



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών

*Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής, της σχολής
Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών*

**Συγκριτική μελέτη αποδέσμευσης
φωτοευαισθητοποιητών Foscan και Fospeg από καρκινικά
κύτταρα με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού**

Κανλή Γεωργία

2012

*Eπιβλέπουσα:
Γιόβα Διδώ, Καθηγήτρια ΕΜΠ*

Κανλή Γεωργία

Απόφοιτος Εφαρμοσμένων Μαθηματικών & Φυσικών Επιστημών

Copyright ©Κανλή Γεωργία

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Περίληψη

Ο καρκίνος του προστάτη θεωρείται θεραπεύσιμη ασθένεια, αν και οι σύγχρονες θεραπείες συνήθως προκαλούν δυσάρεστες παρενέργειες στους ασθενείς. Η λύση του παρόντος προβλήματος έρχεται με μία σχετικά καινούρια θεραπεία στην αντιμετώπιση της νόσου του καρκίνου, την φωτοδυναμική θεραπεία. Αρκετές φωτοευαίσθητες ουσίες χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία, οι οποίες διαφέρουν σε αρκετά χαρακτηριστικά τους. Υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες για τα χαρακτηριστικά της φωτοευαίσθητης ουσίας, όμως ελάχιστες έρευνες ασχολούνται με τη σύγκριση αυτών σε καρκινική κυτταρική σειρά ώστε να συμβάλουν στην επιλογή της βέλτιστης φωτοδραστικής ουσίας για συγκεκριμένες εφαρμογές. Ένας πιθανός τρόπος για τη βελτίωση της δραστικότητας μίας φωτοευαίσθητης ουσίας είναι η εγκλεισμένη λιποσωμιακή μορφή της.

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία σκοπός είναι η συγκριτική μελέτη της αποδέσμευσης από κύτταρα καρκινικής σειράς του προστάτη LNCaP της ελεύθερης και της εγκλεισμένης λιποσωμιακής μορφής της m-THPC (foscan και fospeg αντίστοιχα). Η συγκεκριμένη εργασία προσδιορίζει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας σαν συνάρτηση του χρονικού διαστήματος μετά από την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας από την καρκινική σειρά, με αρχικές συγκεντρώσεις 0.15μg/ml και 1.2 μg/ml και την μεταξύ τους σύγκριση. Συγκεκριμένα, θα καθοριστεί ποια από τις δύο ουσίες αποδεσμεύεται πιο γρήγορα από τα κύτταρα.

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, προκύπτει ότι η εγκλεισμένη λιποσωμιακή μορφή της m-THPC (fospeg) ενισχύει την πρόσληψη της φωτοευαίσθητης ουσίας από τα καρκινικά κύτταρα, δηλαδή έχει περισσότερη απορρόφηση από την καρκινική σειρά. Επίσης είναι φανερό ότι αυξάνει το ρυθμό της αποδέσμευσης από τα καρκινικά κύτταρα. Με τα παραπάνω χαρακτηριστικά μπορούμε να αντιληφθούμε ότι η φωτοευαίσθητη ουσίας της εγκλεισμένης λιποσωμιακής μορφής m-THPC fospeg οδηγεί στη μείωση της δόσης της φωτοευαίσθητης ουσίας και με τη γρήγορη αποδέσμευση της, αυτό συμβάλει σημαντικά στην εξάλειψη της φωτοευαίσθησίας μετά την φωτοδυναμική θεραπεία.

Abstract

Prostate cancer is considered a curable condition, even though current treatments can cause unpleasant side effects. The solution to this problem is provided by a considerably new treatment in dealing with cancer, called photodynamic therapy (PDT). Multiple photosensitizers are employed in this therapy, differing in many of their characteristics. Although, countless in vitro studies on the attributes of photosensitizers do exist, a direct comparison of these substances on one cell line are rare and may contribute to the choice of the optimal photoactive substance for a specific application. One way for improvement is the encapsulation of liposomal formulation; using liposomes as transport agents offers plenty of advantages.

In this thesis project the main purpose is the comparative study of the release, from cells of the prostate cancer cell lines LNCaP, of the free and the liposomal encapsulated form of m-THPC (foscan and fospeg respectively). The experiments in this work identify the intracellular concentration of the photosensitive substance as a function of time, after the removal of the photosensitive substance from the original tumor cell lines with concentrations of 0.15mg/ml and 1.2mg/ml and their comparison. Specifically, we will determine which of the two substances are released faster than the cells

After processing the results, it was concluded that the liposomal encapsulated form of m-THPC (fospeg) enhances the absorption of the photosensitive substance by tumor cell lines. It also became obvious that it was increased the rate of release cells. With the aforementioned features we can deduct that the photosensitizers of the encapsulated liposomal formulation m-THPC (fospeg) lead to dose reduction of the photosensitive substance and with its quick release it contributes significantly to the elimination of photosensitivity after photodynamic therapy.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ...

Γίοβα Διδώ,
για την ευκαιρία που μου πρόσφερε.

Πετρή Ασπασία,
για τη τεράστια υπομονή της.

Όλους τους συντελεστές του εργαστηρίου,
για την άμεση ενσωμάτωση μου στην ομάδα.

Τη μαμά μου,
Ά φορά που αγωνίστηκε για μένα.

Τους δυσλεκτικούς,
γιατί \nexists δεν μπορώ, \exists δεν θέλω.

To Γιώργο και την Έλενα,
για τη βοήθεια στη συγγραφή του παρόντος
κειμένου

Περιεχόμενα

1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1 Φωτοδυναμική Θεραπεία	1
1.1.1 Ιστορική αναδρομή	1
1.1.2 Φωτοδυναμική Θεραπεία	2
1.1.3 Κβαντική Ερμηνεία	5
1.1.4 Μηχανισμός φωτοδυναμικής Θεραπείας	9
Φωτοφυσική διαδικασία	9
Φωτοχημική διαδικασία	10
Βιολογική διαδικασία	13
1.1.5 Μηχανισμός καταστροφής καρκινικών κυττάρων	14
Νέκρωση και Απόπτωση	15
Κυτταρική βλάβη	18
1.1.6 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα	19
1.2 Φωτοευαίσθητες Ουσίες στη Φωτοδυναμική Θεραπεία	21
1.2.1 Φωτοευαίσθητες Ουσίες	21
1.2.2 Φωτοφυσικές παράμετροι φωτοευαίσθητοποιητών	22
1.2.3 Βασικά χαρακτηριστικά φωτοευαίσθητοποιητών	24
1.2.4 Οικογένειες φωτοευαίσθητων ουσιών	25
Πορφυρίνες	25
Χλωροφύλλες	29
Χρωστικές	32
1.2.5 Βιολογικές διεργασίες	33
1.3 Λιποσώματα	34
1.3.1 Εισαγωγή	34
1.3.2 Βασικά χαρακτηριστικά	35

1.3.3	Αλληλεπιδράσεις κυττάρων με λιποσώματα	36
1.3.4	Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα	37
1.3.5	Φωτοευαίσθητες ουσίες με λιποσώματα	38
1.3.6	Φυσικές ιδιότητες	40
1.3.7	Λιποσωματιδιακοί σχηματισμοί της mTHPC	41
2	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	43
2.1	Σκοπός της πειρατικής μελέτης	43
2.2	Πειραματικές Διατάξεις	44
2.2.1	Αεραγωγός	44
2.2.2	Κλίβανος	45
2.2.3	Καταψύκτης	46
2.2.4	Δοχείο υγρού αζώτου	47
2.2.5	Μικροσκόπιο	47
2.2.6	Φυγοκέντρηση	48
2.2.7	Συνθήκες αποστείρωσης	50
2.2.8	Μέτρηση Κυττάρων	52
2.2.9	Φασματοσκοπία φυρισμού	54
2.2.10	Ουσίες	58
2.2.11	Φωτοευαίσθητοποιητές	60
2.3	Πειραματικές Μέθοδοι	64
2.3.1	Κύτταρα	64
2.3.2	Καλλιέργεια Κυττάρων	65
2.3.3	Ανακαλλιέργεια Κυττάρων	66
2.3.4	Αποθήκευση Κυττάρων	68
2.3.5	Εισαγωγή φωτοευαίσθητης ουσίας	69
2.3.6	Απελευθέρωση φωτοευαίσθητης ουσίας	72
2.3.7	Μέτρηση απελευθέρωσης της φωτοευαίσθητης ουσίας	73
2.4	Αποτελέσματα	75
2.4.1	Αρχική συγκέντρωση φωτοευαίσθητης ουσίας 0.15 µg/ml για την ελεύθερη μορφή (foscans)	75
2.4.2	Αρχική συγκέντρωση φωτοευαίσθητης ουσίας 1.2 µg/ml για την ελεύθερη μορφή (foscans)	78

2.4.3	Αρχική συγκέντρωση φωτοευαίσθητης ουσίας 0.15 μg/ml για την εγκλεισμένη λιποσωμιακή μορφή (fospeg)	80
2.4.4	Αρχική συγκέντρωση φωτοευαίσθητης ουσίας 1.2 μg/ml για την εγκλεισμένη λιποσωμιακή μορφή (fospeg)	83
2.4.5	Καμπύλες αναφοράς	87
2.5	Συμπεράσματα	89
2.5.1	Σύγκριση εγκλεισμένης λιποσωμιακής και ελεύθερης m-THPC (foscan και fospeg)	89
	Ένταση φθορισμού	89
	Συγκέντρωση	93
	Αποδέσμευση	97
2.5.2	Προοπτικές - Επίλογος	98

Κατάλογος Σχημάτων

1.1	Τα πέντε στάδια της φωτοδυναμικής θεραπείας	4
1.2	Οι ενεργειακές μεταβάσεις	5
1.3	Γραφική αναπαράσταση των φωτοφυσικών και των φωτοχημικών μηχανισμών της φωτοδυναμικής θεραπείας	9
1.4	Οι μηχανισμοί δράσης της φωτοδυναμικής θεραπείας	15
1.5	Νέκρωση και Απόπτωση	16
1.6	Οπτικό παράθυρο ιστών	23
1.7	Χημική δομή της αιματοπορφυρίνης	26
1.8	Χημική δομή της Photofrin	27
1.9	Χημική δομή του 5-Αμινολεβουλινικού οξέος	28
1.10	Χημική δομή της m-THPC	30
1.11	Χημική δομή της φθαλοκυανίνης	32
1.12	Χημική δομή της μεταλλοφθαλοκυανίνης	33
1.13	Λιποσώματα	34
1.14	Οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης των κυττάρων με τα λιποσώματα	36
2.1	Αεραγωγός	44
2.2	Η ροή του αέρα στον αεραγωγό	45
2.3	Κλίβανο	45
2.4	Καταψύκτης	46
2.5	Καταψύκτης	46
2.6	Μικροσκόπιο	47
2.7	Μικροσκόπιο	48
2.8	Φυγοκέντρηση	50
2.9	Ο αεραγωγός με ενεργή λάμπα UV	51
2.10	Το μικροσκοπικό πλέγμα του αιμοκυτταρομέτρου	53

2.11 Παράδειγμα μέτρησης των κυττάρων μέσο του αιμοκυτταρομέτρου	54
2.12 Οι ενεργειακές μεταβάσεις	55
2.13 Οπτικό διάγραμμα για τη διάταξη μέτρησης του φθορισμού	57
2.14 Φασματοφωτομετρική διάταξη του εργαστηρίου	58
2.15 Χημική δομή της ισοπροπανόλη	58
2.16 Χημική δομή του Triton X-100	60
2.17 Χημική δομή της m-THPC	61
2.18 Φασματικά χαρακτηριστικά της m-THPC	62
2.19 Αντιδράσεις μεταξύ της διεγερμένης φωτοευαίσθητης ουσίας m-THPC και του οξυγόνου	62
2.20 Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) με συγ- κέντρωση 0.15 µg/ml και χρόνο 3h	75
2.21 Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) με συγ- κέντρωση 0.15 µg/ml και χρόνο 6h	76
2.22 Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) με συγ- κέντρωση 0.15 µg/ml και χρόνο 12h	76
2.23 Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) με συγ- κέντρωση 0.15 µg/ml και χρόνο 24h	77
2.24 Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) με συγ- κέντρωση 0.15 µg/ml και χρόνο 72h	77
2.25 Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) με συγ- κέντρωση 1.2 µg/ml και χρόνο 3h	78
2.26 Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) με συγ- κέντρωση 1.2 µg/ml και χρόνο 6h	78
2.27 Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) με συγ- κέντρωση 1.2 µg/ml και χρόνο 12h	79
2.28 Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) με συγ- κέντρωση 1.2 µg/ml και χρόνο 24h	79
2.29 Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) με συγ- κέντρωση 1.2 µg/ml και χρόνο 72h	80
2.30 Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) με συγκέντρωση 0.15 µg/ml και χρόνο 3h	80
2.31 Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) με συγκέντρωση 0.15 µg/ml και χρόνο 6h	81

2.32 Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) με συγκέντρωση 0.15 µg/ml και χρόνο 12h	81
2.33 Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) με συγκέντρωση 0.15 µg/ml και χρόνο 24h	82
2.34 Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) με συγκέντρωση 0.15 µg/ml και χρόνο 48h	82
2.35 Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) με συγκέντρωση 0.15 µg/ml και χρόνο 72h	83
2.36 Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) με συγκέντρωση 1.2 µg/ml και χρόνο 3h	83
2.37 Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) με συγκέντρωση 1.2 µg/ml και χρόνο 6h	84
2.38 Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) με συγκέντρωση 1.2 µg/ml και χρόνο 12h	84
2.39 Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) με συγκέντρωση 1.2 µg/ml και χρόνο 24h	85
2.40 Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) με συγκέντρωση 1.2 µg/ml και χρόνο 48h	85
2.41 Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) με συγκέντρωση 1.2 µg/ml και χρόνο 72h	86
2.42 Καμπύλη αναφοράς της ελεύθερης m-THPC (foscan)	87
2.43 Καμπύλη αναφοράς της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg)	88
2.44 Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) με συγκέντρωσεις 0.15 µg/ml και 1.2 µg/ml και χρόνο 3, 6, 12, 24 και 72h	90
2.45 Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) με συγκεντρώσεις 0.15 µg/ml και 1.2 µg/ml και χρόνο 3, 6, 12, 24, 48 και 72h	91
2.46 Διάγραμμα ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της ελεύθερης m-THPC (foscan) φωτοευαίσθητης ουσίας μεταξύ του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση 0.15 µg/ml	93

2.47 Διάγραμμα ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) μεταξύ του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση 0.15 μg/ml	93
2.48 Διάγραμμα ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της ελεύθερης m-THPC (foscans) φωτοευαίσθητης ουσίας μεταξύ του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση 1.2 μg/ml	94
2.49 Διάγραμμα ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) μεταξύ του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση 1.2 μg/ml	94
2.50 Διάγραμμα ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της ελεύθερης (foscans) και της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) μεταξύ του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση 0.15 μg/ml	95
2.51 Διάγραμμα ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της ελεύθερης (foscans) και της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) μεταξύ του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση 1.2 μg/ml	96
2.52 Γραφική παράσταση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης και του χρόνου, μετά από την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση 0.15 μg/ml	97
2.53 Γραφική παράσταση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης και του χρόνου, μετά από την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση 1.2 μg/ml	97

Κατάλογος Πινάκων

1.1	Οι ενεργειακές μεταβάσεις	8
2.1	Οι μέγιστες τιμές της έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (fo-scan) σε κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με συγκεντρώσεις 0.15 μg/ml και 1.2 μg/ml συνάρτηση του χρονικού διαστήματος απομάκρυνσης της φωτοευαίσθητης ουσίας.	89
2.2	Οι μέγιστες τιμές της έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με συγκεντρώσεις 0.15 μg/ml και 1.2 μg/ml συνάρτηση του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας.	90
2.3	Οι μέγιστες τιμές της έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (fo-scan) και της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με συγκέντρωση 0.15 μg/ml συνάρτηση του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνσης της φωτοευαίσθητης ουσίας.	91
2.4	Οι μέγιστες τιμές της έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (fo-scan) και της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με συγκέντρωση 0.15 μg/ml συνάρτηση του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνσης της φωτοευαίσθητης ουσίας.	92

1

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Φωτοδυναμική Θεραπεία

1.1.1 Ιστορική αναδρομή

Η χρήση του φωτός ως θεραπευτικού παράγοντα μπορεί να εντοπιστεί κατά τη διάρκεια χριλιάδων ετών. Η πρώτες ενδείξεις για την εφαρμογή της ηλιακής ακτινοβολίας στον ανθρωπινό οργανισμό έγινε στην Αρχαία Αίγυπτο, Ινδία και Κίνα για τη θεραπεία δερματολογικών παθήσεων, όπως ψωρίαση, λεύκη, καρκίνο και ραχίτιδα. Οι αρχαίοι Έλληνες συνήθιζαν να εκθέτουν ολόκληρο το σώμα τους στον ήλιο και να είναι γυμνοί. Ο διάσημος Έλληνας γιατρός, ο Ηρόδοτος, θεωρείται ο πατέρας της ηλιοθεραπεία διότι τόνισε τη σημασία της έκθεσης στον ήλιο για την αποκατάσταση της υγείας [1].

Ο θάνατος των χυτάρων που προκαλείται από την αλληλεπίδραση του φωτός και των χημικών ουσιών έχει αναγνωριστεί εδώ και 100 χρόνια. Η πρώτη αναφορά έγινε από τον Oscar Raab, ένας φοιτητής της ιατρικής, σε συνεργασία με τον καθηγητή Herman von Tappeiner, στο Μόναχο. Ο Oscar Raab είχε ανακαλύψει την οπτική ιδιότητα του φθορισμού και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι δεν ευθύνεται το φως αλλά κάποιο προϊόν του φθορισμού [1]. Ανακάλυψε ότι ο φωτισμός σε μικροβιακές καλλιέργειες με την παρουσία της ακριδίνης και των συναφών ενώσεων προκαλούσε θάνατο των χυτάρων [2]. Διατύπωσε την άποψη ότι το αποτέλεσμα αυτό προκλήθηκε από τη μεταφορά ενέργειας, από το φως στην χημική ουσία, παρόμοια διαδικασία παρατηρείται στα φυτά μετά την απορρόφηση του φωτός από την χλωροφύλλη. Λίγο αργότερα, ο Herman von Tappeiner πρόβλεψε τις μελλοντικές δυνατότητες για την εφαρμογή των φθορίζουσαν ουσιών στην ιατρική [1].

Η πρώτη χορήγηση φωτοευαισθητοποιητή σε ανθρώπους πραγματοποιήθηκε το 1900, για την θεραπεία της επιληψίας όπου ένας Γάλλος νευρολόγος χρησιμοποίησε την ηωσίνη με στοματική αγωγή. Ανακάλυψε, όμως, ότι αυτό προκαλεί δερματίτιδα σε περιοχές του δέρματος που είναι εκτεθειμένες στον ήλιο. Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε στην πρώτη ιατρική εφαρμογή, ο Herman von Tappeiner και ένας δερματολόγος ο

Jesionek χρησιμοποίησαν την αλληλεπίδραση του λευκού φωτός με την φυσιοϊζουσα ουσία (ηωσίνη) για τη θεραπεία του όγκου στο δέρμα [1]. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά αλλά έλειπε η μακροχρόνια παρακολούθηση που οδήγησε στο να ξεχαστεί η φωτοδυναμική θεραπεία πιθανώς λόγω της ιονίζουσας ακτινοβολίας στη θεραπεία του καρκίνου [3]. Στην πορεία της φωτοδυναμικής θεραπείας ανακαλύφθηκε ότι όλα όσα αναφέραμε ήταν περιοδικά και η σημερινή εποχή της φωτοδυναμικής θεραπείας ξεκίνησε από Lipson και Baldes, στη Mayo Clinic. Το 1960 διέδωσαν ότι σε χειρουργημένους ασθενείς οι νεοπλασματικοί ιστοί θα φυσορίζουν κάτω από υπεριώδες φως μετά τη χορήγηση της πορφυρίνης, η οποία προετοιμάστηκε από τον Dr. Samuel Schwartz [2].

Ο Jodlbauer και ο Herman von Tappeiner προσπάθησαν να αποδείξουν την απαίτηση του οξυγόνου και το 1907 εισήγαγαν τον όρο φωτοδυναμική δράση για να περιγράψουν το φαινόμενο αυτό [1]. Όμως, ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιήθηκε η λέξη «δυναμική» δεν είναι σαφής. Στην πραγματικότητα, ο Herman von Tappeiner δεν ήταν ικανοποιημένος με τον όρο αυτό, όπως αναφέρει στον πρόλογο του βιβλίου Die Sensibilisierende Wirkung Fluorescierender Substanzen: «Whether or not the name is to be used further or dropped, must be left to the discretion of my colleagues», δηλαδή, «κατά πόσον ο ορισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω ή να αποχωρήσει, πρέπει να αφεθεί στην κρίση των συναδέλφων μου». Το ίδιο σκεπτικό είχαν και άλλοι συνάδελφοι του von Tappeiner όπως ο Blum [3].

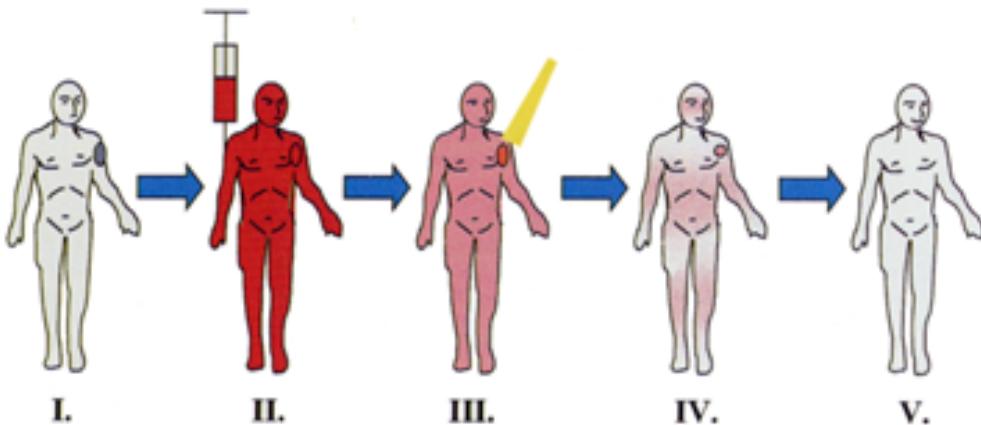
1.1.2 Φωτοδυναμική Θεραπεία

Η φωτοδυναμική θεραπεία (PhotoDynamic Therapy PDT) είναι μια θεραπεία για επιφανειακές βλάβες στο δέρμα, στα μάτια και σε επιλεκτική βάση για συμπαγείς όγκους [4]. Μπορεί να οριστεί ως η χορήγηση ενός τοξικού φαρμάκου ή μίας χρωστική ουσία σε έναν ασθενή που πάσχει από κάποια οργανική βλάβη (πιθανότατα καρκίνο), όπου στην συνέχεια ακτινοβολείται με ορατό φως (συνήθως μακρύ κόκκινο). Αυτή η διαδικασία με την απαραίτητη παρουσία οξυγόνου οδηγεί στο κυτταρικό θάνατο και την καταστροφή των ιστών, μέσω κυτταροτοξικότητας. Η φωτοδυναμική θεραπεία εξαρτάται από τρεις παράγοντες: την ακτινοβολία φωτός, την φωτοευαίσθητη ουσία και το οξυγόνο, οι οποίες ανεξάρτητα δεν επηρεάζουν τα βλαβερά ή υγιής κύτταρα [5], [6]. Δηλαδή, εάν κάποιος από τους τρεις παράγοντες είναι απών, δεν υφίσταται καμία επίδραση. Η συνολική αποτελεσματικότητα απαιτεί προσεκτικό σχεδιασμό στην

δοσομετρία της φωτοευαίσθητης ουσίας και στο ακτινοβολούμενο φως. Αν και η φωτοδυναμική θεραπεία έχει ανακαλυφθεί εδώ και 100 χρόνια η εφαρμογή της κλινικά δεν ξεπερνάει τα 10 χρόνια [7].

Η αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας στην αντιμετώπιση του καρκίνου εξαρτάται από τον τύπο του φωτοευαίσθητο ποιητή, τη συγκέντρωση του, την πυκνότητα ενέργειας του φωτός, το ποσοστό της πυκνότητας ενέργειας του φωτός και τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου [4]. Η φωτοδυναμική θεραπεία εκμεταλλεύεται την ενέργεια του φωτός για να βλάψει ή να καταστρέψει τους ιστούς. Η διαδικασία είναι αποτελεσματική διότι η φωτοευαίσθητη ουσία απορροφά απευθείας την ενέργεια του ακτινοβολούμενου φωτός, η οποία μεταβιβάζεται στην συνέχεια στο μοριακό οξυγόνο για να δημιουργήσει μια ενεργό μορφή του οξυγόνου (μονήρες οξυγόνο). Αυτό το στάδιο είναι απαραίτητο διότι το μονήρες οξυγόνο είναι ο σημαντικότερος κυτταροτοξικός παράγοντας, διότι αντιδρά γρήγορα με δύο κυτταρικά συστατικά το οποίο προκαλεί τη ζημία που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο και καταστροφή του όγκου [7]. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι το βιολογικό αποτέλεσμα είναι φωτοχημικό και όχι θερμικό, αυτό σημαίνει ότι κατά τη διάρκεια και μετά τη θεραπεία η βλάβη στους συνδετικούς ιστούς είναι μικρή, όπως στο κολλαγόνο και στην ελαστίνη [4], [8].

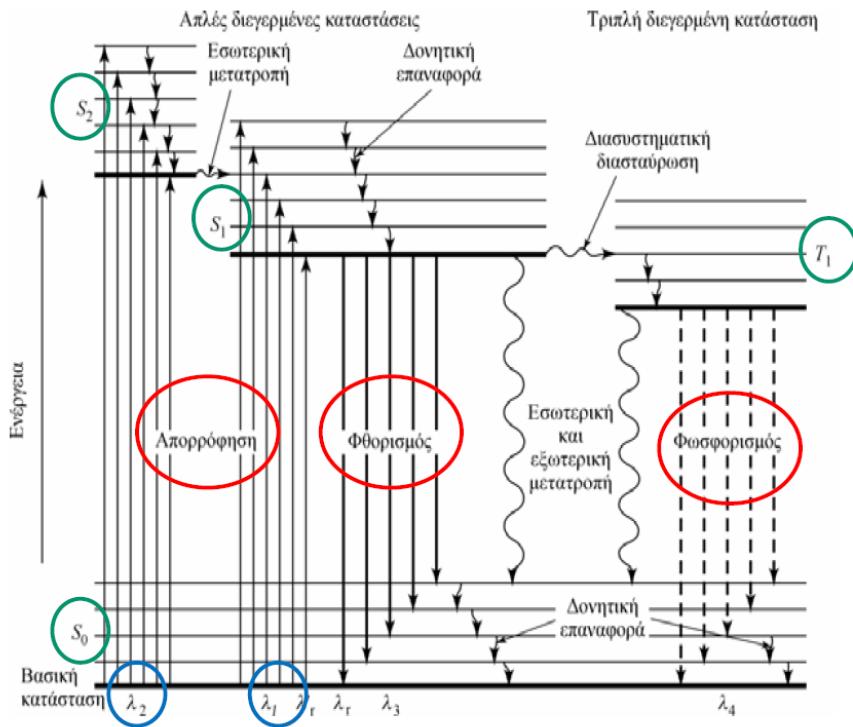
Ένας περιορισμός της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι ότι δεν μπορεί να θεραπεύσει τη νόσο σε προχωρημένο επίπεδο, αυτό συμβαίνει διότι η ακτινοβόληση ολόκληρου του σώματος δεν είναι δυνατόν (τουλάχιστον με την σημερινή τεχνολογία). Παρ' ολα αυτά, σε αυτήν την περίπτωση η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να βοηθήσει στην βελτίωση της ποιότητας και στην επιμήκυνση της ζωής του ασθενούς. Η καταστροφή του καρκινικού όγκου μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία γίνεται μέσω τριών μηχανισμών. Πρώτον, η φωτοευαίσθητη ουσία μπορεί να στοχεύσει στα καρκινικά κύτταρα άμεσα, προκαλώντας νέκρωση ή απόπτωση. Εναλλακτικά, μπορεί να προκαλέσει καταστροφή στα αγγεία του όγκου ή στα υγιή αγγεία γύρο από τον όγκο με αποτέλεσμα να απαγορεύσει την προσέλευση του αίματος και επακόλουθα του οξυγόνου [9].



Σχήμα 1.1: Τα πέντε στάδια της φωτοδυναμικής θεραπείας: **I.** Αποτίμηση της φωτοδυναμικής θεραπείας ως θεραπεία για ασθενή με καρκινικό όγκο **II.** Η χορήγηση της φωτοευαίσθητης ουσίας και η επιλεκτική καταχράτηση της από τους καρκινικούς όγκους **III.** Το φως κατευθύνεται στον όγκο και στους γύρο υγιής ιστούς **IV.** Η σταδιακή αποβολή της φωτοευαίσθητης ουσίας **V.** Η πλήρης καταστροφή του όγκου και η πλήρης αποβολή της φωτοευαίσθητης ουσίας

Η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να θεωρηθεί ως μία διαδικασία πέντε σταδίων. Το πρώτο στάδιο είναι η αποτίμηση της φωτοδυναμικής θεραπείας ως θεραπεία για ασθενή με καρκινικό όγκο. Το δεύτερο στάδιο της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι η χορήγηση της φωτοευαίσθητης ουσίας και η επιλεκτική καταχράτηση της από τους καρκινικούς όγκους. Στο τρίτο στάδιο το φως κατευθύνεται στον όγκο και στους γύρο υγιής ιστούς, μετά από προκαθορισμένο χρόνο. Στο τέταρτο στάδιο η φωτοευαίσθητη ουσία αποβάλλεται σταδιακά από όλους τους ιστούς ενώ ο όγκος αρχίζει να συρρικνώνεται ως αποτέλεσμα της φωτοδυναμικής θεραπείας με την καταστροφή των κυττάρων του όγκου. Ο όγκος καταστρέφεται γρήγορα και κάθε πιθανή βλάβη στους υγιής ιστούς θεραπεύεται μέσα στις επόμενες 6 - 8 εβδομάδες. Στο πέμπτο στάδιο υπάρχει η πλήρης καταστροφή του όγκου και η αποβολή της φωτοευαίσθητης ουσίας [10]. Για να υπάρχουν θετικά αποτελέσματα της διαδικασίας πρέπει το φως να στοχεύσει με ακρίβεια, αυτό μπορεί εύκολα να πραγματοποιηθεί με την χρήση σύγχρονων οπτικών ίνών και συστήματα διαφόρων τύπων ενδοσκόπησης [7], [11].

1.1.3 Κβαντική Ερμηνεία



Σχήμα 1.2: Οι ενεργειακές μεταβάσεις

Το παραπάνω διάγραμμα (1.2) περιγράφει τα διαφορετικά ενεργειακά επίπεδα που συμμετέχουν στην απορρόφηση και στην εκπομπή φωτός από τις φυσικές χρωμοφόρες. Η απορρόφηση ενέργειας πραγματοποιείται μεταξύ των κοντινών δονητικών και περιστροφικών ενεργειακών επιπέδων των διεγερμένων καταστάσεων σε διαφορετικές μοριακές τροχιές. Παρακάτω υπάρχει αναλυτική ερμηνεία του κάθε μηχανισμού που επιτρέπει το μόριο να επιστρέψει στην βασική του στάθμη:

Εσωτερική μετάπτωση

Το μόριο οδηγείται σε χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση, συγκεκριμένα σε κοντινό δονητικό επίπεδο της βασικής ενεργειακής κατάστασης, χωρίς καμία εκπομπή ακτινοβολίας. Η ενέργεια του χάνεται μέσω δονητικής αποδιέγερσης [12],[13].

Εκπομπή φυσικού

Η εκπομπή φυσικού περιλαμβάνει πάντα μεταπτώσεις προς χαμηλότερα ενέργειακά επίπεδα. Το μόριο καταλήγει σε ένα δονητικό επίπεδο της βασικής μονήρους διεγερμένης κατάστασης από κάποιο δονητικό επίπεδο της μονήρους διεγερμένης στάθμης, με εκπομπή ενός φωτονίου. Η ενέργειακή διαφορά μεταξύ του δονητικού επιπέδου της μονήρους στάθμης και του δονητικού επιπέδου της βασικής μονήρους κατάστασης εκφράζει την ενέργεια του φωτονίου. Επειδή, υπάρχει απώλεια ενέργειας όσο το μόριο βρίσκεται στην διεγερμένη κατάσταση, η εκπεμπόμενη ενέργεια είναι μικρότερη από την απορροφηθείσα ενέργεια και προφανώς το μήκος κύματος είναι μεγαλύτερο. Το φάσμα φυσικού περιγράφει της πιθανές διαδρομές που θα ακολουθήσει το μόριο, δηλαδή τις μεταβάσεις από την μονήρη διεγερμένη κατάσταση σε οποιοδήποτε δονητικό επίπεδο της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Αυτές η πιθανές μεταβάσεις εξαρτώνται από τη δομή του μορίου και από το τοπικό του περιβάλλον [13].

Δονητική αποδιέγερση

Το μόριο μπορεί να οδηγηθεί στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της ενέργειακής κατάστασης που βρίσκεται, χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας [13].

Εξωτερική μετατροπή

Η μετάβαση από τη διεγερμένη κατάσταση στη βασική κατάσταση ή σε κάποια χαμηλότερη κατάσταση μπορεί να περιλαμβάνει αλληλεπίδραση με μεταφορά ενέργειας μεταξύ μορίου και μορίων διαλύτη ή άλλου συστατικού [12].

Εσωτερική μετατροπή

Το μόριο οδηγείται σε χαμηλότερη ενέργειακή κατάσταση χωρίς καμία εκπομπή ακτινοβολίας, όπου η ενέργεια του χάνεται. Η εσωτερική μετατροπή περιγράφει ενδομοριακούς μηχανισμούς και είναι αποτελεσματικότερη όταν δύο ενέργειακά επίπεδα επικαλύπτονται μέσω των δονητικών επιπέδων [12].

Διασυστηματική διασταύρωση

Το spin του διεγερμένου μορίου αναστρέφεται με αποτέλεσμα να αλλάζει η πολλαπλότητα του μορίου. Το μόριο από την μονήρη διεγερμένη κατάσταση (S^*) μπορεί να οδηγηθεί στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση (T^*). Η μετάβαση από την βασική κατάσταση (S_0) στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση (T^*) είναι απίθανη [12], [13].

Φωσφορισμός

Το μόριο από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση μπορεί να επιστρέψει στη βασική κατάσταση με εκπομπή ακτινοβολίας (φωσφορισμός) [12],[13].

Μεταφορά ενέργειας μέσω κρούσεων

Εφόσον το διεγερμένο μόριο συγχρουστεί με άλλο μόριο χαμηλότερου ενεργειακού επιπέδου η ενέργεια του διεγερμένου μορίου μεταφέρεται στο άλλο μόριο, χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας. Ο μηχανισμός αυτός αναφέρεται ως απόσβεση φυσιορισμού [13].

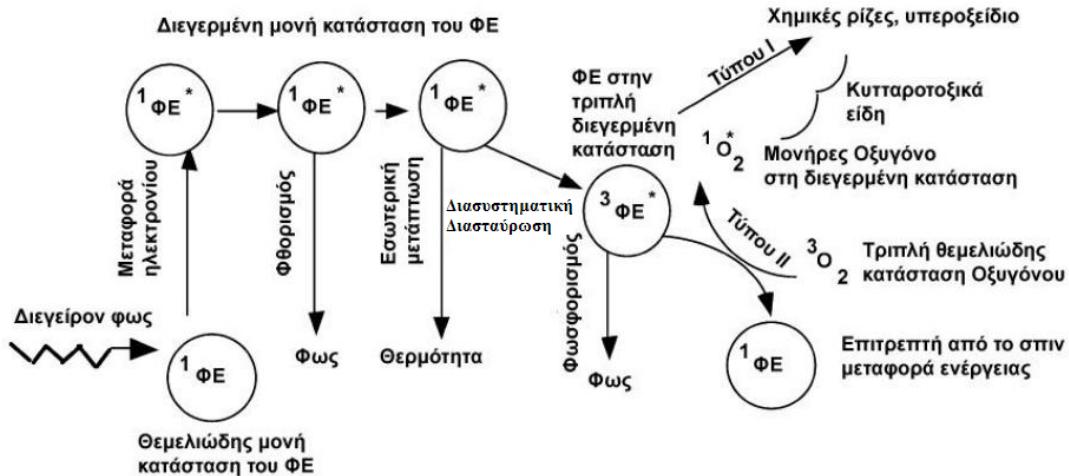
Μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού

Εφόσον υπάρχει σύζευξη διπόλο - διπόλο ανάμεσα σε δύο μόρια, η ενέργεια μεταφέρεται στο άλλο μόριο, χωρίς επαφή. Ο μηχανισμός αυτός είναι μία παραλλαγή της απόσβεσης φυσιορισμού [13].

ΜΕΤΑΒΑΣΗ	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΙΚΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ (SEC)
$S(0) \Rightarrow S(1) \text{ ή } S(n)$	Απορρόφηση (διέγερση)	10^{-15}
$S(n) \Rightarrow S(1)$	Εσωτερική μετατροπή (Internal Conversion)	$10^{-14} \text{ to } 10^{-10}$
$S(1)^* \Rightarrow S(1)$	Δονητική αποδιέγερση (Vibrational Relaxation)	$10^{-12} \text{ to } 10^{-10}$
$S(1) \Rightarrow S(0)$	Φθορισμός	$10^{-9} \text{ to } 10^{-7}$
$S(1) \Rightarrow T(1)$	Διασυστηματική διασταύρωση (Intersystem Crossing)	$10^{-10} \text{ to } 10^{-8}$
$S(1) \Rightarrow S(0)$	Εσωτερική μετατροπή (Internal Conversion)	$10^{-7} \text{ to } 10^{-5}$
$S(1) + M \Rightarrow S(0)$	Quenching	-----
$T(1) \Rightarrow S(0)$	Φωσφορισμός	$10^{-4} \text{ to } 100$
$T(1) + M \Rightarrow S(0)$	Quenching	-----

Πίνακας 1.1: Οι ενεργειακές μεταβάσεις

1.1.4 Μηχανισμός φωτοδυναμικής Θεραπείας



Σχήμα 1.3: Γραφική αναπαράσταση των φωτοφυσικών και των φωτοχημικών μηχανισμών της φωτοδυναμικής θεραπείας

Φωτοφυσική διαδικασία

Η εικόνα (2.13) περιγράφει τις διαδικασίες για την απορρόφηση του φωτός και τη μεταφορά ενέργειας που πραγματοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία. Στο προηγούμενο κεφάλαιο έχουμε δώσει τις ερμηνείες του κάθε μηχανισμού που επιτρέπει το μόριο να επιστρέψει στη βασική του στάθμη. Στη φωτοφυσική διαδικασία υπάρχουν 3 τρόποι αλληλεπίδρασης.

Η φωτοευαίσθητη ουσία έχει δύο ηλεκτρόνια με αντίθετα spin (απλή κατάσταση) στη χαμηλή ενεργειακή κατάσταση. Μετά την απορρόφηση του φωτός (φωτόνια), ένα από τα ηλεκτρόνια ενισχύεται σε υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση με ίδιο spin, δηλαδή μεταφέρεται στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση. Αυτή η διαδικασία είναι μικρής διάρκειας, κάποια νανοδευτερόλεπτα, οπού μπορεί να χάσει την ενέργεια της μέσω φυσισμού ή μέσω εσωτερικής μετατροπής [5]. Επίσης, το ηλεκτρόνιο στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση της φωτοευαίσθητης ουσίας μπορεί να μεταβεί και στην διαδικασίας της διασυστηματικής διασταύρωσης, η οποία αντιστρέφει το spin του διεγερμένου μορίου με αποτέλεσμα να αλλάζει η πολλαπλότητα του. Αυτή η διαδικασία οδηγεί το ηλεκτρόνιο στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση [5],[12]. Η παραμονή του ηλεκτρονίου στην τριπλή

διεγερμένη κατάσταση επηρεάζει σημαντικά τη φωτοδυναμική θεραπεία διότι αυξάνει την πιθανότητα αλληλεπίδρασης του διεγερμένου μορίου με το οξυγόνο, κάτι που είναι απαραίτητο για τη φωτοδυναμική θεραπεία [14].

Φωτοχημική διαδικασία

Στη φωτοχημική διαδικασία υπάρχουν 2 τρόποι αλληλεπίδρασης, Τύπου I και Τύπου II.

Τύπου I

Το διεγερμένο μόριο της φωτοευαίσθητης ουσίας που βρίσκεται στην τριπλή διεγερμένη στάθμη μπορεί να αντιδράσει απευθείας με το υπόστρωμα, δηλαδή με την κυτταρική μεμβράνη ή με το μόριο του υποστρώματος (S), μεταφέροντας ένα πρωτόνιο ή ένα ηλεκτρόνιο για να σχηματιστεί μία ρίζα ανιόντων ή κατιόντων αντίστοιχα [5]. Τα περισσότερα βιολογικά υποστρώματα υποβάλλονται σε οξείδωση [15], [16]:



Η διεγερμένη κατάσταση του φωτοευαίσθητοποιητή και η θεμελιώδης κατάσταση του υποστρώματος μπορεί να λειτουργήσει ως δότης υδρογόνου [15]:



Αυτές οι ελεύθερες ρίζες που έχουν δημιουργηθεί μπορούν να αντιδράσουν με

το μόριο του οξυγόνου παράγοντας αντιδραστικά είδη οξυγόνου [5]. Με την παρουσία του οξυγόνου, για παράδειγμα, η οξειδωμένη μορφή των ευαισθητοποιητών και των υποστρωμάτων μπορούν εύκολα να αντιδράσουν με το O_2 και να δώσουν υπεροξειδιοκές ρίζες δημιουργώντας μια σειρά ριζικών αυτοοξειδώσεων [15].



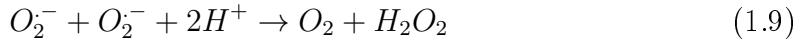
Συγκεκριμένα, η διαδικασία αυτή συχνά περιλαμβάνει την αρχική παραγωγή ανιόντος υπεροξειδίου, αυτό συμβαίνει μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίου από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση στο μοριακό οξυγόνο [15].



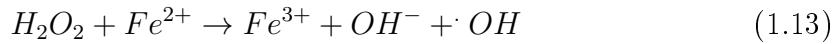
Οποιαδήποτε αντίδραση με το O_2^- δημιουργεί υπεροξείδια του οξυγόνου H_2O_2 . Το υπεροξείδιο από μόνο του δεν έχει αρκετά αντιδραστικό χαρακτήρα ώστε να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη στα βιολογικά συστήματα, ενώ έχει αρκετά αντιδραστικό χαρακτήρα με τον εαυτό του ώστε να παράγει υπεροξείδιο του υδρογόνου και του οξυγόνου. Η αντίδραση αυτή μπορεί να λειτουργήσει ως καταλύτης μέσω του ενζύμου υπεροξείδιο της δισμουτάσης. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου [5]:

- είναι σημαντικό σε βιολογικά συστήματα, επειδή μπορεί να περάσει εύκολα μέσα από τις κυτταρικές μεμβράνες και δεν μπορούν τα κύτταρα να το αποβάλουν
- είναι αναγκαίο για τη λειτουργία πολλών ενζύμων
- όπως και το ίδιο το οξυγόνο είναι αναγκαίο για την υγεία

- είναι σημαντικό για την παραγωγή της δραστικής ρίζας του υδροξυλίου ($HO\cdot$)



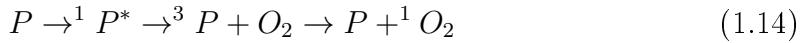
Αναφέραμε πιο πάνω ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου βοηθάει στην παραγωγή της ρίζας του υδροξυλίου ($HO\cdot$), δηλαδή το υπεροξείδιο λειτουργεί ως αναγωγικό μέσο και όχι ως οξειδωτικό μέσο. Το υπεροξείδιο προσφέρει ένα ηλεκτρόνιο για την μείωση των ιόντων του μετάλλου (όπως το ιόν σιδήρου ή το Fe^{3+}) που λειτουργεί ως καταλύτης για τη μετατροπή από υπεροξείδιο του υδρογόνου σε ρίζα του υδροξυλίου. Είναι αρκετά σημαντική σε βιολογικά συστήματα, επειδή τα περισσότερα κύτταρα έχουν κάποια επίπεδα σιδήρου, χαλκού ή άλλων μετάλλων [5].



Τύποι II

Το διεγερμένο μόριο του φωτοευαισθητοποιητή (τριπλή διεγερμένη κατάσταση) μεταφέρει την ενέργεια του απευθείας στο μοριακό οξυγόνο, το οποίο βρίσκεται στην θεμελιώδη κατάσταση, σχηματίζοντας μονήρες οξυγόνο, το οποίο βρίσκεται στην διεγερμένη κατάσταση [5]. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται μέσω της μεταφοράς ενέργειας από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση του φωτοευαισθητοποιητή στην τριπλή

διεγερμένη κατάσταση του οξυγόνου, η οποία είναι η βασική κατάσταση του μορίου του οξυγόνου [15].



Η κβαντική απόδοση του μονήρους οξυγόνου μπορεί να διατυπωθεί από την παρακάτω εξίσωση:

$$\varphi_{\Delta} = \varphi_R^T = \frac{k_R^T[T_1].[S]}{k_{phosph}[T_1] + k_{ISC}^T[T_1] + k_R^T[T_1].[S]} \quad (1.15)$$

Το μονήρες οξυγόνο είναι αρκετά αντιδραστικό είδος, ηλεκτροφιλικό και μπορεί να οξειδωθεί γρήγορα με βιομόρια. Είναι ασταθής, με διάρκεια ζωής που κυμαίνεται από 4 ms στο νερό έως 25-100 ms σε μη πολικά οργανικά διαλύματα. Το μονήρες μπορεί να απενεργοποιηθεί με την επιστροφή του στην θεμελιώδη κατάσταση ή να αντιδράσει με βιομόρια οπου θα δώσουν οξειδωτικά είδη [15].

Η αλληλεπιδράσεις **Τύπου I και Τύπου II** μπορούν να εμφανιστούν ταυτόχρονα και η σχέση μεταξύ αυτών των διαδικασιών εξαρτάται από τον τύπο του φωτοευασθητοποιητή, τις συγκεντρώσεις του υποστρώματος και του οξυγόνου [17].

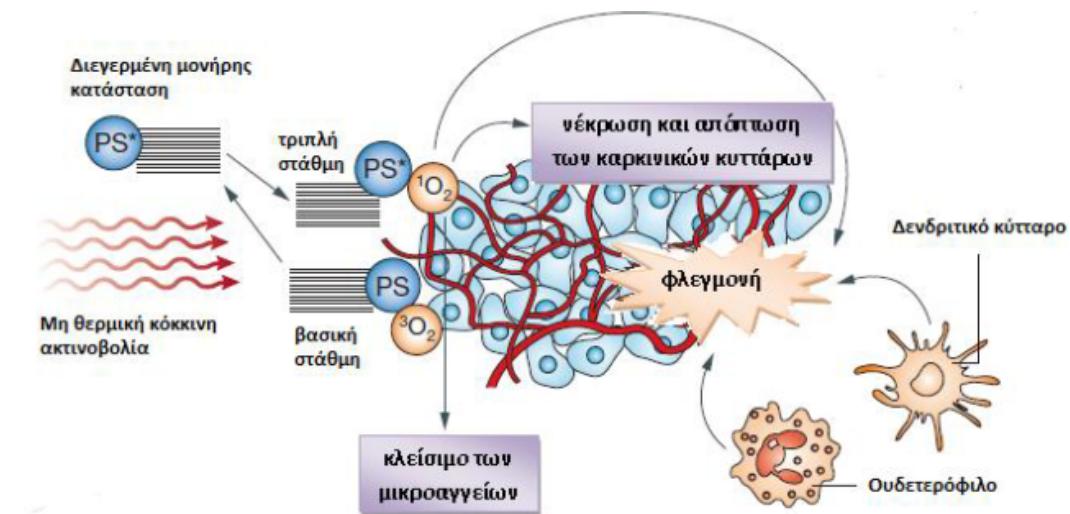
Βιολογική διαδικασία

Η φωτοδυναμική θεραπεία περιλαμβάνει όχι μόνο φωτοχημικές και φωτοφυσικές διαδικασίες αλλά και βιολογικές διαδικασίες. Η φωτοευασθητη ουσία πρέπει να είναι σε θέση να απορροφάται από το αίμα, αυτό συνήθως συμβαίνει μέσω ενδοφλέβιας ένεσης [4]. Μόλις η φωτοευασθητη ουσία προστεθεί στο αίμα τα μόρια του αποσυνθέτονται από τον διαλύτη που τους μεταφέρει. Συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες και τα κύτταρα (ερυθρά, λευκά αιμοσφαίρια), τα οποία περιέχονται στο αίμα, παίζουν το ρόλο του μέσου με το οποίο θα μπορέσουν να μεταφερθούν τα μόρια της φωτοευασθητης ουσίας. Στη συνέχεια τα μόρια αυτά πρέπει να αποκολληθούν από τα μέσα που τα μεταφέρουν και να διασχίσουν τα τοιχώματα των αγγείων, ώστε να διαχυθούν στον όγκο [13].

Επιπλέον, το μήκος κύματος του φωτός που φτάνει στο βλαβερό ιστό πρέπει να απορροφάται από αυτό. Το ποσοστό του φωτός που θα απορροφήσει η φωτοευαίσθητη ουσία εξαρτάται από το ίδιο το φως και από τα χαρακτηριστικά του ιστού, τον οποίο διαπερνάει. Όταν ο ιστός εκτίθεται στο ορθό μήκος κύματος, ο φωτοευαίσθητοποιητής παράγει ένα ενεργό είδος οξυγόνου που οξειδώνει τα βασικά στοιχεία των κυττάρων. Αυτό σημαίνει ότι η φωτοδυναμική θεραπεία προκαλεί άμεσα τον κυτταρικό θάνατο και τον τραυματισμό των μικροαγγείων. Δεδομένου ότι η διαδικασία της φωτοδυναμικής θεραπείας αποτελείται από φωτοχημική και όχι θερμική αντίδραση, η βλάβη στους συνδετικούς ιστούς είναι μικρή, όπως στο κολλαγόνο και στην ελαστίνη. Αυτό το χαρακτηριστικό της φωτοδυναμικής θεραπείας δεν το περιλαμβάνουν άλλες θεραπείες όπως η χημειοθεραπεία ή η ακτινοθεραπεία [4].

1.1.5 Μηχανισμός καταστροφής καρκινικών κυττάρων

Ο κύριος στόχος της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι ο θάνατος των κυττάρων. Οι ιδιότητες που επηρεάζουν τον θάνατο αυτό είναι οι φυσικοχημικές ιδιότητες του φωτοευαίσθητοποιητή, η συγκέντρωση του οξυγόνου, το μήκος κύματος και η ένταση του φωτός. Ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από τη φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να εμφανιστεί με απόπτωση ή νέκρωση είτε με κυτταρική βλάβη του DNA [18]. Δηλαδή η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων από τη φωτοδυναμική θεραπεία περιγράφεται από τρεις αλληλεπιδράσεις: απευθείας κυτταρικό θάνατο, την καταστροφή των αγγείων και την ενεργοποίηση του αντικαρκινικού ανοσοποιητικού συστήματος [19].



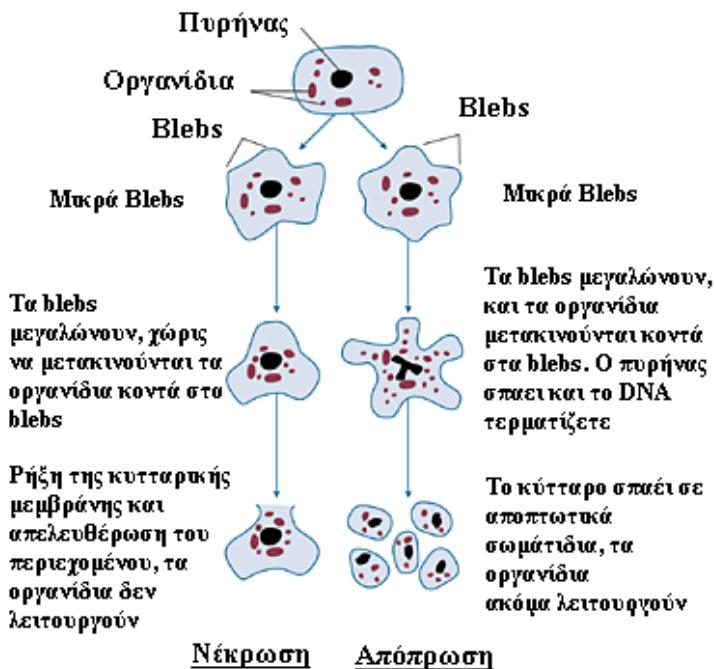
Σχήμα 1.4: Οι μηχανισμοί δράσης της φωτοδυναμικής θεραπείας

Στην παραπάνω εικόνα φαίνονται οι μηχανισμοί δράσης της φωτοδυναμικής θεραπείας για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Το ενεργό οξυγόνο μπορεί να προκαλέσει απευθείας κυτταρικό θάνατο με την επαγωγή νέκρωσης ή/και απόπτωσης, μπορεί να προκαλέσει καταστροφή της αγγείωσης του όγκου, και να παράγει οξεία φλεγμονή που προσελκύει λευκοκύτταρα, όπως τα δενδριτικά κύτταρα και τα ουδετερόφιλα [19].

Νέκρωση και Απόπτωση

Είναι γνωστό ότι υπάρχουν 2 κύριοι τρόποι θανάτου των ευκαρυωτικών κυττάρων: η νέκρωση και η απόπτωση. Υπάρχει επίσης και η κατάσταση που εμφανίζει τη σύμπλεξη της απόπτωσης και της νέκρωσης, όπου ονομάζετε νεκραπόπτωση [20]. Η κατάσταση που επιλέγει το κύτταρο για τον θάνατο του εξαρτάται από τη διάρκεια και την ένταση των τραυμάτων και από τα ενεργειακά αποθέματα του κυττάρου. Η νέκρωση δεν απαιτεί ενέργεια, ενώ η απόπτωση απαιτεί. Επομένως, αν κάποια κύτταρα ακολουθήσουν την διαδικασία της απόπτωσης μπορεί να οδηγηθούν σε κατάσταση νέκρωσης διότι δεν έχουν απομείνει ενεργειακά αποθέματα [21], [22].

Η νέκρωση προκαλέται από τις απότομες βλάβες των κυττάρων, είναι ο ξαφνικός θάνατος των κυττάρων, συνήθως προκαλείται από φυσικούς ή χημικούς τραυματισμούς, είτε από υποθερμία ή υπερθερμία. Μπορεί να χαρακτηριστεί από τις μορφολογι-



Blebs Εξόγκωμα στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου που προκαλείται από την τοπική αποσύνθεση του κυτταροσκελετού από την κυτταρική μεμβράνη.

Σχήμα 1.5: Νέκρωση και Απόπτωση

κές ή βιοχημικές αλλαγές των κυττάρων. Από τις μορφολογικές αλλαγές μπορούμε να εξακριβώσουμε την νέκρωση από την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, την διόγκωση του κυτταροπλάσματος και των μιτοχονδρίων και την πλήρη λύση του κυττάρου. Ενώ στις βιοχημικές αλλαγές παρατηρούνται από την απορρύθμιση της ομοιόστασης ιόντων, την παθητική διαδικασία, την τυχαία πέψη του DNA και την κατάτμηση του DNA μετά την λύση του κυττάρου [20].

Με τον όρο **απόπτωση** ορίζουμε τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, δηλαδή ενεργοποιεί την προϋπάρχουσα ρύθμιση κυτταρικού θανάτου η οποία είναι κωδικοποιημένη στο γενετικό υλικό. Η απόπτωση εμφανίζεται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και κατά τη ανάπτυξη των οργάνων[23]. Μπορεί να χαρακτηριστεί είτε από τις μορφολογικές είτε από τις βιοχημικές αλλαγές των κυττάρων, όπως και η νέκρωση. Στην πρώτη περίπτωση μπορεί να παρατηρηθεί από τη διόγκωση της πλασματικής μεμβράνης

(Blebbing) χωρίς απώλεια ακεραιότητας, τη συσσωμάτωση της χρωματίνης στη πυρινική μεμβράνη, τη συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος, τη συμπύκνωση του πυρήνα, τη κατάτμηση του κυττάρου σε μικρότερα τμήματα και τη δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων. Ενώ στις βιοχημικές αλλαγές παρατηρούνται από την ισχυρά ρυθμιζόμενη διαδικασία με την ενεργοποίηση των ενζύμων, την κατάτμηση του DNA πριν τη λύση του κυττάρου, την απελευθέρωση παραγόντων από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα, την ενεργοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης των κασπάσων, τις μεταβολές στην μεμβράνη [22], [23].

Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι σημαντικό ρόλο στο θάνατο των κυττάρων έχουν και τα μιτοχόνδρια. Υπάρχουν 3 κύριοι μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου που σχετίζονται αναμεταξύ τους: a) η διακοπή της μεταφοράς ηλεκτρονίων, της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και την παραγωγή ATP, b) η απελευθέρωση πρωτεΐνων που ενεργοποιούν τις κασπάσες και c) η μετατροπή του κυτταρικού δυναμικού οξειδοαναγωγής [20].

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία θα ασχοληθούμε με την διαδικασία της απόπτωσης. Η απόπτωση μπορεί να περιγραφθεί από 3 διαδοχικά στάδια: τον προγραμματισμένο θάνατο από εξωκυτταρικά ή ενδοκυτταρικά σήματα, τον κυτταρικό θάνατο μέσω των κασπασών, την απομάκρυνση και την διάσπαση των διαλυμένων κυττάρων [24].

Επίσης υπάρχουν 2 τρόποι που οδηγούν στην απόπτωση, η μια είναι η θετική επαγωγή και η άλλη η αρνητική επαγωγή.

Στη θετική επαγωγή της απόπτωσης τα κύτταρα έρχονται σε στιγμιαίο θάνατο με εντολή σήματος. Αυτό συμβαίνει στο τέλος μίας ανοσιακής αντίδρασης κατά τη καταστροφή των ενεργοποιημένων περιφερικών T-κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση της ομοιόστασης των λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια [22], [25]. Όπως αναφέραμε η θετική επαγωγή της απόπτωσης είναι άμεση και ενισχύεται με αναστολές της πρωτεΐνοσύνθεσης [20], [26].

Στην αρνητική επαγωγή της απόπτωσης τα κύτταρα πεθαίνουν όταν δεν λαμβάνουν σήματα επιβίωσης από το περιβάλλον [27]. Κάτι τέτοιο μπορει να παρατηρηθεί στους νευρώνες, όταν σταματήσουν να λαμβάνουν ηλεκτρικά σήματα ή όταν δεν έρχονται σε επαφή με τους νευροτροφικούς παράγοντες [22]. Εκτός από τα εξωκυτταρικά ερευθίσματα στα κύτταρα υπάρχουν και τα ενδοκυτταρικά ερευθίσματα. Επομένως,

αν παρατηρηθεί κάποια εσωτερική βλάβη στα κύτταρα, η οποία δεν μπορεί να επανέλθει στην αρχική υγειής κατάσταση τα κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση [27].

Η αρνητική επαγωγή της απόπτωσης είναι μια πολύπλοκη διαδικασία με πολλά βήματα, όπου για την ολοκλήρωση της απαιτείται η σύνδεση πρωτεΐνών [20].

Οι υποδοχές των κυττάρων στην επιφάνεια τους έχουν σημαντικό ρόλο στην απόπτωση. Μπορούν να ενεργοποιήσουν τον αποπτικό μηχανισμό των κασπασών μέσω σήματος από ειδικούς υποκαταστάτες. Οι κασπάσες είναι ένζυμα που συμμετέχουν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις, όπου καθοδηγούν στην διαίρεση του DNA και στην καταστροφή του κυττάρου. Οι κασπάσες αποτελούνται από 3 μέρη: το αμινοτελικό άκρο, την μεγάλη ομάδα και την μικρή ομάδα [28].

Οι κασπάσες μπορούν να χωριστούν σε 3 κατηγορίες:

ΟΜΑΔΑ 1: Κασπάσες -1, -4 και -5

που έχουν προτίμηση σε υπόστρωμα με την αλληλουχία αμινοξέων WEHD (Try-Glu-His-Asp)

ΟΜΑΔΑ 2: Κασπάσες -2, -3 και -7

που έχουν προτίμηση σε υπόστρωμα με την αλληλουχία αμινοξέων DEXD (aSP-Glu-x-Asp) με προϋπόθεση να υπάρχει στην θέση P4 ένα ασπαρτικό (D)

ΟΜΑΔΑ 3: Κασπάσες -6, -8, -9 και granzyme B

που έχουν προτίμηση σε υπόστρωμα με την αλληλουχία αμινοξέων EXD (Glu-X-Asp)

Η ομάδα 1 είναι αναγκασμένη να οδηγήσει τα κύτταρα στην φλεγμονή ενώ ο ρόλος της ομάδας 2 και 3 είναι να μεταδίδει σήματα για να οδηγήσει το κύτταρα στην απόπτωση [28], [26].

Κυτταρική βλάβη

Η βλάβη του DNA έχει παρατηρηθεί σε πολλές *in vitro* μελέτες, ωστόσο αυτή η βλάβη δεν έχει άμεση σχέση με τις θανατηφόρες επιδράσεις. Έχει αποδειχθεί ότι η φωτοδυναμική θεραπεία προκαλεί βλάβες στο DNA με βάση την οξειδωτική βλάβη, η οποία προκαλεί διάσπαση του έλικα και των συνδέσεων. Οι μεταλλάξιογονικές δυνατότητες ποικίλουν αναμεταξύ διαφόρων τύπων κυττάρων, αντικατοπτρίζοντας διαφορές στις i-

κανότητες επισκευής ή στον μηχανισμό επιτήρησης της βλάβης. Μπορούμε να δούμε ότι η βλάβη του DNA που προκαλείται από την φωτοδυναμική θεραπεία δεν εξαρτάται μόνο από αυτήν (φωτοδυναμική θεραπεία) αλλά και από τον κυτταρικό μηχανισμό αυτοεπιδιόρθωσης [24]. Η βλάβη του DNA στην φωτοδυναμική θεραπεία παρατηρείται πολύ λιγότερη από άλλες θεραπείες ακτινοβόλησης. Παρά το γεγονός ότι το DNA, RNA και η πρωτεΐνική σύνθεση επηρεάζονται από την φωτοδυναμική θεραπεία, η ανάρρωση τους εμφανίζεται δηλώνοντας ότι η ζημία αυτή δεν είναι απαραίτητη να είναι θανατηφόρα [18], [29].

1.1.6 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα

Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα και μερικά μειονεκτήματα στην φωτοδυναμική θεραπεία. Τα πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

- Ιδιαίτερα αποτελεσματική, οδηγώντας σε $\simeq 80\%$ κυτταρικό θάνατο [4], [30].
- Είναι πολύ λιγότερο επεμβατική από οποιαδήποτε άλλη μορφή θεραπείας του καρκίνου. Το μόνο επεμβατικό μέρος σε αυτή την διαδικασία είναι η εισαγωγή της οπτικής ίνας [31], [4], [30].
- Ειδική στόχευση και επιλεκτικότητα, δηλαδή η φωτοδυναμική θεραπεία είναι πιο επιλεκτική για τα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με άλλες σύγχρονες μεθόδους θεραπείας του καρκίνου. [31], [4], [30].
- Επαναλαμβανόμενες δόσεις μπορούν να δοθούν χωρίς περιορισμό στην συνολική δόση, έτσι ώστε η θεραπεία να εφαρμοστεί έως ότου ο καρκίνος έχει εξαλειφθεί εντελώς [31], [4], [30].
- Μπορούν να συνδυαστούν, για παράδειγμα με χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία και ακτινοβολία [4], [30].
- Δυνατότητα αντιμετώπισης των πολλών βλαβών ταυτόχρονα [4], [30].
- Μπορεί να σκοτώσει τα κύτταρα με την απόπτωση [4].
- Φωτοχημική διεργασία (κατά την διάρκεια και μετά την θεραπεία η βλάβη στους συνδετικούς ιστούς είναι μικρή) [4].

- Τεράστιες δυνατότητες για περαιτέρω ανάπτυξη [4], [30].

Μερικά μειονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

- Μετά τη θεραπεία, οι ασθενείς είναι ευαίσθητοι στο φως λόγω της φωτοευαίσθητης ουσίας. Η διάρκεια αυτής της ευαίσθησίας εξαρτάται από τον τύπο της φωτοευαίσθητης ουσίας [31], [4].
- Ο χρόνος που μεσολαβεί από τη χορήγηση της φωτοευαίσθητης ουσίας και της ακτινοβόλησης είναι συχνά ενοχλητικές προς στους ασθενείς. Αυτός ο χρόνος εξαρτάται από τον τύπο της φωτοευαίσθητης ουσίας [31], [4], [30].
- Κατά την διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας η βλάβη των γύρων ιστών είναι πιθανή, εφόσον η δοσιμετρία δεν είναι με ακρίβεια υπολογισμένη [30].

Από τα μειονεκτήματα μπορούμε να βγάλουμε το συμπέρασμα ότι η βελτίωση της φωτοευαίσθητης ουσίας θα πρέπει να γίνει άμεσα από το ερευνητικό προσωπικό. Έτσι ώστε να μπορέσει να οδηγήσει την φωτοδυναμική θεραπεία σε μια βέλτιστη ανάπτυξη.

1.2 Φωτοευαίσθητες Ουσίες στη Φωτοδυναμική Θεραπεία

1.2.1 Φωτοευαίσθητες Ουσίες

Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα από φωτοευαίσθητες ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται στην φωτοδυναμική θεραπεία, με ποικίλα χαρακτηρίστηκα. Η αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας εξαρτάται από την επιλογή της φωτοευαίσθητης ουσίας, αυτή η επιλογή γίνεται με μεγάλη προσοχή και με βάση την κλινική κατάσταση του ασθενούς [13].

Οι φωτοευαίσθητες ουσίες πρέπει να ακολουθούν κάποια χαρακτηριστικά για να είναι αποδέκτες στη φωτοδυναμική θεραπεία:

- **Χαμηλή κυτταροτοξικότητα:** Στη φωτοδυναμική θεραπεία δεν χρησιμοποιούνται τοξικές χημικές ουσίες, διότι δεν επιθυμούνται οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες. Επίσης, ο μεταβολισμός της φωτοευαίσθητης ουσίας δεν πρέπει να δημιουργεί νέα τοξικά παράγοντα [32], [4].
- **Να μην προκαλεί μεταλλαξιογεννήσεις ή καρκινογεννήσεις:** Προφανώς και δεν είναι επιθυμητή η δημιουργία νέας ασθένειας [32], [4].
- **Αποβολή:** Η αποβολή της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι απαραίτητη [32], [4].
- **Επιλεκτικότητα:** Η φωτοευαίσθητη ουσία πρέπει να συσσωρεύεται επιλεκτικά στους ιστούς, οι οποίοι είναι προσβεβλημένοι από τη νόσο και μόνο. Αυτό σημαίνει ότι δεν επηρεάζονται οι υγιείς ιστοί με τον φωτισμό και την ενεργοποίηση της φωτοευαίσθητης ουσίας [32].
- **Επιλεκτική ενεργοποίηση:** Η φωτοευαίσθητη ουσία πρέπει να ενεργοποιείται αξιόπιστα με κατάληλο μήκος κύματος [32], [4].
- **Γρήγορη αποδέσμευση** της φωτοευαίσθητης ουσίας από τους υγιείς ιστούς ώστε να αποφεύγεται η ενεργοποίηση της από το φώς του ηλίου [32], [4].
- **Εύκολη στη χορήγηση** της: Ένας σημαντικός παράγοντας είναι η εύκολη χορήγηση της φωτοευαίσθητης ουσίας όπως τοπική εφαρμογή, εισπνοή, κατάποση ή ενδοφλέβια ανάλογα με την κλινική κατάσταση [32].

- **Ασφάλεια:** Να μην σχηματίζει συσσωματώματα, δεν επιθυμείται η φωτοευαίσθητη ουσία να προκαλέσει νοσηρότητα όπως θρόμβωση, εγκεφαλικό επεισόδιο, καρδιακή προσβολή, κλπ [32], [4].
- **Διαθέσιμη:** Η φωτοευαίσθητη ουσία πρέπει να είναι εμπορικά διαθέσιμη και να μπορεί να παραχθεί από ένα τοπικό φαρμακείο, για την άμεση πρόσβαση της [32], [4].
- **Χαμηλό κόστος:** Μια απαγορευτική ουσία θα αποτρέψει την ευρεία χρήση του [32], [4].

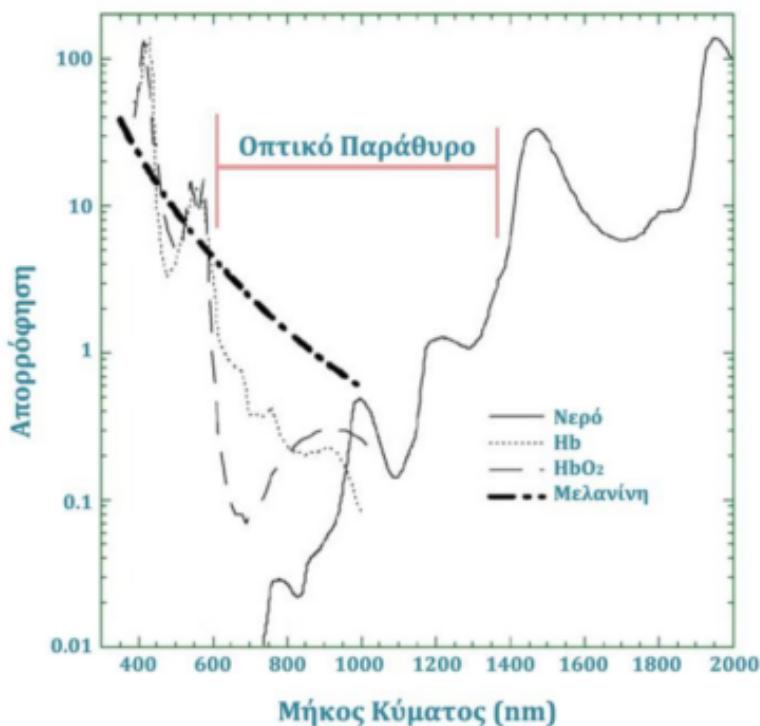
1.2.2 Φωτοφυσικές παράμετροι φωτοευαισθητοποιητών

Στη φωτοδυναμική θεραπεία η φωτοευαίσθητη ουσία έχει το ρόλο του μεσολάβητή, μεταφέρει την ενέργεια της ακτινοβολίας στο οξυγόνο ή στα κυτταρίκα συστήματα με αποτέλεσμα την καταστροφή του όγκου [32]. Οι φωτοφυσικοί παράμετροι που χαρούνται με τη μεσολάβηση του φωτοευαισθητοποιητή είναι:

- Ο συντελεστής απόδοσης μονήρους οξυγόνου $\phi_{\Delta} = P_s/f_t$. P_s : παραγόμενο μονήρες οξυγόνο και f_t : τα φωτόνια τα οποία απορροφήθηκαν από τη φωτοευαίσθητη ουσία [13].
- Ο συντελεστής απόδοσης τριπλής διεργεμένης κατάστασης $\phi_t = n_t/f_t$. n_t : ο αριθμός των μορίων της φωτοευαίσθητης ουσίας τα οποία βρίσκονται στη τριπλή διεγερμένη κατάσταση και f_t : τα φωτόνια τα οποία απορροφήθηκαν από τη φωτοευαίσθητη ουσία [33].
- Η ενέργεια του μορίου της φωτοευαίσθητης ουσίας στη τριπλή διεγερμένη κατάσταση που καταναλώθηκε στη παραγωγή μονηρούς οξυγόνου $S_{\Delta} = \phi_{\Delta}/\phi_t$. ϕ_{Δ} : ο συντελεστής απόδοσης μονήρους οξυγόνου και ϕ_t : ο συντελεστής απόδοσης τριπλής διεργεμένης κατάστασης [13], [34].
- Ο χρόνος παραμονής στη τριπλή διεγερμένη κατάσταση τ_t . Όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος τ_t τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα αλληλεπίδρασης του διεργεμένου μορίου με το οξυγόνο ή τα περιβάλλοντα μόρια [35].
- Η διαφορά ενέργειας μεταξύ της βασικής μονήρους κατάστασης και της τριπλής διεγερμένης κατάστασης του μορίου της φωτοευαίσθητης ουσίας ΔE_t . Πρέπει

$\Delta E_t > \Delta E_\Delta = 94 \text{ KJmol}^{-1}$, όπου ΔE_Δ είναι η διαφορά ενέργειας μεταξύ της μονήρους διεγερμένης κατάστασης του οξυγόνου και της βασικής τριπλής κατάστασης του οξυγόνου [2].

- Ο συντελεστής απόδοσης φυσιορισμού $\phi_{fl} = n_f/f_t$. n_f : ο αριθμός των μορίων της φωτοευαίσθητης ουσίας τα οποία πέρασαν από τη πρώτη μονήρη διεγερμένη κατάσταση στη βασική εκπέμποντας φυσιορισμό και f_t : τα φωτόνια τα οποία απορροφήθηκαν από την φωτοευαίσθητη ουσία. Ο συντελεστής απόδοσης φυσιορισμού ϕ_{fl} είναι απαραίτητος και για τη διάγνωση του καρκίνου αφού η φωτοευαίσθητη ουσία είναι επιλεκτική στους καρκινικούς ιστούς, με τη προϋπόθεση ότι ο συντελεστής απόδοσης φυσιορισμού σε αυτή τη διαδικασία να είναι μικρός [36], [35].
- Ο συντελεστής απορρόφησης στην περιοχή του κόκκινου πρέπει να είναι μεγάλος. Η απορρόφηση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος συνεπάγεται μεγαλύτερο βάθος διείσδυσης και κατά συνέπεια αποτελεσματικότερη νέκρωση του όγκου [36], [13], [35], [34].



Σχήμα 1.6: Οπτικό παράθυρο ιστών

Ο συντελεστής απορρόφησης δεν πρέπει να είναι εξαιρετικά μεγάλος διότι δεν μπορεί να διεισδύσει σε μεγάλο βάθος, λόγω της απορρόφησης του από τα μόρια της φωτοευαίσθητης ουσίας που βρίσκονται στα ανώτερα στρώματα καρκινικών ιστών [13]. Δηλαδή, η φωτοευαίσθητη ουσία πρέπει να απορροφά στην περιοχή 600 - 800 nm.

- Ο συντελεστής απορρόφησης στην περιοχή των μικρότερων μήκων κύματος από τα 600 nm πρέπει να είναι αρκετά μικρός. Ο ασθενής πρέπει να είναι προστατευμένος από την ηλιακή ακτινοβολία διότι δεν επιθυμείται τυχαία ενεργοποίηση της φωτοευαίσθητης ουσίας [5].

1.2.3 Βασικά χαρακτηριστικά φωτοευαισθητοποιητών

Οι φωτοευαίσθητη ουσία υποχρεούται να ακολουθεί κάποια βασικά χαρακτηριστικά προκειμένου να μπορέσει να λειτουργήσει ως φωτοευαίσθητη ουσία στην φωτοδυναμική θεραπεία.

Φαρμακολογικά χαρακτηριστικά

- Η φωτοευαίσθητη ουσία πρέπει να συσσωρεύεται επιλεκτικά στους ιστούς, οι οποίοι είναι προσβεβλημένοι από τη νόσο και μόνο. Αυτό σημαίνει ότι δεν επηρεάζονται οι υγιείς ιστοί με τον φωτισμό και την ενεργοποίηση της φωτοευαίσθητης ουσίας [32], [36].
- Άμεση αποδέσμευση από τους υγιείς ιστούς, ώστε να βοηθήσει στην αύξηση της επιλεκτικότητας και στην μειώση της φωτοευαισθησίας [32], [36].
- Έλλειψη τοξικότητας με την απουσία ακτινοβολίας. Στην φωτοδυναμική θεραπεία δεν χρησιμοποιούνται τοξικές χημικές ουσίες, διότι δεν επιθυμούνται οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες [32], [4].
- Χημική καθαρότητα με σταθερή σύσταση και σταθερό χρόνο ζωής.
- Διαλυτότητα στα υγρά των ιστών του σώματος.

Φωτοθεραπευτικά χαρακτηριστικά

Για την αύξηση της ποιότητας ζωής του ασθενή η φωτοευαίσθητη ουσία πρέπει να απορροφάται όσο το δυνατόν λιγότερο από τους υγιείς ιστούς και η αποβολή της να είναι γρήγορη. Όσο η φωτοευαίσθητη ουσία παραμένει στον οργανισμό του ασθενή, ο ασθενής θα πρέπει να προφυλάσσεται από την ηλιακή ακτινοβολία. Αυτή η διαδικασία μπορεί να διαρκέσει αρκετές εβδομάδες μειώνοντας την ποιότητα ζωής [32], [4].

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Η φωτοευαίσθητη ουσία πρέπει να είναι μια καθαρή χημική ουσία και η σύνθεση της αρκετα απλή, ώστε να μπορεί να παραχθεί από ένα τοπικό φαρμακείο, για την άμεση πρόσβαση της. Επίσης η ουσία πρέπει να είναι αμφίφιλη, δηλαδή να διαλύεται στο νερό και να είναι υδροφοβική, για την αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων [35], [4].

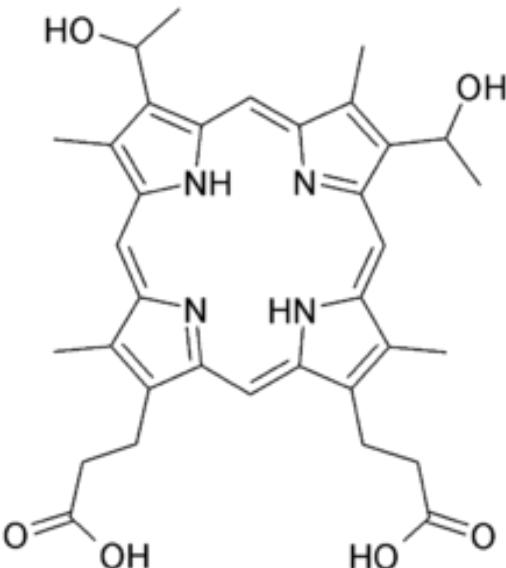
1.2.4 Οικογένειες φωτοευαίσθητων ουσιών

Οι φωτοευαίσθητες ουσίες μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 μεγάλες οικογένειες: τις πορφυρίνες, τις χλωροφύλλες και τις χρωστικές. Επίσης, οι φωτοευαίσθητες ουσίες μπορούν να χωριστούν και σε τρεις γενιές. Στην 1η γενιά κατατάσσονται οι φωτοευαίσθητες ουσίες που δημιουργήθηκαν στη χρονική περίοδο 1970 με αρχές του 1980 δηλαδή οι πορφυρίνες. Στην 2η γενιά ανήκουν οι φωτοευαίσθητες ουσίες που αναπτύχθηκαν στα τελή του 1980, δηλαδή τα παράγωγα των πορφυρίνων και στην 3η γενιά κατατάσσονται οι φωτοευαίσθητες ουσίες που δημιουργήθηκαν τα τελευταία χρόνια ώστε να βοηθήσουν στην βελτίωση και στην αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας [37].

Πορφυρίνες

Η οικογένεια των πορφυρινών περιέχει τα παράγωγα της αιματοπορφυρίνης. Ήταν η πρώτη φωτοευαίσθητη ουσία που έγιναν λεπτομερής μελέτες. Ωστόσο, αποδείχθηκε εξαιρετικά απογοητευτικό για τους επιστήμονες, οι οποίοι προσπάθησαν να καυχορίσουν τη χημική δομή της και να εντοπίσουν τα συστατικά της [5]. Στο εμπόριο κυκλοφορούν

μίγματα που αποτελούνται από διάφορες αναλογίες μονομερών, διμερών και ολιγομερών της αιματοπορφυρίνης [13]. Παρακάτω φαίνεται η χημική δομή της αιματοπορφυρίνης.



Σχήμα 1.7: Χημική δομή της αιματοπορφυρίνης

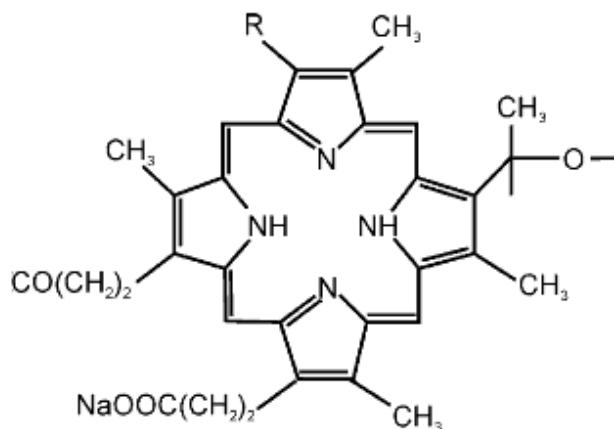
Photofrin

Η Photofrin είναι η πρώτη φωτοευαίσθητη ουσία που χρησιμοποιήθηκε κλινικά. Αυτή η φωτοευαίσθητη ουσία είναι στην πραγματικότητα συνδυασμός μονηρών, διμερών και ολιγομερών που προκύπτουν από την χημική τροποποίηση της αιματοπορφυρίνης [32].

Το φάσμα απορρόφησης της ουσίας Photofrin έχει πέντε κορυφές, η ισχυρότερη απορρόφηση είναι περίπου στα 400 nm και η ασθενέστερη απορρόφηση είναι περίπου στα 630 nm [38]. Το φως στα 630 nm μπορεί να έχει βάθος διείσδυσης περίπου 5 mm, ανάλογα με την συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας [37].

Οι μη υγιείς ιστοί ακτινοβολούνται περίπου μετά από 24h από την χορήγηση της φωτοευαίσθητης ουσίας, οι οποία χορηγείται ενδοφλέβια. Οι δόσεις ενέργειας βρίσκονται στις τιμές 150-300J/cm². Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου έχουν αποδειχθεί άριστα και έχει πάρει έγκριση για θεραπεία καρκίνου του δέρματος, του πνεύμονα, του εγκεφάλου, του οισοφάγου, της κεφαλής -τραχήλου, της ουροδόχου κύστης και του μαστού [32].

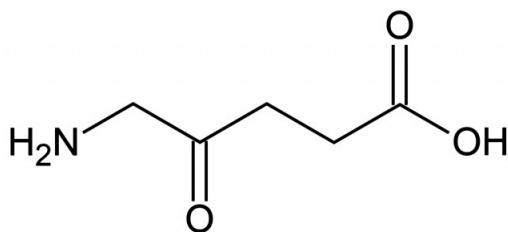
Όπως αναφέραμε το φάρμακο είναι αξιόπιστο, δεν προκαλεί πόνο, σχετικά ασφαλές και μη τοξικό. Ωστόσο, η φωτοευαίσθητη ουσία δεν είναι αρκετά επιλεκτική στα 2 mg/kg και το σημαντικότερο είναι ότι έχει παρατεταμένη φωτοευαίσθησία. Από το τελευταίο χαρακτηριστικό αυτής της φωτοευαίσθητης ουσίας, ο ασθενής πρέπει να μην αλληλεπιδράσει με το ηλιακό φως για 4 εβδομάδες, το φως του δωματίου δεν επηρεάζει τον ασθενή. Όπως είπαμε η Photofrin δεν είναι αρκετά επιλεκτική στα 2 mg/kg, επομένως η φωτοευαίσθητη ουσία θα υπάρχει και στα υγιείς κύτταρα όπου θα αντιδράσει με την ακτινοβολία φωτός. Η δράση του φωτός στα υγιείς κύτταρα είναι λιγότερο έντονη. Μια λύση του παραπάνω προβλήματος είναι η μείωση της χορηγούμενης δόσης όπου μειώνει την φωτοευαίσθησία με ισάξια αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας. Συγκεκριμένα, μείωση κατά 1.2 mg/kg σε θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα και μείωση κατά 0.2 mg/kg σε θεραπεία του καρκίνου του δέρματος και της κεφαλής -τραχήλου [32].



Σχήμα 1.8: Χημική δομή της Photofrin

5-Αμινολεβουλινικό οξύ (ALA)

Το 5-αμινολεβουλινικό οξύ είναι φυσικό αμινοξύ που μετατρέπεται ενζυμικά σε πρωτοπορφυρίνη. Παρακάτω φαίνεται η χημική δομή του.



Σχήμα 1.9: Χημική δομή του 5-Αμινολεβουλινικού οξέος

Το 5-Αμινολεβουλινικό οξύ χορηγείται τοπικά. Το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται στην δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι 400 - 630 nm, το οποίο πρέπει να παρέχει επαρκής βάθος διείσδυσης. Ωστόσο, το φάρμακο δεν έχει μεγάλο βάθος διείσδυσης, οπότε απαιτείται μεγάλη προσοχή όταν αντιμετωπίζονται βαθιά τραύματα. Αυτή η φωτοευαίσθητη ουσία είναι μία φυσική ουσία, η οποία δεν μπορεί να βοηθήσει στην τροποποίηση των πλευρικών αλυσίδων που χρησιμοποιούνται για την αύξηση της απορρόφησης ή της δραστηριότητας. Το 5-Αμινολεβουλινικό οξύ δεν είναι ιδιαίτερα ενεργό, αυτό το γεγονός οδηγεί σε υψηλές ενέργειες ή σε μεγάλες χρονικά θεραπείες [4].

Το 5-Αμινολεβουλινικό οξύ χορηγείται τοπικά και χρειάζεται 3 - 4 ώρες πριν από την ακτινοβόληση, όπου η ακτινοβολία δόσης είναι στα 150 J/cm². Το 5-Αμινολεβουλινικό οξύ στην φωτοδυναμική θεραπεία είναι αρκετά αποτελεσματικό για βασικούτταρικό και ακανθούτταρικό καρκίνωμα του δέρματος. Οι κλινικές εφαρμογές της φωτοδυναμικής θεραπείας έχουν αυξηθεί σημαντικά με την εισαγωγή του δέλτα-αμινολεβουλινικό οξύ, ιδιαίτερα σε τοπικές εφαρμογές της φωτοευαίσθητης ουσίας. Επίσης, το 5-Αμινολεβουλινικό οξύ χορηγείται και για την θεραπεία του καρκίνου στην ουροδόχο κύστη. Αρκετές ώρες μετά την χορήγηση της ουσίας, ακτινοβολείται με λευκό φως στα 100 J/cm². Ο χρόνος της θεραπείας διαρκεί γύρο στη/ις 1 - 2 ώρες. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι το λευκό φως ενεργοποιεί πολλαπλές ζώνες φάσματος στο αμινολεβουλινικό οξύ 400 - 630 nm [4].

Παράγωγα Βενζοπορφυρίνης

Η Verteporfin είναι ένα παράγωγο της βενζοπορφυρίνης, το οποίο κλινικά χορηγείται εγκλεισμένο σε λιποσώματα. Η φωτοευαίσθητη ουσία δραστηριοποιείται στα 690 nm, με συντελεστή απορρόφησης $\epsilon = 35000 M^{-1} cm^{-1}$. Σε γενικές γραμμές η

χορήγηση της φωτοευαίσθητης ουσίας γίνεται ενδοφλέβια και μετά από 15 - 30 λεπτά πραγματοποιείται η φωτοδυναμική θεραπεία [13].

Η Verteporfin χρησιμοποιείται συνήθως για την φωτοδυναμική θεραπεία ηλιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας. Για την συγκεκριμένη θεραπεία χρησιμοποιείται δόση της φωτοευαίσθητης ουσίας στα 6 mg/kg και δόση ακτινοβολίας στα 100 J/cm². Η ακτινοβολία γίνεται με διοδικό laser 690 nm και έχει διάρκεια 15 - 30 λεπτά μετά τη χορήγηση της φωτοευαίσθητης ουσίας. Αξίζει να σημειώσουμε ότι οι ασθενείς πρέπει να επανεξετάζονται κάθε τρίμηνο για ανάπτυξη νεοαγγείου [32].

Επίσης, η φωτοδυναμική θεραπεία με Verteporfin χρησιμοποιούνται και σε ασθενείς που έφεραν πολλαπλούς, μη μελανωματικούς καρκίνους στο δέρμα. Για την συγκεκριμένη θεραπεία χρησιμοποιείται ενδοφλέβια δόση της φωτοευαίσθητης ουσίας στα 14 mg/kg και δόση ακτινοβολίας στα 60, 120 και 180 J/cm². Η ακτινοβολία γίνεται με laser στα 688 nm, 1 - 3 ώρες μετά τη χορήγηση της φωτοευαίσθητης ουσίας. Το ποσοστό επιτυχίας είναι από 63 - 93 % για δόσεις από 60 - 180 J/cm² [39].

Χλωροφύλλες

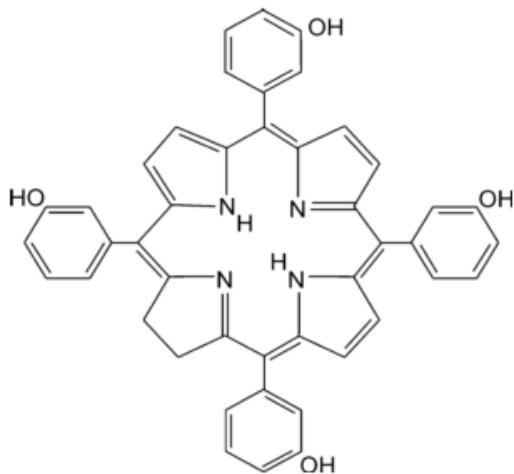
Στην οικογένεια των χλωροφυλλών περιέχουν ενώσεις οι οποίες παράγονται από της χλωροφύλλες και ονομάζονται χλωρίνες. Οι χλωροφύλλες παίζουν σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση των επιπτώσεων της φωτοδυναμικής κατανάλωση του οξυγόνου λόγω της μη αναστρέψιμης καταστροφής του φωτοευαισθητοποιητή, το οποίο οδηγεί στην μείωση του ποσοστού απορρόφησης των φωτονίων [40].

m-THPC

Η m-THPC ανηκεί στην οικογένεια των χλωρινών με μία σειρά από ενδιαφέροντα κλινικά χαρακτηριστικά που την καθηστούν μία από τις καλύτερες φωτοευαίσθητες ουσίες στην ομάδα των χλωρινών. Η m-THPC παρουσιάζει δύο κορυφές στο φάσμα απορρόφησης, μια κύρια στα 415 nm και μία δευτερεύουσα στα 652 nm και ο συντελεστής απορρόφησης είναι $\epsilon = 30000 M^{-1}cm^{-1}$ [36]. Ωστόσο, πολλά από τα πλεονεκτήματα αυτής της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι επίσης σημαντικά μειονεκτήματα. Δυστυχώς, ο αριθμός των ασθενών που έχουν θεραπευτεί από την m-THPC μπορούν να βγάλουν ορισμένα συμπεράσματα, αλλά μόνο ο χρόνος και η εντατική παρακολούθηση μπορεί να

επιτρέψει την πραγματική εκτίμηση. Είναι αξιοσημίωτο να αναφέρουμε ότι η φωτοευαίσθητη ουσία m-THPC είναι μια εξαιρετικά κλινικά ελεγχόμενη ουσία για βλάβες του δέρματος, του πνεύμονα, του οισοφάγου και κυρίως του όγκου στην κεφαλή και στον τράχηλο [32].

Η φωτοευαίσθητη ουσία χαρακτηρίζεται με μεγάλο βάθος διείσδυσης. Η ουσία χορηγείται ενδοφλέβια και η δόση του καθίσταται περίπου στα 0.15 mg/kg. Όπως μπορούμε να καταλάβουμε χρειαζόμαστε μεγαλύτερη δόση (κατά 0.05 mg/kg) για την επιτυχή φωτοδυναμική θεραπεία σε σύγκριση με τη φωτοευαίσθητη ουσία Photofrin, αλλά το κόστος ανά ασθενή είναι ισοδύναμο [32].



Σχήμα 1.10: Χημική δομή της m-THPC

Η φωτοευαίσθητη ουσία χρησιμοποιείται και για την φωτοδυναμική θεραπεία στο κεφάλι και στο λαιμό. Το μεγάλο βάθος διείσδυσης οδηγεί στις αγγειακές βλάβες που μπορεί να είναι καταστροφικό. Το φάρμακο αυτό είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στο φως, έτσι ώστε να απαιτείται δόση ακτινοβολίας μόνο 20 J/cm^2 . Αυτό επιτρέπει την μικρή διάρκεια της θεραπείας, ίσως αρκετά λεπτά το πολύ [32]. Επίσης, για τη θεραπεία καρκίνων κεφαλής - τραχήλου χορηγείται δόση των 0.15 mg/kg και οι όγκοι ακτινοβολούνται με διοδικό laser 652 nm, 4 μέρες μετά την χορήγηση του φαρμάκου και οι συνολικές δόσεις ακτινοβολίας είναι 20 J/cm^2 . Το ίδιο πρωτόκολλο ακολουθείται για τη θεραπεία καρκίνου του δέρματος, του οισοφάγου και των πνευμόνων [13]. Ανάλογα με την κλινική εικόνα του ασθενή η δόση της φωτοευαίσθητης ουσίας κυμαίνεται από

0.10 με 0.15 mg/kg και η δόση της ακτινοβολίας από 5 εως 20 J/cm^2 , από 48 με 96 ώρες μετά την χορήγηση της ούσιας [32].

Purpurin

Purpurin είναι μία φωτοευαίσθητη ουσία που ανήκει στην οικογένεια των χλωροφυλλών. Το φάρμακο είναι συνθετικό και καυθαρό, αλλά λόγω της κακής σταθερότητας του στο νερό πρέπει να κατασκευάζεται προσεκτικά. Η φωτοευαίσθητη ουσία purpurin ενεργοποιείται στα 660 nm και είναι αρκετά αποτελεσματική για σύντομες θεραπείες. Σε γενικές γραμμές η δόση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι στα 1.2 mg/kg και ακτινοβολία χορηγείται μετά από 24 ώρες, το γεγονός αυτό μπορεί να βοηθήσει στον εύκολο προγραμματισμό. Η κλινική εμπειρία δείχνει ότι η φωτοευαίσθητη ουσία είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπιση του βασικοκυτταρικού καρκινώματος, του πλακώδους καρκινώματος και του θωρακικού τοιχώματος [39].

HPPH

Η HPPH (Photochlor) είναι μία φωτοευαίσθητη ουσία που ανήκει στην οικογένεια των χλωροφυλλών με εξαιρετικές κλινικές ιδιότητες. Αυτό το φάρμακο είναι υδρόφοβη λιπόφιλη φωτοευαίσθητη ουσία με εξερετική δράση στα 665 nm και έχει αντιμετωπίσει με επιτυχία μια σειρά από καρκινικούς όγκους σε σκύλους και γάτες. Χορηγείται ενδοφλέβια και έχει ελάχιστη τοξικότητα [32].

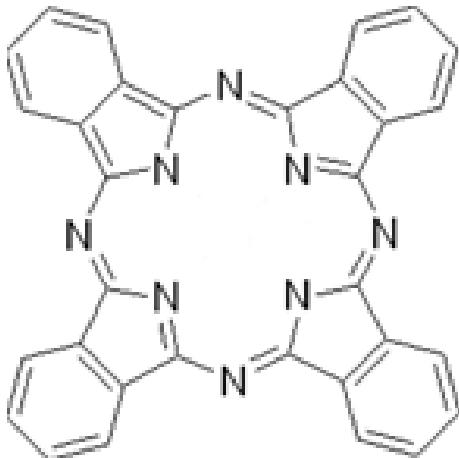
Οι οκτώ από τους οκτώ ασθενείς που πραγματοποίησαν τις συνεδρίες για την θεραπεία του καρκίνου του οισοφάγου θεραπεύτηκαν επιτυχώς. Το πρωτόκολλο αναφέρει ότι η δόση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι στα 0.15 mg/kg και μετά από 48 ώρες η δόση της ακτινοβολίας στα 150 J/cm^2 . Επίσης, τρεις ασθενείς θεραπεύτηκαν από βασικοκυτταρικό καρκίνωμα με 0.08 mg/kg και ακτινοβολείται μετά από 24 (48) ώρες στα $50 \text{ ή } 150 \text{ J/cm}^2$ (200 J/cm^2). Οι ασθενείς πρέπει να προφυλάσσονται από την ακτινοβολία του φωτός για αρκετές μέρες μετά την χορήγηση του φαρμάκου. Αυτός ο χρόνος εξαρτάται από την δόση της φωτοευαίσθητης ουσίας [32], [39].

Χρωστικές

Οι φωτοευαίσθητες ουσίες που ανήκουν στην χρωστική οικογένεια ενεργοποιούνται στα 650 - 850 nm και η δόση ακτινοβολίας είναι 100 J/cm^2 . Οι περισσότερες χρωστικές φωτοευαίσθητες ουσίες είναι υδροφοβικές και είναι συνηθισμένες για αλινική χρήση. Τα σύνθετα υλικά, χρωστικές ουσίες με μέταλλα, φαίνεται να βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας. Τα μέταλλα που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση τους με χρωστικές ουσίες συνήθως είναι αλουμίνιο, ψευδάργυρος, και πυρίτιο. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι μέχρι στιγμής όλες οι επιτυχημένες χρωστικές ουσίες έχουν παρόμοιες δομές με τις πορφυρίνες. Τα πιο σημαντικά μέλη αυτής της ομάδας είναι οι φθαλοκυανίνες και οι ναφθαλοκυανίνες [32].

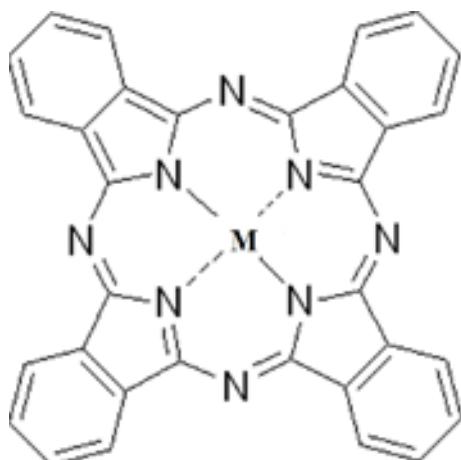
Φθαλοκυανίνες

Οι φθαλοκυανίνες ανήκουν στην οικογένεια των χρωστικών και η πρώτη φορά που χρησημοποιήθηκαν ως φωτοευαίσθητη ουσία ήταν το 1985 από τον Ben-Hur και Rosenthal [10]. Αυτή η φωτοευαίσθητη ουσία έχει την μεγαλύτερη απορρόφηση από όλες τις υπόλοιπες γνωστές φωτοευαίσθητες ουσίες στην κόκκινη περιόχη του φάσματος (680 nm), με συντελεστή απορρόφησης $\epsilon > 10^5 M^{-1}cm^{-1}$ [36], [39].



Σχήμα 1.11: Χημική δομή της φθαλοκυανίνης

Η σύνθετη μορφή του, δηλαδή όταν ο πυρήνας είναι συνδεδεμένος με ένα άτομο του αλουμινίου, του ψευδαργύρου ή του πυριτίου, παρουσιάζει πολύ υψηλούς συντελεστές απόδοσης μονήρους οξυγόνου [36], [41].



Σχήμα 1.12: Χημική δομή της μεταλλοφθαλοκυανίνης

Η φθαλοκυανίνη αλουμινίου έχει πάρει έγκριση για την φωτοδυναμική θεραπεία του πνεύμονα και του δέρματος. Επίσης, μελετάτε κλινικά για καρκίνους κεφαλής - τραχήλου. Η φωτοευαίσθητη ουσία μπορεί να χορηγηθεί είτε τοπικά, είτε με ένεση ή μικροέγχυση στην περιόχη του όγκου είτε ενδοφλέβια και τα κλινικά αποτελέσματα είναι άριστα [13].

1.2.5 Βιολογικές διεργασίες

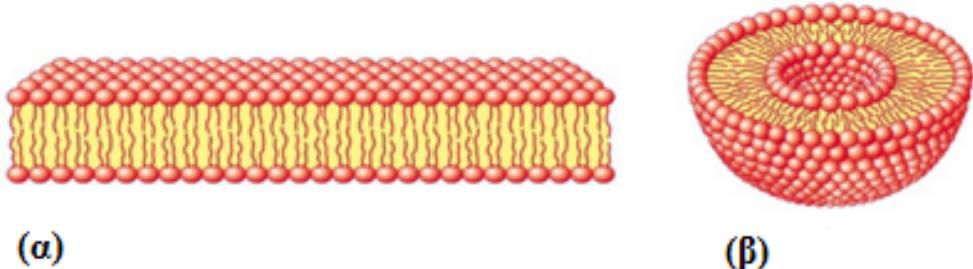
Από την στιγμή που η φωτοευαίσθητη ουσία εισέλθει στον οργανισμό μέχρι να αποβληθεί από τον οργανισμό πραγματοποιούνται διάφορες βιολογικές διεργασίες. Μετά την είσοδο της φωτοευαίσθητης ουσίας στο αίμα ακολουθεί αποσύνδεση των μορίων του από το μέσο-διαλύτη και ένωση τους με τις πρωτεΐνες ώστε να έρθει σε ισορροπία με τα συστατικά του αίματος. Μέσα στο αίμα υπάρχουν και διάφορα κύτταρα, όπως ερυθρά αιμοσφαίρια και λευκά αιμοσφαίρια, τα οποία μπορούν να βοηθήσουν στην μεταφορά των μορίων της φωτοευαίσθητης ουσίας. Στη συνέχεια το μόρια της φωτοευαίσθητης ουσίας αποκολλούνται από τα κύτταρα και προσκολλούνται στα τοιχώματα των αγγείων, τα οποία πρέπει να τα διασχίσουν ώστε να φτάσουν στο στόχο [42].

Μετά από κάποιο διάστημα τα μόρια της φωτοευαίσθητης ουσίας θα απομακρυνθούν από το στόχο μέσω του λεμφικού συστήματος και θα ξανά βρεθούν στην κυκλοφορία του αίματος μέσω του θωρακικού αγωγού για να αποβληθούν από το ήπαρ στην χολή και στο τελικό στάδιο να αποβληθούν από τον οργανισμό [42].

1.3 Λιποσώματα

1.3.1 Εισαγωγή

Τη πρώτη φορά που περιγράφηκαν τα λιποσώματα ήταν το 1986 και προτάθηκαν ως μεσολαβητές φαρμάκων στη χημειοθεραπεία το 1974. Από τότε το ενδιαφέρον για τα λιποσώματα έχει αυξηθεί δραματικά και υπάρχουν πολλές μελέτες πάνω στη μεταφορά φαρμάκων μέσο λιποσωμάτων [43]. Τα λιποσώματα είναι σφαιρικές κλειστές δομές, όπου στο εσωτερικό μέρος τους περιέχουν το διαλύτη και στο εξωτερικό μέρος τους περιέχουν καμπύλες λιπιδιακές διπλοστοιβάδες. Το μέγεθος των λιποσωμάτων κυμαίνεται από 20 nm και αποτελείται από μία ή περισσότερες ομόκεντρες μεμβράνες, πάχους περίπου 4 nm. Τα λιποσώματα διαθέτουν μοναδικές ιδιότητες λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα των λιπιδίων [15].



Σχήμα 1.13: (α) λιπιδική διπλοστοιβάδα, (β) λιπόσωμα

Τα λιποσώματα είναι απλά τεχνητά οχήματα σφαιρικού σχήματος που μπορούν να παρασκευαστούν από φυσικά και συνθετικά μόρια λιπιδίων. Τα κύρια συστατικά τους είναι συστατικά που υπάρχουν άφθονα στον ανθρώπινο οργανισμό και παρέχουν καλή βιοσυμβατότητα, όπως τα φωσφολιπίδια και η χοληστερόλη [44]. Για την παρασκευή των λιποσωμάτων χρησιμοποιούμε αμφίφιλα λιπιδια, τα οποία αποτελούνται από υφρόφοιβες πολικές ομάδες και από υδρόφοιβες αλυσίδες υδρογονανθράκων. Τα λιποσώματα φτιάχνονται έτσι ώστε να παγιδεύουν ποσότητες τόσο στο εσωτερικό υδατικό διαμέρισμα όσο και εντός της λιπιδικής διπλοστοιβάδας [45]. Τα λιποσώματα μπορεί να απαρτίζονται εξ' ολοκλήρου από συνθετικά συστατικά, που επιλέγονται επειδή φέρουν βελτιωμένες χημικές ιδιότητες [15], [45].

Σχηματίζονται αυθόρυμητα όταν τα λιπίδια διασπείρονται σε υδάτινο μέσο. Αυτό

σημαίνει ότι σε ένα υδατικό διάλυμα θα υπάρχει αυθόρυμη συγκέντρωση των μορίων και σχηματισμός μικροδομών. Αυτή η αυτο-οργάνωση συνοδεύεται από την αύξηση της εντροπίας του συστήματος. Η αύξηση της εντροπίας εξαρτάται από της υδροφοβικές αλυσίδες υδρογονανθράκων που αναγκάζουν τα μόρια του νερού να σχηματίσουν μία διατεταγμένη δομή γύρω από το υδρόφοβο τμήμα [15].

Η απαλλαγή των μελών που διέταξε το νερό μπορεί να επιτευχθεί με την οδήγηση των υδρόφοβων τμημάτων από το υδατικό διάλυμα και με την απομόνωση τους στο εσωτερικό. Έτσι, η αύξηση της εντροπίας που αποκτήθηκε από τα μόρια του νερού μπορεί να οδηγήσει σε συνολική αύξηση της ελεύθερης ενέργειας [15].

Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι η κύρια κινητήρια δύναμη στον σχηματισμό λιπιδικών μεμβρανών. Αυτή η συνάθροιση υδρογονανθρακικών αλυσίδων ευνοείται επίσης και από τις μεταξύ τους ελκτικές δυνάμεις τύπου van der Waals, καθώς επίσης και από τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις και τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των πολικών κεφαλών και των μορίων του νερού από το περιβάλλον [45]. Η άσκηση αυτού του συνόλου των δυνάμεων έχει τρεις σημαντικές προεκτάσεις:

- Οι διπλοστοιβάδες των λιπιδίων έχουν την τάση να είναι εκτεταμένες.
- Οι διπλοστοιβάδες των λιπιδίων θα έχουν την τάση να ενώσουν τα άκρα τους ώστε να μην υπάρχουν εκτεθειμένες υδρογονανθρακικές αλυσίδες, γεγονός που συνεπάγεται στη δημιουργία κλειστού διαμερίσματος.
- Οι διπλοστοιβάδες λιπιδίων κλείνουν από μόνες τους επειδή κάθε οπή ή άνοιγμα στη διπλοστοιβάδα είναι ενεργειακά μη επιτρεπτή.

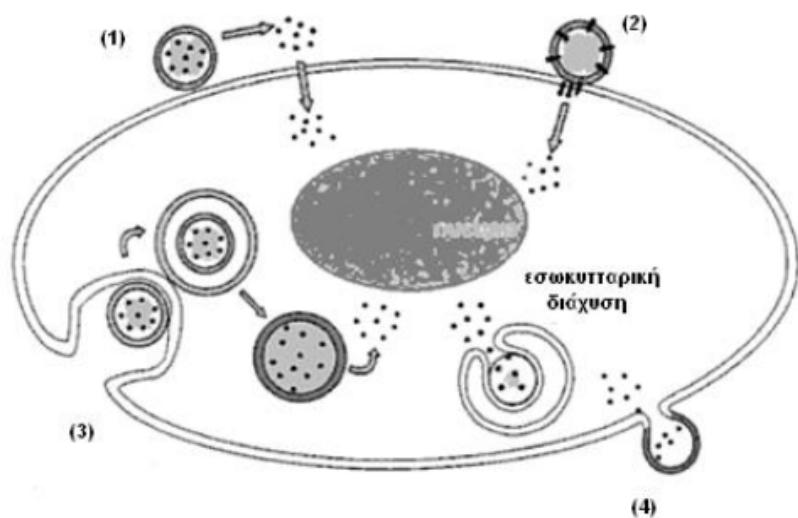
1.3.2 Βασικά χαρακτηριστικά

Για να υπάρχει χρήση των λιποσωμάτων στη διανομή φαρμάκων στους καρκινικούς ιστούς πρέπει να πληρούν τρεις βασικές προϋποθέσεις [43]:

- Παρατεταμένη κυκλοφορία στο αίμα
- Επαρκής συγκέντρωση στον όγκο
- Ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου και πρόσληψη από τα καρκινικά κύτταρα

1.3.3 Αλληλεπιδράσεις κυττάρων με λιποσώματα

Τα λιποσώματα μπορούν να απελευθερώσουν με τα κύτταρα τέσσερις μηχανισμούς. Το ποιός μηχανισμός θα κυριαρχήσει εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του λιποσώματος (σύνθεση, μέγεθος, φορτίο), από το είδος του κυττάρου καθώς και από τις συνθήκες του περιβάλλοντος (π.χ. παρουσία αίματος ή ορού) [46].



Σχήμα 1.14: Οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης των κυττάρων με τα λιποσώματα

- (1) Ανταλλαγή των συστατικών τους με τις κυτταρικές μεμβράνες, κυρίως των λιπιδίων και των πρωτεΐνών. Αυτή η ανταλλαγή συμβαίνει κυρίως μέσω συσχετιζόμενων πρωτεϊνών μεταφοράς ή χωρίς κάποια προφανή αλληλεπίδραση. Έχει βρεθεί ότι η ανταλλαγή λιπιδίων δεν εξαρτάται από την ενζυματική δραστηριότητα [47].
- (2) Προσρόφηση ή δέσιμο των λιποσωμάτων στα κύτταρα. Τα λιποσώματα προσροφώνται στην επιφάνεια των κυττάρων. Αυτό μπορεί να οδηγήσει ή να μην οδηγήσει σε άλλες αντιδράσεις. Σε κάποιες περιπτώσεις τα λιποσώματα παραμένουν προσδεμένα στην επιφάνεια χωρίς κάποια περαιτέρω μεταβολή. Η πρόσδεση στα κύτταρα χωρίς την πρόσληψη ολόκληρου του λιποσώματος μπορεί να οδηγήσει στη μεταφορά του περιεχομένου του λιποσώματος [47].
- (3) Μόλις το λιπόσωμα προσδεθεί στο κύτταρο παραιτείται κυτταρική εσωτερίκευση των λιποσωμάτων μέσω ενδοκύττωσης ή φαγοκύττωσης. Τα κύτταρα

μέσω φαγοκύττωσης προσλαμβάνουν τα λιποσώματα τα οποία καταλήγουν στα λιπίδια, όπου τα λυσοσωμικά ένζυμα τα ανοίγουν. Τα λιποσώματα, εάν έχουν το κατάλληλο μέγεθος, μπορούν να προσληφθούν μέσω ενδοκύττωσης έχοντας πρόσβαση και στα υποκυτταρικά διαμερίσματα (π.χ. Gogli) [47].

- (4) Σύντηξη του προσδεμένου λιποσώματος με τη κυτταρική μεμβράνη. Όταν το λιπόσωμα βρεθεί κοντά στη κυτταρική μεμβράνη μπορεί να οδηγήσει σε σύντηξη, όπου μπορεί να καταλήξει σε ανάμειξη της λιποσωμικής με τα λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης και απελευθέρωση του λιποσωματικού περιεχομένου στο κυτταρόπλασμα. Αυτή η αλληλεπίδραση θεωρείται σπάνια, διότι απαιτεί ειδικούς παράγοντες επαγωγής της σύντηξης [47].

1.3.4 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα

Προκειμένου η φωτοδυναμική θεραπεία να είναι αποτελεσματική πρέπει η φωτοευαίσθητη ουσία να χορηγείται σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Όμως, η αραίωση στο αίμα, ο μεταβολισμός και η πιθανή πρόσληψη της ουσίας από τους υγιείς ιστούς καθιστούν πρόβλημα, ως αποτέλεσμα την ελλιπή κατανομή τους στο επιθυμητό σημείο. Τα λιποσώματα παρέχουν ιδανικά μέσα να αντιμετωπίσουν αποτελεσματικά όλα τα πιο πάνω ζητήματα [45]. Τα χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων τους αποδίδουν μια σειρά πλεονεκτημάτων όπως:

- Τα λιποσώματα μπορεί να μεταβολίζονται *in vivo*
- Τα λιποσώματα δεν είναι τοξικά και δεν είναι αντιγονικά
- Τα λιποσώματα επιτρέπουν την επιβραδυνόμενη απελευθέρωση των φαρμάκων με χαμηλό θεραπευτικό δείκτη τροποποιώντας την φαρμακοκινητική τους
- Διευκολύνουν τη κατανομή και τη πρόσληψη σε ειδική θέση δράσης
- Τα λιποσώματα μπορούν να προστατεύσουν τα εγκλωβισμένα σε αυτά φάρμακα από την αποικοδόμηση
- Τα λιποσώματα κάνουν πολύ πιο εύκολη τη θεραπεία μειώνοντας τη συχνότητα χορήγησης του φαρμάκου
- Μπορούν να τροποποιήσουν την ιστική κατανομή του φαρμάκου με θεραπευτικό ευνοϊκό τρόπο

- Δείχνουν συμβατότητα τόσο για λιπόφιλα όσο και για υδρόφιλα φάρμακα. Δηλαδή επιτρέπουν στα υδατοδιαλυτά και μη υλικά να χρησιμοποιηθούν μαζί σε μια φαρμακοτεχνική μορφή χωρίς τη χρήση των επιφανειοδραστικών ή άλλων γαλακτωματοποιητών
- Οι λιποσωμικές επιφάνειες μπορούν να τροποποιηθούν ώστε να παρέχουν βιοπροσκόλληση, η οποία χρησιμοποιείται για να αυξηθεί ο χρόνος παραμονής σε μια συγκεκριμένη θέση
- Συμβάλλουν στη σταθεροποίηση πρωτεΐνών
- Προσφέρουν ελεγχόμενη ενυδάτωση

Ενώ τα μειονεκτήματα των λιποσωμάτων είναι [45]:

- Η υγρή κρυσταλλική τους δομή παρεμποδίζει μια πραγματική μεμβρανική μεταφορά και προκαλεί φυσική αστάθεια
- Η χωρητικότητα φόρτισης τους είναι πολύ χαμηλή
- Πιθανές αλλεργικές αντιδράσεις
- Ο πτωχός εγκλωβισμός φαρμάκων θα μπορούσε να αποτελέσει έναν περιορισμό

1.3.5 Φωτοευαίσθητες ουσίες με λιποσώματα

Δύο βασικοί σκοποί συσχετίζονται με την εισαγωγή της φωτοευαίσθητης ουσίας. Ο ένας είναι η μορφοποίηση για την κατάλληλη προετοιμασία της ενδοφλέβιας χορήγησης ενώ ο άλλος είναι η αύξηση της επιλεκτικότητας στο καρκινικό όγκο. Η φωτοευαίσθητη ουσία συνήθως έχει υδροφοβικές ιδιότητες, διότι είναι απαραίτητο για την διείσδυση της ουσίας από της κυτταρικές μεμβράνες. Επίσης, η υδροφοβικές ιδιότητες της φωτοευαίσθητης ουσίας προκαλούν προβλήματα στην παράδοση [15].

Στην φωτοδυναμική θεραπεία χρησιμοποιούνται διάφορες προσεγγίσεις για την διαμόρφωση της φωτοευαίσθητης ουσίας:

- Ενυδράκωση σε κολλοειδείς φορείς
- Συστήματα μυκηλλίων

- Λιποσώματα
- Βιοδιασπώμενα νανοσωματίδια
- Σύζευξη της φωτοευαίσθητης ουσίας με υδρόφιλα πολυμερή

Οι φωτοφυσικές ιδιότητες των πορφυρινών εξαρτώνται από την ομαδοποίηση τους. Η μονομερή πορφυρίνη παρουσιάζει φάσμα με μία έντονη ζώνη Soret ($\lambda_{max} = 390 - 415 nm$ και συντελεστή απορρόφησης $\varepsilon = 1 - 210^5 M^{-1} cm^{-1}$) και τέσσερις ασθενέστερες ζώνες (Q - ζώνες) στα 450 - 700 nm. Επίσης, παρουσιάζει σημαντική εκπομπή φθορισμού σε δύο φασματικές περιοχές (620 - 640 nm και 660 - 690 nm) όπου ο χρόνος ζωής του είναι στο εύρος 10 - 18 ns. Οι παραπάνω ιδιότητες αλλάζουν δραματικά κατά την ομαδοποίηση του. Για μεγάλες αυτο-συνδεδεμένες δομές, ο συντελεστής απορρόφησης της πορφυρίνης μειώνεται δραματικά, η ζώνη Soret μετατοπίζεται και υπάρχει μείωση στην απόδοση του φθορισμού και στην διάρκεια ζωής. Επιπλέον, η ομαδοποίηση μειώνει την απόδοση και την διάρκεια ζωής της τριπλής διεγερμένης κατάστασης, μειώνοντας με την σειρά του την απόδοση του 1O_2 σχηματισμού [4], [15].

Η βιβλιογραφία περιγράφει δύο μοντέλα ομαδοποίησης της πορφυρίνης:

- face - to - face ομαδοποίηση (H - ομαδοποίηση)
- edge - to - edge ομαδοποίηση (J - ομαδοποίηση)

Υπάρχουν τρείς κύριες επιδράσεις των λιποσωμάτων στις φωτοευαίσθητες ουσίες.

Επίδραση του μονομερισμού

- Ο μονομερισμός των επιβαριμένων υδρόφοβων φωτοευαίσθητοποιήτων εμφανίζεται ως αποτέλεσμα των μορίων της φωτοευαίσθητης ουσίας στο εσωτερικό των υδρόφοβων διπλοστιβάδων.

Επίδραση της συγκέντρωσης

- Η τοπική συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας μέσα στη φυσαλίδα είναι μεγαλύτερη σε σχέση με το διαλυτικό μέσο, κατά αρκετές τάξεις μεγέθους. Η υψηλή τοπική συγκέντρωση μπορεί να οδηγήσει σε μία δομικά ελεγχόμενη διαδικασία ομαδοποίησης των λιποσωματικών διπλοστιβάδων.

Επίδραση του ιξώδες

- Η φωτοευαίσθητη ουσία βρίσκεται σε ένα δομημένο μικροπεριβάλλον μετά την ενσωμάτωση της σε λιποσωματική διπλοστιβάδα. Η αυξημένη ρευστότητα επιβραδύνει τις μετακινήσεις των μορίων που βρίσκονται στο εσωτερικό της λιποσωματικής διπλοστιβάδας και όλες οι συγκρουόμενες διαδικασίες των διεγερμένων καταστάσεων περιορίζουν την διάδοση.

Η λιπιδική διπλοστιβάδα είναι μια σύνθετη δομή που αποτελείται από αμφιφιλικά μόρια και οι δεσμοί της φωτοευαίσθητης ουσίας προέρχονται από ενώσεις υδροφοβικών και ηλεκτρικών αλληλεπιδράσεων. Οι δεσμοί της φωτοευαίσθητης ουσίας επιρεάζονται επίσης από τον υδροφοβικό/υδροφιλικό χαρακτήρα του περιβάλλοντα μέσου και από την παρουσία των ηλεκτροστατικά φορτισμένων διασυνδέσεων. Οι υδροφοβικές φωτοευαίσθητες ουσίες μπορούν να διεισδύσουν στη λιπιδική διπλοστιβάδα ενώ οι υδροφιλικές φωτοευαίσθητες ουσίες συνήθως βρίσκονται στην επιφάνεια των λιποσωμάτων ή σε ένα ενδολιποσωματικό υδάτινο περιβάλλον κοντά στις πολικές περιοχές, αντιδρώντας ασθενών με την υδροφιλική περιοχή των λιποσωμάτων. Τα υδρόφοβα τμήματα των αμφιφιλων φωτοευαίσθητοποιητών βρίσκονται σε μικροπεριβάλλον χαμηλής πολικότητας ενώ τα φορτισμένα επιφανειακά υποστρώματα είναι προσανατολισμένα προς τις πολικές περιοχές των μοριακών λιπιδίων [15].

1.3.6 Φυσικές ιδιότητες

Οι φωτοφυσικές ιδιότητες και η παραγωγή του 1O_2 είναι ευαίσθητες στο διεπιφανειακό χαρακτήρα των συγκεκριμένων μικροτομών που φιλοξενούν τη φωτοευαίσθητη ουσία. Η εκτίμηση των φωτοφυσικών και φωτοχημικών παραμέτρων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εντόπιση της φωτοευαίσθητης ουσίας και για την διερεύνηση της γύρω περιοχής. Μετά την ενσωμάτωση της φωτοευαίσθητης ουσίας σε λιποσώματα τα αντίστοιχα φάσματα απορρόφησης και εκπομπής φθορισμού μετατοπίζονται προς το κόκκινο και η ένταση φθορισμού αυξάνεται. Αυτή η φασματοσκοπική αλλαγή βοηθάει στη πρόσληψη της φωτοευαίσθητης ουσίας και στην κατανομή της σε λιποσώματα [15]. Συνήθως, στην αματοπορφυρίνη εμφανίζεται μετατόπιση της απορρόφησης και της εκπομπής προς το ερυθρό περίπου 10 - 20 nm (max), μετά την ενσωμάτωση της σε μια λιποσωμική μήτρα [15].

Η ενσωμάτωση του ευαισθητοποιητή της παρφυρίνης σε διπλοστιβάδα λιπιδίων επηρεάζει τη διαμορφωτική δυναμική του μορίου στη θεμελιώδη κατάσταση και διεγέρεται στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση. Αυτές οι αλλαγές επηρεάζουν τη μετατόπιση Stokes, δηλαδή η ενεργειακή διαφορά μεταξύ της απορρόφησης και της εκπομπής σε χαμηλά δονητικά επίπεδα της θεμελιώδη και της πρώτης διεγερμένης κατάστασης [15].

Ωστόσο, επειδή η παραγωγή του 1O_2 σε φωτοευαίσθητες ουσίες με λιποσώματα ελέγχεται από πολλούς παράγοντες, ενεργώντας συχνά ο ένας εναντίον του άλλου, η συνολική επίδραση των λιποσωμάτων στην κβαντική απόδοση για τον σχηματισμό του μονατομικού οξυγόνου δύσκολα μπορεί να γενικευθεί [48].

Μια ασυνήθιστη αύξηση της κβαντικής απόδοσης του σχηματισμού μονατομικού οξυγόνου στην παρουσία των λιποσωμάτων μπορεί να αποδοθεί στην επίδραση μονομερισμού των κυστιδίων. Ενώ, η μείωση της κβαντικής απόδοσης του σχηματισμού μονατομικού οξυγόνου μπορεί να αποδοθεί σε συνάθροιση που εμφανίζεται σε λιποσώματα λόγω της επίδρασης της συγκέντρωσης [4].

Μετά το σχηματισμό του 1O_2 , μπορεί και διαχέεται ελεύθερα μεταξύ των λιπιδικών και των υδατικών φάσεων. Η ισορροπία του 1O_2 μεταξύ της λιποσωματικής διπλοστιβάδας και της υδατικής φάσης επιτυγχάνεται πριν την διάσπαση του 1O_2 , το οποίο βρίσκεται κυρίως στην υδατική φάση. Ο χρόνος ζωής του 1O_2 είναι διαφορετικός στις δύο φάσεις διότι ο όγκος των λιπιδίων αντιπροσωπεύει ελάχιστο ποσοστό του συνολικού όγκου. Ο χρόνος ζωής του 1O_2 είναι ουσιαστικά ανεξάρτητα από τον εντοπισμό του ευαισθητοποιητή [15].

1.3.7 Λιποσωματιδιακοί σχηματισμοί της mTHPC

Οι κλινικές εφαρμογές της mTHPC στην φωτοδυναμική θεραπεία παρουσιάζουν αρκετές δυσκολίες λόγω της υψηλής υδροφιβικής ιδιότητας αυτής της φωτοευαίσθητης ουσίας. Για την αντιμετώπιση του παρόντος προβλήματος και τη βελτίωση της φωτοδυναμικής θεραπείας, πολλά διαφορετικά συστήματα διανομής έχουν σχεδιαστεί. Μεταξύ αυτών διακρίνονται κάποια με φολικό οξύ, nanoemulsions (για τη θεραπεία καρκίνου του δέρματος), PEGylated mTHPC, λιποσώματα σχηματιζόμενα από DMPC/ Gemini surfactant, κατιονικά λιποσώματα και πολλά εμπορικά λιποσωματιδιακά σκευασμάτα, όπως και Foslip και Fospeg. Η φωτοευαίσθητη ουσία Foslip είναι μια πρόσφατα σχεδιασμένη τρίτης γενιάς φωτοευαίσθητη ουσία με βάση τα dipalmitoylphosphatidylcho-

line/dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPC / DPPG) λιποσωμαδιακά σκευάσματα της mTHPC. Η φωτοευαίσθητη ουσία Fospeg είναι μια σταθεροποιημένη μορφή της Foslip, η οποία επιπλέον περιέχει μικρή ποσότητα PEG-phosphatidylethanolamine [49], [15].

Αρκετές μελέτες έχουν αφιερωθεί στη διερεύνηση των ιδιοτήτων των λιποσωμικών σχηματισμών της mTHPC. Η ομάδα του Buchholz πραγματοποίησε συγχριτικές μελέτες για την mTHPC με λιποσωματικούς σχηματισμούς της (Fospeg), σε αιλουροειδές ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος και για την φαρμακοκινητικότητα του πλάσματος. Οι συγγραφείς απέδειξαν ότι οι εντάσεις φθορισμού και ο δείκτης φθορισμού (όγκος / δέρμα) ήταν 2 έως 4 φορές υψηλότερες για τις λιποσωματιδιακές μορφές της mTHPC. Επίσης, η μέγιστη ένταση φθορισμού του όγκου φάνηκε να πραγματοποιείται 5.5 φορές νωρίτερα με την φωτοευαίσθητη ουσία Fospeg. Μια άλλη πρόσφατη έρευνα μελέτησε τις φωτοκινητικές ιδιότητες της Foslip από 2 έως 8 ώρες μετά από ενδοφλέβια χορήγηση της φωτοευαίσθητης ουσίας. Η μελέτη αυτή έδειξε μια ταχεία κάθαρση από το πλάσμα και μία κατά μέσο όρο αναλογία όγκου / μυών 6.6 σε ένα μοντέλο με καρκινικό όγκο σε αρουραίο [15].

Η ομάδα του Pegaz μελέτησε την ικανότητα του mTHPC σε λιποσωματικούς σχηματισμούς (Fospeg) για την απόφραξη των νεοαγγείων και έδειξαν ότι η Foslip φαίνεται να είναι λιγότερη ισχυρή από ότι η Fospeg όσον αφορά τη φωτοθραυμβική δραστηριότητα τους σε νεοσσό χοριοαλλαντοική μεμβράνη. Δηλαδή, η δόση ακτινοβολίας της Foslip ήταν δύο φορές μεγαλύτερη από την Fospeg για να προκληθεί η επιθυμητή αγγειακή βλάβη. Μπορεί να προκύψει ότι ο σχηματισμός της φωτοευαίσθητης ουσίας που βασίζεται στη τεχνολογία των PEGylated λιποσωματιδιων προσφέρει ένα κατάλληλο σύστημα παροχής για τη θεραπεία της χοριοειδικής νεοαγγείωσης που σχετίζεται με την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας [48], [15].

2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός της πειρατικής μελέτης

Στη συγκεκριμένη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες καρκινικών κυτταρικών σειρών. Διαλέχθηκε αυτή η μέθοδος μελέτης διότι καθιστά την πειραματική διαδικασία περισσότερο ελέγχιμη, όπως επαναληψιμότητα ή αύξηση πολυπλοκότητας, λόγο του γεγονότος ότι δεν εμπλέκεται ζωντανός οργανισμός, πειραματόζωα. Επίσης, στις μελέτες που χρησιμοποιούν κυτταρικές σειρές επηρεάζονται από λιγότερες μεταβλητές σε σχέση με τις μελέτες σε πειραματόζωα και με αυτό το τρόπο μπορούμε να μελετήσουμε ξεχωριστά κάθε μηχανισμό. Ένας ακόμα σημαντικός λόγος που προτιμήθηκαν οι κυτταρικές σειρές είναι ότι η χρήση των πειραματόζωων τείνει να είναι απαγορεύσιμη.

Αρκετές φωτοευαίσθητες ουσίες χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία, οι οποίες διαφέρουν σε αρκετά χαρακτηριστικά τους. Παρατηρούνται αμέτρητες μελέτες για τα χαρακτηριστικά της φωτοευαίσθητης ουσίας όμως ελάχιστες έρευνες ασχολούνται με τη σύγκριση αυτών σε καρκινική κυτταρική σειρά ώστε να συμβάλει στην επιλογή της βέλτιστης φωτοδραστικής ουσίας για συγκεκριμένες εφαρμογές. Η επιλογή της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι μία σημαντική απόφαση για κάθε περίπτωση, καθώς επηρεάζει άμεσα την θεραπεία και την ποιότητα ζωής του ασθενή. Η ποιότητα ζωής στους ασθενείς μπορεί να επηρεαστεί με την εμφάνιση της φωτοευαίσθησίας μετά την φωτοδυναμική θεραπεία. Αν όμως μειωθεί η δόση της φωτοευαίσθητης ουσίας που χορηγείται και αυξηθεί η ταχύτητα της αποβολής της από τον οργανισμό μειώνεται ο κίνδυνος της φωτοευαίσθησίας, διότι μικρότερη ποσότητα θα κατακρατείται από τα κύτταρα.

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία ο σκοπός είναι η συγκριτική μελέτη της αποδέσμευσης από κύτταρα καρκινικής σειράς του προστάτη LNCaP της ελεύθερης και της εγκλεισμένης λιποσωμιακής μορφής της m-TLPC (foscanc και fospeg αντίστοιχα). Το πείραμα της συγκεκριμένης εργασίας προσδιορίζει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας σαν συνάρτηση του χρονικού διαστήματος μετά από την

απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας από την καρκινική σειρά με αρχικές συγκεντρώσεις 0.15 μ g/ml και 1.2 μ g/ml και την μεταξύ τους σύγκριση.

2.2 Πειραματικές Διατάξεις

Σε αυτό το κεφάλαιο θα περιγράψουμε όλες τις πειραματικές διατάξεις που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη διπλωματική εργασία.

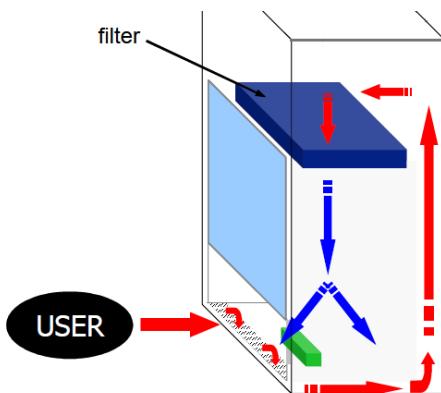
2.2.1 Αεραγωγός

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μια ευρεία ποικιλία εφαρμογών, όπως εξετάσεις στειρότητας, καλλιέργεια κυττάρων, μοριακή βιολογία, προετοιμασία των ναρκωτικών, βιομηχανία τροφίμων και συναρμολόγηση οπτικών και ηλεκτρονικών εξαρτημάτων. Προφανώς σε αυτή την πειραματική διάταξη χρησιμοποιούμε τον αεραγωγό για τη καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων.



Σχήμα 2.1: Αεραγωγός

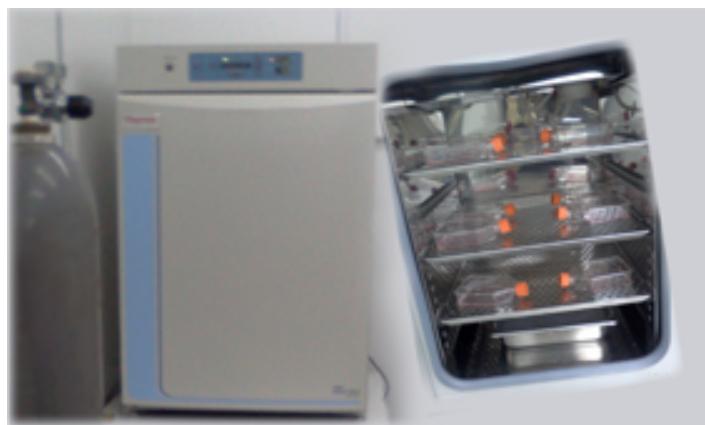
Στο παρακάτω σχήμα μπορούμε να δούμε τη ροή του αέρα, όπου το μπλε χρώμα είναι ο καυθαρός αέρας ενώ το κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύει το μη φιλτραρισμένο αέρα. Ο αέρας εισέρχεται στο χώρο της καμπίνας μέσω της σχισμής και μεταφέρεται από το πίσω μέρος της σε ειδικά φίλτρα. Αφού ο αέρας έχει επεξεργαστεί μέσω των φίλτρων εισέρχεται στην εργαζόμενη περιοχή. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται καθ' όλη τη διάρκεια λειτουργίας του αεραγωγού.



Σχήμα 2.2: Η ροή του αέρα στον αεραγωγό

2.2.2 Κλίβανος

Για την καλλιέργεια των κυττάρων πρέπει τα κύτταρα να τοποθετούνται σε ειδικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας, θερμοκρασία του σώματος 36 – 37°C, ο οποίος τροφοδοτείται με αέριο διοξείδιο του άνθρακα σε ποσοστό 5%. Η παρουσία του αερίου (διοξείδιο του άνθρακα) βοηθάει στη διατήρηση του PH. Επίσης, για την αποφυγή μολύνσεων μέσα στο κλίβανο είναι απαραίτητη η τοποθέτηση νερού με άλας, όπου τοποθετείται στο κάτω μέρος του κλιβάνου μέσα σε ένα ανοιχτό δοχείο.



Σχήμα 2.3: Κλίβανο

Για λόγους ασφάλειας ο κλίβανος είναι συνδεδεμένος με UPS (Uninterruptible Power Supply - Αδιάλειπτη Παροχή Ενέργειας), δηλαδή μόλις σταματήσει η παροχή

ρεύματος η συσκευή συνδέεται αυτόματα με τη γεννήτρια.

2.2.3 Καταψύκτης

Για τη διαδικασία της κατάψυξης των κυττάρων, πριν τα κύτταρα εισέλθουν στο υγρό άζωτο, τοποθετούνται στο καταψύκτη για 24 ώρες, μέσα σε θήκη από φελιζόλ, ώστε να ρυθμιστεί σταδιακά η θερμοκρασία του στους -80°C , χωρίς να προκληθούν προβλήματα, όπως σοκ.



Σχήμα 2.4: Καταψύκτης σε θερμοκρασία -80°C

Επίσης για την συντήρηση των ουσιών που χρησιμοποιούνται σε αυτήν την διπλωματική εργασία χρησιμοποιήσαμε και τους καταψύκτες σε θερμοκρασία -20°C και $4 - 8^{\circ}\text{C}$, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Σχήμα 2.5: (Αριστερά): Ψυγείο σε θερμοκρασία $4 - 8^{\circ}\text{C}$
 (Δεξιά): Καταψύκτης σε θερμοκρασία -20°C

2.2.4 Δοχείο υγρού αζώτου

Η διατήρηση των κυττάρων γίνεται στο υγρό αζώτο. Είναι ένα απλό θερμομονωτικό δοχείο, το οποίο περιέχει θήκες που τοποθετούνται τα φιαλίδια με τα κύτταρα.

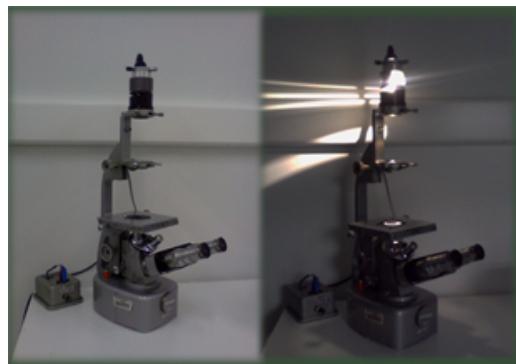
2.2.5 Μικροσκόπιο

Το μικροσκόπιο είναι το όργανο που μπορεί να παρατηρηθούν μικροσκοπικά αντικείμενα. Είναι ένα όργανο γνωστό για τους περισσότερους ανθρώπους. Ανάλογα με τους φακούς που χρησιμοποιηθούν έχουμε και την αντίστοιχη μεγέθυνση του αντικειμένου. Η μεγέθυνση ενός μικροσκοπίου μπορεί να υπολογιστεί από τον ακόλουθο τύπο:

$$M = m_1 m_2 \quad (2.1)$$

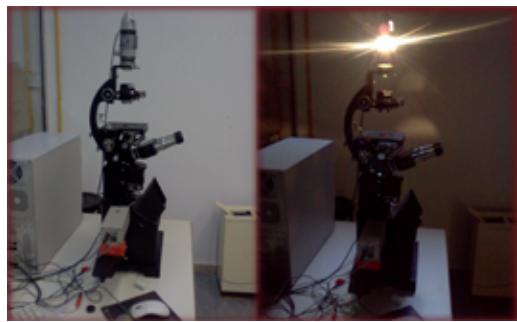
όπου m_1 και m_2 είναι οι εγκάρσιες μεγεθύνσεις του προσοφθάλμιου φακού και του αντικειμενικού φακού, αντίστοιχα.

Όπως μπορούμε να παρατήσουμε οι φακοί που χρησιμοποιούνται στο μικροσκόπιο είναι ανάλογοι της μεγέθυνσης, αλλά προφανώς η μεγέθυνση δεν προσφέρει μεγαλύτερη ευχρίνεια του αντικειμένου.



Σχήμα 2.6: Μικροσκόπιο

Για τη μελέτη κυτταρικών καλλιεργειών χρησιμοποιείται ανάστροφο μικροσκόπιο. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να προσκολλούνται στο πυθμένα της φλάσκας, όπου καλλιεργούνται, με αποτέλεσμα να γίνονται ορατά με το ανάστροφο μικροσκόπιο. Τα μικροσκόπια που χρησιμοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας ήταν ένα απλό (εικόνα (2.6)) και ένα συνδεδεμένο με μία Camera CCD (εικόνα (2.7)), με τη βοήθεια ενός κατάλληλου λογισμικού μπορούσαμε να λαμβάνουμε εικόνες των κυττάρων.



Σχήμα 2.7: Μικροσκόπιο

2.2.6 Φυγοκέντρηση

Η φυγοκέντρηση χρησιμοποιείται κυρίως στους τομείς της βιολογίας, της κυτταρικής και μοριακής βιοχημείας και της ιατρικής. Χρησιμοποιείται για την απομόνωση των κυττάρων και των μακρομορίων από κάποιο διάλυμα με βάση την φυγόκεντρο δύναμη. Θα χρησιμοποιήσουμε απλή συσκευή φυγοκέντρησης με χαμηλή ταχύτητα περιστροφής και ο ρότορας διαθέτει ταλαντευόμενες θέσεις, δηλαδή όταν περιστρέφονται σε οριζόντια θέση κατά την φυγοκέντρηση.

Παρατηρούμε ότι η φυγόκεντρος διαχωρίζεται σε 2 περιοχές ίσης απόστασης από τον άξονα περιστροφής, στις οποίες μπορούμε να τοποθετήσουμε τα διαλύματα. Πρέπει να λάβουμε υπόψη με ιδιαίτερη προσοχή τη δυναμική ισορροπία. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πρέπει να είναι τοποθετημένες στη φυγόκεντρο αντισυμετρικά με ίσους όγκους. Έτσι ώστε, να διασφαλιστεί το ίδιο βάρος και στις δύο πλευρές. Όταν παραβιάζεται η παραπάνω ισορροπία παρατηρούνται ταλαντώσεις της φυγόκεντρου πολύ μικρού πλάτους. Εφόσον τα κύτταρα έχουν πακτωθεί αρκετά η αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος όταν πραγματοποιηθεί με προσεκτική απόχυση. Αυτό επιτυγχάνεται με σταθερή αύξηση της γωνίας του δοκιμαστικού σωλήνα από το επίπεδο του εδάφους. Αν όμως τα κύτταρα δεν έχουν πακτωθεί αρκετά, η αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος

Θα πραγματοποιηθεί με χρήση πιπέτας. Τοποθετούμε την πιπέτα στο κάτω όριο του υπερκείμενου διαλύματος κατά μήκος του δοκιμαστικού σωλήνα και αφαιρείται με μικρό και σταθερό ρυθμό.

Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης τα κύτταρα περιστρέφονται με γωνιακή ταχύτητα ω (r/s) και φυγόκεντρο δύναμη είναι:

$$F_c = mw^2r \quad (2.2)$$

όπου m : μάζα του κυττάρου και r : η απόσταση του από τον άξονα περιστροφής. Παρατηρούμε ότι η φυγόκεντρος δύναμη είναι ανάλογη της ακτίνας, της μάζας και του τετραγώνου της γωνιακής ταχύτητας.

Το κύτταρο εκτοπίζει κάποια μάζα διαλύματος, ασκώντας μια δύναμη:

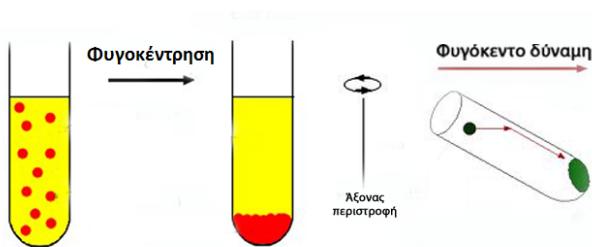
$$F_c^1 = -m_0w^2r \quad (2.3)$$

όπου m_0 : μάζα του εκτοπιζόμενου διαλύματος.

Τέλος, έχουμε τη δύναμη της τριβής που ασκείται στο κύτταρα κατά την κίνηση του μέσα στο υγρό λόγω ιξώδες. Η δύναμη της τριβής είναι:

$$F_f = -fu \quad (2.4)$$

όπου f : ο συντελεστής τριβής και u : η ταχύτητα του κυττάρου, όπου εξαρτάται από τη βαρυτική δύναμη, τη πυκνότητα, το μέγεθος και το σχήμα του.



Σχήμα 2.8: Φυγοκέντρηση

Εφόσον η συνισταμένη δύναμη μηδενίζεται (δεύτερος νόμος του Νεύτωνα) προκύπτει ο συντελεστής καθίζησης:

$$S = \frac{u}{w^2 r} = \frac{V(p - p_0)}{f} \quad (2.5)$$

Μπορεί να παρατηρηθεί εύκολα ότι ο συντελεστής καθίζησης είναι αντιστρόφως ανάλογος με τον συντελεστή τριβής. Έχει ως μονάδα μέτρησης το χρόνο (sec), η πιο συνηθισμένη μονάδα μέτρησης είναι η μονάδα του Svedberg S ($= 10^{-13}$)

2.2.7 Συνθήκες αποστείρωσης

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας του πειράματος πρέπει να εξασφαλιστεί η καθαριότητα του χώρου και του κάθε εργαλείου που χρησιμοποιείται, όπως και η ασφάλεια του εργαζομένου. Δεν είναι επιθυμητό η ανάπτυξη βακτηρίων ή διαφόρων μικροοργανισμών στο χώρο του εργαστηρίου, διότι θα μολυνθεί ο χώρος και κατά συνέπεια θα επηρεάσει την καλλιέργεια των κυττάρων.

Για αυτό το λόγο έχουν εγκατασταθεί στο εργαστήριο λάμπες UV, έτσι ώστε να επιτυγχάνουμε την απαλλαγή των μικροβίων. Είναι γνωστό ότι η ακτινοβολία UV σταματάει την ανάπτυξη των βακτηρίων. Πρέπει να τονίσουμε ότι η υπεριώδης ακτινοβολία δεν καταστρέψει τους μικροοργανισμούς, αλλά ένα τμήμα του DNA στο οποίο οφείλεται η αναπαραγωγή του. Η υπεριώδης ακτινοβολία απορροφάται σχεδόν πλήρως από το νουκλεϊκό οξύ του μικροοργανισμού και επηρεάζει τους ομοιοπολικούς δεσμούς. Η υπεριώδης ακτινοβολία δεν έχει απολυμαντική δράση για αυτό πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους απολύμανσης. Αυτή η τεχνολογία είναι πολύ

αποτελεσματική για την αναστολή της ανάπτυξης των βακτηριδίων.

Η υπεριώδης ακτινοβολία είναι επιβλαβής για τον άνθρωπο, στο δέρμα και στον οφθαλμό. Συγκεκριμένα μπορεί να προκαλέσει εγκαύματα και διαχρονικά χαρκίνο του δέρματος. Επίσης, μπορεί να παράγει εξαιρετικά επώδυνη φλεγμονή του κερατοειδούς χιτώνα και να βλάψει τον αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού, όπου μπορεί να οδηγήσει σε προσωρινή ή μόνιμη βλάβη της όρασης. Για αυτό το λόγο θα πρέπει να είμαστε προσεκτικοί και να αποφεύγουμε την ακτινοβόληση σε υπεριώδες ακτινοβολίες.

Οι λάμπες UV είναι εγκατεστημένες στο ταβάνι του εργαστηρίου, ώστε να μπορούν να ακτινοβολήσουν όλο το χώρο του εργαστηρίου. Ο διακόπτης λειτουργίας βρίσκεται εξωτερικά, δίπλα από την πόρτα. Ενώ, πάνω από αυτήν βρίσκεται μια λάμπα επιβεβαίωσης, όπου είναι ανοιχτή εφόσον ο χώρος ακτινοβολείται από υπεριώδη ακτινοβολία, με αυτό το τρόπο μπορούμε να γνωρίζουμε αν είναι ανοιχτές ή όχι οι λάμπες UV πριν εισέλθουμε στο χώρο του εργαστηρίου. Επίσης, για λόγους ασφάλειας η υπεριώδης ακτινοβολία σταματάει μόλις ενεργοποιήσουμε τη τεχνητή πηγή φωτός.

Επίσης, λάμπα UV έχει τοποθετηθεί στον αεραγωγό με εξωτερικό χρονοδιακόπτη, έτσι ώστε να υπάρχει μέγιστη αποστείρωση του αεραγωγού και οποιοδήποτε εργαλείο, όπως pipetas, tubes, tips κ.α.



Σχήμα 2.9: Ο αεραγωγός με ενεργή λάμπα UV

Εκτός από την υπεριώδη ακτινοβολία χρησιμοποιούμε και διάλυμα ($\simeq 70\%$ ισοπροπανόλη και $\simeq 30\%$ απιονισμένο νερό) για την καταστροφή διάφορων μικροοργανισμών. Η δράση της αυξάνεται με την αύξηση των ανθράκων που περιέχει η αλυσίδα, η μέγιστη τιμή είναι 6 άνθρακες. Η δράση της ισοπροπανόλης είναι η καταστροφή διαφόρων

μικροβίων, αρχικά με την λύση της κυτταρικής μεμβράνης προκαλώντας μετουσίωση των πρωτεΐνών και τελικά κυτταρικό θάνατο.

Στο τέλος θα ήθελα να αναφέρω κατά την διάρκεια του πειράματος οι εργαζόμενοι χρησιμοποίησαν γάντια, μάσκες και ποδιές για την επιθυμητή ασφάλεια τους.

2.2.8 Μέτρηση Κυττάρων

Το αιμοκυτταρόμετρο αναπτύχτηκε για την καταμέτρηση των κυττάρων του αίματος. Αποτελείται από 2 ίδια τμήματα, όπου κάθε τμήμα έχει μικροσκοπικό πλέγμα χαραγμένο στην επιφάνεια του γυαλιού. Το σχήμα του πλέγματος αποτελείται ένα τετράγωνο, όπου στην περιφέρεια του υπάρχουν 3 διαδοχικές σχισμές, με 9 μικρά τετράγωνα, ας τις ονομάσουμε πλατείες. Οι 4 πλατείες στις γωνίες αποτελούνται από σχισμές όπου σχηματίζουν 16 κελιά, ενώ τα υπόλοιπα 5 αποτελούνται από πιο πυκνές σχισμές, κάθετες και παράλληλες αναμεταξύ τους. Η μεσαία πλατεία αποτελείται από 25 κελιά όπου κάθε κελί περιέχει 16 μικρότερα κελιά.

Για την προετοιμασία της μέτρησης πρέπει να καθαριστεί καλά, με ισοπροπανόλη και χαρτί, η επιφάνεια του αιμοκυτταρομέτρου και η επιφάνεια που θα καλύψει το αιμοκυτταρόμετρο. Η επιφάνεια που καλύπτει το όργανο εισάγεται πριν τη τοποθέτηση των κυττάρων. Η εισαγωγή των κυττάρων γίνεται μέσο πιπέτας στα ακριανά σημεία (ανάμεσα από την επιφάνεια του αιμοκυτταρομέτρου και την επιφάνεια που καλύπτει το αιμοκυτταρόμετρο), συγκεκριμένα τοποθετούμε 9 ml από το αραιωμένο διάλυμα. Η καταμέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται μέσο μικροσκοπίου, όπου παίρνουμε την μέση τιμή. Κάθε πλατεία έχει εμβαδό 1 mm^2 και βάθος 0.1 mm. Από τα προηγούμενα προκύπτει ότι, ο συνολικός όγκος μίας πλατείας είναι 0.1 mm^3 ή 10^{-4} cm^3 . Γνωρίζουμε ότι $1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml}$, επομένως, η συγκέντρωση κυττάρων ανά ml μπορεί να καθοριστεί [50].

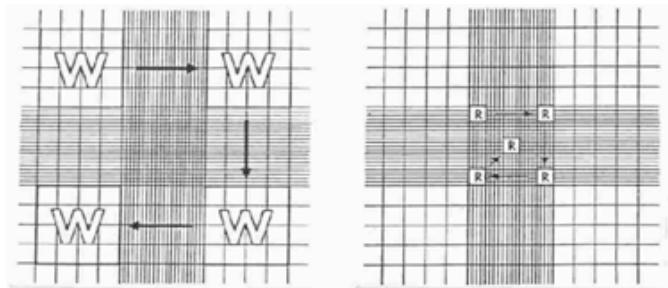
Υπάρχουν 2 τρόποι καταμέτρησης:

I)

Μετράμε τον αριθμό των κυττάρων στη μεσαία πλατεία από τα τέσσερα γωνιακά μικρά κελιά και από το μεσαίο μικρό κελί. Υπολογίζουμε το μέσο όρο τους. Επομένως, η συγκέντρωση των κυττάρων ανά 1 ml = Μέσο όρο των κυττάρων $\times 2.000$ [51], [52].

II)

Μετράμε τον αριθμό των κυττάρων στις τέσσερις γωνιακές πλατείες και υπολογίζουμε το μέσο όρο τους. Η συγκέντρωση των κυττάρων ανά 1 ml = Μέσο όρο των κυττάρων $\times 10.000$. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία [50], [52].

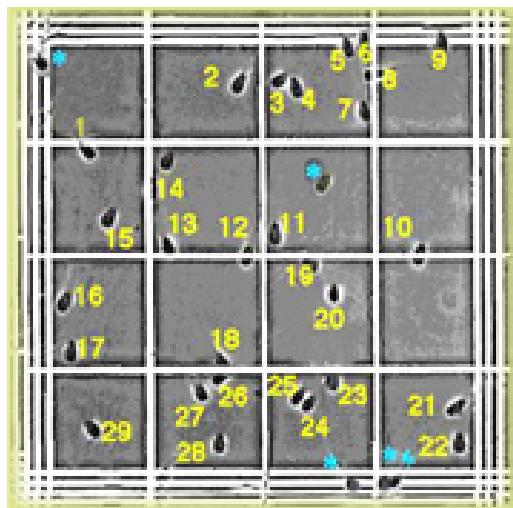


Σχήμα 2.10: Το μικροσκοπικό πλέγμα του αιμοκυτταρομέτρου

Πρέπει να δώσουμε ιδιαίτερη προσοχή, ώστε το διάλυμα που θα προστεθεί στο αιμοκυτταρόμετρο να είναι αρκετά αραιό για την αποφυγή πιθανών επικαλύψεων των κυττάρων και προφανώς να είναι ομοιόμορφο ώστε να έχουμε όσο το δυνατόν μικρότερο σφάλμα στη μέτρηση.

Επίσης, πρέπει να λάβουμε υπόψην μας πια κύτταρα δεν θα υπολογιστούν στην μέτρηση:

- Τα νεκρά κύτταρα.
- Συσσωματώματα
- Όσα κύτταρα έρχονται σε επαφή με το κεντρικό σταυρό
- Όσα κύτταρα βρίσκονται έξω από τις πλατείες και δεν ακουμπούν τις 3 διαδοχικές σχισμές στην περιφέρεια του τετραγώνου.



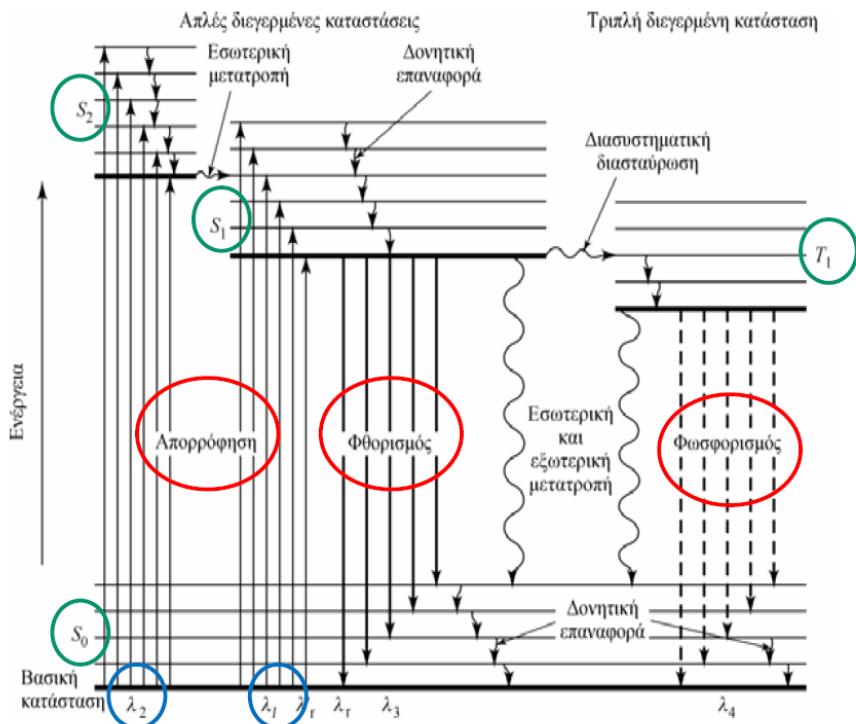
Σχήμα 2.11: Παράδειγμα μέτρησης των κυττάρων μέσο του αιμοκυτταρομέτρου

2.2.9 Φασματοσκοπία φθορισμού

Φθορισμό ονομάζουμε την εκπομπή του φωτός, συγκεκριμένου μήκους κύματος, από μία ουσία που έχει απορροφήσει κάποια δέσμη φωτός ή ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, διαφορετικού μήκους κύματος. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το εκπεμπόμενο φως έχει μεγαλύτερο μήκος κύματος (χαμηλότερη ενέργεια) από την απορροφούμενη ακτινοβολία. Δηλαδή, η φασματοσκοπία φθορισμού διεγείρει τα ηλεκτρόνια των μορίων προκαλώντας εκπομπή φωτός [12].

Ο φθορισμός είναι πολύ χρήσιμος για την αναγνώριση ουσιών, καθώς κάθε φθορίζουσα ουσία φθορίζει σε διαφορετικό μήκος κύματος. Ακριβώς για αυτό το λόγο χρησιμοποιούμε σε αυτή την εργάσια τη φασματοσκοπία φθορισμού, για να εντοπιστεί η συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας στα κύτταρα.

Με την απορρόφηση ακτινοβολίας κοντά στο μήκος κύματος λ_1 και λ_2 (εικόνα (;;)) προκαλείται η διέγερση του μορίου. Ός αποτέλεσμα έχει τη μετάβαση του ηλεκτρονίου από τη βασική κατάσταση σε οποιαδήποτε διεγερμένη δονητική κατάσταση. Η απευθείας μετάβαση του ηλεκτρονίου στη τριπλή κατάσταση είναι σχεδόν αδύνατη. Ο φθορισμός προκαλείται επειδή το ηλεκτρόνιο πάντα επιστρέφει σε οποιοδήποτε δονητικό επίπεδο της βασικής κατάστασης. Η ενέργεια του φωτονίου που εκπέμπεται ορίζεται από την ενεργειακή διαφορά της διεγερμένης δονητικής κατάστασης και του δονητικού επιπέδου της βασικής κατάστασης [13].



Σχήμα 2.12: Οι ενεργειακές μεταβάσεις

Κβαντική απόδοση

Φ : Απόδοση φθορισμού = (Αριθμός μορίων που προκαλούν φθορισμό) / (Συνολικός αριθμός των διεγερμένων μορίων)

Εάν $\Phi = 1$ έχουμε μόρια με υψηλά επίπεδα φθορισμού,
ενώ αν $\Phi = 0$ έχουμε μόρια με χαμηλά επίπεδα φθορισμού

Παράμετροι που επηρεάζουν το φθορισμό

- Η ένταση του φθορισμού (F) είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη θερμοκρασία. Η θερμοκρασία προκαλεί αύξηση της κινητικότητας, επομένως αύξηση των κρούσεων, αυτό μας οδηγεί στην αύξηση της πιθανότητας αποδιέγερσης με εξωτερική μετατροπή.
- Η ένταση του φθορισμού είναι αντιστρόφως ανάλογη με το ιξώδες του διαλύτη, λόγω αύξηση της πιθανότητας αποδιέγερσης με εξωτερική μετατροπή.

- Παρατηρούμε μείωση της έντασης του φθορισμού στη παρουσία του διαλυμένου οξυγόνου στον διαλύτη.
- Επίσης, παρατηρούμε μείωση της έντασης του φθορισμού σε διαλύτες με βαρέα άτομα.
- Τέλος, η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη με την ισχύ της ακτινοβολίας που απορροφάται από το σύστημα.

$$F = K'(P_0 - P) \quad (2.6)$$

όπου K' : σταθερά που εξαρτάται από τη κβαντική απόδοση,
 P_0 : η ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας,
 P : η ισχύς της εξερχόμενης ακτινοβολίας

Από το νόμο του Beer προκύπτει η σχέση της έντασης του φθορισμού (F) συνάρτηση της συγκέντρωσης στης φθορίζουσας ουσίας:

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-ebc} \quad (2.7)$$

όπου e: γραμμοριακή απορροφητικότητα,
b: πάχος του υλικού,

$$(2.6) \xrightarrow{(2.7)} F = K'P_0(1 - 10^{-ebc}) \xrightleftharpoons{\text{Maclaurin Series}}$$

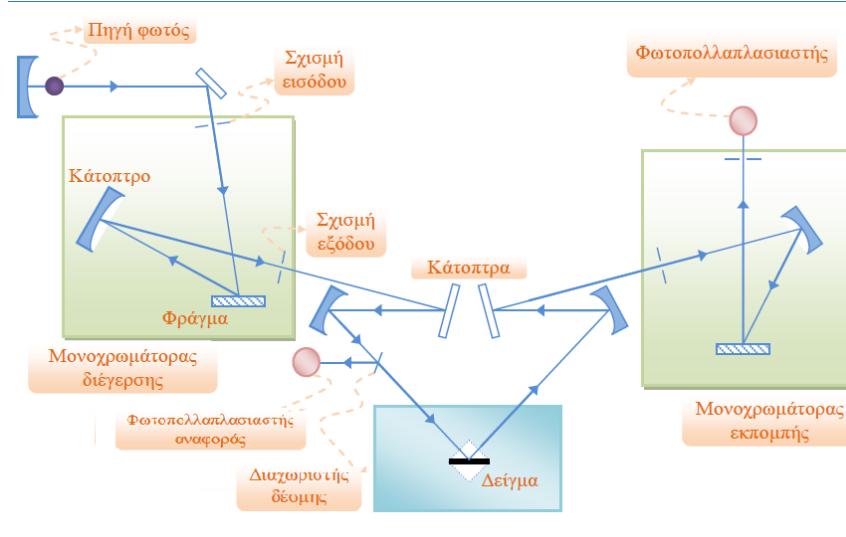
$$F = K'P_0\left(2.3ebc - \frac{(2.3ebc)^2}{2!} + \frac{(2.3ebc)^3}{3!} - \dots\right) \quad (2.8)$$

Για $2.3ebc < 0.05$ μπορούμε να κρατήσουμε μόνο τον πρώτο όρο, όλοι οι οι υπόλοιποι όροι αγνοούνται.

$$2.3ebc < 0.05 \Leftrightarrow F = 2.3K'ebcP_0 = K''c$$

Επομένως, η ένταση του φθορισμού (F) είναι ανάλογη της συγκέντρωσης στης φθορίζουσας ουσίας, για $2.3ebc < 0.05$ [12].

Στη συγκεκριμένη διάταξη η μέτρηση του φθορισμού μπορεί να υλοποιηθεί είτε για συνεχή σάρωση σε όλο το εύρος των μηκών κύματος του οργάνου, είτε για κάποιο υποσύνολο της, είτε για συγκεκριμένο μήκος κύματος. Μπορούμε να πούμε ότι η διάταξη χωρίζεται σε 3 μέρη: τη περιοχή της διέγερσης, τη περιοχή της εκπομπής και τη περιοχή του δείγματος.



Σχήμα 2.13: Οπτικό διάγραμμα για τη διάταξη μέτρησης του φθορισμού

Αρχικά, στη περιοχή της διέγερσης έχουμε τη πηγή φωτός, η οποία είναι λυχνία ξένου μεγάλης έντασης, παλμική και με μικρό χρόνο διάρκειας του παλμού). Η δέσμη από τη λυχνία οδηγείται με τη βοήθεια κατόπτρων (επίπεδο-κοίλο: $R_1 = \infty$ & $R_2 < 0$) και επίπεδο-επίπεδο: $R_1 = \infty$ & $R_2 = \infty$) στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα διέγερσης, οπου διέρχεται από το φράγμα (1440 γραμμές/mm) και εστιάζεται στη σχισμή εξόδου με τη βοήθεια επιπέδου-κοίλου κατόπτρου ($R_1 < 0$ & $R_2 = \infty$). Η ακτινοβολία οδηγείται μέσο του επίπεδου-επίπεδου κατόπτρου: $R_1 = \infty$ & $R_2 = \infty$ και του επίπεδου-κοίλου: $R_1 < 0$ & $R_2 = \infty$ στο διαχωριστή της δέσμης, όπου ένα μικρό μέρος του μεταφέρεται στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς ενώ το υπόλοιπο μέρος προσπίπτει στο δείγμα. Για να μη παρατηρηθεί απόκλιση στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς χρησιμοποιείται καμπύλη αναφοράς ροδαμίνης B, στην οποία η κβαντική απόδοση διατηρείται σταθερή για απορρόφηση μήκους κύματος 200 - 600 nm και εκπομπή 630 nm. Στη συνέχεια, στη περιοχή της εκπομπής η ανακλώμενη δέσμη μεταφέρεται στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής με τη βοήθεια των κατόπτρων (επίπεδο-κοίλο: $R_1 < 0$ & $R_2 = \infty$) και επίπεδο-επίπεδο: $R_1 = \infty$ & $R_2 = \infty$), όπου ο

μονοχρωμάτορας εκπομπής περιέχει φράγμα (1200 γραμμές/mm) και επιπέδου-κοίλου κατόπτρου ($R_1 < 0$ & $R_2 = \infty$). Στο τέλος, η πορεία της δέσμης είναι στη σχιμή εξόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής και στο φωτοπολλαπλασιαστή για ανάλυση.

Για το μονοχρωμάτορα διέγερσης γνωρίζουμε ότι το εύρος σάρωσης του είναι από 200 έως 800 nm ενώ για το μονοχρωμάτορα εκπομπής το εύρος σάρωσης του είναι από 200 έως 900 nm. Οι μονοχρωμάτορες μπορεί να δουλεύουν ανεξάρτητα μεταξύ τους είτε συνδυαστικά.

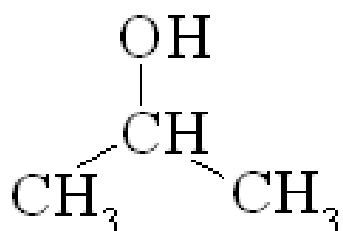


Σχήμα 2.14: Φασματοφωτομετρική διάταξη του εργαστηρίου

2.2.10 Ουσίες

Ισοπροπανόλη

Η ισοπροπανόλη, γνωστή και ως propan-2-ol, 2-propanol είναι άχρωμο και εύ-φλεκτο υλικό. Ο χημικός του τύπος είναι $CH_3CH(OH)CH_3$. Είναι πλήρως διαλυτό στο νερό, σχετικά μη τοξικό και εξατμίζεται γρήγορα. Έχει πολλές εφαρμογές, σε αυτό το πείραμα ωστε χρησιμοποιηθεί κυρίως ως καθαριστικό υγρό.



Σχήμα 2.15: Χημική δομή της ισοπροπανόλη

FBS

Το FBS (Fetal Bovine Serum) έχει χρώμα κίτρινο-καφέ και διατηρείται στους –20°C. Πρόκειται για το τμήμα του πλάσματος που απομένει μετά την πήξη του αίματος, κατά την οποία επεξεργάζονται οι ινωδογόνες πρωτεΐνες του πλάσματος. Το FBS προέρχεται από το αίμα που λαμβάνεται από ένα βοοειδές έμβρυο. Χρησιμοποιείται στις κυτταροκαλλιέργειες λόγω του ότι έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε αντισώματα. Προστατέψει τα κύτταρα από τους στρεσογόνους παράγοντες της πειραματικής διαδικασίας, δεδομένου ότι ο φυσικός του ρόλος είναι η προστασία των κυττάρων του οργανισμού από παρόμοια πίεση με τη διατήρηση της ομοιόστασης.

PBS

Το PBS (Phosphate Buffered Saline) είναι άχρωμο και διατηρείται στους 4–8°C. Είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διατηρήσει τις καλλιέργειες κυττάρων στο φυσιολογικό εύρος pH (7.0 - 7.6). Επίσης, χρησιμοποιείται για την πλύση των κυττάρων, για την απομάρυνση αιωρημάτων, και ως μέσο αραίωσης για τη διαχοπή της δράσης της Trypsin.

RPMI

Το RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) έχει χρώμα ροζ-πορτοκαλί και διατηρείται στους 4 – 8°C. Είναι το θρεπτικό μέσο, το οποίο είναι απαραίτητο για τις κυτταροκαλλιέργειες. Είναι εμπλουτισμένο με βιταμίνες, αμινοξέα, αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες ή ορό.

Αντιβιοτικό (100X), liquid

Το αντιβιοτικό είναι ημιδιαφανές κίτρινο και διατηρείται στους –20°C. Ως αντιβιοτικό χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε χημική ένωση που εμποδίζει ή καταργεί την αύξηση των μικροοργανισμών, όπως τα βακτήρια ή τους μύκητες.

Trypsin 0.25% EDTA Solution

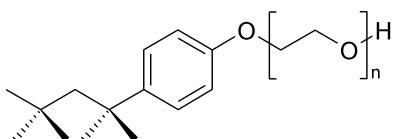
Η Trypsin έχει χρώμα ροζ-φούξια και διατηρείται στους -20°C . Χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των κυττάρων από τις επιφάνειες που καλλιεργούνται. Πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στο χρόνο αλληλεπίδρασης της Trypsin με τα κύτταρα για την αποφυγή βλαβών στα κύτταρα λόγω της κυτταροτοξιότητας. Επομένως, μόλις αντιληφθούμε την πλήρη αποκόλληση των κυττάρων πρέπει να σταματήσουμε τη δράση της.

DMSO

Το DMSO, (Dimethyl sulfoxide) είναι άχρωμο και διατηρείται στους 20°C . Η οξείδωση του σουλφιδίου διμεθυλίου με διοξείδιο του οξυγόνου ή αζώτου δημιουργεί το DMSO. Εμείς χρησιμοποιούμε το DMSO όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε θερμοκρασία εως -190°C , έτσι ώστε να καταστείλει τη διαδικασία της διόγκωσης.

Triton X-100

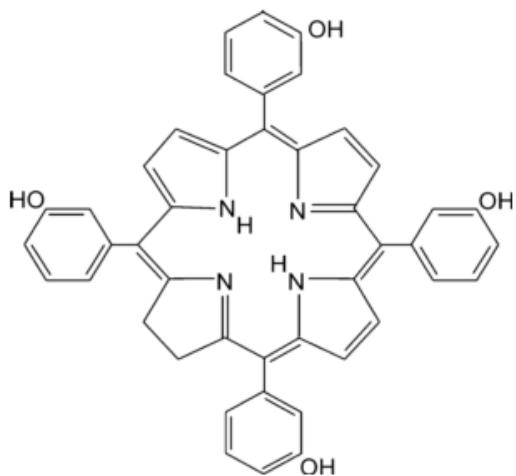
Το Triton X-100 είναι άσπρο-θιολό και διατηρείται σε θερμοκρασίες δωματίου. Είναι 100 % δραστικό υλικό που χρησιμοποιείται κυρίως σε βιοχημικές εφαρμογές για τη διαλυτοποίηση των πρωτεΐνων.



Σχήμα 2.16: Χημική δομή του Triton X-100

2.2.11 Φωτοευαίσθητοποιητές

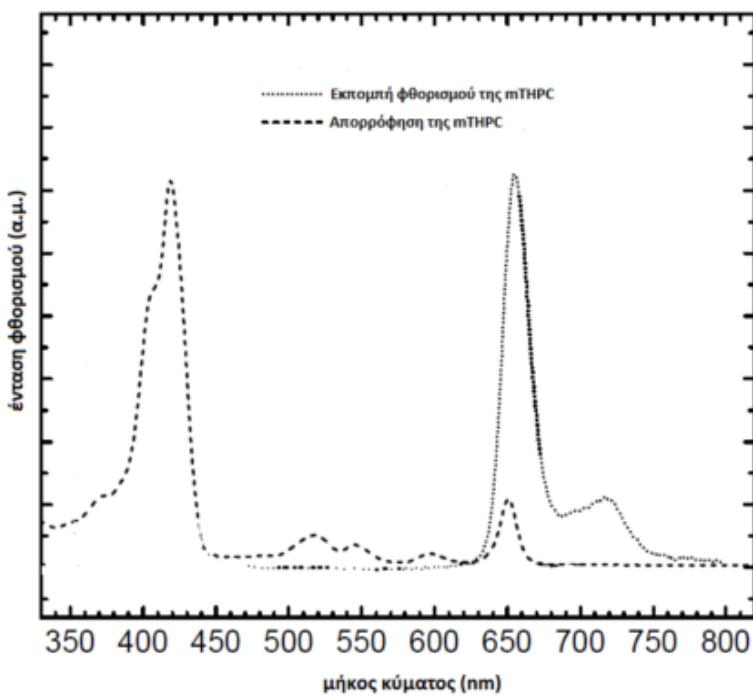
Η 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη (m-THPC ή temoporfin) είναι μία φωτοευαίσθητη ουσία δεύτερης γενιάς, που χρησιμοποιείται κλινικά με την εμπορική ονομασία Foscan. Έχει εγκριθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για συμπληρωματική θεραπεία προχωρημένων καρκίνων της κεφάλης και του τραχήλου [48].



Σχήμα 2.17: Χημική δομή της m-THPC

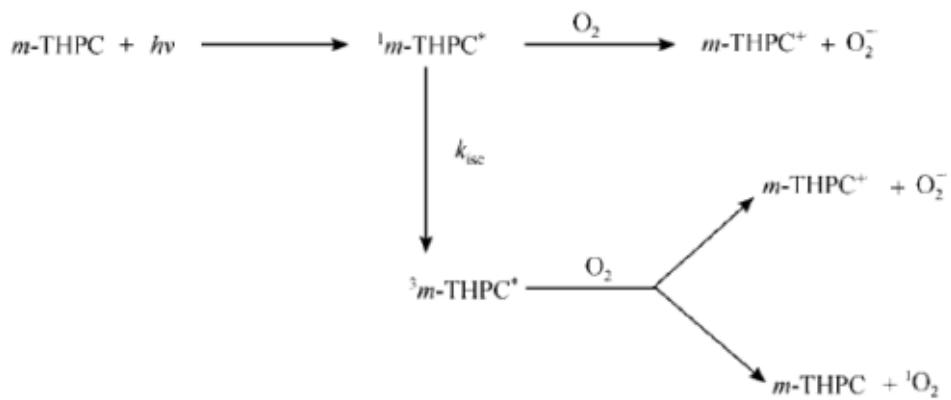
Η κλινική του δράση έχει μελετηθεί και μελετάται και σε άλλους καρκίνους, όπως ο καρκίνος του προστάτη, ο στοματικός ακανθοκυτταρικός καρκίνος και ως βοηθητική θεραπεία σε συνδυασμό με τη χειρουργική θεραπεία στο πλευρικό όγκο του μεσοθηλιακού ιστού [48]. Αυτή η φωτοευαίσθητη ουσία ήταν η πρώτη που χρησιμοποιήθηκε επίσημα για κλινική μελέτη στη φωτοδυναμική θεραπεία για τον καρκίνο του προστάτη [19].

Η κορυφή απορρόφησης της m-THPC είναι στα 652 nm και στα 417 nm, υψηλότερα από την Photofrin που είναι στα 630 nm, αλλά χαμηλότερα από άλλες φωτοευαίσθητες ουσίες όπως η φθαλοκυανίνη στα 670 nm [53], [54]. Για m-THPC, στη φωτοδυναμική θεραπεία απαιτούνται πολύ μικρές δόσεις φωτοευαίσθητης ουσίας (0.1 - 0.3 mg/kg) και δόσεις ακτινοβολίας (10 - 20 J/cm²). Συγκριτικά με την Photofrin, η m-THPC είναι περίπου 100 με 200 φορές πιο αποτελεσματική σε όρους γενική δόσης για τη φωτοδυναμική θεραπεία (δόση φωτοευαίσθητης ουσίας * δόση ακτινοβολίας), ενώ επιτρέπει τη νέκρωση όγκων μεγαλύτερου βάθους [55].



Σχήμα 2.18: Φασματικά χαρακτηριστικά της m-THPC

Επιπλέον, η m-THPC έχει ως αποτέλεσμα μικρότερους χρόνους φωτοευαισθησίας από την αιματοπορφυρίνη και απαιτεί προστασία των ματιών και του δέρματος από την ηλιακή ακτινοβολία έως 6 εβδομάδες [56]. Τέλος, οι χημικές αντιδράσεις της m-THPC με το μοριακό οξυγόνο φαίνονται στη παρακάτω εικόνα (2.19).



Σχήμα 2.19: Αντιδράσεις μεταξύ της διεγερμένης φωτοευαίσθητης ουσίας m-THPC και του οξυγόνου

Λιποσωματιδιακοί σχηματισμοί της mTHPC

Η mTHPC(Foscan) είναι μία ισχυρή δεύτερης γενιάς φωτοευαίσθητη ουσία με έντονη υδροφοβική ιδιότητα, η οποία προκαλεί συσσώρευση μορίων και αποτρέπει τη βιοδιαθεσιμότητα της στα βιολογικά μέσα. Αυτή η ιδιότητα οδηγεί σε χαμηλό ρυθμό συσσώρευσης της φωτοευαίσθητης ουσίας στα καρκινικά κύτταρα, δηλαδή κακή διαλυτότητα της φωτοευαίσθητης ουσίας στα βιολογικά μέσα, όπως το πλάσμα του αίματος. Για την αντιμετώπιση του παρόντος προβλήματος και τη βελτίωση της φωτοδυναμικής θεραπείας χρησιμοποιούνται διάφορα σκευάσματα της mTHPC εγκλεισμένα με λιποσώματα όπως Foslip και Fospeg. Η φωτοευαίσθητη ουσία Foslip ήταν το πρώτο σκευάσμα της mTHPC εγκλεισμένη με λιποσώματα, με βάση τα dipalmitoylphosphatidylcholine/dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPC / DPPG). Η φωτοευαίσθητη ουσία Fospeg είναι μια σταθεροποιημένη μορφή της Foslip, η οποία επιπλέον περιέχει μικρή ποσότητα PEG-phosphatidylethanolamine [57], [49], [15].

Σύμφωνα με μελέτες, η λιποσωμική μορφή παρουσιάζει μεγαλύτερες μέγιστες τιμές έντασης φυσιορισμού συγκριτικά με την απλή μορφή της mTHPC. Αυτό είναι αρκετά σημαντικό στη κλινική εικόνα, διότι με αυτό το τρόπο μειώνεται η απαιτούμενη δόση της φωτοευαίσθητης ουσίας, επομένως επάγεται μικρότερη φωτοευαίσθησία στους ασθενείς. Επίσης, παρατηρείται ότι ο χρόνος μεταξύ της χορήγησης της φωτοευαίσθητης ουσίας και της ακτινοβόλησης μπορεί να μειωθεί αρκετά. Είναι αξιοσημείωτο να αναφέρουμε ότι η λιποσωματιδιακή μορφή της mTHPC έχει μεγαλύτερη επιλεκτικότητα [58].

2.3 Πειραματικές Μέθοδοι

Κατά τη διάρκεια του πειράματος χρησιμοποιήσαμε διάφορες μεθόδους. Σε αυτό το κεφάλαιο ωσα γίνει αναλυτική περιγραφή τους.

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η συγχριτική μελέτη της αποδέσμευσης από καρκινικά κύτταρα, της καρκινικής σείρας LNCaP για την ελεύθερη και εγκλεισμένη λιποσωμιακή μορφή της m-THPC. Θα καθορίσουμε ποια αποδεσμεύεται πιο γρήγορα από τα κύτταρα. Η εργασία συνίσταται στον πειραματικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης της φωτοευάσθητης ουσίας σε καρκινικά κύτταρα για διάφορους χρόνους, αφού έχουν επωαστεί για 24 ώρες με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις της ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC και στην μεταξύ τους σύγκριση.

2.3.1 Κύτταρα

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα είναι τύπου LNCaP. Συγχεκριμένα, επιλέχθηκαν κύτταρα της καρκινικής σειράς κυττάρων του προστάτη από άνδρα (50 έτων) της Καυκάσιας φυλής με διαγνωσμένο μεταστατικό καρκίνο του προστάτη. Μπορεί να δημιουργήσουν ένα μοντέλο καρκίνου του προστάτη σε μεγάλη προσέγγιση με το πραγματικό, διότι διατηρούν τις καρκινικές ιδιότητες όταν εμφυτεύονται σε μύες. Προτιμήθηκε αυτή η μέθοδος μελέτης διότι καθιστά τις πειραματικές συνθήκες περισσότερο ελεγχόμενες αφού δεν εμπλέκεται κάποιος ζωντανός οργανισμός (πειραματόζωα). Υπάρχει η δυνατότητα επανάληψης των πειραμάτων, αυξάνοντας τον αριθμό και τη πολυπλοκότητα των μηχανισμών που μπορούν να μελετηθούν και προφανώς δεν απαιτείται η θανάτωση πειραματόζωων.

Τα κύτταρα LNCaP διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία εως -190°C σε ειδικά φυαλίδια. Συνήθως, κάθε φυαλίδιο περιέχει $5 * 10^6$ κύτταρα σε 1 ml πλήρους θρεπτικού μέσου και 50 μl DMSO. Η ψύξη των κυττάρων πρέπει να γίνεται σταδιακά, για αυτό το λόγο τοποθετούνται στους -80°C για 24 ώρες και στη συνέχεια τοποθετούνται σε δοχείο με υγρό άζωτο.

2.3.2 Καλλιέργεια Κυττάρων

I)

Αφαιρεση κυττάρων από το υγρό άζωτο και παραμονή στο κλίβανο επώασης για περίπου 5 min.

Προσοχή: Ενώ τα κύτταρα βρίσκονται στην κατάψυξη εως (-190°C) έχει προστεθεί ήδη η ουσία DMSO, έτσι ώστε να καταστείται την διαδικασία της διόγκωσης. Αυτό συμβαίνει διότι δεν ψέλουμε τα κύτταρα να σπάσουν λόγο της διόγκωσης.

II)

Καταστολή δράση του DMSO

Εφόσον τα κύτταρα ξεπαγώσουν, εάν αφήσουμε την ουσία DMSO να αλληλεπιδράσει με τα κύτταρα θα προκαλέσει την καταστροφή τους. Κάτι τέτοιο προφανώς και δεν είναι επιθυμητό, επομένως πρέπει να σταματήσουμε τη δράση της ουσίας στα κύτταρα και να τα απομονώσουμε. Αυτό μπορεί να συμβεί προσθέτοντας στο αρχικό μας διάλυμα $\simeq 9\text{ml}$ από:

- ✓ 90%: PBS, $\simeq 8100 \mu\text{l}$
- ✓ 10%: FBS, $\simeq 900 \mu\text{l}$ και
- ✓ 0.8%: Αντιβιοτικό, $\simeq 72 \mu\text{l}$

III)

Φυγοκέντρηση

Χωρίζουμε το διάλυμα που δημιουργήσαμε στο δεύτερο βήμα σε 3 δοκιμαστικούς σωλήνες και τοποθετούνται στην φυγόκεντρο για περίπου 7 λεπτά με γωνιακή ταχύτητα 5000 Revolutions per minutes (Rpm).

Προσοχή: Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πρέπει να είναι τοποθετημένες στην φυγόκεντρο αντισυμμετρικά με ίσους όγκους.

Το αποτέλεσμα της φυγοκέντρησης είναι ότι θα μεταφέρει τα κύτταρα στο κάτω μέρος του δοκιμαστικού σωλήνα ενώ στο πάνω μέρος του θα βρίσκεται το διάλυμα, στο προηγούμενο κεφάλαιο υπάρχει αναλυτικότερη ερμηνεία.

IV)

Δημιουργία πλήρους θρεπτικού μέσου (ΠΘΜ)

Η τοποθέτηση των κυττάρων πραγματοποιείται σε φλάσκα 25cm^2 στην οποία τοποθετούνται 5 ml πλήρους θρεπτικού μέσου. Ο όγκος του πλήρους θρεπτικού μέσου είναι ανάλογος της επιφάνειας της φλάσκας, όπως θα δούμε παρακάτω. Επομένως, το πλήρες θρεπτικό μέσο θα αποτελείται από:

- ✓ 90%: RPMI, $\simeq 4500 \mu\text{l}$
- ✓ 10%: FBS, $\simeq 500 \mu\text{l}$ και
- ✓ 0.8%: Αντιβιοτικό, $\simeq 40 \mu\text{l}$

V)

Αφού έχει τελειώσει η διαδικασία της φυγοκέντρησης, αδειάζουμε προσεχτικά το υπερκείμενο διάλυμα του φυγοκεντρισμένου δοκιμαστικού σωλήνα, ώστε να παραμείνουν τα κύτταρα στο κάτω μέρος του σωλήνα. Αυτό επιτυγχάνεται με σταθερή αύξηση της γωνίας του δοκιμαστικού σωλήνα από το επίπεδο του εδάφους. Σαν αποτέλεσμα επιτυγχάνεται η απομόνωση των κυττάρων. Προσθέτουμε κάποια ml πλήρους θρεπτικού μέσου σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και τα ανακατεύουμε αρκετά με την χρήση της πιπέτας (pipeting), έτσι ώστε να γίνει το διάλυμα ομοιόμορφο και να μεταφερθούν όλα τα κύτταρα του κάθε δοκιμαστικού σωλήνα στην φλάσκα.

Ελέγχουμε στο μικροσκόπιο την κατάσταση των κυττάρων και στη συνέχεια τοποθετείται η φλάσκα στο κλίβανο για 48 ώρες.

2.3.3 Ανακαλλιέργεια Κυττάρων

Όταν η επικάλυψη των κυττάρων στην επιφάνεια της φλάσκας ξεπεράσει το 70% εμποδίζεται η παραγωγή των κυττάρων. Τα κύτταρα LNCaP με τις δεδομένες συνθήκες ανακαλλιεργούνται με ρυθμό 1:3, για αυτό το λόγο μεταφέρουμε τα κύτταρα σε τρεις φλάσκες των 25cm^2 ή σε μία μεγαλύτερη φλάσκα των 75cm^2 .

I)

Αφαιρούμε προσεχτικά το πλήρες θρεπτικό μέσο από την φλάσκα και ξεπλένουμε 2 φορές τα κύτταρα με PBS και αντιβιοτικό, 99.2% και 0.8% αντίστοιχα.

II)

Τοποθετούμε Trypsin για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας (1ml για φλάσκα 25cm² ή 3ml για φλάσκα 75cm²). Αυτή η διαδικασία όμως διαρκέσει περίπου 3 λεπτά, μπορεί να γίνει αντιληπτή μακροσκοπικά. Για την αποφυγή της κυτταροτοξιότητας, δεν πρέπει ο χρόνος αλληλεπίδρασης της Trypsin με τα κύτταρα να ξεπερνάει τον αναφερόμενο χρόνο. Επομένως, μόλις αντιληφθούμε την πλήρη αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα τοποθετούμε το παρακάτω διάλυμα, που αναστέλλει τη δράση της Trypsin:

5ml για φλάσκα 25cm² ή 15ml για φλάσκα 75cm²:

- ✓ 90%: PBS, \simeq 4500 μl (για φλάσκα 25cm²), \simeq 13500 μl (για φλάσκα 75cm²)
- ✓ 10%: FBS, \simeq 500 μl (για φλάσκα 25cm²), \simeq 1500 μl (για φλάσκα 75cm²) και
- ✓ 0.8%: Αντιβιοτικό, \simeq 40 μl (για φλάσκα 25cm²), \simeq 120 μl (για φλάσκα 75cm²)

III)

Χωρίζουμε το διάλυμα που δημιουργήσαμε στο δεύτερο βήμα σε δοκιμαστικούς σωλήνες και τοποθετούνται στην φυγόκεντρο για περίπου 7 λεπτά με γωνιακή ταχύτητα 5000 Rpm, ακριβώς όπως αναφέραμε στην παραπάνω μέθοδο.

IV)

Δημιουργία πλήρες θρεπτικού μέσου (ΠΘΜ)

5ml για φλάσκα 25cm² ή 15ml για φλάσκα 75cm²:

- ✓ 90%: Rpmi, \simeq 4500 μl (για φλάσκα 25cm²), \simeq 13500 μl (για φλάσκα 75cm²)
- ✓ 10%: FBS, \simeq 500 μl (για φλάσκα 25cm²), \simeq 1500 μl (για φλάσκα 75cm²) και
- ✓ 0.8%: Αντιβιοτικό, \simeq 40 μl (για φλάσκα 25cm²), \simeq 120 μl (για φλάσκα 75cm²)

V)

Αφαιρούμε με μεγάλη προσοχή το υπερκείμενο διάλυμα του δοκιμαστικού σωλήνα ώστε να παραμένουν τα κύτταρα στο κάτω μέρος του δοκιμαστικού σωλήνα. Προσθέτουμε πλήρες θρεπτικό μέσο σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και ανακατεύουμε αρκετά με τη χρήση της πιπέτας (pipetting), έτσι ώστε να γίνει το διάλυμα ομοιόμορφο. Μεταφέρονται όλα τα κύτταρα του κάθε δοκιμαστικού σωλήνα στην/ις φλάσκα/ες.

Ελέγχουμε στο μικροσκόπιο την κατάσταση των κυττάρων και στη συνέχεια

τοποθετούμε την/τις φλάσκα/ες στο κλίβανο για 48 ώρες.

2.3.4 Αποθήκευση Κυττάρων

I)

Αφαιρούμε προσεχτικά το πλήρες θρεπτικό μέσο από την θλάσκα και ξεπλένουμε 2 φορές τα κύτταρα με PBS και αντιβιοτικό, 99.2% και 0.8% αντίστοιχα.

II)

Τοποθετούμε Trypsin για να αποκολλήσουν τα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας 3ml για φλάσκα 75cm²). Αυτή η διαδικασία θα διαρκέσει περίπου 3 λεπτά, μπορεί να γίνει αντιληπτό μακροσκοπικά. Όπως αναφέραμε, για την αποφυγή της κυτταροτοξικότητας, δεν πρέπει ο χρόνος αλληλεπίδρασης της Trypsin με τα κύτταρα να ξεπερνάει τον αναφερόμενο χρόνο. Επομένως, μόλις αντιληφθούμε την πλήρη αποκόλληση των κυττάρων από την φλάσκα τοποθετούμε το παρακάτω διάλυμα, που αναστέλλει τη δράση της Trypsin:

15ml για φλάσκα 75cm²:

- ✓ 90%: PBS, \simeq 13500 μ l
- ✓ 10%: FBS, \simeq 1500 μ l και
- ✓ 0.8%: Αντιβιοτικό, \simeq 120 μ l

III)

Χωρίζουμε το διάλυμα που δημιουργήσαμε στο δεύτερο βήμα σε δοκιμαστικές σωλήνες και τοποθετούνται στην φυγόκεντρο για περίπου 7 λεπτά με γωνιακή ταχύτητα 5000 Rpm, ακριβώς όπως αναφέραμε στην πιο πάνω μέθοδο.

IV)

Δημιουργία πλήρες θρεπτικού μέσου (ΠΘΜ), 1ml:

- ✓ 90%: Rpmi, \simeq 900 μ l
- ✓ 10%: FBS, \simeq 100 μ l
- ✓ 0.8%: Αντιβιοτικό, \simeq 8 μ l

V)

Αφαιρούμε με μεγάλη προσοχή το υπερκείμενο διάλυμα του δοκιμαστικού σωλήνα ώστε να παραμένουν τα κύτταρα στο κάτω μέρος του δοκιμαστικού σωλήνα. Προσθέτουμε πλήρες ψευπτικό μέσο σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και ανακατεύουμε αρκετά με την χρήση της πιπέτας (pipeting), έτσι ώστε να γίνει το διάλυμα ομοιόμορφο. Μεταφέρονται όλα τα κύτταρα του κάθε δοκιμαστικού σωλήνα σε σωλήνα χωρητικότητας 2ml οπού προσθέτω 50 μl DMSO. Χρησιμοποιούμε την ουσία DMSO για την καταστολή της διαδικασίας της διόγκωσης (πρήξιμο). Τοποθετούμε τα κύτταρα στους -80°C για 24 ώρες και στη συνέχεια τα μεταφέρουμε στους -190°C στο υγρό άζωτο. Χρειαζόμαστε σταδιακή φύξη των κυττάρων για τη βέλτιστη αποθήκευση τους.

2.3.5 Εισαγωγή φωτοευαίσθητης ουσίας

Στη συγκεκριμένη πειραματική μέθοδο ωσα δημιουργήσουμε 5 φλάσκες με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωτοευαίσθητης ουσίας για χρόνο 3, 6, 12, 24 και 72 ώρες. Σε κάθε φλάσκα τοποθετούμε περίπου 10^6 κύτταρα. Μια φλάσκα δεν ωσα περιέχει καθόλου φωτοευαίσθητη ουσία, η οποία ωσα λειτουργήσει ως υπόβαθρο για τις άλλες φλάσκες που έχουν διαφορετικές συνθήκες. Δυο φλάσκες ωσα περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις (1.2 και 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) από την φωτοευαίσθητη ουσία foscan ενώ οι άλλες δυο ωσα έχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις (1.2 και 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) από την φωτοευαίσθητη ουσία fospegl.

I)

Το πρώτο βήμα είναι να δημιουργήσουμε την συγκεντρώσεις που χρειαζόμαστε από κάθε φωτοευαίσθητη ουσία. Οι αρχικές συγκεντρώσεις για το foscan και το fospegl είναι 1 και 1.5 mg/ml αντίστοιχα. Από την παρακάτω σχέση μπορούμε να δούμε τον απλό χανόνα της αραίωσης:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \quad (2.9)$$

όπου:

C_1 : είναι η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος

V_1 : ο όγκος του αρχικού διαλύματος

C_2 : η συγκέντρωση του αραιωμένου διαλύματος και

V_2 : ο όγκος του τελικού διαλύματος

Πρέπει να προσέξουμε ότι η διαφορά της αρχικής συγκέντρωσης με την τελική είναι αρκετά μεγάλη, για την αποφυγή σφαλμάτων θα πραγματοποιηθεί ακόμα μία ενδιάμεση αραίωση, συγκέντρωσης $15 \text{ }\mu\text{g/ml}$.

Foscan 15 $\mu\text{g/ml}$

Τοποθετώ $7.5 \text{ }\mu\text{l}$ από την αρχική συγκέντρωση $C=1 \text{ mg/ml}$ σε $492.5 \text{ }\mu\text{l}$ PBS

Fospeg 15 $\mu\text{g/ml}$

Τοποθετώ $5 \text{ }\mu\text{l}$ από την αρχική συγκέντρωση $C=1.5 \text{ mg/ml}$ σε $495 \text{ }\mu\text{l}$ πλήρες θρεπτικό μέσο

Foscan 1.2 $\mu\text{g/ml}$

Τοποθετώ $400 \text{ }\mu\text{l}$ από την ενδιάμεση συγκέντρωση Foscan $C=15 \text{ }\mu\text{g/ml}$ σε $4600 \text{ }\mu\text{l}$ πλήρες θρεπτικό μέσο

Fospeg 1.2 $\mu\text{g/ml}$

Τοποθετώ $400 \text{ }\mu\text{l}$ από την ενδιάμεση συγκέντρωση Fospeg $C=15 \text{ }\mu\text{g/ml}$ σε $4600 \text{ }\mu\text{l}$ πλήρες θρεπτικό μέσο

Foscan 0.15 $\mu\text{g/ml}$

Τοποθετώ $50 \text{ }\mu\text{l}$ από την ενδιάμεση συγκέντρωση Foscan $C=15 \text{ }\mu\text{g/ml}$ σε $4950 \text{ }\mu\text{l}$ πλήρες θρεπτικό μέσο

Fospeg 0.15 $\mu\text{g/ml}$

Τοποθετώ $50 \text{ }\mu\text{l}$ από την ενδιάμεση συγκέντρωση Fospeg $C=15 \text{ }\mu\text{g/ml}$ σε $4950 \text{ }\mu\text{l}$ πλήρες θρεπτικό μέσο

Όπως μπορούμε να δούμε ο παραπάνω κανόνας δεν παραβιάζεται. Προφανώς και αυτό είναι το επιθυμητό.

II)

Για να μπορέσουμε να πραγματοποιήσουμε το πείραμα θα πρέπει η πληρότητα των κυττάρων να είναι επαρκής. Δηλαδή, θα πρέπει να έχουμε τουλάχιστον μια φλάσκα 75 cm^2 με $5 * 10^6$ κύτταρα.

Αφαιρούμε προσεχτικά το πλήρες θρεπτικό μέσο από την φλάσκα και ξεπλένουμε 2 φορές τα κύτταρα με PBS και αντιβιοτικό, 99.2% και 0.8% αντίστοιχα.

Τοποθετούμε Trypsin για να αποκολλήσουν τα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας 15ml για φλάσκα 75cm²). Όπως αναφέραμε η διαδικασία θα διαρκέσει περίπου 3 λεπτά, μπορεί να γίνει αντιληπτό μακροσκοπικά. Για την αποφυγή της κυτταροτοξικότητας, δεν πρέπει ο χρόνος αλληλεπίδρασης της Trypsin με τα κύτταρα να ξεπερνάει τον αναφερόμενο χρόνο. Επομένως, μόλις αντιλιφθούμε την πλήρη αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα τοποθετούμε το παρακάτω διάλυμα, που αναστέλλει τη δράση της Trypsin:

- ✓ 90%: PBS, \simeq 13500 μl
- ✓ 10%: FBS, \simeq 1500 μl και
- ✓ 0.8%: Αντιβιοτικό, \simeq 120 μl

III)

Χωρίζουμε το διάλυμα που δημιουργήσαμε στο δεύτερο βήμα σε δοκιμαστικούς σωλήνες και τοποθετούνται στη φυγόκεντρο για περίπου 7 λεπτά με γωνιακή ταχύτητα 5000 Rpm.

IV)

Αφαιρούμε με μεγάλη προσοχή το υπερκείμενο διάλυμα του δοκιμαστικού σωλήνα ώστε να παραμένουν τα κύτταρα στο κάτω μέρος του δοκιμαστικού σωλήνα. Προσθέτουμε πλήρους θρεπτικό μέσο σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και ανακατεύουμε αρκετά με τη χρήση της πιπέτας (pipeting), έτσι ώστε να γίνει το διάλυμα ομοιόμορφο. Μεταφέρονται όλα τα κύτταρα του κάθε δοκιμαστικού σωλήνα σε 2ml πλήρους θρεπτικού μέσου, τα οποία στη συνέχεια μετριούνται με τη βιοήθεια του κυτταρόμετρου όπως έχουμε αναφέρει στο προηγούμενο κεφάλαιο:

- 2ml πλήρους θρεπτικού μέσου:
- ✓ 90%: Rpmi, \simeq 1800 μl
 - ✓ 10%: FBS, \simeq 20 μl και
 - ✓ 0.8%: Αντιβιοτικό, \simeq 16 μl

V)

Τοποθετούμε σε 5 φλάσκες των 25 cm² τα διαλύματα που δημιουργήσαμε στο

πρώτο βήμα, δηλαδή σε 2 φλάσκες τις διαφορετικές συγκεντρώσεις της φωτοευαίσθητης ουσίας foscan, σε άλλες 2 φλάσκες τις διαφορετικές συγκεντρώσεις της φωτοευαίσθητης ουσίας fospeg και σε 1 φλάσκα εισάγουμε μόνο πλήρες θρεπτικό μέσο χωρίς κάποια φωτοευαίσθητη ουσία. Σε κάθε φλάσκα προσθέτουμε περίπου 10^6 κύτταρα. Αφήνουμε τις ουσίες για 24 ώρες και στην συνέχεια τις αλλάζουμε με πλήρες θρεπτικό μέσο, χωρίς καμία φωτοευαίσθητη ουσία.

2.3.6 Απελευθέρωση φωτοευαίσθητης ουσίας

I)

Αφαιρούμε προσεκτικά το πλήρες θρεπτικό μέσο από την φλάσκα και ξεπλένουμε 2 φορές τα κύτταρα με PBS και αντιβιοτικό, 99.2% και 0.8% αντίστοιχα.

Για την αποκόλληση των κυττάρων προσθέτουμε στην φλάσκα των 25cm^2 5ml Trypsin. Αφήνουμε να δράση η Trypsin με τα κύτταρα περίπου 3 λεπτά, μόλις αντιλιφθούμε την πλήρη αποκόλληση των κυττάρων από την φλάσκα τοποθετούμε το παρακάτω διάλυμα, που αναστέλλει τη δράση της Trypsin:

- ✓ 90%: PBS, $\simeq 4500 \mu\text{l}$
- ✓ 10%: FBS, $\simeq 500 \mu\text{l}$ και
- ✓ 0.8%: Αντιβιοτικό, $\simeq 40 \mu\text{l}$

II)

Χωρίζουμε το διάλυμα που δημιουργήσαμε στο προηγούμενο βήμα σε δοκιμαστικές σωλήνες και τοποθετούνται στην φυγόκεντρο για περίπου 7 λεπτά με γωνιακή ταχύτητα 5000 Rpm.

III)

Αφαιρούμε με μεγάλη προσοχή το υπερκείμενο διάλυμα του δοκιμαστικού σωλήνα ώστε να παραμένουν τα κύτταρα στο κάτω μέρος του δοκιμαστικού σωλήνα. Προσθέτουμε πλήρες θρεπτικό μέσο σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και ανακατεύουμε αρκετά με την χρήση της πιπέτας (pipeting), έτσι ώστε να γίνει το διάλυμα ομοιόμορφο. Μεταφέρόνται όλα τα κύτταρα του κάθε δοκιμαστικού σωλήνα σε 1ml πλήρους θρεπτικού μέσου, τα οποία στη συνέχεια μετριούνται με τη βιοήθεια

του κυτταρόμετρου όπως έχουμε αναφέρει στο προηγούμενο κεφάλαιο:

1ml πλήρους θρεπτικού μέσου:

- ✓ 90%: Rpmi, \simeq 900 μ l
- ✓ 10%: FBS, \simeq 10 μ l και
- ✓ 0.8%: Αντιβιοτικό, \simeq 8 μ l

IV)

Ξαναφυγοκεντρούμε το διάλυμα, πλήρες θρεπτικό μέσο και κύτταρα, για περίπου 7 λεπτά με γωνιακή ταχύτητα 5000 Rpm, ώστε να απομονώσουμε τα κύτταρα και να τα μεταφέρουμε σε 2 ml διάλυμα, το οποίο προκαλεί την διάλυση των κυττάρων και την απελευθέρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας που έχουν απορροφήσει τα κύτταρα.

Το συγκεκριμένο διάλυμα περιέχει:

- ✓ 90%: Ισοπροπανόλη, \simeq 900 μ l
- ✓ 10%: Tryton X-100, \simeq 10 μ l και
- ✓ 0.8%: Hcl, \simeq 8 μ l

Επειδή το διάλυμα εξατμίζεται αρκετά εύκολα τοποθετούνται στα στόμια των δοκιμαστικών σωλήνων ειδικές μεμβράνες και καπάκια με σκοπό την απομόνωση του διαλύματος από το περιβάλλον.

2.3.7 Μέτρηση απελευθέρωσης της φωτοευαίσθητης ουσίας

Από το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε στην απελευθέρωση φωτοευαίσθητης ουσίας έχουμε σε δοκιμαστικούς σωλήνες τα καρκινικά κύτταρα για διάφορους χρόνους αφού έχουν απωαστεί για 24 ώρες με διάφορες συγκεντρώσεις της ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (Foscan και Fospeg).

I)

Φυγοκεντρούμε το διάλυμα που βρίσκονται στους δοκιμαστικούς σωλήνες για περίπου 7 λεπτά με γωνιακή ταχύτητα 5000 Rpm, ώστε να απομονωθούν τα

κύτταρα στην κάτω επιφάνεια του δοκιμαστικού σωλήνα. Στη συγκεκριμένη μέθοδο λαμβάνεται μόνο το υπερχείμενο διάλυμα, η παρουσία κυττάρων μέσα στο φυτορίμετρο μπορεί να προκαλέσει σκεδάσεις, δηλαδή λανθασμένες μετρήσεις. Η δέσμια φωτοευαίσθητη ουσία που είχαν τα καρκινικά κύτταρα σε κάθε χρόνο υπολογίζεται από την απελευθέρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας που έγινε στην προηγούμενη ενότητα. Η λήψη του υπερχείμενου διαλύματος γίνεται με τη χρήση της πιπέτας. Τοποθετούμε την πιπέτα στο κάτω όριο του υπερχειμένου διαλύματος κατά μήκος του δοκιμαστικού σωλήνα και λαμβάνεται με μικρό και σταθερό ρυθμό.

II)

Στη συνέχεια τοποθετούνται 100,000 κύτταρα σε κυβέτα φυτορισμού, συνολικός όγκος 3 ml από το διάλυμα (90% Ισοπροπανόλη, 10% Tryton X-100 και 0.8% HCl) και από το διάλυμα που υπάρχει στους δοκιμαστικούς σωλήνες από την προηγούμενη μέθοδο (απελευθέρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας).

III)

Τοποθετούμε την κυβέτα φυτορισμού που δημιουργήσαμε στο δεύτερο βήμα στο μηχάνημα φυτορισμού. Η σάρωση πραγματοποιείται από 480 έως 720 nm με μήκος διέγερσης 420 nm και ταχύτητα 480 nm/min. Με αυτό τον τρόπο μπορούμε να πάρουμε τα φάσματα φυτορισμού για κάθε συνθήκη (χρόνος + συγκέντρωση φωτοευαίσθητης ουσίας). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές για να έχουμε το μικρότερο δυνατό σφάλμα μέτρησης.

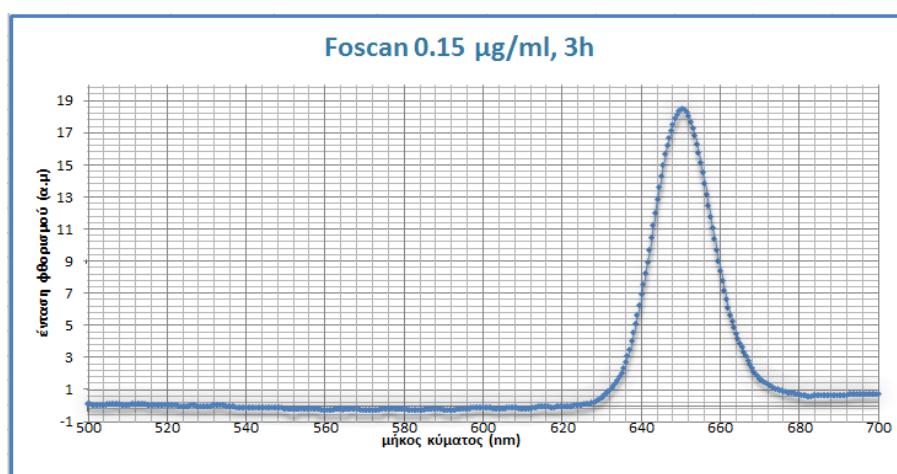
Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε συνθήκη, δηλαδή για χρόνο 3, 6, 12, 24 και 72 ώρες και για συγκέντρωση 1.2 και 0.15 µg/ml της ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (Foscan και Fospeg).

2.4 Αποτελέσματα

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η σχέση της έντασης φθορισμού της ελεύθερης (foscan) και της εγκλεισμένης λιποσωμιακής (fospes) μορφή της m-THPC σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις για 24 ώρες συνάρτηση του μήκους κύματος, με διέγερση στα 420 nm. Το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας από τα καρκινικά κύτταρα είναι 3, 6, 12, 24 και 72 ώρες. Η κορυφή της έντασης φθορισμού παρατηρείται στα 650 nm και η μείωση της τιμής της πραγματοποιείται με την αύξηση του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας.

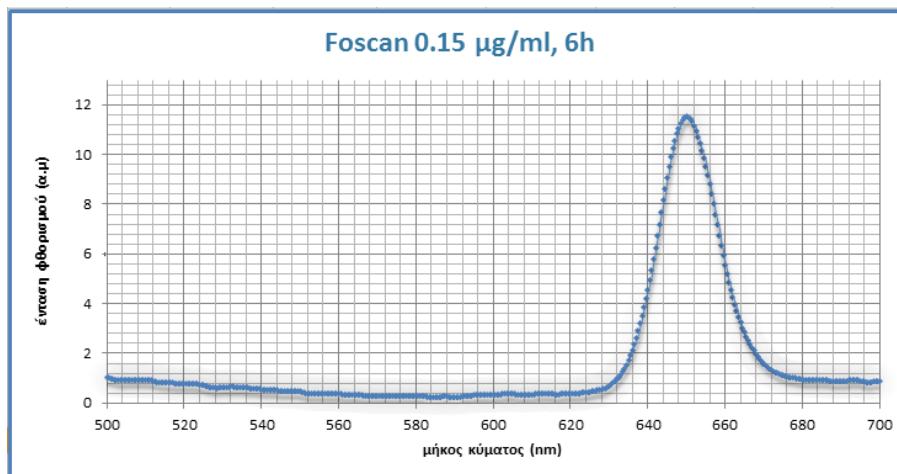
2.4.1 Αρχική συγκέντρωση φωτοευαίσθητης ουσίας 0.15 μg/ml για την ελεύθερη μορφή (foscan)

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 3h



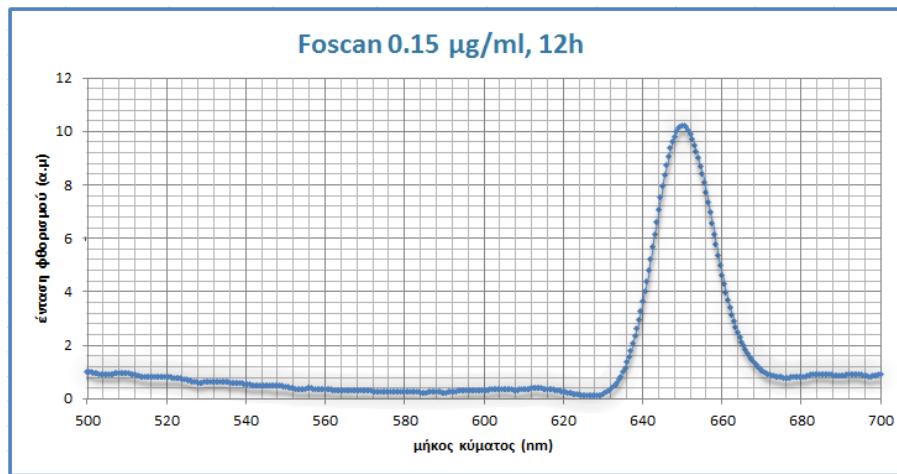
Σχήμα 2.20: Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 0.15 μg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 3h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 18.47 a.u.

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 6h



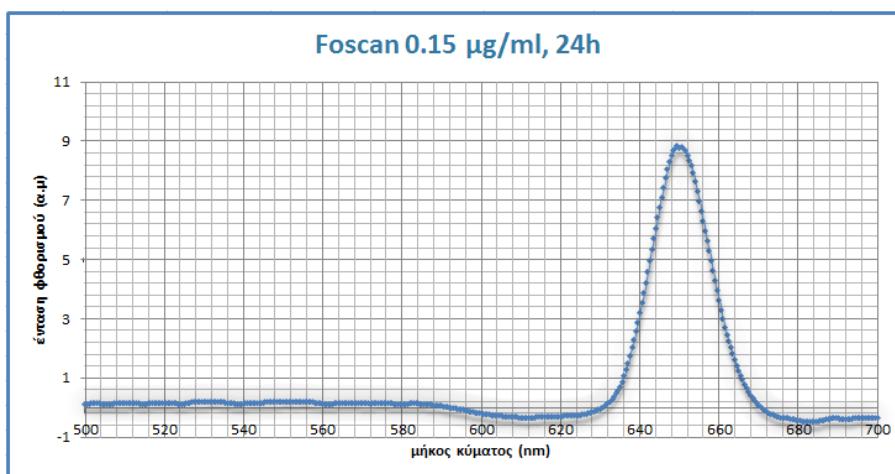
Σχήμα 2.21: Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 0.15 µg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 6h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 11.53 α.μ.

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 12h



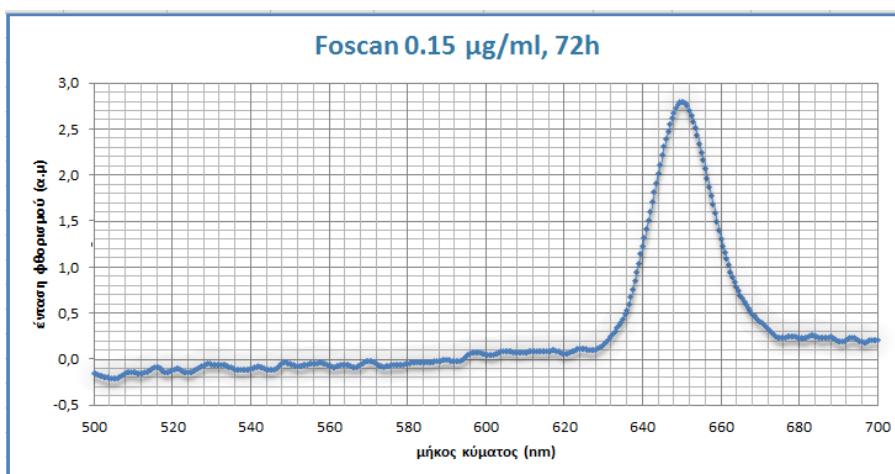
Σχήμα 2.22: Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 0.15 µg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 12h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 10.21 α.μ.

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 24h



Σχήμα 2.23: Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 0.15 µg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 24h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 9.15 a.u.

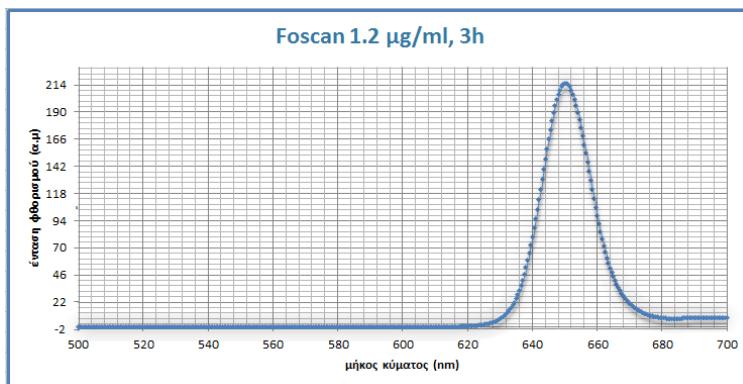
Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 72h



Σχήμα 2.24: Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 0.15 µg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 72h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 2.80 a.u.

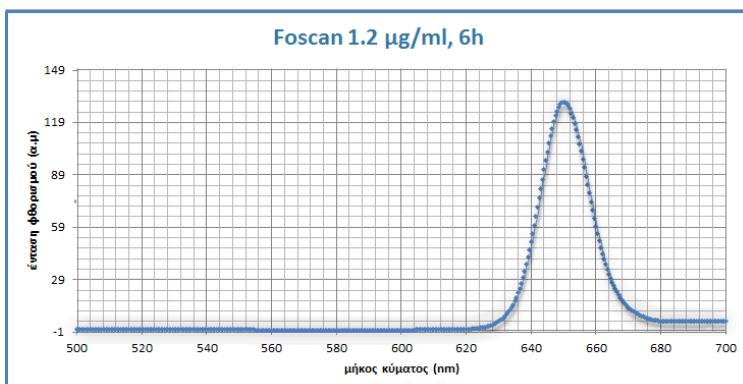
2.4.2 Αρχική συγκέντρωση φωτοευαίσθητης ουσίας 1.2 μg/ml για την ελεύθερη μορφή (foscan)

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 3h



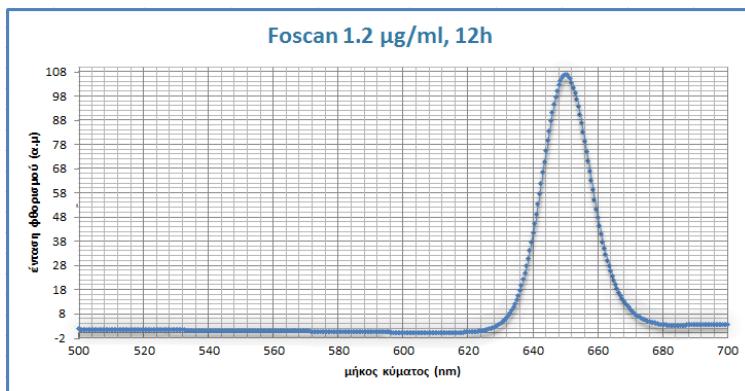
Σχήμα 2.25: Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 1.2 μg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 3h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 215.15 α.μ.

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 6h



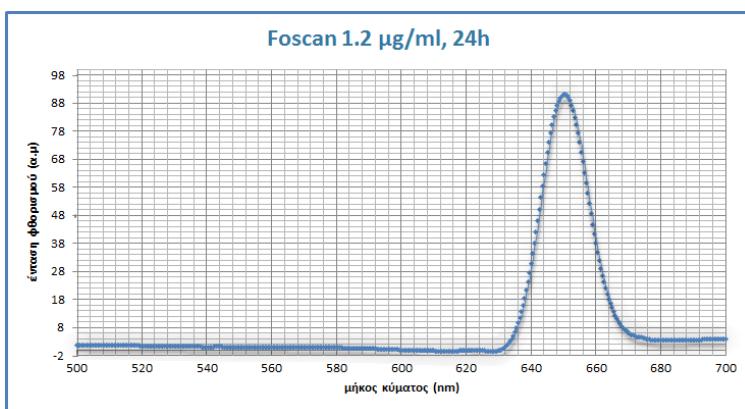
Σχήμα 2.26: Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 1.2 μg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 6h. με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 130.78 α.μ.

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 12h



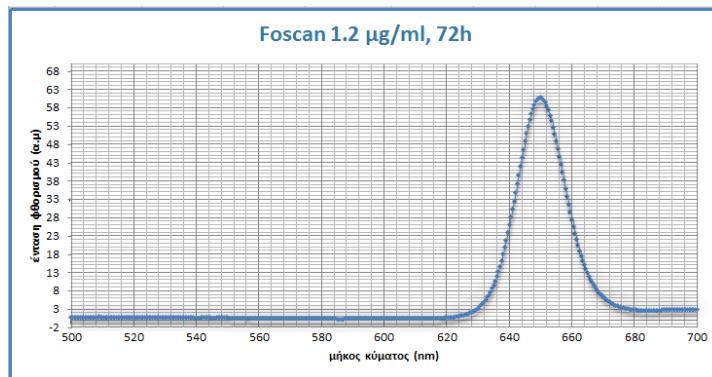
Σχήμα 2.27: Φάσμα έντασης φωτοευαίσθητης m-THPC (foscan) σε καρκινικά χύταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 12h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 106.78 a.u.

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 24h



Σχήμα 2.28: Φάσμα έντασης φωτοευαίσθητης m-THPC (foscan) σε καρκινικά χύταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 24h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 91.00 a.u.

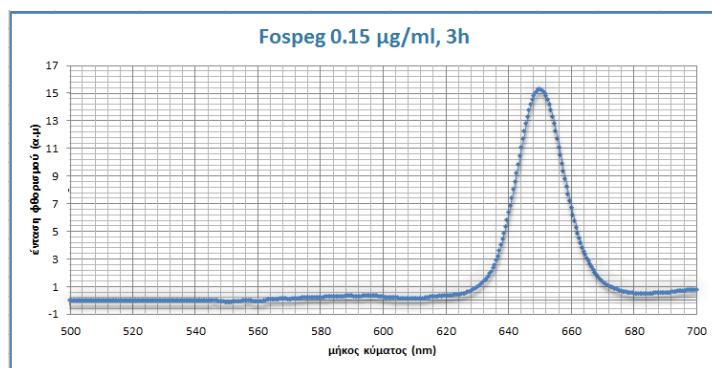
Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 72h



Σχήμα 2.29: Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 1.2 µg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 72h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 60.73 a.u.

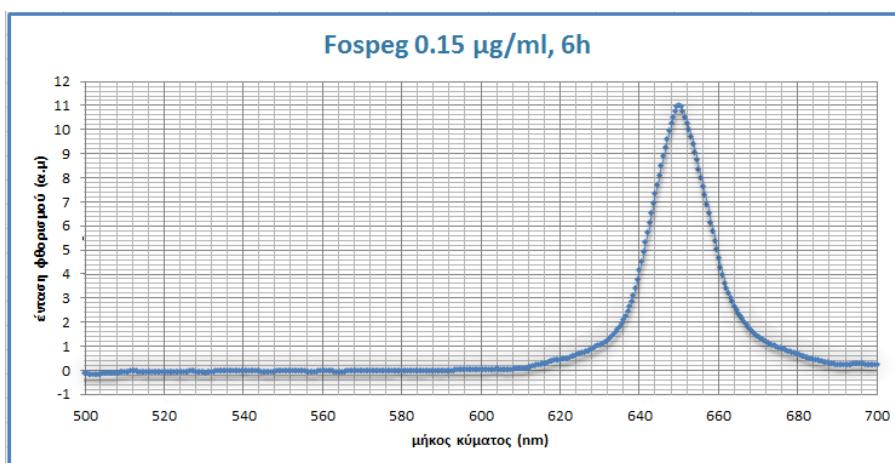
2.4.3 Αρχική συγκέντρωση φωτοευαίσθητης ουσίας 0.15 µg/ml για την εγκλεισμένη λιποσωμιακή μορφή (fospeg)

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 3h



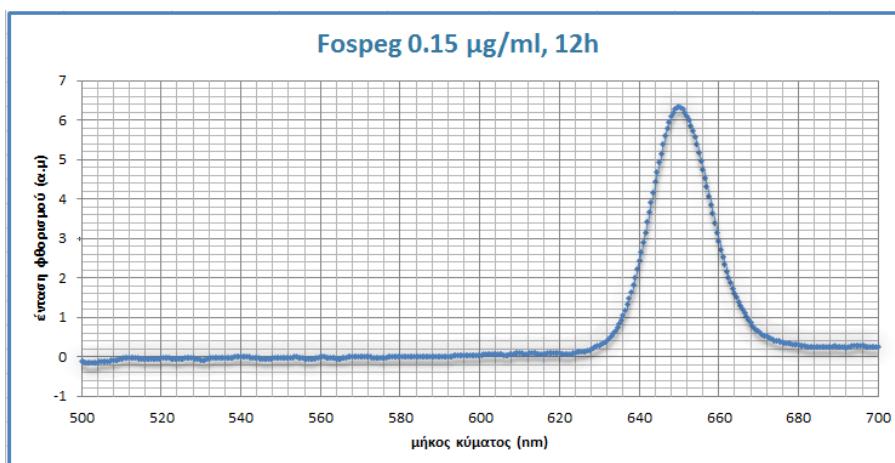
Σχήμα 2.30: Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 0.15 µg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 3h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 15.30 a.u.

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 6h



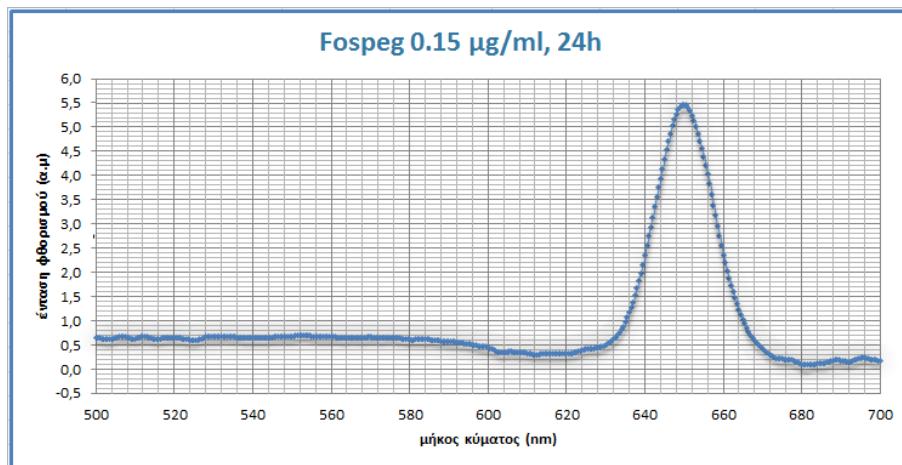
Σχήμα 2.31: Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 0.15 µg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 6h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 11.14 a.u.

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 12h



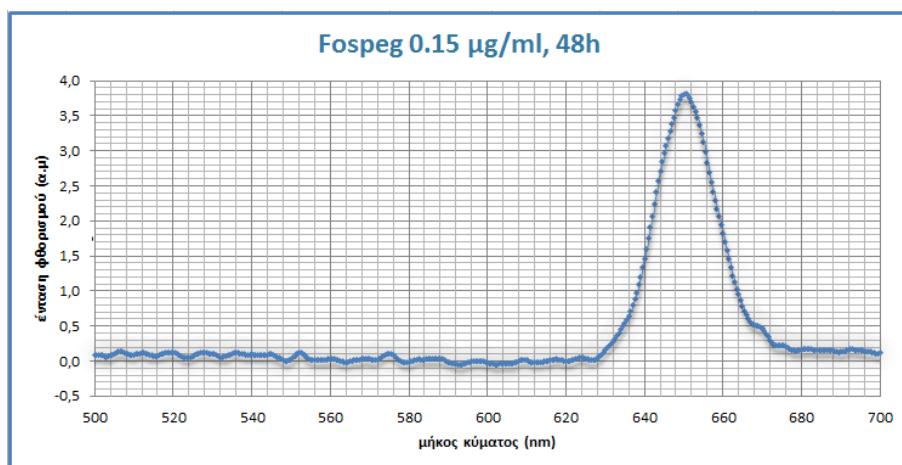
Σχήμα 2.32: Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 0.15 µg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 12h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 6.33 a.u.

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 24h



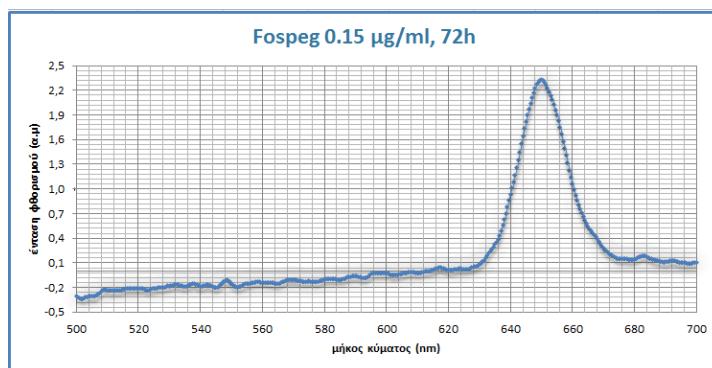
Σχήμα 2.33: Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 0.15 µg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 24h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 5.47 α.μ.

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 48h



Σχήμα 2.34: Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 0.15 µg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 48h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 3.01 α.μ.

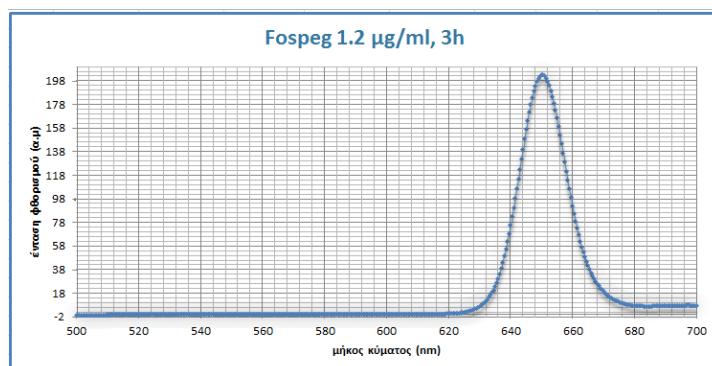
Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 72h



Σχήμα 2.35: Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 0.15 µg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 72h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 2.32 α.μ.

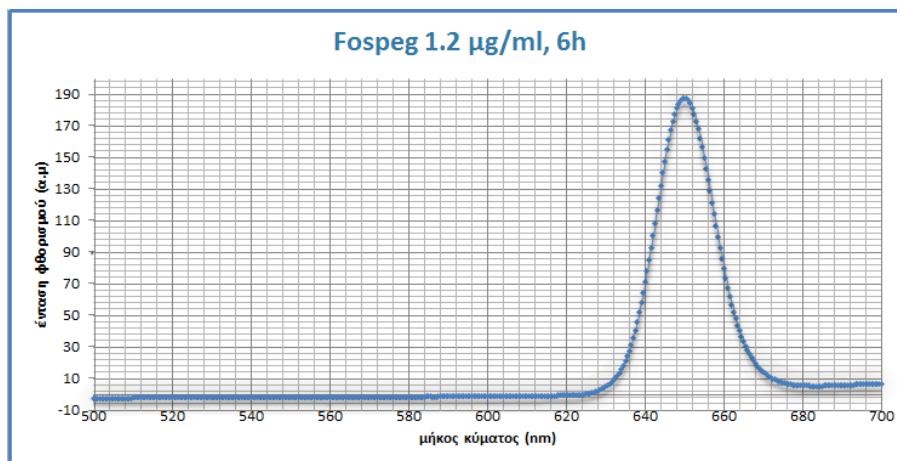
2.4.4 Αρχική συγκέντρωση φωτοευαίσθητης ουσίας 1.2 µg/ml για την εγκλεισμένη λιποσωμιακή μορφή (fospeg)

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 3h



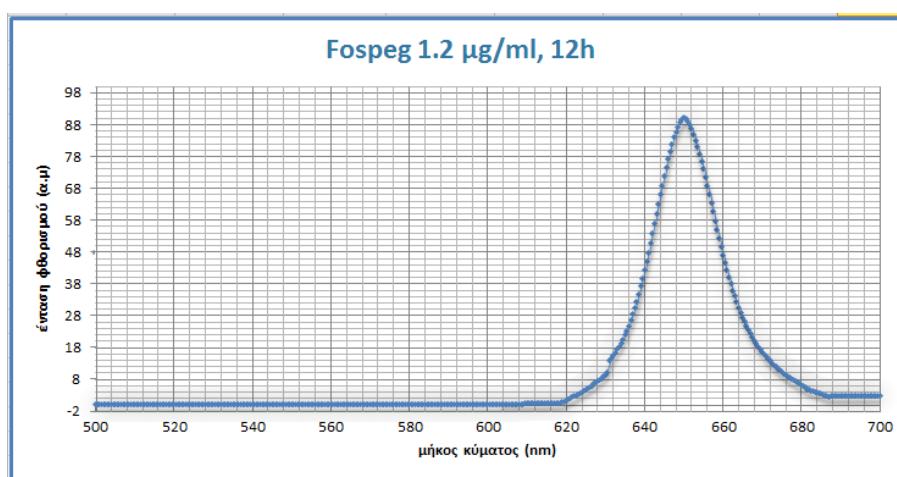
Σχήμα 2.36: Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 1.2 µg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 3h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 202.91 α.μ.

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 6h



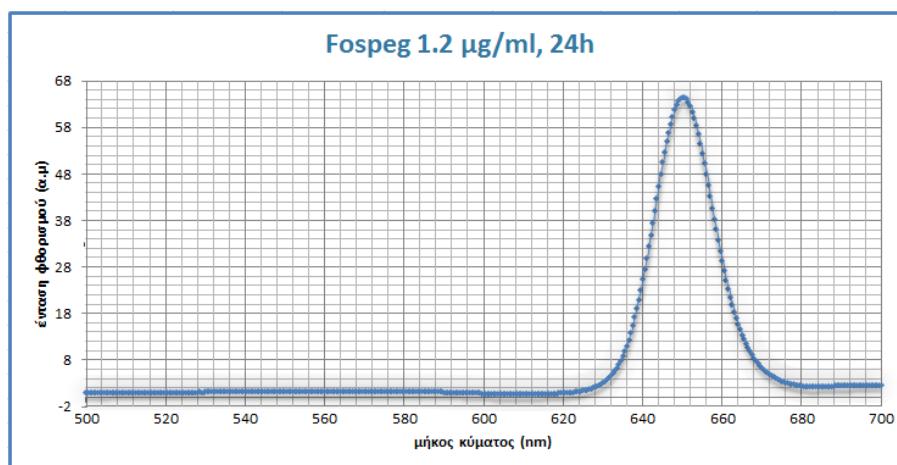
Σχήμα 2.37: Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 1.2 µg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 6h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 187.55 α.μ.

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 12h



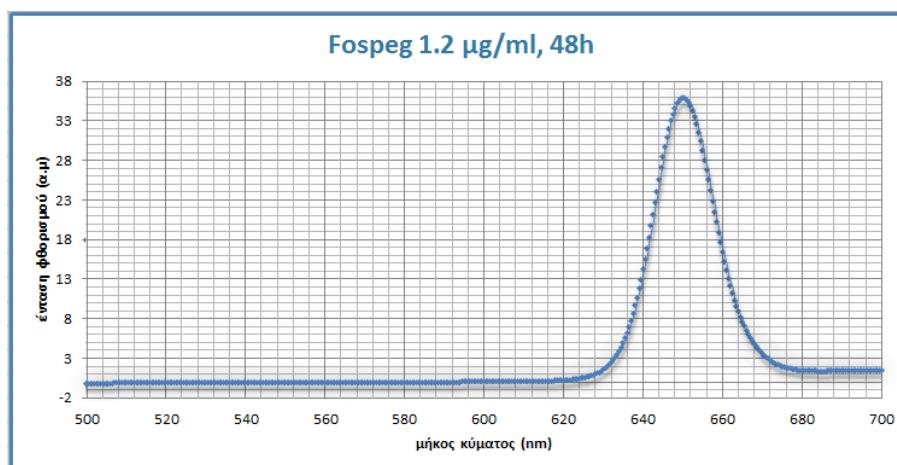
Σχήμα 2.38: Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 1.2 µg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 12h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 90.23 α.μ.

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 24h



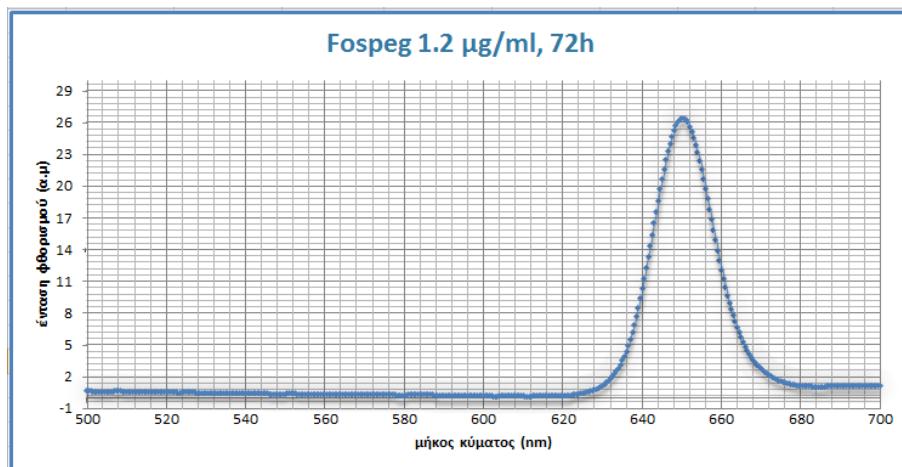
Σχήμα 2.39: Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 1.2 µg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 24h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 64.53 a.u.

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 48h



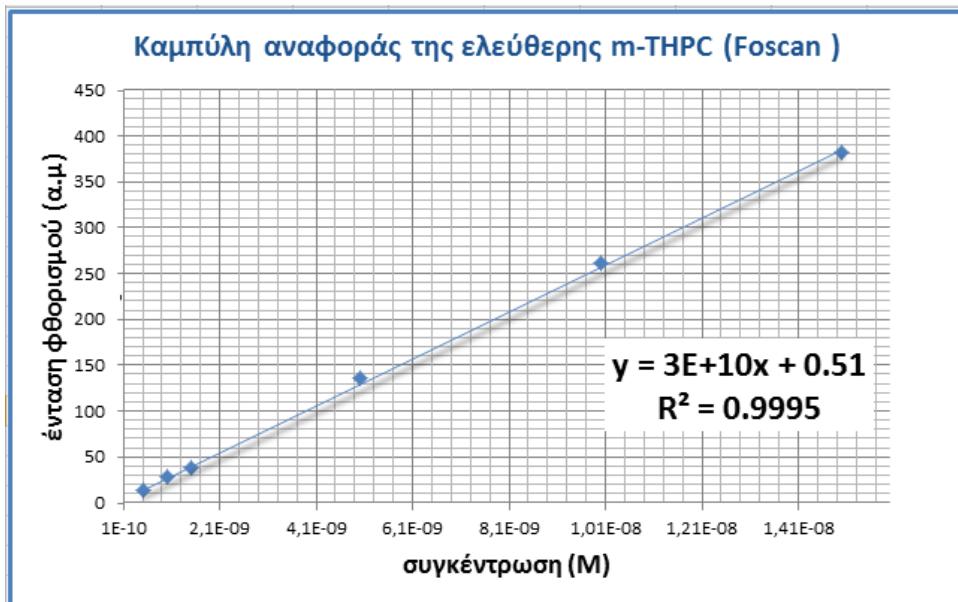
Σχήμα 2.40: Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 1.2 µg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 48h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 35.90 a.u.

Χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας: 72h



Σχήμα 2.41: Φάσμα έντασης φθορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospege) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση 1.2 µg/ml για 24h και το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι 72h, με διέγερση στα 420 nm. Ένταση κορυφής 24.45 a.u.

2.4.5 Καμπύλες αναφοράς



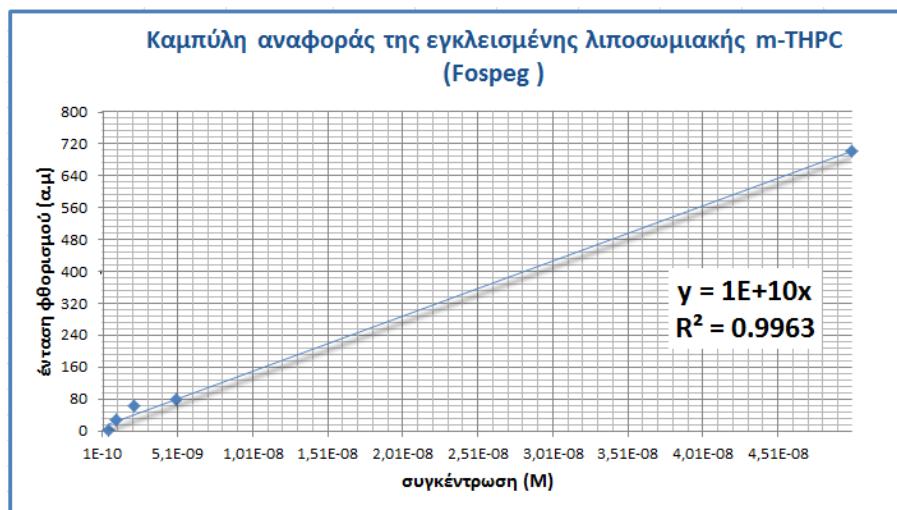
Σχήμα 2.42: Καμπύλη αναφοράς της ελεύθερης m-THPC (foscan)

Από το διάγραμμα (2.42) μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας που αποδεσμεύτηκε από τα καρκινικά κύτταρα. Η καμπύλη αναφοράς της ελεύθερης m-THPC (foscan) υπολογίζει την συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας:

$$y = 3 * 10^{10}x + 0.51 \Rightarrow y - 0.51 = 3 * 10^{10}x \Rightarrow x = \frac{y - 0.51}{3 * 10^{10}} \quad (2.10)$$

Από το διάγραμμα (2.43) μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας που αποδεσμεύτηκε από τα καρκινικά κύτταρα. Από την καμπύλη αναφοράς της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) υπολογίζεται η συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας:

$$y = 10^{10}x \Rightarrow x = \frac{y}{10^{10}} \quad (2.11)$$



Σχήμα 2.43: Καμπύλη αναφοράς της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg)

2.5 Συμπεράσματα

2.5.1 Σύγκριση εγκλεισμένης λιποσωμιακής και ελεύθερης m-THPC (foscan και fospeg)

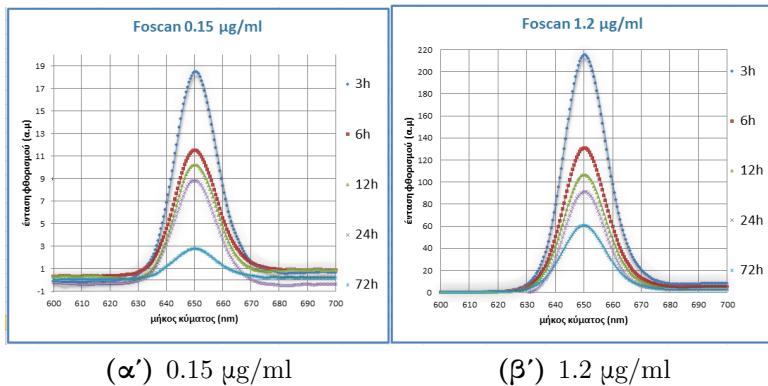
Ένταση φθορισμού

Είναι φανερό από τους παρακάτω πίνακες (2.1) και (2.2) ότι η ένταση φθορισμού της φωτοευαίσθητης ουσίας μειώνεται με την αύξηση του χρόνου.

Στον παρακάτω πίνακα (2.1) και παρουσιάζονται οι τιμές της κορυφής έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) σε κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με συγκεντρώσεις 0.15 µg/ml και 1.2 µg/ml σαν συνάρτηση του χρονικού διαστήματος απομάκρυνσης της φωτοευαίσθητης ουσίας. Υπάρχει απότομη μείωση της έντασης και στις δύο συγκεντρώσεις μεταξύ των 3 και 6 ωρών και στη συνέχεια βαθμιαία μείωση ανάλογη της ώρας. Για τη συγκέντρωση 0.15 µg/ml της Foscan η μέγιστη ένταση φθορισμού είναι 18.47 α.μ. και η ελάχιστη 2.80 α.μ. ενώ για τη συγκέντρωση 1.2 µg/ml της Foscan η μέγιστη ένταση φθορισμού είναι 215.15 α.μ. και η ελάχιστη 60.73 α.μ.

	Foscan	0.15 µg/ml	1.2 µg/ml
3h	18.47	215.15	
6h	11.53	130.78	
12h	10.21	106.78	
24h	9.15	91.00	
72h	2.80	60.73	

Πίνακας 2.1: Οι μέγιστες τιμές της έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) σε κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με συγκεντρώσεις 0.15 µg/ml και 1.2 µg/ml συνάρτηση του χρονικού διαστήματος απομάκρυνσης της φωτοευαίσθητης ουσίας.

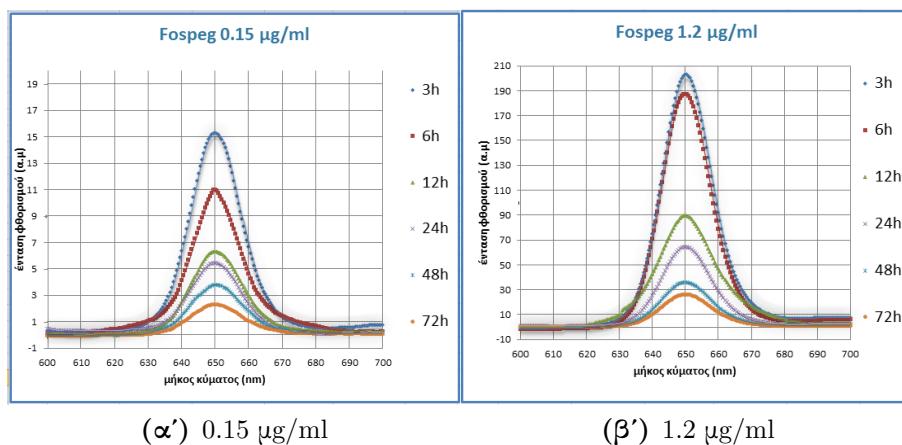


Σχήμα 2.44: Φάσμα έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση (α') 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και (β') 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ για 24h συνάρτηση του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας και 72h, με διέγερση στα 420 nm

Στον επόμενο πίνακα (2.2) παρουσιάζονται οι τιμές της κορυφής έντασης φυσιορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με συγκεντρώσεις 0.15 µg/ml και 1.2 µg/ml σαν συνάρτηση του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνσης της φωτοευαίσθητης ουσίας. Στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν παρατηρείτε απότομη μείωση της έντασης μεταξύ των 3 και 6 ωρών, όπως με την ελεύθερη m-THPC (foscan), αλλά η απότομη μείωση της έντασης παρατηρείται μεταξύ των 3 και 12 ωρών. Για τη συγκέντρωση 0.15 µg/ml της Foscan η μέγιστη ένταση φυσιορισμού είναι 15.30 α.μ. και η ελάχιστη 2.32 α.μ. ενώ για τη συγκέντρωση 1.2 µg/ml της Foscan η μέγιστη ένταση φυσιορισμού είναι 202.91 α.μ. και η ελάχιστη 26.45 α.μ.

Fospeg	0.15 µg/ml	1.2 µg/ml
3h	15.30	202.91
6h	11.14	187.55
12h	6.33	90.23
24h	5.47	64.53
48h	3.80	35.90
72h	2.32	26.45

Πίνακας 2.2: Οι μέγιστες τιμές της έντασης φυλορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με συγκεντρώσεις 0.15 µg/ml και 1.2 µg/ml συνάρτηση του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας.



Σχήμα 2.45: Φάσμα έντασης φυσορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (foscine) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκέντρωση (α') 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και (β') 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ για 24h συνάρτηση του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας, με διέγερση στα 420 nm

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές της κορυφής έντασης φυσιορισμού της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) και της ελεύθερης (foscans) σε κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με συγκέντρωση 0.15 μg/ml σαν συνάρτηση του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνσης της φωτοευαίσθητης ουσίας. Στην συγκεκριμένη περίπτωση παρατηρείται βαθμιαία μείωση ανάλογη της ώρας. Η μέγιστη τιμή στην Fospeg είναι 15.30 α.μ. ενώ στην Foscan είναι 18.47 α.μ. Η διαφορά τους είναι 3.17 α.μ. για τις μέγιστες τιμές ενώ για τις ελάχιστες είναι 0.48 α.μ. Όπως είναι φανερό στην φωτοευαίσθητη ουσία Foscan παρατηρούνται μεγαλύτερες τιμές.

0.15 µg/ml	Fospeg	Foscan
3h	15.30	18.47
6h	11.14	11.53
12h	6.33	10.21
24h	5.47	9.15
72h	2.32	2.8

Πίνακας 2.3: Οι μέγιστες τιμές της έντασης φυδορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscan) και της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με συγκέντρωση 0.15 μg/ml συνάρτηση του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας.

Ο πίνακας παρουσιάζει τις τιμές της κορυφής έντασης φυσορισμού της εγκλει-

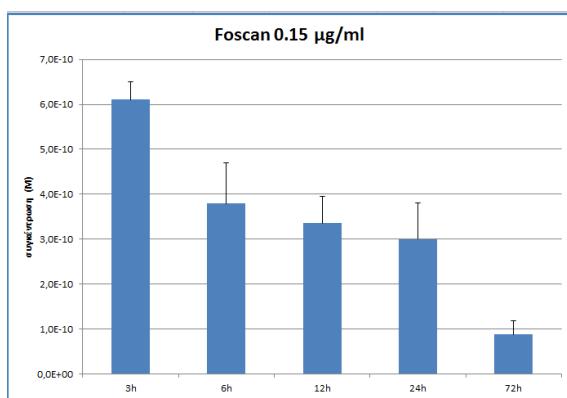
συμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) και της ελεύθερης (foscans) σε κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με συγκέντρωση 0.15 μg/ml σαν συνάρτηση του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας. Η μέγιστη τιμή για το Fospeg είναι 202.91 α.μ. ενώ για το Foscans είναι 215.15 α.μ. Η διαφορά τους είναι 12.24 α.μ. για τις μέγιστες τιμές ενώ για τις ελάχιστες είναι 34.28 α.μ. Όπως είναι φανερό στην φωτοευαίσθητη ουσία Foscans παρατηρούνται μεγαλύτερες τιμές και σε αυτήν τη συγκέντρωση με μεγαλύτερη διαφορά έντασης στις 72 ώρες.

1.2 μg/ml	Fospeg	Foscans
3h	202.91	215.15
6h	187.55	130.78
12h	90.23	106.78
24h	64.53	91.00
72h	26.45	60.73

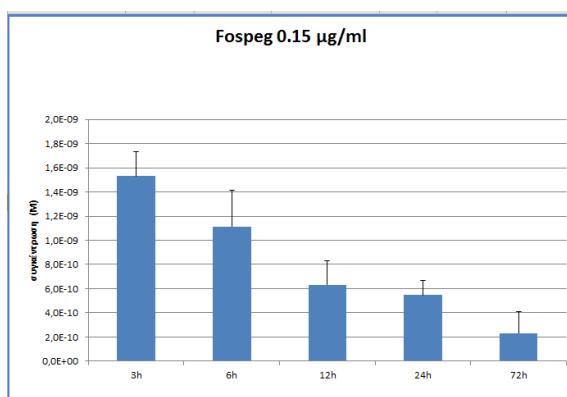
Πίνακας 2.4: Οι μέγιστες τιμές της έντασης φθορισμού της ελεύθερης m-THPC (foscans) και της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) σε καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με συγκέντρωση 0.15 μg/ml συνάρτηση του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνσης της φωτοευαίσθητης ουσίας.

Συγκέντρωση

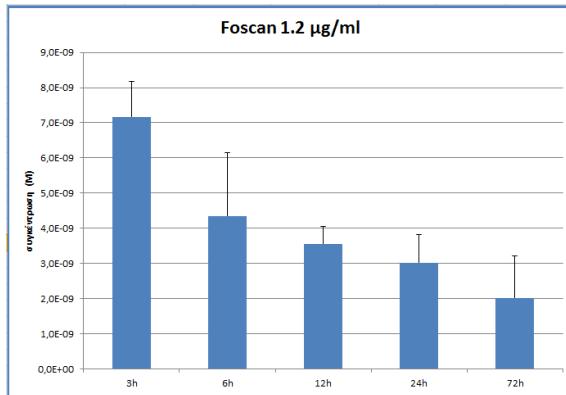
Από τις καμπύλες αναφοράς μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας για την ελεύθερη (foscan) και την εγκλεισμένη λιποσωμιακή μορφή της m-THPC (fospeg). Από τα διαγράμματα είναι ξεκάθαρο και αναμενόμενο ότι η συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας μειώνεται σε σχέση με το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας.



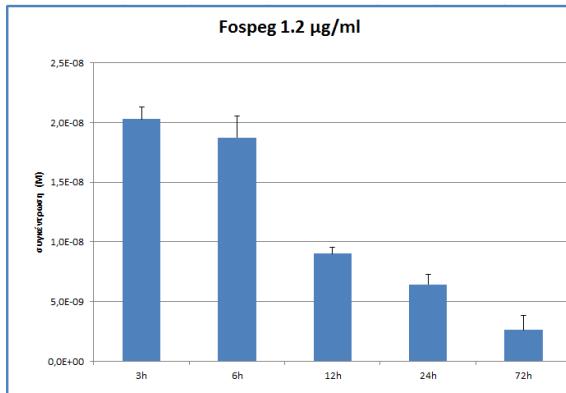
Σχήμα 2.46: Διάγραμμα ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της ελεύθερης m-THPC (foscan) φωτοευαίσθητης ουσίας μεταξύ του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση $0.15 \mu\text{g}/\text{ml}$. Με μέγιστη τιμή στα $6.11 \times 10^{-10} \text{ M}$ και ελάχιστη στα $0.88 \times 10^{-10} \text{ M}$



Σχήμα 2.47: Διάγραμμα ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) μεταξύ του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση $0.15 \mu\text{g}/\text{ml}$. Με μέγιστη τιμή στα $15.30 \times 10^{-10} \text{ M}$ και ελάχιστη στα $0.23 \times 10^{-10} \text{ M}$



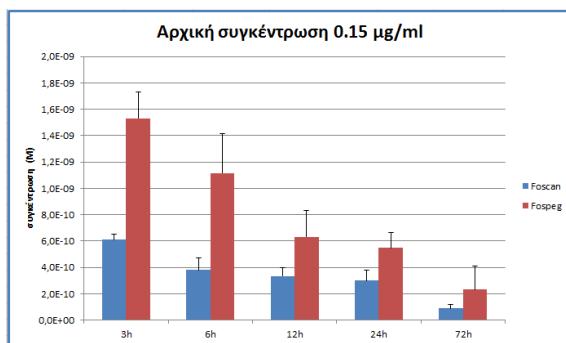
Σχήμα 2.48: Διάγραμμα ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της ελεύθερης m-THPC (foscan) φωτοευαίσθητης ουσίας μεταξύ του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση 1.2 μg/ml. Με μέγιστη τιμή στα 7.17×10^{-9} M και ελάχιστη στα 2.02×10^{-9} M



Σχήμα 2.49: Διάγραμμα ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) μεταξύ του χρονικού διαστήματος μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση 1.2 μg/ml. Με μέγιστη τιμή στα 20.29×10^{-9} M και ελάχιστη στα 2.65×10^{-9} M

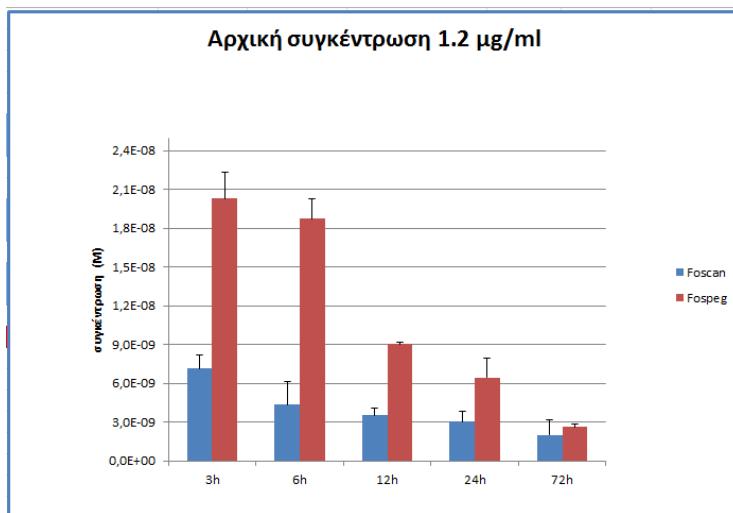
Στο παρακάτω διάγραμμα μπορούμε να συγχρίνουμε την ενδοκυτταρική συγκέντρωση της ελεύθερης (foscan) και της εγκλεισμένης λιποσωμιακής μορφής m-THPC (fospeg) στο χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση 0.15 μg/ml. Παρατηρείται ότι οι τιμές της εγκλεισμένης λιποσωμιακής μορφής m-THPC (fospeg) είναι μεγαλύτερες, δηλαδή η fospeg έχει περισσότερη απορρόφηση της φωτοευαίσθητης ουσίας από την καρκινική σειρά σε σχέση με την foscan. Στις 3 ώρες παρατηρούμε μεγάλη διαφορά συγκέντρωσης, η εγκλεισμένη λιποσωμιακή μορφή της m-THPC (fospeg) έχει περισσότερο από την διπλάσια ποσό-

τητα της ελεύθερης μορφής (foscan) ενώ στις 72 ώρες η διαφορά είναι ελάχιστη όπου, η ελεύθερη μορφή (foscan) έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση ($0.88 \cdot 10^{-10} \text{ M}$) από ότι η εγκλεισμένη λιποσωμιακή μορφή (fospeg) ($0.23 \cdot 10^{-10} \text{ M}$).



Σχήμα 2.50: Διάγραμμα ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της ελεύθερης (foscan) και της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) κατά χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση $0.15 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}$

Ομοίως και για το παρακάτω διάγραμμα, όπου μπορούμε να συγχρίνουμε την ενδοκυτταρική συγκέντρωση της ελεύθερης (foscan) και της εγκλεισμένης λιποσωμιακής μορφής m-THPC (fospeg) για το χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση $1.2 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}$. Παρατηρείται ότι οι τιμές της εγκλεισμένης λιποσωμιακής μορφής m-THPC (fospeg) είναι μεγαλύτερες, δηλαδή η fospeg έχει περισσότερη κατακρατήση της φωτοευαίσθητης ουσίας από ότι η foscan. Στις 3 ώρες παρατηρούμε μεγάλη διαφορά συγκέντρωσης, η εγκλεισμένη λιποσωμιακή μορφή της m-THPC (fospeg) έχει περισσότερο από την διπλάσια ποσότητα της ελεύθερης μορφής (foscan), όπως και με την αρχική συγκέντρωση $0.15 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}$. Στις 72 ώρες η διαφορά είναι ελάχιστη ($6.3 \cdot 10^{-10}$) και η εγκλεισμένη λιποσωμιακή μορφή (fospeg) έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση ($2.65 \cdot 10^{-9} \text{ M}$) από ότι η ελεύθερη μορφή (foscan) ($2.02 \cdot 10^{-9} \text{ M}$).



Σχήμα 2.51: Διάγραμμα ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της ελεύθερης (foscan) και της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (fospeg) κατά χρονικό διάστημα μετά την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση 1.2 μg/ml

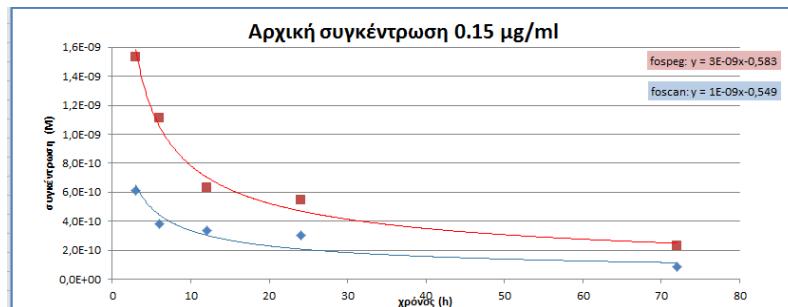
Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, προκύπτει ότι η εγκλεισμένη λιποσωμιακή μορφής της m-THPC (fospeg) ενισχύει την πρόληψη της φωτοευαίσθητης ουσίας από τα καρκινικά κύτταρα, δηλαδή έχει περισσότερη απορρόφηση από την καρκινική σειρά. Με το παραπάνω χαρακτηριστικό μπορούμε να αντιληφθούμε ότι η φωτοευαίσθητη ουσίας της εγκλεισμένης λιποσωμιακής μορφής m-THPC (fospeg) οδηγεί στη μείωση της δόσης της φωτοευαίσθητης ουσίας, αυτό συμβάλει σημαντικά στην εξάλειψη της φωτοευαίσθησίας μετά την φωτοδυναμική θεραπεία.

Αποδέσμευση

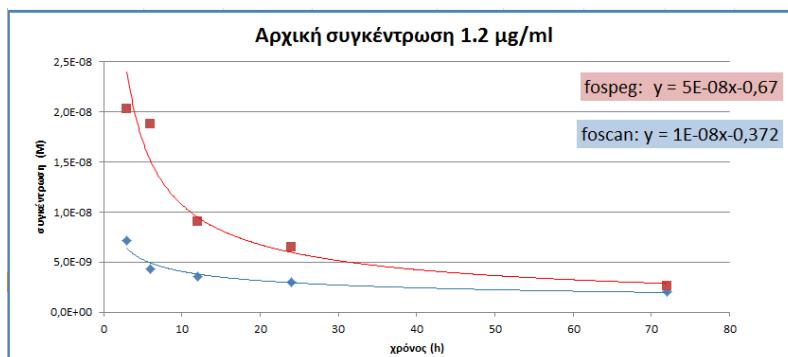
Γνωρίσουμε ότι μια σημαντική ιδιότητα την ιδανικής φωτοευαίσθητης ουσίας είναι η γρήγορη αποδέσμευση της φωτοευαίσθητης ουσίας από τον οργανισμό, όπως και η προφύλαξη του ασθενούς από την ηλιακή ακτινοβολία. Όσο η φωτοευαίσθητη ουσία παραμένει στον οργανισμό του ασθενούς, ο ασθενής θα πρέπει να προφυλάσσεται από την ηλιακή ακτινοβολία.

Παρακάτω μπορούμε να δούμε τη γραφική παράσταση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης και του χρόνου, μετά από την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας.

Η μορφή της είναι $y = ax^{-b}$.



Σχήμα 2.52: Γραφική παράσταση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης και του χρόνου, μετά από την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση 0.15 µg/ml



Σχήμα 2.53: Γραφική παράσταση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης και του χρόνου, μετά από την απομάκρυνση της φωτοευαίσθητης ουσίας με αρχική συγκέντρωση 1.2 µg/ml

Εστώ

$$y_{foscan} = y_{fospeg}$$

$$\Leftrightarrow a_{foscan}x^{-b_{foscan}} = a_{fospeg}x^{-b_{fospeg}} \Leftrightarrow \quad (2.12)$$

$$\frac{a_{foscan}}{x^{b_{foscan}}} = \frac{a_{fospeg}}{x^{b_{fospeg}}} \quad (2.13)$$

$$\Leftrightarrow \dots \Leftrightarrow \quad (2.14)$$

$$\Leftrightarrow \ln x_{fospeg} = \frac{\ln a_{fospeg} - \ln a_{foscan} + b_{foscan} \ln x_{foscan}}{b_{fospeg}} \quad (2.15)$$

- Για αρχική συγκέντρωση $0.15 \text{ } \mu\text{g/ml}$: $a_{foscan} = 10^{-9}$, $b_{foscan} = 0.549$ και $a_{fospeg} = 310^{-9}$, $b_{fospeg} = 0.583$
- Για αρχική συγκέντρωση $1.2 \text{ } \mu\text{g/ml}$: $a_{foscan} = 10^{-8}$, $b_{foscan} = 0.372$ και $a_{fospeg} = 510^{-8}$, $b_{fospeg} = 0.67$

Αν βάλουμε τις συνθήκες που προκύπτουν από τα παραπάνω διαγράμματα έχουμε και για τις δύο περιπτώσεις (αρχική συγκέντρωση $0.15 \text{ } \mu\text{g/ml}$ και $1.2 \text{ } \mu\text{g/ml}$) ότι:

$$x_{fospeg} < x_{foscan}$$

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, προκύπτει ότι η εγκλεισμένη λιποσωμιακή μορφή της m-THPC (fospeg) αυξάνει τον ρυθμό της αποδέσμευσης από τα καρκινικά κύτταρα, δηλαδή η εγκλεισμένη λιποσωμιακής μορφής της m-THPC (fospeg) απομακρύνει την φωτοευαίσθητη ουσία πιο γρήγορα από την ελεύθερη μορφή της (foscan). Αυτό συμβάλει σημαντικά στην εξάλειψη της φωτοευαίσθησίας μετά την φωτοδυναμική θεραπεία, διότι η (fospeg) αποδεσμεύεται ταχύτερα από την (foscan)

2.5.2 Προοπτικές - Επίλογος

Η φωτοδυναμική θεραπεία έχει αρχίσει και δείχνει την σημαντική ισχύ της ως μία είτε εναλλακτική είτε ως συνεπικουρική θεραπεία στην αντιμετώπιση της ασθένειας του καρκίνου του προστάτη. Αρκετές φωτοευαίσθητες ουσίες χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία, οι οποίες διαφέρουν σε αρκετά χαρακτηριστικά τους. Η φωτοευαίσθητη ουσία m-THPC είναι αρκετά υποσχόμενη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αυτή τη θεραπεία. Όμως περισσότερες δυνατότητες και προοπτικές φαίνεται να παρουσιάζει η εγκλεισμένη λιποσωμιακή μορφή της.

Είναι φανερό από την παραπάνω μελέτη, η εγκλεισμένη λιποσωμιακή μορφή της m-THPC εισάγει νέες βελτιώσεις που ενισχύουν την πρόληψη της φωτοευαίσθητης ουσίας από τα καρκινικά κύτταρα και αυξάνει τον ρυθμό της αποδέσμευσης από αυτά, το οποίο συμβάλει στη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας. Με τα παραπάνω χαρακτηριστικά μπορούμε να αντιληφθούμε ότι η φωτοευαίσθητη ουσίας της εγκλεισμένης λιποσωμιακής μορφής m-THPC fospeg οδηγεί στη μείωση της δόσης της φωτοευαίσθητης ουσίας και με την γρήγορη αποδέσμευση της, αυτό συμβάλει σημαντικά στην εξάλειψη της φωτοευαισθησίας μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία.

Μέσα από νέα πειράματα και μελέτες, η εγκλεισμένη λιποσωμιακή μορφή της m-THPC, καθώς και άλλες φωτοευαίσθητες ουσίες μπορούν να συμβάλουν καθοριστικά στην εξέλιξη και στη βελτίωση της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Bibliography

- [1] R Ackroyd, C Kelty, N Brown, and M Reed. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology*, 74(5):656–669, November 2001.
- [2] D Kessel. Photodynamic therapy: from the beginning. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(1):3–7, May 2004.
- [3] J Moan and Q Peng. *An outline of the history of PDT*. 2003.
- [4] Luis Amselem, Kaan Gündüz, Alfredo Adan, Melisa ZiE•an KarslıoD•lu, Amanda Rey, Noelia Sabater, and Xavier Valldeperas. Photodynamic Therapy of Symptomatic Choroidal Nevi. *Middle East African journal of ophthalmology*, 18(4):309–313, January 2011.
- [5] A Castano, T Demidova, and M Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: part one, photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(4):279–293, December 2004.
- [6] Tayyaba Hasan, Bernhard Ortel, Anne C E Moor, and Brian W Pogue. *Photodynamic Therapy of Cancer*. 5th edition.
- [7] S B Brown, E A Brown, and Ian Walker. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The lancet oncology*, 5(8):497–508, 2004.
- [8] T Dougherty, C Gomer, B Henderson, G Jori, D Kessel, M Korbelik, J Moan, and Q Peng. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(12):889–905, June 1998.

- [9] Nimalan Arumainayagam, C M Moore, Hashim U Ahmed, and M Emberton. Photodynamic therapy for focal ablation of the prostate. *World journal of urology*, 28(5):571–6, October 2010.
- [10] K Kalka, H Merk, and H Mukhtar. Photodynamic therapy in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42(3):389–413; quiz 414–6, March 2000.
- [11] A Kubler. Photodynamic therapy. *Medical Laser Application*, 20(1):37–45, May 2005.
- [12] University of Athens & Department of Chemistry. Fasmatometria moriakis fotaugeias. Technical report.
- [13] Maria Kiriazi. *Study of photodynamic therapy and autioxidants synergistic action on skin cancer using photophysical methods*. PhD thesis, 2007.
- [14] Ángeles Juarranz, Pedro Jaén, Francisco Sanz-Rodríguez, Jesús Cuevas, and Salvador González. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clinical and Translational Oncology*, 10(3):148–154, April 2008.
- [15] Universite Henri and Poincare Nancy. *Photophysical and Photobiological characteristics of liposomal mTHPC*. PhD thesis, 2009.
- [16] P Bilski, G Motten, M Bilska, and F Chignell. The photooxidation of diethylhydroxylamine by rose bengal in micellar and nonmicellar aqueous solutions. *Photochemistry and photobiology*, 58(1):11–8, July 1993.
- [17] Further Reading. Photodynamic Therapy of Cancer Photoproperties of Photosensitizers. *Annual Review of Physical Chemistry*, pages 53–62, 2005.
- [18] C A Robertson, D Hawkins Evans, and H Abrahamse. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 96(1):1–8, July 2009.
- [19] Caroline M Moore, Doug Pendse, and Mark Emberton. Photodynamic therapy for prostate cancer—a review of current status and future promise. *Nature clinical practice. Urology*, 6(1):18–30, January 2009.

- [20] G Andrikoulas, M & Bartholomatos. Apoptosis, cell death prerequisite for life. *Medicine*, 18(5):496–513, 2001.
- [21] J Gujral, T Bucci, A Farhood, and H Jaeschke. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 33(2):397–405, February 2001.
- [22] Nancy L Oleinick, Rachel L Morris, and Irina Belichenko. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(1):1–21, January 2002.
- [23] C Haanen and I Vermes. Apoptosis: programmed cell death in fetal development. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 64(1):129–33, January 1996.
- [24] S Sen. Programmed cell death: concept, mechanism and control. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 67(3):287–319, August 1992.
- [25] Guido Majno and Isabelle Joris. Apoptosis, Oncosis and Necrosis. 146(1):3–15, 1995.
- [26] S Pileri, S Poggi, E Sabattini, S Santucci, G Melilli, B Falini, and P Tosi. Apoptosis as programmed cell death (PCD): Cupio dissolvi in cell life. *Apoptosis*, (I 994):48–55, 1994.
- [27] Michael Jacobson, Miguel Weil, and Martin Raff. Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell*, 88(1):347–354, 1997.
- [28] P Saikumar, Z Dong, V Mikhailov, M Denton, J M Weinberg, and M A Venkatachalam. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *The American journal of medicine*, 107(5):489–506, November 1999.
- [29] A Castano, T Demidova, and M Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: part two”cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(1):1–23, March 2005.
- [30] Aladin Milutinovic. Application of Photodynamic Therapy to Lung Cancer Treatment. pages 1–16, 2007.
- [31] Emily Wetzel, Caitlin Siegel, Elise Greer. Photodynamic Therapy: Seeing the Light in Cancer Treatment. *University of North Carolina at Chapel Hill*, 2005.

- [32] R Allison. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(1):27–42, May 2004.
- [33] Timothy C. Zhu and Jarod C. Finlay. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. *Medical Physics*, 35(7):3127, 2008.
- [34] L Prasmickaite and A Bonsted. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and. *Journal of Microscopy*, 218(May):133–147, 2005.
- [35] Emma S Nyman and Paavo H Hynninen. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 73(1-2):1–28, January 2004.
- [36] Stephen Detty, Michael & Gibson, Scott & Wagner. Current Clinical and Pre-clinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *Medicinal Chemistry*, 47(16), 2004.
- [37] C Hopper. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *The lancet oncology*, 1:212–9, December 2000.
- [38] Ingrid Wang. *Photodynamic therapy and laser-based diagnostic studies of malignant tumours*. PhD thesis, 1999.
- [39] Two-year Results Evaluating, Tumor Response, and Cosmetic Outcomes. Photodynamic Therapy of Multiple Nonmelanoma Skin Cancers With Verteporfin and Red Lightb•“Emitting Diodes. *Archives of Dermatology*, 140, 2004.
- [40] Irene Georgakoudi. Effects of photosensitizer Bleaching and localization on photodynamic oxygen consumption and dosimetry, 1998.
- [41] Juergen Berlanda, Tobias Kiesslich, Victoria Engelhardt, Barbara Krammer, and Kristjan Plaetzer. Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 100(3):173–180, September 2010.
- [42] A Castano, T Demidova, and M Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(2):91–106, June 2005.

- [43] Thomas L Andresen, Simon S Jensen, and Kent Jørgensen. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Progress in lipid research*, 44(1):68–97, January 2005.
- [44] Yvette Niamien Konan, Robert Gurny, and Eric Allémann. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 66(2):89–106, March 2002.
- [45] Stella Durai. *Study of the influence of agents and other macerating excipients in release of locomotive liposomal drugs when liposomes are dispersed in hydrogels*. PhD thesis, University of Patra, 2006.
- [46] Danilo D Lasic. Liposomes. *Science & Medicine*, 1996.
- [47] A Derycke. Liposomes for photodynamic therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(1):17–30, January 2004.
- [48] Jan-Willem Hofman, Myrra G Carstens, Femke van Zeeland, Conny Helwig, Frits M Flesch, Wim E Hennink, and Cornelus F van Nostrum. Phototoxicity of mTHPC (temoporfin) loaded polymeric micelles mediated by lipase catalyzed degradation. *Pharmaceutical research*, 25(9):2065–2073, September 2008.
- [49] Sebastiaan Visscher, Slávka Kaščáková, Henriëtte Bruijn, Angélique Van Der Ploeg Van Den Heuvel, Arjen Amelink, Henricus Sterenborg, Dominic Robinson, Jan Roodenburg, and Max Witjes. Fluorescence localization and kinetics of mTHPC and liposomal formulations of mTHPC in the window-chamber tumor model. *Lasers in surgery and medicine*, 43(6):528–36, August 2011.
- [50] Counting Cells with a Hemocytometer Protocol. *National Science Foundation, Biotech & MSUM Biochem*, 2006.
- [51] Signal Transduction, Ilhog Ri, Ylhz Wr, Ghwhuplqh Wkh, Qxpehu Ri, Fhoov Shu, H U Ri, W K H Fkdpehu, U H Dfwxdoo, Fkdpehuv Rq, Hdfk Khprf, Wrphwhu Wkh, and Hwfkhg Olqhv. APPENDIX G : Basics of Using a Hemocytometer. *Signal Transduction*, pages 5–6, 2010.
- [52] P J Hansen. Use of a Hemocytometer Protocol. *University of Florida*, pages 4–5.

- [53] Monika Ritsch-Marte and Andreas Zilmmermann. *Mthpc Fluorescence as a Ph-Insensitive Tumor Marker in a Combined Photodynamic Diagnosis and Photodynamic Therapy Treatment of Malignant Brain Tumors.* World Scientific Publishing, university edition, October 2002.
- [54] C M Yow, J Y Chen, N K Mak, N H Cheung, and a W Leung. Cellular uptake, subcellular localization and photodamaging effect of temoporfin (mTHPC) in nasopharyngeal carcinoma cells: comparison with hematoporphyrin derivative. *Cancer letters*, 157(2):123–31, September 2000.
- [55] J Y Chen, N K Mak, C M Yow, M C Fung, L C Chiu, W N Leung, and N H Cheung. The binding characteristics and intracellular localization of temoporfin (mTHPC) in myeloid leukemia cells: phototoxicity and mitochondrial damage . *Photochemistry and photobiology*, 72(4):541–7, October 2000.
- [56] Sebastiaan De Visscher, Dominic J Robinson, Slávka Kaščáková, Riette De Brujin, Angelique Poeg, Henricus Jcm Sterenborg, Jan Ln Roodenburg, and Max Jh Witjes. Fluorescence kinetics of Foscan, Fospeg and Foslip in the window-chamber model. *Head & Neck Oncology*, 1(Suppl 1):O18, 2009.
- [57] Aspasia Petri, Dido Yova, Eleni Alexandratou, Maria Kyriazi, and Michail Rallis. Comparative characterization of the cellular uptake and photodynamic efficiency of Foscan and Fospeg in a human prostate cancer cell line. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, May 2012.
- [58] Julia Buchholz, Barbara Kaser-Hotz, Tania Khan, Carla Rohrer Bley, Katja Melzer, Reto a Schwendener, Malgorzata Roos, and Heinrich Walt. Optimizing photodynamic therapy: in vivo pharmacokinetics of liposomal meta-(tetrahydroxyphenyl)chlorin in feline squamous cell carcinoma. *American Association for Cancer*, 11(20):7538–44, October 2005.