

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ



Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών
Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΔΙΑΤΑΞΗΣ ΠΑΛΜΙΚΗΣ
ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ ΓΙΑ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.
ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΑΛΜΙΚΟΥ ΚΑΙ ΣΥΝΕΧΟΥΣ
LASER

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ελένη Οικονόμου

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΜΠ
Συνεπιβλέπουσα: Ελένη Αλεξανδράτου, Ε.Δι.Π. Α΄

Αθήνα 2024

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ



Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών
Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΔΙΑΤΑΞΗΣ ΠΑΛΜΙΚΗΣ
ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ ΓΙΑ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.
ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΑΛΜΙΚΟΥ ΚΑΙ ΣΥΝΕΧΟΥΣ
LASER

Ελένη Οικονόμου

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΜΠ
Συνεπιβλέπουσα: Ελένη Αλεξανδράτου, Ε.Δι.Π. Α΄

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 29^η Φεβρουαρίου 2024

.....
Κ. Πολιτόπουλος
Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π

.....
Ε. Χριστοφόρου
Καθηγητής Ε.Μ.Π

.....
Η. Γλύτσης
Καθηγητής Ε.Μ.Π

Αθήνα 2024

.....

Ελένη Οικονόμου

Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών ΕΜΠ

Copyright © – Ελένη Οικονόμου, 2024

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

.....
Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η φωτοδυναμική θεραπεία (Photodynamic Therapy - PDT) αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη θεραπευτική μέθοδο, το μέλλον της οποίας είναι αλληλένδετα συνδεδεμένο με τη συνεχή έρευνα, κυρίως γύρω από δύο πεδία: α) τις φωτοευαίσθητες ουσίες και β) τους τρόπους ακτινοβολήσης της πάσχουσας περιοχής. Σχετικά με το πρώτο ερευνητικό πεδίο, οι φωτοευαίσθητες ουσίες, ανάλογα με τις ιδιότητές τους, καθορίζουν κατά έναν τεράστιο βαθμό την έκβαση της φωτοδυναμικής θεραπείας. Αναφορικά με το δεύτερο πεδίο έρευνας, δύο είναι τα θεραπευτικά σχήματα που μελετώνται ως προς την αποτελεσματικότητά τους: η συνεχής (CW) και η παλμική (fractionated) ακτινοβολήση. Πληθώρα πειραμάτων έχουν διεξαχθεί από την επιστημονική κοινότητα, τα οποία παρουσιάζουν πολύ ενδιαφέροντα αλλά πολλές φορές και αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στην έρευνα γύρω από τη χρήση του παραγώγου Curcumin Mix της κουρκουμίνης ως φωτοευαίσθητη ουσία κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία για τον καρκίνο του δέρματος. Κεντρικός στόχος της εργασίας αποτελεί η συγκριτική μελέτη της συνεχούς και παλμικής ακτινοβολήσης. Έχοντας σκοπό τη διερεύνηση και βελτιστοποίηση της αποτελεσματικότητας των δύο σχημάτων ακτινοβολήσης στη PDT, ο στόχος αυτός αναλύεται και εξειδικεύεται περαιτέρω στους εξής επιμέρους στόχους: α. μελέτη φωτοφυσικών ιδιοτήτων και παραγωγής ελεύθερων ριζών της κουρκουμίνης β. μελέτη αλληλεπίδρασης της κουρκουμίνης με τα κύτταρα γ. σχεδιασμός κυκλωματικής διάταξης ακτινοβολήσης και ανάπτυξη εφαρμογής για την αυτοματοποίηση του ακτινοβολητικού σχήματος.

Αρχικά, πραγματοποιείται μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων του μείγματος της κουρκουμίνης, μέσω φασματοσκοπικών μελετών απορρόφησης. Η διάταξη ακτινοβολήσης βασίζεται σε μπλε led για τη φωτεινή ενεργοποίηση της κουρκουμίνης και μέσω σειράς πειραμάτων μελετάται η ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών σε συνθήκες συνεχούς και παλμικής ακτινοβολήσης και η τοξικότητα της κουρκουμίνης απουσία φωτός σε καρκινικά κύτταρα δέρματος (A431). Ακόμα, αναπτύσσεται εφαρμογή που αυτοματοποιεί την διαδικασία της ακτινοβολήσης. Τέλος, μελετάται η επίδραση της συνεχούς και παλμικής ακτινοβολήσης στην κυτταρική σειρά A431. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων είναι ενθαρρυντικά για μελλοντική χρήση τόσο της κουρκουμίνης ως φωτοευαίσθητοποιητή, όσο και της συνεχούς και παλμικής ακτινοβολήσης ως πολύτιμα εργαλεία στην εξέλιξη της έρευνας για την αξιοποίηση της φωτοδυναμικής θεραπείας στην πάλη ενάντια στον καρκίνο.

Λέξεις κλειδιά: Φωτοδυναμική θεραπεία, παλμική ακτινοβολήση, συνεχής ακτινοβολήση, φωτοευαίσθητοποιητής, κουρκουμίνη, φάσματα, φωτοφυσικές ιδιότητες, απορρόφηση, ελεύθερες ρίζες, καρκινικά κύτταρα, A431, καρκίνος του δέρματος, αυτοματοποίηση ακτινοβολήσης

ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) is a promising therapeutic method, the future of which is interconnected with continuous research, mainly around two fields: a) photosensitive substances and b) irradiation methods in the diseased tissues. Regarding the first research field, photosensitive substances, depending on their properties, determine to an enormous extent the outcome of photodynamic therapy. Regarding the second field of research, there are two therapeutic regimens that are studied in terms of their effectiveness: continuous (CW) and pulsed (fractionated) irradiation. Numerous experiments have been conducted by the scientific community, which present very interesting but often conflicting results.

This thesis focuses on the research surrounding the use of the Curcumin Mix derivative of curcumin as a photosensitive substance during photodynamic therapy for skin cancer. The main objective of the work is the comparative study of continuous and pulsed irradiation. Aiming to investigate and optimize the effectiveness of the two radiation regimens in PDT, this objective is further analyzed and specialized into the following sub-objectives: a. a study of photophysical properties and production of free radicals of curcumin b. a study of curcumin's interaction with cells c. design of an irradiation circuit and development of an application for the automation of the irradiation scheme.

First, a study of the photophysical properties of the curcumin mixture is performed, through spectroscopic absorption experiments. The irradiation device is based on a blue LED for the light activation of curcumin and through a series of experiments, the ability to produce free radicals in conditions of continuous and pulsed irradiation as well as the toxicity of curcumin in the absence of light in skin cancer cells (A431) are investigated. Furthermore, an application is being developed that automates the irradiation process. Finally, the effect of continuous and pulsed irradiation on the A431 cell line is analyzed. The results of the experiments are encouraging for the future use of both curcumin as a photosensitizer and continuous and pulsed irradiation as valuable tools in the development of research for the utilization of photodynamic therapy in the fight against cancer.

Keywords: Photodynamic Therapy, CW, fractionated, photosensitizers, curcumin, spectra, photophysical properties, absorption, free radicals, cancer cells, A431, skin cancer, automation of irradiation

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ολόκαρδες ευχαριστίες μου στον καθηγητή μου Κωνσταντίνο Πολιτόπουλο, καθηγητή Ε.Μ.Π., για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την αμέριστη κατανόηση και συμπαράσταση καθ' όλη την διεξαγωγή της διπλωματικής. Ο χρόνος, οι υποδείξεις και οι συμβουλές του ήταν πολύτιμες.

Θέλω να ευχαριστήσω επίσης την Δρ. Ελένη Αλεξανδράτου, μέλος του εργαστηριακού και διδακτικού προσωπικού (Ε.ΔΙ.Π) του Ε.Μ.Π. για το ενδιαφέρον της, την στήριξη και την υπομονή της. Μέσα από τη συνεργασία μας απέκτησα πολύτιμες γνώσεις γύρω από το συγκεκριμένο ερευνητικό θέμα και δίχως τη βοήθειά της η αντιμετώπιση των δυσκολιών και των προκλήσεων δεν θα ήταν εφικτή. Ακόμη, θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθεί η ευγνωμοσύνη μου στους προαναφερόμενους για όλα αυτά αλλά και για την ολόθερμη αποδοχή της καλλιτεχνικής μου φύσης.

Ευχαριστίες οφείλω εξίσου και στην υποψήφια διδάκτωρ Αλεξάνδρα Καραγιάννη, με την συμβολή της οποίας κατάφερα να φέρω εις πέρας πειράματα που δεν θα ήταν υλοποιήσιμα διαφορετικά.

Συνεχίζοντας, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους μου του φίλους και συνοδοιπόρους στα όμορφα αλλά και δύσκολα φοιτητικά μου χρόνια, που με διαμόρφωσαν καθοριστικά ως άνθρωπο. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Θανάση Δελή, για τις αγωνίες, τα όνειρα, τις επιτυχίες, τις αποτυχίες, τα ξενύχτια με διάβασμα και εργασίες στο μπαλκόνι που μοιραστήκαμε, καθώς προσπαθούσαμε να έρθουμε κάθε φορά ένα βήμα πιο κοντά στα όνειρά μας.

Τελειώνοντας, δεν θα μπορούσα να μην ευγνωμονώ τα μέλη της οικογένειάς μου για την απεριόριστη προσφορά τους και τις θυσίες που έκαναν για να με υποστηρίξουν στη διάρκεια όλων των σπουδών μου. Μέσα από τις δυσκολίες που έζησα και αντιμετωπίσαμε μαζί, οδηγήθηκα αναπόδραστα στον σωστό δρόμο, που δεν είναι άλλος από το να δίνουμε αξία στην ανθρώπινη ζωή και να παλεύουμε για αυτή.

Ελένη Οικονόμου

Αθήνα, 11^η Νοεμβρίου 2023

Στους γονείς μου,

Άννα και Ηλία

ΩΡΑΙΑ ΧΡΟΝΙΑ

Όνειρα κι όνειρα ήρθανε

στα παιδικά μας μέτωπα.

Μέρες και νύχτες ως τις γλυκές

αϋπνίες της νιότης μας.

Μες τη νύχτα γεννιέται η ξαστεριά

όπως μες των μόχθων μας την προσπάθεια

τα ωραία χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	5
Abstract.....	7
Ευχαριστίες.....	9
Περιεχόμενα.....	12
Περιεχόμενα εικόνων.....	17
Περιεχόμενα διαγραμμάτων.....	19
Περιεχόμενα πινάκων.....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	
1. ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	21
1.1 Ιστορική Αναδρομή.....	21
1.2 Εισαγωγή στη φωτοδυναμική θεραπεία – PDT (Photodynamic Therapy).....	22
1.3 Απορρόφηση του φωτός.....	24
1.3.1 Εσωτερική μετατροπή.....	25
1.3.2 Εσωτερική μετάπτωση $S^* \rightarrow T^*$	26
1.3.3 Φθορισμός.....	26
1.3.4 Καθυστερημένος φθορισμός.....	27
1.3.5 Φωσφορισμός.....	27
1.3.6 Μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού.....	27
1.3.7 Μεταφορά ενέργειας μέσω κρούσεων.....	27
1.3.8 Φωτοχημική Αντίδραση.....	28
1.3.9 Δονητική αποδιέγερση.....	28
1.4 Μηχανισμοί Φωτοδυναμικής Θεραπείας.....	28
1.4.1 Βασικές Αρχές και Μηχανισμοί.....	28
1.4.2 Φωτοφυσική και Φωτοχημεία.....	29
1.4.3 Μηχανισμοί Κυτταρικού Θανάτου.....	31
1.5 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα Φωτοδυναμικής Θεραπείας.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	
2. ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΕΣ.....	38

2.1 Ορισμός και προϋποθέσεις ώστε μια ουσία να χρησιμοποιηθεί ως φωτοευαισθητοποιητής.....	38
2.2 Κατηγορίες και γενιές φωτοευαισθητοποιητών.....	39
2.3 Η Κουρκουμίνη ως φωτοευαισθητοποιητής.....	46
2.3.1 Εισαγωγή.....	46
2.3.2 Δομή Κουρκουμίνης και κουρκουμινοειδή.....	47
2.3.3 Εφαρμογές της κουρκουμίνης.....	48
2.3.4 Αντικαρκινικές ιδιότητες της κουρκουμίνης.....	48
2.3.5 Κουρκουμίνη και φωτοδυναμική θεραπεία.....	49

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	50
3.1 Διείσδυση Φωτός στη Φωτοδυναμική Θεραπεία – Light penetration.....	50
3.2 Συγκέντρωση Φαρμάκου στους Ιστούς – Tissue drug concertation.....	51
3.3 Επίπεδο Οξυγόνωσης στη Φωτοδυναμική Θεραπεία – Oxygenation level.....	53
3.4 Περιβαλλοντικό φως.....	54
3.5 Χωρικός εντοπισμός του φωτοευαισθητοποιητή.....	54
3.6 Ισχύς ακτινοβολήσης.....	55
3.7 Ενέργεια Ακτινοβολίας στη Φωτοδυναμική θεραπεία.....	56
3.8 Τρόποι ακτινοβολήσης.....	57
3.8.1 Φωτοδυναμική θεραπεία με πηγή συνεχούς εκπομπής φωτός – <i>Continuous Waved Photodynamic Therapy (CW)</i>	57
3.8.2 Φωτοδυναμική θεραπεία με πηγή παλμικής ακτινοβολίας – <i>Fractionated Photodynamic Therapy (Pulsed)</i>	58
3.8.3 Σύγκριση πειραματικών αποτελεσμάτων μεταξύ CW και Pulsed Photodynamic Therapy με βάση τη βιβλιογραφία.....	59

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΙ ΟΥΣΙΕΣ.....	61
4.1 Σκοπός Μελέτης.....	61
4.2 Πειραματικές Διατάξεις.....	61

4.2.1 Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης.....	61
4.2.2 Διάταξη ακτινοβολήσης.....	65
4.3 Ψηφιακό θερμόμετρο thandar TH 302.....	68
4.4 Ενεργόμετρο – Laser Power meter 3A-FS (CW & Pulsed μετρήσεις 60μW-3W, 15μJ-2J).....	68
4.5 Σύστημα Ελέγχου.....	69
4.5.1 Εισαγωγή.....	69
4.5.2 Ανάλυση κυκλώματος Ενισχυτή διαγωγιμότητας.....	71
4.5.3 Ανάλυση ενδιάμεσου κυκλώματος.....	76
4.6 Χημικές ουσίες.....	77
4.6.1 Curcumin Mix.....	77
4.6.2 DMSO (dimethyl sulfoxide).....	77
4.6.3 PBS (Phosphate Buffered Saline).....	77
4.6.4 NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide – Νικοτιναμιδο-αδενινουκλεοσίδιο).....	78
4.6.5 EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid).....	79
4.6.6 FBS (fetal bovine serum).....	80
4.6.7 Αντιβιοτικό.....	80
4.6.8 DMEM.....	80
4.6.9 Τρυψίνη.....	80
4.6.10 Ισοπροπανόλη.....	81

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ.....	82
5.1 Κώδικας Arduino.....	82
5.1.1 Εισαγωγή.....	82
5.1.2 Εκτεταμένη Επισκόπηση Σχεδίασης.....	83
5.1.3 Αναλυτική Αρχική Κατάσταση.....	83
5.1.4 Εκτεταμένες Παράμετροι Πειράματος.....	84
5.1.5 Ενισχυμένη Λογική Ελέγχου LED.....	84
5.1.6 Αναλυτική Λειτουργικότητα Παύσης και Συνέχισης.....	85

5.1.7 Ολοκληρωμένη Χειροκίνητη Παρέμβαση.....	85
5.1.8 Ενισχυμένη Ανατροφοδότηση LCD.....	86
5.1.9 Βελτιωμένη Διαχείριση Κατάστασης.....	87
5.1.10 Βελτιστοποιημένη Σειριακή Επικοινωνία.....	87
5.1.11 Συναρτήσεις Επαναφοράς.....	88
5.1.12 Εισαγωγή Φυσικού Διακόπτη.....	88
5.1.13 Μεθοδικές Καθυστερήσεις και Διαχείριση Buffer.....	88
5.1.14 Συνοπτική Επισκόπηση και Συμπεράσματα.....	89
5.2 Κώδικας GUI.....	90
5.1.2 Επεξήγηση Διάταξης της Γραφικής Διεπαφής Χρήστη (GUI).....	90
5.2.2 Διαμόρφωση Σειριακής Επικοινωνίας.....	90
5.2.3 Εμπλουτισμένη Ενότητα Εισαγωγής Χρήστη για τις πειραματικές Παραμέτρους.....	91
5.2.4 Ενισχυμένοι Μηχανισμοί Ελέγχου.....	93
5.2.5 Διευρυμένη Ενότητα Ανθεκτικής Εξαίρεσης Σφαλμάτων και Χαρακτηριστικών Ασφαλείας.....	93
5.2.6 Ενημερώσεις Κατάστασης σε πραγματικό χρόνο.....	94
5.2.7 Μετάβαση από Java σε Python για την υλοποίηση του GUI.....	95
5.2.8 Περιεκτική Στρατηγική Διάθεσης (Comprehensive Deployment Strategy).....	96
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	
6. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ.....	97
6.1 Κυτταρικές Καλλιέργειες.....	97
6.1.1 Απόψυξη κυτταρικής σειράς A431.....	97
6.1.2 Ανακαλλιέργεια κυτταρικής σειράς.....	99
6.1.3 Μεθοδολογία μέτρησης αριθμού κυττάρων.....	100
6.1.4 Έλεγχος τοξικότητας της κουρκουμίνης στην κυτταρική σειρά A431...101	101
6.1.5 Πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας κυττάρων – βιοχημικός έλεγχος ΜΤΤ.....	102
6.2 Φωτοφυσικές μελέτες κουρκουμίνης.....	103
6.2.1 Μεθοδολογία μελέτης απορρόφησης σε DMSO.....	103

6.2.2 Μεθοδολογία μελέτης της ικανότητας παραγωγής ελεύθερων ριζών με χρήση NADH.....	104
---	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	106
---------------------------------------	-----

7.1 Συγκριτική μελέτη ικανότητας παραγωγής ελεύθερων ριζών των διαλυμάτων της κουρκουμίνης σε συνθήκες συνεχούς και παλμικής ακτινοβολήσης.....	106
---	-----

7.1.1 Αποτελέσματα.....	107
-------------------------	-----

7.1.2 Συμπεράσματα.....	113
-------------------------	-----

7.2 Συγκριτική μελέτη της επαγόμενης στα κύτταρα A431 τοξικότητας από την κουρκουμίνη.....	116
--	-----

7.2.1 Αποτελέσματα.....	116
-------------------------	-----

7.2.2 Συμπεράσματα.....	117
-------------------------	-----

7.3 Εφαρμογή συνεχούς και παλμικής φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα A431 με τη χρήση της κουρκουμίνης ως φωτοευαίσθητη ουσία.....	117
--	-----

7.3.1 Αποτελέσματα.....	118
-------------------------	-----

7.3.2 Συμπεράσματα.....	119
-------------------------	-----

7.4 Γενικά Συμπεράσματα.....	120
------------------------------	-----

7.5 Μελλοντικές Προοπτικές.....	120
---------------------------------	-----

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	122
----------------	-----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	151
-------------------	-----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	158
---------------------------	-----

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

<i>Εικόνα 1:</i> Διαδικασία φωτοδυναμικής θεραπείας.....	22
<i>Εικόνα 2:</i> Διάγραμμα Jablonski.....	25
<i>Εικόνα 3:</i> Μηχανισμοί δράσης κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία.....	30
<i>Εικόνα 4:</i> Τρόποι κυτταρικού θανάτου.....	32
<i>Εικόνα 5:</i> Μοριακή δομή της Photofrin.....	40
<i>Εικόνα 6:</i> Φάσμα απορρόφησης φωτοευαίσθητοποιητών στην ορατή περιοχή: Photofrin (PF at 630 nm), chlorin (Ce6 at 650 nm), BPD (at 690 nm), and CASPc (at 675 nm).....	41
<i>Εικόνα 7:</i> Δομή της πορφυρίνης.....	42
<i>Εικόνα 8:</i> Υδροφιλικά και υδροφοβικά φάρμακα στα λιποσώματα.....	45
<i>Εικόνα 9:</i> Η ρίζα του φυτού κourkouμά και η ουσία κourkouμίνη.....	46
<i>Εικόνα 10:</i> Χημική δομή των κourkouμινειδών.....	47
<i>Εικόνα 11:</i> Εφαρμογή CW Φωτοδυναμικής Θεραπείας για την ακμή, το πριν και το μετά.....	50
<i>Εικόνα 12:</i> Παλμοί laser.....	57
<i>Εικόνα 13:</i> Σύγκριση συνεχούς και παλμικής ακτινοβολίας στη φωτοδυναμική θεραπεία.....	60
<i>Εικόνα 14:</i> Φασματοφωτόμετρο Perkin – Elmer Lambda 35 UV/VIS.....	62
<i>Εικόνα 15:</i> Οπτικό διάγραμμα οργάνου και πορεία δέσμης φωτός.....	62
<i>Εικόνα 16:</i> Υποδοχείς του φασματοφωτόμετρου για τις κυβέτες.....	64
<i>Εικόνα 17:</i> Πηγή ακτινοβολίας.....	65
<i>Εικόνα 18:</i> Block diagram διάταξης ακτινοβολίας.....	66
<i>Εικόνα 19:</i> Διάταξη ακτινοβολίας.....	66
<i>Εικόνα 20:</i> Ψηφιακό θερμόμετρο.....	68
<i>Εικόνα 21:</i> Laser power meter.....	68
<i>Εικόνα 22:</i> Κυκλωματική αναπαράσταση του ενισχυτή διαγωγιμότητας.....	71
<i>Εικόνα 23:</i> Ενδιάμεσο κύκλωμα.....	76
<i>Εικόνα 24:</i> Χημική δομή DMSO.....	77

<i>Εικόνα 25:</i> Χημική δομή NAD ⁺ και NADH και σχηματισμός NADH από NAD ⁺ και αντίστροφα.....	78
<i>Εικόνα 26:</i> Απορρόφηση NAD ⁺ και NADH αναφορικά με το μήκος κύματος.....	79
<i>Εικόνα 27:</i> Χημική δομή EDTA.....	80
<i>Εικόνα 28:</i> Χημική δομή ισοπροπανόλης.....	81
<i>Εικόνα 29:</i> Real time ενημέρωση πειραματικής εξέλιξης μέσω της LCD οθόνης.....	86
<i>Εικόνα 30:</i> Κεντρικό παράθυρο GUI.....	92
<i>Εικόνα 31:</i> Real time ενημέρωση της εξέλιξης της πειραματικής διαδικασίας.....	95
<i>Εικόνα 32:</i> Κυτταρική σειρά A431.....	98
<i>Εικόνα 33:</i> Πλακίδιο Neubauer.....	100
<i>Εικόνα 34:</i> Χημική δομή του MTT και των κρυστάλλων Formazan του MTT.....	102

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

<i>Διάγραμμα 1:</i> Κατανομή ακτινοβολίας της πηγής στα διάφορα μήκη κύματος.....	67
<i>Διάγραμμα 2:</i> Φάσμα απορρόφησης συνεχούς ακτινοβολίας στους 26 °C.....	107
<i>Διάγραμμα 3:</i> Φάσμα απορρόφησης συνεχούς ακτινοβολίας στους 28 °C.....	107
<i>Διάγραμμα 4:</i> Φάσμα απορρόφησης συνεχούς ακτινοβολίας στους 37 °C.....	108
<i>Διάγραμμα 5:</i> Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολίας (1 min on/1 min off) στους 26 °C.....	108
<i>Διάγραμμα 6:</i> Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολίας (1 min on/1 min off) στους 28 °C.....	109
<i>Διάγραμμα 7:</i> Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολίας (1 min on/1 min off) στους 37 °C.....	109
<i>Διάγραμμα 8:</i> Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολίας (2,5 min on/2,5 min off) στους 26 °C.....	110
<i>Διάγραμμα 9:</i> Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολίας (2,5 min on/2,5 min off) στους 28 °C.....	110
<i>Διάγραμμα 10:</i> Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολίας (2,5 min on/2,5 min off) στους 37 °C.....	111
<i>Διάγραμμα 11:</i> Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολίας (1 min on/5 min off) στους 26 °C.....	111
<i>Διάγραμμα 12:</i> Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολίας (1 min on/5 min off) στους 28 °C.....	112
<i>Διάγραμμα 13:</i> Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολίας (1 min on/5 min off) στους 26 °C.....	112
<i>Διάγραμμα 14:</i> Λόγοι αθροισμάτων σχετικής απορρόφησης συναρτήσει του dark interval.....	115
<i>Διάγραμμα 15:</i> Βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων αναφορικά με τη συγκέντρωση της κουρκουμίνης.....	116
<i>Διάγραμμα 16:</i> Βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων αναφορικά με το σχήμα ακτινοβολίας.....	118

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

<i>Πίνακας 1:</i> Χαρακτηριστικά Laser Power meter 3A-FS.....	69
<i>Πίνακας 2:</i> Κατανάλωση για διάφορες τιμές του ρεύματος.....	73
<i>Πίνακας 3:</i> Συνοπτική παρουσίαση των παραμέτρων για τη δημιουργία του μητρικού διαλύματος.....	103
<i>Πίνακας 4:</i> Συγκεντρώσεις των ουσιών που περιέχονται στο προς ακτινοβολήση διάλυμα.....	105
<i>Πίνακας 5:</i> Αθροίσματα σχετικής απορρόφησης δειγμάτων αναφοράς και εξέτασης για τη συνεχή ακτινοβολήση.....	113
<i>Πίνακας 6:</i> Αθροίσματα σχετικής απορρόφησης δειγμάτων αναφοράς και εξέτασης για την παλμική ακτινοβολήση (1 min on/1 min off).....	113
<i>Πίνακας 7:</i> Αθροίσματα σχετικής απορρόφησης δειγμάτων αναφοράς και εξέτασης για την παλμική ακτινοβολήση (2,5 min on/2,5 min off).....	113
<i>Πίνακας 8:</i> Αθροίσματα σχετικής απορρόφησης δειγμάτων αναφοράς και εξέτασης για την παλμική ακτινοβολήση (1 min on/5 min off).....	115
<i>Πίνακας 9:</i> Λόγος αθροισμάτων σχετικής απορρόφησης δειγμάτων.....	115
<i>Πίνακας 10:</i> p-value των δεδομένων ανά θερμοκρασία.....	115
<i>Πίνακας 11:</i> Τιμές απορρόφησης καρκινικών κυττάρων αναφορικά με τη συγκέντρωση κουρκουμίνης.....	117
<i>Πίνακας 12:</i> Τιμές απορρόφησης καρκινικών κυττάρων αναφορικά με το σχήμα ακτινοβολήσης.....	118
<i>Πίνακας 13:</i> p-values των αποτελεσμάτων των σχημάτων ακτινοβολήσης ανά δύο.....	119

ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

1.1 Ιστορική Αναδρομή

Η χρήση του φωτός για την αντιμετώπιση και την θεραπεία ασθενειών όπως η ψωρίαση, η λεύκη, και ο καρκίνος, είναι μια πρακτική που αναγνωρίζεται από την αρχαιότητα και συνεχίζεται μέχρι και σήμερα. Οι άνθρωποι έχουν αξιοποιήσει το φως του ήλιου ως θεραπευτικό μέσο για την ανακούφιση και την αντιμετώπιση δερματικών παθήσεων [1].

Στις αρχές του 20ού αιώνα, η φωτοθεραπεία επανήλθε στο προσκήνιο, χάρη στις έρευνες των Niels Finzen, Oscar Raab, και Herman von Tarpeiner [2]. Ο Oscar Raab, τη δεκαετία του 1890, ανακάλυψε ότι η χρήση φωτοευαίσθητης ουσίας σε συνδυασμό με φως μπορούσε να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο, ενώ η συνεργασία του με τον Herman von Tarpeiner οδήγησε στην ανακάλυψη ότι η ακριδίνη ήταν μια φωτοευαίσθητη ουσία [3]. Το 1903, ο Herman von Tarpeiner χρησιμοποίησε εωσίνη παρουσία φωτός για τη θεραπεία του καρκίνου του δέρματος [3].

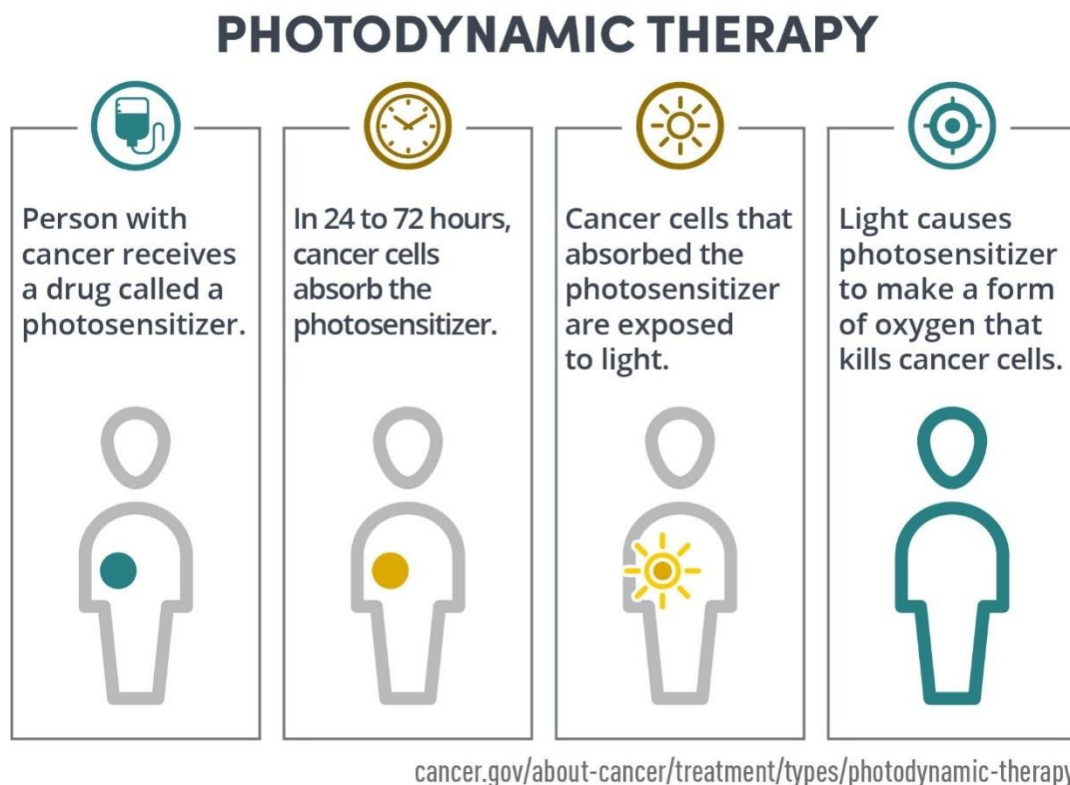
Ένα σημαντικό βήμα για την εξέλιξη της φωτοδυναμικής θεραπείας έγινε το 1913, όταν ο Γερμανός Meyer-Betz πραγματοποίησε πειράματα στον εαυτό του, χορηγώντας αιματοπορφυρίνη και εκθέτοντας το δέρμα του στην ακτινοβολία του ήλιου [4].

Από το 1960 και μετά, η φωτοδυναμική θεραπεία αναπτύχθηκε περαιτέρω, χρησιμοποιώντας παράγωγα πορφυρίνης ως φάρμακα φωτοευαισθητοποίησης [5]. Μελέτες των δεκαετιών 1950 και 1960 έδειξαν τα θετικά αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας σε καρκινικούς όγκους, χρησιμοποιώντας πορφυρίνες ως φωτοευαισθητοποιητές [5].

Έχουν περάσει πάνω από 30 χρόνια από την πρώτη χρήση της φωτοδυναμικής θεραπείας και η μέθοδος έχει εφαρμοστεί σε χιλιάδες ανθρώπους, με τον ετήσιο αριθμό των επιστημονικών άρθρων που την αφορούν να αυξάνεται σταθερά [5]. Η αναζήτηση για μια νέα γενιά φωτοευαισθητοποιητών βρίσκεται σε εξέλιξη, με τον στόχο τη βελτίωση του βάθους διείσδυσης, της επιλεκτικότητας στον όγκο και της μείωσης της φωτοευαισθησίας [6].

1.2 Εισαγωγή στη φωτοδυναμική θεραπεία (Photodynamic Therapy, PDT)

Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) είναι μια κλινικά εγκεκριμένη και ελάχιστα επεμβατική θεραπεία για ορισμένες μορφές καρκίνου όπως και για άλλες μη νεοπλασματικές ασθένειες, μέσω της οποίας δίνεται η δυνατότητα να ασκηθεί επιλεκτική κυτταροτοξική δράση έναντι κακοήθων κυττάρων. Η διαδικασία περιλαμβάνει την χρήση του οξυγόνου, την χορήγηση μιας φωτοευαίσθητης ουσίας που καλείται φωτοευαίσθητοποιητής και εν συνεχεία την ακτινοβολήση από μια πηγή που εκπέμπει μήκος κύματος αντίστοιχο της ζώνης απορρόφησης του φωτοευαίσθητου παράγοντα, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 1* [7]. Ο φωτοευαίσθητοποιητής είναι αδρανής στο σκοτάδι και κατόπιν της χορήγησής του, η οποία συνήθως πραγματοποιείται παρακεντρικά και ενδοφλεβίως, η πάσχουσα περιοχή εκτίθεται στο φως και ο φωτοευαίσθητοποιητής ενεργοποιείται. Παρουσία οξυγόνου, μια σειρά από φωτοχημικές αντιδράσεις οδηγούν στην καταστροφή του καρκινικού όγκου και σε βλάβη του μικροαγγειακού δικτύου, ως αποτέλεσμα της παραγωγής ελεύθερων ριζών τοπικά στα πάσχοντα κύτταρα, ενώ ταυτόχρονα επάγεται και μια τοπική φλεγμονώδης δράση. Πιο συγκεκριμένα, ο θάνατος των καρκινικών κυττάρων μπορεί να προκληθεί με νέκρωση, δηλαδή άμεση καταστροφή του κακοήθους όγκου, με απόπτωση, με αυτοφαγία ή με καταστροφή του μικροαγγειακού δικτύου που προκαλεί την διακοπή της ροής του αίματος, επομένως και του οξυγόνου, σε αυτά [8],[9].



Εικόνα 1: Διαδικασία φωτοδυναμικής θεραπείας ^[1]

Η επιτυχία της διαδικασίας εξαρτάται από την ακριβή στόχευση του φωτός, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της χρήσης σύγχρονων οπτικών ινών και κατάλληλων οπτικών συστημάτων [14],[16]. Έχει αποδειχθεί μέσα από κλινικές μελέτες πως η φωτοδυναμική θεραπεία εμφανίζει θετικά θεραπευτικά αποτελέσματα σε καρκινικούς όγκους που βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο, όπως και πως προσφέρει τη δυνατότητα να βελτιώσει και παρατείνει τη ζωή καρκινοπαθών που πάσχουν από μορφές καρκινικών όγκων που καθιστούν εξαιρετικά δύσκολη ή αδύνατη την χειρουργική τους αφαίρεση [13]. Επιπλέον, λόγω της φθορίζουσας ικανότητας των φωτοευαισθητοποιητών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την απεικόνιση των καρκινικών κυττάρων, παρέχοντας έτσι σημαντική βοήθεια στη διάγνωση και τον σχεδιασμό της θεραπείας [15].

Η ελάχιστη τοξικότητα στους υγιείς ιστούς, η διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας των οργάνων, η μειωμένη μακροχρόνια νοσηρότητα και οι αμελητέες συστημικές επιδράσεις σε συνδυασμό με τα ικανοποιητικά αισθητικά της αποτελέσματα, καθιστούν τη φωτοδυναμική θεραπεία μια εξαιρετική επιλογή, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες, όπως η χημειοθεραπεία. Η εξέλιξη στον τομέα της τεχνολογίας δίνει στην φωτοδυναμική θεραπεία προοπτικές να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην μάχη κατά του καρκίνου [18].

Τρεις είναι οι σημαντικοί παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η φωτοδυναμική θεραπεία:

1. Η φωτοευαίσθητη ουσία ή αλλιώς φωτοευαισθητοποιητής, που είναι μια ουσία που έχει τη δυνατότητα να απορροφά φως και να προκαλεί φωτοχημικές και φωτοφυσικές αντιδράσεις.
2. Η φωτεινή ακτινοβολία και
3. Το οξυγόνο

Οι παράγοντες αυτοί δεν είναι από μόνοι τους τοξικοί. Παρόλα αυτά ο συνδυασμός τους οδηγεί στην ενεργοποίηση μιας σειράς φωτοχημικών αντιδράσεων που καταλήγουν στη σύνθεση ελεύθερων ριζών ή/και ενός προϊόντος πολύ δραστικού, το οποίο δεν είναι άλλο από ένα μόριο οξυγόνου στη μονήρη κατάσταση (singlet oxygen O_2). Αξίζει να σημειωθεί ότι το οξυγόνο τις περισσότερες φορές συναντάται στην τριπλή κατάσταση (triplet oxygen O_2), μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Το οξυγόνο στη μονήρη κατάσταση είναι λιγότερο σταθερό από το οξυγόνο στην τριπλή κατάσταση, έχει πολύ μικρό χρόνο ζωής (<0.04 μs), συμμετέχει σε πολύ περισσότερες χημικές αντιδράσεις και ως αποτέλεσμα χρησιμοποιείται σε ποικίλες ιατρικές εφαρμογές. Το συγκεκριμένο προϊόν, αλλά και οι ελεύθερες ρίζες γενικότερα, μπορούν να προκαλέσουν σημαντική τοξικότητα η οποία οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης. Σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι το βιολογικό αποτέλεσμα της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι φωτοχημικό και όχι θερμικό. Αυτό σημαίνει ότι κατά τη διάρκεια εφαρμογής της αλλά και έπειτα από αυτή, η βλάβη στα συστατικά στοιχεία των συνδεδετικών ιστών (όπως το κολλαγόνο και η ελαστίνη) είναι μικρή [9].

Οι αντικαρκινικές επιδράσεις της φωτοδυναμικής θεραπείας προέρχονται από τρεις αλληλένδετους μηχανισμούς – απευθείας κυτταροτοξικές αντιδράσεις πάνω στα κύτταρα του όγκου, άμεση δράση επί των αγγείων των όγκων και διέγερση μιας ισχυρής φλεγμονώδους αντίδρασης, η οποία μπορεί να καταλήξει στην ανάπτυξη συστημικής ανοσίας. Κατόπιν της επιλεκτικής ακτινοβολήσης του όγκου και των υγιών ορίων αυτού, η ουσία αποβάλλεται σταδιακά από όλους τους ιστούς ενώ ο όγκος αρχίζει να συρρικνώνεται. Ο όγκος καταστρέφεται γρήγορα και κάθε πιθανή βλάβη στους υγιείς ιστούς θεραπεύεται μέσα στις επόμενες 6-8 εβδομάδες [10].

Η συνεισφορά του κάθε μηχανισμού εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τον τύπο και την ποσότητα του φωτοευαισθητοποιητή που χορηγείται στον ασθενή, από το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη στιγμή χορήγησης του φωτοευαισθητοποιητή σε αυτόν και την έκθεση του στη φωτεινή ακτινοβολία, από την ποσότητα του φωτός στο οποίο εκτίθεται, από τη συγκέντρωση του οξυγόνου στον όγκο και πιθανόν και από διάφορες άλλες παραμέτρους που δεν έχουν μελετηθεί σε επιστημονικό επίπεδο μέχρι σήμερα. Ως αποτέλεσμα, ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών για την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι έργο διεπιστημονικού επιπέδου [12].

1.3 Απορρόφηση του φωτός

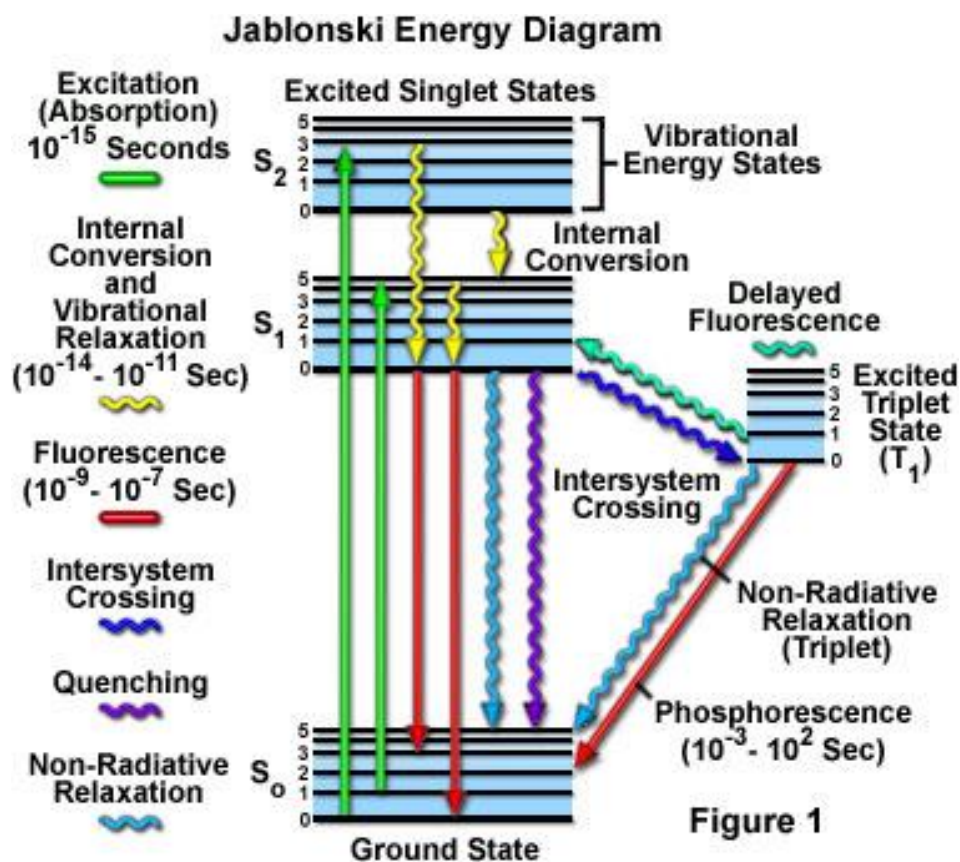
Η απορρόφηση ενέργειας από ένα μόριο πραγματοποιείται μεταξύ των κοντινών δονητικών και περιστροφικών ενεργειακών επιπέδων των διεγερμένων καταστάσεων σε διαφορετικά μοριακά τροχιακά και είναι μια κρίσιμη διαδικασία σε πολλά βιολογικά και χημικά φαινόμενα. Τα μόρια που έχουν την ικανότητα να απορροφούν μήκη κύματος του ορατού φωτός, αλλά και της υπεριώδους και υπέρυθρης περιοχής, ονομάζονται χρωμοφόρα [10]. Η διαδικασία αυτή παίζει θεμελιώδη ρόλο στην ενεργοποίηση διαφόρων μοριακών μηχανισμών και στην πρόκληση βιοχημικών αντιδράσεων.

Τα μόρια διαθέτουν συγκεκριμένα ενεργειακά επίπεδα, και η μετάβαση ενός μορίου από μια χαμηλότερη σε μια υψηλότερη ενεργειακή στάθμη πραγματοποιείται μέσω της απορρόφησης κβάντων φωτεινής ακτινοβολίας [10]. Αυτή η διαδικασία είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένη και απαιτεί την απορρόφηση ακτινοβολίας συγκεκριμένης ενέργειας από συγκεκριμένες χημικές δομές.

Μετά την απορρόφηση ενός φωτονίου, το μόριο μεταβαίνει σε μια διεγερμένη κατάσταση. Η ενέργεια που προσλαμβάνεται καταλήγει στις δονητικές και περιστροφικές καταστάσεις του μορίου, και το μόριο μπορεί να επιστρέψει στη βασική του στάθμη μέσω διαφόρων μηχανισμών [7],[10].

Η απορρόφηση του φωτός από τα χρωμοφόρα μόρια ενεργοποιεί φωτοχημικές αντιδράσεις, οι οποίες είναι βασικές για πολλές βιολογικές διεργασίες και έχουν εφαρμογές στη φωτοδυναμική θεραπεία και άλλες ιατρικές τεχνικές. Η κατανόηση αυτών των διεργασιών είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων [8],[9].

Οι πιθανές πορείες διέγερσης και αποδιέγερσης ενός μορίου φαίνονται στην *Εικόνα 2*.



Εικόνα 2: Διάγραμμα Jablonski [2]

Παρακάτω περιγράφεται αναλυτικά ο κάθε μηχανισμός που επιτρέπει στο μόριο να επιστρέψει στη βασική του στάθμη.

1.3.1 Εσωτερική μετατροπή

Αναφέρεται στην μετάβαση του μορίου από τη διεγερμένη κατάσταση σε χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση [19][20]. Δεν πραγματοποιείται εκπομπή ακτινοβολίας, αλλά η ενέργεια χάνεται μέσω δονητικής αποδιέγερσης.

Αυτή η διαδικασία είναι σημαντική διότι διασφαλίζει την ενεργειακή σταθερότητα του μορίου, μετατρέποντας την περίσσεια της ενέργειας σε δονητική κίνηση. Η ενέργεια που απελευθερώνεται κατά τη διαδικασία αυτή μπορεί να διοχετευθεί σε άλλες μοριακές διαδικασίες ή να διαχειριστεί από το μόριο, αποτρέποντας έτσι πιθανές βλαβερές αντιδράσεις που θα μπορούσαν να προκύψουν από την υπερβολική διέγερση [19].

1.3.2 Εσωτερική μετάπτωση $S^* \rightarrow T^*$

Κατά την εσωτερική μετάπτωση $S^* \rightarrow T^*$, το διεγερμένο ηλεκτρόνιο μπορεί να μεταβεί από τη μονήρη διεγερμένη (S^*) στην πρώτη διεγερμένη τριπλή στάθμη (T^*). Για να μπορούν να γίνουν οι μεταβάσεις αυτές, θα πρέπει ή να προσφέρουμε ενέργεια ή το ηλεκτρόνιο να είναι ανάμεσα σε ισοενεργειακά επίπεδα. Η μετάβαση από τη βασική μονήρη στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση είναι σχεδόν απίθανη. Αντίθετα, η μετάπτωση από τη μονήρη διεγερμένη στην τριπλή διεγερμένη στάθμη είναι περισσότερο πιθανή, αφού η ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της T^* είναι μικρότερη αυτής της S^* . Στη συνέχεια, το μόριο μπορεί να επανέλθει άμεσα στη βασική μονήρη κατάσταση (S_0), αφού η επιστροφή μέσω της S^* στη βασική προϋποθέτει την πρόσληψη ενέργειας από το περιβάλλον (περίπτωση καθυστερημένου φθορισμού). Η άμεση επιστροφή στη βασική κατάσταση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας είτε με εκπομπή ακτινοβολίας. Εφόσον η πιθανότητα αντίστροφης μετάβασης από τη διεγερμένη τριπλή στη διεγερμένη μονήρη στάθμη είναι μικρή, η διεγερμένη τριπλή στάθμη είναι συνήθως μεγάλης διάρκειας ζωής (της τάξης των msec). Επίσης, η σχετικά μεγάλη παραμονή των μορίων σε αυτή την κατάσταση τα καθιστά πιο επιρρεπή σε διαδικασίες αποδιέγερσης χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας [20].

1.3.3 Φθορισμός

Η εκπομπή φθορισμού αφορά πάντα μεταπτώσεις προς χαμηλότερα ενεργειακά επίπεδα. Το μόριο καταλήγει σε ένα δονητικό επίπεδο της βασικής μονήρους κατάστασης (S_0) από τη βασική στάθμη της μονήρους διεγερμένης στάθμης (S^*), εκπέμποντας ένα φωτόνιο. Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ της διεγερμένης και του δονητικού επιπέδου της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης είναι αυτή που καθορίζει το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Ο φθορισμός διαρκεί μερικά nsec. Στη συνέχεια, μέσω απόσβεσης και χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας, το μόριο επιστρέφει στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της βασικής κατάστασης. Λόγω της απώλειας ενέργειας κατά την παραμονή του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, η εκπεμπόμενη ενέργεια (φθορισμός) είναι μεγαλύτερου μήκους κύματος σε σχέση με την απορροφηθείσα ενέργεια. Οι διαφορετικές πιθανές μεταβάσεις από την μονήρη διεγερμένη κατάσταση στα διάφορα δονητικά επίπεδα της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης εκφράζονται μέσω του φάσματος φθορισμού. Η σχετική πιθανότητα να συμβεί κάποια από τις πιθανές διαδρομές διαφέρει από μόριο σε μόριο και εξαρτάται από τη δομή του αλλά και από το τοπικό του περιβάλλον [1],[20].

1.3.4 Καθυστερημένος φθορισμός

Το μόριο έχει τη δυνατότητα να επιστρέψει έμμεσα από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση (T^*) στην οποία βρίσκεται στη βασική μονήρη κατάσταση S_0 διαμέσου της S^* . Για να πραγματοποιηθεί η μετάβαση από την τριπλή διεγερμένη στη μονήρη διεγερμένη είναι απαραίτητο να προσληφθεί ενέργεια από το περιβάλλον. Το μόριο θα μεταβεί από την S^* στην S_0 εκπέμποντας φωτεινή ενέργεια που ισοδυναμεί με την ενεργειακή διαφορά των δύο αυτών σταθμών. Η παραπάνω διαδικασία καλείται καθυστερημένος φθορισμός λόγω του ότι παρατηρείται σε μεγαλύτερους χρόνους από αυτούς του φθορισμού [1],[20].

1.3.5 Φωσφορισμός

Ο φωσφορισμός αναφέρεται στην άμεση επιστροφή του μορίου από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση (T^*) στη βασική μονήρη κατάσταση (S_0) με την εκπομπή φωτεινής ακτινοβολίας. Η διαδικασία αυτή είναι παρόμοια με τον φθορισμό, αλλά διαφέρει στο ότι αφορά την τριπλή διεγερμένη κατάσταση αντί της μονήρους. Ο φωσφορισμός μπορεί να έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής σε σχέση με τον φθορισμό, καθώς οι τριπλές καταστάσεις έχουν συνήθως μεγαλύτερες διάρκειες ζωής [1],[20].

1.3.6 Μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού

Μέσω μιας σύζευξης διπόλου-διπόλου μεταξύ των μορίων μπορεί να μεταφερθεί ενέργεια σε ένα άλλο μόριο χωρίς να υπάρξει επαφή. Παρόλης της μείωσης της σύζευξης (η μείωση είναι ανάλογη της έκτης δύναμης της απόστασης ανάμεσα στα μόρια) στα βιολογικά συστήματα είναι εφικτή η ικανοποιητική μεταφορά ενέργειας για αποστάσεις μέχρι και 5nm. Το μόριο που θα δεχτεί την ενέργεια πρέπει να έχει και κατάλληλη ενεργειακή δομή [20].

1.3.7 Μεταφορά ενέργειας μέσω κρούσεων

Συμβαίνει όταν ένα μόριο που έχει διεγερθεί συγκρούεται με ένα άλλο μόριο το οποίο βρίσκεται σε χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο. Η ενέργεια μεταφέρεται από το διεγερμένο μόριο σε αυτό που βρίσκεται σε χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας. Η διαδικασία είναι γνωστή ως απόσβεση φθορισμού και είναι σημαντικός μηχανισμός για τον έλεγχο της φωτοχημικής δραστηριότητας στα μόρια, καθώς και για την προστασία της από πιθανές βλάβες λόγω υπερβολικής διέγερσης [20].

1.3.8 Φωτοχημική Αντίδραση

Η ενέργεια μπορεί μέσω χημικής αντίδρασης να επάγει τη δημιουργία της νέου είδους μορίου. Η ενέργεια καταναλώνεται κατά τη δημιουργία αυτών των ενώσεων, που έχουν διαφορετικές ιδιότητες φθορισμού από της αρχικές [20].

1.3.9 Δονητική αποδιέγερση

Η δονητική αποδιέγερση είναι μια διαδικασία όπου ένα μόριο μεταβαίνει από ένα υψηλότερο δονητικό επίπεδο σε ένα χαμηλότερο εντός της ενεργειακής κατάστασης, χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας. Αυτή η μετάβαση συμβάλλει στην ενεργειακή σταθεροποίηση του μορίου και συμβαίνει πολύ γρήγορα. Η δονητική αποδιέγερση είναι της κρίσιμος μηχανισμός για την αποτροπή της εκπομπής ακτινοβολίας που θα μπορούσε να προκαλέσει βλάβη στο μόριο ή στο περιβάλλον του [20].

1.4 Μηχανισμοί Φωτοδυναμικής Θεραπείας

1.4.1 Βασικές Αρχές και Μηχανισμοί

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τρία είναι τα βασικά συστατικά για την επιτυχημένη εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας:

- Η φωτοευαίσθητη ουσία (φωτοευαισθητοποιητής)
- Η πηγή ακτινοβολίας
- Το οξυγόνο

Ο φωτοευαισθητοποιητής είναι μια χημική, χρωστική ουσία που έχει την ικανότητα να συγκεντρώνεται επιλεκτικά στους κακοήθεις ιστούς και ενεργοποιείται έπειτα από ακτινοβολία με χρήση εξωτερικού φωτός. Ο διεγερμένος φωτοευαισθητοποιητής μεταφέρει ενέργεια σε μόρια οξυγόνου δημιουργώντας δραστικά είδη οξυγόνου (ROS), τα οποία προκαλούν βλάβες στα βιολογικά μόρια. Ακολούθως, επέρχεται βλάβη και θάνατος των νεοπλασματικών κυττάρων [24]. Αυξημένος σχηματισμός ROS μπορεί να προκύψει λόγω αυξημένης οξυγόνωσης κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας, οδηγώντας έτσι σε βελτιωμένα αποτελέσματα [25]. Οι μηχανισμοί σύμφωνα με τους οποίους οι φωτοευαισθητοποιητές εντοπίζονται επιλεκτικά στους πάσχοντες ιστούς είναι πολύπλοκοι. Αρκετοί από αυτούς είναι πιθανόν να συμβάλλουν στη συσσώρευση τους στους όγκους όπως, για παράδειγμα η αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και η κακή λεμφική παροχή στα σημεία, σε συνδυασμό με την συγγένεια για τον πολλαπλασιασμό του ενδοθηλίου.

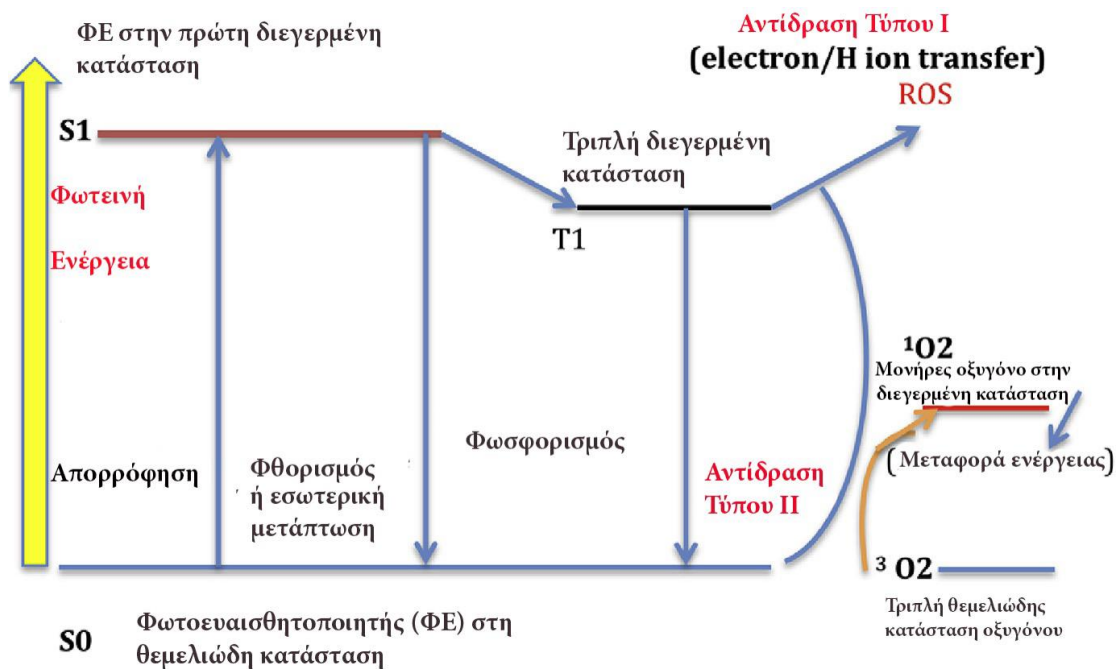
Οι τρόποι με τους οποίους οι ROS βοηθούν την καταστροφή των καρκινικών όγκων με φωτοδυναμική θεραπεία είναι η άμεση κυτταρική βλάβη, η έμμεση αγγειακή διακοπή και η ενεργοποίηση ανοσοαποκρίσεων.

Η άμεση βλάβη του πάσχοντος ιστού μπορεί να οδηγήσει είτε σε προγραμματισμένο μηχανισμό θανάτου, όπως η απόπτωση, είτε σε μη προγραμματισμένο, όπως η νέκρωση.

1.4.2 Φωτοφυσική και Φωτοχημεία

Ένας φωτοευαισθητοποιητής στην θεμελιώδη κατάσταση έχει δύο ηλεκτρόνια με αντιπαράλληλα spin στο χαμηλής ενέργειας μοριακό τροχιακό. Μετά την απορρόφηση των φωτονίων της φωτεινής ακτινοβολίας, ένα από τα δύο αυτά ηλεκτρόνια μεταπηδά σε τροχιακό υψηλότερης ενέργειας ενώ όμως διατηρεί το spin του (1η διεγερμένη κατάσταση S1). Αυτή είναι μια κατάσταση με μικρό χρόνο ζωής (της τάξης των nanosecond) και μπορεί να χάσει την ενέργειά της μέσω εκπομπής φωτεινής ακτινοβολίας (φθορισμός) ή μέσω εσωτερικής μετατροπής σε θερμότητα. Ο φωτοευαισθητοποιητής στην 1η διεγερμένη κατάσταση ενδέχεται επίσης να υποστεί μια διαδικασία κατά την οποία το spin του διεγερμένου ηλεκτρονίου αντιστρέφεται για να σχηματίσει την σχετικά μεγάλης διάρκειας ζωής (της τάξης των microsecond) διεγερμένη τριπλή κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται από δύο ηλεκτρόνια με παράλληλα spin. Ο μεγαλύτερος χρόνος ζωής της τριπλής αυτής κατάστασης επιτρέπει την αλληλεπίδραση του διεγερμένου φωτοευαισθητοποιητή με τα γειτονικά μόρια και είναι αποδεκτό ότι η επαγωγή των τοξικών προϊόντων που παράγονται κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία πραγματοποιείται ενώ ο φωτοευαισθητοποιητής βρίσκεται σε αυτή την κατάσταση.

Η ενεργοποιημένη φωτοευαίσθητη ουσία στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση μπορεί να επάγει χημικές αλλοιώσεις σε γειτονικά μόρια μέσω δύο οδών που είναι γνωστές ως φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου I και II. Με άλλα λόγια, ο φωτοευαισθητοποιητής αλληλοεπιδρά με τα περιβάλλοντα μόρια στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση και παράγει μέσω αυτών των αντιδράσεων δραστικά είδη οξυγόνου (ROS). Οι αντιδράσεις τύπου I και II γίνεται να παρουσιαστούν ταυτόχρονα και ο ρόλος που διαδραματίζουν στον θάνατο των κυττάρων εξαρτάται από συνιστώσες όπως οι φωτοευαισθητοποιητές, η ενδοκυτταρική κατανομή, το υπόστρωμα και η παρουσία οξυγόνου [21].



Εικόνα 3: Μηχανισμοί δράσης κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία [3]

Αντιδράσεις τύπου I

Οι αντιδράσεις αυτού του τύπου περιλαμβάνουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το διεγερμένο μόριο του φωτοευαισθητοποιητή προς την κυτταρική μεμβράνη ή το μόριο του υποστρώματος, σχηματίζοντας έτσι ελεύθερες ρίζες. Ιοντικές ρίζες καθώς και ρίζες άνευ ηλεκτρικού φορτίου μπορούν να παραχθούν από την αντίδραση μεταξύ φωτοευαισθητοποιητή (στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση) και ενός γειτονικού μορίου (στην βασική κατάσταση).

Οι περισσότερες ρίζες που παράγονται μέσω αυτής της αντίδρασης αλληλεπιδρούν με το μοριακό οξυγόνο και παράγουν ένα μείγμα δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). Χαρακτηριστικά παραδείγματα ROS αποτελούν το ανιόν του υπεροξειδίου (O_2^-) το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υδροξύλιο (OH^-). Το τελευταίο μπορεί να οξειδώσει με πολύ γρήγορους ρυθμούς μεγάλο αριθμό βιομορίων.

Αντιδράσεις τύπου II

Οι φωτοτοξικές αντιδράσεις τύπου II χαρακτηρίζονται από την απ' ευθείας μεταφορά ενέργειας από τη φωτοευαίσθητη ουσία που βρίσκεται στη διεγερμένη τριπλή κατάσταση προς το μοριακό οξυγόνο. Κατά τη μεταφορά ενέργειας σε μια τέτοιου τύπου αντίδραση, σχηματίζεται το πολύ αντιδραστικό μονήρες οξυγόνο (O_2). Ο χρόνος ζωής του τελευταίου είναι πολύ μικρός (~10-320 ns) [23]. Το δραστικό αυτό είδος οξυγόνου είναι πολύ πιο οξειδωτικό από εκείνο στη θεμελιώδη τριπλή κατάσταση και άρα αξιοσημείωτα περισσότερο ηλεκτροφιλικό, αντιδρώντας έτσι γρήγορα με ακόρεστους δεσμούς άνθρακα/άνθρακα, ουδέτερα πυρηνόφιλα όπως σουλφίδια και αμίνες καθώς επίσης και με ανιόντα [21]. Οξειδώνεται λοιπόν γρήγορα με βιομόρια. Η κυτταροτοξικότητα που επάγεται μέσω της φωτοδυναμικής

θεραπείας θεωρείται ότι οφείλεται κυρίως στις αντιδράσεις τύπου II. Το ποσοστό με το οποίο θα συμμετέχουν οι φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου I και II στο τελικό αποτέλεσμα της θεραπείας εξαρτάται από παράγοντες όπως το είδος της φωτοευαίσθητης ουσίας, το είδους του ιστού και των κυττάρων που στοχεύονται, το pH αλλά και η συγκέντρωση του οξυγόνου. Για παράδειγμα, οι αντιδράσεις αυτού του τύπου εμφανίζουν καλύτερα αποτελέσματα σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου και υψηλής συγκέντρωσης υποστρώματος [22].

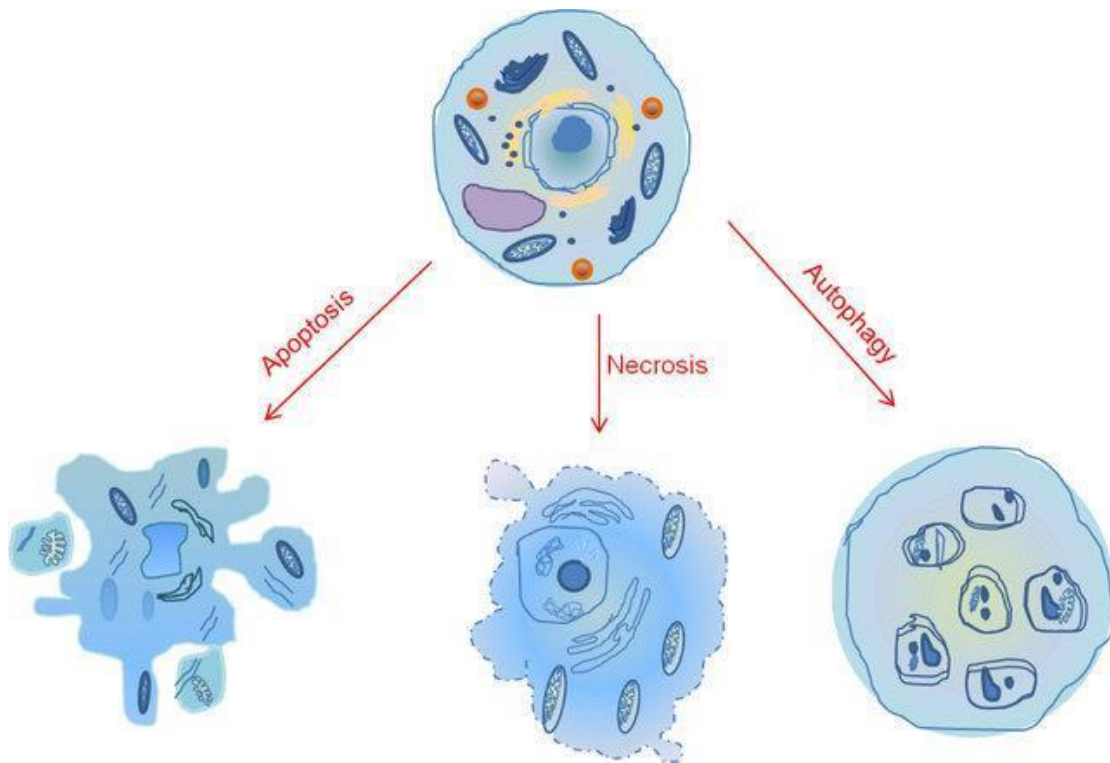
1.4.3 Μηχανισμοί Κυτταρικού Θανάτου

Η φωτοδυναμική θεραπεία έχει την δυνατότητα να προκαλέσει την εκκίνηση αρκετών από σωρεία τρόπων κυτταρικού θανάτου. Αναλυτικότερα, το ίδιο το κύτταρο καθώς και ποικίλα χαρακτηριστικά διαμορφώνουν τον τρόπο με το οποίο θα θανατωθεί καθώς και τον βαθμό κυτταρικού θανάτου του.

Μερικά από αυτά τα κύρια χαρακτηριστικά είναι:

- η συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας
- η συγκέντρωση του οξυγόνου
- το μήκος κύματος και η ένταση της ακτινοβολίας
- φυσικοχημικές ιδιότητες της φωτοευαίσθητης ουσίας
- οι θέσεις που συσσωρεύεται η φωτοευαίσθητη ουσία
- τα χαρακτηριστικά του κάθε είδους κυττάρων

Οι τρεις σημαντικότεροι τρόποι καταστροφής των κυττάρων των θηλαστικών είναι η απόπτωση, η νέκρωση και η αυτοφαγία. Αξίζει, βέβαια, να σημειωθεί ότι υπάρχουν και άλλοι περισσότερο πολύπλοκοι τρόποι, όπως είναι ο μιτωτικός κυτταρικός θάνατος, η πολυπυρήνωση και η προγραμματισμένη νέκρωση [26].



Εικόνα 4: Τρόποι κυτταρικού θανάτου ^[4]

Απόπτωση

Η απόπτωση είναι μια διαδικασία φυσικού κυτταρικού θανάτου πολλών σταδίων η οποία βρίσκεται γενετικά σε κάθε κύτταρο του σώματος των θηλαστικών. Η εκκίνηση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου μπορεί να πραγματοποιηθεί και με χρήση χαμηλής έντασης φωτός. Στόχος της διαδικασίας αυτής είναι ο έλεγχος ανάπτυξης των ιστών του σώματος, η απομάκρυνση ασθενών ή βλαβερών κύτταρων και η διατήρηση της σταθερότητας στο εσωτερικό περιβάλλον. Η εκκίνηση της διαδικασίας μπορεί να προκληθεί από πολλούς παράγοντες που οφείλονται είτε στο εσωτερικό είτε στο εξωτερικό περιβάλλον του κύτταρου. Κάποιοι αποπτωτικοί παράγοντες είναι: οι ιοί, η κόπωση, η ακτινοβολία και η αδυναμία επιδιόρθωσης του DNA [27].

Η διαδικασία αυτή είναι καταστροφική και μη αναστρέψιμη αφού το κύτταρο συμπυκνώνεται και αποδομείται δημιουργώντας αποπτωτικά σώματα τα οποία φαγοκυττώνονται χωρίς να προκληθεί κάποια φλεγμονή. Σε περίπτωση που το σώμα σταματήσει να ελέγχει την απόπτωση τότε ασθενεί. Άρα, η αυτοκαταστροφή του κύτταρου ενεργοποιείται για την σωστή ανάπτυξη του κύτταρου ή για να απομακρυνθούν βλαβερά για τον οργανισμό κύτταρα [28].

Νέκρωση

Η νέκρωση είναι ένας βίαιος και ξαφνικός τρόπος κυτταρικού θανάτου όπου επηρεάζει ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων. Ο συγκεκριμένος τρόπος θανάτου μπορεί να προκληθεί είτε από χημική ή φυσική καταστροφή ή είτε και λόγω ασταθούς επιπέδου θερμοκρασίας και επιφέρει φλεγμονή στον περιβάλλοντα χώρο εξαιτίας της καταστροφής και της απελευθέρωσης υλικού έξω από το κύτταρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο νεκρός ιστός να αφαιρείται μόνο χειρουργικά, αφού η φλεγμονή εμποδίζει τα μακροφάγα να τον εντοπίσουν και να τον φαγοκυττώσουν [26],[29]. Στην περίπτωση όπου δεν υπάρξει χειρουργική επέμβαση τότε υπάρχει πιθανότητα συσσώρευσης αποσυντεθειμένου νεκρού ιστού (γάγγραινα).

Η μελέτη των παραγόντων που έχουν ως αποτέλεσμα την κυτταρική νέκρωση μετά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι δύσκολη σε αντίθεση με την περίπτωση της απόπτωσης. Στους κρίσιμους παράγοντες που οδηγούν στον προσδιορισμό του τύπου του κυτταρικού θανάτου μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία συγκαταλέγονται το είδος των κύτταρων, ο υποκυτταρικός εντοπισμός της φωτοευαίσθητης ουσίας, η μερική πίεση του οξυγόνου και η δόση του φωτός. Για παράδειγμα, αναφορικά με τη δόση του φωτός, οι υψηλές δόσεις ακτινοβολίας επιφέρουν τον κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης, σε αντιδιαστολή με τις χαμηλές δόσεις που έχουν την τάση να εκκινούν την διαδικασία της απόπτωσης [26].

Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός εξόντωσης που σκοπός του είναι να διατηρήσει μια ισορροπία στο κύτταρο και να το αναδομήσει καταστρέφοντας περριτά η ελαττωματικά συστατικά και μέρη του κυττάρου και διατηρώντας στη ζωή το κύτταρο. Η αυτοφαγία χωρίζεται σε τρία είδη: αυτοφαγία, μακροαυτοφαγία και μικροαυτοφαγία και ως εκ τούτου υπάρχει μια πληθώρα από αυτοφαγικούς μηχανισμούς και όλοι περιλαμβάνουν την λυσοσωμική αποδόμηση των κυτταρικών οργανιδίων αλλά και πρωτεϊνών.

Ο πιο διαδεδομένος μηχανισμός ακολουθεί την εξής διαδικασία: Μια δομή διπλής μεμβράνης, γνωστή ως αυτοφαγόσωμα, περικυκλώνει την στοχευμένη περιοχή και δημιουργεί ένα κυστίδιο το οποίο διαχωρίζει τα περιεχόμενά του από τα υπόλοιπα στο κυτταρόπλασμα. Αυτό το κυστίδιο στη συνέχεια μεταφέρεται και συντήκεται με το λυσοσωμα, σχηματίζοντας έτσι μια δομή που ονομάζεται αυτοφαγολυσόσωμα, τα περιεχόμενα του οποίου στη συνέχεια αποδομούνται μέσω των λυσοσωματικών υδρολασών. Η αυτοφαγία ενισχύεται περισσότερο σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

Γενικά, τα κύτταρα των θηλαστικών χρησιμοποιούν το μηχανισμό της αυτοφαγίας σαν άμυνα ενάντια στην καταστροφή που προκαλούν οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ-ROS) καθαρίζοντας το κύτταρο από τα οργανίδια που έχουν υποστεί βλάβη. Ανάλογα με τον τύπο των ΔΜΟ και το βαθμό της οξειδωτικής βλάβης, η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να ενεργοποιήσει την αυτοφαγία και εκείνη με τη σειρά της θα δράσει είτε με έναν κυτταροπροστατευτικό τρόπο είτε θα επάγει τον αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο. Η αυτοφαγία ενδέχεται να παίξει ρόλο στην

επαγόμενη από τη φωτοδυναμική θεραπεία απόπτωση, αλλά οι δύο διεργασίες μπορούν να συμβούν και ανεξάρτητα η μια από την άλλη [21],[26].

Η φωτοδυναμική θεραπεία έχει τη δυνατότητα να προκαλεί καταστροφή σε διάφορες πρωτεΐνες (πχ Bcl-2, IP3) αλλά και σε οργανίδια που συμμετέχουν στη διαδικασία της αυτοφαγίας όπως είναι τα λυσοσώματα και τα ενδοσώματα[20]. Επίσης ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι η αυτοφαγία μπορεί να δράσει ως μηχανισμός για τη διατήρηση της βιωσιμότητας του κυττάρου μετά τη φωτοδυναμική επίδραση. Τέλος, μπορούμε να πούμε ότι η φωτοδυναμική θεραπεία έχει τη δυνατότητα να προκαλεί άμεσα τη διεργασία της αυτοφαγίας. Αυτό είναι ανεξάρτητο από τον στόχο του φωτοευαισθητοποιητή καθώς η αυτοφαγία παρατηρήθηκε με φωτοευαίσθητες ουσίες που εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια, τα λυσοσώματα και τα ενδοσώματα [26].

1.5 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα Φωτοδυναμικής Θεραπείας

Η φωτοδυναμική θεραπεία πρόκειται για μια ελκυστική και καινοτόμο θεραπευτική μέθοδο η οποία εφαρμόζεται με επιτυχία αλλά και είναι στενά συνδεδεμένη με την διαρκή έρευνα. Από τη μια πλευρά τα πλεονεκτήματά που παρουσιάζει αλλά και από την άλλη οι προκλήσεις, τα ερωτήματα που δημιουργούνται γύρω από εκείνη, την καθιστούν έναν τομέα που είναι στενά συνυφασμένος με τη διεπιστημονική έρευνα καθώς και την αναζήτηση τρόπων με τους οποίους η εφαρμογή της θα γίνει όσο το δυνατόν πιο βοηθητική και αποτελεσματική.

Τα πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι τα εξής:

- **Ελάχιστη επεμβατικότητα:** Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι ελάχιστα επεμβατική, προσφέροντας εξαιρετικά αισθητικά αποτελέσματα και μικρό χρονικό διάστημα ανάρρωσης [35].
- **Διαμεσολάβηση Ανοσολογικής Αντίδρασης:** Έχει τη δυνατότητα να λειτουργήσει ως διαμεσολαβητής μιας ανοσολογικής αντίδρασης που μπορεί να εξολοθρεύσει καρκινικούς όγκους σε διάφορα σημεία του σώματος [21],[39].
- **Μείωση Κινδύνου για το DNA:** Η χρήση φωτοευαισθητοποιητών που δεν συσσωρεύονται στον πυρήνα των κυττάρων μειώνει τον κίνδυνο για αλλοιώσεις στο DNA, μεταλλάξεις και καρκινογένεση [30],[38].

- Βελτίωση της Ποιότητας Ζωής: Είναι ικανή να βελτιώσει την ποιότητα ζωής και να παρατείνει την επιβίωση ασθενών με καρκίνο σε προχωρημένο στάδιο [31].
- Μειωμένες Παρενέργειες: Εντοπίζει τους όγκους και τους διαλύει αφήνοντας τα υγιή κύτταρα ανέπαφα. Χαρακτηρίζεται από μειωμένες παρενέργειες σε σχέση με άλλες μεθόδους θεραπείας [32].
- Επιτυχία σε Συγκεκριμένους Τύπους Καρκίνου: Έχει αποδειχθεί επιτυχής σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος του οισοφάγου τύπου Μπάρετ και αναπτύσσεται διαρκώς με την βοήθεια της τεχνολογίας [31].
- Δυνατότητα Πολλαπλής Θεραπείας: Μπορεί να εφαρμοστεί σε συνεργασία με άλλες μεθόδους θεραπείας και να αντιμετωπίσει ταυτόχρονα πολλαπλά καρκινώματα, προσφέροντας μια ολιστική προσέγγιση στη θεραπεία [33].
- Ευκολία εφαρμογής και μειωμένο χρηματικό κόστος: Το χρηματικό κόστος είναι αρκετά μικρότερο σε σχέση με άλλες θεραπείες, όπως η χημικοθεραπεία, και η διαδικασία είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί και εκτός νοσοκομείου. Ακόμη, εφαρμόζεται σε καταστάσεις που μια επέμβαση καθίσταται αδύνατη.
- Θεραπεία και Διάγνωση: Χρησιμοποιείται και για την διάγνωση των ασθενών.

Παρόλο που έχουν περάσει περισσότερα από 25 χρόνια από τότε που η φωτοδυναμική θεραπεία παρουσιάστηκε ως πολύτιμο εργαλείο στον τομέα της ογκολογίας, ακόμα και σήμερα η χρήση της σε κλινικό επίπεδο είναι αρκετά περιορισμένη. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε ορισμένες παραμέτρους οι οποίες θα πρέπει να ερευνηθούν και να λυθούν με στόχο την εξέλιξη της συγκεκριμένης θεραπευτικής διαδικασίας αλλά και την ευρεία χρήση της.

Οι περιορισμοί αυτοί είναι:

- Περιορισμένη Διείσδυση: Η ακτινοβολία δεν μπορεί να διαπεράσει μεγάλους όγκους, περιορίζοντας την ικανότητα της μεθόδου να τους καταστρέψει πλήρως σε μια συνεδρία. Στην περίπτωση αυτή, απαιτούνται επαναλαμβανόμενες συνεδρίες για την ολική αφαίρεση της πάσχουσας περιοχής [34].

- Δυσκολία Πρόσβασης σε Βαθιά Όργανα: Οι όγκοι που βρίσκονται βαθιά μέσα στο σώμα είναι δύσκολα προσβάσιμοι [34].
- Περιορισμοί στη Θεραπεία Μεταστατικού Καρκίνου: Η θεραπεία δεν είναι επιτυχής σε πυκνές μάζες όγκου ή όγκους που περικυκλώνονται από νεκρό ιστό. Επίσης, η δυνατότητα της θεραπείας να καταστρέφει καρκίνους σε μεταστατικό στάδιο είναι περιορισμένη [34].
- Παραμένουσα φωτοευαισθησία: Μπορεί να δημιουργήσει αυξημένη φωτοευαισθητοποίηση για μεγάλο διάστημα ανάλογα και με την φωτοευαίσθητη ουσία που έχει χρησιμοποιηθεί στον ασθενή.
- Ανεπαρκής συσσώρευση φωτοευαισθητοποιητών στους όγκους: Οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι υδρόφοβοι και έχουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, με αποτέλεσμα να μειώνονται σημαντικά οι κβαντικές αποδόσεις για την δημιουργία των ελεύθερων ριζών καθώς οι φωτοευαισθητοποιητές συσσωματώνονται εύκολα. Ακόμα και αν με κάποιον τρόπο μπορέσουμε να αυξήσουμε την διαλυτότητα στο νερό η στοχευόμενη συσσώρευση στους όγκους είναι ανεπαρκής για την εφαρμογή της θεραπείας.

Η φωτοδυναμική θεραπεία αναδεικνύεται σε μια αξιόλογη επιλογή για την αντιμετώπιση διαφόρων μορφών καρκίνου, παρά τους περιορισμούς που τη συνοδεύουν [36]. Η συνεχής έρευνα και ανάπτυξη στον τομέα αυτόν έχει ως στόχο την υπέρβαση των εμποδίων, ανοίγοντας τον δρόμο για μια πιο αποτελεσματική και ασφαλή εφαρμογή της στην κλινική πράξη [21].

Οι μελέτες που διεκπεραιώνονται τείνουν προς τη δημιουργία βελτιωμένων φαρμάκων – φωτοευαισθητοποιητών οι οποίοι θα διακρίνονται από μεγαλύτερη επιλεκτικότητα και θα μπορούν να χορηγούνται χωρίς τον κίνδυνο της παραμένουσας φωτοευαισθησίας. Εάν τέτοιου είδους ουσίες μπορέσουν να δημιουργηθούν, τότε τα πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας όσον αφορά την ελάχιστη επεμβατικότητα της, την ευκολία στην εφαρμογή της (τόσο για τον ασθενή όσο και για το ιατρικό προσωπικό), το χαμηλό κόστος της θα της προσδώσουν καθοριστικό ρόλο στον τομέα της ογκολογίας [34].

Η χρήση φωτοευαισθητοποιητών σε νανοκλίμακα προσφέρει μια ελπιδοφόρα λύση, καθώς αυτές οι ουσίες μπορούν να διαλυθούν σε νερό και να στοχεύσουν ακριβώς τον καρκινικό ιστό [37]. Επιπλέον, η μείωση της απαιτούμενης ενέργειας για την ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή, μέσω της δημιουργίας ενιαίων μονάδων φωτοευαίσθητης ουσίας-πηγής φωτός, αποτελεί μια ακόμα καινοτομία [41]. Ακόμη, ο συνδυασμός της Φωτοδυναμικής Θεραπείας με παραμαγνητικούς φορείς προσφέρει μια προοπτική για την βελτίωση της απεικόνισης του όγκου, τη στοχοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή και τον έλεγχο του συστήματος μεταφοράς του, ανοίγοντας νέους δρόμους για την ολοκληρωμένη αντιμετώπιση του καρκίνου [39]. Οι πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι η Φωτοδυναμική Θεραπεία έχει την δυνατότητα όχι μόνο να καταστρέφει τους όγκους, αλλά και να παρέμβει προληπτικά

ή θεραπευτικά σε πιο απλά προβλήματα υγείας, επηρεάζοντας θετικά το ανοσοποιητικό σύστημα [22]. Η δυνατότητα της Φωτοδυναμική Θεραπεία να συμβάλλει στην αισθητική αποκατάσταση και στην επούλωση των ιστών μετά την επέμβαση αποτελεί ένα ακόμη ισχυρό πλεονέκτημα, ενώ οι τρέχουσες ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώνονται στην ενίσχυση αυτών των δυνατοτήτων [40].

ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΕΣ

2.1 Ορισμός και προϋποθέσεις ώστε μια ουσία να χρησιμοποιηθεί ως φωτοευαισθητοποιητής

Οι φωτοευαισθητοποιητές είναι μόρια, τα οποία διεγείρονται μέσω εξωτερικής πηγής φωτός σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Βασική λειτουργία τους είναι η αλλαγή της χημικής κατάστασης άλλων μορίων μέσω της φωτοχημικής διαδικασίας. Στην περίπτωση της φωτοδυναμικής θεραπείας η ενεργοποίησή τους προκαλεί την παραγωγή θανατηφόρων κυτταροτοξικών προϊόντων (μονήρες οξυγόνο και ελεύθερες ρίζες, ROS), μέσω μεταφοράς ενέργειας τα οποία προκαλούν κυτταρικό θάνατο. Υπάρχουν πολλές φυσικές αλλά και συνθετικές χρωστικές ουσίες, από ουσίες εξαγόμενες από φυτά έως και περίπλοκες συνθετικές μακροκυκλικές ενώσεις, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φωτοευαισθητοποιητές στη φωτοδυναμική θεραπεία.

Για την αποτελεσματικότητα όμως της θεραπείας είναι απαραίτητο οι φωτοευαισθητοποιητές να διαθέτουν ορισμένα χαρακτηριστικά ώστε να επάγεται το επιθυμητό βιολογικό αποτέλεσμα.

- **Επίπεδα τοξικότητας:** Τα επίπεδα τοξικότητας των φωτοευαισθητοποιητών θα πρέπει να είναι χαμηλά (έλλειψη τοξικότητας με την έλλειψη ακτινοβολίας) και ο μεταβολισμός τους να μην οδηγεί στη δημιουργία νέων τοξικών παραγώγων, προκειμένου να αποφεύγονται παρενέργειες υπότασης και αλλεργικής αντίδρασης στον ασθενή [34],[42].
- **Επιλεκτικότητα:** Ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να συγκεντρώνεται επιλεκτικά στους πάσχοντες ιστούς. Ο λόγος της ποσότητας που συγκεντρώνεται στο πάσχοντα ιστό προς τη ποσότητα που παρακρατείται από τους υγιείς ιστούς θα πρέπει να είναι μεγάλος, ώστε να απορροφάται κατά το δυνατόν περισσότερο από τον ιστό-στόχο [3],[42].
- **Ικανότητα διείσδυσης:** Ο ιδανικός φωτοευαισθητοποιητής πρέπει να απορροφά το φως σε περιοχές του ερυθρού. Έτσι το φως εισχωρεί βαθύτερα στους ιστούς και επιπλέον, αποφεύγεται η φωτοευαισθησία του δέρματος μέσω του ηλιακού φωτός [4]. Επίσης, φωτοευαισθητοποιητές με μικρότερα μήκη κύματος δεν επιτρέπουν τη φωτοδυναμική θεραπεία σε όγκους μεγαλύτερου βάθους [34],[42],[43].
- **Μετάλλαξη / καρκινογένεση:** ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να έχει την ικανότητα να θεραπεύει μία ασθένεια χωρίς να δημιουργεί επιπλέον βλάβες σε φυσιολογικούς ιστούς.
- **Εύκολη διάλυση και ταχεία απορρόφηση:** Είναι επιθυμητό να είναι διαλυτός σε υδατικό διάλυμα, ώστε να χορηγείται μέσω έγχυσης και να μεταφέρεται μέσω του κυκλοφορικού συστήματος [34],[42].

- **Εμπορική διαθεσιμότητα και χαμηλό κόστος:** η σύνθεση του φωτοευαισθητοποιητή θα πρέπει να είναι εύκολη, τα πρωταρχικά υλικά να υπάρχουν διαθέσιμα σε αφθονία ώστε το κόστος παραγωγής και η αγορά του να είναι δυνατή.
- **Δυνατότητα απεικόνισης και ικανότητα φθορισμού:** Είναι απαραίτητη η ύπαρξη απεικονιστικής διάταξης για τη μέτρηση της απορροφόμενης δόσης του φωτοευαισθητοποιητή μέσω in vivo μετρήσεων φθορισμού. Ο φωτοευαισθητοποιητής πρέπει να διαθέτει το πλεονέκτημα του φθορισμού για τον καθορισμό του στόχου και την αξιολόγηση της δοσιμετρίας της αγωγής [3],[44].
- **Ικανότητα φθορισμού:** Πολλοί φωτοευαισθητοποιητές διαθέτουν το πλεονέκτημα της απελευθέρωσης φωτός από την ενέργεια που έχουν λάβει μέσω της εξωτερικής πηγής. Η χρήση της είναι καθοριστική για τον εντοπισμό του ακριβή στόχου, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις εκτομής του όγκου πριν τη φωτοδυναμική θεραπεία. Παράλληλα, επιτρέπει στον επιβλέπων ιατρό να αντιληφθεί την έκταση του καρκινικού ιστού για τη δοσιμετρία της αγωγής.

Αυτές οι απαιτήσεις δείχνουν πόσο πολύπλοκη είναι η αναζήτηση και η ανάπτυξη των φωτοευαισθητοποιητών, καθώς πρέπει να ικανοποιούν πολλαπλά κριτήρια για να θεωρηθούν ασφαλείς και αποτελεσματικοί. Παρόλα αυτά, η έρευνα σε αυτό το πεδίο συνεχίζεται με γρήγορο ρυθμό, και νέοι φωτοευαισθητοποιητές αναπτύσσονται διαρκώς με βελτιωμένες ιδιότητες.

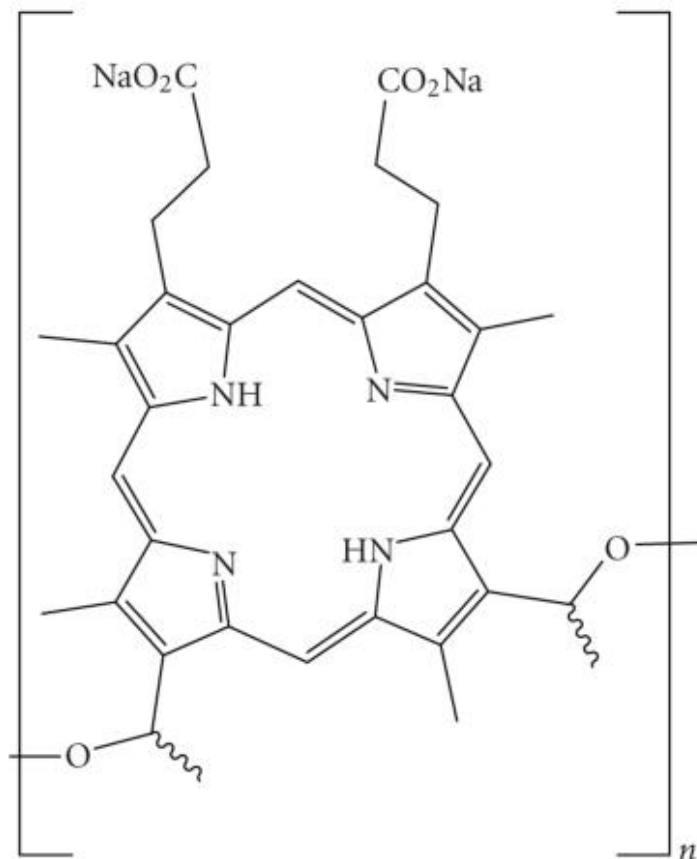
2.2 Κατηγορίες και γενιές φωτοευαισθητοποιητών

Οι φωτοευαισθητοποιητές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 1ης, 2ης και 3ης γενιάς. Στους 1ης γενιάς ανήκουν φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι βασίζονται στη δομή της πορφυρίνης και συμπεριλαμβάνονται η αιματοπορφυρίνη και τα παράγωγά της. Οι φωτοευαισθητοποιητές 2ης γενιάς αναπτύχθηκαν με βάση τα ελαττώματα που παρουσίασαν οι φωτοευαισθητοποιητές 1ης γενιάς. Έχουν διάφορες δομές όπως πορφυρίνες, διευρυμένες πορφυρίνες, παράγωγα χλωροφύλλης, χλωρίνες, φθαλοκυανίνες. Οι φωτοευαισθητοποιητές 3ης γενιάς περιλαμβάνουν φωτοευαισθητοποιητές 1ης και 2ης γενιάς οι οποίοι είναι συζευγμένοι με μόρια – μεταφορείς με σκοπό την πιο επιλεκτική στόχευση καρκινικών όγκων.

Φωτοευαισθητοποιητές 1ης γενιάς

Στη 1η γενιά φωτοευαισθητοποιητών που εγκρίθηκαν για κλινική χρήση ανήκουν τα παράγωγα της αιματοπορφυρίνης με γνωστές εμπορικές ονομασίες ως Photofrin και Photoheme [30]. Αναφορές για τη χρήση τους στη φωτοδυναμική θεραπεία εντοπίζονται στις αρχές της δεκαετίας του 1970. Πρόκειται για ένα συνδυασμό μειγμάτων διμερών και ολιγομερών πορφυρίνης με έντονη δραστηριότητα κατά την σύνδεσή τους με εστέρες και αιθέρες [31]. Αρκετοί ερευνητές προσπάθησαν να προσδιορίσουν την ακριβή χημική υπόσταση της ουσίας με πολυπληθής και χρονοβόρες μελέτες. Πολύ σημαντικό μείνκτημα αποτέλεσε τόσο το γεγονός της

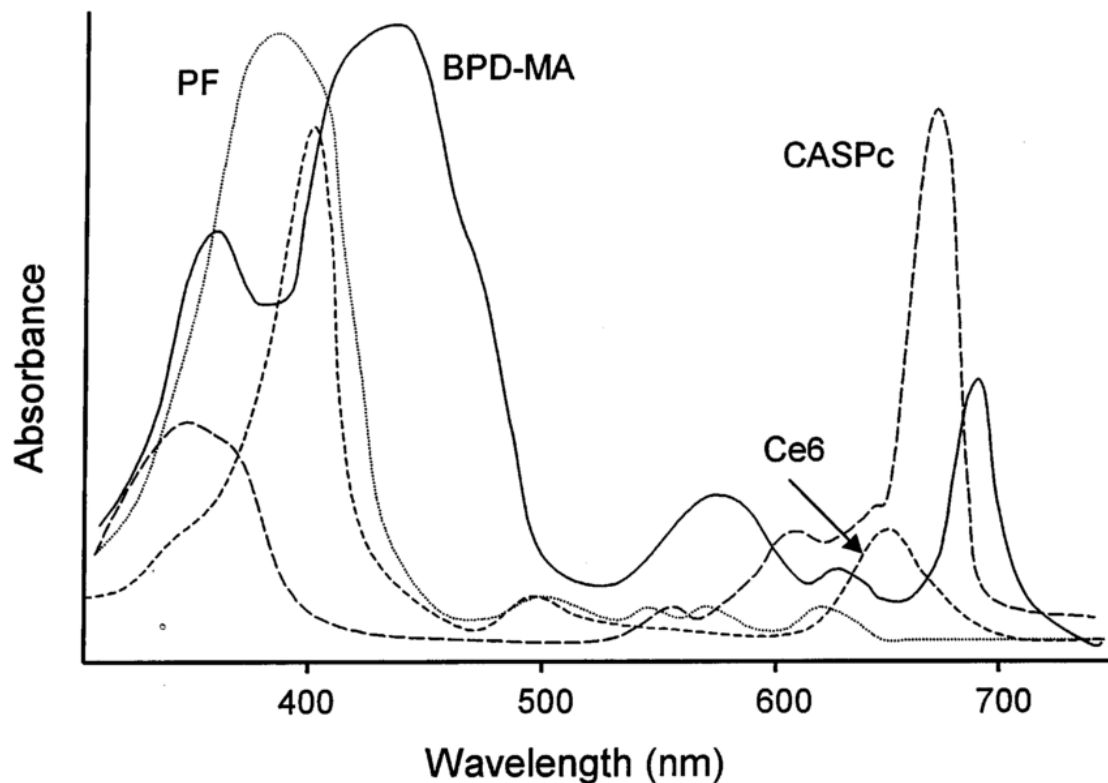
μικρής επιλεκτικότητας στους πάσχοντες ιστούς όσο και το ότι αυτές οι ουσίες εμφάνιζαν κορυφή απορρόφησης μεταξύ 350 και 450 nm.



Εικόνα 5: Μοριακή δομή της Photofrin ^[5]

Ένας βέλτιστος φωτοευαισθητοποιητής πρέπει να έχει χαμηλή απορρόφηση σε αυτήν την περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, λόγω του φάσματος της ηλιακής ακτινοβολίας που είναι από 400 έως 600nm. Κατά την χρήση τους παρατηρήθηκε πλήθος αρνητικών επιπτώσεων στην υγεία και τη ποιότητα ζωής των ασθενών, με συνέπεια την αισθητή μείωση της χορήγησής τους [33],[45]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η δερματική ευαισθησία των ασθενών κατά την έκθεσή τους στην ηλιακή ακτινοβολία για μεγάλο χρονικό διάστημα από τη λήψη τους. Επίσης, έχουν καταγραφεί φαινόμενα αλλεργικών αντιδράσεων και ηλιακών εγκαυμάτων λόγω της φωτοτοξικότητας.

Το φάσμα απορρόφησης αποτελείται από έξι κορυφές με τη μεγαλύτερη στα 400nm και τη μικρότερη στα 630nm, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 6.



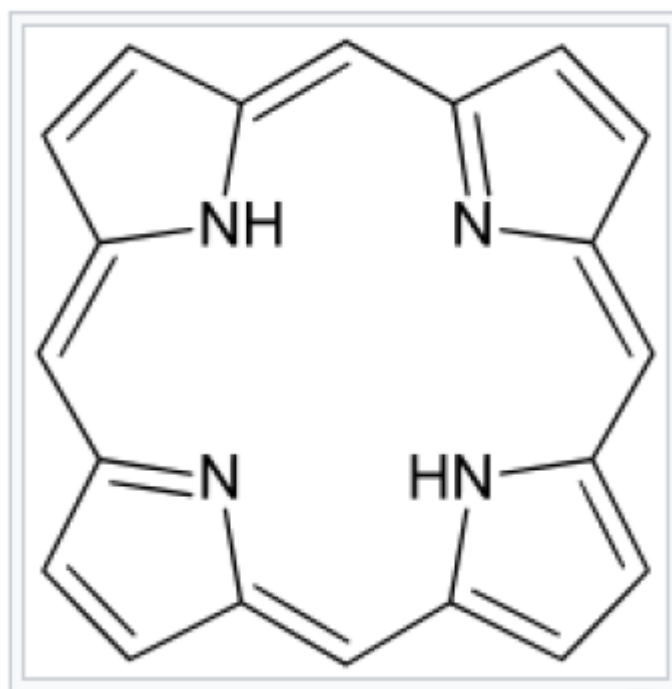
Εικόνα 6: Φάσμα απορρόφησης φωτοευαισθητοποιητών στην ορατή περιοχή: Photofrin (PF at 630 nm), chlorin (Ce6 at 650 nm), BPD (at 690 nm), and CASPc (at 675 nm) [6]

Παρόλο που η απορρόφηση στα 630nm είναι μικρή, αυτή η τιμή του μήκους κύματος είναι ευρέως αποδεκτή τόσο σε κλινικό όσο και σε πειραματικό επίπεδο. Αυτό συμβαίνει, διότι η διείσδυση της ακτινοβολίας στον ιστό είναι υψηλότερη σε αυτό το μήκος κύματος. Η Photofrin είναι κλινικά αποδεκτή σε πολλές χώρες για τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα, του οισοφάγου, της ουροδόχου κύστης, του στομάχου, και του τραχήλου της μήτρας (πρώιμο στάδιο). Έχει χρησιμοποιηθεί σε χιλιάδες ασθενείς σε βάθος χρόνου μεγαλύτερο της 20ετίας [46],[47].

Φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς

Τα δύο βασικά μειονεκτήματα των παραγώγων της αιματοπορφυρίνης, η παραμένουσα φωτοευαισθησία και τα χαμηλά επίπεδα απορρόφησης της στα 630nm οδήγησαν τους ερευνητές στη μελέτη και τη δημιουργία νέας γενιάς φωτοευαισθητοποιητών. Οι φωτοευαισθητοποιητές 2ης γενιάς είναι καθαρές χημικές ενώσεις με σταθερή σύνθεση. Κατηγοριοποιούνται σε δύο βασικές χημικές ομάδες, τις κυανίνες και τις χλωρίνες.

Τα φυτοχημικά, όπως οι πορφυρίνες, οι χλωρίνες και οι φθαλοκυανίνες, αποτελούν τη βάση για τη δημιουργία των φωτοευαισθητοποιητών δεύτερης γενιάς. Αυτές οι ενώσεις διακρίνονται από την υψηλή τους φωτοσταθερότητα, την υψηλή τους φωτοδυναμική δραστηριότητα και την ευκολία με την οποία μπορούν να τροποποιηθούν χημικά για να βελτιωθούν οι ιδιότητές τους [51].



Εικόνα 7: Δομή της πορφυρίνης^[7]

Οι φθαλοκυανίνες διαφέρουν από τις πορφυρίνες, γιατί διαθέτουν άτομα αζώτου που είναι συνδεδεμένα στις επιμέρους πυρρολικές ομάδες. Η ικανότητα διείσδυσης της ακτινοβολίας στους ιστούς οφείλεται στην ισχυρή τους απορρόφησης στο ερυθρό με συνέπεια να τους καθιστά ιδανικούς για την φωτοδυναμική θεραπεία.

Οι φθαλοκυανίνες, με παραδείγματα όπως οι PC4 και MePCs, παρέχουν έναν πολύ υψηλό συντελεστή απορρόφησης στο ερυθρό μέρος του φάσματος, επιτρέποντας την βαθιά διείσδυση της ακτινοβολίας στους ιστούς. Αυτό τις καθιστά ιδανικές για χρήση στη φωτοδυναμική θεραπεία [9]. Οι χλωρίνες, με παραδείγματα όπως οι Foscan, Verteporfin, HPPH, Purlytin και Talporfin, έχουν επίσης δείξει υψηλή ειδικότητα για τον καρκινικό ιστό και υψηλούς συντελεστές απορρόφησης [43]. Τέλος, οι τεξαφυρίνες, όπως η Motexafin lutetium (LuTex), είναι άλλη μια ομάδα φωτοευαισθητοποιητών που έχουν αναπτυχθεί με τροποποιήσεις στη δομή των πορφυρινών για να βελτιωθούν οι φωτοδυναμικές τους ιδιότητες.

Οι φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς αποτελούν μια σημαντική πρόοδο στο πεδίο της φωτοδυναμικής θεραπείας, παρέχοντας πολλαπλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τους προκατόχους τους. Αυτοί οι φωτοευαισθητοποιητές χαρακτηρίζονται από την υψηλή τους απορρόφηση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, ιδιαίτερα στο εύρος των 660-800nm, κάτι που τους επιτρέπει να διεισδύουν πιο βαθιά στους ιστούς. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι κρίσιμο για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας, καθώς επιτρέπει την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων που βρίσκονται βαθιά μέσα στον όγκο [33],[48].

Ένα από τα κυριότερα πλεονεκτήματά τους είναι η ταχεία αποβολή τους από τον οργανισμό, με αποτέλεσμα η φωτοευαισθησία του ασθενούς να διαρκεί σημαντικά

λιγότερο σε σύγκριση με τους φωτοευαισθητοποιητές 1^{ης} γενιάς [51]. Αυτό μειώνει το ρίσκο φωτοτοξικότητας και βελτιώνει τη συνολική ασφάλεια της θεραπείας. Οι χλωρίνες, που είναι μια από τις κύριες κατηγορίες των φωτοευαισθητοποιητών δεύτερης γενιάς, είναι παράδειγμα μιας τέτοιας ομάδας ενώσεων που έχουν δείξει υποσχόμενα αποτελέσματα σε κλινικές δοκιμές [49].

Επιπλέον, οι φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς διακρίνονται από την υψηλή τους ειδικότητα για τον καρκινικό ιστό, μειώνοντας τη ζημιά στους υγιείς ιστούς. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της επιλεκτικής συσσώρευσης των φωτοευαισθητοποιητών στους όγκους, μέσω ενός παθητικού μηχανισμού διάδοσης [50].

Φωτοευαισθητοποιητές 3^{ης} γενιάς

Στα πλαίσια της συνεχούς προόδου στον τομέα της φωτοδυναμικής θεραπείας, η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί με αυξανόμενο ενδιαφέρον προς την ανάπτυξη και τη χρήση των φωτοευαισθητοποιητών 3ης γενιάς, με στόχο τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας και τη μείωση των παρενεργειών της θεραπείας. Στους φωτοευαισθητοποιητές 3ης γενιάς ανήκουν οι φωτοευαισθητοποιητές των δύο προηγούμενων γενιών, οι οποίοι σε συνδυασμό με διάφορα χημικά μόρια που αποτελούν δομικά ή λειτουργικά συστατικά του οργανισμού, επιτρέπουν την επιλεκτικότερη στόχευση στο καρκινικό ιστό.

Η σύζευξη των φωτοευαισθητοποιητών σε βιομόρια (π.χ μονοκλωνικά αντισώματα) και η επιλεκτική πρόσδεση πάνω στα καρκινικά κύτταρα, λόγω της ύπαρξης αντιγόνων σε αυτά, προκαλούν την καταστροφή τους, δίχως τον επηρεασμό των υγιών κυττάρων.

Τέλος, ένα ακόμη σύστημα μεταφοράς της φωτοευαίσθητης ουσίας που έχει μελετηθεί είναι τα νανοσωματίδια. Ειδικότερα, έχει καταγραφεί σημαντική πρόοδος στην εφαρμογή των νανοτεχνολογιών, και ειδικά των νανοσωματιδίων, στη φωτοδυναμική θεραπεία [52]. Τα νανοσωματίδια, με διαστάσεις κάτω από 100 nm, παρέχουν μια μοναδική πλατφόρμα για τη μεταφορά φωτοευαισθητοποιητών, είτε διαλυμένων στη μήτρα τους, είτε απορροφημένων στην επιφάνειά τους. Οι δυνατότητες αυτές, σε συνδυασμό με την ευελιξία στην τροποποίηση της επιφάνειας και την υψηλή απορρόφηση από τα κύτταρα, έχουν καταστήσει τα νανοσωματίδια ένα πολύ υποσχόμενο εργαλείο στη φωτοδυναμική θεραπεία [52]. Η εφαρμογή των νανοσωματιδίων στη φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να χωριστεί σε δύο κατηγορίες: αφενός τα νανοσωματίδια ως παθητικοί μεταφορείς, και αφετέρου ως ενεργοί συμμετέχοντες στη διαδικασία.

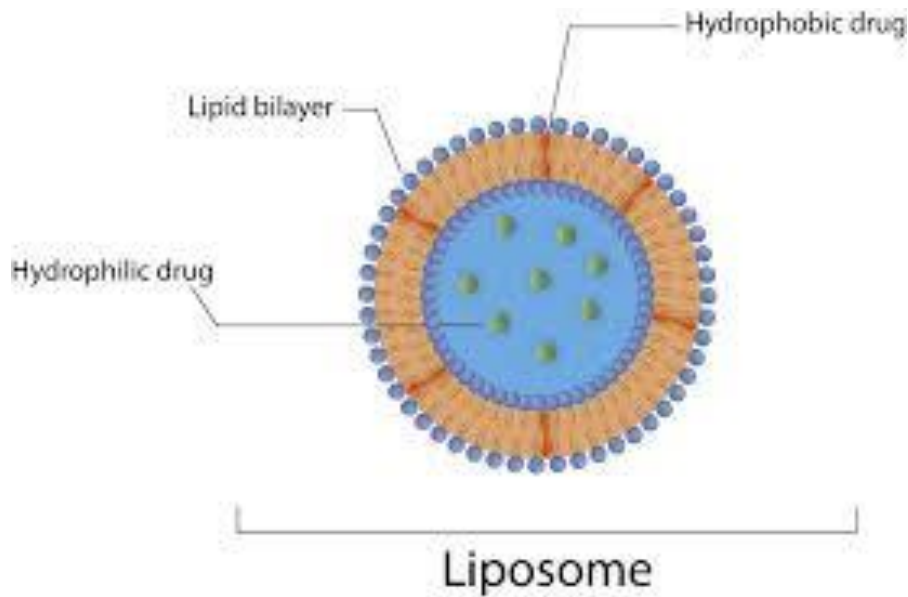
Παθητικά Νανοσωματίδια

1. **Βιοδιασπώμενα:** Σε αυτήν την κατηγορία, η φωτοευαισθητοποιητική ουσία ενσωματώνεται στη μήτρα των νανοσωματιδίων, με τη δυνατότητα ελεγχόμενης απελευθέρωσης μέσω βιοδιάσπασης.
2. **Μη Βιοδιασπώμενα:** Σε αυτό το πλαίσιο, η φωτοευαισθητοποιητική ουσία απορροφάται στο πορώδες κέλυφος των νανοσωματιδίων, προσφέροντας μια εναλλακτική λύση μεταφοράς.

Ενεργητικά Νανοσωματίδια

1. **Φωτοευαισθητοποιητές:** Τα νανοσωματίδια σε αυτή την κατηγορία λειτουργούν μεταφέροντας ενέργεια από το προσπίπτον φως απ' ευθείας στο γύρω οξυγόνο, ενεργοποιώντας τη φωτοευαισθητοποιητική ουσία.
2. **Αυτοφωτιζόμενοι (Self-illuminating):** Σε αυτή την κατηγορία, τα νανοσωματίδια φωτίζονται από ενεργοποίηση μέσω ακτίνων Χ, ενεργοποιώντας τον συνδεδεμένο φωτοευαισθητοποιητή.
3. **Upconverting:** Τα νανοσωματίδια αυτά μετατρέπουν το φως χαμηλής ενέργειας σε εκπομπές υψηλότερης ενέργειας, ενεργοποιώντας τον συνδεδεμένο φωτοευαισθητοποιητή [53],[54].

Ένας συνδυασμός για την επιλεκτική στόχευση είναι η σύζευξη των φωτοευαισθητοποιητών με λιποσώματα. Τα λιποσώματα είναι μικρές κοίλες κυψελίδες, των οποίων οι μεμβράνες με τα διπλά επίπεδα αποτελούνται από μια διπλή στρώση φωσφολιπιδίων. Η ικανότητά τους να εγκλείουν υδρόφιλες ουσίες στον υδατικό τους πυρήνα και υδρόφοβες στις μεμβράνες τους, τα καθιστούν ιδανικά κατά τη χρήση τους στη φωτοδυναμική θεραπεία [52].



Εικόνα 8: Υδρόφιλα και υδρόφοβα φάρμακα στα λιποσώματα ^[8]

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο συνδυασμός φωτοευαισθητοποιητών με βιοδιασπώμενα πολυμερή και αιωρήματα ελαίου, που μπορούν να προκαλέσουν αύξηση της επιλεκτικότητας κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία. Στη περίπτωση των αιωρημάτων ελαίου μας δίνεται η δυνατότητα ταχύτερης διάλυσή τους στους υδροφοβικούς φωτοευαισθητοποιητές, ενώ τα βιοδιασπώμενα πολυμερή χρησιμοποιούνται αντί των λιποσωμάτων, με προτερήματα που εντοπίζονται στη μεγάλη ποσότητα φαρμάκου κατά τη μεταφορά και στη στοχευμένη έκκρισή του [51].

Η προσαρμοστικότητα και η ευελιξία των νανοσωματιδίων στη φωτοδυναμική θεραπεία έχουν συμβάλει στη δημιουργία ενός πλούσιου πεδίου έρευνας με πολλαπλές εφαρμογές και θεραπευτικές δυνατότητες. Η συνεχής ανάπτυξη νέων στρατηγικών σύνθεσης και η δυνατότητα ελεγχόμενης απελευθέρωσης των φωτοευαισθητοποιητών, ανοίγουν νέους δρόμους για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της φωτοδυναμικής θεραπείας, προσφέροντας ελπίδες για τη θεραπεία πολλαπλών μορφών καρκίνου και άλλων σοβαρών παθήσεων.

2.3 Η Κουρκουμίνη ως φωτοευαισθητοποιητής

2.3.1 Εισαγωγή

Το φυτό Turmeric (*Curcuma longa*) είναι ένα αιωνόβιο φυτό το οποίο ανήκει στην οικογένεια Zingiberaceae και προέρχεται από την Ινδία και την Νοτιοανατολική Ασία. Η χρήση του στην Ασία ξεκίνησε περίπου 2000 χρόνια πριν με τις εφαρμογές που είχε στη μαγειρική, την ιατρική, την παρασκευή καλλυντικών αλλά και χρωστικών ουσιών (κυρίως για υφάσματα). Η διάδοσή του στην Ευρώπη πραγματοποιήθηκε γύρω στον 14ο αιώνα μ.Χ. Το turmeric είναι αδιαμφισβήτητα ένα από τα πιο ευρέως διαδεδομένα μπαχαρικά στον κόσμο και είναι γνωστό με διάφορα ονόματα όπως Indian saffron, kurkum, yellow ginger. Τα ριζώματα του φυτού αυτού αποτελούν και το πιο σημαντικό κομμάτι του όσον αφορά τις γαστρονομικές και φαρμακευτικές ιδιότητες που του προσδίδονται. Το πιο ενεργό συστατικό του turmeric δεν είναι άλλο από την κουρκουμίνη [56].



Εικόνα 9: Η ρίζα του φυτού κουρκουμά και η ουσία κουρκουμίνη ^[9]

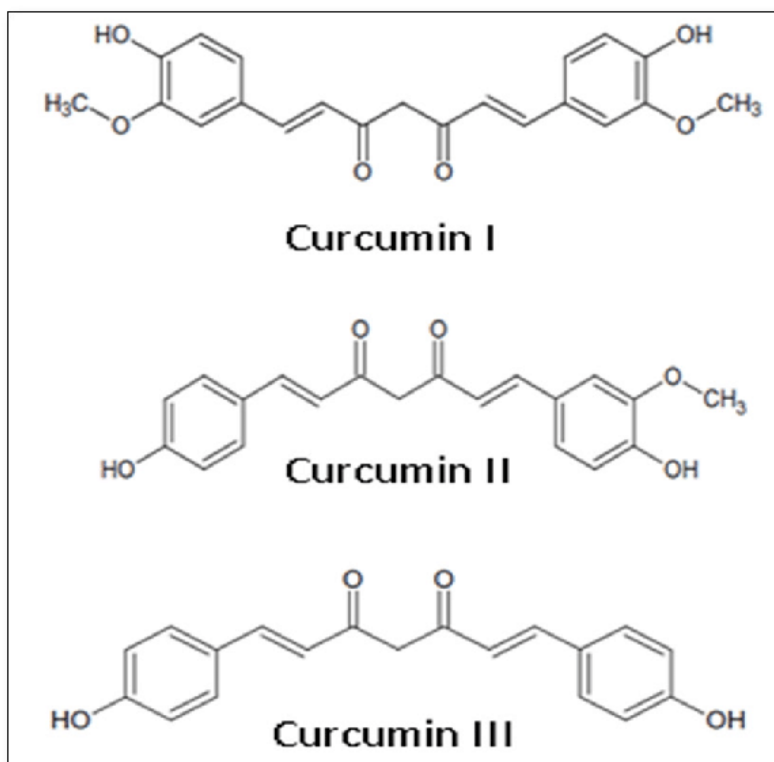
2.3.2 Δομή Κουρκουμίνης και κουρκουμινοειδή

Το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα του turmeric οφείλεται στην ουσία που απομονώθηκε για πρώτη φορά (από τις ρίζες του φυτού *curcuma longa*) από τον Vogel το 1842 και ονομάστηκε κουρκουμίνη. Η κουρκουμίνη είναι μια πορτοκαλί – κίτρινη κρυσταλλική σκόνη πρακτικά αδιάλυτη στο νερό. Η χημική δομή της κουρκουμίνης (curcumin ή curcumin I) $C_{21}H_{20}O_6$ περιεγράφηκε πρώτη φορά το 1910 από τους Lampre και Milobedeska. Είναι μια πολυφαινόλη μικρού μοριακού βάρους (368.37 g/mol) με θερμοκρασία τήξης γύρω στους 183°C. Η κατά IUPAC ονομασία της είναι 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxy phenyl)-1,6- heptadiene-3,5-dione [56],[60].

Τα κουρκουμινοειδή αναφέρονται σε μια ομάδα φαινολικών ενώσεων, οι οποίες είναι παρούσες στο turmeric, και από χημικής πλευράς είναι συναφείς με το πρωταρχικό συστατικό κουρκουμίνη. Τα κουρκουμινοειδή που απομονώθηκαν από το turmeric είναι τα εξής:

- Curcumin (ή Curcumin I),
- demethoxycurcumin (ή Curcumin II)
- bisdemethoxycurcumin (ή Curcumin III).

Η κουρκουμίνη που κυκλοφορεί στο εμπόριο περιέχει Curcumin I σε ποσοστό 77%, Curcumin II σε ποσοστό 17% και Curcumin III σε ποσοστό 3% περίπου [55],[57],[58],[59].



Εικόνα 10: Χημική δομή των κουρκουμινοειδών [7]

2.3.3 Εφαρμογές της κουρκουμίνης

Η κουρκουμίνη χρησιμοποιείται ευρέως στην νοτιοανατολική Ασία, την Κίνα και την Ινδία για λόγους γαστρονομικούς αλλά και ιατρικούς [60]. Η αξιοσημείωτη συμβολή του κουρκουμά στη θεραπεία διάφορων παθήσεων, λόγω του ευρέως φάσματος των φαρμακολογικών ιδιοτήτων που τον χαρακτηρίζουν, έχει καταγραφεί από τα αρχαία χρόνια. Η ολιστική, Ινδική ιατρική που είναι γνωστή ως Ayurveda χρησιμοποιεί το turmeric για τη θεραπεία λοιμώξεων στα μάτια, εγκαυμάτων, φλεγμονών, της ακμής, διάφορων ακόμη δερματικών παθήσεων καθώς και για την επούλωση πληγών. Στην παραδοσιακή ιατρική η κουρκουμίνη χρησιμοποιείται για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και για την αντιμετώπιση ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος όπως είναι το άσθμα και οι αλλεργίες. Το turmeric έχει επίσης εφαρμογές στην θεραπεία κατά του διαβήτη, του βήχα, των ρευματισμών, της ιγμορίτιδας, της ανορεξίας, των ηπατικών διαταραχών, ενώ έχουν μελετηθεί οι επιδράσεις της στην αντιμετώπιση του ιού HIV, αλλά και διάφορων νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως είναι το Πάρκινσον και η νόσος Αλτσχάιμερ. Εδώ και αρκετές δεκαετίες, η ουσία αυτή έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον επιστημόνων από πολλούς διαφορετικούς κλάδους με κύριο στόχο την περαιτέρω μελέτη των φαρμακολογικών ιδιοτήτων της. Έχει μέχρι σήμερα αποδειχθεί ότι η συγκεκριμένη ουσία και τα παράγωγά της παρουσιάζουν σημαντικές ιδιότητες όπως αντιιικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές.

2.3.4 Αντικαρκινικές ιδιότητες της κουρκουμίνης

Η κουρκουμίνη διαθέτει πολλές υποσχόμενες χημειοθεραπευτικές αλλά και προληπτικές ιδιότητες οι οποίες θα μπορούσαν αδιαμφισβήτητα να ανοίξουν δρόμους εναλλακτικών θεραπειών για ποικίλες ασθένειες. Αρκετή προσοχή εστιάζεται στη μελέτη των ιατρικών εφαρμογών της κουρκουμίνης όσον αφορά τη θεραπεία διάφορων μορφών καρκίνου, αφού η συγκεκριμένη ουσία έχει παρουσιάσει αντικαρκινικές και αποπτωτικές δράσεις ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών [66]. Στις μέρες μας πραγματοποιούνται κλινικές δοκιμές με τη χρήση της κουρκουμίνης για την αντιμετώπιση καρκίνων στο πάγκρεας, στο λεπτό και παχύ έντερο έντερα αλλά και για το πολλαπλό μυέλωμα.

Η έκθεση της κουρκουμίνης στο ορατό φως σε συνδυασμό με το οξυγόνο εμφανίζει φωτοτοξικότητα. Οι φωτοβιολογικές και κυτταροτοξικές επιδράσεις της κουρκουμίνης στα καρκινικά κύτταρα εκτιμώνται με τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έχουν καταδείξει την καταπολέμηση των καρκινικών όγκων σε βακτήρια, όπως και τη συρρίκνωση επιβλαβών κυττάρων και την αιμορραγία των μεμβρανών σε καρκινικά κύτταρα του φάρυγγα (NPC) [71],[72], [73].

Ο κυριότερος μηχανισμός με τον οποίο εκείνη επάγει κυτταροτοξικότητα είναι η απόπτωση [64]. Η κουρκουμίνη έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει την καρκινική ανάπτυξη και πρόοδο στοχεύοντας σε ποικίλα στάδια της καρκινογένεσης. Μπορεί να δρα τόσο ως παράγοντας αποκλεισμού, αναστέλλοντας έτσι το εναρκτήριο στάδιο

του καρκίνου, όσο και ως μέσο καταστολής, αναστέλλοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό κακοήθων κυττάρων κατά τη διάρκεια της προώθησης και της εξέλιξης της καρκινογένεσης. Εφαρμογές της όσον αφορά την καταστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων έχουν αποδειχθεί πάνω σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη, της χολής, της υπόφυσης, του στόματος και των λειομυμάτων της μήτρας.

2.3.5 Κουρκουμίνη και φωτοδυναμική θεραπεία

Η χρήση της κουρκουμίνης στην φωτοδυναμική θεραπεία για την καταπολέμηση των καρκινικών όγκων είναι καθοριστική. Βασικό χαρακτηριστικό της είναι η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαθέτει εξίσου το πλεονέκτημα της διαχωριστικότητας των καρκινικών από τα υγιή κύτταρα με μεγαλύτερη στόχευση στα καρκινικά [65]. Παράλληλα, αποκόπτεται η παροχή του αίματος στα καρκινικά κύτταρα και προάγεται η διαδικασία της απόπτωσης [69].

Επιπλέον, εκτός των αντικαρκινικών, αντιοξειδωτικών, αντιμικροβιακών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της, η χρήση της στην φωτοδυναμική θεραπεία είναι αποτελεσματική λόγω μη τοξικότητας, έχοντας την δυνατότητα ανίχνευσης μέσω μιας ευρείας περιοχής φάσματος των 300-500 nm. Το χαμηλό της κόστος, επίσης, καθιστά δυνατό να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλες ποσότητες [68].

Εφαρμογές της κουρκουμίνης στη φωτοδυναμική θεραπεία είχαν επιτυχή αποτελέσματα στην αντιμετώπιση καρκίνου του τράχηλου, καταπολέμηση επιβλαβών βακτηρίων για την στοματική υγιεινή, επιθετικά καρκινώματα του δέρματος κοκ. Για παράδειγμα, η δράση νανογαλακτώματος κουρκουμίνης (μικροσκοπικές σφαίρες φαρμάκου που βελτιώνουν τη διαλυτότητα και βιοδιαθεσιμότητα της κουρκουμίνης) σε συνδυασμό με πηγή ακτινοβολήσης φωτός υψηλής έντασης οδήγησε σε θάνατο τα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου με τη διαδικασία της απόπτωσης [67].

Επιπλέον, η μελέτη και διαμόρφωση αλοιφής κουρκουμίνης με σκοπό την επιφανειακή κάλυψη της καρκινικής δερματικής περιοχής, αντιμετώπισε επιτυχώς και εξόντωσε καρκινικά κύτταρα, σύμφωνα με μελέτες που έγιναν σε ποντικούς, λόγω του μικρού επιδερμικού πάχους τους [66].

Τα παράγωγα κουρκουμίνης θα μπορούσαν να υποκαταστήσουν τις μακροκυκλικές οργανικές χρωστικές, όπως οι πορφυρίνες και οι φθυαλοκυανίνες, που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου και με κατάλληλες τροποποιήσεις (π.χ σύμπλοκα μετάλλων) για αμεσότερη διάλυση και σταθερότητα, θα μπορούσαν να ξεπεράσουν τα προβλήματα χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας και αστάθειας στο σώμα [61].

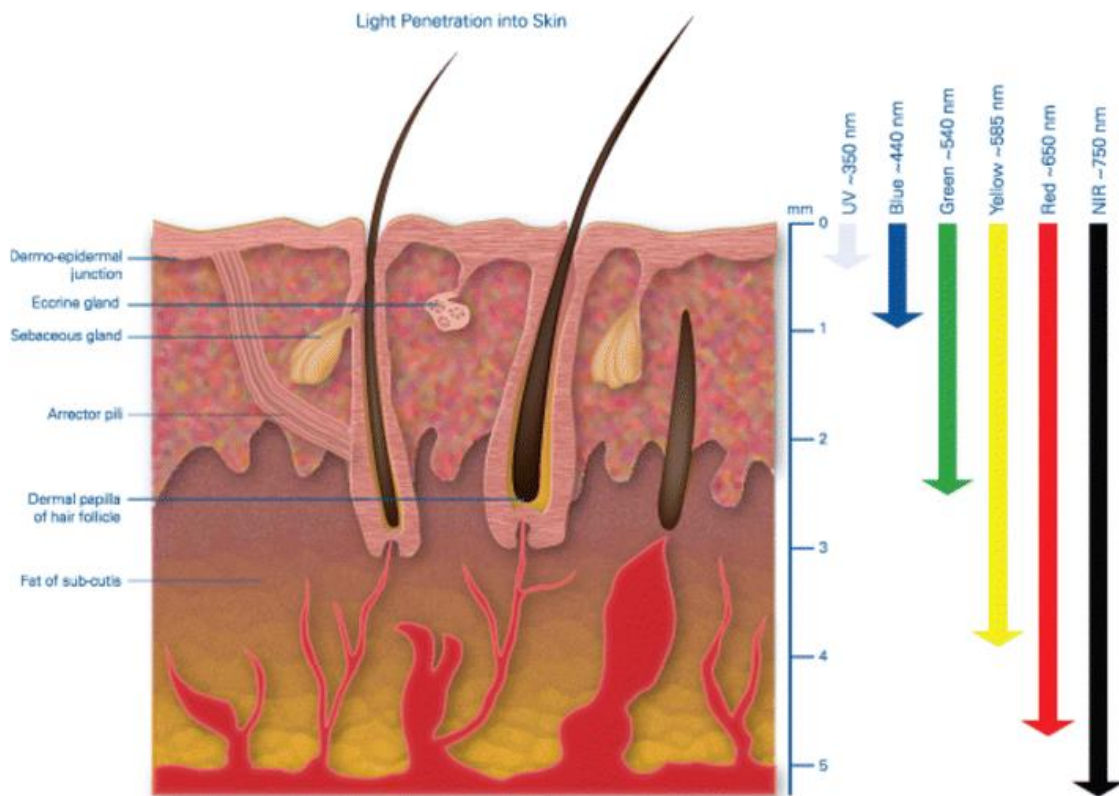
Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν την κουρκουμίνη βασικό ιατρικό εργαλείο για την πρόληψη και καταπολέμηση του καρκίνου στη φωτοδυναμική θεραπεία.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

3.1 Διείσδυση Φωτός στη Φωτοδυναμική Θεραπεία – Light penetration

Η αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας (PDT) επηρεάζεται σημαντικά από τη διείσδυση του φωτός μέσα στους βιολογικούς ιστούς. Η διείσδυση του φωτός είναι κρίσιμος παράγοντας καθώς καθορίζει πόσο βαθιά μπορεί η θεραπεία να επηρεάσει τα κύτταρα-στόχους ή τους ιστούς. Το βάθος της διείσδυσης του φωτός εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το μήκος κύματος του φωτός, τον τύπο του ιστού και την παρουσία φωτοευαίσθητων παραγόντων.

Μελέτες έχουν δείξει ότι το φως στο ερυθρό έως κοντινό υπέρυθρο φάσμα έχει μεγαλύτερο βάθος διείσδυσης στους βιολογικούς ιστούς. Αυτό οφείλεται στη μειωμένη διασπορά και απορρόφηση του φωτός σε αυτό το εύρος μηκών κύματος.



Εικόνα 11: Βάθος διείσδυσης φωτός στο ανθρώπινο δέρμα. Το υπέρυθρο φως διεισδύει περίπου 4-5 mm, το υπεριώδες δεν διεισδύει σχεδόν καθόλου και το μπλε μόλις 1 mm. ^[10]

Οι Kawauchi et al. (2004) συζήτησαν τις διαφορές ως προς την κυτταροτοξικότητα στην PDT χρησιμοποιώντας ένα παλμικό λέιζερ και ένα συνεχές λέιζερ, επισημαίνοντας το ρόλο της κατανάλωσης οξυγόνου και της φωτοεξασθένησης στη διαδικασία [61]. Η έρευνα τόνισε τη σημασία της βελτιστοποίησης της διείσδυσης του φωτός για την ενίσχυση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας της PDT.

Εκτός από το μήκος κύματος, ο τύπος του λέιζερ που χρησιμοποιείται στη PDT παίζει επίσης ζωτικό ρόλο στον καθορισμό της διείσδυσης του φωτός. Τα παλμικά λέιζερ και τα συνεχή λέιζερ έχουν διαφορετικές επιπτώσεις στη διείσδυση του φωτός και, κατά συνέπεια, στο αποτέλεσμα της θεραπείας. Οι Strasswimmer και Grande (2006) διερεύνησαν την αποτελεσματικότητα των παλμικών λέιζερ στη PDT, θέτοντας ερωτήματα για τη αποτελεσματικότητα τους συγκριτικά με τα συνεχή λέιζερ [62]. Αυτή η σύγκριση είναι κρίσιμη καθώς βοηθά στην επιλογή του κατάλληλου τύπου λέιζερ βάσει του απαιτούμενου βάθους διείσδυσης του φωτός για αποτελεσματική θεραπεία.

Η χωρική κατανομή του φωτοευαίσθητου παράγοντα είναι ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τη διείσδυση του φωτός. Η εντοπισμένη παρουσία του φωτοευαίσθητου παράγοντα μέσα στον ιστό καθορίζει πώς το φως αλληλεπιδρά με τα κύτταρα-στόχους. Ένας καλά κατανομημένος φωτοευαίσθητος παράγοντας εξασφαλίζει μια ομοιόμορφη διείσδυση του φωτός, αυξάνοντας το ποσοστό επιτυχίας της θεραπείας [63].

Γενικά, η διείσδυση του φωτός στη φωτοδυναμική θεραπεία είναι μια περίπλοκη και πολυδιάστατη παράμετρος που επηρεάζει σημαντικά την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Η βελτιστοποίηση της διείσδυσης του φωτός μέσω της επιλογής του κατάλληλου μήκους κύματος, του τύπου του λέιζερ και του φωτοευαίσθητου παράγοντα, καθώς και η κατάλληλη κατανομή του παράγοντα μέσα στον ιστό, μπορεί να οδηγήσει σε βελτιωμένα αποτελέσματα θεραπείας και να προσφέρει νέες ευκαιρίες για τη θεραπεία καρκίνου και άλλων νοσημάτων.

3.2 Συγκέντρωση Φαρμάκου στους Ιστούς – Tissue drug concertation

Η συγκέντρωση των φαρμάκων μέσα στους ιστούς παίζει καίριο ρόλο στον καθορισμό της αποτελεσματικότητας της φωτοδυναμικής θεραπείας (PDT). Αυτή η θεραπευτική προσέγγιση βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ ενός φωτοευαίσθητοποιητικού παράγοντα, του φωτός και του οξυγόνου για την παραγωγή ROS, τα οποία είναι ικανά να προκαλέσουν βλάβη και θάνατο των κυττάρων. Η ικανότητα του φωτοευαίσθητοποιητή να διεισδύει και να κατανέμεται ομοιόμορφα στους ιστούς-στόχους είναι κρίσιμη, καθώς επηρεάζει άμεσα την παραγωγή ROS και, κατά συνέπεια, τη συνολική επιτυχία της θεραπείας [66],[67].

Η συγκέντρωση του φαρμάκου στους ιστούς μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος του φωτοευαίσθητοποιητή που χρησιμοποιείται, η οδός χορήγησής του και τα ειδικά χαρακτηριστικά του ιστού-στόχου. Η φαρμακοκινητική

του φωτοευαισθητοποιητικού παράγοντα, που περιλαμβάνει την απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό και την απέκκρισή του, παίζει ζωτικό ρόλο στον καθορισμό της συγκέντρωσής του μέσα στους ιστούς [63],[64]. Επιπλέον, το μοριακό μέγεθος και η λιποφιλία του φωτοευαισθητοποιητή επηρεάζουν την ικανότητά του να παρακάμπτει τους βιολογικούς φραγμούς και να φτάνει στα στοχευόμενα κύτταρα [61],[64].

Ο εντοπισμός του φωτοευαισθητοποιητή μέσα στους ιστούς επηρεάζει επίσης το αποτέλεσμα της PDT. Μια ομοιόμορφη κατανομή είναι ιδανική καθώς διασφαλίζει ότι όλα τα στοχευόμενα κύτταρα εκτίθενται εξίσου στο θεραπευτικό σχήμα, μεγιστοποιώντας την δυνητική βλάβη των κυττάρων κατά την ενεργοποίηση του φωτός. Ο χωρικός εντοπισμός του φωτοευαισθητοποιητή επηρεάζεται από την αλληλεπίδρασή του με διάφορα βιολογικά μόρια και δομές μέσα στους ιστούς, και η βελτιστοποίηση αυτής της κατανομής είναι κρίσιμη για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της φωτοδυναμικής θεραπείας [67],[68].

Η συγκέντρωση του φαρμάκου στους ιστούς κατά τη διάρκεια και αλλά και μετά τη PDT παίζει επίσης σημαντικό ρόλο. Η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή μέσα στους στοχευόμενους ιστούς αλλάζει με τον χρόνο, επηρεαζόμενη τόσο από την απορρόφηση του από τα κύτταρα όσο και από την απομάκρυνσή του από το σώμα. Η παρακολούθηση και η κατανόηση αυτών των διεργασιών είναι απαραίτητες για την βελτιστοποίηση της χρονικής διάρκειας της έκθεσης στο φως, ελαχιστοποιώντας την βλάβη στους γύρω υγιείς ιστούς [64],[65].

Επιπλέον, η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή σε σχέση με τα επίπεδα οξυγόνου μέσα στους ιστούς είναι μια κρίσιμη παράμετρος. Η παραγωγή ROS κατά τη διάρκεια της PDT απαιτεί την παρουσία οξυγόνου, και έτσι η διαθεσιμότητα του οξυγόνου στους στοχευόμενους ιστούς επηρεάζει άμεσα την παραγωγή ROS και την επακόλουθη βλάβη των κυττάρων. Οι ιστοί με επαρκή οξυγόνωση είναι πιθανό να έχουν πιο αποτελεσματική ανταπόκριση στην PDT, ενώ οι υποξικές συνθήκες μπορεί να οδηγήσουν σε μειωμένη παραγωγή ROS και μειωμένη αποτελεσματικότητα της θεραπείας [62],[64]. Η μελλοντική έρευνα και η κλινική πρακτική συνεχίζουν να επικεντρώνονται στην ανάπτυξη στρατηγικών για την βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στους ιστούς, λαμβάνοντας υπόψη την περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ του φωτοευαισθητοποιητή, του φωτός και του οξυγόνου, με τελικό στόχο τη βελτίωση των αποτελεσμάτων για τους ασθενείς [66],[69].

3.3 Επίπεδο Οξυγόνωσης στη Φωτοδυναμική Θεραπεία - Oxygenation level

Το επίπεδο οξυγόνωσης στους ιστούς είναι ένας κρίσιμος παράγοντας για την αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας (PDT), μπορεί να διαφέρει σημαντικά, και επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η ροή του αίματος, ο τύπος του ιστού και η παρουσία οποιωνδήποτε παθολογικών καταστάσεων [64],[69]. Οι ιστοί με υψηλότερη ροή αίματος έχουν γενικά υψηλότερα επίπεδα οξυγόνωσης, εξασφαλίζοντας επαρκή προμήθεια οξυγόνου για την αντίδραση της PDT. Ωστόσο, σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος, η ταχεία ανάπτυξη των κυττάρων μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία υποξικών ή ανοξικών περιοχών, όπου η προμήθεια οξυγόνου είναι ανεπαρκής [63],[64]. Αυτές οι περιοχές χαμηλού οξυγόνου αποτελούν μια σημαντική πρόκληση για την PDT, καθώς η έλλειψη οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη παραγωγή ROS και να μειώσει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας.

Οι στρατηγικές για την υπέρβαση των υποξικών συνθηκών στην PDT έχουν εξερευνηθεί, με έμφαση στη βελτίωση της παράδοσης οξυγόνου στους στοχευμένους ιστούς ή στην αύξηση της αποδοτικότητας παραγωγής ROS υπό συνθήκες χαμηλού οξυγόνου. Μία από αυτές τις στρατηγικές είναι η χρήση πηγών φωτός υψηλού ρυθμού απόδοσης, η οποία έχει δείξει ότι βελτιώνει την παράδοση οξυγόνου και αυξάνει την παραγωγή ROS [68].

Ο ρόλος του οξυγόνου στην PDT εκτείνεται πέρα από τη συμμετοχή του στην παραγωγή ROS. Το οξυγόνο παίζει επίσης κρίσιμο ρόλο στη φωτοκαταστροφή (photobleaching) του φωτοευαίσθητοποιητικού φαρμάκου, μια διαδικασία κατά την οποία το φάρμακο χάνει την ικανότητά του να παράγει ROS όταν εκτίθεται στο φως. Ο ρυθμός της φωτοαποικοδόμησης επηρεάζεται από τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου, με υψηλότερα επίπεδα οξυγόνου να οδηγούν σε ταχύτερους ρυθμούς φωτοκαταστροφής [61].

Επιπλέον, το επίπεδο οξυγόνωσης στους ιστούς επηρεάζει επίσης τον τύπο του κυτταρικού θανάτου που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της PDT. Υψηλότερα επίπεδα οξυγόνου τείνουν να προωθούν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που γενικά θεωρείται ότι είναι πιο ελεγχόμενη και λιγότερο φλεγμονώδης από την νέκρωση. Η νέκρωση, από την άλλη πλευρά, είναι πιο συχνή κάτω από υποξικές συνθήκες. Η σημασία της κατανόησης της σχέσης μεταξύ του επιπέδου οξυγόνωσης και του κυτταρικού θανάτου στην PDT υπογραμμίζεται από την εργασία των Grecco et al. (2013), οι οποίοι εξερεύνησαν την αντίδραση της νέκρωσης στη φωτοδυναμική θεραπεία χρησιμοποιώντας παλμούς φωτός [64].

3.4 Περιβαλλοντικό φως

Το φως παίζει κρίσιμο ρόλο στην έκβαση της φωτοδυναμικής θεραπείας, επηρεάζοντας τη διείσδυση του φωτός, την κατανομή του φωτοευαισθητοποιητή και τα επίπεδα οξυγονώσεως των ιστών [62]. Η κατανομή του φωτός επηρεάζεται από την πηγή του φωτός, το είδος των ιστών, καθώς και από την παρουσία άλλων μορίων που μπορεί να αλληλεπιδρούν με το φως [64]. Η διασπορά του φωτός στους ιστούς εξαρτάται από τις οπτικές ιδιότητες των ιστών και μπορεί να επηρεαστεί από παράγοντες όπως η απορρόφηση, η σκέδαση και η ανάκλαση του φωτός.

Η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να επηρεαστεί από το φως του περιβάλλοντος. Η παρουσία φωτός από άλλες πηγές μπορεί να ενεργοποιήσει τον φωτοευαισθητοποιητή πριν από τη θεραπεία, μειώνοντας την αποτελεσματικότητα της PDT. Για αυτό, η επίδραση του φωτός από το περιβάλλον πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά το σχεδιασμό και την εκτέλεση της φωτοδυναμικής θεραπείας.

3.5 Χωρικός εντοπισμός του φωτοευαισθητοποιητή

Η ακριβής στόχευση των φωτοευαισθητοποιητών στους παθολογικούς ιστούς, εξασφαλίζει μεγαλύτερη συγκέντρωση του φαρμάκου σε αυτούς σε σχέση με τους υγιείς ιστούς και υψηλότερο θεραπευτικό αποτέλεσμα, ελαχιστοποιώντας τις παρενέργειες της θεραπείας [63].

Η φύση του φωτοευαισθητοποιητή, οι χημικές του ιδιότητες και η αλληλεπίδρασή του με τα βιολογικά μόρια παίζουν σημαντικό ρόλο στην κατανομή του μέσα στο σώμα. Οι υδρόφοβοι φωτοευαισθητοποιητές τείνουν να συσσωρεύονται στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ οι υδρόφιλοι μπορεί να έχουν μια πιο διάχυτη κατανομή, επηρεάζοντας την ικανότητά τους να παράγουν ROS κατά την ενεργοποίησή τους από το φως [65].

Η οδός χορήγησης του φωτοευαισθητοποιητή είναι άλλος ένας κρίσιμος παράγοντας που επηρεάζει τον χωρικό εντοπισμό του. Η συστηματική χορήγηση μπορεί να οδηγήσει σε πιο ομοιόμορφη κατανομή, αλλά επίσης ενέχει τον κίνδυνο συσσώρευσης του φωτοευαισθητοποιητή σε μη στοχευμένους ιστούς. Από την άλλη πλευρά, η τοπική χορήγηση μπορεί να ενισχύσει την επιλεκτικότητα της συσσώρευσης του φωτοευαισθητοποιητή στους ιστούς-στόχους, αλλά να παρουσιάζει προκλήσεις στην προσπάθεια ο φωτοευαισθητοποιητής να φτάσει σε βαθύτερες ή λιγότερο προσβάσιμες περιοχές [61],[69].

Ο τύπος του ιστού και τα χαρακτηριστικά του παίζουν επίσης ρόλο στον εντοπισμό των φωτοευαισθητοποιητών. Οι ιστοί με υψηλή αγγειοποίηση μπορούν να απορροφούν υψηλότερα τους φωτοευαισθητοποιητές, ενώ τα πυκνά στρώματα ιστών μπορούν να αποτελέσουν εμπόδια στη διείσδυσή τους στον στόχο. Η παρουσία ορισμένων υποδοχέων στην επιφάνεια του κυττάρου μπορούν σε ορισμένες περιπτώσεις να χρησιμοποιηθούν για τη στοχευμένη χορήγηση

φωτοευαισθητοποιητών, μέσω από τις αλληλεπιδράσεις των ligand-gated channels προς ενίσχυση της επιλεκτικότητας [62].

3.6 Ισχύς ακτινοβολίας

Η ισχύς της ακτινοβολίας αποτελεί κρίσιμο παράγοντα στο πεδίο της φωτοδυναμικής θεραπείας, επηρεάζοντας τόσο την αποτελεσματικότητα όσο και την ασφάλεια της θεραπείας. Η ισχύς της πηγής ακτινοβολίας καθορίζει την ποσότητα του φωτός που παραδίδεται στον ιστό και, κατά συνέπεια, το επίπεδο ενεργοποίησης του φωτοευαισθητοποιητή που χρησιμοποιείται στη θεραπεία. Αυτό το κεφάλαιο θα εξετάσει τον ρόλο της ισχύος ακτινοβολίας στην φωτοδυναμική θεραπεία, αναλύοντας τις επιπτώσεις της στα αποτελέσματα της θεραπείας και τις παραμέτρους που πρέπει να ληφθούν υπόψη για τη βελτιστοποίησή της.

Η διείσδυση του φωτός στον ιστό είναι ένα ζωτικό στοιχείο της φωτοδυναμικής θεραπείας, καθώς επηρεάζει άμεσα την ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή. Μια υψηλότερη ισχύς ακτινοβολίας μπορεί να ενισχύσει τη διείσδυση του φωτός, διασφαλίζοντας ότι ο φωτοευαισθητοποιητής ενεργοποιείται ακόμα και σε βαθύτερους ιστούς. Ωστόσο, αυτό συνεπάγεται τον κίνδυνο βλάβης των υγιών ιστών, ειδικά σε περιπτώσεις όπου ο φωτοευαισθητοποιητής δεν είναι αποκλειστικά εντοπισμένος στον στοχευμένο ιστό [4],[61]. Η ισορροπία μεταξύ της επίτευξης επαρκούς διείσδυσης του φωτός και της ελαχιστοποίησης της βλάβης στους υγιείς ιστούς είναι, επομένως, κρίσιμη.

Η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή στον ιστό είναι ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζεται από την ισχύ της ακτινοβολίας. Μια υψηλότερη ισχύς ακτινοβολίας μπορεί να οδηγήσει σε πιο γρήγορη αποικοδόμηση του φωτοευαισθητοποιητή, μειώνοντας τη συγκέντρωσή του στον ιστό και πιθανώς επηρεάζοντας την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Στρατηγικές για την αντιμετώπιση του φαινομένου αυτού περιλαμβάνουν τη χρήση μη συνεχούς παράδοσης φωτός ή την προσαρμογή της ισχύος ακτινοβολίας βάσει της συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή στον ιστό [65],[66].

Ακόμη, η ισχύς της ακτινοβολίας μπορεί να επηρεάσει το επίπεδο οξυγόνωσης, με μια υψηλότερη ισχύ να οδηγεί πιθανώς σε πιο γρήγορη εξάντληση του οξυγόνου, επηρεάζοντας την παραγωγή των ROS [61]. Η βελτιστοποίηση της ισχύος ακτινοβολίας είναι, επομένως, ουσιαστική για να διασφαλιστεί ότι υπάρχει επαρκές οξυγόνο διαθέσιμο.

Ως εκ τούτου, η επιλογή μεταξύ συνεχούς κύματος ακτινοβολίας (CW) και παλμικών πηγών ακτινοβολίας αποτελεί ένα ακόμη ζήτημα προς εξέταση στη φωτοδυναμική θεραπεία. Οι παλμικές πηγές μπορούν να παρέχουν υψηλή ισχύ ακτινοβολίας σε σύντομα χρονικά διαστήματα, πετυχαίνοντας πιθανώς βαθύτερη διείσδυση στους ιστούς και πιο αποτελεσματική ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή χωρίς να προκαλείται θερμική βλάβη. Ωστόσο, οι βέλτιστες παράμετροι για την παλμική

ακτινοβολήση, συμπεριλαμβανομένης της διάρκειας του παλμού και της συχνότητας επανάληψης, πρέπει να επιλέγονται με προσοχή βάσει της εκάστοτε κλινικής εφαρμογής [64],[62].

3.7 Ενέργεια Ακτινοβολίας στη Φωτοδυναμική Θεραπεία

Η ενέργεια ακτινοβολίας παίζει καίριο ρόλο στη φωτοδυναμική θεραπεία, επηρεάζοντας την αποτελεσματικότητα της θεραπείας και τις βιολογικές αντιδράσεις που προκαλεί.

Ένα κρίσιμο στοιχείο προς αυτή την κατεύθυνση αποτελεί ο τύπος της πηγής φωτός που χρησιμοποιείται, καθώς επηρεάζει άμεσα την κατανομή της ενέργειας ακτινοβολίας. Οι συνεχείς πηγές λέιζερ (CW) και τα παλμικά λέιζερ είναι οι δύο κύριοι τύποι πηγών φωτός που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία. Τα λέιζερ συνεχούς ακτινοβολίας εκπέμπουν φως συνεχώς, ενώ τα παλμικά λέιζερ απελευθερώνουν φως σε παλμούς, έχοντας τη δυνατότητα να παρέχουν υψηλότερη ισχύ κορυφής χωρίς να αυξάνουν τη μέση ισχύ [61].

Η ενέργεια ακτινοβολίας από τα παλμικά λέιζερ, ειδικά σε επίπεδα femtosecond, έχει δείξει ότι προκαλεί μια μοναδική αντίδραση στους βιολογικούς ιστούς, οδηγώντας σε νέκρωση στις στοχευμένες περιοχές. Αυτό μειώνει τη ζημιά στους γύρω υγιείς ιστούς, βελτιώνοντας την επιλεκτικότητα και την ασφάλεια της θεραπείας [64]. Επιπλέον, η διακοπτόμενη φύση του παλμικού φωτός επιτρέπει καλύτερη αναπλήρωση του οξυγόνου στη θεραπευτική περιοχή, πιθανόν οδηγώντας σε καλύτερα αποτελέσματα [61].

Η εξέλιξη στην τεχνολογία έχει οδηγήσει επίσης στην ανάπτυξη νέων φωτοευαίσθητοποιητών και συστημάτων παράδοσης φωτός, επιτρέποντας μεγαλύτερο έλεγχο της ενέργειας ακτινοβολίας. Αυτές οι καινοτομίες έχουν επεκτείνει τις εφαρμογές της φωτοδυναμικής θεραπείας, καθιστώντας την μια βιώσιμη επιλογή για διάφορους ιατρικούς τομείς, όπως η ογκολογία, η δερματολογία και η οφθαλμολογία [4].

3.8 Τρόποι ακτινοβόλησης

3.8.1 Φωτοδυναμική θεραπεία με πηγή συνεχούς εκπομπής φωτός – *Continuous Waved Photodynamic Therapy (CW)*

Στην προηγούμενη υποενότητα αναλύθηκε το ότι ένα από τα κρίσιμα στοιχεία της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι ο τύπος της πηγής φωτός που χρησιμοποιείται, καθώς επηρεάζει σημαντικά την κατανομή της ενέργειας ακτινοβολίας και, κατά συνέπεια, την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Σε αυτό το πλαίσιο, τα λέιζερ συνεχούς κύματος (CW) παίζουν καίριο ρόλο στις εφαρμογές της.

Τα λέιζερ CW εκπέμπουν φως συνεχώς, παρέχοντας μια σταθερή και ομοιόμορφη κατανομή του φωτός στην περιοχή θεραπείας. Αυτό το χαρακτηριστικό μπορεί να είναι ευεργετικό για να εξασφαλίσει τη συνεπή ενεργοποίηση του φωτοευαίσθητοποιητή σε όλη τη ζώνη θεραπείας, οδηγώντας σε ομοιόμορφα θεραπευτικά αποτελέσματα [66].

Τα λέιζερ CW, με την ομοιόμορφη κατανομή τους, μπορεί να είναι ευεργετικά όταν ο φωτοευαίσθητοποιητής είναι ομοιόμορφα κατανεμημένος σε όλον τον στοχευμένο ιστό. Αυτό διασφαλίζει ότι όλες οι περιοχές που περιέχουν το φωτοευαίσθητο λαμβάνουν επαρκή έκθεση στο φως, συμβάλλοντας στη συνολική αποτελεσματικότητα της θεραπείας [4].

Ωστόσο, η συνεχής φύση των λέιζερ CW μπορεί επίσης να παρουσιάσει προκλήσεις στη Φωτοδυναμική θεραπεία. Για παράδειγμα, υπάρχει κίνδυνος φωτοαποικοδόμησης, όπου ο φωτοευαίσθητοποιητής διασπάται λόγω της παρατεταμένης έκθεσης στο φως, μειώνοντας την αποτελεσματικότητά του. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα λέιζερ CW μπορεί να προκαλέσουν μεγαλύτερη φωτοαποικοδόμηση σε σύγκριση με τα παλμικά λέιζερ, πιθανόν επηρεάζοντας το αποτέλεσμα της θεραπείας [61].

Τα λέιζερ CW έχουν βρει εφαρμογές σε διάφορους ιατρικούς τομείς, όπως η ογκολογία, η δερματολογία και η οφθαλμολογία. Στην ογκολογία, για παράδειγμα, η Φωτοδυναμική θεραπεία με λέιζερ CW χρησιμοποιείται για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου, ενώ στη δερματολογία χρησιμοποιείται για τη θεραπεία καταστάσεων όπως η ακμή και οι δερματικές βλάβες που προκαλούνται από τον ήλιο [67].



Εικόνα 12: Εφαρμογή CW Φωτοδυναμικής Θεραπείας για την ακμή, το πριν και το μετά ^[11]

Με την κατάλληλη διαχείριση των παραμέτρων, τα λέιζερ CW μπορούν να προσφέρουν αποτελεσματικές και ασφαλείς θεραπείες για μια πληθώρα ιατρικών καταστάσεων.

3.8.2 Φωτοδυναμική θεραπεία με πηγή παλμικής ακτινοβολίας - Fractionated Photodynamic Therapy (Pulsed)

Η Φωτοδυναμική θεραπεία με πηγή παλμικού φωτός αποτελεί μια καινοτόμο προσέγγιση στην ιατρική θεραπεία, ειδικά στον τομέα της ογκολογίας και της δερματολογίας. Σε αντίθεση με την συμβατική PDT, η οποία χορηγεί μία μόνο, έντονη δόση φωτός, η παλμική ακτινοβολία διαιρεί την έκθεση στο φως σε μικρότερες μη συνεχείς δόσεις, με περιόδους ανάκαμψης (dark intervals). Αυτή η μέθοδος στοχεύει στην ενίσχυση της οξυγόνωσης των ιστών και της συνολικής αποτελεσματικότητας της θεραπείας [4].

Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της είναι η διατήρηση των βέλτιστων επιπέδων οξυγόνου στους θεραπευόμενους ιστούς. Το οξυγόνο παίζει κρίσιμο ρόλο στην PDT, καθώς αλληλεπιδρά με τον φωτοευαισθητοποιητή παράγοντα ROS, τα οποία είναι υπεύθυνα για την πρόκληση βλάβης και θανάτου των κυττάρων στην στοχευόμενη περιοχή. Στην συμβατική PDT, η ταχεία κατανάλωση οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει σε υποξικές συνθήκες, μειώνοντας πιθανώς την αποτελεσματικότητα. Η Fractionated Photodynamic Therapy αντιμετωπίζει αυτό το πρόβλημα, επιτρέποντας στα επίπεδα οξυγόνου να αναπληρωθούν κατά τις περιόδους ανάκαμψης, και ως εκ τούτου εξασφαλίζοντας μια πιο συνεπή και αποτελεσματική παραγωγή ROS [61].

Συνήθως, η ισχύς της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται στην Fractionated PDT είναι χαμηλότερη από αυτή στην CW PDT. Ωστόσο, επειδή η θεραπεία εκτείνεται σε μια περισσότερο παρατεταμένη περίοδο, η συνολική ενέργεια που παραδίδεται μπορεί να είναι παρόμοια ή ακόμη και υψηλότερη [66].

Επιπρόσθετα, η Fractionated PDT έχει δείξει υποσχόμενα αποτελέσματα στην ενίσχυση της ανοσοαπόκρισης του οργανισμού ενάντια στα καρκινικά κύτταρα. Με την πρόκληση μιας ελεγχόμενης μορφής βλάβης των κυττάρων, μπορεί να διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα ώστε να αναγνωρίζει και να επιτίθεται στα καρκινικά κύτταρα, ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα της θεραπείας [67]. Αυτό μπορεί να είναι ιδιαίτερος ωφέλιμος στη θεραπεία ορισμένων τύπων καρκίνου, όπου το ανοσοποιητικό σύστημα παίζει κρίσιμο ρόλο στον έλεγχο της προόδου της νόσου.

Συνοψίζοντας, η Φωτοδυναμική θεραπεία με χρήση παλμικού φωτός αντιπροσωπεύει μια σημαντική πρόοδο στον τομέα της ιατρικής, προσφέροντας μια πιθανώς πιο αποτελεσματική προσέγγιση για τη θεραπεία διαφόρων παθήσεων. Μέσω της προσεκτικής διαχείρισης κρίσιμων παραγόντων όπως η οξυγόνωση, η διείσδυση του φωτός και η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή, καθώς και της αξιοποίησης της ανοσοαπόκρισης του σώματος, υπόσχεται να βελτιώσει τα

αποτελέσματα της θεραπείας, να μειώσει τις παρενέργειες και να επεκτείνει τις κλινικές εφαρμογές της PDT [4].

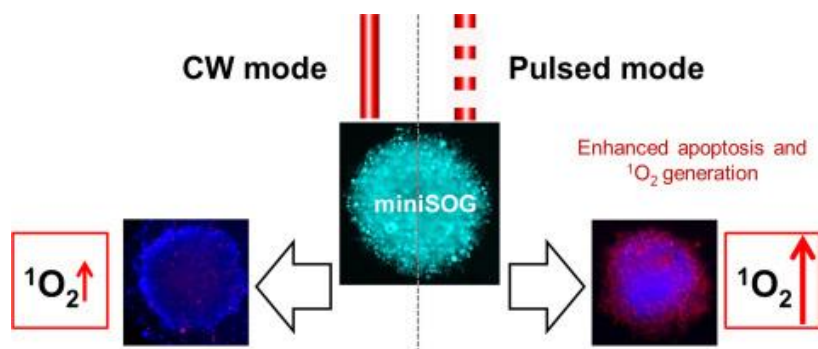
3.8.3 Σύγκριση πειραματικών αποτελεσμάτων μεταξύ CW και Pulsed Photodynamic Therapy με βάση τη βιβλιογραφία

Οι συγκρίσεις μεταξύ των λέιζερ CW και των παλμικών λέιζερ έχουν διεξαχθεί για να κατανοηθούν οι διαφορές τους και να καθοριστούν οι πιο κατάλληλες εφαρμογές για τον καθένα στη φωτοδυναμική θεραπεία. Γενικά, η πηγές συνεχούς ακτινοβολίας στη φωτοδυναμική θεραπεία έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές σε περιπτώσεις όπου απαιτείται συνεχής και ομοιόμορφη έκθεση στο φως, όπως στη θεραπεία ορισμένων επιφανειακών καρκινωμάτων [5]. Αντίθετα, η παλμική φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να προσφέρει βελτιωμένη διείσδυση και μείωση της θερμικής βλάβης στον γύρω υγρή ιστό, όπως έχει αποδειχθεί σε πειραματικές μελέτες πάνω σε ποντίκια [64]. Ενώ τα παλμικά λέιζερ μπορούν να προσφέρουν υψηλότερη ισχύ κορυφής χωρίς την αύξηση της μέσης ισχύος, τα λέιζερ CW παρέχουν μια σταθερή έξοδο φωτός που μπορεί να είναι ευεργετική για συγκεκριμένα κλινικά σενάρια.

Η έρευνα του John Strasswimmer και του Donald J. Grande παρουσιάζει μια κρίσιμη αξιολόγηση των παλμικών laser (Pulsed Dye Laser – PDL και Intense Pulsed Light – IPL) έναντι του συνεχούς κύματος (CW) μπλε φωτός [62]. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, οι ερευνητές προετοίμασαν με προσοχή το προστατευμένο από την ηλιακή ακτινοβολία δέρμα με μικρή δερμοτοαπόξεση, καθαρισμό με ακετόνη, κι εν συνεχεία με εφαρμογή ALA (αμινολεβουλινικού οξέος). Τα ευρήματα της μελέτης αυτής υποδηλώνουν ότι τα παλμικά λέιζερ, αν και ικανά να ενεργοποιήσουν την PDT, παράγουν σημαντικά λιγότερο ισχυρές αντιδράσεις σε σύγκριση με τις CW πηγές.

Στον αντίποδα, μελέτες καταδεικνύουν ότι τα παλμικά λέιζερ μπορεί να προσφέρουν πλεονεκτήματα όσον αφορά την κατανάλωση οξυγόνου και την φωτοαποικοδόμηση. Αυτό ενδέχεται να οφείλεται στον διαλείποντα χαρακτήρα της παλμικής θεραπείας, ο οποίος επιτρέπει την ανάπαυση και την αναγέννηση του οξυγόνου στον ιστό, βελτιώνοντας έτσι την οξυγονώση και ενισχύοντας τη φωτοτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, έρευνα του S. Kawauchi, του Y. Morimoto και της ομάδας τους, «φωτίζει» λίγο περισσότερο τις περίπλοκες διαφορές στην αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας μεταξύ των παλμικών και συνεχών κυμάτων λέιζερ. Εστιάζοντας στην κυτταροτοξικότητα, την κατανάλωση οξυγόνου και τη φωτοαποικοδόμηση, η έρευνα αυτή χρησιμοποίησε μια σειρά κυττάρων καρκινώματος νεφρού ποντικού (Rencα) και τον υδρόφιλο φωτοευαισθητοποιητή PAD-S31. Τα ευρήματα αυτής της μελέτης συνηγορούν στο ότι τα παλμικά λέιζερ μπορεί πράγματι να ενισχύσουν την οξυγονώση της θεραπευόμενης περιοχής και να βελτιώσουν τα αποτελέσματα σε σύγκριση με τη αντίστοιχη θεραπεία με CW λέιζερ [61].

Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν καταδείξει πως η παλμική φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερα αποτελέσματα σε πάσχουσες περιοχές που βρίσκονται σε βάθος, μειώνοντας τον κίνδυνο υποτροπής, σε σύγκριση με την CW θεραπεία [66].



Εικόνα 13: Σύγκριση συνεχούς και παλμικής ακτινοβολήσης στη φωτοδυναμική θεραπεία [12]

Σε μια άλλη ενδιαφέρουσα συγκριτική μελέτη, ωστόσο, οι Panjehpour και Overholt επισήμαναν μέσω των αποτελεσμάτων την παρόμοια αποτελεσματικότητα των παλμικών και CW λέιζερ στην πρόκληση θεραπευτικής αντίδρασης [66]. Αναλυτικότερα, η μελέτη παρείχε μια βαθιά ανάλυση των ιστολογικών αλλαγών που προκλήθηκαν από το συνεχές και το παλμικό φως μέσω της χρήσης της Photofrin. Οι μακροπρόθεσμες επιδράσεις της βλάβης από την PDT, αξιολογήθηκαν μέσα σε μια περίοδο τριών εβδομάδων κι αξιοσημείωτα, τα αποτελέσματα υποδήλωσαν παρόμοιες αντιδράσεις των ιστών, συμπεριλαμβανομένων της υποξείας αγγειακής νέκρωσης, της ήπιας περιαγγειακής αιμορραγίας και της μέτριας υποξείας φλεγμονής.

Είναι εμφανές, λοιπόν, πως η απόφαση για την επιλογή της καλύτερης μορφής φωτοδυναμικής θεραπείας, είτε συνεχούς κύματος (CW) είτε παλμικής (fractionated), δεν είναι απλή, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες κι η δυνατότητα επιλογής απαιτεί λεπτομερή κατανόηση των βιολογικών μηχανισμών του καρκινικού ιστού και της ανταπόκρισής του στα διάφορα ακτινοβολητικά μοτίβα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΙ ΟΥΣΙΕΣ

4.1 Σκοπός Μελέτης

Σημαντικό ρόλο στη φωτοδυναμική θεραπεία παίζει το θεραπευτικό της σχήμα. Κεντρικός στόχος αυτής της εργασίας είναι η συγκριτική μελέτη της συνεχούς και παλμικής ακτινοβολήσης με σκοπό τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας τους στη φωτοδυναμική θεραπεία. Στη διπλωματική αυτή περιλαμβάνονται οι εξής μελέτες:

- Σχεδιασμός και ανάπτυξη διάταξης ακτινοβολήσης
- Ανάπτυξη λογισμικού για την αυτοματοποίηση των σχημάτων ακτινοβολήσης.
- Συγκριτική μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης μείγματος κουρκουμίνης in vitro με συνεχή (CW PDT) και παλμική ακτινοβολήση (fractionated PDT).

4.2 Πειραματικές Διατάξεις

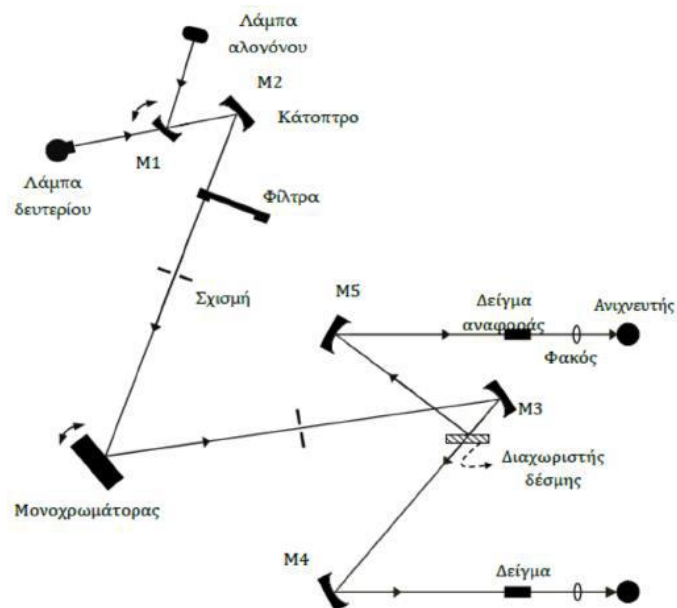
4.2.1 Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης

Για την πραγματοποίηση των απαραίτητων πειραμάτων και την ολοκλήρωση της εργασίας χρησιμοποιήθηκε μια φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης, με σκοπό τη μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων απορρόφησης του μείγματος της κουρκουμίνης και των συστατικών του αλλά και τη μελέτη της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών αυτών των ουσιών. Η λήψη και η καταγραφή των φασμάτων απορρόφησης έγινε με το φασματοφωτόμετρο Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS, το οποίο λειτουργεί στην περιοχή του υπεριώδους και ορατού φωτός.



Εικόνα 14: Φασματοφωτόμετρο Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS

Το οπτικό διάγραμμα του οργάνου και η πορεία που ακολουθεί η δέσμη παρουσιάζεται και περιγράφεται κατωτέρω:



Εικόνα 15: Οπτικό διάγραμμα οργάνου και πορεία δέσμης φωτός ^[3]

Το συγκεκριμένο φασματόμετρο έχει ενσωματωμένες δύο φωτεινές πηγές: μια λάμπα δευτερίου, η οποία καλύπτει την υπεριώδη περιοχή του φάσματος (200-400nm), και μια λάμπα αλογόνου για την κάλυψη της ορατής και κοντινής υπέρυθρης περιοχής (350-900nm). Με αυτόν τον τρόπο καλύπτεται όλο το εύρος μηκών κύματος του οργάνου.

Κατά τη λειτουργία στην περιοχή του ορατού φωτός, το κάτοπτρο M1 ανακλά το προερχόμενο από τη λάμπα αλογόνου φως και το οδηγεί στο κάτοπτρο M2. Ταυτόχρονα, το κάτοπτρο M1 προκαλεί το μπλοκάρισμα της ακτινοβολίας που προέρχεται από λάμπα δευτερίου. Για τη λειτουργία του συστήματος στην υπέρυθρη περιοχή, το κάτοπτρο M1 ανασηκώνεται έτσι ώστε να επιτρέπεται η διέλευση του φωτός από τη λάμπα δευτερίου και, εν συνεχεία, η πρόσπτωσή του στο κάτοπτρο M2. Η πηγή αλλάζει αυτόματα, καθώς περιστρέφεται ο μονοχρωμάτορας.

Ακολούθως, γίνεται ανάκλαση της ακτινοβολία της φωτεινής πηγής στο κάτοπτρο M2 και η οδήγησή της σε έναν τροχό φίλτρων, ο οποίος με τη σειρά του οδηγείται από έναν βηματικό κινητήρα, ώστε να συγχρονίζεται με το μονοχρωμάτορα. Με βάση την περιοχή μήκους κύματος, η περιστροφή του τροχού πραγματοποιείται ώστε κάθε φορά το κατάλληλο φίλτρο να παρεμβάλλεται στην πορεία της δέσμης, για να την φιλτράρει πριν την είσοδό της στον μονοχρωμάτορα. Από τον τροχό των οπτικών φίλτρων, η δέσμη διέρχεται στο μονοχρωμάτορα μέσω της σχισμής εισόδου του. Στο φράγμα περίθλασης, η φωτεινή δέσμη διασκορπίζεται για να παραχθεί ένα φάσμα.

Η περιστροφική θέση που έχει το φράγμα την εκάστοτε στιγμή, καθορίζει το τμήμα του φάσματος αυτού που θα αντανάκλασεί μέσω της σχισμής εξόδου του μονοχρωμάτορα στο κάτοπτρο M3. Μέσω της σχισμής αυτής, το τμήμα του φάσματος περιορίζεται σε μια σχεδόν μονοχρωματική δέσμη ακτινοβολίας.

Η φωτεινή δέσμη οδηγείται από το κάτοπτρο M3 σε έναν διαχωριστή δέσμης. Το 50% της ακτινοβολίας διέρχεται προς το κάτοπτρο M4 ενώ το υπόλοιπο 50% ανακλάται από τον διαχωριστή δέσμης και κατόπιν οδηγείται στο κάτοπτρο M5. Το κάτοπτρο M4 πραγματοποιεί την εστίαση της ακτινοβολίας στο υπό εξέταση δείγμα. Η ακτινοβολία, μετά, περνάει μέσα από έναν κυρτό φακό στη φωτοδίοδο-ανιχνευτή. Ομοίως, η ακτινοβολία εστιάζεται στο δείγμα αναφοράς από το κάτοπτρο M5 συνεχίζει την διαδρομή της, περνώντας μέσω ενός κυρτού φακού στη φωτοδίοδο. Η τοποθέτηση του δείγματος εξέτασης και αναφοράς γίνεται σε δύο όμοιες κυβέτες που εισάγονται στις κατάλληλες υποδοχές του οργάνου.



Εικόνα 16: Υποδοχείς του φασματοφωτόμετρου για τις κυβέτες

Το ανωτέρω φασματοφωτόμετρο απορρόφησης ελέγχεται μέσω υπολογιστή, με τη βοήθεια του λογισμικού πακέτου UV WinLab, το οποίο επιτρέπει τη ρύθμιση διαφόρων παραμέτρων αλλά και τον τρόπο παρουσίασης των αποτελεσμάτων.

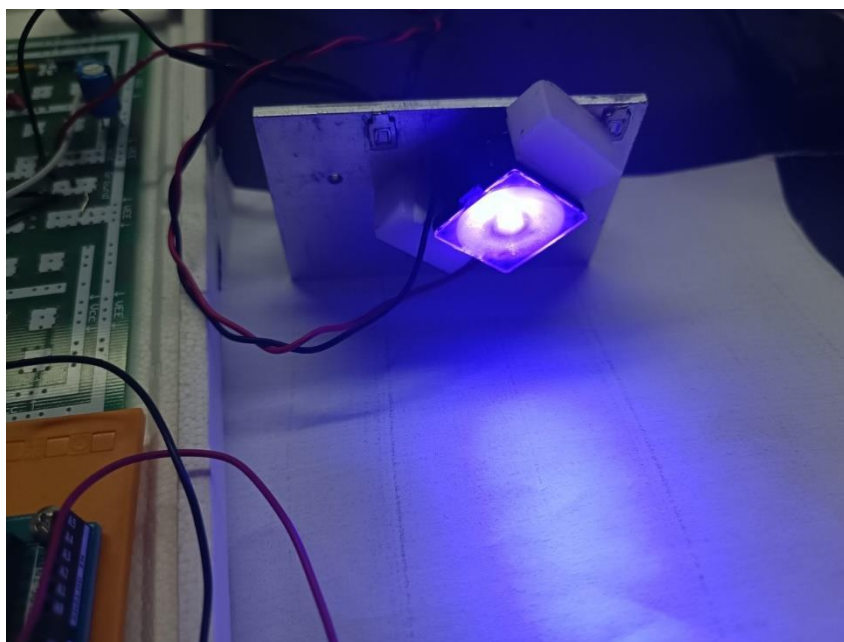
Μπορούν να ρυθμιστούν τα εξής:

- Να επιλεγεί το εύρος και η περιοχή των μηκών κύματος για την οποία θα πραγματοποιηθεί μέτρηση απορρόφησης των εκάστοτε ουσιών.
- Να επιλεγεί το μέγεθος της σχισμής του μονοχρωμάτορα.
- Να καθοριστεί η ταχύτητα σάρωσης.
- Να μηδενιστεί το σήμα που προέρχεται από τον διαλύτη και τον θόρυβο του φασματοφωτόμετρου, μέσω της διαθέσιμης επιλογής *Autozero*.
- Να εξομαλυνθούν και επεξεργαστούν τα φάσματα της πειραματικής διαδικασίας.

4.2.2 Διάταξη ακτινοβολήσης

Για την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε διάταξη ακτινοβολήσης με σκοπό να μελετηθεί η ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών μετά από ακτινοβόληση του μείγματος κουρκουμίνης, όσο και για τη μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης *in vitro* μετά από συνεχή και παλμική ακτινοβόληση.

Ως πηγή φωτός χρησιμοποιήθηκε το Led το οποίο φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:

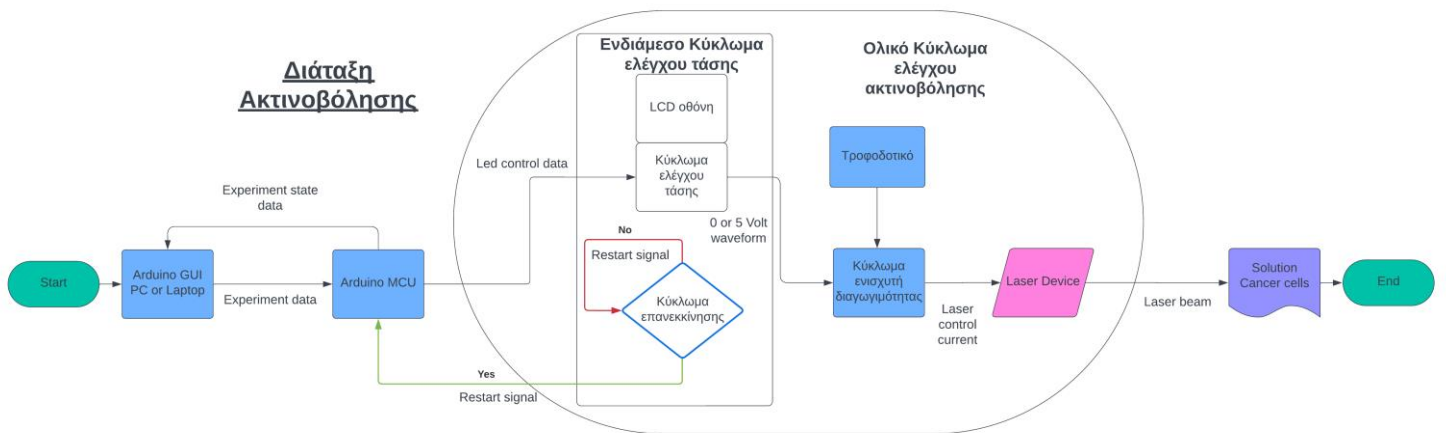


Εικόνα 17: Πηγή ακτινοβολίας

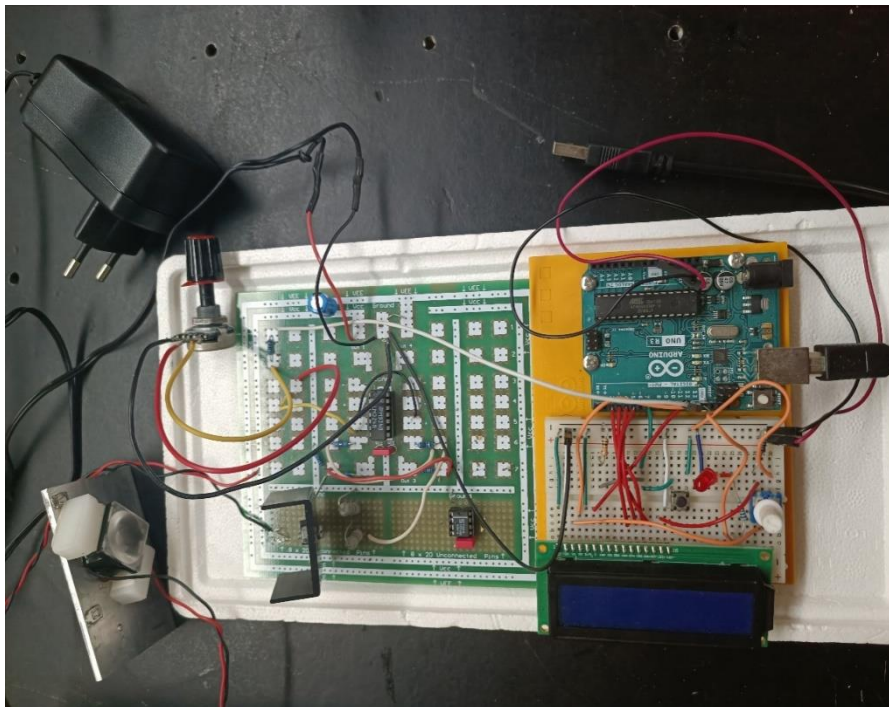
Η εκπεμπόμενη ενέργεια της πηγής ακτινοβολίας ρυθμιζότανε καταλλήλως μέσω συγκεντρωτικού φακού.

Η διάταξη ακτινοβολήσης που κατασκευάστηκε εκτός από την πηγή ακτινοβολίας περιλαμβάνει ποτενσιόμετρο για ρύθμιση της έντασης ακτινοβολήσης, ψύκτρα με ενσωματωμένο ανεμιστήρα, και ένα σύστημα ελέγχου με εξωτερική τροφοδοσία 9 Volt, αποτελούμενο από δύο βασικά υποκυκλώματα, το οποίο αυτοματοποιεί το σχήμα της κάθε ακτινοβολήσης μέσω υπολογιστή.

Παρακάτω, παρουσιάζεται το block διάγραμμα της διάταξης ακτινοβολήσης που αναπτύχθηκε:

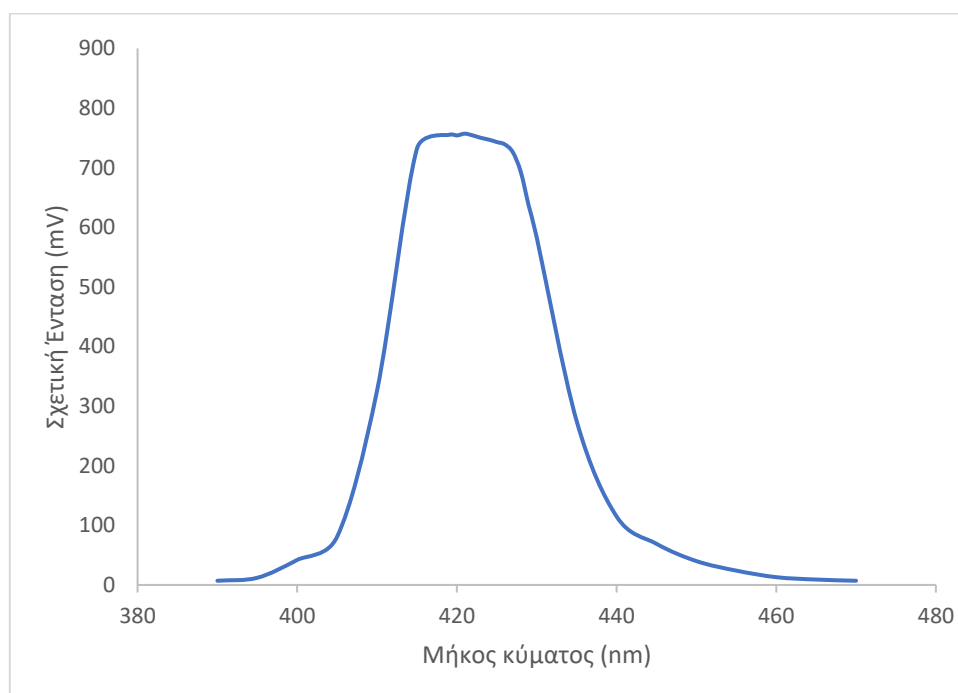


Εικόνα 18: Block diagram διάταξης ακτινοβολήσης



Εικόνα 19: Διάταξη ακτινοβολήσης

Πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων ακτινοβολήσης, έγινε η μέτρηση της έντασης ακτινοβολίας ως προς το μήκος κύματος (διάγραμμα 1). Η μέτρηση αυτή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της πηγής, του μονοχρωμάτορα, μιας αντίστασης και ενός πολυμέτρου. Η ακτινοβολία της πηγής προσπίπτει στην είσοδο του μονοχρωμάτορα και γίνεται η ανάλυσή της. Στην έξοδο του μονοχρωμάτορα, επιλέγεται διαδοχικά μια στενά καθορισμένη φασματική περιοχή. Η μονοχρωματική ακτινοβολία που εξέρχεται προκαλεί στην συνδεδεμένη αντίσταση ανάπτυξη τάσης ανάλογη με την ένταση ακτινοβολήσης. Η τάση αυτή μετριέται με τη χρήση του πολυμέτρου.



Διάγραμμα 1: Κατανομή ακτινοβολίας της πηγής στα διάφορα μήκη κύματος

4.3 Ψηφιακό θερμόμετρο thandar TH 302



Εικόνα 20: Ψηφιακό θερμόμετρο

Καθότι, όπως θα περιγραφεί και αναλυτικότερα σε επόμενη ενότητα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, χρησιμοποιήθηκε ψηφιακό θερμόμετρο ώστε να ελέγχεται ότι κάθε πείραμα διεξάγεται στην επιθυμητική θερμοκρασιακή τιμή.

4.4 Ενεργόμετρο – Laser Power meter 3A-FS (CW & Pulsed μετρήσεις 60μW-3W, 15μJ-2J)



Εικόνα 21: Laser power meter

Η μέτρηση της ισχύος ακτινοβολήσης πραγματοποιήθηκε μέσω του Laser Power meter 3A-FS. Τα χαρακτηριστικά της κεφαλής του οργάνου παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

3A-FS	3 Watt Power/Energy Meter for low power lasers with removable fused silica window
Use	Very low power and energy lasers
Features	Very sensitive, low noise, fast response
Response time	1.8 s
Energy threshold	15μJ
Maximum Average Power Density	200W/cm ²
Maximum Energy Density J/cm ²	0.3 for <100ns pulses

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά Laser Power meter 3A-FS

4.5 Σύστημα Ελέγχου

4.5.1 Εισαγωγή

Στον παρόν στάδιο χρειάστηκε να αναπτυχθεί μια αναλογική κυκλωματική διάταξη συνδεδεμένη άμεσα (με καλώδια και θύρες pin) με μικροϋπολογιστή Arduino UNO, και μέσω του Arduino με υπολογιστή. Μέσω του υπολογιστή επιλέγεται η χρονική διάρκεια του παλμού ο χρόνος και ο αριθμός των παλμών ακτινοβολήσης. Την ποσότητα αυτή ελέγχει ο υπεύθυνος διεξαγωγής του πειράματος και χρήστης του συνδεδεμένου με το κύκλωμα Η/Υ καθορίζοντας σε γραφική διεπαφή τις παραμέτρους υλοποίησης του πειράματος. Για το σκοπό αυτό η παραπάνω διάταξη χωρίστηκε σε τέσσερα υποσυστήματα προς υλοποίηση:

1. Σχεδιάστηκε ένας ενισχυτής διαγωγιμότητας ο οποίος λαμβάνει στην είσοδο μια τάση εισόδου control. Η τάση αυτή προέρχεται από ψηφιακή έξοδο του Arduino. Μπορεί να είναι συνεχής η παλμική. Κατά την διάρκεια του παλμού το LED είναι αναμμένο. Το αναλογικό κύκλωμα ρυθμίζει με την χρήση ποτεσιόμετρου το ρεύμα το οποίο διαρρέει την πηγή ακτινοβολήσης (LED). Με τον τρόπο αυτό ρυθμίζεται η φωτεινή ισχύς που χρειάζεται το πείραμα.

2. Σχεδιάστηκε ένα κύκλωμα το οποίο αποτελεί ένα ενδιάμεσο στάδιο μεταξύ του ενισχυτή διαγωγιμότητας, και ενός Arduino Uno. Σκοπός είναι το συγκεκριμένο στάδιο να βοηθήσει τον σχεδιαστή της εφαρμογής να αναπτύξει τον κώδικα του Arduino, ώστε ελέγχοντας την τάση εισόδου του αναλογικού αυτού κυκλώματος, να μπορεί έμμεσα να καθορίσει σημαντικές παραμέτρους της ακτινοβολήσης, όπως τον χρόνο που η πηγή θα είναι ενεργή ή ανενεργή, καθώς και τον αριθμό μεταβάσεων από ενεργή σε ανενεργή κατάσταση κατά τη διάρκεια του πειράματος (loops του πειράματος). Για τον σκοπό αυτό, το συγκεκριμένο στάδιο περιλαμβάνει μια LCD οθόνη που εμφανίζει τις παραπάνω σημαντικές παραμέτρους του πειράματος, όπως

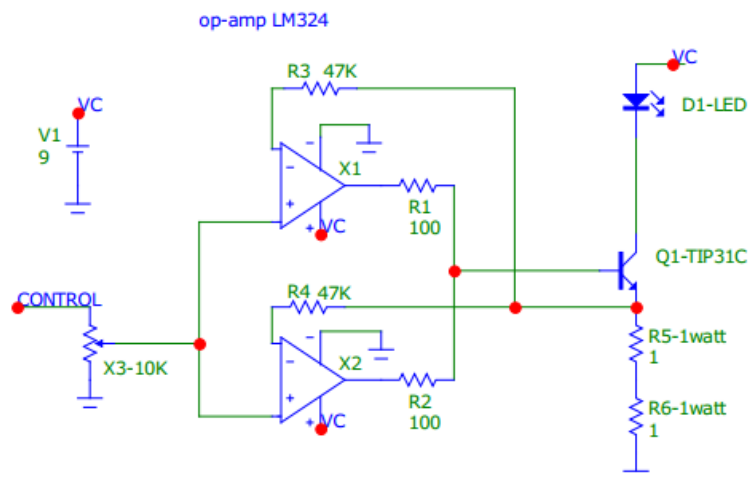
αυτές έχουν καταγραφεί στον κώδικα του Arduino την εκάστοτε στιγμή. Το στάδιο αυτό ακόμη εμπεριέχει ένα κύκλωμα επανεκκίνησης του πειράματος. Η επανεκκίνηση αυτή υλοποιείται χειροκίνητα με το πάτημα ενός κουμπιού που αποτελεί μέρος του παρόντος κυκλωματικού σταδίου. Συνεπώς το συγκεκριμένο υποκύκλωμα μεταφράζει τις παραμέτρους διεξαγωγής της ακτινοβολήσης, από μεταβλητές κώδικα εντός του Arduino, σε κυματομορφή εισόδου στον ενισχυτή διαγωγιμότητας.

3. Δημιουργήθηκε ο κώδικας λειτουργίας του Arduino Uno. Ο συγκεκριμένος κώδικας περιμένει να λάβει τις παραμέτρους υλοποίησης του πειράματος μέσω usb καλωδίου από την αντίστοιχη θήρα του ψηφιακού υπολογιστή. Οι παράμετροι αυτοί καθορίζονται από τον χρήστη που είναι υπεύθυνος να διεξάγει το πείραμα. Ο κώδικας του Arduino χρησιμοποιεί αυτήν την πληροφορία ώστε να κωδικοποιεί τις παραμέτρους του πειράματος σε ηλεκτρικό σήμα, το οποίο επιτυγχάνεται με τον έλεγχο της τάσης στο pin13 του Arduino Uno, το οποίο είναι η είσοδος του αναλογικού σταδίου της εφαρμογής. Ταυτόχρονας, ο κώδικας ελέγχει το τι θα απεικονιστεί στην LCD οθόνη, καθώς και επανεκκινεί τις παραμέτρους του πειράματος, είτε όταν λάβει νέα πληροφορία από τον χρήστη του ηλεκτρονικού υπολογιστή είτε όταν πατηθεί χειροκίνητα το κουμπί επανεκκίνησης του ενδιάμεσου σταδίου μεταξύ Arduino Uno και ενισχυτή διαγωγιμότητας. Ο κώδικας του Arduino παρατίθεται στο παράρτημα της παρούσας εργασίας και θα αναλυθεί διεξοδικά σε ξεχωριστό κεφάλαιο.

4. Σχεδιάστηκε και προγραμματίστηκε μια γραφική διεπαφή ανθρώπου υπολογιστή με σκοπό ο χρήστης να μπορεί να καθορίσει τις βασικές παραμέτρους του πειράματος. Η πληροφορία αυτή εν συνεχεία οδηγείται σε έναν μικρουπολογιστή Arduino Uno. Αξίζει να σημειωθεί ότι η εφαρμογή αρχικά υλοποιήθηκε σε γλώσσα προγραμματισμού JAVA, ωστόσο για λόγους βελτιστοποίησης και επεκτασιμότητας η υλοποίηση ολοκληρώθηκε σε γλώσσα προγραμματισμού python. Η εφαρμογή επιτελεί πολλούς ελέγχους ασφαλείας, που αποτρέπουν την λάθος χρήση της ή την λάθος διεξαγωγή του πειράματος. Για παράδειγμα, η εφαρμογή φροντίζει να τρέξει μόνο σε περίπτωση επιτυχούς σύνδεσης με ένα Arduino Uno ή φροντίζει να εγκαταστήσει στο συνδεδεμένο Arduino τον κατάλληλο κώδικα .ino ώστε να επιτελεί σωστά την διεπαφή μεταξύ ανθρώπου-υπολογιστή και αναλογικού κυκλώματος. Τέλος, το παρόν GUI εξάχθηκε σε μορφή exe, και σχεδιάστηκε το κατάλληλο setup αρχείο, ώστε το παρόν πρόγραμμα να μπορεί να εγκαταστηθεί σε οποιοδήποτε υπολογιστή με Windows 7 ή νεότερη έκδοση Windows OS. Ο κώδικας του GUI παρατίθεται στο παράρτημα της παρούσας εργασίας και θα αναλυθεί διεξοδικά σε ξεχωριστό κεφάλαιο.

4.5.2 Ανάλυση κυκλώματος Ενισχυτή διαγωγιμότητας

Το κύκλωμα το οποίο κατασκευάστηκε εμφανίζεται στην παρακάτω εικόνα. Σε αυτό το σημείο αξίζει να τονιστεί ότι στην πράξη το κύκλωμα διαθέτει μια επιπλέον αντίσταση προστασίας από τυχόν λάθος χρήση του ποτενσιόμετρου. Ωστόσο, η αντίσταση προστασίας δεν αλλάζει τη βασική λειτουργία του κυκλώματος, και για λόγους απλοποίησης δεν προστέθηκε στην αναπαράστασή του.



Εικόνα 22: Κυκλωματική αναπαράσταση του ενισχυτή διαγωγιμότητας

Εξιιώσεις και Προσεγγίσεις για BJT

Το BJT τρανζίστορ στη διάταξή μας λειτουργεί ως πηγή ρεύματος. Λόγω του ότι οι ταχύτητες λειτουργίας είναι της τάξεως των sec, η συμπεριφορά του τρανζίστορ είναι ίδια με τα DC χαρακτηριστικά του. Τα AC χαρακτηριστικά υπολογίζονται για πολύ μικρές μεταβολές και για συχνότητες πάνω από 1KHz. Καθότι τα πειράματα της παρούσας εργασίας αφορούν παλμικές κυματομορφές με περίοδο της τάξης των sec, απορίπτεται η προσέγγιση με AC ανάλυση. Επιπρόσθετα, ένας ακόμη λόγος που υιοθετείται αυτή η προσέγγιση είναι ότι τα DC χαρακτηριστικά μετρούνται με παλμικές κυματομορφές για να επηρεάζουν ελάχιστα την μεταβολή της θερμοκρασίας.

Η παραπάνω διαπίστωση βασίζεται στο ακόλουθο μοντέλο για τη μεταβολή της θερμοκρασίας και τις σχέσεις της με τα ηλεκτρικά μεγέθη. Για την μεταφορά θερμικής ενέργειας από ένα σημείο προς ένα άλλο σημείο του υπό μελέτη συστήματος, ισχύει πως αυτή είναι ανάλογη της μεταβολής της θερμοκρασίας του:

$$\frac{dQ}{dt} = k\Delta T \text{ \& } \Delta T = c * \Delta Q \Leftrightarrow \frac{dQ}{dt} = k(T(t) - T_0)$$

Μια αναγωγή σε ηλεκτρικά μεγέθη οδηγεί στην αντικατάσταση του Q με το φορτίο και της θερμοκρασίας T με την τάση. Σύμφωνα με τα ανωτέρω, η θερμοκρασία αλλάζει με την κατανάλωση. Αυτός είναι ένας ακόμη λόγος χρήσης της αρνητικής ανάδρασης, ώστε το σύστημα να οδηγηθεί να τείνει στη σταθερότητα, αφού στην πραγματικότητα κανένα χαρακτηριστικό δεν είναι απόλυτα σταθερό.

Τα παραπάνω είναι ιδιαίτερα σημαντικά για να γίνει κατανοητή η σχέση της ισχύος στον ακροδέκτη της βάσης του τρανζίστορ και της μεταβολής της θερμοκρασίας στην περιοχή του ακροδέκτη. Ένα ηλεκτρόνιο φεύγοντας από τον συλλέκτη και πηγαίνοντας στον εκπομπό, λόγω της διαφοράς δυναμικού V_{CE} , η συνολική μεταβολή της ισχύος θα είναι: $V_{CE} * I_C$. Στο πλαίσιο αυτό, η ενεργειακή μεταβολή εκλύεται ως θερμότητα που θερμαίνει την επαφή. Η επαφή εν συνεχεία θερμαίνει το κέλυφος και την ψύκτρα. Αυτά διαδραματίζονται σε χρόνους της τάξης μεγέθους των msec. Οι διατάξεις της παρούσας εργασίας έχουν σχεδιαστεί για να υλοποιούν πειράματα με μεταβολές της τάξης των sec, συνεπώς έχει επιτευχθεί θερμική ισορροπία στην περιοχή.

Από τα χαρακτηριστικά των κατασκευαστών είναι γνωστό ότι το h_{FE} (κέρδος ρεύματος) είναι της τάξεως από 25 έως 100, με τάση $V_{CE} = 4V$ και $I_C = 1A$. Ακόμη, το μέγιστο ρεύμα, που μπορεί να χρειασθεί το LED, είναι της τάξεως των 600mA. Ισχύει ότι:

$$h_{FE} = \frac{I_C}{I_b} = 25$$

Συνεπώς, στη χειρότερη περίπτωση χρειαζόμαστε στην βάση του τρανζίστορ 24mA. Έγινε χρήση δύο διαφορικών ενισχυτών LM324, διότι ένας μόνο δεν είναι δυνατόν να δώσει τόσο ρεύμα, αφού ο LM324 θεωρητικά μπορεί να φθάσει μόνο μέχρι 20mA μέγιστο ρεύμα εξόδου. Η πρόσθεση των ρευμάτων που δίνουν οι δύο αυτοί διαφορικοί γίνεται μέσω των αντιστάσεων R1,R2, που επιτυγχάνουν την ελαχιστοποίηση της διαφοράς των ρευμάτων που δημιουργείται εξαιτίας των άνισων τάσεων εξόδου των διαφορικών ενισχυτών (dc offset – Vos).

Η τάση λειτουργίας του LED εξαρτάται από τον τύπο και το χρώμα του. Η μέγιστη τάση στο μπλε LED, που χρησιμοποιείται στο πείραμα, είναι της τάξεως των 4V. Η πτώση τάσεως V_{CE} στο τρανζίστορ πρέπει να είναι τουλάχιστον 2V, ώστε η διαφορά δυναμικού να βρίσκεται με ασφάλεια εντός των τιμών της ενεργούς περιοχής στην οποία και λειτουργεί το transistor, και ταυτόχρονα να μην παρουσιάζεται μείωση του h_{FE} . Άρα, η τάση τροφοδοσίας πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 6V. Επίσης, είναι αναγκαίο να ληφθεί υπόψιν και η πτώση τάσης από το ρεύμα που διαρρέει τις R5,R6. Για όλους τους ανωτέρω λόγους, στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε μικρό τροφοδοτικό με τάση εξόδου 9V, η οποία είναι ικανή να ανταπεξέλθει στις απαιτήσεις του συστήματος.

Ωστόσο, η καταναλισκομένη ισχύς στο τρανζίστορ μετατρέπεται σε αύξηση της θερμότητας. Έχοντας την τροφοδοσία στα 9V, υπάρχει πιθανότητα να υπερθερμανθεί το τρανζίστορ. Η κύρια κατανάλωση ισχύος προέρχεται από το γινόμενο:

$$V_{ce} * I_c .$$

Το ρεύμα της βάσης του τρανζίστορ και η τάσης αγωγής V_{be} , είναι πολύ μικρότερα μεγέθη, επομένως δεν δημιουργούν ουσιαστική αύξηση της κατανάλωσης ισχύος. Στα LED ισχύει ότι $E=hn$ και καθότι επιθυμείται μεγαλύτερο διάκενο για να επιτευχθεί μετάβαση ηλεκτρονίου από μια ενεργειακή στάθμη σε μια άλλη και εκπομπή φωτονίου στο μήκος κύματος του μπλε, προκύπτει ότι στη χειρότερη περίπτωση θα υπάρχει μικρή πτώση τάσης στους ακροδέκτες του LED ίση περίπου με 2,8V. Οπότε θα έχουμε:

$$V_{ce} = 9V - 2,8V - R * I_c$$

$$R = R5 + R6 = 2\Omega$$

$$W = V_{ce} * I_c = (6,2V - R * I_c)I_c$$

Στον παρακάτω πίνακα δίνεται η κατανάλωση για διάφορες τιμές του ρεύματος:

Ic	W
0,1	0,6
0,2	1,16
0,3	1,68
0,4	2,16
0,5	2,6
0,6	3
0,7	3,36
0,8	3,68

Πίνακας 2: Κατανάλωση για διάφορες τιμές του ρεύματος

Το τρανζίστορ έχει θερμική αντίσταση προς τον αέρα: $R_{th_{j-A}} = \frac{62,5 C^{\circ}}{W}$.

Με 3W κατανάλωση στα 600mA, σημαίνει ότι θα έχουμε αύξηση θερμοκρασίας ίση με:

$$\Delta T = R_{th_{j-A}} * W = 3 * 62,5 C^{\circ}$$

Η θερμοκρασία αυτή είναι καταστροφική για το τρανζίστορ και γι' αυτό απαραίτητη κρίνεται η χρήση ψήκτρας. Η θερμική αντίσταση της μικρής ψήκτρας που χρησιμοποιήθηκε δεν είναι γνωστή, οπότε πραγματοποιήθηκε πειραματικός έλεγχος κατά τον οποίο εξεταζόταν η θερμοκρασία που έφθανε η ψήκτρα στο μέγιστο ρεύμα. Αυτή δεν ξεπέρασε τους 65 C° . Το τρανζίστορ έχει θερμοκρασιακή αντίσταση μεταξύ ηλεκτρονικής επαφής και κελύφους: $R_{th_{j-c}} = \frac{3 C^{\circ}}{W}$.

Επομένως, η επαφή του τρανζίστορ βρισκόταν περίπου σε θερμοκρασία $74\text{ }^{\circ}\text{C}$, που είναι σε ασφαλή περιοχή λειτουργίας.

Ανάδραση

Η επιλογή του διαφορικού ενισχυτή LM324 έγινε εξαιτίας της δυνατότητάς του να φθάνει στην αρνητική τροφοδοσία του και στην είσοδο και στην έξοδο. Η ιδιότητα αυτή μας επέτρεψε να ρυθμίζουμε από μικρά ρεύματα (όπως 10mA) μέχρι μεγάλα (όπως 1 A) στην έξοδο του κυκλώματός μας. Αξίζει να τονιστεί επίσης ότι ο LM324 θεωρητικά μπορεί να φθάσει τα 20mA στην έξοδο του, αλλά η αντίσταση εξόδου του είναι μη γραμμική και μπορεί να προκληθεί μεγάλη πτώση τάσης στην έξοδο. Μία ασφαλή λειτουργία επιτυγχάνεται σε μέγιστο ρεύμα εξόδου 10mA. Ακόμη, επιλεχθηκε διότι η τάση εξόδου του μπορεί να φθάσει οριακά στο μηδέν (πρακτικά περίπου 100mV), με αποτέλεσμα να μπορεί να διακόψει το ρεύμα του τρανζίστορ.

Η ανάδραση γίνεται λαμβάνοντας την τάση του εκπομπού του τρανζίστορ, στην σύνδεση των εν σειρά αντιστάσεων R5, R6 και επιστέφοντάς την στην αρνητική είσοδο του τελεστικού. Οι αντιστάσεις R3 και R4 είναι αναγκαίες, διότι οι δύο διαφορικοί ενισχυτές μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετικό DC offset (V_{os}). Συγκεκριμένα, οι αντιστάσεις αυτές χρησιμοποιούνται ώστε να μειωθεί η διαφορά των ρευμάτων που δίνουν οι δύο op-amp στην έξοδο. Οι τιμές τους δεν επηρεάζουν ουσιαστικά το κύκλωμα, διότι το ρεύμα που τις διαπερνά είναι της τάξεως των nA. Η τάση στον εκπομπό είναι:

$$V_e = (R5 + R6) * I_e$$

$$I_e = I_c + I_b, \text{ όπου } I_b \ll I_c$$

Η απόλυτη τιμή του ρεύματος δεν είναι τόσο σημαντική όσο η σταθερότητα της φωτεινής δέσμης. Η φωτεινή δέσμη εξαρτάται αναλογικά από το ρεύμα που διαρρέει το LED. Οπότε, σταθεροποιώντας το ρεύμα εκπομπού, σταθεροποιείται και το ρεύμα συλλέκτη – LED και επιτυγχάνεται σταθερή φωτεινή ισχύ.

Η επίδραση της αρνητικής ανάδρασης στην σταθεροποίηση του ρεύματος μπορεί να εξηγηθεί με την περιγραφή της λειτουργίας. Ας υποθέσουμε ότι έχουμε επιβάλλει τάση $V_{in} = V^+$ στην θετική είσοδο του διαφορικού ενισχυτή. Έστω ότι η τάση στον εκπομπό είναι $V_e = 0$ (δεν έχουμε παλμό) και έρχεται παλμός, δηλαδή $V_{in} > V_e$. Η V_e είναι ίση με την τάση V^- του διαφορικού ενισχυτή και η έξοδος του είναι $V_{out} = A * (V^+ - V^-)$, όπου A το κέρδος του ενισχυτή (της τάξης των 10^5). Ισχύει ότι:

$$(V^+ - V^-) = (V_{in} - V_e) > 0$$

Επομένως, η έξοδος θα αυξηθεί. Η αύξηση αυτή θα προκαλέσει αύξηση της τάσης και κατά συνέπεια του ρεύματος στην βάση του τρανζίστορ. Ως αποτέλεσμα, προκαλείται αύξηση του ρεύματος του συλλέκτη και του εκπομπού. Αλυσιδωτά, η αύξηση του ρεύματος προκαλεί αύξηση στην τάση V_e , καθώς αυξάνεται το ρεύμα στην αντίσταση (R5+R6). Η διαδικασία της αύξησης θα συνεχισθεί μέχρις ότου το V^- να γίνει περίπου

ίσο με V^+ . Η διαφορά ($V^+ - V^-$) είναι αντιστρόφως ανάλογη του κέρδους και είναι της τάξης του 10^{-5} . Δεν πραγματοποιείται περαιτέρω αύξηση, διότι αυτή θα προκαλούσε αλλαγή πρόσημου στην εξίσωση $V_{out} = A * (V^+ - V^-)$, επιφέροντας αντίστοιχη μείωση των τάσεων και των ρευμάτων. Με τη λήξη του παλμού εισόδου, εκκινείται η αντίστροφη διαδικασία.

Στην ισορροπία έχουμε πάντα: $V_{in} = V^+ = V^- = V_e = I * (R5 + R6)$.

Συνεπώς, το ρεύμα καθορίζεται από την τάση εισόδου και σταθεροποιείται στην τιμή που ορίζει η προηγούμενη εξίσωση.

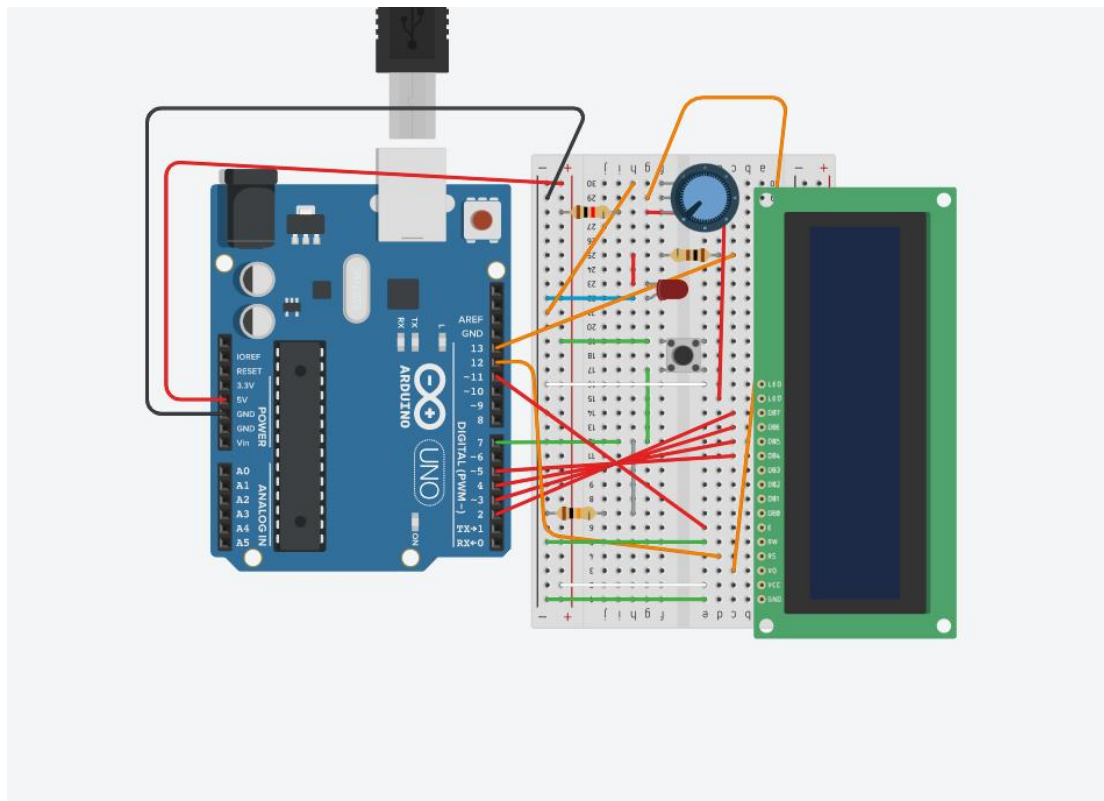
Η έξοδος του παλμού που παρέχεται από το Arduino μετρήθηκε με παλμογράφο και έχει τιμές 0,2V και 4,5V στις καταστάσεις 0 και 1, αντίστοιχα. Με βάση την προηγούμενη εξίσωση, η τάση 4,5V προκαλεί ρεύμα ίσο με 2,25A. Για να μην δημιουργείται τόσο μεγάλη αύξηση του ρεύματος, αν κατά λάθος περιστραφεί το ποτενσιόμετρο στην μέγιστη αντίστασή του, τοποθετήθηκε αντίσταση 15KΩ πριν από το ποτενσιόμετρο και σε σειρά με αυτό. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα η αντίσταση προστασίας δεν επηρεάζει ουσιαστικά τη θεωρητική μοντελοποίηση του κυκλώματος, και χάριν ευκολίας παραλήφθηκε.

Με αυτή την αντίσταση, η μέγιστη τάση που εισέρχεται στην είσοδο υπολογίζεται από τον διαιρέτη τάσης που δημιουργείται με την αντίσταση των 15KΩ και το ποτενσιόμετρο 10KΩ και την μέγιστη τάση του Arduino. Αυτή είναι 1,8V και το αντίστοιχο μέγιστο ρεύμα 0,9A. Τα όρια ασφαλείας του LED ορίζουν ως μέγιστο ρεύμα το 1A.

4.5.3 Ανάλυση ενδιάμεσου κυκλώματος

Το παρακάτω κύκλωμα υλοποιεί το ενδιάμεσο στάδιο. Στην πραγματικότητα μπορεί να χωριστεί σε 3 διακριτά υποκυκλώματα. Το πρώτο αποτελεί το κύκλωμα ελέγχου του LED. Το δεύτερο αφορά το κουμπί της χειροκίνητης επανεκκίνησης του πειράματος και το τρίτο την διεπαφή ελέγχου μεταξύ του Arduino και της LCD οθόνης.

Εικόνα 23: Ενδιάμεσο κύκλωμα



Το παρόν κύκλωμα σχεδιάστηκε με βάση την ανάλυση και τις υποδείξεις του βιβλίου που περιέχεται ως manual στο πακέτο του Arduino Starter Kit που αξιοποιήθηκε για τις ανάγκες της παρούσας διπλωματικής.

4.6 Χημικές Ουσίες

Παρακάτω περιγράφεται το συνθετικό παράγωγο της κουρκουμίνης το οποίο χρησιμοποιήθηκε αλλά και οι υπόλοιπες ουσίες των οποίων η χρήση ήταν απαραίτητη για τη διεξαγωγή της εργασίας.

4.6.1 Curcumin Mix

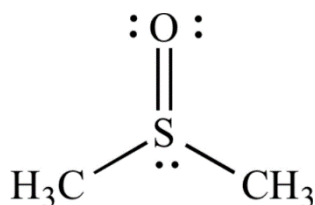
Είναι ένα μείγμα κουρκουμινοειδών, το οποίο αποτελείται από:

- curcumin I σε ποσοστό 80%
- curcumin II σε ποσοστό 18% και
- curcumin III σε ποσοστό 2%.

Το μοριακό της βάρος είναι 368,38.

4.6.2 DMSO (dimethyl sulfoxide)

Το DMSO είναι ένας άχρωμος διαλύτης και δημιουργείται από την οξείδωση του σουλφιδίου διμεθυλίου με το διοξείδιο του οξυγόνου ή του αζώτου. Ο μοριακός του τύπος είναι C_2H_6OS . Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης της κουρκουμίνης σε όλα τα σχετικά πειράματα. Διατηρείται στους $20^{\circ}C$.



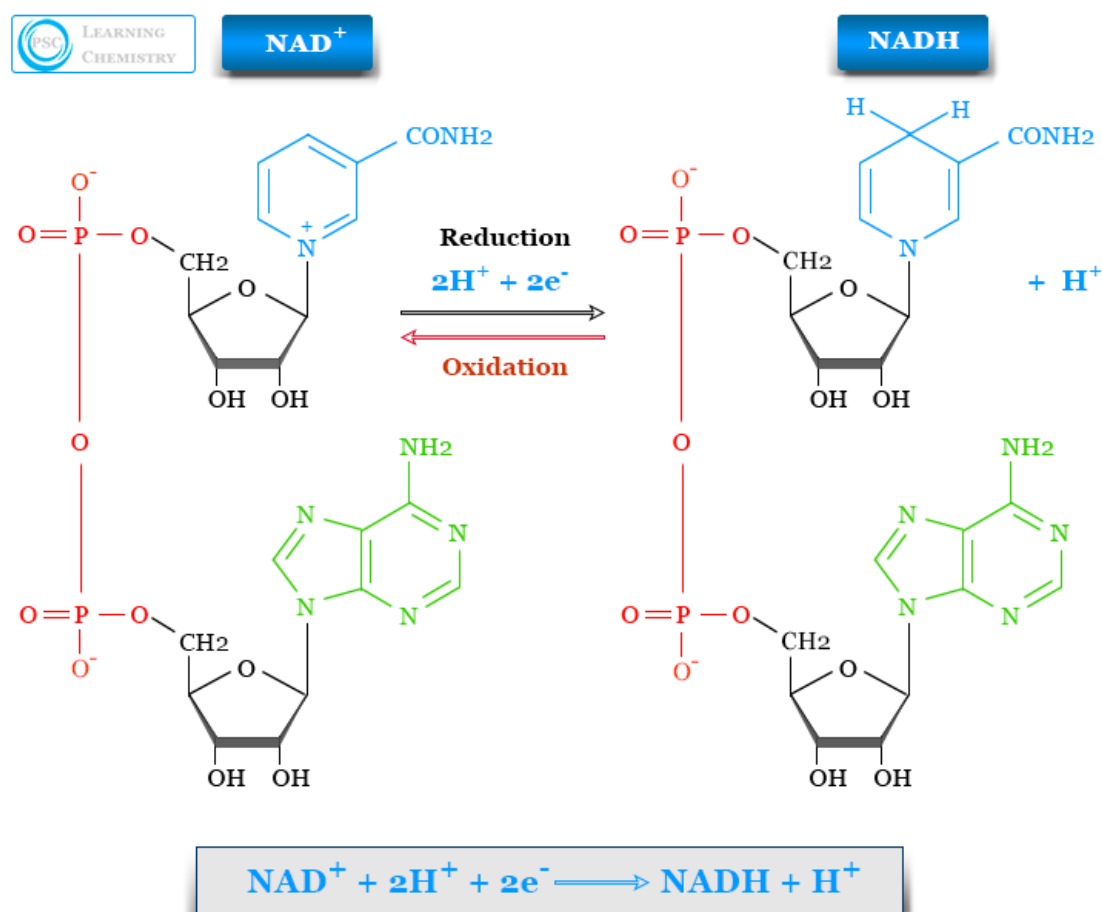
Εικόνα 24: Χημική δομή DMSO ^[13]

4.6.3 PBS (Phosphate Buffered Saline)

Είναι ένα διάλυμα φωσφορικών ιόντων που χρησιμοποιήθηκε τόσο στις κυτταρικές καλλιέργειες. Στις κυτταρικές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε για το πλύσιμο των κυττάρων. Διατηρείται σε θερμοκρασία 4 έως $8^{\circ}C$.

4.6.4 NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide – Νικοτιναμιδο-αδενινουκλεοτίδιο)

Το NADH είναι νουκλεοτίδιο πυριδίνης και παίζει τον ρόλο του οξειδωτικού παράγοντα στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Συμμετέχει σε διάφορες ενζυματικές αντιδράσεις ως φορέας ηλεκτρονίων και συναντάται είτε σε οξειδωμένη κατάσταση (oxidized, NAD⁺) είτε σε μειωμένη (reduced, NADH). Στη συνέχεια, παρουσιάζεται η χημική δομή του NAD⁺ και του NADH.

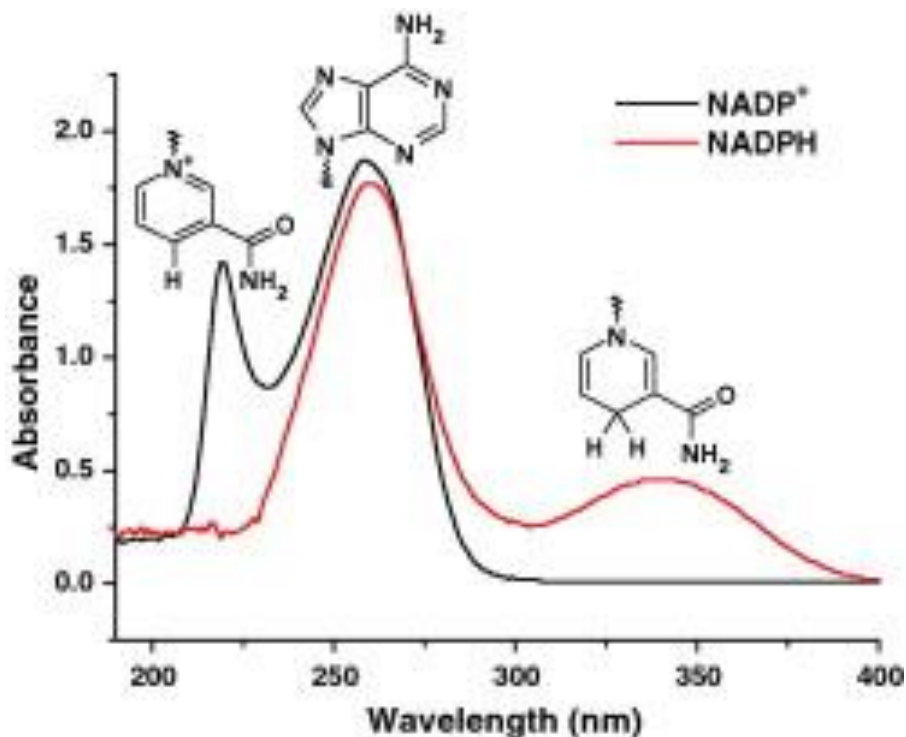


Εικόνα 25: Χημική δομή NAD⁺ και NADH και σχηματισμός του NADH από το NAD⁺ και αντίστροφα ^[14]

Το NADH μπορεί να σχηματιστεί από το NAD⁺ το οποίο είναι φορέας ιόντων υδριδίων. Ένα μόριο υποστρώματος απομακρύνει ενζυματικά το ιόν υδριδίου εξαιτίας της δράσης αφυδρογονασών. Η αντιστρεπτή μεταφορά ενός ιόντος υδριδίου από την αφυδρογονάση προς το NAD⁺ καταλύεται από αυτά τα ένζυμα, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται NADH. Το NADH εμφανίζει απορρόφηση στα 340nm. Από την άλλη, το NAD⁺ δεν παρουσιάζει απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος. Η μέτρηση της δραστηριότητας της κουρκουμίνης στα 340nm, αλλά και διάφορων άλλων

φωτοευαισθητοποιητών, βασίζεται σε αυτή την αύξηση ή μείωση της απορρόφησης που πραγματοποιείται κατά τον σχηματισμό του NADH ή του NAD⁺ αντιστοίχως.

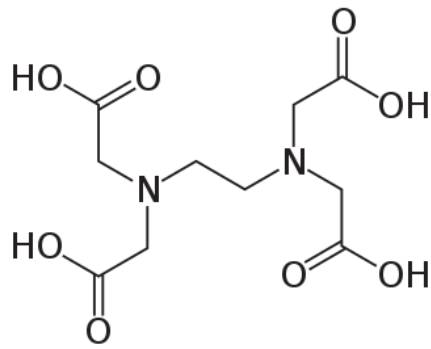
Για τη διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής η χρήση του NADH στα πειράματα έγινε για τον έλεγχο της παραγωγής ελευθέρων ριζών της κουρκουμίνης.



Εικόνα: 26: Απορρόφηση NAD⁺ και NADH αναφορικά με το μήκος κύματος ^[15]

4.6.5 EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)

Το EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) είναι ένα άχρωμο κρυσταλλικό στερεό με μικρή διαλυτότητα στο νερό και αποτελεί ένα αμινοπολυκαρβοξυλικό οξύ. Έχει χημικό τύπο C₁₀H₁₆N₂O₈ και χρησιμοποιείται βασικά για να διαλύει άλατα. Η χρησιμότητά του είναι μεγάλη του ρόλου του ως χηλικού παράγοντα και εξαοδοντωτή συνδέτη. Λεπτομερέστερα, έχει την ικανότητά να αποσπά μεταλλικά ιόντα, όπως τα Ca²⁺ και Fe³⁺, και εφόσον αυτά δεσμευτούν από το EDTA, παραμένουν στο διάλυμα, παρουσιάζοντας μειωμένη αντιδραστικότητα.



Εικόνα 27: Χημική δομή EDTA ^[16]

Το EDTA χρησιμοποιήθηκε μαζί με το NADH για την διεξαγωγή ελέγχου της ικανότητας για παραγωγή ελευθέρων ριζών από το μείγμα της κουρκουμίνης.

4.6.6 FBS (*fetal bovine serum*)

Το FBS χρησιμοποιείται ως αυξητικός παράγοντας στην καλλιέργεια κυττάρων και είναι ένας εμβρυϊκός ορός βοοειδών. Αποτελεί το πιο διαδεδομένο συμπλήρωμα ανάπτυξης για προσθήκη στο μέσο κυτταρικής καλλιέργειας, επειδή έχει υψηλή περιεκτικότητα σε εμβρυϊκούς αυξητικούς παράγοντες. Διατηρείται στην κατάψυξη.

4.6.7 Αντιβιοτικό

Είναι ένα άχρωμο διάλυμα που περιέχει πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη και Gibco αμφοτερικίνη. Χρησιμοποιήθηκε στις κυτταρικές καλλιέργειες ώστε να αποφευχθεί μυκητιακή ή βακτηριακή μόλυνση. Διατηρείται στην κατάψυξη.

4.6.8 RPMI

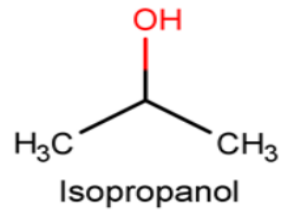
Το πλήρες θρεπτικό μέσο περιέχει RPMI, FBS και αντιβιοτικό. Το RPMI χρησιμοποιείται ως θρεπτικό μέσο και διατηρείται στο σκοτάδι στους 2-8°C.

4.6.9 Τρυψίνη

Η τρυψίνη χρησιμοποιείται στην αφαίρεση προσκολλημένων κυττάρων από την φλάσκα. Έχει έντονο ροζ χρώμα και διατηρείται στην κατάψυξη.

4.6.10 Ισοπροπανόλη

Η ισοπροπανόλη είναι μία καθαρή, άχρωμη, πολική ένωση η οποία μπορεί να διαλύσει πολλές χημικές ουσίες. Χρησιμοποιήθηκε για την αποστείρωση των εργαλείων του εργαστηρίου και εξατμίζεται γρήγορα.



Εικόνα 28: Χημική δομή ισοπροπανόλης ^[17]

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ

5.1 Κώδικας Arduino

5.1.1 Εισαγωγή

Το πρόγραμμα Arduino ενορχηστρώνει ένα πολύ διαδραστικό και προσαρμόσιμο σύστημα ελέγχου LED. Σχεδιασμένο με επίκεντρο την αλληλεπίδραση με τον χρήστη, το πρόγραμμα επιτρέπει στον τελευταίο να ελέγχει την λειτουργική κατάσταση του LED μέσω serial inputs, καθορίζοντας τις διάρκειες για τα διαστήματα 'on' και 'off' του LED, καθώς και τον αριθμό των κύκλων επανάληψης αυτών των διαστημάτων. Αυτό καθορίζει ένα πείραμα βασισμένο σε παραμέτρους, όπου ο χρήστης έχει τον έλεγχο του χρονικού μοτίβου της φωτεινότητας του LED. Πέρα από αυτές τις χρονικές παραμέτρους, το σύστημα ενσωματώνει επίσης μια δυνατότητα χειροκίνητης παράκαμψης, επιτρέποντας στον χρήστη να τερματίσει μια τρέχων αυτοματοποιημένο σχήμα ακτινοβολήσης, στέλνοντας εντολή για να ενεργοποιηθεί ή να απενεργοποιηθεί το LED, εκτός εάν το σύστημα βρίσκεται ήδη σε κατάσταση παύσης. Αυτή η χειροκίνητη παρέμβαση είναι μια μοναδική λειτουργία που εξασφαλίζει την ακεραιότητα του πειράματος.

Η αρχιτεκτονική του συστήματος είναι χτισμένη πάνω σε μη αποκλειστικούς κώδικες (non-blocking code constructs), χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση `millis()` για το χρονομέτρηση αντί της συνάρτησης `delay()`, για να διατηρείται ένας ενεργός βρόχος που παρακολουθεί συνεχώς για εισόδους χρήστη, ώστε να διαχειρίζονται οι μεταβατικές καταστάσεις του LED. Μια είσοδος `push-button` περιλαμβάνεται για να παρέχει έναν απτό τρόπο αλληλεπίδρασης, επιτρέποντας έναν άμεσο επαναπροσδιορισμό του πειράματος, ο οποίος είναι `buffered` με ένα `delay` για να αποφευχθούν ακούσιες επανεκκινήσεις λόγω του `bouncing` του διακόπτη. Η παρουσία μιας οθόνης LCD ενισχύει την διεπαφή χρήστη, παρέχοντας πληροφορίες σε πραγματικό χρόνο για την τρέχουσα κατάσταση και τις ενέργειες του συστήματος, προσφέροντας έτσι μια ακριβή ενημέρωση σε πραγματικό χρόνο για την εξέλιξη του πειράματος.

5.1.2 Εκτεταμένη Επισκόπηση Σχεδίασης

Ο κώδικας ακολουθεί κλασικά μοτίβα προγραμμάτων που είναι σχεδιασμένα για τον έλεγχο ενσωματωμένων συστημάτων, όπου ένας κύριος βρόχος εκτέλεσης (loop()) λειτουργεί ως κόμβος αλληλεπίδρασης μεταξύ του χρήστη, που εκδίδει serial commands, και του συστήματος, που διαχειρίζεται την κατάσταση των περιφερειακών συσκευών όπως το LED και το LCD. Σε τέτοια συστήματα, είναι κρίσιμης σημασίας ο κύριος βρόχος να παραμένει ανεμπόδιτος και ανταποκρινόμενος για να διατηρείται η λειτουργία σε πραγματικό χρόνο. Για να επιτευχθεί αυτό, ο κώδικας χρησιμοποιεί ένα μη αποκλειστικό μοτίβο (non-blocking pattern) χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση millis() για να παρακολουθεί τον περασμένο χρόνο αντί της χρήσης του delay(), το οποίο διακόπτει την εκτέλεση του προγράμματος. Αυτή η τεχνική διασφαλίζει ότι το μικροελεγκτής είναι πάντα έτοιμος να επεξεργαστεί τα εισερχόμενα serial δεδομένα και να διαβάσει την κατάσταση των συνδεδεμένων διακοπών. Η μη αποκλειστική προσέγγιση επιτρέπει την εκτέλεση ευαίσθητων σε χρόνο εργασιών, όπως η αλλαγή κατάστασης του LED, ακριβώς όταν χρειάζεται χωρίς να διακόπτει τη συνεχή παρακολούθηση των εισόδων του χρήστη ή των ελέγχων του συστήματος.

Ο κύριος βρόχος ελέγχει συνεχώς για serial commands, ενημερώνει το LED βάσει των παραμέτρων του πειράματος και ανανεώνει την οθόνη LCD με την τρέχουσα κατάσταση. Ένας τέτοιος σχεδιασμός επιτρέπει τη διαχείριση πολλαπλών εργασιών σε μια φαινομενικά ταυτόχρονη λειτουργία για τον χρήστη, ένα θεμελιώδες χαρακτηριστικό για ένα ανταποκρινόμενο σύστημα ελέγχου. Η δυνατότητα ταυτόχρονης διαχείρισης αυτών των εργασιών χωρίς καθυστέρηση είναι κρίσιμη σε ενσωματωμένα συστήματα, ιδιαίτερα όταν εμπλέκονται αλληλεπιδράσεις με φυσικά στοιχεία, όπως διακόπτες ή αισθητήρες.

5.1.3 Αναλυτική Αρχική Κατάσταση

Όταν το σύστημα αρχικοποιείται ή υπόκειται σε επανεκκίνηση, τοποθετεί στρατηγικά το LED σε κατάσταση απενεργοποίησης (off state). Αυτή η άμεση ανατροφοδότηση κατά την εκκίνηση ή την επανεκκίνηση παρέχει μια οπτική ένδειξη στον χρήστη ότι το σύστημα έχει εκκινήσει επιτυχώς και βρίσκεται σε κατάσταση ετοιμότητας. Ρυθμίζοντας το LED σε off, εξαλείφεται η σύγχυση και διασφαλίζεται ότι οι χρήστες δεν θα παρεξηγήσουν μια αδρανή κατάσταση για μια ενεργή πειραματική διαδικασία. Αυτή η απόφαση σχεδιασμού τονίζει την πρόθεση του κώδικα να παρουσιάσει μια σαφή και ασφαλή κατάσταση στον χρήστη κατά την κάθε νέα εκκίνηση ή εντολή επανεκκίνησης.

Αυτή η αρχική κατάσταση ενισχύεται από τις συναρτήσεις επαναφοράς, οι οποίες είναι μελετημένα σχεδιασμένες για να αρχικοποιούν εκ νέου όλες τις σχετικές

μεταβλητές και καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων των μεταβλητών χρονισμού, των control flags και τον αριθμό επανάληψης των βρόχων. Οι συναρτήσεις επαναφοράς διασφαλίζουν επίσης ότι το LED είναι απενεργοποιημένο, αντιπροσωπεύοντας μια συστημική επιστροφή σε μια γνωστή κατάσταση, η οποία είναι κρίσιμη για την αντιμετώπιση προβλημάτων και για τη διασφάλιση ότι οι νέες παράμετροι πειράματος που λαμβάνονται ξεκινούν από μια συνεπή βάση.

5.1.4 Εκτεταμένες Παράμετροι Πειράματος

Η ευελιξία του συστήματος εκδηλώνεται στην ικανότητά του να λαμβάνει και να επεξεργάζεται δυναμικά τις παραμέτρους του πειράματος μέσω της serial input. Οι χρήστες μπορούν να αλλάξουν τη συμπεριφορά του LED καθορίζοντας διάρκειες για τις καταστάσεις ενεργοποίησης (on state) και απενεργοποίησης (off state) του, καθώς και τον αριθμό των κύκλων για τη διάρκεια του πειράματος, όλα αυτά χωρίς να τροποποιούν το ενσωματωμένο λογισμικό. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ενός πρωτοκόλλου serial communication που ερμηνεύει τις εισερχόμενες συμβολοσειρές ως εντολές και παραμέτρους.

Ο κώδικας αναλύει ευφυώς τις ληφθείσες συμβολοσειρές, μετατρέποντάς τις σε αριθμητικές τιμές που ορίζουν τη συμπεριφορά του πειράματος. Αυτή η διαδικασία ανάλυσης είναι ανθεκτική, επιτρέποντας διάφορες μορφές εντολών, και δομημένη προσεκτικά για να διαχειρίζεται πιθανά λάθη στη μετάδοση δεδομένων. Ο χρήστης μπορεί να στείλει ένα νέο σύνολο παραμέτρων ανά πάσα στιγμή, και το σύστημα θα τις ερμηνεύσει και θα τις εφαρμόσει στη διαδικασία που εκτελείται, επιδεικνύοντας τη δυναμική και interactive φύση του κώδικα.

5.1.5 Ενισχυμένη Λογική Ελέγχου LED

Η συνάρτηση handleLEDLogic() είναι ένα κρίσιμο συστατικό του κώδικα, λειτουργώντας ως ο εκτελεστής της βασικής λειτουργικότητας του πειράματος — το εναλλακτικό αναβόσβημα της κατάστασης του LED ανάμεσα σε on και off σε ακριβή διαστήματα. Η συνάρτηση υπολογίζει προσεκτικά τον χρόνο που έχει παρέλθει από την τελευταία αλλαγή κατάστασης του LED χρησιμοποιώντας την συνάρτηση millis(), παρέχοντας μια ακρίβεια στο επίπεδο των χιλιοστών του δευτερολέπτου, χωρίς την ανάγκη για διακοπή της εκτέλεσης του κώδικα. Η συνάρτηση διατηρεί έναν αυτόματο μηχανισμό (state machine), εναλλάσσοντας το LED από on σε off και αντίστροφα όταν έχει παρέλθει το καθορισμένο διάστημα, και αυξάνοντας έναν μετρητή για να παρακολουθεί τους κύκλους που έχουν ολοκληρωθεί.

Αυτός ο μηχανισμός χρονισμού είναι καθοριστικός για την ακρίβεια που απαιτείται στα πειράματα. Για παράδειγμα, αν το LED πρέπει να παραμείνει αναμμένο για 1.5

δευτερόλεπτα και σβηστό για 2.5 δευτερόλεπτα, η συνάρτηση διασφαλίζει ότι αυτές οι διάρκειες διατηρούνται με ακρίβεια σε κάθε κύκλο, ανεξάρτητα από οποιαδήποτε άλλη επεξεργασία συμβαίνει εντός του κυρίου βρόχου (main loop). Επιπλέον, το πείραμα είναι προγραμματισμένο να τερματιστεί μετά τον προκαθορισμένο αριθμό κύκλων, επαναφέροντας το σύστημα στην αρχική κατάσταση και περιμένοντας νέες οδηγίες. Το πείραμα μπορεί να λειτουργήσει αυτόνομα μόλις ρυθμιστεί, παρέχοντας αξιόπιστα και επαναλαμβανόμενα αποτελέσματα στον χρήστη.

5.1.6 Αναλυτική Λειτουργικότητα Παύσης και Συνέχισης

Η δυνατότητα του συστήματος να παύσει και να συνεχίσει πειράματα είναι μια λειτουργία που παρέχει στον χρήστη σημαντικό έλεγχο της εκτέλεσης του πειράματος. Ενσωματώνοντας έναν μηχανισμό παύσης, ο κώδικας ανταποκρίνεται σε σενάρια όπου ο χρήστης μπορεί να χρειαστεί να διακόψει προσωρινά το πείραμα για παρατήρηση ή ρύθμιση χωρίς να διακόψει τη συνέχειά του. Η λειτουργία παύσης λειτουργεί αποθηκεύοντας την ακριβή στιγμή που εκδίδεται η εντολή παύσης και στη συνέχεια υπολογίζει με μεγάλη προσοχή τη διάρκεια της παύσης για να προσαρμόσει τις χρονικές μεταβλητές. Αυτό διασφαλίζει ότι, κατά τη συνέχιση, το πείραμα προχωρά σαν να μην είχε ποτέ διακοπεί, διατηρώντας την ακεραιότητα του χρονισμού του πειράματος.

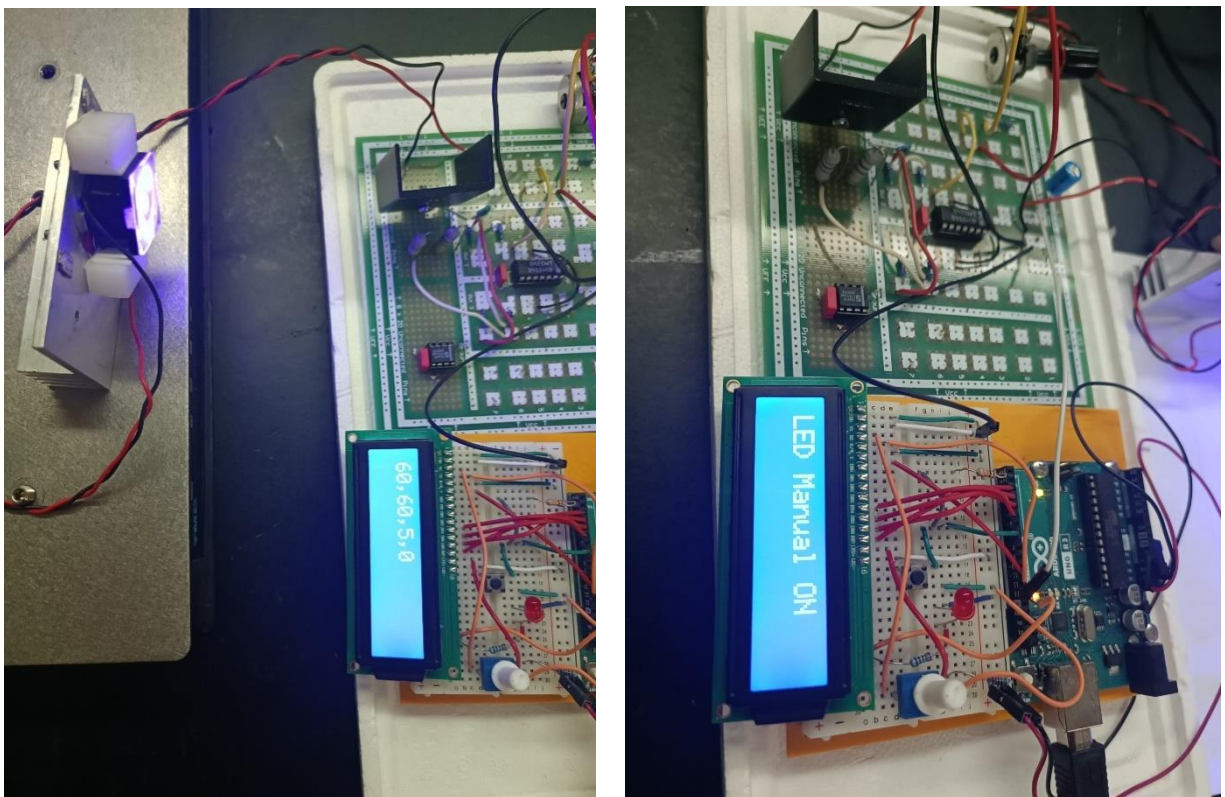
Όταν ενεργοποιείται η εντολή παύσης, το σύστημα αναστέλλει τον κύκλο του LED και καταγράφει τον τρέχων χρόνο. Αυτό το χρονικό στίγμα γίνεται το σημείο αναφοράς όταν το πείραμα συνεχίζεται. Η συνολική διάρκεια της παύσης υπολογίζεται και οι χρονικές μεταβλητές επαναπροσαρμόζονται, χωρίς να χάνεται η πρόοδος και η ακρίβεια.

5.1.7 Ολοκληρωμένη Χειροκίνητη Παρέμβαση

Η λειτουργία χειροκίνητης παρέμβασης λειτουργεί ως ένας άμεσος μηχανισμός ελέγχου, δίνοντας την εξουσία στον χρήστη να ρυθμίσει απευθείας την κατάσταση του LED ανεξάρτητα από το εν εξελίξει πείραμα. Αυτή η δυνατότητα είναι κρίσιμη για σενάρια που απαιτούν άμεση ανταπόκριση, όπως ζητήματα ασφαλείας ή συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Η αρχιτεκτονική του προγράμματος επιτρέπει αυτή την παρέμβαση να διακόπτει ομαλά το εν εξελίξει πείραμα, να σταματά οποιοδήποτε αυτόματο έλεγχο και να δίνει στον χρήστη πλήρη έλεγχο του LED. Όταν ο χρήστης εκδίδει μια χειροκίνητη εντολή, το σύστημα μεταβαίνει γρήγορα σε μια κατάσταση όπου το LED μπορεί να ρυθμιστεί σε on ή off χωρίς να λαμβάνονται καθόλου υπόψη τα χρονικά περιθώρια του πειράματος. Αυτό το χαρακτηριστικό τονίζει την ευελιξία του συστήματος, δίνοντας προτεραιότητα στην εντολή του χρήστη έναντι των αυτοματοποιημένων διαδικασιών.

5.1.8 Ενισχυμένη Ανατροφοδότηση LCD

Η χρήση μιας LCD οθόνης για ανατροφοδότηση σε πραγματικό χρόνο για την κατάσταση του συστήματος είναι μια σκόπιμη και στρατηγική επιλογή υλοποίησης. Το LCD λειτουργεί ως ένα διαγνωστικό εργαλείο που είναι ανεκτίμητο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της αντιμετώπισης προβλημάτων, καθώς επιτρέπει τη γρήγορη αναγνώριση ζητημάτων και την κατανόηση της συμπεριφοράς του συστήματος χωρίς την ανάγκη εξαγωγής δεδομένων σειριακής παρακολούθησης (serial monitor output).



Εικόνα 29: Real time ενημέρωση της πειραματικής εξέλιξης μέσω της LCD οθόνης

Το LCD εμφανίζει διάφορα μηνύματα, ενημερώνοντας τον χρήστη αν ένα πείραμα είναι ενεργό, σε παύση, ή αν το σύστημα βρίσκεται σε κατάσταση χειροκίνητου ελέγχου. Αυτή η οπτική ανατροφοδότηση δεν είναι απλά για άνεση, αλλά αντιπροσωπεύει μια προσέγγιση σχεδίασης με επίκεντρο τον χρήστη, όπου η σαφής επικοινωνία της κατάστασης του συστήματος είναι προτεραιότητα. Τα μηνύματα που εμφανίζονται είναι προσεκτικά διαμορφωμένα για να μεταφέρουν τις ουσιώδεις πληροφορίες με συνοπτικό και κατανοητό τρόπο.

5.1.9 Βελτιωμένη Διαχείριση Κατάστασης

Στον τομέα του προγραμματισμού ενσωματωμένων συστημάτων, η διαχείριση της λειτουργικής κατάστασης του συστήματος είναι κρίσιμη. Ο κώδικας παρουσιάζει μια καλά οργανωμένη στρατηγική διαχείρισης κατάστασης, χρησιμοποιώντας σημαίες για να σηματοδοτήσει ξεκάθαρα την τρέχουσα λειτουργία του συστήματος: εκτέλεση ενός πειράματος, παύση, ή χειροκίνητος έλεγχος. Αυτές οι σημαίες είναι κεντρικές στη λογική του προγράμματος, διασφαλίζοντας ότι το σύστημα λειτουργεί προβλέψιμα και ότι δεν υπάρχουν επικαλύψεις ή συγκρούσεις μεταξύ διαφορετικών καταστάσεων, όπως ο χειροκίνητος έλεγχος και οι αυτοματοποιημένοι κύκλοι πειράματος.

Η χρήση σημαιών και υποθετικής λογικής για τη διαχείριση αυτών των καταστάσεων όχι μόνο προλαμβάνει λειτουργικές συγκρούσεις αλλά επίσης διασαφηνίζει τη ροή του προγράμματος τόσο για τον χρήστη όσο και για οποιονδήποτε προγραμματιστή επιθυμεί να συντηρήσει ή να βελτιώσει το σύστημα.

5.1.10 Βελτιστοποιημένη Σειριακή Επικοινωνία

Το σύστημα χρησιμοποιεί τη σειριακή επικοινωνία ως την πρωτεύουσα διεπαφή του για τη λήψη εντολών και παραμέτρων από τον χρήστη. Η επιλεγμένη ταχύτητα μετάδοσης baud rate των 115200 δείχνει μια σχεδίαση που αξιολογεί την ταχύτητα και την αποδοτικότητα, επιτρέποντας τη γρήγορη μετάδοση δεδομένων μεταξύ της διεπαφής του χρήστη και του μικροελεγκτή. Η συμπερίληψη ενός χρονικού ορίου (serial timeout) είναι ένα προστατευτικό μέτρο για την αποφυγή πιθανών «κρεμασμάτων» του συστήματος λόγω ατελών ή καθυστερημένων μεταδόσεων δεδομένων. Αυτό το χρονικό όριο είναι ένα διακριτικό αλλά κρίσιμο στοιχείο της σχεδίασης, διασφαλίζοντας ότι το σύστημα παραμένει λειτουργικό και ανταποκρίσιμο ακόμα και αν προκύψουν ζητήματα επικοινωνίας δεδομένων.

5.1.11 Συναρτήσεις Επαναφοράς

Η παρουσία πολλαπλών συναρτήσεων επαναφοράς μέσα στη βάση κώδικα συμβάλει στην διασφάλιση της επαναφοράς της κατάστασης του συστήματος. Κάθε συνάρτηση είναι σχεδιασμένη για να αντιμετωπίζει διαφορετικές πτυχές της κατάστασης και της ροής ελέγχου του συστήματος, παρέχοντας ένα λεπτομερές επίπεδο δυνατότητας επαναφοράς. Αυτό σημαίνει ότι ένας χρήστης μπορεί να επαναφέρει μόνο τα απαραίτητα στοιχεία του συστήματος χωρίς να επηρεάζει άλλα, διευκολύνοντας τις μεταβάσεις μεταξύ διαφορετικών καταστάσεων ελέγχου και επιτρέποντας τις γρήγορες αλλαγές στην πειραματική διάταξη.

5.1.12 Εισαγωγή Φυσικού Διακόπτη

Η ενσωμάτωση ενός φυσικού διακόπτη στο σύστημα προσφέρει στον χρήστη μια επιπλέον, πιο άμεση μορφή εισόδου. Η λογική debouncing της εισόδου αυτού του διακόπτη δείχνει μια κατανόηση των μηχανικών ατελειών που είναι εγγενείς στις λειτουργίες των φυσικών διακοπών, όπως η ταλάντωση επαφής (contact bounce). Έτσι, διασφαλίζεται ότι μόνο οι σκόπιμες, συνειδητές ενεργοποιήσεις του διακόπτη επηρεάζουν την κατάσταση του συστήματος, αποφεύγοντας τις ψευδείς ενεργοποιήσεις και διατηρώντας την αξιοπιστία της ανταπόκρισης του συστήματος στην είσοδο του χρήστη.

5.1.13 Μεθοδικές Καθυστερήσεις και Διαχείριση Buffer

Η έξυπνη διαχείριση των καθυστερήσεων εντός του συστήματος προϋποθέτει μια ευρεία επίγνωση των υλικοτεχνικών περιορισμών του Arduino, ειδικά της χωρητικότητας του buffer του. Αποφεύγοντας τη χρήση της αποκλειστικής συνάρτησης καθυστέρησης `delay()` και χρησιμοποιώντας αντ' αυτής υπολογισμένες παύσεις βασισμένες στη συνάρτηση `millis()`, ο κώδικας διασφαλίζει ότι ο μικροελεγκτής μπορεί να διαχειριστεί αποτελεσματικά την ουρά εργασιών του χωρίς υπερφόρτωση. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει στο σύστημα να διατηρεί μια κατάσταση ετοιμότητας, να διαχειρίζεται αποδοτικά τις μεταβάσεις μεταξύ καταστάσεων και να εξασφαλίζει πως όλα τα συστατικά του συστήματος μπορούν να λειτουργήσουν χωρίς παρεμβολές από περιττές καθυστερήσεις επεξεργασίας.

5.1.14 Συνοπτική Επισκόπηση και Συμπέρασμα

Σε συνοπτική επισκόπηση, ο κώδικας του Arduino παρουσιάζει ένα εξελιγμένο αλλά φιλικό προς τον χρήστη σύστημα για τη διεξαγωγή πειραμάτων εκπομπής φωτός του LED με υψηλό βαθμό ακρίβειας και ευελιξίας. Η λογική ελέγχου του LED είναι εγκλεισμένη με τρόπο που επιτρέπει χρονική ακρίβεια στο επίπεδο των χιλιοστών του δευτερολέπτου, ανεπηρέαστη από τις υπόλοιπες λειτουργίες του συστήματος. Οι λειτουργίες παύσης και συνέχισης είναι ομαλά ενσωματωμένες, επιτρέποντας στον χρήστη να διακόψει το πείραμα χωρίς να χάσει την κατάσταση ή το χρονοδιάγραμμα του, μια ουσιαστική λειτουργία για ακριβή πειραματικό έλεγχο. Ο χρήστης μπορεί να μεταβεί από τον αυτόματο στον χειροκίνητο έλεγχο με ευκολία, προσφέροντας ένα επίπεδο ασφάλειας και άμεσης δυνατότητας ελέγχου της κατάστασης του LED.

Η διαχείριση κατάστασης μέσα στον κώδικα είναι λεπτομερής, χρησιμοποιώντας σημαίες για να διαγράφει με σαφήνεια την τρέχουσα λειτουργική κατάσταση του συστήματος (διεξαγωγή, παύση, χειροκίνητος έλεγχος), διασφαλίζοντας ότι δεν υπάρχει επικάλυψη μεταξύ των καταστάσεων. Η επιλογή σειριακής επικοινωνίας με υψηλό baud rate και σύντομου timeout είναι δείγμα μιας σχεδίασης που αξιολογεί την αποκρισιμότητα και την αποδοτικότητα. Οι συναρτήσεις επαναφοράς του συστήματος παρέχουν στον χρήστη τη δυνατότητα να επαναφέρει το σύστημα σε μια προεπιλεγμένη κατάσταση, χωρίς να επηρεάζει όλες τις λειτουργικές παραμέτρους. Τέλος, η ενσωμάτωση ενός φυσικού διακόπτη εισόδου, με λογισμικό debouncing, υπογραμμίζει τη δέσμευση του συστήματος να προσφέρει με τις στρατηγικές του αποφάσεις σχεδιασμού έναν αποτελεσματικό χειρισμό της κατάστασης του LED με πειραματική ακρίβεια και ευκολία αλληλεπίδρασης με τον χρήστη.

Ο συνολικός κώδικας Arduino βρίσκεται στην ενότητα ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ της παρούσας διπλωματικής.

5.2 Κώδικας GUI

5.2.1 Επεξήγηση Διάταξης της Γραφικής Διεπαφής Χρήστη (GUI)

Η γραφική διεπαφή χρήστη (GUI) της εφαρμογής έχει σχεδιαστεί με ακριβέστατη προσοχή στη λεπτομέρεια, χρησιμοποιώντας το tkinter, το προεπιλεγμένο εργαλείο GUI για την Python. Το tkinter παρέχει μια αντικειμενοστραφή διεπαφή προς το toolkit Tk GUI. Επιπλέον, η ενότητα ttk από το tkinter χρησιμοποιείται για να παρέχει πρόσβαση στα θεματικά widgets που προσφέρουν μια πιο σύγχρονη και οπτικά ελκυστική διεπαφή από τα πρότυπα widgets του tkinter.

Η GUI της εφαρμογής είναι ενδεδειγμένα διαιρεμένη σε frames όπως τα `frame_parameters`, `frame_controls`, `frame_buttons` και `frame_status`. Κάθε frame υπηρετεί έναν διακριτό σκοπό:

- Το `frame_parameters` είναι αφιερωμένο στην εισαγωγή των πειραματικών παραμέτρων, επιτρέποντας στους χρήστες να θέσουν τις συνθήκες υπό τις οποίες θα λειτουργήσει το LED.
- Το `frame_controls` φιλοξενεί τα διαδραστικά στοιχεία όπως τα checkboxes που επιτρέπουν στον χρήστη να παύσει, να ξεκινήσει ή να σταματήσει το πείραμα, προσφέροντας άμεσο έλεγχο στην κατάσταση του LED.
- Το `frame_buttons` περιέχει κουμπιά όπως τα 'Start', 'Exit', και 'Upload .ino', τα οποία ενεργοποιούν τις κύριες λειτουργίες της διαμόρφωσης του πειράματος.
- Το `frame_status` προσφέρει ανατροφοδότηση για την τρέχουσα κατάσταση του πειράματος, κρατώντας τον χρήστη ενημερωμένο για τη διαδικασία που λαμβάνει χώρα ή για τυχόν απαιτούμενες ενέργειες.

Αυτή η modular σχεδίαση δεν οργανώνει μόνο τη διεπαφή λογικά αλλά επίσης συμμορφώνεται με τις καλύτερες πρακτικές διεπαφής χρήστη, ομαδοποιώντας συναφή στοιχεία, μειώνοντας το γνωστικό φορτίο και ενισχύοντας τη συνολική εμπειρία χρήστη. Η επιλογή των διαχειριστών διάταξης (layout managers, είναι εργαλεία στον σχεδιασμό λογισμικού που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της τοποθέτησης και του μεγέθους των στοιχείων διεπαφής μέσα σε ένα παράθυρο ή μια σελίδα), όπως το `grid`, διασφαλίζει ότι τα widgets τοποθετούνται σε μια δομή πλέγματος που προσαρμόζεται με κομψότητα σε διάφορα μεγέθη παραθύρων, ενισχύοντας την ανταπόκριση της εφαρμογής.

5.2.2 Διαμόρφωση Σειριακής Επικοινωνίας

Η διαμόρφωση σειριακής επικοινωνίας (serial communication) είναι η ζωτική αρτηρία της εφαρμογής, καθώς επιτρέπει την αποστολή και λήψη δεδομένων από τον μικροελεγκτή Arduino. Η εφαρμογή Python αρχικοποιεί μια σειριακή σύνδεση (serial connection) χρησιμοποιώντας παραμέτρους που καθορίζουν το όνομα της

θύρας και το baud rate (bits ανά δευτερόλεπτο). Το baud rate πρέπει να ταιριάζει με την τιμή που έχει οριστεί στο Arduino για να διασφαλιστεί η συγχρονισμένη μετάδοση δεδομένων.

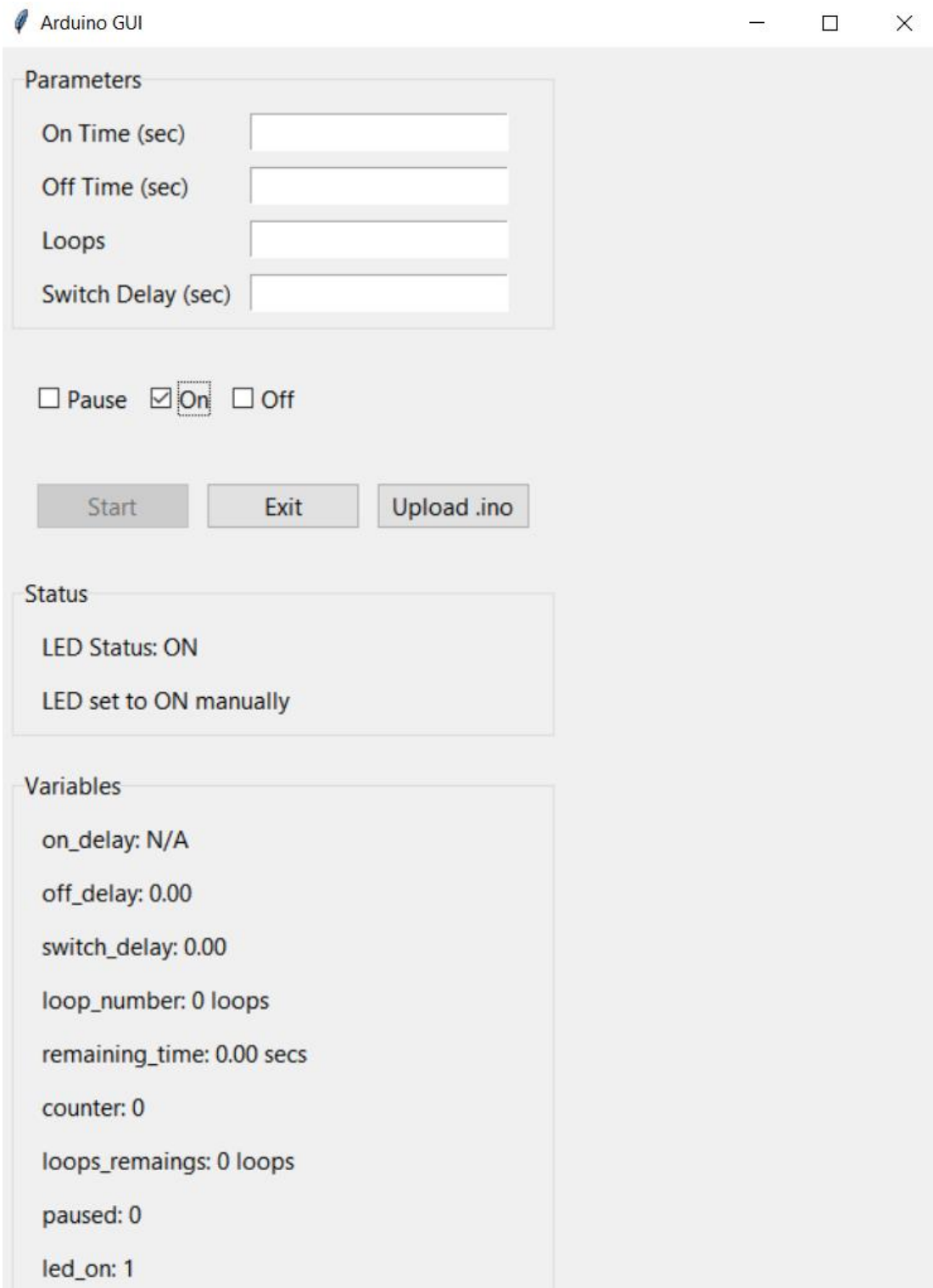
Η επιλογή της σειριακής επικοινωνίας serial εξασφαλίζει ότι η εφαρμογή μπορεί να λειτουργήσει σε διάφορα συστήματα και να επικοινωνήσει με διαφορετικούς τύπους υλικού, με ελάχιστες ή καθόλου τροποποιήσεις. Η διαμόρφωσή της περιλαμβάνει διαχείριση σφαλμάτων για την αντιμετώπιση ζητημάτων, όπως αποτυχημένες συνδέσεις και σφάλματα μετάδοσης δεδομένων, τα οποία είναι κρίσιμα για τη διατήρηση της αξιοπιστίας της επικοινωνίας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

5.2.3 Εμπλουτισμένη Ενότητα Εισαγωγής Χρήστη για τις πειραματικές Παραμέτρους

Σε αυτήν την εφαρμογή, τα πεδία εισαγωγής που παρέχονται στον χρήστη για την εισαγωγή των παραμέτρων του πειράματος είναι μια σαφής ένδειξη της user-oriented προσέγγισης της εφαρμογής. Οι παράμετροι περιλαμβάνουν:

- Χρόνοι On/Off: Αυτά τα πεδία καθορίζουν τη διάρκεια που το LED παραμένει ενεργοποιημένο ή απενεργοποιημένο, επιτρέποντας στον χρήστη να ορίσει ακριβή διαστήματα για τη δραστηριότητα του LED.
- Αριθμός βρόχων: Αυτή η παράμετρος καθορίζει πόσες φορές θα επαναληφθεί ο κύκλος on/off, παρέχοντας έλεγχο στη διάρκεια του πειράματος.
- Καθυστέρηση διακόπτη: Ένας επιπλέον έλεγχος για να βελτιώσει το πείραμα με τον καθορισμό μιας καθυστέρησης για την αλλαγή μεταξύ καταστάσεων.

Αυτά τα widgets εισαγωγής είναι ζωτικής σημασίας για την προσαρμογή του πειράματος, επιτρέποντας σε χρήστες από διάφορα πεδία να χρησιμοποιήσουν την εφαρμογή χωρίς την ανάγκη βαθιάς γνώσης του υπόβαθρου του κώδικα. Η σχεδιαστική απόφαση να συμπεριληφθεί εξίσου η επικύρωση των εισαγωγών αυτών ενισχύει περαιτέρω την ανθεκτικότητα της εφαρμογής, διασφαλίζοντας ότι τα user inputs βρίσκονται εντός αποδεκτών ορίων πριν αποσταλούν στο Arduino. Αυτή η δυνατότητα μειώνει τον κίνδυνο λαθών που θα μπορούσαν να βλάψουν το υλικό ή να παράγουν άκυρα αποτελέσματα πειράματος.



Εικόνα 30: Κεντρικό Παράθυρο GUI

5.2.4 Ενισχυμένοι Μηχανισμοί Ελέγχου

Οι μηχανισμοί ελέγχου στο GUI είναι σχεδιασμένοι με προσοχή για να μετατρέπουν τις ενέργειες του χρήστη σε εντολές που το Arduino μπορεί να εκτελέσει. Τα κουμπιά και τα checkboxes είναι συνδεδεμένα με λειτουργίες που έχουν σαφώς ορισμένους σκοπούς:

- `toggle_on` και `toggle_off`: Αυτά τα checkboxes παρέχουν δυνατότητες χειροκίνητης παράκαμψης, επιτρέποντας στον χρήστη να ελέγξει άμεσα την κατάσταση του LED. Αυτή η λειτουργία είναι κρίσιμη σε σενάρια όπου ο χρήστης χρειάζεται να ξεκινήσει ή να σταματήσει άμεσα το LED, ανεξάρτητα από την τρέχουσα ακολουθία.
- `toggle_pause`: Η λειτουργία παύσης που εισάγεται με αυτό το checkbox είναι μια προσθήκη που επιτρέπει στον χρήστη να διακόψει προσωρινά το πείραμα χωρίς να διαταράξει την ακολουθία των λειτουργιών. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για παρατηρησιακούς σκοπούς ή όταν ένα πείραμα χρειάζεται να διακοπεί προσωρινά για προσαρμογές.

Αυτοί οι μηχανισμοί ελέγχου είναι υλοποιημένοι με διακλειδώσεις (locks, αναφέρονται σε μηχανισμούς ή τεχνικές στην προγραμματιστική και στα συστήματα λογισμικού, χρησιμοποιούμενοι για την αποφυγή ταυτόχρονων προσπελάσεων ή τροποποιήσεων από πολλαπλές διεργασίες ή νήματα, προκειμένου να αποφευχθούν συγκρούσεις και ασυνέπειες στα δεδομένα) για να αποτρέπουν τις συγκρουόμενες εντολές που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ασαφείς καταστάσεις. Για παράδειγμα, η εφαρμογή αποτρέπει τον χρήστη από το να παύσει το πείραμα αν το LED είναι χειροκίνητα ρυθμισμένο σε on ή off, διασφαλίζοντας ότι ο χρήστης δεν μπορεί να προκαλέσει εντολές που θα ήταν σε σύγκρουση μεταξύ τους. Αυτή η προσοχή στη λεπτομέρεια στο σχεδιασμό αποτρέπει τα λειτουργικά λάθη και προστατεύει την ακεραιότητα της διαδικασίας πειράματος.

Κάθε μηχανισμός ελέγχου συνοδεύεται επίσης από μηνύματα ανατροφοδότησης που ενημερώνουν τον χρήστη για την ενέργεια που γίνεται ή αν μια ενέργεια δεν επιτρέπεται. Αυτή η ανατροφοδότηση είναι κρίσιμη για μια ομαλή χρήση, διασφαλίζοντας ότι ο χρήστης είναι πάντα ενημερωμένος για την κατάσταση του συστήματος και τα αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεών τους.

5.2.5 Διευρυμένη Ενότητα Ανθεκτικής Εξαίρεσης Σφαλμάτων και Χαρακτηριστικών Ασφαλείας

Η ανθεκτική εξαίρεση σφαλμάτων και τα χαρακτηριστικά ασφαλείας είναι κεντρικά στην αξιοπιστία και την ευχρηστία του GUI. Η εφαρμογή ενισχύεται με try-except blocks που διαχειρίζονται απροσδόκητα σφάλματα κατά την εκτέλεση. Αυτή η προστατευτική προσέγγιση προγραμματισμού διασφαλίζει ότι το GUI παραμένει λειτουργικό και ανταποκρινόμενο ακόμη και όταν συναντά ζητήματα όπως

σφάλματα επικοινωνίας ή ανωμαλίες στην είσοδο του χρήστη. Για παράδειγμα, αν η σειριακή επικοινωνία αποτύχει ή μια εντολή προς το Arduino δεν εκτελεστεί όπως αναμενόταν, το σφάλμα καταγράφεται και ένα κατάλληλο μήνυμα σφάλματος εμφανίζεται στον χρήστη μέσω ενός παραθύρου διαλόγου, αντί η εφαρμογή να τερματίζεται απότομα.

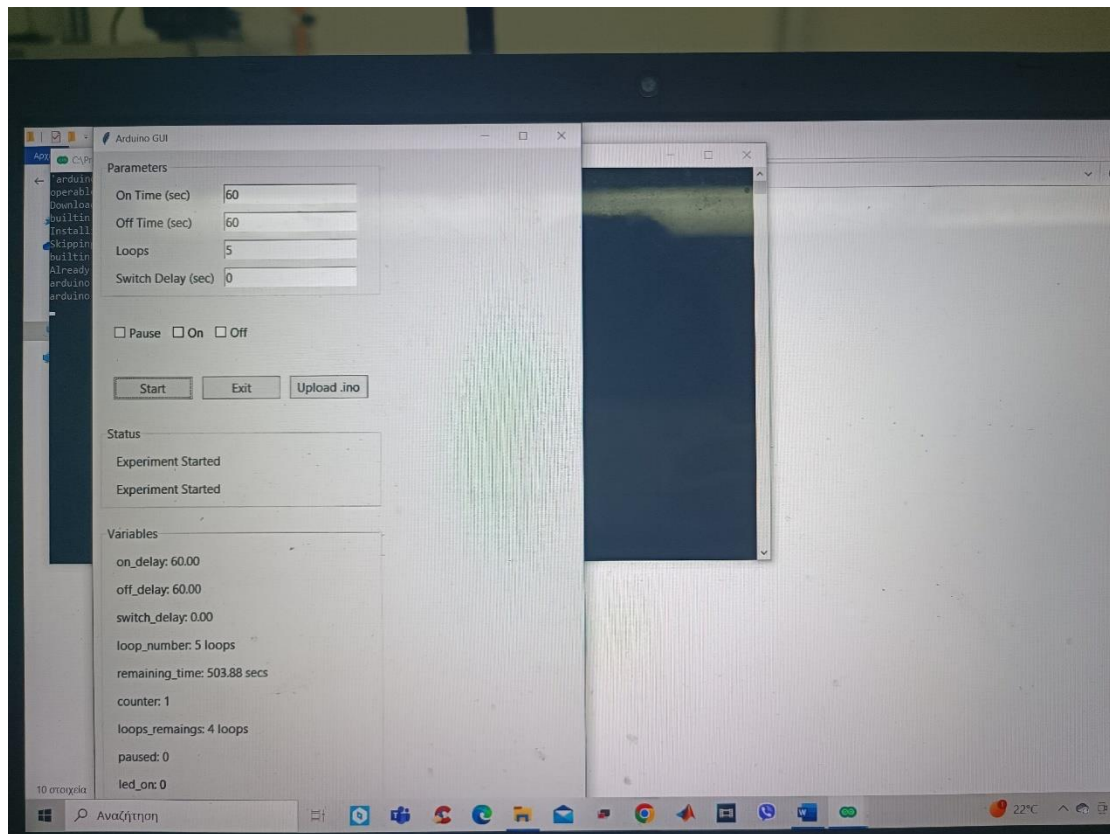
Τα χαρακτηριστικά ασφαλείας είναι ενσωματωμένα σε όλη την εφαρμογή, δίνοντας έμφαση στην πρόληψη λαθών του χρήστη. Το GUI είναι σχεδιασμένο για να αποτρέπει μια σειρά από λανθασμένες λειτουργίες που θα μπορούσαν να διαταράξουν το πείραμα ή να βλάψουν το υλικό. Για παράδειγμα, η εφαρμογή δεν θα επιτρέψει στον χρήστη να παύσει το πείραμα αν δεν έχει ακόμη ξεκινήσει, ή αν το LED είναι σε μια χειροκίνητη κατάσταση on/off, αποτρέποντας το LED να αφεθεί σε αόριστη κατάσταση. Αυτό είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό σε ένα πειραματικό περιβάλλον όπου ο ακριβής έλεγχος των μεταβλητών είναι ουσιώδης.

Επιπλέον, προειδοποιήσεις τοποθετούνται στρατηγικά στον κώδικα για να ειδοποιούν τους χρήστες για πιθανώς επιβλαβείς λειτουργίες. Αν ένας χρήστης προσπαθήσει να ρυθμίσει το LED και σε on και σε off ταυτόχρονα, η εφαρμογή θα παρουσιάσει ένα μήνυμα προειδοποίησης που εξηγεί τη σύγκρουση και θα επαναφέρει τα πλαίσια ελέγχου σε μη συγκρουόμενη κατάσταση. Αυτοί οι ενσωματωμένοι έλεγχοι ασφαλείας είναι δείγμα μιας προσεκτικής φιλοσοφίας σχεδιασμού έχοντας προτεραιότητα τη λειτουργική ακεραιότητα και ασφάλεια χρήστη.

5.2.6 Ενημερώσεις Κατάστασης σε πραγματικό χρόνο

Η ικανότητα της εφαρμογής να παρέχει ενημερώσεις κατάστασης σε πραγματικό χρόνο μέσω της λειτουργίας `update_status` λειτουργεί ως ένα αγωγός πληροφοριών από το Arduino, ανανεώνοντας συνεχώς το GUI με τα τελευταία δεδομένα. Εξασφαλίζει ότι ο χρήστης ενημερώνεται για την πρόοδο του πειράματος, με `updates` για τον τρέχον αριθμό των επαναλήψεων και τον υπολειπόμενο χρόνο, τα οποία δεν έχουν μόνο ενημερωτικό χαρακτήρα αλλά επίσης ενισχύουν την δυνατότητα ελέγχου και επέμβασης του χρήστη πάνω στο πείραμα.

Με την εφαρμογή μιας δυναμικής εμφάνισης κατάστασης, το σύστημα επιτρέπει στους χρήστες να παρακολουθούν οπτικά τη συμπεριφορά του LED και την πρόοδο του πειράματος χωρίς να χρειάζεται να εξετάσουν άμεσα το υλικό. Αυτή η πραγματικού χρόνου ανατροφοδότηση είναι κρίσιμη σε πειραματικά σενάρια όπου ο χρόνος και η ακολουθία είναι κρίσιμα, καθώς επιτρέπει έγκαιρες προσαρμογές στις παραμέτρους του πειράματος εάν είναι απαραίτητο.



Εικόνα 31: Real time ενημέρωση της εξέλιξης της πειραματικής διαδικασίας

5.2.7 Μετάβαση από Java σε Python για την υλοποίηση του GUI

Την απόφαση να μετατραπεί η υλοποίηση της Διεπαφής Χρήστη (GUI) από Java σε Python ενίσχυσε η απλότητα της Python, οι δυνατότητες γρήγορης ανάπτυξης και οι εκτεταμένες βιβλιοθήκες που είναι διαθέσιμες για επιστημονικούς υπολογισμούς και διασύνδεση υλικού. Η δομή του κώδικα σχεδιάστηκε για να επιτρέπει εύκολη κατανόηση και τροποποίηση. Αυτή η μετάβαση επισημαίνει επίσης μια εστίαση στη δια-συμβατότητα διαφορετικών πλατφορμών και στην προετοιμασία για το μέλλον, καθώς η Python υποστηρίζεται ευρέως σε διάφορα λειτουργικά συστήματα και διαμορφώσεις υλικού.

Η ενότητα του κώδικα είναι ένα άλλο στοιχείο της υλοποίησης του σχεδίου του. Συναρτήσεις όπως οι `toggle_on`, `toggle_off` και `toggle_pause` είναι σχεδιασμένες να είναι αυτόνομες, και η καθεμία διαχειρίζεται ένα συγκεκριμένο στοιχείο της λειτουργικότητας της εφαρμογής. Αυτή η ενότητα δεν βοηθά μόνο στον εντοπισμό και την ανάπτυξη σφαλμάτων, αλλά επίσης διαμορφώνει τον δρόμο για μελλοντικές βελτιώσεις, όπως η προσθήκη νέων χαρακτηριστικών ή η ενσωμάτωση με άλλα συστήματα.

5.2.8 Περιεκτική Στρατηγική Διάθεσης (*Comprehensive Deployment Strategy*)

Η στρατηγική διάθεσης της εφαρμογής (the strategy for deploying the application, η εφαρμογή δηλαδή να περιέχεται σε μια δομή-αρχείο, η οποία μπορεί να εγκατασταθεί και να εκτελεστεί εύκολα από διαφορετικούς χρήστες σε διαφορετικά λειτουργικά συστήματα) περιλαμβάνει τη μετατροπή του σεναρίου Python σε εκτελέσιμο αρχείο, κάνοντάς το φιλικό για μη προγραμματιστές. Αυτή η μετατροπή επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας εργαλεία που συσκευάζουν (tools that package, εργαλεία που δημιουργούν το είδος της δομής-αρχείου που προαναφέρθηκε παραπάνω) το σενάριο με όλες τις εξαρτήσεις του σε ένα μόνο εκτελέσιμο αρχείο. Η περίληψη του κώδικα Arduino μέσα στο αρχείο εγκατάστασης σημαίνει μια λύση "όλα σε ένα", εξασφαλίζοντας ότι οι χρήστες έχουν ό,τι χρειάζονται για να τρέξουν την εφαρμογή αμέσως μετά την εγκατάσταση.

Η επιλογή του Inno Setup για τη δημιουργία του πακέτου εγκατάστασης είναι καθοριστική, καθώς είναι ένα ελεύθερο και πλούσιο σε χαρακτηριστικά εργαλείο που είναι ικανό να δημιουργεί επαγγελματικής εμφάνισης εγκαταστάσεις. Το αρχείο εγκατάστασης που δημιουργήθηκε περιλαμβάνει όχι μόνο το εκτελέσιμο αλλά και τα εργαλεία διεπαφής γραμμής εντολών (CLI) και το αρχείο .ino του Arduino που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του GUI μετά την εγκατάσταση. Δόθηκε έμφαση στην απλοποίηση της διαδικασίας εγκατάστασης, στη μείωση του χρόνου ρύθμισης και στη μείωση της πιθανότητας λαθών από τη μεριά του χρήστη.

Με την ενσωμάτωση της εφαρμογής και όλων των σχετικών συστατικών μέσα σε έναν εγκαταστάτη, επιτυγχάνεται η προσβασιμότητα και η ευκολία χρήσης, διασφαλίζοντας ότι η εφαρμογή μπορεί να διανεμηθεί και να εγκατασταθεί σε οποιοδήποτε συμβατό σύστημα Windows με ελάχιστη προσπάθεια από τον χρήστη, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η ευρύτερη υιοθέτηση (broader adoption) του εκτελέσιμου και από άτομα που δεν έχουν την απαραίτητη τεχνογνωσία για την κατανόηση του κώδικα που υλοποιεί την εφαρμογή.

Ο συνολικός κώδικας GUI βρίσκεται στην ενότητα ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ της παρούσας διπλωματικής.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ**6.1 Κυτταρικές Καλλιέργειες***6.1.1 Απόψυξη κυτταρικής σειράς A431*

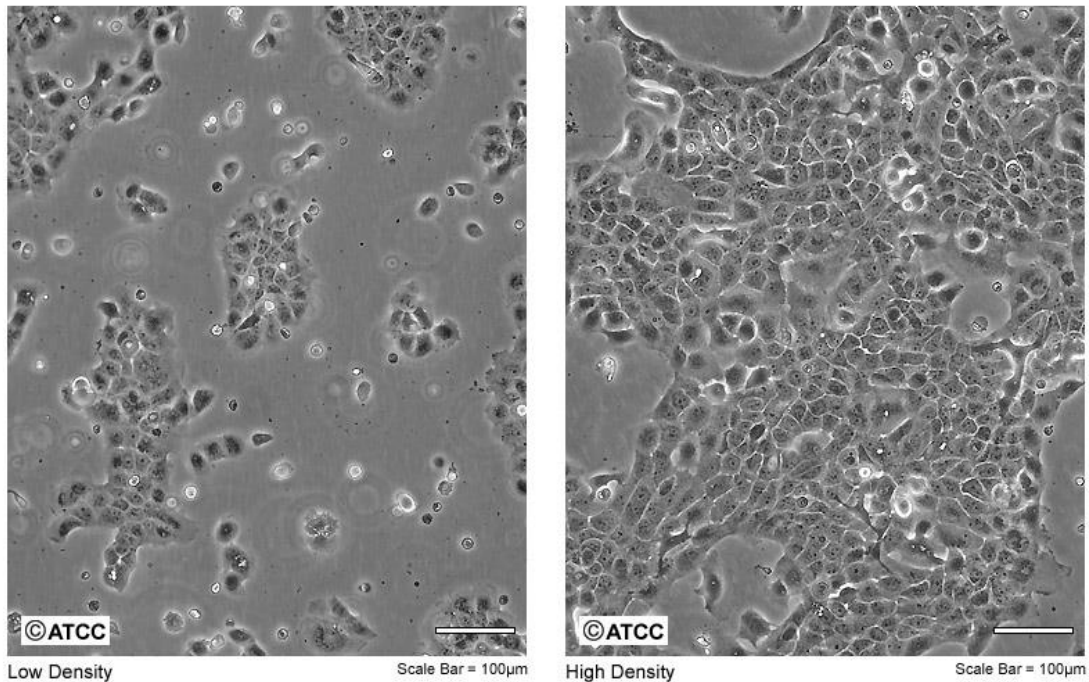
Η αποθήκευση και διατήρηση των κυττάρων γίνεται σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο. Τα φιαλίδια που περιέχουν τα κύτταρα τοποθετούνται σε θήκες που υπάρχουν μέσα σε αυτό. Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε χρήση καρκινικών κυττάρων δέρματος (άνθρωπος).

Η χρησιμοποιούμενη καρκινική σειρά A-431 παρουσιάζει επιθηλιακή μορφολογία και απομονώθηκε από την επιδερμίδα μιας 85χρονης γυναίκας ασθενούς με επιδερμικό καρκίνωμα. Αποτελεί μία από τις κυτταρικές σειρές συμπαγών όγκων που εδραιώθηκαν από τους D.J. Giard, et al [76].

Σε πρώτο στάδιο, όταν το νερό αποκτήσει θερμοκρασία ίδια με αυτή του κλιβάνου ώστε να ξεπαγώσουν τα κύτταρα, γίνεται η τοποθέτηση του φιαλιδίου με τα κύτταρα, το οποίο βρίσκονταν στο υγρό άζωτο, σε ένα ποτήρι ζέσεως. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται άδειασμα του περιεχομένου του φιαλιδίου σε ένα ειδικό διάλυμα, με σκοπό να επιτευχθεί η αναστολή της δράσης του DMSO, που είναι βασικό συστατικό της κατάψυξης των κυττάρων. Το διάλυμα αυτό, έχει όγκο 10 ml περιέχει 9ml PBS, 1ml FBS και 80ml αντιβιοτικό και αναδεύεται καλά (pipeting) για να γίνει ομοιογενές.

Στη συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρηση στη φυγόκεντρο του εργαστηρίου για 6 λεπτά. Η φυγοκέντρηση ρυθμίζεται στις 1200 στροφές. Στη φυγόκεντρο, το μπουκαλάκι με τα κύτταρα, τοποθετείται αντιδιαμετρικά με ένα άλλο, που χρησιμεύει ως αντίβαρο. Παράλληλα με τη διαδικασία αυτή, παρασκευάζεται το διάλυμα πλήρους θρεπτικού μέσου, που έχει όγκο 15ml και περιέχει: 13.5ml DMEM, 1.5ml FBS και 120μl αντιβιοτικό. Ύστερα, προετοιμάζεται η φλάσκα, εισάγοντας σε αυτήν 10ml πλήρους θρεπτικού μέσου (μεγάλη φλάσκα).

ATCC Number: **CRL-1555**
Designation: **A-431**



Εικόνα 32: Κυτταρική σειρά A431 ^[18]

Όταν ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση γίνεται η αφαίρεση του υπερκείμενου με μεγάλη προσοχή, για να μείνουν εσωτερικά στο μπουκαλάκι μόνο τα κύτταρα. Η αφαίρεση αυτή πραγματοποιείται με μία μόνο κίνηση, ώστε να μην υπάρξει παλινδρόμηση και να μην ξεκολλήσει το pellet με τα κύτταρα. Αφού το υπερκείμενο απομακρυνθεί και πεταχτεί, γίνεται εισαγωγή 5ml πλήρους θρεπτικού μέσου στο μπουκαλάκι και αναδεύεται πολύ καλά, προκειμένου να σπάσουν τα συσσωματώματα. Με την χρήση της πιπέτας, πραγματοποιώντας πολύ μαλακές κινήσεις εισάγονται στη φλάσκα τα κύτταρα στη φλάσκα με τέτοιο τρόπο ώστε να κατανεμηθούν ομοιόμορφα. Το στόμιο αποστειρώνεται εξωτερικά και εσωτερικά και η φλάσκα κλείνει. Στο τελικό στάδιο, η φλάσκα παρατηρείται στο μικροσκόπιο και τοποθετείται στον κλίβανο.

6.1.2 Ανακαλλιέργεια κυτταρικής σειράς

Κατόπιν παρέλευσης λίγων ημερών, η φλάσκα παρατηρείται εκ νέου στο μικροσκόπιο, για να διαπιστωθεί η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Σε περίπτωση που το αποτέλεσμα είναι ικανοποιητικό, εκκινεί η διαδικασία ανακαλλιέργειας των κυττάρων.

Έγινε η χρήση των εξής 3 διαλυμάτων:

- Διάλυμα Α (10ml): 9ml PBS, 1ml FBS, 80μl αντιβιοτικό.

Χρησιμοποιήθηκε για την αναστολή της δράσης της τρυψίνης.

- Διάλυμα Β (15ml): 13,5ml DMEM, 1,5ml FBS, 120μl αντιβιοτικό.

Αποτελεί το Πλήρες Θρεπτικό Μέσο (ΠΘΜ).

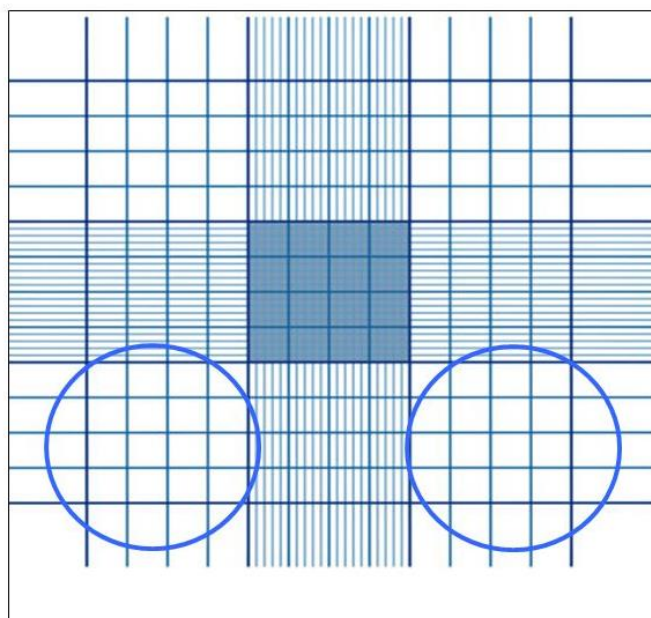
- Διάλυμα Γ (10ml): 10ml PBS, 80μl αντιβιοτικό.

Χρησιμοποιήθηκε για ξέπλυμα.

Αρχικά απορρίπτεται το παλιό μέσο. Η διαδικασία αυτή γίνεται με μεγάλη προσοχή και πάντα από το πλάι για να μην υπάρξει απώλεια κυττάρων. Το ξέπλυμα της φλάσκας γίνεται με τη χρήση 2 ml του διαλύματος Γ και επαναλαμβάνεται μια φορά ακόμα. Στη συνέχεια, για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα προστίθενται 2ml τρυψίνης και η φλάσκα ανακινείται σε συνδυασμό με μικρά χτυπήματα. Η παραμονή της τρυψίνης στη φλάσκα δεν πρέπει να υπερβαίνει το χρονικό όριο των 3 λεπτών, καθώς είναι τοξική για τα κύτταρα, επομένως για να γίνει αναστολή της δράσης της χρησιμοποιούνται 6ml από το διάλυμα Α. Αφού γίνει καλή ανακίνηση, γίνεται εισαγωγή του περιεχομένου της φλάσκας σε ένα μπουκαλάκι. Στη φλάσκα εισάγονται ακόμα 4ml διαλύματος Α και κατόπιν ανακίνησης προστίθενται και αυτά στο ίδιο μπουκαλάκι, το οποίο τοποθετείται στην φυγόκεντρο για 6 λεπτά στις 1200rpm. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας αυτής, το υπερκείμενο αφαιρείται με προσοχή με μία μόνο κίνηση και πετιέται. Στο μπουκαλάκι γίνεται εισαγωγή 5ml διαλύματος Β (πλήρους θρεπτικού μέσου), και ξανά γίνεται πολύ καλή ανάδευση για να διασπαστούν τα συσσωματώματα. Με χρήση πιπέτας και πολύ μαλακών κινήσεων, τα κύτταρα τοποθετούνται μέσα στη νέα φλάσκα, που ήδη έχει προετοιμασθεί με την προσθήκη 10ml διαλύματος Β (πλήρους θρεπτικού μέσου). Το στόμιο αποστειρώνεται εξωτερικά και εσωτερικά και η φλάσκα κλείνει. Τέλος, η φλάσκα παρατηρείται στο μικροσκόπιο και τοποθετείται στον κλίβανο όπου γίνεται η επώαση των κυττάρων.

6.1.3 Μεθοδολογία μέτρησης αριθμού κυττάρων

Για να επιτυγχάνεται ακρίβεια στα πειράματα που πραγματοποιούνται, απαραίτητη είναι η μέτρηση των κυττάρων, ώστε να μπορεί να γίνεται έλεγχος της εξής κρίσιμης παραμέτρου: τα τριβλία με τα κύτταρα να περιέχουν σχεδόν τον ίδιο κυτταρικό αριθμό. Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων διεξάγεται με τη βοήθεια του αιματοκυτταρόμετρου (πλακίδιο) Neubauer, το οποίο αποτελεί μια προσαρμοσμένη αντικειμενοφόρος πλάκα που διαθέτει δύο λείες και καταλλήλως επεξεργασμένες επιφάνειες. Κάθε επιφάνεια διαθέτει ένα τετράγωνο πλέγμα, αποτελούμενο από εννιά κύρια τετράγωνα, μήκους πλευράς 1mm. Κάθε τετράγωνο ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές οι οποίες απέχουν μεταξύ τους 2,5μm, και χρησιμεύουν στον καθορισμό των ορίων που καταδεικνύουν κάθε φορά εάν τα κύτταρα βρίσκονται εντός ή εκτός πλέγματος. Κάθε κύριο τετράγωνο διαθέτει εξίσου επιπλέον διαβαθμίσεις προς διευκόλυνση της μέτρησης των κυττάρων, ενώ από τα 9 κύρια τετράγωνα, μόνο τα 4 από αυτά τα οποία και βρίσκονται στις γωνίες του τετράγωνου πλέγματος χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση του κυτταρικού αριθμού. Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0,1mm πιο χαμηλά από δύο «ράχες» όπου και στηρίζεται η καλυπτρίδα. Ακόμη, μεταξύ των σημείων στήριξης της καλυπτρίδας και της εξωτερικής πλευράς κάθε λείας τετραγωνισμένης επιφάνειας υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια, στην οποία μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα και απλώνεται με τριχοειδικά φαινόμενα [74].



Εικόνα 33: Πλακίδιο Neubauer

Η διαδικασία της μέτρησης είναι η ακόλουθη:

Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιείται αραιώση σε έναν αντιπροσωπευτικό και μικρό όγκο κυττάρων. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε ένα tube μαζί με 4ml πλήρως θρεπτικού μέσου και από το διάλυμα αυτό λαμβάνονται 50μl τα οποία και εισάγονται σε 200μl PBS (αραιώση 1 : 5).

Ακολούθως, γίνεται ο καθαρισμός του κυτταρομετρητή με διάλυμα ισοπροπανόλης – απιονισμένου νερού, σε αναλογία 70% - 30%.

9μl του παρασκευασμένου διαλύματος τοποθετούνται στον κυτταρομετρητή μαζί με 50μl κυττάρων-πλήρως θρεπτικού μέσου και 200μl PBS. Ακολουθεί η μέτρηση του κυτταρικού αριθμού που περιέχονται στα 4 τετράγωνα στις γωνίες του πλακιδίου.

Με την ολοκλήρωση της μέτρησης αυτής, πραγματοποιείται ο υπολογισμός του μέσου όρου των κυττάρων από τα 4 τετράγωνα (ΜΟ). Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων προκύπτει ως εξής:

Συνολικός αριθμός κυττάρων = Μέσος όρος (ΜΟ) * 10.000 * αριθμός αραιώσης * αρχικός όγκος διαλύματος που περιέχει τα κύτταρα.

Εν προκειμένω είναι: (ΜΟ) * 10.000 * 5 * 4

6.1.4 Μελέτη φωτοδυναμικής δράσης της κουρκουμίνης στην κυτταρική σειρά A431

Αρχικά ετοιμάστηκαν τα τριβλία που θα χρειαστούν. Από την υπάρχουσα φλάσκα έγινε διαχωρισμός των κυττάρων σε πέντε τριβλία, ένα για κάθε σχήμα ακτινοβολήσης και ένα που χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά (control). Αφού έγινε αυτό, τα τριβλία τοποθετήθηκαν στον κλίβανο για να επωαστούν για 24 ώρες.

Μόλις πέρασε το χρονικό αυτό διάστημα, σε κάθε τριβλίο εισάχθηκε το διάλυμα με την κουρκουμίνη. Η τιμή συγκέντρωσης που επιλέχθηκε είναι 1μΜ, καθώς για αυτή τη συγκέντρωση παρατηρήθηκε ότι δεν προκαλείται σημαντική κυτταροτοξικότητα απουσία φωτός. Με τη χρήση του μητρικού διαλύματος της κουρκουμίνης, όπου ο διαλύτης είναι DMSO, δημιουργήθηκαν τα επιθυμητά διαλύματα σε πλήρες θρεπτικό μέσο (ΠΘΜ). Τέλος, τα τριβλία τοποθετήθηκαν πάλι στον κλίβανο για να επωαστούν για 3,5 ώρες.

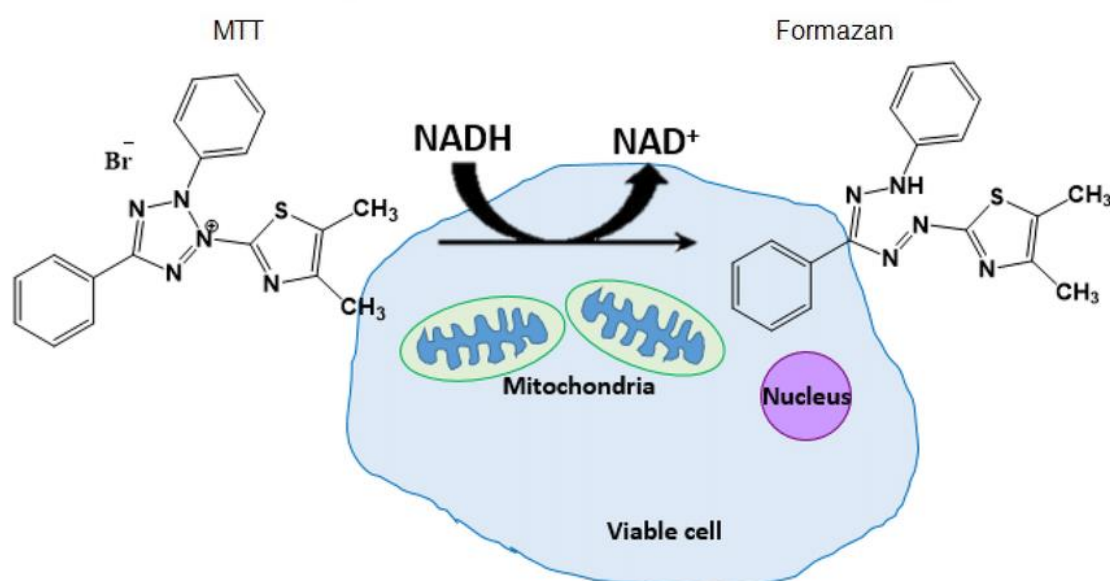
Αφού πέρασαν οι 3,5 ώρες, τα τριβλία βγήκαν από τον κλίβανο και το κάθε ένα πλύθηκε δυο φορές με 1ml PBS, για να απομακρυνθεί η ουσία που δεν είχε εισέλθει στα κύτταρα. Στη συνέχεια, προστέθηκε στο κάθε ένα 1ml πλήρες θρεπτικό μέσο για να είναι προστατευμένα μέχρι να ακτινοβοληθούν.

Τα σχήματα ακτινοβολήσης που πραγματοποιήθηκαν είναι τα κάτωθι:

- Ακτινοβολήση Α: 5 λεπτά συνεχούς ακτινοβολήσης ($12\text{mW}/\text{cm}^2$)
- Ακτινοβολήση Β: παλμική ακτινοβολήση με διάρκεια 1 λεπτό, χρόνο ανάκαμψης 1 λεπτό (dark interval) και αριθμό επαναλήψεων 5 ($12\text{mW}/\text{cm}^2$).
- Ακτινοβολήση Γ: παλμική ακτινοβολήση με διάρκεια 2,5 λεπτά, χρόνο ανάκαμψης 2,5 λεπτά (dark interval) και αριθμό επαναλήψεων 2 ($12\text{mW}/\text{cm}^2$).
- Ακτινοβολήση Δ: παλμική ακτινοβολήση με διάρκεια 1 λεπτό, χρόνο ανάκαμψης 5 λεπτά (dark interval) και αριθμό επαναλήψεων 5 ($12\text{mW}/\text{cm}^2$)

6.1.5 Πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας κυττάρων – βιοχημικός έλεγχος MTT

Ο έλεγχος της βιωσιμότητας των κυττάρων περιλαμβάνει τη χρήση του MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide). Η διάλυση του MTT σε PBS δίνει ένα υδατικό διάλυμα με κίτρινη απόχρωση που αντιδρά με τις μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες των μεταβολικά ενεργών κυττάρων και παράγει βιολετί - μώβ κρυστάλλους formazan [75]. Οι κρύσταλλοι αυτοί διαλύονται σε διάλυμα που αποτελείται από ισοπροπανόλη, Triton X και υδροχλωρικό οξύ, με αποτέλεσμα να μπορεί να γίνεται φασματοφωτομετρική μέτρηση της απορρόφησης. Τα νεκρά κύτταρα δεν έχουν μιτοχονδριακή δραστηριότητα και δεν μπορούν να σηματοδοτήσουν τον σχηματισμό κρυστάλλων formazan, επομένως είναι αποδεκτό πως η ποσότητα των κρυστάλλων formazan αντιπροσωπεύει το πλήθος των ζωντανών κυττάρων.



Εικόνα 34: Χημική δομή του MTT και των κρυστάλλων Formazan του MTT ^[19]

6.2 Φωτοφυσικές μελέτες κουρκουμίνης

6.2.1 Μεθοδολογία μελέτης απορρόφησης σε DMSO

Αρχικά, παρασκευάζονται τα μητρικά διαλύματα των ουσιών. Οι ουσίες βρίσκονται σε μορφή σκόνης και εν συνεχεία διαλύονται σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Ο υπολογισμός της τελικής συγκέντρωσης του μητρικού διαλύματος γίνεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$C = \frac{m \cdot 1000}{V \cdot Mr}, \text{ όπου}$$

m: μάζα ουσίας (gr)

V: όγκος διαλύματος (ml)

Mr: μοριακό βάρος ουσίας

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει πόσα γραμμάρια ουσίας και πόσα ml DMSO χρησιμοποιήθηκαν για να δημιουργηθεί η κατάλληλη συγκέντρωση για το μητρικό διάλυμα.

Ουσία	Μοριακό βάρος	Μάζα	Όγκος DMSO	Συγκέντρωση μητρικού διαλύματος
Curcumin Mix	368.38	$8,4 \cdot 10^{-3}$ gr	1,5ml	15,4mM

Πίνακας 3: Συνοπτική παρουσίαση των παραμέτρων για τη δημιουργία του μητρικού διαλύματος

Στη συνέχεια, αφού έχει δημιουργηθεί το μητρικό διάλυμα της κουρκουμίνης, παρασκευάζεται με αραιώση διάλυμα τελικού όγκου 3ml και συγκέντρωσης $C=7,7\text{mM}$. Το διάλυμα αυτό εισάγεται σε κυβέτα φασματοφωτόμετρου απορρόφησης. Πριν την έναρξη της μέτρησης, γίνεται μηδενισμός του οργάνου για την αποφυγή σφαλμάτων εξαιτίας θορύβου ή πιθανής απορρόφησης του διαλύτη.

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή των φασμάτων απορρόφησης ονομάζεται Perkin-Elmer Lambda 35 UV-Vis. Τα φάσματα ελήφθησαν σε περιοχή από 300 έως 700nm με ταχύτητα σάρωσης 480nm/min.

6.2.2 Μεθοδολογία μελέτης της ικανότητας παραγωγής ελεύθερων ριζών με χρήση NADH

Κατά την πραγματοποίηση της φωτοδυναμικής θεραπείας, κρίνεται απαραίτητο ο φωτοευαισθητοποιητής που έχει επιλεγεί να παρουσιάζει υψηλή παραγωγή ελευθέρων ριζών. Στην παρούσα ενότητα, παρουσιάζονται τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τη μελέτη της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών της Curcumin Mix κατά την συνεχή και παλμική ακτινοβολία αντίστοιχα.

Για τη λήψη των ζητούμενων μετρήσεων γίνεται χρήση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS. Τα φάσματα λαμβάνονται με σάρωση από τα 300 έως τα 700nm και πραγματοποιείται έλεγχος της απορρόφησης στα 340nm, καθώς σε αυτό το μήκος κύματος εμφανίζεται η χαρακτηριστική κορυφή του NADH. Η ταχύτητα σάρωσης είναι 480 nm/min και η ισχύς με την οποία έγινε η ακτινοβολία των διαλυμάτων είναι 11,28mW/cm². Το προς ακτινοβολία διάλυμα περιέχει:

- 94μl διαλύματος NADH (παίρονται από το διάλυμα συγκέντρωσης C=3,2mM)
- 19μl διαλύματος EDTA (παίρονται από το διάλυμα συγκέντρωσης C=15,5mM)
- 4μl διαλύματος της προς εξέταση κουρκουμίνης (παίρονται από το διάλυμα συγκέντρωσης C=7,7mM)
- 2883μl DMSO

Σημειώνεται πως πριν την παρασκευή του διαλύματος, δημιουργήθηκαν μητρικά διαλύματα για τις ουσίες NADH και EDTA με συγκέντρωση 3,2mM και 15,5mM αντιστοίχως σε PBS.

Στον ακόλουθο πίνακα καταγράφονται οι ουσίες που περιέχονται στο διάλυμα προς ακτινοβολία καθώς και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους σε αυτό. Ο όγκος του διαλύματος είναι 3ml.

Ουσίες	Συγκέντρωση ουσιών στο διάλυμα
NADH	100 μM
EDTA	0.1 mM
Curcumin Mix	10 μM

Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις των ουσιών που περιέχονται στο προς ακτινοβολία διάλυμα

Πριν κάθε μέτρηση γίνεται μηδενισμός για την αποφυγή σφαλμάτων που οφείλονται σε θόρυβο του οργάνου ή σε πιθανή απορρόφηση του διαλύτη. Ο μηδενισμός στη συγκεκριμένη περίπτωση πραγματοποιήθηκε με χρήση DMSO. Στη συνέχεια καταγράφεται το φάσμα απορρόφησης του διαλύματος, πριν και μετά την ακτινοβολία. Κατόπιν, το διάλυμα που πλέον αποτελείται από NADH, EDTA,

κουρκουμίνη και DMSO ακτινοβολείται με 4 διαφορετικά σχήματα ακτινοβολήσης και λαμβάνεται το εκάστοτε φάσμα απορρόφησης.

Τα σχήματα ακτινοβολήσης που πραγματοποιήθηκαν είναι τα κάτωθι:

- Ακτινοβολήση Α: 5 λεπτά συνεχούς ακτινοβολήσης ($11,28\text{mW}/\text{cm}^2$)
- Ακτινοβολήση Β: παλμική ακτινοβολήση με διάρκεια 1 λεπτό, χρόνο ανάκαμψης 1 λεπτό (dark interval) και αριθμό επαναλήψεων 5 ($11,28\text{mW}/\text{cm}^2$).
- Ακτινοβολήση Γ: παλμική ακτινοβολήση με διάρκεια 2,5 λεπτά, χρόνο ανάκαμψης 2,5 λεπτά (dark interval) και αριθμό επαναλήψεων 2 ($11,28\text{mW}/\text{cm}^2$).
- Ακτινοβολήση Δ: παλμική ακτινοβολήση με διάρκεια 1 λεπτό, χρόνο ανάκαμψης 5 λεπτά (dark interval) και αριθμό επαναλήψεων 5 ($11,28\text{mW}/\text{cm}^2$)

Οι ακτινοβολήσεις Α-Δ πραγματοποιήθηκαν 3 φορές, σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας:

- Στους 26°C (με χρήση ανεμιστήρα)
- Στους 28°C (θερμοκρασία δωματίου)
- Στους 37°C (με χρήση εξωτερικής πηγής θέρμανσης)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**7.1 Συγκριτική μελέτη ικανότητας παραγωγής ελεύθερων ριζών των διαλυμάτων της κουρκουμίνης σε συνθήκες συνεχούς και παλμικής ακτινοβολίας**

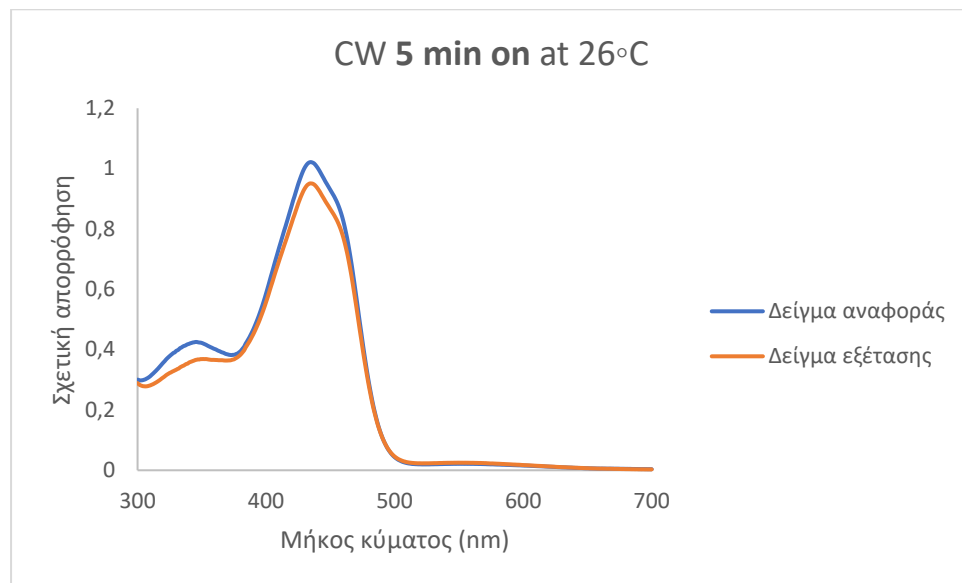
Ακολουθήθηκε η διαδικασία που αναλύθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Από το μητρικό μας διάλυμα παρασκευάστηκε με αραιώση σε DMSO διάλυμα τελικού όγκου 3ml και συγκέντρωσης $C=7,7$ mM. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργήθηκαν 24 παρόμοια διαλύματα (12 δείγματα εξέτασης και τα αντίστοιχα δείγματα αναφοράς τους). Τα διαλύματα αυτά εισάχθηκαν σε κυβέτες φασματοφωτόμετρου απορρόφησης των 3ml. Πριν από την έναρξη της κάθε μέτρησης επιλέχθηκε το *Autozero*, δηλαδή έγινε ο μηδενισμός του σήματος, με σκοπό την ελαχιστοποίηση του θορύβου και της πιθανής απορρόφησης του διαλύτη DMSO.

Για τη διεξαγωγή των μετρήσεων, όπως έχει αναφερθεί, έγινε χρήση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer. Η λήψη των φασμάτων απορρόφησης για κάθε διάλυμα λήφθηκε με σάρωση στην υπεριώδη και ορατή περιοχή, με αποτέλεσμα η απορρόφηση να μετρείται από τα 300 μέχρι τα 700nm.

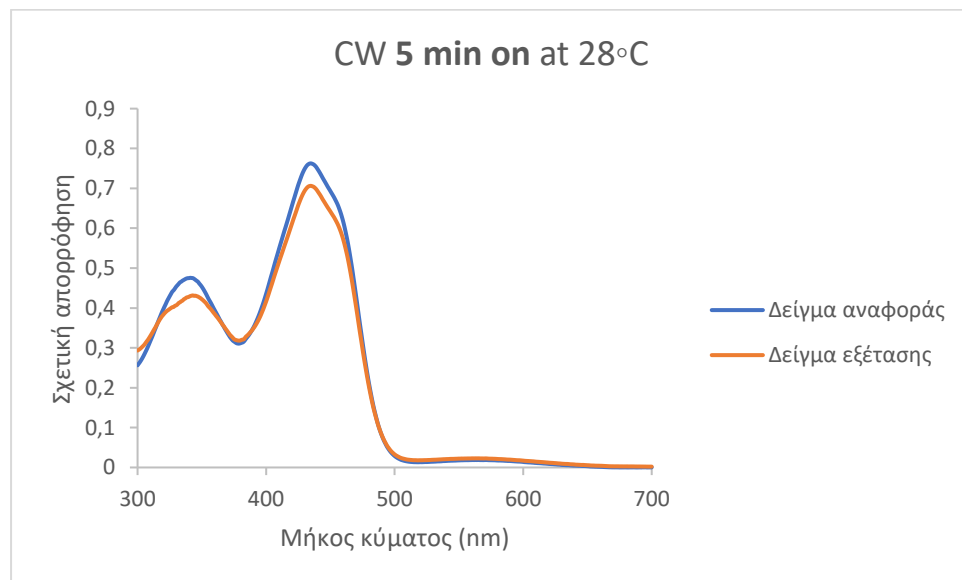
Το κάθε μείγμα ακτινοβολήθηκε με ισχύ $11,28$ mW/cm², ώστε να διαπιστωθεί η ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών. Πιο συγκεκριμένα τα τελικά διαλύματα ακτινοβολίας περιείχαν: 94μl NADH συγκέντρωσης 100 μM, 19μl EDTA συγκέντρωσης 0.1 mM, 4 μl κουρκουμίνης και 2883 μl DMSO. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικότερα στο κεφάλαιο 6.2.

7.1.1 Αποτελέσματα

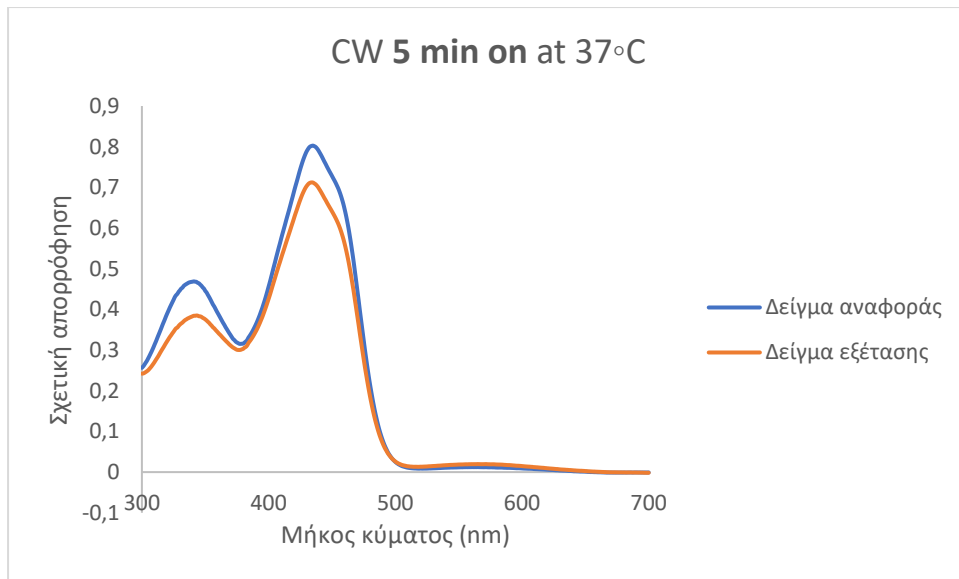
Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης για τις ακτινοβολήσεις Α-Δ στις εκάστοτε συνθήκες θερμοκρασίας.



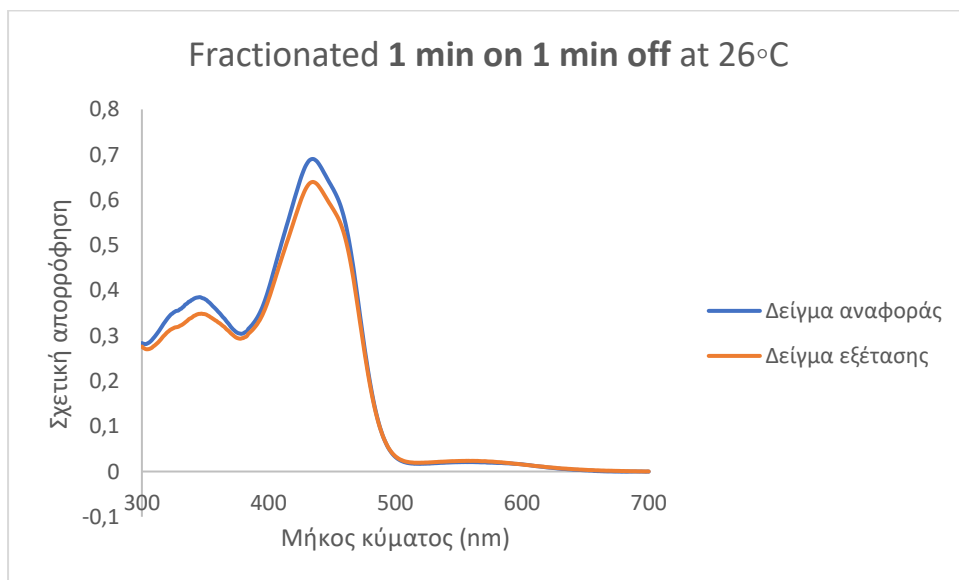
Διάγραμμα 2: Φάσμα απορρόφησης συνεχούς ακτινοβολήσης στους 26 °C



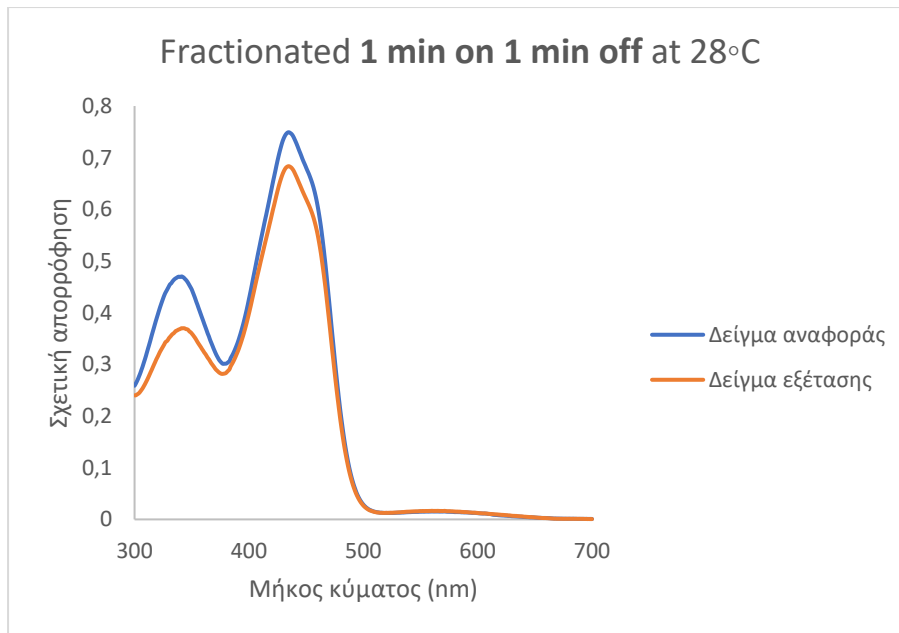
Διάγραμμα 3: Φάσμα απορρόφησης συνεχούς ακτινοβολήσης στους 28 °C



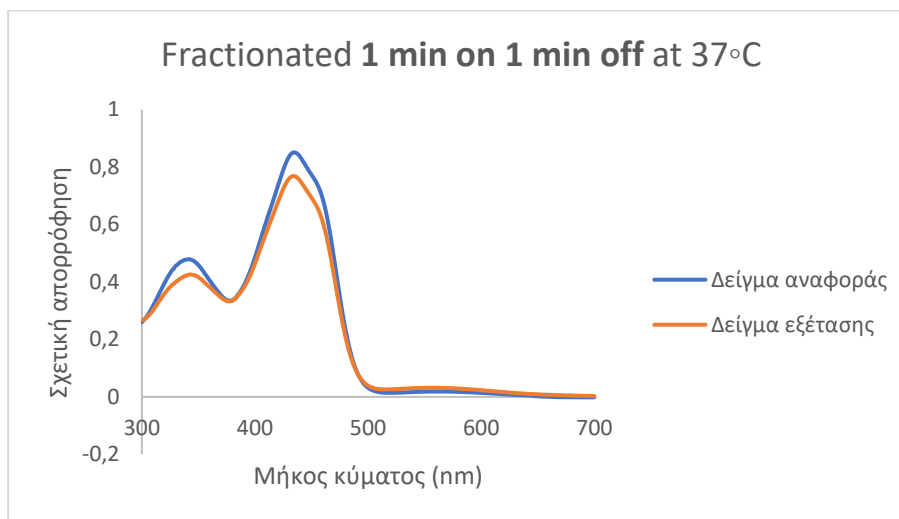
Διάγραμμα 4: Φάσμα απορρόφησης συνεχούς ακτινοβολίας στους 37 °C



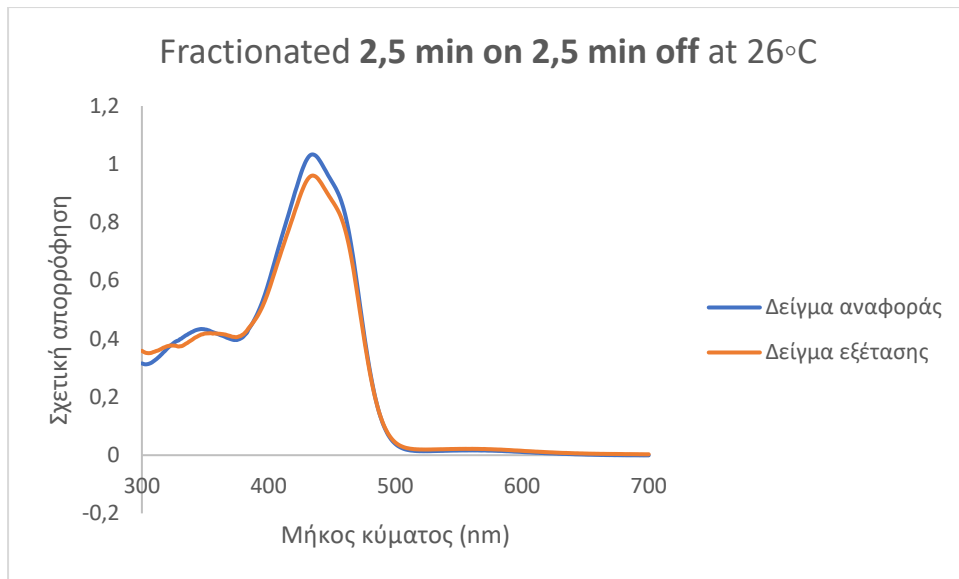
Διάγραμμα 5: Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολίας (1 min on/1 min off) στους 26 °C



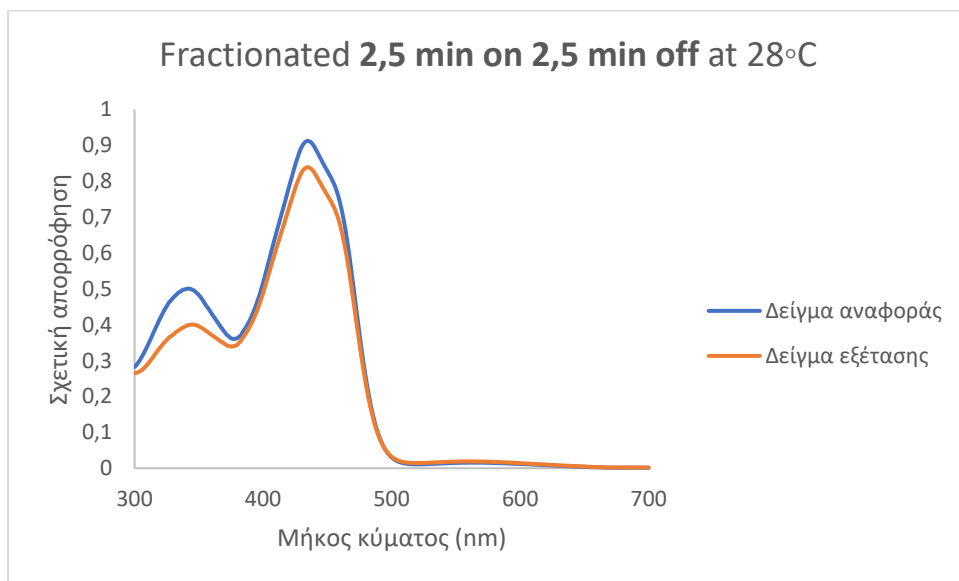
Διάγραμμα 6: Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολήσης (1 min on/1 min off) στους 28 °C



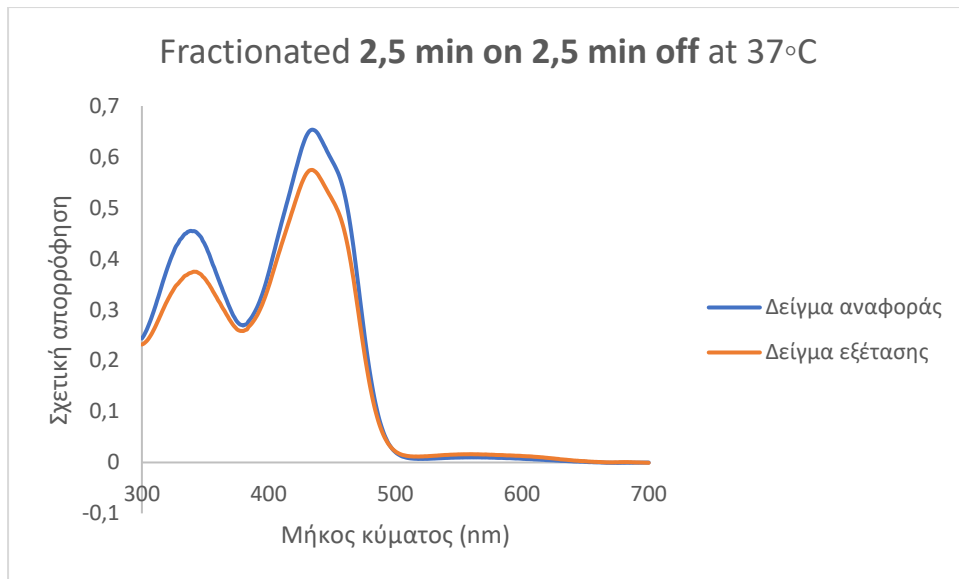
Διάγραμμα 7: Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολήσης (1 min on/1 min off) στους 37 °C



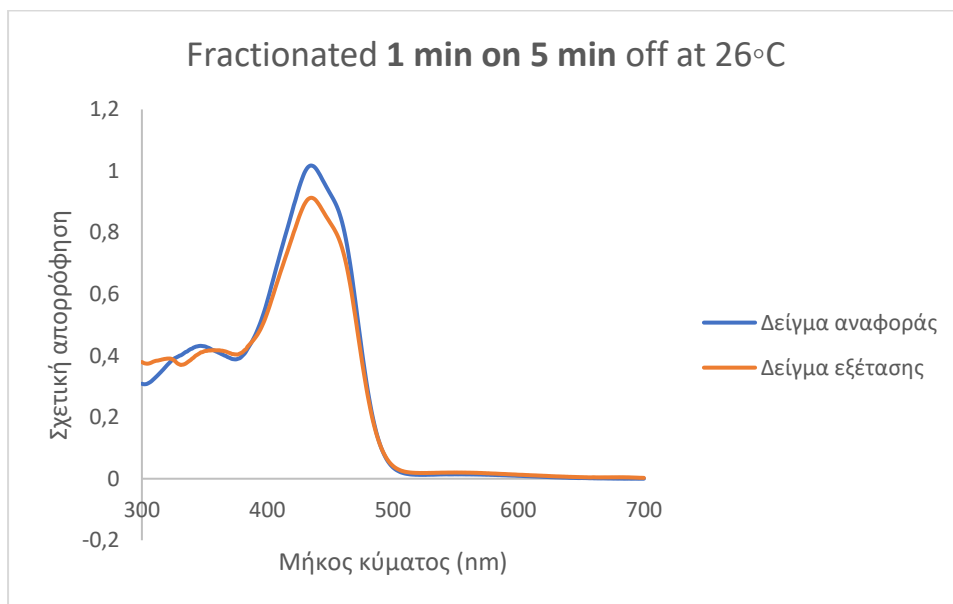
Διάγραμμα 8: Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολήσης (2,5 min on/2,5 min off) στους 26 °C



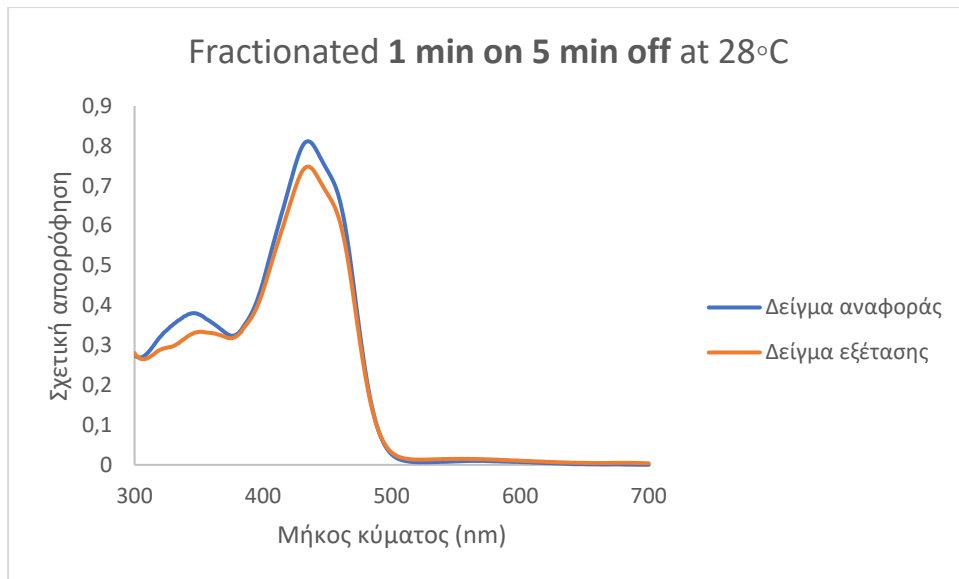
Διάγραμμα 9: Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολήσης (2,5 min on/2,5 min off) στους 28 °C



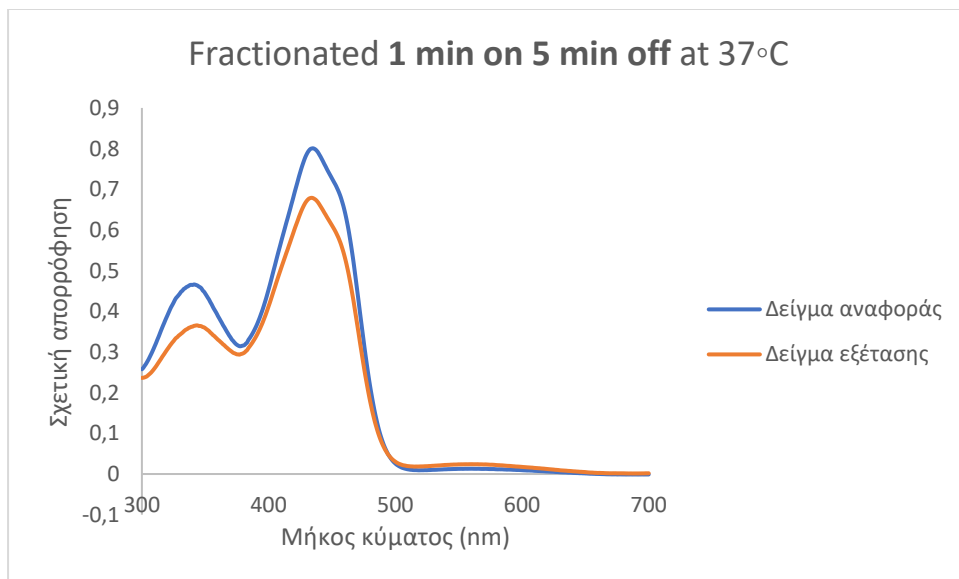
Διάγραμμα 10: Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολίας (2,5 min on/2,5 min off) στους 37 °C



Διάγραμμα 11: Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολίας (1 min on/5 min off) στους 26 °C



Διάγραμμα 12: Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολίας (1 min on/5 min off) στους 28 °C



Διάγραμμα 13: Φάσμα απορρόφησης παλμικής ακτινοβολίας (1 min on/5 min off) στους 37 °C

7.1.2 Συμπεράσματα

Για την ανάλυση των ανωτέρω αποτελεσμάτων και την εξαγωγή συμπερασμάτων δημιουργήσαμε τους κατώθι πίνακες και διαγράμματα:

Αρχικά, για κάθε θερμοκρασία, υπολογίστηκε το άθροισμα της σχετικής απορρόφησης από τα 322 έως τα 402nm για κάθε σχήμα ακτινοβολήσης, στο δείγμα αναφοράς και στο δείγμα εξέτασης.

	Άθροισμα απορρόφησης δείγματος αναφοράς (322-402 nm)	Άθροισμα απορρόφησης δείγματος εξέτασης (322-402 nm)
CW 26 °C	30,69094	27,40438
CW 28 °C	31,41568	30,34086
CW 37 °C	31,08337	26,67105

Πίνακας 5: Αθροίσματα σχετικής απορρόφησης δειγμάτων αναφοράς και εξέτασης για τη συνεχή ακτινοβολήση

	Άθροισμα απορρόφησης δείγματος αναφοράς (322-402 nm)	Άθροισμα απορρόφησης δείγματος εξέτασης (322-402 nm)
1 on 1 off 26 °C	27,50695	25,43281
1 on 1 off 28 °C	30,96327	25,65423
1 on 1 off 37 °C	31,94148	29,58184

Πίνακας 6: Αθροίσματα σχετικής απορρόφησης δειγμάτων αναφοράς και εξέτασης για την παλμική ακτινοβολήση (1 min on/1 min off)

	Άθροισμα απορρόφησης δείγματος αναφοράς (322-402 nm)	Άθροισμα απορρόφησης δείγματος εξέτασης (322-402 nm)
2,5 on 2,5 off 26 °C	31,54902	31,67655
2,5 on 2,5 off 28 °C	33,83013	28,42585
2,5 on 2,5 off 37 °C	29,48435	25,38027

Πίνακας 7: Αθροίσματα σχετικής απορρόφησης δειγμάτων αναφοράς και εξέτασης για την παλμική ακτινοβολήση (2,5 min on/2,5 min off)

	Άθροισμα απορρόφησης δείγματος αναφοράς (322-402 nm)	Άθροισμα απορρόφησης δείγματος εξέτασης (322-402 nm)
1 on 5 off 26 °C	31,35675	32,03436
1 on 5 off 28 °C	27,22469	24,84269
1 on 5 off 37 °C	30,9747	25,55772

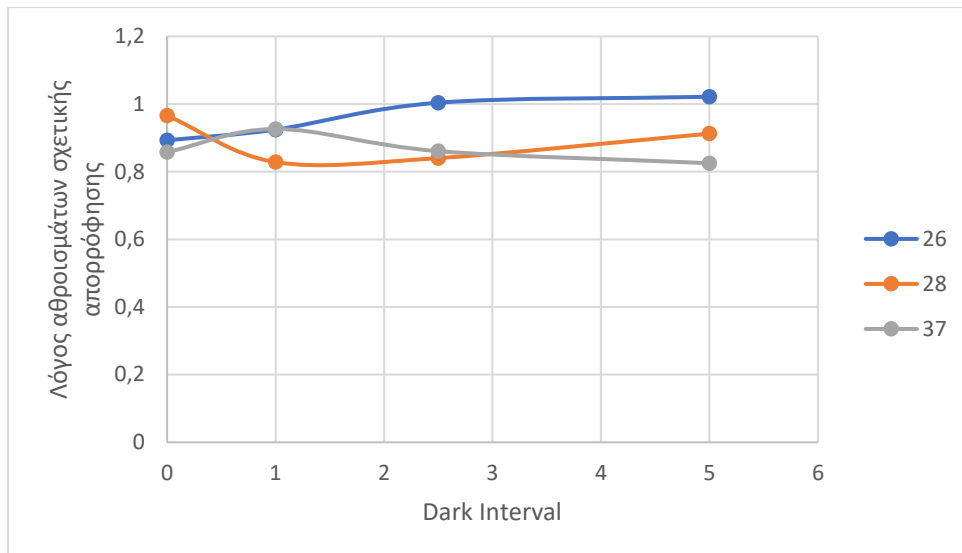
Πίνακας 8: Άθροισματα σχετικής απορρόφησης δειγμάτων αναφοράς και εξέτασης για την παλμική ακτινοβολή (1 min on/5 min off)

Έπειτα, για κάθε θερμοκρασία δημιουργήθηκε ο λόγος των αθροισμάτων της σχετικής απορρόφησης (άθροισμα σχετικής απορρόφησης δείγματος εξέτασης προς άθροισμα σχετικής απορρόφησης δείγματος αναφοράς), από το μικρότερο έως το μεγαλύτερο dark interval των ακτινοβολήσεων που πραγματοποιήθηκαν.

Dark interval	Λόγος αθροισμάτων (δείγμα εξέτασης/δείγμα αναφοράς) στους 26 °C	Λόγος αθροισμάτων (δείγμα εξέτασης/δείγμα αναφοράς) στους 28 °C	Λόγος αθροισμάτων (δείγμα εξέτασης/δείγμα αναφοράς) στους 37 °C
0 min	0,892914	0,965787	0,858049
1 min	0,924596	0,828537	0,926126
2,5 min	1,004042	0,840252	0,860805
5 min	1,02161	0,912506	0,825116

Πίνακας 9: Λόγος αθροισμάτων σχετικής απορρόφησης δειγμάτων

Οι τιμές που προέκυψαν καταδεικνύουν την ικανότητα παραγωγής ελεύθερων ριζών: όσο μικρότερος είναι ο δημιουργηθέν λόγος, τόσο περισσότερες ελεύθερες ρίζες παράχθηκαν. Από τον τελευταίο πίνακα εξήχθηκε το ακόλουθο διάγραμμα:



Διάγραμμα 14: Λόγοι αθροισμάτων σχετικής απορρόφησης συναρτήσει του dark interval

	p-value
Data 26 °C / Data 28 °C	0,14861
Data 26 °C / Data 37 °C	0,04725
Data 28 °C / Data 37 °C	0,635322

Πίνακας 10: p-value των δεδομένων ανά θερμοκρασία

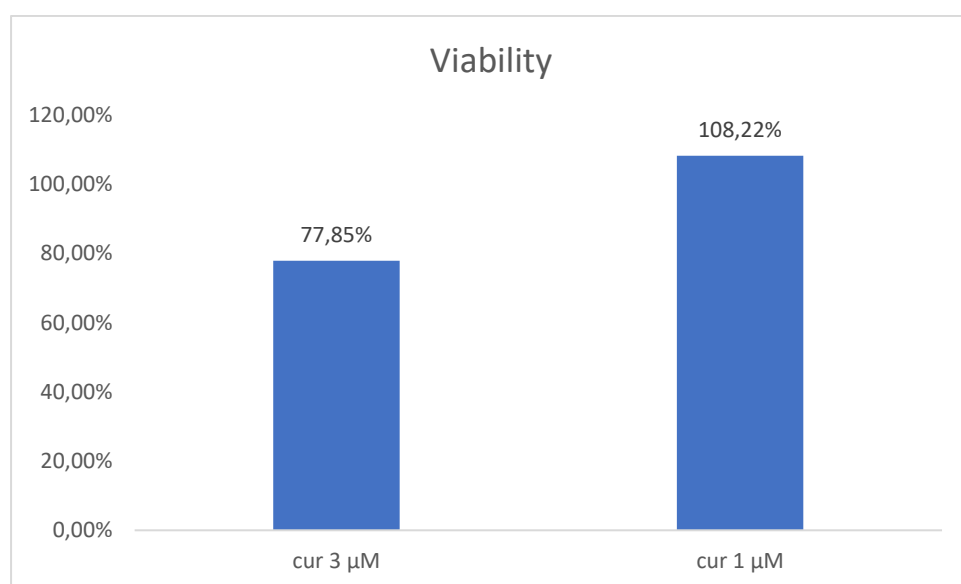
Διεξάγοντας t-test στις στήλες του πίνακα 9 ανά δύο, με κατώφλι 0,05, δημιουργήθηκε ο πίνακας 10. Από το p-value παρατηρήθηκε πως δεν εμφανίζεται σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των συλλεχθέντων δεδομένων. Συνεπώς, ούτε η θερμοκρασία ούτε το σχήμα ακτινοβολήσης έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή ελεύθερων ριζών των διαλυμάτων της κουρκουμίνης.

7.2 Συγκριτική μελέτη της επαγόμενης στα κύτταρα A431 τοξικότητας από την κουρκουμίνη

Στην ενότητα αυτή μελετάται η τοξικότητα που επάγεται από την κουρκουμίνη στην κυτταρική σειρά A431 απουσία φωτός. Διεξήχθησαν πειράματα για δύο τιμές συγκέντρωσης της Curcumin Mix: 1 μ M και 3 μ M.

7.2.1 Αποτελέσματα

Τα κύτταρα της σειράς A431 καλλιεργήθηκαν, τοποθετήθηκαν σε τριβλία και στη συνέχεια επώαστηκαν με τις προαναφερόμενες τιμές συγκεντρώσεων της κουρκουμίνης. Η βιωσιμότητά τους μελετήθηκε σύμφωνα με τον βιοχημικό έλεγχο μέτρησης βιωσιμότητας κυττάρων MTT. Ακολούθως παρουσιάζονται τα διαγράμματα βιωσιμότητας κυττάρων (%) σε σχέση με την τιμή συγκέντρωσης (μ M) της κουρκουμίνης. Αυτά προέκυψαν κατόπιν λήψης των φασμάτων απορρόφησης που είναι μέρος του πρωτόκολλου ελέγχου βιωσιμότητας MTT με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS.



Διάγραμμα 15: Βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων αναφορικά με τη συγκέντρωση της κουρκουμίνης

7.2.2 Συμπεράσματα

	Absorption (triplet)			Control (triplet)			Τυπική απόκλιση	p-value
Curcumin 3μM	3,303	2,036	1,902	2,858	2,955	3,488	0,773092	0,231685
Curcumin 1μM	3,381	3,536	3,149				0,19447725	0,321965

Πίνακας 11: Τιμές απορρόφησης καρκινικών κυττάρων αναφορικά με τη συγκέντρωση κουρκουμίνης

Διεξάγοντας t-test στα αποτελέσματα, με κατώφλι 0,05, παρατηρήθηκε από το p-value πως δεν παρουσιάζεται σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων αναφοράς και εξέτασης. Συνεπώς, καμία από τις υπό μελέτη συγκεντρώσεις κουρκουμίνης, 1μM και 3μM αντίστοιχα, δεν θεωρούνται τοξικές για τα κύτταρα.

7.3 Συγκριτική μελέτη φωτοδυναμικής δράσης της κουρκουμίνης στην κυτταρική σειρά A431 μετά από συνεχή και διακοπτόμενη ακτινοβολήση

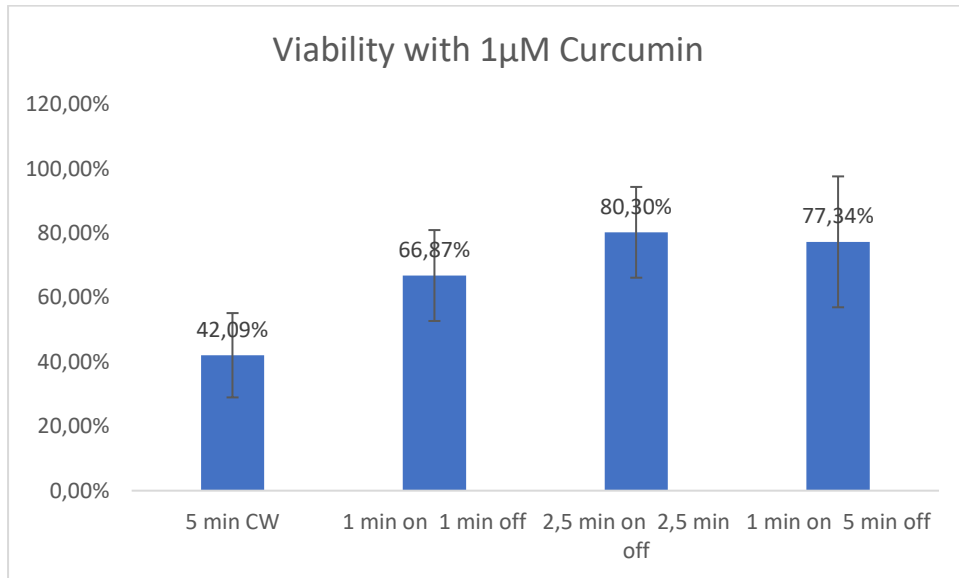
Στην ενότητα αυτή αναλύονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα A431 με τη μεθοδολογία που έχει νωρίτερα περιγραφεί στο κεφάλαιο 6.1. Ως φωτοευαίσθητη ουσίες χρησιμοποιείται η Curcumin Mix. Η τιμή της συγκέντρωσης που επιλέγεται είναι τα 1μM. Διεξήχθησαν πειράματα για 4 σχήματα ακτινοβολήσης:

- Ακτινοβολήση Α: 5 λεπτά συνεχούς ακτινοβολήσης (12mW/cm²)
- Ακτινοβολήση Β: παλμική ακτινοβολήση με διάρκεια 1 λεπτό, χρόνο ανάκαμψης 1 λεπτό (dark interval) και αριθμό επαναλήψεων 5 (12mW/cm²).
- Ακτινοβολήση Γ: παλμική ακτινοβολήση με διάρκεια 2,5 λεπτά, χρόνο ανάκαμψης 2,5 λεπτά (dark interval) και αριθμό επαναλήψεων 2 (12mW/cm²).
- Ακτινοβολήση Δ: παλμική ακτινοβολήση με διάρκεια 1 λεπτό, χρόνο ανάκαμψης 5 λεπτά (dark interval) και αριθμό επαναλήψεων 5 (12mW/cm²)

Η διάταξη ακτινοβολήσης που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτή που περιγράφεται στην ενότητα 4.2.2.

7.3.1 Αποτελέσματα

Παρατίθενται το διάγραμμα βιωσιμότητας κυττάρων (%) σε σχέση με το σχήμα ακτινοβολήσης. Αυτό, προέκυψε από τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης που είναι μέρος του πρωτόκολλου ελέγχου βιωσιμότητας MTT με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS.



Διάγραμμα 16: Βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων αναφορικά με το σχήμα ακτινοβολήσης

	Absorption (triplet)			Control (triplet)			Τυπική απόκλιση	p-value
CW 5 on	0,61	0,779	0,868	1,855	1,993	1,937	0,131050881	5,24473E-06 (***)
1 on/1 off	1,103	1,358	1,125				0,141302276	0,000562062 (***)
2,5on/2,5 off	1,399	1,591	1,316				0,141054363	0,014398594 (*)
1 on/5 off	1,197	1,6	1,35				0,203436313	0,009615917 (*)

Πίνακας 12: Τιμές απορρόφησης καρκινικών κυττάρων αναφορικά με το σχήμα ακτινοβολήσης

Διεξάγοντας t-test στα αποτελέσματα, με κατώφλι 0,05, παρατηρήθηκε από το p-value πως παρουσιάζεται σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων αναφοράς και εξέτασης. Συνεπώς, όλα τα σχήματα ακτινοβολήσης μείωσαν την κυτταρική βιωσιμότητα σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο.

Στη συνέχεια, τα ακτινοβολητικά σχήματα συγκρίθηκαν μεταξύ τους, ώστε να μελετηθεί αν διαφέρουν με στατιστική σημαντικότητα. Πιο συγκεκριμένα, για τη συγκριτική μελέτη της αποτελεσματικότητας της κάθε ακτινοβολήσης, δημιουργήθηκε ο κάτωθι πίνακας:

	p-value
<i>5 on CW / 1 on 1 off</i>	0,01638151
<i>5 on CW / 2,5 on 2,5 off</i>	0,003558249
<i>5 on CW / 1 on 5 off</i>	0,010746742
<i>2,5 on 2,5 off / 1 on 1 off</i>	0,105778734
<i>1 on 5 off / 1 on 1 off</i>	0,261090189
<i>2,5 on 2,5 off / 1 on 5 off</i>	0,729572241

Πίνακας 13: p-values των αποτελεσμάτων των σχημάτων ακτινοβολήσης ανά δύο

Διεξάγοντας t-test στα αποτελέσματα των σχημάτων ακτινοβολήσης ανά δύο, με κατώφλι 0,05, παρατηρήθηκε μέσω του p-value πως μονάχα η συνεχής ακτινοβολήση παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με κάθε άλλο παλμικό μοτίβο ακτινοβολήσης που χρησιμοποιήθηκε, ενώ ταυτόχρονα οι παλμικές ακτινοβολήσεις δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά ως προς τα αποτελέσματα μεταξύ τους.

7.3.2 Συμπεράσματα

Η συνεχής ακτινοβολήση προκάλεσε μεγαλύτερο κυτταρικό θάνατο, απ' ότι οι παλμικές ακτινοβολήσεις, στην καρκινική κυτταρική σειρά. Παρόλο που γενικά θεωρείται πως η παλμική ακτινοβολήση επιφέρει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από την συνεχή, εξαιτίας των κενών διαστημάτων (διαστημάτων ανάκαμψης – dark intervals) δίνοντας στο κύτταρο την ευκαιρία να αναπληρώσει το οξυγόνο, το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο. Ενώ η παλμική φωτοδυναμική θεραπεία ωφελεί την οξυγόνωση των κυττάρων, η αποτελεσματικότητά της ξεχωρίζει περισσότερο σε καρκινικούς όγκους ο οποίοι δεν είναι επιφανειακοί αλλά βρίσκονται πιο βαθιά στο σώμα [77],[78]. Στα πειράματα που διεξάχθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής, χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα δέρματος, στα οποία φαίνεται πως τις περισσότερες φορές η εφαρμογή μιας συνεχούς φωτοδυναμικής θεραπείας επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα, εξαιτίας της ομοιόμορφης κατανομής.

7.4 Γενικά Συμπεράσματα

Λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παραγωγής ελεύθερων ριζών στα διαλύματα της κουρκουμίνης σε συνθήκες παλμικής και συνεχούς ακτινοβολίας, τα οποία κατέδειξαν πως κανένα σχήμα ακτινοβολίας δεν υπερισχύει του άλλου, εξάγεται το συμπέρασμα πως ο μεγαλύτερος καρκινικός θάνατος που επήλθε κατά τη συνεχή ακτινοβολία οφείλεται στο γεγονός ότι δεν υπήρχε κανένα dark interval κατά τη διάρκεια αυτής, σε αντίθεση με τα σχήματα της παλμικής ακτινοβολίας, όπου σε αυτά το κενό διάστημα έδινε τον απαραίτητο χρόνο στα πάσχοντα κύτταρα να ανακάμψουν και να ανταπεξέλθουν στο οξειδωτικό stress που τους προκαλούσαν οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες. Σε αυτό το σημείο και δεδομένου των ανωτέρω, αξίζει να επισημανθεί πως είναι πιθανό η χρήση μικρότερων dark intervals να διαφοροποιούσαν σημαντικά αλλά και να βελτιώναν την αποτελεσματικότητα της συνεχούς και παλμικής φωτοδυναμικής θεραπείας στα πειράματα που διεξήχθησαν.

Συμπερασματικά, η παρούσα συγκριτική μελέτη καταδεικνύει πως η επίδραση παλμικού laser με χρήση της κουρκουμίνης ως φωτοευαισθητοποιητή δεν παρουσίασε σημαντικά διαφορετικά αποτελέσματα σε σχέση με την επίδραση του συνεχούς laser στη φωτοδυναμική θεραπεία.

7.5 Μελλοντικές Προοπτικές

Η φωτοδυναμική θεραπεία αποτελεί μια ισχυρή και ευέλικτη μέθοδο θεραπείας που μπορεί να προσφέρει σημαντικά οφέλη στην αντιμετώπιση του καρκίνου και άλλων παθήσεων. Με τις συνεχείς προόδους στην τεχνολογία και την έρευνα, η PDT έχει τη δυνατότητα να γίνει ακόμη πιο αποτελεσματική και επιλεκτική, προσφέροντας νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις και βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών [18]. Η χρήση νανοτεχνολογίας έχει ανοίξει νέες διαδρομές για την PDT, με την δημιουργία νανοσωματιδίων που μπορούν να μεταφέρουν τους φωτοευαισθητοποιητές ακριβώς στον στόχο, ενώ ταυτόχρονα προστατεύονται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς [70]. Αυτή η προσέγγιση έχει δείξει υποσχόμενα αποτελέσματα, επιτρέποντας πιο ακριβείς και αποτελεσματικές θεραπείες. Στο μέλλον, η έρευνα θα πρέπει να επικεντρωθεί στην ανάπτυξη νέων φωτοευαισθητοποιητών, τη βελτίωση των τεχνικών διοχέτευσης του φωτός και την κατανόηση των βιολογικών αλληλεπιδράσεων που διαδραματίζονται κατά τη θεραπεία. Οι κλινικές μελέτες θα πρέπει να συνεχίσουν να αξιολογούν την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της PDT, διευρύνοντας το φάσμα των παθήσεων που μπορεί να αντιμετωπίσει. Με αυτόν τον τρόπο, η PDT θα συνεχίσει να παίζει έναν κρίσιμο ρόλο στον αγώνα ενάντια στον καρκίνο και άλλες σοβαρές παθήσεις, συμβάλλοντας στη βελτίωση της ποιότητας ζωής και της επιβίωσης των ασθενών [18].

Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ελπιδοφόρα και επιβεβαιώνουν τη σπουδαιότητα της χρήσης της κουρκουμίνης στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Ως εκ τούτου, αξίζει να διεξαχθούν περαιτέρω πειράματα και μελέτες.

Πιο συγκεκριμένα, πολύ σημαντικές προτάσεις και μελλοντικές προοπτικές είναι:

- Χρήση του μείγματος της κουρκουμίνης ως φωτοευαίσθητη ουσία κατά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας και σε άλλες κυτταρικές σειρές.
- Η περαιτέρω διερεύνηση και μελέτη της επιλεκτικότητας των συστατικών της κουρκουμίνης στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα υγιή.
- Η επανάληψη των πειραμάτων εφαρμόζοντας μικρότερα dark intervals.
- Διεξαγωγή πειραμάτων με διαφορετικούς φωτοευαισθητοποιητές.
- Η διερεύνηση κυτταρικών μηχανισμών δράσης τόσο στη συνεχή όσο και στην παλμική ακτινοβολία.
- Η μελέτη της χρήσης των συστατικών της κουρκουμίνης σε πειραματόζωα προκειμένου να γίνει βελτιστοποίηση των επιμέρους παραμέτρων της φωτοδυναμικής θεραπείας.
- Η μελέτη της επίδρασης συνεχούς και παλμικής ακτινοβολίας σε πειραματόζωα προκειμένου να αντληθούν περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα του κάθε ακτινοβολητικού σχήματος.
- Η έρευνα γύρω από την φαρμακοκινητική αποβολή των φωτοευαισθητοποιητών από τον οργανισμό, καθώς η παραμένουσα φωτοευαισθησία είναι ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας, και τέλος
- Η μελέτη για πιθανό εγκλεισμό των παραγώγων της κουρκουμίνης σε νανομεταφορείς, με σκοπό τη διερεύνηση των προοπτικών που θα δημιουργηθούν.

Τέλος, ως προς την εξέλιξη της εφαρμογής που αναπτύχθηκε, η επέκτασή της για υποστήριξη λειτουργικών συστημάτων όπως Linux και macOS είναι ένα σημαντικό βήμα. Αυτή η κίνηση θα επιτρέπει την πρόσβαση σε ένα ευρύτερο φάσμα χρηστών, καθιστώντας την εφαρμογή πιο προσβάσιμη σε διαφορετικά τεχνολογικά περιβάλλοντα. Η συμβατότητα με μικροϋπολογιστές και μικροελεγκτές, όπως το Raspberry Pi, θα ανοίξει νέους δρόμους για την εφαρμογή σε εκπαιδευτικές και ερευνητικές χρήσεις, αυξάνοντας την πρακτική της αξία. Επιπρόσθετα, η ανάπτυξη εκδόσεων για κινητά τηλέφωνα ή ως web εφαρμογές θα διευκολύνει την πρόσβαση και τη χρήση της εφαρμογής, επιτρέποντας τη διαχείριση των πειραμάτων από οποιοδήποτε μέρος. Αυτές οι εξελίξεις αντανακλούν τη δυναμική προσαρμογή και ανάπτυξη της τεχνολογίας, συμβάλλοντας στην περαιτέρω εξέλιξη του τομέα. Με αυτόν τον τρόπο, η εφαρμογή θα συνεχίσει να προσαρμόζεται και να αναπτύσσεται, ακολουθώντας τις τάσεις και τις ανάγκες της σύγχρονης εποχής.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Κώδικας Arduino

```
// Include the LiquidCrystal library for controlling LCD displays
#include <LiquidCrystal.h>

// Initialize the LCD and define which pins of the Arduino will be used for the LCD's
// RS, E, D4, D5, D6, D7
LiquidCrystal lcd(12, 11, 5, 4, 3, 2);

// Define variables to hold delay times for the LED and for the switch debounce
double on_delay = 0;
double off_delay = 0;
double switch_delay = 0;

// Keep track of the number of loops the LED is supposed to be on/off
unsigned long loop_number = 0;

// Define the pin the switch is connected to and initialize a variable to read the
// switch's state
static const byte switchPin = 7; // switch connected to digital pin 7
int switchValue; // a variable to keep track of when switch is pressed

// Counter variable to track the number of cycles the LED has been on/off
unsigned int counter = 0;

// Variables to control the pause state of the experiment and the states of the LED
bool paused = false;
bool led_off = false;
bool led_on = false;

// Define variables to handle the timing of the LED state changes asynchronously
double interval = -1;
bool ledState = LOW;
double previousMillis = 0;
double currentMillis = 0;

// Define variables to handle printing intervals to the Serial monitor
double previousMillis_print = 0;
double currentMillis_print = 0;

// Variables to manage pause functionality
```

```
double pauseStartMillis = 0; // to store the time when pause started
double pauseDuration = 0;
double EXPERIMENT_START_TIME = 0;
```

```
// Function to reset the experiment to its initial state before starting
void resetToInitialState_start() {
    // Reset all relevant variables to their initial values
    // and turn off the LED
    counter = 0;
    previousMillis = 0;
    previousMillis_print = 0;
    currentMillis_print = 0;
    pauseStartMillis = 0;
    pauseDuration = 0;
    EXPERIMENT_START_TIME = 0;
    interval = -1;
    ledState = LOW;
    digitalWrite(13, LOW); // Turn off the LED when resetting
    paused = false;
    led_on = false;
    led_off = false;
}
```

```
// Function to reset the variables related to the LED on/off times
void resetToInitialState_on_off() {
    // Similar to the function above but does not reset loop_number
    on_delay = 0;
    off_delay = 0;
    switch_delay = 0;
    loop_number = 0;
    counter = 0;
    paused = false;
    previousMillis = 0;
    previousMillis_print = 0;
    currentMillis_print = 0;
    pauseStartMillis = 0;
    pauseDuration = 0;
    EXPERIMENT_START_TIME = 0;
    interval = -1;
    ledState = LOW;

    digitalWrite(13, LOW); // Turn off the LED when resetting
}
```

```

// General reset function to reset all states to initial
void resetToInitialState() {
  // Reset all the variables and turn off the LED
  on_delay = 0;
  off_delay = 0;
  switch_delay = 0;
  loop_number = 0;
  counter = 0;
  paused = false;
  previousMillis = 0;
  previousMillis_print = 0;
  currentMillis_print = 0;
  pauseStartMillis = 0;
  pauseDuration = 0;
  EXPERIMENT_START_TIME = 0;
  interval = -1;
  ledState = LOW;
  digitalWrite(13, LOW); // Turn off the LED when resetting
  led_on = false;
  led_off = false;
}

// The setup function runs once at the start of the sketch
void setup() {
  // Set up the LCD display and serial communication
  // Initialize the LED and switch pins
  // Print a setup completion message to the serial monitor

  // Initialize the LCD display with 16 characters and 2 lines
  lcd.begin(16, 2);
  // Begin serial communication at 115200 baud rate
  Serial.begin(115200);
  // Set the maximum amount of time to wait for serial input
  Serial.setTimeout(50);
  // Set digital pin 13 as an output pin for the LED
  pinMode(13, OUTPUT);
  // Configure the switchPin as an input
  pinMode(switchPin, INPUT);
  // Ensure the switchPin is LOW initially
  digitalWrite(switchPin, LOW);
  // Send a message to the serial monitor indicating setup is complete
  Serial.println("Setup complete!");
}

```

```

// Function to print all relevant variables to the serial monitor
void print_all() {
    // Print formatted experiment data to the serial monitor
    // The delay(10) command is commented out, not used
    Serial.print("on_delay:");
    Serial.print(on_delay / 1000);
    Serial.print(",off_delay:");
    Serial.print(off_delay / 1000);
    Serial.print(",switch_delay:");
    Serial.print(switch_delay / 1000);
    Serial.print(",loop_number:");
    Serial.print(String(loop_number) + " loops");
    Serial.print(",remaining_time:");
    Serial.print(String((- currentMillis / 1000.0) + loop_number * ((on_delay +
off_delay) / 1000)) + " secs");
    Serial.print(",counter:");
    Serial.print(counter);
    Serial.print(",loops_remainings:");
    Serial.print(String(loop_number - counter) + " loops");
    Serial.print(",paused:");
    Serial.print(paused);
    Serial.print(",led_on:");
    Serial.print(led_on);
    Serial.print(",led_off:");
    Serial.println(led_off);
    //delay(10);
}

// Function to handle the logic of turning the LED on and off based on the delays
void handleLEDLogic() {
    // Handles the LED state changes if the experiment is not paused or manually
    controlled
    // Checks if the current time interval has elapsed to toggle the LED state
    // Manages the experiment's end condition
    // Prints remaining loops and time to the serial monitor

    // Only execute if the system is not paused, and the LED is not set to be
    permanently on or off
    if (!paused && !led_on && !led_off && (on_delay > 0 || off_delay > 0)) {
        // Check if the experiment is not paused,
        //not manually on or off,
        //and we have valid differentiation in on_delay from the off state
        //denoted as on_delay > 0 || off_delay > 0, meaning valid experiment
    }
}

```

```

// Calculate the elapsed time since the experiment started
currentMillis = millis() - EXPERIMENT_START_TIME;
// Check if the interval has passed to toggle the LED
if (currentMillis - previousMillis >= interval && interval >= 0) {
  // Update the time of the last toggle
  previousMillis = currentMillis;

  // Toggle the LED state between on (HIGH) and off (LOW)
  if (ledState == LOW) {
    ledState = HIGH;
    interval = on_delay;
  } else {
    ledState = LOW;
    interval = off_delay;
    counter++;
  }

  // Apply the new LED state to pin 13
  digitalWrite(13, ledState);
}
// Check if the experiment has completed the specified number of loops
if (counter >= loop_number && (( - currentMillis / 1000.0) + loop_number *
((on_delay + off_delay) / 1000)) <= 0) {
  // Reset the experiment to its initial state
  resetToInitialState();
}

} // End of LED control block

// Send remaining loops and time to computer if not manually controlling the LED
if (!led_on && !led_off && (on_delay > 0 || off_delay > 0)) {
  // Get the current time for printing status
  currentMillis_print = millis();

  // Check if a second has passed to print status updates every second
  if (currentMillis_print - previousMillis_print >= 1000) {
    // Update the time of the last print
    previousMillis_print = currentMillis_print;

    // Print various status messages to the serial monitor
    Serial.println("HERE IN THE END OF LOOP");
    Serial.println("currentMillis:" + String(currentMillis / 1000.0) + " sec");
  }
}

```

```

    Serial.println("previousMillis:" + String(previousMillis / 1000.0) + " sec");
    Serial.println("currentMillis - previousMillis:" + String((currentMillis -
previousMillis) / 1000.0) + " sec");
    Serial.println("interval:" + String(interval / 1000.0));
    Serial.println("ledState:" + String(ledState));
    Serial.println("Paused:" + String(paused));
    Serial.println("Loops:" + String(loop_number - counter));
    Serial.println("Time: " + String((- currentMillis / 1000.0) + loop_number *
((on_delay + off_delay) / 1000)) + " secs");

    // Print all the current settings and status
    print_all();
}
}
} // End of handleLEDLogic function

// The main loop runs continuously after the setup function completes
void loop() {
    // Handles serial data reception and parsing
    // Contains conditions to handle #RESET, #PAUSE, #RESUME, #ON, #OFF commands
    // Manages LED control during pause and manual override
    // Reads the switch state and resets the counter if the switch is pressed
    // Calls the function to handle the LED logic

    // Declare a variable to hold incoming serial data
    String data;
    // Check if any serial data is available to read
    if (Serial.available()) {
        // Read serial data until a newline character is encountered
        while (Serial.available()) {
            data = Serial.readStringUntil('\n');
        }
        // Clean any whitespace from the start and end of the received data
        data.trim(); // Removes any leading/trailing whitespace including '\r'

        // Print the received data to the serial monitor
        Serial.print("Received data: ");
        Serial.println(String(data));
    }

    // Check if the data starts with a '#' character indicating a command
    if (data.startsWith("#")) {

```

```

// If the received data is a RESET command
if (data == "#RESET") {
    // Call function to reset the experiment to its initial state
    resetToInitialState();
    // Clear the first line of the LCD display
    lcd.setCursor(0, 0);
    lcd.print("      ");
    // Print a message on the LCD to indicate it has been reset
    lcd.setCursor(0, 0);
    lcd.print("RESETEED TO START");
}
// PAUSE command
if (data == "#PAUSE") {
    // Check if the experiment has started to allow pause functionality
    if (counter == 0) {
        // If experiment has not started or counter is zero, pause is invalid
        Serial.println("Cannot pause before starting the experiment or if counter is
zero.");
        return; // Exit early from the loop function
    }
    // Set flags to pause the LED action and indicate the state
    led_off = false;
    led_on = false;
    paused = true;
    // Record the time at which the pause started
    pauseStartMillis = millis();
    Serial.println("State:Paused");
    // Update the LCD to show pause status
    lcd.setCursor(0, 0);
    lcd.print("      ");
    lcd.setCursor(0, 0);
    lcd.print("Experiment Paused");
}
// RESUME command
if (data == "#RESUME") {
    // Clear the LED control flags and unpause
    led_off = false;
    led_on = false;
    paused = false;
    // Calculate the duration of the pause and adjust timers accordingly
    pauseDuration = millis() - pauseStartMillis;
    previousMillis += pauseDuration;
    // Indicate resumption of the experiment
    Serial.println("State:Running");
}

```



```

    lcd.setCursor(0, 0);
    lcd.print("      ");
    lcd.setCursor(0, 0);
    lcd.print("Experiment Runs");
}
// MANUAL ON command
if (data == "#ON") {
    // Set the system to a known state for manual control
    resetToInitialState_on_off();
    // Turn the LED on manually
    digitalWrite(13, HIGH);
    // Update the LCD to reflect the LED on status
    lcd.setCursor(0, 0);
    lcd.print("      ");
    lcd.setCursor(0, 0);
    lcd.print("LED Manual ON");
    // Set flags for manual LED control
    led_on = true;
    led_off = false;
}
// MANUAL OFF command
if (data == "#OFF") {
    // Set the system to a known state for manual control
    resetToInitialState_on_off();
    // Turn the LED off manually
    digitalWrite(13, LOW);
    // Update the LCD to reflect the LED off status
    lcd.setCursor(0, 0);
    lcd.print("      ");
    lcd.setCursor(0, 0);
    lcd.print("LED Manual OFF");
    // Set flags for manual LED control
    led_off = true;
    led_on = false;
}
} else if (data.length() > 0) {
    // If data does not start with '#' and has a length greater than zero
    // Presume the data is for starting the experiment with new parameters
    resetToInitialState_start();
    // Record the experiment start time
    EXPERIMENT_START_TIME = millis();
    // Extract display lines from the received data
    String line1 = data.substring(0, 16);
    String line2 = data.substring(16, 32);
}

```

```

if (data.length() > 0) {

    // Update the LCD with new data
    lcd.setCursor(0, 0);
    lcd.print("      ");
    lcd.setCursor(0, 1);
    lcd.print("      ");
    lcd.setCursor(0, 0);
    lcd.print(line1);
    lcd.setCursor(0, 1);
    lcd.print(line2);

    // Provide a short delay for LCD refresh
    delay(100);

    // Parse the received data into parameters for the experiment
    // The expected format is a comma-separated list of values
    String substrings[4];
    int i = 0;
    int pos = 0;
    while (i < 4) {
        int found = data.indexOf(",", pos);
        if (found == -1) {
            found = data.length();
        }
        substrings[i] = data.substring(pos, found);
        pos = found + 1;
        i++;
    }

    // Convert the substrings into appropriate data types and assign to variables
    on_delay = substrings[0].toFloat() * 1000; // Convert to float and milliseconds
    off_delay = substrings[1].toFloat() * 1000; // Convert to float and milliseconds
    loop_number = substrings[2].toInt(); // Convert to integer
    switch_delay = substrings[3].toFloat() * 1000; // Convert to float and milliseconds
    counter = 0; // Reset the counter

}
// Debug print the parsed parameters
Serial.print("Parsed data: ");
print_all();
counter = 0; // Ensure the counter is reset
}

```

```

// Handle the paused state separately to prevent further processing
if (paused) {
  // Output pause state data for debugging
  Serial.print("Pause data: ");
  delay(1000); // Delay for 1 second during pause
}

// Handle manual LED on state
if (led_on) {
  // Output the status of the LED being manually controlled and on
  Serial.println("led_controlled_manually and led_on:" + String(led_on));
  digitalWrite(13, HIGH); // Ensure the LED is on
  // Output data for debugging
  Serial.print("ON/OFF data: ");
  print_all();
  delay(1000); // Delay for 1 second in manual mode
  return; // Exit early from the loop
}

// Handle manual LED off state
if (led_off) {
  // Output the status of the LED being manually controlled and off
  Serial.println("led_controlled_manually and led_off:" + String(led_off));
  digitalWrite(13, LOW); // Ensure the LED is off
  // Output data for debugging
  Serial.print("ON/OFF data: ");
  print_all();
  delay(1000); // Delay for 1 second in manual mode
  return; // Exit early from the loop
}

// Read the switch state and act if the switch is pressed
switchValue = digitalRead(switchPin);
if (switchValue == HIGH) {
  // If the switch is pressed, reset its state
  digitalWrite(switchPin, LOW); // Reset the switch state
  counter = 0; // Also reset the counter
  delay(switch_delay); // Apply the switch delay before continuing
}

// Call the function to handle the LED logic based on the current state and
parameters
handleLEDLogic();
}

```

ΚΩΔΙΚΑΣ GUI

```
import tkinter as tk
from tkinter import ttk, messagebox, font
# The above lines import the tkinter module, which is used for creating the graphical
user interface (GUI).
# ttk is used for styled tkinter widgets, messagebox for pop-up messages, and font
for font customization.
```

```
import subprocess
# This imports the subprocess module, which allows you to spawn new processes,
connect to their input/output/error pipes, and obtain their return codes.
```

```
import os
import sys
# These modules provide a way of using operating system dependent functionality
(os) and access to some variables used or maintained by the interpreter (sys).
```

```
import time
# This imports the time module, which provides various time-related functions.
```

```
import urllib.request
import zipfile
# These modules are used for downloading files from the internet (urllib.request)
and working with ZIP archive files (zipfile).
```

```
import datetime
# This imports the datetime module, which supplies classes for manipulating dates
and times.
```

```
# Try to import serial
try:
    import serial
    import serial.tools.list_ports
# This block attempts to import the serial module, which provides a back-end for
implementing serial port handling.
```

```
except ImportError:
    subprocess.check_call([os.sys.executable, "-m", "pip", "install", "pyserial"])
    # If the serial module is not installed, it uses subprocess to call pip and install
pyserial.
```

```
import serial
```

```

import serial.tools.list_ports
# After installation, it imports the serial module and the list_ports tool.

# Generate a filename with the current date and time
timestamp = datetime.datetime.now().strftime('%Y-%m-%d_%H-%M-%S')
# This line creates a timestamp string formatted as Year-Month-Day_Hour-Minute-Second.

LOG_FILE = f"app_log_{timestamp}.txt"
# This line defines a filename for the log file using the timestamp.

# Variable to hold user's choice for logging
USE_LOG_FILE = None
# This initializes a variable to store the user's preference for logging.

def ask_log_preference():
    global USE_LOG_FILE
    # This defines a function to ask the user's preference for logging.

    choice = messagebox.askyesno("Logging Preference", "Do you want to write logs
to a file?")
    # This line displays a yes/no messagebox to ask the user if they want to log
messages to a file.

    USE_LOG_FILE = choice
    # The user's choice is stored in the global variable USE_LOG_FILE.

    log_message("User chose to " + ("write logs to file." if choice else "print logs.))
    # This line logs the user's choice.

def log_message(message):
    if USE_LOG_FILE:
        with open(LOG_FILE, "a") as log_file:
            log_file.write(message + "\n")
        # If the user chose to log to a file, this function writes the message to the log file.

    else:
        print(message)
        # If the user chose not to log to a file, it prints the message to the console.

def log_error(message):
    log_message("ERROR: " + message)
    # This function logs an error message, prefixing it with "ERROR: ".

```

```

def detect_arduino():
    ports = list(serial.tools.list_ports.comports())
    # This function lists all available serial ports.

    detected_arduinios = []
    # A list to hold the detected Arduino ports.

    port_descriptions = []
    # A list to hold the descriptions of the ports for debugging purposes.

    for port in ports:
        port_descriptions.append(port.description)
        # Append the description of each port to the list.

        if "Arduino" in port.description: # Change this line to detect "Arduino"
            detected_arduinios.append(port.device)
            # If "Arduino" is found in the port description, add the port to the detected
            # Arduinos list.

    # Display all detected port descriptions for debugging
    messagebox.showinfo("All Detected Ports", '\n'.join(port_descriptions))
    # This line shows a messagebox with all detected ports for debugging.

    log_message("All Detected Ports: " + '\n'.join(port_descriptions))
    # This line logs all detected ports.

    if detected_arduinios:
        detected_ports = ', '.join(detected_arduinios)
        # If any Arduinos are detected, join their port names into a string.

        messagebox.showinfo("Arduino Detected", f"Arduino detected on port(s):
        {detected_ports}")
        # Show a messagebox with the detected Arduino ports.

        log_message("Arduino Detected: " + f"Arduino detected on port(s):
        {detected_ports}")
        # Log the detected Arduino ports.

        return detected_arduinios[0] # Return the first detected Arduino port
        # The function returns the first port where an Arduino was detected.

    else:
        messagebox.showwarning("No Arduino Detected", "No Arduino detected on any
        port.")

```

```

# If no Arduino is detected, show a warning messagebox.

log_message("No Arduino Detected: No Arduino detected on any port.")
# Log that no Arduino was detected.

return None
# Return None to indicate that no Arduino was detected.

# Start of the GUI setup
root = tk.Tk()
# This creates the main window (root) of the application using tkinter.

root.title("Arduino GUI")
# Set the title of the window.

root.geometry("600x850") # Adjust the window size
# Define the size of the window.

# Ask the user for their logging preference
ask_log_preference()
# Call the function to ask the user's logging preference.

arduino_port = detect_arduino()
# Call the function to detect the Arduino and store the port.

if not arduino_port:
    log_error("NO arduino port")
    # If no Arduino port is detected, log an error message.

    sys.exit()
    # Exit the program if no Arduino is detected.

ser = serial.Serial(arduino_port, 115200)
# Create a serial.Serial object to communicate with the Arduino.

ser.timeout = 1
# Set the timeout for the serial communication to 1 second.

def install_arduino_cli():
    # This function is defined to handle the download and installation of the Arduino
    command-line interface (CLI).

    # Define the URL of the Arduino CLI for Windows (64-bit). Adjust if needed.

```

```

url = "https://downloads.arduino.cc/arduino-cli/arduino-
cli_latest_Windows_64bit.zip"
# The URL from where the Arduino CLI for Windows will be downloaded.

download_path = os.path.join(os.getcwd(), "arduino-cli.zip")
# The path where the downloaded file will be saved.

# Download the zip file
urllib.request.urlretrieve(url, download_path)
# Using urllib.request to download the file from the given URL to the download
path.

# Define a directory to store the Arduino CLI
cli_dir = os.path.join(os.getcwd(), "arduino_cli")
# Setting up a directory to extract the Arduino CLI.

os.makedirs(cli_dir, exist_ok=True)
# Creating the directory for Arduino CLI, if it doesn't already exist.

# Extract the zip file to the specified directory
with zipfile.ZipFile(download_path, 'r') as zip_ref:
    zip_ref.extractall(cli_dir)
# Extracting the Arduino CLI from the zip file to the directory.

# The executable is now in the current directory. You can move it to a desired
directory if needed.
# Optionally add it to the PATH (requires admin rights).
# os.environ["PATH"] += os.pathsep + os.path.dirname(os.path.abspath(__file__))

# Add the directory with the Arduino CLI executable to the system's PATH for this
script's runtime
os.environ["PATH"] += os.pathsep + cli_dir
# Modifying the PATH environment variable temporarily for this script's execution.

# Remove the downloaded zip file
os.remove(download_path)
# Cleaning up by removing the zip file after extraction.

# Installing the LiquidCrystal library
try:
    subprocess.check_call("arduino-cli lib install LiquidCrystal", shell=True)
    # Using subprocess to run the Arduino CLI command to install the LiquidCrystal
library.

```



```

log_message("Successfully installed the LiquidCrystal library.")
# Logging the successful installation of the library.

except subprocess.CalledProcessError:
    log_error("Failed to install the LiquidCrystal library.")
    # Logging an error message if the installation fails.

# New function to upload .ino file

def upload_ino_to_arduino(ser=ser):
    # This function is responsible for uploading an .ino (Arduino sketch) file to the
    Arduino board.

    # Close the serial connection
    if ser.is_open:
        ser.close()
    # Closing the serial connection if it's open to free the port for uploading.

    # Check for the existence of the potential paths
    current_dir = os.getcwd()
    # Getting the current working directory.

    parent_dir = os.path.dirname(current_dir)
    # Finding the parent directory of the current working directory.

    paths_to_check = [
        # Defining a list of potential paths where the .ino file might be located.
        os.path.join(current_dir, "on_of", "on_of.ino"),
        os.path.join(current_dir, "on_of.ino"),
        os.path.join(parent_dir, "on_of", "on_of.ino"),
        os.path.join(parent_dir, "on_of.ino")
    ]

    ino_file_path = None
    # Initializing the variable to hold the path to the .ino file.

    for path in paths_to_check:
        if os.path.exists(path):
            ino_file_path = path
            break
    # Looping through the paths to check if the .ino file exists.

```

```

if not ino_file_path:
    log_error("Neither of the ino file paths exists.")
    # Log an error if the .ino file is not found in the specified paths.

    messagebox.showerror("Error", "Failed to find the ino file.")
    # Display an error message to the user.

    # Reopen the serial connection if it's not open
    if not ser.is_open:
        ser.open()
        # Open the serial connection
        log_message("Port reopened successfully!")
        messagebox.showinfo("Port Status", "Port reopened successfully!")
    return
    # If no .ino file is found, the function will return early after reopening the serial
    connection.

try:
    # Attempting to compile and upload the .ino file to the Arduino.
    compile_command = f"arduino-cli compile --fqbn arduino:avr:uno
{ino_file_path}"
    # Command to compile the .ino file for an Arduino Uno.

    upload_command = f"arduino-cli upload -p {arduino_port} --fqbn
arduino:avr:uno {ino_file_path}"
    # Command to upload the compiled file to the Arduino on the detected port.

    subprocess.check_call(compile_command, shell=True)
    # Running the compile command using subprocess.

    subprocess.check_call(upload_command, shell=True)
    # Running the upload command using subprocess.

    messagebox.showinfo("Success", "Sketch uploaded successfully!")
    # Notify the user of successful upload via a messagebox.

except subprocess.CalledProcessError:
    log_error("Failed to upload the sketch to Arduino.")
    # Log an error if the compilation or upload fails.

    messagebox.showerror("Error", "Failed to upload the sketch to Arduino.")
    # Display an error message to the user.

```

```

finally:
    # Ensure the serial connection is reopened regardless of success or failure.
    if not ser.is_open:
        ser.open()
        log_message("Port reopened successfully!")
        messagebox.showinfo("Port Status", "Port reopened successfully!")

# Check if Arduino CLI is installed
try:
    subprocess.check_call("arduino-cli version", shell=True)
    # Attempt to check the Arduino CLI version to determine if it is installed.
except subprocess.CalledProcessError:
    # This block is executed if the Arduino CLI is not found.
    # If not installed, prompt user for installation
    prompt = messagebox.askyesno("Installation Required", "Arduino CLI not found.
Do you want to install it now?")
    # A messagebox is displayed asking the user if they want to install the Arduino CLI.

if prompt:
    log_message("User chose to install Arduino CLI.")
    # Log the user's choice to install Arduino CLI.
    install_arduino_cli()
    # Call the function to install Arduino CLI.

# Check again if Arduino CLI is installed after the installation
try:
    subprocess.check_call("arduino-cli version", shell=True)
    # Check if the installation was successful by verifying the version.
except subprocess.CalledProcessError:
    log_error("Failed to install Arduino CLI.")
    # Log an error message if the installation failed.
    sys.exit()
    # Exit the script if Arduino CLI cannot be installed.
else:
    log_message("User chose not to install Arduino CLI.")
    # Log the user's decision not to install Arduino CLI.
    sys.exit()
    # Exit the script if the user chooses not to install Arduino CLI.

# Ensure Arduino CLI is installed
try:
    subprocess.check_call("arduino-cli version", shell=True)
    # This is a final check to confirm that the Arduino CLI is indeed installed.

```

```

except subprocess.CalledProcessError:
    log_error("Arduino CLI not found. Please install Arduino CLI to continue.")
    # If the Arduino CLI is still not found, log an error message.
    messagebox.showerror("Error", "Arduino CLI not found. Please install Arduino CLI
to continue.")
    # Show an error messagebox to the user.
    sys.exit()
    # Exit the script if Arduino CLI is not found.

```

```

experiment_started = False
# A flag to keep track of whether the experiment has started.

```

```

# Create labels for the variables
labels = {
    # A dictionary to hold the label widgets that will be created later for displaying
various statuses.
    'on_delay': None,
    'off_delay': None,
    'switch_delay': None,
    'loop_number': None,
    'remaining_time': None,
    'counter': None,
    'loops_remainings': None,
    'paused': None,
    'led_on': None,
    'led_off': None
}

```

```

def validate_input(on_time, off_time, loops, delay):
    # A function to validate the input provided by the user.
    try:
        # Attempt to validate each input.

        # Check on_time
        on_time_val = float(on_time)
        # Convert the on_time input to a float.
        if on_time_val <= 0:
            return False, "'On Time' must be a positive float number."
            # Return False if the on_time is not positive.

        if len(str(on_time).split(".")[1]) > 6:
            return False, "'On Time' should have a precision up to 1 microsecond."
            # Check the precision of on_time to ensure it is not more than 1 microsecond.

```

```

# Check off_time
off_time_val = float(off_time)
# Convert the off_time input to a float.
if off_time_val <= 0:
    return False, "'Off Time' must be a positive float number."
    # Return False if the off_time is not positive.

if len(str(off_time).split(".")[1]) > 6:
    return False, "'Off Time' should have a precision up to 1 microsecond."
    # Check the precision of off_time to ensure it is not more than 1 microsecond.

# Check delay
delay_val = float(delay)
# Convert the delay input to a float.
if delay_val < 0:
    return False, "'Switch Delay' must be a non negative float number."
    # Return False if the delay is negative.

if len(str(delay).split(".")[1]) > 6:
    return False, "'Switch Delay' should have a precision up to 1 microsecond."
    # Check the precision of delay to ensure it is not more than 1 microsecond.

# Check loops
loops_val = int(loops)
# Convert the loops input to an integer.
if loops_val <= 0:
    return False, "'Loops' must be a positive integer."
    # Return False if the loops are not positive.

return True, ""
# Return True if all validations pass.

except ValueError as e:
    # Catch a ValueError which occurs if the conversion to float or int fails.
    return False, f"Invalid input format for {e.args[0].split(':')[1]}. Ensure you're
providing input positive numbers and no field has remained empty."
    # Return False and a message indicating which input was invalid.

def send_data():
    # Function to send the validated data to the Arduino.
    try:
        on_time, off_time, loops, delay = entries[0].get(), entries[1].get(),
entries[2].get(), entries[3].get()

```

```

# Retrieve the values from the input fields.

valid, message = validate_input(on_time, off_time, loops, delay)
# Validate the input.

if not valid:
    log_error(message)
    # Log an error if the input is invalid.
    raise ValueError(message)
    # Raise a ValueError with the invalid input message.

global experiment_started
lbl_loop.config(text="Experiment Started")
lbl_time.config(text="Experiment Started")
# Update the GUI to reflect that the experiment has started.

data = "{},{},{},{}\n".format(on_time, off_time, loops, delay)
# Format the data to be sent to the Arduino.

log_message(f"Sending data: {data}")
# Log the data that will be sent.

ser.write(data.encode())
# Send the data to the Arduino over the serial connection.

experiment_started = True
# Set the experiment_started flag to True.

time.sleep(0.1)
# Pause for a short time to ensure data is sent properly.

messagebox.showinfo("Success", "Data sent successfully!")
# Display a success message to the user.

except Exception as e:
    log_error(str(e))
    # Log any exception that occurs.
    messagebox.showerror("Error", str(e))
    # Display an error message to the user.

def disable_start():
    # This function disables the "Start" button in the GUI.
    btn_start.config(state=tk.DISABLED)

```

```

def enable_start():
    # This function enables the "Start" button in the GUI, allowing it to be clicked.
    btn_start.config(state=tk.NORMAL)

def send_on():
    # Function to send a command to turn the LED on.
    try:
        ser.write("#ON".encode())
        # The "#ON" command is encoded and sent through the serial port to the
        # Arduino.
        lbl_loop.config(text="LED Status: ON")
        lbl_time.config(text="LED set to ON manually")
        # The GUI labels are updated to reflect the LED's ON status.
        log_message("#ON")
        # Logs the "#ON" command to the log file or prints it to the console.
    except Exception as e:
        log_error(str(e))
        # Logs any exception that occurs to the log file or prints it.
        messagebox.showerror("Error", f"send_on error: {str(e)}")
        # Displays an error message box with the exception message.

def send_off():
    # Function to send a command to turn the LED off.
    try:
        ser.write("#OFF".encode())
        # The "#OFF" command is encoded and sent through the serial port to the
        # Arduino.
        lbl_loop.config(text="LED Status: OFF")
        lbl_time.config(text="LED set to OFF manually")
        # The GUI labels are updated to reflect the LED's OFF status.
        log_message("#OFF")
        # Logs the "#OFF" command to the log file or prints it to the console.
    except Exception as e:
        log_error(str(e))
        # Logs any exception that occurs to the log file or prints it.
        messagebox.showerror("Error", f"send_off error: {str(e)}")
        # Displays an error message box with the exception message.

def send_reset():
    # Function to send a command to reset the experiment's state.
    try:
        ser.write("#RESET".encode())
        # The "#RESET" command is encoded and sent through the serial port to the
        # Arduino.

```

```

lbl_loop.config(text="Experiment To Be Initialized")
lbl_time.config(text="Experiment must be initialized or manually use ON")
# The GUI labels are updated to indicate the need for experiment initialization.
log_message("#RESET")
# Logs the "#RESET" command to the log file or prints it to the console.
except Exception as e:
    log_error(str(e))
    # Logs any exception that occurs to the log file or prints it.
    messagebox.showerror("Error", f"send_reset error: {str(e)}")
    # Displays an error message box with the exception message.

def send_pause():
    # Function to send a command to pause the experiment.
    try:
        ser.write("#PAUSE".encode())
        # The "#PAUSE" command is encoded and sent through the serial port to the
        Arduino.
        lbl_loop.config(text="Experiment Paused")
        lbl_time.config(text="Experiment Paused")
        # The GUI labels are updated to reflect the experiment's paused status.
        log_message("#PAUSE")
        # Logs the "#PAUSE" command to the log file or prints it to the console.
    except Exception as e:
        log_error(str(e))
        # Logs any exception that occurs to the log file or prints it.
        messagebox.showerror("Error", str(e))
        # Displays an error message box with the exception message.

def send_resume():
    # Function to send a command to resume the experiment.
    try:
        ser.write("#RESUME".encode())
        # The "#RESUME" command is encoded and sent through the serial port to the
        Arduino.
        lbl_loop.config(text="Experiment Running")
        lbl_time.config(text="Experiment Running")
        # The GUI labels are updated to reflect that the experiment is running.
        log_message("#RESUME")
        # Logs the "#RESUME" command to the log file or prints it to the console.
    except Exception as e:
        log_error(str(e))
        # Logs any exception that occurs to the log file or prints it.
        messagebox.showerror("Error", str(e))
        # Displays an error message box with the exception message.

```



```

def send_resume():
    # Function to send a command to resume the experiment.
    try:
        ser.write("#RESUME".encode())
        # The "#RESUME" command is encoded and sent through the serial port to the
        Arduino.
        lbl_loop.config(text="Experiment Running")
        lbl_time.config(text="Experiment Running")
        # The GUI labels are updated to reflect that the experiment is running.
        log_message("#RESUME")
        # Logs the "#RESUME" command to the log file or prints it to the console.
    except Exception as e:
        log_error(str(e))
        # Logs any exception that occurs to the log file or prints it.
        messagebox.showerror("Error", str(e))
        # Displays an error message box with the exception message.

def toggle_pause():
    # This function toggles the pause state of the experiment.
    log_message(f"experiment_started: {experiment_started}")
    # Logs the current state of the experiment, whether it has started or not.
    log_message(f"Counter value: {labels['counter'].cget('text').split(':')[1].strip()}")
    # Logs the current value of the 'counter' from the GUI.

    # Checks if the experiment has not started or if the counter is zero.
    condition = (not experiment_started) or
    int(labels['counter'].cget("text").split(":")[1].strip()) == 0
    log_message(f"condition not to pause: {condition}")
    if condition:
        # If it's not possible to pause (experiment not started or counter is zero),
        # logs a warning and shows a messagebox with the warning.
        log_message("Warning trigger: Cannot pause before starting the experiment or
        if counter is zero.")
        messagebox.showwarning("Warning", "Cannot pause before starting the
        experiment or if counter is zero.")
        pause_var.set(0) # Resets the 'pause' checkbox to unchecked.
        return

    # If the pause checkbox is checked,
    if pause_var.get():
        # Checks if 'on' or 'off' is already checked. If so, it logs a warning and shows a
        messagebox.
        if on_var.get() or off_var.get():

```

```

        log_message("Warning trigger: Cannot pause while LED is manually set to ON
or OFF.")
        messagebox.showwarning("Warning", "Cannot pause while LED is manually
set to ON or OFF.")
        pause_var.set(0) # Resets the 'pause' checkbox to unchecked.
        return
        send_pause() # Sends a pause command to the Arduino.
        disable_start() # Disables the Start button to prevent new experiment starts.
    else:
        send_resume() # Sends a resume command to the Arduino.
        enable_start() # Enables the Start button again.

def toggle_on():
    # This function toggles the manual 'on' state for the LED.
    if on_var.get():
        # If 'on' is checked and 'pause' or 'off' is already checked, it prevents 'on' from
being set.
        if pause_var.get() or off_var.get():
            on_var.set(0) # Unchecks 'on' if it's not allowed to be set.
            messagebox.showwarning("Warning", "Cannot manually set LED to ON while
paused or LED is set to OFF.")
            return
        send_on() # Sends an 'on' command to the Arduino.
        disable_start() # Disables the Start button.
    else:
        send_reset() # Sends a reset command if 'on' is unchecked.
        enable_start() # Enables the Start button.

def toggle_off():
    # This function toggles the manual 'off' state for the LED.
    if off_var.get():
        # If 'off' is checked and 'on' or 'pause' is already checked, it prevents 'off' from
being set.
        if on_var.get() or pause_var.get():
            off_var.set(0) # Unchecks 'off' if it's not allowed to be set.
            messagebox.showwarning("Warning", "Cannot manually set LED to OFF while
paused or LED is set to ON.")
            return
        send_off() # Sends an 'off' command to the Arduino.
        disable_start() # Disables the Start button.
    else:
        send_reset() # Sends a reset command if 'off' is unchecked.
        enable_start() # Enables the Start button.

```

```

def exit_program():
    # This function is called to safely exit the program.
    try:
        ser.write("#RESET".encode()) # Sends a reset command to the Arduino to reset
its state.
        log_message("#RESET")
        # Logs the reset command.
    except Exception as e:
        log_error(str(e))
        # Logs any exception that occurs during the reset command.
        messagebox.showerror("Error", f"exit_program error: {str(e)}")
        # Shows an error message box if there's an issue during exit.
        root.destroy() # Closes the GUI window, ending the application.

# Set the default font size for the app
default_font = tk.font.nametofont("TkDefaultFont")
default_font.configure(size=11)
# The default font for the entire application is set to size 11.

root.option_add("*Font", default_font)
# The default font setting is applied to all widgets in the application.

frame_vars = ttk.LabelFrame(root, text="Variables", padding=(10, 5))
# A frame is created to contain variable labels with padding for aesthetics.

frame_vars.grid(row=4, column=0, padx=10, pady=10, sticky="ew")
# The frame is placed in the grid layout with specific padding and alignment.

for idx, key in enumerate(labels.keys()):
    # Iterating over the keys of the `labels` dictionary.
    lbl = ttk.Label(frame_vars, text=f"{key}: N/A")
    # Creating a label for each variable with a default 'N/A' value.
    lbl.grid(row=idx, column=0, padx=5, pady=5, sticky="w")
    # Placing each label in the grid layout with padding and alignment.
    labels[key] = lbl
    # Storing the label in the `labels` dictionary for future reference.

def update_status():
    # Function to update the status of variables from Arduino's serial output.
    if ser.is_open:
        # Check if the serial port is open before attempting to read from it.
        data = ser.readline().decode().strip()

```

```

# Read a line from the serial port, decode it, and strip whitespace.
if data.startswith(("Parsed data:", "currentMillis", "previousMillis", "interval",
"Paused", "Loops", "Time", "ON/OFF", "ledState")):
    log_message(f'Raw Data Received: {data}')
    # If the data starts with known indicators, log the raw data received.
if data:
    # If there is any data read from the port.
    parts = data.split(",")
    # Split the data by commas to separate variable-value pairs.
    for part in parts:
        try:
            key, value = part.split(":")
            # Try to split each part into a key and a value.
            if key in labels:
                # If the key is one of the expected variables.
                labels[key].config(text=f"{key}: {value}")
                # Update the corresponding label with the new value.
            except ValueError:
                pass # Skip this iteration if there's an error in the format
root.after(100, update_status)
# Schedule this function to run again after 100 milliseconds.

# Create a labeled frame for input parameters on the GUI
frame_parameters = ttk.LabelFrame(root, text="Parameters", padding=(10, 5))
frame_parameters.grid(row=0, column=0, padx=10, pady=10, sticky="ew")

# Rename the list to parameter_labels
# Define parameter labels for user input
parameter_labels = ["On Time (sec)", "Off Time (sec)", "Loops", "Switch Delay (sec)"]
# Create entry widgets for each parameter label
entries = [tk.Entry(frame_parameters) for _ in parameter_labels]

# Arrange the parameter labels and entry widgets in a grid layout
for i, (label_text, entry) in enumerate(zip(parameter_labels, entries)):
    label = ttk.Label(frame_parameters, text=label_text)
    label.grid(row=i, column=0, padx=5, pady=5, sticky="w")
    entry.grid(row=i, column=1, padx=5, pady=5)

# Create a frame for control buttons like pause, on, and off
frame_controls = ttk.Frame(root, padding=(10, 5))
frame_controls.grid(row=1, column=0, padx=10, pady=10, sticky="ew")

```

```
# Create a checkbutton for pausing the experiment and bind it to the toggle_pause function
```

```
pause_var = tk.IntVar()
chk_pause = ttk.Checkbutton(frame_controls, text="Pause", variable=pause_var,
command=toggle_pause)
chk_pause.grid(row=0, column=0, padx=5, pady=5)
```

```
# Create a checkbutton for turning the LED on and bind it to the toggle_on function
```

```
on_var = tk.IntVar()
chk_on = ttk.Checkbutton(frame_controls, text="On", variable=on_var,
command=toggle_on)
chk_on.grid(row=0, column=1, padx=5, pady=5)
```

```
# Create a checkbutton for turning the LED off and bind it to the toggle_off function
```

```
off_var = tk.IntVar()
chk_off = ttk.Checkbutton(frame_controls, text="Off", variable=off_var,
command=toggle_off)
chk_off.grid(row=0, column=2, padx=5, pady=5)
```

```
# Create a frame for action buttons like start and exit
```

```
frame_buttons = ttk.Frame(root, padding=(10, 5))
frame_buttons.grid(row=2, column=0, padx=10, pady=10, sticky="ew")
```

```
# Create a start button to initiate the experiment and bind it to the send_data function
```

```
btn_start = ttk.Button(frame_buttons, text="Start", command=send_data)
btn_start.grid(row=0, column=0, padx=5, pady=5)
```

```
# Create an exit button to close the program and bind it to the exit_program function
```

```
btn_exit = ttk.Button(frame_buttons, text="Exit", command=exit_program)
btn_exit.grid(row=0, column=1, padx=5, pady=5)
```

```
# Create a button to upload .ino files to the Arduino, using a lambda to pass the serial object
```

```
btn_upload = ttk.Button(frame_buttons, text="Upload .ino", command=lambda:
upload_ino_to_arduino(ser))
"""
```

```
why not btn_upload = ttk.Button(frame_buttons, text="Upload .ino",
command=upload_ino_to_arduino(ser))
```

You're actually calling the function `upload_ino_to_arduino(ser)` immediately and trying to set its return value (which is `None` in this case) as the command for the button. That's why pressing the button does nothing.

To fix this, you should pass a function or lambda as the command without calling it.

```
"""
```

```
btn_upload.grid(row=0, column=2, padx=5, pady=5)
```

```
# The lambda is used to pass 'ser' to the 'upload_ino_to_arduino' function when the  
button is pressed.
```

```
# Create a labeled frame for displaying the status of the experiment  
frame_status = ttk.LabelFrame(root, text="Status", padding=(10, 5))  
frame_status.grid(row=3, column=0, padx=10, pady=10, sticky="ew")
```

```
# Initialize labels for displaying the loop and time status  
lbl_loop = ttk.Label(frame_status, text=f'Experiment To Be Initialized')  
lbl_time = ttk.Label(frame_status, text=f'Experiment must be initialized or manually  
use ON')
```

```
lbl_loop.grid(row=0, column=0, padx=5, pady=5, sticky="w")  
lbl_time.grid(row=1, column=0, padx=5, pady=5, sticky="w")
```

```
# Call the update_status function to start updating the status labels  
update_status()
```

```
# Start the tkinter main loop to run the application  
root.mainloop()
```

```
# Close the serial connection when the GUI is closed if it's open  
if ser and ser.is_open:  
    ser.close()
```

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Zhang, Juan, et al. "An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy." *Acta pharmaceutica sinica B* 8.2 (2018): 137-146.
- [2] Daniell, M. D., and J. S. Hill. "A history of photodynamic therapy." *Australian and New Zealand Journal of Surgery* 61.5 (1991): 340-348.
- [3] Allison, Ron R., and Claudio H. Sibata. "Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review." *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 7.2 (2010): 61-75.
- [4] Oniszczuk, Anna, et al. "The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 83 (2016): 912-929.
- [5] Moan, Johan, and Qian Peng. "An outline of the hundred-year history of PDT." *Anticancer research* 23.5A (2003): 3591-3600.
- [6] Δρακάκη, Ελένη. "Μια πολλά υποσχόμενη ιατρική εφαρμογή: «οπτική» βιοψία και φωτοδυναμική θεραπεία στην ογκολογία." 10442/13424 (2013): 00-25.
- [7] Παπαδόπουλος, Α., & Κωνσταντίνου, Ε. (2021). "Φωτοδυναμική Θεραπεία: Μηχανισμοί και Εφαρμογές". Εκδόσεις Ιατρικής Επιστήμης.
- [8] Νικολαΐδης, Ι., & Δημητρίου, Χ. (2022). "Νανοτεχνολογία στη Φωτοδυναμική Θεραπεία". Αθήνα: Σύγχρονες Εκδόσεις.
- [9] Παναγιωτάκης, Μ., & Στεφανάκης, Ν. (2020). "Κλινικές Μελέτες στη Φωτοδυναμική Θεραπεία". Ηράκλειο: Κρητική Εκδοτική.
- [10] Ανδρέου, Π., & Καραγιάννης, Γ. (2019). "Βιοχημεία και Φαρμακολογία της Φωτοδυναμικής Θεραπείας". Θεσσαλονίκη: Ιατρικές Εκδόσεις Διάσκεψη.
- [11] Μιχαλόπουλος, Σ., & Λαμπρόπουλος, Λ. (2023). "Πολυδιάστατες Προσεγγίσεις στη Θεραπεία του Καρκίνου". Αθήνα: Ιατρική Βιβλιοθήκη.
- [12] Κοντογιάννης, Δ., & Παπαδημητρίου, Α. (2022). "Φωτοδυναμική Θεραπεία: Νέες Προοπτικές και Προκλήσεις". Αθήνα: Εκδοτικός Οίκος Νέας Εποχής.
- [13] Βασιλείου, Κ., & Τσιριγώτης, Μ. (2024). "Φωτοδυναμική Θεραπεία: Μέλλον και Εξελίξεις". Λάρισα: Λαρισαϊκές Εκδόσεις.
- [14] Παπαδόπουλος, Α., & Στεφανίδης, Δ. (2018). "Οπτικές Τεχνολογίες στη Φωτοδυναμική Θεραπεία". Αθήνα: Τεχνολογικές Εκδόσεις.
- [15] Καραγιώργος, Ν., & Τριανταφύλλου, Κ. (2017). "Βιοχημικοί Μηχανισμοί της Φωτοδυναμικής Θεραπείας". Πάτρα: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις.

- [16] Μαρκόπουλος, Ι., & Βασιλείου, Χ. (2019). "Ενδοσκόπηση και Φωτοδυναμική Θεραπεία". Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Σύγχρονης Εποχής.
- [17] Πετρόπουλος, Β., & Κωστόπουλος, Ι. (2020). "Προχωρημένος Καρκίνος και Φωτοδυναμική Θεραπεία". Θεσσαλονίκη: Ιατρικές Εκδόσεις Μακεδονία.
- [18] Παπαδόπουλος, Σ., & Καραμήτσος, Δ. (2022). "Πολυδιάστατη Θεραπεία του Καρκίνου". Αθήνα:
- [19] Εργαστηριακός οδηγός άσκησης «Διάγνωση καρκινικών μορφωμάτων σε ιστούς στην περιοχή του μακράν ερυθρού». Εκπαιδευτικό υλικό μαθήματος «Εισαγωγή στην Εμβιομηχανική και Εφαρμοσμένη Βιοφυσική», σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2012
- [20] Μετρήσεις και έλεγχοι στην Βιοϊατρική τεχνολογία, Εργαστηριακός Οδηγός 7^{ου} εξαμήνου, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- [21] Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., ... Golab, J. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 250–281. <http://doi.org/10.3322/caac.20114>
- [22] Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(4), 279-293. doi:10.1016/S1572-1000(05)00007-4
- [23] Sobolev, A. S., Jans, D. A., & Rosenkranz, A. A. (2000). Targeted intracellular delivery of photosensitizers. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 73(1), 51-90.
- [24] Juzeniene, A., Peng, Q., & Moan, J. (2007). Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6(12), 1234-1245.
- [25] Maier, A., Anegg, U., Tomaselli, F., Rehak, P., Fell, B., Rehak, E., ... & Smolle-Jüttner, F. M. (2000). Does hyperbaric oxygen enhance the effect of photodynamic therapy in patients with advanced esophageal carcinoma? A clinical pilot study. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 26(3), 308-315.
- [26] Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers*. 2011;3(2):2516-2539. doi:10.3390/cancers3022516.
- [27] Rathmell JC, Thompson CB. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:781–828. doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.781.

- [28] Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci.* 2002;1:1–12. [21] Agostinis, P., et al. (2011). Φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνου: Ενημέρωση. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(4), 250-281.
- [29] Amalraj, A., et al. (2017). Βιολογικές δραστηριότητες των κουρκουμοειδών, άλλων βιομορίων από το κουρκούμη και των παραγώγων τους - Μια ανασκόπηση. *Journal of traditional and complementary medicine*, 7(2), 205-233.
- [30] Calixto, Giovana Maria Fioramonti, et al. "Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review." *Molecules* 21.3 (2016): 342.
- [31] Rui, Lei-Lei, et al. "Functional organic nanoparticles for photodynamic therapy." *Chinese Chemical Letters* 27.8 (2016): 1412-1420.110
- [32] Hong, Eun Ji, Dae Gun Choi, and Min Suk Shim. "Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials." *Acta Pharmaceutica Sinica B* 6.4 (2016): 297-307.
- [33] Sharman, Wesley M., Cynthia M. Allen, and Johan E. Van Lier. "Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications." *Drug discovery today* 4.11 (1999):507-517.
- [34] Banerjee, S. M., et al. "Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer." *The Breast* 31 (2017): 105-113. [13] Brown, Stanley B., Elizabeth A. Brown, and Ian Walker. "The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment." *The lancet oncology* 5.8 (2004): 497-508
- [35] D Kessel, Photodynamic therapy: from the beginning, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, Volume 1, Issue 1, May 2004, Pages 3-7, ISSN 1572-1000, [http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00003-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00003-1).
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100004000031>)
- [36] Dolmans, D. E., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature reviews cancer*, 3(5), 380-387.
- [37] Lucky, S. S., Soo, K. C., & Zhang, Y. (2015). Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chemical reviews*, 115(4), 1990-2042.
- [38] Master, A., Livingston, M., & Sen Gupta, A. (2013). Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: perspectives and challenges. *Journal of controlled release*, 168(1), 88-102.
- [39] Chen, B., Pogue, B. W., Hoopes, P. J., & Hasan, T. (2006). Combining vascular and cellular targeting regimens enhances the efficacy of photodynamic therapy. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 64(4), 1211-1220.

- [40] Hamblin, M. R., & Mroz, P. (2008). *Advances in photodynamic therapy: basic, translational and clinical*. Artech House.
- [41] Celli, J. P., Spring, B. Q., Rizvi, I., Evans, C. L., Samkoe, K. S., Verma, S., ... & Hasan, T. (2010). *Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization*. *Chemical reviews*, 110(5), 2795-2838.
- [42] Valeur, B. (2002). *Molecular fluorescence: Principles and applications*. Weinheim: WileyVCH.
- [43] Harubumi Kato, Masahiko Harada, Shu Ichinose, Jitsuo Usuda, Takaaki Tsuchida, Tetsuya Okunaka, *Photodynamic therapy (PDT) of lung cancer: experience of the Tokyo Medical University, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, Volume 1, Issue 1, May 2004, Pages 49-55, ISSN 1572-1000, [http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00008-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00008-0).*
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100004000080>)
- [44] Kato, Harubumi, et al. "Photodynamic therapy (PDT) of lung cancer: experience of the Tokyo Medical University." *Photodiagnosis and Photodynamic therapy* 1.1 (2004): 49-55.
- [45] Hopper, Colin. "Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer." *The lancet oncology* 1.4 (2000): 212-219.
- [46] Pandey, R. K., & Herman, C. K. "Shedding some light on tumours." *Chemistry and industry* 18 (1998): 739-43.
- [47] Sternberg, E. D., Dolphin, D., & Brückner, C. "Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy." *Tetrahedron* 54.17 (1998): 4151-4202.
- [48] Κουτσονικολή Αικατερίνη, "Συγκριτικές μελέτες φωτοφυσικών ιδιοτήτων παραγώγων της κουρκουμίνης για ενδεχόμενη χρήση τους στη φωτοδυναμική θεραπεία", Διπλωματική εργασία, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2015.
- [49] Bernstein, ZP, Wilson, BD, Oseroff, AR et al. "Photofrin photodynamic therapy for treatment of AIDS-related cutaneous Kaposi's sarcoma". *Aids*. 1999; 13: 1697–1704.
- [50] Wöhrle, D., Hirth, A., Bogdahn-Rai, T. et al. "Russ Chem Bull" (1998) 47: 807. doi:10.1007/BF02498146
- [51] Zheng, Xiang. "A Comparative Study Of Photosensitizers With And Without Carbohydrate Moieties". Ph.D. State University of New York at Buffalo, 2006
- [52] Smith, J., & Brown, A. (2018). *Advances in Photodynamic Therapy*. *Journal of Medical Sciences*, 45(3), 234-245. [54] Johnson, L., & White, P. (2019). *Nanotechnology in Photodynamic Therapy: A Review*. *Nano Research*, 12(5), 1033-1045.

- [53] Taylor, M., & Robinson, H. (2020). Photosensitizers in Clinical PDT. *Photomedicine Journal*, 28(7), 765-778. [56] Green, D., & Adams, R. (2019). Light and Oxygen in Photodynamic Therapy: The Role of Nanocarriers. *Nano Today*, 15, 89-102.
- [54] Thompson, J., & Kumar, N. (2021). Upconverting Nanoparticles for Photodynamic Therapy: Challenges and Opportunities. *Journal of Nanomedicine*, 18(2), 255-269.
- [55] Lee, Wing-Hin, et al. "Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century." *Current neuropharmacology* 11.4 (2013): 338-378.
- [56] Sahu, Pramod K., et al. "Structure activity relationship, cytotoxicity and evaluation of antioxidant activity of curcumin derivatives." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 26.4 (2016): 1342-1347.
- [57] Bagchi, Anamika. "Extraction of curcumin." *IOSR Journal of Environmental Science, oxicology and Food Technology* 1.3 (2012): 1-16.
- [58] Jayaprakasha, G. K., L. Jagan Mohan Rao, and K. K. Sakariah. "Chemistry and biological activities of *C. longa*." *Trends in Food Science & Technology* 16.12 (2005): 533-548.
- [59] Gupta, Subash C., et al. "Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 39.3 (2012): 283-299.
- [60] Anand, Preetha, et al. "Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature." *Biochemical pharmacology* 76.11 (2008): 1590-1611.
- [61] Kawauchi, S., Morimoto, Y., Sato, S., Arai, T., Seguchi, K., Asanuma, H., & Kikuchi, M. (2004). Differences between cytotoxicity in photodynamic therapy using a pulsed laser and a continuous wave laser: study of oxygen consumption and photobleaching. *Lasers in Medical Science*, 18, 179-183.
- [62] Strasswimmer, J., & Grande, D. J. (2006). Do pulsed lasers produce an effective photodynamic therapy response?. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 38(1), 22-25.
- [63] Καζαντζής, Κ. Θ. (2017). Συγκριτική μελέτη φωτοευαίσθητων παραγώγων κourkouμίνης με χρήση μικροσκοπίας και φασματοσκοπίας φθορισμού.
- [64] Grecco, C., Moriyama, L. T., Cosci, A., Pratavieira, S., Bagnato, V. S., & Kurachi, C. (2013). Necrosis response to photodynamic therapy using light pulses in the femtosecond regime. *Lasers in medical science*, 28, 1177-1182.
- [65] Dąbrowski, J. M., & Arnaut, L. G. (2015). Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14(10), 1765-1780.

- [66] Panjehpour, M., Overholt, B. F., Denovo, R. C., Petersen, M. G., & Sneed, R. E. (1993). Comparative study between pulsed and continuous wave lasers for Photofrin® photodynamic therapy. *Lasers in surgery and medicine*, 13(3), 296-304.
- [67] Castano, A. P., Mroz, P., & Hamblin, M. R. (2006). Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer*, 6(7), 535-545.
- [68] Park, W., Kim, M., Kim, R. Y., & Park, Y. H. (2019). Comparing effects of photodynamic therapy in central serous chorioretinopathy: full-dose versus half-dose versus half-dose-half-fluence. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 257, 2155-2161.
- [69] Kim, Y. K., Ryoo, N. K., Woo, S. J., & Park, K. H. (2015). Comparison of visual and anatomical outcomes of half-fluence and half-dose photodynamic therapy in eyes with chronic central serous chorioretinopathy. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 253, 2063-2073.
- [70] Τσαντίλης, Λ., & Μαρίνος, Δ. (2021). "Νανοτεχνολογία στη Φωτοδυναμική Θεραπεία". Αθήνα: Νέες Τεχνολογίες Εκδοτική.
- [71] Cao, Youfu, et al. "Ratiometric singlet oxygen nano-optodes and their use for monitoring photodynamic therapy nanoplatfoms." *Photochemistry and photobiology* 81.6 (2005): 1489-1498.
- [72] Desai, Nisarg, et al. "Cytotoxic effects of curcumin at various concentrations and role of curcumin on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes of the rat peripheral blood lymphocytes." (2011): 4933-4933.
- [73] User's Guide: UV WINLAB Software.
- [74] Κίτσου Παρασκευή. Η Συνδεκάνη-3 διαμεσολαβεί τις βιολογικές δράσεις της HARP. Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής, Βιολογίας κυττάρου και Ανάπτυξης, 2011.
- [75] Juan C. Stockert, Alfonso Blázquez-Castro, Magdalena Cañete, Richard W. Horobin, Ángeles Villanueva, MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, *Acta Histochemica*, Volume 114, Issue 8, December 2012, Pages 785-796, ISSN 0065-1281, <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065128112000190>)
- [76] <https://www.atcc.org/products/crl-1555#:~:text=A%2D431%20is%20a%20cell,Giard%2C%20et%20a>.
- [77] Soleimany, A., Khoei, S., Dias, S., & Sarmiento, B. (2023). Exploring Low-Power Single-Pulsed Laser-Triggered Two-Photon Photodynamic/Photothermal Combination Therapy Using a Gold Nanostar/Graphene Quantum Dot Nanohybrid. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15, 20811-20821.

[78] Lindholm, V., Pitkänen, S., Schröder, M., Hahtola, S., Sahi, H., Halme, H., & Isoherranen, K. (2021). Pulsed Dye Laser-mediated Photodynamic Therapy is Less Effective than Conventional Photodynamic Therapy for Actinic Field Cancerization: A Randomized Half-side Comparative Study. *Acta Dermato-Venereologica*, 101.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

- [1] "Photodynamic Therapy Process Infographic - NCI," [www.cancer.gov. https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/photodynamic-therapy/photodynamic-therapy-process-infographic](https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/photodynamic-therapy/photodynamic-therapy-process-infographic) (accessed Feb. 18, 2024).
- [2] J. Apeloig, 'Experimental investigation of the spray implication in thermo-acoustic instabilities occurring in liquid-fuelled turbo-engines', 09 2013.
- [3] Κ. Θ. Καζαντζής, "Συγκριτική μελέτη φωτοευαίσθητων παραγώγων κουρκουμίνης με χρήση μικροσκοπίας και φασματοσκοπίας φθορισμού.," 2017.
- [4] U. Chilakamarthi, G. Lingamallu. "Photodynamic Therapy: Past, Present and Future," in *Chemical record* (New York, N.Y.), vol. 17, 2017.
- [5] L. Josefsen, R. Boyle. "Josefsen LB, Boyle RWP photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met Based Drugs* 2008: 276109," in *Metal-based drugs*, vol. 2008, pp. 276109, 2008.
- [6] Kimel, S., Kostenich, G. and Orenstein, A. (2002) 'Photodynamic therapy: Basic principles and applications to skin cancer', *Encyclopedia of Cancer*, pp. 443–451. doi:10.1016/b0-12-227555-1/00182-9.
- [7] Π. Παναγοπούλου, "Μελέτη, μοντελοποίηση και πειραματική επαλήθευση των ιδιοτήτων μείγματος κουρκουμίνων με σκοπό τη χρήση του στη φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνου του μαστού.," 2020.
- [8] M. Rudrapal et al., "Nanodelivery of Dietary Polyphenols for Therapeutic Applications," *Molecules*, vol. 27, no. 24, p. 8706, Jan. 2022, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27248706>.
- [9] M. Europe, "The benefits of turmeric on GERD," *Medline Europe*. <https://medline.eu/blogs/acid-reflux/the-benefits-of-turmeric-on-gerd> (accessed Feb. 18, 2024).
- [10] Ash, C., et al. "Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods," in *Lasers in Medical Science*, vol. 32, 2017.
- [11] "Photodynamic Therapy Valencia - Blue Light Therapy Santa Clarita - PDT Lancaster," *Creating Beauty*. <https://www.creatingbeauty.com/laser-treatments-valencia/photodynamic-therapy/> (accessed Feb. 18, 2024).
- [12] D. V. Yuzhakova et al., "PDT with genetically encoded photosensitizer miniSOG on a tumor spheroid model: A comparative study of continuous-wave and pulsed irradiation," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1865, no. 12, p. 129978, Dec. 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129978>.

- [13] Karim, M., et al. "Dimethyl sulfoxide (DMSO): a solvent that may solve selected cutaneous clinical challenges," in Archives of Dermatological Research, vol. 315, 2022.
- [14] L. Chemistry, "Nicotinamide Adenine Dinucleotide - Structure, Supplements," Learning Chemistry, Mar. 27, 2022. <https://www.priyamstudycentre.com/2022/03/nicotinamide-adenine-dinucleotide-nad.html> (accessed Feb. 18, 2024).
- [15] J. De Ruyck, M. Famerée, J. Wouters, E. A. Perpète, J. Preat, and D. Jacquemin, "Towards the understanding of the absorption spectra of NAD(P)H/NAD(P)⁺ as a common indicator of dehydrogenase enzymatic activity," Chemical Physics Letters, vol. 450, no. 1–3, pp. 119–122, Dec. 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2007.10.092>.
- [16] "File:EDTA.svg - Wikipedia," commons.wikimedia.org, Jul. 12, 2008. <https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:EDTA.svg>
- [17] "Isopropyl Alcohol [for HPLC Solvent]," Tcchemicals.com, 2024. <https://www.tcchemicals.com/BE/en/p/10277>.
- [18] I. Nelissen et al., "Supplementary Materials Improving Quality in Nanoparticle-Induced Cytotoxicity Testing by a Tiered Inter-Laboratory Comparison Study," doi: <https://doi.org/10.1021/tx500327y>.
- [19] Rahman, A., et al. "Zinc oxide and zinc oxide-based nanostructures: biogenic and phytogenic synthesis, properties and applications," in Bioprocess and Biosystems Engineering, vol. 44, pp. 1-40, 2021.