag} η θερμική αγωγιμότητα της γέλης αγαρόζης και f το κλάσμα όγκου των νανοσωματιδίων. Αντίστοιχα, όπου c_{np} η ειδική θερμοχωρητικότητα υπό σταθερό όγκο των νανοσωματιδίων και c_{ag} της γέλης αγαρόζης. Εδώ, αξίζει να σημειωθεί πως αναφορικά με τις θερμικές ιδιότητες των νανοδομών, αυτές θεωρήθηκαν ως συμπαγείς νανοσφαίρες χρυσού.

Όπως είναι γνωστό, όταν μία δέσμη φωτός αλληλεπιδρά με ένα νανοσωματίδιο επικρατούν φαινόμενα απορρόφησης και σκέδασης, τα οποία περιγράφονται από τις ενεργές διατομές απορρόφησης (S_{abs}) και σκέδασης (S_{sca}), αντίστοιχα. Στην περίπτωση σύμπτωσης του μήκους κύματος της δέσμης με το μέγιστο απορρόφησης των νανοδομών, η εξασθένιση της δέσμης μπορεί να θεωρηθεί πως οφείλεται πρακτικά μόνο στην απορρόφηση [115,189]. Για τις οπτικές ιδιότητες της σφαίρας, χρησιμοποιήθηκε το άθροισμα των αντίστοιχων ιδιοτήτων της γέλης αγαρόζης και των νανοδομών. Για τις νανοδομές, ο συντελεστής απορρόφησης μ_a υπολογίστηκε ως [173]:

$$\mu_a = S_{abs} \cdot N \quad (14)$$

όπου, S_{abs} η ενεργός διατομή απορρόφησης των νανοσωματιδίων [cm^2] και N αριθμητική τους συγκέντρωση (number density – [σωματίδια/ cm^3]). Για τον υπολογισμό του S_{abs} χρησιμοποιήθηκε κώδικας που έχει αναπτυχθεί από τον Επ. Καθ. Γεώργιο Τσιγαρίδα, του Τομέα Φυσικής του ΕΜΠ, αναφορικά με τη σκέδαση Mie νανοδομών. Τα εξαχθέντα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με σύγκριση των αντίστοιχων τιμών που δίνει η κατασκευάστρια εταιρεία των νανοσωματιδίων (<https://nanocomposix.com/pages/mie-theory-calculator>). Για την αριθμητική τους πυκνότητα χρησιμοποιήθηκε η τιμή που έδινε το φύλλο προδιαγραφών που τα συνόδευε ($1,9 \cdot 10^9$ σωματίδια/ml). Αναφορικά με τον δείκτη διάθλασης της σφαίρας, θεωρήθηκε πως εξαρτάται μόνο από το άγαρ, ενώ η ίδια παραδοχή έγινε και για την πυκνότητα. Η χωρική κατανομή για κάποιες εκ των ανωτέρω παραμέτρων παρουσιάζεται στην **εικόνα 38** που ακολουθεί.



Εικόνα 38. (a) Χωρική αναπαράσταση της γεωμετρίας προς προσομοίωση. Χωρική κατανομή (b) του συντελεστή απορρόφησης (absorption coefficient), (c) της κατ' όγκο ενεργού θερμοχωρητικότητας (effective volumetric heat capacity) και (d) της θερμικής αγωγιμότητας (thermal conductivity).

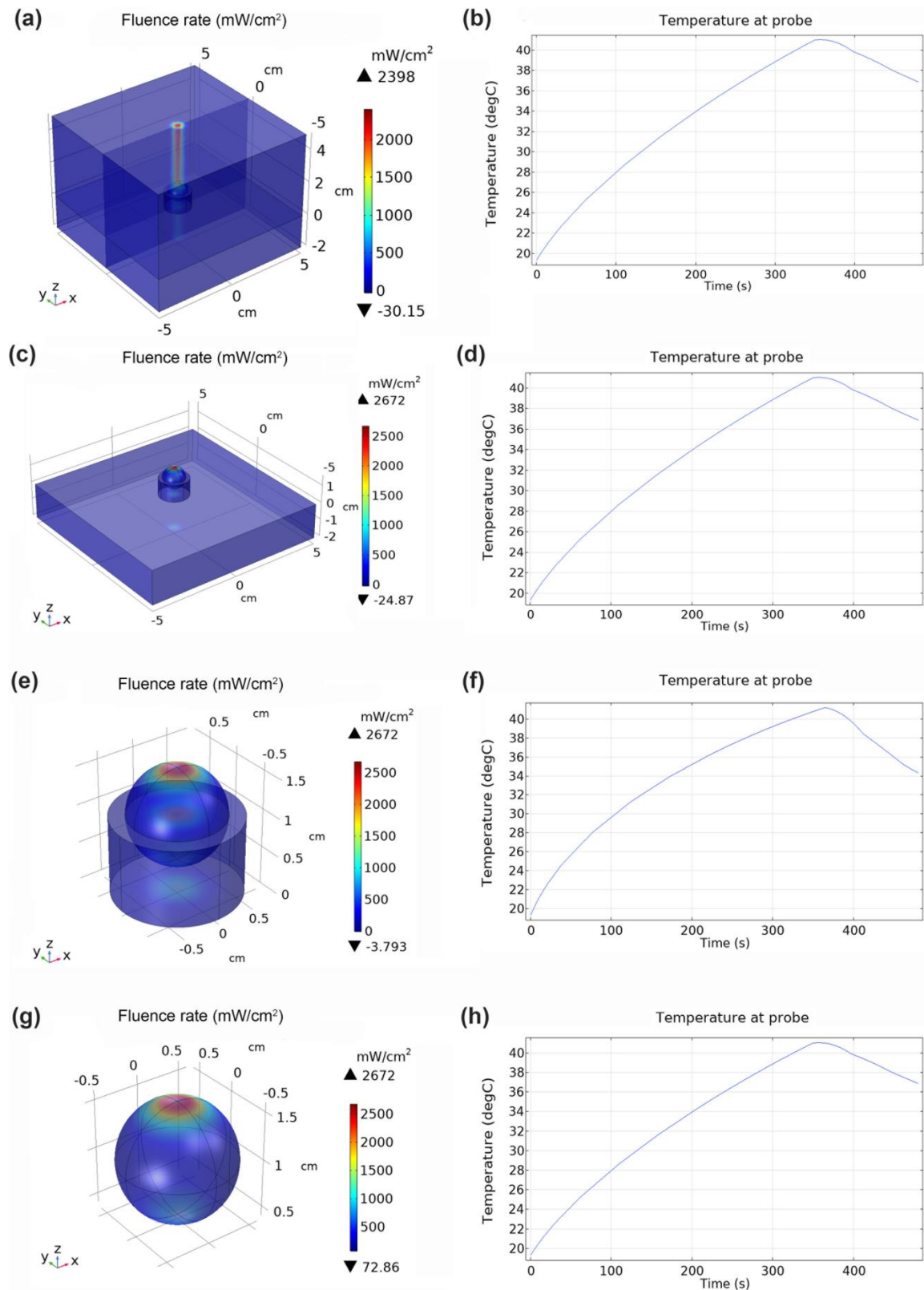
7.3 Ο ρόλος της γεωμετρίας

Εν συνεχεία, παρουσιάζεται ο ρόλος της επιλογής της προς αναπαράσταση γεωμετρίας. Το μέγεθος του πλέγματος που αντιστοιχεί στα παρακάτω ορίστηκε χειροκίνητα, με μέγιστο μήκος πλευράς στοιχειώδους τετραέδρου 0,29 cm, ελάχιστο 0,005 cm και παράγοντα αύξησης μεταξύ των δύο (maximum element growth rate) 1,3, προκειμένου να υπάρχει ικανοποιητική ακρίβεια στα αποτελέσματα και συμφωνία με το πλήθος στοιχείων της αντίστοιχης προσομοίωσης που εκτελέστηκε στο Matlab (βλ. παρακάτω). Ως εκ τούτου, το πλήθος των στοιχειωδών τετραέδρων ήταν 525.650 (506.470 εσωτερικά και 19.180 στις εξωτερικές / συνοριακές επιφάνειες), προσφέροντας μία πολύ λεπτομερή απεικόνιση του μοντέλου. Ελέγχθηκε η συμφωνία των πραγματικών, μετρούμενων τιμών κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης με αυτά που προκύπτουν από την προσομοίωση σε τέσσερις περιπτώσεις.

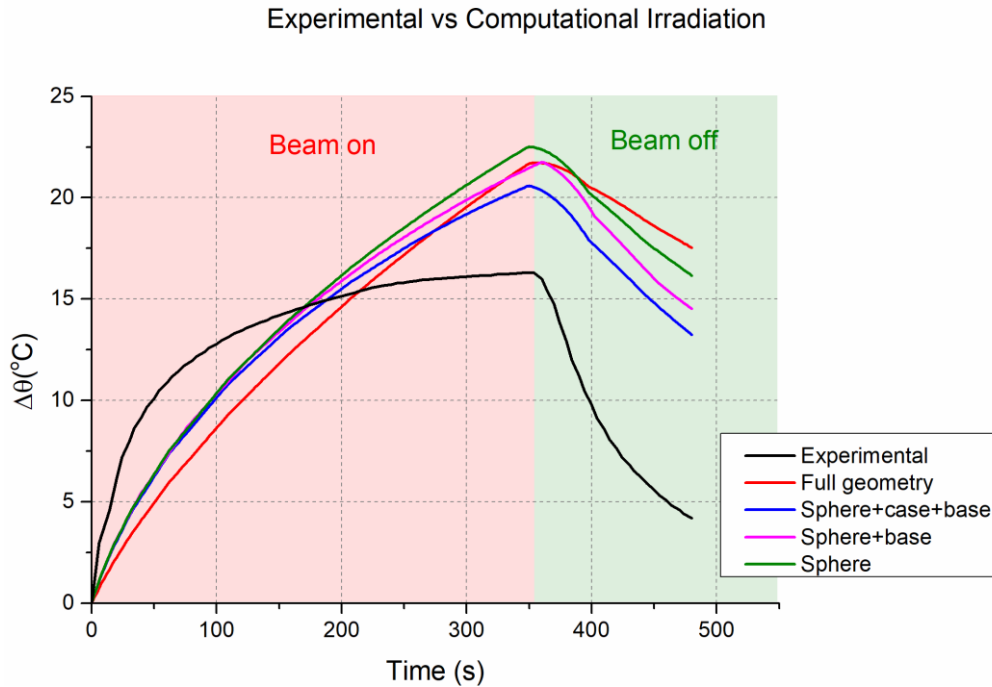
Στην πρώτη περίπτωση, έχει προσομοιωθεί πρακτικά το σύνολο της διάταξης. Στη δεύτερη έχει αφαιρεθεί ο περιβάλλον αέρας, ενώ στην τρίτη έχει αφαιρεθεί επιπλέον η μεταλλική έδρα. Τέλος, στην τέταρτη περίπτωση η ακτινοβολούμενη σφαίρα αναπαρίσταται ως το μοναδικό αντικείμενο στον χώρο (βλ. **εικόνα 39**). Όπως φαίνεται από τη συγκεκριμένη εικόνα, διαφορετική γεωμετρία οδηγεί και σε διαφορετικό προφίλ θερμοκρασιακής μεταβολής, με τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της θερμοκρασίας να ομαδοποιούνται στην **εικόνα 40**, για διευκόλυνση της σύγκρισης.

Όπως γίνεται κατανοητό, όσο πιο πλήρης είναι η γεωμετρία τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος προσομοίωσης (584 s για την πρώτη περίπτωση & 183 s για την τέταρτη περίπτωση), λαμβάνονται όμως υπόψη περισσότερες αλληλεπιδράσεις. Όπως φαίνεται από τη σύγκριση των γραφικών παραστάσεων που προκύπτουν με αυτήν που αντιστοιχεί στα πειραματικά δεδομένα (βλ. **εικόνα 40**), η καμπύλη που είναι σε μεγαλύτερη συμφωνία με αυτά είναι εκείνη που αντιστοιχεί στην πλήρη γεωμετρία, χωρίς τον περιβάλλοντα αέρα (δεύτερη περίπτωση). Γι' αυτήν, η απόκλιση της μέγιστης θερμοκρασίας με την μέγιστη πειραματικά μετρούμενη είναι της τάξης του 12,1%, ενώ και η ψύξη του υλικού πλησιάζει περισσότερο το πραγματικό μοντέλο, σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Αξίζει να σημειωθεί, πως η μόνη εμφανής διαφορά της παραπάνω γεωμετρίας με την πλήρη είναι η απουσία του αέρα. Ο αέρας, λειτουργώντας ως μία ακόμα δεξαμενή θερμότητας στο σύστημα, απορροφά μέρος της θερμικής ενέργειας της σφαίρας και δεν επιτρέπει την ταχεία θέρμανσή της (κατά τη φάση της ακτινοβολήσης) και αντίστοιχα την ταχεία ψύξη της (κατά τη φάση της θερμικής αποκατάστασης, αντίστοιχα). Το παραπάνω μοντέλο μπορεί να είναι πιο ρεαλιστικό και πιο κοντά στον πραγματικό κόσμο, όμως εισάγει ταυτόχρονα πολλούς νέους στοιχειώδεις γεωμετρικούς τομείς (βλ. παρακάτω, § [7.4 Ο ρόλος του μεγέθους του πλέγματος](#)) οι οποίοι αυξάνουν την αβεβαιότητα της προσομοίωσης. Για να γίνει περισσότερο κατανοητό το ανωτέρω, αρκεί κανείς να αναλογιστεί πως, με την παρουσία του αέρα, εισέρχονται ταυτόχρονα στο μοντέλο οι παράμετροί του, όπως η πυκνότητα (density – [kg/m³]), η θερμοχωρητικότητα (heat capacity – [J/(kg·K)]), η θερμική αγωγιμότητα (thermal conductivity – [W/(m·K)]), ο λόγος ειδικών θερμοτήτων (gamma), ο συντελεστής θερμικής διαστολής (coefficient of thermal expansion – [1/K]), ο δείκτης διάθλασης (refractive index) (πραγματικό και φανταστικό μέρος), ο συντελεστής απορρόφησης (absorption coefficient – [1/m]), ο συντελεστής σκέδασής του (scattering coefficient – [1/m]) κ.ά.



Εικόνα 39. Σύγκριση μεταξύ της προσομοιούμενης γεωμετρίας και της μεταβολής της θερμοκρασίας στο εσωτερικό σφαίρας αγαρόζης. **(a, b)** πλήρες μοντέλο **(c, d)** άνευ αέρα, **(e, f)** άνευ αέρα και μεταλλικής έδρας και **(g, h)** μόνο η σφαίρα αγαρόζης. Στην εικόνα **(a)** απεικονίζεται επιπροσθέτως ένα επίπεδο x-z για την αρτιότερη αναπαράσταση του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας, έως ότου η δέσμη συναντήσει τη σφαίρα.



Εικόνα 40. Σύγκριση των πειραματικών αποτελεσμάτων (experimental) με εκείνα της υπολογιστικής προσομοίωσης (computational) για τις τέσσερις απεικονίσεις της γεωμετρίας (πλήρης γεωμετρία – full geometry, σφαίρα + βάση + μεταλλική έδρα – sphere + case + base, σφαίρα + βάση – sphere + case και σκέτη σφαίρα – sphere). Διακρίνεται με ροζ φόντο αριστερά η χρονική διάρκεια που το laser είναι σε λειτουργία (beam on) και αντίστοιχα με πράσινο φόντο δεξιά η φάση της θερμικής διάχυσης με το laser εκτός λειτουργίας (beam off).

Επιπροσθέτως, όλη η αέρια μάζα που περιβάλλει το σύστημα θεωρείται ακίνητη. Αντιθέτως, στο μοντέλο όπου έχει αφαιρεθεί ο αέρας, η διάχυση της θερμότητας προς τον χώρο όπου στην πραγματικότητα αυτός υπάρχει προσομοιώνεται μέσω της ροής θερμότητας με συναγωγή (αφού υπάρχουν διεπιφάνειες στερεών – ρευστών). Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται ο νόμος του Νεύτωνα για τη συναγωγή της θερμότητας:

$$q_0 = h \cdot (T_{ext} - T) \quad (15)$$

όπου q_0 η πυκνότητα ροής θερμότητας [W/m^2], h ο συντελεστής μεταφοράς θερμότητας [$W/(m^2 \cdot K)$], T_{ext} [K] η θερμοκρασία του περιβάλλοντος και T [K] η θερμοκρασία σε κάθε στοιχειώδες τμήμα της γεωμετρίας. Στους συγκεκριμένους υπολογισμούς, για τη σταθερά h επιλέχθηκε η τιμή $30 W/(m^2 \cdot K)$ ώστε να προσομοιώνει τη φυσιολογική ροή αέρα και επιπροσθέτως τις κινήσεις του, λόγω της παρουσίας ερευνητών στο χώρο αλλά και ρευμάτων αέρα

(η πειραματική διάταξη βρισκόταν αρκετά κοντά σε παράθυρο). Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί πως οι προσομοιώσεις εκτελέστηκαν και για πληθώρα τιμών της σταθεράς h , χωρίς όμως σημαντικές διαφορές στο τελικό αποτέλεσμα. Επομένως, όπως συμπεραίνεται και από το γράφημα της **εικόνας 40**, μπορεί να θεωρηθεί ακριβέστερη η αναπαράσταση του αέρα μέσω της έλλειψης του (δεύτερη περίπτωση) και της αντικατάστασής του με ροή θερμότητας με συναγωγή.

Για λόγους σύγκρισης επαναλήφθηκε η ανωτέρω διαδικασία και με τον τροποποιημένο για τις ανάγκες της παρούσας έρευνας κώδικα μελέτης της θερμοκρασιακής μεταβολής «MCmatlab». Ο κώδικας υλοποιήθηκε στο περιβάλλον του Matlab, για 512.000 δομικά στοιχεία και 1 min χρόνου Monte Carlo προσομοίωσης. Όπως φαίνεται και από την **εικόνα 41**, παρατηρείται και πάλι μεγαλύτερη άνοδος της θερμοκρασίας για την περίπτωση της σκέτης σφαίρας και της σφαίρας μέσα στη βάση της (μήτρα εποξικής ρητίνης), μόνο που αυτή τη φορά η σφαίρα μέσα στη βάση παρουσιάζει τη μεγαλύτερη θερμοκρασία. Πιο ήπια θερμοκρασιακή άνοδος προκύπτει για την πλήρη γεωμετρία αλλά και για την πλήρη, άνευ παρουσίας αέρα γεωμετρία, με την πρώτη να παρουσιάζει τις χαμηλότερες τιμές θερμοκρασίας.

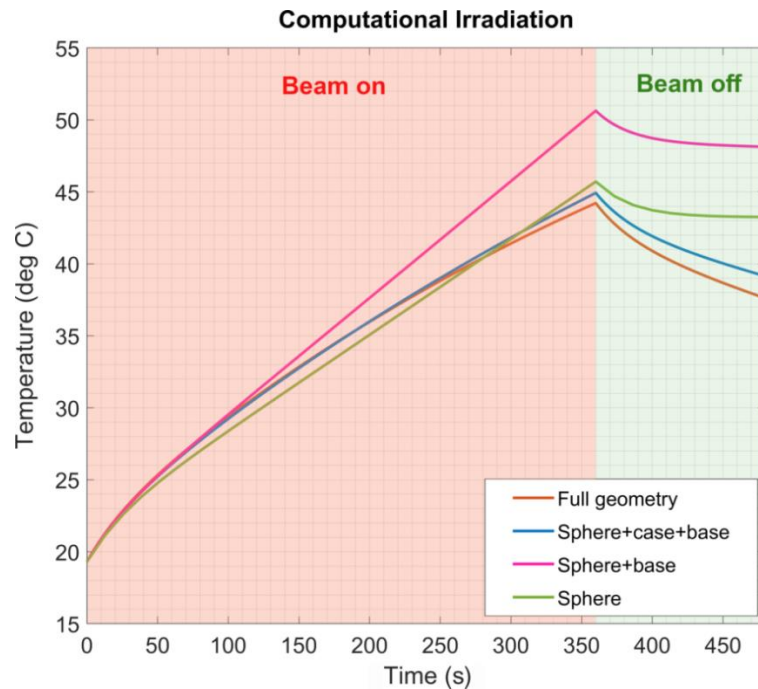
Σε επίπεδο απόλυτων τιμών θερμοκρασίας, για τα βέλτιστα μοντέλα των δύο μεθόδων (γεωμετρία: «πλήρης» για το «MCmatlab» και γεωμετρία: «σφαίρα + βάση + μεταλλική έδρα» για το COMSOL Multiphysics), η προσομοίωση μέσω του «MCmatlab» οδηγεί σε υπερεκτίμηση της θερμοκρασίας σε σχέση με τα πειραματικά δεδομένα (της τάξης του +24,1%), σε αντίθεση με την αντίστοιχη προσομοίωση μέσω του COMSOL Multiphysics (+12,1%). Ο δε χρόνος που απαιτείται για τα παραπάνω είναι περίπου 11 min για το πρώτο και περίπου 3 min για το δεύτερο (βλ. **πίνακα 5**). Από άποψη μορφής της καμπύλης της θερμοκρασιακής μεταβολής, ο κώδικας «MCmatlab» φαίνεται να υπερτερεί ελαφρώς, καθώς είναι πιο κοντά στην αντίστοιχη των πειραματικών δεδομένων (κυρίως στο τμήμα της θερμικής αποκατάστασης).

Πίνακας 5. Σύγκριση των μέγιστων θερμοκρασιών και χρόνων εκτέλεσης για τα βέλτιστα μοντέλα.

Παράμετρος	Πειραματικά δεδομένα	COMSOL Multiphysics ^a	MCmatlab ^b
Μέγιστη θερμοκρασία (°C)	35,6	39,9	44,2
Χρόνος προσομοίωσης (s)	-	191	656

^a Οι τιμές αναφέρονται στη γεωμετρία «σφαίρα + βάση + μεταλλική έδρα», για μέγεθος πλέγματος «extra fine», για 282.439 θεμελιώδη δομικά στοιχεία (voxels).

^b Οι τιμές αναφέρονται στην πλήρη γεωμετρία, για 512.000 δομικά στοιχεία (voxels).



Εικόνα 41. Σύγκριση της θερμοκρασιακής μεταβολής για τις τέσσερις διαφορετικές γεωμετρίες (πλήρης γεωμετρία – full geometry, σφαίρα + βάση + μεταλλική έδρα – sphere + case + base, σφαίρα + βάση – sphere + case και σκέτη σφαίρα – sphere), για τον τροποποιημένο κώδικα «MCmatlab».

Επομένως, γίνεται αντιληπτό πως στη συγκεκριμένη περίπτωση, η χρήση του COMSOL Multiphysics προκρίνεται σε σχέση με τη χρήση του «MCmatlab», τόσο από άποψη απόλυτων τιμών των αποτελεσμάτων, όσο και από άποψη χρόνου προσομοίωσης, υπολογιστικών πόρων, μικρότερης δυσκολίας στο σχεδιασμό του μοντέλου αλλά και ρεαλιστικότερης οπτικοποίησής του.

Σε κάθε περίπτωση, οφείλει να σημειωθεί πως η σύγκριση των πειραματικών δεδομένων με τα θεωρητικά-υπολογιστικά μπορεί να είναι ασφαλής μόνο ως προς τη γενική εικόνα και την τάξη μεγέθους των θερμοκρασιακών μεταβολών, λόγω της πληθώρας των παραδοχών που υπεισέρχονται σε αυτά.

7.4 Ο ρόλος του μεγέθους του πλέγματος

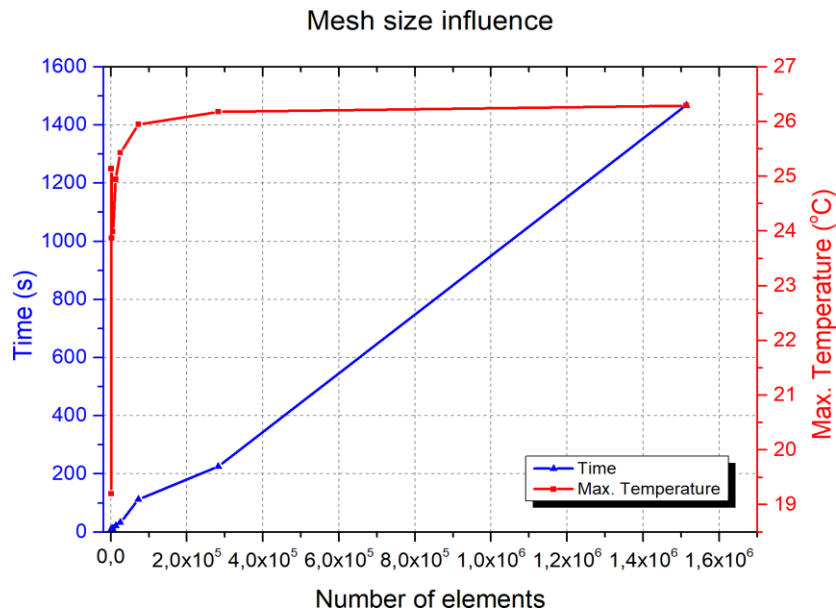
Το COMSOL Multiphysics για να εκτελέσει την εκάστοτε προσομοίωση, «τμηματοποιεί» το σύνολο της προς μελέτη γεωμετρίας σε στοιχειώδη γεωμετρικά στερεά (τετράεδρα), αντίστοιχα των voxels που χρησιμοποιούνται στο «MCmatlab». Προφανώς, όσο μικρότερο είναι το μέγεθός τους τόσο πιο πυκνό είναι το πλέγμα (mesh) που δημιουργείται και άρα σε τόσο περισσότερα στοιχειώδη στερεά γίνονται οι υπολογισμοί. Αυτό έχει μεν ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη ακρίβεια κατά την προσομοίωση, αλλά ταυτόχρονα αυξάνει τις απαιτήσεις σε υπολογιστική ισχύ και χρόνο. Κομβικό σημείο επομένως, για να έχει φυσικό νόημα και επαρκή ακρίβεια η εκάστοτε προσομοίωση, αποτελεί η κατάλληλη επιλογή του μεγέθους του πλέγματος. Αξίζει να σημειωθεί πως ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να ορίσει διαφορετικό μέγεθος πλέγματος σε επιλεγμένα σημεία της γεωμετρίας, βέβαια υπό το κόστος της μίας επιπλέον διαδικασίας.

Στη συνέχεια, παρατίθεται ως παράδειγμα ο υπολογισμός της μέγιστης θερμοκρασίας στο εσωτερικό της σφαίρας από άγαρ (άνευ νανοσωματιδίων) σε ίδια γεωμετρία και με ίδιες παραμέτρους με αυτές της προηγούμενης ενότητας. Οι υπολογισμοί εκτελέστηκαν για όλα τα διαθέσιμα μεγέθη πλέγματος και τα αποτελέσματα καταγράφονται συγκεντρωτικά στον **πίνακα 6**.

Σε αντιπαραβολή του παρακάτω πίνακα (βλ. **πίνακα 6**), η **εικόνα 42** αναπαριστά τη μέγιστη καταγραφόμενη θερμοκρασία (max. temperature – [°C]) καθώς και το χρόνο (time – [s]) της προσομοίωσης για κάθε τιμή πλήθους στοιχείων (number of elements). Οι τιμές του πλήθους των στοιχείων αντιστοιχούν στο μέγεθος του πλέγματος που αναγράφεται στον **πίνακα 6**. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί, μικρές τιμές πλήθους στοιχείων απαιτούν πολύ μικρούς υπολογιστικούς χρόνους, με σημαντικές όμως αποκλίσεις στην ακρίβεια της προσομοίωσης. Από την άλλη πλευρά, υπερβολικά μεγάλες τιμές πλήθους στοιχείων εκτοξεύουν το συνολικό χρόνο που απαιτείται για την

εκτέλεση της προσομοίωσης, με ασήμαντες βελτιώσεις στην ακρίβεια του υπολογιζόμενου αποτελέσματος (περιοχή plateau στο γράφημα).

Όσον αφορά μεταβολές στην υπολογιζόμενη θερμοκρασία, μη-αναμενόμενες τιμές μπορούν να λειτουργήσουν ως αφορμή για καταλληλότερη επιλογή του μεγέθους του πλέγματος. Ένα επιπλέον βήμα που μπορεί να γίνει για τον έλεγχο της αριότητας του μοντέλου, είναι ο υπολογισμός της χωρικής κατανομής του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας (βλ. **εικόνα 43**). Σε περιπτώσεις αδρών πλεγμάτων (coarse meshes) και άρα μη επαρκούς αριθμού στοιχειωδών γεωμετρικών στερεών, η δέσμη του laser θα φαίνεται να απορροφάται έντονα, ακόμα και αν αυτό δε συνάδει με τις οπτικές ιδιότητες του υλικού (π.χ. αέρας). Σε μία τέτοια περίπτωση, ο χρήστης θα πρέπει να επιλέξει πυκνότερο πλέγμα έως ότου ο ρυθμός ροής της ακτινοβολίας να σταθεροποιηθεί.



Εικόνα 42. Αναπαράσταση της επιρροής του μεγέθους του πλέγματος (mesh size) στον υπολογιστικό χρόνο (time) και στη μέγιστη υπολογιζόμενη θερμοκρασία (max. temperature). Μικρές τιμές πλήθους στοιχείων (number of elements) προσφέρουν πολύ σύντομους υπολογιστικούς χρόνους και μικρή ακρίβεια. Το αντίστροφο παρατηρείται για μεγάλες τιμές πλήθους στοιχείων. Από κάποια τιμή όμως και έπειτα εισερχόμαστε σε περιοχή plateau και οι αυξημένοι απαιτούμενοι χρόνοι δεν προσφέρουν αντίστοιχη αύξηση στην ακρίβεια.

Συμπερασματικά, στη συγκεκριμένη γεωμετρία, το μέγεθος του πλέγματος μπορεί να ορισθεί σε «extra fine» χωρίς ουσιαστική διαφορά στο τελικό θερμοκρασιακό αποτέλεσμα. Από άποψη χρόνου εκτέλεσης του προγράμματος,

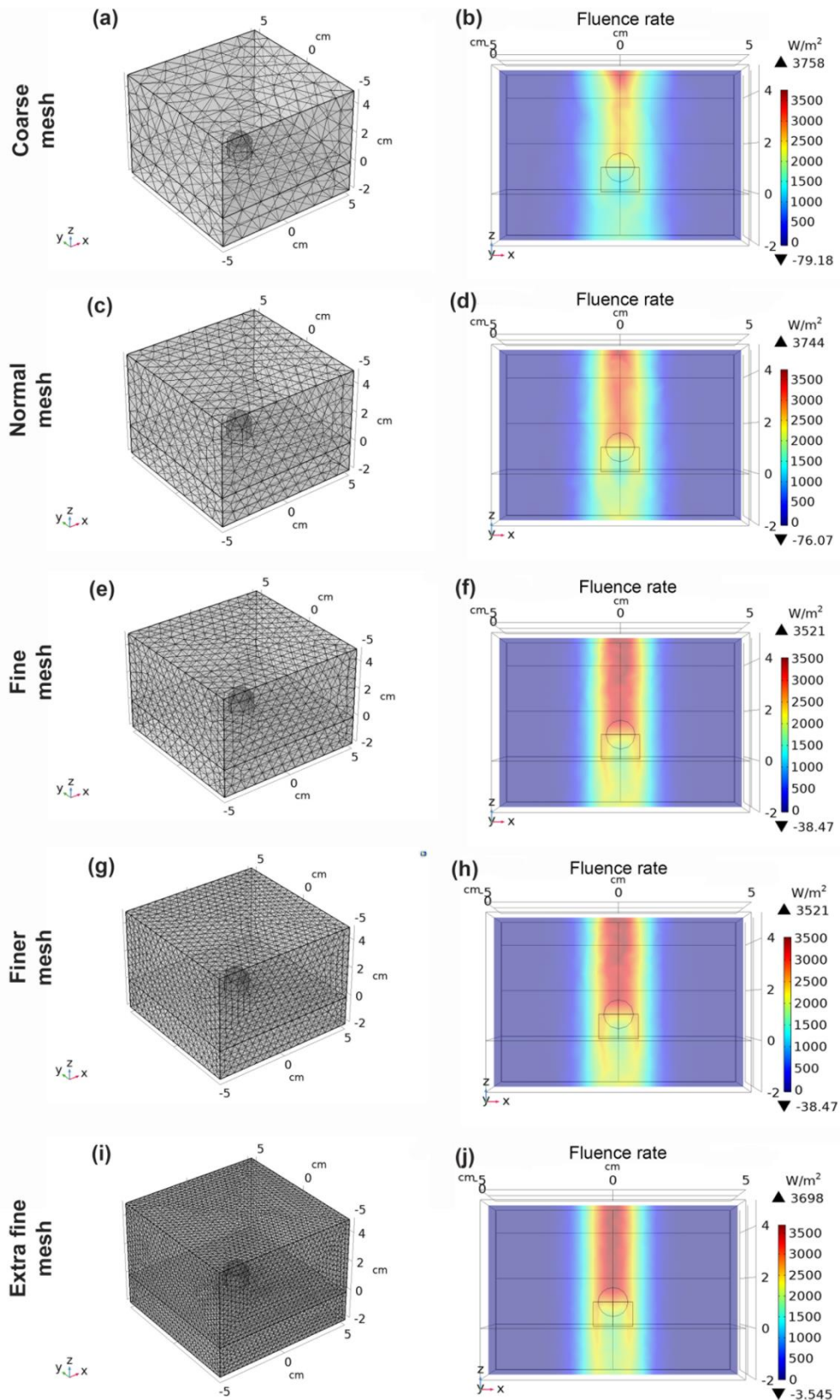
με την επιλογή «extra fine» αυτός περιορίζεται πρακτικά στο 1/6 του αντίστοιχου για την επιλογή «extremely fine» (226 s και 1468 s, αντίστοιχα). Αναφορικά με την ακρίβεια του αποτελέσματος, παρατηρείται αμελητέα διαφορά, της τάξης του 0,4% ανάμεσα στις δύο επιλογές (μέγιστη καταγραφόμενη θερμοκρασία 26,18°C, για την επιλογή «extra fine», σε σχέση με 26,29°C για την επιλογή «extremely fine»), ενώ και οι δύο διαφέρουν λιγότερο από 2,7% σε σχέση με την πραγματική, πειραματικά μετρούμενη μέγιστη θερμοκρασία (26,9°C). Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμα και η επιλογή «finer» προσφέρει αξιόπιστα αποτελέσματα (απόκλιση της τάξης του 3,5%, σε σχέση με την πραγματικότητα), σε περίπτωση που χρειάζεται να γίνει οικονομία χρόνου ή υπολογιστικών πόρων.

Πίνακας 6. Συνεισφορά της πυκνότητας πλέγματος στην προσομοίωση.

Πλέγμα ^a	Πλήθος στοιχείων ^b	Χρόνος εκτέλεσης (s)	Μέγιστη θερμοκρασία (°C)
Extremely coarse	896	10	19,20
Extra coarse	1.440	10	25,14
Coarser	2.511	10	23,87
Coarse	4.934	13	23,99
Normal	12.947	21	24,94
Fine	24.868	33	25,43
Finer	72.584	112	25,95
Extra fine	282.439	226	26,18
Extremely fine	1.513.574	1468	26,29
Πραγματικό μοντέλο	-	-	26,9

^a Τα μεγέθη του πλέγματος αναφέρονται σε φθίνουσα σειρά, από το πιο αδρό (extremely coarse) στο πιο πυκνό (extremely fine). Η ορολογία είναι αυτή που θα συναντήσει ο χρήστης στο περιβάλλον του προγράμματος.

^b Το αναγραφόμενο πλήθος αναφέρεται μόνο στα δομικά στοιχεία (domain elements) και όχι στα συνοριακά (boundary elements) ή στα στοιχεία στα άκρα της γεωμετρίας (edge elements).



Εικόνα 43. Σύγκριση διαφορετικών πλεγμάτων (meshes) και της υπολογιζόμενης χωρικής κατανομής του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας (fluence rate) για όλο και πυκνότερο πλέγμα. (a, b) coarse mesh, (c, d) normal mesh, (e, f) fine mesh, (g, h) finer mesh και (i, j) extra fine mesh.

7.5 Ο ρόλος της δέσμης

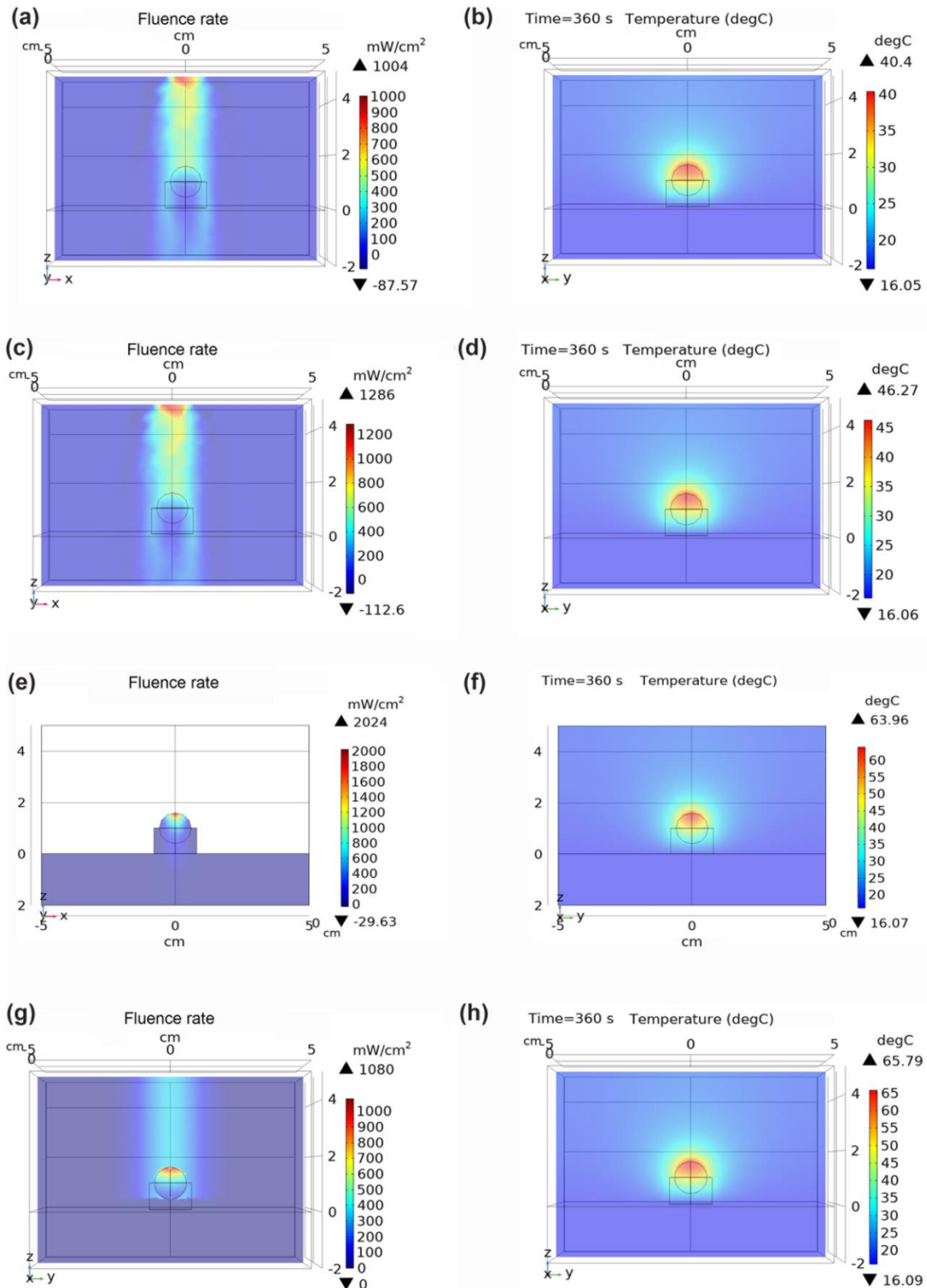
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η επιλογή της αναπαράστασης της δέσμης του laser που προσπίπτει στο ακτινοβολούμενο δείγμα. Όπως προέκυψε από τις προσομοιώσεις που διεξήχθησαν, στην περίπτωση που το πλέγμα δεν είναι επαρκώς πυκνό, διαφορετικά προφίλ δέσμης μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικά και ίσως ασαφή, αποτελέσματα (βλ. **εικόνα 44**).

Πιο συγκεκριμένα, το COMSOL Multiphysics, μέσω του module «Radiative Beam in Absorbing Media» και της επιλογής «Incident Intensity», δίνει τη δυνατότητα στον χρήστη να επιλέξει μεταξύ δύο προεγκατεστημένων προφίλ δέσμης. Το πρώτο αφορά επίπεδη δέσμη (top-hat beam) και το δεύτερο γκαουσιανή δέσμη (gaussian beam), με τις αντίστοιχες εξισώσεις να φαίνονται παρακάτω:

$$\blacksquare \text{ Top - hat: } f(\mathbf{O}, \mathbf{e}) = \begin{cases} \frac{1}{\pi \cdot R^2}, & d \leq R \\ 0, & d > R \end{cases}, \quad d = \frac{\|\mathbf{e} \times (\mathbf{x} - \mathbf{O})\|}{\|\mathbf{e}\|} \quad (16)$$

$$\blacksquare \text{ Gaussian: } f(\mathbf{O}, \mathbf{e}) = \frac{1}{2\pi \cdot \sigma^2} \cdot \exp\left(-\frac{d^2}{2\sigma^2}\right), \quad d = \frac{\|\mathbf{e} \times (\mathbf{x} - \mathbf{O})\|}{\|\mathbf{e}\|} \quad (17)$$

όπου, \mathbf{O} το διάνυσμα θέσης του σημείου εκπομπής της δέσμης, \mathbf{e} η κατεύθυνσή της, R η ακτίνα της, d η απόσταση τυχαίου σημείου από τον άξονα διάδοσής της και σ η τυπική απόκλιση της σε επίπεδο κάθετο σε αυτό της διάδοσης. Τα παραπάνω προφίλ, πολλαπλασιαζόμενα επί την ισχύ της δέσμης, δίνουν την αντίστοιχη έντασή της.



Εικόνα 44. Σύγκριση διαφορετικών αναπαραστάσεων δέσμης και της επαγόμενης αύξησης της θερμοκρασίας για: **(a - d)** υλοποίηση της δέσμης μέσα από το «Radiative Beam in Absorbing Media» module του COMSOL Multiphysics, **(e), (f)** όπως και τα προηγούμενα, αλλά χωρίς να λαμβάνεται υπόψη ο αέρας πάνω από το δείγμα και **(g), (h)** υλοποίηση της δέσμης με αναγραφή της εξίσωσής της και χωρίς τη χρήση του άνωθεν αναφερθέντος module.

Επιπρόσθετα μελετήθηκε το σενάριο «χειροκίνητης» εισαγωγής της μορφής της δέσμης, μέσω της εξίσωσής της, παρακάμπτοντας πλήρως το module «Radiative Beam in Absorbing Media». Σε αυτή την περίπτωση ο χρήστης ορίζει την εξίσωση της χωροχρονικά μεταβαλλόμενης έντασης $I(x, y, z, t)$ της δέσμης, η οποία είναι συνάρτηση της ισχύος P του laser. Στην **εξίσωση (18)** που περιγράφει την ένταση I , διακρίνεται πως η ισχύς του laser έχει ορισθεί ως χρονικά μεταβαλλόμενη, κάτι που έγινε προκειμένου να μπορεί να προσομοιωθεί όχι μόνο η φάση της ακτινοβολήσης, αλλά και η φάση της θερμικής αποκατάστασης / διάχυσης της θερμότητας που λαμβάνει χώρα αφότου κλείσει το laser.

$$I(x, y, z, t) = \frac{2P(t)}{\pi w_0^2} \cdot \frac{w_0^2}{w_{(h_{air}-z)}^2} \cdot \exp\left(-\frac{2(x-x_0)^2}{w_{(h_{air}-z)}^2} - \frac{2(y-y_0)^2}{w_{(h_{air}-z)}^2}\right) \quad (18)$$

όπου, w_0 η ακτίνα της δέσμης όταν είναι εστιασμένη (beam waist), x_0, y_0 οι συντεταγμένες του σημείου εκπομπής της δέσμης και $w_{(h_{air}-z)}^2$ η ακτίνα της δέσμης σε κάθε σημείο κατά μήκος του άξονα z . Η έκφραση $h_{air} - z$ (όπου h_{air} το ύψος του αέρα πάνω από τη μεταλλική έδρα) υφίσταται προκειμένου να ληφθεί υπόψη το γεγονός πως η δέσμη δεν διαπερνά τη γεωμετρία κατά τη φορά $z'z$ αλλά κατά την zz' (δηλαδή διαπερνά νοητά πρώτα τον αέρα, μετά τη σφαίρα, τη βάση της και τέλος τη μεταλλική έδρα). Όσον αφορά τον όρο $P(t)$, προκύπτει από την παρακάτω συνάρτηση:

$$P(t) = \begin{cases} P_0, & t \leq t_{on} \\ 0, & t_{on} < t \leq t_{tot} \end{cases} \quad (19)$$

όπου, P_0 η ισχύς του laser, t_{on} η χρονική διάρκεια της ακτινοβολήσης και t_{tot} η συνολική διάρκεια του πειράματος. Τέλος, ο όρος της ακτίνας της δέσμης w_z δίνεται από τη σχέση:

$$w(z) = w_0 \cdot \text{sqrt}\left(1 + \frac{(z-z_0)^2}{z_R^2}\right) \quad (20)$$

όπου, z_R^2 το μήκος Rayleigh για το μήκος κύματος λ , που με τη σειρά του υπολογίζεται ως:

$$\frac{\pi \cdot w_0^2}{\lambda} \quad (21)$$

Υπενθυμίζεται σε αυτό το σημείο πως το μήκος Rayleigh είναι η απόσταση, πάνω στον άξονα διάδοσης της δέσμης, μεταξύ του σημείου εστίασής της (beam waist) και του σημείου όπου η ενεργός διατομή της διπλασιάζεται (η απόσταση δηλαδή μεταξύ των σημείων όπου η δέσμη έχει διαμέτρους w_0 και $w_0\sqrt{2}$, αντίστοιχα) [169].

Όπως μπορεί κανείς να συμπεράνει από τις **εικόνες 44 (a, c)**, οι διαφορές μεταξύ επίπεδης και γκαουσιανής δέσμης είναι περιορισμένες, αλλά υπαρκτές, κάτι που απεικονίζεται και στην αντίστοιχη άνοδο της θερμοκρασίας (βλ. **εικόνες 44 (b, d)**). Παρατηρώντας πιο προσεκτικά τη χωρική κατανομή του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας στις παραπάνω περιπτώσεις, θα μπορούσε να προκύψει το συμπέρασμα πως αυτός εξασθενεί καθώς διαδίδεται στο μέσο. Προφανώς, τόσο μεγάλης κλίμακας εξασθένιση από ένα στρώμα αέρα, πάχους λίγων εκατοστών δεν ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα, γεγονός που μάλιστα οδηγεί σε λανθασμένες τιμές θερμοκρασιακής μεταβολής. Η εξήγηση για την παραπάνω εξασθένιση μπορεί να αναζητηθεί στο μέγεθος του πλέγματος που είχε επιλεγεί για το συγκεκριμένο σετ προσομοιώσεων, το οποίο είχε καθορισθεί σε «fine». Ένας τρόπος για να παρακαμφθούν τα ανωτέρω είναι η αφαίρεση του στρώματος του αέρα, ώστε η δέσμη να προσπίπτει απευθείας πάνω στη σφαίρα (βλ. **εικόνα 44 (e)**). Ένας δεύτερος τρόπος είναι η αναπαράσταση της δέσμης με εισαγωγή από τον χρήστη της εξίσωσής της (βλ. **εικόνα 44 (g)**). Η συγκεκριμένη επιλογή μπορεί μάλιστα να εξάγει πιο σωστά αποτελέσματα αναφορικά με τη χωρική κατανομή του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας, σε σχέση με τα ενσωματωμένα προφίλ δέσμης του προγράμματος. Ενέχει όμως τον κίνδυνο της λανθασμένης εκτίμησης της θερμοκρασιακής μεταβολής σε περίπτωση ανεπαρκούς πυκνότητας πλέγματος. Αυτό μπορεί να συμβεί καθότι η χωρική αναπαράσταση του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας θα είναι μεν σωστή, αλλά το πλέγμα θα είναι πολύ αραιό για την ακριβή προσομοίωση των θερμικών φαινομένων (γεγονός που ίσως δεν γίνει αντιληπτό από τον χρήστη).

Συμπερασματικά, απαιτείται η δέουσα προσοχή κατά τον καθορισμό των παραμέτρων της προσομοίωσης: όχι μόνο για τις οπτικές και θερμικές ιδιότητες των υλικών αλλά και για τη μοντελοποίηση της γεωμετρίας, το μέγεθος του πλέγματος και την αναπαράσταση της δέσμης.

Page intentionally left blank

In vivo & in silico ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

8.1 Εισαγωγή

Ένα από τα τελευταία στάδια της παρούσας διδακτορικής έρευνας, ήταν η εφαρμογή και ο έλεγχος των υπολογιστικών μοντέλων σε *in vivo* συνθήκες. Έτσι, πραγματοποιήθηκε πείραμα που περιελάμβανε ζώα (μύες), προφανώς συνοδευόμενο και από τις αντίστοιχες υπολογιστικές προσομοιώσεις. Το *in vivo* μέρος της μελέτης έγινε στο Ινστιτούτο Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας, του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (ΕΚΕΦΕ) «Δημόκριτος» (Αγ. Παρασκευή, Αττική, Ελλάδα). Όσον αφορά τις υπολογιστικές προσομοιώσεις, μέρος τους αφιερώθηκε και στη μελέτη της πιθανής αύξησης της θερμοκρασίας της περιοχής ακτινοβολήσης κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Οι μύες που χρησιμοποιήθηκαν άνηκαν στη φυλή NOD SCID (nonobese diabetic / severe combined immunodeficient) και χαρακτηρίζονταν από την απώλεια λειτουργικών T και B κυττάρων. Η χρήση των μυών επιλέχθηκε λόγω των ομοιοτήτων που παρουσιάζουν στις παθοφυσιολογικές αντιδράσεις και στον γενετικό τους κώδικα με τον αντίστοιχο των ανθρώπων. Σημαντικό επίσης ρόλο διαδραμάτισε το χαμηλό τους κόστος, η διαθεσιμότητά τους και η σχετική ευκολία εκτροφής και χειρισμού τους. Άλλωστε, οι παραπάνω λόγοι συντελούν στην ευρύτερη χρήση μυών στην προκλινική αξιολόγηση νέων ενώσεων για διάγνωση ή / και θεραπεία ασθενειών [190]. Η φιλοξενία των ζώων έγινε σε κλωβούς, σε χώρο με κατάλληλο εξαερισμό, κλιματισμό και θερμοκρασία, με τιμές υγρασίας 55% - 65% και εναλλασσόμενο φωτισμό (12 ώρες φως και 12 ώρες συσκότιση). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως δεν κρίθηκαν αναγκαίες εξειδικευμένες διαδικασίες φροντίδας τους αλλά ακολουθήθηκαν οι γενικές δράσεις βελτίωσης της φροντίδας και της ευζωίας ζώων, σύμφωνα με τις οδηγίες της Επιτροπής Ευζωίας της εγκατάστασης (Εκτροφείο Πειραματόζωων του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» - EL 25 BIO 019/020).

Στο *in vivo* πείραμα (και στις αντίστοιχες προσομοιώσεις) μελετήθηκε η περίπτωση του καρκίνου του μαστού. Η συγκεκριμένη μορφή καρκίνου είναι μία από τις συχνότερα εμφανιζόμενες μορφές κακοήθειας αλλά και μία από τις κυρίαρχες αιτίες θανάτου παγκοσμίως [1]. Επομένως, η σειρά που επιλέχθηκε ήταν η 4T1 (breast carcinoma cell line), η οποία παράγει καρκινικούς όγκους (μαστού). Η ταχεία ανάπτυξη των όγκων, η διαθεσιμότητά τους, η δυνατότητα υποδόριας ανάπτυξής τους και η περιορισμένη έρευνα επί αυτών στη διεθνή βιβλιογραφία οδήγησε στη χρήση τους στα συγκεκριμένα πειράματα [191–195].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η τρέχουσα τάση στην ανάπτυξη των φωτοευαίσθητοποιών ουσιών είναι προς συντελεστές απορρόφησης σε μήκη κύματος στο φάσμα του ερυθρού και του κοντινού υπερύθρου, λόγω του αυξημένου βάθους διείσδυσης που παρουσιάζουν οι αντίστοιχες δέσμες φωτός. Σήμερα, για τις περισσότερες φωτοευαίσθητοποιές ουσίες, το μήκος κύματος ενεργοποίησής τους βρίσκεται στην περιοχή των 630 - 700 nm, με αποτέλεσμα η δράση τους να χαρακτηρίζεται από επιφανειακές κυρίως αλληλεπιδράσεις. Στα ανωτέρω μήκη κύματος, η δέσμη απορροφάται κυρίως από τα μόρια του φαρμάκου, της μελανίνης, της αιμοσφαιρίνης και σχεδόν καθόλου από του νερού [30,134]. Επίσης, οι σχετικά χαμηλές τιμές έντασης προσπίπτουσας ακτινοβολίας και οι χρόνοι θεραπείας που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη (στις περισσότερες περιπτώσεις διαρκούν λίγα λεπτά) έχουν ως αποτέλεσμα περιορισμένες φωτοθερμικές επιδράσεις, που συνήθως δεν λαμβάνονται υπόψη. Ως εκ τούτου, υλοποιήθηκε μία υπολογιστική μελέτη για την αξιολόγηση της θερμοκρασιακής κατανομής κατά τη διάρκεια της ΦΔΘ, σε διάταξη αντίστοιχη με εκείνη της *in vivo* μελέτης. Για το σκοπό αυτό, αναπτύχθηκε στο περιβάλλον του COMSOL Multiphysics μία φιλική ως προς τον χρήστη εφαρμογή. Η συγκεκριμένη, λαμβάνει ως είσοδο διάφορες παραμέτρους, όπως την ισχύ της πηγής φωτός, το χρόνο ακτινοβολήσης, την αρχική θερμοκρασία σώματος κ.ά. και επιστρέφει, μεταξύ άλλων, το ρυθμό ροής της ακτινοβολίας καθώς και τη μέγιστη θερμοκρασία του ακτινοβοληθέντος ιστού, σε καθορισμένες από τον χρήστη χρονικές στιγμές.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως το *in vivo* πείραμα που έλαβε χώρα είχε τον χαρακτήρα του προπαρασκευαστικού και περιελάμβανε τη χρήση του ελάχιστου δυνατού αριθμού ζώων.

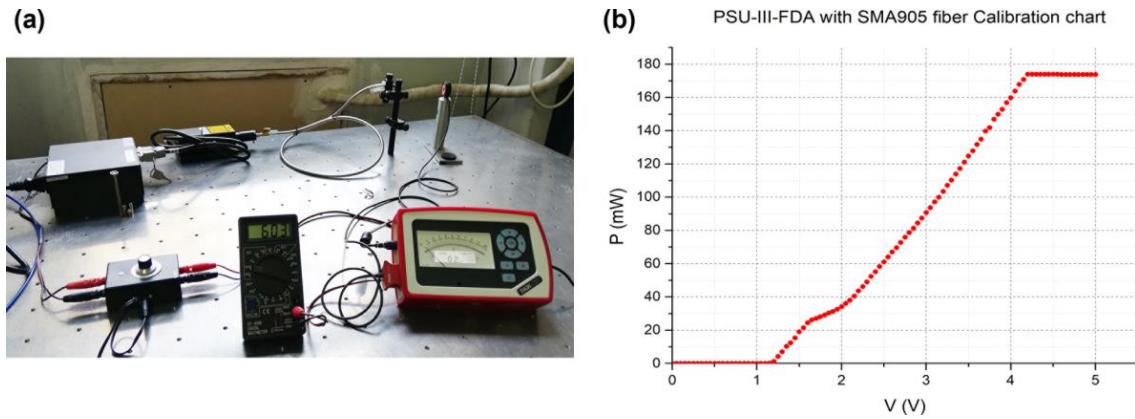
8.2 Υλικά και μέθοδοι

Για τις ανάγκες της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις μύες, όλοι θηλυκού γένους, ηλικίας 12 εβδομάδων, με μέσο βάρος 22,4 g (μέτρηση με ζυγό 440-33N, KERN & SOHN GmbH, Balingen, Germany), οι οποίοι προήλθαν από το Εκτροφείο Πειραματόζωων του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» (κωδ. εγκατ.: EL 25 BIO 019/020). Όσον αφορά τα καρκινικά κύτταρα της 4T1 σειράς (προέλευσης ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»), αυτά προετοιμάστηκαν σε διάλυμα 0,25 mL των $1 \cdot 10^6$ κυττάρων και κατόπιν εγχύθηκαν υποδόρια στην αριστερή μπροστά μασχαλιαία περιοχή κάθε ζώου. Η θεραπεία ξεκίνησε όταν οι σχηματισθέντες όγκοι είχαν μέση διάμετρο 1 cm.

Ως φωτοευαισθητοποιός ουσία χρησιμοποιήθηκε το σκεύασμα Metvix (Galderma, France), το οποίο παραχωρήθηκε ευγενικά από τη φαρμακευτική εταιρεία ΦΑΡΜΑΣΕΡΒ - ΛΙΛΛΥ ΑΕΒΕ (Κηφισιά, Ελλάδα), κατόπιν αντίστοιχου αιτήματος. Το αίτημα αποτελούνταν από επιστολή ενδιαφέροντος καθώς και από αναλυτικό πρωτόκολλο του πειράματος. Το Metvix (αρ. αδείας: 535/7-1-2008) είναι μια λιπόφιλη ουσία σε μορφή κρέμας (προσοχή, να μη συγχέεται με τον όρο «γέλη») η οποία προσφέρει σχετικά αυξημένη απορρόφηση στους όγκους [66,196]. Αυτός, ο δεύτερης γενιάς φωτοευαισθητοποιητής, περιέχει 160 mg/g αμινολεβουλινικού μεθυλίου ($C_6H_{11}NO_3 \cdot HCl$) (methyl aminolevulinate - MAL) και μεταξύ άλλων, 40 mg/g κητοστεατυλικής αλκοόλης (cetostearyl alcohol), 2 mg/g παραϋδροξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα (methyl parahydroxybenzoate), 1 mg/g παραϋδροξυβενζοϊκού οξέος προπυλεστέρα (propyl parahydroxybenzoate) και 30 mg/g αραχιδέλαιου (arachis oil) [197]. [30]. Με την πάροδο του χρόνου μεταβολίζεται σε ενδοκυτταρικές πορφυρίνες, περιλαμβανομένης της ιδιαίτερας φωτοευαισθητικής πρωτοπορφυρίνης IX (protoporphyrin IX - PpIX). Η συγκεκριμένη, μετά την ακτινοβόλησή της με φως στα 405 nm ή στα 635 nm, οδηγεί στην παραγωγή κυτταροτοξικού μονήρους οξυγόνου [30,198]. Η επιλογή του Metvix ως φωτοευαισθητοποιού παράγοντα έγινε με βάση τη διαθεσιμότητά του και το σχετικά μικρό του κόστος (199,41 € - λιανική τιμή ανά συσκευασία, σύμφωνα με τη βάση φαρμάκων «Γαληνός»). Επίσης, καθότι κρέμα, προσφέρει ευκολία στη χορήγησή του (επιφανειακή επάλειψη) αλλά και μικρότερες πιθανότητες εμφάνισης παρενεργειών. Αν και οι θεραπευτικές ενδείξεις του φαρμάκου αφορούν κυρίως δερματικές παθήσεις, όπως ακτινική κεράτωση (actinic keratosis - AK), βασικοκυτταρικό καρκίνωμα και ακανθοκυτταρικό (πλακώδες)

καρκίνωμα [197], υπάρχουν λίγες δημοσιευμένες μελέτες αναφορικά με τη χρήση του σε αδενοκαρκίνωμα μαστού (mammary adenocarcinoma cells – MDA-MB- 231 cells) [199]. Παρόλα ταύτα, δεν υπάρχει καμία αναφορά για έρευνα επί 4T1 όγκων σε μύες, εξ' όσων γνωρίζουμε. Αξίζει να σημειωθεί πως, επιπροσθέτως, μελετήθηκε το ενδεχόμενο χρήσης της κρέμας και για *in vitro* μετρήσεις, όμως δεν κατέστη εφικτή η εύρεση ενδεδειγμένου τρόπου διάλυσής της. Μάλιστα, για το σκοπό αυτό υπήρξε ανταλλαγή αλληλογραφίας με την προμηθεύτρια φαρμακοβιομηχανία (χωρίς αποτέλεσμα), με την υπεύθυνη φαρμακοποιό μεγάλου δημόσιου νοσοκομείου της Αθήνας, αλλά και με στέλεχος άλλης φαρμακοβιομηχανίας.

Η ακτινοβολήση έγινε με χρήση δύο πηγών φωτός, για τη μελέτη της εξάρτησης του θεραπευτικού αποτελέσματος από το μήκος κύματος της δέσμης. Η πρώτη δέσμη προερχόταν από το διοδικό laser συνεχούς λειτουργίας με $\lambda = 660 \text{ nm}$, MRL-I-660 (βλ. § [6.2.2 Πηγές φωτός](#)). Η ισχύς εξόδου του συγκεκριμένου laser προερχόταν από σταθερή, μη-ρυθμιζόμενη τάση ρεύματος, με αποτέλεσμα να είναι και αυτή με τη σειρά της σταθερή. Προκειμένου να υπάρχει η δυνατότητα μεταβολής της για τις δοσιμετρικές ανάγκες του πειράματος, κατασκευάστηκε ένας ρυθμιστής τάσης εισόδου (βλ. [εικόνα 45 \(a\)](#)). Επίσης, με τη βοήθεια βολτόμετρου και ισχυόμετρου (PM100A) με την κεφαλή φωτιδιόδου πυριτίου S121C (βλ. § [6.2.4 Μέτρηση ενέργειας / ισχύος](#)) έγινε βαθμονόμηση της διάταξης, μέσω εξαγωγής της καμπύλης τάσης εισόδου – ισχύος εξόδου. Με βάση αυτή, δίνεται η δυνατότητα στον χειριστή της πηγής laser να κάνει χρήση της διάταξης χωρίς να υπάρχει η ανάγκη μέτρησης της εξόδου του laser μετά από κάθε τροποποίηση της τάσης εισόδου. Στο σημείο αυτό βέβαια θα πρέπει να σημειωθεί, πως η χρήση οργάνων (π.χ. ποτενσιόμετρο, τροφοδοτικό) όχι υψηλής ποιότητας μπορεί να οδηγήσει σε διακυμάνσεις στην τάση εξόδου και επομένως στην ανάγκη τακτικής βαθμονόμησης της διάταξης.

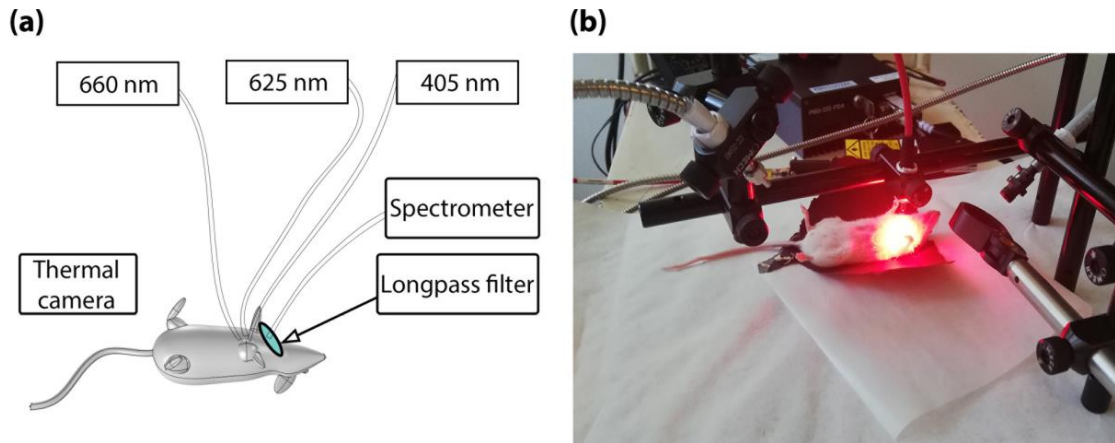


Εικόνα 45. (a) Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τη βαθμονόμηση του ρυθμιστή τάσης εισόδου (κάτω αριστερά). Δίπλα του διακρίνεται το βολτόμετρο και ακόμα πιο δεξιά το ισχυόμετρο. Στο άνω μέρος της φωτογραφίας φαίνονται από αριστερά προς τα δεξιά, το τροφοδοτικό του laser (PSU-III-FDA), η κεφαλή του, η οπτική ίνα με το μεταλλικό κάλυμμά της και η κεφαλή του ισχυόμετρου. **(b)** Η καμπύλη βαθμονόμησης που εξήχθη. Τιμές ισχύος άνω του 1 mW καταγράφονται για τιμές τάσης εισόδου άνω των 1,2 V. Η μέγιστη ισχύς που μετρήθηκε ήταν 173,8 mW στα 4,2 V.

Η δεύτερη δέσμη προερχόταν από μία πηγή LED με έξοδο οπτικής ίνας, μήκους κύματος 625 nm και μέγιστης ισχύος 17,5 mW (M625F2, Thorlabs, Germany). Για τις μετρήσεις ισχύος χρησιμοποιήθηκε το άνωθεν αναφερθέν ισχυόμετρο και η αντίστοιχη κεφαλή (PM100A και S121C, αντίστοιχα). Εδώ, αξίζει να σημειωθεί πως ο αρχικός προγραμματισμός του πειράματος έγινε με δύο εκδοχές, καθώς δεν ήταν βέβαιη η διαθεσιμότητα της πηγής M625F2, την ώρα του πειράματος (εκδοχή A). Επομένως, σχεδιάστηκε και μία εκδοχή B όπου προβλεπόταν η χρήση διαθέσιμης, χαμηλής ισχύος πηγής laser He-Ne (με $\lambda = 632$ nm), η οποία όμως δεν μπορούσε να συνδεθεί με οπτική ίνα. Έτσι, προσαρμόστηκε και ένα οπτικό σύστημα (κατόπτρου / φακών) για να οδηγηθεί η δέσμη στην περιοχή της ακτινοβολήσης. Τέλος, έγιναν οι αντίστοιχοι υπολογισμοί για τους χρόνους ακτινοβολήσης στις δύο περιπτώσεις (που διέφεραν, τόσο λόγω του διαφορετικού μήκους κύματος, όσο και της διαφορετικής ισχύος των πηγών). Η παραπάνω διάταξη αποτυπώνεται στη φωτογραφία της **εικόνας 46** καθώς και σχηματικά στην **εικόνα 47**.



Εικόνα 46. Φωτογραφία της πειραματικής διάταξης. Στο άνω αριστερά μέρος διακρίνεται το διοδικό laser He-Ne που είχε τοποθετηθεί σε περίπτωση που χρειαζόταν για την ακτινοβολήση. Η δέσμη του οδηγούνταν στον στόχο μέσω κατόπτρου. Στο άνω ράφι του τροχήλατου καροτσιού διακρίνεται δεξιά το τροφοδοτικό του laser των 660 nm, ακριβώς πίσω του το πολύμετρο και ο ροοστάτης ρύθμισης της τάσης του, ενώ επάνω του εδράζεται η κεφαλή της πηγής LED των 405 nm (η οποία εναλλασσόταν με την αντίστοιχη των 625 nm). Μπροστά από το τροφοδοτικό βρίσκεται η κεφαλή του laser και αριστερά της η μεταλλική οπτική τράπεζα που έχει καλυφθεί με λευκό χαρτί για λόγους υγιεινής. Επάνω της διακρίνονται οι ράβδοι ανάρτησης των στηριγμάτων των οπτικών τινών και των κατόπτρων. Στο κάτω ράφι διακρίνονται από τα αριστερά προς τα δεξιά, το τροφοδοτικό του διοδικού laser He-Ne, το φασματόμετρο και ο ρυθμιστής τάσης (driver) των πηγών LED, αντίστοιχα.



Εικόνα 47. Η πειραματική διάταξη: **(a)** Σχηματική αναπαράσταση των κύριων οργάνων. **(b)** Η οπτική ίνα με το μεταλλικό περίβλημα (στα αριστερά της εικόνας) χρησιμοποιήθηκε για την καθοδήγηση της δέσμης των 660 nm. Η ίνα με το ερυθρό περίβλημα (πάνω από τον μυ) καθοδηγούσε τη δέσμη των 625 nm ή των 405 nm (ανάλογα με το πρωτόκολλο). Στα δεξιά της εικόνας, φαίνεται η οπτική ίνα συλλογής και το βαθυπερατό φίλτρο (longpass filter), τα οποία τοποθετήθηκαν όσο το δυνατόν πλησιέστερα στον μυ κατά τη διάρκεια λήψης του φάσματος φθορισμού.

Για τη διέγερση του φωτοευαισθητοποιημένου παράγοντα (μελέτη φθορισμού του) χρησιμοποιήθηκε μία πηγή LED με μήκος κύματος 405 nm (με ισχύ εξόδου 8 mW), η οποία κατέληγε σε πολυρυθμική οπτική ίνα, διαμέτρου 800 μm (M405FP1 και FT800UMT, αντίστοιχα, Thorlabs, Germany), καθώς η πρωτοπορφυρίνη IX παρουσιάζει έντονη απορρόφηση στο παραπάνω μήκος κύματος. Το φως συλλέχθηκε από μία οπτική ίνα διαμέτρου 600 μm (QP600-2-SR-BX, Ocean Optics, Dunedin, Florida, US), προσαρτημένη σε ένα φασματόμετρο του ίδιου οίκου (USB 4000). Χρησιμοποιήθηκε ένα βαθυπερατό φίλτρο (longpass filter) 600 nm (FEL0600, Thorlabs, Germany) για την αποκοπή των 405 nm αλλά και των ανεπιθύμητων περιοχών του φάσματος (προς ενίσχυση του σήματος φθορισμού). Το συλλεχθέν φάσμα καταγράφηκε και επεξεργάστηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό SpectraSuite (Ocean Optics, Dunedin, Florida, US), με χρόνο ολοκλήρωσης ρυθμισμένο στα 100 ms και με αφαίρεση του σήματος υποβάθρου. Επίσης, μετρήθηκε η επιφανειακή θερμοκρασία των μυών στην κοιλιακή τους χώρα καθώς και στην περιοχή του όγκου. Για αυτές τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε η θερμική κάμερα ToughCam EL S (βλ. § [6.2.3 Μέτρηση θερμοκρασίας](#)).

Για την εκτίμηση της μεταβολής του καρκινικού όγκου χρησιμοποιήθηκαν οι σχέσεις:

$$Εμβαδόν = \pi \cdot \frac{Διάμετρος_{max} \cdot Διάμετρος_{min}}{4} , \quad (22)$$

$$Όγκος = \frac{Διάμετρος_{max} \cdot Διάμετρος_{min}^2}{2} . \quad (23)$$

όπου για τη μέτρηση των μέγιστων (max) και ελάχιστων (min) διαμέτρων χρησιμοποιήθηκε μηχανικό παχύμετρο (ακρίβειας 0,01 mm).

8.3 Σύνοψη περιγραφή του πρωτοκόλλου

Για της ανάγκες της παρούσας έρευνας σχεδιάστηκαν και υλοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά πρωτόκολλα ακτινοβολήσης, με τις παραμέτρους τους να φαίνονται στον **πίνακα 7**. Προκειμένου να μελετηθεί η εξάρτηση του θεραπευτικού αποτελέσματος της ΦΔΘ από το μήκος κύματος της δέσμης ακτινοβολήσης, τρία από τα ζώα ακτινοβολήθηκαν με την ίδια πυκνότητα ενέργειας, η οποία ήταν κατά προσέγγιση 100 J/cm² [166,200]. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως στη βιβλιογραφία της φωτοδυναμικής θεραπείας των 4T1 όγκων αναφέρονται τιμές έως και ~400 mW/cm² για την πυκνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας [201]. Παρόλα ταύτα, στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο αυτή περιορίστηκε στα ~200 mW/cm² (ανάλογα και με τις δυνατότητες της κάθε πηγής), προς συμμόρφωση με τις συστάσεις του φύλλου προϊόντος του σκευάσματος (Summary of Product Characteristics – SmPC) [202]. Η πυκνότητα ενέργειας καθορίστηκε μέσω του χρόνου ακτινοβολήσης. Ο μυς Νο. 4, όπως και οι υπόλοιποι τρεις, έλαβε την απαιτούμενη δόση φωτοευαισθητοποιού ουσίας αλλά δεν ακτινοβολήθηκε, δρώντας ως ζώο αναφοράς (control).

Για τη φωτοδυναμική θεραπεία το τρίχωμα στην περιοχή του όγκου ξυρίστηκε προσεκτικά μία ημέρα πριν από την ακτινοβολήση. Λίγο πριν από την εφαρμογή της κρέμας, κάθε μυς ζυγίστηκε και ελήφθη το φάσμα φθορισμού της περιοχής του όγκου. Ένα λεπτό στρώμα (πάχους κατά προσέγγιση 1 mm) κρέμας Metvix, που αντιστοιχεί σε περίπου 30 mg, εφαρμόστηκε τοπικά στην ορατή έκταση του όγκου αλλά και πέραν αυτής, προκειμένου να καλυφθεί και ένα περιθώριο 1,5 mm (όπως ορίζει το φύλλο οδηγιών του σκευάσματος). Η περιοχή καλύφθηκε με μη-απορροφητική ταινία (Parafilm - PM 996), η οποία και προσαρτήθηκε / σταθεροποιήθηκε με χειρουργική ταινία (Micropore TM, 3M TM). Στη συνέχεια, ο κάθε μυς

τοποθετήθηκε για χρονικό διάστημα τριών ωρών στον κλωβό του, ο οποίος καλύφθηκε με μαύρο, χονδρό ύφασμα, για να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη φωτοευαισθησία. Μετά από τρεις ώρες, το ζώο ενέθηκε ενδοπεριτοναϊκά με διάλυμα κεταμίνης / ξυλαζίνης (υδροχλωρική κεταμίνη 100 mg/mL, 10% και υδροχλωρική ξυλαζίνη 23,32 mg/mL, 5%), σε δόση 10 mg/kg σωματικού βάρους και η φωτοδυναμική θεραπεία έλαβε χώρα.

Πίνακας 7. Πρωτόκολλο ακτινοβολήσης για κάθε ζώο.

Παράμετρος	Μυς No. 1	Μυς No. 2	Μυς No. 3 ^a		Μυς No. 4 (Αναφοράς)
λ (nm)	625	660	660	625	-
P (mW) ^b	47,5	157	157	47,5	-
E (mW/cm ²) ^c	60,5	199,9	199,9	60,5	-
H (J/cm ²)	99,9	102	50,3	49	-

^a Ο μυς No.3 ακτινοβολήθηκε ταυτόχρονα με το laser και την πηγή LED. Κάθε μία από τις δύο στήλες του αντιστοιχεί στις τιμές της αντιστοιχίας πηγής.

^b Όπως μετρήθηκαν την άκρη της ίνας. Οι διαφορές στις τιμές οφείλονται στη μέγιστη ισχύ P της κάθε πηγής.

^c Όπως μετρήθηκε στην επιφάνεια του δέρματος.

Όσον αφορά το φάσμα φθορισμού της περιοχής θεραπείας, αυτό ελήφθη: (i) πριν από την εφαρμογή της φωτοευαισθητοποιού ουσίας, (ii) λίγο πριν από τη φωτοδυναμική θεραπεία και (iii) αμέσως μετά το τέλος της θεραπείας. Σε καθημερινή βάση γινόταν θερμομέτρηση με τη θερμική κάμερα και μέτρηση των διαστάσεων του όγκου.

Τέλος, ως λήξη του πειράματος (θανάτωση των ζώων) θεωρήθηκε η ημέρα που παρατηρήθηκε ο πρώτος αυθόρμητος θάνατος ζώου. Η θανάτωση έγινε σε αεροστεγή θάλαμο με εισπνοή ατμών ισοφλουρανίου (isoflurane 1000mg/g Inhalation vapor), ο οποίος είναι ένας φθοριωμένος αιθέρας με γενικές αναισθητικές και μυοχαλαρωτικές ιδιότητες.

8.4 Υπολογιστική προσομοίωση

8.4.1 Φωτοδυναμική δράση ΦΔΘ

Η *in vivo* διαδικασία μελετήθηκε και μέσω υπολογιστικής προσομοίωσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο κώδικας «PDT Simulator», ο οποίος αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής έρευνας, με την παραδοχή του κανονικά οξυγονούμενου κέντρου, για λόγους μείωσης των μεταβλητών. Υπενθυμίζεται πως οι φωτοχημικές εξισώσεις που αφορούν τον προς προσομοίωση μηχανισμό αναφέρονται στη φωτοδυναμική δράση Τύπου II. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως η προσομοίωση των φωτοδυναμικών φαινομένων είναι δυνατή και μέσω του COMSOL Multiphysics. Παρόλα αυτά, απαιτείται η χρήση του module «Mathematics» για την αναγραφή των εξισώσεων που τα διέπουν, το οποίο όμως δεν είναι διαθέσιμο με βάση την άδεια χρήσης που διαθέτει ο Τομέας Φυσικής του ΕΜΠ.

Η προσομοίωση της γεωμετρίας του πειράματος έγινε με έναν κύβο ακμής 2 cm, του οποίου τα άνω 0,3 cm αναπαριστούσαν τον αέρα, ενώ ο υπόλοιπος όγκος του τον περιτοναϊκό μυϊκό ιστό του ζώου. Στο εσωτερικό του κύβου υπήρχε σφαίρα διαμέτρου 1 cm, η οποία προέβαλλε κατά 0,3 cm από τον μυϊκό ιστό και έπαιξε τον ρόλο του καρκινικού όγκου. Επίσης, στο άνω τμήμα του μυϊκού ιστού καθώς και του όγκου που προέβαλλε, θεωρήθηκε δερματικός ιστός πάχους 220 μm, ο οποίος αναπαριστούσε τα στρώματα της επιδερμίδας και της δερμίδας του ζώου. Η διάμετρος του σφαιρικού όγκου αντιστοιχούσε στην πειραματικά μετρούμενη, ενώ το πάχος του δέρματος σε βιβλιογραφικές τιμές μυών [203,204].

Αναφορικά με τις οπτικές παραμέτρους, οι συντελεστές απορρόφησης και σκέδασης του δέρματος εξήχθησαν από τα δεδομένα των αναφορών [205,206]. Όσον αφορά τις τιμές του παράγοντα ανισοτροπίας και του δείκτη διάθλασης, αυτές ορίστηκαν στα 0,8 και 1,4, αντίστοιχα, με βάση προηγούμενη δημοσιευμένη μελέτη της παρούσας ερευνητικής ομάδας [135]. Οι αντίστοιχες τιμές για τον μυϊκό ιστό στηρίχθηκαν στις αναφορές [207,208]. Όσον αφορά τις οπτικές ιδιότητες του 4T1 όγκου, δεν ήταν δυνατό να βρεθούν στη βιβλιογραφία αντίστοιχες με τα χρησιμοποιούμενα μήκη κύματος. Επομένως, οι τιμές των συντελεστών απορρόφησης και σκέδασης εξήχθησαν με παρεμβολή των διαθέσιμων δεδομένων των αναφορών [209,210], με βάση τις βέλτιστες καμπύλες των σχετικών γραφημάτων της αναφοράς [211] και παρουσιάζονται

στον **πίνακα 8**. Όσον αφορά τις αντίστοιχες τιμές για την πηγή των 405 nm, αυτές εξήχθησαν από τα δεδομένα της αναφοράς [206]. Επιπλέον, δεδομένου ότι ο δείκτης διάθλασης σχετίζεται με τη συγκέντρωση πρωτεϊνών, που στους καρκινικούς ιστούς είναι υψηλότερη από ότι στους υγιείς, η τιμή του καθορίστηκε στο 1,54 [135], ενώ ο παράγοντας ανισοτροπίας στο 0,9 [135,212]. Επίσης, καθώς το Metvix οδηγεί στο σχηματισμό PpIX, ελήφθη υπόψη η συμβολή της στις οπτικές ιδιότητες της περιοχής του όγκου, με βάση τη βιβλιογραφία [213–216]. Έτσι, για τις ανάγκες της προσομοίωσης υπολογίστηκαν οι συνολικοί συντελεστές απορρόφησης και σκέδασης στη θέση του όγκου ως εξής [217,218]:

$$\blacksquare \quad \mu_a = \mu_{a,4T1} + \mu_{a,PpIX} \quad (24)$$

$$\blacksquare \quad \mu_s = \mu_{s,4T1} + \mu_{s,PpIX} \quad (25)$$

όπου, μ_a ο συνολικός συντελεστής απορρόφησης, $\mu_{a,4T1}$ ο συντελεστής απορρόφησης της περιοχής του όγκου και $\mu_{a,PpIX}$ η αντίστοιχη τιμή για την PpIX.

Πίνακας 8. Οπτικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν στην προσομοίωση.

Ιστός / Περιοχή	Παράμετρος	Τιμή @ 405 nm	Τιμή @ 625 nm	Τιμή @ 660 nm
Δέρμα	μ_a	2,86 cm ⁻¹	0,33 cm ⁻¹	0,20 cm ⁻¹
	μ_s	113,9 cm ⁻¹	166,4 cm ⁻¹	165 cm ⁻¹
	g_f		0,8	
	n		1,4	
	d		220 μm	
4T1 όγκος	μ_a	3,89 cm ⁻¹	0,94 cm ⁻¹	0,76 cm ⁻¹
	μ_s	68,5 cm ⁻¹	86,2 cm ⁻¹	98,0 cm ⁻¹
	g_f		0,9	
	n		1,54	
	d		1 cm	

PpIX	μ_a	1,88 cm ⁻¹	0,06 cm ⁻¹	0,0 cm ⁻¹
	μ_s	115,0 cm ⁻¹	66,7 cm ⁻¹	66,7 cm ⁻¹
	g_f		0,9	
	n		1,38	
Μυϊκός ιστός (περιτόναιο)	μ_a	3,0 cm ⁻¹	2,2 cm ⁻¹	2,2 cm ⁻¹
	μ_s	36,4 cm ⁻¹	20,5 cm ⁻¹	19,6 cm ⁻¹
	g_f		0,8	
	n		1,4	

Οι τιμές των g_f , n και d αφορούν και τα τρία μήκη κύματος κάθε ιστού / περιοχής.

Όσον αφορά τις φωτοχημικές παραμέτρους που εισήχθησαν στο υπολογιστικό μοντέλο, αυτές αντιστοιχούσαν στο 5-αμινολεβουλινικό οξύ PpIX (ALA-PpIX), λόγω της εστεροποίησης του MAL σε ALA [219,220], εξήχθησαν από τις αναφορές [30,142,151] και παρουσιάζονται στον **πίνακα 9**. Για τον υπολογισμό της αρχικής επιφανειακής συγκέντρωσης της φωτοευαισθητοποιού ουσίας λήφθηκε υπόψη η μάζα της (30 mg) που αντιστοιχούσε σε $m = 4,8$ mg αμινολεβουλινικού μεθυλίου, το ύψος της στρώσης που σχημάτισε πάνω στο δέρμα ($h \approx 0,1$ cm), η αντίστοιχη ακτίνα ($r \approx 0,8$ cm) καθώς και η μοριακή μάζα του αμινολεβουλινικού μεθυλίου (181.62 g/mol) [202]. Με αυτόν τον τρόπο, η αρχική επιφανειακή συγκέντρωση $[S_0]$ υπολογίστηκε στα 131 mM, βάσει της σχέσης:

$$[S_0] = \frac{m}{\pi r^2 h M_r} \quad (26)$$

Ένα από τα κύρια προβλήματα που παρουσιάστηκαν, πέραν της ακρίβειας των τιμών των παραμέτρων που αναφέρθηκαν ανωτέρω, ήταν και ο καθορισμός της συγκέντρωσης της φωτοευαισθητοποιού ουσίας, που παρέμεινε τελικά στην επιφάνεια της καρκινικής περιοχής (βλ. παρακάτω). Ως εκ τούτου, εφαρμόστηκε συντελεστής διόρθωσης (0,1) στην τιμή της $[S_0]$, ο οποίος κρίθηκε επαρκής προκειμένου να ληφθεί υπόψη το χειρότερο σενάριο της αφαίρεσης του parafilm από τα ζώα κατά τη διάρκεια της τριώρης αναμονής. Επίσης, συνυπολογίστηκαν επιπρόσθετες απώλειες της φωτοευαισθητοποιού ουσίας

(π.χ. ποσότητα του Metvix παρέμενε στο γάντι κατά την εφαρμογή αλλά και στο τρίχωμα του ζώου). Επομένως, μετά από την πάροδο των τριών ωρών συσκότισης και τον καθαρισμό της περιοχής με φυσιολογικό ορό, θεωρήθηκε πως η απορρόφηση της ουσίας μέσω του δέρματος περιορίστηκε στο 5% της επιφανειακής της συγκέντρωσης. Επιπλέον, προκειμένου να ληφθεί υπόψη η συγκέντρωση της PpIX ως συνάρτηση του βάθους, εξήχθη και χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη των σχετικών δεδομένων που παρατίθενται σε μελέτη των Campbell *et al.* του 2016 [214]. Τέλος, για τις ανάγκες της προσομοίωσης, θεωρήθηκε ότι τα μόρια της πρωτοπορφυρίνης IX είχαν συσσωρευτεί μόνο στον καρκινικό ιστό, καθώς όπως αναφέρεται και στο φυλλάδιο χαρακτηριστικών του σκευάσματος «με την κρέμα Metvix παρατηρείται στους ανθρώπους υψηλότερος βαθμός συγκέντρωσης πορφυρινών σε περιοχές με βλάβες, σε σύγκριση με το υγιές δέρμα» [197].

Πίνακας 9. Φωτοχημικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν στην προσομοίωση ^a.

Παράμετρος	Τιμή
ϵ	0,003 (cm ⁻¹ μM ⁻¹)
ξ	3,7 · 10 ⁻³ (cm ² mW ⁻¹ s ⁻¹)
σ	9 · 10 ⁻⁵ (μM ⁻¹)
β	11,9 (μM)
f	1
δ	33 (μM)
g_o	0,7 (μM s ⁻¹) ^b
$[^3O_2]_o$	60 (μM)
$[^1O_2]_{rx,o}$ ^c	0
$[S_0]_{corrected}$ ^d	655 (μM)
$[^1O_2]_{rx,sh}$	500 (μM)

^a Οι τιμές εξήχθησαν από τις αναφορές [30,151].

^b Η τιμή εξήχθη από την αναφορά [142].

^c Αρχική συγκέντρωση του μονήρους οξυγόνου που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο.

^d Συγκέντρωση της κρέμας που απορροφήθηκε, μετά την εφαρμογή διορθωτικών παραγόντων. Για τη φυσική σημασία των υπόλοιπων παραμέτρων βλ. **πίνακα 3**.

8.4.2 Φωτοθερμική δράση ΦΔΘ

Το δεύτερο τμήμα της προσομοίωσης, αναφορικά με τη μελέτη της πιθανής ανόδου της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας, εκτελέστηκε μέσω του COMSOL Multiphysics. Για την υλοποίησή του χρησιμοποιήθηκαν τα modules «Radiative Beam in Absorbing Media» και «Bioheat Transfer». Ο σχεδιασμός του μοντέλου του μυός έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να αντιστοιχεί στις πραγματικές διαστάσεις του, ενώ το ίδιο έγινε και για τη γεωμετρία της ακτινοβολήσης. Για την παραπάνω μελέτη αναπτύχθηκε η εφαρμογή «Thermal Effects Simulator», στο περιβάλλον του COMSOL Multiphysics.

Στην **εικόνα 48** που ακολουθεί, παρουσιάζεται το παράθυρο χρήσης της εν λόγω εφαρμογής. Όπως διακρίνεται, στο αριστερό τμήμα του ο χρήστης ορίζει τις παραμέτρους της θεραπείας. Αρχικά θα πρέπει να θέσει τις (καρτεσιανές) συντεταγμένες του όγκου καθώς και την ακτίνα του (tumor radius). Εν συνεχεία, καθορίζει την ισχύ της πηγής φωτός (source power), όπως επίσης και την ακτίνα της δέσμης (spot radius). Επιπροσθέτως, θα πρέπει να ορίσει τον χρόνο ακτινοβολήσης (treatment time) αλλά και το χρονικό διάστημα μετά το πέρας της θεραπείας για το οποίο ενδιαφέρεται να προσομοιώσει τη διάχυση της θερμότητας (diffusion time). Μάλιστα, έχει τη δυνατότητα να καθορίσει και το βήμα του χρόνου για τους υπολογισμούς. Θέτοντας μικρό πλήθος βημάτων μειώνει τον χρόνο εκτέλεσης της εφαρμογής, ενώ στην αντίθετη περίπτωση απαιτείται μεν περισσότερος χρόνος αλλά παράγονται περισσότερες χρονικές στιγμές, στις οποίες μπορεί να μελετήσει τα εξαχθέντα αποτελέσματα. Ακολούθως, θέτει τη θερμοκρασία σώματος του μυός. Αναφορικά με τις διαδικασίες νέκρωσης, αυτές ορίζονται έμμεσα μέσω της θερμοκρασίας άμεσης νέκρωσης (instant necrosis temp.), όπου σε περίπτωση που ξεπεραστεί η τιμή της θεωρείται πως επέρχεται άμεσος κυτταρικός θάνατος. Επίσης, ορίζεται και ο αποπτωτικός θάνατος, μέσω του καθορισμού του αντίστοιχου κατωφλίου θερμοκρασίας (damage temperature) και του χρόνου ακτινοβολήσης για την πρόκλησή του (damage time). Τέλος, ο χρήστης μπορεί να επιλέξει και την πυκνότητα πλέγματος με την οποία επιθυμεί να κατασκευαστεί το μοντέλο (βλ. § [7.4 Ο ρόλος του μεγέθους του πλέγματος](#)). Οι οπτικές και θερμικές ιδιότητες των ιστών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έκδοση της εφαρμογής προέρχονται από τις αναφορές [221–223] και φαίνονται στον **πίνακα 10**. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί πως η εφαρμογή προγραμματίστηκε και

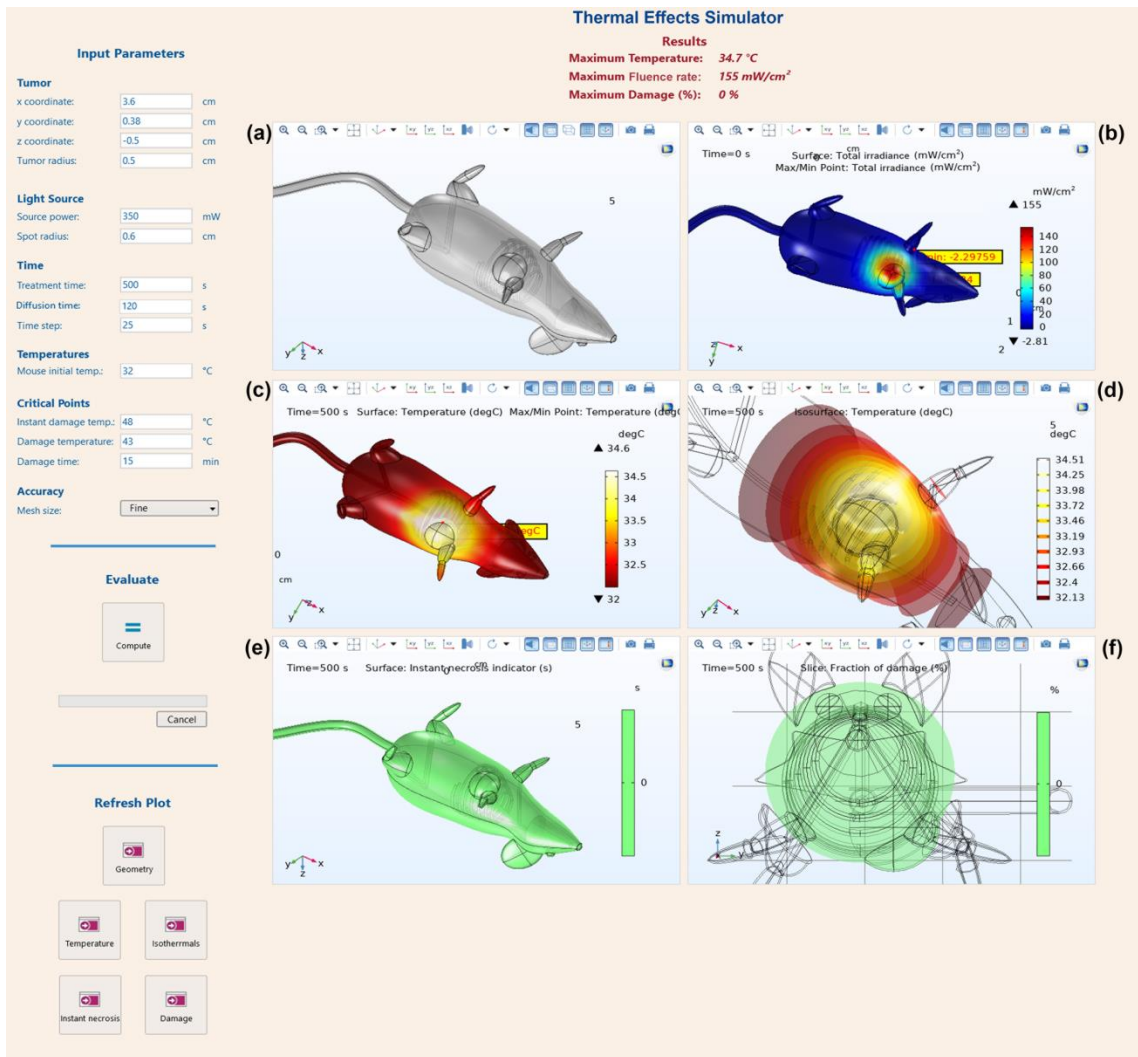
εκτελέστηκε για την περίπτωση πηγής με μήκος κύματος 625 nm (καθώς ήταν η μεγαλύτερης διάρκειας ακτινοβολία στο *in vivo* πείραμα) και με επίπεδο προφίλ δέσμης ακτίνας 0,6 cm (για λόγους απλοποίησης του προβλήματος). Προφανώς, υπάρχει η δυνατότητα ορισμού οποιασδήποτε δέσμης, μέσω του κατάλληλου καθορισμού των οπτικών παραμέτρων των ιστών, όπως επίσης και οποιουδήποτε προφίλ αυτής. Το παραπάνω όμως δεν μπορεί να γίνει από τον τελικό χρήστη μέσω της εφαρμογής αλλά μέσα από το μητρικό αρχείο του COMSOL Multiphysics, δημιουργώντας μία νέα έκδοση αυτής.

Η εφαρμογή (βλ. **εικόνα 48**) υπολογίζει και εμφανίζει στο άνω μέρος της (ακριβώς κάτω από το όνομά της) την τιμή της μέγιστης θερμοκρασίας του ιστού, της μέγιστης πυκνότητας προσπίπτουσας ακτινοβολίας και το μέγιστο ποσοστό νέκρωσης. Επιπλέον, με τη μορφή τρισδιάστατων, διαδραστικών διαγραμμάτων (ο χρήστης μπορεί να περιστρέψει το ζώο, να κάνει μεγέθυνση ή σμίκρυνση και να επιλέξει τη χρονική στιγμή που τον ενδιαφέρει) δίνεται η μορφή της προς αναπαράσταση γεωμετρίας καθώς και η χωρική κατανομή της πυκνότητας προσπίπτουσας ακτινοβολίας, της θερμοκρασίας, των ισόθερμων καμπυλών, της νέκρωσης και του ποσοστού αυτής.

Πίνακας 10. Οπτικές και θερμικές ιδιότητες των ιστών για την εφαρμογή.

Ιστός/ Περιοχή	Συντελεστής απορρόφησης [μ_a (cm ⁻¹)]	Θερμοχωρη- τικότητα [C_p (J/kg·K)]	Θερμική αγωγιμότητα [k (W/m·K)]	Πυκνότητα [ρ (kg/m ³)]
Δέρμα	0,33	2291	0,58	1180
Όγκος 4T1	0,94	4200	0,56	1150
Μυς	2,20	3421	0,48	1060
Οστό	0,10	1313	0,50	1145
Αίμα ^a	-	4180	-	1000

^a Ο ρυθμός αιματικής διήθησης (blood perfusion rate) και η συνεισφορά του μεταβολισμού στην άνοδο της θερμοκρασίας (metabolic heat source) θεωρήθηκαν 0,0064 s⁻¹ and 0 (αμελητέα), αντίστοιχα.



Εικόνα 48. Αποτύπωση (snapshot) του παραθύρου αλληλεπίδρασης με την εφαρμογή «Thermal Effects Simulator». Στο αριστερό τμήμα διακρίνονται οι παράμετροι που πρέπει να ορίσει ο χρήστης καθώς και τα κομμάτια για την εκτέλεση των αντίστοιχων υπολογισμών. Οι γραφικές παραστάσεις, οι οποίες είναι διαδραστικές και τρισδιάστατες (ο χρήστης μπορεί να περιστρέψει το ζώο, να κάνει μεγέθυνση και να επιλέξει τη χρονική στιγμή που τον ενδιαφέρει), είναι (a) η αναπαράσταση της γεωμετρίας και η χωρική κατανομή: (b) της πυκνότητας προσπίπτουσας ακτινοβολίας, (c) της θερμοκρασίας, (d) των ισόθερμων επιφανειών, (e) της νέκρωσης και (f) του ποσοστού αυτής. (Σημείωση για τις εικόνες (b - c): αν και η εφαρμογή προβάλλει τη θέση της μέγιστης και ελάχιστης τιμής σε κίτρινο πλαίσιο, αυτά δεν είναι εδώ ορατά λόγω της θέσης του μυός που επιλέχθηκε προκειμένου να αποτυπώνεται καλύτερα ο όγκος.)

Τέλος, προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή άνοδος της θερμοκρασίας αλλά και να αναδειχθούν οι δυνατότητες της εφαρμογής, αυτή εκτελέστηκε με βάση το *in vivo* πείραμα για δεκαπέντε διαφορετικά σενάρια θεραπείας (διέφεραν ως

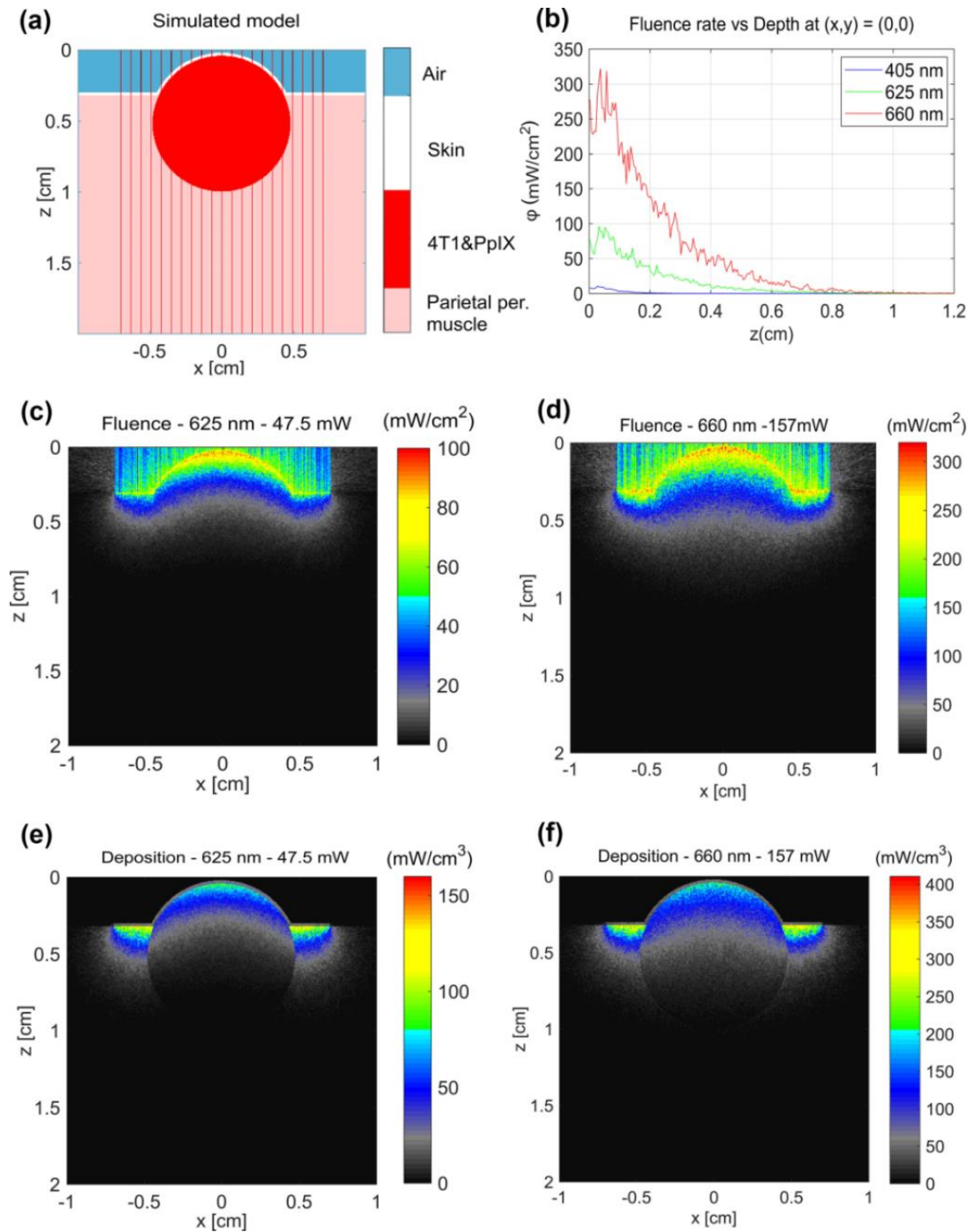
προς τον χρόνο θεραπείας και την πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας). Ομαδοποιήθηκαν ανά πέντε με βάση τον χρόνο ακτινοβολήσης (βλ. **πίνακα 11**), ενώ για κάθε ομάδα εξετάστηκε και η συνεισφορά της πυκνότητας προσπίπτουσας ακτινοβολίας (για τιμές από 50 έως 250 mW/cm², με βήμα 50 mW/cm²). Όσον αφορά το μέγεθος του πλέγματος, αυτό ορίστηκε σε «fine».

Πίνακας 11. Τα δεκαπέντε σενάρια θεραπείας.

Σενάριο	Χρόνος ακτινοβολήσης [<i>t</i> (min)]	Πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας [<i>E</i> (mW/cm ²)]
No. 1 – 5	5	50 – 250
No. 6 – 10	15	50 – 250
No. 10 – 15	30	50 – 250

8.5 Αποτελέσματα

Η υπολογιστική προσομοίωση ανέδειξε τις διαφορές που προκύπτουν από το βάθος διείσδυσης της κάθε δέσμης. Όπως φαίνεται από την **εικόνας 49 (b - d)**, τα μεγαλύτερα μήκη κύματος οδηγούν σε υψηλότερες τιμές ρυθμού ροής της ακτινοβολίας σε μεγαλύτερα βάθη. Ως αποτέλεσμα, ιστοί κείμενοι βαθύτερα δύνανται να απορροφήσουν σημαντικά υψηλότερες ποσότητες ενέργειας (βλ. **εικόνας (e)** και **(f)**). Ως υπεύθυνες για τις αυξημένες τιμές ρυθμού ροής ακτινοβολίας που καταγράφηκαν στα ανώτερα στρώματα της γεωμετρίας, θεωρήθηκαν οι τιμές του συντελεστή σκέδασης του δέρματος και του όγκου, καθώς στην περιοχή συνυπάρχουν διαδιδόμενα και σκεδαζόμενα φωτόνια. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως για τα 660 nm η πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας υπερέβη τοπικά τα 200 mW·cm⁻² προκειμένου να επιτευχθούν επαρκώς υψηλές τιμές εντός του όγκου.



Εικόνα 49. (a) Εγκάρσια τομή της γεωμετρίας (simulated model), όπου οι κόκκινες κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν τη διεύθυνση διάδοσης της δέσμης (η πυκνότητά τους είναι τυχαία). (b) Χωρική κατανομή του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας με το βάθος (depth) για τις φωτεινές δέσμες θεραπείας (στα 625 και 660 nm) και φθορισμού (στα 405 nm), στα πρώτα 1,2 cm του όγκου. (c, d) Χωρική κατανομή του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας για τις δέσμες θεραπείας (ο όρος «rate» έχει παραληφθεί από τον τίτλο για χωροταξικούς λόγους) και (e, f) της εναποτιθέμενης ενέργειας, αντίστοιχα. Οι τιμές της ισχύος διαφέρουν λόγω των διαφορετικών δυνατοτήτων των πηγών φωτός.

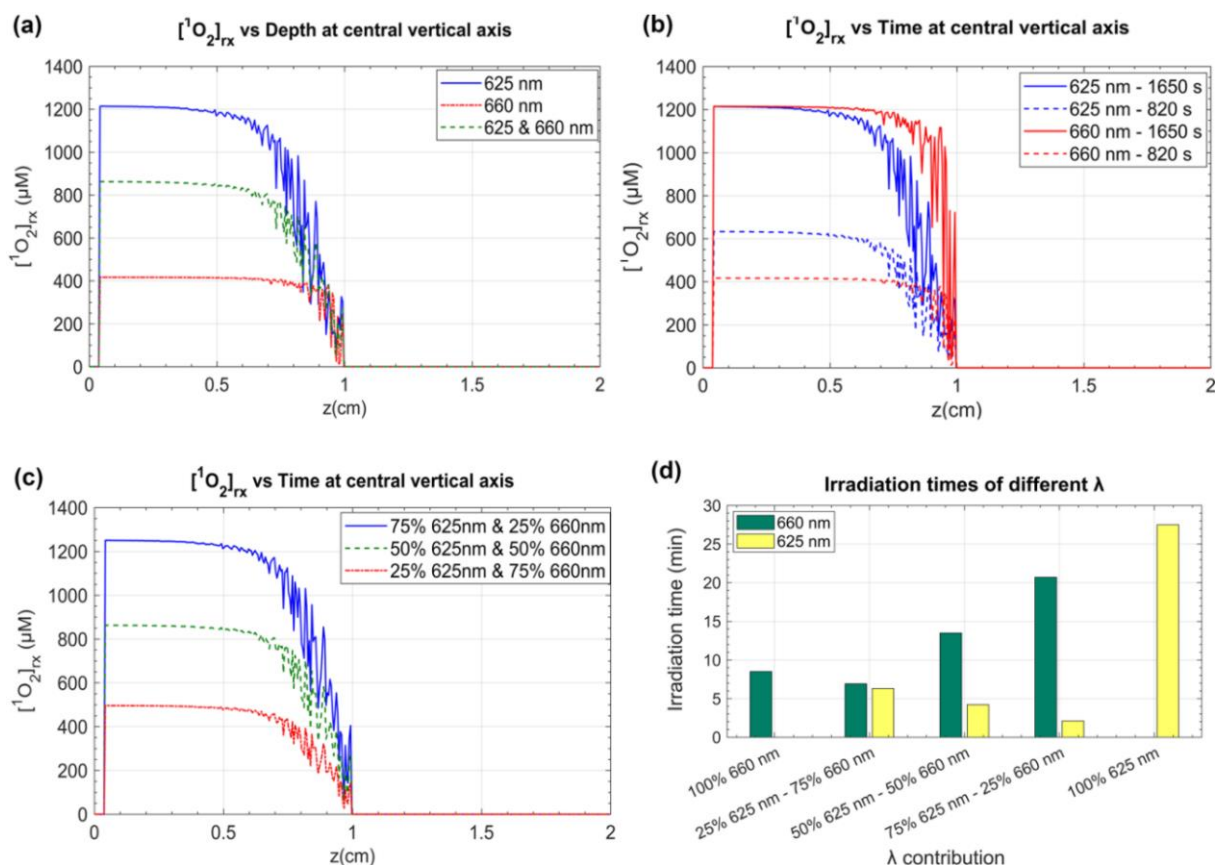
Η *in silico* μελέτη ανέδειξε τη διακύμανση στις τιμές των κυτταροτοξικών προϊόντων κατά το τέλος της ακτινοβολήσης με κάθε πρωτόκολλο και παρουσιάζεται στην **εικόνα 50 (a)**. Η υψηλότερη τιμή του $[^1O_2]_{rx}$ καταγράφεται με το πρωτόκολλο των 625 nm ενώ η χαμηλότερη με αυτό των 600 nm. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως οι τιμές διέφεραν άνω του 200%, παρόλη τη σταθερή τιμή της πυκνότητας ενέργειας (δόση φωτός), που είχε οριστεί στα $\sim 100 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$. Τέλος, ο συνδυασμός των δύο πηγών φωτός (που εφαρμόστηκε *in vivo* στο ζώο No. 3) φαίνεται να οδηγεί σε ενδιάμεσα αποτελέσματα (από άποψη παραγωγής $(^1O_2)_{rx}$).

Εν συνεχεία, μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου ακτινοβολήσης στην παραγωγή του μονήρους οξυγόνου για τα δύο μήκη κύματος του *in vivo* πειράματος. Όπως φαίνεται και από την **εικόνα 50 (b)**, παρά το χαμηλότερο βάθος διείσδυσης της δέσμης των 625 nm, ο υψηλότερος συντελεστής απορρόφησης (σε σχέση με εκείνον που αντιστοιχεί στη δέση των 660 nm), είχε ως αποτέλεσμα την κατά περίπου 50% αυξημένη παραγωγή $(^1O_2)_{rx}$ στα πρώτα 0,5 cm του όγκου (για χρόνο ακτινοβολήσης 820 s). Αντιθέτως, πέρα από αυτό το σημείο, το υψηλότερο βάθος διείσδυσης και ο ρυθμός ροής της δέσμης των 660 nm άρχισαν να αντισταθμίζουν τη χαμηλότερη τιμή του μ_a . Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι ο αυξημένος χρόνος ακτινοβολήσης (1650 s) με τη δέση των 660 nm οδηγεί στην ίδια ποσότητα $(^1O_2)_{rx}$, υποδηλώνοντας πιθανά φαινόμενα κορεσμού, τουλάχιστον αναφορικά με τις συγκεκριμένες τιμές φωτοχημικών παραμέτρων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η υλοποίηση ενός ακόμα σεναρίου (βλ. **εικόνα 50 (c)**), το οποίο προέβλεπε τρεις πιθανούς συνδυασμούς των πηγών φωτός προκειμένου να επιτευχθεί η συνολική δόση των $100 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$. Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα, όταν η επί τις εκατό συνεισφορά των δεσμών για τα 625 nm και 660 nm είναι 75% - 25%, αντίστοιχα, οι τιμές του $[^1O_2]_{rx}$ που παρατηρούνται είναι κατά 3% υψηλότερες σε σχέση με αυτές που προκύπτουν από την ακτινοβολήση μόνο με τη δέση των 625 nm (βλ. **εικόνα 50 (a)**), ενώ ο χρόνος θεραπείας μειώνεται. Η αντιστροφή του ποσοστού συνεισφοράς κάθε δέσμης (25% - 75%) οδηγεί σε τιμές $[^1O_2]_{rx}$ κατά 31% μειωμένες σε σχέση με τη δέση των 625 nm και κατά 19% αυξημένες σε σχέση με τη δέση των 660 nm, αντίστοιχα. Εδώ, πρέπει να σημειωθεί πως το γράφημα της **εικόνας 50 (a)** σκοπίμως δεν ενσωματώθηκε σε αυτό της **εικόνας 50 (c)** για λόγους σαφήνειας.

Προκειμένου να δοθεί μια αίσθηση του χρόνου που απαιτείται για την υλοποίηση των παραπάνω πρωτοκόλλων (σε *in vivo* εφαρμογή τους, να μη

συγκέεται με το χρόνο που απαιτείται για την υπολογιστική προσομοίωσή τους), παρουσιάζεται το γράφημα της εικόνας 50 (d). Από αυτό γίνεται αντιληπτή η αύξηση του χρόνου θεραπείας με την αυξανόμενη συνεισφορά της δέσμης των 625 nm καθώς και η μεγάλη διαφορά του απαιτούμενου χρόνου μεταξύ των ακραίων περιπτώσεων (χρήση μόνο μίας πηγής φωτός).



Εικόνα 50. (a) Σύγκριση των τιμών του $[^1O_2]_{rx}$ που παράγεται από την ακτινοβόληση με 625 nm, 660 nm και το συνδυασμό τους. Η πυκνότητα ενέργειας σε όλες τις περιπτώσεις ήταν $100 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$. (b) Επίδραση του χρόνου ακτινοβόλησης στην τιμή του $[^1O_2]_{rx}$ που παράγεται, για τα 625 και 660 nm. (c) Επίδραση στην τιμή του $[^1O_2]_{rx}$ τριών διαφορετικών συνδυασμών των δύο δεσμών, από άποψη συνεισφοράς στη συνολική δόση των $100 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$. Ο 50% - 50% συνδυασμός αφορά στην περίπτωση του μύς Νο. 3. (d) Ο απαιτούμενος χρόνος για τα πρωτόκολλα των εικόνων (a) και (c), αντίστοιχα. (Σημείωση: όλες οι περιπτώσεις αναφέρονται σε σχέση με το βάθος στον κεντρικό, εγκάρσιο άξονα του όγκου (depth at central vertical axis))

Όσον αφορά την *in vivo*, προ-θεραπείας μελέτη φθορισμού της καρκινικής περιοχής των μυών, όπως φαίνεται από την εικόνα 51 (a), το ζώο που θα ακτινοβολούνταν μόνο με την πηγή των 660 nm (No. 2) παρουσίασε σήμα

χαμηλότερης έντασης. Αντιθέτως, το μέγιστο σήμα φθορισμού των άλλων δύο μυών (No. 1 και No. 3) ήταν σε παρόμοια επίπεδα. Οι τρεις κύριες κορυφές που εντοπίστηκαν ήταν στα 604, 636 και 704 nm με ελάχιστες διακυμάνσεις.

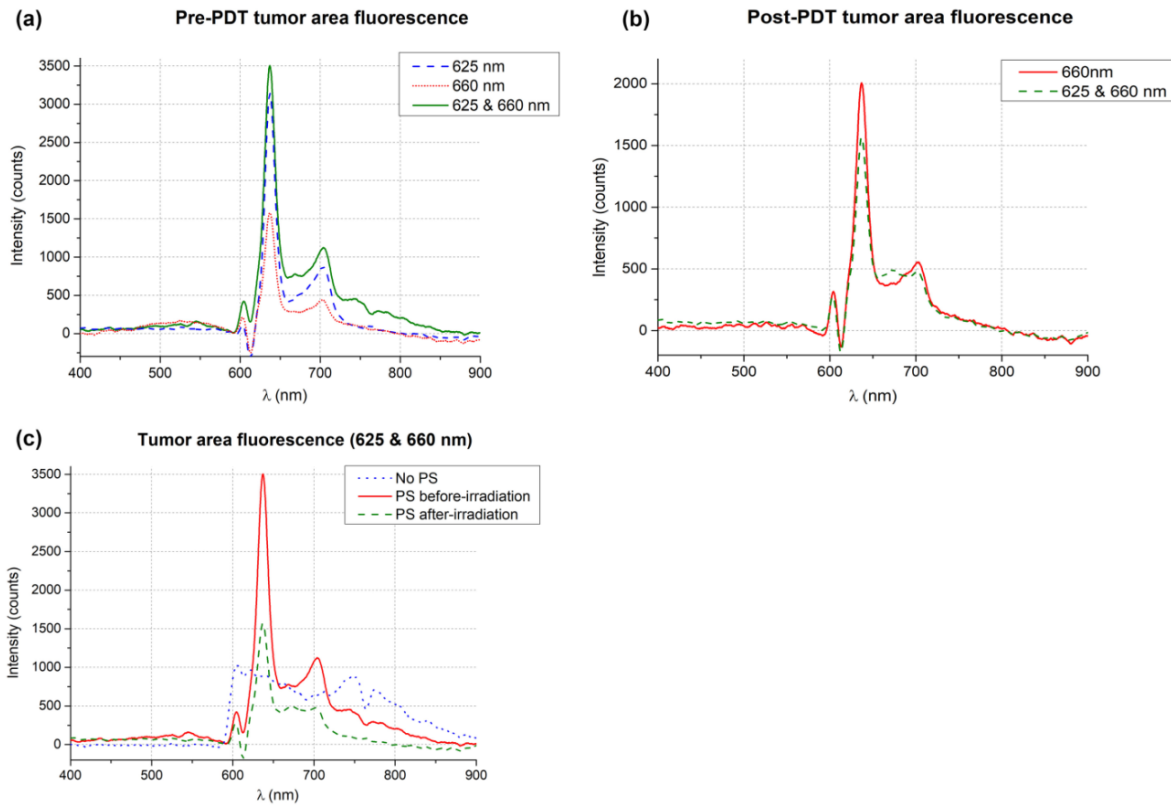
Σε αντιπαραβολή με τα ανωτέρω, η **εικόνα 51 (b)** παρουσιάζει τα ληφθέντα φάσματα φθορισμού των ζώων No. 2 και No. 3 αμέσως μετά τη λήξη της φωτοδυναμικής θεραπείας. Το αντίστοιχο φάσμα του ζώου No. 1 δεν εμφανίζεται καθώς τα δεδομένα ήταν κατακεραματισμένα. Σε αντίθεση με τα προ-θεραπείας φάσματα των μυών No. 2 και No. 3, εδώ παρατηρήθηκε μικρή απόκλιση των ληφθέντων σημάτων.

Η **εικόνα 51 (c)** καταδεικνύει τις διαφορές στο φάσμα φθορισμού της περιοχής πριν την εφαρμογή του φωτοευαίσθητοποιού παράγοντα (No PS), μετά την εφαρμογή του (λίγο πριν την ακτινοβόληση - PS before-irradiation) και τέλος, με τη λήξη της φωτοδυναμικής θεραπείας (PS after-irradiation). Στην πρώτη περίπτωση, το φάσμα παρουσίασε τοπικά μέγιστα στα 604, 622, 750 και 774 nm. Μετά τη χορήγηση του Metvix, τόσο προτού όσο και μετά την ακτινοβόληση, οι κορυφές που παρατηρήθηκαν βρίσκονταν στα 604, 636 και 704 nm. Κύρια διαφορά μεταξύ των δύο τελευταίων ήταν η ένταση του φθορισμού, η οποία ήταν υπερδιπλάσια για την προ-ακτινοβόλησης περίπτωση, για τα 636 nm.

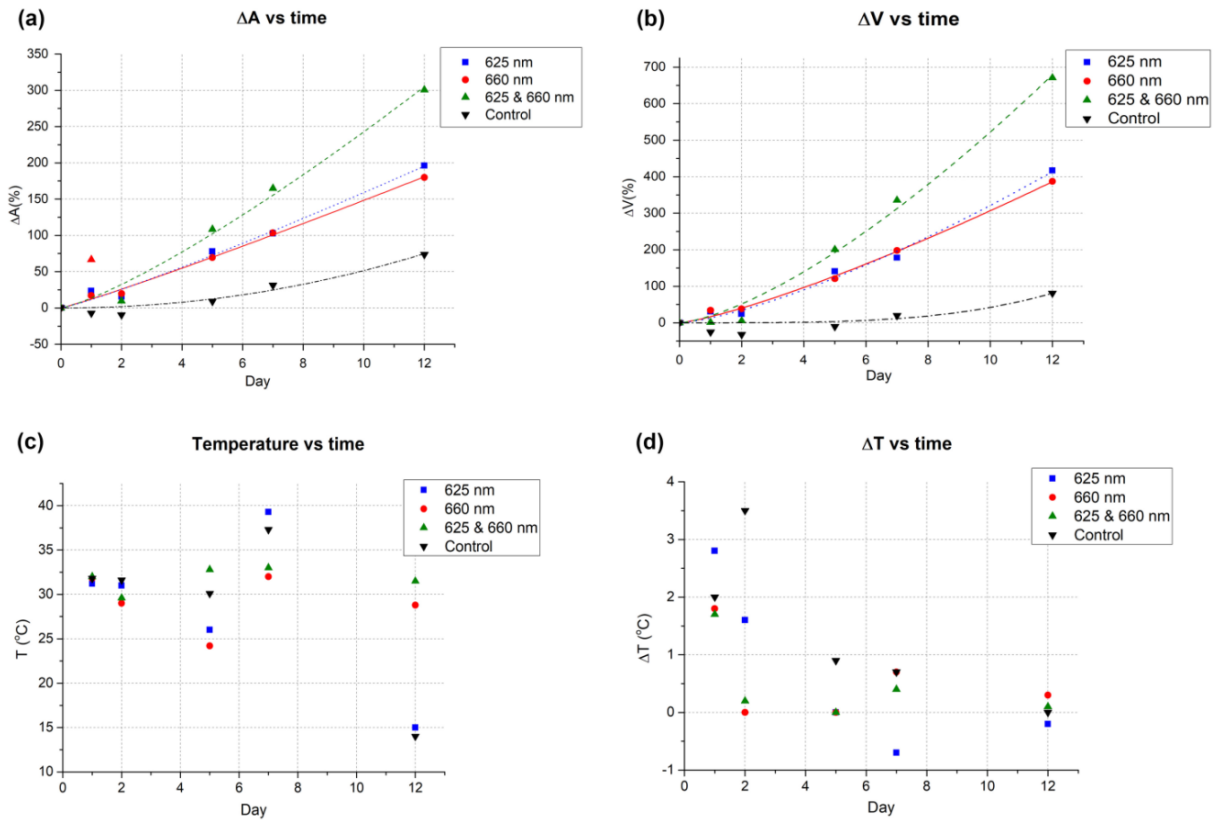
Η εκτίμηση του μεγέθους του κάθε καρκινικού όγκου σε συνάρτηση με το χρόνο (μέρες από τη θεραπεία) παρουσιάζεται στις **εικόνες 52 (a, b)**. Η πρώτη (**a**) αφορά τη μεταβολή του εμβαδού σε εγκάρσιο επίπεδο στο κέντρο του όγκου ενώ η δεύτερη (**b**) την μεταβολή του όγκου της καρκινικής περιοχής. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί, το ποσοστό αύξησης του όγκου ήταν υψηλότερο μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία με το συνδυασμό των δεσμών των 625 και 660 nm, σε σχέση με την ακτινοβόληση με μία μόνο πηγή (625 ή 660 nm, αντίστοιχα). Ενδιαφέρον έχουν οι καμπύλες του όγκου του ζώου που δεν ακτινοβολήθηκε καθώς παρουσίασε τον χαμηλότερο ρυθμό αύξησης.

Αναφορικά με τη θερμοκρασία της καρκινικής και της σωματικής (κοιλιακής) περιοχής των μυών με την πάροδο των ημερών, αυτή φαίνεται σε απόλυτες τιμές στην **εικόνα 52 (c)**, ενώ η **εικόνα 52 (d)** παρουσιάζει τη μεταξύ τους διαφορά. Η περιοχή του όγκου παρουσίαζε υψηλότερες τιμές από τον υγιή ιστό, αν και με την πάροδο των ημερών αυτή τη διαφορά έτεινε να ελαχιστοποιηθεί. Η θερμοκρασία του όγκου του μυός που δεν ακτινοβολήθηκε και εκείνου που υποβλήθηκε σε θεραπεία με το συνδυασμό πηγών φωτός (No. 4 και No. 3, αντίστοιχα) ήταν η υψηλότερη που παρατηρήθηκε (37,3 και

39,3°C, αντίστοιχα) την ημέρα 7. Όσον αφορά το ζώο που υποβλήθηκε σε θεραπεία με τη δέσμη των 660 nm (No. 2), παρουσίαζε συνεχώς χαμηλότερες τιμές θερμοκρασίας από όλα τα υπόλοιπα.

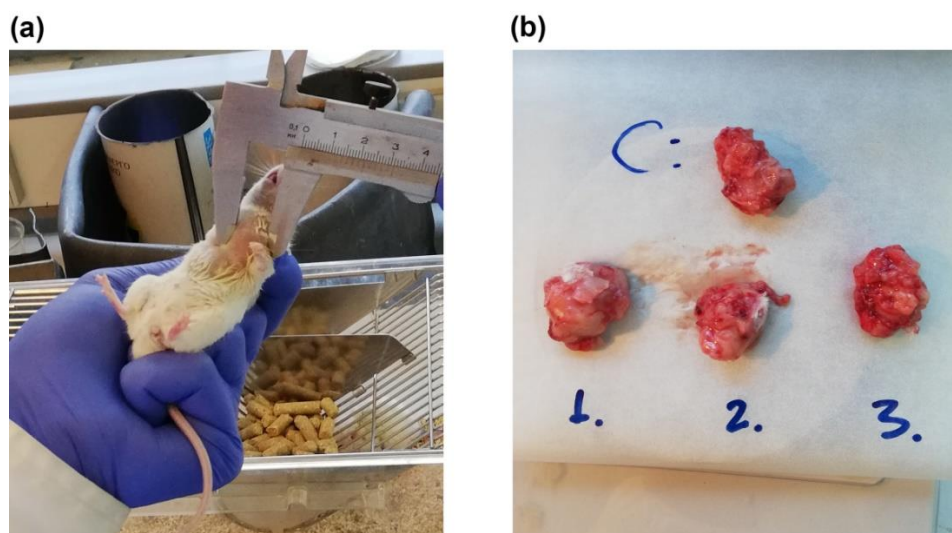


Εικόνα 51. Τα φάσματα φθορισμού της περιοχής του όγκου **(a)** ακριβώς πριν και **(b)** αμέσως μετά την ακτινοβολήση με κάθε πηγή φωτός (το φάσμα που αντιστοιχεί στην πηγή των 625 nm δεν εμφανίζεται καθώς τα αντίστοιχα δεδομένα δεν κατέστη δυνατό να ανακτηθούν). **(c)** Τα φάσματα φθορισμού της περιοχής του όγκου ακριβώς πριν την εφαρμογή της φωτοευαισθητοποιού ουσίας (διακεκομμένη γραμμή – No PS), ακριβώς πριν την ακτινοβολήση (συνεχής γραμμή – PS before-irradiation) και αμέσως μετά την ακτινοβολήση (διακεκομμένη γραμμή με παύλες – PS after-irradiation) με τις δύο πηγές φωτός.



Εικόνα 52. Μεταβολή (%) της καρκινικής περιοχής **(a)** κατά εμβαδόν επιφάνειας και **(b)** κατά όγκο, σε σχέση με τις ημέρες που παρήλθαν από την εφαρμογή της θεραπείας. **(c)** Η καταγραφόμενη θερμοκρασία (στην περιοχή του όγκου) και **(d)** η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ όγκου και κοιλιακής χώρας.

Ως λήξη του πειράματος θεωρήθηκε η δωδέκατη ημέρα, όταν ο μυς που δεν είχε ακτινοβοληθεί πέθανε. Τότε και τα υπόλοιπα ζώα θανατώθηκαν, οι όγκοι τους αφαιρέθηκαν και ζυγίστηκαν. Σε αυτό το χρονικό σημείο οι όγκοι είχαν πλέον αρχίσει να διεισδύουν στην περιοχή του ποδιού και επίσης να εκτείνονται προς το λαιμό. Την ίδια ημέρα, ο μυς No. 1 υπεβλήθη σε διαδικασίες ανάνηψης, με τη θερμοκρασία του να είναι σημαντικά χαμηλότερη από εκείνη των δύο ζωντανών ζώων (βλ. **εικόνα 52 (c)**). Όσον αφορά τον όγκο του μυός αναφοράς, είχε αναπτυχθεί με ελλειπτικό τρόπο, σε αντίθεση με τους άλλους που ήταν πιο σφαιρικοί. Η μάζα των εξαχθέντων όγκων παρουσίασε μικρές διακυμάνσεις, με τον ελαφρύτερο να είναι εκείνος που ακτινοβολήθηκε με το πρωτόκολλο συνδυασμού πηγών φωτός. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί πως το ζώο αναφοράς είχε επίσης έναν από τους ελαφρύτερους όγκους (βλ. **πίνακα 12**). Ο βαρύτερος όγκος ήταν εκείνος του μυός No. 2. Τέλος, όλες οι μάζες ήταν παρόμοιες σε σύσταση, υφή και χρώμα (βλέπε **εικόνα 53 (b)**).



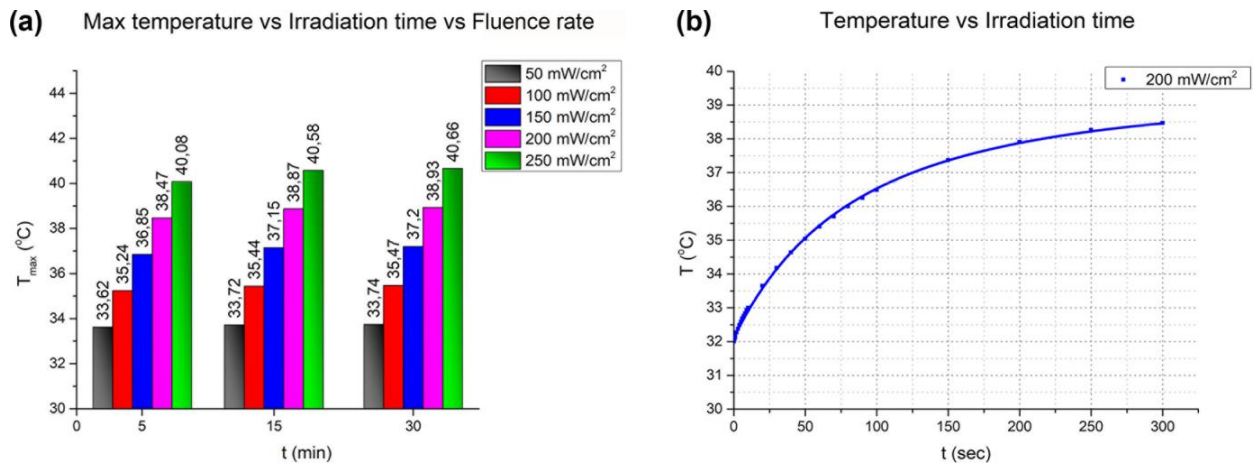
Εικόνα 53. (a) Μέτρηση των διαστάσεων του όγκου και (b) οι εξαχθέντες όγκοι από τους τρεις μύες που υποβλήθηκαν σε ΦΔΘ (1, 2, 3) και από τον μυ που δεν ακτινοβολήθηκε (C), αντίστοιχα.

Πίνακας 12. Μάζα εξαχθέντων όγκων.

λ (nm)	Μύς	Μάζα (g)
625	No. 1	4,69 ± 0,01
660	No. 2	5,32 ± 0,01
625 & 660	No. 3	4,26 ± 0,01
-	Control	4,26 ± 0,01

Αναφορικά με την πιθανή άνοδο της θερμοκρασίας λόγω της φωτοδυναμικής θεραπείας και τα δεκαπέντε σενάρια, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **εικόνα 54**. Οι διαφορές στη θερμοκρασία που καταγράφονται μεταξύ των 5 και 15 min θεραπείας κυμαίνονται μεταξύ του 0,30 και 1,25% (για $E = 50 - 250 \text{ mW/cm}^2$), ενώ οι αντίστοιχες διαφορές μεταξύ των 15 και 30 min θεραπείας μεταξύ του 0,06 και 0,20%, αντίστοιχα. Όπως παρατηρείται, πέραν των 5 min ακτινοβολήσης και για δεδομένη τιμή πυκνότητας προσπίπτουσας ακτινοβολίας, οι θερμοκρασιακές μεταβολές είναι πρακτικά αμελητέες (κάτω από το σφάλμα μέτρησης της θερμικής κάμερας). Αυτό συνεπάγεται την εξοικονόμηση σημαντικών υπολογιστικών πόρων για την προσομοίωση του μοντέλου. Για παράδειγμα, η *in silico* μελέτη του *in vivo* πειράματος εκτελέστηκε μόνο για τα πέντε πρώτα λεπτά της θεραπείας (βλ.

εικόνα 54 (b)) και όχι για το σύνολο των 27,5 min της, χωρίς να ανακλύψει θέμα συνέπειας των αποτελεσμάτων. Όπως φαίνεται από αυτά, στα πρώτα ένα με δύο λεπτά της ακτινοβολήσης συντελείται η μεγαλύτερη θερμοκρασιακή άνοδος, ενώ στη συνέχεια αυτή εισέρχεται σταδιακά σε περιοχή αργής ανόδου (εξαιτίας της λογαριθμικής μορφής της καμπύλης).



Εικόνα 54. (a) Μέγιστη καταγραφόμενη θερμοκρασία (max temperature) σε σχέση με τον χρόνο ακτινοβολήσης (irradiation time) και την πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας (fluence rate). **(b)** Θερμοκρασιακή άνοδος για το σενάριο ακτινοβολήσης των 5 min και 200 mW/cm², το οποίο ταυτίζεται με τα πρώτα 5 min του *in vivo* πειράματος.

8.6 Συμπεράσματα

Η παρούσα *in vivo* μελέτη, αν και περιελάμβανε μικρό πλήθος ζώων, ανέδειξε τη σημασία της επιλογής του κατάλληλου μήκους κύματος για τη διενέργεια της φωτοδυναμικής θεραπείας. Οι δέσμες τόσο των 625 nm όσο και των 660 nm βρίσκονται εντός του εύρους του φάσματος που θεωρείται επαρκές για τη διέγερση της πρωτοπορφυρίνης [197]. Όπως παρατηρήθηκε, αν και η δέση των 625 nm έχει μικρότερο βάθος διείσδυσης από εκείνη των 660 nm, η αντίστοιχη υπολογιζόμενη τιμή του παραγόμενου (¹O₂)_{rx} ήταν σημαντικά υψηλότερη, ειδικά στα πρώτα χιλιοστά του όγκου, παρόλο που η πυκνότητα ενέργειας ήταν η ίδια σε όλα τα ζώα. Το γεγονός αυτό αποδίδεται σε δύο βασικούς παράγοντες. Ο πρώτος είναι η υψηλότερη τιμή του συντελεστή απορρόφησης της PpIX στα 625 nm σε σχέση με τα 660 nm. Ο δεύτερος είναι ο τριπλάσιος χρόνος ακτινοβολήσης μεταξύ του μυός που υποβλήθηκε σε

θεραπεία με φως στα 625 nm και εκείνου που υποβλήθηκε σε θεραπεία στα 660 nm, καθώς επέτρεψε την επαναοξυγόνωση της περιφέρειας του όγκου (υπενθυμίζεται πως ο πυρήνας των καρκινικών όγκων είναι νεκρωτικός [23]).

Η χαμηλότερη υπολογιζόμενη τιμή παραγόμενου (1O_2)_{rx} παρουσιάστηκε στα 660 nm, όπου η συγκέντρωσή του ήταν κάτω από τα 500 μ M. Σε συμφωνία με την προσομοίωση, ο μυς που ακτινοβολήθηκε *in vivo* με το πρωτόκολλο των 660 nm παρουσίαζε τη χαμηλότερη θερμοκρασία όγκου καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (άρα είχε πιθανώς μεγαλύτερο νεκρωτικό πυρήνα), ενώ είχε επίσης και τον βαρύτερο όγκο. Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα των υπολογιστικών προσομοιώσεων που παρουσιάζονται στην **εικόνα 50**, η χαμηλότερη απορρόφηση των φωτονίων στα 660 nm θα μπορούσε να αντισταθμιστεί με αυξημένο χρόνο ακτινοβολήσης, αν και αυτό προϋποθέτει αυξημένο χρόνο υπό αναισθησία. Στην κλινική πράξη αυτό δεν είναι επιθυμητό για τον ασθενή, είναι δε και ασύμφορο για την οργάνωση των θεραπειών της κλινικής.

Εδώ, πρέπει να σημειωθεί πως οι αυξημένοι χρόνοι θεραπείας δεν οδηγούν απαραίτητα και σε αυξημένες τιμές (1O_2)_{rx}, καθώς η ποσότητα του διαθέσιμου φωτοευαισθητοποιού παράγοντα δεν είναι απεριόριστη και ως εκ τούτου, επηρεάζεται η αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Επιπρόσθετα, τα συσσωρευμένα μόριά του υπόκεινται σε φωτολεύκανση και δρουν ως εμπόδιο για τη διείσδυση της δέσμης βαθύτερα στον ιστό, μειώνοντας έτσι την παραγωγή των κυτταροτοξικών μορίων. Επομένως, ένας αποτελεσματικός συνδυασμός ακτινοβολήσης με φως 625 nm και 660 nm είναι σε θέση να ενισχύσει το θεραπευτικό αποτέλεσμα, καθότι η δέσμη των 625 nm «εκμεταλλεύεται» την υψηλότερη τιμή του μ_a που της αντιστοιχεί, ενώ η άλλη δέσμη (660 nm) επιτρέπει τη θεραπεία σε μεγαλύτερα βάθη. Το παραπάνω πρωτόκολλο υποστηρίχθηκε περαιτέρω από τα *in vivo* αποτελέσματα, καθώς ο μυς που υποβλήθηκε σε αυτό παρουσίασε τη μικρότερη θερμοκρασιακή διακύμανση (τόσο στην καρκινική όσο και στην κοιλιακή περιοχή), καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Επιπλέον, ο εξαχθείς όγκος του είχε τη μικρότερη μάζα από τους υπόλοιπους, παρόλο που παρουσίαζε τον υψηλότερο ρυθμό αύξησης.

Το τελευταίο γεγονός οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο τρόπος υπολογισμού του μεγέθους του όγκου μέσω της **εξίσωσης (23)**, αν και είναι βιβλιογραφικά αποδεκτός [199,224,225], μπορεί να οδηγήσει σε τιμές που διαφέρουν από τις πραγματικές. Αρκεί να αναλογιστεί κανείς πως το ζώο με τον μικρότερο ρυθμό αύξησης του όγκου (No. 4, control) παρουσίασε ταυτόχρονα το χειρότερο

θεραπευτικό αποτέλεσμα (πέθανε πρώτο), επιβεβαιώνοντας ταυτόχρονα την έλλειψη φωτοδυναμικής δράσης του φωτοευαισθητοποιού παράγοντα σε περίπτωση μη ακτινοβόλησής του. Βέβαια, πέραν του μικρού αριθμού των ζώων (που δεν μπορούν να αποτελέσουν στατιστικό δείγμα), θα πρέπει να σημειωθεί πως η εφαρμογή της φωτοευαισθητοποιού ουσίας και της δέσμης φωτός έγινε επιφανειακά, καθιστώντας τη θεραπεία περισσότερο επιφανειακή (superficial based) και λιγότερο ολιστική (whole-tumor based). Επομένως, εφαρμόστηκε και η **εξίσωση (22)**, η οποία σύμφωνα με τα εξαχθέντα αποτελέσματα (σε σχέση με τη μάζα των αφαιρεθέντων όγκων) φαίνεται να είναι καταλληλότερη για το συγκεκριμένο είδος θεραπείας. Σε κάθε περίπτωση, πιο εξελιγμένες απεικονιστικές μέθοδοι (π.χ. μαγνητική τομογραφία συντονισμού - magnetic resonance imaging - MRI), οι οποίες δεν ήταν διαθέσιμες στην παρούσα μελέτη, θεωρείται πως θα μπορούσαν να βελτιώσουν περαιτέρω την ακρίβεια των αποτελεσμάτων.

Το πρωτόκολλο του *in vivo* πειράματος περιελάμβανε τακτικές μετρήσεις θερμοκρασίας τόσο της καρκινικής όσο και της κοιλιακής περιοχής, πριν αλλά και μετά την φωτοδυναμική θεραπεία. Δυστυχώς, η διαθέσιμη σχετική βιβλιογραφία είναι φτωχή σε δεδομένα, καθώς οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες επικεντρώνονται στις φωτοθερμικές επιδράσεις κατά τη διάρκεια της θεραπείας και όχι μετά από αυτή [132,226–229]. Ως εκ τούτου, δεν κατέστη εφικτή η σύγκριση με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας. Ωστόσο, η παρακολούθηση της θερμοκρασίας είναι μια σημαντική διαδικασία καθώς δύναται να αντικατοπτρίσει την κατάσταση του ζώου με έναν γρήγορο και μη επεμβατικό τρόπο [230,231] (υπενθυμίζεται πως η μη-επεμβατικότητα είναι ένα από τα κυριότερα πλεονεκτήματα της ΦΔΘ). Άλλωστε, αναμένονται θερμοκρασιακές διαφοροποιήσεις μεταξύ του όγκου και του παρακείμενου ιστού, καθώς οι καρκινικές περιοχές παρουσιάζουν μη-ομαλή αιμάτωση και διαφορετικούς μεταβολικούς ρυθμούς [232,233]. Αυτές οι διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν και στην παρούσα μελέτη, όπου η θερμοκρασία του όγκου παρουσίαζε υψηλότερες τιμές από την περιβάλλουσα υγιή περιοχή, κάτι που πιθανώς οφείλεται σε τοπική φλεγμονώδη απόκριση του οργανισμού [234], σε συμφωνία με άλλες μελέτες για τον ίδιο τύπο καρκίνου [225,235]. Κατά τη δωδέκατη ημέρα (θανάτωση των ζώων), η θερμοκρασία του μυός No. 1 ήταν κατά 50% χαμηλότερη από εκείνη των άλλων δύο ζωντανών (No. 2 και No. 3). Το γεγονός αυτό αποδίδεται σε μειωμένους μεταβολικούς ρυθμούς, που πιθανολογείται πως υποδήλωναν τη φθίνουσα πορεία των ζωτικών λειτουργιών

του [236]. Η μειούμενη θερμοκρασιακή διαφορά (βλ. **εικόνα 52 (d)**) μεταξύ υγιούς και καρκινικού ιστού μετά τη θεραπεία αποδόθηκε στην αγγειακή καταστροφή (vascular shutdown) λόγω της θεραπείας καθότι, ως γνωστόν, η περιορισμένη αιμάτωση οδηγεί σε χαμηλότερα θερμικά φορτία. Τέλος, με βάση την εφαρμογή «Thermal Effects Simulator», οι θερμοκρασίες που καταγράφονται κατά τη διάρκεια της θεραπείας, σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία [237], δεν είναι επαρκείς προκειμένου να υπάρξουν φωτοθερμικά φαινόμενα που θα προκαλέσουν έστω μετουσίωση των πρωτεϊνών (η οποία υπενθυμίζεται πως είναι η πρώτη από τις μη-αντιστρεπτές βλάβες που επέρχονται). Παρόλα αυτά, είναι αρκετά υψηλές ώστε να επηρεάσουν ελαφρώς το ρυθμό φωτολεύκανσης της πρωτοπορφυρίνης και άρα το θεραπευτικό αποτέλεσμα της φωτοδυναμικής θεραπείας [238,239].

Όσον αφορά τη φασματοσκοπία φθορισμού, αυτή μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη μη-επεμβατική διάγνωση του καρκίνου καθώς και στον καθορισμό της συγκέντρωσης των μορίων της φωτοευαισθητοποιού ουσίας. Όπως είναι γνωστό, το κύριο κυτταροτοξικό προϊόν που παράγεται με την εφαρμογή του Metvix είναι η πρωτοπορφυρίνη IX και ως εκ τούτου, η ανίχνευση αυτής χρησιμοποιείται ευρέως σε σχετικές μελέτες [240–242]. Τα φάσματα φθορισμού που συλλέχθηκαν λίγο πριν από τη θεραπεία (βλ. **εικόνα 51 (a)**) είναι σε συμφωνία με το φάσμα φθορισμού της πρωτοπορφυρίνης που αναφέρεται στη βιβλιογραφία [243–245]. Περιελάμβαναν τις κύριες κορυφές των 635 και 705 nm (μετά τη διέγερση των μορίων PpIX με φως στα 405 nm), καθιστώντας δυνατή μία ευρύτερη συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας του επαγόμενου φθορισμού και της συγκέντρωσης των μορίων της πρωτοπορφυρίνης. Η σχεδόν κατά το ήμισυ μειωμένη μέγιστη τιμή του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας που καταγράφηκε από τον μν No. 2 δεν θα πρέπει να αξιολογείται ποσοτικά αλλά περισσότερο ποιοτικά, καθώς το άκρο της ίνας συλλογής ήταν πιο μακριά από το δέρμα από ότι στις υπόλοιπες μετρήσεις, για τεχνικούς λόγους. Από την άλλη πλευρά, εκείνο το ζώο παρουσίασε τον βαρύτερο εξαχθέντα όγκο, γεγονός που υποδηλώνει μία λογική και αναμενόμενη συσχέτιση μεταξύ της μειωμένης συγκέντρωσης της PpIX και του θεραπευτικού αποτελέσματος. Στο τελευταίο θα πρέπει να συνυπολογιστεί και ο αυξημένος φθορισμός που παρουσίασε το συγκεκριμένο ζώο μετά την εφαρμογή της θεραπείας, ο οποίος καταδεικνύει τη μειωμένη κατανάλωση της πρωτοπορφυρίνης και άρα την αντίστοιχα μειωμένη παραγωγή (1O_2)_{rx}.

Δυστυχώς, τα αντίστοιχα δεδομένα του ζώου Νο. 3 δεν ήταν διαθέσιμα, καθώς η διάταξη μετακινήθηκε κατά λάθος.

Τελικώς, η φωτοδυναμική θεραπεία καθυστέρησε την ανάπτυξη του όγκου κατά τρόπο σύμφωνο με τη βιβλιογραφία [199]. Μία σύγκριση των *in vivo* αποτελεσμάτων με τα αποτελέσματα της μελέτης των Sutoris *et al.* [199] αποκαλύπτει την ίδια συμπεριφορά του μεγέθους του όγκου, δηλαδή μία μικρή αύξηση (ημέρα 1) ακολουθούμενη από μείωση του όγκου και την τελικά περαιτέρω ανάπτυξή του. Η διαφορετική χρονική εξέλιξη (ταχύτερη στην περίπτωση της παρούσας έρευνας) αποδίδεται πιθανώς στην αυξημένη επιθετικότητα των 4T1 κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν, σε σχέση με τα κύτταρα αδενοκαρκινώματος του μαστού που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη των Sutoris *et al.*. Επιπροσθέτως, το είδος της θεραπείας (επιφανειακή εφαρμογή της κρέμας και αντίστοιχη ακτινοβολήση) πιστεύεται πως διαδραμάτισε ρόλο. Όσον αφορά το ζώο αναφοράς, το οποίο έλαβε την φωτοευαισθητοποιήσιμη ουσία αλλά δεν ακτινοβολήθηκε, δεν αναμενόταν καμία επίδραση στην ανάπτυξη του όγκου του [199]. Αναφορικά με τη δέσμη των 405 nm που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις φθορισμού, θεωρήθηκε αμελητέα η επίδρασή της στο θεραπευτικό αποτέλεσμα, λόγω του μικρού βάθους διείσδυσής της, του χαμηλού ρυθμού ροής της ακτινοβολίας και του εξαιρετικά σύντομου χρόνου εφαρμογής της. Το γεγονός ότι οι μετρήσεις εμβαδού, όγκου και μάζας δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές μεγέθους όγκου μεταξύ του ζώου ελέγχου και αυτών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία δεν μπορεί να αξιολογηθεί με στατιστικά σημαντικό τρόπο, λόγω του πολύ μικρού δείγματος. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες με παρόμοια αποτελέσματα στη βιβλιογραφία [206,209], οι οποίες στηρίζουν τις παρατηρήσεις τους κυρίως στη συμπίεση των αιμοφόρων αγγείων και στις υποξικές συνθήκες που επικρατούν στο εσωτερικό της καρκινικής περιοχής. Επιπλέον και, σύμφωνα με την υπολογιστική προσομοίωση που διεξήχθη, η κύρια νεκρωτική περιοχή αναμενόταν να βρίσκεται στο άνω τμήμα του όγκου, λαμβάνοντας υπόψη την επιφανειακή ακτινοβολήση. Επομένως, η περιορισμένη επίδραση της θεραπείας στην περιφέρεια του όγκου (όπου πραγματοποιούνταν οι μηχανικές μετρήσεις μεγέθους) δεν αποτέλεσε έκπληξη. Αντίθετα, το γεγονός ότι ο μύς που δεν υποβλήθηκε σε θεραπεία πέθανε, ενώ οι περισσότεροι από τους υπόλοιπους δεν παρουσίασαν επιδεινωμένη κλινική εικόνα μπορεί να θεωρηθεί ως επιτυχημένο θεραπευτικό αποτέλεσμα.

8.7 Παρατηρήσεις - Σημεία προς βελτίωση

Ένα από τα βασικά συμπεράσματα που προέκυψαν ήταν η περιορισμένη και μη-ομοιόμορφη διάχυση του φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκε ως φωτοευαισθητοποιός ουσία. Αυτό ήταν σε ένα βαθμό αναμενόμενο, αν αναλογιστεί κανείς τον τρόπο απορρόφησης όλων των φαρμάκων που χορηγούνται σε μορφή κρέμας (με επιφανειακή επάλειψη και εν συνεχεία απορρόφηση της ουσίας). Στο παραπάνω ήρθε να προστεθεί και η περιορισμένη δυνατότητα υπολογισμού της ποσότητας της ουσίας που τελικώς απορροφήθηκε, για τέσσερις κυρίως λόγους. Ο πρώτος αφορούσε τον τρόπο χορήγησής της, καθότι σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας [197], αυτή γίνεται με επάλειψη μίας στρώσης φαρμάκου πάχους περίπου 1 mm. Το στρώμα του φαρμάκου θα πρέπει να καλύπτει την περιοχή ενδιαφέροντος, συν ένα όριο (margin) της τάξης των 5 – 10 mm, για να καλύψει πιθανές, μη-ορατές διηθήσεις του όγκου. Ο δεύτερος λόγος σχετίζεται με την ανατομία της περιοχής, καθώς το δέρμα των μυών, αν και αποτριχωμένο (ξυρισμένο) δεν ήταν τελείως λείο. Αυτό συνέβη λόγω της μη-επίπεδης περιοχής προς αποτρίχωση, καθώς ο όγκος εξείχε κατά ένα μέρος από το φυσιολογικό περίγραμμα του σώματος, καθιστώντας τη διαδικασία επίφοβη για τραυματισμό του δέρματος. Το μικρό μέρος των τριχών που εξείχε δε λειτουργούσε μόνο ως σκεδαστής της προσπίπτουσας δέσμης αλλά και ως παράγοντας που εμποδίζει την πλήρη απορρόφηση της ουσίας. Ο τρίτος λόγος είχε να κάνει με την περίδεση της περιοχής. Καθότι το Metnix μπορεί να προκαλέσει σημαντική φωτοευαισθησία, είναι απαραίτητη η προστασία της περιοχής επάλειψης από το ηλιακό φως ή ακόμα και από το φως του εργαστηρίου. Για να επιτευχθεί αυτό, η περιοχή καλύφθηκε με μη-απορροφητική μεμβράνη (parafilm) και εν συνεχεία οι μύες τοποθετήθηκαν ανά δύο σε μεταλλικούς κλωβούς, οι οποίοι καλύφθηκαν με μαύρο, μη-διαπερατό στο φως, ύφασμα. Ο απαραίτητος όμως χρόνος για την απορρόφηση της ουσίας είναι της τάξης των τριών ωρών, διάστημα κατά το οποίο οι μύες επανήλθαν από την ελαφριά, εισπνεόμενη νάρκωση και έβγαλαν την περίδεση. Σε αυτό το διάστημα είναι αδύνατον να γνωρίζουμε εάν ο ένας από τους δύο μύες που βρίσκονταν σε κάθε κλωβό ήρθε σε επαφή (πιθανώς έγλειψε) την κρέμα του άλλου. Ως εκ τούτου, ήταν πρακτικά ανέφικτος ο ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός της ουσίας μόνο από την χορηγούμενη ποσότητά της. Ο εκ των υστέρων υπολογισμός της ποσότητας με φασματοσκοπικές μεθόδους δεν κατέστη δυνατός για τεχνικούς λόγους (μικρό

δείγμα ζώων, αδυναμία απόλυτου καθορισμού της σχετικής θέσης όγκου – άκρης της οπτικής ίνας συλλογής σήματος, λόγω σημαντικών μετακινήσεων της διάταξης κατά τις φάσεις του πειράματος).

Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί πως το θεραπευτικό αποτέλεσμα της ΦΔΘ σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την παρουσία της PpIX, η συγκέντρωση της οποίας παρουσιάζει διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Ο αναγνώστης θα πρέπει να έχει κατά νου ότι αυτή παράγεται μεν (μέσω της εστεροποίησης του αμινολεβουλινικού μεθυλίου) αλλά ταυτόχρονα υπόκειται σε φωτολεύκανση και αποβάλλεται από τον οργανισμό. Ως εκ τούτου, ο συντελεστής απορρόφησής της αλλάζει κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας, καθιστώντας την ακριβή υπολογιστική προσομοίωση της διαδικασίας ιδιαίτερα πολύπλοκη [217,246]. Επιπροσθέτως θα πρέπει να σημειωθεί πως ένας ακόμα παράγοντας που αυξάνει τη δυσκολία του παραπάνω εγχειρήματος είναι η μη-επαρκής γνώση της κυτταρικής πυκνότητας, η οποία επίσης επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας, μέσω της κυτταρικής κατανομής της PpIX [247].

Συμπερασματικά, το ανωτέρω πείραμα παρήγαγε ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Ταυτόχρονα κατέδειξε όμως και την ανεπαρκή δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας, υπό τη χρήση πηγών φωτός με μικρό μήκος κύματος και επιφανειακά εφαρμοζόμενων φωτοευαισθητοποιών ουσιών. Επομένως, κρίθηκε επιβεβλημένη η σχεδίαση ενός ακόμα πειράματος, το οποίο θα ξεπερνούσε τις παθογένειες και τα «αδύναμα σημεία» του πρώτου. Έτσι, σχεδιάστηκε μία νέα *in silico* μελέτη, με χρήση ενδοφλέβια χορηγούμενης φωτοευαισθητοποιού ουσίας (που να απορροφά σε μεγαλύτερα μήκη κύματος) που να περιλαμβάνει και το συνδυασμό με ένα ακόμα είδος θεραπείας (φωτοθερμία).

Page intentionally left blank

In silico ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

9.1 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε ήδη από το **Κεφάλαιο 2** της παρούσας διατριβής, η πολυπλοκότητα της νόσου του καρκίνου οδηγεί στην ανάγκη περισσότερο στοχευμένων μεθόδων αντιμετώπισης της και άρα στη διεύρυνση του πεδίου έρευνας, από μονοθεραπείες σε συνδυαστικές θεραπείες. Επιπροσθέτως, όπως δείχθηκε και στο **Κεφάλαιο 8**, η ΦΔΘ υπό προϋποθέσεις μπορεί να μην αποδειχθεί πάντα επαρκής. Επομένως, στο παρόν κεφάλαιο, σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε μία πλήρης υπολογιστική μελέτη του συνδυασμού φωτοδυναμικής και πλασμονικής φωτοθερμικής θεραπείας σε μύες, με πέρα των άλλων στόχων να υπερβεί τις όποιες παθογένειες της *in vivo* μελέτης του προηγούμενου κεφαλαίου.

Ως εκ τούτου, η υπολογιστική προσομοίωση του πειράματος αποτελούνταν από τρία διαφορετικά μέρη. Το πρώτο αφορούσε την προσομοίωση της φωτοδυναμικής θεραπείας και εκτελέστηκε με τον κώδικα «PDT Simulator» που αναπτύχθηκε στο περιβάλλον του Matlab. Το δεύτερο στην προσομοίωση της πιθανής ανόδου της θερμοκρασίας ως παράπλευρο φαινόμενο της ΦΔΘ και υλοποιήθηκε μέσω δύο διαφορετικών προσεγγίσεων, της εφαρμογής «Thermal Effects Simulator» και του προγράμματος «MCmatlab». Το τρίτο, που είχε ως αντικείμενο τη μελέτη της φωτοθερμίας με τη χρήση νανοσωματιδίων, εκτελέστηκε επίσης με τη χρήση των «Thermal Effects Simulator» και «MCmatlab».

9.2 Υπολογιστική προσομοίωση ΦΔΘ

Για τη συγκεκριμένη μελέτη θεωρήθηκε και πάλι μυς της φυλής NOD SCID, σωματικού βάρους 25 g, στη μασχαλιαία περιοχή του οποίου είχε αναπτυχθεί 4T1 όγκος, διαμέτρου 0,5 cm [248]. Το φάρμακο που επιλέχθηκε ως

φωτοευαισθητοποιός ουσία ήταν σε ενέσιμη μορφή, προκειμένου να υπάρχει ομοιόμορφη απορρόφησή του στην περιοχική του όγκου. Η μόνη διαθέσιμη ενέσιμη ουσία, με άδεια χρήσης στη φωτοδυναμική θεραπεία, σχετικά λογικό κόστος (1.001,57 € - λιανική τιμή ανά συσκευασία, σύμφωνα με τη βάση φαρμάκων «[Γαληνός](#)») είναι το Visudyne® (αρ. αδείας: EU/1/00/140/001), (Cherplapharm Arzneimittel GmbH, Greifswald, Germany).

Το Visudyne® είναι ένα φάρμακο υψηλού κόστους που επισήμως χρησιμοποιείται στη φωτοδυναμική θεραπεία της εκφύλισης της ωχράς κηλίδας (πάθηση των οφθαλμών, που οφείλεται σε υποχοροειδική νεοαγγείωση). Παρόλα αυτά, καθότι φωτοευαισθητοποιός ουσία, ερευνάται η πιθανή χρήση της και στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου (κλινικές δοκιμές υπ' αριθμ. NCT02939274, NCT02464761, κατά τη βάση δεδομένων [clinicaltrials.gov](#)). Το Visudyne® έχει ως δραστική ουσία τη βερτεπορφίνη (verteporfin), ένα λιπόφιλο μονόζινο παράγωγο της βενζοπορφυρίνης (BPD-MA) το οποίο συνίσταται από 1:1 μείγμα των ισοδύναμων στερεοϊσομερών BPD-MA_c και BPD-MA_D. Αυτά παρουσιάζουν παρόμοιες φαρμακοκινητικές ιδιότητες, τόσο ως προς την κατανομή όσο και ως προς την αποβολή από τον οργανισμό. Επίσης περιέχει φωσφατιδιλογλυκερόλη ωού, φωσφατιδυλοχολίνη, παλμιτικό εστέρα του ασκορβικού οξέος, βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (E321) (το οποίο είναι ερεθιστικό για τους οφθαλμούς και τους βλεννογόνους) και μονοϋδρική λακτόζη. Βρίσκεται σε γυάλινο φιαλίδιο που περιέχει 15 mg βερτεπορφίνης σε μορφή κόνεως, για παρασκευή διαλύματος προς ενδοφλέβια έγχυση.

Η ουσία, προκειμένου να ενεργοποιηθεί μετά τη βιοκατανομή της, χρειάζεται να ακτινοβοληθεί με φως μήκους κύματος 689 nm (ερυθρό), σύμφωνα με το φύλλο οδηγιών της. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως στο φάσμα απορρόφησης της βερτεπορφίνης παρουσιάζονται και άλλες κορυφές (στα 652, 566, 435 και 345 nm [249]). Μάλιστα, στις δύο τελευταίες η απορρόφηση είναι αρκετά πιο ισχυρή, αλλά δε χρησιμοποιούνται λόγω του πολύ περιορισμένου βάθους διείσδυσης του φωτός σε αυτά τα μήκη κύματος (υπενθυμίζεται πως μία δέσμη φωτός στην περιοχική των ~680 nm έχει περίπου πενταπλάσιο βάθος διείσδυσης στο δέρμα από μία αντίστοιχη στην περιοχική των ~430 nm [134]). Τέλος, η βερτεπορφίνη παρουσιάζει μέγιστο φάσματος εκπομπής φθορισμού στα ~692 nm [30].

Προκειμένου να δοθεί μία αίσθηση των χρόνων ακτινοβολήσης που επισήμως απαιτούνται, σύμφωνα με το φύλλο οδηγιών του σκεύασματος (προφανώς για τη θεραπεία της εκφύλισης της ωχράς κηλίδας), αναφέρεται ότι

η απαιτούμενη δόση είναι 50 J/cm^2 , τα οποία χρειάζονται 83 s προκειμένου να επιτευχθούν με πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας 600 mW/cm^2 [250]. Στη βιβλιογραφική ανασκόπηση που διεξήχθη (βλ. **πίνακα 13**), οι αντίστοιχες τιμές για *in vivo* πειράματα σε μύες αναφορικά με την απαιτούμενη δόση κυμαίνονται από 20 έως και 250 J/cm^2 , οι χρόνοι ακτινοβολήσης που αναφέρονται ποικίλουν από 3 έως και 100 min και ο ρυθμός ροής από 12 έως και 150 mW/cm^2 . Για την ακτινοβολήση της βερτεπορφίνης θεωρήθηκε πηγή μήκους κύματος 680 nm, ισχύος 60 mW, με πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας 167 mW/cm^2 , προκειμένου να είναι ρεαλιστικότερη η μελέτη (λόγω ύπαρξης τέτοιας πηγής LED στο εργαστήριο). Ο χρόνος ακτινοβολήσης ήταν 15 min και επομένως η συνολική πυκνότητα ενέργειας (δόση φωτός) $150,3 \text{ J/cm}^2$. Η δόση του Visudyne® που αντιστοιχούσε στον μυ ήταν 1 mg/kg σωματικού βάρους, μέσω ενέσιμου υδατικού διαλύματος 100 μL .

Πίνακας 13. Τιμές βασικών παραμέτρων *in vivo* μελετών ΦΔΘ με βερτεπορφίνη σε μύες.

Συνολική δόση φωτός (J/cm^2)*	Ρυθμός ροής (mW/cm^2)*	Χρόνος ακτινοβολήσης (min)	Δόση ουσίας (mg/kg)	Ενέσιμος όγκος ουσίας (μL)	Χρόνος διάχυσης (h)	Αναφορά
20 (J/cm)	74 (mW/cm)	4,5	1	75	1	[251]
40	-	-	2	-	3	[252]
120	-	-	1	-	24	[224]
22,5 - 135 (J/cm)	12 - 150 (mW/cm)	-	0,17 - 0,99 (μM)	-	3	[253]
100 - 250	50 - 150	15 - 45	1	-	3	[254]
-	12 - 150	3 - 100	1	-	3	[255]
-	12 - 150 (mW/cm)	3 - 100	1	-	3	[256]

* Σε κάποιες περιπτώσεις, οι μονάδες δίνονται σε (J/cm) και (mW/cm) καθότι στις αντίστοιχες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν γραμμικές διατάξεις (η οπτική ίνα τοποθετείται ενδοϊστικά και γίνεται χρήση κυλινδρικού διαχύτη).

9.2.1 Φωτοδυναμική δράση ΦΔΘ

Όσον αφορά το πρώτο μέρος της μελέτης της φωτοδυναμικής δράσης, αυτό υλοποιήθηκε μέσω του κώδικα «PDT Simulator» που αναπτύχθηκε για την παρούσα διδακτορική διατριβή (βλ. **Κεφάλαιο 5**) και χρησιμοποιήθηκε και στο *in vivo* πείραμα του προηγούμενου κεφαλαίου. Η γεωμετρία της ακτινοβολήσης αναπαραστάθηκε με βάση το προαναφερθέν πείραμα και δε θα συζητηθεί ξανά, για λόγους αποφυγής επανάληψης. Για την προσομοίωση της χωρικής κατανομής του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας χρησιμοποιήθηκαν 15.704.804 φωτόνια (60 min Monte Carlo προσομοίωσης).

Για τον υπολογισμό της παραπάνω κατανομής απαιτείται η γνώση του συντελεστή απορρόφησης (μ_a) της βερτεπορφίνης, οι τιμές του οποίου όμως δεν είναι διαθέσιμες από τη βιβλιογραφία, εξ όσων γνωρίζουμε. Για τον υπολογισμό του χρησιμοποιήθηκε ο τύπος $\mu_a = \ln(10) \cdot [S] \cdot \varepsilon$ [208], όπου $[S]$ είναι η συγκέντρωση της ουσίας και ε ο συντελεστής απόσβεσης. Ο υπολογισμός της αρχικής συγκέντρωσης βασίστηκε στην κατά βάρος περιεκτικότητα που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα (1 mg/ml, διαλυμένα σε 100 μ L) και στο μοριακό βάρος της βερτεπορφίνης (718,8 g/mol) [257]. Παρόλα αυτά, η πειραματικά μετρούμενη τιμή της συγκέντρωσης στην περιοχή του όγκου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (δυστυχώς όχι για 4T1 όγκους) είναι αρκετά μειωμένη και θεωρήθηκε 0,25 μ M, με βάση τον μέσο όρο των δεκατριών μετρήσεων της αναφοράς [256]. Αναφορικά με το ε , όπως είναι γνωστό, οι τιμές του εξαρτώνται από το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός. Για τον υπολογισμό τους χρησιμοποιήθηκε η τιμή 0,0783 $\text{cm}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ (που αναφέρεται στα 690 nm) [30] και με βάση αυτή και το διάγραμμα της κανονικοποιημένης έντασης (βλ. εικόνα 7 (b) της αναφοράς [30]) εξήχθησαν οι αντίστοιχες τιμές για τα 680 και 808 nm. Οι τιμές του συντελεστή σκέδασης (μ_s), του παράγοντα ανισοτροπίας (g_f) και του δείκτη διάθλασης (n) θεωρήθηκαν ίδιες με αυτές του περιβάλλοντα ιστού (όγκος 4T1) καθώς ούτε αυτές ήταν διαθέσιμες.

Οι τιμές των οπτικών παραμέτρων της καρκινικής περιοχής (μ_a , μ_s , g_f και n) (βλ. **πίνακα 14**) υπολογίστηκαν όπως και στην ενότητα «[8.4 Υπολογιστική προσομοίωση](#)» με τη συνεισφορά της αναφοράς [258]. Η συνύπαρξη της φωτοευαισθητοποιού ουσίας με τον καρκινικό ιστό λήφθηκε υπόψη μέσω των **σχέσεων (24, 25)**, αυτή τη φορά προσαρμοσμένων στις τιμές της βερτεπορφίνης. Για τον υπολογισμό των συντελεστών απορρόφησης και σκέδασης του υποδόριου μυϊκού ιστού χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από πρόσφατη μελέτη

της ομάδας του Bashkatov [207]. Πιο συγκεκριμένα, για το μ_a χρησιμοποιήθηκε το γράφημα της εικόνας 3 της εν λόγω αναφοράς, για το μ_s η εξίσωση:

$$\mu_s = \mu'_s / (1 - g_f) = (6,623 \cdot 10^{10} \cdot \lambda^{-3,964} + 44,71 \cdot \lambda^{-0,393}) / (1 - g_f) \quad (27)$$

ενώ, για τις αντίστοιχες τιμές του δερματικού ιστού που κάλυπτε τον καρκινικό έγινε χρήση της αναφοράς [211]. Τέλος, οι τιμές των φωτοχημικών παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον **πίνακα 15**.

Πίνακας 14. Οπτικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν στην προσομοίωση.

Ιστός/περιοχή	Παράμετρος	Τιμή @ 680 nm	Τιμή @ 808 nm
Δέρμα	μ_a	0,94 cm ⁻¹	1,26 cm ⁻¹
	μ_s	37,1 cm ⁻¹	8,34 cm ⁻¹
	g_f		0,8
	n		1,37
	d		220 μm
4T1 όγκος	μ_a	0,76 cm ⁻¹	0,06 cm ⁻¹
	μ_s	98,0 cm ⁻¹	12,75 cm ⁻¹
	g_f		0,9
	n		1,54
	d		0,6 cm
Visudyne®	μ_a	0,05 cm ⁻¹	0 cm ⁻¹
	μ_s	Θεωρήθηκαν ίδιες με του όγκου	
	g_f		
	n		
Μυϊκός ιστός (περιτόναιο)	μ_a	2,2 cm ⁻¹	2,4 cm ⁻¹
	μ_s	19,2 cm ⁻¹	17,1 cm ⁻¹
	g_f		0,8
	n		1,4

Οι τιμές των g_f , n και d αφορούν και τα δύο μήκη κύματος κάθε ιστού / περιοχής.

Πίνακας 15. Φωτοχημικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν στην προσομοίωση^a.

Παράμετρος	Τιμή
ε	0,071 (cm ⁻¹ μM ⁻¹)
ξ	55·10 ⁻³ (cm ² mW ⁻¹ s ⁻¹)
σ	1,7·10 ⁻⁵ (μM ⁻¹)
β	11,9 (μM)
f	1
δ	33 (μM)
g_0	0,7 (μM s ⁻¹)
[³ O ₂] ₀	40 (μM)
[¹ O ₂] _{rx,0} ^b	0
[S ₀]	0,25 (μM)
[¹ O ₂] _{rx,sh}	420 (μM)

^a Οι τιμές ελήφθησαν από τις αναφορές [142,253,256,258].

^b Αρχική συγκέντρωση του μονήρους οξυγόνου που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο.

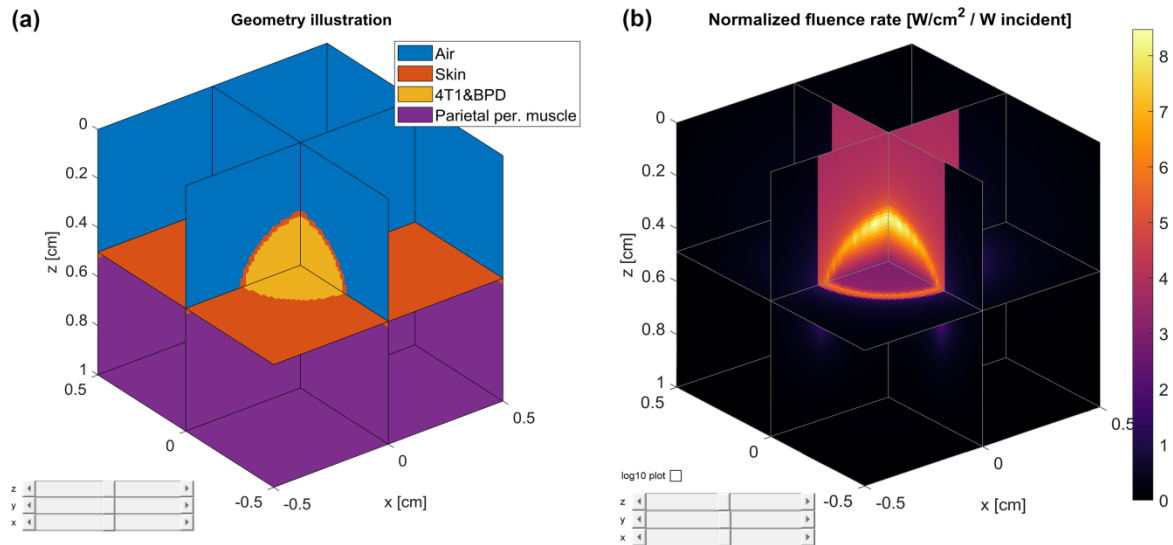
Σε αυτό το δεύτερο πείραμα, έγινε προσπάθεια να αυξηθεί η ακρίβεια της υπολογιστικής προσομοίωσης, σε σχέση με τον κώδικα που εφαρμόστηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, λαμβάνοντας υπόψη και την υποξική περιοχή που συνήθως αναπτύσσουν οι καρκινικοί όγκοι, μέσω της **εξίσωσης (10)**. Για λόγους σύγκρισης, η προσομοίωση εκτελέστηκε και για την περίπτωση κανονικά οξυγονούμενου, μη-νεκρωτικού καρκινικού κέντρου (δηλαδή με σταθερή χωρική κατανομή της οξυγόνωσης).

9.2.2 Φωτοθερμική δράση ΦΔΘ

Σε αντιστοιχία με το πείραμα της προηγούμενης ενότητας, μελετήθηκε και πάλι η πιθανή άνοδος της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας, μέσω του Monte Carlo κώδικα «MCmatlab» καθώς και της εφαρμογής «Thermal Effects Simulator» που αναπτύχθηκε. Οι τιμές των

παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ίδιες με εκείνες που περιγράφηκαν στην ενότητα «[8.4 Υπολογιστική προσομοίωση](#)», με μόνη διαφορά την αναγωγή των οπτικών ιδιοτήτων στα 808 nm.

Όσον αφορά τον κώδικα «MCmatlab», λόγω της αυξημένης δυσκολίας σχεδίασης πολύπλοκων γεωμετριών μέσω των εξισώσεων που διέπουν τις επιφάνειές τους στον χώρο, η προς αναπαράσταση γεωμετρία απλοποιήθηκε όπως φαίνεται στην **εικόνα 55 (a)**. Ο χώρος στον οποίο πραγματοποιήθηκε η προσομοίωση ήταν κυβικού σχήματος, ακμής 1 cm και αντιστοιχούσε στην ευρύτερη περιοχή του όγκου του ζώου. Τα πρώτα εκατοστά αναπαριστούσαν τον αέρα (με μπλε χρώμα στην αντίστοιχη εικόνα) και ακολουθούσαν από δερματικό ιστό (με πορτοκαλί χρώμα, αντίστοιχα). Από την κάτω πλευρά του δέρματος βρισκόταν περιτοναϊκός μυς (αναπαριστάνεται με ιώδες χρώμα). Στο κέντρο της γεωμετρίας υπήρχε ο σφαιρικός όγκος, ο οποίος προέβαλε από την επιφάνεια του δέρματος (με κίτρινο χρώμα στην αντίστοιχη εικόνα). Σε αυτό το σημείο αξίζει να τονιστεί η ιδιαίτερη μέριμνα που δόθηκε στη ρεαλιστικότητα του μοντέλου κατά τον προγραμματισμό της γεωμετρίας, ώστε η επιφάνεια του όγκου που προεξείχε να εξακολουθεί να καλύπτεται από δέρμα. Επίσης, ειδική μέριμνα δόθηκε στον αυτοματοποιημένο τρόπο υπολογισμού της θέσης του κέντρου του όγκου (που είναι απαραίτητη για την προσομοίωση) και ως εκ τούτου γράφτηκε και ο αντίστοιχος κώδικας. Η διάρκεια της Monte Carlo προσομοίωσης ορίστηκε στα 5 min (που μεταφράζονται σε ~17.100.000 φωτόνια), ενώ ο συνολικός χρόνος που χρειάστηκε για την εκτέλεση του κώδικα ήταν 2,6 ώρες. Σύμφωνα με τα εξαχθέντα αποτελέσματα, η άνοδος της θερμοκρασίας μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα, σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία [128]. Τέλος, όσον αφορά την ενέργεια της δέσμης, το 84,4% αυτής απορροφήθηκε από τον όγκο.



Εικόνα 55. Απλοποιημένη τρισδιάστατη αναπαράσταση ενός τεταρτημορίου **(a)** της γεωμετρίας του προβλήματος (geometry illustration) και **(b)** της χωρικής κατανομής του κανονικοποιημένου ρυθμού ροής της ακτινοβολίας (normalized fluence rate). Ο χρωματικός κώδικας στο **(a)**: μπλε, πορτοκαλί, κίτρινο και ιώδες αντιστοιχεί: στον αέρα (air), δέρμα (skin), 4T1 όγκο μετά τη χορήγηση της βερτεπορφίνης (4T1 & BPD) και στον περιτοναϊκό μυ (parietal per. muscle), αντίστοιχα.

Αναφορικά με την εφαρμογή «Thermal Effects Simulator», προκειμένου να αυξηθεί η ακρίβεια των αποτελεσμάτων, χρειάστηκε να μειωθεί η προς μελέτη γεωμετρία στην καρκινική περιοχή και στους πέριξ υγείς ιστούς. Επομένως, δημιουργήθηκε μία νέα έκδοση της εφαρμογής, η οποία δίνει στον χρήστη τη δυνατότητα να προσομοιώνει ένα μόνο τμήμα της γεωμετρίας. Για να πράξει το ανωτέρω, θέτει ως μεταβλητές τη θέση στον άξονα x (σε cm) του επιπέδου y-z, το οποίο θα λειτουργήσει ως σημείο διατομής του μοντέλου. Θέτοντας για παράδειγμα στην παράμετρο «Front plane» όπου $x = 5$ και στην παράμετρο «Back plane» όπου $x = 2$, η προς αναπαράσταση γεωμετρία θα περιοριστεί ανάμεσα στις θέσεις 5 και 2 cm, αντίστοιχα. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί πως η αρχή των αξόνων (0, 0, 0) βρίσκεται στο σημείο που ενώνεται η ουρά με το σώμα του ζώου. Προκειμένου να ελεγχθεί μετά από κάθε δοκιμή η νέα γεωμετρία που σχηματίζεται, αρκεί να πατηθεί το κομβίο «Geometry» της καρτέλας «Refresh plot». Τέλος, ειδική μέριμνα έχει ληφθεί ώστε ο επανασχεδιασμός της γεωμετρίας να μη συνδέεται με τον επαναυπολογισμό όλης της προσομοίωσης, προς εξοικονόμηση υπολογιστικών πόρων.

9.3 Υπολογιστική προσομοίωση ΠΦΘΘ

Το τρίτο σκέλος της *in silico* μελέτης αφορούσε την προσομοίωση της θερμοκρασιακής ανόδου κατά την υποβολή του καρκινικού όγκου σε πλασμονική φωτοθερμική θεραπεία. Για την πρόκληση των υπερθερμικών φαινομένων χρησιμοποιήθηκαν νανοκελύφη χρυσού JSD0035 NanoXact™ (βλ. § [6.2.1 Νανοσωματίδια](#)). Επιλέχθηκαν τα συγκεκριμένα καθώς έχουν επίστρωση πολυαιθυλενογλυκόλης (polyethylene glycol – PEG) (πρόκειται για ένωση πολυαιθέρα που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες αιθυλενοξειδίου). Η συγκεκριμένη επίστρωση, η οποία χρησιμοποιείται συχνά σε φαρμακευτικά προϊόντα (το πρώτο σκεύασμα έλαβε έγκριση από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων - FDA, το 1990 [259]), θεωρείται μία ασφαλής, σταθερή ουσία που δεν πυροδοτεί αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος [260]. Επιπλέον επιτρέπει την παραγωγή ομοιογενών υδατικών διαλυμάτων (μεγάλης σημασίας για την έγχυσή τους στον οργανισμό του ζώου) και τέλος, λόγω του ουδέτερου / ελαφρώς αρνητικού επιφανειακού της φορτίου, θεωρείται κατάλληλη για *in vivo* χρήση [260,261].

Όπως φαίνεται και από τον **πίνακα 16** που ακολουθεί, οι τιμές των παραμέτρων που αφορούν την *in vivo* ΠΦΘΘ σε μύες διαφέρουν σημαντικά, καταδεικνύοντας την έλλειψη δοσιμετρίας στο εν λόγω πεδίο. Με αφορμή αυτό το γεγονός, παραμετροποιήθηκε η συγκέντρωση των νανοδομών και η διάρκεια της θεραπείας, προκειμένου να μελετηθεί η βέλτιστη τιμή τους. Έτσι, μέσω της χρήσης του «Thermal Effects Simulator» και της μεθόδου «Parametric sweep», υπολογίστηκε η μέση τιμή της θερμοκρασιακής ανόδου στον καρκινικό όγκο, για τρεις διαφορετικές τιμές πλήθους νανοδομών (number of particles – NoP) και τέσσερις πιθανές διάρκειες θεραπειών. Όσον αφορά το πρώτο μέγεθος, μελετηθήκαν οι τιμές από $6,1 \cdot 10^7$ έως $6,1 \cdot 10^9$ νανοσωματίδια και αναφορικά με τον χρόνο τιμές από 3 έως 6 min, αντίστοιχα, με τα αποτελέσματα να φαίνονται στο γράφημα της **εικόνας 56 (a)**. Εν συνεχεία, με βάση το βέλτιστο πλήθος νανοδομών, εκτελέστηκε νέα παραμετρική μελέτη αναφορικά με τη θερμοκρασιακή άνοδο, σε σχέση με την πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας, μέσω της ισχύος της πηγής laser και τον χρόνο (βλ. **εικόνα 56 (b)**). Εδώ, αξίζει να σημειωθεί πως, σύμφωνα με τα αποτελέσματα αναφορικά με τη βελτιστοποίηση των προς αναπαράσταση γεωμετριών (βλ. § [7.3 Ο ρόλος της γεωμετρίας](#) και [7.4 Ο ρόλος του μεγέθους του πλέγματος](#)), κατά την προσομοίωση του μοντέλου δεν ελήφθη υπόψη ο αέρας ως δομή, παρά μόνο τα φαινόμενα

συναγωγής θερμότητας. Το μέγεθος του πλέγματος ορίστηκε σε «finer», με τον χρόνο κάθε παραμετρικής προσομοίωσης να διαμορφώνεται κατά προσέγγιση στις 2,5 h. Προκειμένου να δοθεί μία αίσθηση των υπολογιστικών απαιτήσεων, αναφέρεται πως το μέγεθος του εξαγόμενου αρχείου της παραπάνω συγκριτικής μελέτης ήταν ~55 GB. Τέλος, η ανωτέρω μεθοδολογία εφαρμόστηκε και για την περίπτωση πλήρους απουσίας αέρα, για λόγους σύγκρισης (βλ. **εικόνα 56 (c)**).

Τελικά, η εικονική εφαρμογή των νανοσωματιδίων έγινε με εφάπαξ ένεση $6,1 \cdot 10^8$ νανοδομών στην περιοχή του όγκου [248,262], με διάλυμα όγκου 10 μL [248,262]. Η ακτινοβολήσή τους πραγματοποιήθηκε με πηγή laser στα 808 nm, ελλειπτικής δέσμης διατομής 5 x 8 mm, και ισχύος 550 mW, προκειμένου να είναι ρεαλιστικότερη η μελέτη (λόγω ύπαρξης τέτοιας πηγής στο εργαστήριο), ενώ διήρκεσε 210 s. Στόχος του *in silico* πειράματος ήταν η επίτευξη μέσης θερμοκρασίας (στον όγκο) της τάξης των 48 - 49°C, προκειμένου να υπερβεί το κατώφλι των 48°C που τέθηκε ως θερμοκρασία νέκρωσης, να μην υπάρξει καρκινική περιοχή που να βρίσκεται κάτω από τους ~43°C (και άρα να αναπτύξει αντοχή στη θεραπεία), η διάρκεια της ακτινοβολήσης (και άρα της νάρκωσης) να είναι η ελάχιστη δυνατή και να συμβαδίζει με τα αποτελέσματα των αντίστοιχων μελετών που παρατίθενται στον **πίνακα 16**. Αναφορικά με τη θέση έγχυσης του διαλύματος των νανοδομών, αυτή επιλέχθηκε να είναι περίπου στα 2/3 της διαμέτρου του όγκου (από την επιφάνεια του δέρματος). Η συγκεκριμένη επιλογή έγινε με γνώμονα την περιορισμένη εν τω βάθει αποτελεσματικότητα της ΦΔΘ και προκειμένου τα υπερθερμικά φαινόμενα να εντοπιστούν εντονότερα σε βαθύτερα στρώματα του καρκινικού ιστού. Όσον αφορά τις θερμικές ιδιότητες της περιοχής, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές $C_p = 4,171 \text{ J}/(\text{cm}^3 \cdot \text{K})$ και $k = 64 \cdot 10^{-4} \text{ W}/(\text{cm} \cdot \text{K})$.

Πίνακας 16. Τιμές βασικών παραμέτρων *in vivo* μελετών ΠΦΘΘ σε μύες.

Ρυθμός ροής (W/cm ²)	Χρόνος ακτινοβολήσης (min)	Συγκέντρωση νανοδομών ^a	Ενέσιμος όγκος ουσίας (μL)	Περιοχή/ τρόπος έγχυσης	Αναφορά
-	6,7	$3,6 \cdot 10^{12}$ σωμα./ml	30	Λεμφαδένες (μασχαλιαίοι)	[263]
4	3	$2,4 \cdot 10^{11}$ σωμα./ml	100	Ουραία φλέβα	[126]

4	6	$1,4 \cdot 10^{10}$ σωμ./ml	20 - 50	Ενδοϊστικά	[98]
0,8	10	80 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-	Ουραία φλέβα	[264]
1	5	10 mg/kg	-	Ουραία φλέβα	[265]
1	2	27,5 pM	10	Όγκος	[248]
1,7 - 1,9	10	120 OD	100	Ουραία φλέβα	[125]
0,9 - 1,1	10	40 OD	15	Όγκος	

^a Όπως αναφέρονται στην εκάστοτε μελέτη.

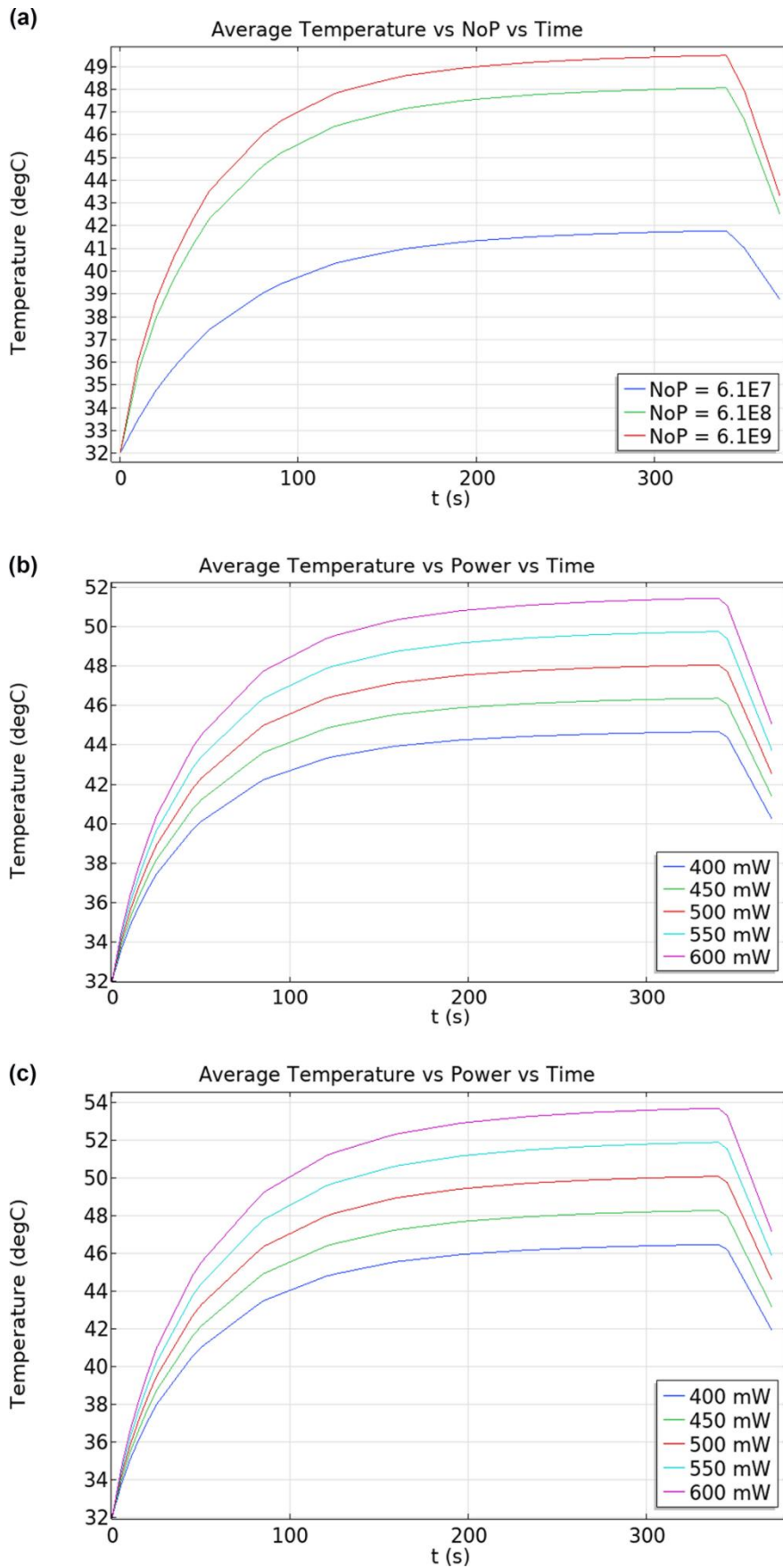
Οι δύο τελευταίες καταχωρήσεις του πίνακα έχουν κοινή αναφορά τη Νο. [125].

Όπως είναι γνωστό, η ακτινοβολήση νανοδομών με δέσμη μήκους κύματος που συμπίπτει με το μέγιστο της απορρόφησής τους οδηγεί σε τοπική άνοδο της θερμοκρασίας, λόγω της αλληλεπίδρασής τους με το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο με μη-τετριμμένο τρόπο. Προκειμένου να μελετηθεί, σε επίπεδο νανοκλίμακας, το φαινόμενο της σκέδασης του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου και της αλλαγής της χωρικής κατανομής του από νανοσωματίδια, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το module «Electromagnetic Waves, Frequency Domain», του COMSOL Multiphysics. Η λύση που προκύπτει, αξιοποιείται στη συνέχεια για τον υπολογισμό της ενέργειας που απορροφά το κάθε νανοσωματίδιο, θέτοντάς το ως μια σημειακή πηγή θερμότητας. Το ανωτέρω μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με αυτοματοποιημένο είτε με χειροκίνητο τρόπο. Στον πρώτο τρόπο, χρησιμοποιείται το module «Electromagnetic Heating» του προγράμματος, που λαμβάνει υπόψη τη διασύνδεση των αντίστοιχων φυσικών φαινομένων. Στο δεύτερο, ο χρήστης θέτει το νανοσωματίδιο ως πηγή θερμότητας μέσω της παραμέτρου «Total power dissipation density (ewfd.Qh)». Η παραπάνω θεώρηση έχει το πλεονέκτημα της δυνατότητας πλήρους παραμετροποίησης τόσο της δέσμης (μήκος κύματος, διεύθυνση διάδοσης, ένταση, προφίλ, κατάσταση πόλωσης κτλ), όσο και των νανοδομών (σχήμα, μέγεθος, υλικό, προσανατολισμό κτλ). Όταν όμως η μελέτη αφορά ολόκληρο όργανο ή τμήμα του, είναι δεδομένη και η χρήση πολύ μεγάλου πλήθους νανοσωματιδίων (βλ. **πίνακα 16**). Ακόμα και στο απλό σενάριο, όπου η συγκέντρωσή τους δεν είναι

τόσο υψηλή ώστε να πρέπει να ληφθεί υπόψη η μεταξύ τους αλληλεπίδραση, ο συνδυασμός μεγάλου πλήθους δομών νανομετρικών διαστάσεων και συνολικής γεωμετρίας μεγέθους ακόμα και εκατοστών του μέτρου, απαιτεί τη δημιουργία πλέγματος με σημαντικές διαφοροποιήσεις στην πυκνότητα των στοιχείων του και στο μέγεθός τους. Όπως είναι αναμενόμενο, το ανωτέρω οδηγεί μοιραία σε τεράστιες, μη ρεαλιστικές υπολογιστικές απαιτήσεις.

Προκειμένου να παρακαμφθεί αυτό το εμπόδιο υιοθετήθηκε μία άλλης φιλοσοφίας λύση. Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα «[7.2 Υπολογιστική μελέτη υπερθερμίας](#)», το θερμοκρασιακό αποτέλεσμα της ακτινοβολήσης μιας περιοχής που περιέχει νανοσωματίδια μπορεί να προσεγγιστεί θεωρώντας τη ως μία περιοχική αυξημένου συντελεστή απορρόφησης. Ο συνολικός συντελεστής απορρόφησης ενός υλικού που περιέχει νανοσωματίδια μπορεί να υπολογιστεί ως το άθροισμα του συντελεστή απορρόφησης του υλικού με τον αντίστοιχο συντελεστή των νανοδομών. Ο υπολογισμός του δευτέρου γίνεται μέσω της **σχέσης (14)**. Για την εύρεση των τιμών της ενεργού διατομής απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό που προσφέρεται από την παρασκευάστρια εταιρεία των νανοδομών (Mie Theory Calculator - <https://nanocomposix.com/pages/mie-theory-calculator>). Σύμφωνα με αυτό, για νανοκελύφη χρυσού με πυρήνα πυριτίας, με διάμετρο πυρήνα 119 nm, πάχος κελύφους 16 nm και εντός περιβάλλοντος με δείκτη διάθλασης 1,54 (όγκος 4T1), η τιμή του S_{abs} είναι $1,23 \cdot 10^4 \text{ nm}^2$. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί πως η παραπάνω τιμή προκύπτει ως ο μέσος όρος των τιμών που το πρόγραμμα επιστρέφει για ακτινοβολήση με δέσμες στα 805 και 810 nm. Λαμβάνοντας επομένως υπόψη τη βέλτιστη τιμή της αριθμητικής συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων ($6,1 \cdot 10^8$ σωματίδια), η τιμή του μ_a^{NPs} διαμορφώθηκε στα $7,5 \text{ cm}^{-1}$.

Τέλος, με βάση τις παραπάνω τιμές, προσομοιώθηκε η ΠΦΘΘ και με χρήση του προγράμματος «MCmatlab», για λόγους σύγκρισης με το αναπτυχθέν «Thermal Effects Simulator». Όπως και στην περίπτωση της ενότητας «[9.2.2 Φωτοθερμική δράση ΦΔΘ](#)», η προς μελέτη γεωμετρία περιορίστηκε σε έναν κύβο ακμής 1 cm, όπου ελήφθη υπόψη και ο αέρας. Σε πέντε θέσεις της γεωμετρίας τοποθετήθηκαν εικονικοί αισθητήρες καταγραφής της θερμοκρασίας, οι οποίοι διακρίνονται στην ίδια εικόνα. Ο χρόνος της Monte Carlo προσομοίωσης ορίστηκε στα 15 min, ενώ το μοντέλο αποτελούνταν από 10^6 voxels. Τα αποτελέσματα της εν λόγω προσομοίωσης φαίνονται στην **εικόνα 60 (b)**.



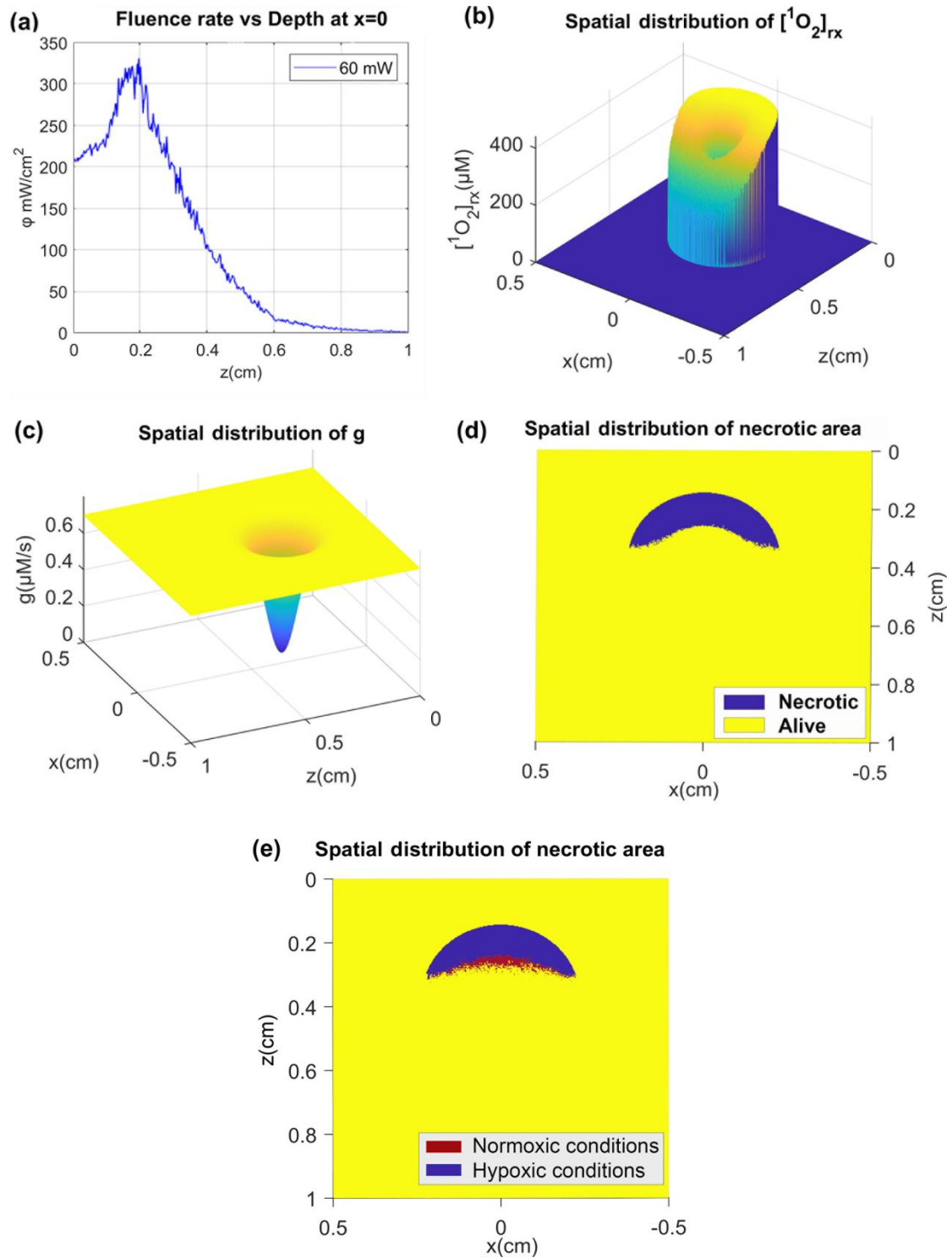
Εικόνα 56. Συγκριτική μελέτη της εξάρτησης της ανόδου της μέσης θερμοκρασίας (average temperature) σε σχέση με τον χρόνο ακτινοβολήσης (time) και (a) το πλήθος

των νανοδομών (number of particles - NoP), **(b, c)** την ισχύ της δέσμης του laser (power). Η διαφορά μεταξύ των διαγραμμάτων **(b)** και **(c)** έγκειται στην ύπαρξη αέρα (μέσω φαινομένων συναγωγής θερμότητας) και στην απουσία του, αντίστοιχα. Ο συνδυασμός $6,1 \cdot 10^8$ νανοσωματιδίων, ισχύος 550 mW και χρόνου θεραπείας 210 s προκρίνεται ως η αποδοτικότερη επιλογή.

9.4 Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα της υπολογιστικής προσομοίωσης της φωτοδυναμικής θεραπείας παρουσιάζονται στην **εικόνα 57**. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα **(a)** της συγκεκριμένης εικόνας, ο ρυθμός ροής της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ήταν $\sim 200 \text{ mW/cm}^2$. Η τιμή αυτή, λαμβάνοντας υπόψη την απόκλιση από την πραγματική, γκαουσιανή δέσμη καθώς και τη μη-επίπεδη επιφάνεια πρόσπτωσης της *in silico* γεωμετρίας, μπορεί να θεωρηθεί σε συμφωνία με την αλγεβρικά υπολογιζόμενη από τα δεδομένα του προβλήματος ($\sim 167 \text{ mW/cm}^2$). Όσον αφορά την περιοχή της επιφάνειας του όγκου, τα σκεδαζόμενα φωτόνια συντέλεσαν στην τοπική αύξηση του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας κατά $\sim 50\%$, γεγονός που αναμενόταν και από τη βιβλιογραφία [98]. Η χωρική κατανομή της συγκέντρωσης του μονήρους οξυγόνου (βλ. **εικόνα 57 (b)**) ήταν αντίστοιχη του ρυθμού ροής της διαδιδόμενης ακτινοβολίας, με την τιμή της να κυμαίνεται κατά μέσο όρο στα 432 μM στο άνω και στα 254 μM στο κάτω ημισφαίριο του όγκου, αντίστοιχα. Καθότι το κέντρο του καρκινικού όγκου είναι νεκρωτικό και περιβάλλεται από υποξική περιοχή, οι τιμές του $[^1\text{O}_2]_{rx}$ μειώνονται αντιστοίχως με το διαθέσιμο μοριακό οξυγόνο. Αποτέλεσμα των ανωτέρω ήταν η νεκρωτική ζώνη που δημιουργήθηκε να είναι σχήματος ημισελήνου. Αναφορικά με το μέγιστο υπολογιζόμενο βάθος νέκρωσης, αυτό υπολογίστηκε στα 0,33 cm. Στο επίπεδο αυτό η διάμετρος της ζώνης νέκρωσης ήταν 0,44 cm.

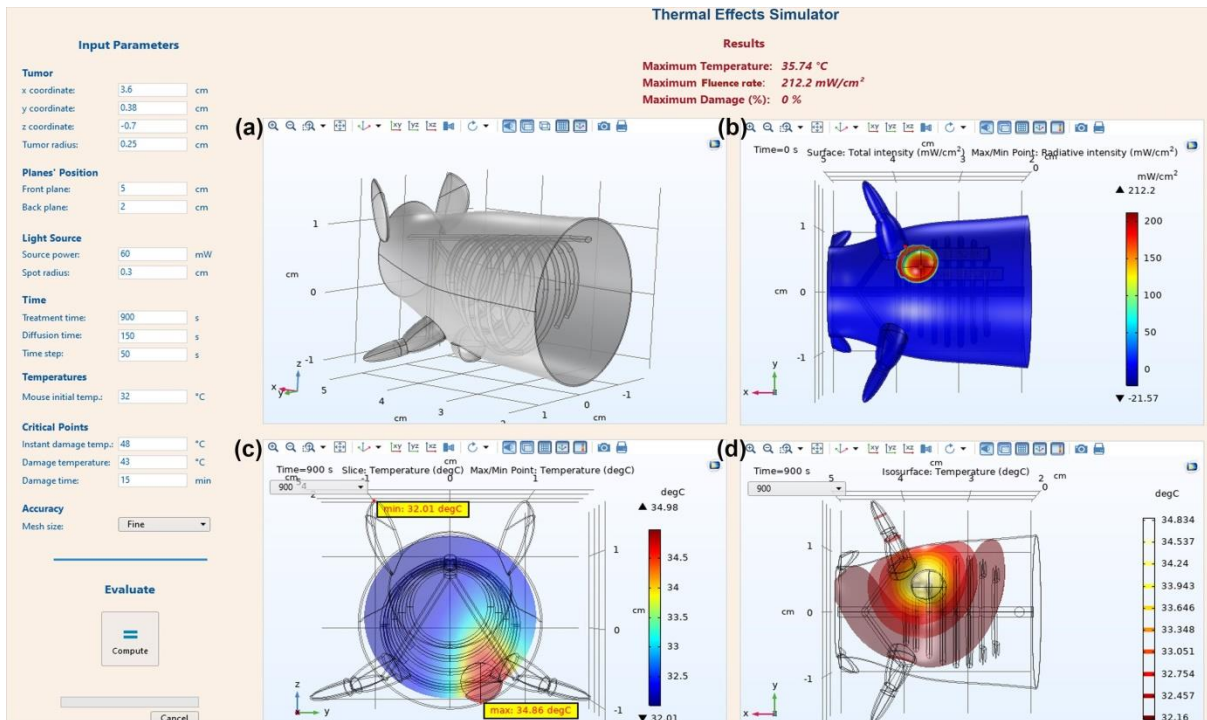
Επιπροσθέτως, έγινε σύγκριση της ζώνης νέκρωσης υπό υποξικές συνθήκες (hypoxic conditions), όπως αναπαρίσταται με μπλε χρώμα στην **εικόνα 57 (e)**, με εκείνη που δημιουργείται όταν η οξυγόνωση είναι σταθερή σε όλο τον όγκο της καρκινικής περιοχής (normoxic conditions), όπως φαίνεται με ερυθρό χρώμα στην ίδια εικόνα. Η αντίστοιχη προσομοίωση κατέδειξε πως στη δεύτερη περίπτωση παρουσιάζεται αύξηση της τάξης του 18,6%. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί πως το συγκεκριμένο ποσοστό δεν οφείλεται σε αύξηση του μέγιστου βάθους νέκρωσης αλλά στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων στο κέντρο του όγκου.



Εικόνα 57. Αποτελέσματα της υπολογιστικής προσομοίωσης της ΦΔΘ στο περιβάλλον του Matlab για 15.704.804 φωτόνια. **(a)** Ο ρυθμός ροής της ακτινοβολίας κατά τον άξονα z (fluence rate *vs* depth), για $x = 0$. Διακρίνεται έντονα η συνεισφορά των σκεδαζόμενων φωτονίων στην τοπική αύξηση του ρυθμού ροής της ακτινοβολίας. Εγκάρσια τομή της χωρικής κατανομής (spatial distribution) της **(b)** παραγωγής μονήρους οξυγόνου, **(c)** οξυγόνωσης, η οποία θεωρείται πως πρακτικά μηδενίζεται λόγω υποξικότητας του όγκου και **(d)** της νεκρωτικής περιοχής (necrotic area). **(e)** Σύγκριση

της ζώνης νέκρωσης (necrotic area) που προκύπτει όταν η οξυγόνωση του όγκου είναι επαρκής (normoxic conditions) και όταν επικρατούν υποξικές συνθήκες στο κέντρο του (hypoxic conditions).

Τα αποτελέσματα της μελέτης της πιθανής ανόδου της θερμοκρασίας λόγω της ακτινοβολήσης για τη διενέργεια της φωτοδυναμικής θεραπείας φαίνονται στην **εικόνα 58**. Η εφαρμογή «Thermal Effects Simulator» εκτελέστηκε για τις παραμέτρους της ΦΔΘ του παρόντος πειράματος. Η μέγιστη καταγραφόμενη θερμοκρασία ήταν 35,7°C (όπως παρουσιάζεται στο άνω τμήμα της **εικόνας 58**, στην ενότητα «Results» και στο «Maximum Temperature») και, όπως αναμενόταν, καταγράφηκε στα πρώτα χιλιοστά του όγκου (βλ. **εικόνα 58 (c)**, όπου φαίνεται η εγκάρσια τομή στο επίπεδο y-z). Αντίστοιχα, η ελάχιστη θερμοκρασία (που αντιστοιχούσε στην αρχική θερμοκρασία σώματος του ζώου) καταγράφηκε στην άκρη της περιοχής του ωτός (βλ. **εικόνα 58 (c)**). Όσον αφορά τη χωρική κατανομή των θερμοκρασιών, οι κύριες (θερμότερες) ισοθερμικές καμπύλες βρίσκονταν στην περιοχή του όγκου, ενώ στα όρια της προς αναπαράσταση γεωμετρίας η τιμή της θερμοκρασίας βρισκόταν σε φυσιολογικά για το ζώο επίπεδα. Προς αντιπαραβολή των ανωτέρω εκτελέστηκε και η αντίστοιχη προσομοίωση με τον κώδικα «MCmatlab», όπου επίσης δεν παρατηρήθηκε σημαντική θερμοκρασιακή άνοδος (δεν παρατίθενται σχετικές εικόνες για λόγους αποφυγής επανάληψης). Μάλιστα, στην περίπτωση του τελευταίου, η μέγιστη θερμοκρασία που καταγράφηκε ήταν 32,02°C.



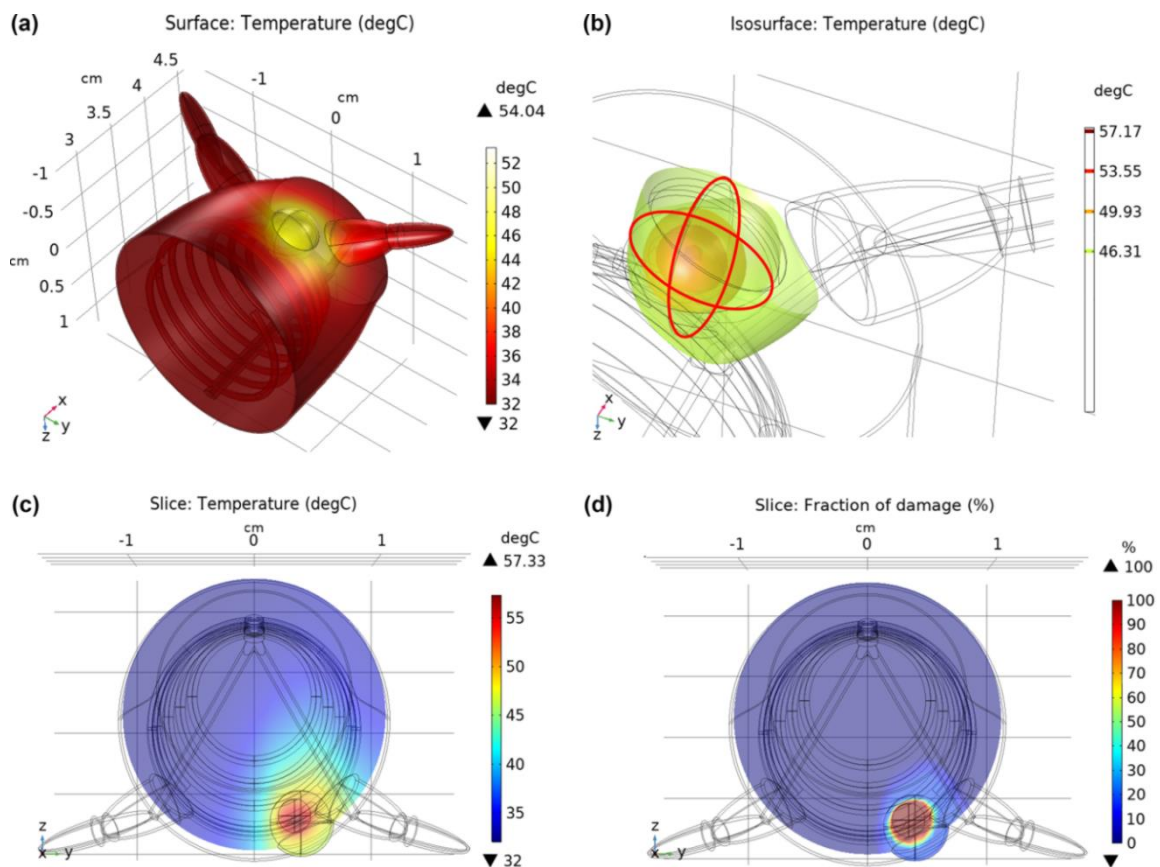
Εικόνα 58. Αποτελέσματα της μελέτης της θερμοκρασιακής ανόδου κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας, με χρήση της εφαρμογής «Thermal Effects Simulator». Μετά από 15 min ακτινοβολήσης με δέση στα 680 nm η μέγιστη καταγραφόμενη θερμοκρασία είναι 35,7°C. Η προς αναπαράσταση γεωμετρία δεν αντιπροσωπεύει ολόκληρο το ζώο για εξοικονόμηση υπολογιστικών πόρων. (Σημείωση: για εποπτικούς λόγους στην εικόνα έχουν συμπεριληφθεί οι τέσσερις πρώτες τρισδιάστατες κατανομές (a - d) που υπολογίζει η εφαρμογή.)

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της προσομοίωσης της θερμοκρασιακής ανόδου κατά την υποβολή του καρκινικού όγκου σε ΠΦΘΘ με χρήση της εφαρμογής «Thermal Effects Simulator». Όπως προαναφέρθηκε, αρχικά έγινε βελτιστοποίηση των παραμέτρων της θεραπείας. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τα δεδομένα της εικόνας 56 (a), αρχική τιμή της τάξης των 10^7 νανοσωματιδίων οδήγησε σε μικρή διαφορά στην απόλυτη τιμή της θερμοκρασιακής ανόδου σε σχέση με τη χρήση $\sim 10^8$ ή $\sim 10^9$ νανοσωματιδίων. Από την άλλη πλευρά, παρατηρήθηκε πως είτε χρησιμοποιηθούν $6,1 \cdot 10^8$ είτε $6,1 \cdot 10^9$ νανοδομές, το τελικό αποτέλεσμα είναι στην ουσία το ίδιο. Το παραπάνω είναι μάλιστα σε συμφωνία με τη συζήτηση της ενότητας «[6.3.4 Αποτελέσματα](#)», καθώς καταδεικνύει φαινόμενα κορεσμού με την αύξηση, πέραν ενός σημείου, της συγκέντρωσης των νανοδομών. Επομένως, η επιλογή της τιμής των $6,1 \cdot 10^8$ νανοσωματιδίων (που

αντιστοιχούσαν σε $6,1 \cdot 10^{10}$ νανοσωματίδια/ml) κρίθηκε ως η αποδοτικότερη, για τη συγκεκριμένη γεωμετρία, μιας και ήταν και σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (βλ. **πίνακα 16**). Όσον αφορά την ισχύ της δέσμης του laser και τη διάρκεια της θεραπείας, στην περίπτωση όπου δεν ελήφθη υπόψη η επίδραση του αέρα, η υπολογιζόμενη θερμοκρασιακή άνοδος ήταν εντονότερη (βλ. **εικόνα 56 (c)**), με το δέρμα να αναπτύσσει ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες (μέγιστη τιμή $T = 52,1^\circ\text{C}$, για χρόνο ακτινοβολήσης $t = 210$ s). Το σημαντικότερο όμως πρόβλημα θα ήταν η επακόλουθη επιλογή χαμηλότερης ισχύος από την απαραίτητη ή της θεώρησης επίτευξης του θερμοκρασιακού στόχου, οδηγώντας πιθανότατα σε υποδοσιασμό και αδυναμία ελέγχου της νόσου. Αντιθέτως, θεωρώντας πως υπάρχουν φαινόμενα θερμικής συναγωγής, ναι μεν η υπολογιζόμενη θερμοκρασιακή άνοδος ήταν ηπιότερη (βλ. **εικόνα 56 (b)**), με τον δερματικό ιστό όμως να προστατεύεται περισσότερο (μέγιστη τιμή οριακά μικρότερη των 48°C , για χρόνο ακτινοβολήσης $t = 210$ s).

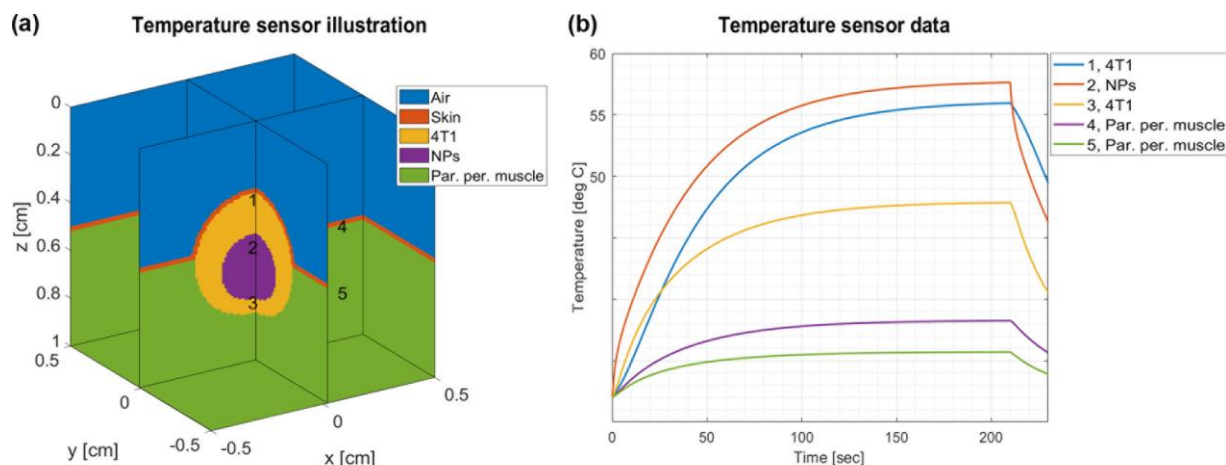
Τελικά, τα δεδομένα που προέκυψαν (για τη βελτιστοποιημένη τιμή των $6,1 \cdot 10^8$ νανοδομών), συνηγόρησαν στη χρήση ισχύος 550 mW και χρόνου θεραπείας 210 min. Ο συγκεκριμένος συνδυασμός οδήγησε σε επαρκή θερμοκρασιακή άνοδο, καθότι στην περιοχή του όγκου η μέση υπολογιζόμενη θερμοκρασία ήταν $49,3^\circ\text{C}$, η μέγιστη $57,3^\circ\text{C}$ και η ελάχιστη 44°C , αντίστοιχα (βλ. **εικόνα 59**), με την επαγόμενη ζώνη νέκρωσης να παρουσιάζεται στην **εικόνα 59 (d)**. Αυτές οι θερμοκρασιακές τιμές θεωρήθηκαν κατάλληλες ώστε να ελαχιστοποιηθεί το μέγεθος της περιοχής που δε θα επιτυχάνονταν υπερθερμία και παράλληλα να μην υπάρχει σε ευρεία κλίμακα υπέρβαση του κατωφλίου των $\sim 60^\circ\text{C}$, όπου επέρχεται μετουσίωση των πρωτεϊνών (και άρα φωτοπηξία). Ταυτόχρονα, οι πέριξ υγείς ιστοί προστατεύτηκαν σε ικανοποιητικό βαθμό, με τη θερμοκρασία εντός της θωρακικής περιοχής να βρίσκεται σημαντικά κάτω των 46°C (βλ. **εικόνες 59 (b)** και **(c)**). Προφανώς, το δέρμα που κάλυπτε τον όγκο εκτέθηκε σε υψηλές θερμοκρασίες, όμως το γεγονός αυτό μπορεί να θεωρηθεί αποδεκτό σε σχέση με την πιθανή θεραπεία της κακοήθειας. Όσον αφορά τα θωρακικά οστά και την έξω επιφάνεια του πνεύμονα που βρισκόταν κάτω από τον όγκο, τοπικά, οι απόλυτες τιμές τις θερμοκρασίας μπορούν να θεωρηθούν υψηλές. Παρόλα ταύτα, υπενθυμίζεται πως το προσομοιούμενο μοντέλο δεν λαμβάνει υπόψη του την παρουσία θυλάκων αέρα εντός της θωρακικής κοιλότητας. Οι ανωτέρω, λόγω του μειωμένου συντελεστή θερμικής αγωγιμότητας, αναμένεται να περιορίσουν τοπικά τη θερμοκρασιακή άνοδο. Όσον αφορά τη μέγιστη πυκνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας που

αντιστοιχούσε στην παραπάνω τιμή ισχύος ($1,8 \text{ W/cm}^2$), αυτή ήταν εντός των αντίστοιχων τιμών των *in vivo* μελετών της βιβλιογραφίας (βλ. πίνακα 16). Τέλος, παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές θερμοκρασίας εκτός του καρκινικού όγκου, στη μασχαλιαία περιοχή, σε σύγκριση με το αντιδιαμετρικό της σημείο, παρόλη την έκκεντρη έγχυση των νανοδομών. Το γεγονός αυτό ερμηνεύθηκε με βάση τον μικρότερο όγκο που ήταν διαθέσιμος για τη διάχυση της θερμότητας (λόγω της τοπικής μορφολογίας της ανατομίας του μύσος).



Εικόνα 59. Θερμοκρασιακή άνοδος μετά από ΠΦΘΘ με $6,1 \cdot 10^{10}$ νανοσωματίδια/ml και 210 s ακτινοβολήσης με πηγή 550 mW. **(a)** Θερμοκρασιακός χάρτης των εξωτερικών και εσωτερικών επιφανειών. **(b)** Εστιασμένη εικόνα στην περιοχή του όγκου (ελλείψεις ερυθρού χρώματος), όπου φαίνονται οι τέσσερις υψηλότερες ισοθερμικές καμπύλες. Εγκάρσια τομή στο κέντρο του όγκου όπου αναπαρίσταται **(c)** η κατανομή της θερμοκρασίας και **(d)** το ποσοστό της νέκρωσης. Η τιμή 100% αφορά νέκρωση λόγω υπέρβασης του κατωφλίου των 48°C , ενώ οι υπόλοιπες τιμές την απόπτωση που θα προκαλούνταν εάν ο ιστός παρέμενε σε θερμοκρασία άνω των 43°C για τουλάχιστον 15 min.

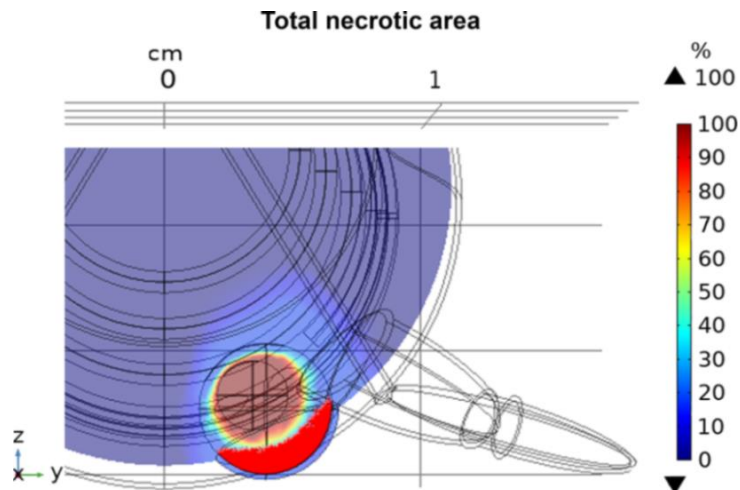
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την προσομοίωση της ΠΦΘΘ με τον κώδικα «MCmatlab» ήταν σε συμφωνία με εκείνα που προέκυψαν από την εφαρμογή «Thermal Effects Simulator». Όπως φαίνεται και από την **εικόνα 60 (b)**, η μέγιστη θερμοκρασία που κατέγραψε ο αισθητήρας Νο. 2, ο οποίος είχε τοποθετηθεί στο άνω τμήμα της περιοχής που περιείχε τις νανοδομές, ήταν 57,6°C. Το κάτω τμήμα του όγκου ανέπτυξε θερμοκρασίες της τάξης των 47,9°C, με τη μέγιστη καταγραφόμενη θερμοκρασία στον όγκο (κίτρινη περιοχή στην **εικόνα 60 (a)**) να είναι οι 56,8°C. Τέλος, ο περίξ υγιής ιστός παρέμεινε πλησίον της φυσιολογικής θερμοκρασίας του ζώου (32°C), εκτός του δέρματος, στο οποίο αναπτύχθηκε μέγιστη θερμοκρασία της τάξης των 56°C.



Εικόνα 60. Υπολογιστική προσομοίωση της ΠΦΘΘ με τον κώδικα «MCmatlab». (a) Η απλοποιημένη γεωμετρία αποτελείται από το στρώμα του αέρα (air), το δέρμα (skin), τον καρκινικό όγκο (4T1), την περιοχή όπου υπάρχουν νανοδομές (NPs) και από τον περιτοναϊκό μυϊκό ιστό (par. per. muscle) (αποτυπώνονται με μπλε, πορτοκαλί, κίτρινο, ιώδες και πράσινο χρώμα, αντίστοιχα). (b) Η θερμοκρασιακή άνοδος στους αισθητήρες στα σημεία 1 – 5 της εικόνας (a). (Σημείωση: ο χρωματικός κώδικας της εικόνας (a) δε συνδέεται με αυτόν της εικόνας (b).)

Τελικό στάδιο της επεξεργασίας των εξαχθέντων αποτελεσμάτων ήταν η υπέρθεση της ζώνης νέκρωσης που προέκυψε από τη ΦΔΘ με την αντίστοιχη της ΠΦΘΘ, η οποία παρουσιάζεται στην **εικόνα 61** που ακολουθεί. Όπως διακρίνεται, μετά την εφαρμογή της συνδυαστικής θεραπείας, ένα σημαντικό μέρος του καρκινικού όγκου είναι νεκρωμένο. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως το ποσοστό (%) που εμφανίζεται στην ίδια εικόνα, αφορά τη

νέκρωση από την ΠΦΘΘ. Η 100% νέκρωση προέρχεται από την υπέρβαση του κατωφλίου των 48°C, ενώ οι υπόλοιπες τιμές σχετίζονται με την απόπτωση που θα προκαλούνταν εάν ο ιστός παρέμενε σε θερμοκρασία άνω των 43°C για τουλάχιστον 15 min. Όσον αφορά τις απόλυτες τιμές, με χρήση του προγράμματος ImageJ, προκύπτει πως η συνολική νεκρωτική περιοχή καταλαμβάνει το ~68,7% του καρκινικού όγκου. Αντιθέτως, στην περίπτωση απουσίας αέρα, το αντίστοιχο, πλασματικό όμως ποσοστό ανέρχεται στο ~83%.



Εικόνα 61. Μεγεθυμένη εικόνα της συνολικής νεκρωτικής περιοχής (total necrotic area) μετά τη συνδυαστική ΦΔΘ – ΠΦΘΘ. Με έντονο κόκκινο χρώμα διακρίνεται η ζώνη νέκρωσης λόγω της ΦΔΘ. Ο χρωματικός χάρτης (%) αναφέρεται στη νέκρωση λόγω της ΠΦΘΘ. Η τιμή 100% αφορά νέκρωση λόγω υπέρβασης του κατωφλίου των 48°C, ενώ οι υπόλοιπες τιμές την απόπτωση που θα προκαλούνταν εάν ο ιστός παρέμενε σε θερμοκρασία άνω των 43°C για τουλάχιστον 15 min.

9.5 Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα παραπάνω, όπως άλλωστε αναμενόταν, το θεραπευτικό αποτέλεσμα είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με την ένταση της ακτινοβολίας και το διαθέσιμο μοριακό οξυγόνο. Η χωρική κατανομή της συγκέντρωσης του κυτταροτοξικού μονήρους οξυγόνου (βλ. **εικόνα 57 (b)**), καταδεικνύει με σαφή τρόπο την εξάρτησή της από αυτούς τους δύο βασικούς πυλώνες της φωτοδυναμικής θεραπείας. Έτσι, μπορεί κανείς να παρατηρήσει κατά πρώτον, τη μείωσή της με την αύξηση του βάθους εντός του ιστού, κατά τρόπο ανάλογο της μείωσης του ρυθμού ροής της διαδιδόμενης ακτινοβολίας (βλ. **εικόνα 57 (a)**). Κατά δεύτερον, την άμεση εξάρτησή της από τη διαθέσιμη ποσότητα του

μοριακού οξυγόνου, το οποίο προέρχεται από την αιμάτωση της περιοχής. Είναι δε χαρακτηριστικό το γεγονός της ύπαρξης «οπής» στο διάγραμμα της συγκέντρωσης του μονήρους οξυγόνου, η οποία είναι σε αντιστοιχία με το «βύθισμα» που παρατηρείται στη χωρική κατανομή της οξυγόνωσης (βλ. **εικόνα 57 (c)**). Απόρροια των ανωτέρω είναι και η χωρική κατανομή της νεκρωτικής ζώνης (βλ. **εικόνα 57 (d)**), η οποία ακολουθεί το ίδιο μοτίβο με τη $[^1O_2]_{rx}$ (βλ. **εικόνα 57 (b)**). Εδώ, αξίζει να σημειωθεί πως η ζώνη νέκρωσης έχει υπολογιστεί με βάση ένα κατώφλι συγκέντρωσης κυτταροτοξικών μορίων, η τιμή του οποίου έχει προέλθει από τη βιβλιογραφία και άρα δεν απηχεί απαραίτητα την πραγματική τιμή που μπορεί να έχει στο εκάστοτε *in vivo* πείραμα.

Επιπροσθέτως, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συγκριτική μελέτη της επίδρασης της επαρκούς οξυγόνωσης του κέντρου του όγκου. Όπως προέκυψε από την αντίστοιχη προσομοίωση, η τελική επιρροή της στο θεραπευτικό αποτέλεσμα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο που όμως μπορεί να υποβαθμιστεί κατά περίπτωση. Έτσι, στη συγκεκριμένη γεωμετρία όγκου, για επιφανειακή ακτινοβολή και με τις δεδομένες τιμές παραμέτρων, η συνεισφορά της περιορίστηκε σε ποσοστό κάτω του 20% του συνολικού μεγέθους της ζώνης νέκρωσης. Το ποσοστό αυτό, παρόλο που δεν είναι ευκαταφρόνητο, ενδέχεται να αποτελεί μία υπερεκτίμηση καθώς το μέγεθος της υποξικής περιοχής και ο βαθμός της υποξίας αυτής δεν ήταν γνωστά στο παρόν πείραμα.

Καθώς στο πρώτο πείραμα (βλ. προηγούμενο κεφάλαιο) παρατηρήθηκε (έστω και μικρή) άνοδος της θερμοκρασίας λόγω της εφαρμογής της φωτοδυναμικής θεραπείας, το φαινόμενο αυτό μελετήθηκε και στο παρόν πείραμα. Όπως κατέδειξαν τα αποτελέσματα τόσο της εφαρμογής «Thermal Effects Simulator» όσο και του κώδικα «MCmatlab», καταγράφεται και πάλι θερμοκρασιακή άνοδος, της ίδιας τάξης μεγέθους, η οποία και πάλι δεν είναι ικανή να προκαλέσει υπερθερμικά αποτελέσματα [266,267]. Οι μικρότερες απόλυτες τιμές της θερμοκρασίας αποδίδονται κυρίως στη χαμηλότερη ισχύ της δέσμης που χρησιμοποιήθηκε. Εξίσου σημαντικό είναι το γράφημα **(d)** της **εικόνας 58**, καθώς η χωρική κατανομή των ισοθερμικών επιφανειών καταδεικνύει την ορθή επιλογή του τμήματος του ζώου που αναπαραστάθηκε. Παρόλα αυτά, η γεωμετρία θα μπορούσε να είναι κατά μισό εκατοστό κοντύτερη, αφού η κοιλιακή περιοχή μετά τα θωρακικά οστά δε θερμάνθηκε και άρα θα μπορούσε να έχει παραληφθεί· επιλέγεται όμως να παρουσιαστεί για εποπτικούς λόγους. Οι τιμές της θερμοκρασίας στα όρια της γεωμετρίας είναι πρακτικά ίδιες με την αρχική θερμοκρασία σώματος του μύος, γεγονός

που σημαίνει πως δεν παραλήφθηκε περιοχή που θερμάνθηκε και επομένως θα έπρεπε να είχε συμπεριληφθεί.

Όσον αφορά την πλασματική φωτοθερμική θεραπεία, αυτή ήρθε να συμπληρώσει με επιτυχία την αντίστοιχη φωτοδυναμική, δρώντας στις βαθύτερα κείμενες περιοχές, όπου η δεύτερη δεν παρήγαγε επαρκή αποτελέσματα. Στο παρόν κεφάλαιο, αναδείχθηκε η συμβολή της διεξαχθείσας υπολογιστικής προσομοίωσης στη δοσιμετρία της ΠΦΘΘ. Σύμφωνα με αυτή μπόρεσαν να επιλεγούν οι βέλτιστες τιμές της συγκέντρωσης των ναοδομών και της θέσης έγχυσής τους, του χρόνου ακτινοβολησής τους καθώς και της ισχύος της πηγής φωτός. Χάρη στα προαναφερθέντα, η θερμοκρασία που αναπτύχθηκε στην καρκινική περιοχή κρίνεται επαρκής για ένα σημαντικά βελτιωμένο, συνδυαστικό αποτέλεσμα της ΦΔΘ – ΠΦΘΘ, ενώ οι κείμενοι υγιείς ιστοί, με εξαίρεση το δέρμα δεν εκτέθηκαν σε ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες. Σε αυτό το σημείο να αναφερθεί πως, για την προστασία του τελευταίου, έχει προταθεί ένας αρκετά ενδιαφέρον τρόπος ψύξης από την ομάδα του T. Kodama [263], μέσω της χρήσης υδρόψυκτης γυάλινης πλάκας, η οποία βρίσκεται σε επαφή με το δέρμα. Βέβαια, η αξιολόγηση της αποδεκτής πιθανής βλάβης των πέριξ υγιών ιστών, σε σχέση με τον έλεγχο της νόσου, επαφίεται στον εκάστοτε ιατρό (για εφαρμογή σε ασθενή) ή κτηνίατρο (σε περίπτωση ζώου) που θα έχει και τη γενική εποπτεία της θεραπείας. Τέλος, η συμβολή προσωπικού με τις κατάλληλες γνώσεις φυσικής και ιατρικής (π.χ. φυσικού ιατρικής) είναι καταλυτικής σημασίας για τη δοσιμέτρηση του φαινομένου. Ένα από τα πιο αυταπόδεικτα παραδείγματα είναι η πλασματική θερμοκρασιακή άνοδος, η οποία προέκυψε στην περίπτωση απουσίας αέρα στην παραπάνω προσομοίωση. Όπως φάνηκε από τα εξαχθέντα αποτελέσματα, η θεώρηση της θερμοκρασιακής συναγωγής στη διεπιφάνεια δέρματος - αέρα, ήταν αρκετή για να μεταβληθούν οι απόλυτες τιμές θερμοκρασίας σχεδόν κατά 2°C, κυρίως όμως να προκύψει ένα νέο ποσοστό καταστροφής του όγκου.

Όπως γίνεται αντιληπτό, μία ακόμα χρησιμότητα της εφαρμογής «Thermal Effects Simulator» που αναπτύχθηκε, αφορά στην καθοδήγηση που αυτή μπορεί να προσφέρει για την αύξηση της ακρίβειας των αποτελεσμάτων, με την ταυτόχρονη εξοικονόμηση υπολογιστικής ισχύος και χρόνου. Όπως αναλύθηκε εκτενώς στην ενότητα [7.4 Ο ρόλος του μεγέθους του πλέγματος](#), όσο μεγαλύτερη είναι η προς αναπαράσταση γεωμετρία και όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των στοιχειωδών τετραέδρων του πλέγματος, τόσο πιο απαιτητική από άποψη υπολογιστικού κόστους είναι η προσομοίωση. Μέσω όμως της εφαρμογής,

δίνεται η δυνατότητα στον χρήστη να επικεντρώσει τη μελέτη του σε ένα μόνο τμήμα του ζώου και ως εκ τούτου να μειώσει κατά πολύ τις υπολογιστικές απαιτήσεις. Αυτή η εξοικονόμηση μπορεί να αξιοποιηθεί για την αύξηση της ακρίβειας της προσομοίωσης, μέσω της επιλογής πυκνότερου πλέγματος για το μοντέλο. Με λίγες διαδοχικές δοκιμές, παρατηρώντας τις τιμές των ισοθερμικών καμπυλών, μπορεί να βελτιστοποιήσει το μέγεθος της προς αναπαράσταση γεωμετρίας, μειώνοντας το προς μελέτη τμήμα του ζώου έως ότου στα γεωμετρικά όριά του να βρίσκεται ισοθερμική καμπύλη που να ταυτίζεται με την αρχική θερμοκρασία σώματος του ζώου. Σε αυτό το σημείο, η γεωμετρία δεν θα περιέχει μέρη του σώματος που δεν αποτελούν σημεία ενδιαφέροντος, αλλά ταυτόχρονα δεν θα έχει αποκλείσει και τμήματα που η θερμοκρασία μεταβάλλεται και άρα θα πρέπει να μελετηθούν. Βέβαια, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στον τρόπο που θα οριστούν οι νέες συνοριακές επιφάνειες που θα δημιουργηθούν ως προς τον θερμικό τους ρόλο (π.χ. επιφάνειες σταθερής θερμοκρασίας λόγω ομοιόστασης, θερμομονωτικές επιφάνειες κτλ).

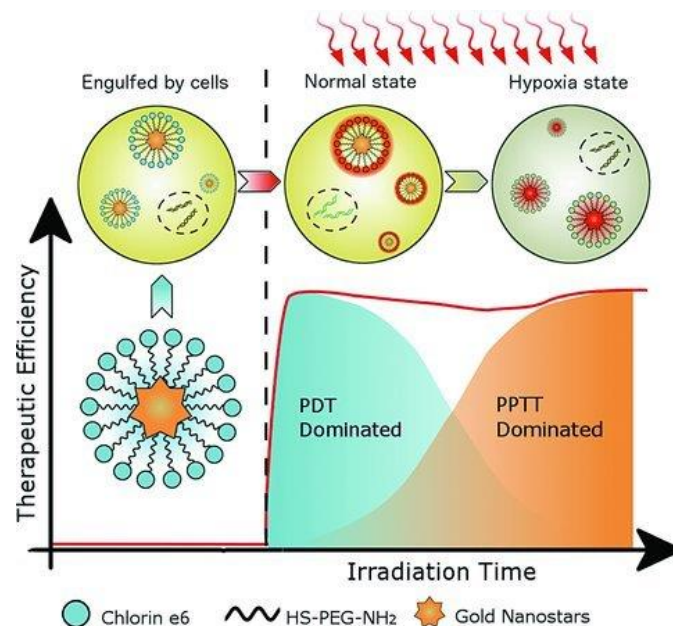
9.6 Παρατηρήσεις

Πρέπει να σημειωθεί πως η παρούσα υπολογιστική μελέτη, όπως και οι περισσότερες αντίστοιχες έρευνες, δεν έχει ως στόχο της την εξαγωγή απόλυτων τιμών παραμέτρων. Στοχεύει στην ανάδειξη θεμελιωδών συσχετισμών μεταξύ μεγεθών και διαδικασιών, για τη βελτιστοποίηση του θεραπευτικού αποτελέσματος στη συνδυαστική φωτοδυναμική και πλασμονική φωτοθερμική θεραπεία. Πηγή του ανωτέρω είναι η εγγενής δυσκολία απόλυτου και ακριβούς προσδιορισμού του συνόλου των παραμέτρων που αλληλεπιδρούν σε κάθε μία από τις παραπάνω μονοθεραπείες, πόσο μάλλον στο συνδυασμό τους. Δεν είναι τυχαίο το γεγονός πως μελέτες – οδηγοί στο συγκεκριμένο πεδίο (βλ. αναφορές [30,142]), χρησιμοποιούν πλήθος παραδοχών (όπως για παράδειγμα φωτοχημικές ιδιότητες καλά μελετημένων φωτοευαίσθητοποιών ουσιών στη θέση νέων, θεώρηση ομοιόμορφης και επ' άπειρον οξυγόνωσης του όγκου κ.ά.).

Ένα ακόμα ζήτημα, το οποίο δεν έχει προς το παρόν διευκρινιστεί επαρκώς εξ όσων γνωρίζουμε, είναι η δράση της ΠΦΘΘ σε μία περιοχή που έχει εκτεθεί σε ΦΔΘ, αν και υπάρχουν αναφορές περί επιτάχυνσης της αποπτωτικής διαδικασίας [128] ή ενίσχυσής της, παράλληλα με φαινόμενα νέκρωσης [108]. Η συντριπτική πλειοψηφία των μελετών που απαντώνται στη διεθνή

βιβλιογραφία χρησιμοποιεί σύμπλοκα φωτοευαισθητοποιών ουσιών με νανοσωματίδια (βλ. **πίνακα 2**) και όχι δύο ανεξάρτητους παράγοντες, όπως στην περίπτωση της παρούσας έρευνας, αυξάνοντας κατά πολύ την πολυπλοκότητα και το κόστος της μεθόδου. Επιπροσθέτως, γίνεται προσπάθεια χρήσης μίας μόνο πηγής φωτός (single wavelength therapy), η οποία εκκινεί ταυτόχρονα τις δύο θεραπείες. Επομένως, αναφορικά με τη σειρά εφαρμογής των δύο, κάποιες μελέτες τις εφαρμόζουν ταυτόχρονα [130,133], ενώ σε κάποιες άλλες εφαρμόζεται πρώτα η ΠΦΘΘ και αμέσως μετά η ΦΔΘ, ώστε να αποδεσμευθούν τα μόρια της φωτοευαισθητοποιού ουσίας από τις νανοδομές που έχουν προσδεθεί [128]. Ως εκ τούτου, δεν μπορεί να επιχειρηθεί μία ασφαλής σύγκριση με τις δημοσιευμένες μελέτες, παρά μόνο μία παράλληλη ανάγνωσή τους. Σε κάθε περίπτωση, ο φωτοδυναμικός μηχανισμός λαμβάνει χώρα σχεδόν ακαριαία (βλ. § [2.6 Οξυγόνο και παραγωγή κυτταροτοξικών μορίων](#)), ενώ ο φωτοθερμικός ακολουθεί, λόγω της ανόδου και διάχυσης της θερμοκρασίας. Το παραπάνω φαινόμενο αποτυπώνεται αρκετά παραστατικά στην **εικόνα 62**.

Τέλος, αναφορικά με τον χρόνο που μεσολάβησε μεταξύ της χορήγησης των νανοδομών και της ακτινοβολίας, αυτός αντιστοιχούσε σε απευθείας εφαρμογή της θεραπείας. Ο λόγος που επιλέχθηκε το συγκεκριμένο μοντέλο είναι η αποφυγή διάχυσης των νανοσωματιδίων στην περιφέρεια του όγκου και στους πέριξ υγείς ιστούς και άρα στην επακόλουθη, μη-επιθυμητή, θέρμανση μη-καρκινικών περιοχών.



Εικόνα 62. Χρονική συνεισφορά της ΦΔΘ (PDT) και της ΠΦΘΘ (PPTT) στην αποτελεσματικότητα (therapeutic efficiency) της συνδυαστικής θεραπείας, με

σύμπλοκο φωτοευαίσθητοποιού ουσίας και νανοσωματιδίων (chlorin e6 και gold nanostars, αντίστοιχα). *Reprinted with permission from “Shouju Wang, Peng Huang, Liming Nie, et al., Single Continuous Wave Laser Induced Photodynamic/Plasmonic Photothermal Therapy Using Photosensitizer-Functionalized Gold Nanostars, Advanced Materials, 2013; 25(22): 3055-3061”. Copyright © 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.*

9.7 Διάταξη *in vivo* ακτινοβολήσης

Με βάση τη γνώση που αποκομίστηκε τόσο από τις υπολογιστικές μελέτες, όσο και από το *in vivo* πείραμα του προηγούμενου κεφαλαίου, σχεδιάστηκε μία διάταξη ακτινοβολήσης που μπορεί να υπηρετήσει ως οδηγός για τις ανάγκες παρόμοιων μελετών. Μεγάλη βαρύτητα δόθηκε κατά το σχεδιασμό της στην ευχρηστία, στην εργονομικότητα αλλά και στη φορητότητά της. Καθώς τα πειράματα που έλαβαν χώρα αφορούσαν μύες, η όλη διάταξη δομήθηκε με την αντίστοιχη γεωμετρία / μέγεθος.

Όπως παρουσιάστηκε αναλυτικά νωρίτερα, το πρώτο στάδιο της θεραπείας θα πρέπει να περιλαμβάνει την προσομοίωσή της. Επομένως, η ύπαρξη ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της διάταξης, αν και αυτός θα μπορούσε να είναι οποιοσδήποτε υπολογιστής στον οποίο έχει πρόσβαση ο θεράπωντας ιατρός και / ή ο φυσικός ιατρικής. Ιδανικά, αυτός ο υπολογιστής θα πρέπει να είναι φορητός (laptop), ώστε να υπάρχει η δυνατότητα χρήσης του και στον χώρο τέλεσης της μελέτης / ιατρικής πράξης. Αυτό είναι απαραίτητο σε περίπτωση που χρησιμοποιηθεί κάποια φωτοευαίσθητοποιός ουσία σε μορφή κρέμας ή γέλης προκειμένου να ληφθεί το φάσμα φθορισμού της και έτσι να εξαχθούν πληροφορίες για την επιφανειακή συγκέντρωσή της. Επίσης, θα μπορούσε να φανεί χρήσιμος σε περίπτωση που προκύψει κάποια μη-προγραμματισμένη τροποποίηση λίγο πριν τη διενέργεια της θεραπείας, για την επαναδοσιμέτρηση του φαινομένου. Σε κάθε περίπτωση, καθότι οι *in silico* προσομοιώσεις είναι αρκετά απαιτητικές από άποψη υπολογιστικής ισχύος, προτείνεται η χρήση ενός αρκετά ισχυρού υπολογιστή (στα πλαίσια του εφικτού), ο οποίος θα εκτελεί μόνο την εκάστοτε προσομοίωση (και όχι παράλληλες εργασίες).

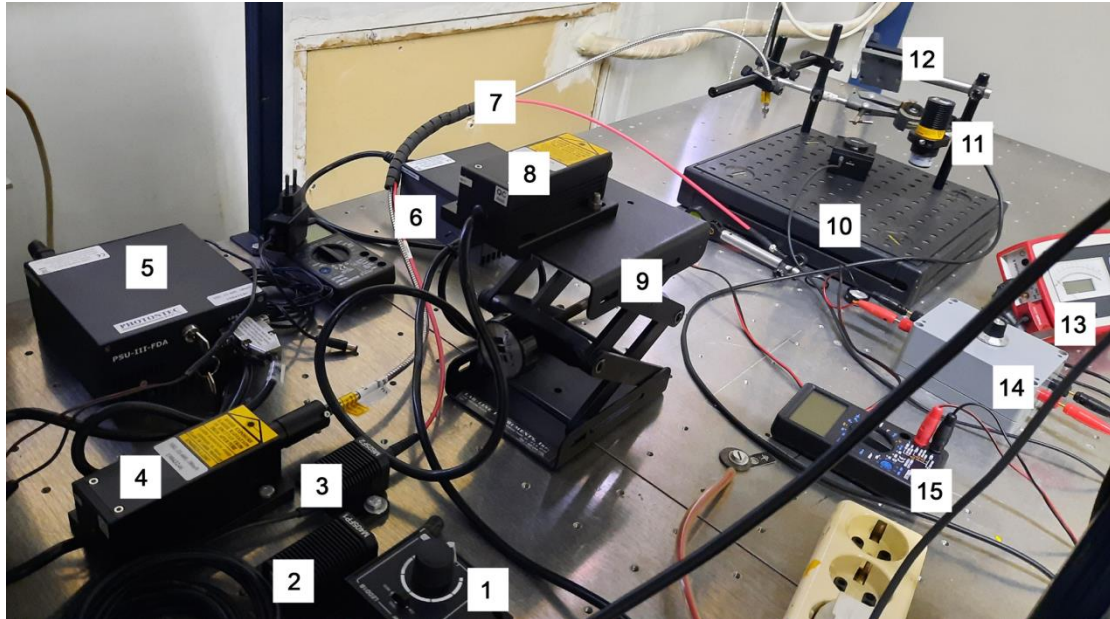
Όσον αφορά την ίδια τη διάταξη, αυτή θα πρέπει να έχει ως βάση μία μεταλλική οπτική τράπεζα ικανών διαστάσεων, προκειμένου να μπορούν να βιδώνονται οι ράβδοι ανάρτησης των στηριγμάτων των οπτικών ινών, των

κατόπτρων, των οπτικών φίλτρων κ.ά. Το πλήθος των σπειρωμάτων της θα πρέπει να είναι το ελάχιστο δυνατό για την ευκολότερη απολύμανσή τους. Το χρώμα της τράπεζας θα πρέπει να είναι μαύρο ματ (και όχι στο φυσικό χρώμα του μετάλλου) ώστε να μειωθούν τυχόν ανακλάσεις από τις δέσμες των πηγών φωτός.

Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στα τροφοδοτικά των πηγών φωτός, τα οποία ιδανικά θα πρέπει να βρίσκονται συγκεντρωμένα σε χώρο που δε θα υπάρχει άμεση επαφή με το προσωπικό που θα είναι παρόν την ώρα της θεραπείας, καθώς αναπτύσσουν υψηλές θερμοκρασίες και τάσεις ρεύματος. Μία επιλογή θα ήταν η τοποθέτησή τους κάτω από τον πάγκο που θα βρίσκεται η οπτική τράπεζα (π.χ. όπως στο ράφι της **εικόνας 46**). Στο ίδιο σημείο θα πρέπει να βρίσκεται και το φασματόμετρο σε περίπτωση διενέργειας μελέτης φασματοσκοπίας φθορισμού, για την αποφυγή ακούσιων μετακινήσεών του.

Αναφορικά με τις κεφαλές των πηγών φωτός, αυτές, εφόσον έχουν έξοδο οπτικής ίνας, μπορούν να βιδωθούν στην άκρη της οπτικής τράπεζας. Σε διαφορετική περίπτωση, θα πρέπει να βιδωθούν σε βάση με δυνατότητα κατακόρυφων μετακινήσεων (Jiffy-Jack), η οποία με τη σειρά της θα προσαρτηθεί στην οπτική τράπεζα. Στην πρώτη περίπτωση, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην προσεκτική τοποθέτηση των οπτικών ινών, ώστε να μην παρεμβάλλονται ούτε στην πορεία της ελεύθερης δέσμης πηγής φωτός (εφόσον αυτή υφίσταται) αλλά ούτε να εμποδίζουν τις κινήσεις του προσωπικού. Άλλωστε, ειδικά η ίνα συλλογής φωτός για τη φασματοσκοπία φθορισμού, θα πρέπει να είναι απολύτως ακίνητη σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

Τέλος, θα πρέπει να υπάρχει πρόνοια για τη χωροταξική διευθέτηση όλων των παρελκόμενων αλλά απαραίτητων οργάνων / εξοπλισμού, όπως για παράδειγμα της θερμικής κάμερας, ισχυόμετρου / ενεργόμετρου, πολύμετρου, πολύπριζου, ακόμα και για τα γυαλιά οφθαλμικής προστασίας. Ένα παράδειγμα των ανωτέρω φαίνεται στην **εικόνα 63** που ακολουθεί.



Εικόνα 63. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ενδεικτικού εξοπλισμού για τη διενέργεια ΦΔΘ – ΠΦΘΘ. **1)** Ρυθμιστής τάσης (οδηγός) πηγών LED, **2)** πηγή LED 405 nm, **3)** πηγή LED 625 nm, **4)** πηγή laser 660 nm, **5)** τροφοδοτικό laser 660 nm, **6)** τροφοδοτικό laser 808 nm, **7)** οπτικές ίνες, **8)** πηγή laser 808 nm, **9)** βάση κατακόρυφων μετακινήσεων (Jiffy-Jack), **10)** οπτική τράπεζα, **11)** πηγή LED 680 nm, **12)** κάτοπτρο (για οδήγηση της δέσμης του laser των 808 nm), **13)** ισχυόμετρο, **14)** ρυθμιστής τάσης τροφοδοτικού laser 660 nm και **15)** πολύμετρο.

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

10.1 Συμπεράσματα

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της δοσιμετρίας στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου. Η επιτυχημένη αντιμετώπιση της νόσου σε επίπεδο ασθενούς προϋποθέτει την εξατομίκευση του θεραπευτικού πρωτοκόλλου, που προς το παρόν απουσιάζει από τη σύγχρονη κλινική πράξη. Η χρήση υπολογιστικών προσομοιώσεων φαίνεται να αποτελεί έναν πολύ ασφαλή για τον ασθενή, ευέλικτο και οικονομικά συμφέροντα τρόπο, προκειμένου να καταστεί το προαναφερθέν εφικτό. Άλλωστε, μαζί με τις *in situ* μετρήσεις σε εργαστηριακό περιβάλλον και με τη χρήση ομοιωμάτων / προσομοιωτών ιστών, οι *in silico* μελέτες συμβάλλουν καταλυτικά στην ελαχιστοποίηση των αντίστοιχων *in vivo* πειραμάτων.

Στα πλαίσια αυτής της έρευνας αναπτύχθηκε καινοτόμος κώδικας υπό την ονομασία «PDT Simulator». Πρόκειται για ένα σύνολο αλγορίθμων, οι οποίοι υπολογίζουν τις τιμές βασικών παραμέτρων της φωτοδυναμικής θεραπείας και βάσει αυτών προσομοιώνουν το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Ο κώδικας βασίζεται στην Τύπου II ΦΔΘ με επιφανειακή ακτινοβολήση και στην Monte Carlo προσομοίωση της πορείας, απορρόφησης και σκέδασης των φωτονίων της δέσμης ακτινοβολήσης. Με γνωστές τις οπτικές και φωτοχημικές ιδιότητες των δομών που απαρτίζουν την προς μελέτη γεωμετρία (τόσο των ιστών, όσο και του φωτοευαίσθητοποιού παράγοντα), εξάγονται αποτελέσματα αναφορικά με την παραγόμενη ζώνη νέκρωσης, με τη μορφή χρωματικών χαρτών και αριθμητικών τιμών. Επιπροσθέτως, δίνεται η δυνατότητα στον χρήστη, εφόσον έχει προηγηθεί το αντίστοιχο *in vivo* πείραμα, να υπολογίσει τις τιμές παραμέτρων που πιθανώς δεν είναι γνωστές (π.χ. την αρχική συγκέντρωση του μοριακού οξυγόνου). Με αυτόν τον τρόπο δύναται να δημιουργηθούν βάσεις δεδομένων, με τιμές μεγεθών που προς το παρόν δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Απώτερος στόχος είναι η χρήση αυτών των τιμών για την εξατομίκευση της

εκάστοτε θεραπείας, ώστε να είναι εφικτός ο βέλτιστος σχεδιασμός του θεραπευτικού πρωτοκόλλου. Μία ακόμα σημαντική δυνατότητα του κώδικα είναι ο υπολογισμός της οξυγόνωσης της περιοχής θεραπείας αλλά και του χρόνου που θα απαιτηθεί, προκειμένου να επιτευχθεί συγκεκριμένη ζώνη νέκρωσης.

Ο παραπάνω κώδικας, αφού πρώτα βελτιστοποιήθηκε αναφορικά με το πλήθος των υπό προσομοίωση φωτονίων, χρησιμοποιήθηκε σε *in vivo* πείραμα φωτοδυναμικής θεραπείας μυών που έφεραν καρκινικούς όγκους. Το ανωτέρω αποσκοπούσε στη μελέτη της επίδρασης που έχουν διαφορετικά πρωτόκολλα δοσιμετρίας στην επιφανειακή ΦΔΘ όγκων 4T1 σε μύες NOD-SCID, συνδυασμός που απουσιάζει από τη διεθνή βιβλιογραφία. Όπως αποδείχθηκε, οι οπτικές ιδιότητες του παράγοντα φωτοευαισθητοποίησης, μαζί με τις παραμέτρους ακτινοβολήσης, επηρεάζουν έντονα το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Επιπλέον, οι συμβατικές εξισώσεις που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του μεγέθους του όγκου φαίνεται πως είναι ανεπαρκείς για επιφανειακές θεραπείες. Όσον αφορά την αξιοποίηση δεδομένων φασματοσκοπίας φθορισμού και θερμοκρασιακών μετρήσεων, αυτή φαίνεται να βοηθά στην επιτήρηση και πρόγνωση του θεραπευτικού αποτελέσματος. Οι ανωτέρω, *in vivo* παρατηρήσεις, ήταν σε συμφωνία με την αντίστοιχη υπολογιστική προσομοίωση. Σύμφωνα με αυτές, το θεραπευτικό αποτέλεσμα υποβαθμίζεται όταν χρησιμοποιείται μονοχρωματικό φως σε αναντιστοιχία με το φάσμα απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιού παράγοντα, ακόμη και αν χρησιμοποιηθούν υψηλές τιμές πυκνότητας προσπίπτουσας ακτινοβολίας ή αυξημένοι χρόνοι ακτινοβολήσης. Έτσι, η επιλογή πηγής με κατάλληλο μήκος κύματος αποδεικνύεται βαρύνουσας σημασίας. Από την άλλη πλευρά, το αυξημένο βάθος διείσδυσης της δέσμης είναι εξίσου σημαντικό. Μάλιστα, στην περίπτωση αυτής της μελέτης, τα βέλτιστα αποτελέσματα προέκυψαν από τον κατάλληλο συνδυασμό δύο πηγών φωτός (μία με μικρό βάθος διείσδυσης που ταιριάζει με το φάσμα απορρόφησης της φωτοευαισθητοποιού ουσίας και μία με μεγαλύτερο βάθος διείσδυσης, με ελαφρά όμως αναντιστοιχία με το προαναφερθέν), γεγονός που επιτρέπει τη μείωση του συνολικού χρόνου θεραπείας.

Ανεξαρτήτως από το εάν ο φωτοευαισθητοποιός παράγοντας χορηγηθεί με επιφανειακή επάλειψη ή με ενδοφλέβια έγχυση, εφόσον η ακτινοβολήση είναι επιφανειακού τύπου, η ζώνη νέκρωσης που δημιουργείται καταλαμβάνει τα ανώτερα στρώματα του καρκινικού όγκου και όχι το σύνολό του. Ειδικά στην περίπτωση θεώρησης υποξικών συνθηκών, η παραπάνω ζώνη μειώνεται ακόμα

περισσότερο, καθώς το οξυγόνο είναι ένας ακρογωνιαίος λίθος της ΦΔΘ. Οι συμβατικοί τρόποι ενίσχυσης του θεραπευτικού αποτελέσματος της επιφανειακής ΦΔΘ περιλαμβάνουν την επιλογή φωτοευαίσθητοποιών ουσιών με υψηλή απορρόφηση στο μήκος κύματος που χρησιμοποιείται, αυξημένες τιμές συγκέντρωσης και χρόνου ακτινοβολήσής τους καθώς και πιο ισχυρές πηγές φωτός. Ωστόσο, τίθενται ζητήματα τοξικότητας, πόνου, χρόνου και κόστους της θεραπείας. Βιβλιογραφικά έχουν αναφερθεί και άλλοι, έμμεσοι τρόποι για την ενίσχυση της απόκρισης των καρκινικών όγκων στη ΦΔΘ, όπως για παράδειγμα η χορήγηση χαμηλών δόσεων βιταμίνης D [268]. Επιπλέον και η θερμοκρασία του χώρου έχει συσχετισθεί με το θεραπευτικό αποτέλεσμα, καθώς το στρες λόγω ψύχους μπορεί να ενεργοποιήσει βιοφυσικές διαδικασίες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του όγκου [269,270]. Σε κάθε περίπτωση, τα περισσότερα εγκεκριμένα και κλινικά διαθέσιμα σκευάσματα για τη ΦΔΘ παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση κάτω από το υπέρυθρο τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, όπου το βάθος διείσδυσης είναι περιορισμένο. Επομένως, η ανάγκη εξεύρεσης εναλλακτικών μεθόδων για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της ΦΔΘ οδηγεί σε νέες συνδυαστικές προσεγγίσεις. Τα νανοσωματίδια μπορούν να διαδραματίσουν καθοριστικό ρόλο στην ενδοκυτταρική μεταφορά φαρμάκων και την αύξηση της επιλεκτικότητάς τους [271–273], κυρίως όμως μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κέντρα παραγωγής θερμότητας για την επίτευξη υπερθερμίας.

Όσον αφορά την επιδιωκόμενη αύξηση της θερμοκρασίας κατά την ΠΦΘΘ σε μύες (που μελετήθηκαν *in silico* στην παρούσα έρευνα), όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα «[3.1 Εισαγωγικά στοιχεία](#)», καταγράφεται ένα ευρύ φάσμα τιμών στη διεθνή βιβλιογραφία. Σύμφωνα με τα δεδομένα που εξήχθησαν από την παρούσα μελέτη, η επίτευξη μίας συγκεκριμένης τιμής θερμοκρασίας στην περιοχή του όγκου μπορεί να αποδειχθεί παραπλανητική ή και επιβλαβής για τους πέριξ υγείς ιστούς. Αρχικά, σε *in vivo* πειράματα, η μέτρηση της θερμοκρασίας μπορεί να γίνει είτε από απόσταση (μέσω θερμικής κάμερας), είτε με επαφή (τοποθέτηση αισθητήρα στο δέρμα), είτε επεμβατικά (τοποθέτηση αισθητήρα εντός του όγκου). Στην πρώτη περίπτωση υπάρχει η δυνατότητα απεικόνισης των βαθμίδων θερμότητας στην ευρύτερη περιοχή, προφανώς όμως αφορά την επιφάνεια του δέρματος. Στη δεύτερη περίπτωση, η μέτρηση αφορά ένα μόνο σημείο (και πάλι στην επιφάνεια του δέρματος) ενώ εισάγονται και προβλήματα σκίασης, λόγω της παρεμβολής του αισθητήρα στην πορεία της δέσμης ακτινοβολήσης. Εν τούτοις, η δοσιμετρία του φαινομένου βασιζόμενη

μόνο στην επιφανειακά μετρούμενη θερμοκρασία μπορεί να αποβεί επισφαλής. Στην τρίτη περίπτωση, η μέτρηση είναι μεν πιο ακριβής καθότι πραγματοποιείται στην περιοχή ενδιαφέροντος, ανακύπτουν όμως αρκετές δυσκολίες καθώς πλέον η τεχνική είναι επεμβατική, με τη μέτρηση να αφορά και πάλι ένα μόνο σημείο ή πολλαπλά, με την εισαγωγή περισσότερων διάσπαρτων αισθητήρων.

Η λύση στο παραπάνω πρόβλημα μπορεί να δοθεί μόνο μέσα από πιο προηγμένες τεχνικές, όπως για παράδειγμα η μαγνητική θερμοκρασιακή τομογραφία συντονισμού (magnetic resonance temperature imaging - MRTI) [98]. Το συγκριτικό της πλεονέκτημα είναι η δυνατότητα απεικόνισης της θερμοκρασιακής μεταβολής στο σύνολο της περιοχής, σε πραγματικό χρόνο. Με αυτόν τον τρόπο δύναται να βελτιστοποιηθούν οι παράμετροι της θεραπείας, όπως η ισχύς της πηγής φωτός ή ο χρόνος ακτινοβολήσης, προστατεύοντας έτσι τους υγιείς ιστούς. Καθόσον όμως η προαναφερθείσα τεχνική προϋποθέτει αρκετά δαπανηρό εξοπλισμό αλλά και πολλές εργονομικές δυσκολίες σε κλινικό περιβάλλον, μία εναλλακτική θα μπορούσε να είναι η υπολογιστική προσομοίωση της διαδικασίας. Το μεγάλο πλεονέκτημά της είναι η δυνατότητα τρισδιάστατης αναπαράστασης της θερμοκρασιακής μεταβολής, χωρίς να υπάρχει κανένας περιορισμός στο πλήθος των δοκιμών και των συγκριτικών μελετών που μπορούν να διεξαχθούν. Το μειονέκτημά της είναι η ανάγκη παραμετροποίησης και κατηγοριοποίησης των πιθανών μοντέλων (π.χ. τύπος καρκίνου, περιοχή ανάπτυξης, ανατομία περιοχής κ.ά.) και η *in vivo* δειγματοληπτική επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που θα προκύψουν. Σε ακόμα σημαντικότερο πρόβλημα μπορεί να αναδειχθεί η ύπαρξη φαινομενικά μικρών περιπτώσεων ανακρίβειας, καθώς το τελικό αποτέλεσμα μπορεί να φαντάζει αρκετά αληθοφανές και άρα παραπλανητικό. Αναφορικά με το κόστος της μεθόδου, αυτό είναι αμελητέο σε σχέση με την MRTI καθώς, πέραν του κόστους αγοράς του λογισμικού και μίας θερμικής κάμερας (για την εποπτεία της θεραπείας), δεν υφίσταται κανένα άλλο κόστος ή ανάγκη δαπανηρής συντήρησης του εξοπλισμού. Επιπροσθέτως, το σύνολο της προσομοίωσης μπορεί να πραγματοποιηθεί οποιαδήποτε χρονική στιγμή και από οποιοδήποτε μέρος, ανεξαρτήτως από εξωγενείς ανασταλτικούς παράγοντες (π.χ. συνθήκες πανδημίας) βοηθώντας έτσι στο οργανόγραμμα του εκάστοτε εργαστηρίου / κλινικής. Για όλους τους παραπάνω λόγους, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην ανάπτυξη μίας καινοτόμου, εύχρηστης και αξιόπιστης εφαρμογής μελέτης των φωτοθερμικών φαινομένων.

Τέλος, όσον αφορά τις απόλυτες τιμές επιδιωκόμενης θερμοκρασίας, αυτές δεν μπορούν να οριστούν με ακρίβεια καθώς εξαρτώνται από πλήθος παραμέτρων. Παρόλα ταύτα, στο μοντέλο που μελετήθηκε στην παρούσα έρευνα και αφορούσε μυ, τιμές της τάξης των 40 – 45°C (κατά μέσο όρο) μπορούν να θεωρηθούν ανεπαρκείς, καθώς σημεία της περιφέρειας του όγκου θα αναπτύξουν σημαντικά χαμηλότερες θερμοκρασίες και πιθανότατα δε θα υπάρξει τοπικός έλεγχος της νόσου. Από την άλλη, λόγω των φαινομένων διάχυσης της θερμότητας, επιδίωξη ανάπτυξης θερμοκρασιών άνω των 50 – 52°C (κατά μέσο όρο), αναμένεται να οδηγήσει στην πρόκληση βλαβών στους πέριξ υγείς ιστούς καθώς και σε διαδικασίες μετουσίωσης των πρωτεϊνών. Σε κάθε περίπτωση, η διενέργεια υπολογιστικών προσομοιώσεων για την μελέτη των βαθμίδων θερμοκρασίας εκτός της καρκινικής περιοχής κρίνεται επιβεβλημένη, μέσω εργαλείων όπως η εφαρμογή «Thermal Effects Simulator» που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας έρευνας.

Εν συνεχεία, επιχειρείται μία σύγκριση των προσομοιώσεων μέσω του Matlab και του COMSOL Multiphysics, η οποία προφανώς δεν περιορίζεται στη μελέτη μόνο φωτοθερμικών αλλά μπορεί να γενικευθεί και για την προσομοίωση φωτοδυναμικών φαινομένων (υπενθυμίζεται σε αυτό το σημείο πως δεν πραγματοποιήθηκε μελέτη των τελευταίων λόγω της απουσίας σχετικής άδειας χρήσης). Στο περιβάλλον του COMSOL Multiphysics, ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να κατασκευάσει το μοντέλο που επιθυμεί, χρησιμοποιώντας γεωμετρικά στερεά που μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (π.χ. μπορούν να αφαιρούνται ώστε να προκύπτουν νέα σχήματα). Αντιθέτως, το Matlab απαιτεί τη σχεδίαση της γεωμετρίας μέσα από τις εξισώσεις που διέπουν τα αντικείμενα, ως επιφάνειες στο χώρο. Επιπροσθέτως, προκειμένου ο χρήστης να ελέγξει το αποτέλεσμα της κάθε δομής που προγραμματίζει θα πρέπει να εκτελέσει, έστω και τμηματικά, τον κώδικα που έχει γράψει. Από την άλλη πλευρά, στο COMSOL Multiphysics, δίνεται η επιλογή στον χρήστη να κατασκευάσει ένα – ένα τα αντικείμενα που προγραμματίζει, χωρίς το ένα να εξαρτάται από την ορθότητα του άλλου, ομαδοποιώντας τα σταδιακά. Επιπροσθέτως, εφόσον το επιθυμεί, μπορεί να κατασκευάσει το σύνολο της γεωμετρίας, με διαφορετικό χρωματισμό για κάθε δομή που εισάγει, επιβλέποντας το συνολικό μοντέλο. Συμπερασματικά, γίνεται κατανοητό πως η υλοποίηση σύνθετων γεωμετριών μέσω του Matlab, μεταπίπτει σε ένα αρκετά σύνθετο και πολύπλοκο πρόβλημα. Με βάση τα συγκριτικά αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, εξάγεται το συμπέρασμα πως η αναπτυχθείσα εφαρμογή

«Thermal Effects Simulator» μπορεί να οδηγήσει σε επαρκώς ακριβή αποτελέσματα, μέσα από ένα φιλικότερο προς τον χρήστη περιβάλλον, ενώ η σχεδιασθείσα γεωμετρία μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως σχέδιο για τρισδιάστατες εκτυπώσεις. Μάλιστα, λόγω της δυνατότητας απεικόνισης πιο σύνθετων, άρα και ρεαλιστικότερων γεωμετριών, μπορούν να ληφθούν υπόψη περισσότερες παράμετροι. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η δυνατότητα καθορισμού διαφορετικής αρχικής θερμοκρασίας ιστών και περιβάλλοντος (κάτι που απουσιάζει από το «MCmatlab»). Τα ανωτέρω έχουν ιδιαίτερη σημασία, ειδικά αν κάποιος αναλογιστεί πως όσο ρεαλιστικότερο είναι το προσομοιούμενο μοντέλο, τόσο ακριβέστερα θα είναι τα εξαγόμενα αποτελέσματα.

Ένα ιδιαίτερος χρήσιμο στάδιο μεταξύ του θεωρητικού, *in silico* υπολογισμού του αναμενόμενου αποτελέσματος και του πραγματικού, που θα προκύψει από *in vivo* μελέτες, είναι η προσομοίωση του φαινομένου μέσω ομοιωμάτων / προσομοιωτών ιστών. Η σύγχρονη τεχνολογία προσφέρει τη δυνατότητα κατασκευής σύνθετων και αρκετά ρεαλιστικών γεωμετριών, οι οποίες δύναται να αξιοποιηθούν για *in situ* μετρήσεις στο εργαστήριο. Το βασικότερο και ταυτόχρονα αντιπροσωπευτικότερο, από άποψη οπτικών κυρίως ιδιοτήτων, υλικό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι η γέλη αγαρόζης. Μάλιστα, λόγω του τρόπου παρασκευής της, επιτρέπει την ενσωμάτωση ουσιών που μπορούν να διαδραματίσουν ποικίλους ρόλους, όπως για παράδειγμα φθορίζουσες ουσίες ή νανοδομές. Η χύτευσή της σε διάφορες συγκεντρώσεις και με την προσθήκη κατάλληλων σκεδαστών, εντός τρισδιάστατα εκτυπωμένων καλουπιών, δίνει τη δυνατότητα ακριβούς αναπαράστασης ανατομικών περιοχών. Με αυτόν τον τρόπο, τα κατασκευαζόμενα ομοιώματα δύναται να χρησιμοποιηθούν για τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων ακτινοβολήσης και για τη δοκιμή εναλλακτικών μεθόδων (π.χ. τροποποίηση του προφίλ της δέσμης). Κυρίως όμως, παρέχουν τη δυνατότητα δοσιμέτρησης και εκτίμησης του αποτελέσματος της μελέτης προτού το *in vivo* πείραμα, περιορίζοντας έτσι σημαντικά τον αριθμό των απαιτούμενων ζώων. Η παραπάνω μεθοδολογία ακολουθήθηκε και στην παρούσα διδακτορική έρευνα.

Τελικά, όπως προέκυψε από τη διεξαχθείσα μελέτη, η επιφανειακά εφαρμοζόμενη φωτοδυναμική θεραπεία έχει τα σημαντικά μειονεκτήματα του περιορισμένου βάθους δράσης και της δυσκολίας αντιμετώπισης υποξικών περιοχών. Από την άλλη πλευρά, η πλασμονική φωτοθερμική θεραπεία δύναται να εφαρμοστεί σε μεγαλύτερα βάθη και δεν εξαρτάται από την οξυγόνωση του

όγκου. Παρόλα ταύτα, λόγω της μη-απόλυτα εντοπισμένης δράσης της, είτε θα πρέπει να υποδοσιαστεί η περιφέρεια του όγκου ώστε να προστατευθεί ο πέριξ υγιής ιστός, είτε να αντιμετωπιστεί η περιφέρεια του όγκου, εκθέτοντας όμως σε υπερθερμικά φαινόμενα και τον πέριξ υγιή ιστό. Το τελευταίο «δίλημμα» δεν υφίσταται στην περίπτωση της φωτοδυναμικής θεραπείας, καθότι το παραγόμενο κυτταροτοξικό μονήρες οξυγόνο έχει σαφώς εντοπισμένη ακτίνα δράσης.

Συμπερασματικά, η σημαντικότερη ίσως παρατήρηση της παρούσας διατριβής, είναι η δυνατότητα συνδυαστικής θεραπείας συμπαγών όγκων, η οποία με τη χρήση επιφανειακής φωτοδυναμικής θεραπείας, ως μονοθεραπεία, δε θα ήταν εφικτή. Τα υπερθερμικά φαινόμενα δύναται να συμπληρώσουν επαρκώς τη φωτοδυναμική δράση της ΦΔΘ. Με αυτόν τον τρόπο παύει να είναι απαραίτητη η χρήση ενδοϊστικών εφαρμογών για τη διενέργεια της φωτοδυναμικής θεραπείας, ενισχύοντας τη μη-επεμβατική της φύση (που είναι και ένα σαφές πλεονέκτημα της μεθόδου). Βέβαια, καταλυτικής σημασίας είναι η δοσιμέτρηση του συνδυαστικού σχήματος μέσω κωδίκων και εύχρηστων εφαρμογών όπως οι «PDT Simulator» και «Thermal Effects Simulator», καθόσον οι δύο συνιστώσες του (φωτοδυναμική και φωτοθερμική) έχουν σχεδιαστεί ώστε να λειτουργούν συμπληρωματικά και όχι να αλληλεπικαλύπτονται. Απόρροια αυτού του γεγονότος είναι και η μείωση της απαιτούμενης ποσότητας του φωτοευαισθητοποιού παράγοντα, των νανοσωματιδίων αλλά και της διάρκειας της κάθε θεραπείας (σε σχέση με την εφαρμογή της ως μονοθεραπεία).

Σε κάθε περίπτωση, η συνολική αξιολόγηση του παραπάνω μοντέλου θα πρέπει να γίνεται παράλληλα από τον ιατρό (για εφαρμογή σε ασθενή) ή κτηνίατρο (σε περίπτωση ζώου) και τον φυσικό ιατρικής. Οι δύο πρώτοι κατέχουν τις απαραίτητες γνώσεις αναφορικά με το επιδιωκόμενο θεραπευτικό αποτέλεσμα και τον βαθμό προστασίας των πέριξ υγιών ιστών. Ο τρίτος είναι ο καθ' ύλην αρμόδιος για τον άρτιο σχεδιασμό του μοντέλου, όντας γνώστης των θεμάτων φυσικής αλλά και ανατομίας / βιολογίας που άπτονται της δοσιμέτρησης της θεραπείας.

10.2 Μελλοντικοί στόχοι

Η χρήση υπολογιστικών μεθόδων στη φωτοδυναμική θεραπεία αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη εξέλιξη για τη στοχευμένη δοσιμετρία της. Προκειμένου να υπάρξει σύγκλιση με το εξατομικευμένο, καθιερωμένο και αποδεδειγμένα αποτελεσματικό σύστημα σχεδιασμού θεραπείας (treatment planning system - TPS), το οποίο χρησιμοποιείται εδώ και χρόνια στην ακτινοθεραπεία, θα πρέπει να μπορούν να αξιοποιηθούν τα δεδομένα του εκάστοτε ασθενούς. Πιο συγκεκριμένα, με βάση εικόνες που λαμβάνονται με απεικονιστικές τεχνικές (π.χ. υπολογιστική τομογραφία), δύναται να παραχθούν τρισδιάστατες αναπαραστάσεις της προς θεραπεία ανατομίας. Έτσι, μπορεί να επιτραπεί η ακριβέστερη εκτέλεση Monte Carlo υπολογιστικών προσομοιώσεων, όπως αυτές που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διατριβή ή να εφαρμοσθούν μαθηματικά μοντέλα, επιτρέποντας τη δοσιμέτρηση της ΦΔΘ. Το μεγαλύτερο εμπόδιο σε αυτή την προσπάθεια, είναι η αυξημένη υπολογιστική ισχύς που απαιτείται για την εκτέλεση των προσομοιώσεων. Προς τη συγκεκριμένη κατεύθυνση υπάρχουν πολλά υποσχόμενες μελέτες, όπως για παράδειγμα της ομάδας των Cassidy, Betz και Lilge [162,274], όπου χρησιμοποιούνται αλγόριθμοι βελτιστοποίησης της μεθόδου, οι οποίοι αξίζουν περαιτέρω διερεύνηση.

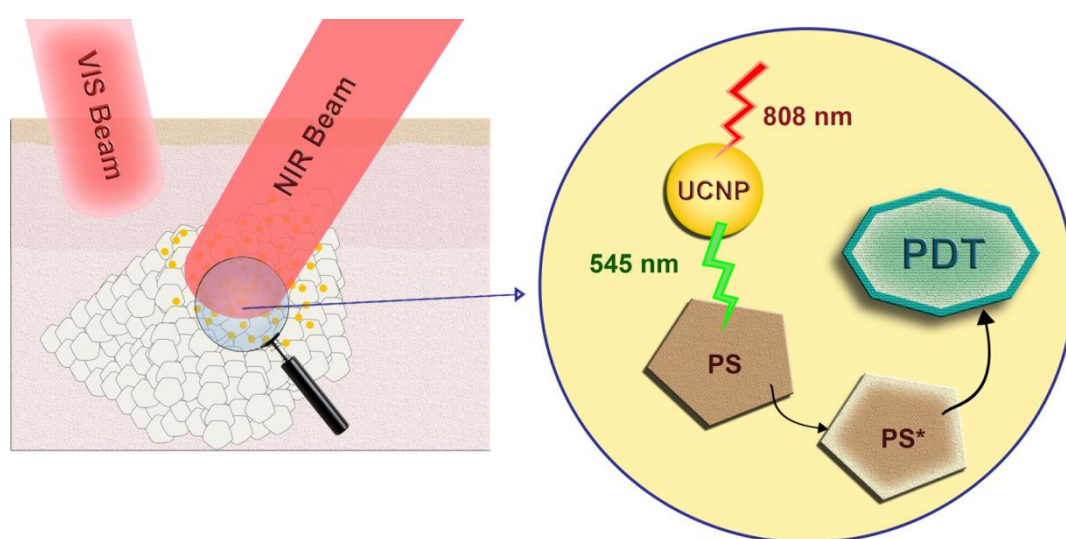
Όπως σχολιάστηκε ανωτέρω, η σύγκριση μεταξύ του Matlab και του COMSOL Multiphysics υποδεικνύει το δεύτερο ως επαρκέστερο και προτιμητέο πρόγραμμα για την εκτέλεση *in silico* προσομοιώσεων. Το συγκριτικό του πλεονέκτημα, της σημαντικά ρεαλιστικότερης αναπαράστασης πολύπλοκων δομών και της θεώρησης πολλών αλληλεπιδρώντων παραγόντων, μπορεί να το εκμεταλλευθεί κανείς και για την προσομοίωση της φωτοδυναμικής θεραπείας. Η μοντελοποίηση της τελευταίας μέσω μίας εύχρηστης εφαρμογής, αντίστοιχης της «Thermal Effects Simulator», θα μπορούσε να αποτελέσει πολύτιμο εργαλείο στα χέρια του ιατρού ή / και του φυσικού ιατρικής, καθώς εκείνος θα μπορούσε να προσαρμόσει τις παραμέτρους της θεραπείας, προκειμένου να την εξατομικεύσει και βελτιστοποιήσει για τις ανάγκες του εκάστοτε ασθενούς. Μάλιστα, η υλοποίηση του τελευταίου και η *in vivo* επιβεβαίωση τόσο αυτού, όσο και της εφαρμογής «Thermal Effects Simulator», αποτελεί και έναν από τους επόμενους στόχους της παρούσας ερευνητικής ομάδας.

Όπως αναδείχθηκε από την παρούσα διατριβή, το παραγόμενο μονήρες οξυγόνο είναι ο «πρωταγωνιστής» της φωτοδυναμικής θεραπείας Τύπου II. Ως εκ τούτου, η μέτρηση και παρακολούθηση των επιπέδων του κατά τη διάρκεια της

ΦΔΘ αποτελεί έναν από τους αμεσότερους και ασφαλέστερους τρόπους πρόγνωσης του θεραπευτικού αποτελέσματος. Για την ανίχνευση του μονήρους οξυγόνου μπορούν να χρησιμοποιηθούν φασματοσκοπικές τεχνικές, όπως η ανίχνευση επαγόμενου φθορισμού (singlet oxygen luminescence detection - SOLD) [275], αν και η υλοποίηση της προαναφερθείσας είναι αρκετά δύσκολη. Ειδικά για την *in vivo* εφαρμογή της, κύριο πρόβλημα αποτελεί η παρουσία πηγών πολύ εντονότερης φωταύγειας, όπως η φωτοευαισθητοποιός ουσία ή ακόμα και ο ίδιος ο ιστός [140]. Το ιδιαίτερα αδύναμο σήμα που παράγεται και πρέπει να ολοκληρωθεί για το σύνολο της περιοχής, δεν δύναται να συλλεχθεί με χρήση οπτικών ινών [46], ενώ και οι φωτοπολλαπλασιαστές κοντινού υπέρυθρου που απαιτούνται είναι αρκετά δαπανηροί. Ως αποτέλεσμα, η άμεση παρακολούθηση των επιπέδων του μονήρους οξυγόνου δεν είναι προς το παρόν εφικτή σε κλινικό επίπεδο, ιδιαίτερα σε ρεαλιστικές συνθήκες φωτισμού εργασίας. Παρόλα ταύτα, υπάρχουν ορισμένες ενδιαφέρουσες μεθοδολογίες σε *in vivo* μελέτες [140,276] οι οποίες αξίζουν περαιτέρω διερεύνηση.

Ένα άλλο ζήτημα αποτελεί το γεγονός πως οι δέσμες που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία βρίσκονται στο ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, ώστε να είναι σε συμφωνία με το φάσμα απορρόφησης των φωτοευαισθητοποιών παραγόντων. Το παραπάνω όμως συνεπάγεται πως έχουν περιορισμένο βάθος διείσδυσης και επομένως, η θεραπεία εν τω βάθει ή μεγάλου πάχους όγκων καθίσταται προβληματική. Ως εκ τούτου, η ιδανική δέσμη για την ακτινοβόληση θα έπρεπε να βρίσκεται στο (κοντινό) υπέρυθρο τμήμα του φάσματος (ώστε να συμπίπτει και με το οπτικό παράθυρο των βιολογικών ιστών), προκειμένου να είναι σχετικά διεισδυτική αλλά ταυτόχρονα και στο ορατό ώστε να μπορεί απορροφηθεί από την φωτοευαισθητοποιό ουσία. Μία λύση στο ανωτέρω πρόβλημα μπορεί να προέλθει από τη χρήση των λεγόμενων νανοσωματιδίων αναβιβασμού (upconverting nanoparticles - UCNPs), τα οποία αναφέρονται εκτενώς στη διεθνή βιβλιογραφία την τελευταία δεκαετία, αν και ο μηχανισμός δράσης τους μελετάται από τα μέσα της δεκαετίας του 1960 [277,278]. Πρόκειται για νανοδομές οι οποίες έχουν τη δυνατότητα εκπομπής φωτός μικρότερου μήκους κύματος από αυτό με το οποίο ακτινοβολούνται (εκπομπή anti-Stokes). Επομένως, εφόσον έχουν εγχυθεί στην περιοχή ενδιαφέροντος της ΦΔΘ, μπορούν αρχικά να ακτινοβοληθούν με διεισδυτική δέσμη φωτός και ακολούθως, να λειτουργήσουν τα ίδια ως τοπικά εντοπισμένες πηγές φωτός νανομετρικών διαστάσεων (nano-laser sources), διεγείροντας τα μόρια της

φωτοευαίσθητοποιού ουσίας (βλ. **εικόνα 64**). Το μεγαλύτερο εμπόδιο στη χρήση τους είναι η περιορισμένη διαθεσιμότητά τους (υπάρχουν παγκοσμίως ελάχιστες εταιρείες που τα παρασκευάζουν και μάλιστα μόνο μία που να κατασκευάζει UCNPs που να απορροφούν στα 808 nm, εξ όσων γνωρίζουμε) καθώς και το αυξημένο κόστος τους (της τάξης των 1300 € για 1 ml διαλύματος περιεκτικότητας 5 mg/ml). Για περαιτέρω πληροφορίες επί του συνδυασμού ΦΔΘ – UCNPs, ο ενδιαφερόμενος αναγνώστης παραπέμπεται στο άρθρο ανασκόπησης των Qiu *et al.* [279], ενώ αξίζει να σημειωθεί πως τα παραπάνω αποτελούν αντικείμενο έρευνας και για την παρούσα ερευνητική ομάδα [280].



Εικόνα 64. Σχηματική αναπαράσταση της ενίσχυσης της ΦΔΘ με τη χρήση νανοσωματιδίων αναβιβασμού (UCNPs). Τα καρκινικά κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί κάτω από το δέρμα έχουν εγχυθεί με UCNPs, επιπλέον της φωτοευαίσθητοποιού ουσίας (PS). Οι νανοδομές ακτινοβολούνται με δέσμη στο κοντινό υπέρυθρο (NIR beam) και όχι στο ορατό (VIS beam) τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (που δε θα μπορούσε να διεισδύσει αρκετά βαθιά). Τα UCNPs απορροφούν τα φωτόνια της δέσμης (π.χ. στα 808 nm) και τα επανεκπέμπουν σε χαμηλότερο μήκος κύματος (π.χ. στα 545 nm). Τα νέα φωτόνια μπορούν να διεγείρουν τα μόρια της PS (PS*) και να λάβουν χώρα φωτοδυναμικά φαινόμενα.

Η μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης σε επίπεδο κυττάρου είναι ιδιαίτερης ερευνητικής σημασίας. Ένας από τους βέλτιστους και, αναμφιβόλως σύγχρονους τρόπους υλοποίησης του ανωτέρω, είναι μέσω της χρήσης οπτικής παγίδας / λαβίδας (optical trap / tweezers). Η οπτική παγίδευση αποτελεί μία τεχνική οπτικής ακινητοποίησης και μικροχειρισμού μικρών δομών (π.χ. κυττάρων), με τη χρήση μικροσκοπίου και δυνάμεων βαθμίδας, προερχόμενες

από ισχυρά εντοπισμένη δέσμη laser. Η σημασία της είναι εξέχουσα· άλλωστε το 2018, το βραβείο Nobel στη Φυσική απονεμήθηκε κατά το ήμισυ στον A. Ashkin «για τις οπτικές λαβίδες και την εφαρμογή τους στα βιολογικά συστήματα». Μάλιστα, η πρώτη οπτική παγίδα που αναπτύχθηκε στην Ελλάδα (και μία από τις ελάχιστες, αν όχι η μοναδική ερευνητική, που υπάρχουν στη χώρα μας), βρίσκεται στο εργαστήριο της [Ομάδας Ανάπτυξης και Εφαρμογών Laser](#), στον Τομέα Φυσικής του ΕΜΠ. Για περισσότερες λεπτομέρειες ο ενδιαφερόμενος αναγνώστης παραπέμπεται στις αναφορές [281–284]. Όσον αφορά την εφαρμογή της οπτικής παγίδευσης στη φωτοδυναμική θεραπεία, υπάρχουν ελάχιστες μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία, προφανώς με *in vitro* προσανατολισμό [285]. Ο στόχος είναι η επαγωγή φωτοδυναμικής δράσης σε κύτταρα, τα οποία βρίσκονται σε διάλυμα που περιέχει μία φωτοευαισθητοποιό ουσία και ακτινοβολούνται με δέσμη laser. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως έχει παρατηρηθεί παραγωγή μονήρους οξυγόνου (χωρίς τη χρήση φωτοευαισθητοποιού ουσίας) κατά την οπτική παγίδευση κυττάρων με δέσμες κυρίως στα 1064 nm, χωρίς όμως να υπάρχει προς το παρόν, μία σαφής συσχέτιση μεταξύ των δύο διαδικασιών [286].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης ο συνδυασμός της οπτικής παγίδευσης και των νανοσωματιδίων αναβίβασιμης. Εφόσον συνυπάρχουν στο κυτταρικό διάλυμα τόσο ο φωτοευαισθητοποιός παράγοντας όσο και οι παραπάνω νανοδομές, η φωτεινή δέσμη δύναται όχι μόνο να ακινητοποιήσει το προς μελέτη κύτταρο, αλλά να «ενεργοποιήσει» και τα UCNPs. Αυτά ακολούθως θα εκπέμπουν φως σε χαμηλότερο μήκος κύματος, κατάλληλα επιλεγμένο για την εκκίνηση των φωτοδυναμικών φαινομένων. Μάλιστα, λόγω της παρατήρησης του φαινομένου υπό μικροσκόπιο, είναι δυνατή η ταυτόχρονη εκτίμηση του θεραπευτικού αποτελέσματος μέσω της ανίχνευσης των νεκρών κυττάρων, με χρήση φθορίζουσών ουσιών όπως η ηωσίνη Y (eosin Y) [285].

Εν κατακλείδι, γίνεται εύκολα αντιληπτό πως η δοσιμετρία της εξατομικευμένης φωτοδυναμικής θεραπείας, είτε αυτή εφαρμόζεται ως μονοθεραπεία είτε εντός ενός συνδυαστικού θεραπευτικού σχήματος, δύναται να προσφέρει ένα εξαιρετικά γόνιμο έδαφος για την εφαρμοσμένη έρευνα. Προς αυτή την κατεύθυνση εστιάζονται οι προσπάθειες πολλών ερευνητικών ομάδων παγκοσμίως, με την παρούσα ερευνητική ομάδα να μην αποτελεί εξαίρεση.

Page intentionally left blank

- [1] Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW, editors. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cma.2010.02.010>.
- [2] Hausman DM. What is cancer? *Perspect Biol Med* 2019;62:778–84. <https://doi.org/10.1353/pbm.2019.0046>.
- [3] Walsh JC, Lebedev A, Aten E, Madsen K, Marciano L, Kolb HC. The clinical importance of assessing tumor hypoxia: relationship of tumor hypoxia to prognosis and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2014;21:1516–54. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5378>.
- [4] Schmitz A, Fischer SC, Mattheyer C, Pampaloni F, Stelzer EHK. Multiscale image analysis reveals structural heterogeneity of the cell microenvironment in homotypic spheroids. *Sci Rep* 2017;7:43693. <https://doi.org/10.1038/srep43693>.
- [5] Dini S, Binder BJ, Fischer SC, Mattheyer C, Schmitz A, Stelzer EHK, et al. Identifying the necrotic zone boundary in tumour spheroids with pair-correlation functions. *J R Soc Interface* 2016;13:20160649. <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0649>.
- [6] Taghibakhshi A, Barisam M, Saidi MS, Kashaninejad N, Nguyen N-T. Three-dimensional modeling of avascular tumor growth in both static and dynamic culture platforms. *Micromachines* 2019;10:580. <https://doi.org/10.3390/mi10090580>.
- [7] Blackadar CB. Historical review of the causes of cancer. *World J Clin Oncol* 2016;7:54–86. <https://doi.org/10.5306/wjco.v7.i1.54>.
- [8] van Middendorp JJ, Sanchez GM, Burr ridge AL. The Edwin Smith papyrus: a clinical reappraisal of the oldest known document on spinal injuries. *Eur Spine J* 2010;19:1815–23. <https://doi.org/10.1007/s00586-010-1523-6>.
- [9] The Edwin Smith surgical papyrus: published in facsimile and hieroglyphic transliteration with translation and commentary in two volumes. *J Am Med Assoc* 1931;96:1534. <https://doi.org/10.1001/jama.1931.02720440082042>.

- [10] Weiss L. Early concepts of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:205–17. <https://doi.org/10.1023/A:1010698321682>.
- [11] Early history of cancer. *Am Cancer Soc*, <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/what-is-cancer.html> (accessed January 16, 2021).
- [12] Rothschild BM, Tanke DH, Helbling M 2nd, Martin LD. Epidemiologic study of tumors in dinosaurs. *Naturwissenschaften* 2003;90:495–500. <https://doi.org/10.1007/s00114-003-0473-9>.
- [13] Odes EJ, Randolph-Quinney PS, Steyn M, Throckmorton Z, Smilg JS, Zipfel B, et al. Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa. *S Afr J Sci* 2016;112. <https://doi.org/10.17159/sajs.2016/20150471>.
- [14] Oldest “definite” case of human cancer discovered in 4,500-year-old human remains from Siberia. *Sib Times* 2014.
- [15] Schultz M, Parzinger H, Posdnjakov D V, Chikisheva TA, Schmidt-Schultz TH. Oldest known case of metastasizing prostate carcinoma diagnosed in the skeleton of a 2,700-year-old Scythian king from Arzhan (Siberia, Russia). *Int J Cancer* 2007;121:2591–5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.23073>.
- [16] Despeignes V. Observation concernant un cas de cancer de l’estomac traité par les rayons Roentgen. *Lyon Med* 1896;82:428–30.
- [17] Guthrie F. XIII. – On some derivatives from the olefines. *Q J Chem Soc* 1860;12:109–26. <https://doi.org/10.1039/QJ8601200109>.
- [18] Berenblum I. Experimental inhibition of tumour induction by mustard gas and other compounds. *J Pathol Bacteriol* 1935;40:549–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/path.1700400312>.
- [19] Papavramidou N, Papavramidis T, Demetriou T. Ancient Greek and Greco-Roman methods in modern surgical treatment of cancer. *Ann Surg Oncol* 2010;17:665–7. <https://doi.org/10.1245/s10434-009-0886-6>.
- [20] Faguet GB. A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. *Int J Cancer* 2015;136:2022–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.29134>.
- [21] Tohme S, Simmons RL, Tsung A. Surgery for cancer: a trigger for metastases. *Cancer Res* 2017;77:1548–52. [---

{ 188 }](https://doi.org/10.1158/0008-</p>
</div>
<div data-bbox=)

5472.CAN-16-1536.

- [22] Nurgali K, Jagoe RT, Abalo R. Editorial: adverse effects of cancer chemotherapy: anything new to improve tolerance and reduce sequelae? *Front Pharmacol* 2018;9:245. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00245>.
- [23] Kareliotis G, Tremi I, Kaitatzi M, Drakaki E, Serafetinides AA, Makropoulou M, et al. Combined radiation strategies for novel and enhanced cancer treatment. *Int J Radiat Biol* 2020;1-55. <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1787544>.
- [24] Zhang Q, Li L. Photodynamic combinational therapy in cancer treatment. *J BUON* 2018;23:561-7.
- [25] Chen W, Zhang J. Using nanoparticles to enable simultaneous radiation and photodynamic therapies for cancer treatment. *J Nanosci Nanotechnol* 2006;6:1159-66. <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.327>.
- [26] Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer* 2010;102:1555-77. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605642>.
- [27] de Jong M, Maina T. Of mice and humans: are they the same? Implications in cancer translational research. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 2010;51:501-4. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.065706>.
- [28] AAPM Report No. 88: Photodynamic Therapy Dosimetry. Report of Task Group 5. 2005. <https://doi.org/0271-7344>.
- [29] van Straten D, Mashayekhi V, de Bruijn HS, Oliveira S, Robinson DJ. Oncologic photodynamic therapy: Basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers (Basel)* 2017;9. <https://doi.org/10.3390/cancers9020019>.
- [30] Kim MM, Ghogare AA, Greer A, Zhu TC. On the in vivo photochemical rate parameters for PDT reactive oxygen species modeling. *Phys Med Biol* 2017;62:R1-r48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1088/1361-6560/62/5/r1>.
- [31] Usuda J, Kato H, Okunaka T, Furukawa K, Tsutsui H, Yamada K, et al. Photodynamic therapy (PDT) for lung cancers. *J Thorac Oncol* 2006;1:489-93. [https://doi.org/10.1016/S1556-0864\(15\)31616-6](https://doi.org/10.1016/S1556-0864(15)31616-6).
- [32] Ahn TG, Lee BR, Choi EY, Kim DW, Han SJ. Photodynamic therapy for

- breast cancer in a BALB/c mouse model. *J Gynecol Oncol* 2012;23:115–9. <https://doi.org/10.3802/jgo.2012.23.2.115>.
- [33] Raab O. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Zeitung Biol* 1900;39:524–6.
- [34] Jarvi M. Evaluation of Photophysical Methods for Photodynamic Therapy Dosimetry. University of Toronto, 2012.
- [35] von Tappeiner H, Jesionek A. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. *Munch Med Wochenschr* 1903;47:2042–2044.
- [36] von Tappeiner H, Jodlbauer A. Über die wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) stoffe auf protozoen und enzyme. *Dtsch Arch Klin Med* 1904;80:427–487.
- [37] von Tappeiner H, Jodlbauer A. Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen Gesamte Untersuchungen über die photodynamische erscheinung. Leipzig FCW Vogel, 1907.
- [38] Meyer-Betz F. Untersuchungen über die biologische photodynamische werikung des hematoporphyrins und anderer derivative des blut und galenafarbstoffs. *Dtsch Arch Klin* 1913;112:476–503.
- [39] Rassmussen-Taxdal DS, Ward GE, Figge FH. Fluorescence of human lymphatic and cancer tissues following high doses of intravenous hematoporphyrin. *Cancer* 1955;8:76–81.
- [40] Lipson RL, Baldes EJ. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. *Arch Dermatol* 1960;82:508–16.
- [41] Jeffes EW. Levulan: the first approved topical photosensitizer for the treatment of actinic keratosis. *J Dermatolog Treat* 2002;13 Suppl 1:S19–23. <https://doi.org/10.1080/095466302317414663>.
- [42] Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007;21:293–302. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2006.01902.x>.
- [43] Itoh Y, Ninomiya Y, Tajima S, Ishibashi A. Photodynamic therapy for acne vulgaris with topical 5-aminolevulinic acid. *Arch Dermatol* 2000;136:1093–5.
- [44] Karrer S, Abels C, Landthaler M, Szeimies RM. Topical photodynamic

- therapy for localized scleroderma. *Acta Derm Venereol* 2000;80:26-7.
- [45] Wang XL, Wang HW, Wang HS, Xu SZ, Liao KH, Hillemanns P. Topical 5-aminolaevulinic acid-photodynamic therapy for the treatment of urethral condylomata acuminata. *Br J Dermatol* 2004;151:880-5. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06189.x>.
- [46] Wilson BC, Patterson MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol* 2008;53:R61-109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/9/r01>.
- [47] Mundt A, Roeske J, Chung T, Al. E. Physical Basis of Radiation Therapy. In: Kufe D, Pollock R, Weichselbau R, Al. E, editors. *Holland-Frei Cancer Med*. 6th ed., Hamilton (ON): BC Decker; 2003.
- [48] Sheng W, He S, Seare WJ, Almutairi A. Review of the progress toward achieving heat confinement-the holy grail of photothermal therapy. *J Biomed Opt* 2017;22:80901. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.8.080901>.
- [49] Kirkpatrick JP, Wang Z, Sampson JH, McSherry F, Herndon JE 2nd, Allen KJ, et al. Defining the optimal planning target volume in image-guided stereotactic radiosurgery of brain metastases: results of a randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015;91:100-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2014.09.004>.
- [50] Σωτηρίου Ε, Απάλλα Ζ, Δ. Σ. Φωτοδυναμική θεραπεία: Βασικές αρχές λειτουργίας και ανασκόπηση των θεραπευτικών ενδείξεων. *Ελληνική Επιθεώρηση Δερματολογίας Αφροδισιολογίας* 2007;18:7-19.
- [51] Ortmann B, Druker J, Rocha S. Cell cycle progression in response to oxygen levels. *Cell Mol Life Sci* 2014;71:3569-82. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1645-9>.
- [52] Wang Y, Shang W, Niu M, Tian J, Xu K. Hypoxia-active nanoparticles used in tumor theranostic. *Int J Nanomedicine* 2019;14:3705-22. <https://doi.org/10.2147/IJN.S196959>.
- [53] Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckland, NZ)* 2015;3:83-92. <https://doi.org/10.2147/HP.S93413>.
- [54] Stewart RD, Yu VK, Georgakilas AG, Koumenis C, Park JH, Carlson DJ. Effects of radiation quality and oxygen on clustered DNA lesions and

- cell death. *Radiat Res* 2011;176:587–602.
<https://doi.org/10.1667/rr2663.1>.
- [55] Rycaj K, Tang DG. Cancer stem cells and radioresistance. *Int J Radiat Biol* 2014;90:615–21. <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.892227>.
- [56] Schulz A, Meyer F, Dubrovskaja A, Borgmann K. Cancer stem cells and radioresistance: DNA repair and beyond. *Cancers (Basel)* 2019;11:862. <https://doi.org/10.3390/cancers11060862>.
- [57] Jacques SL. Light distributions from point, line and plane sources for photochemical reactions and fluorescence in turbid biological tissues. *Photochem Photobiol* 1998;67:23–32.
- [58] Nielsen KP, Juzeniene A, Juzenas P, Stamnes K, Stamnes JJ, Moan J. Choice of optimal wavelength for PDT: the significance of oxygen depletion. *Photochem Photobiol* 2005;81:1190–4. <https://doi.org/10.1562/2005-04-06-ra-478>.
- [59] Svanberg K, Niels B, Axelsson J, Andersson-Engels S, Svanberg S. Photodynamic therapy: superficial and interstitial illumination. *J Biomed Opt* 2010;15:1–10. <https://doi.org/10.1117/1.3466579>.
- [60] Kessel D, Luo Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J Photochem Photobiol B* 1998;42:89–95. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(97\)00127-9](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(97)00127-9).
- [61] Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *Br J Pharmacol* 2008;154:1–3. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.98>.
- [62] Kataoka H, Nishie H, Hayashi N, Tanaka M, Nomoto A, Yano S, et al. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. *Ann Transl Med* 2017;5:183. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.03.59>.
- [63] Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* 2011;15:1239–53. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x>.
- [64] Baran T. Optical dosimetry and treatment planning for photodynamic therapy. University of Rochester, 2013.
- [65] Lee S, Galbally-Kinney KL, Murphy BA, Davis SJ, Hasan T, Spring B, et al. In vivo PDT dosimetry: singlet oxygen emission and photosensitizer

- fluorescence. *Bios*, International Society for Optics and Photonics; 2010, p. 75510F-75510F – 7.
- [66] 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. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x>.
- [67] Schmidt R. Photosensitized generation of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* 2006;82:1161–77. <https://doi.org/10.1562/2006-03-03-IR-833>.
- [68] Moan J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *J Photochem Photobiol B Biol* 1990;6:343–4. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/1011-1344\(90\)85104-5](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/1011-1344(90)85104-5).
- [69] Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* 1991;53:549–53.
- [70] Niedre M, Patterson MS, Wilson BC. Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo. *Photochem Photobiol* 2002;75:382–91. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)075<0382:dnildo>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)075<0382:dnildo>2.0.co;2).
- [71] Hatz S, Lambert JD, Ogilby PR. Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. *Photochem Photobiol Sci* 2007;6:1106–16. <https://doi.org/10.1039/b707313e>.
- [72] Hatz S, Poulsen L, Ogilby PR. Time-resolved singlet oxygen phosphorescence measurements from photosensitized experiments in single cells: effects of oxygen diffusion and oxygen concentration. *Photochem Photobiol* 2008;84:1284–90. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00359.x>.
- [73] Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers (Basel)* 2011;3:2516–39. <https://doi.org/10.3390/cancers3022516>.
- [74] Soriano J, Mora-Espí I, Alea-Reyes ME, Pérez-García L, Barrios L, Ibáñez E, et al. Cell death mechanisms in tumoral and non-tumoral human cell lines triggered by photodynamic treatments: apoptosis, necrosis and parthanatos. *Sci Rep* 2017;7:41340. <https://doi.org/10.1038/srep41340>.

- [75] Bastian JD, Egli RJ, Ganz R, Hofstetter W, Leunig M. Differential response of porcine osteoblasts and chondrocytes in cell or tissue culture after 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Osteoarthr Cartil* 2009;17:539–46. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.08.005>.
- [76] Bacellar IOL, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. *Int J Mol Sci* 2015;16:20523–59. <https://doi.org/10.3390/ijms160920523>.
- [77] Soriano J, García-Díaz M, Mora M, Sagristá ML, Nonell S, Villanueva A, et al. Liposomal temocene (m-THPPo) photodynamic treatment induces cell death by mitochondria-independent apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830:4611–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.021>.
- [78] Yoon J-H, Yoon H-E, Kim O, Kim SK, Ahn S-G, Kang KW. The enhanced anti-cancer effect of hexenyl ester of 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy in adriamycin-resistant compared to non-resistant breast cancer cells. *Lasers Surg Med* 2012;44:76–86. <https://doi.org/10.1002/lsm.21154>.
- [79] Amo T, Kawanishi N, Uchida M, Fujita H, Oyanagi E, Utsumi T, et al. Mechanism of cell death by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic action and its enhancement by ferrochelatase inhibitors in human histiocytic lymphoma cell line U937. *Cell Biochem Funct* 2009;27:503–15. <https://doi.org/10.1002/cbf.1603>.
- [80] Kaczanowski S. Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Phys Biol* 2016;13:31001. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/13/3/031001>.
- [81] Ke B, Tian M, Li J, Liu B, He G. Targeting programmed cell death using small-molecule compounds to improve potential cancer therapy. *Med Res Rev* 2016;36:983–1035. <https://doi.org/10.1002/med.21398>.
- [82] Kaminsky VO, Zhivotovsky B. Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. *Antioxid Redox Signal* 2014;21:86–102. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5746>.
- [83] Karsch-Bluman A, Feiglin A, Arbib E, Stern T, Shoval H, Schwob O, et al. Tissue necrosis and its role in cancer progression. *Oncogene* 2019;38:1920–35. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0555-y>.
- [84] Guicciardi ME, Malhi H, Mott JL, Gores GJ. Apoptosis and necrosis in

- the liver. *Compr Physiol* 2013;3:977–1010. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120020>.
- [85] Martin SJ, Henry CM. Distinguishing between apoptosis, necrosis, necroptosis and other cell death modalities. *Methods* 2013;61:87–9. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.06.001>.
- [86] Pettigrew CA, Cotter TG. Deregulation of cell death (apoptosis): implications for tumor development. *Discov Med* 2009;8:61–3.
- [87] Krysko D V, Vanden Berghe T, Parthoens E, D’Herde K, Vandenabeele P. Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance. *Methods Enzymol* 2008;442:307–41. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)01416-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)01416-X).
- [88] Soriano J, Villanueva A, Stockert JC, Cañete M. Regulated necrosis in HeLa cells induced by ZnPc photodynamic treatment: a new nuclear morphology. *Int J Mol Sci* 2014;15:22772–85. <https://doi.org/10.3390/ijms151222772>.
- [89] Coupienne I, Fettweis G, Rubio N, Agostinis P, Piette J. 5-ALA-PDT induces RIP3-dependent necrosis in glioblastoma. *Photochem Photobiol Sci* 2011;10:1868–78. <https://doi.org/10.1039/c1pp05213f>.
- [90] Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1627–37. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.003>.
- [91] Rice SR, Li YR, Busch TM, Kim MM, McNulty S, Dimofte A, et al. A novel prospective study assessing the combination of photodynamic therapy and proton radiation therapy: safety and outcomes when treating malignant pleural mesothelioma. *Photochem Photobiol* 2019;95:411–8. <https://doi.org/10.1111/php.13065>.
- [92] Luksiene Z, Kalvelyte A, Supino R. On the combination of photodynamic therapy with ionizing radiation. *J Photochem Photobiol B* 1999;52:35–42.
- [93] Huang X, El-Sayed MA. Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT). *Alexandria J Med* 2011;47:1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajme.2011.01.001>.
- [94] Jain S, Hirst DG, O’Sullivan JM. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *Br J Radiol* 2012;85:101–13.

- <https://doi.org/10.1259/bjr/59448833>.
- [95] Shahidian A, Ghassemi M, Mohammadi J, Hashemi M. *Bio-Engineering Approaches to Cancer Diagnosis and Treatment*. Elsevier Science; 2020.
- [96] Dimitriou NM, Pavlopoulou A, Tremi I, Kouloulis V. Prediction of gold nanoparticle and microwave-induced hyperthermia effects on tumor control via a simulation approach. *Nanomater* 2019;9:E167. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/nano9020167>.
- [97] Cabral RM, Baptista P V. The chemistry and biology of gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: promises and challenges. *Nano Life* 2013;03:1330001. <https://doi.org/https://doi.org/10.1142/s179398441330001x>.
- [98] Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, Sershen SR, Rivera B, Price RE, et al. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:13549–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.2232479100>.
- [99] Ali MRK, Wu Y, El-Sayed MA. Gold-nanoparticle-assisted plasmonic photothermal therapy advances toward clinical application. *J Phys Chem C* 2019;123:15375–93. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b01961>.
- [100] Alkilany AM, Murphy CJ. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanoparticle Res an Interdiscip Forum Nanoscale Sci Technol* 2010;12:2313–33. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9911-8>.
- [101] Dimitriou NM, Tsekenis G, Balanikas EC, Pavlopoulou A, Mitsiogianni M, Mantso T, et al. Gold nanoparticles, radiations and the immune system: Current insights into the physical mechanisms and the biological interactions of this new alliance towards cancer therapy. *Pharmacol Ther* 2017;178:1–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.03.006>.
- [102] Zolnik BS, González-Fernández A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology* 2010;151:458–65. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1082>.
- [103] Liu Y, Hardie J, Zhang X, Rotello VM. Effects of engineered nanoparticles on the innate immune system. *Semin Immunol* 2017;34:25–32. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.09.011>.

- [104] Terentyuk GS, Maslyakova GN, Suleymanova L V, Khlebtsov NG, Khlebtsov BN, Akchurin GG, et al. Laser-induced tissue hyperthermia mediated by gold nanoparticles: toward cancer phototherapy. *J Biomed Opt* 2009;14:21016. <https://doi.org/10.1117/1.3122371>.
- [105] Kouloulas V, Triantopoulou S, Uzunoglou N, Pistevou-Gompaki K, Barich A, Zygogianni A, et al. Hyperthermia is now included in the NCCN clinical practice guidelines for breast cancer recurrences: an analysis of existing data. *Breast Care* 2015;10:109-16. <https://doi.org/10.1159/000376594>.
- [106] Cheong SK, Krishnan S, Cho SH. Modeling of plasmonic heating from individual gold nanoshells for near-infrared laser-induced thermal therapy. *Med Phys* 2009;36:4664-71. <https://doi.org/10.1118/1.3215536>.
- [107] Baronzio G, Parmar G, Ballerini M, Szasz A, Baronzio M, Cassutti V. A brief overview of hyperthermia in cancer treatment. *J Integr Oncol* 2014;3:115. <https://doi.org/10.4172/2329-6771.1000115>.
- [108] Xu W, Qian J, Hou G, Wang Y, Wang J, Sun T, et al. A dual-targeted hyaluronic acid-gold nanorod platform with triple-stimuli responsiveness for photodynamic/photothermal therapy of breast cancer. *Acta Biomater* 2019;83:400-13. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.026>.
- [109] Ivarsson K, Myllymäki L, Jansner K, Stenram U, Tranberg K-G. Resistance to tumour challenge after tumour laser thermotherapy is associated with a cellular immune response. *Br J Cancer* 2005;93:435-40. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602718>.
- [110] Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000;12:1539-46. <https://doi.org/10.1093/intimm/12.11.1539>.
- [111] Salomatina E, Jiang B, Novak J, Yaroslavsky AN. Optical properties of normal and cancerous human skin in the visible and near-infrared spectral range. *J Biomed Opt* 2006;11:64026. <https://doi.org/10.1117/1.2398928>.
- [112] Carrillo-Cazares A, Jiménez-Mancilla NP, Luna-Gutiérrez MA, Isaac-Olivé K, Camacho-López MA. Study of the optical properties of

- functionalized gold nanoparticles in different tissues and their correlation with the temperature increase. *J Nanomater* 2017;2017:3628970. <https://doi.org/10.1155/2017/3628970>.
- [113] Jain PK, Lee KS, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *J Phys Chem B* 2006;110:7238–48. <https://doi.org/10.1021/jp057170o>.
- [114] Zheng YB, Huang TJ, Desai AY, Wang SJ, Tan LK, Gao H, et al. Thermal behavior of localized surface plasmon resonance of Au/TiO₂ core/shell nanoparticle arrays. *Appl Phys Lett* 2007;90:183117. <https://doi.org/10.1063/1.2736283>.
- [115] Jauffred L, Samadi A, Klingberg H, Bendix PM, Oddershede LB. Plasmonic heating of nanostructures. *Chem Rev* 2019;119:8087–130. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00738>.
- [116] Ali MRK, Ibrahim IM, Ali HR, Selim SA, El-Sayed MA. Treatment of natural mammary gland tumors in canines and felines using gold nanorods-assisted plasmonic photothermal therapy to induce tumor apoptosis. *Int J Nanomedicine* 2016;11:4849–63. <https://doi.org/10.2147/IJN.S109470>.
- [117] Karampelas I, Sloan AE. Laser-induced interstitial thermotherapy of gliomas. *Prog Neurol Surg* 2018;32:14–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1159/000469676>.
- [118] Zhang Y, Zhan X, Xiong J, Peng S, Huang W, Joshi R, et al. Temperature-dependent cell death patterns induced by functionalized gold nanoparticle photothermal therapy in melanoma cells. *Sci Rep* 2018;8:8720. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26978-1>.
- [119] Melamed JR, Edelstein RS, Day ES. Elucidating the fundamental mechanisms of cell death triggered by photothermal therapy. *ACS Nano* 2015;9:6–11. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b00021>.
- [120] Yang W, Liang H, Ma S, Wang D, Huang J. Gold nanoparticle based photothermal therapy: Development and application for effective cancer treatment. *Sustain Mater Technol* 2019;22:e00109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.susmat.2019.e00109>.
- [121] O'Neill DP, Peng T, Stiegler P, Mayrhauser U, Koestenbauer S, Tscheliessnigg K, et al. A three-state mathematical model of

- hyperthermic cell death. *Ann Biomed Eng* 2011;39:570–9.
<https://doi.org/10.1007/s10439-010-0177-1>.
- [122] COMSOL Multiphysics. Thermal Damage n.d.
<https://doc.comsol.com/5.5/doc/com.comsol.help.heat/heat Ug ht features.09.031.html> (accessed February 2, 2021).
- [123] Wissler EH. Pennes' 1948 paper revisited. *J Appl Physiol* 1998;85:35–41.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1998.85.1.35>.
- [124] Suriyanto, Ng EYK, Kumar SD. Physical mechanism and modeling of heat generation and transfer in magnetic fluid hyperthermia through Néelian and Brownian relaxation: a review. *Biomed Eng Online* 2017;16:36. <https://doi.org/10.1186/s12938-017-0327-x>.
- [125] Dickerson EB, Dreaden EC, Huang X, El-Sayed IH, Chu H, Pushpanketh S, et al. Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice. *Cancer Lett* 2008;269:57–66.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.04.026>.
- [126] O'Neal DP, Hirsch LR, Halas NJ, Payne JD, West JL. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Lett* 2004;209:171–6.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.02.004>.
- [127] Camerin M, Magaraggia M, Soncin M, Jori G, Moreno M, Chambrier I, et al. The in vivo efficacy of phthalocyanine-nanoparticle conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma. *Eur J Cancer* 2010;46:1910–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.02.037>.
- [128] Jang B, Park J-Y, Tung C-H, Kim I-H, Choi Y. Gold nanorod-photosensitizer complex for near-infrared fluorescence imaging and photodynamic/photothermal therapy in vivo. *ACS Nano* 2011;5:1086–94. <https://doi.org/10.1021/nn102722z>.
- [129] Wu C, Li D, Wang L, Guan X, Tian Y, Yang H, et al. Single wavelength light-mediated, synergistic bimodal cancer photoablation and amplified photothermal performance by graphene/gold nanostar/photosensitizer theranostics. *Acta Biomater* 2017;53:631–42.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.078>.
- [130] Wang S, Huang P, Nie L, Xing R, Liu D, Wang Z, et al. Single continuous wave laser induced photodynamic/plasmonic

- photothermal therapy using photosensitizer-functionalized gold nanostars. *Adv Mater* 2013;25:3055–61. <https://doi.org/10.1002/adma.201204623>.
- [131] Lin J, Wang S, Huang P, Wang Z, Chen S, Niu G, et al. Photosensitizer-loaded gold vesicles with strong plasmonic coupling effect for imaging-guided photothermal/photodynamic therapy. *ACS Nano* 2013;7:5320–9. <https://doi.org/10.1021/nn4011686>.
- [132] Yan J, Sun H, Li J, Qi W, Wang H. A theranostic plaster combining photothermal therapy and photodynamic therapy based on chlorin e6/gold nanorods (Ce6/Au nrs) composite. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2018;537:460–6. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.10.051>.
- [133] Sun Q, You Q, Pang X, Tan X, Wang J, Liu L, et al. A photoresponsive and rod-shape nanocarrier: Single wavelength of light triggered photothermal and photodynamic therapy based on AuNRs-capped & Ce6-doped mesoporous silica nanorods. *Biomaterials* 2017;122:188–200. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.021>.
- [134] Ash C, Dubec M, Donne K, Bashford T. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. *Lasers Med Sci* 2017;32:1909–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10103-017-2317-4>.
- [135] Kareliotis G, Lioffi S, Makropoulou M. Assessment of singlet oxygen dosimetry concepts in photodynamic therapy through computational modeling. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2018;21. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.12.016>.
- [136] Grapengiesser S, Ericson M, Gudmundsson F, Larko O, Rosen A, Wennberg AM. Pain caused by photodynamic therapy of skin cancer. *Clin Exp Dermatol* 2002;27:493–7.
- [137] AAPM Report No. 57: Recommended Nomenclature for Physical Quantities in Medical Applications of Light. Report of Task Group 2. 1996.
- [138] Penjweini R, Kim MM, Finlay JC, Zhu TC. Investigating the impact of oxygen concentration and blood flow variation on photodynamic therapy. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* 2016;9694. <https://doi.org/10.1117/12.2211120>.

- [139] Jarvi MT, Patterson MS, Wilson BC. Insights into photodynamic therapy dosimetry: simultaneous singlet oxygen luminescence and photosensitizer photobleaching measurements. *Biophys J* 2012;102:661–71. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.12.043>.
- [140] Niedre MJ, Yu CS, Patterson MS, Wilson BC. Singlet oxygen luminescence as an in vivo photodynamic therapy dose metric: validation in normal mouse skin with topical amino-levulinic acid. *Br J Cancer* 2005;92:298–304. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602331>.
- [141] Niedre MJ, Secord AJ, Patterson MS, Wilson BC. In vitro tests of the validity of singlet oxygen luminescence measurements as a dose metric in photodynamic therapy. *Cancer Res* 2003;63:7986–94.
- [142] Wang KK, Finlay JC, Busch TM, Hahn SM, Zhu TC. Explicit dosimetry for photodynamic therapy: macroscopic singlet oxygen modeling. *J Biophotonics* 2010;3:304–18. <https://doi.org/10.1002/jbio.200900101>.
- [143] Pogue BW, Elliott JT, Kanick SC, Davis SC, Samkoe KS, Maytin E V, et al. Revisiting photodynamic therapy dosimetry: reductionist & surrogate approaches to facilitate clinical success. *Phys Med Biol* 2016;61:R57-89. <https://doi.org/https://doi.org/10.1088/0031-9155/61/7/r57>.
- [144] Patterson MS, Wilson BC, Graff R. In vivo tests of the concept of photodynamic threshold dose in normal rat liver photosensitized by aluminum chlorosulphonated phthalocyanine. *Photochem Photobiol* 1990;51:343–9. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1990.tb01720.x>.
- [145] Zhu TC, Finlay JC, Hahn SM. Determination of the distribution of light, optical properties, drug concentration, and tissue oxygenation in-vivo in human prostate during motexafin lutetium-mediated photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2005;79:231–41. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.09.013>.
- [146] Weston MA, Patterson MS. Monitoring oxygen concentration during photodynamic therapy using prompt photosensitizer fluorescence. *Phys Med Biol* 2013;58:7039–59. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/58/20/7039>.
- [147] Vaupel PW, Kelleher DK. Pathophysiological and vascular characteristics of tumours and their importance for hyperthermia: heterogeneity is the key issue. *Int J Hyperth* 2010;26:211–23. <https://doi.org/10.3109/02656731003596259>.

- [148] Lebedev AY, Cheprakov A V, Sakadzic S, Boas DA, Wilson DF, Vinogradov SA. Dendritic phosphorescent probes for oxygen imaging in biological systems. *ACS Appl Mater Interfaces* 2009;1:1292-304. <https://doi.org/10.1021/am9001698>.
- [149] Wilson DF, Harrison DK, Vinogradov SA. Oxygen, pH, and mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Appl Physiol* 2012;113:1838-45. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01160.2012>.
- [150] Liu B, Farrell TJ, Patterson MS. A dynamic model for ALA-PDT of skin: simulation of temporal and spatial distributions of ground-state oxygen, photosensitizer and singlet oxygen. *Phys Med Biol* 2010;55:5913-32. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/55/19/019>.
- [151] Zhu TC, Liu B, Kim MM, McMillan D, Liang X, Finlay JC, et al. Comparison of singlet oxygen threshold dose for PDT. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* 2014;8931. <https://doi.org/10.1117/12.2039719>.
- [152] Zhu TC, Kim MM, Liang X, Finlay JC, Busch TM. In-vivo singlet oxygen threshold doses for PDT. *Photonics Lasers Med* 2015;4:59-71. <https://doi.org/10.1515/plm-2014-0037>.
- [153] Varga S, Patachia S, Ion R. Numerical simulation of singlet oxygen generation by a porphyrin-based photosensitizer. *Proc. 1st WSEAS Int. Conf. Mater. Sci., Stevens Point, Wisconsin, USA: World Scientific and Engineering Academy and Society (WSEAS); 2008, p. 57-62.*
- [154] Liang X, Wang KK, Zhu TC. Parameter optimization for FEM based modeling of singlet oxygen during PDT using COMSOL. *COMSOL Conf. 2010, Boston: 2010.*
- [155] Makropoulou M, Kaselouris E, Drakaki E, Serafetinides AA, Sianoudis JA. A diffusion approximation model of light transport in multilayered skin tissue. *Eur. Conf. Biomed. Opt., vol. 6628, SPIE; 2007, p. 10.*
- [156] De Jode ML. Monte carlo simulations of light distributions in an embedded tumour model: studies of selectivity in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2000;15:49-56. <https://doi.org/10.1007/s101030050047>.
- [157] Maltzman JS, Koretzky GA. Azathioprine: old drug, new actions. *J Clin Invest* 2003;111:1122-4. <https://doi.org/10.1172/JCI18384>.
- [158] Kato H. History of photodynamic therapy--past, present and future.

Gan To Kagaku Ryoho 1996;23:8-15.

- [159] Kareliotis G, Papachristou M, Priftakis D, Datselis I, Makropoulou M. Computational study of necrotic areas in rat liver tissue treated with photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2019;192:40-8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.01.007>.
- [160] Makropoulou M, Kareliotis G, Spyratou E, Drakaki E, Serafetinides AA, Efstathopoulos E. Non-ionizing, laser radiation in Theranostics: The need for dosimetry and the role of Medical Physics. *Phys Medica* 2019;63:7-18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2019.05.016>.
- [161] Kareliotis G., Priftakis D., Papachristou M., Datselis I., Makropoulou M. Computational study of necrotic radius in photodynamic therapy and monitoring with PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2018;45:S624-S624. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4148-3>.
- [162] Cassidy J, Betz V, Lilge L. Treatment plan evaluation for interstitial photodynamic therapy in a mouse model by Monte Carlo simulation with FullMonte . *Front Phys* 2015;3:6.
- [163] Star WM, Aalders MC, Sac A, Sterenborg HJ. Quantitative model calculation of the time-dependent protoporphyrin IX concentration in normal human epidermis after delivery of ALA by passive topical application or iontophoresis. *Photochem Photobiol* 2002;75:424-32.
- [164] Penjweini R, Zhu TC. PDT study using a model incorporating initial oxygen concentration and blood flow increase. 2015 COMSOL Conf., vol. 1, Boston: 2015
- [165] Yu G, Durduran T, Zhou C, Wang HW, Putt ME, Saunders HM, et al. Noninvasive monitoring of murine tumor blood flow during and after photodynamic therapy provides early assessment of therapeutic efficacy. *Clin Cancer Res* 2005;11:3543-52. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-04-2582>.
- [166] Hu XH, Feng Y, Lu JQ, Allison RR, Cuenca RE, Downie GH, et al. Modeling of a type II photofrin-mediated photodynamic therapy process in a heterogeneous tissue phantom. *Photochem Photobiol* 2005;81:1460-8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1562/2005-05-04-ra-513>.
- [167] Salas-García I, Fanjul-Vélez F, Arce-Diego JL. Photosensitizer

- absorption coefficient modeling and necrosis prediction during photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B Biol* 2012;114:79–86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.05.013>.
- [168] Moen I, Stuhr LEB. Hyperbaric oxygen therapy and cancer – a review. *Target Oncol* 2012;7:233–42. <https://doi.org/10.1007/s11523-012-0233-x>.
- [169] Siegman AE. *Lasers*. Mill Valley, CA: University Science Books; 1986.
- [170] ISO 11146-1:2005 *Lasers and laser-related equipment – Test methods for laser beam widths, divergence angles and beam propagation ratios – Part 1: Stigmatic and simple astigmatic beams*. Geneva, Switzerland: 2005.
- [171] Gentec-EO. The beginner’s guide on spot size of laser beam. <https://www.gentec-eo.com/blog/spot-size-of-laser-beam> (accessed January 21, 2021).
- [172] Foy JM, Schnieden H. Estimation of total body water (virtual tritium space) in the rat, cat, rabbit, guinea-pig and man, and of the biological half-life of tritium in man. *J Physiol* 1960;154:169–76.
- [173] Pattani VP, Tunnell JW. Nanoparticle-mediated photothermal therapy: a comparative study of heating for different particle types. *Lasers Surg Med* 2012;44:675–84. <https://doi.org/10.1002/lsm.22072>.
- [174] Wagnières G, Cheng S, Zellweger M, Utke N, Braichotte D, Ballini JP, et al. An optical phantom with tissue-like properties in the visible for use in PDT and fluorescence spectroscopy. *Phys Med Biol* 1997;42:1415.
- [175] Correard F, Maximova K, Estève M-A, Villard C, Roy M, Al-Kattan A, et al. Gold nanoparticles prepared by laser ablation in aqueous biocompatible solutions: assessment of safety and biological identity for nanomedicine applications. *Int J Nanomedicine* 2014;9:5415–30. <https://doi.org/10.2147/IJN.S65817>.
- [176] González-Rubio G, Guerrero-Martínez A, Liz-Marzán LM. Reshaping, fragmentation, and assembly of gold nanoparticles assisted by pulse lasers. *Acc Chem Res* 2016;49:678–86. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00041>.
- [177] Shurrab K, Kochaji N, Bachir W. Development of temperature distribution and light propagation model in biological tissue irradiated

- by 980 nm laser diode and using COMSOL simulation. *J Lasers Med Sci* 2017;8:118–22. <https://doi.org/10.15171/jlms.2017.21>.
- [178] Nguyen TTA, Shupp JW, Moffatt LT, Ramella-Roman JC. Construction of a digital and physical mouse model aimed at the study of electrical shock. *Proc.SPIE*, vol. 8945, 2014. <https://doi.org/10.1117/12.2039661>.
- [179] Ma J, Yang X, Sun Y, Yang J. Thermal damage in three-dimensional vivo bio-tissues induced by moving heat sources in laser therapy. *Sci Rep* 2019;9:10987. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47435-7>.
- [180] Marti D, Aasbjerg RN, Andersen PE, Hansen AK. MCmatlab: an open-source, user-friendly, MATLAB-integrated three-dimensional Monte Carlo light transport solver with heat diffusion and tissue damage. *J Biomed Opt* 2018;23:1–6.
- [181] Jaime RAO, Basto RLQ, Lamien B, Orlande HRB, Eibner S, Fudym O. Fabrication methods of phantoms simulating optical and thermal properties. *Procedia Eng* 2013;59:30–6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.proeng.2013.05.090>.
- [182] Zhang M, Che Z, Chen J, Zhao H, Yang L, Zhong Z, et al. Experimental determination of thermal conductivity of water–agar gel at different concentrations and temperatures. *J Chem Eng Data* 2011;56:859–64. <https://doi.org/10.1021/je100570h>.
- [183] Firbank M, Oda M, Delpy DT. An improved design for a stable and reproducible phantom material for use in near-infrared spectroscopy and imaging. *Phys Med Biol* 1995;40:955–61. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/40/5/016>.
- [184] Struzziero G, Remy B, Skordos AA. Measurement of thermal conductivity of epoxy resins during cure. *J Appl Polym Sci* 2019;136:47015. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/app.47015>.
- [185] Shimamura A, Hotta Y, Hyuga H, Hotta M, Hirao K. Improving the thermal conductivity of epoxy composites using a combustion-synthesized aggregated β -Si₃N₄ filler with randomly oriented grains. *Sci Rep* 2020;10:14926. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71745-w>.
- [186] Warriar P, Teja A. Effect of particle size on the thermal conductivity of nanofluids containing metallic nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 2011;6:247. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-247>.

- [187] Javidi M, Heydari M, Attar MM, Haghpanahi M, Karimi A, Navidbakhsh M, et al. Cylindrical agar gel with fluid flow subjected to an alternating magnetic field during hyperthermia. *Int J Hypertherm* 2015;31:33–9. <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.988661>.
- [188] Landau LD, Lifshitz EM. *Electrodynamics of Continuous Media*. Oxford: Pergamon Press; 1960.
- [189] Cheong S-K, Krishnan S, Cho SH. Modeling of plasmonic heating from individual gold nanoshells for near-infrared laser-induced thermal therapy. *Med Phys* 2009;36:4664–71. <https://doi.org/10.1118/1.3215536>.
- [190] Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002;420:520–62. <https://doi.org/10.1038/nature01262>.
- [191] Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol* 2001;Chapter 20:Unit 20.2. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39>.
- [192] DuPré SA, Redelman D, Hunter Jr KW. The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *Int J Exp Pathol* 2007;88:351–60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2007.00539.x>.
- [193] DuPre' SA, Hunter KWJ. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Exp Mol Pathol* 2007;82:12–24. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2006.06.007>.
- [194] Baklaushev VP, Grinenko NF, Yusubalieva GM, Abakumov MA, Gubskii IL, Cherepanov SA, et al. Modeling and integral X-ray, optical, and MRI visualization of multiorgan metastases of orthotopic 4T1 breast carcinoma in BALB/c mice. *Bull Exp Biol Med* 2015;158:581–8. <https://doi.org/10.1007/s10517-015-2810-3>.
- [195] Lee HS, Ha AW, Kim WK. Effect of resveratrol on the metastasis of 4T1 mouse breast cancer cells in vitro and in vivo. *Nutr Res Pract* 2012;6:294–300. <https://doi.org/10.4162/nrp.2012.6.4.294>.
- [196] Choi SH, Kim KH, Song K-H. Efficacy of ablative fractional laser-assisted photodynamic therapy for the treatment of actinic cheilitis: 12-month follow-up results of a prospective, randomized, comparative

- trial. *Br J Dermatol* 2015;173:184–91. <https://doi.org/10.1111/bjd.13542>.
- [197] Metvix 160 mg/g cream. <https://www.medicines.org.uk/emc/product/6777/smpc> (accessed March 25, 2020).
- [198] Wachowska M, Muchowicz A, Firczuk M, Gabrysiak M, Winiarska M, Wańczyk M, et al. Aminolevulinic acid (ALA) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer. *Molecules* 2011;16:4140–64. <https://doi.org/10.3390/molecules16054140>.
- [199] Sutoris K, Vetvicka D, Horak L, Benes J, Nekvasil M, Jezek P, et al. Evaluation of topical photodynamic therapy of mammary carcinoma with an experimental gel containing liposomal hydroxyl-aluminium phthalocyanine. *Anticancer Res* 2012;32:3769–74.
- [200] Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin* 2011;61:250–81. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>.
- [201] Johansson A. *Spectroscopic Techniques for Photodynamic Therapy Dosimetry*. Lund University, 2007.
- [202] METVIX - Product Monograph 2017. <https://www.galderma.com/sites/g/files/jcdfhc196/files/inline-files/Metvix-PM-E.pdf> (accessed March 25, 2020).
- [203] Calabro K, Curtis A, Galarneau J-R, Krucker T, Bigio IJ. Gender variations in the optical properties of skin in murine animal models. *J Biomed Opt* 2011;16:11008. <https://doi.org/10.1117/1.3525565>.
- [204] Tabassum S, Pera V, Greening G, Muldoon TJ, Roblyer D. Two-layer inverse model for improved longitudinal preclinical tumor imaging in the spatial frequency domain. *J Biomed Opt* 2018;23:1–12.
- [205] Sunar U, Rohrbach DJ, Morgan J, Zeitouni N, Henderson BW. Quantification of PpIX concentration in basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma models using spatial frequency domain imaging. *Biomed Opt Express* 2013;4:531–7. <https://doi.org/10.1364/BOE.4.000531>.
- [206] Vishwanath K, Yuan H, Barry WT, Dewhirst MW, Ramanujam N. Using optical spectroscopy to longitudinally monitor physiological changes within solid tumors. *Neoplasia* 2009;11:889–900. <https://doi.org/10.1593/neo.09580>.

- [207] Bashkatov AN, Berezin K V, Dvoretzkiy KN, Chernavina ML, Genina EA, Genin VD, et al. Measurement of tissue optical properties in the context of tissue optical clearing. *J Biomed Opt* 2018;23:1–31.
- [208] Jacques SL. Optical properties of biological tissues: a review. *Phys Med Biol* 2013;58:R37-61. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/58/11/R37>.
- [209] Ramirez G, Proctor AR, Jung KW, Wu TT, Han S, Adams RR, et al. Chemotherapeutic drug-specific alteration of microvascular blood flow in murine breast cancer as measured by diffuse correlation spectroscopy. *Biomed Opt Express* 2016;7:3610–30. <https://doi.org/10.1364/BOE.7.003610>.
- [210] Rajaram N, Reesor AF, Mulvey CS, Frees AE, Ramanujam N. Non-invasive, simultaneous quantification of vascular oxygenation and glucose uptake in tissue. *PLoS One* 2015;10:e0117132–e0117132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117132>.
- [211] Sabino CP, Deana AM, Yoshimura TM, da Silva DFT, França CM, Hamblin MR, et al. The optical properties of mouse skin in the visible and near infrared spectral regions. *J Photochem Photobiol B* 2016;160:72–8. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.047>.
- [212] Honda N, Ishii K, Terada T, Nanjo T, Awazu K. Determination of the tumor tissue optical properties during and after photodynamic therapy using inverse Monte Carlo method and double integrating sphere between 350 and 1000 nm. *J Biomed Opt* 2011;16:58003. <https://doi.org/10.1117/1.3581111>.
- [213] Valentine RM, Brown CTA, Moseley H, Ibbotson S, Wood K. Monte Carlo modeling of in vivo protoporphyrin IX fluorescence and singlet oxygen production during photodynamic therapy for patients presenting with superficial basal cell carcinomas. *J Biomed Opt* 2011;16:48002. <https://doi.org/10.1117/1.3562540>.
- [214] Campbell CL, Brown CTA, Wood K, Moseley H. Modelling topical photodynamic therapy treatment including the continuous production of Protoporphyrin IX. *Phys Med Biol* 2016;61:7507–21. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/61/21/7507>.
- [215] Honda N, Kariyama Y, Hazama H, Ishii T, Kitajima Y, Inoue K, et al. Optical properties of tumor tissues grown on the chorioallantoic membrane of chicken eggs: tumor model to assay of tumor response to photodynamic therapy. *J Biomed Opt* 2015;20:1–8.

<https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.12.125001>.

- [216] Beaulieu E, Laurence A, Birlea M, Sheehy G, Angulo-Rodriguez L, Latour M, et al. Wide-field optical spectroscopy system integrating reflectance and spatial frequency domain imaging to measure attenuation-corrected intrinsic tissue fluorescence in radical prostatectomy specimens. *Biomed Opt Express* 2020;11:2052–72. <https://doi.org/10.1364/BOE.388482>.
- [217] Vignion-Dewalle A-S, Betrouni N, Tylcz J-B, Vermandel M, Mortier L, Mordon S. Comparison of three light doses in the photodynamic treatment of actinic keratosis using mathematical modeling. *J Biomed Opt* 2015;20:58001. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.5.058001>.
- [218] Dupont C, Mordon S, Deleporte P, Reyns N, Vermandel M. A novel device for intraoperative photodynamic therapy dedicated to glioblastoma treatment. *Future Oncol* 2017;13:2441–54. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0261>.
- [219] Housel J, Zeitouni N. Photodynamic Therapy for Nonmelanoma Skin Cancer. In: Weber R, Moore B, editors. *Cutan. Malig. Head Neck A Multidiscip. Approach*. 1st ed., Plural Publishing, Inc.; 2011, p. 207–207.
- [220] Wiegell S. Update on photodynamic treatment for actinic keratosis. In: Soyer P, Prow T, Jemec G, editors. *Actinic Keratosis*, vol. 46, Basel: Karger; 2015, p. 122–8.
- [221] Kareliotis G, Xanthopoulos S, Drakaki E, Papachristou M, Datsaris I, Bouziotis P, et al. Photodynamic therapy of 4T1 tumors in NOD-SCID mice 2020:1–14.
- [222] Sandell JL, Zhu TC. A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT. *J Biophotonics* 2011;4:773–87. <https://doi.org/10.1002/jbio.201100062>.
- [223] Mesradi M, Genoux A, Cuplov V, Abi-Haidar D, Jan S, Buvat I, et al. Experimental and analytical comparative study of optical coefficient of fresh and frozen rat tissues. *J Biomed Opt* 2013;18:1–9. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.11.117010>.
- [224] Tong ZS, Miao PT, Liu TT, Jia YS, Liu XD. Enhanced antitumor effects of BPD-MA-mediated photodynamic therapy combined with adriamycin on breast cancer in mice. *Acta Pharmacol Sin* 2012;33:1319–24. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.45>.

- [225] Jie S, Guo X, Ouyang Z. Tumor ablation using novel photothermal Na_xWO₃ nanoparticles against breast cancer osteolytic bone metastasis. *Int J Nanomedicine* 2019;14:7353–62. <https://doi.org/10.2147/IJN.S217974>.
- [226] Koo E, Austin E, Mamalis A, Jagdeo J. Thermal ultra short photodynamic therapy: heating fibroblasts during sub-30-minute incubation of 5-aminolevulinic acid increases photodynamic therapy-induced cell death. *Dermatol Surg* 2018;44:528–33. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000001341>.
- [227] Austin E, Koo E, Jagdeo J. Thermal photodynamic therapy increases apoptosis and reactive oxygen species generation in cutaneous and mucosal squamous cell carcinoma cells. *Sci Rep* 2018;8:12599. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30908-6>.
- [228] Yang Z, Sun Z, Ren Y, Chen X, Zhang W, Zhu X, et al. Advances in nanomaterials for use in photothermal and photodynamic therapeutics (Review). *Mol Med Rep* 2019;20:5–15. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10218>.
- [229] Bhana S, O'Connor R, Johnson J, Ziebarth JD, Henderson L, Huang X. Photosensitizer-loaded gold nanorods for near infrared photodynamic and photothermal cancer therapy. *J Colloid Interface Sci* 2016;469:8–16. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.02.012>.
- [230] Song C, Appleyard V, Murray K, Frank T, Sibbett W, Cuschieri A, et al. Thermographic assessment of tumor growth in mouse xenografts. *Int J Cancer* 2007;121:1055–8. <https://doi.org/10.1002/ijc.22808>.
- [231] Tepper M, Shoval A, Hoffer O, Confino H, Schmidt M, Kelson I, et al. Thermographic investigation of tumor size, and its correlation to tumor relative temperature, in mice with transplantable solid breast carcinoma. *J Biomed Opt* 2013;18:1–11.
- [232] Kallinowski F, Schlenger KH, Runkel S, Kloes M, Stohrer M, Okunieff P, et al. Blood flow, metabolism, cellular microenvironment, and growth rate of human tumor xenografts. *Cancer Res* 1989;49:3759–64.
- [233] Zhu TC, Liu B, Penjweini R. Study of tissue oxygen supply rate in a macroscopic photodynamic therapy singlet oxygen model. *J Biomed Opt* 2015;20. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.20.3.038001>.
- [234] Hwang HS, Shin H, Han J, Na K. Combination of photodynamic

- therapy (PDT) and anti-tumor immunity in cancer therapy. *J Pharm Investig* 2018;48:143–51. <https://doi.org/10.1007/s40005-017-0377-x>.
- [235] Liu R, Tang J, Xu Y, Zhou Y, Dai Z. Nano-sized indocyanine green J-aggregate as a one-component theranostic agent. *Nanotheranostics* 2017;1:430–9. <https://doi.org/10.7150/ntno.19935>.
- [236] Zhang Y, Zhang N, Hoffman RM, Zhao M. Surgically-induced multi-organ metastasis in an orthotopic syngeneic imageable model of 4T1 murine breast cancer. *Anticancer Res* 2015;35:4641–6.
- [237] Svensson J, Johansson A, Svanberg K, St. A-E. Tissue temperature monitoring during interstitial photodynamic therapy. *SPIE BiOS*, vol. 5698, San Jose, Ca: SPIE; 2005, p. 11.
- [238] Juzeniene A, Juzenas P, Bronshtein I, Vorobey A, Moan J. The influence of temperature on photodynamic cell killing in vitro with 5-aminolevulinic acid. *J Photochem Photobiol B Biol* 2006;84:161–6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.02.009>.
- [239] Mamalis A, Koo E, Sckisel GD, Siegel DM, Jagdeo J. Temperature-dependent impact of thermal aminolaevulinic acid photodynamic therapy on apoptosis and reactive oxygen species generation in human dermal fibroblasts. *Br J Dermatol* 2016;175:512–9. <https://doi.org/10.1111/bjd.14509>.
- [240] Rollakanti KR, Kanick SC, Davis SC, Pogue BW, Maytin E V. Techniques for fluorescence detection of protoporphyrin IX in skin cancers associated with photodynamic therapy. *Photonics Lasers Med* 2013;2:287–303. <https://doi.org/10.1515/plm-2013-0030>.
- [241] Kitajima Y, Ishii T, Kohda T, Ishizuka M, Yamazaki K, Nishimura Y, et al. Mechanistic study of PpIX accumulation using the JFCR39 cell panel revealed a role for dynamin 2-mediated exocytosis. *Sci Rep* 2019;9:8666. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44981-y>.
- [242] Osaki T, Yokoe I, Sunden Y, Ota U, Ichikawa T, Imazato H, et al. Efficacy of 5-aminolevulinic acid in photodynamic detection and photodynamic therapy in veterinary medicine. *Cancers (Basel)* 2019;11:495. <https://doi.org/10.3390/cancers11040495>.
- [243] Markwardt NA, Haj-Hosseini N, Hollnburger B, Stepp H, Zelenkov P, Rühm A. 405 nm versus 633 nm for protoporphyrin IX excitation in fluorescence-guided stereotactic biopsy of brain tumors. *J Biophotonics*

- 2016;9:901–12. <https://doi.org/10.1002/jbio.201500195>.
- [244] Marois M, Bravo J, Davis SC, Kanick SC. Characterization and standardization of tissue-simulating protoporphyrin IX optical phantoms. *J Biomed Opt* 2016;21:035003. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.21.3.035003>.
- [245] Prael S. Protoporphyrin IX dimethyl ester, <https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/149.html> (accessed March 18, 2020).
- [246] Vignion-Dewalle A-S, Baert G, Devos L, Thecua E, Vicentini C, Mortier L, et al. Red light photodynamic therapy for actinic keratosis using 37 J/cm²: Fractionated irradiation with 12.3 mW/cm² after 30 minutes incubation time compared to standard continuous irradiation with 75 mW/cm² after 3 hours incubation time using a mathematical m. *Lasers Surg Med* 2017;49:686–97. <https://doi.org/10.1002/lsm.22665>.
- [247] Gibson SL, Havens JJ, Nguyen ML, Hilf R. Delta-aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy inhibits protoporphyrin IX biosynthesis and reduces subsequent treatment efficacy in vitro. *Br J Cancer* 1999;80:998–1004. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690454>.
- [248] Yang TD, Choi W, Yoon TH, Lee KJ, Lee J-S, Joo JH, et al. In vivo photothermal treatment by the peritumoral injection of macrophages loaded with gold nanoshells. *Biomed Opt Express* 2015;7:185–93. <https://doi.org/10.1364/BOE.7.000185>.
- [249] Simionescu S, Teodorescu S, Ion RM, Voicila E, Nechifo G. Polymeric membrane for verteporfin purification. *Mater Plast* 2017;54:14–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.37358/MP.17.1.4775>.
- [250] Visudyne: ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: Περίληψη των χαρακτηριστικών του προϊόντος 2008. https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2008/2008042345751/anx_45751_el.pdf.
- [251] Isabelle M, Klubben W, He T, Laughney AM, Glaser A, Krishnaswamy V, et al. Assessment of biophysical tumor response to PDT in pancreatic cancer using localized reflectance spectroscopy. *Opt Methods Tumor Treat Detect Mech Tech Photodyn Ther XX* 2011;7886:78860S. <https://doi.org/10.1117/12.876147>.
- [252] Runnels JM, Chen N, Ortel B, Kato D, Hasan T. BPD-MA-mediated photosensitization in vitro and in vivo: cellular adhesion and β1

- integrin expression in ovarian cancer cells. *Br J Cancer* 1999;80:946–53. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690448>.
- [253] Kim MM, Penjweini R, Liang X, Zhu TC. Explicit macroscopic singlet oxygen modeling for benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD)-mediated photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B Biol* 2016;164:314–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.09.031>.
- [254] Kim MM, Penjweini R, Zhu TC. In vivo outcome study of BPD-mediated PDT using a macroscopic singlet oxygen model. *Proc SPIE--the Int Soc Opt Eng* 2015;9308. <https://doi.org/10.1117/12.2077803>.
- [255] Liu B, Liang X, Zhu T. Singlet oxygen modeling of BPD mediated-PDT using COMSOL, 2012.
- [256] McMillan DD, Chen D, Kim MM, Liang X, Zhu TC. Parameter determination for singlet oxygen modeling of BPD-Mediated PDT. *Proc SPIE--the Int Soc Opt Eng* 2013;8568:856810. <https://doi.org/10.1117/12.2003277>.
- [257] National Center for Biotechnology Information. Compound Summary for CID 31296. PubChem Compd Database; CID=31296 2019. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Visudyne> (accessed November 22, 2020).
- [258] Xu Y, Long S, Yang Y, Zhou F, Dong N, Yan K, et al. Mathematical simulation of temperature distribution in tumor tissue and surrounding healthy tissue treated by laser combined with indocyanine green. *Theor Biol Med Model* 2019;16:12. <https://doi.org/10.1186/s12976-019-0107-3>.
- [259] Weissig V, Pettinger TK, Murdock N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *Int J Nanomedicine* 2014;9:4357–73. <https://doi.org/10.2147/IJN.S46900>.
- [260] Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;99:28–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>.
- [261] Stiufiuc R, Iacovita C, Nicoara R, Stiufiuc G, Florea A, Achim M, et al. One-step synthesis of PEGylated gold nanoparticles with tunable surface charge. *J Nanomater* 2013;2013:146031. <https://doi.org/10.1155/2013/146031>.

- [262] Gutwein LG, Singh AK, Hahn MA, Rule MC, Knapik JA, Moudgil BM, et al. Fractionated photothermal antitumor therapy with multidye nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2012;7:351–7. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26468>.
- [263] Sugiura T, Matsuki D, Okajima J, Komiya A, Mori S, Maruyama S, et al. Photothermal therapy of tumors in lymph nodes using gold nanorods and near-infrared laser light with controlled surface cooling. *Nano Res* 2015;8:3842–52. <https://doi.org/10.1007/s12274-015-0884-x>.
- [264] Zhang Y, Sun X, Nan N, Cao K-X, Ma C, Yang G-W, et al. Elemene inhibits the migration and invasion of 4T1 murine breast cancer cells via heparanase. *Mol Med Rep* 2017;16:794–800. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6638>.
- [265] Yang Y, Zhu D, Liu Y, Jiang B, Jiang W, Yan X, et al. Platinum-carbon-integrated nanozymes for enhanced tumor photodynamic and photothermal therapy. *Nanoscale* 2020;12:13548–57. <https://doi.org/10.1039/D0NR02800B>.
- [266] Griffin RJ, Dings RPM, Jamshidi-Parsian A, Song CW. Mild temperature hyperthermia and radiation therapy: role of tumour vascular thermotolerance and relevant physiological factors. *Int J Hyperthermia* 2010;26:256–63. <https://doi.org/10.3109/02656730903453546>.
- [267] Song CW, Park HJ, Lee CK, Griffin R. Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment. *Int J Hyperth* 2005;21:761–7. <https://doi.org/10.1080/02656730500204487>.
- [268] Deda DK, Araki K. Nanotechnology, light and chemical action: An effective combination to kill cancer cells. *J Braz Chem Soc* 2015;26:2448–70. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150316>.
- [269] Hylander BL, Eng JW-L, Repasky EA. The impact of housing temperature-induced chronic stress on preclinical mouse tumor models and therapeutic responses: An important role for the nervous system. *Adv Exp Med Biol* 2017;1036:173–89. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67577-0_12.
- [270] Kokolus KM, Capitano ML, Lee C-T, Eng JW-L, Waight JD, Hylander BL, et al. Baseline tumor growth and immune control in laboratory mice are significantly influenced by subthermoneutral housing temperature. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110:20176 LP – 20181.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.1304291110>.
- [271] Sztandera K, Gorzkiewicz M, Klajnert-Maculewicz B. Nanocarriers in photodynamic therapy –in vitro and in vivo studies. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2019;n/a:e1509. <https://doi.org/10.1002/wnan.1599>.
- [272] Stuchinskaya T, Moreno M, Cook MJ, Edwards DR, Russell DA. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates. *Photochem Photobiol Sci* 2011;10:822–31. <https://doi.org/10.1039/c1pp05014a>.
- [273] Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chem Rev* 2015;115:1990–2042. <https://doi.org/10.1021/cr5004198>.
- [274] Cassidy J, Betz V, Lilge L. Monte Carlo fluence simulation for prospective evaluation of interstitial photodynamic therapy treatment plans. vol. 9308. 2015. <https://doi.org/10.1117/12.2077951>.
- [275] Kim MM, Penjweini R, Gemmell NR, Veilleux I, McCarthy A, Buller G, et al. A feasibility study of singlet oxygen explicit dosimetry (SOED) of PDT by intercomparison with a singlet oxygen luminescence dosimetry (SOLD) system. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* 2016;9694. <https://doi.org/10.1117/12.2213236>.
- [276] Jarvi MT, Niedre MJ, Patterson MS, Wilson BC. Singlet oxygen luminescence dosimetry (SOLD) for photodynamic therapy: current status, challenges and future prospects. *Photochem Photobiol* 2006;82:1198–210. <https://doi.org/10.1562/2006-05-03-IR-891>.
- [277] Wang M, Abbineni G, Clevenger A, Mao C, Xu S. Upconversion nanoparticles: synthesis, surface modification and biological applications. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 2011;7:710–29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.02.013>.
- [278] Wang F, Banerjee D, Liu Y, Chen X, Liu X. Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy. *Analyst* 2010;135:1839–54. <https://doi.org/10.1039/C0AN00144A>.
- [279] Qiu H, Tan M, Ohulchanskyy TY, Lovell JF, Chen G. Recent progress in upconversion photodynamic therapy. *Nanomater (Basel, Switzerland)* 2018;8. <https://doi.org/10.3390/nano8050344>.
- [280] Spyratou E, Kareliotis G, Makropoulou M, Efstathopoulos E,

Serafetinides AA. Theoretical study of laser-based phototherapies' improvement via upconverting nanoparticles. *J Phys Conf Ser*, Vol. 1859 012043, 2021

- [281] Παπαγιάκουμου Ε-Χ. Διερεύνηση των φυσικών χαρακτηριστικών και του τρόπου διάδοσης σύμφωνης ακτινοβολίας για την κατανόηση των βασικών μηχανισμών οπτικής παγίδευσης. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ), 2005.
- [282] Σπυράτου Ε. Φωτο-βιοφυσικές εφαρμογές των laser και ανάπτυξη μεθοδολογίας μικροχειρισμού νανοσωματιδίων με χρήση οπτικής παγίδας laser. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ), 2010. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.12681/eadd/23335>.
- [283] Κοτσιφάκη Δ. Οπτική παγίδα και μικροχειρισμός διηλεκτρικών σωματιδίων και βιολογικών δειγμάτων χρησιμοποιώντας δέσμες laser. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ), 2012. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.12681/eadd/27748>.
- [284] Γουσέτης Α. Μελέτη οπτικής παγίδευσης υποβοηθούμενης από πλασματικά πεδία. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ), 2014. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.26240/heal.ntua.5211>.
- [285] Mao F, Xing Q, Wang K, Lang L, Wang Z, Chai L, et al. Optical trapping of red blood cells and two-photon excitation-based photodynamic study using a femtosecond laser. *Opt Commun* 2005;256:358–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.optcom.2005.06.076>.
- [286] Blázquez-Castro A. Optical tweezers: Phototoxicity and thermal stress in cells and biomolecules. *Micromachines* 2019;10:507. <https://doi.org/10.3390/mi10080507>.

Α' ΑΑΡΜ - REPORT Νο .88 - ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Η έρευνα για την παρούσα διατριβή άρχισε με μία βιβλιογραφική ανασκόπηση αναφορικά με τη δοσιμετρία στη φωτοδυναμική θεραπεία. Όπως σύντομα έγινε αντιληπτό, η διεθνής βιβλιογραφία είναι αρκετά φτωχή σε πρωτόκολλα επί του συγκεκριμένου θέματος, τα οποία να είναι και πλήρη αλλά και ευρέως αποδεκτά.

Η έκθεση υπ' αριθμ. 88 της Αμερικανικής Ένωσης Φυσικών Ιατρικής (ΑΑΡΜ) παραμένει έως και σήμερα το ίσως πιο ευρέως διαδεδομένο και αναγνωρισμένο πρωτόκολλο για ΦΔΘ. Αυτό, σε συνδυασμό με την έλλειψη κάποιου επίσημου πρωτοκόλλου στην ελληνική γλώσσα, μας οδήγησε στη μετάφραση / απόδοση του ανωτέρω, με την ταυτόχρονη διόρθωση κάποιων αριθμητικών παροραμάτων. Η μετάφραση έλαβε στις 04/02/2019 επίσημη έγκριση από την ΑΑΡΜ να διαμοιραστεί στην Ένωση Φυσικών Ιατρικής Ελλάδος (ΕΦΙΕ) για χρήση από τα μέλη της. Να σημειωθεί πως στο ενδεικτικό απόσπασμά της που ακολουθεί, οι αριθμοί σελίδων που αναγράφονται στον πίνακα περιεχομένων αναφέρονται στο αρχικό κείμενο.

ΑΑΡΜΙ REPORT NO. 88

ΔΟΣΙΜΕΤΡΙΑ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

**A Task Group Report of the General Medical Physics Committee
of the Science Council**

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2018

AAPM Report No. 88

ΔΟΣΙΜΕΤΡΙΑ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Πρωτότυπη έκδοση:

AAPM Report No. 88, *Photodynamic Therapy Dosimetry*, AAPM Task Group Report of the General Medical Physics Committee of the Science Council, Copyright © 2005 by American Association of Physicists in Medicine

Disclaimer:

The American Association of Physicists in Medicine (AAPM) published the original version of this document in the English language. This translation has not been verified by AAPM.

Η Αμερικάνικη Ένωση Φυσικών Ιατρικής (AAPM) δημοσίευσε την πρωτότυπη έκδοση αυτού του εγγράφου στην Αγγλική γλώσσα. Αυτή η μετάφραση δεν έχει επαληθευθεί από την AAPM.

Η παρούσα ελληνική μεταφρασμένη έκδοση έχει λάβει την έγκριση της AAPM για να διατεθεί από την Ένωση Φυσικών Ιατρικής Ελλάδος (ΕΦΙΕ).

Μετάφραση και επιστημονική επιμέλεια:

Καρελιώτης Γεώργιος (Φυσικός Ιατρικής – Ακτινοφυσικός, Υποψήφιος Διδάκτορας
Τομέα Φυσικής – Ε.Μ.Π.)

Μακροπούλου Μυρσίνη (Φυσικός Ιατρικής – Εκτός Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών,
Καθηγήτρια Τομέα Φυσικής – Ε.Μ.Π.)

Αντίγραφα της πρωτότυπης έκθεσης είναι διαθέσιμα από:

Medical Physics Publishing
4513 Vernon Blvd.
Madison, WI 53705-4964
Telephone: 1-800-442-5778 or
608-262-4021
Fax: 608-265-2121
Email: mpp@medicalphysics.org
Web site: www.medicalphysics.org

General Medical Physics Committee of the Science Council

Task Group 5

Fred W. Hetzel (Chair)	HealthOne Alliance Research, Denver, Colorado
Suresh M. Brahmavar (Retired)	Baystate Health Systems, Inc., Springfield, Massachusetts
Qun Chen	HealthOne Alliance Research, Denver, Colorado
Steven L. Jacques	Oregon Health & Science University, Portland, Oregon
Michael S. Patterson	Medical Physics, Hamilton Regional Cancer Center, Hamilton, Ontario, Canada
Brian C. Wilson	Princess Margaret Hospital, Toronto, Ontario, Canada
Timothy C. Zhu	Radiation Oncology, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania

Πρόλογος στην ελληνική έκδοση

Το παρόν πόνημα αποτελεί πιστή μετάφραση της έκθεσης υπ' αριθμόν 88 της Αμερικάνικης Ένωσης Φυσικών Ιατρικής, που εκδόθηκε το 2005, με πρωτότυπο τίτλο «*Photodynamic Therapy Dosimetry*». Μεταφράστηκε προκειμένου να μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ευχέρεια ακόμα και από άτομα που δεν είναι εξοικειωμένα με τη τεχνική ορολογία της φωτοδυναμικής θεραπείας και των lasers. Παρά την υπερδεκαετή χρονική απόσταση μεταξύ του πρωτότυπου και του παρόντος κειμένου, επιλέξαμε να το μεταφράσουμε διότι μια προσεκτική βιβλιογραφική αναζήτηση έδειξε ότι δεν υπάρχει κάποιο μεταγενέστερο και ταυτόχρονα πληρέστερο αντίστοιχο πρωτόκολλο.

Αξίζει να σημειωθεί πως στην παρούσα έκδοση έχουν διορθωθεί κάποια οφθαλμοφανή αριθμητικά λάθη της πρωτότυπης έκδοσης, με τις αρχικές τιμές να παρατίθενται στο τέλος της αντίστοιχης σελίδας.

Κατά τη μετάφραση της πρωτότυπης έκδοσης παρουσιάστηκε σε κάποιους όρους σημαντική δυσκολία κατά την απόδοσή τους στην ελληνική γλώσσα, λόγω της διαφορετικής ορολογίας που συναντάται σε διαφορετικά επιστημονικά πεδία, όπως για παράδειγμα αυτό της ιατρικής, της φωτονικής, της μηχανικής κ.α.. Σε αυτό το σημείο οφείλουμε να ευχαριστήσουμε τον Ομότιμο καθηγητή του Τομέα Φυσικής του Ε.Μ.Π. κύριο Σεραφετινίδη Αλέξανδρο, για τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις του επί του θέματος. Επιπλέον παρατηρήσεις μόνο ευπρόσδεκτες μπορούν να είναι, καθώς θα συμβάλλουν στην αρτιότερη παρουσίαση αντίστοιχων μελλοντικών προσπαθειών.

Αναγνωρίζοντας βέβαια τις αξιοσημείωτες εξελίξεις σε όλες τις συνιστώσες της φωτοδυναμικής θεραπείας (τεχνολογία πηγών μονοχρωματικής ακτινοβολίας, φωτοευαίσθητοποιητές νεότερης γενιάς, κυματοδηγοί και ανιχνευτές ακτινοβολίας κ.ά.), αισθανόμαστε την ανάγκη να προσπαθήσουμε να συμπεριλάβουμε τις σύγχρονες παραμέτρους στη δοσιμετρία σε μια επικαιροποιημένη και στα πλαίσια των ελληνικών αναγκών μελλοντική έκδοση.

Οι μεταφραστές

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
A1. Τι είναι η ΦΔΘ;	1
A2. Παρούσα κλινική κατάσταση της ΦΔΘ	2
A3. Παρούσα κατάσταση της οπτικής δοσιμετρίας	2
A4. Συνέπειες ανεπαρκούς δοσιμετρίας στη θεραπεία	7
A5. Σκοπός της παρούσας έκθεσης	8
A6. Δομή της έκθεσης	8
A7. Αποποίηση ευθυνών	8
B. ΟΡΙΣΜΟΙ	9
B1. Θεμελιώδεις ποσότητες περιγραφής της φωτεινής ακτινοβολίας	9
B2. Ποσότητες που περιγράφουν τον ιστό στόχο	10
B3. Όροι που σχετίζονται με την πηγή φωτός	11
B4. Όροι που σχετίζονται με τη διάδοση του φωτός	12
Γ. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΣΙΜΕΤΡΙΑ ΣΤΗ ΦΔΘ	14
Γ1. Βαθμονόμηση κατά τη διάρκεια προληπτικής συντήρησης	14
Γ2. Διαδικασίες που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της ΦΔΘ	15
Δ. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟ / ΝΟΣΗΛΕΥΤΗ / ΦΥΣΙΚΟ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΕΤΑΙ ΣΕ ΦΔΘ	17
Δ1. Ιατρός	17
Δ2. Νοσηλεύτης	17
Δ3. Φυσικός	17
Δ4. Ειδικός laser	18
Δ5. Δοσιμέτρης φωτός	18
Ε. ΣΥΣΤΑΣΗ ΓΙΑ ΤΙΣ ΒΑΣΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΡΘΡΩΝ / ΕΚΘΕΣΕΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΦΔΘ	18
Ε1. Εισαγωγή	18
Ε2. Παράμετροι που μπορούν να ποσοτικοποιηθούν	19
Ε3. Παράμετροι που δεν μπορούν να ποσοτικοποιηθούν	21
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΦΔΘ	23
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	29
ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	29

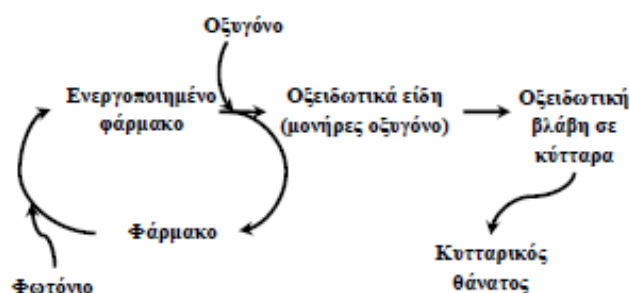
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α1. Τι είναι η ΦΔΘ;

Η φωτοδυναμική θεραπεία (ΦΔΘ) (Photodynamic therapy (PDT)) είναι μία φωτο-ενεργοποιούμενη χημειοθεραπεία, στην οποία χρησιμοποιείται φωτεινή ακτινοβολία για την ενεργοποίηση ενός φωτοευαίσθητου φαρμάκου¹ που έχει συσσωρευθεί στο εσωτερικό κυττάρων, ώστε να (τους) επάγει οξειδωτικές βλάβες. Σε αντίθεση με την κλασική χημειοθεραπεία, η οποία έχει συστημική δράση, η ΦΔΘ επιτυγχάνει εντοπισμένη δράση. Υπό αυτή την έννοια, η ΦΔΘ μπορεί να παρομοιαστεί περισσότερο με μία χειρουργική τεχνική ή τεχνική ακτινοθεραπείας, παρά χημειοθεραπεία.

Οι βασικοί δομικοί λίθοι για μία επιτυχημένη ΦΔΘ είναι: 1) το φάρμακο, 2) το φως και 3) το οξυγόνο. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 1α, η φωτοευαίσθητοποιός ουσία ενεργοποιείται απορροφώντας ένα φωτόνιο ώστε να μεταβεί στη διεγερμένη κατάστασή της. Τότε, αλληλεπιδρά με το μοριακό οξυγόνο, που είναι διαλυμένο στο εσωτερικό των κυττάρων, παράγοντας οξειδωτικές ρίζες και, συνηθέστερα, μονήρες οξυγόνο. Εν συνεχεία, οι οξειδωτικές ρίζες προσβάλλουν κυτταρικές δομές μέσω οξειδωτικών μηχανισμών, επάγοντας βλάβες. Τέτοιες βλάβες μπορεί να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης ή απόπτωσης, ανάλογα με την επιλογή της φωτοευαίσθητοποιού ουσίας, της ποσότητάς της και του φωτός που θα χορηγηθεί.

Φωτοδυναμική Θεραπεία (ΦΔΘ)



Εικόνα 1α: Φωτόνιο + φάρμακο + οξυγόνο → οξειδωτικές ρίζες → οξειδωτικές βλάβες → κυτταρικός θάνατος.

Η ΦΔΘ είναι μία φωτο-ενεργοποιούμενη χημειοθεραπεία. Ένα φωτόνιο απορροφάται από κάποια φωτοευαίσθητοποιός ουσία, μεταφέροντάς τη σε μία διεγερμένη κατάσταση (βλ. εικόνα 1β). Η φωτοευαίσθητοποιός ουσία μπορεί να μεταφέρει την ενέργειά της σε άτομα οξυγόνου παράγοντας μία χημική ρίζα που ονομάζεται «μονήρες οξυγόνο», το οποίο προσβάλλει κυτταρικές δομές μέσω οξείδωσης.

¹Η ουσία του φαρμάκου είναι ευαίσθητη στο φως, αλλά το αποτέλεσμα που επάγει ποιεΐται στα κύτταρα. Επομένως στο εξής θα χρησιμοποιείται ο όρος «φωτοευαίσθητοποιός ουσία». (Σ.τ.Μ.)

General Medical Physics Committee of the Science Council (July 2005)
No. 89 "Recommendations of the AAPM Regarding the Impact of Implementing the
2004 Task Group 43 Report on Dose Specification for 103Pd and 125I
Interstitial Brachytherapy," Report of the Photon-Emitting Brachytherapy
Dosimetry Subcommittee of the Radiation Therapy Committee, Reprinted
from *Medical Physics*, Vol. 32, Issue 5, (2005)

Για αντίγραφα της πρωτότυπης έκθεσης καθώς και τιμολόγηση και διαθεσιμότητα
άλλων εκθέσεων και δημοσιεύσεων της AAPM μπορεί κανείς να απευθυνθεί:

Medical Physics Publishing
4513 Vernon Blvd.
Madison, WI 53705-4964
Telephone: 1-800-442-5778 or
608-262-4021
Fax: 608-265-2121
Email: mpp@medicalphysics.org
Web site: www.medicalphysics.org

B' ΚΩΔΙΚΑΣ

B. Κώδικες Matlab

Για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής αναπτύχθηκε ο κώδικας «PDT Simulator», ο οποίος προσομοιώνει τη φωτοδυναμική δράση, με βάση τον μηχανισμό Τύπου II. Αποτελείται από αρχεία / υποκώδικες, γραμμένους ως αρχεία .m στο πρόγραμμα Matlab. Τα βασικότερα εξ αυτών παρατίθενται στη συνέχεια.

B.1 Parameters.m

```
%% Καθορισμός παραμέτρων
%% Αρχικές συνθήκες πηγής και χρόνου:
fl=150;           %Ισχύς πηγής (mW)
irradtime=1200;  %Χρόνος ακτινοβολήσης (s)

%% Φωτοχημικές σταθερές φωτοευαισθητοποιού ουσίας:
ksi=3.7*(10^(-3)); %ξ(cm^2)*(mW^-1)*(s^-1)
sigma=9*(10^(-5)); %σ (μM^-1)
delta=33;        %δ (μM)
vita=11.9;       %β (μM)
fr=1;           %f (-)

%% Αρχικές συνθήκες θεραπείας:
ssurface=7;      %Επιφανειακή συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιού ουσίας (μM)
omol=80;         %Αρχική συγκέντρωση [3O2] (μM)
osing=0;         %Αρχική συγκέντρωση [1O2]rx (μM)
g0=0.7;         %Αρχική οξυγόνωση (μM/s)
omin=700;       %Συγκέντρωση κατωφλίου [1O2]rx,th για νέκρωση (σε μM)

%% Για τον fixed_1O2_algorithm:
omol_step=20;    %Μεγάλο βήμα αύξησης του [3O2]
omol_step_opt=5; %Μικρό βήμα αύξησης του [3O2]
```

B.2 Statistics.m

```
%% Υπολογισμός στατιστικών στοιχείων δέσμης
% Προσοχή στις σειρές του T και F που υπάρχει όγκος

Parameters;
lenx=length(x);
lenz=length(z);

%% Μέση τιμή ρυθμού ροής σε όλο τον όγκο
flu=0; % Ρυθμός ροής
leni=0; % Πλήθος

for i=1:lenx
    for j=1:lenz
        if Tzx(j,i)==4 % Εντοπισμός καρκινικών κελιών
            flu=Fxz(j,i)+flu;
            leni=leni+1;
        end % if
    end % j
end % i

mflu4=flu/leni; % Μέση τιμή
disp(['Μέση τιμή ρυθμού ροής σε όλο τον όγκο:',num2str(mflu4),'mW/cm2'])

%% Μέση τιμή συνολικής πυκνότητας ενέργειας σε όλο τον όγκο
mene=(mflu4*irradtime)/1000; % /1000 για το "m" των mW
disp(['Μέση τιμή ρυθμού ροής σε όλο τον όγκο:',num2str(mene),'J/cm2'])
```


B.3 Spatial_distributions.m

```
%% Υπολογισμός [1O2], [3O2], [S] σε 3D

%% Αρχικοποίηση

% Φόρτωση παραμέτρων
Parameters;

% Δημιουργία διανυσμάτων p αποθήκευσης τιμών
p=zeros(lenz,lenx); % [1O2]
p2=zeros(lenz,lenx); % [3O2]
p3=zeros(lenz,lenx); % [S0]
g=zeros(lenz,lenx); % [g]

% Κάλεσμα και καθορισμός μεταβλητών με βάση τα αρχεία Monte Carlo (MCxyz)
global binsize
global cancerradius

dx=binsize;
dz=binsize;
xx=( [1:lenx]' -lenx/2)*dx;
yy=( [1:leny]' -leny/2)*dy;
zz=[1:lenz]';
zzmin=min(zz);
zzmax=max(zz);
xxmin=min(xx);
xxmax=max(xx);
yymin=min(yy);
yymax=max(yy);

%% Υπολογισμός μείωσης οξυγόνωσης λόγω νεκρωτικού κέντρου

% Θέση κέντρου όγκου
xc=0; % [cm], x
yc=0; % [cm], y
zc=cancerradius+0.16; % [cm], z

% Κατασκευή χωρικής μεταβολής της οξυγόνωσης (για g0 = 0.7)
for ig=1:lenx
    for iz=1:lenz
        xd=xx(ig)-xc; % x απόσταση από το νεκρωτικό κέντρο
        zd=zz(iz)-zc; % z απόσταση από το νεκρωτικό κέντρο
        r2 =sqrt(xd^2 + zd^2); % Ακτινική απόσταση από το νεκρωτικό κέντρο
        if ( r2<=cancerradius) % Εάν βρισκόμαστε εντός του όγκου
            g(iz,ig)=0.7+(-0.16/(0.2*sqrt(pi/2)))*exp(-5*((r2)/0.2)^2); %με δοκιμές
        else
            g(iz,ig)=g0;
        end %if
    end
end
```

```

end %iz
end %ig

% Σχεδίαση χωρικής κατανομής
%[X,Y]=meshgrid(x,z);
%mesh(X,Y,g);
%title('Spatial distribution of g')
%xlabel('x(cm)'), ylabel('z(cm)'), zlabel('g(μM/s)')
%grid on

%% Επίλυση συστήματος διαφορικών
time=[0:(irradtime/2):irradtime]; % Προσοχή στο βήμα

for u=1:lenz %Από εδώ μπορεί να περιοριστεί ο υπολογισμός μόνο στα όρια του
    όγκου
    so=(ssurface*exp(-1.3*z(u)); %Υπολογισμός συγκέντρωσης με το βάθος (Liu
        - 2010, Star - 2002), για 16%
    for i=1:lenx %Από εδώ μπορεί να περιοριστεί ο υπολογισμός μόνο στα όρια
        του όγκου
        fi=Fxz(u,i);
        if T(round(leny/2),i,u)==4 %Εάν είμαστε στον όγκο
            %Διαφορικές:
            f=@(t,x)[(-(ksi*sigma*fi*(x(1)+delta)*x(2))/(x(2)+vita))*x(1);(((ksi*fi*x(1))/
                (x(2)+vita))*x(2)+g(u,i)*(1-(x(2)/omol)));((fr*ksi*fi*x(1)*x(2))/(x(2)+vita))];

            %Επίλυση συστήματος:
            [t,xa]=ode45(f,time,[so omol osing]);

            %Αποθήκευση τιμών στο διάνυσμα p
            p(u,i)=xa(length(time),3); %[1O2] Από εδώ μπορεί να οριστεί στην
                επιθυμητή χρονική στιγμή
            p2(u,i)=xa(length(time),2); %[3O2]
            p3(u,i)=xa(length(time),1); %[S0]
            else
                p(u,i)=0; %[1O2]
                p2(u,i)=omol; %[3O2]
                p3(u,i)=0; %[S0]
            end %if
        end %i
    end %u

%% Υπολογισμός νεκρών - ζωντανών κελιών

% Δημιουργία πίνακα necromap αποθήκευσης τιμών
necromap=zeros(lenz,lenx);

for u1=1:lenz
    for i=1:lenx
        if (p(u1,i)>=omin)
            necromap(u1,i)=0; % Τιμή 0 αν είναι νεκρό

```

```

else
    necromap(u1,i)=1; %Τιμή 1 αν είναι ζωντανό
end % if
end % i
end % u1

%% Υπολογισμός μέγιστου βάθους νέκρωσης και πλάτους νέκρωσης (στο ίδιο βάθος)
(για y=0)

znecro=0; % Βάθος νέκρωσης
xnecro=0; % Πλάτος νέκρωσης
necror2=0; % Αρχικοποίηση (χρήση στη μετατροπή γραμμής και σειράς σε μήκος)

% Υπολογισμός μέγιστης γραμμής με νεκρό κελί
for u2=1:lenz
    for i=1:lenx
        if necromap(u2,i)==0
            znecro=u2;
            continue
        end % if
    end % i
end % u2

% Υπολογισμός μέγιστης στήλης με νεκρό κελί
for i=1:lenx
    for u2=1:lenz
        if necromap(u2,i)==0
            xnecro=i;
            continue
        end % if
    end % u2
end % i

% Μετατροπή γραμμής και σειράς σε μήκος
necroz=znecro*dz;
necror=(lenx/2-(lenx-xnecro))*dz;

if necror>0
    necror2=necror;
else
    necror2=0; % Όστε να μη βγει αρνητικό
end % if

zn=['Necrosis depth (z axis) = ',num2str(necroz),'cm']
rn=['Horizontal necrosis (x axis) = ',num2str(necror2),'cm']

disp(zn) % Επιστροφή τιμής μέγιστου βάθους νέκρωσης
disp(rn) % Επιστροφή τιμής πλάτους νέκρωσης

```

```

%% Υπολογισμός ποσοστού νέκρωσης στο xz επίπεδο των ανωτέρω

dead=0; % Αρχικοποίηση
alive=0; % Αρχικοποίηση

for u=1:lenz % Από εδώ μπορεί να καθοριστεί το βάθος των υπολογισμών
    for i=1:lenx % Αλλαγή για υπολογισμό μόνο στα 0.3 cm στον άξονα r
        if Tzx(u,i)==4 % Ωστε το ποσοστό να αφορά μόνο τον όγκο
            if necromap(u,i)==0
                dead=dead+1;
            else
                alive=alive+1;
            end % if
        end % Tzx
    end % i
end % u

perc=(dead/(dead+alive))*100;
perc1=['Death percentage (%) = ',num2str(perc),'%']

disp(perc1) % Επιστροφή ποσοστού νέκρωσης

%% Για εύρεση κελιού με τουλάχιστον την ζητούμενη συγκέντρωση
% d=find(p>=Omin,1); % ",1" για το 1ο που έχει την ζητούμενη τιμή κτλ

%% Σχεδιασμός γραφικών:
subplot(221)
plot(z,Fxz(:,round(lenx/2)),'blue') %Για λογαριθμική με semilogy αντί για plot
title('Irradiance vs Depth at x=0')
xlabel('z(cm)'), ylabel('φ mW/cm^2')
grid on
hold on
legend(sprintf('%g mW', fl))
grid on
hold on
subplot(222)
[X,Y]=meshgrid(x,z);
mesh(X,Y,p);
title('Spatial distribution of [1O2]rx')
xlabel('x(cm)'), ylabel('z(cm)'), zlabel(' [1O2](μM)')
grid on
hold on
subplot(223)
[X,Y]=meshgrid(x,z);
mesh(X,Y,g);
title('Spatial distribution of g')
xlabel('x(cm)'), ylabel('z(cm)'), zlabel('g(μM/s)')
grid on
hold on
subplot(224)

```

```
[X Y]=meshgrid(x,z);  
mesh(X,Y,necromap);  
title('Spatial distribution of necrotic area')  
xlabel('x(cm)'), ylabel('z(cm)'), zlabel(['x_{necr.}](cm)')  
grid on  
hold off
```

B.4 Correction_algorithm.m

```
%% Υπολογισμός [3O2]0, [S]0, g0 βάσει των πειραματικών μετρήσεων

% Αρχικές συνθήκες:
Parameters;
incr=1.05; % Ποσοστό αύξησης
global dz

% Νεκρωτική περιοχή (cm):
necroz=0; %Υπολογιζόμενο βάθος νέκρωσης
necroz=0; %Υπολογιζόμενο πλάτος νέκρωσης
expnecroz=0.41; %Πειραματικό βάθος νέκρωσης
expnecroz=0.45; %Πειραματικό πλάτος νέκρωσης

lenx=length(x);
lenz=length(z);
times=0; %Για τον αριθμό των επαναλήψεων

% Δημιουργία διανύσματος p αποθήκευσης τιμών
p=zeros(lenz,lenx);

% Βρόχος ελέγχου
while necroz<expnecroz
    omol=omol*incr;
    g0=g0*incr;
    so=ssurface*incr;

    % Επίλυση διαφορικών
    time=[0:irradtime/2:irradtime];
    for u=1:lenz
        for i=1:lenx
            for fi=Fxz_633(u,i)
                % Διαφορικές:
                f=@(t,x)[(-(ksi*sigma*fi*(x(1)+delta)*x(2))/(x(2)+vita))*x(1);(-ksi*fi*x(1)/
                (x(2)+vita))*x(2)+g0*(1-x(2)/omol)];(ksi*fi*x(1)*x(2)/(x(2)+vita));

                % Επίλυση συστήματος:
                [t,xa]=ode45(f,time,[so omol osing]);

                % Αποθήκευση τιμών στο διάνυσμα p
                p(u,i)=xa(length(time),3); %[1O2], στην τελευταία τιμή του χρόνου
            end
        end
    end

    % Υπολογισμός νεκρών - ζωντανών κελιών

    % Δημιουργία πίνακα necromap αποθήκευσης τιμών
    necromap=zeros(lenz,lenx);
```

```

for u1=1:lenz
    for i=1:lenx
        if (p(u1,i)>=omin)
            necromap(u1,i)=0; %Τιμή 0 αν είναι νεκρό
        else
            necromap(u1,i)=1;
        end % if
    end % i
end % u1

% Υπολογισμός βάθους νέκρωσης και "οριζόντιας" νέκρωσης

% Υπολογισμός μέγιστης γραμμής με νεκρό κελί
for u2=1:lenz
    for i=1:lenx
        if necromap(u2,i)==0
            znecro=u2;
            continue
        end % if
    end % i
end % u2

% Μετατροπή γραμμής και σειράς σε μήκος
necroz=znecro*dz;

% Μέτρηση φορών εκτέλεσης
times=times+1;

end

times1=['Loop repeated ',num2str(times),' times.'];
omol1=['3O2 = ',num2str(omol),' μM'];
g01=['g = ',num2str(omol),' μM/sec'];
so2=['S = ',num2str(so),' μM'];

disp(times1);
disp(omol1)
disp(so2)
disp(g01)

```

B.5 Fixed_1O2_algorithm.m

```
%% Υπολογισμός [3O2]0 και [g0] για επίτευξη συγκεκριμένης τιμής [1O2] (Άξονες x-z)

% Initial conditions:
Parameters;
m=omin; % Αν χρειαστεί να οριστεί manually το omin

lenr=length(x);
lenz=length(z);

% Μετατροπή πίνακα F από (cm-1) σε (mW/cm-1)
% Δε χρειάζεται εάν έχει ήδη εκτελεστεί ο Spatial_distributions
for k=1:lenz
    for l=1:lenr
        Fxz(k,l)=Fzx(k,l)*fl;
    end
end

%Δημιουργία διανυσμάτων p αποθήκευσης τιμών
p=zeros(lenz,lenr);
p1=zeros(lenz,lenr);
p2=zeros(lenz,lenr);
p3=zeros(lenz,lenr);

%Επίλυση διαφορικών (σε περίπτωση που δεν οριστεί το omin)
time=[0:(irradtime)];
for u=1:lenz
    so=ssurface*exp(-1.3*z(u)); %Υπολογισμός συγκέντρωσης με το βάθος (Liu - 2010,
                                Star - 2002), για 16%

    for i=1:lenr
        fi=Fxz(u,i);
        %Διαφορικές:
        f=@(t,x)[(-(ksi*sigma*fi*(x(1)+delta)*x(2))/(x(2)+vita))*x(1);(-(ksi*fi*x(1)/
        (x(2)+vita))*x(2)+g0*(1-x(2)/omol));(ksi*fi*x(1)*x(2)/(x(2)+vita))];

        %Επίλυση συστήματος:
        [t,xa]=ode45(f,time,[so omol osing]);

        %Αποθήκευση τιμών στο διάνυσμα p
        p(u,i)=xa(length(time),3); %[1O2] - πάει στην τελευταία τιμή του χρόνου
    end % i
end % u

m=max(max(p)) %Maximum [1O2]

%% %Εύρεση [3O2]0

g01=g0*10; % Ωστε να μην είναι δεκαδικός (για την "for")
omol2=zeros(g01,2);
```



```

for o=1:(g01-1)
g02=o/10 % Νέα τιμή g0
m2=0; % Αρχικοποίηση m2

time=[0:(irradtime)];
for u=1:lenz
so=ssurface*exp(-1.3*z(u)); %Υπολογισμός συγκέντρωσης με το βάθος (Liu - 2010,
Star - 2002), για 16%

for i=1:lenr
fi=Fxz(u,i);
%Διαφορικές:
f=@(t,x)[(-(ksi*sigma*fi*(x(1)+delta)*x(2))/(x(2)+vita))*x(1)];(-(ksi*fi*x(1)/
(x(2)+vita))*x(2)+g02*(1-x(2)/omol));(ksi*fi*x(1)*x(2)/(x(2)+vita));

%Επίλυση συστήματος:
[t,xa]=ode45(f,time,[so omol osing]);

%Αποθήκευση τιμών στο διάνυσμα p1
p1(u,i)=xa(length(time),3); %[1O2] - πάει στην τελευταία τιμή του χρόνου
end % i
end % u

%Maximum [1O2]
m2=max(max(p1));
omol1=omol;

while (m2<m)
omol1=omol1+omol_step % Χονδροειδής υπολογισμός
%Initial conditions:
%omol=j; %μM

time=[0:(irradtime-1)];
for u=1:lenz
so=ssurface*exp(-1.3*z(u));
for i=1:lenr
fi=Fxz(u,i);
% Διαφορικές:
f=@(t,x)[(-(ksi*sigma*fi*(x(1)+delta)*x(2))/(x(2)+vita))*x(1)];((ksi*fi*x(1)
/(x(2)+vita))*x(2)+g02*(1-x(2)/omol1));(ksi*fi*x(1)*x(2)/(x(2)+vita));

% Επίλυση συστήματος:
[t,xa]=ode45(f,time,[so omol1 osing]);

% Αποθήκευση τιμών στο διάνυσμα p2
p2(u,i)=xa(length(time),3); %[1O2] - πάει στην τελευταία τιμή του χρόνου

end % i
end % u
m2=max(max(p2))

```

```

end % while

omol1=omol1-omol_step; % Αφού ξεπεράστηκε η τιμή επιστροφή και ακριβής
                        υπολογισμός
m3=0;

while m3<m
omol1=omol1+omol_step_opt % Αύξηση με μικρό βήμα για ακριβή υπολογισμό

time=[0:(irradtime)];
for u=1:lenz
so=ssurface*exp(-1.3*z(u));
for i=1:lenr
fi=Fxz(u,i);
%Διαφορικές:
f=@(t,x)[-(ksi*sigma*fi*(x(1)+delta)*x(2))/(x(2)+vita))*x(1);(ksi*fi*x(1)
/(x(2)+vita))*x(2)+g02*(1-x(2)/omol1));(ksi*fi*x(1)*x(2)/(x(2)+vita)];

% Επίλυση συστήματος:
[t,xa]=ode45(f,time,[so omol1 osing]);

% Αποθήκευση τιμών στο διάνυσμα p3
p3(u,i)=xa(length(time),3); %[102] - πάει στην τελευταία τιμή του χρόνου

end % i
end % u
m3=max(max(p3));
end % while

% Αποθήκευση τιμών O(g)
omol2(o,1)=g02;
omol2(o,2)=omol1;
omol2(o+1,1)=g0;
omol2(o+1,2)=omol;
end % o

%% Σχεδίαση γραφικών παραστάσεων
figure(1)
plot(omol2(:,1),omol2(:,2))
title(['^3O_{2}]_{0,min} vs g_{0}')
xlabel('g_{0} (μMs^{-1})'), ylabel(['^3O_{2}]_{0,min} (μM)')
grid on

```

B.6 Time_calculator.m

```
%% Υπολογισμός ελάχιστου χρόνου ακτινοβόλησης για επίτευξη συγκεκριμένου
βάθους νέκρωσης

% Σταθερές
Parameters;
znecr=0.32; % (cm)
tmax=8000; % Μέγιστος χρόνος ακτινοβόλησης σε s (μετράει κ το 0). Να διαιρείται με
το 4.

%% Ορισμός βάθους νέκρωσης
global binsize

% Μετατροπή cm σε "κελί"
j=znecr/binsize;
h=round(j,0); %Στρογγυλοποίηση στον πλησιέστερο ακέραιο

% Εύρεση στήλης με καρκινικό κελί
col=0; % Αρχικοποίηση
col=find(Tzx(h,:)==4,1); % ,1 για το 1ο που έχει την ζητούμενη τιμή
col=col+3; %Για να μην είναι πάνω στο όριο

% Υπολογισμός συγκέντρωσης με το βάθος (Campbel)
so=(ssurface*exp(-z(h)/0.7))-0.335;

% Χρόνος
v=tmax/8; %Μεγάλο βήμα αύξησης χρόνου σε sec
vv=10; %Μικρό βήμα αύξησης χρόνου σε sec
time=[0:v:tmax]; %Χρόνος ακτινοβόλησης σε sec

%% Κατάτμηση χρόνου
time1=[0:v:(tmax/4)];
time1_1=[0:vv:(tmax/4)];
time2=[(tmax/4+1):v:(tmax/2+1)];
time2_2=[(tmax/4+1):vv:(tmax/2)];
time3=[(tmax/2+1):v:((3/4)*tmax+1)];
time3_3=[(tmax/2+1):vv:((3/4)*tmax)];
time4=[((3/4)*tmax+1):v:tmax+1];
time4_4=[((3/4)*tmax+1):vv:tmax];

%% Υπολογισμός μείωσης αιματικής ροής λόγω νεκρωτικού κέντρου
global vesselradius

dx=binsize;
dz=binsize;
xx=( [1:lenx]' -lenx/2)*dx;
yy=( [1:leny]' -leny/2)*dy;
zz=[1:lenz]*dz;
```

```

zzmin=min(zz);
zzmax=max(zz);
xxmin=min(xx);
xxmax=max(xx);
yymin=min(yy);
yymax=max(yy);

% Θέση κέντρου του όγκου
xc=0; % [cm], x
yc=0; % [cm], y
zc=vesselradius+0.16; % [cm], z

for ig=1:lenx
    for iz=1:lenz
        xd=xx(ig)-xc; % x distance from necrotic core center
        zd=zz(iz)-zc;
        r2 =sqrt(xd^2+zd^2); % r from vessel center
        if ( r2<=vesselradius) % if r is within vessel
            g(iz,ig)=0.7+(-0.16/(0.2*sqrt(pi/2)))*exp(-5*((r2)/0.2)^2); %με δοκιμές
        else
            g(iz,ig)=g0;
        end
    end %ix
end %iz

%% Εύρεση χρονικού διαστήματος

fi=Fxz_633(h,col); %

% 1ο χρονικό διάστημα

% Διαφορικές:
f=@(t,x)[(-(ksi*sigma*fi*(x(1)+delta)*x(2))/(x(2)+vita))*x(1);((ksi*fi*x(1))/(x(2)+vita))*x(2)+g(h,col)*(1-x(2)/omol)];(ksi*fi*x(1)*x(2)/(x(2)+vita)];

% Επίλυση συστήματος:
[t,xa]=ode45(f,time1,[so omol osing]);

% Αποθήκευση τιμών στο διάνυσμα pp
pp=xa(:,3); %Για να πάρει τις τιμές του 1O2

% Εύρεση κελιού με τουλάχιστον την ζητούμενη συγκέντρωση
d=find(pp>=omin,1); %,1 για το 1ο που έχει τη ζητούμενη τιμή

% 2ο χρονικό διάστημα

% Διαφορικές:
f=@(t,x)[(-(ksi*sigma*fi*(x(1)+delta)*x(2))/(x(2)+vita))*x(1);(-(ksi*fi*x(1))/(x(2)

```

```

+vita))*x(2)+g(h,col)*(1-x(2)/omol));(ksi*fi*x(1)*x(2)/(x(2)+vita))];

% Επίλυση συστήματος:
[t,xa]=ode45(f,time2,[so omol osing]);

% Αποθήκευση τιμών στο διάνυσμα pp
pp2=xa(:,3); %Για να πάρει τις τιμές του 1O2

% Εύρεση κελιού με τουλάχιστον τη ζητούμενη συγκέντρωση
d2=find(pp2>=omin,1); % ,1 για το 1ο που έχει την ζητούμενη τιμή

% 3ο χρονικό διάστημα

% Διαφορικές:
f=@(t,x)[(-(ksi*sigma*fi*(x(1)+delta)*x(2))/(x(2)+vita))*x(1);(-(ksi*fi*x(1)/(x(2)
+vita))*x(2)+g(h,col)*(1(2)/omol));(ksi*fi*x(1)*x(2)/(x(2)+vita))];

% Επίλυση συστήματος:
[t,xa]=ode45(f,time3,[so omol osing]);

% Αποθήκευση τιμών στο διάνυσμα pp
pp3=xa(:,3); %Για να πάρει τις τιμές του 1O2

%Εύρεση κελιού με τουλάχιστον τη ζητούμενη συγκέντρωση
d3=find(pp3>=omin,1); % ,1 για το 1ο που έχει την ζητούμενη τιμή

% 4ο χρονικό διάστημα

% Διαφορικές:
f=@(t,x)[(-(ksi*sigma*fi*(x(1)+delta)*x(2))/(x(2)+vita))*x(1);(-(ksi*fi*x(1)/(x(2)
+vita))*x(2)+g(h,col)*(1-(2)/omol));(ksi*fi*x(1)*x(2)/(x(2)+vita))];

% Επίλυση συστήματος:
[t,xa]=ode45(f,time4,[so omol osing]);

% Αποθήκευση τιμών στο διάνυσμα pp
pp4=xa(:,3); %Για να πάρει τις τιμές του 1O2

% Εύρεση κελιού με τουλάχιστον τη ζητούμενη συγκέντρωση
d4=find(pp4>=omin,1); % ,1 για το 1ο που έχει τη ζητούμενη τιμή

%% Υπολογισμός χρόνου

if d>0

% Διαφορικές:
f=@(t,x)[(-(ksi*sigma*fi*(x(1)+delta)*x(2))/(x(2)+vita))*x(1);(-(ksi*fi*x(1)/
(x(2)+vita))*x(2)+g(h,col)*(1-x(2)/omol));(ksi*fi*x(1)*x(2)/(x(2)+vita))];

```

```

% Επίλυση συστήματος:
[t,xa]=ode45(f,time1_1,[so omol osing]);

% Αποθήκευση τιμών στο διάνυσμα pp
pp1=xa(:,3); %Για να πάρει τις τιμές του I02

% Εύρεση κελιού με τουλάχιστον την ζητούμενη συγκέντρωση
d1=find(pp1>=omin,1); % ,1 για το I0 που έχει τη ζητούμενη τιμή

tt=d1*vv;
o=['Minimum illumination time = ',num2str(tt),'sec'];
disp(o)

elseif d2>0

% Διαφορικές:
f=@(t,x)[(-(ksi*sigma*fi*(x(1)+delta)*x(2))/(x(2)+vita))*x(1);(-(ksi*fi*x(1)/
(x(2)+vita))*x(2)+g(h,col)*(1-x(2)/omol));(ksi*fi*x(1)*x(2)/(x(2)+vita))];

% Επίλυση συστήματος:
[t,xa]=ode45(f,time2_2,[so omol osing]);

% Αποθήκευση τιμών στο διάνυσμα pp
pp1=xa(:,3); %Για να πάρει τις τιμές του I02

% Εύρεση κελιού με τουλάχιστον την ζητούμενη συγκέντρωση
d1=find(pp1>=omin,1); % ,1 για το I0 που έχει τη ζητούμενη τιμή

tt=d1*vv;
o=['Minimum illumination time = ',num2str(tt),'sec'];
disp(o)

elseif d3>0

% Διαφορικές:
f=@(t,x)[(-(ksi*sigma*fi*(x(1)+delta)*x(2))/(x(2)+vita))*x(1);(-(ksi*fi*x(1)/
(x(2)+vita))*x(2)+g(h,col)*(1-x(2)/omol));(ksi*fi*x(1)*x(2)/(x(2)+vita))];

% Επίλυση συστήματος:
[t,xa]=ode45(f,time3_3,[so omol osing]);

% Αποθήκευση τιμών στο διάνυσμα pp
pp1=xa(:,3); %Για να πάρει τις τιμές του I02

% Εύρεση κελιού με τουλάχιστον την ζητούμενη συγκέντρωση
d1=find(pp1>=omin,1); % ,1 για το I0 που έχει τη ζητούμενη τιμή

tt=d1*vv;
o=['Minimum illumination time = ',num2str(tt),'sec'];
disp(o)

```

```
elseif d4>0
```

```
    % Διαφορικές:
```

```
    f=@(t,x)[(-(ksi*sigma*fi*(x(1)+delta)*x(2))/(x(2)+vita))*x(1)];(-(ksi*fi*x(1)/  
(x(2)+vita))*x(2)+g(h,col)*(1-x(2)/omol));(ksi*fi*x(1)*x(2)/(x(2)+vita));
```

```
    % Επίλυση συστήματος:
```

```
    [t,xa]=ode45(f,time4_4,[so omol osing]);
```

```
    % Αποθήκευση τιμών στο διάνυσμα pp
```

```
    pp1=xa(:,3); %Για να πάρει τις τιμές του I02
```

```
    % Εύρεση κελιού με τουλάχιστον την ζητούμενη συγκέντρωση
```

```
    d1=find(pp1>=omin,1); % 1 για το I0 που έχει τη ζητούμενη τιμή
```

```
    tt=d1*vv;
```

```
    o=['Minimum illumination time = ',num2str(tt),'sec'];
```

```
    disp(o) % Εμφάνιση ελάχιστου χρόνου ακτινοβολήσης
```

```
else
```

```
    oo=['The requested necrotic depth cannot be achieved at the specified  
        time scale.'];
```

```
    disp(oo) % Εμφάνιση μηνύματος αδυναμίας υπολογισμού
```

```
end
```