

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

"Μικροσυστήματα και Νανοδιατάξεις"

Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΡΟΣΤΑΤΗ



Ζαχαρένια Νικητάκη Φυσικός Εφαρμογών, ΕΜΠ

Επιβλέπουσα: Δρ. Διδώ Γιόβα, Καθηγήτρια ΣΗΜΜΥ ΕΜΠ

AOHNA 2011

Προλεγόμενα

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στη Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Μικροσυστήματα και Νανοδιατάξεις», από την Άνοιξη του 2010 μέχρι το Φθινόπωρο του 2011.

Πιο συγκεκριμένα, στο Εργαστήριο Βιοιατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κυρίας Διδώς Γιόβα και την ενεργή υποστήριξη της Υποψήφιας Διδάκτορος κυρίας Ασπασίας Πετρή.

Θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες προς τη Διευθύντρια του Εργαστηρίου κυρία Διδώ Γιόβα για την ανάθεση του θέματος της μεταπτυχιακής εργασίας, η οποία παρουσίασε εξαιρετικό ενδιαφέρον. Αισθάνομαι ιδιαίτερα ευγνώμων, καθώς με την εμπιστοσύνη που μου έδειξε μου παρέσχε τη δυνατότητα να ασχοληθώ ερευνητικά με ένα θέμα Βιοϊατρικής μείζονος σημασίας, τη *Φωτοδυναμική Θεραπεία*. Η έρευνα στον τομέα της Βιοϊατρικής αποτελεί για μένα όνειρο ζωής, διότι αφενός βρίσκω πολύ ενδιαφέρουσα την εργαστηριακή πρακτική της και αφετέρου η προοπτική της εφαρμογής της δουλειάς μου στη βελτίωση της ποιότητας ζωής όσων βρεθούν στη δυσάρεστη θέση του ασθενούς με κάνει να νιώθω κοινωνικά χρήσιμη. Ευχαριστώ την Καθηγήτριά μου για την εμπιστοσύνη, την ενθάρρυνση και την ευγένεια που μου εξέφρασε. Την ευχαριστώ επίσης για την επιστημονική

Ευχαριστώ εκ βαθέων την κυρία Ασπασία Πετρή, για τη συνεχή συνεργασία, για τη συμπαράσταση και για τις γνώσεις στις οποίες με έκανε κοινωνό. Την ευχαριστώ για τη φιλική αντιμετώπιση και την προθυμία της. Αισθάνομαι τυχερή που τη γνώρισα και την είχα δίπλα μου τον τελευταίο ενάμιση χρόνο.

Τον καλό μου φίλο Γιάννη Σαλάτα για την ηλεκτρονική επεξεργασία των εικόνων που έχρηζαν μετάφρασης ευχαριστώ ιδιαίτερα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου για τη φιλικό κλίμα με το οποίο με υποδέχτηκαν και για το χρόνο που περάσαμε μαζί.

Τέλος, ευχαριστώ τους συναδέλφους μου στο διατμηματικό μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «Μικροσυστήματα και Νανοδιατάξεις» για τις φιλικές σχέσεις που αναπτύξαμε, τη συνεργασία και την αλληλοϋποστήριξη. Τους ευχαριστώ για τις πολλές ενδιαφέρουσες συζητήσεις μας, επιστημονικές και μη, και για τις όμορφες στιγμές που ζήσαμε μαζί.

Περίληψη

Η Φωτοδυναμική Θεραπεία (ΦΔΘ) είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος αντιμετώπισης καλοήθων και μη ασθενειών, οι οποίες εμφανίζουν υπερανάπτυξη ανεπιθύμητων ή μη φυσιολογικών κυττάρων. Η βασική ιδέα στηρίζεται στη χορήγηση μιας μη τοξικής ουσίας, του φωτοευαισθητοποιητή (ΦΕ), ο οποίος συσσωρεύεται επιλεκτικά στα κύτταρα του όγκου, καθιστώντας τα ευάλωτα στην οπτική ακτινοβολία. Όταν ολοκληρωθεί η επωαστική περίοδος με τον ΦΕ, ακολουθεί ακτινοβόληση του όγκου με ορατό φως. Παρουσία οξυγόνου, η ενεργοποίηση του ΦΕ από την ακτινοβολία προκαλεί την παραγωγή ελευθέρων ριζών, οι οποίες είναι κυτταροτοξικές. Αποτέλεσμα της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας είναι ο κυτταρικός θάνατος και επομένως η αποδόμηση του πάσχοντος ιστού. Η χρήση της ΦΔΘ στην αντιμετώπιση του καρκίνου θεωρείται ιδιαιτέρως ελκυστική, δεδομένης της θεμελιώδους εξειδίκευσης και επιλεκτικότητας που παρέχει.

Στην παρούσα εργασία ερευνάται η συνδυαστική δράση Φωτοδυναμικής Θεραπείας και αντιοξειδωτικών σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη. Ειδικότερα μελετήθηκε η Φωτοδυναμική δράση με δύο σκευάσματα του ΦΕ mTHPC (απλή μορφή-Foscan & λιποσωμική μορφή-Fospeg) και εκχύλισμα προερχόμενο από τον φλοιό του πεύκου *Pinus halepensis,* πλούσιο σε πολυφαινόλες. Η αντιοξειδωτική ή/και προοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος μελετήθηκαν συστηματικά. Καθώς παρόμοιες μελέτες οι οποίες συνδυάζουν τη ΦΔΘ με αντιοξειδωτικά σε προοξειδωτικές δόσεις έχουν δείξει συνεργειακή δράση, μελετάται εδώ το συγκριμένο εκχύλισμα.

Το κείμενο είναι χωρισμένο σε δύο μέρη, στο θεωρητικό και το πειραματικό. Το θεωρητικό μέρος ξεκινά με την εισαγωγή στη Φωτοδυναμική Θεραπεία όπου παρουσιάζονται αναλυτικά οι δύο κύριες συνιστώσες της, οι φωτοευαισθητοποιητές και τα lasers. Στη συνέχεια εξηγούνται οι μηχανισμοί επίδρασης σε ατομικό, μοριακό, χημικό, υποκυττάριο και κυτταρικό επίπεδο. Ακολούθως αναφέρονται οι μηχανισμοί καταστροφής των όγκων από κυτταρικό επίπεδο μέχρι την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα τελευταία δύο κεφάλαια του πρώτου μέρους αφιερώνονται στη συμβολή της Νανοτεχνολογίας στη ΦΔΘ και τους τρόπους ενίσχυσης της Φωτοδυναμικής δράσης.

Στο πειραματικό μέρος περιγράφονται τα πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν, αναφέρονται τα υλικά, οι διατάξεις και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν και παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που εξήχθησαν. Στο τέλος γίνεται συζήτηση για τα συμπεράσματα και τις μελλοντικές προοπτικές.

Η μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος του φλοιού του πεύκου *Pinus halepensis*, πραγματοποιήθηκε με πειράματα βιωσιμότητας, στα ακόλουθα στάδια:

Έλεγχος Ι: τοξικότητα σκότους των δύο σκευασμάτων του ΦΕ mTHPC, Foscan και Fospeg.

Έλεγχος ΙΙ: επίδραση μόνο της ακτινοβόλησης.

Έλεγχος III: κλασική ΦΔΘ με τα δύο προαναφερθέντα σκευάσματα.

Έλεγχος ΙV: προσδιορισμός συγκέντρωσης αντιοξειδωτικού στην οποία ξεκινά η προοξειδωτική δράση.

Έλεγχος V: τοξικότητα σκότους αντιοξειδωτικού και Foscan, τοξικότητα σκότους αντιοξειδωτικού και Fospeg.

Έλεγχος VI: τοξικότητα αντιοξειδωτικού και ακτινοβόλησης.

Έλεγχος VII: πιθανή συνεργειακή δράση ΦΔΘ και αντιοξειδωτικού.

Summary

Photodynamic therapy is considered to be a promising method for the treatment of malignant and non-malignant diseases that are generally characterized by overgrowth of unwanted or abnormal cells. The basic concept for this method consists of administering a non-toxic drug, known as a photosensitizer, which selectively accumulates by the tumor cells. After the incubation time, irradiation of the tumor follows, with visible light. In presence of oxygen, the activation of the photosensitizer through irradiation, leads to the generation of cytotoxic species and consequently to cell death and tissue devastation. The use of Photodynamic Therapy as a cancer therapy is considered particularly attractive, due to its fundamental specificity and selectivity.

In the present study is investigated the combination of Photodynamic Therapy and the use of antioxidants on human prostate cancer cells. Specifically the photodynamic action of two formulations of PS mTHPC (simple form – Foscan &liposomal form – Fospeg) and the extract from the pine *Pinus halepensis* bark, rich in polyphenols, is investigated. The antioxidant and/or prooxidant properties of this extract were studied in depth. Since similar studies combining PDT with antioxidants in prooxidant concentrations have demonstrated synergetic action, this particular extract is investigated.

This thesis is divided in two parts, the theoretical and the experimental. The theoretical part includes firstly an introduction to Photodynamic Therapy which details its two main components, the photosensitizers and lasers. Secondly, the mechanisms of the PD effect in atomic, molecular, chemical, subcellular and cellular level are explained followed by the mechanisms of tumor destruction at a cellular level leading to the activation of the immune system. The last two chapters of the first part are devoted to the contribution of Nanotechnology in PDT and other ways of enhancing the photodynamic action.

The experimental part details the protocols developed during the experiments, the materials, devices and methods that were used. Finally the results are presented followed by the conclusions and a discussion about future prospects.

Control I: Dark toxicity of the two formulations of PS mTHPC, Foscan and Fospeg.

Control II: The effects of illumination only.

Control III: Classic PDT using the two previously mentioned formulations.

Control IV: Determination of the antioxidants concentration where its prooxidant action begins.

Control V: Dark toxicity of antioxidant and Foscan, dark toxicity of antioxidant and Fospeg.

Control VI: Toxicity of antioxidant under illumination.

Control VII: Possible synergetic action of PDT with the antioxidant.

Πίνακας περιεχομένων

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ1
II.	ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΕΣ3
i.	Ο ιδανικός Φωτοευαισθητοποιητής3
ii.	Οικογένειες και γενιές Φωτοευαισθητοποιητών4
iii.	Υποκυττάριος εντοπισμός φωτοευαισθητοποιητών10
iv.	Το «οπτικό παράθυρο» των ιστών12
III.	Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ LASERS ΣΤΗ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ13
i.	Εισαγωγή στα Lasers15
ii.	Εξαναγκασμένη εκπομπή και lasers15
iii.	Διοδικά lasers ημιαγωγών18
iv.	Άλλα lasers που αξιοποιούνται στη ΦΔΘ24
IV.	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ26
i.	Φωτοφυσική και Φωτοχημεία26
ii.	Χημικές ενώσεις και στοιχεία που επηρεάζονται29
iii.	Διαταραχή κυτταρικών λειτουργιών και ιδιοτήτων30
iv.	Τα είδη του κυτταρικού θανάτου που επάγονται από τη ΦΔΘ
v.	Μηχανισμοί καταστροφής των όγκων41
V.	ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ46
i.	Η Νανοτεχνολογία στη Φωτοδυναμική Θεραπεία46
ii.	ΦΔΘ και αναστολείς της αγγειογένεσης53

iii.	Συνδυασμός ΦΔΘ με χημειοθεραπεία53
iv.	Σύνδεσμος ΦΘΔ με ανοσοδιεγερτικά54
v.	ΦΔΘ με αντιοξειδωτικά σε προοξειδωτικές δόσεις55
B.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
I.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ63
II.	ΥΛΙΚΑ, ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ66
i.	Θρεπτικά μέσα και αντιδραστήρια66
ii.	Όργανα68
iii.	Πρωτόκολλα74
III.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ87
i.	Πειράματα προσδιορισμού της οριακά τοξικής δόσης εκχυλίσματος αντιοξειδωτικών88
ii.	Συνδυασμός εκχυλίσματος και φωτοευαισθητοποιητών94
iii.	Πειράματα ακτινοβόλησης χωρίς ΦΕ ή αντιοξειδωτικό97
iv.	Συνδυασμός εκχυλίσματος και ακτινοβόλησης100
v.	Φωτοδυναμική με το εκχύλισμα του Pinus halepensis101
IV.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ110
i.	Η επίδραση του εκχυλίσματος του φλοιού του πεύκου Pinus halepensis
ii.	Σύγκριση της λιποσωμικής μορφής του ΦΕ mTHPC–Fospeg, με την απλή του μορφή –Foscan 113
iii.	Βελτιώσεις της πειραματικής διαδικασίας που εισήχθησαν στην παρούσα μελέτη 113
iv.	Μελλοντικά πειράματα
v.	Επίλογος115
Αν	αφορές117

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ι. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η Φωτοδυναμική Θεραπεία μπορεί να ορισθεί από την ακόλουθη διαδικασία: Αρχικά, χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή, ουσίας η οποία ενεργοποιείται από το φως και παράγει ενεργό οξυγόνο ή/και ελεύθερες ρίζες, είτε συστημικά, είτε τοπικά ή και επιδερμικά, σε ασθενή που φέρει κάποιον όγκο καλοήθη ή κακοήθη. Μετά από ορισμένη επωαστική περίοδο, η συγκεκριμένη πάσχουσα περιοχή ακτινοβολείται με ορατή ακτινοβολία, κατάλληλου μήκους κύματος. Παρουσία οξυγόνου, η ακτινοβόληση του ευαισθητοποιητή δημιουργεί κυτταροτοξικές ουσίες, οι οποίες προκαλούν κυτταρικό θάνατο και ακολούθως ολοκληρωτική καταστροφή του όγκου. (1)

Ο όρος «Φωτοδυναμική δράση» εισήχθη πρώτη φορά το 1904 από τον Prof. Hermann von Tappeiner, έναν από τους πρωτοπόρους της Φωτοβιολογίας, διευθυντή του Φαρμακολογικού Ινστιτούτου του πανεπιστημίου Ludwig-Maximilians, του Μονάχου.

Οι θεραπευτικές ιδιότητες της οπτικής ακτινοβολίας ήταν γνωστές από την αρχαιότητα. Για τη βελτίωση καταστάσεων όπως η ψωρίαση, η λεύκη του δέρματος, η ραχίτιδα, ο καρκίνος του δέρματος ακόμα και για την ψύχωση, 3000 χρόνια πριν, οι άνθρωποι έβγαιναν στον ήλιο. Αναφορές θέλουν τους αρχαίους Αιγύπτιους, τους αρχαίους Έλληνες, τους Ινδούς και τους Κινέζους να γνωρίζουν τις θεραπευτικές ιδιότητες του ήλιου. Μάλιστα ο Ηρόδοτος ο Ιατρός αναφέρει τον όρο «ηλιοθεραπεία» και τη συνιστά για την αποκατάσταση της υγείας, το δεύτερο αιώνα προ Χριστού. (2)

Στις αρχές του εικοστού αιώνα, εργάτες χρησιμοποιούσαν χρωστικές, όπως την ηωσίνη, σε συνδυασμό με φως για να θεραπεύσουν τον καρκίνο του δέρματος. Στην ίδια εποχή τοποθετείται και η χρήση της αιματοπορφυρίνης.

Μέχρι τη δεκαετία του '60 είχε ήδη παρατηρηθεί ότι οι πορφυρίνες εντοπίζονται επιλεκτικά στις καρκινικές περιοχές και ότι, επιπλέον, η ακόλουθη έκθεση στο φως επιφέρει υποτροπή σε αυτές. Το έναυσμα, το οποίο προκάλεσε το σύγχρονο ενδιαφέρον για τη Φωτοδυναμική Θεραπεία, δόθηκε τη δεκαετία του '60, όταν ανακαλύφθηκε το παράγωγο της αιματοπορφυρίνης, γνωστό ως Photofrin, το οποίο αποτέλεσε και τον πρώτο φωτοευαισθητοποιητή, ο οποίος εγκρίθηκε για κλινική εφαρμογή για την καταπολέμηση του καρκίνου, σε πολλές χώρες. Με την πάροδο του χρόνου, συνειδητοποιήθηκαν οι αδυναμίες της πρώιμης αυτής θεραπείας, οδηγώντας την έρευνα σε κατευθύνσεις για τη βελτίωση στα μέγιστα. Αναφέρονται οι ακόλουθες αδυναμίες: παρατεταμένη ευαισθησία στο ηλιακό φως βλάβης (καταστροφή γειτονικών υγειών περιοχών), ελλιπής διείσδυση του φωτός σε σχέση με

το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται και το γεγονός ότι η θεραπεία αυτή αποτελούσε μια περίπλοκη τεχνική της οποίας οι επιμέρους παράμετροι δεν ήταν πλήρως γνωστές.

Στις μέρες μας, η έρευνα προσανατολίζεται στην ανάπτυξη νέων φωτοευαισθητοποιών ουσιών, καθώς και στην κατανόηση των μηχανισμών σε κυτταρικό επίπεδο, που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο και κατ' επέκταση στη θεραπεία της νόσου. Επιπλέον διερευνώνται και οι άλλοι μηχανισμοί δράσης της ΦΔΘ οι οποίοι οδηγούν στην καταστροφή του όγκου, όπως η καταστροφή της αγγείωσης και η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Επίσης ερευνάται και η δυνατότητα συνδυασμένης δράσης της ΦΔΘ με άλλες θεραπείες. (3)

Η συνειδητοποίηση του γεγονότος ότι η απόπτωση είναι ύψιστης σημασίας για την εμβρυϊκή ανάπτυξη και για το ανοσοποιητικό σύστημα οδήγησε σε έρευνα για το πώς θα μπορούσε αυτή η πρωταρχική ιδιότητα να αξιοποιηθεί για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων ιστών και συγκεκριμένα των καρκινικών κυττάρων. Η θεραπεία με χρήση ιοντιζουσών ακτινοβολιών καθώς και η Χημειοθεραπεία προκαλούν απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα, διαφέρουν όμως ως προς τη Φωτοδυναμική Θεραπεία στο ότι οι πρώτες στοχεύουν να βλάψουν το DNA και να οδηγήσουν στην απόπτωση μέσω των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, της ανάσχεσης της ανάπτυξης και της ενεργοποίησης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου¹ρ53.Η ΦΔΘ, ωστόσο, δρα μέσω της απόκρισης σε οξεία καταπόνηση, περιλαμβάνοντας τη μιτοχονδριακή καταστροφή, την έκκριση του ενζύμου κυτοχρωμικής-coξειδάσης και το σχηματισμό ενός αποπτωτικού σωματίου, μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών.

Το πεδίο που αφορά στους μεταγραφικούς παράγοντες είναι και αυτό πολύ σημαντικό για την κατανόηση της ΦΔΘ. Πρόκειται για πρωτεΐνες οι οποίες εκκρίνονται συχνά έπειτα από οξεία καταπόνηση, προσδένονται σε ειδικές περιοχές του DNA και έτσι οδηγούν στη μεταγραφή γονιδίων και κατά συνέπεια στην παραγωγή πληθώρας πρωτεϊνών οι οποίες επιδρούν στην κυτταρική λειτουργία και στον κυτταρικό θάνατο ή την επιβίωση.

Ένα από τα καίρια ερωτήματα στην έρευνα για τη ΦΔΘ είναι κάτω από ποιες συνθήκες τα καρκινικά κύτταρα γίνονται περισσότερο επιδεκτικά στον κυτταρικό θάνατο (επαγόμενο από ΦΔΘ) σε σχέση με τα φυσιολογικά. Οι ποικίλες μεταλλάξεις στα καρκινικά κύτταρα οι οποίες προκαλούνται από την έκφραση των ογκογονιδίων προκαλούν είτε αυξημένη είτε μειωμένη επιδεκτικότητα στη ΦΔΘ. Όμως, θεωρείται ότι πολλές μεταλλάξεις, οι οποίες οδηγούν σε ανθεκτικότητα έναντι της Θεραπείας με ιοντίζουσες ακτινοβολίες ή της Χημειοθεραπείας, δεν οδηγούν σε ταυτόχρονη ανθεκτικότητα έναντι της ΦΔΘ. Εάν η υπόθεση αυτή εν τέλει αποδειχτεί, τότε η ΦΔΘ μπορεί να αποτελέσει εναλλακτική πρόταση σε περιπτώσεις όπου οι συμβατικές αυτές θεραπείες αποτυγχάνουν. Ένα άλλο πλεονέκτημα της ΦΔΘ είναι ότι δεν

¹ Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια υπάρχουν στα φυσιολογικά κύτταρα· η λειτουργία τους είναι να ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα καρκινικά κύτταρα μεταξύ των άλλων μεταλλάξεων που έχουν υποστεί, έχουν επιπλέον χάσει το p53.

προκαλεί αθροιστική βλάβη, με αποτέλεσμα να μπορεί να εφαρμοστεί κατ' επανάληψη σε περιπτώσεις όπου αυτό κρίνεται αναγκαίο. (4)

II. $\Phi\Omega TOEYAI\Sigma\Theta HTOHOIHTE\Sigma$

i. Ο ιδανικός Φωτοευαισθητοποιητής

Από την πρώτη χρήση του παράγωγου της αιματοπορφυρίνης μέχρι τις μέρες μας γίνεται διαρκής προσπάθεια για την ανεύρεση ουσιών με τις βέλτιστες ιδιότητες. Διαδικασία αρκετά περίπλοκη και επομένως επίπονη. Συνοψίζονται εδώ κάποιες βασικές προϋποθέσεις τις οποίες υποχρεούται να πληροί ο «ιδανικός φωτοευαισθητοποιητής».

Πρώτιστα θα πρέπει να είναι μη τοξικός απουσία ακτινοβολίας, τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα πειραματόζωα, που χρησιμοποιούνται στην έρευνα για τη συγκεκριμένη θεραπεία. Μη τοξικός και κατά τη διαδικασία της έγχυσης στον οργανισμό (να μην προκαλεί υπόταση ή αλλεργική αντίδραση). (3) (5) (6)

Να μην προκαλεί καρκινογένεση ή να διεγείρει μεταστάσεις. (5) (6)

Οι τελευταίας γενιάς ΦΕ θα πρέπει να απορροφούν το φως στην περιοχή του ερυθρού και μακράν του ερυθρού. Η φασματική αυτή περιοχή επιλέγεται τέτοια ώστε το φως να μπορεί να εισχωρεί βαθύτερα στους ιστούς. Φωτοευαισθητοποιητές που απορροφούν σε μικρότερα μήκη κύματος, (τα οποία έχουν μικρότερη διείσδυση στους ιστούς) φαίνεται ότι οδηγούν σε ανεπιθύμητη φωτοευαισθησία του δέρματος, διότι μπορούν να διεγερθούν από το ηλιακό φως. Ένα επιπλέον μειονέκτημα των μικρών μηκών κύματος είναι το ότι δεν επιτρέπουν την εφαρμογή της ΦΘΔ σε όγκους εβρισκόμενους σε βάθος. Ζώνες απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος δεν είναι χρήσιμες διότι τότε τα φωτόνια δεν θα έχουν επαρκή ενέργεια για να μεταφέρουν στους Φωτοευαισθητοποιητές ώστε να διεγερθεί το φαινόμενο. (3) (5) (6)

Θα πρέπει να έχει υψηλή απορρόφηση από τον ιστό-στόχο, έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται η ποσότητα που πρέπει να εγχυθεί στον οργανισμό, για να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα. (3) (6)

Βασική ιδιότητα είναι η επιλεκτικότητα της συγκέντρωσης, δηλαδή ο λόγος της ποσότητας που συγκεντρώνεται στον πάσχοντα ιστό προς την ποσότητα που κατακρατείται από υγιείς ιστούς. Ιδανικά πρέπει να απορροφάται αποκλειστικά από τον ιστό στόχο, ώστε να μη βλάπτονται οι γύρω ιστοί. (1) (5) (6) Η υποκυττάρια επιλεκτικότητα στη συσσώρευση είναι επίσης σημαντική. Προτιμότερο είναι να συγκεντρώνεται σε μιτοχόνδρια ώστε να προκαλείται απόπτωση και όχι νέκρωση των κυττάρων. (5) (6)

Επιπλέον η σύνθεση του Φωτοευαισθητοποιητή θα πρέπει να είναι σχετικά εύκολη και τα πρωταρχικά υλικά να υπάρχουν σε αφθονία, ώστε να είναι δυνατή η ευρείας κλίμακας παραγωγή. (3) (5) (6)

Ο ΦΕ θα πρέπει να διαθέτει χημική καθαρότητα, φυσική και χημική σταθερότητα, έτσι ώστε οι ιδιότητες του να είναι σταθερές και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί μαζικά, μέσω του κατάλληλου πρωτόκολλου. (1) (3) (6)

Το διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της χορήγησης του ΦΕ και της μέγιστης συσσώρευσης στον όγκο να είναι όσο το δυνατό πιο σύντομο. Σύντομος θα πρέπει να είναι και ο χρόνος μέχρι να αποβληθεί από τον οργανισμό, μετά τη θεραπεία, ώστε να ελαχιστοποιείται η διάρκεια φωτοευαισθησίας στο ηλιακό φως. (1) (3) (6)

Επιπλέον είναι επιθυμητό να είναι διαλυτός είτε στο νερό είτε σε μη τοξικό μίγμα υδατικού διαλύματος, ώστε να μπορεί να χορηγηθεί στον οργανισμό μέσω έγχυσης και να πάει στον στόχο μέσω του κυκλοφορικού συστήματος.(3) (6)

Τέλος είναι επιθυμητή η ύπαρξη ολοκληρωμένης μεθοδολογίας για την απεικόνιση της απορροφώμενης δόσης του ΦΕ καθώς και την επακόλουθη απόκριση της θεραπείας, μέσω μετρήσεων φθορισμού in vivo. (3) (6)

ii. Οικογένειες και γενιές Φωτοευαισθητοποιητών

Οι φωτοευσθητοποιητές μπορούν να ταξινομηθούν σε *οικογένειες* σύμφωνα με τη χημική τους σύνθεση. Στο σημείο αυτό αναφέρονται τρεις σημαντικές οικογένειες. Αυτές που βασίζονται στην πορφυρίνη, στη χλωροφύλλη και τις χρωστικές. Επιπλέον, η οικογένεια της πορφυρίνης διακρίνεται σε τρεις *γενιές*.

Στην πρώτη οικογένεια, την οικογένεια της πορφυρίνης, ανήκουν φωτοευαισθητοποιητές παράγωγα της αιματοπορφυρίνης (HpD-Hematoporphyrin derivative), παράγωγα της βενζοπορφυρίνης (BpD- Benzoporphyrin derivative), το 5-αμινολεβουλινικό οξύ (ALA5-Aminolevulinic acid) και οι texaphyrines.

Στην οικογένεια της χλωροφύλλης ανήκουν οι χλωρίνες, οι βακτηριοχλωρίνες και οι πουρπουρίνες.

Στην οικογένεια των χρωστικών ανήκουν οι φθαλοκυανίνες και οι ναφθαλοκυανίνες.

Σημειώνεται εδώ ότι ο χωρισμός σε οικογένειες δεν είναι αποκλειστικός, για παράδειγμα η m-TPC εντάσσεται στην οικογένεια της χλωροφύλλης, αλλά είναι και παράγωγο της πορφυρίνης.(6)

Photofrin (οικογένεια πορφυρίνης)

Είναι ο πρώτος φωτοευαισθητοποιητής που χρησιμοποιήθηκε κλινικά. Είναι μίγμα περίπου 60 μονομερών, διμερών και ολιγομερών της αιματοπορφυρίνης. Το φάσμα απορρόφησης παρουσιάζει έξι κορυφές, με την κυριότερη στα 400 nm και την ασθενέστερη στα 630 nm. Αν και στα 630 nmη απορρόφηση είναι μικρή, αυτό είναι το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται τόσο πειραματικά όσο και κλινικά, διότι σε αυτό το μήκος κύματος η διεισδυτικότητα της ακτινοβολίας στον ιστό είναι υψηλότερη.

Το σημαντικότερο μειονέκτημα της Photofrin είναι η παρατεταμένη φωτοευαισθησία του ασθενή στο ηλιακό φως, διότι αφενός έχει μεγάλο συντελεστή απορρόφησης σε μήκη κύματος όπου παρουσιάζει μέγιστο η ηλιακή ακτινοβολία και αφετέρου διότι κατακρατείται από τους υγιείς ιστούς για τέσσερις έως έξι εβδομάδες μετά τη χορήγηση.(5)

m-THPC (οικογένεια χλωροφύλλης)

Η 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη (m-THP) φαίνεται μέχρι στιγμής να είναι ο φωτοευαισθητοποιητής με τις καλύτερες ιδιότητες από την ομάδα των χλωρινών. Η m-THPπαρουσιάζει δύο κορυφές στο φάσμα απορρόφησης, μία κύρια στα 415nm και μία δευτερεύουσα στα 652 nm. Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα είναι η παραμένουσα φωτοευαισθησία για δύο εβδομάδες περίπου και ο οξύς πόνος κατά τη διάρκεια της θεραπείας. (7)

ΦΕ από την οικογένεια των χρωστικών

Οι περισσότερες χρωστικές που χρησιμοποιούνται στα μελάνια είναι αποτελεσματικοί ΦΕ. Κλινική εφαρμογή βρίσκουν κυρίως οι φθαλοκυανίνες και οι ναφθαλοκυανίνες. Ενεργοποιούνται στα 650-850 nm με 100J/cm². Οι περισσότερες χρωστικές είναι υδρόφοβες, επομένως χρειάζονται κάποιο φορέα για να οδηγηθούν στον ιστό στόχο. Είτε εγκλείονται σε λιποσώματα, είτε προσδένονται σε κάποιο μέταλλο. (6)

Φωτοευαισθητοποιητές πρώτης γενιάς

Η πρώτη γενιά περιλαμβάνει παράγωγα της αιματοπορφυρίνης και τη Photofrin.

Φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς

Η δεύτερη γενιά ΦΕ αναπτύχθηκε για να αντιμετωπίσει σημαντικές δυσκολίες που προέκυψαν από τη χρήση ΦΕ πρώτης γενιάς, όπως η παρατεταμένη εναπομείνασα φωτοευαισθησία και τη μη ικανοποιητική διείσδυση στους ιστούς.

Οι ΦΕ δεύτερης γενιάς είναι χημικώς πιο απλοί, συγκρινόμενοι με τους ΦΕ πρώτης γενιάς, απορροφούν ακτινοβολία σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, ενώ προκαλούν λιγότερη φωτοευαισθησία στο δέρμα, μετά το πέρας της θεραπείας. Επιπλέον ΦΕ δεύτερης γενιάς οφείλουν να είναι τουλάχιστον εξίσου αποτελεσματικοί με τη Photofrin στην ικανότητα καταστροφής των όγκων. Από τη δεύτερη γενιά, αναφέρεται ο ΦΕ Foscan ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.(6)

Foscan

Μέσο-τετρα-υδροξυφαινυλο-χλώριο με τις εμπορικές ονομασίες Foscan και Temoporfin. Ανήκει στην οικογένεια των Χλωρινών, ενεργοποιείται στα 652 nm και έχει μοριακό συντελεστή απόσβεσης 3x10⁴M⁻¹cm⁻¹. Είναι εξαιρετικά δραστικός φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς, υδρόφοβος, με χρόνο ημιζωής στον ανθρώπινο οργανισμό 45-65h. (8)

Το Foscan έχει πάρει έγκριση στην Ευρώπη για την ανακουφιστική θεραπεία καρκίνων του αυχένα και της κεφαλής, το 2001. Λόγω της υψηλής δραστικότητας του Foscan για να επιτευχτεί μια ισχυρή απόκριση απαιτούνται εξαιρετικά χαμηλές δόσεις και μικρή ένταση ακτινοβολίας. Συγκρινόμενο μάλιστα με τη Photofrin, για το ίδιο αποτέλεσμα απαιτούνται 100 φορές χαμηλότερες δόσεις. (9)

Ο μηχανισμός δράσης του Foscan είναι η άμεση πρόκληση τοξικότητας στα καρκινικά κύτταρα καθώς και βλαβών στο αγγειακό σύστημα.

Μελέτες φαρμακοκινητικής έδειξαν ότι η συγκέντρωση του Foscan δε σχετίζεται ούτε με το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών αλλά ούτε και με το μεταβολισμό της χοληστερόλης. Οι παραμένουσες συγκεντρώσεις του ΦΕ που παρατηρούνται στο πλάσμα του αίματος, μετά την ενδοφλέβια έγχυση, επομένως, μπορεί να οφείλονται στο σχηματισμό μιας αποθήκης φαρμάκου στο αγγειακό σύστημα. Η δημιουργία αποθήκης φαρμάκου είναι μία υπόθεση για να ερμηνευτούν παραμένουσες συγκεντρώσεις συγκεντρώσεις εγχεόμενων ουσιών. Συνήθως προτείνονται ως πιθανά για τον εν λόγω σχηματισμό τα απεκκριτικά όργανα (ήπαρ, νεφροί). Οι συγκεκριμένοι μελετητές δίνουν την ερμηνεία ότι η αποθήκη σχηματίστηκε στο αγγειακό σύστημα διότι παρατήρησαν αποχρωματισμό της φλέβας όπου είχε γίνει η έγχυση σε αρκετούς ασθενείς για διάστημα από δύο εβδομάδες έως έξι μήνες. (10)

Σημαντικά αποτελέσματα έχουν επιτευχτεί με τη χρήση του Foscan: -- κλινικές μελέτες σε ασθενείς με κακοήθες μεσοθηλίωμα έδειξαν ότι μπορεί να επιτευχτεί καταστροφή του όγκου έως και σε βάθος 10mm. (11)

--άλλες μελέτες σε περιπτώσεις καρκίνου του εγκεφάλου έδειξε ότι το Foscan έχει την ικανότητα να συσσωρεύεται στα καρκινικά κύτταρα και όχι στα υγιή σε αναλογία 100:1, αναδεικνύοντας έτσι τη ΦΔΘ με Foscan σε ιδιαίτερα επιλεκτική μέθοδο θεραπείας. (12) (13) (14)

--άλλη έρευνα που αφορά σε θεραπεία του καρκίνου του χείλους, σε πρώιμο στάδιο, έδειξαν πλήρη ίαση σε ποσοστό 96% των ασθενών, γεγονός που επιβεβαιώθηκε 12 εβδομάδες μετά τη θεραπεία, μέσω βιοψιών. (15)

Παρά το γεγονός ότι το Foscan φαίνεται να είναι ένας από τους πιο δραστικούς ΦΕ, παρουσιάζει το μείζον μειονέκτημα της παραμένουσας φωτοευαισθησίας στο ηλιακό φως για αρκετές εβδομάδες μετά τη θεραπεία, η βέλτιστη δράση του Foscan απαιτεί η φωτοθεραπεία να γίνει μία εβδομάδα μετά την ενδοφλέβια χορήγηση του φαρμάκου, στοιχείο που αποτελεί ένα ακόμα σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου. Παρά τα μειονεκτήματα του, το Foscan είναι ένας σημαντικός ΦΕ, που μπορεί να προσφέρει κλινικά οφέλη σε ασθενείς που έχουν εξαντλήσει τυπικές μεθόδους θεραπείας. (5)

Άλλοι ΦΕ δεύτερης γενιάς είναι:

Tookad (Palladium bacteriopherophorbide)

Προκαλεί ελάχιστη ή μηδαμινή φωτοευαισθησία, λόγω του πολύ μικρού χρόνου ημιζωής του στο πλάσμα του αίματος. Επιπλέον έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιείται σε σχετικά μεγάλα μήκη κύματος, επιτυγχάνοντας έτσι διείσδυση έως και 4 mm. (5)

Pulrytin (Tine thyletiopurpurin)

Πλεονεκτεί της Photofrin, λόγω του μεγαλύτερου βάθους διείσδυσης, καθώς όμως δεν είναι διαλυτή στο νερό, πρέπει να διαλύεται σε γαλακτώματα λιπιδίων με αποτέλεσμα να παρουσιάζει τοξικότητα σκότους. (5)

Lutrin (motexafin lutetium, Lu-Tex)

Έχει δοκιμαστεί κλινικά, με θετικά αποτελέσματα, σε καρκίνο του στήθους και του προστάτη. Προκαλεί ελάχιστη παραμένουσα φωτοευαισθησία, καλή απορρόφηση στα 732nm, είναι διαλυτή στο νερό, όμως σε μερικούς ασθενής προκάλεσε οξύ πόνο. (5)

Φωτοευαισθητοποιητές τρίτης γενιάς

Η τρίτη γενιά ΦΕ αναπτύχθηκε ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερη επιλεκτικότητα στην απορρόφηση από τους καρκινικούς ιστούς. Η τρίτη γενιά ΦΕ αποτελείται από σημαντικούς ΦΕ δεύτερης γενιάς, που έχουν συζευχθεί ή εγκλειστεί σε μόρια –φορείς, τα οποία οδηγούν τους ΦΕ στον καρκινικό ιστό.

Τέτοια βιομόρια-φορείς είναι μονοκλωνικά αντισώματα, πολυμερή ή λιποσώματα.

Καθώς τα καρκινικά κύτταρα παράγουν αντιγόνα στην επιφάνεια τους τα οποία διαφέρουν σημαντικά από εκείνα των φυσιολογικών κυττάρων, επιτρέπεται στα μονοκλωνικά αντισώματα να δρουν ως επιλεκτικοί διανομείς του Φωτοευαισθητοποιητή.

ΦΕ συζευγμένοι με μονοκλωνικά αντισώματα προσδένονται επιλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα, διευκολύνοντας έτσι τη φωτοευαισθητοποίηση του καρκινικού ιστού, αφήνοντας ανέπαφους τους φυσιολογικούς ιστούς.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά δύο σκευάσματα της mTHPC, το FosPeg και τοFoscan. Ο FosPeg είναι ΦΕ τρίτης γενιάς, και ουσιαστικά είναι Foscan εγκλεισμένος σε λιποσώματα. Το σκεύασμα με την εμπορική ονομασία Foscan, όπως προαναφέρθηκε περιέχει την απλή μορφή της mTHPC. (16) (17)

Φωτοευαισθητοποιητές εγκλεισμένοι σε λιποσώματα - FosPeg

Καθώς οι περισσότεροι ΦΕ είναι υδρόφοβοι, όταν εγχέονται στο αίμα, που είναι υδατικό διάλυμα, σχηματίζουν συσσωματώματα. Όμως η μορφή μονομερούς είναι εκείνη που έχει τις επιθυμητές φωτοφυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες. Επομένως ο εγκλεισμός του ΦΕ σε λιποσώματα, εξασφαλίζει τη διατήρηση της μορφής του μονομερούς. (18)

Τα λιποσώματα, καθώς είναι τεχνητά κυστίδια, αποτελούμενα από φωσφολιπίδια, είναι βιοσυμβατά και βιοδιασπώμενα. Αποτελούνται από μία ή περισσότερες διπλοστιβάδες λιπιδίων και στο εσωτερικό τους έχουν υδατικό διάλυμα. (18)

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι κατασκευής λιποσωμάτων, από τους οποίους εξαρτάται το μέγεθος, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, η επιφανειακή πυκνότητα φορτίου, ο βαθμός υδροφοβικότητας. Επιγραμματικά αναφέρονται η σπηλαίωση υπερήχων και η εξώθηση μεμβράνης. (18)

Η δομή του λιποσώματος πρέπει να εξασφαλίζει την επιβίωση του για μεγάλο χρονικό διάστημα στο κυκλοφορικό σύστημα, ώστε να αποφευχθεί η φαγοκύτωση πριν κατορθώσει να φτάσει στον προορισμό του. Έτσι η επιφάνεια του λιποσώματος εμπλουτίζεται με πολυμερή όπως η πολυαιθυλενική γλυκόλη –polyethylene glycol-PEG. Η PEG εμποδίζει την πρόσδεση

πρωτεϊνών αυξάνοντας τον χρόνο ημιζωής του νανοσωματιδίου στην κυκλοφορία του αίματος. (18)

Το σκεύασμα FosPeg είναι m-THPC εγκλεισμένη σε λιποσώματα που φέρουν στην επιφάνειά τους το πολυμερές πολυαιθυλενική γλυκόλη-PEG. Πολλές μελέτες ισχυρίζονται ότι εμφανίζει καλύτερη φαρμακοκινητική συμπεριφορά καθώς και θεραπευτική αποτελεσματικότητα και από την σκέτη ουσία m-THPC και από την εγκλεισμένη σε συμβατικά λιποσώματα.

Στο εργαστήριό μας έχει μελετηθεί η αποτελεσματικότητα της mTHPC, για τις δύο μορφές της, την απλή- Foscan και τη λιποσωμική-Fospeg, σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη. Η υπεροχή της λιποσωμικής μορφής διαπιστώθηκε για κάθε δόση ακτινοβολίας και κάθε συγκέντρωση. Συγκεκριμένα για δόση ακτινοβολίας 180 mJ/cm² η συγκέντρωση που απαιτείται ώστε να πέσει η βιωσιμότητα στο μισό είναι 0,15 μg/ml για το Fospeg, ενώ για το Foscan 1,2 μg/ml. Επίσης μελέτες φαρμακοκινητικής, με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, μετά από 24 ώρες επώασης έδειξαν μεγαλύτερη ενδοκυττάρια συγκέντρωση του Fospeg. (19)

Οι Buchholz et al. αναφέρουν συσσώρευση στον όγκο 2-4 φορές μεγαλύτερη τηςm-THPC εγκλεισμένης σε λιποσώματα σε σχέση με την απλή μορφή του. Επίσης ο χρόνος ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη συσσώρευση ήταν 5,5 φορές μικρότερος για τη λιποσωμική μορφή. (20)

Οι Pegaza et al. διαπίστωσαν ότι ΦΔΘ με FosPeg επέφερε μεγαλύτερη καταστροφή της αγγείωσης του όγκου, σε σύγκριση με m-THPC εγκλεισμένο σε συμβατικά λιποσώματα. Αυτό υποδεικνύει ότι η παρουσία της PEG οδήγησε στη δημιουργία θρόμβων. (21)

Οι Ris et al. αναφέρουν ότι πέτυχαν εκτεταμένη νέκρωση με τη χρήση PEG –m-THPC, σε πειράματα με ξενομοσχεύματα, σε σχέση με την απλή m-THPC. Η ενίσχυση της Φωτοδυναμικής δράσης παρουσία της PEG ερμηνεύτηκε με την επιλεκτική συσσώρευση που προκλήθηκε. (22)

iii. Υποκυττάριος εντοπισμός φωτοευαισθητοποιητών

Ο πιο σημαντικός παράγοντας που καθορίζει το αποτέλεσμα της ΦΔΘ είναι το πώς ο φωτοευαισθητοποιητής επιδρά με τα κύτταρα του ιστού-στόχου ή του καρκίνου. Το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό της επίδρασης αυτής είναι ο υποκυττάριος εντοπισμός του ΦΕ, διότι ο ΦΕ έχει τη δυνατότητα να συγκεντρωθεί μεταξύ πολλών διαφορετικών οργανιδίων, όπως τα λυσοσωμάτια², τα μιτοχόνδρια³, η πλασματική μεμβράνη⁴, το σύμπλεγμα Golgi⁵και το ενδοπλασματικό δίκτυο⁶.

Ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός, για μια πληθώρα ΦΕ, έχει διερευνηθεί, σε κυτταρικές καλλιέργειες. Σημαντικά γνωρίσματα αποτελούν το καθαρό ιοντικό φορτίο, ο βαθμός υδροφοβικότητας και ο βαθμός ασυμμετρίας που εμφανίζουν τα μόρια του ΦΕ. Οι ΦΕ, οι οποίοι είναι υδρόφοβοι και έχουν δύο ή λιγότερα αρνητικά φορτία, διαχέονται διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης και στη συνέχεια εντοπίζονται σε άλλες ενδοκυτταρικές μεμβράνες. Οι ΦΕ του είδους αυτού τείνουν να απορροφώνται περισσότερο από τα κύτταρα, από όσο ΦΕ με μεγαλύτερο φορτίο, οι οποίοι παρουσιάζουν μεγάλη πολικότητα που δεν τους επιτρέπει να διαχυθούν μέσω της πλασματικής μεμβράνης. Οι δεύτεροι αυτοί ΦΕ συλλαμβάνονται από το κύτταρο μέσω της διαδικασίας της ενδοκύτωσης.

Η απορρόφηση του ΦΕ από τα καρκινικά κύτταρα είναι εξαιρετικά σημαντική για την αποτελεσματικότητα της ΦΔΘ, διότι τα ROS⁷έχουν πολύ μικρό χρόνο ημιζωής και δρουν πολύ κοντά στο σημείο όπου παράγονται. Το είδος της φωτοκαταστροφής που υφίστανται τα κύτταρα, τα οποία έχουν απορροφήσει ΦΕ και έχουν φωτιστεί, εξαρτάται από τον ακριβή υποκυττάριο εντοπισμό του ΦΕ. Η κατανόηση λοιπόν του υποκυττάριου εντοπισμού, είναι σημαντική για την κατάλληλη επιλογή ΦΕ, ανάλογα με την εκάστοτε εφαρμογή. (1) (3) (23)

Στο σημείο αυτό αναφέρονται κάποια από τα σημαντικότερα οργανίδια όπου συσσωρεύεται ο ΦΕ.

²Λυσοσωμάτιο: ενδοκυττάριο μεμβρανικό οργανίδιο, το οποίο περιέχει πεπτικά ένζυμα. Το εσωτερικό ενός λυσοσωματίου είναι πολύ όξινο και τα ένζυμά του είναι πολύ δραστικά σε όξινο PH.(23)

³Μιτοχόνδριο: μεμβρανικό οργανίδιο, με μέγεθος περίπου ίσο με το μέγεθος ενός βακτηρίου. Που διενεργεί οξειδωτική φωσφορυλίωση και παράγει το μεγαλύτερο μέρος του ΑΤΡ των ευκαρυωτικών κυττάρων (23)

⁴Κυτταρική ή πλασματική μεμβράνη: η μεμβράνη που περιβάλλει ένα ζωντανό κύτταρο.(23)

⁵Σύμπλεγμα Golgi: μεμβρανικό οργανίδιο, όπου υφίστανται τροποποίηση οι πρωτεΐνες που παράγονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (23)

⁶Ενδοπλασματικό δίκτυο: ένα λαβυρινθώδες μεμβρανικό διαμέρισμα, που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, όπου εκκρίνονται τα λιπίδια και παρασκευάζονται οι μεμβρανικές πρωτεΐνες (23)

⁷δραστικά είδη οξυγόνου (reactiveoxygenspecies –ROS) -αναφέρονται στη συνέχεια

Λυσοσώματα

Τα λυσοσωμάτια, προτάθηκαν αρχικά(1993) ως τα πλέον κρίσιμα σωματίδια για τον εντοπισμό των ΦΕ. Επόμενες έρευνες όμως έδειξαν ότι, παρόλο που εντοπισμένος ΦΕ στα σωματίδια αυτά μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο (εφόσον φωτιστεί),η σχετική αποτελεσματικότητα είναι πολύ χαμηλότερη, από αυτήν που προκαλούν οι ΦΕ που εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια ή άλλα οργανίδια. (24)

Στα λυσοσώματα συγκεντρώνονται οι ανιονικές πορφυρίνες, με φορτίο -2. Έχει παρατηρηθεί ότι η αρχική συγκέντρωση του ΦΕ στα λυσοσώματα ανακατανέμεται, μετά από μικρή έκθεση στην ακτινοβολία. Συγκεκριμένα ο ΦΕ οδεύει προς το κυτταρόπλασμα και από εκεί στον πυρήνα του κυττάρου. (25)

Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν σημαντικά οργανίδια για τη συγκέντρωση των ΦΕ και ως προς την αποτελεσματικότητα μετά την ακτινοβόληση. Πολλοί ΦΕ, μέσω της μιτοχονδριακής καταστροφής, προκαλούν απόπτωση (ένα είδος κυτταρικού θανάτου που θα συζητηθεί στη συνέχεια). (3)

Υδρόφοβοι ΦΕ, με κατιονικό φορτίο, τείνουν να συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια. Αυτό εξηγείται από την επίδραση του ηλεκτρικού δυναμικού της μεμβράνης τους, καθώς και από το διπλό στρώμα λιπιδίων που η μεμβράνη διαθέτει. Έχει παρατηρηθεί ότι τα μιτοχόνδρια καρκινικών κυττάρων τείνουν να συσσωρεύουν κατιονικές χρωστικές σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από τα μιτοχόνδρια των φυσιολογικών κυττάρων. (26)

Πλασματική μεμβράνη

Οι ουσίες που έχουν την τάση να συγκεντρώνονται στην πλασματική μεμβράνη είναι γενικά άσχετες με τη ΦΔΘ.Η Photofrin (εμπορική ονομασία του HpD),που είναι ο πρώτος ΦΕ, παρουσιάζει μία δυναμική κατανομή, μεταξύ των κυτταρικών οργανιδίων. Τις πρώτες τρεις ώρες τις επώασης (σε πείραμα in vitro) παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωσή της στην πλασματική μεμβράνη, ενώ στο σύμπλεγμα Golgi επέδρασε μετά από 24 ώρες. Η επίδραση της ΦΔΘ, όπου παρατηρείται συγκέντρωση ΦΕ στην πλασματική μεμβράνη διαπιστώθηκε ότι είναι η διακοπή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, για χαμηλή δόση. Για υψηλότερη δόση παρατηρήθηκε ρήξη της πλασματικής μεμβράνης και διαστολή του κυττάρου, αμέσως μετά την ακτινοβόληση. Χαρακτηριστικά της τυπικής απόπτωσης όπως έκκριση φωσφατιδυλσερίνης και θραύσεις στο DNA δεν παρατηρήθηκαν. (27)

Σύμπλεγμα Golgi

Μελέτη για τη συγκέντρωση του ΦΕ Foscan⁸(ανήκει στην κατηγορία των χλωρινών) έδειξε χαμηλή συγκέντρωση στα λυσοσωμάτια και ασθενή συσσώρευση στα μιτοχόνδρια. Εικόνες φθορισμού, που πάρθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο, έδειξαν πολύ υψηλή συγκέντρωση στο σύμπλεγμα Golgi και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Επιπλέον, αυτά τα οργανίδια βλάπτονται κατά κύριο λόγο όταν χρησιμοποιείται ο ΦΕ Foscan. Το γεγονός αυτό αποδείχτηκε μέσω της εκτίμησης της δραστηριότητας επιλεγμένων οργανιδίων, αμέσως μετά την ακτινοβόληση. (28) (29)

iv. Το «οπτικό παράθυρο» των ιστών

Είναι σημαντικό για τη ΦΔΘ να μπορεί να προβλεφθεί η χωρική κατανομή της ακτινοβολίας, στον ιστό που αποτελεί τον στόχο. Το φως είτε σκεδάζεται είτε απορροφάται, όταν εισέρχεται στον ιστό. Η έκταση και των δύο φαινομένων εξαρτάται από το είδος του ιστού και από το μήκος κύματος. Η οπτική των ιστών περιλαμβάνει τη μέτρηση της χωρικής/χρονικής κατανομής και το μέγεθος των δομών που επηρεάζονται, την οπτική τους απορρόφηση και τις ιδιότητες της σκέδασης. Η ανομοιογένεια των βιολογικών δομών προκαλεί σκέδαση, με αποτέλεσμα η εικόνα που παρατηρείται μικροσκοπικά να είναι θολή. Η πολλαπλή σκέδαση στο ανομοιογενές μέσον προκαλεί διάχυση της φωτεινής δέσμης και απώλεια της κατευθυντικότητας. Η απορρόφηση οφείλεται κυρίως στα ενδογενή χρωμοφόρα των ιστών, όπως η αιμοσφαιρίνη, η μυοσφαιρίνη και τα κυτοχρώματα.

Η σκέδαση είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας ανάσχεσης της διείσδυσης του φωτός, στους περισσότερους ιστούς. Καθορίζεται από τον συντελεστή σκέδασης μ_s, όπου για μαλακούς ιστούς κυμαίνεται από 100 έως 1000 cm⁻¹. Η απορρόφηση είναι συνήθως λιγότερο σημαντική, καθορίζεται από το συντελεστή απορρόφησης μ_a, οι τιμές του βρίσκονται μεταξύ των 0,1 και 5 cm⁻¹, για τους περισσότερους ιστούς, για την περιοχή του πράσινου και μεγαλύτερων μηκών κύματος. Η τρίτη παράμετρος είναι ο ανισοτροπικός παράγοντας, ο οποίος είναι ένα μέτρο της αλλαγής κατεύθυνσης της σκεδαζόμενης δέσμης.

Η συνδυασμένη θεώρηση της απορρόφησης, στα χαμηλότερα μήκη κύματος (από τα χρωμοφόρα των κυττάρων) με την μειωμένη σκέδαση στα μεγαλύτερα μήκη κύματος και της απορρόφησης από το νερό σε μήκη κύματα μεγαλύτερα από τα 1100 nm, οδηγεί στο λεγόμενο «οπτικό παράθυρο» των ιστών στα 600-1100nm. (3)

⁸Ο φωτοευαισθητοποιητής Foscan[®] (μετα-τετραϋδροξυφαινυλοχλωρίνη) είναι δεύτερης γενιάς, έχει λάβει ευρωπαϊκή έγκριση για την ανακουφιστική θεραπεία καρκίνων της κεφαλής και του αυχένα (29)

III. H XPH Σ H T Ω N LASERS Σ TH $\Phi \Omega$ TO Δ YNAMIKH Θ EPA Π EIA

Τα lasers είναι πολύ δημοφιλή στη ΦΔΘ, λόγω αρκετών ιδιοτήτων τους με χαρακτηριστική σπουδαιότητα, οι οποίες τα διαφοροποιούν από τις συμβατικές πηγές φωτός. Συγκεκριμένα, αναφέρονται η συμφωνία φάσης, η μονοχρωματικότητα και ο παραλληλισμός της δέσμης στην έξοδό τους. Τα δύο κύρια χαρακτηριστικά τους, που τα καθιστούν απαραίτητα στη ΦΔΘ είναι η μονοχρωματικότητα και το ότι συνδυάζονται με οπτικές ίνες για τη μεταφορά της δέσμης στην περιοχή του στόχου. Η μονοχρωματικότητα είναι σημαντική, διότι το laserμπορεί να ρυθμιστεί σε συγκεκριμένη κορυφή απορρόφησης του ΦΕ, με αποτέλεσμα να αξιοποιείται όλη η διοχετευόμενη ενέργεια στη διέγερση και τη Φωτοδυναμική ενεργοποίηση του ΦΕ. Δε συμβαίνει το ίδιο με τις συμβατικές πηγές φωτός (π.χ. λυχνία βολφραμίου), όπου η ισχύς εξόδου μοιράζεται μεταξύ μερικών εκατοντάδων νανομέτρων στο φάσμα του υπεριώδους, του ορατού και του υπέρυθρου, με αποτέλεσμα μόνο ένα κλάσμα της ισχύος να βρίσκεται στη ζώνη απορρόφησης του ΦΕ. Ποσοτικοποιώντας τη διαφορά αυτή, διαπιστώνεται ότι για να επιτευχθεί ο ίδιος ρυθμός διέγερσης και συνεπώς ο ίδιος χρόνος θεραπείας, χρειάζεται 100 φορές μεγαλύτερη ισχύς, αν χρησιμοποιηθεί συμβατική λυχνία αντί για laser. Το άλλο σημαντικό μειονέκτημα της συμβατικής λυχνίας είναι η αδυναμία παραγωγής παράλληλης δέσμης, γεγονός που κάνει αδύνατη τη μεταφορά φωτός μέσω οπτικής ίνας.

Στην εικόνα που ακολουθεί παριστάται το οπτικό φάσμα από τα 380 έως τα 800 nm. Έχει υπερτεθεί στο φάσμα αυτό, το βάθος διείσδυσης του φωτός σε ιστό, για να δειχθεί κατά προσέγγιση πόσο βαθειά μπορεί να εισχωρήσει το φως και κατά συνέπεια να ενεργοποιήσει τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή, στα βαθύτερα στρώματα του ιστού. Ο όρος «βάθος διείσδυσης» είναι ένα μέτρο της εξασθένισης του φωτός από τον ιστό. Στο σχήμα η καμπύλη παριστά το 1/ε της προσπίπτουσας ενέργειας, δηλαδή πόσο έχει εισχωρήσει, συναρτήσει του μήκους κύματος, έως ότου να απομείνει το 1/ε της αρχικής ενέργειας. Παρουσιάζεται, επίσης, η αντιστοιχία εκπομπής των lasers και των μεγίστων απορρόφησης των φωτοευαισθητοποιητών. (30)

Από την εικόνα, γίνεται φανερό ότι στην περιοχή του μπλε έχει μόνο επιφανειακή επίδραση η ακτινοβολία, ενώ προσεγγίζοντας το ερυθρό και το εγγύς υπέρυθρο, το βάθος διείσδυσης αυξάνεται. Αυτό συμβαίνει για δύο κυρίως λόγους, την απορρόφηση και τη σκέδαση, από ποικίλα μόρια που συνιστούν τον ιστό. Παραδείγματος χάρη, στην περιοχή του μπλε και πράσινου, η απορρόφηση οφείλεται στη μελανίνη και την αιμοσφαιρίνη. Μια αξιοσημείωτη αύξηση παρατηρείται μετά τα 600nm, η οποία οδηγεί σε μια βέλτιστη περιοχή μηκών κύματος ή στο λεγόμενο «θεραπευτικό παράθυρο», στη θεραπεία με laser, στα 600-1100 nm.



Σχήμα III.1: τα Lasers που χρησιμοποιούνται στη ΦΔΘ, το βάθος διείσδυσης στον ιστό και οι φωτοευαισθητοποιητές⁹

⁹Επεξεργασμένηεικόνα, πηγή:**AJMacRobertandTTheodossiou.**Photodynamic Therary of Cancer. *Elsevier*. 2005.

Στη συνέχεια, γίνεται ανασκόπηση διαφόρων τύπων lasers τα οποία βρίσκουν εφαρμογή στη Φωτοδυναμική Θεραπεία. Η τεχνολογία των lasersέχει σημειώσει πολύ μεγάλη πρόοδο τα τελευταία χρόνια, με αποτέλεσμα να υπάρχει πληθώρα δυνατοτήτων για τη ΦΔΘ, ως προς την επιλογή του κατάλληλου laserγια ικανοποιητική συμφωνία με το φάσμα απορρόφησης πλήθους φωτοευαισθητοποιητών.

Επιπλέον, λόγω της διαρκούς αύξησης της κλινικής εφαρμογής της ΦΔΘ, πρακτικές ιδιότητες, όπως η φορητότητα και η ολοκληρωμένη μορφή της θεραπευτικής συσκευής, αναδεικνύονται πολύ σημαντικές. (30)

i. Εισαγωγή στα Lasers

Ένα Laserαποτελείται από ένα ενεργό υλικό (με δυνατότητα αντιστροφής πληθυσμών), τοποθετημένο μέσα σε κατάλληλη οπτική κοιλότητα, η οποία γενικά απαρτίζεται από δύο κάτοπτρα που το ένα βρίσκεται απέναντι από το άλλο. Παρά το γεγονός ότι το φως αυθόρμητης εκπομπής δεν είναι κατευθυντικό, ένα ποσοστό του προσπίπτει στα κάτοπτρα και επιστρέφει στο ενεργό υλικό. Αν η διάταξη των κατόπτρων είναι σωστή, και αν το ενεργό υλικό είναι οπτικά ομογενές, είναι δυνατές πολλαπλές ανακλάσεις. Το φως που διέρχεται μέσω του φθορίζοντος υλικού μπορεί να ενισχυθεί με μια διαδικασία που είναι γνωστή ως εξαναγκασμένη εκπομπή. Αν το μέσο είναι κατάλληλα προετοιμασμένο, η εξαναγκασμένη εκπομπή είναι δυνατό να υπερβεί την απορρόφηση του φωτός. Όταν η ενίσχυση είναι αρκετή τα χαρακτηριστικά της εκπομπής αλλάζουν εντελώς. Στη θέση της διάχυτης μη-κατευθυντικής εκπομπής, μια ισχυρή δέσμη μεγάλης κατευθυντικότητας διαδίδεται κατά μήκος του άξονα που ορίζεται από τα δύο κάτοπτρα. Όταν συμβαίνει μια τέτοια εκπομπή, το σύνολο που είναι γνωστό ως laser λέγεται ότι ταλαντώνεται ή διαφορετικά, ότι εκπέμπει ακτινοβολία laser. Η εκπομπή laser είναι συνήθως πάρα πολύ σύμφωνη ακτινοβολία και στο χώρο και στο χρόνο. (31)

ii. Εξαναγκασμένη εκπομπή και lasers

Ένα ηλεκτρόνιο μπορεί να διεγερθεί και να μεταβεί σε ένα ενεργειακό επίπεδο E₂ με μεγαλύτερη ενέργεια από το ενεργειακό επίπεδο E₁ στο οποίο βρισκόταν. Η μετάβαση πραγματοποιείται(σχήμα III.2.α) με την απορρόφηση ενός φωτονίου με ενέργεια hv=E₂-E₁.



Σχήμα III.2: Απορρόφηση, αυθόρμητη εκπομπή και εξαναγκασμένη εκπομπή

Όταν ένα ηλεκτρόνιο που βρίσκεται σε ένα ενεργειακό επίπεδο με μεγάλη ενέργεια μεταβαίνει σε ένα μη κατειλημμένο ενεργειακό επίπεδο με μικρότερη ενέργεια, τότε εκπέμπεται ένα φωτόνιο. Υπάρχουν δύο δυνατότητες για τη διαδικασία της εκπομπής. Το ηλεκτρόνιο μπορεί να μεταβεί αυθόρμητα στο χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο, ή μπορεί η μετάβαση να προκληθεί από ένα άλλο φωτόνιο.

Στην περίπτωση της αυθόρμητης εκπομπής το ηλεκτρόνιο μεταπίπτει από το ενεργειακό επίπεδο E_2 στο E_1 εκπέμποντας ένα φωτόνιο με ενέργεια hv= E_2 - E_1 (σχήμα III.2.β).Η μετάβαση είναι αυθόρμητη μόνον εφόσον η κατάσταση που αντιστοιχεί στην ενέργεια εκπέμποντας ένα φωτόνιο με ενέργει στην ενέργεια εκπέμποντας ένα

Στην εξαναγκασμένη εκπομπή, ένα φωτόνιο με ενέργεια hv=E₂-E₁προκαλεί τη διαδικασία της εκπομπής προκαλώντας τη μετάβαση του ηλεκτρόνιου από το ενεργειακό επίπεδοE₂στο E₁.Το φωτόνιο που εκπέμπεται βρίσκεται σε συμφωνία φάσης με το προσκρούον φωτόνιο, και τα δύο φωτόνια κινούνται προς την ίδια κατεύθυνση, έχουν την ίδια συχνότητα και επομένως έχουν την ίδια ενέργεια E_2 -E₁. Το φαινόμενο εποπτικά παρουσιάζεται σαν να προκαλείται συντονισμός του ηλεκτρόνιου που προσκρούοντος φωτονίου με το ηλεκτρόνιο, εξαναγκάζοντάς το σε ταλάντωση ίσης συχνότητας με το φωτόνιο. Η εξαναγκασμένη ταλάντωση του ηλεκτροκολεί την εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από το ηλεκτρόνιο, του οποίου το ηλεκτρικό πεδίο είναι σε φάση με το φωτόνιο. Όταν το προσκρούον φωτόνιο απομακρύνεται, τότε το ηλεκτρόνιο μπορεί να επιστρέψει στο ενεργειακό επίπεδο Ε₁, αφού έχει εκπέμψει ένα φωτόνιο με ενέργεια hv=E₂-E₁.

Η εξαναγκασμένη εκπομπή είναι η βάση για την ενίσχυση φωτονίων, αφού έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο φωτονίων από ένα μόνο προσκρούον φωτόνιο. Με βάση αυτό το φαινόμενο είναι δυνατό να κατασκευαστεί μία συσκευή που να ενισχύει το φως. Στο σχήμα ΙΙΙ.2.γ φαίνεται ότι για να προκληθεί εξαναγκασμένη εκπομπή πρέπει το προσκρούον φωτόνιο να μην απορροφάται από ένα άλλο ηλεκτρόνιο το οποίο βρίσκεται στο ενεργειακό επίπεδο Ε₁. Όταν πρόκειται να αξιοποιηθεί ένα σύνολο ατόμων προκειμένου να ενισχυθεί το φως, θα πρέπει να εξασφαλισθεί ότι η πλειοψηφία των ατόμων βρίσκεται στο ενεργειακό επίπεδο Ε₂. Αν δεν συμβαίνει αυτό, τότε τα προσκρούοντα φωτόνια θα απορροφώνται από άτομα στο ενεργειακό επίπεδο E_1 . Όταν υπάρχουν περισσότερα άτομα στο ενεργειακό επίπεδο E_2 από τα άτομα που βρίσκονται στο ενεργειακό επίπεδο E_1 , τότε λέμε ότι συμβαίνει αντιστροφή πληθυσμών. Προκύπτει ότι όταν υπάρχουν μόνο δύο ενεργειακά επίπεδα, τότε δεν είναι δυνατό να επιτευχθεί αντιστροφή πληθυσμών, διότι σε συνθήκες σταθερής κατάστασης, η προσπίπτουσα φωτεινή ροή έχει ως αποτέλεσμα τόσες διεγέρσεις ατόμων από το E_1 στο E_2 όσες και εξαναγκασμένες εκπομπές από το E_2 στο E_1 .

Σε ένα σύστημα όμως το οποίο περιέχει τρία ενεργειακά επίπεδα, όπως εικονίζεται στο σχήμα III.3 συμβαίνει η αντιστροφή πληθυσμών με την ακόλουθη διαδικασία. Τα άτομα διεγείρονται λόγω μιας εξωτερικής διέγερσης προς το ενεργειακό επίπεδο E₃, το οποίο ονομάζεται ενεργειακό επίπεδο άντλησης και η διαδικασία διέγερσης των ατόμων στο ενεργειακό επίπεδο E₃ ονομάζεται άντληση. Εξετάζεται εδώ μόνο η περίπτωση της οπτικής άντλησης, παρότι δεν είναι η μοναδική μέθοδος για τη μετάβαση από το E₁ στο E₃. Τα άτομα που βρίσκονται στο E₃ μεταβαίνουν γρήγορα προς το E₂, το οποίο είναι ένα επίπεδο στο οποίο δεν πραγματοποιείται αυτή η γρήγορη αυθόρμητη μετάβαση προς το E₁. Η E₂ είναι μία κατάσταση μεγάλου χρόνου ζωής, μία μετασταθής κατάσταση. Εφόσον τα άτομα δεν μεταβαίνουν γρήγορα από την E₂ στην E₁ προκαλείται συσσώρευση των ατόμων σε αυτό το ενεργειακό επίπεδο και, καθώς μέσω της άντλησης, όλο και περισσότερα άτομα μεταβαίνουν στην κατάσταση E₃ και ακολούθως στην κατάσταση E₂, δημιουργείται αντιστροφή των πληθυσμών μεταξύ των επιπέδων E₂ και E₁.



Σχήμα ΙΙΙ.3 Αρχή λειτουργίας του LASER.

(a) Τα άτομα που βρίσκονται στη θεμελιώδη κατάσταση αντλούνται στο ενεργειακό επίπεδο E₃διά των προσκρουόντων φωτονίων που έχουν ενέργεια hv₁₃=E₂-E₁. (β) Τα άτομα στο ενεργειακό επίπεδο E₃ μεταβαίνουν γρήγορα στη μετασταθή κατάσταση E+2+ εκπέμποντας ένα φωτόνιο ή προκαλώντας ταλαντώσεις στο πλέγμα: hv₃₂=E₃-E₂. (γ) Αφού οι καταστάσεις στο ενεργειακό επίπεδο E₂ είναι μετασταθείς, πολύ γρήγορα καταλαμβάνονται από άτομα και πραγματοποιείται αντιστροφή πληθυσμών μεταξύ των E₂ και E₁. (δ) Ένα τυχαίο φωτόνιο με ενέργεια hv=E₂-E₁μπορεί να προκαλέσει εξαναγκασμένη εκπομπή. Τα φωτόνια που προκύπτουν από την εξαναγκασμένη εκπομπή μπορούν να προκαλέσουν με τη σειρά τους νέες εξαναγκασμένες εκπομπές, και να δημιουργηθεί έτσι μια χιονοστιβάδα εκπομπών φωτονίων, τα οποία επιπλέον βρίσκονται σε συμφωνία φάσης.

Όταν ένα άτομο που βρίσκεται στο E₂ μεταβαίνει αυθόρμητα σε ένα χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο, εκπέμπεται ένα φωτόνιο το οποίο μπορεί να προσκρούσει σε ένα γειτονικό άτομο προκαλώντας μία εξαναγκασμένη εκπομπή. Τα φωτόνια από το δεύτερο αυτό άτομο μπορούν στη συνέχεια να προσπέσουν σε δύο άλλα άτομα, προκαλώντας και πάλι εξαναγκασμένη εκπομπή, παράγοντας τέσσερα φωτόνια, τα οποία συνεχίζοντας αυτή τη διαδικασία προκαλούν

το φαινόμενο της χιονοστιβάδας στην παραγωγή φωτονίων. Όλα τα φωτόνια που συμμετέχουν στο φαινόμενο βρίσκονται σε φάση. Στο τέλος του φαινομένου της χιονοστιβάδας, όλα τα άτομα του επιπέδου E₂, έχουν επιστρέψει στο ενεργειακό επίπεδο E₁ και η διαδικασία της άντλησης χρειάζεται να ξεκινήσει και πάλι, προκειμένου να επαναληφθεί ο κύκλος της εξαναγκασμένης εκπομπής. (32)

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα είδη των lasers που βρίσκουν εφαρμογή στη ΦΔΘ, με ιδιαίτερη έμφαση στα διοδικά lasersημιαγωγών, καθώς σε αυτήν την κατηγορία ανήκει το laser το οποίο περιλαμβάνει η πειραματική διάταξη.

iii. Διοδικά lasers ημιαγωγών

Παρά το γεγονός ότι τα ρυθμιζόμενα lasers χρωστικών ή τα lasers στερεάς κατάστασης χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό για την εργαστηριακή μελέτη της ΦΔΘ, τα διοδικά lasers ημιαγωγών, τα οποία έχουν σταθερό μήκος κύματος εξόδου, έχουν κυριαρχήσει στην κλινική εφαρμογή. Τα διοδικά lasers συνδυάζουν πλεονεκτήματα όπως το μικρό μέγεθος της διάταξης, η αξιοπιστία, η υψηλή απόδοση, η πολύ καλή συμφωνία και το γεγονός ότι είναι συζεύξιμα με οπτικές ίνες. Πλέον συνηθίζεται κάθε φωτοευαισθητοποιητής να συνοδεύεται με το δικό του διοδικό laser. (30)

Ένα laser ημιαγωγού είναι μια φωτοδίοδος εκπομπής με δύο από τις όψεις τις επίπεδες, γυαλισμένες και παράλληλες μεταξύ τους. Οι επιφάνειες των δύο άλλων όψεων είναι ανώμαλες. Λόγω του μεγάλου δείκτη διάθλασης του υλικού οι γυαλισμένες όψεις έχουν αρκετή ανακλαστικότητα για να πραγματοποιηθεί ταλάντωση laser. (31)

Στην περίπτωση των ημιαγωγών τα ενεργειακά επίπεδα αναφέρονται πλέον σε όλον τον κρύσταλλο και όχι σε μεμονωμένα άτομα, όπως παρουσιάστηκαν προηγούμενη παράγραφο.

Φωτοφυσικές ιδιότητες των διοδικών lasersημιαγωγών

Το διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων για έναν εξιδανικευμένο ημιαγωγό παρουσιάζεται στο σχήμα III.4. Το φάσμα ενεργειακών επιπέδων αποτελείται από πολύ ευρείες ζώνες: αυτές είναι η ζώνη σθένους (ΖΣ) και η ζώνη αγωγιμότητας (ΖΑ), οι οποίες διαχωρίζονται από μια περιοχή απαγορευμένων ενεργειών, το ενεργειακό χάσμα (Εχ). Κάθε ζώνη αποτελείται πρακτικά από έναν μεγάλο αριθμό πολύ κοντά τοποθετημένων ενεργειακών καταστάσεων.

Σύμφωνα με την απαγορευτική αρχή του Pauliμπορούν να βρίσκονται μόνο δύο ηλεκτρόνια (με αντίθετο σπιν)



Σχήμα ΙΙΙ.4: Ζώνη σθένους, ζώνη αγωγιμότητας και επίπεδο Fermi για έναν ημιαγωγό σε κάθε ενεργειακή κατάσταση. Κατά συνέπεια η πιθανότητα κατάληψης f(E)μιας δεδομένης κατάστασης ενέργειας Ε δίνεται από τη στατιστική Fermi-Dirac, και όχι από τη στατιστική Maxwell-Boltzmann. Επομένως:

$$f(E) = \frac{1}{1 + e^{(E-F)/kT}}$$
 (III.1)

όπου Fενέργεια του επιπέδου Fermi. Αυτό το επίπεδο έχει την ακόλουθη σημασία: όταν T→Ο ισχύει:

> f=1 για E<F f=0 για E>F (III.2)

με αποτέλεσμα αυτό το επίπεδο παριστά το σύνορο μεταξύ των πλήρως κατειλημμένων και των τελείως κενών επιπέδων σε T=0⁰K.Για μη εκφυλισμένους ημιαγωγούς το επίπεδο Fermiβρίσκεται μέσα στη ζώνη χάσματος (σχήμα III.4), επομένως για T=0⁰ Kη ζώνη σθένους θα είναι πλήρως κατειλημμένη, ενώ η ζώνη αγωγιμότητας θα είναι εντελώς κενή. Στη θερμοκρασία αυτή ο ημιαγωγός δεν άγει, επομένως λειτουργεί ως μονωτής. Για το επίπεδο Fermi επιπλέον ισχύει ότι για κάθε θερμοκρασία f(F)=1/2.



Σχήμα ΙΙΙ.5: Αρχή λειτουργίας ενός laser ημιαγωγού

Έστω ότι ο ημιαγωγός βρίσκεται σε T=0⁰K, στο σχήμα IV.5α η σκιασμένη περιοχή αντιστοιχεί σε εντελώς πλήρεις ενεργειακές καταστάσεις. Έστω ότι τα ηλεκτρόνια διεγείρονται από τη ζώνη σθένους στη ζώνη αγωγιμότητας. Μετά από έναν πολύ βραχύ χρόνο (~10⁻¹³s) τα ηλεκτρόνια στη ζώνη αγωγιμότητας θα έχουν πέσει στα χαμηλότατα επίπεδα μέσα στη ζώνη και επίσης τα ηλεκτρόνια κοντά στην κορυφή της ζώνης σθένους θα έχουν πέσει στα χαμηλότατα επίπεδα μέσα στα χαμηλότατα μη κατειλημμένα επίπεδα, αφήνοντας έτσι την κορυφή της ζώνης σθένους σθένους γεμάτη οπές. Αυτό σημαίνει πως υπάρχει τότε αντιστροφή πληθυσμών μεταξύ των ζωνών σθένους, επανασυνδέονται με τις οπές, εκπέμποντας ένα φωτόνιο. Δεδομένης μιας αντιστροφής πληθυσμών μεταξύ των ζωνών σθένους και αγωγιμότητας όπως φαίνεται στο σχήμα III.5β, η διαδικασία της εξαναγκασμένης εκπομπής της ακτινοβολίας επανασύνδεσης θα

παράγει ταλάντωση laser, όταν ο ημιαγωγός τοποθετηθεί σε ένα κατάλληλο αντηχείο. Από το σχήμα III.5 γίνεται φανερό ότι η συχνότητα της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας πρέπει να ακολουθεί τη συνθήκη E_χ<hv<F_{αγ}-F_{σθ}, η οποία δημιουργεί το εύρος γραμμής απολαβής του ημιαγωγού. F_{αγ} και F_{σθ} είναι οι ενέργειες των αποκαλούμενων επιπέδων Fermiτων ζωνών αγωγιμότητας και σθένους, αντίστοιχα.

Ακολουθεί η περίπτωση όπου ο ημιαγωγός διατηρείται σε θερμοκρασία T>0. Αναφέροντας πάλι στο σχήμα III.5, σημειώνεται ότι, αν και ο ημιαγωγός στο σύνολό του δεν είναι σε θερμική ισορροπία, δύναται να επιτευχθεί μία ισορροπία εντός της κάθε ζώνης σε πολύ βραχύ χρόνο. Συνεπώς ορίζονται οι έννοιες πιθανότητα κατάληψης για τις ζώνες σθένους f_{σθ} και αγωγιμότητας f_{αγ}ως εξής:

$$f_{\sigma\theta} = \frac{1}{1 + e^{(E - F_{\sigma\theta})/kT}} \quad (III.3)$$
$$f_{\alpha\gamma} = \frac{1}{1 + e^{(E - F_{\alpha\gamma})/kT}} \quad (III.4)$$

Από τις συναρτήσεις ΙΙΙ.3 και ΙΙΙ.4 και τα προλεχθέντα συνάγεται ότι για T=0⁰K τα επίπεδα Fermitης κάθε ζώνης διαχωρίζουν τα τμήματα των πλήρως κατειλημμένων και των εντελώς κενών επιπέδων της κάθε ζώνης. Οι τιμές των $F_{\sigma\theta}$ και $F_{\alpha\gamma}$ εξαρτώνται από τον αριθμό των ηλεκτρονίων που διεγείρονται στη ζώνη αγωγιμότητας με την αντλητική διαδικασία. Η αναγκαία συνθήκη για την λειτουργία ως laser προκύπτει από την απαίτηση ο αριθμός των γεγονότων εξαναγκασμένης εκπομπής να γίνει μεγαλύτερος από τον αριθμό των γεγονότων απορρόφησης. Η περίσσεια είναι αναγκαία για να ξεπεραστούν οι απώλειες της κοιλότητας. Και η εξαναγκασμένη εκπομπή και η απορρόφηση είναι ανάλογες με το γινόμενο του αριθμού των φωτονίων που βρίσκονται στην κοιλότητα και του συντελεστή Β, οποίος αναφέρεται στην μετάπτωση. Επιπλέον, ο ρυθμός εξαναγκασμένης εκπομπής του υψηλότερου επιπέδου με την πιθανότητα μη κατάληψης του χαμηλότερου επιπέδου, ενώ ο ρυθμός απορρόφησης θα είναι ανάλογος με το γινόμενο της πιθανότητας κατάληψης του χαμηλότερου επιπέδου με την πιθανότητα μη κατάληψης του υψηλότερου επιπέδου. Ως εκ τούτου. Για να προκύψει εξαναγκασμένη εκπομπή πρέπει να ικανοποιείται η συνθήκη:

$$Bq[f_{\alpha\gamma}(1-f_{\sigma\vartheta})-f_{\sigma\vartheta}(1-f_{\alpha\gamma})]>0 \quad (III.5)$$

Από αυτή την ανισότητα εξάγεται η συνθήκη $f_{\alpha\gamma}$ > $f_{\sigma\theta}$. Από την (ΙΙΙ.4) αυτό σημαίνει ότι

$$F_{\alpha\gamma}$$
- $F_{\sigma\vartheta}$ > E_2 - E_1 = hv (III.6)

όπου E₂ και E₁ οι ενέργειες του υψηλότερου και του χαμηλότερου επιπέδου αντίστοιχα. (33)

Χαρακτηριστικά των Lasersημιαγωγών

Οι αντλητικές διεργασίες σε ένα laser ημιαγωγού επιτυγχάνονται συνήθως προπαρασκευάζοντας τον ημιαγωγό υπό την μορφή μια διοδικής επαφής p-n με υψηλά

εκφυλισμένες p-τύπου και n-τύπου περιοχές. Με αυτόν τον τρόπο η αντιστροφή των πληθυσμών συμβαίνει στην περιοχή της επαφής.

Αρχικά εξετάζεται η περίπτωση ενός laser επαφής όπου τα υλικά τύπου ρκαι τύπου η είναι τα ίδια: GaAs και εφάπτονται άμεσα για να σχηματίσουν την επαφή (ομοεπαφή). Η αρχή λειτουργίας μια διόδου κατασκευασμένης με αυτόν τον τρόπο παριστάνεται στο σχήμα III.6. Επειδή τα υλικά είναι πολύ εμπλουτισμένα, το επίπεδο Fermi F_p του ημιαγωγού ρ πέφτει μέσα στη ζώνη σθένους και το επίπεδο Fermi F_n του ημιαγωγού ηπέφτει μέσα στη ζώνη αγωγιμότητας. Χωρίς την εφαρμογή τάσης τα δύο επίπεδα Fermi βρίσκονται στην ίδια οριζόντια γραμμή, έχουν δηλαδή την ίδια ενέργεια(σχήμα III.6α). Όταν εφαρμοστεί μία τάση Vτα δύο επίπεδα διαχωρίζονται κατά μία ποσότητα που δίνεται από

$\Delta F=eV$ (III.7)

Επομένως, εάν η δίοδος είναι ορθά πολωμένη τα ενεργειακά επίπεδα θα είναι τότε όπως στο σχήμα ΙΙΙ.6β.





Η αντιστροφή των πληθυσμών έχει παραχθεί στο λεγόμενο «στρώμα απογύμνωσης» της επαφής p-n. Αυτό που πρωτίστως επιτυγχάνει η ορθή πόλωση είναι η έγχυση στο στρώμα απογύμνωσης ηλεκτρονίων από τη ζώνη αγωγιμότητας του υλικού τύπου n και οπές από τη ζώνη σθένους του υλικού τύπου p.Tελικά, δεδομένου ότι ΔF≅Eχ συνεπάγεται από την (III.7) ότι V≅E_x/e. Για το GaAsαυτή η τάση είναι περίπου 1,5V.

Το σχήμα ΙΙΙ.7 παριστά το διάγραμμα ενός laserεπαφής p-n, η σκιασμένη περιοχή είναι το στρώμα απογύμνωσης. Φαίνεται ότι η δίοδος έχει μικρές διαστάσεις. Το πάχος απογύμνωσης είναι συνήθως πολύ μικρό της τάξης του 0,1 μm. Δράση laser επιτυγχάνεται με την κατασκευή των επιφανειών παράλληλη, και με το κόψιμο των επιφανειών κατά μήκος των κρυσταλλικών

επιπέδων. Οι δύο άλλες επιφάνειες αφήνονται επεξεργασμένες ανώμαλα, ώστε να εξουδετερωθεί ταλάντωση σε ανεπιθύμητες διευθύνσεις.



Σχήμα ΙΙΙ.7: (α) απεικόνιση ενός laser ημιαγωγού και (β) εγκάρσια κατανομή της έντασης φωτός

Συχνά οι δύο επιφάνειες δεν έχουν ανακλαστικές επιστρώσεις. Στην πράξη, επειδή ο δείκτης διάθλασης του ημιαγωγού είναι πολύ μεγάλος, υπάρχει ήδη αρκετά μεγάλη ανακλαστικότητα για τη διαχωριστική επιφάνεια ημιαγωγού-αέρα. Η ενεργός περιοχή αποτελείται από στρώμα πάχους ~1μm, που είναι κάπως πλατύτερο από το στρώμα απογύμνωσης. Λόγω της περίθλασης η εγκάρσια διάσταση της δέσμης είναι πολύ μεγαλύτερη ,~40μm από το πλάτος της ενεργού περιοχής ΤοσχήμαΙΙΙ.7β. Η δέσμη laser εκτείνεται κατά πολύ μέσα στις περιοχές p και n. Όμως, επειδή οι εγκάρσιες διαστάσεις της δέσμης είναι ακόμη πολύ μικρές, η δέσμη εξόδου παρουσιάζει τελικά κάπως μεγάλη απόκλιση, της τάξης μερικών μοιρών. Σε θερμοκρασία δωματίου η πυκνότητα ρεύματος κατωφλίου για ένα laser ομοεπαφής είναι αρκετά υψηλή (~10⁵ A/cm²για το GaAs). Αυτό οφείλεται στις υψηλές απώλειες του ρυθμού της κοιλότητας, επειδή εκτείνεται πολύ μέσα στις περιοχές ρκαιη, όπου η απορρόφηση κυριαρχεί της ενίσχυσης. Αυτή η πυκνότητα ρεύματος, όμως, ελαττώνεται γρήγορα με τη μείωση της θερμοκρασίας λειτουργίας. Η σχέση είναι κατά προσέγγιση $exp(T/T_0)$, όπου η τιμή της T_0 και η περιοχή ισχύος της έκφρασης μεταβάλλεται από τον έναν ημιαγωγό στον άλλον. Αυτή η συμπεριφορά προκύπτει από το γεγονός ότι καθώς η θερμοκρασία ελαττώνεται, το f_{αγ}(1 $f_{\sigma\theta}$) αυξάνει, ενώ το $f_{\sigma\theta}$ (1- $f_{\alpha\nu}$) ελαττώνεται. Επομένως η απολαβή, η οποία εξαρτάται από τη διαφορά $f_{\alpha\gamma}(1-f_{\sigma\theta})-f_{\sigma\theta}(1-f_{\alpha\gamma})$, αυξάνεται γρήγορα. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι ότι τα lasersομοεπαφής μπορούν να λειτουργήσουν ςωμόνο σε κρυογενικές θερμοκρασίες.

Tα lasers ημιαγωγών καλύπτουν μία ευρεία περιοχή μηκών κύματος από περίπου 0,7 έως 30μm. (32) (33)

Το laserδιπλής ετεροεπαφής Al_{0.3}Ga_{0.7}As(p)-GaAsκαιGaAs-Al_{0.3}Ga_{0.7}As(n)

Εξετάζεται εδώ το συγκεκριμένο laser, καθώς είναι αυτό που περιλαμβάνει η πειραματική διάταξη.

Για να ξεπεραστεί η δυσκολία της επίτευξης κρυογενικών θερμοκρασιών, κατασκευάστηκαν τα lasersετεροεπαφής.

-1μπ
<l

Στο σχήμα ΙΙΙ.8 εικονίζεται μια τέτοια διάταξη.

Σχήμα ΙΙΙ.8: Απεικόνιση ενός laser διπλής ετεροεπαφής. Η ενεργός περιοχή αποτελείται από στρώμα GaAs(n)

Σε αυτήν τη δίοδο υπάρχουν δύο επαφές Al_{0.3}Ga_{0.7}As(p)-GaAsκαιGaAs-Al_{0.3}Ga_{0.7}As(n) μεταξύ διαφορετικών υλικών. Η ενεργός περιοχή αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα GaAs (0,1-0,3 μm). Με μια τέτοια δίοδο η πυκνότητα ρεύματος κατωφλίου, για θερμοκρασία δωματίου, μπορεί να μειωθεί περίπου δύο τάξεις μεγέθους (~10³ A/cm²), συγκριτικά με τη διάταξη ομοεπαφής. Έτσι η συνεχής λειτουργία σε θερμοκρασία δωματίου γίνεται δυνατή. Η μείωση της πυκνότητας ρεύματος κατωφλίου οφείλεται στο συνδυασμένο αποτέλεσμα τριών περιστάσεων: (i) ο δείκτης διάθλασης του GaAs (n \cong 3,6) είναι σημαντικά μεγαλύτερος από εκείνον τουAl_{0.3}Ga_{0.7}As (n \cong 3,4), παράγοντας τη δομή οπτικού κυματοδηγού. Αυτό σημαίνει πως ο ρυθμός laser θα είναι τώρα εγκλωβισμένος στο στρώμα του GaAs, δηλαδή στην περιοχή ενίσχυσης και, αντίθετα από την κατάσταση στη δίοδο ομοεπαφής, τα πτερύγια της κατανομής του πεδίου δεν εκτείνονται πλέον μέσα στης μη αντλούμενες, και ως εκ τούτου απορροφούσες περιοχές. (ii) Το χάσμα ζώνης τουAl_{0.3}Ga_{0.7}As (~1,8 eV) είναι σημαντικά μεγαλύτερο από εκείνο του GaAs (~1,5 eV). Συνεπώς σχηματίζονται ενεργειακοί φραγμοί στις δύο επαφές, οι οποίοι εγκλωβίζουν αποτελεσματικά τις εγχυμένες οπές και τα ηλεκτρόνια στο ενεργό στρώμα. Για δεδομένη πυκνότητα ρεύματος η συγκέντρωση οπών και ηλεκτρονίων στο ενεργό στρώμα. αυξάνεται, και ως εκ τούτου η απολαβή επίσης αυξάνεται. (iii) Η ικανότητα κατανάλωσης θερμότητας της διόδου έχει αισθητά βελτιωθεί. Αυτό έχει επιτευχθεί συγκολλώντας στο υπόστρωμα GaAs(p) ένα πλακίδιο χαλκού ή κασσίτερου το οποίο, λόγω της μάζας και της θερμικής του αγωγιμότητας, δρα σαν απαγωγέας θερμότητας. (32) (33)

iv. Άλλα lasers που αξιοποιούνται στη $\Phi \Delta \Theta$

Laser Nd:YAG

Για το laser Nd:YAG η βασική γραμμή του, στα 1064 nm, βρίσκεται εντός αυτού του θεραπευτικού παράθυρου, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται, πλέον, ευρέως στη Θερμική Θεραπεία μεlaser. Τα lasers Nd:YAG μπορούν να ρυθμιστούν είτε σε συνεχή λειτουργία (πολυρυθμική, με ισχύ εξόδου ~200 W), είτε σε λειτουργία μακρών παλμών (~500 W, στα 50 Hz), είτε σε λειτουργία Q-switching (~50 MW, με διάρκεια παλμού ~10 ns). Το Nd:YAG είναι ένα laser στερεάς κατάστασης, με έναν κρύσταλλο Ύττριο Αλουμίνιο γρανάτη, με 1% προσμίξεις τρισθενών ιόντων Νεοδυμίου, ως το ενεργό μέσο του laser. Μια άλλη μετάβαση των ιόντων του Νεοδυμίου οδηγεί στην παραγωγή ακτινοβολίας στα 1320 nm. Παρόλο που οι διαθέσιμες χρωστικές απορροφούν στα 800-1100 nm, η παραγωγή μονήρους οξυγόνου μέσω της δεύτερης διαδικασίας είναι ασύμφορη ενεργητικά, διότι η ενέργεια αυτών των χρωστικών στην κατάσταση τριπλέτας είναι εξαιρετικά χαμηλή. Όμως, η βασική συχνότητα του laserμπορεί να διπλασιαστεί (δημιουργία δεύτερης αρμονικής) ή και να τριπλασιαστεί (δημιουργία τρίτης αρμονικής), με τη χρήση μη γραμμικών κρυστάλλων, ώστε να μετατραπεί η ακτινοβολία εξόδου, για να βρεθεί στην περιοχή του ορατού και να είναι αξιοποιήσιμη στη Φωτοδυναμική Θεραπεία. (30) (33)

Lasers ιόντων Αργού

Τον πρώτο καιρό της Φωτοδυναμικής Θεραπείας, τα lasers ιόντων Αργού, χρησιμοποιήθηκαν ευρέως. Το laserιόντων Αργού, αξιοποιεί ιονισμένο πλάσμα αργού ως μέσο ενίσχυσης, παράγοντας δύο γραμμές, στα 448 και 514nm. Η δεύτερη βρίσκεται ακριβώς στο μέγιστο της απορρόφησης του m-THPC. Τα lasers ιόντων Αργού ρυθμίζονται σε συνεχή λειτουργία, με συνήθη ισχύ εξόδου 5-10 W, στα 514 nm. (30) (33)

Laser ιόντων Κρυπτού

Τα lasersκρυπτού, μοιάζουν με τα προηγούμενα, έχουν ως μέσο ενίσχυσης τα ιόντα κρυπτού. Εκπέμπουν στα 568 και 647 nm. Η πρώτη γραμμή ενεργοποιεί την κορυφή Rose Bengal στα 559 nm, ενώ η δεύτερη ενεργοποιεί τον m-THPC(652 nm). (30)
Tunable laser οργανικών χρωστικών

Στην ιδανική περίπτωση είναι επιθυμητό να συμπίπτει ακριβώς η έξοδος του laser με το μέγιστο της απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή. Για το λόγο αυτόν, στη Φωτοδυναμική Θεραπεία χρησιμοποιούνται ευρέως τα tunable lasers οργανικών χρωστικών. Σε αυτά τα lasers το μέσο ενίσχυσης είναι μία οργανική χρωστική με υψηλή κβαντική απόδοση φθορισμού. Τα lasersαυτά είναι όμως δύσχρηστα, λόγω της δυσκολίας στη ρύθμιση του επιθυμητού μήκους κύματος, έχουν ωστόσο χρησιμοποιηθεί για τη διέγερση αρκετών Φ-Ε, όπως το HpD (στα 630 nm), τη φωτοπορφυρίνη-IX(στα 635 nm), τη φωτοπρωτοπορφυρίνη (στα 670 nm) και κάποιες φθαλοκυανίνες (γύρω στα 675nm). (30)

Laser ατμών χαλκού

Τα lasers ατμών χαλκού βρίσκουν και αυτά εφαρμογή στη Φωτοδυναμική Θεραπεία. Πρόκειται για παλμικά lasers, με διάρκεια παλμού περί τα 50ns, συχνότητα επανάληψης που φτάνει τα 20 kHz και ισχύ εξόδου 40 W.Kαι οι δύο φασματικές γραμμές της εξόδου του (511 και 578 nm) αξιοποιούνται κλινικά. Ενεργοποιούν επίσης και φωτοευαισθητοποιητές της περιοχής του ερυθρού. (30)

Laser στερεάς κατάστασης

Μια σχετικά νέα κατηγορία αποτελούν τα lasers στερεάς κατάστασης Ti:Sapphire. Το μέσο ενίσχυσης είναι κρύσταλλος σαπφείρου (Al₂O₃), νοθευμένος με τιτάνιο ~1%.Η έξοδός του μπορεί να ρυθμιστεί μεταξύ 690-1100 nm, καλύπτοντας τις κορυφές απορρόφησης πλήθους φωτοευαισθητοποιητών. (30)

Τα περισσότερα από τα παραπάνω lasers ενεργοποιούν ουσίες στην περιοχή του ερυθρού. Τα lasers αυτά χρησιμεύουν για περιπτώσεις όπου απαιτείται εισχώρηση στον ιστό. Lasers στην περιοχή του μπλε/πράσινου αξιοποιούνται σε περιπτώσεις όπου οι κακώσεις είναι επιδερμικές.(30)

ΙV. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ

i. Φωτοφυσική και Φωτοχημεία



Σχήμα IV.1: Γραφική αναπαράσταση των φωτοφυσικών και φωτοχημικών μηχανισμών τηςΦωτοδυναμικής Θεραπείας¹⁰

Φωτοφυσική

Οι δύο πιο σημαντικές λειτουργίες της ΦΔΘ είναι η διαδικασία της απορρόφησης του φωτός και η μεταφορά ενέργειας. Ένας ΦΕ στη θεμελιώδη κατάσταση(¹ΦΕ) έχει δύο ηλεκτρόνια, με αντιπαράλληλαspin, σε ένα μοριακό τροχιακό, χαμηλής ενέργειας, που λέγεται μονή κατάσταση, διότι έχει συνολικό σπιν μηδέν (M=2S+1, η πολλαπλότητα των ενεργειακών καταστάσεων). Μετά την απορρόφηση φωτονίου, ένα από αυτά τα ηλεκτρόνια ωθείται σε ένα τροχιακό υψηλότερης ενέργειας(¹ΦΕ^{*}), διατηρώντας το αρχικό του σπιν. Η νέα κατάσταση έχει

¹⁰Ana P. Castano, Tatiana N. Demidova, Michael R. Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—– photosensitizers, photochemistryand cellular localization. *Elsevier*. 2005.

μικρό χρόνο ζωής, χάνει την ενέργειά της είτε μέσω φθορισμού είτε μέσω εσωτερικής μετάπτωσης, ελευθερώνοντας θερμότητα. Κατά την εσωτερική μετάπτωση το μόριο από τη διεγερμένη κατάσταση μεταπηδά σε ένα κοντινό δονητικό επίπεδο της διεγερμένης ενεργειακής κατάστασης. Ο φθορισμός αξιοποιείται για την απεικόνιση της συγκέντρωσης του ΦΕ στον ιστό και για τη διερεύνηση της κινητικότητας των φαρμάκων. Η διεγερμένη μονή κατάσταση του ΦΕ μπορεί επίσης να ακολουθήσει μια διαδικασία, γνωστή ως εσωτερική μετατροπή, όπου το σπιν του διεγερμένου ηλεκτρονίου αντιστρέφεται, σχηματίζοντας μία σχετικά μακρόβια διεγερμένη τριπλή κατάσταση, τις οποίας τα ηλεκτρόνια έχουν παράλληλα σπιν (³ΦΕ^{*}). Η νέα αυτή κατάσταση έχει πολλαπλότητα M=3 διότι το συνολικό σπιν είναι ½+½=1 και M=2S+1. Η μετάβαση από τη βασική (¹ΦΕ)στην τριπλή διεγερμένη στην τριπλή διεγερμένη στάθμη είναι περισσότερο πιθανή, διότι η ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της ³ΦΕ^{*}είναι μικρότερη αυτής της ¹ΦΕ^{*}. Η σχετικά μεγάλη παραμονή των μορίων στην ³ΦΕ^{*}τα καθιστά πιο επιρρεπή σε διαδικασίες αποδιέγερσης χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας.

Υπάρχει μία πιθανότητα όμως να επιστρέψει από την ³ΦE^{*} στην ¹ΦΕ μέσω της ¹ΦE^{*}. Για να συμβεί όμως η μετάβαση από την ³ΦE^{*} στην ¹ΦE^{*} χρειάζεται απορρόφηση ενέργειας. Η διαδικασία αυτή της έμμεσης μετάβασης λέγεται καθυστερημένος φθορισμός ή φωσφορισμός. (3)

Φωτοχημεία

Η διεγερμένη τριπλή κατάσταση στη συνέχεια μπορεί να ακολουθήσει δύο ακόμα δρόμους. Πρώτον, στην αντίδραση τύπου Ι, μπορεί να αντιδράσει κατευθείαν με το υπόστρωμα (π.χ. με την κυτταρική μεμβράνη ή ένα μόριο) και να μεταφέρει ένα πρωτόνιο ή ένα ηλεκτρόνιο, έτσι ώστε να μετατραπεί σε χημική ρίζα (σε ανιόν η ή κατιόν αντίστοιχα). Οι ρίζες αυτές αντιδρούν στη συνέχεια με το μονήρες οξυγόνο, παράγοντας δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species –ROS). Εναλλακτικά στην αντίδραση τύπου ΙΙ, η τριπλή διεγερμένη κατάσταση μπορεί να αποδώσει την ενέργειά της κατευθείαν στο μοριακό οξυγόνο, το οποίο βρίσκεται στη θεμελιώδη κατάσταση, σχηματίζοντας μονήρες οξυγόνο στη διεγερμένη κατάσταση. Οι δύο αυτές εναλλακτικές διαδικασίες, δύναται να συμβούν ταυτόχρονα. Ο λόγος μεταξύ τους εξαρτάται από το είδος του ΦΕ, από τη συγκέντρωση των συστατικών του υποστρώματος καθώς και από τη συγκέντρωση του οξυγόνου.

Στη διαδικασία τύπου Ι συχνά συμβαίνει να παραχθεί αρχικά ανιόν υπεροξειδίου, μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίου από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση του ΦΕ στο μοριακό οξυγόνο. Το υπεροξείδιο δεν προκαλεί από μόνο του οξειδωτική βλάβη στα βιολογικά συστήματα, αλλά είναι ιδιαίτερα δραστικό και μπορεί να αντιδράσει το ίδιο, παράγοντας υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνο. Η αντίδραση αυτή μπορεί να καταλυθεί μέσω του ενζύμου υπεροξείδιο της δισμουτάσης (SOD). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι σημαντικό στα βιολογικά συστήματα, διότι μπορεί να διασχίσει εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες και τα

κύτταρα δεν μπορούν να το αποβάλουν. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι στην πραγματικότητα απαραίτητο για τη λειτουργία πολλών ενζύμων. Είναι επίσης σημαντικό για την παραγωγή της πολύ δραστικής ρίζας του υδροξυλίου (HO[•]). Στην πραγματικότητα, στη διαδικασία αυτή, το υπεροξείδιο δρα ως αναγωγικός και όχι ως οξειδωτικός παράγοντας. Αυτό συμβαίνει διότι το υπεροξείδιο συνεισφέρει ένα ηλεκτρόνιο για να προκαλέσει αναγωγή στα μεταλλικά ιόντα (όπως το σιδηρικό ιόν ή το Fe³⁺), τα οποία δρουν ως καταλύτες για τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου(H₂O₂) σε ρίζα υδροξυλίου (HO[•]). Η αντίδραση αυτή λέγεται αντίδραση του Fenton¹¹, ανακαλύφθηκε περισσότερο από 100 χρόνια πριν. Είναι σημαντική στα βιολογικά συστήματα διότι τα περισσότερα κύτταρα έχουν κάποια επίπεδα σιδήρου, χαλκού ή άλλων μετάλλων, τα οποία μπορούν να καταλύσουν την αντίδραση αυτή. Το ανηγμένο μεταλλικό ιόν στη συνέχεια καταλύει τη ρήξη του δεσμού οξυγόνου-οξυγόνου στο υπεροξείδιο του υδρογόνους με το HO[•]. Το H₂O₂μπορεί να αντιδράσει με το HO[•], σχηματίζοντας μονήρες οξυγόνο ή με το νιτρικό οξείδιο (NO[°]), παράγοντας OONO[°], ένα επίσης πολύ ενεργό οξειδωτικό μόριο.

Το HO^{\bullet} , όπως και το H_2O_2 , έχει την ιδιότητα να διεισδύει στις κυτταρικές μεμβράνες, χωρίς να μπορούν τα κύτταρα να το αποβάλουν. Η βλάβη που μπορεί να προκαλέσει περιορίζεται από το ρυθμό διάχυσης. Αυτή η πολύ δραστική ρίζα μπορεί να προσδεθεί σε ένα οργανικό υπόστρωμα (το οποίο περιέχει άνθρακα και συμβολίζεται με Rστη συνέχεια). Το υπόστρωμα αυτό μπορεί για παράδειγμα να είναι ένα λιπαρό οξύ, το οποίο μπορεί να σχηματίσει υπεροξικά παράγωγα, τα οποία είναι αυτά χημικές ρίζες.

Η ρίζα του υδροξυλίου μπορεί, επίσης, να οξειδώσει το οργανικό υπόστρωμα, αφαιρώντας του ένα ηλεκτρόνιο. Το οξειδωμένο πλέον υπόστρωμα είναι και αυτό μια χημική ρίζα, έχει λοιπόν τη δυνατότητα να αντιδράσει με άλλα μόρια, προκαλώντας αλυσιδωτή αντίδραση. Για παράδειγμα, μπορεί να αντιδράσει με ένα οξυγόνο, το οποίο βρίσκεται στη θεμελιώδη στάθμη, παράγοντας μία ρίζα υπεροξυλίου (ROO[•]). Η ρίζα αυτή είναι και πάλι πολύ ενεργή και μπορεί να αντιδράσει με άλλα μόρια, σε αλυσιδωτή αντίδραση. Αυτού του είδους οι αλυσιδωτές αντιδράσεις συναντώνται συχνά στην οξειδωτική καταστροφή των λιπαρών οξέων και άλλων λιπιδίων, δικαιολογώντας το γεγονός ότι χημικές ρίζες, όπως το υδροξύλιο έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν ευρεία καταστροφή.

Η ΦΔΘ μπορεί να επιδράσει μόνο στα μόρια και τις δομές που βρίσκονται στην εγγύς περιοχή του μονήρους οξυγόνου και των ριζών του υδροξυλίου, λόγω της υψηλής δραστικότητας και του μικρού χρόνου ζωής τους. Ο χρόνος ημιζωής του οξυγόνου στα βιολογικά συστήματα είναι μικρότερος από 40 ns και, επιπλέον, η ακτίνα επίδρασης του μονήρους οξυγόνου είναι της τάξης των 20nm. (3)

 $^{^{11}}$ Αντίδραση του Fenton:(1) $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH^-$

⁽²⁾ $Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + OOH + H^+$

ii. Χημικές ενώσεις και στοιχεία που επηρεάζονται

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), όπως και το μονήρες οξυγόνο, παράγονται μέσω της αντίδρασης τύπου ΙΙ, είναι οξειδωτικοί παράγοντες, που μπορούν να αντιδράσουν άμεσα με πλήθος βιολογικών μορίων.

Βλάβη στις πρωτεΐνες λόγω της οξείδωσης των αμινοξέων

Τα αμινοξέα είναι οργανικά μόρια. Περιέχουν μια αμινομάδα και μια καρβοξυλομάδα. Τα ααμινοξέα (εκείνα στα οποία η αμινομάδα και η καρβοξυλομάδα συνδέονται με το ίδιο άτομο άνθρακα) λειτουργούν ως δομικοί λίθοι των πρωτεϊνών.

Τα κατάλοιπα των αμινοξέων στις πρωτεΐνες (συμπεριλαμβανομένων των κυστεΐνη, μεθιονίνη, τυροσίνη, ιστιδίνη και τρυπτοφάνη) αποτελούν πρωταρχικό στόχο της οξειδωτικής επίθεσης των πρωτεϊνών, λόγω της μεγάλης τους δραστικότητας. Οι μηχανισμοί αντίδρασης είναι πολύ σύνθετοι και κατά κανόνα οδηγούν σε πληθώρα τελικών προϊόντων. Η κυστεΐνη και η μεθιονίνη οξειδώνονται κυρίως σε θειικά οξέα, η ιστιδίνη αποδίδει ένα θερμικώς ασταθές ενδοϋπεροξείδιο, η τρυπτοφάνη αντιδρά μέσω ενός σύνθετου μηχανισμού δίνοντας φορμυλκυνουρενίνη-Ν, η τυροσίνη μπορεί να υποστεί φαινολική οξείδωση. (4)

Βλάβη στο DNΑμέσω της οξείδωσης των νουκλεοτιδίων

Η κάθε έλικα του DNA αποτελείται από νουκλεοτίδια, οποία συνδέονται με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Το κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από μια αζωτούχο βάση(A, T, G, C), ένα σάκχαρο και μια φωσφορική ομάδα. (23)

Το DNA μπορεί να υποστεί οξειδωτική βλάβη στις αζωτούχες βάσεις αλλά και στα σάκχαρα. Μπορεί επίσης να συμβεί διασύνδεση τουDNAμε πρωτεΐνη (το κύτταρο δυσκολεύεται ιδιαίτερα να αποκαταστήσει αυτή τη βλάβη). Παρά το γεγονός ότι τα κύτταρα έχουν σε κάποιο βαθμό τη δυνατότητα να επισκευάσουν την οξειδωτική βλάβη του DNAή των πρωτεϊνών, δεν μπορούν να αντιστρέψουν τις μεταλλάξεις ή τον κυτταρικό θάνατο. Από τις τέσσερις βάσεις του DNA, η γουανίνη είναι η περισσότερο επιδεκτική στην οξείδωση μέσω του ¹O₂. (3)

Λιπίδια

Τα ακόρεστα λιπίδια τυπικά υφίστανται αντιδράσεις ene-type¹², δίνοντας υπεροξείδια λιπιδίων (τα LOOHs παράγονται από φωσφολιπίδια και τη χοληστερόλη). (3)

Μεταβολή της συγκέντρωσης Ασβεστίου

Πειράματα in vitro έχουν δείξει αύξηση στα επίπεδα του ασβεστίου μετά την εφαρμογή ΦΔ θεραπείας. Η αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του Ca²⁺ θεωρείται ότι συμβαίνει λόγω της ροής του μέσω των ιοντικών καναλιών, της απελευθέρωσης του από εσωτερικά μέρη όπου είναι αποθηκευμένο στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια και στην ενεργοποίηση μηχανισμών ιοντικής ανταλλαγής. Για το λόγο ότι το Ca²⁺ αποτελεί σημαντικό σύνδεσμο μεταξύ πολλών διαδικασιών που ενεργοποιούνται μέσω της ΦΔΘ και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην επίδραση της ΦΔΘ σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, η ανάλυση των αποτελεσμάτων των επιπέδων του ασβεστίου που εκφράζονται στα κύτταρα είναι πολύ σημαντική στην κατανόηση και την αποσαφήνιση του κυτταρικού θανάτου που επιφέρει η ΦΔΘ. (4)

iii. Διαταραχή κυτταρικών λειτουργιών και ιδιοτήτων

Για την περεταίρω κατανόηση των κυτταρικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται ή επηρεάζονται από τη ΦΔΘ, ερευνώνται εδώ οι μηχανισμοί μετάδοσης σήματος, η κυτταρική πρόσφυση και η κυτταρική απόκριση σε καταπονήσεις όπως η υποξία και η αγγειογένεση.

 $\left(\begin{array}{c} & X \\ R \end{array} \right)^{*} \xrightarrow{X} \left[\left(\begin{array}{c} & X \\ R \end{array} \right)^{*} \xrightarrow{X} \\ R \end{array} \right)^{*} \xrightarrow{X} \left[\left(\begin{array}{c} & X \\ R \end{array} \right)^{*} \xrightarrow{X} \\ R \end{array} \right)^{*} \xrightarrow{X} \left[\left(\begin{array}{c} & X \\ R \end{array} \right)^{*} \xrightarrow{X} \\ R \end{array} \right]^{*} \xrightarrow{X} \left[\left(\begin{array}{c} & X \\ R \end{array} \right)^{*} \xrightarrow{X} \\ R \end{array} \right]^{*} \xrightarrow{X} \left[\left(\begin{array}{c} & X \\ R \end{array} \right)^{*} \xrightarrow{X} \\ R \end{array} \right]^{*} \xrightarrow{X} \left[\left(\begin{array}{c} & X \\ R \end{array} \right)^{*} \xrightarrow{X} \\ R \end{array} \right]^{*} \xrightarrow{X} \left[\left(\begin{array}{c} & X \\ R \end{array} \right)^{*} \xrightarrow{X} \\ R \end{array} \right]^{*} \xrightarrow{X} \left[\left(\begin{array}{c} & X \\ R \end{array} \right)^{*} \xrightarrow{X} \\ R \end{array} \right]^{*} \xrightarrow{X} \left[\left(\begin{array}{c} & X \\ R \end{array} \right)^{*} \xrightarrow{X} \\ R \xrightarrow{X} \\ R \end{array} \right]^{*} \xrightarrow{X} \left[\left(\begin{array}{c} & X \\ R \end{array} \right)^{*} \xrightarrow{X} \\ R \xrightarrow{X} \\$

¹²Ene-type reaction:

R: H, metal X=Y: C=C, C=C, C=O, C=S, C=N, N=N, N=O, etc

Αλλαγές στη μετάδοση σήματος μεταξύ των κυττάρων



ΣχήμαΙV.2: Μηχανισμοί μετάδοσης σήματος που ενεργοποιούνται μετά τη ΦΔΘ¹³

Τα δίκτυα μεταγωγής σήματος παρέχουν στα κύτταρα μηχανισμούς για να λαμβάνουν εξωτερικά ερεθίσματα και να αποκρίνονται σε αυτά με τον κατάλληλο τρόπο. (23)

Ασβέστιο

Το Ca²⁺ έχει σημαντικό και ευρύ ρόλο ως ενδοκυτταρικός αγγελιαφόρος. Μια αύξηση της συγκέντρωσης του ελεύθερου Ca²⁺ στο κυτταροδιάλυμα¹⁴ είναι η απάντηση σε πολλά διαφορετικά σήματα. Φυσιολογικά η συγκέντρωση του ελεύθερου Ca²⁺στο κυτταροδιάλυμα είναι πολύ μικρότερη από τη συγκέντρωσή του στο εξωκυττάριο υγρό και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Οι διαφορές αυτές διατηρούνται από κυτταρικές αντλίες οι οποίες απομακρύνουν ενεργά το Ca²⁺ από το κυτταροδιάλυμα, είτε προς τον εξωκυττάριο χώρο είτε προς το ενδοπλασματικό δίκτυο. Με τον τρόπο αυτόν, διαμέσου της μεμβράνης του ενδοπλασματικό δικτύου αλλά και της κυτταρικής μεμβράνης υπάρχει μια απότομη ηλεκτροχημική βαθμίδωση

¹³Ana P. Castano, Tatiana N. Demidova, Michael R. Hambliv. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—– cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *PhotodiagPhotod.* 2005, Vol. 2, 1, pp. 1-23.

¹⁴Υδατικό διάλυμα μικρών και μεγάλων μορίων που γεμίζει το κύριο διαμέρισμα του κυτταροπλάσματος

του Ca²⁺. Όταν ένα σήμα ανοίξει πρόσκαιρα διαύλους Ca²⁺σε οποιαδήποτε από αυτές τις δύο μεμβράνες, ακολουθώντας την ηλεκτροχημική βαθμίδωσή του, το Ca²⁺ εισρέει στο κυτταροδιάλυμα, όπου πυροδοτεί μεταβολές σε πρωτεΐνες ευαίσθητες στο Ca²⁺. (23)

Η αύξηση στη συγκέντρωση Ασβεστίου, που επιφέρει η ΦΔΘ, συνδέεται με τον κυτταρικό θάνατο και σε κάποιες περιπτώσεις, υπό ορισμένες συνθήκες, με την κυτταρική επιβίωση. (4)

Λιπίδια

Η ταχεία απελευθέρωση μεταβολιτών αραχιδονικού οξέως, η οποία έχει παρατηρηθεί σε πολλές περιπτώσεις μετά την εφαρμογή ΦΔΘ, εικάζεται ότι οφείλεται στην ενεργοποίηση του ενζύμου φωσφολιπάση A2 (ΦΛΑ2), από το Ca²⁺. Η ΦΛΑ2 οδηγεί το κύτταρο είτε στην απόπτωση είτε στην επιβίωση.

Η ενεργοποίηση των φωσφολιπασών¹⁵, μέσω πολλών διαδικασιών, μπορεί να επηρεάσει -από κοινού-τη συγκέντρωση του Ca²⁺και τον μεταβολισμό των λιπιδίων.

Τα κεραμίδια είναι μια οικογένεια λιπιδίων. Ένα κεραμίδιο συντίθεται από μία σφιγγοσίνη και ένα λιπαρό οξύ. Τα κεραμίδια απαντώνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στην πλασματική μεμβράνη. Αποτελούν συστατικά της σφιγγομυελίνης, η οποία είναι το πιο συχνό λιπίδιο που απαντάται στη λιπιδική διπλή στοιβάδα, των μεμβρανών. Είναι μεταγωγείς σήματος και συμμετέχουν στη ρύθμιση λειτουργιών όπως τη διαφοροποίηση, την αναπαραγωγή, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και την απόπτωση (π.κ.θ. τύπου Ι). Για τον λόγο αυτό ερευνάται ο ρόλος τους στη ΦΔΘ.

Έχει παρατηρηθεί ότι μετά τη ΦΔΘ τα επίπεδα των κεραμιδίων ανεβαίνουν και συμβαίνει απόπτωση στα κύτταρα.(1) (4)

Πρωτεΐνες κινάσες

Μια βασική διαδικασία μεταγωγής σήματος (στα ευκαρυωτικά κύτταρα) είναι εκείνη που περιλαμβάνει πρωτεΐνη κινάση, ενεργοποιημένη από μιτογόνα¹⁶ (mitogen-activated protein kinase MAPK). Η διαδικασία αυτή ρυθμίζει πολλές λειτουργίες όπως την επαγωγή της εκκίνησης του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 (από τη G0 που βρίσκεται όταν ηρεμεί), τον έλεγχο της εμβρυϊκής ανάπτυξης, την κυτταρική κίνηση, την απόπτωση, όπως επίσης την κυτταρική και τη

¹⁵Φωσφολιπάση: είδοςενζύμου

¹⁶Μιτογόνο: ένζυμο που επάγει τη μίτωση (ένα είδος κυτταρικής διαίρεσης)

νευρωνική διαφοροποίηση. Στις ΜΑΡΚ περιλαμβάνονται και οι κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυτταρικά σήματα (ΚΡΕΣ). (23)

Μελέτες για τον ρόλο των ΚΡΕΣ στην ΦΔΘ έδειξαν ότι η έκφραση τους μειώνεται σημαντικά μετά την εφαρμογή ΦΔΘ, ενώ ταυτόχρονα σημειώνεται αύξηση του κυτταρικού θανάτου. Έτσι μπορεί να θεωρηθεί ότι οι δύο αυτές παρατηρήσεις συνδέονται. (4)

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (ΕΑΠ) είναι ένα είδος κινάσης τυροσίνης¹⁷, ο οποίος συμμετέχει στην εκδήλωση και την ανάπτυξη πολλών ειδών καρκίνου και ειδικότερα στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων τους, στην αγγειογένεση, στην επέκταση τους και στην εμφάνιση μεταστάσεων. Πολλές μελέτες σε σειρές καρκινικών κυττάρων έχουν αποδείξει ότι η ΦΔΘ μπορεί να επιφέρει παντελή εξάλειψη του ΕΑΠ στην κυτταρική μεμβράνη και με τον τρόπο αυτό να προκαλέσει απόκριση που αντίκειται στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι υφίσταται μια αύξηση η διαδικασία του Down regulation¹⁸στην έκφραση των πρωτεϊνών και στη φωσφορυλίωση του ΕΑΠ, μετά την ΦΔΘ, η οποία επιφέρει απόπτωση και ακολούθως υποχώρηση στους όγκους των μεταστάσεων.(1)(4)

Πρωτεΐνες που λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες

Οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι ειδικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση ή στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης, δηλαδή της μεταγραφής του DNA σε RNA. Πρόκειται για πρωτεΐνες με συγκεκριμένη τρισδιάστατη δομή, οι οποίες μπορούν να αλληλεπιδρούν με το DNA αναγνωρίζοντας ειδικές αλληλουχίες πάνω σε αυτό, όπου και προσδένονται.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται σε ειδικές θέσεις του DNA των γονιδίων, που ονομάζονται υποκινητές και ενισχυτές. Συνήθως ασκούν τη δράση τους μέσω σχηματισμού συμπλόκων με άλλες πρωτεΐνες της μεταγραφικής μηχανής. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούν διακριτές επιφάνειες του μορίου τους, γνωστές ως περιοχές ενεργοποίησης ή καταστολής.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες παίζουν κεντρικό ρόλο κατά την ανάπτυξη ενός νέου οργανισμού, που αφορά στη δράση τους κατά τη διάρκεια της κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης. Οι ορμόνες, οι αυξητικοί παράγοντες και άλλα χημικά μηνύματα επιδρούν στην αύξηση, τη διαφοροποίηση και τις κυτταρικές λειτουργίες, ενεργοποιώντας τη γονιδιακή έκφραση μέσω της δραστηριοποίησης συγκεκριμένων βιολογικών μονοπατιών και μεταγραφικών παραγόντων. Κατά την εμβρυογένεση, σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, ενεργοποιούνται ομάδες μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. οικογένεια Pax), οι οποίοι επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων είναι απαραίτητα για τη διαφοροποίηση και τη δημιουργία των

¹⁷Κινάση που περιέχει το αμινοξύ τυροσίνη

¹⁸Είναι μια διαδικασία κατά την οποία το κύτταρο μειώνει την ποσότητα κάποιου συστατικού του, έπειτα από εξωτερικό ερέθισμα

διαφόρων ιστών του σώματος. Μεταλλάξεις ή εκτροπή στην έκφραση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων (τόσο στο χώρο όσο και σε ποσότητα) οδηγούν σε σημαντικά προβλήματα, που σχετίζονται κυρίως με μορφολογικές και λειτουργικές ανωμαλίες των διαφόρων οργάνων.

Ο καρκίνος είναι συχνά αποτέλεσμα ενεργοποίησης πρωτο-ογκογονιδίων, τα προϊόντα των οποίων επάγουν την κυτταρική διαίρεση. Πολλά πρωτο-ογκογονίδια κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων που ενέχονται στον προγραμματισμό του πολλαπλασιασμού του κυττάρου (έλεγχος κυτταρικού κύκλου). Η εκτροπή της φυσιολογικής έκφρασης αυτών των γονιδίων προκαλεί αρκετά είδη λευχαιμίας, η πλειονότητα των οποίων χαρακτηρίζεται από ειδικές χρωμοσωμικές μετατοπίσεις. (23)

Πολλές μελέτες στη ΦΔΘ έχουν δείξει ότι οι περιοχές υποκινητών, σε πολλά γονίδια τα οποία συμμετέχουν στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενεργοποιούνται μέσω μιας ποικιλίας φυσικών και χημικών καταπονήσεων. Για το λόγο αυτόν έχουν σχετιστεί οι περιοχές αυτές με την πρόκληση αλλά και με την αποτροπή της απόπτωσης. Έτσι, στα πλαίσια της ΦΔΘ ο μηχανισμός αυτός των ενεργοποιημένων γονιδίων, μπορεί να αξιοποιηθεί ως θεραπευτική μέθοδος για τον καρκίνο, διότι έχει την ιδιότητα είτε να απενεργοποιεί είτε να διεγείρει πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια, μειώνοντας έτσι το μηχανισμό επιβίωσης των κυττάρων, επιφέροντας απόπτωση.(4) (34) (35)

Αλλαγές στην πρόσφυση των κυττάρων

Τα κύτταρα των θηλαστικών προσφύονται στο εξωκυττάριο στρώμα¹⁹, αλλά και μεταξύ τους μέσω ειδικών πρωτεϊνών-υποδοχέων²⁰, που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη. Οι υποδοχείς ταξινομούνται στις ακόλουθες κατηγορίες: ιντεγκρίνες, μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών, σελεκτίνες και καδερίνες. Οι ιντεγκρίνες είναι διάσπαρτα διαμεμβρανικά μόρια πρόσφυσης, τα οποία μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση των κυττάρων με το εξωκυττάριο στρώμα, ελέγχοντας έτσι τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι οι ιντεγκρίνες δρουν, επιπλέον, ως υποδοχείς για τη μεταγωγή σήματος, διεγείροντας πλήθος διακυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία ελέγχουν τη συμπεριφορά και την ανάπτυξη των κυττάρων. (23)

Οι σελεκτίνες μεσολαβούν σε παροδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λευκοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων ή των αιμοπεταλίων. Υπάρχουν τρία είδη από την οικογένεια των σελεκτινών: η σελεκτίνη-L, η οποία εκφράζεται στα λευκοκύτταρα· η σελεκτίνη-Ε, η οποία εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και η σελεκτίνη-Ρ,η οποία εκφράζεται στα αιμοπετάλια. Οι σελεκτίνες αναγνωρίζουν τους υδατάνθρακες της επιφάνειας του κυττάρου. Ο κυριότερος

¹⁹Εξωκυττάριο στρώμα (extracellularmatrix): περίπλοκο δίκτυο πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών που εκκρίνονται από τα κύτταρα. Ένα δομικό συστατικό των ιστών που επίσης επηρεάζει την ανάπτυξη και τη φυσιολογία τους.(23)

²⁰Υποδοχέας: μια πρωτεΐνη που ανιχνεύει ένα ερέθισμα, συνήθως τη μεταβολή στη συγκέντρωση ενός ειδικού σηματοδοτικού μορίου, και κατόπιν πυροδοτεί μια απάντηση μέσα στο κύτταρο. (23)

ρόλος τους είναι να επάγουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λευκοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων κατά τη διάρκεια της μεταφοράς των λευκοκυττάρων από την κυκλοφορία στο μέρος όπου υπάρχει φλεγμονή του ιστού. Οι σελεκτίνες μεσολαβούν στην αρχική πρόσφυση των λευκοκυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Οι καδερίνες συμμετέχουν στον ομοφιλικό μηχανισμό²¹. Εμπλέκονται στην επιλεκτική πρόσφυση μεταξύ των εμβρυϊκών κυττάρων αλλά και είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία σταθερών συνδέσμων μεταξύ των κυττάρων του ιστού. (23)

Οι αλλαγές στην επαφή των κυττάρων με το υπόστρωμα, αλλά και μεταξύ τους είναι από τις πιο σημαντικές επιπτώσεις της Φωτοδυναμικής Θεραπείας. Οι αλλαγές αυτές οφείλονται κυρίως στην καταστροφή των μορίων της πρόσφυσης που βρίσκονται στις μεμβράνες των κυττάρων. Έρευνες έχουν δείξει ότι η μείωση της πρόσφυσης μεταξύ των κυττάρων έχει άμεση σχέση με τη μείωση της τάσης για μετάσταση, που έχουν τα καρκινικά κύτταρα. (4) (36)

Απόκριση στην καταπόνηση

Η Φωτοδυναμική Θεραπεία προκαλεί έκκριση πολλών ουσιών, οι οποίες είναι η απάντηση του κυττάρου στην εξωτερική καταπόνηση. Άλλες ουσίες δρουν προστατευτικά στα κύτταρα και άλλες δίνουν το μήνυμα για προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, δηλαδή την απόπτωση. Οι ουσίες αυτές λοιπόν δρουν ενάντια στο σκοπό της ΦΔΘ που είναι η καταστροφή του κυττάρου. Παράγονται όμως και ουσίες «αυτοκτονίας» που οδηγούν το κύτταρο σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Όλα τα κύτταρα παράγουν ένα κοινό σύνολο πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins-Hsps) και πρωτεϊνών ρυθμιζόμενων από τη γλυκόζη (glucose-regulated proteins-Grps), ως απόκριση σε πλήθος καταπονήσεων. Πειράματα σε Ε. Coli, ζυμομύκητες, δροσόφιλες και μυς έχουν δείξει ότι η αυξημένη έκφραση αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να προστατεύσει τον οργανισμό από βλάβες οφειλόμενες σε καταπονήσεις. Οι πρωτεΐνες θερμικού shock αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών, η λειτουργία των οποίων είναι να προστατεύουν τα κύτταρα από περιβαλλοντικά ή παθοφυσιολογικά ερεθίσματα, ούτως ώστε να επιβιώνουν σε καταστάσεις ανάγκης και να επανακτούν τη φυσιολογική τους λειτουργικότητα.

Οι περισσότερες, αλλά όχι όλες πρωτεΐνες θερμικού σοκ, είναι προστατευτικά μόρια (molecular chaperons). Με τη βοήθειά τους επιτυγχάνεται η κατάλληλη τρισδιάστατη πτύχωση και μεταφορά των πρωτεϊνών καθώς και η αποφυγή μη ειδικών συναθροίσεων των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδίων. Η προστατευτική αυτή λειτουργία των Hsp είναι ιδιαίτερα σημαντική σε υψηλές θερμοκρασίες, όπου ευνοείται η δημιουργία και η συνάθροιση αλλοιωμένων πολυπεπτιδίων, και επιτυγχάνεται με παρεμπόδιση δημιουργίας μη-ειδικών συμπλεγμάτων ή με διάσπαση αυτών. Έτσι ελαττώνεται η τελική κυτταρική διαταραχή.

²¹Ομοφιλικός μηχανισμός: ο μηχανισμός κατά τον οποίο μόρια ενός κυττάρου συνδέονται με μόρια του ίδιου τύπου, που προέρχονται από γειτονικό κύτταρο.

Οι πρωτεΐνες Hsp ταξινομούνται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος, για παράδειγμα, Hsp 70 για πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 70 kDa.

Η οξυγενάση της αίμης διασπά την αίμη σε μονοξείδιο του άνθρακα, σίδηρο και χολοπρασίνη, η οποία ακολούθως ανάγεται σε χολερυθρίνη, μέσω της αναγωγάσης της χολοπρασίνης. Η οξυγενάση της αίμης (OA) όχι μόνο καταλύει την απομάκρυνση των επικίνδυνων μορίων αίμης, τα οποία μπορούν να δημιουργήσουν επιβλαβείς χημικές ρίζες, όταν είναι ελεύθερα, αλλά επιπλέον τα παράγωγα της δράσης της OA λειτουργούν ως νευροδιαβιβαστές, ρυθμίζουν τον αγγειακό τόνο και προστατεύουν το κύτταρο από πλήθος κινδύνων. Το γονίδιο της OA περιέχει θέσεις πρόσδεσης για αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης και της ακολουθίας συναίνεσης AP-1, η οποία μπορεί να συμβάλει στην αύξηση της έκφρασης των γονιδίων, δεδομένου ότι αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας δύναται να ενεργοποιηθεί στη ΦΔΘ.

Από τη ΦΔΘ μπορεί επίσης να αυξηθεί η έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων.

Για να επιτευχθεί η ταχύτατη επαγωγή των πρωτεϊνών Hps σε καταστάσεις θερμικού stress, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα ευρύτατο σύστημα παραγόντων που δρουν σε μεταγραφικό ή μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Κοινοί αποδέκτες όλων των ρυθμιστικών μηχανισμών στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι οι παράγοντες ελέγχου μεταγραφής επί θερμικού σοκ (HSFs-Heat shock transcription factor), οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων θερμικού στρες. Οι παράγοντες HSF σε κατάσταση ηρεμίας βρίσκονται υπό λανθάνουσα μορφή, στην οποία δεν έχουν ικανότητα σύνδεσης με το DNA. Ενεργοποιούνται με την επίδραση διάφορων ερεθισμάτων.

Έρευνες έδειξαν ότι η ΦΔΘ ενδεχομένως να μπορεί να δράσει ως επαγωγέας, ενεργοποιούμενος από το φως, της έκφρασης ενός συγκεκριμένου γονιδίου(για παράδειγμα γονιδίων αυτοκτονίας) αρκεί το εν λόγω γονίδιο να μπορεί να συνδεθεί με έναν υποκινητή θερμικού σοκ ή έναν υποκινητή Grp. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να προκληθεί είτε κυτταρικός θάνατος είτε αντοχή του κυττάρου ενάντια στη ΦΔΘ.(4) (23) (37)

Υποξία και αγγειογένεση

Η υποξία του όγκου σχετίζεται με την κακοήθη εξέλιξη του, την αντίσταση στη Χημειοθεραπεία, στη ΦΔΘ και στη Ραδιοθεραπεία. Πολλά από αυτά τα φαινόμενα στα υποξικά νεοπλασματικά κύτταρα διαμεσολαβούνται από μεταγραφική ενεργοποίηση, ρυθμιζόμενη από το οξυγόνο, συγκεκριμένης ομάδας γονιδίων, των οποίων η σχέση με την ανθεκτικότητα έναντι της θεραπείας δεν είναι εντελώς κατανοητή.

Ο επαγώγιμος παράγοντας υποξίας (HIF)-1 είναι ο κύριος μεταγραφικός ενεργοποιητής γονιδίων ρυθμιζόμενων από το οξυγόνο, τα οποία εμπλέκονται στον αναερόβιο μεταβολισμό ενέργειας, στην αγγειογένεση, στην κυτταρική επιβίωση, στην κυτταρική εισβολή και στην αντίσταση στις φαρμακευτικές ουσίες. Ο (HIF)-1 είναι ένα ετεροδιμερές αποτελούμενο από δύο υπομονάδες, το HIF-1A δεμένο στο HIF-1B. Όμως ενώ η δεύτερη υπομονάδα εκφράζεται

πλήρως, η πρώτη διασπάται ταχέως υπό κανονικές συνθήκες συγκέντρωσης οξυγόνου. Η υποξία σταθεροποιεί το HIF-1A, επιτρέποντας το σχηματισμό του μεταγραφικώς δραστικού συμπλόκουHIF-1, το οποίο προσδένεται στο στοιχείο απόκρισης στην υποξία που βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή συγκεκριμένων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα(vascular endothelial growth factor -VEGF). Ο HIF-1 είναι ένας παράγοντας ο οποίος ευνοεί την αύξηση του όγκου. Λόγω του ότι η ΦΔΘ έχει τη δυνατότητα να καταναλώσει πολύ γρήγορα εξαιρετικά μεγάλες ποσότητες του οξυγόνου των ιστών και επίσης να διακόψει την παροχή αίματος στον όγκο (το οποίο μεταφέρει οξυγόνο), η θεραπεία μπορεί αφ' εαυτής να προξενήσει κάποια επίπεδα υποξίας.

Έχει παρατηρηθεί ότι η ΦΔΘ καταστρέφει την αγγείωση του όγκου, βοηθώντας έτσι στην ταχύτερη εξάλειψή του. Έχει παρατηρηθεί όμως ότι, παρά το στόχο αυτόν της καταστροφής της αγγείωσης, η ΦΔΘ είναι δυνατό να προκαλέσει αγγειογένεση.(4)

Το ενδεχόμενο η ΦΔΘ να προκαλεί απόκριση αγγειογένεσης, κατά την οποία σχηματίζονται νέα αγγεία αίματος, παρατηρήθηκε πρώτη φορά το 1989. Σε ουρές ποντικιών εγχύθηκε meso-tetra (sulphonatophenyl) porphine και η φωταύγεια έδειξε μια αύξηση στα αγγεία αίματος, για χαμηλές δόσεις, αλλά όχι για δόσεις ικανές να προκαλέσουν εκτεταμένη νέκρωση. (38)

Σε άλλη έρευνα, χρησιμοποιήθηκε ανοσοστύπωση κατά Western, για να αναλυθεί η έκκριση ρυθμιστών αγγειογένεσης στα υπερκείμενα διαλύματα κυτταρικών σειρών, που προκαλείται από εφαρμογή ΦΔΘ. Το αποτέλεσμα ήταν ότι ανιχνεύτηκαν και προαγγειογενετικοί και αντιαγγειογενετικοί παράγοντες. (39)

ΦΔΘ με χρήση Photofrin (PF) προκάλεσε την έκφραση της υπομονάδαςHIF-1A του ετεροδιμερούς μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 και επιπλέον αύξησε τα επίπεδα πρωτεϊνών του HIF-1 γονιδίου στόχου, του VEGFσε θεραπευμένο μεταμοσχεύσιμο καρκίνωμα του μαστού, ποντικού(BA). Εφαρμογή της ΦΔΘ σε καρκινικά κύτταρα BA που αναπτύσσονται σε καλλιέργεια, είχε ως αποτέλεσμα μια μικρή αύξηση στην έκφραση του VEGF πιο πάνω από τα βασικά επίπεδα, υποδεικνύοντας ότι η υποξία και το οξειδωτικό στρες που TOV VEGF. (40)

Σε άλλη έρευνα μελετήθηκε η αγγειογένεση που συμβαίνει σε φυσιολογικούς εγκεφάλους ποντικιών, όταν υποστούν PF-ΦΔΘ²². Όντως προκλήθηκε αγγειογένεση. Η έκφραση του VEGF αυξήθηκε στο ημισφαίριο που είχε εφαρμοστεί PF-ΦΔΘ, μία εβδομάδα μετά και παρέμεινε ανεβασμένη για έξι εβδομάδες. (41)

Τα γονίδια που επάγονται από την υποξία έχουν ερευνηθεί και σε ανθρώπινους όγκους, όπου έχει εφαρμοστεί ΦΔΘ. Η εφαρμογή PF-ΦΔΘ, σε ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο του οισοφάγου, σε πρώιμο στάδιο, αύξησε την έκφραση της υπομονάδαςHIF-1A του ετεροδιμερούς μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 καθώς και την έκφραση του γονιδίου στόχου του HIF-1, δηλαδή του VEGF. Η υψηλή έκφραση του HIF-1A σχετίστηκε με χαμηλή απόκριση στη θεραπεία.

²²ΦΔΘ όπου έχει χρησιμοποιηθεί ως φωτοευαισθητοποιητής η Photofrin.

iv. Τα είδη του κυτταρικού θανάτου που επάγονται από τη $\Phi \Delta \Theta$

Το είδος του κυτταρικού θανάτου που θα προκληθεί από την εφαρμογή ΦΔΘ έχει σημαντική επίπτωση στη μεταθεραπευτική ανοσολογική απόκριση του οργανισμού, η οποία δυνητικά μπορεί να ενισχύσει την επίδραση της ΦΔΘ στην καταστροφή του καρκινικού όγκου.

Νέκρωση και απόπτωση

Τα κύτταρα που πεθαίνουν μετά από οξεία βλάβη τυπικά διογκώνονται, διαρρηγνύεται η πλασματική μεμβράνη, τα κυτταρικά οργανίδια υφίστανται ολοκληρωτική καταστροφή. Έτσι τα κύτταρα κατακερματίζονται, διασπείροντας το περιεχόμενό τους πάνω στα γειτονικά κύτταρα και προκαλώντας δυνητικά φλεγμονώδη απάντηση. Η διαδικασία αυτή λέγεται κυτταρική νέκρωση.

Αντίθετα ένα κύτταρο που υφίσταται προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ή, αλλιώς, απόπτωση, πεθαίνει «ήσυχα» προκαλώντας ελάχιστη βλάβη στα γειτονικά του κύτταρα. Το κύτταρο αυτό συρρικνώνεται και συμπυκνώνεται, ο κυτταροσκελετός καταρρέει, το πυρηνικό περίβλημα αποσυναρμολογείται και το DNA του πυρήνα θρυμματίζεται σε μικρά κλάσματα. Η κυτταρική επιφάνεια του κυττάρου που πεθαίνει, τροποποιείται και εκδηλώνει ιδιότητες που προκαλούν την άμεση φαγοκυττάρωσή του είτε από τα γειτονικά του κύτταρα είτε από ένα μακροφάγο.

Ο μηχανισμός που ευθύνεται για αυτό το είδος της λεγόμενης «κυτταρικής αυτοκτονίας» περιλαμβάνει μια οικογένεια πρωτεασών. Οι πρωτεάσες είναι ένζυμα(πρωτεΐνες) που διασπούν άλλες πρωτεΐνες. Οι πρωτεάσες ενεργοποιούνται με πρωτεόλυση σε απάντηση προς διάφορα σήματα που επάγουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Οι ενεργοποιημένες πρωτεάσες αυτοκτονίας διασπούν, και έτσι ενεργοποιούν και άλλα μέλη της ίδιας οικογένειας, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της πρωτεολυτικής ακολουθίας. Στη συνέχεια οι ενεργοποιημένες πρωτεάσες διασπούν άλλες βασικής σημασίας πρωτεΐνες του κύτταρου και το θανατώνουν γρήγορα και ήσυχα. (23)

Οι παράμετροι που επηρεάζουν το είδος του κυτταρικού θανάτου που θα προκληθεί από τη ΦΔΘ, συνοπτικά, είναι οι ακόλουθες: το είδος, η συγκέντρωση και ο υποκυττάριος εντοπισμός του φωτοευαισθητοποιητή, ο χρόνος επώασης, το είδος και η ισχύς της φωτεινής ακτινοβολίας καθώς και ο χρόνος ακτινοβόλησης.(4)

Παρατυχόν φαινόμενο

Εκτός από την νέκρωση και την απόπτωση έχει παρατηρηθεί ένας επιπλέον μηχανισμός κυτταρικής καταστροφής. Σε πείραμα Φωτοδυναμικής θεραπείας in vitro παρατηρήθηκε ότι εκτός από τα κύτταρα που θανατώθηκαν άμεσα, στα γειτονικά τους κύτταρα προκλήθηκε θανατηφόρος βλάβη, η οποία διαδόθηκε σε μια σειρά άλλων γειτονικών κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε παρατυχόν.(4)

Ο βαθμός που συμβαίνει το φαινόμενο αυτό βρέθηκε μεγαλύτερος στα κύτταρα που πεθαίνουν με νέκρωση παρά με απόπτωση. Αρχικά θεωρήθηκε ότι το φαινόμενο οφειλόταν στην διακυτταρική επικοινωνία μέσω των χασμοσυνδέσμων, όμως όταν ελέγχθηκε η υπόθεση αυτή, με την πρόσθεση ενός αναστολέα της δημιουργίας χασμοσυνδέσμων, δεν παρατηρήθηκε μείωση του παρατυχόντος φαινομένου. (42) (43)

Μελετητές από το πεδίο των ιοντιζουσών ακτινοβολιών (όπου και εκεί παρατηρείται το παρατυχόν φαινόμενο) πρότειναν ότι ίσως να οφείλεται αφενός μεν στη διακυτταρική επικοινωνία μέσω χασμοσυνδέσμων αλλά και στη διάχυση των ROS σε γειτονικά κύτταρα. (45)

Μηχανισμοί που ενεργοποιούνται από τη ΦΔΘ και οδηγούν στη νέκρωση

Γενικά μιλώντας, η νέκρωση επέρχεται όταν εφαρμόζονται μεγάλα ποσά φωτεινής ακτινοβολίας και υψηλές συγκεντρώσεις φωτοευαισθητοποιητή. Οι λιπόφιλες ανιονικές χρωστικές, οι οποίες εντοπίζονται στα μεμβρανικά συστήματα επιδρούν στη χοληστερόλη που βρίσκεται στις μεμβράνες και σε άλλα ακόρεστα φωσφολιπίδια μετατρέποντάς τα σε υπεροξείδια. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε αλλαγές στη διαπερατότητα της μεμβράνης, στην απώλεια της μεταβλητότητάς της, στη διασύνδεση των αμινολιπιδίων και των πολυπεπτιδίων και στην απενεργοποίηση των υποδοχέων της και των ενζύμων που σχετίζονται με αυτήν. Η μετατροπή των λιπιδίων και των πρωτεϊνών της μεμβράνης σε υπεροξείδια προκαλεί απώλεια της ακεραιότητάς της και της ιοντικής της ομοιόστασης. Ενδεχομένως αυτή να είναι η πρωταρχική εξήγηση για την πρόκληση νέκρωσης.

Μία άλλη εξήγηση για την πρόκληση νέκρωσης θεωρείται η αναστολή των ενζύμων που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια και η επακόλουθη διακοπή της ενεργειακής υποστήριξης του κυττάρου. Επιπρόσθετα, της απενεργοποίησης των συστημάτων μεταφοράς της μεμβράνης, της άρσης της πολικότητάς της και της αναστολής των ενζύμων που επισκευάζουν το DNA προηγείται η απενεργοποίηση των ενζύμων που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια, στα κυτοσόλια και στα λυσοσώματα, οδηγώντας έτσι σε καθολική απώλεια της ομοιόστασης.(4)

Μηχανισμοί που ενεργοποιούνται από τη ΦΔΘ και οδηγούν στην απόπτωση

Υπερπαραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου-ROS

Τα ROS που δημιουργούνται στα μιτοχόνδρια είτε στο κυτταρόπλασμα είναι εν δυνάμει επαγωγείς της απόπτωσης. Έχουν διατυπωθεί πολλές θεωρίες που υποστηρίζουν ότι τα ROS,που παράγονται από τη ΦΔΘ, δημιουργούν πόρους στα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια ακολούθως απελευθερώνουν τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες που περιέχουν, οδηγώντας έτσι το κύτταρο σε απόπτωση.(4) (46) (47)

Φθορά στο ενδοπλασματικό δίκτυο

Όπως συζητήθηκε στα προηγούμενα, η ΦΔΘ συνοδεύεται με μια αύξηση στη συγκέντρωση του ασβεστίου([Ca²⁺]), η οποία οφείλεται στην απελευθέρωση ασβεστίου από ενδοκυττάριες αποθήκες, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο ή τα μιτοχόνδρια, ή μπορεί να προέρχεται από το εξωτερικό του κυττάρου. Η αύξηση αυτή θεωρείται ότι συνδέεται με την απόπτωση. Θεωρείται ότι η ΦΔΘ αποσταθεροποιεί τη μεμβράνη των μιτοχονδρίων και το ενδοπλασματικό δίκτυο, αυξάνεται έτσι το ασβέστιο το οποίο βρίσκεται στα κυτοσόλια, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί στο άνοιγμα των πόρων των μιτοχονδρίων και ακολούθως στην απόπτωση.(4)

Βλάβη στα λυσοσώματα

Οι υδρόφιλοι ΦΕ τείνουν να συγκεντρώνονται στα λυσοσώματα και ακολούθως να προκαλούν απόπτωση με πολλούς τρόπους. Προκαλείται απελευθέρωση καθεψινών (είδος πρωετασών) από τα οργανίδια τα οποία έχουν υποστεί βλάβη στο κυτταρόπλασμα. Όταν οι καθεψίνες βρεθούν στο κυτοσόλιο μπορούν να άμεσα να ενεργοποιήσουν τις κασπάσες (υπεροικογένεια πρωτεασών) και έτσι να επάγουν την απόπτωση. Οι καθεψίνες με έμμεσο τρόπο συνδέονται και με τη διαδικασία κατά την οποία ανοίγουν οι πόροι των μιτοχονδρίων και ακολούθως ελευθερώνονται οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες. (4) (46)

v. Μηχανισμοί καταστροφής των όγκων

Εκτός από την άμεση καταστροφή των κυττάρων που περιγράφονται με τη νέκρωση και την απόπτωση η Φωτοδυναμική Θεραπεία λειτουργεί με δύο επιπλέον τρόπους. Καταστρέφει το αγγειακό σύστημα του όγκου, στερώντας τον από οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, οδηγώντας τον έτσι μακροπρόθεσμα στην εξάλειψη. Επιπλέον ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα, επάγοντας έτσι μηχανισμούς όπου ο ίδιος ο πάσχων οργανισμός αναγνωρίζει και καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα. Δυνητικά η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού είναι ικανή να αποτρέψει μεταστάσεις. Στα πλαίσια της κατανόησης της ανοσολογικής απόκρισης εντάσσονται και οι έρευνες για παραγωγή εμβολίων κατά του καρκίνου.

Στο σχήμα που ακολουθεί περιγράφονται οι τρεις αυτοί κύριοι μηχανισμοί δράσης της Φωτοδυναμικής Θεραπείας



Σχήμα IV.3: Μηχανισμοί δράσης της Φωτοδυναμικής Θεραπείας στα καρκινικά κύτταρα²³

Ο φωτοευαισθητοποιητής απορροφά φως και ένα ηλεκτρόνιο ανεβαίνει στην βραχύβια, πρώτη διεγερμένη μονή στάθμη. Ακολουθεί εσωτερική μετατροπή, όπου το διεγερμένο ηλεκτρόνιο αλλάζει το σπιν του και παράγει μια σχετικά μακρόβια, τριπλή διεγερμένη κατάσταση. Από την κατάσταση αυτή του ΦΕ μεταφέρεται ενέργεια στη θεμελιώδη τριπλή κατάσταση του οξυγόνου η οποία παράγει δραστικό μονήρες οξυγόνο (¹O₂). Το¹O₂ μπορεί άμεσα να προκαλέσει νέκρωση ή απόπτωση, βλάβες στο αγγειακό σύστημα και ενεργοποίηση οξείας φλεγμονώδους

²³Ana P. Castano, PawelMroz and Michael R. Hamblin. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Nature* . 2006.

απόκρισης, η οποία προσελκύει λευκοκύτταρα όπως τα δενδριτικά κύτταρα και τα ουδετερόφιλα. (48)

Άμεση θανάτωση των καρκινικών κυττάρων

Η πρώτη επίδραση της ΦΔΘ στους καρκινικούς όγκους που μελετήθηκε ήταν η άμεση καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, μέσω της νέκρωσης και της απόπτωσης. Παρατηρήσεις όμως που συνδέονται με τη δημιουργία υποξίας και την αδυναμία επίδρασης της ΦΔΘ σε υποξικά περιβάλλοντα in vitro οδήγησαν στην υπόθεση, που επιβεβαιώθηκε αργότερα, ότι εκτός από τους άμεσους μηχανισμούς καταστροφής θα πρέπει η ΦΔΘ να δρα και με άλλους τρόπους. Η υπόθεση αυτή ήταν αναγκαία γιατί αφενός πειράματα τεχνητής υποξίας in vitro έδειχναν αδυναμία στη δράση της ΦΔΘ και αφετέρου ήταν βέβαιο ότι η ΦΔΘ προκαλεί υποξία, αλλά έμενε ανεξήγητη η επιτυχία της ΦΔΘ in vivo. Επόμενες μελέτες έδειξαν βλάβη στο αγγειακό σύστημα του όγκου και ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού, μηχανισμοί που και οι δύο οδηγούν σε μακροπρόθεσμη καταστροφή του όγκου. (49)

Καταστροφή αγγειακού συστήματος του όγκου

Ο πρώτος, λοιπόν, βοηθητικός μηχανισμός που παρατηρήθηκε να λειτουργεί με την εφαρμογή ΦΔΘ είναι η επίδραση στην αγγείωση του όγκου. Καταστροφή της αγγείωσης οδηγεί σε μακροπρόθεσμο έλεγχο της εξέλιξής του.

Η κατάρρευση του μικροαγγειακού συστήματος είναι εμφανής σε πολλές περιπτώσεις ΦΔΘ, η οποία οδηγεί σε οξεία και μόνιμη υποξία τον όγκο.

Τα επιμέρους φαινόμενα που συμβάλλουν στην αποκοπή του όγκου από το κεντρικό κυκλοφορικό σύστημα, διαφέρουν από ΦΕ σε ΦΕ, καθώς και από το είδος, την ένταση και το χρόνο δράσης της ακτινοβολίας.

Για παράδειγμα ΦΔΘ με ΦΕ τη Photofrin, οδηγεί σε στένωση των αγγείων, εξάλειψη των μακρομορίων των αγγείων, προσκόλληση λευκοκυττάρων και σχηματισμό θρόμβων, όλα αυτά συνδέονται με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την έκκριση θρομβοξάνης. Σε άλλες μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε άλλος ΦΕ παρατηρήθηκε στάση στη ροή του αίματος, από τη συνάθροιση των αιμοπεταλίων. Εικάζεται ότι όλα τα προαναφερθέντα φαινόμενα σχετίζονται με βλάβες που υφίσταται το ενδοθήλιο²⁴ των αγγείων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, περιβάλλουν τα αγγεία, παρέχοντας μηχανική υποστήριξη και βοηθούν στην ανταλλαγή σημάτων μονοξειδίου του αζώτου (NO), με τις απολήξεις των νευρικών κυττάρων, που σχετίζονται με τη διαστολή ή τη συστολή τους. Η ιδιότητα αυτή αξιοποιείται από τη ΦΔΘ, ώστε να ανασταλεί η έκκριση NO, ώστε να προκληθεί συστολή των κυττάρων και ακολούθως να οδηγηθεί ο καρκινικός ιστός σε υποξία.

²⁴Αδένας που καλύπτει εσωτερικά όλα τα αγγεία

Σημειώνεται εδώ, ότι ενδεχόμενη καταστροφή φυσιολογικής αγγείωσης η οποία τροφοδοτεί τον όγκο, ναι μεν προκαλεί σοβαρή βλάβη στον όγκο, δυσκολεύει όμως τη συνολική ανάρρωση του ασθενή, επομένως δεν αποτελεί αποδεκτή πρακτική.(47) (49)

Ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος

Η Φωτοδυναμική Θεραπεία ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα με δύο τρόπους. Αρχικά προκαλείται οξεία φλεγμονώδης απόκριση, όπου ο οργανισμός απομακρύνει τα κατάλοιπα του όγκου και επουλώνει την πληγή. Μακροπρόθεσμα όμως, από τα παράγωγα της φλεγμονής δημιουργούνται αντισώματα εναντίον των αντιγόνων του όγκου και έτσι ολοκληρώνεται η καταστροφή του πρώτου όγκου, αλλά ταυτόχρονα ο οργανισμός προστατεύεται από μελλοντικές μεταστάσεις, αφού πλέον είναι ικανός να αντιμετωπίζει μόνος του την καρκινογένεση. Πρέπει να τονιστεί εδώ ότι αυτά βρίσκονται ακόμα σε ερευνητικό στάδιο. Οι ενδείξεις αυτές αφορούν συγκεκριμένες μελέτες που έγιναν σε πειραματόζωα, ανοίγουν όμως ελπιδοφόρους δρόμους για την αποτελεσματικότητα της Φωτοδυναμικής Θεραπείας. Ίσως να αποτελέσει την ιδανική θεραπεία, αφού οι εναλλακτικές θεραπείες όπως η Θεραπεία με Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες, η Χημειοθεραπεία και η Χειρουργική αφαίρεση των όγκων δρουν ανοσοκατασταλτικά. Στο ακόλουθο σχήμα παριστάται η ενεργοποίηση της φλεγμονώδους απόκρισης:



Σχήμα IV.4: Συνέπειες από την ενεργοποίηση φλεγμονής²⁵

²⁵Ana P. Castano, Pawel Mroz and Michael R. Hamblin. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Nat Rev Cancer.* 2006, Vol. 6, 7, pp. 535-45

Η βλάβη στα ενδοθηλιακά κύτταρα (ΕΘΚ), που προξένησε η ΦΔΘ, ενεργοποιεί πλήθος φαινομένων τα οποία οδηγούν σε τοπική φλεγμονή, σε διαστολή των αγγείων και στη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Τα περισσότερα οφείλονται στην απελευθέρωση θρομβοξάνης (ΘΒΞ), κυτταροκινών όπως η ιντερλευκίνη 1β (ΙL1β), IL6 και ΙL8, ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α (TNFα, Tumor Necrosis Factor) και στη διαπότιση των καρκινικών κυττάρων από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. (47)

Τα **μονοκύτταρα** συγκαταλέγονται στα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος. Ανήκουν στο σύστημα των **φαγοκυττάρων**. Παράγονται στο μυελό των ιστών και στη συνέχεια αποδεσμεύονται στην κυκλοφορία. Μετά από σύντομη παραμονή στο αίμα (1 με 2 ημέρες), μεταναστεύουν στους ιστούς, όποτε πλέον χαρακτηρίζονται ως **μακροφάγα**. Τα **ιστιοκύτταρα** είναι μακροφάγα που ανήκουν στο συνδετικό ιστό. (23)

Οι **κυτταροκίνες** είναι διαβιβαστές πρωτεϊνικής ή γλυκοπρωτεϊνικής φύσης, εκκρίνονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος για να επικοινωνούν μεταξύ τους, κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απάντησης. Συγκεκριμένα οι **ιντερλευκίνες** 1 και 6, και ο TNF-α(καχεξίνη) παράγονται κυρίως από τα μακροφάγα, ασκούν πυρετογόνο δράση και αποτελούν μεσολαβητές της φλεγμονώδους αντίδρασης και των σηπτικών φαινομένων. Η ιντερλευκίνη 8 ανήκει και αυτή στους μεσολαβητές της φλεγμονώδους της φλεγμονώδους αντίδρασης και των σηπτικών σαινομένων. Η ιντερλευκίνη 8 ανήκει και αυτή στους μεσολαβητές της φλεγμονώδους αντίδρασης και των σηπτικών συστησης και ασκεί κυρίως χημειοτακτική δράση. (50)

Η **θρομβοξάνη** παράγεται από μονοκύτταρα, μακροφάγα και αιμοπετάλια και προκαλεί συσσωμάτωση αιμοπεταλίων και συστολή αγγείων και αεραγωγών. Τα μακροφάγα μέσω της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης αναλαμβάνουν να απομακρύνουν από την περιοχή τα κατάλοιπα της νέκρωσης και της απόπτωσης. (23)

Τα **ουδετερόφιλα** προέρχονται από πολυδύναμα κύτταρα του μυελού των οστών και συμμετέχουν στη διαδικασία της φλεγμονής ως μη ειδικοί αποδέκτες μηνυμάτων ειδικών απαντήσεων από άλλα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος.(23)

Τα νεκρωτικά και αποπτωτικά καρκινικά κύτταρα εκφράζουν πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins- HSPs) και προμηθεύουν με αντιγόνα τα **δενδριτικά κύτταρα** (ΔK), τα οποία «μεταναστεύουν» για να συναντήσουν τους λεμφαδένες.(23)

Στο επόμενο σχήμα εξηγείται η διαδικασία με την οποία τα αντιγόνα του όγκου συλλαμβάνονται από τα δενδριτικά κύτταρα με απώτερο αποτέλεσμα τη δημιουργία κυτταροτοξικώνCD8⁺T λεμφοκυττάρων. Τα κύτταρα αυτά είναι η απάντηση του οργανισμού στο μήνυμα εισβολής που δέχθηκε από τον όγκο. Οδηγείται έτσι ο οργανισμός σε μακροχρόνια ανοσία.



Σχήμα ΙV.5: Δημιουργία κυτταροτοξικώνCD8⁺T λεμφοκυττάρων²⁶

Όταν η φωτεινή ακτινοβολία(hu) φτάσει σε έναν ιστό ο οποίος έχει διαποτιστεί με φωτοευαισθητοποιητή προκαλείται νέκρωση και απόπτωση στα κύτταρά του.

Όλα τα κατάλοιπα απομακρύνονται από τα φαγοκύτταρα. Ειδικά όμως τα αντιγόνα που φέρουν πάνω τους τα καρκινικά δεσμεύονται από τα δενδριτικά κύτταρα (ΔΚ) μέσω της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης. Τα δενδριτικά κύτταρα είναι προϊόντα της οξείας φλεγμονώδους απόκρισης που προκαλεί η ΦΔΘ. Όταν το δενδριτικό κύτταρο ωριμάσει, μεταναστεύει στους λεμφαδένες για να παραδώσει το αντιγόνο. Οι λεμφαδένες με τη σειρά τους τροποποιούν τα πρόδρομα Τλεμφοκύτταρα καθιστώντας τα εξειδικευμένους «μαχητές» για την αντιμετώπιση της «εισβολής». Τα εξειδικευμένα πλέον κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα CD8⁺ οδεύουν μέσω των αγγείων του ιστού και επιτίθενται σε αυτόν.

Τα εξειδικευμένα κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα CD8⁺ καθώς και άλλα παράγωγα της ανοσολογικής απόκρισης δίνουν την ιδέα για την παρασκευή εμβολίου έναντι της τόσο δύσκολης αυτής νόσου.(47)

²⁶Ana P. Castano, Pawel Mroz and Michael R. Hamblin. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Nat Rev Cancer.* 2006, Vol. 6, 7, pp. 535-45

V. ENIEXYEH THE $\phi\Omega TO\Delta YNAMIKHE \Delta PAEHE$

i. Η Νανοτεχνολογία στη Φωτοδυναμική Θεραπεία

Από την προηγηθείσα ανάλυση γίνεται σαφές ότι ο βασικός μηχανισμός της Φωτοδυναμικής Θεραπείας συμβαίνει σε επίπεδο νανοκλίμακας. Στην παράγραφο αυτή αναλύονται οι τρόποι συσχετισμού της ΦΔΘ με τη Νανοτεχνολογία και το πώς η δεύτερη ενισχύει τη δράση της πρώτης.

Πολλές βιολογικές διαδικασίες συμβαίνουν σε επίπεδο νανοκλίμακας. Για παράδειγμα η μεταφορά των λιπιδίων από, προς και μεταξύ των κυττάρων συμβαίνει σε επίπεδο νανοκλίμακας, με τη βοήθεια του συστήματος υποδοχής των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας. Επιπλέον, η νευρωνική μεταφορά και πιθανώς η μνήμη βασίζεται στην αποθήκευση ουσιών και στην αποδόμηση τους σε επίπεδο νανοκλίμακας. (51)

Επίσης η έκφραση των γονιδίων είναι μια διαδικασία που συμβαίνει και αυτή σε επίπεδο νανοκλίμακας.

Η Νανοτεχνολογία που συμβαίνει στη φύση παίζει καθοριστικό ρόλο για τα έμβια όντα και την υγεία τους.

Η Βιονανοτεχνολογία είναι λοιπόν η προσπάθεια ανάλυσης, ανάπτυξης και εφαρμογής συνθετικών και φυσικών εργαλείων που το μέγεθός τους είναι περίπου από 1-1000nm. Ο στόχος της είναι να ερμηνεύσει και στη συνέχεια να επέμβει στα βιολογικά συστήματα. Για το σκοπό αυτό απαιτείται η γνώση και η κατανόηση της φυσικής, της χημικής και της βιολογικής συμπεριφοράς των βιολογικών υλικών. (52)

Η κατανόηση των κυτταρικών λειτουργιών επιπέδου νανοκλίμακας, έδωσε την ιδέα η Νανοτεχνολογία να προσπαθήσει να μιμηθεί τους μηχανισμούς αυτούς με σκοπό τη διάγνωση, τη θεραπεία ή και την πρόληψη ασθενειών.

Η Νανοτεχνολογία έχει τη δυνατότητα να επέμβει στα κάθε κρίσιμη παράμετρο της ΦΔΘ, παρέχοντας λύσεις σε επίπεδο έρευνας αλλά και στην κλινική εφαρμογή.

Οι ελλείψεις της ΦΔΘ που καλείται να συμπληρώσει η Νανοτεχνολογία

Η Φωτοδυναμική Θεραπεία, ως μη τελειοποιημένη ακόμα πρακτική, παρουσιάζει μειονεκτήματα, τα οποία ενδεχομένως να μπορεί να βελτιώσει η Νανοτεχνολογία. Τα μειονεκτήματα αυτά συνοψίζονται ως εξής:

Όσον αφορά στους ΦΕ:

Χρόνοι ημιζωής στους ιστούς ακατάλληλοι με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται δυσκολίες στη βελτιστοποίηση του χρονοδιαγράμματος φωτοβόλησης.

Ανεπιθύμητη κατακράτηση από υγιείς ιστούς, με δυσχερή αποτελέσματα τόσο κατά τη διάρκεια της θεραπείας, όσο και στο διάστημα μετά από αυτήν.

Κάποιοι ΦΕ παρουσιάζουν ενέργειες ενεργοποίησης οι οποίες απαιτούν παρατεταμένη ακτινοβόληση.

Ένα άλλο μειονέκτημα είναι η τοξικότητα σκότους, δηλαδή η πρόκληση βλάβης ανεξάρτητα από την παρουσία φωτός.

Κάποιοι ΦΕ βρίσκουν μικρή κλινική εφαρμογή διότι το μήκος διείσδυσης στους ιστούς είναι εξαιρετικά μικρό.

Άλλα μειονεκτήματα είναι η δυσκολία στη σύνθεση, στην αποθήκευση και το μη προσιτό κόστος.(6)

Όσον αφορά στις πηγές φωτός

Ως πηγές φωτός στη ΦΔΘ έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές διατάξεις όπως lasers, LEDs, οπτικές ίνες, αδυνατούν όμως να ξεπεράσουν το πρόβλημα της ανομοιογένειας που προκαλείται μόλις η δέσμη προσπέσει στον ιστό. (53)

Ελλείψεις της Δοσιμετρίας:

Ο στόχος κάθε θεραπευτικής μεθόδου είναι να έχει τη μέγιστη επίδραση στον πάσχοντα ιστό και την ελάχιστη στους υγιείς ιστούς. Η κεντρική ιδέα για τη μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητας είναι ένα αξιόπιστο σύστημα δοσιμετρίας που να περιλαμβάνει όλες τις σχετικές με τη θεραπεία μεταβλητές.

Παρόλο που για την Ακτινοθεραπεία η επίδραση και οι παρενέργειές της είναι προβλέψιμες με μεγάλη ακρίβεια, δεν υπάρχει αντίστοιχο σύστημα δοσιμετρίας για τη ΦΔΘ μέχρι στιγμής. Η ΦΔΘ είναι μία πολυπαραμετρική μέθοδος, γεγονός που δυσκολεύει ιδιαίτερα τη μέτρηση της επίδρασης των επιμέρους μεταβλητών. Η χορηγούμενη δόση, το διάστημα μεταξύ της έγχυσης του φαρμάκου και της φωτοβόλησης, η ροή της φωτεινής ακτινοβολίας, αποτελούν τις κύριες παραμέτρους που επιβάλλεται να μετρηθούν με ακρίβεια. Δεν υπάρχει συστηματικός τρόπος παρακολούθησης της επίδρασης χωριστά κάθε μιας από τις ακόλουθες παραμέτρους: της συγκέντρωσης του ΦΕ, της συγκέντρωσης του ΦΕ στον καρκινικό όγκο, όπως επίσης και της συγκέντρωσης στους υγιείς ιστούς, της πραγματικής ροής της φωτεινής ενέργειας, της παραγωγής μονήρους οξυγόνου, ούτε ενδεχομένως δεκάδων άλλων παραμέτρων. Μπορεί για παράδειγμα η χρήση του ίδιου φαρμάκου, η ίδια εγχεόμενη δόση, η ίδια δόση φωτεινής ακτινοβολίας και ο ίδιος μεσολαβών χρόνος μεταξύ χορήγησης και ακτινοβόλησης να παράσχουν πολύ διαφορετικά αποτελέσματα, ακόμα και αν εφαρμοστούν στον ίδιο ασθενή ο οποίος φέρει πολλαπλές βλάβες. Κάποιοι ασθενείς ανταποκρίνονται θετικά, κάποιοι ελάχιστα, λόγω του πρωτόγονου, ακόμα, συστήματος δοσιμετρίας. Όσο δεν διατίθεται ένα αξιόπιστο σύστημα δοσιμετρίας, η κλινική εφαρμογή της ΦΔΘ παρουσιάζει μεγάλες δυσκολίες. (54)

Νανο-Φωτοδυναμική Θεραπεία

Στο σημείο αυτό εξετάζονται οι επιμέρους παράμετροι της ΦΔΘ υπό το πρίσμα ης Νανοτεχνολογίας:

Φωτοευαισθητοποιητές

Κάθε ΦΕ εισέρχεται στις κυτταρικές ή τις υποκυττάριες μεμβράνες με τον ίδιο τρόπο όπως αν ήταν συνδεδεμένος με μόρια υποδοχείς μεγέθους νανοσωματιδίου. Οι ΦΕ που χορηγούνται ενδοφλεβίως ανιχνεύονται και δεσμεύονται από τον οργανισμό, πριν διανύσουν μεγάλη απόσταση. Συνήθως δεσμεύονται από το λιποπρωτεϊνικό σύστημα του πλάσματος, που αποτελείται από αλβουμίνη ή λιποπρωτεϊνες χαμηλής πυκνότητας (LDL)²⁷. Αν μακροφάγα του ανοσοποιητικού συστήματος δεν ενσωματώσουν αυτούς τους εισβολείς τότε το σύμπλοκο νανοσωματίδιο-φωτοευαισθητοποιητής (ΝΣ-ΦΕ) θα συνεχίσει τη διαδρομή του. Ένα κοινό μέσο μεταφοράς, που αξιοποιείται στη Φαρμακευτική, είναι η ενθυλάκωση θεραπευτικών ουσιών σε λιποπρωτεΐνες και ιδιαίτερα σε λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL)²⁸. Καθώς τα λίπη και οι πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για να επιτευχθεί η διαδικασία του μεταβολισμού και της αναπαραγωγής των καρκινικών κυττάρων, η ενθυλάκωση αυτή είναι μια αξιόπιστη μέθοδος για να στοχευθούν τα καρκινικά κύτταρα. Στη συνέχεια το σύμπλοκο νανοσωματιδίουφωτοευαισθητοποιητή εισέρχεται στο κύτταρο, με ποικίλους τρόπους.

²⁷Lowdensitylipoproteins

²⁸Verylowdensitylipoproteins

Σε επίπεδο νανοκλίμακας οι ΦΕ εισέρχονται στο κύτταρο με διάφορες φυσικές διεργασίες, όπως η διάχυση και η φαγοκύτωση και συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια, στις μεμβράνες, στα λυσοσώματα ή στο σύμπλεγμα Golgi.

Με αυτόν το μηχανισμό θεωρητικά το σύμπλοκο ΝΣ-ΦΕ θα μπορούσε να συσσωρεύεται σε κάθε ιστό. Όμως οι αυξημένες ενεργειακές ανάγκες των καρκινικών κυττάρων, τα κάνουν να συλλαμβάνουν ταχύτερα τα λιποσώματα, για να τραφούν, με αποτέλεσμα ο εγκλεισμός σε λιποσωμάτια να ενισχύει την επιλεκτική συσσώρευση σε αυτά. Για τον ίδιο λόγο, τα καρκινικά κύτταρα έχουν περισσότερους υποδοχείς λιποπρωτεϊνών. Επίσης ο νεοαγγειακός ιστός των όγκων ενισχύει την επιλεκτική συσσώρευση των ΦΕ. Μόλις ο ΦΕ ενεργοποιηθεί και παραγάγει μονήρες οξυγόνο το οργανίδιο στο οποίο ήταν συσσωρευμένος αποδομείται αυτόματα. Έτσι μέσω της διάχυσης ο ΦΕ εξαπλώνεται στο υπόλοιπο κύτταρο και στον νεοαγγειακό ιστό, προκαλώντας περαιτέρω καταστροφή, για όσο διάστημα συνεχίζεται η ακτινοβόληση.

Η πορεία που θα ακολουθήσει ο ΦΕ δεν είναι καθορισμένη, για το λόγο αυτόν η Νανοτεχνολογία καλείται να συμβάλει στην επιλεκτικότερη συσσώρευση του ΦΕ. (51)

Ενθυλάκωση του ΦΕ σε Νανοσωματίδια

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του ΝΣ καθορίζουν τη βιολογική συμπεριφορά και τη φαρμακοκινητική των μορίων. Η ενθυλάκωση είναι μια καθιερωμένη τεχνική στη φαρμακοβιομηχανία, όπου για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται ευρέως λιπίδια σε γαλακτώματα νανοσωματιδίων. Επιτυγχάνεται, έτσι υψηλή επιλεκτικότητα, μεγάλες συγκεντρώσεις ΦΕ μέσα στο ΝΣ, ενεργοποίηση ακόμα και στα 800nmγια καλύτερη διείσδυση στους ιστούς, φθορισμός που βοηθά στην παράλληλη απεικόνιση, χρόνοι ημιζωής που επιτρέπουν την κλινική εφαρμογή καθώς και μείωση της εναπομείνασας φωτοευαισθησίας. (50)

Τα νανοσωματίδια που έχουν φυσική προέλευση βοηθούν στην παράδοση και στην πρόσληψη των ΦΕ στις μεμβράνες και τα κυτταρικά οργανίδια. Τα συνθετικά ΝΣ έχουν καλύτερη προσέγγιση στο στόχο. Πολλά από τα φυσικά και τα συνθετικά ΝΣ είναι υδρόφοβα, με αποτέλεσμα να ανασυντίθενται ανεπαρκώς, να έχουν δυσκολία στη διάχυση στα βιολογικά συστήματα και ενδεχομένως να εξαλείφονται από το ενδοθήλιο. Η δημιουργία νανοσωματιδίων για να ενθυλακώσουν ή να προσδεθούν σε ΦΕ είναι υψηλής σημασίας για την κατανομή των ΦΕ στους ιστούς. Ο κατάλληλος σχεδιασμός λαμβάνει υπόψη τους ιδιαίτερους χρόνους ημιζωής μέσα στους ιστούς, τη στόχευση, την παράκαμψη, την μη πρόκληση ανοσολογικής αντίδρασης και την υδροφιλικότητα. Επίσης το μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι σημαντική παράμετρος. ΝΣ μεγαλύτερα από 200nm, είναι δυνατό να κατακρατηθούν στο ενδοθήλιο ή να γίνουν αντιληπτά από το ανοσοποιητικό σύστημα. Αντιθέτως, μικρότερα νανοσολογική αντίδραση. Τα νανοσωματίδια μπορεί φέρουν κάποια πρόσθετα, όπως μονοκλωνικά αντισώματα, για μεγαλύτερη επιλεκτικότητα, ή χρωστικές ώστε να γίνεται εφικτή η απεικόνιση της πορείας τους. (55) Με τον κατάλληλο σχεδιασμό των νανοσωματιδίων μπορούν να παρακαμφθούν φυσικά εμπόδια στη διανομή του ΦΕ, όπως το δέρμα, το αναπνευστικό σύστημα, ακόμα και η πυρηνική μεμβράνη. Μπορεί επίσης να αποτραπεί η πρόσληψη του φαρμάκου από το ανοσοποιητικό σύστημα και το πώς αυτό καθαρίζει το σώμα, ώστε να αποφευχθούν οι πνεύμονες ή οι νεφροί. (56)

ΦΕ επιφανειακής πρόσδεσης σε ΝΣ

Σε αυτόν το σχεδιασμό, ο ΦΕ παραμένει στην επιφάνεια του ΝΣ, όμως το νανοσωματίδιο είναι εκείνο που καθορίζει τη φαρμακοκινητική. Θεωρητικά, το μονήρες οξυγόνο θα είναι περισσότερο διαθέσιμο, όταν παράγεται από την επιφάνεια παρά από τη διάχυση μέσα από ένα νανοσωματίδιο. (57)

Σύζευξη ΝΣ -ΦΕ με πρόσθετα μέσα

Είναι σαφές ότι ο σχεδιασμός του ΝΣ επηρεάζει δραστικά τα βιολογικά, φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του ΦΕ. Εάν προστεθούν χημικώς δραστικές ομάδες, είναι δυνατός ο περαιτέρω καθορισμός των ιδιοτήτων τού ΦΕ. Για παράδειγμα, νανοσωματίδια που περιέχουν σίδηρο, επιτρέπουν και τη ΦΔ δράση αλλά και την πρόκληση τοπικής υπερθερμίας. Η πρόσδεση αντισωμάτων τα οποία προσδένονται μόνο σε καρκινικά κύτταρα, συμβάλει στην περαιτέρω επιλεκτικότητα της συγκέντρωσης του ΦΕ. Επίσης με την τοποθέτηση μαγνητικών σωματιδίων στο σύμπλοκο ΝΣ-ΦΕ, γίνεται εφικτή η καθοδήγηση στο στόχο, εξωτερικά. Μια πολλά υποσχόμενη τεχνική στη σύγχρονη ιατρική είναι αυτή η καθοδήγηση, η οποία επιτυγχάνεται, καθώς το σύμπλοκο είναι αρκούντως μικρό ώστε να μη γίνεται αντιληπτό από το ανοσοποιητικό σύστημα, και να διαπερνά τις μεμβράνες ανενόχλητο. (58)

Πρόσδεση ΝΣ-ΦΕ σε βιοαισθητήρες

Η τεχνική αυτή επιτρέπει την απεικόνιση της δράσης του ΦΕ και σε συνδυασμό με την κατάλληλη τηλεμετρία παρέχει υψηλής ποιότητας πληροφορία για τη δράση της θεραπείας. Στην απλούστερη μορφή της, μια αλλαγή στο φθορισμό, και ει δυνατόν η απεικόνιση σε πραγματικό χρόνο συντελεί στην επιτυχία της θεραπείας. Εάν ο βιοαισθητήρας έχει βρόχο παροχής ανάδρασης, γίνεται εφικτό το σταμάτημα της διαδικασίας, όταν ο στόχος καταστραφεί.(50)

Ακτινοβόληση

Μέχρι στιγμής η φωτεινή ενέργεια που απαιτείται για την ενεργοποίηση του ΦΕ παρέχεται μέσω ποικίλων συσκευών. Η ακτινοβόληση θεωρείται ως ένα ξεχωριστό στοιχείο της κλινικής

εφαρμογής της ΦΔΘ. Μέσω της Νανοτεχνολογίας θα μπορούσε να αλλάξει αυτή η θεώρηση. Αρχικά, η NT δύναται να βελτιώσει τις σύγχρονες πηγές φωτός. Τα lasers παρέχουν μεν ακρίβεια, αλλά έχουν υψηλό κόστος και μεγάλες φυσικές διαστάσεις ως πηγές φωτός. Η NT μειώνει το κόστος παραγωγής και τις διαστάσεις πολλών πηγών φωτός. Καθίσταται έτσι δυνατή η παρατεταμένη ή η μετρονομική ΦΔΘ. Τα σύγχρονα LEDs βασίζονται σε τεχνολογία ημιαγωγών όπου παραδοσιακά χρησιμοποιούνται ανόργανες δομές όπως το πυρίτιο. Τα LEDs είναι λιγότερο δαπανηρά, αλλά παρέχουν και μικρότερη ακρίβεια από τα Lasers. Τα LEDs είναι και αυτά μεγάλα σε μέγεθος, και «ανελαστικά» συγκρινόμενα με τις οπτικές ίνες. Με τη συμβολή της NT παράγονται οργανικά LEDs (O-LEDs). Οργανικά χημικά εναποτίθενται σε διαφορετικά υποστρώματα, και όταν περάσει ρεύμα δημιουργείται ακτινοβολία πολύ ακριβής, συγκεκριμένου μήκους κύματος, εξαρτώμενη από το σχεδιασμό.

Ο στόχος είναι η κατασκευή εξατομικευμένων νανοδιατάξεων, σε μορφή λεπτής μεμβράνης η οποία θα μπορεί να τοποθετηθεί κοντά σε όγκο που βρίσκεται σε μεγάλο βάθος και θα ακτινοβολεί με συγκεκριμένο τρόπο και για συγκεκριμένο διάστημα. Η ιδανική λύση θα ήταν μια τέτοια διάταξη να είναι βιοδιασπώμενη, ώστε μετά τη θεραπεία, να απομακρύνεται με μη επεμβατικό τρόπο από τον ασθενή. Καθώς απαιτείται ελάχιστη ποσότητα ηλεκτρισμού, τέτοιες συσκευές θα μπορούσαν να λειτουργούν με μπαταρίες, επιτρέποντας την εφαρμογή της θεραπείας ακόμα και σε τριτοκοσμικές συνθήκες.(50)

Η Νανοτεχνολογία παρέχει και μία δεύτερη εναλλακτική για την ακτινοβόληση.

Ειδικά σχεδιασμένα νανοσωματίδια θα μπορούσαν άμεσα να ενισχύουν την ακτινοβόληση, ιδέα εξαιρετικά χρήσιμη για εν τω βάθει όγκους. Δεσμίδες μεταλλικών νανοσωματιδίων εάν σχεδιαστούν να συσσωρεύονται στον ιστό-στόχο μαζί με τον ΦΕ. Έτσι μπορεί να δημιουργηθεί μια φωτεινή κοιλότητα στην οποία, εξ ορισμού, η φωτεινή ένταση θα είναι πολλαπλάσια. Στην περίπτωση των επιφανειακών κακώσεων, απαιτείται πολύ λιγότερη ποσότητα ΦΕ και Φωτεινής ροής. Θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί υπέρυθρη ακτινοβολία για εν τω βάθει όγκους, καθώς η βαθειά εισχώρηση είναι αφ' εαυτής πολύ αδύναμη να ενεργοποιήσει έναν συμβατικό ΦΕ. Όμως, εάν τα νανοσωματίδια έχουν δημιουργήσει μία φωτεινή κοιλότητα, η μικρή δόση φωτός που θα καταφέρει να διεισδύσει, θα είναι αρκετή για να ενεργοποιήσει το μηχανισμό. Επιπλέον, τα μεταλλικά ΝΣ θα μπορούσαν να θερμανθούν από το υπέρυθρο φως.(50)

Μία άλλα σκέψη είναι η δημιουργία φωτεινών πηγών επιπέδου νανοκλίμακας. Πολλά υλικά χαμηλής φωταύγειας, όταν σχεδιαστούν ως νανοσωματίδια, παρουσιάζουν εξαιρετικά μεγάλη παραγωγή φωτός. (59)

Τα νανοσωματίδια μπορούν λειτουργήσουν ως πηγές φωτός, ως μέσο ενίσχυσης της φωτεινής δράσης και ως παράγοντες προστασίας των γειτονικών υγειών ιστών. Τα ΝΣ-πηγές φωτός, χορηγούνται χωριστά από το ΦΕ. Επιτρέπεται, έτσι, στον ΦΕ να συσσωρευτεί στην επιθυμητή περιοχή και να καθαριστεί από το φυσιολογικό γειτονικό ιστό. Το νανοσωματίδιο θα δημιουργήσει κατάλληλο φωτισμό/φωταύγεια στο μήκος κύματος ενεργοποίησης του ΦΕ. Ιδανικά, το ΝΑ είναι σχεδιασμένο ώστε να έχει ανάλογη ικανότητα επιλεκτικής συσσώρευσης με το ΦΕ. Η εκπομπή φωτός ελέγχεται με τη ρύθμιση της φωταύγειας για μικρότερο ή μεγαλύτερο διάστημα, όπως υποδεικνύει η εκάστοτε κλινική εφαρμογή. Όταν προσδεθούν στα ΝΣ, που είναι σχεδιασμένα για να στοχεύουν σε συγκεκριμένο ιστό, ουσίες που έχουν φυσικό φθορισμό ή φωταύγεια, καθίστανται τα ΝΣ αυτά φορείς παραγωγής φωτός. Οι φορείς αυτοί μπορούν να ενεργοποιούνται είτε μόνοι τους, είτε από κάποια εξωτερική πηγή, όπως ακτινοβολία, θέρμανση ή μαγνητικά πεδία.

Καθώς η επιλεκτικότητα δεν είναι απόλυτη και πάντα υπάρχει κίνδυνος φωτεινή ενέργεια ή ελεύθερες ρίζες να προσβάλουν υγιείς ιστούς, γεννιέται η ανάγκη προστασίας αυτών. Έτσι η βασική ιδέα είναι η πρόσδεση παραγόντων ανάσχεσης σε νανοσωματίδια που θα κατευθύνονται σε πολύ ευαίσθητους και σημαντικούς ιστούς.(50)

Φωτοδυναμική Δράση

Ο βασικός μηχανισμός της ΦΔΘ είναι η πρόκληση κυτταρικών και υποκυττάριων αποκρίσεων, μέσω της πολύ δραστικής μορφής μονήρους Οξυγόνου, η οποία δημιουργείται από την αλληλεπίδραση της φωτεινής ενέργειας και του ΦΕ, διαμεσολαβούμενων από νανοσωματίδια φυσικής προέλευσης. Μπορούν να δημιουργηθούν προτιμώμενες διαδρομές που να καταλήγουν σε συγκεκριμένες κυτταρικές μεμβράνες ή οργανίδια. Αν η ΦΘ Δράση κατευθυνθεί εξ ολοκλήρου ενδοκυτταρικά το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση, εάν κατευθυνθεί σε κυτταρικές μεμβράνες ή στο αγγειακό σύστημα τότε παρατηρούνται περισσότερο συστημικά αποτελέσματα. Μέχρι στιγμής η ΦΘΔ δεν ενοχοποιείται για πρόκληση καρκινογένεσης ή μεταστάσεων διότι δεν στοχεύει στον πυρήνα του κυττάρου. Αν όμως με τη βοήθεια των νανοσωματιδίων στοχευθεί ο πυρήνας ώστε να προκληθεί βλάβη στο DNA,θα ενισχυθεί μεν η αποτελεσματικότητα της μεθόδου, αλλά θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το ενδεχόμενο αυτό.

Η άμεση δράση του μονήρους οξυγόνου δεν είναι απαραίτητα η όλη Φωτοδυναμική διαδικασία. Η ΦΔΘ Δύο Φωτονίων υποδεικνύεται από πολλές μελέτες. Σε αυτήν την περίπτωση η ΦΕ ενεργοποιείται δευτερογενώς από φωτόνια που έχουν προκύψει από φθορισμό συντονισμού των φθοροφόρων ή των χρωστικών που έχουν χορηγηθεί. Στη ΦΔΘ Δύο Φωτονίων μεγαλύτερα μήκη κύματος μπορούν να κάνουν την αρχική ενεργοποίηση της ΦΔ Δράσης, επιτρέποντας τη διείσδυση με μεγαλύτερα βάθη. Έχουν παραχθεί ΝΣ-ΦΕ για τη ΦΔΘ 2 Φωτονίων.(50)

Δοσιμετρία

Οι νανοαισθητήρες αποτελούν τη βασική συμβολή της ΝΤ στη δοσιμετρία. Ένας συμβατικός αισθητήρας μονήρους οξυγόνου είναι υπερβολικά μεγάλος για να χρησιμοποιηθεί σε κυτταρικό επίπεδο, παρέχει μη ικανοποιητική ακρίβεια, ενώ δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε υδρόφιλο ή υδρόφοβο περιβάλλον η ίδια διάταξη. Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνταν ήταν τοξικές για το κύτταρο. Η δημιουργία νανο-δεικτών (nanoprobes) μονήρους οξυγόνου έλυσε όλα τα προαναφερθέντα προβλήματα. Η τοξική χρωστική εγκλείστηκε σε νανοσωματίδια ώστε να περιοριστεί η τοξική της δράση. Επιπλέον, η δομή του ΝΣ είναι τέτοια ώστε να επιτρέπει την πρόσληψη του μονήρους οξυγόνου σε ποικίλα περιβάλλοντα ή είδη κυττάρων. Νανοαισθητήρες κατάλληλα σχεδιασμένοι, θα μπορούν να παρακολουθούν τα επίπεδα του μονήρους οξυγόνου, του ΦΕ, της παραγωγής ελεύθερων ριζών, την απόκριση των κυτοκινών και να αναλύουν τις βλάβες στο DNA, στο RNA ή στις πρωτεΐνες, καθώς και τη μεταβολή πλήθους άλλων παραμέτρων. (60) (61)

Εξαιρετικά ωφέλιμη θα ήταν η καταγραφή σε πραγματικό χρόνο της μεταφοράς της φωτεινής ενέργειας, της απορρόφησης και της σκέδασης ώστε να παρέχεται πληροφορία ανάδρασης.

Οι νανοαισθητήρες, καθώς θα έχουν τη δυνατότητα να λειτουργούν χωρίς να επηρεάζουν τη φυσιολογική βιολογική διαδικασία θα αποτελέσουν σημαντικό βοηθητικό εργαλείο για την αποτελεσματικότητα της Θεραπείας.(50) (62)

ii. ΦΔΘ και αναστολείς της αγγειογένεσης

Εφαρμογή συνδυασμένης αντιαγγειογενετικής θεραπείας και ΦΔΘ, σε ποντίκια που έφεραν όγκους, ήταν αποτελεσματικότερη ως προς την καταστροφή του όγκου, από την κάθε θεραπεία ξεχωριστά. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι η έκφραση του VEGFσε όγκους, η οποία επάγεται από ΦΔΘ, μειώνεται όταν χρησιμοποιείται ο αντιαγγειογενετικός παράγοντας IM862 (ή ο EMAP-II). Προτάθηκε λοιπόν, ότι ο συνδυασμός ΦΔΘ με αντιαγγειογενετικούς παράγοντες θα μπορούσε να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας.(40)

iii. Συνδυασμός ΦΔΘ με χημειοθεραπεία

Η ανάπτυξη της αντίστασης του οργανισμού στα φάρμακα περιορίζει σημαντικά την επιτυχία της χημειοθεραπείας σε ασθενείς με καρκίνο, συμβάλλοντας στην υποτροπή της νόσου. Τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν συγκεκριμένους μηχανισμούς για να επιβιώσουν έναντι των τοξικών συγκεντρώσεων των αντικαρκινικών φαρμάκων. Η υπερέκφραση σημαντικών πρωτεϊνών, καθώς και μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53, έχουν συσχετιστεί με αντοχή στα φάρμακα. Επιπλέον, η υπερέκφραση των μεταφορέων εκροής των φαρμάκων και η δέσμευση των κυτταροτοξικών ουσιών σε όξινα ενδοκυττάρια οργανίδια ή στο όξινο μικροπεριβάλλον του όγκου έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται η διαθεσιμότητα του φαρμάκου εντός των καρκινικών κυττάρων. Η πολυπαραγοντική φύση της αντίστασης στα φάρμακα οδηγεί στην απαίτηση θεραπειών οι οποίες να συνδυάζουν πολλούς μηχανισμούς για να σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα. Ένα άλλο σημαντικό μειονέκτημα της χημειοθεραπείας είναι η ανεπιθύμητη συσσώρευση σε άλλα όργανα, προκαλώντας παρενέργειες και βλάβες σε υγιείς ιστούς.

Για να ξεπεραστούν οι ανωτέρω περιορισμοί της Χημειοθεραπείας, δοκιμάζεται η συνδυασμένη δράση της με τη Φωτοδυναμική Θεραπεία, καθώς η βασική αρχή της ΦΔΘ περιλαμβάνει την

επιλεκτική συσσώρευση στα καρκινικά κύτταρα. Προτείνεται λοιπόν ο παράλληλος εγκλεισμός στα νανοσωματίδια που φέρουν ΦΕ φαρμάκων που εντάσσονται στη Χημειοθεραπεία. Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα του συνδυασμού ΦΔΘ με τη Χημειοθεραπεία είναι η δυνατότητα της ΦΔΘ να προκαλεί ανοσία κατά του όγκου.

Οι *Α. Khdair et al* συνδυάζοντας τις δύο αυτές θεραπείες πέτυχαν αύξηση της συσσώρευσης του φαρμάκου στον όγκο και την συνακόλουθη ενίσχυση της ανάσχεσης του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. (63)

iv. Σύνδεσμος ΦΘΔ με ανοσοδιεγερτικά

Ένας άλλος τρόπος για να ενισχυθεί η ΦΔΘ είναι ο συνδυασμός της με ανοσοδιεγερτικά. Το ανοσοποιητικό σύστημα εάν διεγερθεί κατάλληλα ώστε να αναγνωρίζει τα καρκινικά κύτταρα, συμβάλει και αυτό στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Σε προηγούμενο κεφάλαιο παρουσιάστηκε ο μηχανισμός πρόκλησης ανοσολογικής απόκρισης, ο επαγόμενος από τη ΦΔΘ.

ΦΔΘ και μικροβιακά ανοσοενισχυτικά

Τμήματα από μικροοργανισμούς έχει βρεθεί ότι μπορεί να ενισχύσουν την ανοσολογική ανταπόκριση σε συγχορηγούμενα αντιγόνα. Η δράση τους αυτή προκαλείται μέσω της διέγερσης των Toll-like υποδοχέων (TLRs- Toll Like Receptors). Οι υποδοχείς αυτοί που αποτελούν τμήμα της συγγενούς ανοσίας ενεργοποιούνται από συγκεκριμένες μοριακές δομές και μπορούν στη συνέχεια να κινητοποιήσουν τη χυμική και κυτταρική ανοσία. (64)

Τα ανοσοενισχυτικά ενεργοποιούν τους υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) και άλλα μόρια τα οποία είναι ικανά να αναγνωρίζουν πρότυπους παθογόνους παράγοντες. Τέτοιους υποδοχείς διαθέτουν τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Οι υποδοχείς λειτουργούν ως ανιχνευτές κινδύνου, καθώς έχουν την ιδιότητα να προειδοποιούν έγκαιρα για την παρουσία λοίμωξης. Η ενεργοποίηση των TLR, μπορεί να προκαλέσει την έκφραση διαφόρων γονιδίων που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και στην αντίδρασή του εναντίων του όγκου. Οι διαπιστώσεις αυτές οδήγησαν στην υπόθεση ότι η συνδυασμένη θεραπεία που περιλαμβάνει τη χορήγηση των ανοσοδιεγερτικών (όπως οι υποδοχείς τύπου Toll) και τη ΦΔΘ μπορεί να αποδειχθεί αποτελεσματική.

Τα ανοσοενισχυτικά μπορούν να εγχυθούν μέσα στον όγκο και τη γύρω περιοχή είτε κατά τη διάρκεια, είτε μετά τη ΦΔΘ. (48)

ΦΔΘ και θεραπεία με κυτοκίνες

Μια άλλη κατηγορία συνδυασμένης ΦΔΘ αφορά τη χορήγηση κυτοκινών όπως η TNFα για ενίσχυση της ΦΔΘ με ΦΕ. (48)

Όπως προαναφέρθηκε, οι κυτοκίνες είναι διαβιβαστές πρωτεϊνικής ή γλυκοπρωτεϊνικής φύσης, εκκρίνονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος για να επικοινωνούν μεταξύ τους, κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απάντησης. Συγκεκριμένα ο TNF-α(καχεξίνη) παράγεται κυρίως από τα μακροφάγα και αποτελεί μεσολαβητή της φλεγμονώδους αντίδρασης. (50)

ν. ΦΔΘ με αντιοξειδωτικά σε προοξειδωτικές δόσεις

Παρόλο που τα αντιοξειδωτικά εν γένει δρουν προστατευτικά έναντι της ΦΔΘ, έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένα δρουν ως παράγοντες ενίσχυσης της ΦΔ δράσης.

Τα αντιοξειδωτικά είναι αναγωγικοί παράγοντες, με αποτέλεσμα να αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που παράγονται κατά την εφαρμογή της Θεραπείας με αποτέλεσμα να τις εξουδετερώνουν, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της τεχνικής.

Έχει όμως παρατηρηθεί ότι κάποια αντιοξειδωτικά, όπως το Ασκορβικό Οξύ, η α-Τοκοφερόλη (Βιταμίνη Ε), η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (ΒΥΑ), σε επαρκή συγκέντρωση, ενισχύουν τη Φωτοδυναμική Δράση. Η παρουσία στοιχείων μετάπτωσης και ο ακριβής χρόνος χορήγησης του αντιοξειδωτικού είναι επίσης σημαντικοί παράγοντες για την αύξηση της επίδρασης της ΦΔΘ.

Κάποια αντιοξειδωτικά, υπό ορισμένες συνθήκες μπορούν είτε να μειώσουν είτε να αυξήσουν τη Φωτοδυναμική δράση. Έχει παρατηρηθεί ότι ο τρόπος που θα επιδράσουν δεν σχετίζεται τόσο με τη φύση του ΦΕ, αλλά με το είδος του αντιοξειδωτικού και με της συνθήκες της μεθόδου. Η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού μοιάζει να είναι ο σημαντικότερος παράγοντας. Ουσίες όπως τα καροτενοειδή, οι τοκοφερόλες ή τα παράγωγα του ασκορβικού οξέως εκδηλώνουν είτε αντιοξειδωτικές είτε προοξειδωτικές ιδιότητες, αναλόγως το δυναμικό οξειδοαναγωγής, την ανόργανη χημεία του κυττάρου και την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του οξυγόνου. Τα μόρια του αντιοξειδωτικού (InH)λειτουργούν ως υπόστρωμα²⁹ σε αντιδράσεις όπου το ανιόν του ΦΕ (ΦΕ[•]) μεσολαβεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών αντιοξειδωτικού (In°) κατά τη διαδικασία είτε της δέσμευσης των ελευθέρων ριζών (R°)(VI.1) είτε κατά την αυθόρμητη αυτό-οξείδωσή τους (VI.2).

 $InH + R^{\bullet} \rightarrow In^{\bullet} + HO_{2}^{\bullet} \quad (VI.1)$ $InH + O_{2} \rightarrow In^{\circ} + RH \quad (VI.2)$

Η ρίζα του αντιοξειδωτικού στη συνέχεια έχει την τάση να επιστρέψει στην αρχική της μορφή (InH) δεσμεύοντας ένα άτομο Υδρογόνου από κάποια σταθερή ουσία (RH), προκαλώντας το σχηματισμό μιας νέας ρίζας (R[•]).

²⁹Υπόστρωμαστηχημείαείναιηουσία, γιατημεταβολήτηςοποίας, δραέναένζυμοωςκαταλύτης

Ένας άλλος τρόπος προοξειδωτικής δράσης των αντιοξειδωτικών προκύπτει από τη Φωτοχημεία: η τοξική δράση των αναγωγικών παραγόντων συμβαίνει μέσω της αντίδρασης τους με τον ΦΕ που βρίσκεται στη διεγερμένη του τριπλή κατάσταση (³ΦΕ^{*}), οδηγώντας στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών ΦΕ και αντιοξειδωτικού (VI.3).

$$\Phi E + hv \rightarrow {}^{3}\Phi E^{*}$$
, ${}^{3}\Phi E^{*} + InH \rightarrow \Phi E^{\bullet-} + In^{\bullet} + H^{+}$ (VI.3)

Αυτός ο μηχανισμός ενισχύει τις Φωτοδυναμικές αντιδράσεις τύπου Ι. (Η κλασική ΘΔΦ κυριαρχείται από αντιδράσεις τύπου ΙΙ.) (65)

Οι Jakus και Farkas προτείνουν την ακόλουθη σχηματική αναπαράσταση για το μηχανισμό της ΦΔΘ παρουσία αντιοξειδωτικών σε προοξειδωτικές δόσεις.



Σχήμα V.1: Η αύξηση της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού (InH) σε προοξειδωτικές συγκεντρώσεις προκαλεί την ενίσχυση των φωτοδυναμικών αντιδράσεων τύπου Ι, παράγοντας ρίζες αντιοξειδωτικού(In[°]) και ανιόντων ΦΕ (ΦΕ^{°-}). Επίσης η αύξηση της συγκέντρωσης των στοιχείων μετάπτωσης στα κύτταρα προάγει τις αντιδράσεις τύπου Ι. (66)

Βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ)

Οι Girotti et al έδειξαν ότι η φωτοκαταστροφή στα λιπίδια και στις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μπορούσε να ενισχυθεί με την προσθήκη ασκορβικού οξέως σε ΦΔΘ επαγόμενη με πρωτοπορφυρίνη. (67)

Οι Rosenthal και Benhur διερεύνησαν τη φωτο-αιμόλυση ανθρώπινων ερυθροκυττάρων, ευαισθητοποιημένων με ΦΕ από την οικογένεια των χρωστικών (σουλφονιωμένη χλωροαργιλική φθαλοκυανίνη) και διαπίστωσαν ότι αυξάνεται παρουσία ασκορβικού οξέος, ανεξάρτητα από την παρουσία ή την απουσία άλατος σιδήρου. Ο βαθμός της αιμόλυσης ήταν ευθέως συνδεδεμένος με τη συγκέντρωση του ασκορβικού οξέως, υποδεικνύοντας ότι το δεύτερο λειτούργησε ως αντιδρών και όχι ως καταλύτης. Οι μετρήσεις έδειξαν μερικό σχηματισμό μονατομικού οξυγόνου, αν και σε μικρότερο βαθμό από όταν πραγματοποιήθηκε ΦΔΘ απουσία του ασκορβικού οξέως. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι παράλληλα με τη Φωτοδυναμική βλάβη επαγόμενη από το μονατομικό οξυγόνο, ένα κλάσμα της φωτοκαταστροφής συνέβη μέσω της διαδικασίας τύπου Ι, υποβοηθούμενης από το ασκορβικό οξύ. (68)

Οι Buettner et al μελέτησαν την Φωτοδυναμική Δράση του Photofrin στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων (λευχαιμίας και καρκινώματος πλακώδους επιθηλίου) παρουσία Fe(II) και ασκορβικού οξέως συγκέντρωσης 100μΜ. Διαπίστωσαν ότι ο συνδυασμός των μεταλλικών ιόντων με το ασκορβικό οξύ αύξησε την κυτταροτοξική δράση της ΦΔΘ in vitro μέσω της αύξησης της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. (69)

Μελετώντας και πάλι την αύξηση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων οι Kelley et a Ιπεριέγραψαν ότι η αύξηση αυτή ήταν διπλάσια όταν το ασκορβικό οξύ χορηγείτο πριν τη ΦΔΘ και πενταπλάσια όταν χορηγείτο 5 λεπτά αργότερα από την ακτινοβόληση κυττάρων καρκινώματος πλακώδους επιθηλίου. Ερμήνευσαν τα ευρήματά τους μέσω της υπεροξείδωσης των λιπιδίων η οποία επάγεται από ΦΔΘ με ΦΕ τον Photofrin. Η παρουσία του ασκορβικού οξέως ανήγαγε τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή (Fe(III)→Fe(II)). Το ηλεκτρόνιο που προκύπτει από την αναγωγή είναι υπεύθυνο για την υπεροξείδωση. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων των ελευθέρων ριζών, οι οποίες ενισχύουν τη Φωτοδυναμική Δράση. (70)

Βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (ΒΥΑ)

Δοκιμάζοντας ένα άλλο αντιοξειδωτικό, τη Βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη σε κύτταρα αδενοκαρκινώματος του οισοφάγου, οι Shevnchut et al διαπίστωσαν ότι ενισχύει τη ΦΔ όταν συνδυαστεί με ΦΕ HpD (παράγωγο της αιματοπορφυρίνης). Η ενίσχυση συνέβη μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις του αντιοξειδωτικού (0,56mM), σε χαμηλές συγκεντρώσεις δεν υπήρξε επίδραση. Παρατήρησαν αύξηση της δράσης τρεις φορές όταν χορηγήθηκε το αντιοξειδωτικό πριν την ακτινοβόληση, ενώ παρατήρησαν δεκαπλάσια αύξηση όταν αυτό χορηγήθηκε αμέσως μετά. Ανάλογα αποτελέσματα παρατήρησαν in vivo. Πειράματα σε μυς έδειξαν τριπλάσια αύξηση της δράσης τρεις φορήγηση όταν αυτό χορηγήθηκε αμέσως μετά. Ανάλογα αποτελέσματα παρατήρησαν in vivo. Πειράματα σε μυς έδειξαν τριπλάσια αύξηση της δράσης τρεις φοργίματας την ακτινοβόληση σε σχέση με τη χορήγηση πριν από αυτήν. Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι η ΒΥΑ ενδεχομένως περιορίζει την κατανάλωση οξυγόνου από τα καρκινικά κύτταρα, παρεμποδίζοντας την εισροή των ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Με τον τρόπο αυτόν αναστέλλεται η οξειδωτική φωσφορυλίωση και η σύνθεση τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), οδηγώντας σε μειωμένη κυτταρική δραστηριότητα. Ερμήνευσαν την επίδραση της ΒΥΑ ως

μηχανισμό παρεμπόδισης της μιτοχονδριακής αναπνοής, και τη διαφορά στην επίδραση σε χαμηλές συγκεντρώσεις ως αναστολή της δράσης του ΦΕ. (71)

Βιταμίνη Ε (α-Τοκοφερόλη)

Οι Melnikova et al έδειξαν ότι η α-Τοκοφερόλη σε συγκεντρώσεις από 0,33 έως 1 mM μπορεί να ενισχύσει ΦΔ του ΦΕ mTHPC, χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά HT29 καρκινώματος του παχέος εντέρου. Η α-Τοκοφερόλη σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0,001-0,1mM) δεν είχε σημαντική επίδραση στο ίδιο σύστημα. Υπό τις ίδιες συνθήκες παρατήρησαν ότι η α-Τοκοφερόλη δεν κατακρατήθηκε και δεν είχε καμία επίδραση όταν δοκιμάστηκε σε φυσιολογικούς ινοβλάστες. Παρατήρησαν ανάλογα αποτελέσματα όταν δοκίμασαν in vivo την ουσία αυτήν, σε μυς οι οποίοι έφεραν ξενομοσχεύματα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος. Διαπίστωσαν ότι η α-Τοκοφερόλη, για να είναι αποτελεσματική, πρέπει να εγχέεται πριν την εφαρμογή της ΦΔΘ, διαφορετικά δεν επηρεάζει τη μέθοδο.

Φωτόλυση laser flash έδειξε ότι σε αποξυγωνομένο μεθανολικό διάλυμα του mTHPC παρουσία της α-Τοκοφερόλης σχηματίστηκαν ελεύθερες ρίζες, υποδεικνύοντας ότι συνέβη μία μετατόπιση στην αναλογία από την αντίδραση τύπου ΙΙ προς την αντίδραση τύπου Ι, η οποία παράγει ελεύθερες ρίζες, πιθανώς λόγω της έλλειψης οξυγόνου στους όγκους. Επομένως η φωτοτοξική δράση του mTHPC πιθανώς να οφείλεται στην αντίδραση της ελεύθερης ρίζας του (mTHPC[•] -) με το οξυγόνο, οδηγώντας στο σχηματισμό $O_2^{•-}$ και δημιουργώντας με τον τρόπο αυτόν άλλα δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).(64)

ΟιΑΙ-Sherbini et al εξέτασαν τη δράση της Βιταμίνης Ε σε συνδυασμό με ΦΔΘ επαγόμενη από τον ΦΕ HpD. Δοκίμασαν διάφορους χρόνους επώασης του ΦΕ καθώς και της Βιταμίνης. Για επώαση μιας ώρας με τη Βιταμίνη παρατήρησαν ότι όταν ο χρόνος επώασης με τον ΦΕ είναι μικρός (30 λεπτά) και όπως έχουν δείξει προηγούμενες μελέτες σε αυτόν τον χρόνο ο φωτοευαισθητοποιητής συσσωρεύεται στην κυτταρική μεμβράνη, διότι δεν προλαβαίνει να εισχωρήσει στο κύτταρο, η κυτταροτοξική δράση της ΦΔΘ είναι μικρότερη από όταν η επώαση με τον ΦΕ διαρκεί 24h, οπότε έχει εισχωρήσει σε όλα τα οργανίδια. Η συγκέντρωση όμως του ΦΕ που δοκίμασαν (25µg/ml) είναι ικανή να καταστρέψει την κυτταρική μεμβράνη. Εάν η Βιταμίνη Ε είχε δράσει αντιοξειδωτικά, θεωρητικά θα είχε προστατεύσει τα κύτταρα από την καταστροφή, επομένως έδρασε προοξειδωτικά και στον μικρό χρόνο επώασης με τον ΦΕ.

Αντιθέτως όταν η επώαση με τη βιταμίνη και τον ΦΕ διαρκεί 24h τότε η Βιταμίνη προστατεύει τα κύτταρα από τη ΦΔΘ, όταν η μέτρηση της βιωσιμότητας γίνει μία ώρα αργότερα, όμως όταν η βιωσιμότητα μετρηθεί 24h αργότερα, παρατηρείται σημαντική μείωση των πληθυσμών. Μία ερμηνεία είναι ότι η ενίσχυση ή η ανάσχεση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού εξαρτάται από τα επίπεδα οξειδωτικών/αντιοξειδωτικών στο κύτταρο.

Μία άλλη ερμηνεία για την τοξικότητα των αναγωγικών παραγόντων είναι η αντίδραση με τα μόρια του ΦΕ στη διεγερμένη τριπλή κατάσταση η οποία οδηγεί στη δημιουργία ελεύθερων ριζών αντιοξειδωτικού και ΦΕ, προάγοντας έτσι φωτοδυναμικές αντιδράσεις τύπου Ι.

Διαπίστωσαν επίσης ότι η επώαση με τη Βιταμίνη Ε για 24 h εγείρει τοξικότητα, εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση. Μικρές συγκεντρώσεις προκάλεσαν αύξηση των πληθυσμών ενώ μεγαλύτερες αυξανόμενη μείωση. Υποδεικνύοντας έτσι τη μεταβολή της δράσης της Βιταμίνης από αντιοξειδωτική σε προοξειδωτική.

Ο πιο δραστικός συνδυασμός Βιταμίνης Ε και HpD παρατηρήθηκε όταν η επώαση με τον ΦΕ διήρκησε 24h ενώ η Βιταμίνη προστέθηκε μία ώρα πριν την ακτινοβόληση. (72)

Μονοξείδιο του αζώτου (°NO)

Το μονοξείδιο του αζώτου δρα ως αντιοξειδωτικό στα βιολογικά συστήματα, όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις προστατεύοντας τα καρκινικά κύτταρα από τη ΦΔΘ. Σε υψηλές όμως συγκεντρώσεις δρα συνεργειακά με τη ΦΔΘ.(65)

Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις διακρίνονται στις φαινόλες, τις πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή και είναι γνωστές για την αντιοξειδωτική τους δράση.

Σε προηγούμενο διδακτορικό του εργαστηρίου η Κυριαζή διερεύνησε το εκχύλισμα του φλοιού του πεύκου Pinus maritima, το οποίο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες. Δοκιμάζοντας προοξειδωτικές συγκεντρώσεις διαπίστωσε συνεργειακή δράση με τη ΦΔΘ. Σε πειράματα που έγιναν σε μυς τύπου SKH-HR1 και SKH-HR2 διαπιστώθηκε ότι όταν υδατικό διάλυμα του εκχυλίσματος Pinus maritima χορηγηθεί σε μικρές-αντιοξειδωτικές συγκεντρώσεις σε in vivo μοντέλα μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος, παρουσιάζει αντιοξειδωτική, αντιγηραντική και αντικαρκινική δράση. Η δράση αυτή αντιστρέφεται όταν χορηγηθεί τοπικά σε υψηλές (προ-οξειδωτική).Δοκιμάστηκαν τα 100μg/ml ως ισχυρώς προοξειδωτική συγκέντρωση. Η ενδοϊστική χορήγηση διαλύματος του εκχυλίσματος πολύ υψηλής συγκέντρωσης δεν επηρέασε την ανάπτυξη των καρκινωμάτων. Εν αντιθέσει όταν το διάλυμα χορηγήθηκε με τον ίδιο τρόπο αμέσως πριν την επάλειψη με τον ΦΕ και ακολούθησε ΦΔΘ τα αποτελέσματα βελτιώθηκαν σημαντικά. Το ποσοστό πλήρους ίασης από 60% (με επαγωγή μόνο ΦΔΘ χωρίς αντιοξειδωτικό) ανήλθε στο 80%, ενώ δεν παρατήθηκε καμία επίπτωση στη γενικότερη υγεία των μυών. Η παράλληλη χορήγηση αντιοξειδωτικού αύξησε το ποσοστό πλήρους ίασης, ενώ το ποσοστό επανεμφάνισης παρέμεινε μηδενικό (ως προς την «απλή» ΦΔΘ), ενώ τα κοσμητολογικά αποτελέσματα υπήρξαν άριστα. Όλα τα καρκινώματα θεραπεύτηκαν πλήρως με την πρώτη συνεδρία ΦΔΘ. (73)

Οι Sun et al μελέτησαν τη Γενιστίνη, ένα φλαβονοειδές που βρίσκεται στη σόγια. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε in vitro σε κυτταρική σειρά χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας, με τον ΦΕ ALA. Στις συγκεντρώσεις που δοκίμασαν 10, 50 και 100μΜπαρατήρησανμείωση της βιωσιμότητας σε σχέση με την εφαρμογή μόνο ΦΔΘ. Επίσης παρατήρησαν αύξηση της

απόπτωσης. Η γενιστίνη, συμπεραίνουν, ενισχύει τη ΦΔΘ αυξάνοντας την ποσότητα του μονήρους οξυγόνου. (74)

Επίδραση των στοιχείων μετάπτωσης

Στοιχεία μετάπτωσης σε ελάχιστες συγκεντρώσεις μπορούν να συμβάλουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, αυξάνοντας την προοξειδωτική δράση. Από τις Φωτοδυναμικές αντιδράσεις τύπου ΙΙ παράγεται μονήρες οξυγόνο, το οποίο αντιδρά με τα λιπίδια των μεμβρανών, σχηματίζοντας υπεροξείδια λιπιδίων, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Η τελευταία αυτή αντίδραση μπορεί να ενισχυθεί από την παρουσία στοιχείων μετάπτωσης –κυρίως του σιδήρου και του χαλκού που βρίσκονται στα κύτταρα ως ιχνοστοιχεία– σχηματίζοντας ισχυρά οξειδωτικές αλκόξυλ-ρίζες λιπιδίων. Επομένως μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι ο συνδυασμός των στοιχείων μετάπτωσης με αντιοξειδωτικά δυνητικά ενισχύει τη Φωτοδυναμική δράση. (65) (66)

Η επίδραση της συγκέντρωσης και του χρόνου προσθήκης του αντιοξειδωτικού

Η συγκέντρωση και η στιγμή της προσθήκης του αντιοξειδωτικού πιθανολογούνται ότι είναι οι κυριότερες παράμετροι που ευθύνονται για το αποτέλεσμα της αγωγής. Κάποια αντιοξειδωτικά παρουσιάζουν εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση επίδραση στη ΦΔΘ, όταν προστίθενται σε φωτοευαισθητοποιημένα κύτταρα. Οι προαναφερθείσες μελέτες έδειξαν ότι κάποια αντιοξειδωτικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις δεν είχαν καμία επίπτωση στη ΦΔΘ, ενώ σε υψηλότερες έδρασαν ενισχυτικά σε αυτήν. Οι υψηλές συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών στα κύτταρα προκαλούν μια μετατόπιση της Φωτοδυναμικής δράσης προς τους μηχανισμούς τύπου Ι.

Ορισμένα αντιοξειδωτικά παρουσίασαν μικρή ενίσχυση της ΘΔ δράσης όταν χορηγήθηκαν πριν την ακτινοβόληση, ενώ είχαν σημαντική συμβολή όταν χορηγήθηκαν αμέσως μετά.

Μία πιθανή εξήγηση για τη σπουδαιότητα της στιγμής χορήγησης του αντιοξειδωτικού είναι το είδος της δράσης που έχει η προστιθέμενη ουσία, εάν εκδηλώνεται ως αντιοξειδωτική ή προοξειδωτική. Η αντίδραση του μονήρους οξυγόνου κυριαρχεί κατά την έναρξη της ακτινοβόλησης, όταν υψηλές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικού δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες. Με την πάροδο του χρόνου, επικρατούν συνθήκες υποξίας με αποτέλεσμα να κυριαρχούν οι μηχανισμοί των ελευθέρων ριζών. Τότε, οι εναπομείνασες ποσότητες αντιοξειδωτικού λειτουργούν ως προοξειδωτικά προκαλώντας τον ταυτόχρονο σχηματισμό Δραστικών μορφών οξυγόνου και ελευθέρων ριζών αντιοξειδωτικού. Όσο αργότερα προστεθεί το αντιοξειδωτικό, τόσο πιο πιθανό είναι να δράσει προοξειδωτικά.(65)
Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ι. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εργασία αυτή διερευνά τη δυνατότητα συνεργειακής δράσης Φωτοδυναμικής Θεραπείας και αντιοξειδωτικών σε προοξειδωτικές δόσεις. Ειδικότερα μελετήθηκε η Φωτοδυναμική δράση με δύο σκευάσματα του ΦΕ mTHPC(απλή μορφή-Foscan& λιποσωμική μορφή-Fospeg) και εκχύλισμα προερχόμενο από τον φλοιό του πεύκου *Pinus halepensis,* πλούσιο σε πολυφαινόλες, σε καρκινικά κύτταρα προστάτη της σειράς LNCaP.Η αντιοξειδωτική ή/και προοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος μελετήθηκαν συστηματικά. Καθώς παρόμοιες μελέτες οι οποίες συνδυάζουν τη ΦΔΘ με αντιοξειδωτικά σε προοξειδωτικές δόσεις έχουν δείξει συνεργειακή δράση, μελετάται εδώ το συγκριμένο εκχύλισμα.

Όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος, μία μέθοδος ενίσχυσης της ΦΔ δράσης, που όμως δεν έχει εκτενώς μελετηθεί είναι η προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών σε προοξειδωτικές δόσεις. Κάποια αντιοξειδωτικά σε μεγάλες συγκεντρώσεις εμφανίζουν προοξειδωτική συμπεριφορά.

Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες αναφέρονται σε καθαρές ουσίες, γνωστές για την αντιοξειδωτική τους δράση. Στην παρούσα εργασία μελετάται ένα εκχύλισμα, δηλαδή ένα σύνθετο διάλυμα. Το εκχύλισμα αυτό επιλέχτηκε διότι είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις, γνωστές για την αντιοξειδωτική τους δράση (Voulgaridis et al). Επίσης έχει αξιολογηθεί ως ισχυρό αντιοξειδωτικό (Guri et al). (75) (76)

Πρόκειται λοιπόν για ένα καθαρά φυσικό, εύκολα συλλέξιμο προϊόν. Η Χαλέπιος Πεύκη (*Pinus halepensis*), ευδοκιμεί στην Ελλάδα και στις περισσότερες Μεσογειακές χώρες. (77)

Η ουσία Pinus halepensis ερευνήθηκε για πρώτη φορά ως προς τη συνεργειακή της δράση με τη Φωτοδυναμική Θεραπεία και τα πειράματα έγιναν σε κυτταρικό επίπεδο. Η έρευνα σε κυτταρικό επίπεδο είναι μία πρόδρομη μελέτη για να μελετηθούν οι μηχανισμοί επίδρασης. Εάν φέρει θετικά αποτελέσματα συνεχίζεται σε επίπεδο ιστού, σε πειραματόζωα και στη συνέχεια σε εθελοντές ανθρώπους πριν περάσει στην κλινική εφαρμογή.

Το εκχύλισμα του φλοιού του πεύκου *Pinus halepensis* μελετάται ως προς τη συνδυαστική του δράση με ΦΔΘ επαγόμενη από δύο σκευάσματα του ΦΕ mTHPC, Foscanκαι Fospeg. Το πρώτο σκεύασμα είναι η απλή μορφή του ΦΕ, ενώ το δεύτερο αποτελείται από λιποσώματα-φορείς του ΦΕ. Καθώς στο εργαστήριό μας έχουν προηγηθεί μελέτες με τα ίδια σκευάσματα στην ίδια κυτταρική σειρά, τα αποτελέσματα χρησιμοποιούνται στην παρούσα μελέτη για την εξαγωγή συμπερασμάτων. (19) Η μελέτη σε κυτταρικό επίπεδο έγινε με πειράματα ελέγχου βιωσιμότητας με τη μέθοδο MTT Viabilty assay, σε τριπλέτες. Η MTT είναι η χρωστική βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο η οποία ανάγεται σε μπλε του θειαζολίου, μέσω των κυτταρικών μιτοχονδριακών αφυδρογονασών. Με τον τρόπο αυτό μετρούνται τα ζωντανά κύτταρα που περιέχει ένα διάλυμα.

Για να ξεκινήσει ένα πείραμα αποψύχεται ένα φιαλίδιο κυττάρων, από το υγρό άζωτο όπου διατηρείται, και το περιεχόμενό του επωάζεται για τουλάχιστον 48 h, ώστε να συνέλθουν τα κύτταρα. Στη συνέχεια ανακαλλιεργείται για δύο 24ωρα ακόμη, ώστε να προκύψει ο ικανός πληθυσμός που απαιτεί ένα πείραμα. Ακολούθως παρασκευάζονται τριβλία, όπου στο καθένα εισάγονται 500.000 κύτταρα. Κάθε πειραματική συνθήκη αντιπροσωπεύεται από τρία τριβλία, ώστε να υπάρχει στατιστικός έλεγχος. Σε κάθε πείραμα πάντα υπάρχει μία σειρά τριβλίων ελέγχου (control) ώστε να συγκρίνεται η βιωσιμότητα της κάθε συνθήκης με αυτήν. Στη σειρά ελέγχου ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία με τις υπόλοιπες συνθήκες, εκτός από τις παραμέτρους που εξετάζονται στο εκάστοτε πείραμα. Για παράδειγμα γίνονται οι ίδιες αλλαγές στο μέσον, μεταφέρονται και τα control στο μικροσκόπιο, αλλά δεν ακτινοβολούνται ούτε το θρεπτικό τους μέσο περιλαμβάνει κάποια ουσία, η επίδραση οποίας μελετάται στο πείραμα.

Στη συνέχεια, ανάλογα με τη φύση του πειράματος, προστίθενται οι μελετώμενες ουσίες στα τριβλία και/ή γίνεται ακτινοβόληση. Εάν το πείραμα περιλαμβάνει ακτινοβόληση, 24 ώρες μετά από αυτήν, πραγματοποιείται η χρώση των κυττάρων, με τη μέθοδο MTT. Εάν δεν περιλαμβάνει ακτινοβόληση, η χρώση γίνεται έπειτα από 24 ή 48 ώρες επώασης με την ουσία (ή το συνδυασμό ουσιών) που μελετάται. Στη συνέχεια τα διαλύματα που προκύπτουν μετρούνται στο φασματοφωτόμετρο απορρόφησης. Οι πληθυσμοί των κυττάρων), η οποία έχει υπολογιστεί για τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου. (19)

Για την εξαγωγή των συμπερασμάτων γίνεται ο δίπλευρος στατιστικός έλεγχος student t-test, όπου α=0,05 και για το τελικό συμπέρασμα συμπεριλαμβάνονται και εικόνες που ελήφθησαν από το μικροσκόπιο.

Τα πειράματα έγιναν με την ακόλουθη λογική:

Μελετήθηκαν όλες οι παράμετροι (αντιοξειδωτικό, ακτινοβόληση, ΦΕ) μεμονωμένα και σε επιμέρους συνδυασμούς ώστε να διαπιστωθεί ότι χωριστά δεν έχουν επίδραση. Στο τέλος έγιναν ολοκληρωμένα πειράματα ΦΔΘ με το εκχύλισμα αντιοξειδωτικών.

Α. Οι πρώτες καλλιέργειες αφορούν στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης όπου η δράση του εκχυλίσματος του Pinus halepensis από αντιοξειδωτική μετατρέπεται σε προοξειδωτική. Η οριακή αυτή συγκέντρωση συνοδεύεται με την επαγωγή ελαφράς τοξικότητας. Το κριτήριο για την εύρεση της δόσης αυτής ήταν η παρατηρούμενη επίπτωση στη βιωσιμότητα, καθώς και στη μορφολογία των κυττάρων.

Β. Στη συγκέντρωση του εκχυλίσματος, η οποία προέκυψε από τη σειρά Α, δοκιμάστηκαν δυο συγκεντρώσεις 0,15 και 1,2 μg/mlθρεπτικού μέσου δύο Φ.Ε. των Foscanκαι Fospeg, ώστε να ερευνηθεί εάν απουσία φωτός υπάρχει τοξικότητα. Οι συγκεντρώσεις αυτές έχουν καθοριστεί ως μη τοξικές (ως προς την τοξικότητα σκότους) αλλά αποτελεσματικές για τη ΦΘΔ σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας (Petri et al). (19)

Γ. Ακολουθούν πειράματα ελέγχου της επίδρασης μόνο της ακτινοβόλησης σε τρείς δόσεις ενέργειας, όπου για κάθε δόση ερευνώνται δύο συνδυασμοί ισχύος και χρόνου.

Δ. Έπειτα, ελέγχεται ο συνδυασμός ακτινοβόλησης και εκχυλίσματος, στην προσδιορισμένη συγκέντρωση.

Ε. Ελέγχονται όλες μαζί οι παράμετροι. Φωτοδυναμική με αντιοξειδωτικό. Δοκιμάζονται χρόνοι επώασης με το αντιοξειδωτικό για τις ίδιες δόσεις.

Πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι για 24hεπώασης με το εκχύλισμα, μία ώρα πριν την ακτινοβόληση και αμέσως μετά. Οι ΦΕ σε όλα τα πειράματα της ενότητας Ε επωάστηκαν για 24h. Επίσης δοκιμάστηκαν και άλλες, ακραίες, δόσεις του εκχυλίσματος.

Στο επόμενο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα υλικά, οι διατάξεις καθώς και τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν. Ακολουθούν τα αποτελέσματα των πειραμάτων και η συζήτηση πάνω σε αυτά.

ΙΙ. ΥΛΙΚΑ, ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

i. Θρεπτικά μέσα και αντιδραστήρια

RPMI 1640

της εταιρείας Gibco[®]. Το μέσο παρέχει απαραίτητα θρεπτικά συστατικά τα οποία είτε είναι τμήματα κυττάρων, όπως αμινοξέα, λιπαρά οξέα, σάκχαρα, ιόντα, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες και ένζυμα, είτε ιόντα ή μόρια που ρυθμίζουν την κατάλληλη χημική ισορροπία. Η κύρια πηγή ενέργειας για τα κύτταρα είναι η γλυκόζη. (78)

FBS

της εταιρείας Gibco[®]. Εμβρυϊκός ορός μόσχου (Fetal Bovine Serum). Προστατεύει τα κύτταρα από τους στρεσογόνους παράγοντες της πειραματικής διαδικασίας, δεδομένου ότι ο φυσικός του ρόλος είναι η προστασία των κυττάρων του οργανισμού από παρόμοια πίεση με τη διατήρηση της ομοιόστασης.

Antibiotic-Antimycotic (100X), liquid

της εταιρίας Gibco. Το αντιβιοτικό-αντιμυκητικό προστατεύει την καλλιέργεια από βακτήρια και μύκητες.

Trypsine 0.25% EDTA Solution, Sigma

Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο που χρησιμεύει στην αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας. Η μηχανική απομάκρυνση θα επέφερε καταστροφή των κυττάρων.

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma

Υδατικό διάλυμα αλάτων, που δρα ως ρυθμιστικό διάλυμα για να διατηρείται σταθερό το PH. Επίσης είναι ισότονο με τα κύτταρα. Χρησιμεύει στην πλύση των κυττάρων, για απομάκρυνση αιωρημάτων, και ως το μέσο αραίωσης του FBSγια να σταματήσει η δράση της θρυψίνης.

Tritonx-100 (C14H22O(C2H4O)n), Sigma

Μη ιοντική επιφανειοδραστική ουσία, η οποία περιέχει υδρόφιλο και λιπόφιλο μέρος, καταλύει τις κυτταρικές μεμβράνες. Αλκοολούχο διάλυμα της ουσίας αυτής χρησιμοποιείται για τη θανάτωση των κυττάρων, στο τέλος ενός πειράματος.

DMSO, Dimethyl sulfoxide, Sigma

Το διμεθυλοσουλφοξείδιο είναι οργανική ένωση του Θείου. Λειτουργεί ως κρυο-προστατευτικό κατά τη διαδικασία της κατάψυξης των κυττάρων. Οι βιολογικές επιπτώσεις της ψύξης προέρχονται από την κρυστάλλωση του νερού, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμένων ουσιών στην ποσότητα του νερού που παραμένει στην υγρή φάση. Τα κύτταρα είτε καταστρέφονται από μηχανική καταπόνηση λόγω της εισχώρησης των κρυστάλλων στις μεμβράνες είτε λόγω της διαταραχής της χημικής ισορροπίας.

Τα κρυο-προστατευτικά απλώς αυξάνοντας τη συνολική συγκέντρωση όλων των διαλυμένων ουσιών, μειώνουν την ποσότητα του σχηματιζόμενου πάγου, για δεδομένη θερμοκρασία. Ταυτόχρονα όμως είναι ελαφρώς τοξικά, επομένως θέλουν προσοχή στο χειρισμό και απομάκρυνση από την καλλιέργεια μετά την απόψυξη των κυττάρων. (79)

MTT

Το MTT είναι η χρωστική βρωμιούχο 3-(4,5διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5διφαινυλοτετραζόλιο η οποία ανάγεται σε μπλε του θειαζολίου, μέσω των κυτταρικών μιτοχονδριακών αφυδρογονασών. Με τον



τρόπο αυτό μετρούνται τα ζωντανά κύτταρα που περιέχει ένα διάλυμα.

Πλήρες θρεπτικό μέσο

Το πλήρες θρεπτικό μέσο αποτελείται από 90% RPMI, 10% FBSκαι 0,8% αντιβιοτικό (αναλογία όγκων). Παρασκευάζεται πριν από τη χρήση.

Διάλυμα πλύσης

Το διάλυμα πλύσης αποτελείται από 90% PBS, 10%FBS, και 0,8%αντιβιοτικό (αναλογία όγκων). Παρασκευάζεται πριν από τη χρήση.

Διάλυμα χρώσης

Για κάθε ml PBS προστίθενται 500 μg MTT.

Διάλυμα νέκρωσης

Ισοπροπανόλη 89,178 %, υδροχλωρικό οξύ 0,822% και TritonX 10%, αναλογία όγκων.

ii. Όργανα

Φασματοφωτόμετρο απορρόφησης

Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το UV-Vis Spectrophotometer Lambda 35 της εταιρίας PerkinElmer.

Πρόκειται για φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης, η μία κατευθύνεται στο δείγμα προς μέτρηση και η άλλη προς το δείγμα αναφοράς, ώστε να παρέχεται κάθε στιγμή η πληροφορία για το σήμα υποβάθρου.



Εικόνα II.1: Spectrophotometer Lambda 35, Perkin Elmer

Περιλαμβάνει δύο λάμπες, μία Δευτερίου για εκπομπή στο

υπεριώδες (200-400nm) και μία Βολφραμίου-Αλογόνου για εκπομπή στο ορατό και στο κοντινό υπέρυθρο (350-1100 nm).

Αρχή λειτουργίας

Η πορεία της φωτεινής δέσμης και η διάταξη του οργάνου περιγράφονται στο ακόλουθο σχήμα:



Σχήμα ΙΙ.1: Αρχή λειτουργίας του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης

Όταν το όργανο λειτουργεί στην περιοχή του ορατού, η δέσμη κατευθύνεται προς το επίπεδο κάτοπτρο 1 (K1), το οποίο τη στέλνει στο K2, ενώ αποκόπτει την ακτινοβολία του λαμπτήρα Δευτερίου. Όταν η λειτουργία είναι στο υπεριώδες, το K1 υψώνεται ώστε να επιτρέψει τη διέλευση του φωτός στο τοροειδές κάτοπτρο K2. Στη συνέχεια η δέσμη διέρχεται από έναν τροχό οποίος φέρει φίλτρα, τα οποία εναλλάσσει ανάλογα με την περιοχή μηκών κύματος που εξετάζονται. Μέσω του κατάλληλου φίλτρου γίνεται μία πρώτη διαλογή στο φάσμα του λαμπτήρα, η ακριβής επιλογή του μήκους κύματος γίνεται στο μονοχρωμάτορας. Ο μονοχρωμάτορας είναι συγχρονισμένος με τον τροχό φίλτρων, μέσω ενός βηματικού κινητήρα.

Μετά τη διέλευση από το φίλτρο, η δέσμη διέρχεται από τη σχισμή 1, που είναι η σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα, προσπίπτει στο φράγμα περίθλασης και εξέρχεται από τη σχισμή 2.

Στο φράγμα περίθλασης η δέσμη αναλύεται δημιουργώντας ένα φάσμα. Η δυνατότητα περιστροφής του φράγματος επιτρέπει την επιλογή ενός τμήματος του φάσματος. Καθώς το τμήμα του φάσματος οδηγείται στη σχισμή 2 γίνεται η περαιτέρω επιλογή του μήκους κύματος. Η εξερχόμενη δέσμη είναι σχεδόν μονοχρωματική. Η σχισμή είναι μεταβλητή επιτρέποντας επιλογή εύρους ζώνης 0,5, 1, 2 και 4 nm. Η δέσμη ακολούθως κατευθύνεται προς το σφαιρικό κάτοπτρο K3, όπου ανακλάται προς το διαχωριστή δέσμης, ο οποίος μοιράζει την ένταση στα δύο επίπεδα κάτοπτρα K4 και K5, τα οποία στέλνουν μία δέσμη προς το δείγμα για ανάλυση και μία προς το δείγμα αναφοράς, αντίστοιχα. Μετά τη διέλευση από τα δείγματα, η κάθε δέσμη διέρχεται από έναν συγκεντρωτικό φακό και καταλήγει στον αντίστοιχο ανιχνευτή. Οι ανιχνευτές αποτελούνται από φωτοδίους.

Επεξεργασία σήματος

Το σήμα από τους ανιχνευτές αναλύεται μέσω ενός Ηλεκτρονικού Υπολογιστή, με τη χρήση του κατάλληλου λογισμικού. Το φασματοφωτόμετρο του εργαστηρίου συνοδεύεται από το λογισμικό UV-WinLab.Το λογισμικό παρέχει τη δυνατότητα ρύθμισης κάποιων παραμέτρων όπως η ταχύτητα σάρωσης, η επιλογή μηκών κύματος, το πλάτος της σχισμής του μονοχρωμάτορα, το βήμα στα μήκη κύματος που σαρώνονται.

Παρέχεται επίσης η δυνατότητα μηδενισμού του σήματος που οφείλεται στο διαλύτη και το θόρυβο του φασματοφωτομέτρου, μέσω της επιλογής Autozero. Η επιλογή αυτή θέτει τις γραμμές αναφοράς είτε πρόκειται για μετρήσεις διέλευσης, είτε για μετρήσεις απορρόφησης. Επομένως τα φάσματα που προκύπτουν αναφέρονται μόνο στην απορρόφηση που οφείλεται στη συγκέντρωση των ουσιών του δείγματος και όχι του μέσου στο οποίο έχουν διαλυθεί, ούτε και στο θόρυβο του φασματοφωτομέτρου.

ΣτοUV-WinLabυπάρχουν εντολές που αναφέρονται στην επεξεργασία των καμπυλών που προκύπτουν. (80) (81) (82)

Laser

Η πειραματική διάταξη ακτινοβόλησης αποτελείται από το διοδικό laser διπλής ετεροεπαφήςAl_{0.3}Ga_{0.7}As, ένα σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας της διόδου και ένα σύστημα ελέγχου της ισχύος εξόδου, μέσω του ρεύματος που διαρρέει τη δίοδο. Η φυσική που διέπει το laser Al_{0.3}Ga_{0.7}Asέχει αναφερθεί στο θεωρητικό μέρος στην παράγραφο III.iii. Εδώ αναφέρονται τα υπόλοιπα στοιχεία της διάταξης.

Το σύστημα ψύξης

Καθώς η θερμοκρασία της διόδου είναι εκείνη που καθορίζει το μήκος κύματος του laser, είναι απαραίτητο ένα σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας της διόδου. Η μείωση της θερμοκρασίας προκαλεί αύξηση στο ενεργειακό χάσμα και επομένως μείωση του εκπεμπόμενου μήκους κύματος. Καθώς το επιθυμητό μήκος κύματος για τη διέγερση του



Εικόνα ΙΙ.2: Η πειραματική διάταξη ακτινοβόλησης

mTHPCείναι 652nm και το μήκος κύματος αυτό για τη συγκεκριμένη δίοδο επιτυγχάνεται σε θερμοκρασίες κοντά στους 0⁰C, απαιτείται ένα σύστημα ψύξης το οποίο θα κατεβάζει τη θερμοκρασία από αυτήν του δωματίου στην επιθυμητή τιμή. Το σύστημα ψύξης αποτελείται από στοιχεία Peltier.



Σχηματικό διάγραμμα του φαινομένου Peltier

Το 1834 ένας Γάλλος ωρολογοποιός και ερασιτέχνης φυσικός, ο Jean Peltier καθώς έκανε μελέτες πάνω στο φαινόμενο Seebeck παρατήρησε το αντίθετο φαινόμενο, δηλαδή την απορρόφηση θερμότητας από μια επαφή και αποβολή θερμότητας από μια δεύτερη επαφή κατά την επίδραση διαφοράς δυναμικού. Το φαινόμενο Peltier παρατηρείται

όταν δυο διαφορετικοί αγωγοί ενώνονται σε μια επαφή. Επειδή οι στάθμες Fermi των δυο υλικών είναι συνήθως διαφορετικές, μερικά ηλεκτρόνια θα περάσουν μέσα από την επαφή μέχρι να παραχθεί ένα ηλεκτρικό πεδίο σαφώς μεγάλο ώστε να εμποδίζει την περαιτέρω ροή ηλεκτρονίων κατά μήκος της επαφής. Η διαφορά δυναμικού εξαρτάται από το είδος των μετάλλων και από τη θερμοκρασία στο σημείο επαφής.

Ο ρυθμός μεταφοράς της θερμότητας, δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\dot{Q} = \Pi_{AB}I = (\Pi_B - \Pi_A)I \quad (II.1)$$

όπου Π_{ΑΒ} είναι η σταθερά Peltier του κυκλώματος και Π_Α, Π_Β οι σταθερές Peltier κάθε υλικού.

Το σύστημα ψύξης επίσης περιέχει και παθητικό απαγωγό θερμότητας, μία ψύκτρα.

Το ρεύμα που διέρχεται από τα στοιχεία Peltierελέγχεται μέσω του θερμοηλεκτρικού ελεγκτή θερμοκρασίας LDT-5525, της εταιρίας ILX Lightwave.

Τροφοδοσία της διόδου



Εικόνα ΙΙ.3: Το τροφοδοτικό (πάνω) και ο ελεγκτής θερμοκρασίας (κάτω)

Οι δίοδοι laserείναι εξαιρετικά ευαίσθητες σε ηλεκτροστατικές εκφορτίσεις και σε παλμούς ρεύματος (μεταβατικά ρεύματα). Και τα δύο αυτά φαινόμενα είναι ικανά να προκαλέσουν σημαντική βλάβη σε αυτές, με αποτέλεσμα την ελάττωση της ισχύος εξόδου, τη μετατόπιση στο ρεύμα κατωφλίου και τελικά την καταστροφή της διόδου. Για το σκοπό αυτό επιλέχτηκε το τροφοδοτικό ρεύματος LDX-3525, της εταιρίας ILX Lightwave.

Βαθμονόμηση διάταξης

Η εύρεση της θερμοκρασίας για την οποία το μήκος κύματος του laserγίνεται το επιθυμητό, δηλαδή το μήκος στο οποίο απορροφούν οι ΦΕ FoscanκαιFospeg, τα 652 nm έγινε με τη βοήθεια ενός μονοχρωμάτορα και ενός παλμογράφου. Ο μονοχρωμάτορας ρυθμιζόταν στο εκάστοτε μήκος κύματος που έπρεπε να ανιχνευτεί και σημειωνόταν η θερμοκρασία στην οποία το σήμα του παλμογράφου γινόταν μέγιστο. Έτσι προέκυψαν ζεύγη θερμοκρασίας μήκους κύματος. Ενδεικτικά αναφέρονται οι τιμές 652 nm για θ=-6⁰Cκαι 654 nm για θ=0⁰C. Εκτιμήθηκε ότι η μεταβολή του μήκους κύματος με τη θερμοκρασία είναι 0,3nm/⁰C, με αβεβαιότητα 0,5nm.

Για την εύρεση της εξάρτησης της ισχύος εξόδου από το ρεύμα που διαπερνά τη δίοδο έγιναν μετρήσεις με τη βοήθεια του μετρητή ισχύος laser Nova 1z01500, της εταιρίας Ophir Optronics. Επίσης με τον ίδιο τρόπο έγιναν μετρήσεις για την κατανομή της έντασης στο τριβλίο. Η κατανομή διαπιστώθηκε ομοιόμορφη σε ικανοποιητικό βαθμό. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα.





Γράφημα 2: Εξάρτηση της ισχύος του laser που φτάνει στο τριβλίο από το ρεύμα της διόδου.

Γράφημα 1: Κατανομή της ισχύος σε μήκος και πλάτος του τριβλίου, κανονικοποιημένη ως προς την ισχύ του κέντρου του τριβλίου (20mm,20mm)

Για επίτευξη ισχύος 1,5mW/cm² το τροφοδοτικό ρυθμίζεται στα 136mA και το σύστημα ψύξης στα 2,15 A.

Οι αντίστοιχες τιμές για τα 3mW/cm^2 είναι 220mA και2,20A

Ανάστροφο Μικροσκόπιο

Για τη μελέτη κυτταρικών καλλιεργειών χρησιμοποιείται ανάστροφο μικροσκόπιο. Το κοινό μικροσκόπιο δεν είναι χρήσιμο, διότι αδυνατεί να εστιάσει λόγω των διαθλάσεων που προκαλεί στις φωτεινές ακτίνες το θρεπτικό μέσο. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στον πυθμένα του τριβλίου ή της φλάσκας, όπου καλλιεργούνται, με αποτέλεσμα να γίνονται ορατά με το ανάστροφο μικροσκόπιο. Η αρχή λειτουργίας του ανάστροφου μικροσκοπίου είναι η ίδια με του κοινού μικροσκοπίου, με τη διαφορά ότι το φως έρχεται από πάνω, και ο αντικειμενικός φακός βρίσκεται κάτω από το δείγμα. Έτσι ο παρατηρητής βλέπει την κάτω επιφάνεια του αντικειμένου.



Εικόνα ΙΙ.4: 1885, το πρώτο ανάστροφο μικροσκόπιο

Τα ανάστροφα μικροσκόπια του εργαστηρίου μας είναι της εταιρίας Unitron. Το ένα είναι συνδεδεμένο με μια CCD Camera, με τη βοήθεια της οποίας και του κατάλληλου λογισμικό λαμβάνονται φωτογραφίες των κυτταρικών καλλιεργειών.

Κλίβανος επώασης



Ο κλίβανος επώασης παρέχει τις κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και συγκέντρωσης CO₂για την καλλιέργεια των κυττάρων. Η θερμοκρασία επιλέγεται στους 37⁰Cκαι η συγκέντρωση CO₂ 5%. Για τα κατάλληλα επίπεδα υγρασίας, τοποθετείται στον πυθμένα του κλιβάνου, δοχείο το οποίο περιέχει κορεσμένο υδατικό διάλυμα άλατος (διβασικού δωδεκαϋδρικού φωσφορικού νατρίου). Ο κλίβανος είναι συνδεδεμένος με παροχή CO₂.

Εικόνα II.5: Direct heat CO₂ Incubator, Thermo Scientific



Καταψύκτης

Για τη διαδικασία της κατάψυξης των κυττάρων, πριν τα κύτταρα εισέλθουν στο υγρό άζωτο, μπαίνουν στον καταψύκτη για 24h, μέσα σε θήκη από φελιζόλ, ώστε να ρυθμιστεί σταδιακά η θερμοκρασία τους στους -80°C, χωρίς να υποστούν σοκ.

Εικόνα II.6: ULT Freezer, Thermo Scientific

Δοχείο υγρού αζώτου



Η διατήρηση των κυττάρων γίνεται στο υγρό άζωτο. Είναι ένα απλό δοχείο, από θερμομονωτικό υλικό, το οποίο περιέχει θήκες, όπου μέσα τοποθετούνται τα φιαλίδια με τα κύτταρα.

Εικόνα ΙΙ.7: Nitrogen Chamber, Statebourne

iii. Πρωτόκολλα

Καλλιέργεια

Απόψυξη:

Καρκινικά κύτταρα προστάτη, της σειράς LNCaPεξάγονται από το υγρό άζωτο όπου φυλάσσονται και αφού θερμανθούν δια της τριβής, ώστε να αποψυχθούν γρήγορα, ρίχνονται σε 10 ml διαλύματος πλύσης.

Στη συνέχεια γίνεται ανάδευση του διαλύματος που περιέχει τα κύτταρα με τη βοήθεια πιπέτας 1000 μl, αναρροφώντας και πιέζοντας πολλές φορές μέσα στο διάλυμα. Με τη διαδικασία αυτή τα κύτταρα παύουν να είναι συσσωμάτωμα και ολοκληρώνεται η πλύση, ώστε να απομακρυνθεί το παλιό θρεπτικό μέσο καθώς και το DMSO, το οποίο βοηθά μεν τα κύτταρα να διατηρήσουν την ακεραιότητα τους όταν είναι στην κατάψυξη, αλλά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι τοξικό για αυτά.

Το διάλυμα που περιέχει τα κύτταρα στη συνέχεια μοιράζεται σε 4 σωληνάκια και μπαίνει στη φυγόκεντρο για 6-7 λεπτά στις 2500rpm. Ακολουθεί απόχυση του υπερκείμενου διαλύματος, τα κύτταρα έχουν μείνει στον πυθμένα. Με 2 mlθρεπτικού μέσου συλλέγονται τα κύτταρα, σε ένα σωληνάκι, γίνεται ανάδευση με τη βοήθεια μικροπρεπές και στη συνέχεια εισάγονται σε μία μικρή φλάσκα, επιφάνειας 25 cm², η οποία περιέχει ήδη 3 mlθρεπτικού μέσου.

Η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο επώασης.

Μετά από δύο ημέρες ελέγχεται η φλάσκα ως προς την πληρότητα και τη φυσιολογική εξέλιξη της καλλιέργειας. Σε περίπτωση που διαπιστωθεί κάποια μόλυνση της καλλιέργειας, η διαδικασία σταματάει, η φλάσκα απολυμαίνεται και απορρίπτεται. Εάν η πληρότητα δεν είναι ικανοποιητική γίνεται αλλαγή θρεπτικού μέσου και συνέχιση της καλλιέργειας στην ίδια φλάσκα. Εάν η πληρότητα είναι μέγιστη γίνεται μεταφορά των κυττάρων σε μεγάλη φλάσκα.

Αλλαγή θρεπτικού μέσου.

Εάν η καλλιέργεια έχει εξελιχθεί σωστά, τα κύτταρα έχουν προσκολληθεί, σχηματίζοντας αποικίες, στην κάτω επιφάνεια της φλάσκας. Επομένως εάν η φλάσκα περιστραφεί αργά και ομαλά, ώστε να αναστραφεί, τα κύτταρα θα παραμείνουν κολλημένα, ενώ το παλιό θρεπτικό μέσο και τυχόν νεκρά κύτταρα ή θραύσματα από νεκρά κύτταρα θα απομακρυνθούν. Το παλιό μέσο είναι τώρα έτοιμο να αποχυθεί. Κρατώντας τη φλάσκα ανεστραμμένη προστίθεται διάλυμα πλύσης το οποίο είναι PBS, περιεκτικότητας 0,8% σε αντιβιοτικό. Το διάλυμα κατευθύνεται προς την επιφάνεια της φλάσκας που τώρα βρίσκεται κάτω, η οποία δεν έχει κύτταρα. Η φλάσκα επιστρέφει αργά προς την κανονική της θέση και ξανά ανάποδα, ώστε να γίνει ένα ξέπλυμα των κυττάρων, χωρίς όμως να παρασυρθούν από το διάλυμα πλύσης. Το διάλυμα πλύσης στη συνέχεια αποχύνεται. Εάν χρειαστεί ακολουθεί και δεύτερη πλύση. Στη συνέχεια κρατώντας και πάλι τη φλάσκα ανάποδα προστίθεται το νέο θρεπτικό μέσο. Η φλάσκα περιστρέφεται προς την κανονική της θέση και επιστρέφει στον κλίβανο επώασης.

Μεταφορά σε μεγάλη φλάσκα.

Για να γίνει αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα της φλάσκας χρησιμοποιείται θρυψίνη. Εάν γινόταν προσπάθεια να αποκολληθούν τα κύτταρα με μηχανικό τρόπο, θα καταστρεφόταν τα κύτταρα. Για μία μικρή φλάσκα, εισάγεται προσεκτικά 1mlθρυψίνης. Καθώς η θρυψίνη είναι τοξική για τα κύτταρα, είναι επιθυμητό να παραμείνει όσο το δυνατό λιγότερο χρόνο. Επιταχύνεται η διαδικασία αποκόλλησης των κυττάρων με μικρά, συνεχή χτυπήματα του εξωτερικού της φλάσκας. Το στρώμα των κυττάρων είναι ορατό δια γυμνού οφθαλμού, επομένως ο πειραματιστής αντιλαμβάνεται πότε τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί και προσθέτει διάλυμα πλύσης ώστε να σταματήσει η δράση της θρυψίνης. Για μικρή φλάσκα το διάλυμα πλύσης που απαιτείται είναι 5 ml. Εισάγονται αρχικά 3 mlόπου είναι αρκετά για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης και τα κύτταρα μεταφέρονται σε 4 σωληνάκια. Τα υπόλοιπα 2 ml χρησιμοποιούνται για να συλλεχθούν και τα υπόλοιπα κύτταρα που έχουν απομείνει στη φλάσκα. Ακολουθεί φυγοκέντριση, απόχυση του υπερκείμενου διαλύματος και συλλογή των κυττάρων με νέο θρεπτικό μέσο. Αφού γίνει ανάδευση με τη βοήθεια πιπέτας τα κύτταρα εισάγονται σε μία μεγάλη φλάσκα, επιφάνειας 75 cm², σε θρεπτικό μέσο 15 ml. Αφού ελεγχθεί στο μικροσκόπιο ότι τα κύτταρα είναι άρτια και δεν έχουν σχηματίσει συσσωματώματα, η φλάσκα απολυμαίνεται εξωτερικά και εισάγεται στον κλίβανο.

Οι πληθυσμοί των κυττάρων: Το κάθε φιαλίδιο που καταψύχεται περιέχει 5 εκατομμύρια κύτταρα. Κατά την απόψυξη συνήθως έχουν επιβιώσει 3 εκατομμύρια κύτταρα τα οποία εισάγονται σε μικρή φλάσκα. Μία μικρή φλάσκα θεωρείται πλήρης όταν έχει καλυφθεί το 70% της επιφάνειάς της, όταν περιέχει περίπου 5 εκατομμύρια κύτταρα. Μία μεγάλη φλάσκα είναι πλήρης όταν περιέχει περίπου 15 εκατ. κύτταρα.

Ανάλογα με το είδος και το μέγεθος του πειράματος η αναπαραγωγή των κυττάρων μπορεί να συνεχισθεί ώστε να καλλιεργούνται από μία έως και τέσσερις μεγάλες φλάσκες.

Τα κύτταρα που θα περισσέψουν από μία σειρά πειραμάτων, εάν έχουν πάει όλα καλά στη διαδικασία, καταψύχονται ξανά, ώστε να χρησιμοποιηθούν σε επόμενο πείραμα.

Κατάψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα που προορίζονται για πείραμα καταμετρώνται με τη βοήθεια ενός ειδικού πλακιδίου στο οπτικό μικροσκόπιο. Επομένως προσδιορίζεται με αναγωγή η ποσότητα του διαλύματος θρεπτικού μέσου και κυττάρων, η οποία περιέχει 5 εκατομμύρια κύτταρα. Η ποσότητα αυτή τοποθετείται σε φιαλίδια, σε τελική αραίωση 5 εκ. κύτταρα σε 1 ml θρεπτικού μέσου. Προστίθενται σε κάθε φιαλίδιο 50 μl DMSO, το οποίο προστατεύει τα κύτταρα σε συνθήκες πολύ χαμηλής θερμοκρασίας. Αναγράφονται οι ημερομηνίες απόψυξης και κατάψυξης, τα φιαλίδια τοποθετούνται σε θήκη από φελιζόλ, και για εικοσιτέσσερις ώρες τοποθετούνται σε καταψύκτη στους -80°C. Στη συνέχεια εισάγονται σε δοχείο το οποίο περιέχει υγρό άζωτο.

Παρασκευή διαλύματος εκχυλίσματος αντιοξειδωτικού

Το εκχύλισμα συντηρείται σε μορφή σκόνης. Για τη χρήση του γίνεται αραίωση σε PBS. Ζυγίζονται στο ζυγό ακριβείας 10mgσκόνης και προστίθενται 2ml PBS. Επειδή το εκχύλισμα είναι φυσικό προϊόν, δεν έχει υποστεί κάποιου είδους αποστείρωση, το διάλυμά του περνάει από φίλτρο, πόρων 0,22μm. Κατακρατούνται μικροοργανισμοί όπως βακτήρια, πρωτόζωα και μύκητες, των οποίων το μέγεθος είναι μεγαλύτερο από αυτό των πόρων του φίλτρου. (Το φίλτρο δεν φιλτράρει ιούς). (83)

Το διάλυμα αυτό φυλάσσεται στην κατάψυξη. Κάθε φορά γίνεται η επιθυμητή αραίωση, πάλι σε PBS.

Ακτινοβόληση

Τα τριβλία εξάγονται από τον κλίβανο επώασης ανά τρία, όπου για το καθένα διαδοχικά αφαιρείται το θρεπτικό μέσο, προστίθεται PBS γίνεται η ακτινοβόληση, και συμπληρώνεται το τριβλίο με νέο θρεπτικό μέσο. Η αφαίρεση του μέσου και η προσθήκη μικρής ποσότητας PBSγίνεται για να μην υπάρξει απορρόφηση από το μέσο. Το PBS είναι απαραίτητο για να προστατεύσει τα κύτταρα από τον αέρα. Στα πρώτα πειράματα ακτινοβόλησης έγινε προσθήκη 300μl PBS, παρατηρήθηκε όμως ότι δεν ήταν αρκετό, διότι εξατμιζόταν, επομένως αυξήσαμε την ποσότητα του PBS στα 500 μl.

Μέθοδος προσδιορισμού βιωσιμότητας κυττάρων ΜΤΤ

Οι σειρές πειραμάτων της παρούσας εργασίας ακολουθούν την εξής διαδικασία.

Καλλιεργούνται κύτταρα σε τριβλία, όπου κάθε πειραματική συνθήκη αντιπροσωπεύεται με τρία τριβλία. Η διαδικασία σταματάει με χρώση των κυττάρων και μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο.

Τα κύτταρα αφού μετρηθούν στο Μετρητή Αιμοκυττάρων, εισάγονται στα τριβλία.

Ο χειρισμός γίνεται χωριστά για κάθε τριάδα τριβλίων.

Εισάγεται 1,5mlθ ρεπτικού μέσου, στη συνέχεια η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος που περιέχει κύτταρα ώστε ο αριθμός τους να είναι 500.000 και μετά ακόμα 1 ml θρεπτικού μέσου. Τα τριβλία εισάγονται στον κλίβανο και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία τόσες φορές όσες και οι συνθήκες που ελέγχονται στο εκάστοτε πείραμα.

Η πρώτη σειρά τριβλίων είναι πάντα η σειρά ελέγχου (control), όπου ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τις υπόλοιπες σειρές, με τη διαφορά ότι δεν προστίθενται ουσίες προς μέτρηση, ούτε πραγματοποιείται ακτινοβόληση.

Καταμέτρηση κυττάρων

Η καταμέτρηση των κυττάρων γίνεται με Μετρητή Αιμοκυττάρων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας MSUM Biochem & Biotech.

Ο Μετρητής Αιμοκυττάρων είναι ένα πλακίδιο μικροσκοπίου το οποίο φέρει ειδικές χαραγές, όπου σχηματίζεται ένα πλαίσιο, το οποίο όταν σκεπαστεί με καλυπτρίδα έχει γνωστό όγκο. Εισάγοντας μια συγκεκριμένη ποσότητα εναιωρήματος που περιέχει κύτταρα, μετρώντας τα στο μικροσκόπιο και κάνοντας αναγωγή στο συνολικό όγκο του εναιωρήματος προς μέτρηση, πραγματοποιείται μία εκτίμηση του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων.



Συγκεκριμένα, η μορφή των χαραγών εικονίζεται στο ακόλουθο σχήμα:

Η διάσταση του τετραγώνου είναι 3x3mm.Είναι διαιρεμένο σε 9 τετράγωνα, διάστασης 1x1 mm.

Για μικρά κύτταρα γίνεται χρήση του κεντρικού τετραγώνου, με την πυκνή διαγράμμιση. Για μεγαλύτερα κύτταρα χρησιμοποιούνται τα 4 τετράγωνα που βρίσκονται εκτός του κεντρικού σταυρού. Στην παρούσα εργασία ακολουθείται η τεχνική για μεγάλα κύτταρα.

Primary Square area = 1.0 mm² depth = 0.1 mm volume = 1x10⁻⁴ ml

Στο ακόλουθο σχήμα απεικονίζεται ένα από τα τέσσερα αυτά τετράγωνα:

Κάθε ένα από τα τετράγωνα προς μέτρηση οριοθετείται από τρείς πυκνές γραμμές. Για τη διευκόλυνση του πειραματιστή, ως προς τη μέτρηση των κυττάρων που βρίσκονται στα όρια του τετραγώνου, γίνεται η ακόλουθη σύμβαση η οποία αιτιολογείται από τη Στατιστική:

Τα κύτταρα που έστω κι ένα μέρος τους βρίσκεται επάνω έστω σε μία από τις τρεις πυκνές γραμμές του ορίου, εάν αυτές είναι πλευρές του κεντρικού σταυρού δε λαμβάνονται υπόψη, εκτός και εάν εφάπτονται στην εσωτερική γραμμή.

Για τις δύο άλλες πλευρές του τετραγώνου ισχύει το αντίστροφο: Τα κύτταρα που βρίσκονται πάνω στις γραμμές καταμετρώνται, εκτός και αν εφάπτονται στην εξωτερική από τις πυκνές γραμμές.

Καταμετρώνται μόνο τα κύτταρα που έχουν ακέραιο στρογγυλό σχήμα, και δε σχηματίζουν συσσωματώματα. Τα αποπτωτικά κύτταρα παρουσιάζουν διαφορετική εικόνα, σαν να έχουν φυσαλίδες με αποτέλεσμα να διακρίνονται από τα επιβιώσαντα, και δεν περιλαμβάνονται στη μέτρηση. Αν η εικόνα παρουσιάζει πάρα πολλά κύτταρα ή πολύ λίγα, γίνεται νέα μέτρηση με την κατάλληλη αραίωση, σε θρεπτικό μέσο.

Το επίπεδο που φέρει τις χαραγές βρίσκεται σε βάθος 0,1 mm, επομένως κάθε τετράγωνο αντιπροσωπεύει όγκο 0,1 mm³ ή 10^{-4} cm³ ή 10^{-4} ml. Επομένως ο μέσος αριθμός κυττάρων ανά τετράγωνο, πολλαπλασιασμένος με 10^{4} δίνει τον αριθμό των κυττάρων ανά ml.

Σε περίπτωση που τα κύτταρα είναι τόσο πυκνά ώστε να επικαλύπτονται, γίνεται αραίωση 50 μl εναιωρήματος σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου (σε διαφορετικό δοχείο). Τα κύτταρα στο μεγάλο τετράγωνο δεν πρέπει να είναι λιγότερα από 50, για να μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα.

Έτσι ο συνολικός αριθμός κυττάρων είναι:

μέσος αριθμός κυττάρων ανά τετράγωνο x αραίωση⁻¹x 10^4 x συνολικός όγκος διαλύματος.

Πριν γίνει η μέτρηση, πλακίδιο και καλυπτρίδα καθαρίζονται προσεκτικά με ισοπροπανόλη. Τοποθετείται η καλυπτρίδα πάνω στο πλακίδιο και στη συνέχεια εισάγονται 9 μl αραιωμένου διαλύματος. Το διάλυμα μεταφέρεται στην κατάλληλη θέση μέσω του τριχοειδούς φαινομένου. Η μέτρηση γίνεται σε οπτικό μικροσκόπιο.

Μετά τη μέτρηση ακολουθεί καθαρισμός του πλακιδίου και της καλυπτρίδας.

Χρώση των κυττάρων

Όταν έχει ολοκληρωθεί ο χρόνος της καλλιέργειας, γίνεται η χρώση ώστε τα κύτταρα να είναι έτοιμα προς μέτρηση. Εισάγεται στα τριβλία διάλυμα που περιέχει χρωστική. Η χρωστική απορροφάται μόνο από τα ζωντανά κύτταρα, έχει χρώμα κίτρινο αρχικά, αλλά μόλις μεταβολισθεί από τα κύτταρα γίνεται μωβ. Μετά από 3 ώρες επώασης με το διάλυμα της χρωστικής, εισάγεται ο διαλύτης όπου τα κύτταρα νεκρώνονται και σταματάει η διαδικασία της χρώσης. Το διάλυμα του διαλύτη με τα κύτταρα που έχουν χρωστεί είναι έτοιμα να μετρηθούν στο φασματοφωτόμετρο.

Η χρωστική που χρησιμοποιείται είναι η ΜΤΤ. Ζυγίζεται στο ζυγό ακριβείας μια μικρή ποσότητα χρωστικής, 25 mg, και γίνεται αραίωση σε PBS, ώστε η συγκέντρωση να είναι 5mg/ml. Γίνεται ανάδευση στο vortex.

Η διαδικασία της χρώσης είναι ιδιαίτερα απαιτητική σε ακρίβεια κινήσεων, συγχρονισμό και ταχύτητα.

Ανά τρία τα τριβλία εξάγονται από τον κλίβανο επώασης και τοποθετούνται στον απαγωγό. Αφαιρείται το θρεπτικό μέσο, με τη βοήθεια πιπέτας, αργά ώστε να μην παρασυρθούν τα κύτταρα, και από τα τρία τριβλία και προστίθενται 1,3 mlαπό το διάλυμα της χρώσης. Το διάλυμα αυτό είναι περιεκτικότητας 650μg/ml, MTT σε PBS και έχει τη θερμοκρασία του κλιβάνου, ώστε να μη σοκάρει θερμικώς τα κύτταρα. Σημειώνεται η ακριβής ώρα εισαγωγής του διαλύματος της χρώσης και τα τριβλία επιστρέφουν στον κλίβανο επώασης. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία με τα επόμενα τρία τριβλία.

Μετά από αναμονή 10'-12' συνεχίζεται η διαδικασία με τα επόμενα 6 τριβλία. Ακολουθεί και πάλι η αντίστοιχη αναμονή και ετοιμάζονται τα επόμενα κ.ο.κ..

Η αναμονή είναι απαραίτητη διότι η επώαση με τη χρωστική ουσία πρέπει να διαρκέσει ακριβώς 3ώρες για όλα τα τριβλία και το επόμενο στάδιο, περιλαμβάνει φυγοκέντριση, η οποία απαιτεί χρόνο, όπου φυγοκεντρούνται ανά 6 τα σωληνάκια.

Μετά από τρεις ώρες, εξάγονται ανά 6 τα τριβλία από τον κλίβανο, όπου συλλέγεται το περιεχόμενο του καθενός με ξεχωριστό τιπ της πιπέτας και αδειάζεται στο αντίστοιχο σωληνάκι, όπου έχουν σημειωθεί τα στοιχεία της ταυτότητας του τριβλίου από το οποίο προέρχεται.

Συλλέγοντας το διάλυμα της χρωστικής από κάθε τριβλίο γίνεται προσπάθεια να συλλεχθούν όσο το δυνατό περισσότερα κύτταρα. Στη συνέχεια τα σωληνάκια μπαίνουν στη φυγόκεντρο για 7 λεπτά. Στα άδεια τριβλία προστίθεται από 1 ml διαλύτη και επανατοποθετούνται τα καπάκια των τριβλίων διότι ο διαλύτης είναι πολύ πτητικός. Όταν αφαιρείται το διάλυμα της χρωστικής από τα τριβλία πολλά κύτταρα είναι δυνατό να προσκολληθούν στο αντίστοιχο τιπ. Για το λόγο αυτόν, η εισαγωγή του διαλύτη στα τριβλία γίνεται με την ακόλουθη διαδικασία:

Με ένα καθαρό τιπ αναρροφάται η ποσότητα του διαλύτη και αδειάζεται στο κάθε τριβλίο διά μέσου του αντίστοιχου τιπ, ώστε τα κύτταρα που προσκολλήθηκαν στο τιπ να επιστρέψουν στο τριβλίο.

Ο διαλύτης αποτελείται από 89,178% ισοπροπανόλη, 10% triton και 0,822% HCl.

Όταν τελειώσει η φυγοκέντριση, χρησιμοποιώντας και πάλι το ίδιο τιπ για κάθε τριβλίο, αναρροφάται από το αντίστοιχο σωληνάκι το διάλυμα της χρωστικής και αποχύνεται. Σε αυτή τη φάση η διαδικασία πρέπει να γίνεται πολύ προσεκτικά διότι το ίζημα είναι πολύ ευαίσθητο σε οποιαδήποτε μετακίνηση και είναι πολύ εύκολο να αρχίσει να αιωρείται και πάλι στο διάλυμα, με αποτέλεσμα να αποχυθούν κύτταρα προς μέτρηση και να μειωθεί η αξιοπιστία της μεθόδου.

Για τη μέγιστη ακρίβεια η ισχύς της φυγοκέντρου ανεβαίνει στο 100%, η οποία αντιστοιχεί σε 3400 rpm. Όταν μπαίνει το διάλυμα στα σωληνάκια, πρέπει η διεύθυνση του τιπ να είναι κατακόρυφη, ώστε να μην προσκολλώνται κεχρωσμένα θραύσματα κύτταρων στα τοιχώματα, διότι αν συμβεί αυτό μετά τη φυγοκέντριση το υπερκείμενο θα περιέχει τα θραύσματα αυτά, με αποτέλεσμα να αποχυθούν.

Στην πορεία των πειραμάτων παρατηρήθηκε ότι η προσπάθεια αφαίρεσης όσο το δυνατόν περισσότερου μέσου, μερικές φορές οδήγησε στην ανεπιθύμητη αναρρόφηση μέρους του ιζήματος. Επομένως η αφαίρεση του υπερκείμενου γίνεται έως μία ορισμένη χαραγή που φέρουν τα σωληνάκια.

Ακολουθεί η προσθήκη σε κάθε σωληνάκι του διαλύτη από το αντίστοιχο τριβλίο, με το αντίστοιχο τιπ. Στη συνέχεια με ένα καθαρό τιπ προστίθεται ακόμα 1 ml διαλύτη σε κάθε σωληνάκι, πάλι διαμέσου του αντίστοιχου τιπ, ώστε να περιληφθούν στη μέτρηση τα θραύσματα που είχαν κολλήσει στο τιπ.

Τα σωληνάκια σφραγίζονται με τη χρήση parafilm, διότι ο διαλύτης είναι πολύ πτητικός. Πριν αποθηκευτούν τα σωληνάκια, αναδεύονται στο vortexώστε τυχόν ζωντανά κύτταρα να διαλυθούν, για να σταματήσει εντελώς η χρώση.

Τα διαλύματα διατηρούντα στο ψυγείο και η μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο γίνεται την επόμενη μέρα.

Μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο

Οι πρώτες μετρήσεις έγιναν χωρίς αραίωση του διαλύματος. Παρατηρήθηκε όμως ότι οι καμπύλες απορρόφησης που προέκυπταν παρουσίαζαν πλατό, για το λόγο αυτόν οι επόμενες έγιναν με αραίωση 1:3.

Τα διαλύματα λοιπόν για να είναι έτοιμα προς μέτρηση αραιώνονται. Πριν γίνει η αραίωση γίνεται προσθήκη ισοπροπανόλης (το κύριο συστατικό του διαλύτη, το οποίο είναι και πτητικό)ώστε όλα τα σωληνάκια να έρθουν στην ίδια στάθμη. Στη συνέχεια για κάθε σωληνάκι φτιάχνεται ένα άλλο διάλυμα το οποίο περιέχει 500μl από το αρχικό και 1000μlισοπροπανόλης.

Πριν από τη δημιουργία του αραιωμένου, το αρχικό αναδεύεται στο vortex. Και τα αραιωμένα διαλύματα πριν μπουν στο φασματοφωτόμετρο επίσης αναδεύονται.

Για τη μέτρηση χρησιμοποιούνται δύο κυβέτες, που είναι διαφανή ορθογώνια δοχεία. Καθαρίζονται πολύ καλά οι κυβέτες και προστίθεται από 1,5 mlισοπροπανόλης. Με τον τρόπο αυτόν παίρνεται η μέτρηση του υποβάθρου.

Στη συνέχεια η μία κυβέτα παραμένει σταθερή στη θέση της και η δεύτερη είναι που δέχεται τα διαλύματα προς μέτρηση.

Για κάθε διάλυμα πραγματοποιούνται τρεις μετρήσεις. Συνήθως κάθε επόμενη είναι ελαφρώς μετατοπισμένη προς τα κάτω, δηλαδή περιγράφει μικρότερη απορρόφηση.

Αυτό ερμηνεύεται από το φαινόμενο της φωτο-καταστροφής του δείγματος.

Τα δείγματα μετά από τη μέτρηση επιστρέφουν στα αντίστοιχα σωληνάκια και επανασφραγίζονται, ώστε να είναι διαθέσιμα για πιθανή επόμενη μέτρηση.

Μετά από κάθε μέτρηση η κυβέτα καθαρίζεται σχολαστικά ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα κυττάρων από την προηγούμενη μέτρηση.

Επεξεργασία των μετρήσεων.

Τα φάσματα που προκύπτουν αποθηκεύονται σε μορφή πίνακα, ο οποίος δίνει την απορρόφηση για κάθε νανόμετρο από τα 350 μέχρι τα 700.

Για κάθε μέτρηση αφαιρείται η τιμή που αντιστοιχεί στα 690nmαπό την τιμή που αντιστοιχεί στα 560nm. Η διαφορά αυτή είναι το γ της ακόλουθης σχέσης γ=10⁻⁵x-0,0658, όπου x ο αριθμός των κυττάρων που περιέχεται στο αντίστοιχο τριβλίο. Επειδή στις μετρήσεις έχει προηγηθεί αραίωση 1:3, ο αριθμός που προκύπτει πολλαπλασιάζεται με 3. Η καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου, προέρχεται από προηγούμενη εργασία που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας.



Παρατήρηση στο μικροσκόπιο

Στο σημείο αυτό παρουσιάζονται εικόνες καρκινικών κυττάρων προστάτη, τα οποία δεν έχουν υποστεί κάποια αλλοίωση. Η παρουσίαση αυτή γίνεται ως σημείο αναφοράς για την ερμηνεία των εικόνων που θα ακολουθήσουν στα στάδια του πειράματος.

Τα καρκινικά κύτταρα προστάτη όταν αφεθούν να αναπτυχθούν στην καλλιέργεια, χωρίς κάποια παράμετρο ανασταλτική για τη μορφολογία τους έχουν την ακόλουθη μορφή.

Οι δύο πρώτες εικόνες είναι από πυκνές περιοχές των τριβλίων, οι δύο επόμενες από πιο αραιές περιοχές. Οι εικόνες από τις αραιές σε κάλυψη κυττάρων περιοχές είναι χρήσιμες διότι το σχήμα των κυττάρων γίνεται καλύτερα αντιληπτό.





εικόνα 2 τριβλίου ελέγχου (control) 5x

εικόνα 1 τριβλίου ελέγχου (control) 5x



εικόνα 3 τριβλίου ελέγχου (control) 5x



εικόνα 4 τριβλίου ελέγχου (control) 5x

Όταν ο αντικειμενικός φακός είναι ο 5x η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική μιας ευρείας περιοχής του τριβλίου. Όταν είναι ο 10x η εικόνα παριστά τις λεπτομέρειες σε μια πολύ μικρή γειτονιά του τριβλίου. Ακολουθούν εικόνες με αντικειμενικό φακό 10x.





εικόνα 5 τριβλίου ελέγχου (control) 10x

εικόνα 6 τριβλίου ελέγχου (control) 10x



εικόνα 7 τριβλίου ελέγχου (control) 10x

εικόνα 8 τριβλίου ελέγχου (control) 10x

Χαρακτηριστικά της φυσιολογικής μορφολογίας των καρκινικών κυττάρων είναι τα ακόλουθα.

α) η ακεραιότητα του σχήματος

β) η καλή πρόσφυση στο τριβλίο η οποία εκδηλώνεται με το σχήμα των κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα είναι μακρόστενα και παρουσιάζουν απολήξεις. Στη φυσιολογική μορφή οι απολήξεις πεπλατυσμένες. Όταν το κύτταρο υποστεί καταπόνηση, όταν δηλαδή σοκαριστεί χάνει την πρόσφυσή του, γίνεται πιο στρογγυλό και οι απολήξεις του περισσότερο αιχμηρές.

γ) η απουσία εναιωρημάτων στην καλλιέργεια, είναι ένδειξη φυσιολογικής εξέλιξης.

δ) ένα άλλο χαρακτηριστικό της φυσιολογικής ανάπτυξης είναι η σύνδεση των απολήξεων των κυττάρων. Όταν τα κύτταρα υποστούν σοκ, με αποτέλεσμα να μπουν στην προ-αποπτωτική διαδικασία, οι συνδέσεις αυτές διακόπτονται. ε) η ομοιογένεια της καλλιέργειας είναι μία ακόμα ένδειξη της ανεπηρέαστης ανάπτυξης των κυττάρων.

ΙΙΙ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πριν από την έκθεση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας, στο σημείο αυτό αναφέρονται τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου μας.

Είναι τα αποτελέσματα που αφορούν σε πειράματα βιωσιμότητας, μετά από ΦΔΘ, για την ίδια ακριβώς διάταξη, τα ίδια πρωτόκολλα και υλικά, όπου περιλαμβάνουν μετρήσεις με τους ΦΕ Foscan και Fospeg.Αποτελούν τις μετρήσεις αναφοράς για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. (Πετρή και συνεργάτες) (19)





Πειράματα προσδιορισμού της οριακά τοξικής δόσης εκχυλίσματος αντιοξειδωτικών

Για τον προσδιορισμό της οριακά τοξικής δόσης του εκχυλίσματος του φλοιού του πεύκου *Pinus* halepensis δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ανά ml θρεπτικού μέσου καθώς και διαφορετικοί χρόνοι επώασης. Με τα πειράματα αυτά διερευνάται η μεταβολή της συμπεριφοράς του μείγματος αντιοξειδωτικών από αναγωγική σε οξειδωτική, σύμφωνα με την υπόθεση ότι η αλλαγή αυτή συμβαίνει στο κατώφλι της επαγωγής τοξικότητας. Στα τριβλία ελέγχου (control) δεν προστίθεται ούτε ΦΕ ούτε αντιοξειδωτικό.

A1:Αρχικά δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 1 μg/ml & 10 μg/ml εκχυλίσματος αντιοξειδωτικών.

1^η μέρα: παρασκευή τριβλίων με αντιοξειδωτικό, 2^η : παρατήρηση στο μικροσκόπιο, 3^η: χρώση

A2: Καθώς φάνηκε ότι τα 10 μg/ml δεν επηρεάζουν δοκιμάστηκε η συγκέντρωση 100 μg/ml καθώς και επανάληψη της 10μg/ml.

1ⁿ μέρα: Παρασκευή τριβλίων με αντιοξειδωτικό, 2ⁿ : παρατήρηση στο μικροσκόπιο. παρατηρήθηκε ότι στα 100 μg/ml υπήρξε πλήρης καταστροφή της καλλιέργειας, επομένως η συγκέντρωση αυτή προσδιορίζεται ως τοξική-προοξειδωτική. Δεν έγινε χρώση και μέτρηση, το συμπέρασμα εξάγεται από τις εικόνες απεικόνισης.

A3: Δοκιμάστηκαν τα 50 μg/ml ως ενδιάμεση δόση, επανάληψη των δόσεων 1 και 10 μg/ml

1ⁿ μέρα: παρασκευή τριβλίων, 2ⁿ : αλλαγή θρεπτικού μέσου και προσθήκη νέου με τις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος (τα κύτταρα αφέθηκαν στα τριβλία να αναπτυχθούν χωρίς προσθήκη κάποιου παράγοντα για 24 h), 3ⁿ : παρατήρηση στο μικροσκόπιο και χρώση.

A4: Η σειρά αυτή και η επόμενη πραγματοποιήθηκαν μετά το πέρας όλων των πειραμάτων για τυχόν προσδιορισμό μεγαλύτερης επιτρεπόμενης συγκέντρωσης. Δοκιμάστηκε η συγκέντρωση των 30 μg/ml, έγινε επανέλεγχος των 10 και 50 μg/ml.

1^η μέρα: παρασκευή τριβλίων, 2^η : προσθήκη αντιοξειδωτικού χωρίς αλλαγή μέσου, 3^η : παρατήρηση στο μικροσκόπιο και χρώση.

A5: Ελέγχονται οι ίδιες δόσεις με χρώση την 4^η μέρα, δηλαδή μετά από 48 h επώασης με το αντιοξειδωτικό.

1ⁿ μέρα: παρασκευή τριβλίων, 2ⁿ : προσθήκη εκχυλίσματος χωρίς αλλαγή μέσου, 3ⁿ : παρατήρηση στο μικροσκόπιο, 4ⁿ : παρατήρηση και χρώση.

Μικροσκοπικά ευρήματα:







Εικόνα i.1: A1 control

Εικόνα i.2: A1 1μg/ml

Εικόνα i.3: A1 10μg/ml

A1: Στα 10 μg/ml παρατηρείται αύξηση στον αριθμό των στρογγυλών κυττάρων. Ίσως η δόση να είναι ελαφρώς τοξική. Δεν παρατηρείται άλλη αλλαγή στη μορφολογία των κυττάρων.



Εικόνα i.4: A2 control

Εικόνα i.5: A2 10μg/ml



Εικόνα i.6: A2 100μg/ml

A2: Τα 10 μg/ml είναι ελαφρώς τοξική δόση. Τα κύτταρα εμφανίζονται πιο στρογγυλά, δεν έχουν καλή πρόσφυση στο τριβλίο. Τα 100 μg/ml είναι τοξική δόση, καθώς παρατηρήθηκε πλήρης καταστροφή της καλλιέργειας.







Εικόνα i.7: A3 10μg/ml Εικόνα

Εικόνα i.8: A3 50μg/ml

Εικόνα i.9: A3 50μg/ml

A3: Δεν παρατηρείται μορφολογική διαφορά στα τριβλία του control και του 1 μg/ml. Στα 10μg/ml η επίδραση γίνεται εμφανής. Ύπαρξη στρογγυλών κυττάρων, η οποία είναι ένδειξη προαποπτωτικής τάσης. Επίσης παρατηρούνται θραύσματα κυττάρων. Τα 50 μg/ml φαίνονται τοξικά, καθώς παρατηρείται ότι τα κύτταρα δεν έχουν προσκολληθεί ομοιόμορφα στην επιφάνεια του τριβλίου, αλλά έχουν σχηματίσει μικρές αποικίες. Επίσης παρατηρούνται εναιωρήματα και ύπαρξη στρογγυλών κυττάρων.



Еік.i.10: A4 control



Еік. і.11: А4 10µgr/ml



Е**к. III.12: A4 30µg/m**l



Еเк. i.13: A4 30µg/ml

Еік. і.14: А4 50µg/ml

Еік. і.15: A4 50µg/ml

Α4: Η πρώτη δόση παρουσιάζει ελαφρώς αλλοιωμένα κύτταρα, είναι πιο επιμήκη. Η δεύτερη παρουσιάζει πολλά θραύσματα κυττάρων, καθώς και στρογγυλά κύτταρα, ενώ στην τρίτη φαίνεται ότι τα κύτταρα δεν έχουν καλή πρόσφυση στο τριβλίο. Ωστόσο στην τρίτη δόση παρουσιάστηκαν υπέρπυκνες περιοχές σε συνδυασμό με άλλες με ελλιπή κάλυψη.



Εικόνα i.16: A5 control



Εικόνα i.17: A5 10μg/ml



Εικόνα i.18: A5 30μg/ml



Εικόνα i.19: A5 30μg/ml



Εικόνα i.20: A5 50μg/ml



Εικόνα III.21: Α<mark>5 50µg/m</mark>l

A5: Στα 10µg/ml παρατηρούνται και πάλι κάπως αιχµηρές οι απολήξεις των κυττάρων. Στα 30µg/ml υπάρχουν εναιωρήµατα, το σχήµα είναι ελαφρώς αλλοιωµένο. Στα 50µg/ml τα εναιωρήµατα αυξάνονται, ενώ δεν παρατηρείται σχηµατισµός εκτεταµένης αποικίας.

Μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο

Πίνακας i.1: Αριθμητικά αποτελέσματα

	A1			А3			A4			A5		
	αριθμός κυττάρων	%	±%	αριθμός κυττάρων	%	±%	αριθμός κυττάρων	%	±%	αριθμός κυττάρων	%	±%
control	280636	100	3,3	253799	100	4,0	363050	100	1,3	481107	100,0	1,4
1µgr/ml	274610	98	1,0	243441	95,9	0,6						
10µgr/ml	262136	93	3,6	247682	97,6	4,5	420872	115,9	6,2	540377	112,3	2,8
30µgr/ml							392908	108,2	1,8	559688	116,3	4,5
50µgr/ml				209931	82,7	0,9	352043	97,0	3,4	508790	105,8	6,6







Στατιστικός έλεγχος

Εφαρμόζεται ο δίπλευρος στατιστικός έλεγχος t-test, όπου α=0,05, όπως συνηθίζεται σε βιολογικά πειράματα. Στατιστικώς σημαντική διαφορά θεωρείται όταν p<α. Όταν η διαφορά είναι στατιστικώς σημαντική αναφέρεται το p.

A1: Σύμφωνα με τον στατιστικό έλεγχο t-test οι βιωσιμότητες που αντιστοιχούν στα 1 και 10μg/ml δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από εκείνη τουcontrol, ούτε και μεταξύ τους.

A3:Σύμφωνα με τον στατιστικό έλεγχο t-testoι βιωσιμότητες που αντιστοιχούν στα 1, 10 και 50μg/ml δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από εκείνη του control, όμως διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά οι βιωσιμότητες που αντιστοιχούν στα 50μg/ml και από εκείνες που αντιστοιχούν στο 1 μg/ml(p=0,016) και στα 10 μg/ml(p=0,008).

A4:Ο στατιστικός έλεγχος έδειξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μόνο κατά τη σύγκριση του controlμε τα 30 μg/ml (p=0,034).

A5: Ο στατιστικός έλεγχος έδειξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μόνο κατά τη σύγκριση του controlμε τα 10 μg/ml (p=0,028).

Συμπέρασμα

Από τα πειράματα A1, A2, A3 προσδιορίστηκε ως οριακά τοξική δόση τα 10μg/ml. Εκτός από τον στατιστικό έλεγχο, δόθηκε έμφαση στις μικροσκοπικές παρατηρήσεις.

Οι σειρές Α4 και Α5 πραγματοποιήθηκαν με διαφορετική γενιά κυττάρων με αποτέλεσμα ενώ μικροσκοπικά παρουσιάζουν ανάλογα χαρακτηριστικά για κάθε δόση με τα προηγούμενα πειράματα, μετά από τη φασματοσκοπία προκύπτει ότι έχουν διαφορετική επίδραση με το αντιοξειδωτικό. Παρατηρούνται αυξήσεις των πληθυσμών για δόσεις που είχαν προσδιοριστεί ως τοξικές. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στα τελευταία πειράματα, προέρχονται από φιαλίδιο που είχε καταψυχθεί 2 χρόνια νωρίτερα, επομένως έχουν υποστεί λιγότερες μιτωτικές διαιρέσεις. Είναι δηλαδή πιο «νέα» από τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος.

ii. Συνδυασμός εκχυλίσματος και φωτοευαισθητοποιητών

Ως μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση προσδιορίστηκαν τα 10μg/ml. Η συγκέντρωση αυτή δοκιμάζεται με δύο γνωστές μη τοξικές, πλην όμως αποτελεσματικές, δόσεις των σκευασμάτωνFoscanκαι Fospeg. Πρόκειται για τα 0,15 και 1,2 μg Φωτοευαισθητοποιητή ανά ml πλήρους θρεπτικού μέσου. Στα τριβλία ελέγχου δεν προστέθηκε ούτε αντιοξειδωτικό ούτε ΦΕ.

B1: Pinus halepensis 10μg/ml και Foscan σε δύο συγκεντρώσεις

1ⁿ μέρα: παρασκευή τριβλίων, 2ⁿ : προσθήκη 25 μl διαλύματος εκχυλίσματος *Pinus* halepensis σε PBS,συγκέντρωσης 1mgr/mlώστε να προκύψει συγκέντρωση 10µg/ml θρεπτικού μέσου. 3ⁿ : προσθήκη Foscan, χωρίς και πάλι να γίνει αλλαγή του μέσου, για να μην ξεκολλήσουν τα κύτταρα από τα τριβλία. Προσθέτοντας 25μl διαλύματος Foscan σε PBS, συγκέντρωσης 15 μg/ml & 120µg/ml, προκύπτουν τελικές συγκεντρώσεις 0,15µg/ml & 1,2µg/ml, αντίστοιχα. 4ⁿ : χρώση.

B2: Pinus halepensis 10μg/ml και Fospeg σε δύο συγκεντρώσεις

1ⁿ μέρα: παρασκευή τριβλίων, 2ⁿ : προσθήκη 25 μl διαλύματος εκχυλίσματος *Pinus* halepensis σε PBSσυγκέντρωσης 1mgr/ml ώστε να προκύψει συγκέντρωση 10μg/ml θρεπτικού μέσου. 3ⁿ : προσθήκη Fospeg, χωρίς και πάλι να γίνει αλλαγή του μέσου, για να μην ξεκολλήσουν τα κύτταρα από τα τριβλία. Προσθέτοντας 25μl διαλύματος Foscanσε PBS, συγκέντρωσης 15μg/ml & 120μg/ml, προκύπτουν τελικές συγκεντρώσεις 0,15μg/ml & 1,2μg/ml, αντίστοιχα. 4ⁿ : χρώση.

Μικροσκοπικά ευρήματα



Εικόνα ii.1: B1 control



Eıĸ.ii.2: B1 Pinus halepensis 10 µg/ml &0,15µg/ml Foscan



Εικ. ii.3:B1 Pinus halepensis 10 μg/ml &1,2μg/ml Foscan

Μικροσκοπικά δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλοιώσεις. Σημειώνεται ότι στη μεγάλη συγκέντρωση του Foscanβρέθηκαν κάποια θραύσματα κυττάρων, επίσης κάποια κύτταρα είναι ελαφρώς στρογγυλεμένα.









Εικόναii.6:B2 Pinus halepensis 10 μg/ml &0,15μg/ml Fospeg

Η μορφολογία των κυττάρων είναι ελαφρώς αλλοιωμένη. Η πρόσφυση δεν είναι τόσο καλή, γεγονός που φαίνεται από το σχήμα των κυττάρων. Τα κύτταρα είναι πιο στρογγυλά στην κύρια μάζα τους, ενώ οι αιχμές τους είναι πιο οξείες. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην ελαφρά τοξικότητα που επάγει η παρουσία του *Pinus halepensis* στα 10 μg/ml.

Μέτρηση	στο	φασματοφ	ρωτόμετρο
---------	-----	----------	-----------

B1 <i>Pinu</i> s	s halepensis 1	.0µg/ml	B2 Pinus	B2 Pinus halepensis 10µg/ml				
αριθμός & Foscan κυττάρων		%	±%	&Fospeg	αριθμός κυττάρων %		±%	
control	261773	100,0	1,1	control	261773	100,0	1,1	
0,15µg/ml	228639	87,3	5,0	0,15µg/ml	258722	98,8	9,1	
1,2µg/ml	261965	100,1	0,6	1,2µg/ml	275289	105,2	2,4	

Πίνακας ii.1: Αριθμητικά αποτελέσματα



Στατιστικός έλεγχος³⁰

B1: Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις βιωσιμότητες που αντιστοιχούν στο controlκαι σε εκείνες των συγκεντρώσεων 0,15 και 1,2 μg/ml του Foscan (p=0,245 και p=0,959). Οι βιωσιμότητες για τις δύο συγκεντρώσεις του Foscan δεν διαφέρουν ούτε μεταξύ τους (p=0,240).

B2: Ομοίως για τον Fospeg τα αντίστοιχα ρείναι 0,919, 0,297 και 0,615.

Συμπέρασμα

Από τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις και τον στατιστικό έλεγχο προκύπτει ότι: απουσία φωτός, ο συνδυασμός εκχυλίσματος και ΦΕ δεν επηρεάζει τη βιωσιμότητα.

³⁰Εφαρμόζεται ο δίπλευρος στατιστικός έλεγχος t-test, όπου α=0,05, όπως συνηθίζεται σε βιολογικά πειράματα. Στατιστικώς σημαντική διαφορά θεωρείται όταν p<α. Όταν η διαφορά είναι στατιστικώς σημαντική αναφέρεται το p.</p>
iii. Πειράματα ακτινοβόλησης χωρίς ΦΕ ή αντιοξειδωτικό

Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων δοκιμάζονται τρεις δόσεις ακτινοβόλησης, 3, 6 & 9mJ/cm², με δύο συνδυασμούς ισχύος και χρόνου η κάθε μία. Τα τριβλία ελέγχου δεν ακτινοβολούνται, βγαίνουν όμως από τον κλίβανο επώασης για ίδιο χρόνο με τα τριβλία προς ακτινοβόληση, και επίσης γίνεται η ίδια διαδικασία ως προς την αλλαγή του μέσου και την προσθήκη PBS.

Γ1:Ακτινοβόληση

1^η μέρα: παρασκευή τριβλίων, 2^η : ακτινοβόληση, 3^η : παρατήρηση στο μικροσκόπιο και χρώση.

Γ2:Ακτινοβόληση

1^η μέρα: παρασκευή τριβλίων, 2^η : ακτινοβόληση, 4^η : παρατήρηση στο μικροσκόπιο και χρώση.

Μικροσκοπικά ευρήματα



Εικόνα iii.1: Γ1 control



Еιк.iii.2: Г1 1,5 mW/cm²-120s



Еιк. iii.3: Г1 1,5 mW/cm²-240s



Е*к. iii.4:* Г1 1,5 mW/cm²-360s







Е.к. ііі.7: Г1 3mW/cm²-180s

Εικόνα iii.5: Γ1 3 mW/cm²-60s

Εικόνα iii.6: Γ1 3 mW/cm²-120s

Μικροσκοπικά δεν παρατηρούνται αλλοιώσεις, απλώς η ύπαρξη στρογγυλών κυττάρων στην Εικ.iii.3 παρατηρήθηκε αυξημένη.

Η σειρά Γ2 δεν παρουσιάζει διαφοροποίηση σε κάποια δόση από το control, επομένως δεν παρουσιάζονται τα απεικονιστικά αποτελέσματα.

Μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο

	Г1 Г2							
	αριθμός κυττάρων	%	±%		αριθμός κυττάρων	%	±%	
control	203812	100,0	1,7		320390	100,0	8,7	
1,5 mW/cm ² -120 sec	190656	93,5	2,2		279700	87,3	3,3	
1,5 mW/cm ² -240 sec	177131	86,9	5,4		258833	80,8	0,2	
1,5 mW/cm ² -360 sec	219719	107,8	5,9		280631	87,6	1,2	
3 mW/cm ² -60 sec	195335	95,8	5,0		328523	102,5	3,0	
3 mW/cm ² -120 sec	219789	107,8	3,2		339037	105,8	5,0	
3 mW/cm ² -180 sec	203634	99,9	4,1		336295	105,0	7,8	

Πίνακας iii.1: Αριθμητικά αποτελέσματα



Στατιστικός έλεγχος

Γ1α: Κανένας συνδυασμός συνθηκών είτε με το control είτε μεταξύ τους δεν είχε στατιστικώς σημαντική διαφορά

Γ1β: Ομοίως

Γ2α: Στατιστικώς σημαντική διαφορά παρουσιάζει μόνο η σύγκριση μεταξύ 240 και 360 sec (p=0,033)

Γ2β: Κανένας συνδυασμός συνθηκών είτε με το control είτε μεταξύ τους δεν είχε στατιστικώς σημαντική διαφορά

Συμπέρασμα

Οι συνδυασμοί των 3 mW/cm² φαίνεται ότι δε μειώνουν τη βιωσιμότητα, για το λόγο αυτόν επιλέγονται για τη συνέχιση των πειραμάτων. Σημειώνεται ότι η διαφορά στους πληθυσμούς για κάθε συνθήκη μεταξύ των Γ1 και Γ2 αποδίδεται ότι στο Γ1 επωάστηκαν για δύο 24ωρα, ενώ στο Γ2 για τρία 24ωρα.

iv. Συνδυασμός εκχυλίσματος και ακτινοβόλησης

Δ1:Ελέγχεται ενδεχόμενη επαγωγή τοξικότητας από το συνδυασμό του αντιοξειδωτικού με την ακτινοβόληση. Ως δόση αντιοξειδωτικού χρησιμοποιήθηκε εκείνη που προσδιορίστηκε από την πρώτη σειρά πειραμάτων (10μg/ml), όπως επίσης για την ακτινοβόληση επιλέχθηκαν οι συνδυασμοί των 3mW/cm², όπως προσδιορίστηκε από τη σειρά Γ. Τα τριβλία ελέγχου δεν περιέχουν αντιοξειδωτικό ούτε ακτινοβολούνται.

1^ⁿ μέρα: παρασκευή τριβλίων, 2ⁿ : προσθήκη *Pinus halepensis* 10µg/ml, 3ⁿ : ακτινοβόληση,4ⁿ : χρώση

Μικροσκοπικά ευρήματα

Στις καλλιέργειες δεν παρατηρείται αλλοίωση σε καμία συνθήκη. Οι εικόνες είναι όμοιες με τα control, επομένως δεν παρατίθενται.

Μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο

Πίνακας iv.1: Αριθμητικά αποτελέσματα

	αριθμός κυττάρων	%	±%
control	282975	100,0	4,2
<i>P.halepensis</i> 10µg/ml &3 mW/cm ² 60 sec	337728	119,3	7,6
<i>P.halepensis</i> 10µg/ml &3 mW/cm ² 120 sec	307947	108,8	1,9
<i>P.halepensis</i> 10µg/ml &3 mW/cm ² 180 sec	311202	110,0	7,4



Στατιστικός έλεγχος

Σύμφωνα με τον στατιστικό έλεγχο κανένας συνδυασμός συνθηκών δεν είχε στατιστικώς σημαντική διαφορά.

Συμπέρασμα

Ο συνδυασμός ακτινοβόλησης και εκχυλίσματος δεν επηρεάζει τη βιωσιμότητα.

v. Φωτοδυναμική με το εκχύλισμα του Pinus halepensis

Η τελευταία φάση του πειράματος είναι ο έλεγχος όλων των παραμέτρων μαζί. Δοκιμάζονται τα δύο σκευάσματαFoscanκαι Fospeg, στη μικρή δόση. Ελέγχεται η μικρή δόση ώστε η ενδεχόμενη συνεργειακή δράση να έχει την προοπτική του οφέλους της μείωσης της δόσης του ΦΕ. Ισχύς ακτινοβόλησης επιλέχτηκαν τα 3mw/cm², όπου στα πειράματα της σειράς Γ, φάνηκε ότι δεν επηρεάζουν τη βιωσιμότητα. Ελέγχονται δύο συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος, το 1μg/ml και τα 10μg/ml. Τα τριβλία ελέγχου δεν περιέχουν εκχύλισμα αντιοξειδωτικού ούτε υφίστανται ΦΔΘ.

E1: *Pinus halepensis* 1µg/ml, Foscan 0,15µg/ml, ισχύς ακτινοβόλησης 3mW/cm², ελεγχόμενοι χρόνοι ακτινοβόλησης 60 s, 120 s.

1^η μέρα: προετοιμασία τριβλίων, 2^η : αλλαγή μέσου και προσθήκη Foscan, 3^η : προσθήκη αντιοξειδωτικού 1 hπριν την ακτινοβόληση, ακτινοβόληση, επώαση με καθαρό μέσο, 4^η : χρώση των κυττάρων.

E2: *Pinus halepensis* 1µg/ml, Fospeg 0,15µg/ml, ισχύς ακτινοβόλησης 3mW/cm², ελεγχόμενοι χρόνοι ακτινοβόλησης 60 s, 120 s.

1^η μέρα: προετοιμασία τριβλίων, 2^η : αλλαγή μέσου και προσθήκη Foscan, 3^η : προσθήκη αντιοξειδωτικού 1 h πριν την ακτινοβόληση, ακτινοβόληση, επώαση με καθαρό μέσο, 4^η : χρώση των κυττάρων.

E3: *Pinus halepensis* 10µg/ml, Foscan 0,15µg/ml, ισχύς ακτινοβόλησης 3mW/cm², ελεγχόμενοι χρόνοι ακτινοβόλησης 60 s, 120 sκαι 180 s.

1^η μέρα: προετοιμασία τριβλίων, 2^η : αλλαγή μέσου και προσθήκη Foscan, 3^η : προσθήκη αντιοξειδωτικού 1 h πριν την ακτινοβόληση, ακτινοβόληση, επώαση με καθαρό μέσο, 4^η : χρώση των κυττάρων.

E4: *Pinus halepensis* 10µg/ml, Fospeg 0,15µg/ml, ισχύς ακτινοβόλησης 3mW/cm², ελεγχόμενοι χρόνοι ακτινοβόλησης 60 s, 120 sκαι 180 s.

1^η μέρα: προετοιμασία τριβλίων, 2^η : αλλαγή μέσου και προσθήκη Foscan, 3^η : προσθήκη αντιοξειδωτικού 1 h πριν την ακτινοβόληση, ακτινοβόληση, επώαση με καθαρό μέσο, 4^η : χρώση των κυττάρων

Μικροσκοπικά ευρήματα



Εικόνα v.1: E1 control



Eικόναν.2: E1 P.halepensis 1µg/ml, Foscan 0,15 µg/ml, 3mW/cm²-60 s



Eικ. v.3: E1 P.halepensis 1μg/ml, Foscan 0,15 μg/ml, 3mW/cm²-120 s



Eικόναν.4: E2 P.halepensis 1μg/ml, Fospeg 0,15 μg/ml, 3mW/cm²-60 s



Eικ.v.5: E2 P.halepensis 1μg/ml, Fospeg 0,15 μg/ml, 3mW/cm²-120 s



Εικόναν.6: E2P.halepensis 1μg/ml, Fospeg 0,15 μg/ml, 3mW/cm²-120 s

Στα τριβλία της σειράς Ε1 δεν παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις.

Στη σειρά E2 στα 60 s παρατηρείται μια μικρή τοξικότητα, τα κύτταρα είναι ελαφρώς σοκαρισμένα, παρουσιάζονται πιο αιχμηρά. Στα 120 s η τοξικότητα είναι εμφανής, υπάρχουν πολλά νεκρά κύτταρα, και άλλα αιχμηρά.



Eικόναν.7: E3p.hal 10µg/ml, Foscan 0,15 µg/ml, 3mW/cm²-60 s



Eικόναν.8: E3p.hal 10µg/ml, Foscan 0,15 µg/ml, 3mW/cm²-120 s



Eικόναν.9: E3p.hal 10µg/ml, Foscan 0,15 µg/ml, 3mW/cm²-180 s

Στη σειρά Ε3 δεν παρατηρούνται αλλοιώσεις



Εικόναν.10: E4P.hal. 10μg/ml, Fospeg 0,15 μg/gr, 3mW/cm²l-60 s



Εικόναν.10: E4P.hal. 10μg/ml, Fospeg 0,15 μg/gr, 3mW//cm²-120 s



Εικόναν.11: E4P.hal. 10μg/ml, Fospeg 0,15 μg/gr, 3mW//cm²-180 s

Στησειρά Ε4 στα 60 s, δεν παρατηρούνται αλλοιώσεις, στα 120 s υπάρχουν κάποια νεκρά κύτταρα, ενώ στα 180s τα νεκρά κύτταρα είναι πολλαπλάσια.

Μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο

E1 Pinus halepensis 1µg/ml, Fosan 0,15µg/ml & 3mW/cm ²			E2 P Fospe	inus halepensi g 0,15µg/ml &	s 1µg/ml, 3mW/cm²	!	
	αριθμός κυττάρων	%	±%		αριθμός κυττάρων	%	±%
control	250166	100,0	1,2	control	250166	100,0	1,2
60 s	256788	102,6	5,0	60 s	235673	94,2	5 <i>,</i> 0
120 s	246630	98,6	1,8	120 s	200897	80,3	0,9

Πίνακαςν.1: Αριθμητικά αποτελέσματα

E3 Pinus halepensis 10µg/ml, Fosan 0,15µg/ml & 3mW/cm ²			E4Pinus halepensis 1µg/ml, Fospeg 0,15µg/ml & 3mW/cm ²				
	αριθμός κυττάρων	%	±%		αριθμός κυττάρων	%	±%
control	250166	100,0	1,2	control	250166	100,0	1,2
60 s	280603	112,2	0,8	60 s	247114	98,8	2,0
120 s	276212	110,4	7,5	120 s	206314	82,5	8,7
180 s	240988	96,3	4,1	180 s	179537	71,8	3,7









Στατιστικός έλεγχος

Ε1: Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά

E2: Η μείωση της βιωσιμότητας που προκλήθηκε από την ακτινοβόληση για 120 s είναι στατιστικώς σημαντική και μάλιστα p=0,000 (p=0,000154)

E3: Η αύξηση του πληθυσμού στη συνθήκη που αντιστοιχεί στα 60 s ακτινοβόλησης κρίθηκε στατιστικώς σημαντική, με p=0,001.

E4: Η μείωση του πληθυσμού που προκλήθηκε από την ακτινοβόληση γα 180 secείναι στατιστικώς σημαντική, συγκρινόμενη με το control (p=0,018) αλλά και με τα 60 s (p=0,007).

Συμπέρασμα

Ε1 έως Ε4: η αύξηση του χρόνου ακτινοβόλησης προκαλεί μείωση των πληθυσμών.

Ωστόσο στα E1 & E3 παρατηρούνται μεγαλύτεροι πληθυσμοί από τα αντίστοιχα control, επομένως το αντιοξειδωτικό έδρασε προστατευτικά κατά τη διάρκεια της επώασης με αποτέλεσμα να φαίνεται στα αποτελέσματα η ανταγωνιστική δράση του με τη ΦΔΘ.

Συγκρίνοντας το E1 με το E2 και το E3 με το E4, παρατηρείται ότι σε κάθε συνθήκη το Fospeg προκαλεί μεγαλύτερη μείωση της βιωσιμότητας έναντι του Foscan. Επομένως ο εγκλεισμός του ΦΕ σε λιποσώματα αυξάνει την αποτελεσματικότητά του.

Διατηρώντας όλες τις παραμέτρους σταθερές και συγκρίνοντας τη μικρή με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικού παρατηρείται ότι η πρώτη έχει μικρότερη βιωσιμότητα, επομένως δρα και στις δύο περιπτώσεις προστατευτικά και μάλιστα αναλόγως με τη συγκέντρωση.

Αν συγκριθούν όμως τα διαγράμματα αυτά με τα αντίστοιχα απουσία αντιοξειδωτικού, γίνεται φανερό ότι το αντιοξειδωτικό έδρασε προστατευτικά και όχι συνεργειακά.

-.-.-.

Καθώς τα προηγούμενα αποτελέσματα δεν είναι ικανοποιητικά, δοκιμάζονται δυο ακραίες δόσεις του αντιοξειδωτικού. Μία ελάχιστη, το 1µg/ml και μία μέσα στα όρια της τοξικότητας, τα 30µg/ml. Επίσης δοκιμάζονται διαφορετικοί χρόνοι χορήγησης: 24hπριν την ακτινοβόληση, 1h πριν την ακτινοβόληση και αμέσως μετά. Η διάρκεια ακτινοβόλησης επιλέγεται η μικρότερη από εκείνες που δοκιμάστηκαν στα πειράματα E1 έως E4, ώστε η ενδεχόμενη συνεργειακή δράση να έχει την προοπτική του οφέλους της μείωσης του χρόνου ακτινοβόλησης.

E5: Foscan 0,15µg/ml, 3mW/cm²-60 s, χορήγηση αντιοξειδωτικού 24hπριν την ακτινοβόληση.

1ⁿ μέρα: παρασκευή τριβλίων, 2ⁿ : προσθήκη Foscan, προσθήκη εκχυλίσματος Pinus halepensis σε δύο συγκεντρώσεις, 3ⁿ : παρατήρηση στο μικροσκόπιο και ακτινοβόληση, 4ⁿ μέρα: παρατήρηση στο μικροσκόπιο και χρώση.

E6: Foscan 0,15µg/ml, 3mW/cm²-60s, χορήγηση αντιοξειδωτικού 1h πριν και αμέσως μετά την ακτινοβόληση.

1[°] μέρα: παρασκευή τριβλίων, 2[°] : προσθήκη Foscan, 3[°] : παρατήρηση στο μικροσκόπιο, προσθήκη εκχυλίσματος *Pinus halepensis* σε τρεις συγκεντρώσεις και ακτινοβόληση, 4[°] μέρα: παρατήρηση στο μικροσκόπιο και χρώση.

Ε7: Fospeg 0,15µg/ml, 3mW/cm²-60 s, χορήγηση αντιοξειδωτικού 24h πριν την ακτινοβόληση.

106

1^ⁿ μέρα: παρασκευή τριβλίων, 2ⁿ : προσθήκη Fospeg, προσθήκη εκχυλίσματος *Pinus halepensis* σε δύο συγκεντρώσεις, 3ⁿ : παρατήρηση στο μικροσκόπιο και ακτινοβόληση, 4ⁿ μέρα: παρατήρηση στο μικροσκόπιο και χρώση.

E8: Fospeg 0,15µg/ml, 3mW/cm²-60s, χορήγηση αντιοξειδωτικού 1h πριν και αμέσως μετά την ακτινοβόληση.

1^η μέρα: παρασκευή τριβλίων, 2^η : προσθήκη Fospeg, 3^η : παρατήρηση στο μικροσκόπιο, προσθήκη εκχυλίσματος *Pinus halepensis* σε δύο συγκεντρώσεις και ακτινοβόληση, 4^η μέρα: παρατήρηση στο μικροσκόπιο και χρώση.

Μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο

E5 Foscan 0,15µg/ml, 3mW/cm²-60s & <i>Pinus halepensis</i> -24h			E6 Foscan 0,15µg/ml, 3mW/cm ² -60s & <i>Pinus halepensis</i>					
	αριθμός κυττάρων	%	±%		αριθμός κυττάρων	%	±%	
control	479803	100,0	5,2	control	479803	100,0	5,2	
1 µg/ml	490078	102,1	2,5	30 μg/ml_1h πριν	550534	114,7	5,3	
30 µg/ml	479659	100,0	0,4	1μg/ml_αμέσως μετά	457904	95,4	0,4	
				10μg/ml_αμέσως μετά	494126	103,0	2,1	

Πίνακαςν.2	Αριθμητι	κά αποτελ	έσματα
------------	----------	-----------	--------

E7Fospeg 0,15μg/ml, 3mW/cm²-60s &Pinus halepensis-24h			E8 Fospeg 0,15 μg/ml, 3mW/cm ² -60s & <i>Pinus halepensis</i>					
	αριθμός κυττάρων	%	±%		αριθμός κυττάρων	%	±%	
control	686587	100,0	4,4	control	528473	100,0	1,7	
1 μg/ml	672471	97,9	2,7	30 μg/ml_1h πριν	558508	105,7	1,7	
30 µg/ml	666979	97,1	1,1					
				10μg/ml_αμέσως μετά	398327	75,4	0,2	







Στατιστικός έλεγχος

E5: Ο στατιστικός έλεγχος δεν έδειξε στατιστικώς σημαντική διαφορά για κανέναν συνδυασμό ελεγχόμενων συνθηκών

Ε6: Ομοίως

Ε7: Ομοίως

E8: Στατιστικώς σημαντική διαφορά παρουσιάζει η συνθήκη "Fospeg 0,15µg/ml, προσθήκη 10µg/ml *P. halepensis* αμέσως μετά την ακτινοβόληση" τόσο με το control(p=0,008) όσο και με τη συνθήκη "Fospeg 0,15µg/ml, προσθήκη 30µg/ml *P. Halepensis* 1 h πριν την ακτινοβόληση" (p=0,048).

Συμπέρασμα

E5: για το 1μg/ml παρατηρείται συμφωνία με το E1, ωστόσο ούτε στο 30 μg/ml φαίνεται να έχει δράσει καθόλου η ΦΔΘ. Η δράση του αντιοξειδωτικού είναι προστατευτική.

Σε κάθε συνθήκη το Fospegέχει επιφέρει από οριακή έως μερική μείωση της βιωσιμότητας. Εάν συγκριθεί με το Foscan επιβεβαιώνεται πάλι η αποτελεσματικότητα του εγκλεισμού του ΦΕ σε λιποσώματα.

E6 και E8: Η προσθήκη του αντιοξειδωτικού μία ώρα πριν την ακτινοβόληση φαίνεται να προστατεύει οριακά περισσότερο, από την επώαση για 24h με αυτό. Επίσης προστατεύει καλύτερα σε σύγκριση με το αν προστεθεί αμέσως μετά.

Η μοναδική συνθήκη που παρουσιάζει αξιοσημείωτη μείωση της βιωσιμότητας είναι στο Ε8, όπου έπειτα από ΦΔΘ με Fospeg προστέθηκαν 10μg/ml *P. halepensis*. Και πάλι, αν συγκριθεί με μετρήσεις χωρίς αντιοξειδωτικό³¹ φαίνεται ότι η δράση είναι και πάλι προστατευτική έναντι της ΦΔΘ, απλώς δεν κατάφερε να το προστατεύσει αρκετά. Στην περίπτωση του Foscanη προσθήκη αντιοξειδωτικού αμέσως μετά προστατεύει πλήρως.





³¹A. Petri et al (19)

ΙΥ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

i. Η επίδραση του εκχυλίσματος του φλοιού του πεύκου Pinus halepensis

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της δράσης ενός μίγματος αντιοξειδωτικών στην αποτελεσματικότητα της ΦΔΘ επαγόμενης με τον ΦΕ mTHPC σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη. Τα αντιοξειδωτικά στη ΦΔΘ δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς, ωστόσο κάποιες μελέτες έχουν διαπιστώσει συνεργειακή δράση με τη ΦΔΘ, όταν αυτά συνυπάρχουν με τα κύτταρα σε προοξειδωτικές συγκεντρώσεις.

Για το σκοπό αυτό αρχικά προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση εκείνη πάνω από την οποία η δράση του μίγματος αντιοξειδωτικών από αναγωγική μετατρέπεται σε οξειδωτική. Ως ένδειξη για αυτή τη μετάβαση θεωρήσαμε την έναρξη της επαγωγής τοξικότητας. Στη συγκέντρωση που προσδιορίσαμε ως την ελάχιστη η οποία είναι ικανή να επάγει τοξικότητα (10 μg/ml) συνεχίσαμε τα υπόλοιπα πειράματα ελέγχου με σκοπό να επιβεβαιώσουμε ότι οι επιμέρους παράμετροι της θεραπείας δεν προκαλούν τοξικότητα, παρά

Στα πειράματα όμως της σειράς Ε, τα οποία αφορούν ολοκληρωμένη τη μέθοδο, δηλαδή ΦΔΘ παρουσία του αντιοξειδωτικού στη συγκέντρωση που είχε προσδιοριστεί ως «προοξειδωτική» εμφάνισαν εξουδετέρωση της θεραπείας αντί για συνέργεια με αυτήν. Δοκιμάστηκαν τότε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του μίγματος αντιοξειδωτικών όπου και πάλι διαπιστώθηκε ότι έδρασαν ανταγωνιστικά με τη ΦΔΘ.

Οδηγούμαστε επομένως στο συμπέρασμα ότι η τοξικότητα του μίγματος ξεκινάει πριν από τη μετάβαση στην προοξειδωτική του συγκέντρωση.

Πολλές μελέτες παρουσιάζουν τη δράση των πολυφαινολών ως ογκοκατασταλτική, ήδη από χαμηλές (αναγωγικές) τους συγκεντρώσεις.

Οι μηχανισμοί ερμηνείας του φαινομένου ποικίλουν.

Για παράδειγμα η γενιστίνη, ένα φλαβονοειδές, βρέθηκε ότι εμποδίζει τη δράση του ενζύμου τοποϊσομεράση ΙΙ. Το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της δομής και της λειτουργίας του DNA. Καταστέλλοντας τη δράση του ενζύμου αυτού εμποδίζεται ο

πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων καθώς εμποδίζεται η διπλή έλικα του να εκτυλιχθεί, για να διαχωριστεί τη συνέχεια στους δύο κλώνους της αλυσίδας, με σκοπό την αντιγραφή της. (84)

Οι Agullo et al επίσης διαπίστωσαν αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, μελετώντας 14 φλαβονοειδή ως προς την αναστολή των ενζύμων κινασών. Οι κινάσες είναι ενζυμα που συμμετέχουν στην ανάπτυξη και των πολλαπλασιασμό των κυττάρων. (85)

Ωστόσο η ακριβής αιτία της τοξικότητας που παρουσίασε το εκχύλισμα του φλοιού του πεύκου *Pinus halepensis* δεν μπορεί να προσδιοριστεί, διότι πρόκειται για ένα μίγμα πληθώρας ουσιών, πολλές από τις οποίες είναι ακόμα αδιευκρίνιστες.

Στη συνέχεια συνοψίζονται τα στάδια που ακολουθήθηκαν στην παρούσα μελέτη για να εξηγηθεί περεταίρω πώς φτάσαμε στο προαναφερθέν συμπέρασμα.

Η δράση του αντιοξειδωτικού στα καρκινικά κύτταρα

Παρατηρήθηκε ελαφρά επαγωγή τοξικότητας ήδη από τα 10μg/ml. Η τοξικότητα αυτή εκδηλώθηκε με μορφολογικές ανωμαλίες στα κύτταρα, οι οποίες παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά. Στα 100 μg/ml σημειώθηκε ολοκληρωτική καταστροφή της καλλιέργειας.

Συνδυασμός αντιοξειδωτικού και ΦΕ

Τα πειράματα αυτά έγιναν για να διαπιστωθεί ότι δεν εμπλέκεται κάποιος άλλος μηχανισμός στην επαγωγή της τοξικότητας σκότους. Όντως απουσία φωτός η παρουσία του εκχυλίσματος σε συνδυασμό με μη τοξικές δόσεις των δύο σκευασμάτων ΦΕ δεν επέφερε κάποια αλλοίωση.

Πειράματα ακτινοβόλησης χωρίς ΦΕ ή αντιοξειδωτικό

Ανάλογα πειράματα είχαν πραγματοποιηθεί σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου που αφορά τη ΦΔΘ χωρίς αντιοξειδωτικό, για την ίδια κυτταρική σειρά, για τον προσδιορισμό μη τοξικής δόσης ακτινοβολίας. Στο διάστημα όμως που μεσολάβησε μέχρι την παρούσα μελέτη, άλλαξε η διάταξη ακτινοβόλησης. Για το λόγο αυτό επανελήφθησαν μόνο οι συνθήκες ακτινοβόλησης που είχαν αξιολογηθεί ως μη τοξικές όταν δρουν χωρίς την παρουσία ΦΕ, αλλά αποτελεσματικές όταν συνδυάζονται με ΦΕ. Ήταν ένας επανέλεγχος για την καινούργια διάταξη. Επιλέχτηκαν οι συνδυασμοί ισχύος και χρόνου που άφηναν ανεπηρέαστα τα κύτταρα.

Συνδυασμός εκχυλίσματος και ακτινοβόλησης

Για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο αλληλεπίδρασης του εκχυλίσματος με την ακτινοβόληση, δοκιμάστηκε η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που επιλέχτηκε ως το όριο επαγωγής τοξικότητας με τρεις δόσεις ακτινοβολίας. Δεν παρατηρήθηκε κάποιος άλλος μηχανισμός.

Η επίδραση του εκχυλίσματος του φλοιού του πεύκου Pinus halepensis στη ΦΔΘ

Αξιοσημείωτη επαγωγή τοξικότητας είχαν μόνο οι πειραματικές συνθήκες που περιελάμβαναν το ΦΕ Fospeg και συγκεκριμένα οι ακόλουθες:

E2: *Pinus halepensis* 1µg/ml 1hεπώαση, Fospeg 0,15µg/ml, ακτινοβόληση 3mW/cm² για 120 s.

E4: *Pinus halepensis* 10µg/ml 1h επώαση, Fospeg 0,15µg/ml, ακτινοβόληση 3mW/cm²- 180 s.

E8: *Pinus halepensis* 10µg/ml προσθήκη αμέσως μετά την ακτινοβόληση,Fospeg 0,15µg/ml, ακτινοβόληση 3mW/cm²-60s.

Εάν συγκριθούν αυτές οι τοξικότητες με τις αντίστοιχες οι οποίες επάγονται χωρίς την προσθήκη εκχυλίσματος (19) (παρουσιάζονται στην αρχή του προηγούμενου κεφαλαίου), βγαίνει απερίφραστα το συμπέρασμα ότι η δράση του ήταν σε όλες τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν στην παρούσα μελέτη προστατευτική.

Το ερώτημα που γεννάται είναι εάν πράγματι φτάσαμε σε προοξειδωτική συγκέντρωση ή εάν το εκχύλισμα παρουσιάζει αποκλειστικά αντιοξειδωτική δράση σε κάθε συγκέντρωση.

Έχοντας αυτά υπόψη μετά το πέρας των πειραμάτων συνδυασμένης δράσης ΦΔΘ και εκχυλίσματος, αναρωτηθήκαμε εάν η συγκέντρωση που είχε προσδιοριστεί ως το όριο της επαγωγής τοξικότητας (10µg/ml) δεν ήταν η σωστή, και έτσι δοκιμάσαμε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Οι τελευταίες αυτές μετρήσεις είναι τα πειράματα A4 και A5. Στα πειράματα αυτά παρουσιάζεται διαφορετική συμπεριφορά σε σύγκριση με τα A1 και A3, φαίνεται από τους πληθυσμούς ότι δεν είναι τοξική η δόση αυτή, ούτε και οι δυο μεγαλύτερες (30 και 50µg/ml). Μικροσκοπικά όμως είδαμε αλλοιώσεις ήδη από τα 10µg/ml. Η φαινομενική αντίφαση ερμηνεύεται από το γεγονός κύτταρα που έχουν μπει στην αποπτωτική διαδικασία διατηρούν τη μιτοχονδριακή τους μεταβολική δραστηριότητα, επομένως με τον έλεγχο βιωσιμότητας MTT καταμετρώνται ως ζωντανά.

Επομένως το όριο της επαγωγής τοξικότητας, ορθώς επελέγη ως τα 10 μg/ml. Το συμπέρασμα που υποδεικνύεται από τα πειράματα τις σειράς Ε, είναι ότι η επαγωγή της τοξικότητας δεν

συμβαδίζει με την μεταβολή της δράσης από αναγωγική σε οξειδωτική. Συγκεντρώσεις ακόμα μεγαλύτερες έδειξαν

Το μεσολαβόν χρονικό διάστημα μεταξύ της χορήγησης του εκχυλίσματος και της ακτινοβόλησης

Δεν παρατηρείται διαφορά μεταξύ της χορήγησης 24hπριν ή 1h πριν την ακτινοβόληση. Και στις δύο περιπτώσεις η δράση είναι εξίσου προστατευτική.

Εάν όμως η χορήγηση γίνει αμέσως μετά, και πάλι διαπιστώνεται προστατευτική δράση, αλλά στο μεν Foscan είναι πλήρως προστατευτική, στο δε Fospeg παρατηρείται ανταγωνιστική δράση μεταξύ ΦΔΘ και εκχυλίσματος. Η διαπίστωση αυτή προκύπτει από τη σύγκριση με προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, τα οποία αφορούν στην κλασική ΦΔΘ, χωρίς αντιοξειδωτικό. (19)

ii. Σύγκριση της λιποσωμικής μορφής του ΦΕ mTHPC-Fospeg, με την απλή του μορφή -Foscan

Σε όλες τις συνθήκες το Fospeg ήταν περισσότερο αποτελεσματικό από το Foscan. Διαπίστωση που συνάδει με προηγούμενες μελέτες τόσο του εργαστηρίου μας, όσο και με τις διεθνείς. Η πιο αξιοσημείωτη διαφορά εμφανίζεται μεταξύ των πειραμάτων Ε6 και Ε8 όπου μετά από ΦΔΘ προστέθηκαν 10 μg/ml εκχυλίσματος. ΦΔΘ με τη λιποσωμική μορφή του ΦΕ, επέφερε τη μεγαλύτερη μείωση της βιωσιμότητας που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη. Ο εγκλεισμός της mTHPC σε λιποσώματα, επέτρεψε την είσοδό της στο εσωτερικό των κυττάρων, με αποτέλεσμα να προλάβει να δράσει όταν ακτινοβολήθηκε, πριν εξουδετερωθούν τα παράγωγά της από το αντιοξειδωτικό.

iii. Βελτιώσεις της πειραματικής διαδικασίας που εισήχθησαν στην παρούσα μελέτη

Στο σημείο αυτό αναφέρονται κάποιες λεπτομέρειες που εισήχθησαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων με σκοπό να βελτιώσουν την αξιοπιστία της μεθόδου. Οι σκέψεις αυτές προήλθαν από τη διαπίστωση ότι τα αρχικά κυρίως πειράματα παρουσίαζαν διαφορές στους πληθυσμούς των τριβλίων της ίδιας πειραματικής συνθήκης.

Κατά τη διαδικασία του ελέγχου βιωσιμότητας MTT παρατηρήσαμε ότι όταν συλλέγεται το κεχρωσμένο πλέον εναιώρημα, πολλά κύτταρα έμεναν κολλημένα στο τιπ, με αποτέλεσμα να μην καταλήγουν στο αντίστοιχο σωληνάκι για φυγοκέντριση. Για να μειωθεί αυτός ο παράγοντας σφάλματος, μετά από την αναρρόφηση του εναιωρήματος από το τριβλίο, με ένα

καθαρό τιπ αναρροφάται η ποσότητα του διαλύτη και αδειάζεται στο κάθε τριβλίο διά μέσου του αντίστοιχου τιπ, ώστε τα κύτταρα που προσκολλήθηκαν στο τιπ να επιστρέψουν στο τριβλίο.

Κατά τη διαδικασία της χρώσης και πάλι, στα αρχικά πειράματα γινόταν προσπάθεια να συλλεχθεί όσο το δυνατόν περισσότερο υπερκείμενο, από το φυφοκεντρισμένο κεχρωσμένο εναιώρημα. Όμως στη συγκεκριμένη φάση το ίζημα των κεχρωσμένων κυττάρων είναι υπερβολικά ευαίσθητο την κάθε μικροκίνηση με αποτέλεσμα κάποιες φορές να συνέβαινε ανάδευση με το υπερκείμενο. Καθώς όμως δεν υπάρχει χρόνος για επιπλέον φυγοκέντριση, διότι ο χρόνος είναι αυστηρά καθορισμένος, για να πάρουν σειρά τα επόμενα τριβλία ήταν το φαινόμενο αυτό ένας ισχυρός παράγοντας σφάλματος. Έτσι ανεβάσαμε την ισχύ της φυγοκέντρου στο μέγιστο, γεγονός που δεν έχει σημασία αν θα προκαλέσει βλάβη στα κύτταρα, αφού πρόκειται να υποστούν βίαιο θάνατο με το διάλυμα νέκρωσης αμέσως μετά που θα βγουν από τη φυγόκεντρο. Επίσης έγινε η σύμβαση να αναρροφάται συγκεκριμένη ποσότητα υπερκείμενου, έως μία χαραγή που έχουν τα σωληνάκια. Με τον τρόπο αυτό οδηγούμαστε σε πιο αξιόπιστη μέτρηση.

Μία άλλη μικρή λεπτομέρεια που εισήχθη ήταν το άδειασμα του υπερκείμενου, μετά τη φυγοκέντριση εναιωρήματος κυττάρων, είτε μετά από την αποκόλλησή τους από τη φλάσκα που τα περιείχε με θρυψίνη. Αρχικά αναρροφούσαμε το υπερκείμενο με πιπέτα. Στη συνέχεια όμως παρατηρήσαμε ότι εάν το σωληνάκι απλώς αναστραφεί με μία σταθερή και αργή κίνηση, αδειάζει όλο το υπερκείμενο, ενώ δεν χάνονται κύτταρα καθώς το ίζημα των ζωντανών κυττάρων έχει καλή συνοχή και καλή πρόσφυση στο σωληνάκι.

Προσπαθώντας να διερευνήσουμε το λόγο που διέφεραν οι πληθυσμοί στα τριβλία της ίδιας συνθήκης έγιναν κάποιες μετρήσεις βιωσιμότητας στα διαλύματα προς απόχυση. Οι μετρήσεις αυτές δεν παρουσιάζονται εδώ, απλώς αναφέρεται ότι διαπιστώθηκε ότι η διαφορά στους πληθυσμούς δεν οφείλεται στη λανθασμένη αναρρόφηση κυττάρων στην προσπάθεια να τα απομονώσουμε από το υπερκείμενο.

Εν κατακλείδι, αναφέρεται εδώ ότι για μεγαλύτερη συμφωνία των πληθυσμών της ίδιας συνθήκης συνίσταται κατά την αρχική εισαγωγή των κυττάρων στα τριβλία, συνεχής ανάδευση του υπέρπυκνου εναιωρήματος κυττάρων, από το οποίο προέρχονται τα κύτταρα που εισάγονται στα τριβλία. Καθώς το εναιώρημα αυτό είναι υπέρπυκνο, τα κύτταρα καθιζάνουν πολύ γρήγορα, με αποτέλεσμα ενώ εισάγεται ο ίδιος όγκος από το εναιώρημα αυτό, σε κάθε τριβλίο, ο αριθμός των κυττάρων να είναι διαφορετικός.

iv. Μελλοντικά πειράματα

Πριν από την απόρριψη του εκχυλίσματος του φλοιού του πεύκου Pinus halepensis ως ενισχυτικού της Φωτοδυναμικής δράσης, συνιστώνται επαναληπτικά πειράματα ΦΔΘ για τις συγκεντρώσεις 30μg/ml και 50μg/ml καθώς και πρόσθετα πειράματα με ενδιάμεσες ή μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

Η συγκέντρωση που θα παρουσιάσει προοξειδωτική συμπεριφορά, δηλαδή ενίσχυση της ΦΔΘ στη συνέχεια να ελεγχθεί ως προς την τοξικότητα σε υγιή κύτταρα προστάτη.

Το ενδεχόμενο μια μεγάλη συγκέντρωση του συγκεκριμένου εκχυλίσματος η οποία είναι τοξική για καρκινικά κύτταρα να μην είναι τοξική για υγιή ενθαρρύνεται από τη μελέτη των Haddad et al. Οι ερευνητές της ομάδας του Haddad μελέτησαν πλήθος φλαβονοειδών (αντιοξειδωτικών που περιέχονται και στο εκχύλισμα του *Pinus halepensis*) ως προς την επαγωγή της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα προστάτη (LnCaP- η κυτταρική σειρά που μελετήσαμε εδώ) εν συγκρίσει με υγιή κύτταρα προστάτη. Διαπίστωσαν ότι για πολλά από αυτά τα φλαβονοειδή η απόπτωση επάγεται σε μικρότερες συγκεντρώσεις για τα καρκινικά κύτταρα από αυτές που προκαλούν απόπτωση στα υγιή. (86)

ν. Επίλογος

Η Φωτοδυναμική Θεραπεία αποτελεί σπουδαία συμβολή στην αντιμετώπιση νεοπλασματικών ασθενειών, διότι χάρη στην υψηλή επιλεκτικότητά της, συνοδεύεται με την ελάχιστη επαγωγή παρενεργειών, συγκρινόμενη με τις συμβατικές θεραπείες όπως την Χημειοθεραπεία ή την Ακτινοθεραπεία. Η ουσιαστική έλλειψη παρενεργειών αποτελεί σπουδαίο πλεονέκτημα για την ποιότητα ζωής των ασθενών. Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα της ΦΔΘ είναι η ικανότητά της να επάγει εκτός από νέκρωση και απόπτωση. Η επαγωγή της απόπτωσης και όχι της νέκρωσης συμβάλει στην ηπιότερη ανάρρωση του ασθενή. Η πρόκληση προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου βοηθά τον οργανισμό να επουλώσει το τραύμα, αποφεύγοντας την οξεία ενεργοποίηση φλεγμονής.

Πρόκειται για μία πολύ εξειδικευμένη τεχνική, η οποία κινείται στην αιχμή των βιοφυσικών και χημικών φαινομένων, καθώς αξιοποιεί λεπτές ισορροπίες μεταξύ των επιμέρους παραμέτρων της. Η έρευνα ενός πολυπαραγοντικού φαινομένου είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσα μέσα στην πολυπλοκότητά της.

Η προσθήκη αντιοξειδωτικών σε προοξειδωτικές συγκεντρώσεις εντάσσεται στα πλαίσια ενίσχυσης της Φωτοδυναμικής Δράσης. Πρόκειται ουσιαστικά για την προσθήκη ελευθέρων ριζών, σε μικρές συγκεντρώσεις, οι οποίες προστιθέμενες στις ελεύθερες ρίζες που εκλύονται από τη ΦΔΘ, προκαλούν ισχυρή ενίσχυση του φαινομένου.

Τα αντιοξειδωτικά είναι αξιοποιήσιμα και στις αναγωγικές τους συγκεντρώσεις. Μετά το πέρας της θεραπείας, μικρές ποσότητες ΦΕ, παραμένουν στον οργανισμό για μερικές ημέρες προκαλώντας ανεπιθύμητη ευαισθησία στο ηλιακό φως. Η χορήγηση αντιοξειδωτικών σε τακτά διαστήματα εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες, αντιμετωπίζοντας την παραμένουσα φωτοευαισθησία.

Αναφορές

1. **C.A. Robertson, D. Hawkins Evans, H. Abrahamse.** Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photoch Photobio B.* 2009, Vol. 96, 1, pp. 1-8.

2. J.Moan and Q.Peng. An outline of the history of PDT. *Anticancer Res.* 2003, Vol. 23, 5A, pp. 3591-600.

3. Ana P. Castano, Tatiana N. Demidova, Michael R. Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—–photosensitizers, photochemistryand cellular localization. *Photodiagn Photod.* 2004, Vol. 1, 4, pp. 279-93.

4. Ana P. Castano, Tatiana N. Demidova, Michael R. Hambliv. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—–cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiag Photod*. 2005, Vol. 2, 1, pp. 1-23.

5. Aisling E. O'Connor, William M. Gallagher and Annette T. Byrne. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Ongology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy,, (2009). *Photochem Photobiol.* 2009, Vol. 85, 5, pp. 1053-1074.

6. Ron R Allison, Gordon H Downie, Rosa Cuenca, Xin-Hua Hu, Carter J.H Childs, Claudio H. Sibata,. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiag Photod*. 2004, Vol. 1, 1, pp. 27-42.

7. Henri-Pierre Lassalle, Dominique Dumas, Susanna Crafe, Marie-Ange D'Hallewin. Collelation between in vivo pharmacokinetics, intratumoral distrubution and photodynamic efficiency of liposomal mTHPC. *J Control Release*. 2008, Vol. 134, 2, pp. 118-124.

8. A.M. Ronn, M. Nouri, L.A. Loffrein, B.M Steinberg, A. Westerborn, T. Windahl, M.J. Shikowitz, A.L. Abramson. Human Tissue Levels and Plasma Pharmakokinetiks of Temorfin (Foscan, mTHPC). *Laser Med Sci.* 1996, Vol. 11, 4, pp. 267-272.

9. Mitra S., and Foster T.H. Photophysical parameters, photosensitizer retention and tissue optical properties completely account for the higher photodynamic efficacy of meso-tetrahydroxyphenyl-chlorin vs photofrin. *Photochem Photobiol.* 2005, Vol. 81, 4, pp. 849-859.

10. **Triesscheijn, M., M. Ruevekamp, R. Out, T. J. Van Berkel, J. Schellens, P. Baas and F. A. Stewart.** The pharmacokinetic behavior of the photosensitizer meso-tetra-hydroxyphenylchlorin in mice and men. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007, Vol. 60, 1, pp. 849–859.

11. Ris, H. B., H. J. Altermatt, R. Inderbitzi, R. Hess, B. Nachbur, J. C. M. Stewart, Q. Wang, C. K. Lim, R. Bonnett, M. C. Berenbaum and U. Althaus. Photodynamic therapy with chlorins for diffuse malignant mesothelioma: initial clinical results. *Br J Cancer.* 1991, Vol. 64, 4, pp. 1116-20.

12. Molinari, A., C. Bombelli, S. Mannino, A. Stringaro, L. Toccacieli, A. Calcabrini, M. Colone, A. Mangiola, G. Maira, P. Luciani, G. Mancini and G. Arancia. m-THPC-mediated photodynamic therapy of malignant gliomas: Assessment of a new transfection strategy. *Int J Cancer.* 2007, Vol. 121, 5, pp. 1149–1155.

13. **Obwegeser, A., R. Jakober and H. Kostron.** Uptake and kinetics of 14C-labelled meta-tetrahydroxyphenylchlorin and 5-aminolaevulinic acid in the C6 rat glioma model. *Br J Cancer.* 1998, Vol. 78, 6, pp. 733-738.

14. **Zimmermann, A., M. Ritsch-Marte and H. Kostron.** mTHPC-mediated photodynamic diagnosis of malignant brain tumors. *Photochem Photobiol.* 2001, Vol. 74, 4, pp. 611-616.

15. Kubler, A. C., J. de Carpentier, C. Hopper, A. G. Leonard and G. Putnam. Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan-mediated photodynamic therapy. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001, Vol. 30, 6, pp. 504-9.

16. **D.Wohrle, A.Hirth, T Bogdahn-Rai, G. Schurpfeil and M. Shopova.** Photodynamic therapy of cancer: second and third generations of photosensitizers. *Russ Chem B+.* 1998, Vol. 47, 5, pp. 807-16.

17. **Boyle, LB Josefsen and RW.** Photodynamic Therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *Brit J Pharmacol.* 2008, Vol. 154, 1, pp. 1-3.

18. Zheng, Cheng S. Jin and Gang. Liposomal Nanostructures for Photosensitizer Delivery. *Laser Surg Med.* 2011, Vol. 43, 7, pp. 734-748.

19. A. Petri, M. Kyriazi, E. Alexandratou, M. Rallis, S. Grafe and D. Yova. Evaluation of the PDT Effect of Foscan[®] and Fospeg[®] in the LNCaP Human Prostate Cancer Cell Line. *Therapeutic Laser Applications and Laser-Tissue Interactions IV.* Therapeutic Laser Applications and Laser-Tissue Interactions IV. Therapeutic Laser Applications and Laser-Tissue Interactions IV, 2009.

20. Julia Buchholz, Barbara Kaser-Hotz, Tania Khan, Tania Khan, Katja Melzer, Reto A. Schwendener, Malgorzata Roos and Heinrich Walt. Optimizing Photodynamic Therapy: In vivo Pharmacokinetics of Liposomal meta-(Tetrahydroxyphenyl)Chlorin in Feline Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005, Vol. 11, 20, pp. 7538-7544.

21. B. Pegaza, E. Debefvea, J.-P. Ballini a, G. Wagni'eresa, S. Spaniolb, V. Albrechtb,D.V. Scheglmannb, N.E. Nifantievb, H. van den Bergha, Y.N. Konan-Kouakoua. Photothrombic activity of m-THPC-loaded liposomal formulations: Pre-clinical assessment on chick chorioallantoic membrane model. *Eur J Pharm Sci.* 2006, Vol. 28, 1-2, pp. 134-40.

22. H-B Ris, T Krueger, A Giger, CK Lim, JCM Stewart, U Althaus and HJ Altermatt. Photodynamic therapy with mTHPC and polyethylene glycol-derived mTHPC: a comparative study on human tumour xenografts. *Brit J Cancer.* 1999, Vol. 79, 7-8, pp. 1061-6.

23. Alberts-Bray-Johnson-Lewis-Raff-Roberts-Walter. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας: εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του κυττάρου. s.l. : ιατρικές εκδόσεις Π.Χ.Πασχίδης, 2000.

24. **MacDonald I.J., Morgan J., Bellnier D.A.** Subcellular localization patterns and their relationship to photodynamic activity of pyropheophorbide-a derivatives. *J Photochem Photobiol.* 1999, Vol. 70, 5, pp. 789-97.

25. **Peng Q., Farrants GW., Madslien K., et al.** Subcellular localization, redistribution and photobleaching of sulfonated aluminum phtalocyanines in a human melanoma cell line. *Int J Cancer.* 1999, Vol. 49, 2, pp. 290-5.

26. **Rashid F., Horobin R.W.** Interaction of molecular probes with living cells and tissues. Part 2. A structure-activity analysis of mitochondrial staining by cationic probes, and a discution of the synergistic nature of image-based and biochemical approaches. *Histochemistry.* 1990, Vol. 94, 3, pp. 303-8.

27. **Hsien Y.J., Wu C.C., Chang C.J., Yu J.S.** Subcellular localization of photofrin determines the death phenotyoe of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *J Cell Physiol.* 2003, Vol. 194, 3, pp. 363-75.

28. **Teiten M.H., Bezdetnaya L., Morliere P., Santus R., Guillemin F.** Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localization in cultured tumour cells. *Br J Cancer.* 2003, Vol. 88, 1, pp. 146-52.

29. **S Marchal, A François, D Dumas, F Guillemin, and L Bezdetnaya.** Relationship between subcellular localisation of Foscan[®] and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells. *Br J Cancer.* 2007, Vol. 96, 6, pp. 944-51.

30. **A J MacRobert and T Theodossiou.** Photodynamic Therary of Cancer. *Radiat Oncol.* 2005, Vol. 14, pp. 43-55.

31. Young, Matt. 8.4.8 Semiconductor Lasers. Optics and Lasers. s.l. : Spiegel, 2000.

32. **Kasap, S.O.** Στοιχειώδης Κβαντομηχανική. *Αρχές Ηλεκτονικών Υλικών και Διατάξεων.* s.l.: Παπασωτηρίου, 2004.

33. Svelto, Orazio. Semiconductor Lasers. Principles of Lasers. s.l. : Plenum Press, 1998.

34. Παπαβασιλείου, Α.Γ. Μεταγραφικοί παράγοντες και Ορθομοριακή Ιατρική. Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών. s.l. : αρχεία ελληνικής ιατρικής.

35. **Moor, Anne C.E.** Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2000, Vol. 57, 1, pp. 1-13.

36. **M.d.C Pazos and H.B. Nader.** Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2007, 40.

37. Καπράνος Ν., Κομηνέα Α.,. Πρωτεΐνες θερμικού shock, . Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής , Τόμος 11ος, Τεύχος 1ο. 38. **Benstead K, Moore J.V.** Quantitave histological changes in murine tail skin followin photodynamic therapy. *Br J Cancer.* 1989, Vol. 59, pp. 503-9.

39. **Deininger M.H., Weinschenk T., et al.** Release of regulators of angiogenesis following Hypocrellin-A and -B ohotodynamic therapy of human brain tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002, Vol. 298, pp. 520-530.

40. Ferrario A., von Tiehl KF, Rucker N. Antiangiogenic treatment enchances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res.* 2000, Vol. 60, pp. 4066-9.

41. Jiang F, Zhang ZG, Katakowski M, et al. Angiogenesis induced by photodynamic therapy in normal rat brains. *Photochem Photobiol*. 2004, Vol. 79, pp. 494-8.

42. Dahle J., Kaalhus O., Moan J, Steen HB. Cooperative effects of photodynamic treatment of cells in microcolonies. *Proc Natl Acad Sci.* 1997, Vol. 94, 5, pp. 1773-8.

43. **Dahle J., Steen HB., Moan J.** The mode of cell death induced by photodynamic treatment depens on cell density. *Photochem Photobiol.* 1999, Vol. 70, 3, pp. 363-7.

44. Dahle J., Bagdonas S., Kaahlus O., Olsen G., Steen HB., Moan J. The bystander effect in photodynamic inactivation of cells. *Biochim Biophys Acta*. 2000, Vol. 1475, 3, pp. 273-80.

45. **Shao C., Furusawa Y., Kobayashi Y., Funayama T., Wada S.** Bystander effect induced by counted high-LET particles in confluent human fibroblasts: a mechanistic study. *Faseb J.* 2003, Vol. 23, pp. 1422-7.

46. Kristjan Plaetzer, Tobias Kiesslich, Thomas Verwanger and Barbara Krammer. The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview. *Med Laser App.* 2003, Vol. 18, 1, pp. 7-19.

47. Nancy L. Oleinick, Rachel L. Morris and Irina Belichenko. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy:what, where, why, and how. *Photochem Photobiol.* 2002, Vol. 1, pp. 1-21.

48. Ana P. Castano, PawelMroz and Michael R. Hamblin. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Nat Rev Cancer*. 2006, Vol. 6, 7, pp. 535-45.

49. Ana P. Castano, Tatiana N. Demidova, Michael R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: part three—–Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiag Photod.* 2005, Vol. 2, 2, pp. 91-106.

50. Ιδεώδες, Ασκληπιακό Πάρκο Ιατρικής Σχολής. Κυτταροκίνες, Ιδεώδες Ασκληπιακό Πάρκο Ιατρικής Σχολής. http://panacea.med.uoa.gr/topic.aspx?id=138.

51. **R.R. Allison, H.C. Mota, V.S. Bagnato, C.H. Sibata.** Bio-nanotechnology and photodynamic therapy-State of the art review. *Photodiag Photod.* 2008, Vol. 5, 1, pp. 19-28.

52. I., Stupp S. Introduction: functional nanostructures. Chem Rev. 2005, Vol. 105, 4, pp. 1023-4.

53. **T, Mang.** Lasers and light sourses for PDT: past, present and future. *Photodiagn Photodyn.* 2004, Vol. 1, 1, pp. 43-8.

54. Singh S, Nalwa H. S. Nanotechnology and health safety-toxicity and risk assessments of nanostructured materials on human health. *J Nanosci Nanotechnol.* 2007, Vol. 7, 9, pp. 3048-70.

55. **Konan Y.N., Crny R., Favet J. et al.** Preparation and characterization of sterile sub-200 nm meso-tetra(4-hydroxylphenyl)porphyrin-loaded nanoparticles for photodynamic therapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2003, Vol. 55, 1, pp. 1649-59.

56. Brannon-Peppas L, Blanchette J.O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004, Vol. 56, 11, pp. 1649-59.

57. **Pitsillides C.M., Joe E.K.,Wei X.** Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticls. *Biophys J.* 2003, Vol. 84, 6, pp. 4023-32.

58. Xu J, Sun Y, Huang J, et al. Photokilling cancer cells using highly cell-specific antibody -TiO(2) bioconjugayes and electroporation. *Bioelectrochemistry*. 2007, Vol. 71, 2, pp. 217-22.

59. Hayden O., Payne C.K. Nanophotonic light sourses for fluorescence spectroscopy and cellular imaging. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2005, Vol. 44, 9, pp. 1159-66.

60. Cao Y., Koo Y.E., Koo S.M., kopelman R. Ratiometric singlet oxygen nano-optodrs and their use for monitoring photodynamic therapy nanoplatforms. *Photochem Photobiol.* 2005, Vol. 81, 6, pp. 1489-98.

61. Koo Y.E., Fan W., Hah, et al. Photonic explorers based on multifunctional nanoplatforms for biosensing and photodynamic therapy. *Appl Opt.* 2007, Vol. 46, 10, pp. 1924-30.

62. Denise Bechet, Pierre Couleaud, Celine frochot, Marie-Laure Viriot, Francois Guillemin and Muriel Barberi-Heyob. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol.* 2008, Vol. 26, 11, pp. 612-21.

63. Ayman Khdair, Di Chen, Yogesh Patil, Linan Ma, Q ping Dou, Malathy PV Shekhar, Jayanth Panyam. Nanoparticle-mediated combination chemotherapy and photodynamic therapy overcomes tumor drug resistance. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010, Vol. 71, 2, pp. 214-222.

64. **Μίχος, Α.Γ.** Ανοσοενισχυτικά και εμβόλια. *Παιδιατρική Θεραπευτική Ενημέρωση*. 2010, pp. 204-14.

65. Vladislava O. Melnikova, Lina N. Bezdetnaya, Daniel Brault, Alexander Y. Potapenko, François Guillemin. Enhancement of meta-tetrahydroxyphenylchlorin-sensitized photodynamic treatment on human tumor xenografts using a water-soluble vitamin E analogue, Trolox. *Int J Cancer.* 2000, Vol. 88, 5, pp. 798-803.

66. Jakus, Judit and Farkas, Orsolya. Photosensitizers and antioxidants: a way to new drugs? *Photochem Photobiol Sci.* 2005, Vol. 4, pp. 694-698.

67. **A. W. Girotti, J. P. Thomas and J. E. Jordan.** Prooxidant and antioxidant effects of ascorbate on photosensitized peroxidation of lipidis in erythrocyte membranes. *Photochem Photobiol.* 1985, Vol. 41, 3, pp. 267-276.

68. I Rosenthal, E Ben-Hur. Ascorbate-assisted, phthalocyanine-sensitized photohaemolysis of human erythrocytes. *Int J Radiat Biol.* 1992, Vol. 62, 4, pp. 481-6.

69. Garry R. Buettner, Eric E. Kelley and C. Patrick Burns. Membrane Lipid Free Radicals Produced from L1210 Murine Leukemia Cells by Photofrin Photosensitization: An Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping Study. *Cancer Res.* 1993, Vol. 53, 16, pp. 3670-3.

70. Eric E. Kelleya, Frederick E. Domannb, Garry R. Buettner, W. Oberleyb, C.Patrick Burnsa. Increased efficacy of in vitro Photofrin[®] photosensitization of human oral squamous cell carcinoma by iron and ascorbate. *Int J Radiat Biol.* 1997, Vol. 40, 3, pp. 273-7.

71. **Oleg L. Kaliya, Evgeny A. Lukyanets, N. Vorozhtsov.** Catalysis and photocatalysis by phthalocyanines for technology, ecology and medicine. *J Porphyr Phthalocya.* 1999, Vol. 3, 6-7, pp. 592-610.

72. **El-Sayed A.M. Al-Sherbini, Amr H. El Noury, Mahmoud N. El Rouby, Tarek Ibrahim.** Vitamin E (α-tocopherol) enhances the PDT action of hematoporphyrin derivatives on cervical cancer cells. *Med Laser Appl.* 2008, Vol. 24, 1, pp. 65-73.

73. **Κυριαζή, Μαρία.** Διδακτορική Διατριβή: Μελέτη Συνδυαστικής Δράσης Φωτοδυναμικής Θεραπείας και Αντιοξειδωτικών σε Καρκίνο του Δέρματος με Χρήση Φωτοφυσικών Μεθόδων. Αθήνα : s.n., 2007.

74. Dan Sun, Su-juan Zhang, Yong-Feng Wei, Ling-fang Yin. Enhancment of Photodynamic therapy induced cytotoxicityin K562 cells by genistein. 2011, Vol. SOPO, pp. 1-4. Symposium Shangai.

75. E. Voulgaridis, A. Grigoriou and C. Passialis. Investigations on bark extractives of Pinus halepensis Mill . *European Journal of Wood and Wood Products*. 1985, Vol. 43, 7.

76. **Anilda Guri, Panagiotis Kefalas and Vassilios Roussis.** Antioxidant Potential of Six Pine Species. *Phytother Res.* 2006, Vol. 20, pp. 263-6.

77. Richardson, D.M. Ecology and Biogeography of Pinus. s.l. : Cambridge University Press, 1998.

78. Jennie, Mather P. and Roberts, Penelope E. Introduction to Cell and Tissue Culture. New York : Plenum Press, 1998.

79. **Pegg, David E.** Principles of Cryopreservation. [book auth.] Day JG and Stacey GN. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols.* s.l.: Humana Press, 2007.

80. Perkin Elmer. Lambda 20/ Lamda 40 Installation and Maintenance Guide.

81. —. User's Guide: UV WINLAB Software.

82. —. product note: Pharmaceutical Applications: The Lambda Series.

83. Nancy P. Moreno, Barbara Z. Tharp. Comparing Sizes of Microorganisms. *The science of Microbes*. BCM, 2008.

84. *Inhibitory Effects of the Tyrosine Kinase Inhibitor Genistein on Mammalian DNA Topoisomerase II.* **Markovits J., Linassier C., Fosse P. et al.** s.l. : Canser Res, 1989, Vol. 49, pp. 5111-17.

85. Georgine Agullo, Laurence Gamet-Payrastre, Stephane Manenti, Cecile Viala, Christian Remesy, Hugues Chap, Bernard Payrastre. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: A comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol.* 1997, Vol. 53, pp. 1649-57.

86. **AQ Haddad, V Venkateswaran, L Viswanathan, SJ Teahan, NE Fleshner and LH Klotz.** Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer P D.* 2006, Vol. 9, pp. 68-76.