



Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τίτλος διπλωματικής εργασίας

Μελέτη δράσης φωτοδυναμικής θεραπείας σε
συνδυασμό με καταστολή της ενδοκυττάριας
αντιοξειδωτικής άμυνας σε καρκινικά κύτταρα
του προστάτη.

Σπανάκης Μηνάς

Επιβλέπουσα καθηγήτρια

Διδώ Γιόβα

Αθήνα 2012

*Αφιερώνεται,
στην οικογένειά μου**

Περίληψη

Ο καρκίνος του προστάτη είναι σήμερα ο συχνότερος καρκίνος που διαγιγνώσκεται στους άνδρες ηλικίας 50-80 ετών. Για τη θεραπεία του - εφαρμόζονται μια σειρά από διαφορετικές θεραπευτικές μεθόδους όπως χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, προστατεκτομή και άλλες. Η ανάγκη για απαλλαγή από τις παρενέργειες που σχετίζονται με αυτές τις συμβατικές θεραπευτικές μεθόδους οδήγησε στην αναζήτηση νέων θεραπειών. Η φωτοδυναμική θεραπεία, μια καινοτόμος ελάχιστα επεμβατική μέθοδος, κατέχει σημαντική θέση ανάμεσα σε αυτές. Βασίζεται στη νέκρωση του καρκινικού ιστού έπειτα από τη συνδυαστική επίδραση του ορατού φωτός με φωτοευαισθητοποιητή και οξυγόνο. Πολλοί διαφορετικοί φωτοευαισθητοποιητές έχουν μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί με το πέρασμα των χρόνων. Ανάμεσα σε αυτούς, ο φωτοευαισθητοποιητής m-THPC (Foscan) εμφανίζει συγκριτικά πλεονεκτήματα καθώς χορηγείται στη χαμηλότερη δόση σε σχέση με τους υπόλοιπους και ενεργοποιείται με τη χαμηλότερη δόση ενέργειας. Παρόλη την εξαιρετική φωτοδυναμική του δράση, το πρόβλημα της φωτοευαισθησίας, αν και μικρότερο σε σχέση με άλλους φωτοευαισθητοποιητές, παραμένει. Η προσπάθεια βελτίωσης της αποτελεσματικότητας της φωτοδυναμικής θεραπείας, μέσω της μείωσης της χορηγούμενης δόσης φωτοευαισθητοποιητή, οδηγεί στο συνδυασμό της με άλλους παράγοντες. Ένας από αυτούς είναι ο παράγοντας BSO, ο οποίος παρεμποδίζει την ενδοκυττάρια σύνθεση της γλουταθειόνης. Η γλουταθειόνη παρέχει αντιοξειδωτική άμυνα στα κύτταρα και κατά συνέπεια, η μείωση της τα καθιστά πιο ευάλωτα ως προς οξειδωτικά ερεθίσματα.

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη της δράσης που προκαλεί η φωτοδυναμική θεραπεία σε συνδυασμό με καταστολή της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα προστάτη σειράς LNCaP, φωτοευαισθητοποιητής m-THPC (Foscan) για την επαγωγή της φωτοδυναμικής δράσης, καθώς και ο παράγοντας BSO σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για την καταστολή της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας.

Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα, προέκυψε ότι ο συνδυασμός της φωτοδυναμικής θεραπείας με τον παράγοντα BSO σε συγκεκριμένες συνθήκες, μπορεί να οδηγήσει στην ενίσχυση της φωτοδυναμικής δράσης.

Abstract

Nowadays prostate cancer, is the most common cancer diagnosed in men aged 50-80 years. A number of different treatments such as chemotherapy, radiotherapy, prostatectomy etc are applied for its treatment. The need for overcoming from the side effects associated with these conventional therapies has led to research to develop new therapies. Photodynamic therapy, an emerging new modality for treatment of cancerous and non-cancerous diseases, holds a significant place among them. Photodynamic therapy is based on the combined effect of visible light, photosensitizer and oxygen. Many different photosensitizers have been studied and used over the years. Among them, m-THPC (Foscan) shows comparative advantages as it is administered in relative low concentrations and low energy dose is required for its activation. Nevertheless, the side effect of prolonged photosensitivity following its administration, although less than other photosensitizers, still present. The effort to improve the effectiveness of photodynamic therapy, by reducing the dose of the administered photosensitizer, has led to the combination of the therapy with agents that may enhance its effect. One of them is the factor BSO, which inhibits the intracellular production of glutathione. Glutathione provides antioxidant protection to the cells which is considered as a major inhibitor of photodynamic therapy effect. Consequently the elimination of glutathione levels makes the cells more vulnerable to oxidative stimuli.

The purpose of this thesis is to study the effects of photodynamic therapy combined with suppression of intracellular antioxidant defense in prostate cancer cells. The prostate cancer cell line LNCaP was used as a model to study whether the synergy of Foscan - photodynamic therapy and BSO could enhance the cell death caused by PDT, at different concentrations for suppression of intracellular antioxidant defense.

Results revealed, that the combination of photodynamic therapy with BSO under certain experimental conditions, enhanced the photodynamic effect in the LNCaP cells.

Ευχαριστίες

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών ΕΜΠ, κυρία Διδώ Γιόβα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Επίσης, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην Ασπασία Πετρή, υποψήφια διδάκτορα, για τη συνεχή στήριξη και καθοδήγηση σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή της Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ, κύριο Μιχάλη Ράλλη, για τη συνεργασία.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	2
Abstract.....	3
Ευχαριστίες.....	4
Περιεχόμενα.....	5
Εικόνες - Σχήματα.....	10
Διαγράμματα.....	11

Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1.

Καρκίνος του προστάτη

1.1 Προστάτης: δομή και φυσιολογική λειτουργία.....	13
1.2 Αίτια εκδήλωσης του καρκίνου γενικά.....	13
1.3 Καρκίνος του προστάτη.....	14
1.4 Θεραπεία του καρκίνου του προστάτη.....	14
1.4.1 Θεραπευτικές μέθοδοι.....	15
1.4.1.1 Ενεργός παρακολούθηση – Κίνδυνοι.....	15
1.4.1.2 Προστατεκτομή - Κίνδυνοι και επιπλοκές	15
1.4.1.3 Ακτινοβολία - Παρενέργειες.....	16
1.4.1.4 Ορμονοθεραπεία - Παρενέργειες.....	16
1.4.1.5 Χημειοθεραπεία - Παρενέργειες.....	17
1.4.1.6 Κρυοθεραπεία -Παρενέργειες.....	17
1.5 Ανάγκη εμφάνισης νέας θεραπευτικής διαδικασίας.....	18

Κεφάλαιο 2.

Φωτοδυναμική θεραπεία

2.1 Εισαγωγή.....	19
2.2 Ιστορική αναδρομή.....	20
2.3 Μηχανισμοί φωτοδυναμικής δράσης.....	20
2.3.1 Αντίδραση τύπου I.....	22

2.3.2	Αντίδραση τύπου II.....	23
2.4	Μονοπάτια κυτταρικού θανάτου μετά τη φωτοδυναμική δράση.....	23
2.4.1	Απόπτωση.....	24
2.4.2	Νέκρωση.....	24
2.4.3	Αυτοφαγία.....	25
2.5	Πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας.....	25

Κεφάλαιο 3.

Φωτοευαισθητοποιητές

3.1	Εισαγωγή.....	27
3.2	Επιθυμητές ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητών.....	27
3.3	Κατηγορίες φωτοευαισθητοποιητών.....	28
3.3.1	Φωτοευαισθητοποιητές 1 ^{ης} γενιάς	28
3.3.1.1	Μειονεκτήματα φωτοευαισθητοποιητών 1 ^{ης} γενιάς.....	28
3.3.2	Φωτοευαισθητοποιητές 2 ^{ης} γενιάς.....	29
3.3.2.1	Χαρακτηριστικά φωτοευαισθητοποιητών 2 ^{ης} γενιάς.....	30
3.3.3	Φωτοευαισθητοποιητές 3 ^{ης} γενιάς.....	31
3.4	Ενδοκυτταρικές περιοχές – στόχοι των φωτοευαισθητοποιητών in vitro.....	32
3.5	Φαρμακοκινητικές ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητών , βιοκατανομή και συσσώρευση στους καρκινικούς όγκους.....	33
3.6	Μηχανισμοί καταστροφής καρκινικών όγκων μέσω ΦΔΘ (in vivo).....	33
3.7	Χαρακτηριστικά φωτοευαισθητοποιητή <i>m</i> -THPC (Foscan).....	35

Κεφάλαιο 4.

Γλουταθειόνη

4.1	Ιστορική αναδρομή.....	37
4.2	Ο κύκλος της γλουταθειόνης - δομή και σύνθεση.....	37
4.3	Εντοπισμός της γλουταθειόνης στο εσωτερικό του κυττάρου.....	38
4.4	Ο ρόλος της γλουταθειόνης στην κυτταρική λειτουργία.....	39
4.5	Η γλουταθειόνη στα καρκινικά κύτταρα.....	39
4.6	L-S,R-Μεθειονίνη σουλφοξιμίνη (BSO).....	40

Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 5.

5.1 Σκοπός.....	43
-----------------	----

Κεφάλαιο 6.

Πειραματικές διατάξεις

6.1 Κλίβανος επώασης.....	44
6.2 Καταψύκτης.....	44
6.3 Δοχείο υγρού αζώτου.....	45
6.4 Σύστημα Απεικονιστικής Μικροσκοπίας.....	45
6.5 Συστήματα laser για Φωτοδυναμική Θεραπεία.....	46
6.5.1 Χαρακτηριστικά των lasers ημιαγωγών.....	46
6.5.2 Βασική αρχή λειτουργίας των laser ημιαγωγών.....	46
6.5.3 Επαφή p-n.....	47
6.5.4 Λειτουργία των laser ημιαγωγών.....	48
6.5.5 Διοδικό Laser GaAlAs.....	49
6.5.6 Πειραματική διάταξη laser.....	50
6.5.6.1 Το σύστημα ψύξης.....	50
6.5.6.2 Τροφοδοσία της διόδου.....	51
6.5.6.3 Βαθμονόμηση διάταξης.....	51
6.6 Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης.....	53
6.6.1 Η αρχή της απορρόφησης της ακτινοβολίας, νόμος LAMBERT – BEER.....	53
6.6.2 Προϋποθέσεις για την ισχύ του νόμου LAMBERT – BEER.....	54
6.6.3 Αρχή λειτουργίας της διάταξης απορρόφησης.....	55
6.6.4 Διαχείριση σήματος απορρόφησης.....	57
6.7 Φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού.....	57
6.7.1 Εκπομπή φθορισμού.....	57
6.7.2 Η διάταξη φθορισμού.....	58
6.7.3 Αρχή λειτουργίας της διάταξης φθορισμού.....	58

Κεφάλαιο 7.

Μεθοδολογίες

7.1 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς LNCaP.....	60
--	----

7.2	Μεθοδολογία κατάψυξης κυτταρικής σειράς LNCaP.....	60
7.3	Μεθοδολογία απόψυξης κυτταρικής σειράς LNCaP.....	61
7.4	Μεθοδολογία ανακαλλιέργειας κυτταρικής σειράς LNCaP.....	61
7.5	Μεθοδολογία μέτρησης κυτταρικού αριθμού στο μικροσκόπιο.....	62
7.6	Επώαση των κυττάρων σε τριβλία με πλήρες θρεπτικό μέσο.....	63
7.7	Επώαση των κυττάρων σε τριβλία με διαφορετικές συγκεντρώσεις BSO σε πλήρες θρεπτικό μέσο.....	64
7.7.1	Διαλύματα BSO.....	65
7.8	Επώαση των κυττάρων σε τριβλία με m-THPC σε πλήρες θρεπτικό μέσο.....	65
7.8.1	Διάλυμα m-THPC.....	66
7.9	Πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας MTT.....	66
7.9.1	Διάλυμα MTT.....	66
7.9.2	Πειραματική διαδικασία.....	66
7.9.3	Σύσταση διαλύτη.....	67
7.9.4	Μέτρηση απορρόφησης δειγμάτων.....	67
7.10	Πρωτόκολλο μέτρησης επιπέδων γλουταθειόνης.....	68
7.10.1	Αντιδραστήρια.....	68
7.10.2	Διαλύματα.....	68
7.10.3	Προετοιμασία δειγμάτων.....	69
7.10.4	Μέτρηση φθορισμού δειγμάτων.....	69
7.11	Ακτινοβολήση με χρήση laser των κυττάρων που έχουν επωαστεί σε BSO (24h).....	71
7.11.1	Διαδικασία ακτινοβολήσης.....	71

Κεφάλαιο 8. Αποτελέσματα

8.1	Στατιστικός έλεγχος πειραματικών αποτελεσμάτων.....	73
8.2	Καμπύλη αναφοράς MTT.....	73
8.3	Επίδραση του παράγοντα BSO στη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς LNCaP έπειτα από 24ωρη επώαση.....	74
8.4	Καμπύλη αναφοράς επιπέδων της γλουταθειόνης.....	76
8.5	Επίδραση του παράγοντα BSO στα επίπεδα της γλουταθειόνης της κυτταρικής σειράς LNCaP.....	77
8.6	Επίδραση συνδυαστικής δράσης του παράγοντα BSO - φωτός στη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς LNCaP.....	78
8.7	Επίδραση της φωτοδυναμικής θεραπείας στη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς LNCaP.....	80

8.8	Επίδραση της φωτοδυναμικής θεραπείας σε συνδυασμό με τον παράγοντα BSO στη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς LNCaP.....	81
-----	---	----

Κεφάλαιο 9.

Σχολιασμός αποτελεσμάτων – Συμπεράσματα

9.1	Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων BSO στη βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων προστάτη LNCaP μετά την επώασή του σε αυτά για 24 ώρες.....	85
9.2	Επίδραση συνδυαστικής δράσης BSO - φωτός στη βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων προστάτη LNCaP.....	86
9.3	Επίδραση της φωτοδυναμικής θεραπείας με χρήση m-THPC στη βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων προστάτη LNCaP.....	86
9.4	Φωτοδυναμική θεραπεία με συνεργιστική δράση foscan - BSO και επίδραση στη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων προστάτη LNCaP.....	87
9.5	Επίλογος.....	88
9.6	Παράρτημα - Πίνακας φωτοευαισθητοποιητών	89
	Βιβλιογραφία.....	90

Εικόνες – Σχήματα

Εικόνα 1.1: Ο αδένας του προστάτη και η θέση του στο ανθρώπινο σώμα.....	13
Εικόνα 2.1: Κλινική πορεία της ΦΔΘ με ενδοφλέβια χορήγηση φωτοευαισθητοποιητή.....	19
Εικόνα 2.2: Μηχανισμοί φωτοδυναμικής δράσης.....	21
Εικόνα 2.3: Προσανατολισμός spin στις ηλεκτρονιακές καταστάσεις.	21
Εικόνα 2.4: Διάγραμμα Jablonski.....	22
Εικόνα 2.5: Πορεία αντίδρασης τύπου I.....	23
Εικόνα 2.6: Τα τρία διαφορετικά μονοπάτια κυτταρικού θανάτου μετά τη φωτοδυναμική δράση.	24
Εικόνα 3.1: Χημικές δομές διαφορετικών φωτοευαισθητοποιητών - παραγώγων της πορφυρίνης.	30
Εικόνα 3.2 : Μοριακή δομή του m-THPC (foscan).	35
Εικόνα 3.3: Το φάσμα απορρόφησης του m-THPC (foscan)	36
Εικόνα 4.1: Βιοσύνθεση και αναπαραγωγή της γλουταθειόνης.....	37
Εικόνα 4.2: Η δομή της γλουταθειόνης.....	38
Εικόνα 4.3: Η χημική δομή του BSO.....	40
Εικόνα 6.1: Κλίβανος επώασης	44
Εικόνα 6.2: Καταψύκτης.....	44
Εικόνα 6.3: Δοχείο Υγρού Αζώτου.....	45
Εικόνα 6.4: Ανάστροφο μικροσκόπιο.....	45
Εικόνα 6.5: (α) ζώνη σθένους και αγωγιμότητας σε ημιαγωγό (β) αντιστροφή πληθυσμώ.....	47
Εικόνα 6.6 : Λειτουργία της επαφής p-n.	47
Εικόνα 6.7: Τυπική δομή μιας GaAlAs διόδου Laser διπλής ετεροεπαφής.....	49
Εικόνα 6.8: Εργαστηριακή διάταξη laser.....	50
Εικόνα 6.9: Το τροφοδοτικό της διόδου (πάνω) και ο ελεγκτής θερμοκρασίας (κάτω).....	51
Εικόνα 6.10: Εξασθένιση δέσμης ακτινοβολίας που διέρχεται μέσω του απορροφούντος διαλύματος.	53
Εικόνα 6.11: Φασματοφωτοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης, Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer.....	55
Εικόνα 6.12: Οπτικό διάγραμμα φασματοφωτομετρικής διάταξης απορρόφησης...56	
Εικόνα 6.13: Η διάταξη FLUOstar Galaxy.....	58
Εικόνα 6.14: Αρχή λειτουργίας της διάταξης φθορισμού	59
Εικόνα 7.1: Αιματοκυτταρόμετρο Neubauer.	63
Εικόνα 8.1: Δείγμα αναφοράς (control)	75
Εικόνα 8.2: Επώαση με BSO 0,001 mM 24 ώρες.....	75
Εικόνα 8.3: Επώαση με BSO 0,01 mM 24 ώρες.....	75
Εικόνα 8.4: Επώαση με BSO 0,1 mM 24 ώρες.....	75

Εικόνα 8.5: Δείγμα αναφοράς control.....	79
Εικόνα 8.6: 5 mM BSO (24 ώρες) και έκθεση στο φως (λείζερ)	79
Εικόνα 8.7: 10 mM BSO (24 ώρες) και έκθεση στο φως (λείζερ)	79
Εικόνα 8.8: Δείγμα αναφοράς control.....	82
Εικόνα 8.9: 5 mM BSO (24 ώρες) και έκθεση στο φως (λείζερ)	82
Εικόνα 8.10: Φωτοδυναμική θεραπεία με 5mM BSO και m – THPC.....	83
Εικόνα 8.11: 10 mM BSO (24 ώρες) και έκθεση στο φως (λείζερ).....	82
Εικόνα 8.12: Φωτοδυναμική θεραπεία με 10mM BSO και m – THPC.....	83

Διαγράμματα – Πίνακες

Διάγραμμα 3.1: Μηχανισμοί καταστροφής καρκινικών όγκων μέσω ΦΔΘ.	34
Διάγραμμα 6.1: Ποιοτικό διάγραμμα εξάρτησης εκπομπής φωτονίων από διερχόμενο ρεύμα διόδου.....	48
Διάγραμμα 6.2: Εξάρτηση της ισχύος του laser που φτάνει στο τριβλίο από το ρεύμα διόδου.....	52
Διάγραμμα 6.3: Κατανομή της ισχύος σε μήκος και πλάτος του τριβλίου, κανονικοποιημένη ως προς την ισχύ του κέντρου του τριβλίου (20mm, 20mm).....	52
Πίνακας 7.1: Ποσότητες αντιδραστηρίων που συμμετέχουν στη μέτρηση της γλουταθειόνης μέσω φθορισμού	70
Διάγραμμα 8.1: Καμπύλη αναφοράς MTT για τη βιωσιμότητα των κυττάρων.....	73
Διάγραμμα 8.2: Επίδραση του BSO στη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από επώαση (24h)	74
Διάγραμμα 8.3: Καμπύλη αναφοράς γλουταθειόνης (nmoles).....	76
Διάγραμμα 8.4: Επίδραση του παράγοντα BSO στα επίπεδα της γλουταθειόνης.....	77
Διάγραμμα 8.5: Επίδραση συνδυαστικής δράσης BSO - φωτός στη βιωσιμότητα των κυττάρων.....	78
Διάγραμμα 8.6: Επίδραση της φωτοδυναμικής θεραπείας στη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς LNCaP.....	80
Διάγραμμα 8.7: Επίδραση της φωτοδυναμικής θεραπείας (m-THPC & BSO) στη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς LNCaP.....	81

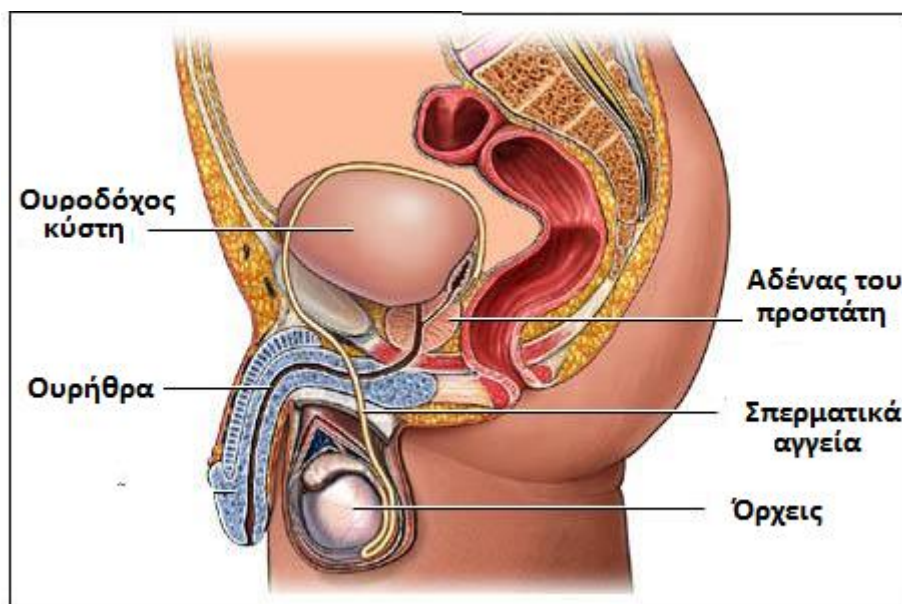
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1.

Καρκίνος του προστάτη

1.1 Προστάτης: δομή και φυσιολογική λειτουργία

Ο αδένας του προστάτη βρίσκεται ακριβώς κάτω από την ουροδόχο κύστη, μπροστά από τον ορθό και είναι περιτριγυρισμένος από δέσμες νεύρων που ελέγχουν τη σύση. Έχει περίπου το μέγεθος ενός καρυδιού, το οποίο όμως αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας των ανδρών. Είναι υπεύθυνος για την παραγωγή ενός υγρού εκκρίματος που περιέχει ορμόνες και πρωτεΐνες το οποίο προστίθεται στο υγρό της εκσπερμάτισης με σκοπό να διατηρήσει το σπέρμα ζωντανό μετά την είσοδό του στον κόλπο. [1]



Εικόνα 1.1:
Ο αδένας του προστάτη και η θέση του στο ανθρώπινο σώμα [2]

1.2 Αίτια εκδήλωσης του καρκίνου γενικά

Σύμφωνα με τις νέες γνώσεις, εντός των κυττάρων υπάρχουν γονίδια του καρκίνου. Εκτός από αυτά, το περιβάλλον στο οποίο ζούμε και ο τρόπος ζωής, ο οποίος σχετίζεται με χημικές ουσίες (πρώτιστα ο καπνός του τσιγάρου), με τον τρόπο διατροφής, με την ακτινοβολία, με τους ιούς κ.α. συμβάλλουν στην εμφάνιση της νόσου του καρκίνου.

Το έναυσμα εξαλλαγής ενός κυττάρου, σε καρκινικό κύτταρο, δίνεται από όλους αυτούς τους εξωτερικούς παράγοντες, με αποτέλεσμα την αφύπνιση των εν υπνώσει ευρισκομένων εντός αυτού καρκινικών γονιδίων.

Τα $\frac{3}{4}$ των ανθρώπων εντός φυσιολογικής περιόδου της ζωής τους, δεν εμφανίζουν καρκίνο. Η ευτυχής αυτή πλειονότητα, την ιδιαιτερότητα αυτή την οφείλει στη δραστικότητα αφενός μεν της γενετικής δομής και αφετέρου της αντίστασής της (ανοσολογική επάρκεια). Η τάση κάθε ανθρώπου να εμφανίσει καρκίνο δεν είναι η ίδια και σε αυτό παίζουν ρόλο οι διαφορετικές ευαισθησίες των καρκινικών γονιδίων. [3]

1.3 Καρκίνος του προστάτη

Ο καρκίνος του προστάτη είναι αποτέλεσμα της κακοήθους ανάπτυξης των κυττάρων του αδένου του προστάτη. Συνήθως ο καρκίνος του προστάτη προέρχεται από την ανεξέλεγκτη και ανώμαλη ανάπτυξη του προστατικού αδένου. Αυτό το είδος της ανάπτυξης αναφέρεται ως προστατικό αδενοκαρκίνωμα. Στις περισσότερες περιπτώσεις προστατικού αδενοκαρκινώματος, η ανάπτυξη πραγματοποιείται με πιο αργό ρυθμό συγκριτικά με τα άλλα είδη καρκίνου. Τα καρκινικά κύτταρα του αδένου του προστάτη υποβάλλονται σε κυτταρική διαίρεση με ένα ανεξέλεγκτο και επιβλαβές ρυθμό. Το αποτέλεσμα είναι πολλά μικρά κύτταρα με πιθανές ανωμαλίες στον αριθμό των χρωμοσωμάτων τους. Η μη φυσιολογική ανάπτυξη οδηγεί σε έναν κακοήθη όγκο, ο οποίος μπορεί να εξαπλωθεί μέσω του ιστού του αδένου του προστάτη και να κάνει μεταστάσεις σε άλλους ιστούς του σώματος. [1]

1.4 Θεραπεία του καρκίνου του προστάτη

Η κατάλληλη θεραπεία εξαρτάται από ένα ευρύ φάσμα παραγόντων όπως είναι ο βαθμός και το στάδιο του όγκου, το προσδόκιμο ζωής του ασθενούς (10 με 15 έτη), η γενικότερη υγεία του, και τέλος η προτίμηση του ίδιου του ασθενή. Υπάρχει μεγάλη αντιπαράθεση σχετικά με την καλύτερη θεραπεία για τον καρκίνο του προστάτη, και πολυάριθμες συνεχιζόμενες μελέτες προσπαθούν να αντιμετωπίσουν το ζήτημα αυτό. Μια σειρά από εφαρμοσμένες θεραπευτικές μεθόδους αναλύονται παρακάτω, καθώς και οι παρενέργειες τους. [4]

1.4.1 Θεραπευτικές μέθοδοι

1.4.1.1 Ενεργός παρακολούθηση

Η έννοια της ενεργού παρακολούθησης, ή προσεκτική αναμονή, εμφανίζεται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια ως μια βιώσιμη εναλλακτική λύση για τους άνδρες που αποφασίζουν να μην υποβληθούν άμεσα σε χειρουργική επέμβαση ή ακτινοθεραπεία. Κατά τη διάρκειά της, ο καρκίνος παρακολουθείται προσεκτικά ώστε να διαπιστωθεί η πιθανή εξέλιξή του. Περιοδικά ο ασθενής υποβάλλεται σε εξέταση αίματος (PSA) και σε ψηφιακή πρωκτική εξέταση (DRE). Παράλληλα πραγματοποιείται βιοψία μία φορά το χρόνο αρχικά και έπειτα σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Εάν τα συμπτώματα εξελίσσονται, ή αν οι εξετάσεις δείχνουν ότι ο καρκίνος αυξάνεται, η θεραπεία είναι αναπόφευκτη. [5]

Κίνδυνοι

Δεν υπάρχουν χαμηλές θερμοκρασίες, ακτινοβολία ή φάρμακα που να εμπλέκονται στην ενεργό παρακολούθηση, έτσι δεν υπάρχουν ιατρικές παρενέργειες. Ωστόσο, οι ασθενείς που επιλέγουν αυτή τη μέθοδο διατρέχουν τον κίνδυνο της εξάπλωσης του καρκίνου στο χρονικό διάστημα ανάμεσα στις επισκέψεις τους στο γιατρό. Ο καρκίνος του προστάτη σε μερικές, λιγότερο συνηθισμένες περιπτώσεις, επεκτείνεται, κάνει μεταστάσεις, ή αναπτύσσεται γρήγορα μέχρι την επόμενη εξέταση. [1]

1.4.1.2 Προστατεκτομή

Μια χειρουργική προσέγγιση για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη είναι η αφαίρεση του συνόλου ή μέρους του προστάτη. Συνήθως, οι άνδρες με καρκίνο σε πρώιμο στάδιο ο οποίος περιορίζεται στον προστάτη, υποβάλλονται σε ριζική προστατεκτομή-αφαίρεση ολόκληρου του αδένου του προστάτη, καθώς και κάποιων γειτονικών ιστών. Στον πιο κοινό τύπο προστατεκτομής-ριζική προστατεκτομή-γίνεται μία τομή στην κοιλιακή χώρα και ο προστάτης αφαιρείται πίσω από το ηβικό οστό. Ο χειρουργός τότε συρράπτει την ουρήθρα κατευθείαν στην ουροδόχο κύστη ώστε να μην παρεμποδίζεται η ροή των ούρων. [5]

Κίνδυνοι και επιπλοκές

Η ανικανότητα και η ακράτεια αποτελούν τις πιο συχνά εμφανιζόμενες παρενέργειες της ριζικής προστατεκτομής.

Επίσης η θρόμβωση αποτελεί μια σοβαρή παρενέργεια η οποία συμβαίνει όταν το αίμα κινείται πολύ αργά μέσω των φλεβών στα πόδια και αρχίζει να πήζει. Ακόμα ο ασθενής για έξι εβδομάδες μετά τη χειρουργική επέμβαση απαγορεύεται να σηκώσει οτιδήποτε πάνω από 5 κιλά καθώς μπορεί να προκληθεί κήλη στη θέση της τομής. [1]

1.4.1.3 Ακτινοβολία

Η ακτινοβολία χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, επειδή τα υψηλής ενέργειας κύματα που εκπέμπονται μπορούν να βλάψουν το DNA των κυττάρων. Εάν ένα κύτταρο διαιρεθεί πριν από την αποκατάσταση της βλάβης του DNA, οδηγείται στο θάνατο. Επειδή τα καρκινικά κύτταρα διαιρούνται ταχύτερα από τα υγιή, η προσεκτικά στοχευόμενη ενέργεια προκαλεί την καταστροφή τους. Υπάρχουν τρεις τρόποι ακτινοβολήσης: μέσω μηχανήματος έξω από το σώμα (θεραπεία με εξωτερική ακτινοβολία), με την τοποθέτηση ραδιενεργών υλικών στο σώμα (εσωτερική ακτινοθεραπεία ή βραχυθεραπεία), καθώς και με την πρόσληψη ραδιενεργών ουσιών (συστηματική θεραπεία ακτινοβολίας). Στόχο της θεραπείας αποτελεί η ακτινοβολήση μιας συγκεκριμένης περιοχής με όσο το δυνατόν περισσότερη ενέργεια, χωρίς να επηρεαστούν τα γειτονικά όργανα. [1]

Παρενέργειες

Η προσωρινή ακράτεια ούρων, η δυσκολία στην ούρηση και η κατακράτηση ούρων σχετίζονται με την εξωτερική ακτινοθεραπεία. Οι ασθενείς μπορεί επίσης να δουν αίμα στα ούρα, τα κόπρανά τους, ή και στο σπέρμα. Ακόμα σαν παρενέργεια εμφανίζεται και η ανικανότητα σε ποσοστό από 25 έως 50% σε άνδρες οι οποίοι είναι κάτω των 60 ετών. [1]

1.4.1.4 Ορμονοθεραπεία

Η ορμονοθεραπεία, επίσης γνωστή και ως θεραπεία στέρησης ανδρογόνων, έχει σχεδιαστεί ώστε να σταματάει την απελευθέρωση τεστοστερόνης ή να την αποτρέπει από το να ενεργεί στα κύτταρα του προστάτη. Αν και η θεραπεία αυτή διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο σε άνδρες με καρκίνο προχωρημένου σταδίου, χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο πριν, κατά τη διάρκεια, ή και μετά από κάποια άλλη τοπική θεραπεία. [5]

Παρενέργειες

Μερικές από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες παρενέργειες που σχετίζονται με την ορμονοθεραπεία είναι: δυσκοιλιότητα ή διάρροια, ναυτία, απώλεια ή μείωση της όρεξης, ζάλη ή πονοκέφαλος, οίδημα (γυναικομαστία) ή ευαισθησία στο στήθος, προβλήματα ύπνου, ανικανότητα ή μείωση της σεξουαλικής επιθυμίας. [1]

1.4.1.5 Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία αποτελεί σχεδόν πάντα μια «θεραπεία σωτηρίας» καθώς εφαρμόζεται σε καρκίνο του προστάτη προχωρημένου σταδίου που προκαλεί μεταστάσεις.[1] Χρησιμοποιεί χημικά για να σκοτώσει ή να σταματήσει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Η αρχή που διέπει όλα τα χορηγούμενα φάρμακα αναφέρεται στην αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και στον τερματισμό της ανάπτυξης και της εξάπλωσης του όγκου. [5] Δυστυχώς όμως, η χημειοθεραπεία δεν μπορεί να εστιάσει σε κάποια συγκεκριμένη περιοχή του σώματος. Όλα τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα του σώματος συνεπώς επηρεάζονται, προκαλώντας μια σειρά από παρενέργειες.

Παρενέργειες

Οι παρενέργειες κάνουν ορισμένους γιατρούς να διστάζουν να χρησιμοποιούν τη χημειοθεραπεία για τον καρκίνο του προστάτη. Η βλάβη που προκαλούν τα φάρμακα είναι συστηματική, έτσι επηρεάζονται όλα κύτταρα που εμφανίζουν ταχύ ρυθμό διαίρεσης. Μερικές παρενέργειες θεραπεύονται με άλλα φάρμακα. Άλλες συνεχίζουν μέχρι η χημειοθεραπεία να διακοπεί.

Η πιο εμφανής παρενέργεια της χημειοθεραπείας σχετίζεται με την απώλεια μαλλιών. Ο τύπος του φαρμάκου, η δόση και η διάρκεια της θεραπείας μπορεί να προκαλέσουν επίσης προβλήματα γονιμότητας σε μερικούς ασθενείς που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία. Άλλες παρενέργειες αναφέρονται σε διάρροια, ναυτία, έμετο, απώλεια όρεξης, και δυσκοιλιότητα. Τέλος, η χημειοθεραπεία καταστρέφει τα λευκά αιμοσφαίρια, καταστέλλοντας έτσι την άμυνα του οργανισμού, και το σώμα γίνεται πιο ευάλωτο σε μολύνσεις. Οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν ρίγη, πυρετό, δύσπνοια, και ρινική συμφόρηση. [1]

1.4.1.6 Κρυοθεραπεία

Η κρυοθεραπεία, γνωστή επίσης και ως κρυοχειρουργική ή κρυοπηξία, υπάρχει εδώ και χρόνια, αλλά μέχρι πριν από λίγα χρόνια, ήταν σπάνια χρησιμοποιείται.

Με τη μέθοδο αυτή, ένας καθετήρας εισάγεται στο σώμα του ασθενούς και διοχετεύει αέριο αργό ή υγρό άζωτο στον προστάτη. Η πολλή χαμηλή θερμοκρασία, καταψύχει τα καρκινικά κύτταρα, οδηγώντας τα στο θάνατο. [5]

Παρενέργειες

Συνήθως οι παρενέργειες που συμβαίνουν οφείλονται σε βλάβες του γειτονικού υγιούς ιστού κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Η σοβαρότητα και η συχνότητα των παρενεργειών σε μεγάλο βαθμό επηρεάζονται από την σχετική υγεία του ασθενή καθώς και από το στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο καρκίνος.

Έτσι ορισμένοι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν: οίδημα στην περιοχή των γεννητικών οργάνων, ερεθισμό κατά την ούρηση, αιματουρία ακόμα και απόφραξη της ουρήθρας και των ουροφόρων οδών. [1]

1.5 Ανάγκη εμφάνισης νέας θεραπευτικής διαδικασίας

Το θεραπευτικό δίλημμα ανάμεσα στην παρακολούθηση και τη ριζική θεραπεία για τους άνδρες με καρκίνο του προστάτη και οι σημαντικές παρενέργειες που σχετίζονται με τη χειρουργική επέμβαση ή την ακτινοθεραπεία έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων, ελάχιστα επεμβατικών διαδικασιών. Αυτές προσπαθούν να επιτύχουν αποτελεσματικότερο έλεγχο του καρκίνου, περιορίζοντας παράλληλα τις αρνητικές συνέπειες στους ασθενείς. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η φωτοδυναμική θεραπεία. [6]

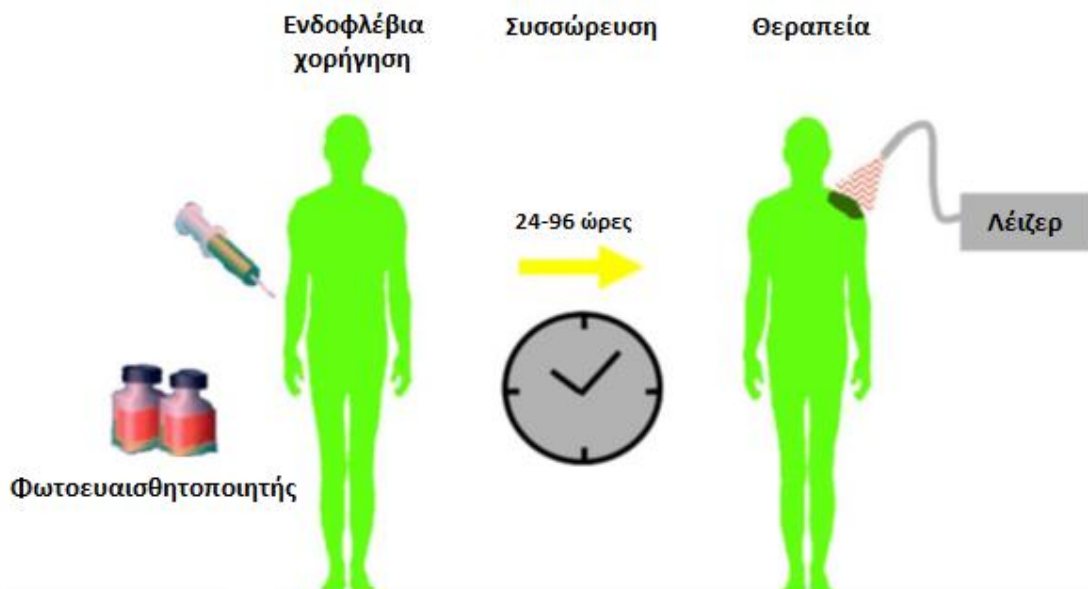
Κεφάλαιο 2.

Φωτοδυναμική Θεραπεία

2.1 Εισαγωγή

Η φωτοδυναμική θεραπεία (ΦΔΘ) αποτελεί την πιο σημαντική βιοϊατρική εφαρμογή της φωτοδυναμικής δράσης. Αποτελεί μια σχετικά νέα θεραπευτική μέθοδο εγκεκριμένη για τη θεραπεία μερικών μορφών καρκίνου και προκαρκινικών αλλοιώσεων.

Η φωτοδυναμική θεραπεία βασίζεται στην πρόκληση κυτταρικού θανάτου έπειτα από τη συνδυαστική επίδραση του ορατού φωτός με κάποιο φωτοευαισθητοποιητή και οξυγόνο. Η θεραπεία συνίσταται στην χορήγηση ενός φωτοευαισθητοποιητή ο οποίος αρχικά συσσωρεύεται επιλεκτικά πάνω στον καρκινικό ιστό και στη συνέχεια διεγείρεται μέσω της έκθεσής του σε φως κατάλληλου μήκους κύματος (γενικά στην περιοχή του ερυθρού, $\lambda \geq 600 \text{ nm}$). Η ενέργεια από το διεγερμένο φωτοευαισθητοποιητή μεταφέρεται στο οξυγόνο (O_2) μετατρέποντάς το σε μονήρες οξυγόνο, ένα εξαιρετικά δραστικό οξυγονούχο είδος. Αυτά τα κυτταροτοξικά προϊόντα, τα οποία παράγονται μετά από την έκθεση του φωτοευαισθητοποιητή στο φως, ενεργοποιούν μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων, με αποτέλεσμα την πρόκληση βλαβών οι οποίες οδηγούν μέχρι και στον κυτταρικό θάνατο. [7]



Εικόνα 2.1:
Κλινική πορεία της ΦΔΘ με ενδοφλέβια χορήγηση φωτοευαισθητοποιητή [8]

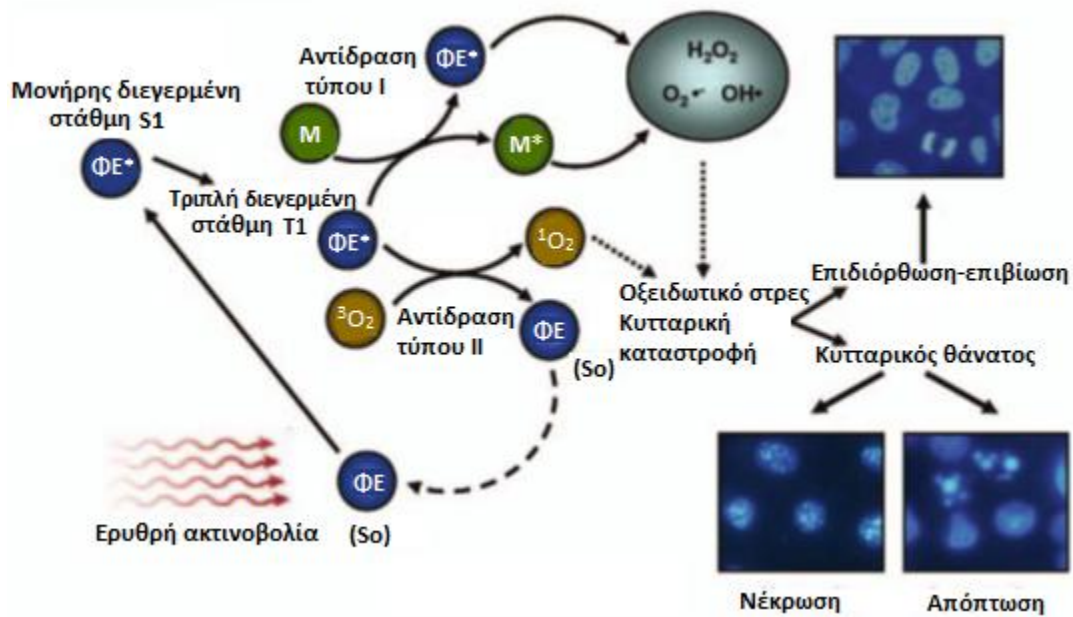
Η αποτελεσματικότητα και η επιλεκτικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται η ποσότητα του φωτοευαισθητοποιητή, η σύνθεση με την οποία χορηγείται, η διάρκεια έγχυσής του, το μήκος κύματος στο οποίο γίνεται η απορρόφηση, η περιοχή-στόχος όπου συσσωρεύεται, η πηγή φωτός, ο χρόνος έκθεσης στο φως καθώς και η ποσότητα του παρεχόμενου φωτός. Επίσης η κατεύθυνση του φωτός, καθώς και η ικανότητα διείσδυσης του διαμέσου των ιστών αποτελούν σημαντικούς παράγοντες εκλεκτικότητας. Καθώς οι φωτοευαισθητοποιητές αποβάλλονται με διαφορετικούς ρυθμούς από τους διάφορους ιστούς, ο προσεκτικός συγχρονισμός της έκθεσης στο φως τη στιγμή όπου η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή στον ιστό είναι η μέγιστη, αυξάνει την αποτελεσματικότητα της ΦΔΘ. [9]

2.2 Ιστορική αναδρομή

Από την αρχαιότητα γίνεται αναφορά στη θεραπεία μιας μεγάλης ποικιλίας διαταραχών οι οποίες αντιμετωπιζόνταν με χρήση φωτός και ενώσεων που ενεργοποιούνταν έπειτα από την έκθεσή τους σε αυτό. Το 1903 απονεμήθηκε στον Niels Finzen βραβείο Νόμπελ για την εργασία του στη φωτοθεραπεία. Ανακάλυψε ότι η θεραπεία με χρήση φωτός θα μπορούσε να περιορίσει τις δερματικές παθήσεις που προκαλούσε η φυματίωση, μια πολύ κοινή ασθένεια της περιόδου. Ομοίως, το φως θα μπορούσε να αντιμετωπίσει με επιτυχία και άλλες σημαντικές ιατρικές περιπτώσεις όπως η νεογνική υπερχολερυθριναιμία. Η χρήση ενός χημικού φωτοευαισθητοποιητή, αντί μιας φυσικής χρωστικής, αναπτύχθηκε σταδιακά από μελέτες των Raab και Jesionek και Von Tarpeiner. Η συνεχής εργασία αποκάλυψε επίσης την εξάρτηση της φωτοδυναμικής αντίδρασης από το οξυγόνο και το φως. Στα 1970 ο Dougherty τυχαία τοποθέτησε μια κυτταρική καλλιέργεια, η οποία περιείχε φωτοευαισθητοποιητικούς παράγοντες, κοντά στα παράθυρα του εργαστηρίου του, και παρατήρησε σημαντικό κυτταρικό θάνατο. Η μελέτη του πάνω στον παράγοντα που προκάλεσε αυτήν την «επιτυχημένη αποτυχία» έδειξε ότι η ουσία αυτή ήταν η πορφυρίνη, η οποία μαζί με τα παράγωγά της, χρησιμοποιήθηκε ευρέως μετέπειτα ως φωτοευαισθητοποιητής. [10]

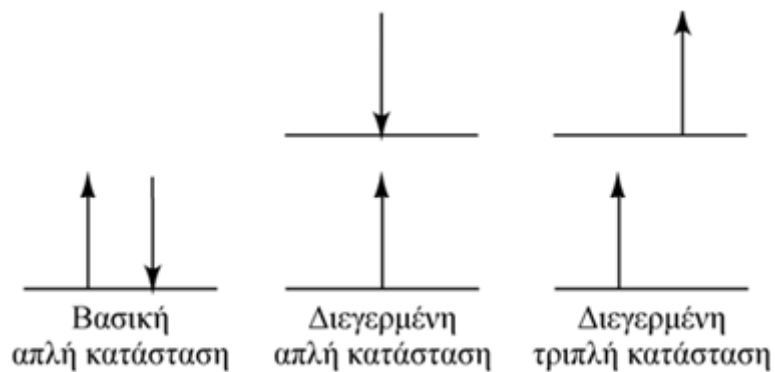
2.3 Μηχανισμοί φωτοδυναμικής δράσης

Τα βασικά βιοχημικά μονοπάτια μέσω των οποίων ο συνδυασμός φωτοευαισθητοποιητή, φωτός και οξυγόνου οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο εμφανίζονται στην εικόνα που ακολουθεί .

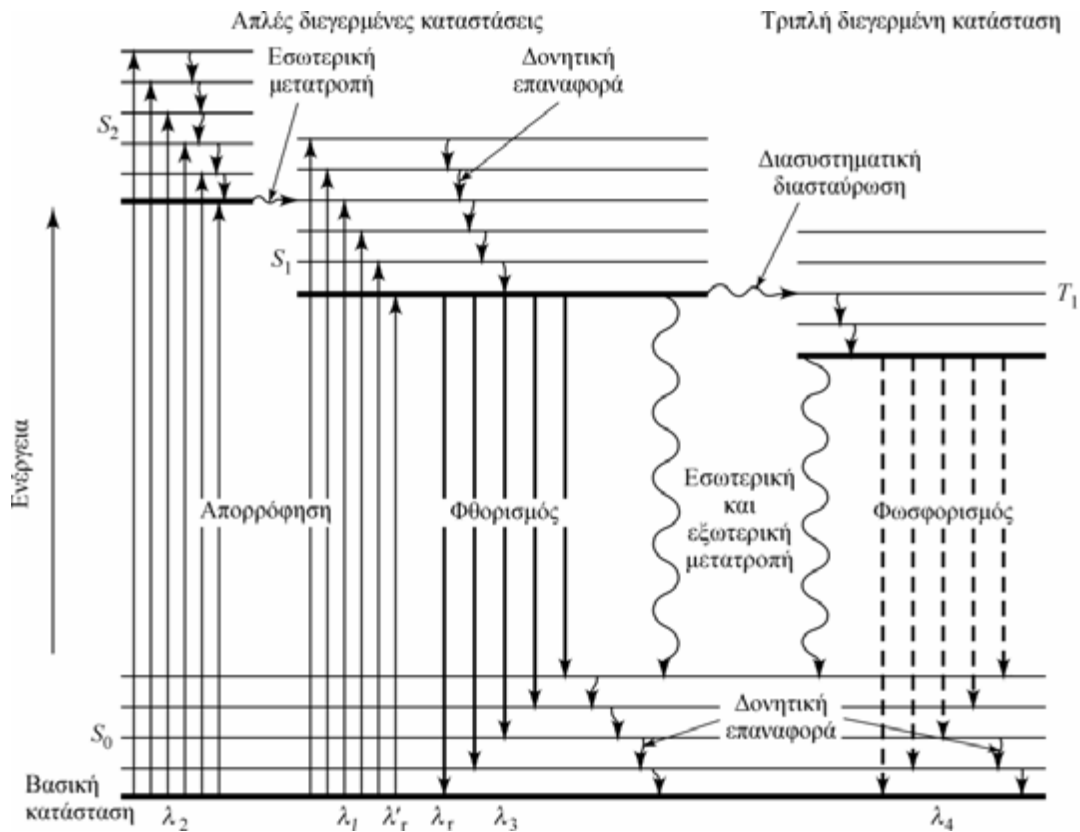


Εικόνα 2.2: Μηχανισμοί φωτοδυναμικής δράσης [7]

Οι φωτοευαισθητοποιητές που βρίσκονται στη θεμελιώδη, μη-διεγερμένη κατάσταση (S0) έπειτα από απορρόφηση φωτός μεταπίπτουν αρχικά σε μια ηλεκτρονικά μονήρη διεγερμένη στάθμη (S1) και στη συνέχεια μέσω εσωτερικής μετάπτωσης μεταβαίνουν στην τριπλή διεγερμένη στάθμη (T1). (Εικόνα 2.4)



Εικόνα 2.3: Προσανατολισμός spin στις ηλεκτρονικές καταστάσεις [11]

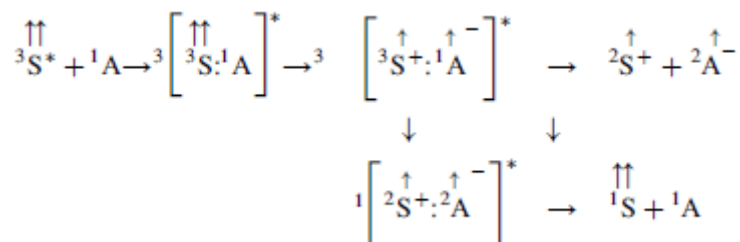


Εικόνα 2.4: Διάγραμμα Jablonski [11]

Η αλληλεπίδραση των φωτοευαισθητοποιητών που βρίσκονται στην τριπλή διεγερμένη στάθμη με τα γειτονικά τους μόρια έχει ως αποτέλεσμα δύο τύπους φωτοχημικών αντιδράσεων, τις αντιδράσεις τύπου I και τύπου II. [12]

2.3.1 Αντιδράσεις τύπου I

Οι αντιδράσεις τύπου I αφορούν τη μεταφορά ηλεκτρονίων από τον διεγερμένο στην τριπλή διεγερμένη στάθμη φωτοευαισθητοποιητή σε γειτονικά μόρια σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες. Η αντίδραση ανάμεσα στο φωτοευαισθητοποιητή που βρίσκεται στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση με ένα γειτονικό μόριο που βρίσκεται στη βασική απλή κατάσταση μπορεί να παράγει ιοντικές ρίζες (²S⁺, ²A⁻) καθώς και ρίζες χωρίς ηλεκτρικό φορτίο (²S, ²A).



Εικόνα 2.5: Πορεία αντίδρασης τύπου I [13]

Η πλειοψηφία των ριζών που παράγονται μέσω αυτής της αντίδρασης αλληλεπιδρά με το μοριακό οξυγόνο παράγοντας ένα μείγμα από τις αποκαλούμενες ως δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ). Το ανιόν του υπεροξειδίου (O_2^-), το υδροξύλιο (OH) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα δραστικών μορφών οξυγόνου από τα οποία ειδικά το υδροξύλιο μπορεί ταχύτατα να οξειδώσει ένα μεγάλο αριθμό βιομορίων. Οι αντιδράσεις τύπου I είναι πιο αποτελεσματική σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου και υψηλής συγκέντρωσης υποστρώματος. [13]

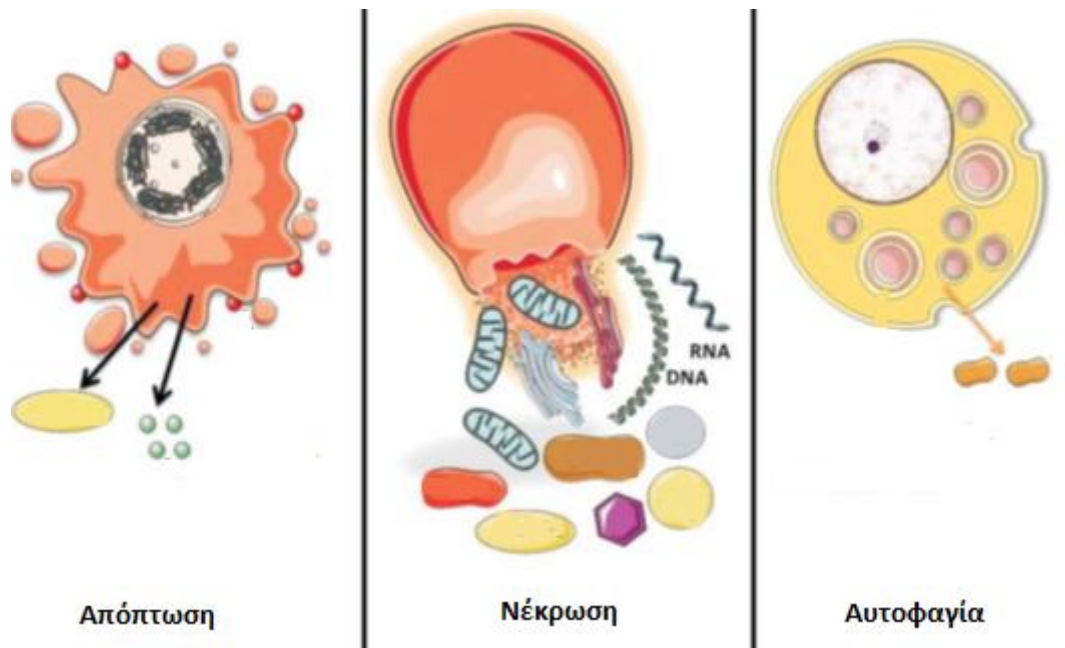
2.3.2 Αντιδράσεις τύπου II

Οι αντιδράσεις τύπου II αναφέρονται στην αλληλεπίδραση ανάμεσα στο φωτοευαισθητοποιητή που βρίσκεται στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση με το οξυγόνο που βρίσκεται στη θεμελιώδη κατάσταση (3O_2). [13] Είναι αντιδράσεις μεταφοράς ενέργειας όπου παράγεται το κυτταροτοξικό μονήρες οξυγόνο (1O_2) ενώ ο φωτοευαισθητοποιητής επιστρέφει στη θεμελιώδη του κατάσταση. [14] Η διάρκεια ζωής του μονήρους οξυγόνου είναι πολύ μικρή (περίπου 10 έως 320 ns) με αποτέλεσμα να περιορίζεται η διάχυσή του σε απόσταση 10 έως 55 nm στα κύτταρα. Κατά συνέπεια η πρόκληση φωτοδυναμικής βλάβης εντοπίζεται πολύ κοντά στη θέση όπου βρίσκεται ο φωτοευαισθητοποιητής. [15]

Παρόλο που οι μηχανισμοί της φωτοδυναμικής θεραπείας δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως, είναι γενικά αποδεκτό ότι το μονήρες οξυγόνο που παράγεται από την αντίδραση τύπου II είναι κυρίως υπεύθυνο για τον κυτταρικό θάνατο. Η συμβολή των αντιδράσεων τύπου I και II στο θάνατο των κυττάρων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των φωτοευαισθητοποιητών, της ενδοκυτταρικής κατανομής, του υποστρώματος και της παρουσίας οξυγόνου. [7]

2.4 Μονοπάτια κυτταρικού θανάτου μετά τη φωτοδυναμική δράση

Τρεις διακριτές μορφές κυτταρικού θανάτου μπορούν να αναγνωριστούν μετά τη φωτοδυναμική δράση: η απόπτωση, η νέκρωση και η αυτοφαγία. Η διάκριση αυτή βασίζεται στις διαφορές που εμφανίζουν οι μορφολογικές, βιοχημικές και μοριακές αλλαγές στις οποίες υπόκεινται τα κύτταρα κατά το θάνατό τους. [12]



Εικόνα 2.6:

Τα τρία διαφορετικά μονοπάτια κυτταρικού θανάτου μετά τη φωτοδυναμική δράση [15]

2.4.1 Απόπτωση

Το πιο κοινό χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι η ενεργή συμμετοχή του κυττάρου στον αυτο-αφανισμό του. Το κύτταρο κινητοποιεί μια αλληλουχία γεγονότων που οδηγούν στην αποσύνθεση του και το σχηματισμό «αποπτωτικών σωμάτων» που στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονται από τα γειτονικά κύτταρα, χωρίς τη δημιουργία φλεγμονής. Η αυξημένη κυτταροπλασματική συγκέντρωση του Ca^{2+} , η κυτταρική αφυδάτωση, η συμπύκνωση της χρωματίνης της περιφέρειας του πυρήνα, η πρωτεόλυση και ο κατακερματισμός του πυρήνα και του κυττάρου αποτελούν τα πιο χαρακτηριστικά μορφολογικά στοιχεία της απόπτωσης.

Από την άλλη πλευρά, ακόμα και κατά τα προχωρημένα στάδια της απόπτωσης, η δομική ακεραιότητα και η λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης διατηρούνται. Επίσης, διατηρούνται ενεργά τα μιτοχόνδρια και τα λυσοσώματα. [12]

2.4.2 Νέκρωση

Η νέκρωση αποτελεί έναν διαφορετικό τρόπο κυτταρικού θανάτου. Συνήθως προκαλείται από υπερβολική δόση κυτταροτοξικών παραγόντων. Ενώ η απόπτωση απαιτεί την ενεργό συμμετοχή ολόκληρου του κυττάρου, η νέκρωση είναι μια παθητική και εκφυλιστική διαδικασία. In vivo, η νέκρωση προκαλεί τη δημιουργία φλεγμονής στους ιστούς. Το πρώτο στάδιο της νέκρωσης είναι η διόγκωση των κυττάρων, ακολουθεί η ρήξη της πλασματικής μεμβράνης και τέλος η απελευθέρωση του κυτταροπλασματικού περιεχομένου. [12]

2.4.3 Αυτοφαγία

Η έκθεση των κυττάρων στη φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί επίσης να οδηγήσει στην διέγερση της διαδικασίας της αυτοφαγίας η οποία σε συνθήκες οξειδωτικού στρες ενισχύεται περισσότερο. Η αυτοφαγία αποτελεί ένα λυσοσωμικό μονοπάτι που οδηγεί στην αποδόμηση και την ανακύκλωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών και των οργανιδίων. Η διαδικασία αυτή μπορεί να έχει τόσο κυτταροπροστατευτικό όσο και αντίθετο ρόλο μετά από χημειοθεραπείες κατά του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων εκείνων των θεραπειών που χρησιμοποιούν τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ) ως πρωταρχικούς παράγοντες για την πρόκληση της κυτταρικής καταστροφής. Πρόσφατες μελέτες οριοθετούν την αυτοφαγία ως ένα μηχανισμό για τη διατήρηση της βιωσιμότητας του κυττάρου μετά τη φωτοδυναμική επίδραση. [15]

Πολλές έρευνες έχουν αποδείξει ότι οι φωτοευαισθητοποιητές που εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο επάγουν καλύτερα την κυτταρική απόπτωση σε σχέση με τους φωτοευαισθητοποιητές που συσσωρεύονται στο σωμάτιο Golgi, τα λυσοσώματα, την κυτταρική μεμβράνη ή παραμένουν διάχυτοι στο κυτταρόπλασμα. Αντιθέτως, οι φωτοευαισθητοποιητές που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και τα λυσοσώματα σχετίζονται με τη νέκρωση. [7]

2.5 Πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας

Τα κύρια πλεονεκτήματα της ΦΔΘ έναντι των άλλων συμβατικών θεραπειών για τον καρκίνο είναι:

- Η ικανότητά της στην επιλεκτική καταστροφή των όγκων
- Η πολύ χαμηλή συστηματική τοξικότητα της (η οποία οφείλεται στο γεγονός ότι οι φωτοευαισθητοποιητές ενεργοποιούνται μόνο παρουσία φωτός),
- Η εφαρμογή της είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με άλλες θεραπευτικές μεθόδους, όπως χημειοθεραπεία, χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία ή ανοσοθεραπεία . [7]
- Τα υψηλά αισθητικά αποτελέσματα που εμφανίζει (ελάχιστη δερματική βλάβη, μικρή ή καθόλου ουλή) τα οποία είναι συχνά καλύτερα σε σχέση με τις συμβατικές θεραπείες.
- Η έλλειψη σημαντικής θνησιμότητας που να συνδέεται με τη φωτοδυναμική θεραπεία. [12]
- Η βελτίωση στην ποιότητα ζωής συγκεκριμένης κατηγορίας ασθενών με ανεγχείρητους όγκους, οι οποίοι έχουν εξαντλήσει άλλων ειδών θεραπείες.
- Τέλος, πολλές διαδικασίες σχετικές με τη ΦΔΘ μπορούν να πραγματοποιηθούν σε εξωνοσοκομειακά περιβάλλοντα (εξωτερικά ιατρεία).

Το πλεονέκτημα αυτό καθιστά τη θεραπεία πιο φιλική προς τον ασθενή αλλά και πιο οικονομική σε κάποιες περιπτώσεις. [15]

Επιπλέον οι φωτοευαισθητοποιητές μπορούν να χορηγηθούν και για τοπικές εφαρμογές της ΦΔΘ, ανάλογα με τον τύπο του όγκου και / ή τη θέση του. Τα αποτελέσματα της ΦΔΘ ποικίλουν, από την καθυστέρηση στην ανάπτυξη του όγκου σε προχωρημένα καρκινικά κύτταρα, με τη βελτίωση στην ποιότητα και τη διάρκεια ζωής των ασθενών, μέχρι και την πλήρη υποχώρηση του όγκου. [7]

Κεφάλαιο 3.

Φωτοευαισθητοποιητές

3.1 Εισαγωγή

Είναι ενώσεις που είναι ικανές να απορροφούν φως ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος και να ενεργοποιούν τις κυτταροτοξικές αντιδράσεις τύπου I και II. Υπάρχουν εκατοντάδες φυσικές και συνθετικές χρωστικές που μπορούν να λειτουργήσουν ως φωτοευαισθητοποιητές οι οποίες κυμαίνονται από φυτικές ενώσεις μέχρι πολύπλοκα συνθετικά μακρομόρια. Το βασικό χαρακτηριστικό κάθε φωτοευαισθητοποιητή είναι η μεγάλη κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρους οξυγόνου και ο μεγάλος χρόνος παραμονής στην τριπλή διεγερμένη στάθμη. [16]

3.2 Επιθυμητές ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητών

Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι ιδανικοί φωτοευαισθητοποιητές για τη φωτοδυναμική θεραπεία θα πρέπει να παρουσιάζουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Να έχουν γνωστή χημική σύνθεση και καλή σταθερότητα.
- Να συσσωρεύονται εκλεκτικά και να διατηρούνται πάνω στους καρκινικούς ιστούς στόχους.
- Να εμφανίζουν ελάχιστη τοξικότητα σε συνθήκες έλλειψης φωτός και να είναι κυτταροτοξικοί μόνο κατόπιν φωτοδυναμικής δράσης. [7]
- Να αποβάλλονται γρήγορα από το σώμα ελαχιστοποιώντας έτσι τις φωτοτοξικές παρενέργειες.
- Να παρουσιάζουν υψηλή φωτοχημική δραστηριότητα, με υψηλές αποδόσεις και μεγάλο χρόνο ημιζωής της τριπλής διεγερμένης κατάστασης.
- Να είναι σε θέση να παράγουν με αποτελεσματικό τρόπο μονήρη οξυγόνα καθώς και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου. [16]
- Να διαθέτουν υψηλό μοριακό συντελεστή απόσβεσης και υψηλή απορρόφηση, ιδίως στις φασματικές περιοχές του ερυθρού και του υπέρυθρου (600-800 nm). Η ιδιότητα αυτή σχετίζεται με την ικανότητα διείσδυσης του φωτός στους ιστούς, η οποία αυξάνεται με την αύξηση του μήκους κύματος της εκάστοτε ακτινοβολίας. Για παράδειγμα, η διείσδυση του φωτός για μήκος κύματος $500 < \lambda < 600$ nm είναι περίπου 4 mm, ενώ στην περιοχή 600-800 nm είναι περίπου 8 mm. [7]

Επίσης η απορρόφηση φωτονίων με μήκη κύματος υψηλότερα των 800nm δεν παρέχει αρκετή ενέργεια ώστε να διεγερθούν τα οξυγόνα και να μεταβούν στη μονήρη κατάσταση όπου θα είναι δραστικά. [15]

3.3 Κατηγορίες φωτοευαισθητοποιητών

Οι φωτοευαισθητοποιητές για τη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου έχουν κατηγοριοποιηθεί σε τρεις γενιές. Η πρώτη γενιά περιλαμβάνει παράγωγα αιματοπορφυρίνης, η δεύτερη διαφορετικές ως προς τη δομή ενώσεις που εμφανίζουν απορρόφηση σε μεγάλα μήκη κύματος και η τρίτη αποτελείται από τους φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς οι οποίοι είναι δεσμευμένοι σε μόρια-μεταφορείς για πιο επιλεκτική στόχευση των καρκινικών όγκων. [17]

3.3.1 Φωτοευαισθητοποιητές 1^{ης} γενιάς

Τα παράγωγα της αιματοπορφυρίνης (HrD) με εμπορικές ονομασίες όπως Photofrin και Photoheme αποτελούν την πρώτη γενιά φωτοευαισθητοποιητών που εγκρίθηκαν για κλινική χρήση. Οι πρώτες αναφορές για την επίδρασή τους στη φωτοδυναμική θεραπεία εμφανίστηκαν κατά τις δεκαετίες 1970-1980. [17] Η σύνθεσή τους προκύπτει από το συνδυασμό της αιματοπορφυρίνης με 5% θειικό οξύ σε διάλυμα οξικού οξέος σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται υδατική βάση που οδηγεί στην εξουδετέρωση του διαλύματος. Έτσι προκύπτει ένα σύνθετο μείγμα διμερών και ολιγομερών πορφυρίνης τα οποία έπειτα από τη σύνδεση τους με εστέρες και αιθέρες εμφανίζουν δραστικότητα. [16] Η Photofrin είναι κλινικά αποδεκτό σε πολλές χώρες για τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα (πρώιμου και προχωρημένου σταδίου), του οισοφάγου, της ουροδόχου κύστης, του στομάχου, και του τραχήλου της μήτρας (πρώιμο στάδιο). [17]

Οι φωτοευαισθητοποιητές 1^{ης} γενιάς έχουν μελετηθεί εκτενώς και έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές κλινικές εφαρμογές. Ωστόσο εμφανίζουν μια σειρά από μειονεκτήματα. [17]

3.3.1.1 Μειονεκτήματα φωτοευαισθητοποιητών 1^{ης} γενιάς

- Μικρή εκλεκτικότητα.

Στην πραγματικότητα, μόνο το 0,1 - 3% του χορηγούμενου φωτοευαισθητοποιητή εντοπίζεται στον καρκινικό ιστό .

- Υψηλός χρόνος παραμονής στους δερματικούς ιστούς.

Οι ενώσεις αυτές μπορούν να διατηρηθούν στο δερματικό ιστό για έως και 10 εβδομάδες μετά τη χορήγησή τους, προκαλώντας έτσι φωτοευαισθησία στον ασθενή ο οποίος θα πρέπει να αποφύγει την έκθεσή του στο φως του ήλιου για αυτό το χρονικό διάστημα.

- Μικρή απορρόφηση στην περιοχή του ερυθρού φάσματος.

Οι ενώσεις αυτές απορροφούν ασθενώς στο κόκκινο. Για παράδειγμα, το Photofrin εμφανίζει ένα αριθμό ζωνών απορρόφησης μεταξύ 400 και 650nm με την ασθενέστερη να εμφανίζεται σε μήκος κύματος 630nm, το οποίο όμως είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο για διέγερση. Η ακτινοβολία σε αυτό το μήκος κύματος δεν μπορεί παρά να διεισδύσει στον ιστό σε βάθος περίπου 5mm.

- Πολυπλοκότητα στη σύσταση.

Χαρακτηρίζονται από σύνθετα μείγματα από τα οποία δεν έχει καταστεί δυνατόν να απομονωθεί ένα ιδιαίτερα ενεργό συστατικό. Έτσι εμφανίζονται δυσκολίες κατά τη σύνθεσή τους.

Παρά τα μειονεκτήματά τους, οι φωτοευαισθητοποιητές 1^{ης} γενιάς έχουν αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για την καταπολέμηση του καρκίνου και έχουν δρομολογήσει την έρευνα για τους νέους, δεύτερης γενιάς, φωτοευαισθητοποιητές με βελτιωμένα χαρακτηριστικά. [17]

3.3.2 Φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς

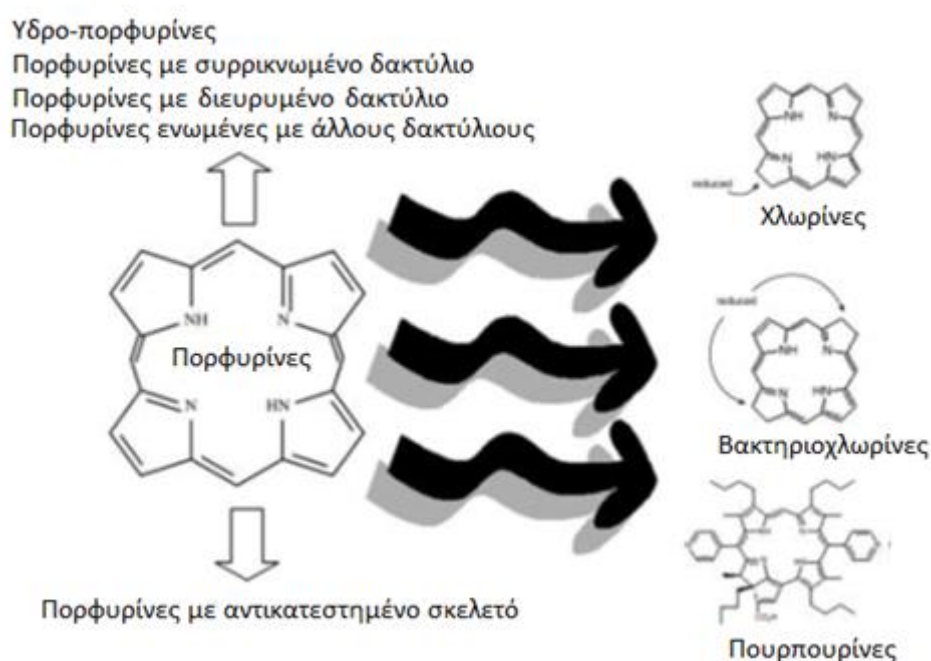
Οι φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς χαρακτηρίζονται κυρίως από τις διαφορετικές χημικές τροποποιήσεις του τετραπυρρολικού δακτυλίου των πορφυρινών (Εικόνα 3.1). Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο βασικές χημικές ομάδες: τις κυανίνες και τις χλωρίνες. [14]

Οι φθαλοκυανίνες, παράγωγα του πορφυρινικού σκελετού αποτελούν μια σημαντική κατηγορία έντονα χρωματισμένων μακροκυκλικών ενώσεων. Διαφέρουν από τις πορφυρίνες έχοντας άτομα αζώτου συνδεδεμένα στις επιμέρους πυρρολικές ομάδες. Η ισχυρή τους απορρόφηση στο ερυθρό, καλύπτει την περιοχή όπου μεγιστοποιείται η ικανότητα διείσδυσης της ακτινοβολίας εντός του ιστού, καθιστώντας τους έτσι ιδανικούς φωτοευαισθητοποιητές για την ΦΔΘ. [17]

Οι ναφθαλοκυανίνες είναι μακροκυκλικές ενώσεις με ένα δεύτερο βενζολικό δακτύλιο προστιθέμενο στην περιφέρεια του φθαλοκυανινικού δακτυλίου.

Αυτή η πρόσθετη σύζευξη προκαλεί την απορρόφηση φωτός μεγαλύτερου μήκους κύματος από τις φθαλοκυανίνες (770nm συγκριτικά με 680nm στις φθαλοκυανίνες). [17]

Οι χλωρίνες και οι βακτηριοχλωρίνες αποτελούν άλλα μέλη της οικογένειας των πορφυρινών. [17] Οι χλωρίνες διαφέρουν από τις πορφυρίνες λόγω της μερικής υδρογόνωσης του πυρολικού δακτυλίου των τελευταίων. Η κορυφή απορρόφησης τους βρίσκεται στην περιοχή του υπέρυθρου και εμφανίζουν γρήγορη και επιλεκτική συσσώρευση πάνω στον ιστό-στόχο.[14] Απορροφούν 10 φορές περισσότερο φως από αυτό που είναι χρήσιμο στις βιολογικές εφαρμογές. Στην κατηγορία των χλωρινών ανήκει και ο φωτοευαισθητοποιητής m-THPC (Foscan) που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία της παρούσας εργασίας. Οι βακτηριοχλωρίνες εμφανίζουν ακόμα πιο ισχυρή απορροφητική ικανότητα, αλλά είναι λιγότερο σταθερές στα διαλύματα. [17] Επιπλέον, και άλλοι φωτοευαισθητοποιητές με διαφορετικές τροποποιήσεις στη δομή των πορφυρινών είναι διαθέσιμοι όπως οι τεξαφυρίνες. [14]



Εικόνα 3.1: Χημικές δομές διαφορετικών φωτοευαισθητοποιητών - παραγώγων της πορφυρίνης [14]

3.3.2.1 Χαρακτηριστικά φωτοευαισθητοποιητών 2^{ης} γενιάς

Σε αντίθεση με τους φωτοευαισθητοποιητές 1^{ης} γενιάς, είναι καθαρές χημικές ενώσεις με σταθερή σύνθεση. Εμφανίζουν υψηλούς συντελεστές απορρόφησης, με τις κορυφές απορρόφησης να εντοπίζονται στις φασματικές περιοχές 660nm - 700 nm ή κοντά στην περιοχή του υπέρυθρου (700nm - 850 nm).

Σε αυτές τις περιοχές, η ικανότητα διείσδυσης της ακτινοβολίας σε ιστούς θηλαστικών φτάνει έως 20 mm βάθος (τετραπλάσια σε σχέση με τους φωτοευαίσθητοποιητές 1^{ης} γενιάς).

Ακτινοβολία με μήκος κύματος μεγαλύτερο των 850nm δεν χρησιμοποιείται γιατί η παραγόμενη ενέργεια δεν είναι ικανή να προκαλέσει κάποια φωτοχημική αντίδραση. Επιπλέον οι φωτοευαίσθητοποιητές που απορροφούν κοντά στην υπέρυθρη περιοχή μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία μελαγχρωματικών όγκων όπου η χρήση φωτοευαίσθητοποιητών που απορροφούν στο ορατό φάσμα δεν είναι αποτελεσματική.

Ο χρόνος ζωής της δεύτερης γενιάς φωτοευαίσθητοποιητών είναι σύντομος και η συσσώρευσή τους στους ιστούς είναι επιλεκτική και γρήγορη (μέσα σε 1-6 ώρες μετά τη χορήγηση), και επομένως η θεραπεία μπορεί να διεξαχθεί την ίδια ημέρα με τη χορήγηση του φαρμάκου. Επιπλέον, ο κίνδυνος εγκαυμάτων από την έκθεση στο φως του ήλιου είναι μικρός καθώς η απομάκρυνση από τους φυσιολογικούς ιστούς είναι ταχεία.

Ακόμα η τοξικότητα για το δέρμα και τα εσωτερικά όργανα σε συνθήκες έλλειψης φωτός (η αποκαλούμενη και ως «σκοτεινή» τοξικότητα) είναι μηδενική ή ελάχιστη. [14]

3.3.3 Φωτοευαίσθητοποιητές 3^{ης} γενιάς

Οι φωτοευαίσθητοποιητές αυτής της γενιάς έχουν ιδιότητες που τους επιτρέπουν την επιλεκτική μεταφορά τους στον καρκινικό ιστό. Αυτό μπορεί να συμβεί μέσω της σύζευξής τους σε βιομόρια, όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAb). Είναι γνωστό ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν στην επιφάνεια τους αντιγόνα που είναι διαφορετικά από εκείνα των φυσιολογικών κυττάρων. Έτσι η επιλεκτική πρόσδεση πάνω στον καρκινικό ιστό προκαλεί την καταστροφή μόνο αυτού χωρίς να επηρεάζεται ο υγιής ιστός. [17]

Επίσης σύζευξη φωτοευαίσθητοποιητών επιτυγχάνεται και με τη χρήση λιποπρωτεϊνών, οι οποίες μαζί με τα μονοκλωνικά αντισώματα θεωρούνται ως «οχήματα ενεργητικής στόχευσης» των καρκινικών όγκων.

Ακόμα ο συνδυασμός φωτοευαίσθητοποιητή με λιποσώματα, αιωρήματα ελαίου, βιοδιασπώμενα πολυμερή και υδρόφιλα πολυμερή χρησιμοποιείται για την επιλεκτική στόχευση καρκινικών όγκων. Αυτά τα συστήματα θεωρούνται παθητικής στόχευσης αφού χρησιμοποιούν το φυσικό τρόπο διασποράς (παθητική διάχυση και διαδικασίες φαγοκυττάρωσης). [18]

Στο παράρτημα παρατίθεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας με ενδεικτικά παραδείγματα φωτοευαίσθητοποιητών με τα βασικά χαρακτηριστικά τους.

3.4 Ενδοκυτταρικές περιοχές – στόχοι των φωτοευαισθητοποιητών in vitro

Η κατανομή των φωτοευαισθητοποιητών στο εσωτερικό του κυττάρου εξαρτάται από τον τρόπο με τον οποίο εισέρχονται σε αυτό καθώς και από τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους. [13] Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται:

- ✓ ο βαθμός υδροφοβικότητας,
- ✓ ο βαθμός ασυμμετρίας,
- ✓ το καθαρό ιοντικό φορτίο τους, το οποίο μπορεί να κυμαίνεται από -4 μέχρι και + 4, [19]
- ✓ ο αριθμός των δακτυλίων τους και
- ✓ η παρουσία ενός κεντρικού ατόμου στην τετραπυρρολική δομή τους. [13]

Τα μιτοχόνδρια, τα λυσοσώματα, η κυτταρική μεμβράνη, οι πυρήνες των καρκινικών κυττάρων και ο κυτταρικός σκελετός έχουν αξιολογηθεί ως οι πιθανοί στόχοι της ΦΔΘ. [20]

Καθώς ο συντελεστής διάχυσης στα κύτταρα είναι κοντά με αυτόν της φωτοφρίνης (Photofrin) και αρκετών φθαλοκυανινών, τα τελευταία μπορούν και διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και να συγκεντρώνονται σε ενδοκυτταρικούς στόχους, κυρίως στα μιτοχόνδρια. [14] Έτσι προκαλείται απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και απελευθέρωση κυτοχρώματος c. [21]

Το μεγαλύτερο μέρος των υδρόφιλων φωτοευαισθητοποιητών καθώς και μερικές πολικές φθαλοκυανίνες προσλαμβάνονται από τα κύτταρα μέσω πινοκύττωσης και συσσωρεύονται σε εξωπυρηνικούς κόκκους κυρίως τα λυσοσώματα. [14] Αποτέλεσμα αυτού είναι η διάρρηξη της μεμβράνης τους και η απελευθέρωση καθεψινών. Αρκετοί φωτοευαισθητοποιητές μπορούν να στοχεύσουν και να συσσωρευτούν στο ενδοπλασματικό δίκτυο και το σωματίο Golgi προκαλώντας ενδοπλασματικό «στρες» και αύξηση των επιπέδων του ενδοκυτταρικού ασβεστίου. [21]

Ακόμα θα πρέπει να σημειωθεί ότι η συσσώρευση του φωτοευαισθητοποιητή μπορεί να εξαρτάται από την κυτταρική σειρά στην οποία προστίθεται. Για παράδειγμα ο φωτοευαισθητοποιητής πορφυρίνη εντοπίζεται στα λυσοσώματα κάποιων κυτταρικών σειρών (καλλιέργεια ινοβλαστών από ανθρώπινο δέρμα) ενώ σε άλλες όχι. [14]

Σε συνθήκες in vivo, η κατάσταση είναι πιο σύνθετη καθώς ο φωτοευαισθητοποιητής εισάγεται στην κυκλοφορία του αίματος και σε πολλές περιπτώσεις αλληλεπιδρά με συστατικά του όπως οι πρωτεΐνες. [13]

3.5 Φαρμακοκινητικές ιδιότητες των φωτοευαισθητοποιητών, βιοκατανομή και συσσώρευση στους καρκινικούς όγκους

Όταν ένας φωτοευαισθητοποιητής εισάγεται στην κυκλοφορία του αίματος, συνδέεται με διάφορες πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες και η βιοκατανομή του μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες των φωτοευαισθητοποιητών μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τις παραμέτρους φωτισμού και να καθορίσουν σε μεγάλο βαθμό την καταστροφή του όγκου.

Με την ενδοφλέβια ένεση του φωτοευαισθητοποιητή προκαλείται μία σειρά φάσεων βιοκατανομής του εντός του σώματος. Αρχικά, ο φωτοευαισθητοποιητής προσδέεται σε πρωτεΐνες, όπου στη συνέχεια μεταφέρεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και δεσμεύεται στη εξωτερική πλευρά των αγγείων. [19] Συγκεκριμένα, υδρόφοβοι φωτοευαισθητοποιητές, συνδέονται ισχυρά με λιποπρωτεΐνες (λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDLs) και χαμηλής πυκνότητας(LDLs)). Είναι κοινώς αποδεκτό σήμερα ότι ο λιπόφιλος χαρακτήρας των φωτοευαισθητοποιητών αυξάνει την επιλεκτικότητά τους στους καρκινικούς όγκους. [22]

Από αυτό το βήμα, ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί στη συνέχεια είτε να προσδεθεί στην εξωκυτταρική μήτρα ή συσσωρευτεί στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων.

Το τελικό στάδιο, αποτελεί η απομάκρυνση του φωτοευαισθητοποιητή από την περιοχή-στόχο μέσω των λεμφαγγείων ή των αιμοφόρων αγγείων, και η αποβολή του είτε από τα νεφρά ή από το συκώτι.

Το αποτέλεσμα της ΦΔΘ στην καταστροφή των όγκων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη στιγμή όπου ο φωτοευαισθητοποιητής εκτίθεται στο φως κατά τη διάρκεια της βιοκατανομής του. [19]

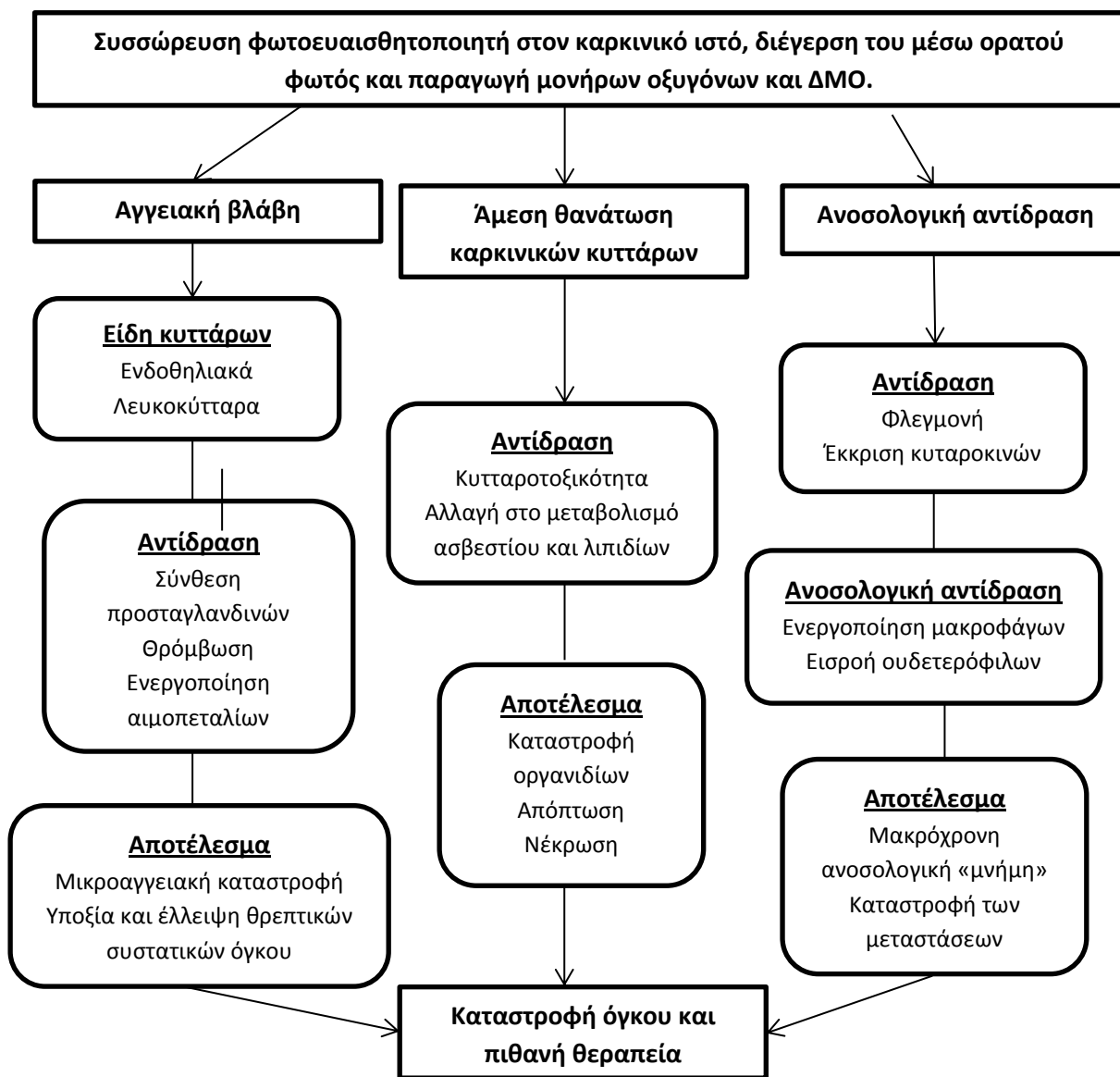
3.6 Μηχανισμοί καταστροφής καρκινικών όγκων μέσω ΦΔΘ (in vivo)

Τρεις διακριτοί μηχανισμοί έχουν αναγνωριστεί οι οποίοι συμβάλλουν στην παρατηρούμενη μείωση (και συχνά εξαφάνιση) των καρκινικών όγκων όταν αυτοί αντιμετωπίζονται με ΦΔΘ.

Στην πρώτη περίπτωση, οι ΔΜΟ που παράγονται από τη ΦΔΘ μπορούν να καταστρέψουν τον καρκινικό όγκο κατευθείαν μέσω της απόπτωσης και / ή της νέκρωσης, εάν ο φωτοευαισθητοποιητής έχει απορροφηθεί από τα κύτταρα του όγκου.

Η ΦΔΘ βλάπτει επίσης το αγγειακό σύστημα που σχετίζεται με τον όγκο. Αυτό μπορεί να προκαλέσει θρόμβωση και αιμορραγία στα καρκινικά αιμοφόρα αγγεία που στη συνέχεια οδηγεί στη θανάτωση του όγκου λόγω της έλλειψης οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών.

Τέλος, η οξεία φλεγμονή και η απελευθέρωση των κυτταροκινών που προκαλεί η ΦΔΘ στον όγκο μπορεί να οδηγήσει σε εισβολή λευκών αιμοσφαιρίων τα οποία μπορούν τόσο να συμβάλουν στην καταστροφή του συγκεκριμένου όγκου καθώς και να διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα να αναγνωρίζει και να καταστρέψει καρκινικά κύτταρα ακόμη και σε απομονωμένες περιοχές. [19]



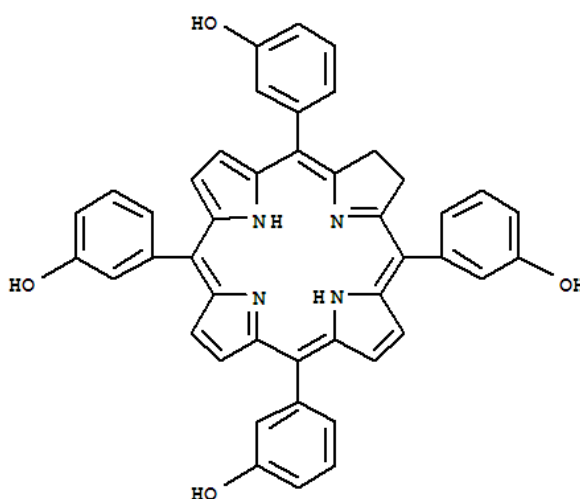
Διάγραμμα 3.1:
Μηχανισμοί καταστροφής καρκινικών όγκων μέσω ΦΔΘ [19]

3.7 Χαρακτηριστικά φωτοευαισθητοποιητή m-THPC (Foscan)

Το m-THPC έχει λάβει ευρωπαϊκή έγκριση για τη χρήση του στη θεραπεία του καρκίνου της κεφαλής και του λαιμού προχωρημένου σταδίου. Επίσης έχει αναφερθεί και η αποτελεσματικότητα της χρήσης του στη θεραπεία πρώιμων καρκινωμάτων στα επιθηλιακά κύτταρα και άλλων νεοπλασιών. Έπειτα από τη χορήγησή και την επώασή του σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων συγκεντρώνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο καθώς και στο σωματίο Golgi.

Ακόμα παρά το γεγονός ότι δε συγκεντρώνεται επιλεκτικά πάνω στα μιτοχόνδρια προκαλείται κάποια επίδραση σε αυτά μετά την ακτινοβολήση των κυττάρων. Έτσι συμπεραίνουμε ότι η απόπτωση των κυττάρων με τη φωτοδυναμική θεραπεία ξεκινά από το ενδοπλασματικό δίκτυο, το σωματίο Golgi και/ή τα μιτοχόνδρια. [23]

Ανήκει στην οικογένεια φωτοευαισθητοποιητών με χλώριο και η δομή του απεικονίζεται στην εικόνα παρακάτω.

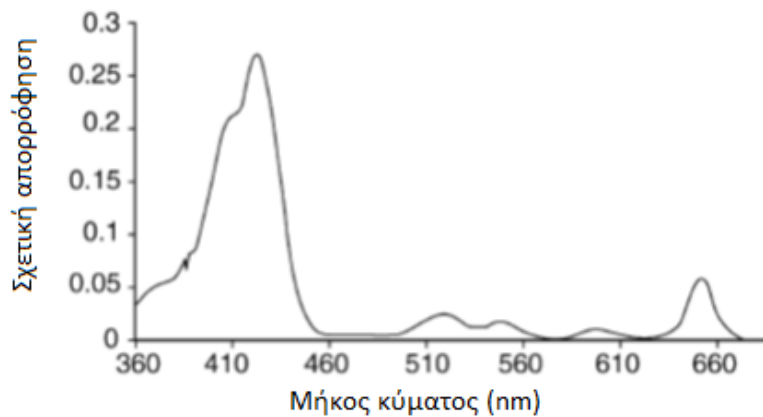


Εικόνα 3.2 : Μοριακή δομή του m-THPC (foscan) [10]

Συγκεντρώνει μία σειρά από ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά τα οποία το κατατάσσουν στην ομάδα των νεότερων φωτοευαισθητοποιητών. [10]

Η πρώτη αναφορά του m-THPC πραγματοποιήθηκε από τον Bonnett et al το 1989. Από τότε, έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες και διαπιστώθηκε ότι εμφανίζει ορισμένα πλεονεκτήματα.

- ✓ Είναι μία καθαρή ένωση που επιτρέπει την ακριβή δοσολογία του και την πιθανή παρακολούθησή του κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας.
- ✓ Εμφανίζει υψηλή απορρόφηση στην ερυθρή περιοχή και καλή εκλεκτικότητα στους καρκινικούς ιστούς.



Εικόνα 3.3: Το φάσμα απορρόφησης του m-THPC (Foscan) [25]

Συγκριτικά με άλλο φωτοευαισθητοποιητή, τη photofrin:

- ✓ Προκαλεί μικρότερη ευαισθησία στο δέρμα καθώς ο χρόνος παραμονής του σε αυτό είναι σημαντικά μικρότερος σε σχέση με το χρόνο παραμονής της photofrin. [24] Οι ασθενείς μπορούν να έρθουν σε επαφή με υποτονικό φως εσωτερικών χώρων 4 ή 5 ημέρες μετά τη χορήγηση του m-THPC. Η φωτοευαισθησία που προκαλείται διαρκεί μόλις 3 εβδομάδες συγκριτικά με τη photofrin όπου το χρονικό διάστημα ανέρχεται σε 6-12 εβδομάδες. [26]
- ✓ Όσον αφορά τη συνολική φωτοδυναμική δόση (δόση φωτοευαισθητοποιητή × δόση φωτός), είναι περίπου 200 φορές πιο ισχυρό από τη photofrin. [24] Η απαιτούμενη δόση φωτός ανέρχεται στα 10-20 J/cm². [26]
- ✓ Παρουσιάζει το μέγιστο της απορρόφησης σε μήκος κύματος 652nm ενώ το αντίστοιχο μέγιστο με χρήση photofrin είναι στα 630nm. Αυτό συνεπάγεται την αποτελεσματικότερη δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας καθώς στα υψηλότερα μήκη κύματος η ικανότητα διείσδυσης της ακτινοβολίας στον καρκινικό ιστό αυξάνεται. [26]

Παρόλο που το m-THPC εμφανίζει μια σειρά από πλεονεκτήματα, το πρόβλημα της φωτοευαισθησίας, αν και μικρότερο σε σχέση με άλλους φωτοευαισθητοποιητές, παραμένει. Η μείωση της χορηγούμενης δόσης φωτοευαισθητοποιητή με ταυτόχρονη διατήρηση της φωτοδυναμικής δράσης αποτελεί ζητούμενο. Προς αυτή την κατεύθυνση, η μείωση της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων θα μπορούσε να συμβάλλει στον περιορισμό της φωτοευαισθησίας. Μικρότερη ποσότητα φωτοευαισθητοποιητή σε κύτταρα πιο ευάλωτα ως προς τα οξειδωτικά ερεθίσματα, διατηρεί τη φωτοδυναμική δράση περιορίζοντας τη φωτοευαισθησία.

Η μείωση της γλουταθειόνης, βασικού ρυθμιστή της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων, με χρήση κατάλληλων παραγόντων, όπως το BSO, είναι μια προσέγγιση ως προς την επίλυση του προβλήματος της φωτοευαισθησίας που προαναφέρθηκε.

Κεφάλαιο 4.

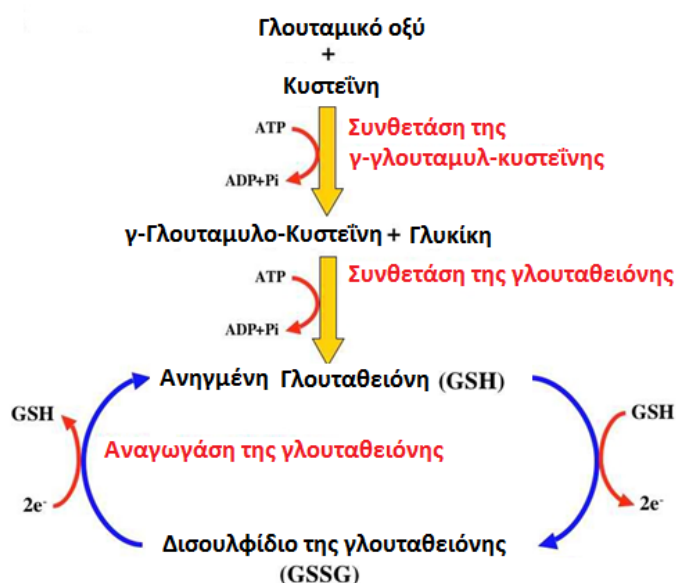
Γλουταθειόνη

4.1 Ιστορική αναδρομή

Η ιστορία της γλουταθειόνης αρχίζει το 1888, όταν ο de Ray Pailhand ανακάλυψε την ουσία «hydrogenant de souffre», η οποία είχε την ιδιότητα να ανάγει το στοιχειακό θείο, και την οποία ονόμασε «philothion». Αργότερα, η ουσία αυτή απομονώθηκε από το χημικό Hopkins και ονομάστηκε γλουταθειόνη. Τέλος, η ανακάλυψη της γλουταθειονυλοσπερμιδίνης από τους Tabor και Tabor το 1975 και της τρυπανοθειόνης από τους Fairlamb et al το 1985 αποτέλεσε την αρχή των μελετών για τις αντιοξειδωτικές δράσεις της γλουταθειόνης. [27]

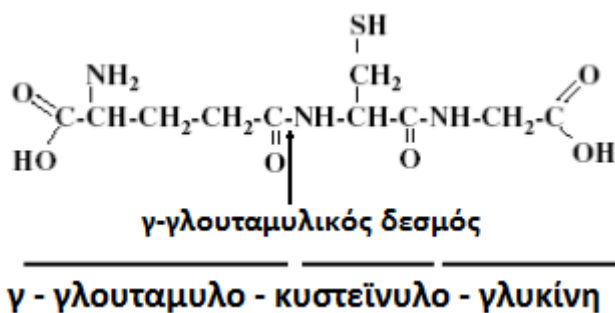
4.2 Ο κύκλος της γλουταθειόνης-δομή και σύνθεση

Η γλουταθειόνη (GSH, γ-γλουταμυλο-κυστεΐνυλο-γλυκίνη), είναι η πιο άφθονη μη πρωτεϊνική θειόλη στα ευκαρυωτικά κύτταρα. [28] Αποτελείται από κυστεΐνη γλουταμικό οξύ και γλυκίνη. [29] Η σύνθεση αυτού του τριπεπτιδίου πραγματοποιείται σε δύο στάδια και καταλύεται από δύο ένζυμα που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Στο πρώτο στάδιο συμμετέχει η συνθετάση της γ-γλουταμυλο-κυστεΐνης, ενώ στο δεύτερο η συνθετάση της γλουταθειόνης η οποία συνδυάζει τη γ-γλουταμυλο-κυστεΐνη με τη γλυκίνη για την παραγωγή της γλουταθειόνης. (Εικόνα 4.1)



Εικόνα 4.1: Βιοσύνθεση και αναπαραγωγή της γλουταθειόνης

Η διαθεσιμότητα σε κυστεΐνη και η δραστικότητα του ενζύμου συνθετάση της γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης αποτελούν τους περιοριστικούς παράγοντες στη σύνθεση της γλουταθειόνης. [28] Τα δύο πιο σημαντικά δομικά χαρακτηριστικά της γλουταθειόνης είναι ο γ-γλουταμυλικός δεσμός και η σουλφυδρική ομάδα (-SH). [29] (Εικόνα 4.2)



Εικόνα 4.2: Η δομή της γλουταθειόνης [29]

Η γλουταθειόνη έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην άμυνα του κυττάρου απέναντι σε ένα μεγάλο αριθμό ζημιογόνων παραγόντων. Υπό κανονικές συνθήκες σταθερής κατάστασης, το μεγαλύτερο μέρος της γλουταθειόνης που υπάρχει είναι σε ανηγμένη μορφή. Η οξείδωση της γλουταθειόνης, είτε ενζυμικά με τη δράση της γλουταθειόνο υπεροξειδάσης είτε μη ενζυμικά, παράγει το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG). Η αναγωγή του τελευταίου μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης ολοκληρώνει τον κύκλο της γλουταθειόνης και διατηρεί αποτελεσματικά την ενδοκυττάρια συγκέντρωσή της. [30] Υπό κανονικές συνθήκες η συγκέντρωση της γλουταθειόνης στα ζωικά κύτταρα κυμαίνεται από 1mM μέχρι και 10mM με την ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH) να υπερσχύει της οξειδωμένης (GSSG). Η διατήρηση της βέλτιστης αναλογίας GSH/GSSG είναι κρίσιμη για την επιβίωση και αμυντική λειτουργία του κυττάρου ως προς την οξείδωση. Αυτή η αναλογία υπερβαίνει το 100 σε κανονικές συνθήκες, ενώ σε διάφορες καταστάσεις οξειδωτικού στρες η τιμή της μειώνεται και κυμαίνεται μεταξύ 1 και 10. [29]

4.3 Εντοπισμός της γλουταθειόνης στο εσωτερικό του κυττάρου

Η οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης η οποία αντιπροσωπεύει ποσοστό μεγαλύτερο του 90% των μη πρωτεϊνικών θειολών του κυττάρου. Το μεγαλύτερο μέρος της γλουταθειόνης εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, εντούτοις ένα μικρό αλλά σημαντικό ποσοστό (10-15%) υπάρχει στα μιτοχόνδρια.

Η μιτοχονδριακή γλουταθειόνη είναι υψίστης σημασίας στην προστασία των οργανιδίων από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ) που παράγονται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση και τη μεταφορά συζευγμένων μιτοχονδριακών οξυγόνων. [31]

4.4 Ο ρόλος της γλουταθειόνης στην κυτταρική λειτουργία

Η γλουταθειόνη συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η επιδιόρθωση του DNA, ο κυτταρικός κύκλος, η ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων του κυττάρου. [29] Αποτελεί το πιο άφθονο ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό και έχει ένα σημαντικό ρόλο στην προστασία έναντι των δραστικών μορφών οξυγόνου (ΔΜΟ), το μεταβολισμό των θρεπτικών και των ξενοβιοτικών ουσιών και τη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο εσωτερικό του κυττάρου. Σχετίζεται με την αναδόμηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών στην αρχική μη οξειδωμένη κατάσταση τους αλλά και με την εξέλιξη του αερόβιου μεταβολισμού στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το οποίο εξηγεί και το ρόλο της γλουταθειόνης στην προστασία έναντι της τοξικότητας που προκαλείται από το οξυγόνο. [32]

4.5 Η γλουταθειόνη στα καρκινικά κύτταρα

Τα επίπεδα της γλουταθειόνης έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζονται αυξημένα σε διάφορα καρκινικά κύτταρα, όπως για παράδειγμα στο μυελό των οστών, στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, των ωοθηκών, του παχέος εντέρου, του λάρυγγα και των πνευμόνων. Η αύξηση αυτή συχνά συνδέεται με μια αυξημένη αντίσταση που προβάλλει ο αμυντικός μηχανισμός του κυττάρου έναντι χημειοθεραπευτικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται κατά τη θεραπευτική διαδικασία. Παρομοίως, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η ανθεκτικότητα σε ορισμένα φάρμακα που περιέχουν ενώσεις όπως κυκλοφωσφαμίδη, μελφαλάνη, μεχλωρεθαμίνη, σχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα της γλουταθειόνης στο εσωτερικό των κυττάρων. [33]

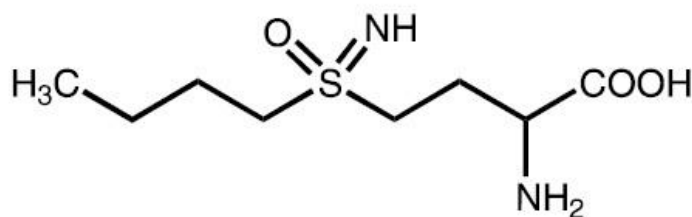
Από την άλλη πλευρά, όταν τα επίπεδα της ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης είναι χαμηλά (έπειτα από χρήση ορισμένων φαρμάκων, όπως BSO), τα κύτταρα είναι περισσότερο ευάλωτα στις δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ). Η αύξηση των ΔΜΟ στα καρκινικά κύτταρα (οξειδωτικό στρες) ίσως αποτελεί μέρος από την έναρξη και την εξέλιξη του καρκίνου, και θεωρείται συχνά ως ανεπιθύμητη ενέργεια. Ωστόσο, τα υπερβολικά υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες μπορούν να προκαλέσουν τοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα.

Έτσι τα κύτταρα είναι πιθανό να είναι πιο ευάλωτα από την περαιτέρω αύξηση των ΔΜΟ, που προκαλείται από εξωγενείς παράγοντες, και να ανταποκρίνονται καλύτερα σε θεραπείες που βασίζονται στην παραγωγή ΔΜΟ.

Επομένως, η αλλαγή των επιπέδων των ΔΜΟ με τη διαφοροποίηση της γλουταθειόνης αποτελεί ένα τρόπο επιλεκτικής θανάτωσης των καρκινικών κυττάρων χωρίς να προκαλείται σημαντική τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα. [29]

4.6 L-S,R-Μεθειονίνη σουλφοξιμίνη (BSO)

Το BSO αποτελεί παράγωγο του MSO (μεθειονίνη σουλφοξιμίνη). Το MSO ήταν ένας πολύ αποτελεσματικός αναστολέας στη βιοσύνθεση της γλουταθειόνης αλλά ταυτόχρονα ήταν εξαιρετικά τοξικός πιθανότατα λόγω της μικρής εξειδίκευσής του. Κατά συνέπεια, παράγωγα του MSO συντέθηκαν και αξιολογήθηκαν ως προς την εξειδίκευση και τη δραστηρότητά τους *in vitro* και *in vivo*. Το BSO βρέθηκε ως το πιο ειδικό και λιγότερο τοξικό παράγωγο από όσα εξετάστηκαν. [34]



Εικόνα 4.3: Η χημική δομή του BSO [36]

Το BSO, μια αμινοσουλφοξιμίνη, έχει αποδειχθεί, *in vitro*, να δρα ανασταλτικά σε μια ποικιλία χημειοθεραπευτικών παραγόντων και να μειώνει τα επίπεδα της ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης (GSH). Παρεμποδίζει επιλεκτικά τη δράση της συνθετάσης της γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης (GCS), η οποία αποτελεί περιοριστικό παράγοντα, στα στάδια σύνθεσης της γλουταθειόνης. Αναλύσεις ως προς την ικανότητα των διαστερεοϊσομερών του BSO στην παρεμπόδιση της GCS έχουν αποδείξει ότι μόνο η L(S) μορφή του είναι δραστική. [35] Ο ρόλος του BSO ως αντικαρκινικός παράγοντας σχετίζεται με την κυτταροτοξικότητα που προκαλείται μέσω της μείωσης της γλουταθειόνης. Έχει παρατηρηθεί ότι μικρομοριακές συγκεντρώσεις BSO προκαλούν σημαντική κυτταροτοξικότητα, *in vitro* και *in vivo*, έναντι κυτταρικών σειρών μελανώματος.

Ο μηχανισμός αυτής της επιλεκτικής κυτταροτοξικότητας κατά των κυττάρων μελανώματος, πιθανόν εμπλέκει τη δημιουργία ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια της μελανογένεσης. [34] Επίσης υψηλή κυτταροτοξικότητα έχει αναφερθεί και για κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος, όπου το BSO εμφανίζεται να προκαλεί απόπτωση των κυττάρων σαν αποτέλεσμα της μείωσης της γλουταθειόνης, αντιοξειδωτικού κρίσιμου για την κυτταρική επιβίωση. [35]

Τα επίπεδα γλουταθειόνης στο ήπαρ, το πάγκρεας και τους σκελετικούς μύες μειώνονται ταχύτατα έπειτα από τη χορήγηση του BSO σε ποντίκια. Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση του BSO επιδρά στην τοξικότητα των χημικών, τα οποία ανάγονται από τη γλουταθειόνη, καθιστώντας τη δράση τους πιο ισχυρή. Έχει αναφερθεί επίσης ότι τα επίπεδα της γλουταθειόνης σε κάποιους ιστούς όπως της καρδιάς και του σπλήνα εμφανίζουν μικρή μείωση μετά τη χορήγηση BSO σε ποντίκια. [36]

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 5.

Σκοπός

Για να εξασφαλιστεί φωτοδυναμική δράση ικανή να προκαλέσει τη νέκρωση του καρκινικού ιστού συνήθως οι φωτοευαισθητοποιητές χορηγούνται σε σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις με συνέπεια την σοβαρή παρενέργεια της φωτοευαισθησίας. Επιπλέον τη φωτοδυναμική δράση ανταγωνίζονται μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας οι οποίοι δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται από τη φωτοδυναμική, αναστέλλοντας τη δράση της. Η αναζήτηση μεθόδων οι οποίες σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική θεραπεία, θα διατηρούν την ικανότητα της φωτοδυναμικής δράσης περιορίζοντας παράλληλα τη φωτοευαισθησία στους οργανισμούς, αποτελεί ζητούμενο.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της συνδυασμένης δράσης της φωτοδυναμικής θεραπείας με καταστολή της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη.

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα προστάτη σειράς LNCaP, φωτοευαισθητοποιητής m-THPC (Foscan) για την επαγωγή της φωτοδυναμικής δράσης, καθώς και ο παράγοντας BSO σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για την καταστολή της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας.

Κεφάλαιο 6.

Πειραματικές διατάξεις

6.1 Κλίβανος επώασης

Ο κλίβανος επώασης χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια των κυττάρων παρέχοντας κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και συγκέντρωσης CO₂ για την ανάπτυξή τους. Η θερμοκρασία επιλέγεται στους 37⁰C και η συγκέντρωση του παρεχόμενου CO₂ είναι 5%. Αναφορικά με τα επίπεδα υγρασίας, τοποθετείται στη βάση του κλιβάνου, δοχείο το οποίο περιέχει κορεσμένο υδατικό διάλυμα άλατος (διβασικού δωδεκαϋδρικού φωσφορικού νατρίου).



Εικόνα 6.1:
Κλίβανος επώασης [37]

6.2 Καταψύκτης

Κατά το στάδιο της κατάψυξης, τα φιαλίδια με τα κύτταρα πριν εισέλθουν στο υγρό άζωτο, όπου και μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα, εισάγονται στον καταψύκτη όπου παραμένουν για 24 ώρες. Η θερμοκρασία στο εσωτερικό του καταψύκτη παραμένει σταθερή στους -80 °C. Η παραμονή των κυττάρων στον καταψύκτη επιτρέπει τη σταδιακή κατάψυξή τους χωρίς την πρόκληση κυτταρικού σοκ από τη μείωση της θερμοκρασίας.



Εικόνα 6.2: Καταψύκτης [37]

6.3 Δοχείο υγρού αζώτου

Η διατήρηση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα πραγματοποιείται στο υγρό άζωτο όπου η θερμοκρασία παραμένει στους -190°C . Είναι ένα δοχείο, από θερμομονωτικό υλικό, το οποίο περιέχει θήκες, στις οποίες τοποθετούνται τα φιαλίδια με τα κύτταρα.



Εικόνα 6.3:
Δοχείο Υγρού Αζώτου [37]

6.4 Σύστημα Απεικονιστικής Μικροσκοπίας

Για την παρατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιείται ανάστροφο μικροσκόπιο UNITRON στη βάση του οποίου βρίσκεται προσαρτημένη CCD camera, μέσω της οποίας είναι εφικτή η λήψη φωτογραφιών των κυτταρικών καλλιιεργειών. Το δείγμα (συνήθως βρίσκεται επάνω σε ένα πλακίδιο), τοποθετείται πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Μετακινώντας τους μικρομετρικούς ρυθμιστές της αντικειμενοφόρου πλάκας, μπορούμε να πάρουμε μια στιγμιαία λήψη της εικόνας του πλακιδίου, η οποία μας ενδιαφέρει. Οι αντικειμενικοί φακοί είναι διάφορων μεγεθύνσεων (10x, 20x, 40x), ενώ οι προσοφθάλμιοι είναι 10x. Έτσι η συνολική μεγέθυνση κυμαίνεται από 100x έως 400x. Στο συγκεκριμένο μικροσκόπιο, ο φωτισμός βρίσκεται στο επάνω μέρος του, ενώ το σύστημα των αντικειμενικών φακών βρίσκεται κάτω από το επίπεδο της αντικειμενοφόρου πλάκας.



Εικόνα 6.4:
Ανάστροφο μικροσκόπιο [38]

6.5 Συστήματα laser για Φωτοδυναμική Θεραπεία

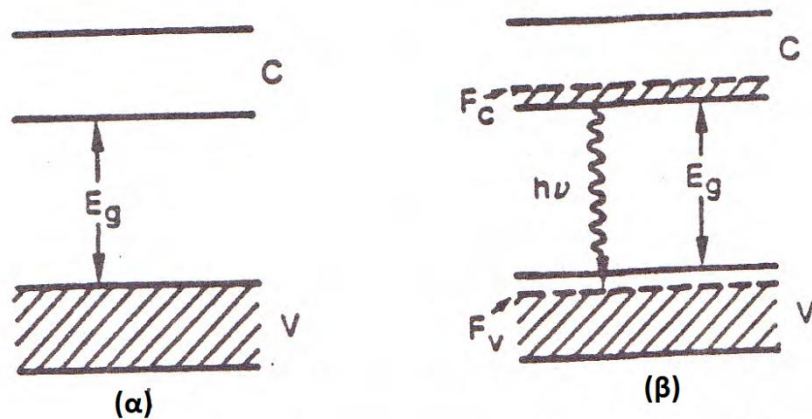
6.5.1 Χαρακτηριστικά των lasers ημιαγωγών

Τα laser ημιαγωγών ή διοδικά laser, έχουν γενικά μικρή ισχύ έως 4 W, με αποτέλεσμα να συγκαταλέγονται κυρίως στην κατηγορία των μαλακών laser. Στις χαμηλές αυτές τιμές ισχύος η ακτινοβολία τους:

- Δεν προκαλεί ούτε θερμότητα, ούτε κάποιες μακροχημικές ή ανατομικές μεταβολές στους ιστούς.
- Είναι δυνατό να βοηθήσει τις δραστηριότητες των κυττάρων και την ενδοκυτταρική επικοινωνία.
- Επιδρά θετικά στο ανοσοποιητικό σύστημα, με αποτέλεσμα να παρατηρείται αύξηση της ενδογενούς θεραπευτικής ικανότητας του οργανισμού.
- Έχουν μικρές φυσικές διαστάσεις.
- Παρέχουν τη δυνατότητα εκπομπής διαφορετικών μηκών κύματος, στο ορατό και το υπέρυθρο, ανάλογα με το είδος της διόδου που χρησιμοποιείται. [39]

6.5.2 Βασική αρχή λειτουργίας των laser ημιαγωγών

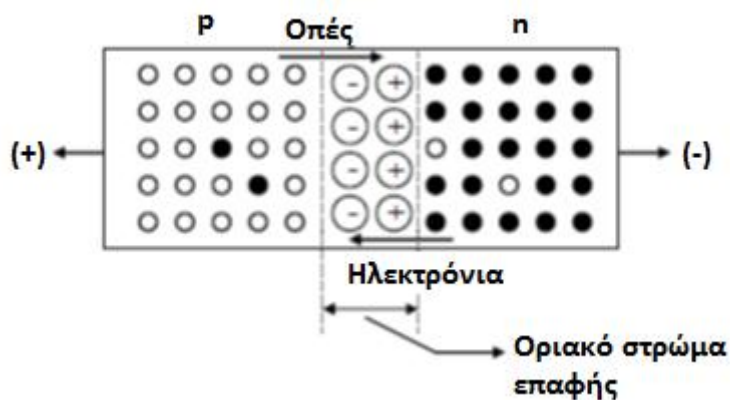
Σε ένα εξιδανικευμένο αγωγό, το φάσμα ενεργειακών επιπέδων αποτελείται από πολύ ευρείες ζώνες. Το ενδιαφέρον εστιάζεται στη ζώνη σθένους V και τη ζώνη αγωγιμότητας C, ανάμεσα στις οποίες παρεμβάλλεται περιοχή απαγορευμένων ενεργειών (ζώνη χάσματος). Κάθε ζώνη αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό ενεργειακών καταστάσεων. Υποθέτουμε ότι τα ηλεκτρόνια με κάποιο τρόπο διεγείρονται από τη ζώνη σθένους στη ζώνη αγωγιμότητας. Μετά από ένα πολύ μικρό χρόνο (της τάξης των 10^{-13} s) τα ηλεκτρόνια στη ζώνη αγωγιμότητας θα έχουν πέσει στα χαμηλότερα ενεργειακά επίπεδα μέσα στη ζώνη αγωγιμότητας και επίσης τα ηλεκτρόνια κοντά στην κορυφή της ζώνης σθένους θα έχουν πέσει στα χαμηλότερα μη κατειλημμένα επίπεδα, αφήνοντας έτσι την κορυφή της ζώνης σθένους γεμάτη οπές. Αυτό σημαίνει πως υπάρχει τότε αναστροφή πληθυσμών μεταξύ των ζωνών σθένους και αγωγιμότητας. Τα ηλεκτρόνια στη ζώνη αγωγιμότητας πέφτουν πίσω στη ζώνη σθένους, επανασυνδέονται με τις οπές, εκπέμποντας φως (ακτινοβολία επανασύνδεσης) ενέργειας ίσης με την ενέργεια του ενεργειακού χάσματος ($E_g = h\nu$). Όταν ο ημιαγωγός τοποθετηθεί σε κατάλληλο οπτικό αντηχείο η ακτινοβολία επανασύνδεσης ενισχύεται διαδοχικά παράγοντας φως laser. [40]



Εικόνα 6.5: (α) ζώνη σθένους και αγωγιμότητας σε ημιαγωγό (β) αντιστροφή πληθυσμών [40]

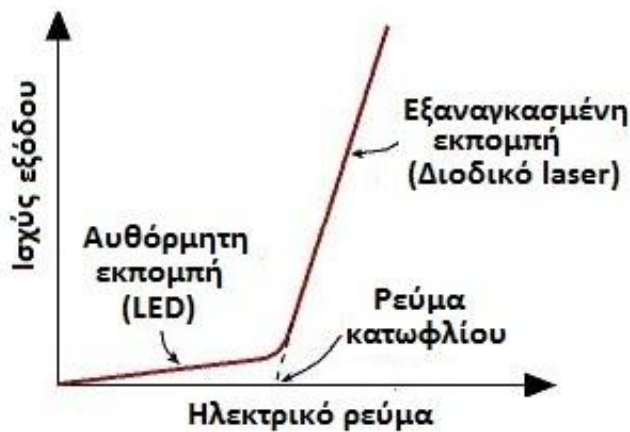
6.5.3 Επαφή p-n

Όταν ένας ημιαγωγός τύπου p έλθει σ' επαφή με έναν ημιαγωγό τύπου n, τότε κατά μήκος μιας στενής περιοχής της επαφής των δυο ημιαγωγών, περιοχή απογύμνωσης, που είναι της τάξης 1 – 2 μm, παρατηρείται διάχυση ηλεκτρονίων και οπών.



Εικόνα 6.6 : Λειτουργία της επαφής p-n [39]

Τα ηλεκτρόνια προέρχονται από τα πλεονάζοντα ηλεκτρόνια της πλευράς n, ενώ οι οπές προέρχονται από την πλευρά p. Με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, η παροχή των ηλεκτρονίων είναι συνεχής και η διάχυση αυτή συντηρείται. Όμως κατά μήκος του οριακού στρώματος της επαφής τα ηλεκτρόνια επανασυνδέονται με τις οπές. Με κάθε επανασύνδεση ηλεκτρονίου – οπής, ελευθερώνεται ενέργεια υπό μορφή φωτονίων. [39] Στην περίπτωση που η ορθή πόλωση της διόδου προκαλέσει ένα σχετικά μικρό ρεύμα (μικρότερο του ρεύματος κατωφλίου) διά μέσου της, τα φωτόνια εκπέμπονται με εντελώς αυθόρμητο τρόπο προς κάθε κατεύθυνση. Τότε η διάταξη αυτή αποτελεί πηγή ασύμφωνου φωτός και ονομάζεται LED.



Διάγραμμα 6.1

Ποιοτικό διάγραμμα εξάρτησης εκπομπής φωτονίων από διερχόμενο ρεύμα δίοδου

Το φαινόμενο όμως της εκπομπής αρχίζει να αλλάζει μορφή αν με τη βοήθεια της εξωτερικής πηγής αρχίζουμε να αυξάνουμε το ρεύμα των εγχεόμενων ηλεκτρονίων στην p - περιοχή. Πράγματι τότε η εκπομπή των φωτονίων αρχίζει να γίνεται εξαναγκασμένη επειδή λόγω της μεγάλης πυκνότητας, τα ήδη εκπεμπόμενα φωτόνια προλαβαίνουν και προτρέπουν σε επανασύνδεση ζεύγη ηλεκτρονίων οπών. Η επιπλέον αύξηση της πυκνότητας του ρεύματος των εγχεόμενων ηλεκτρονίων, θα έχει σαν αποτέλεσμα η εκπομπή των φωτονίων να είναι ολοκληρωτικά σχεδόν εξαναγκασμένη. Η πολλαπλή επίσης διαδρομή των φωτονίων διαμέσου της επαφής $p-n$ λόγω της μεγάλης ανακλαστικότητας των άκρων της, θα έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ενίσχυσης του παραγόμενου συμφώνου πλέον φωτός σε τέτοιο βαθμό ώστε υπερτερώντας των φαινομένων της απορρόφησης, της σκέδασης και των απωλειών στα παράπλευρα τοιχώματα, από την δίοδο να προκύπτει μία δέσμη laser με αρκετά μεγάλο βαθμό συμφωνίας.

6.5.4 Λειτουργία των laser ημιαγωγών

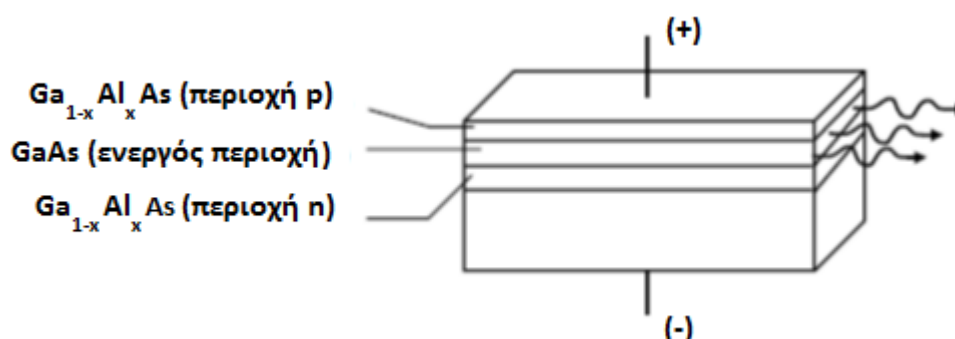
Στα laser ημιαγωγών χρησιμοποιείται ως ενεργό υλικό το οριακό στρώμα της επαφής $p-n$ δυο ημιαγωγών όπως αυτό περιγράφηκε προηγουμένως. Για να χρησιμοποιηθεί μια τέτοια επαφή για δράση laser, πρέπει να συνυπάρχουν και οι άλλες απαιτήσεις, δηλαδή η οπτική ανάδραση, η άντληση και η αναστροφή πληθυσμών.

Η άντληση επιτυγχάνεται με την εφαρμογή τάσης ορθής πόλωσης στην ημιαγωγό διάταξη και έτσι έχουμε διαρκή επαναφορά ηλεκτρονίων αγωγιμότητας στην πλευρά n με ταυτόχρονη αναστροφή πληθυσμών κατά μήκος του οριακού στρώματος της επαφής.

Η αναστροφή πληθυσμών, όπως περιγράφηκε νωρίτερα, πραγματοποιείται μεταξύ των ενεργειακών ζωνών αγωγιμότητας και σθένους και επομένως το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας εξαρτάται από το εύρος E_g του ενεργειακού χάσματος. [39]

6.5.5 Διοδικό Laser GaAlAs

Ένας αντιπροσωπευτικός τύπος laser δίοδου είναι η δίοδος GaAlAs διπλής ετεροεπαφής. Στη δίοδο αυτή η ενεργός περιοχή είναι ένα ενδιάμεσο λεπτό στρώμα GaAs με πάχος 0.1 – 0.3 μm που βρίσκεται σε επαφή μεταξύ δυο διαφορετικών ημιαγωγών στρωμάτων.



Εικόνα 6.7:
Τυπική δομή μιας GaAlAs δίοδου Laser διπλής ετεροεπαφής [39]

Οι δυο αυτές επαφές είναι του τύπου Ga_{1-x}Al_xAs – GaAs / GaAs – Ga_{1-x}Al_xAs όπου x είναι ένας θετικός αριθμός μικρότερος της μονάδας.

Η επιλογή αυτής της διπλής ετεροεπαφής κρίνεται αναγκαία για τους παρακάτω λόγους:

- Μειώνεται κατά πολύ η ελάχιστη πυκνότητα ρεύματος που πρέπει να διαρρέει τη δίοδο για εκπομπή laser.
- Το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας εξαρτάται από την αριθμητική τιμή της παραμέτρου x, δηλαδή από το λόγο των συγκεντρώσεων Ga προς Al στις περιοχές των δυο ετεροεπαφών.

Οι λειτουργικές αυτές ιδιότητες της δίοδου GaAlAs και γενικά όλων των δίοδων laser, σε συνδυασμό με το μικρό τους μέγεθος και το χαμηλό κόστος τις καθιστούν ιδανικές για χρήση σε βιοϊατρικές διατάξεις laser. Στην κατηγορία αυτή ανήκει και το laser χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία. [39]

6.5.6 Πειραματική διάταξη laser

Η πειραματική διάταξη ακτινοβολήσης η οποία χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αποτελείται από το διοδικό laser διπλής ετεροεπαφής, ένα σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας της διόδου και ένα σύστημα ελέγχου της ισχύος εξόδου, μέσω του ρεύματος που διαρρέει τη δίοδο.



Εικόνα 6.8: Εργαστηριακή διάταξη laser

6.5.6.1 Το σύστημα ψύξης

Το μήκος κύματος στο οποίο εκπέμπει το laser καθορίζεται από τη θερμοκρασία της διόδου. Η μείωση της θερμοκρασίας προκαλεί αύξηση στο ενεργειακό χάσμα και επομένως μείωση του εκπεμπόμενου μήκους κύματος. Το επιθυμητό μήκος κύματος για τη διέγερση του m-THPC είναι τα 652nm. Στη συγκεκριμένη δίοδο αυτό επιτυγχάνεται σε θερμοκρασίες κοντά στους 6⁰C, οπότε απαιτείται ένα σύστημα ψύξης το οποίο θα μειώνει τη θερμοκρασία στην επιθυμητή τιμή. Το σύστημα ψύξης επίσης περιέχει και ένα παθητικό απαγωγό θερμότητας (ψύκτρα). Τέλος, το ρεύμα ελέγχεται μέσω του θερμοηλεκτρικού ελεγκτή θερμοκρασίας LDT-5525, της εταιρίας ILX Lightwave. (Εικόνα 6.9)

6.5.6.2 Τροφοδοσία της διόδου

Οι δίοδοι laser είναι εξαιρετικά ευαίσθητες σε ηλεκτροστατικές εκφορτίσεις και σε παλμούς ρεύματος (μεταβατικά ρεύματα). Και τα δύο αυτά φαινόμενα είναι ικανά να προκαλέσουν βλάβη σε αυτές, με αποτέλεσμα την ελάττωση της ισχύος εξόδου, τη μετατόπιση στο ρεύμα κατωφλίου και τελικά την καταστροφή της διόδου.

Για το σκοπό αυτό επιλέχτηκε το τροφοδοτικό ρεύματος LDX-3525, της εταιρίας ILX Lightwave. (Εικόνα 6.9)



Εικόνα 6.9: Το τροφοδοτικό της διόδου (πάνω) και ο ελεγκτής θερμοκρασίας (κάτω)

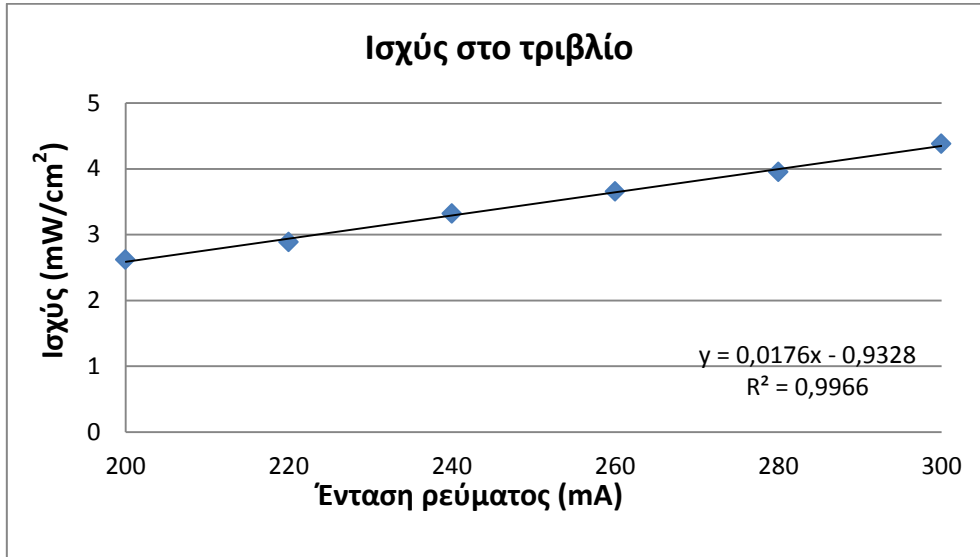
6.5.6.3 Βαθμονόμηση διάταξης

Η εύρεση της θερμοκρασίας για την οποία το μήκος κύματος του laser γίνεται το επιθυμητό (652nm) έγινε με τη βοήθεια ενός μονοχρωμάτορα και ενός παλμογράφου. Ο μονοχρωμάτορας ρυθμιζόταν στο εκάστοτε μήκος κύματος που έπρεπε να ανιχνευτεί και σημειωνόταν η θερμοκρασία στην οποία το σήμα του παλμογράφου γινόταν μέγιστο. Έτσι προέκυψαν ζεύγη θερμοκρασίας μήκους κύματος.

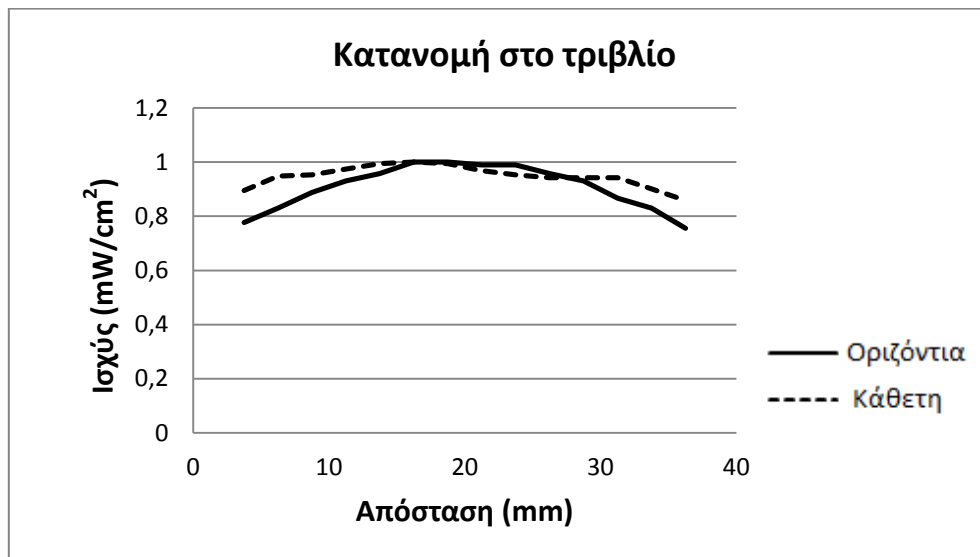
Ενδεικτικά αναφέρονται οι τιμές 652 nm για $\theta = -6^{\circ}\text{C}$ και 654 nm για $\theta = 0^{\circ}\text{C}$. Εκτιμήθηκε ότι η μεταβολή του μήκους κύματος με τη θερμοκρασία είναι $0,3\text{nm}/^{\circ}\text{C}$, με αβεβαιότητα $0,5\text{nm}$.

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

Για επίτευξη ισχύος $1,5\text{mW}/\text{cm}^2$ το τροφοδοτικό ρυθμίζεται στα 136mA και το σύστημα ψύξης στα $2,15\text{ A}$. Οι αντίστοιχες τιμές για τα $3\text{mW}/\text{cm}^2$ είναι 220 mA και $2,20\text{ A}$.



Διάγραμμα 6.2: Εξάρτηση της ισχύος του laser που φτάνει στο τριβλίο από το ρεύμα διόδου



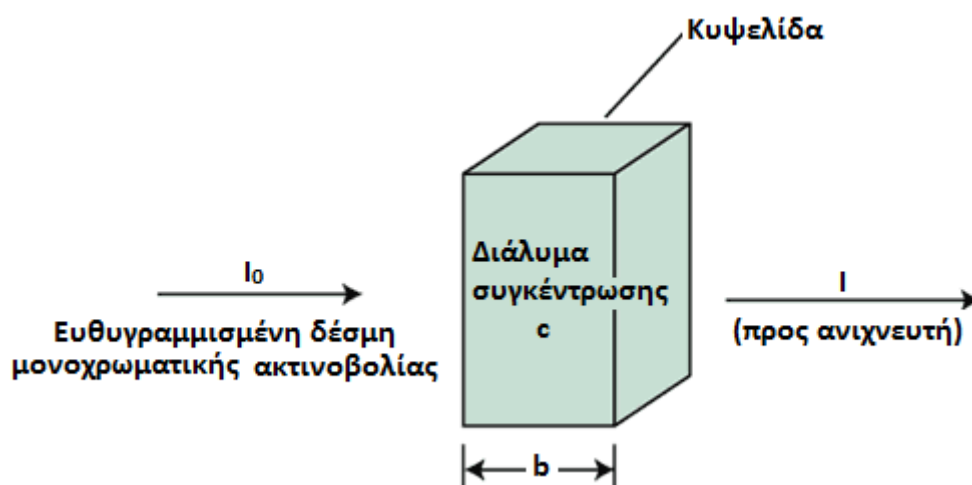
Διάγραμμα 6.3: Κατανομή της ισχύος σε μήκος και πλάτος του τριβλίου, κανονικοποιημένη ως προς την ισχύ του κέντρου του τριβλίου (20mm, 20mm)

6.6 Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης

Αναπτύχθηκε μέθοδος μέτρησης απορρόφησης για τον προσδιορισμό της φωτοδυναμικής βλάβης που προκαλείται στα κύτταρα μετά από την εφαρμογή της ΦΔΘ, μέσω φασματοσκοπίας απορρόφησης.

6.6.1 Η αρχή της απορρόφησης της ακτινοβολίας, νόμος LAMBERT – BEER

Κατά την απορρόφηση, μια δέσμη ακτινοβολίας I_0 κατευθύνεται σ' ένα δείγμα και μετριέται η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας I . Για να έχουμε απορρόφηση πρέπει τα φωτόνια που προσκρούουν στο δείγμα να έχουν ενέργεια ίση μ' αυτή που χρειάζεται για να προκληθεί μια ηλεκτρονική μεταβολή. Τότε μόνο παρατηρείται απορρόφηση, η οποία ελαττώνει την ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας. Η ποσοτική έκφραση της απορρόφησης δίνεται από το νόμο LAMBERT – BEER, ο οποίος ορίζει τη σχέση μεταξύ της ελάττωσης της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και της συγκέντρωσης του διαλύτη, μέσα από τον οποίο διέρχεται η ακτινοβολία. [41] (Εικόνα 6.10)



Εικόνα 6.10:
Εξασθένιση δέσμης ακτινοβολίας που διέρχεται μέσω του απορροφούντος διαλύματος

Για τη μειωμένη ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας ισχύει:

$$I = I_0 \times 10^{-\epsilon bc}$$

Και ακολούθως:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \times b \times c ,$$

(Νόμος του LAMBERT – BEER)

Όπου:

A = απορρόφηση,

I_0 = ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας,

I = μειωμένη ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας,

ε = μοριακή απορροφητικότητα ή μοριακός συντελεστής απόσβεσης ($l/mol \times cm$),

b = πάχος της κυψελίδας (cm),

c = συγκέντρωση της απορροφούσας ουσίας (mol/l) [41]

6.6.2 Προϋποθέσεις για την ισχύ του νόμου LAMBERT – BEER

Οι βασικές προϋποθέσεις για την ισχύ του νόμου του LAMBERT – BEER είναι:

- Η προσπίπτουσα ακτινοβολία πρέπει να είναι **μονοχρωματική** για να είναι σταθερή η μοριακή απορροφητικότητα ε . Αυτό επιτυγχάνεται όταν οι πηγές που χρησιμοποιούνται είναι απόλυτα μονοχρωματικές.
- Τα χημικά είδη που απορροφούν να δρουν ανεξάρτητα στη διαδικασία απορρόφησης, δηλαδή να μην σχηματίζονται σε παράλληλες αντιδράσεις ενώσεις με διαφορετικά ε . Γι' αυτό ισχύει ο νόμος του BEER σε **αραιά διαλύματα** περιοχής συγκεντρώσεων $10^{-2} mol/l > C > 10^{-7} mol/l$. Ακόμα στα αραιά διαλύματα ο δείκτης διάθλασης είναι ανεξάρτητος της συγκέντρωσης του χημικού είδους που απορροφά, πράγμα που προϋποθέτει και ο νόμος του BEER.
- Η απορρόφηση πρέπει να συμβαίνει σ' έναν όγκο ομοιόμορφης διατομής, το οποίο επιτυγχάνεται με την κατάλληλη κατασκευή της κυψελίδας.
- Τα ηλεκτρόνια να επανέρχονται γρήγορα στη θεμελιώδη τους κατάσταση και όχι σε ενδιάμεσες ενεργειακές καταστάσεις, διότι διαφορετικά παρατηρείται το φαινόμενο του φθορισμού και μειώνεται η παρατηρούμενη απορρόφηση.

Όταν δεν ισχύουν τα παραπάνω έχουμε απόκλιση από το νόμο του BEER και η απορρόφηση A δεν μεταβάλλεται γραμμικά με τη συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας. [41]

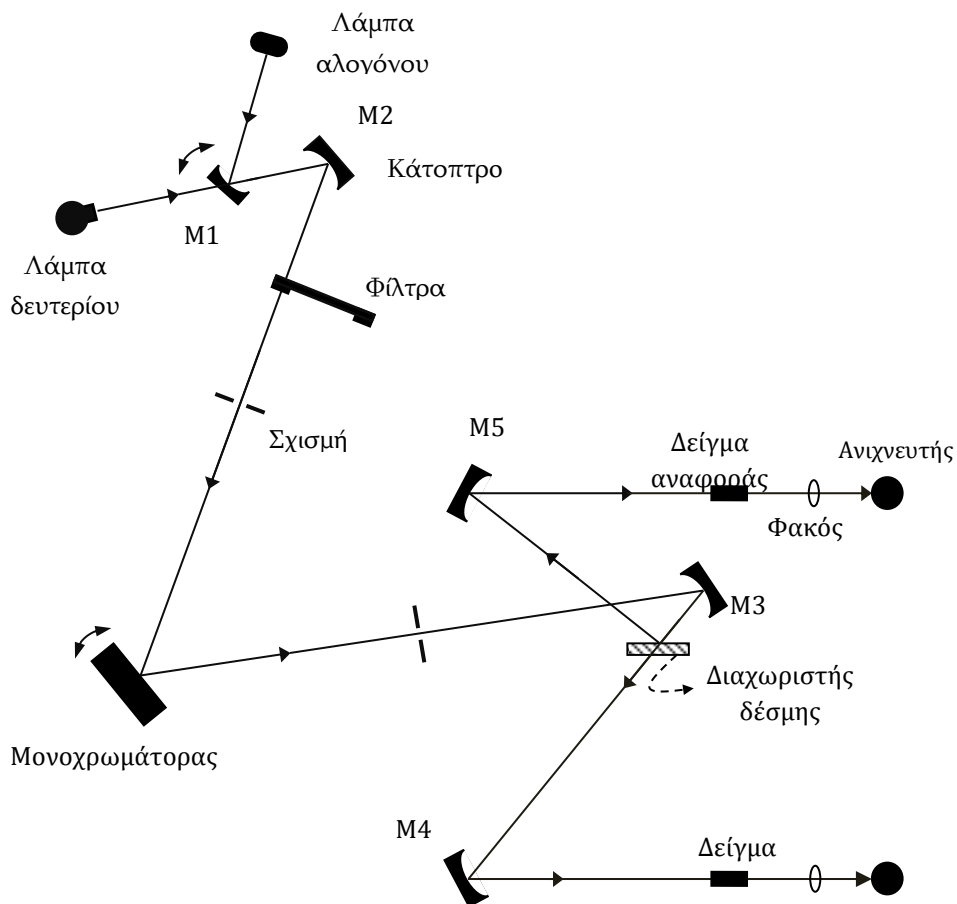
6.6.3 Αρχή λειτουργίας της διάταξης απορρόφησης

Για τη λήψη και την καταγραφή των φασμάτων απορρόφησης των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης.



Εικόνα 6.11:
Φασματοφωτοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης, Perkin-Elmer Lambda 35
UV/VIS Spectrometer [42]

Η πορεία της φωτεινής δέσμης και το οπτικό διάγραμμα του οργάνου φαίνονται στο στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 6.12). Το συγκεκριμένο όργανο διαθέτει δύο φωτεινές πηγές. Μία λυχνία δευτερίου, η οποία εκπέμπει στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος (200-400 nm), και μία λυχνία αλογόνου, η οποία εκπέμπει στην ορατή και κοντινή υπέρυθρη περιοχή (350-900 nm). Όπως φαίνεται και στο οπτικό διάγραμμα του οργάνου, το κάτοπτρο M1 ανασηκώνεται όταν η ακτινοβολία προέρχεται από τη λυχνία δευτερίου προκειμένου να επιτρέψει τη διέλευση φωτός. Όταν η ακτινοβολία προέρχεται από τη λυχνία αλογόνου, το κάτοπτρο M1 επανέρχεται στη θέση του προκειμένου το φως της πηγής να ανακλαστεί και να οδηγηθεί στο κάτοπτρο M2. Όταν γίνεται σάρωση μίας ευρείας περιοχής μηκών κύματος, τότε η μετακίνηση του κατόπτρου και η αλλαγή λυχνίας γίνεται αυτόματα (στα 326nm).



Εικόνα 6.12:

Οπτικό διάγραμμα φασματοφωτομετρικής διάταξης απορρόφησης

Το κάτοπτρο M2 οδηγεί τη φωτεινή δέσμη σε έναν τροχό φίλτρων (filter wheel). Ανάλογα με την περιοχή μήκους κύματος, ο τροχός αυτός περιστρέφεται ώστε να παρεμβληθεί στην πορεία της δέσμης το κατάλληλο φίλτρο που θα φιλτράρει τη δέσμη πριν αυτή εισέλθει στο μονοχρωμάτορα. Στη συνέχεια, η δέσμη περνά μέσα από τη σχισμή 1 (σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα) και προσπίπτει στο μονοχρωμάτορα. Ο μονοχρωμάτορας είναι συγχρονισμένος με τον τροχό φίλτρων και κινούνται μέσω ενός βηματικού κινητήρα. Η δέσμη φωτός του εξεταζόμενου μήκους κύματος θα περάσει από τη σχισμή εξόδου και θα προσπέσει σε ένα νέο κάτοπτρο M3 που θα την οδηγήσει σε ένα διαχωριστή δέσμης.

Το 50 % της ακτινοβολίας ανακλάται από το διαχωριστή δέσμης και οδηγείται προς το κάτοπτρο M5, ενώ το υπόλοιπο 50 % περνά προς το κάτοπτρο M4. Η δέσμη από το κάτοπτρο M5 θα οδηγηθεί στο δείγμα αναφοράς. Το μέρος της δέσμης που θα περάσει από το δείγμα αναφοράς μέσω φακού εστίασης θα οδηγηθεί στη φωτοδίοδο. Με παρόμοιο τρόπο, η δέσμη από το κάτοπτρο M4 θα οδηγηθεί στο δείγμα και από εκεί, μέσω φακών, στη φωτοδίοδο.

6.6.4 Διαχείριση σήματος απορρόφησης

Ο έλεγχος του φασματοφωτόμετρου πραγματοποιείται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή, με την χρήση του λογισμικού πακέτου UV WinLab. Μέσω του λογισμικού αυτού, προσφέρεται η δυνατότητα ρύθμισης κάποιων παραμέτρων που επηρεάζουν τόσο τη μέθοδο φασματοφωτομετρίας όσο και το φασματοφωτόμετρο. Η απόκριση του φασματοφωτόμετρου σε αυτές τις αλλαγές είναι άμεση. Ορισμένες από τις παραμέτρους αυτές είναι οι εξής:

- ✓ η επιλογή των μηκών κύματος, της ταχύτητα σάρωσης (εάν πρόκειται για μέθοδο σάρωσης) και του πλάτους της σχισμής του μονοχρωμάτορα,
- ✓ η ικανότητα μηδενισμού του σήματος που οφείλεται στο διαλύτη και το θόρυβο του φασματοφωτόμετρου, μέσω της επιλογής Autozero. Η επιλογή αυτή θέτει τις γραμμές αναφοράς για τις μετρήσεις απορρόφησης. Έτσι τα φάσματα ή τα αποτελέσματα που προκύπτουν αναφέρονται μόνο στην απορρόφηση που οφείλεται στη συγκέντρωση των ουσιών του δείγματος και όχι του μέσου στο οποίο έχουν διαλυθεί ή διασπαρθεί και το θόρυβο του φασματοφωτόμετρου,
- ✓ η εξομάλυνση (smoothing) και γενικά η επεξεργασία των καμπυλών-φασμάτων που προκύπτουν,
- ✓ η δυνατότητα άμεσης εξαγωγής της συγκέντρωσης των διαφόρων ουσιών που υπάρχουν στα δείγματα μέσω καμπυλών απορρόφησης των δειγμάτων αναφοράς.

6.7 Φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού

6.7.1 Εκπομπή φθορισμού

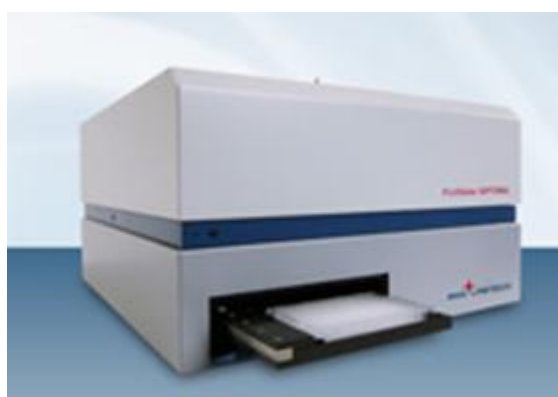
Το μόριο μπορεί να μεταβεί από ένα διεγερμένο δονητικό επίπεδο της πρώτης μονήρους διεγερμένης στάθμης στη βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση, με εκπομπή φωτονίου. Η ενέργεια του φωτονίου και άρα το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, καθορίζεται από την ενεργειακή διαφορά μεταξύ της διεγερμένης και του δονητικού επιπέδου της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η διάρκεια ζωής του φθορισμού είναι της τάξης των nsec. Κατόπιν, μέσω απόσβεσης και χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας, το μόριο επιστρέφει στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της βασικής κατάστασης. Εξαιτίας της απώλειας ενέργειας κατά την παραμονή του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, η εκπεμπόμενη ενέργεια (φθορισμός) είναι μεγαλύτερου μήκους κύματος σε σχέση με την απορροφηθείσα ενέργεια.

Το φάσμα φθορισμού (η κατανομή της έντασης της ακτινοβολίας φθορισμού για κάθε μήκος κύματος), εκφράζει τις διαφορετικές πιθανές μεταβάσεις από την μονήρη διεγερμένη κατάσταση στα διάφορα δονητικά επίπεδα της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης.

Η σχετική πιθανότητα να συμβεί κάποια από τις πιθανές διαδρομές διαφέρει από μόριο σε μόριο και εξαρτάται, όχι μόνο από τη δομή του, αλλά και από το τοπικό του περιβάλλον. [43]

6.7.2 Η διάταξη φθορισμού

Για τη μέτρηση της γλουταθειόνης μέσω βιοχημικής μεθόδου χρησιμοποιήθηκε η διάταξη μέτρησης φθορισμού FLUOstar Galaxy της BMG Lab Technologies Ltd (Germany). Πρόκειται για έναν πολυ-λειτουργικό αναγνώστη πλακιδίων (microplate reader) που μπορεί να υπολογίσει εκτός από την ένταση φθορισμού, απορρόφηση και χημειοφωταύγεια. Η διάταξη αποτελείται από μια πηγή (λυχνία Xe), οπτικά φίλτρα, έναν φωτοπολλαπλασιαστή και οπτικές ίνες μεταφοράς της οπτικής ακτινοβολίας προς και από το δείγμα.

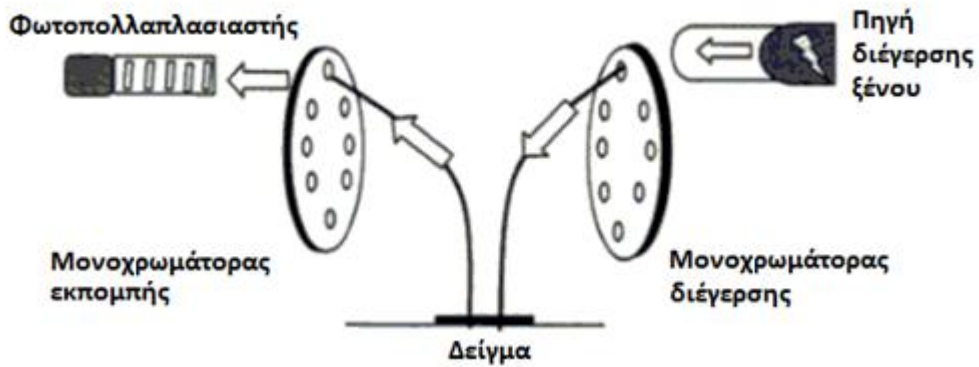


Εικόνα 6.13:
Η διάταξη FLUOstar Galaxy [44]

6.7.3 Αρχή λειτουργίας της διάταξης φθορισμού

Η ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή διέγερσης ξένου καθοδηγείται σε μια κυκλική διάταξη στην οποία έχουν προσαρτηθεί οπτικά φίλτρα τα οποία επιτρέπουν την διέλευση στενής περιοχής μηκών κύματος. Η επιλογή του φίλτρου ανάλογα με τη μέτρηση γίνεται με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού που συνοδεύει τη διάταξη. Το φως που εξέρχεται από το φίλτρο καθοδηγείται μέσω οπτικής ίνας στο δείγμα και το διεγείρει.

Η εκπεμπόμενη από το δείγμα ακτινοβολία φθορισμού, που παρατηρείται κάθετα ως προς την ακτινοβολία διέγερσης, συλλέγεται από δεύτερη οπτική ίνα, οδηγείται σε δεύτερο κυκλικό δίσκο με οπτικά φίλτρα όπου επιλέγεται εκείνο το φίλτρο το οποίο επιτρέπει τη διέλευση στα μήκη κύματος εκπομπής του ιχνηθέτη του δείγματος. Αφού ενισχυθεί μέσω φωτοπολλαπλασιαστή το φως, μετράται και αποδίδεται η ένταση φθορισμού. [41]



Εικόνα 6.14: Αρχή λειτουργίας της διάταξης φθορισμού

Κεφάλαιο 7.

Μεθοδολογίες

7.1 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς LNCaP

Η καλλιέργεια των καρκινικών κυττάρων πραγματοποιείται εντός φλάσκας. Χρησιμοποιήθηκαν δύο μεγέθη φλάσκας (25 cm^2 και 75 cm^2) ανάλογα με το στάδιο της καλλιέργειας και τον αριθμό των κυττάρων (πληρότητα φλάσκας). Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε πλήρες θρεπτικό μέσο (ΠΘΜ) το οποίο αποτελείται από:

- ✓ Θρεπτικό μέσο RPMI 1640,
- ✓ 10% εμβρυϊκό ορό βοδιού, Fetal Bovine Serum, FBS,
- ✓ 0.1% Antibiotic-Antimitotic.

Οι φλάσκες τοποθετούνται εντός κλιβάνου όπου πραγματοποιείται η επώαση των κυττάρων σε σταθερή θερμοκρασία $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ παρουσία αερίου διοξειδίου του άνθρακα σε ποσοστό 5%.

7.2 Μεθοδολογία κατάψυξης κυτταρικής σειράς LNCaP

Η διατήρηση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα επιτυγχάνεται με την αποθήκευσή τους σε υγρό άζωτο όπου η θερμοκρασία ανέρχεται στους $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$. Η κατάψυξη γίνεται σταδιακά ώστε το σοκ που θα υποστούν τα κύτταρα από τη διαφορά θερμοκρασίας να ελαχιστοποιηθεί. Έπειτα από την αποκόλληση και τη συλλογή των κυττάρων από τη φλάσκα, διαδικασία η οποία θα περιγραφεί αναλυτικά παρακάτω, πραγματοποιείται μέτρηση του αριθμού τους στο μικροσκόπιο του εργαστηρίου. Με κατάλληλη αναγωγή μετράται αριθμός κυττάρων ίσος με περίπου 5×10^6 κύτταρα τα οποία μεταφέρονται σε κατάλληλο φιαλίδιο σε 1ml ΠΘΜ. Σε κάθε φιαλίδιο προστίθενται 50μl παράγοντα διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Το DMSO αποτρέπει το σχηματισμό κρυστάλλων νερού στο εσωτερικό των κυττάρων κατά την ψύξη. Με την προσθήκη DMSO ξεκινά άμεσα η διαδικασία της κατάψυξης ώστε να μην προκληθεί τοξικότητα στα κύτταρα στη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα η κατάψυξη γίνεται σταδιακά, έτσι το φιαλίδιο εισάγεται αρχικά σε υπερκαταψύκτη ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) όπου και παραμένει για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Στη συνέχεια τοποθετείται σε δοχείο με υγρό άζωτο ($-190\text{ }^{\circ}\text{C}$) όπου και μπορεί να παραμείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα.

7.3 Μεθοδολογία απόψυξης κυτταρικής σειράς LNCaP

Μετά την εξαγωγή του από το δοχείο με το υγρό άζωτο, το φιαλίδιο τοποθετείται στο εσωτερικό του κλιβάνου όπου και παραμένει για 5min ώσπου να αποψυχθεί. Το διάλυμα των κυττάρων σε ΠΘΜ (1ml) που προκύπτει μετά την απόψυξη, εισάγεται σε σωλήνα φυγοκέντρωσης που περιέχει 9ml διαλύματος φυσιολογικού ορού – 10% FBS. Το διάλυμα εισάγεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και φυγοκεντρείται στις 125rpm για 7min. Μετά τη φυγοκέντρωση ακολουθεί η απόρριψη του υπερκείμενου υγρού από κάθε σωληνάκι. Στα κύτταρα που έχουν παραμείνει προσκολλημένα στον πάτο των σωλήνων, προστίθεται μικρή ποσότητα πλήρους θρεπτικού μέσου, ικανή για τη συλλογή τους και μεταφορά τους σε μεγαλύτερο σωλήνα με χρήση πιπέτας. Ακολούθως με την πιπέτα προκαλείται ανάδευση (pipetting) στο εσωτερικό του σωλήνα ώστε να διαχωριστούν πλήρως τα κύτταρα μεταξύ τους και να μην υπάρχουν συσσωματώματα. Η διαδικασία του pipetting γίνεται προσεκτικά ώστε να μην προκληθεί βλάβη στα κύτταρα. Το διάλυμα αυτό στη συνέχεια εισάγεται σε φλάσκα των 25cm² όπου και κατανέμεται σε όλη την επιφάνειά της για την καλύτερη και ομοιόμορφη ανάπτυξη των κυττάρων. Ο όγκος του διαλύματος στο σύνολό του ανέρχεται στα 5ml. Τέλος η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο όπου και πραγματοποιείται η επώαση των κυττάρων. Για το χρονικό διάστημα των πρώτων 48 ωρών η φλάσκα θα πρέπει να παραμένει ακίνητη εντός του κλιβάνου ώστε να μην προκληθεί αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνειά της. Πιθανή αποκόλληση οδηγεί στη δημιουργία συσσωματωμάτων στο εσωτερικό της φλάσκας αλλά και στην πρόκληση κυτταρικού θανάτου.

7.4 Μεθοδολογία ανακαλλιέργειας κυτταρικής σειράς LNCaP

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται όταν η πληρότητα στην επιφάνεια της φλάσκας σε κύτταρα υπερβαίνει το 70%. Η κατάσταση αυτή παρατηρείται με χρήση του μικροσκοπίου του εργαστηρίου. Από τη στιγμή που διαπιστώνεται το αυξημένο ποσοστό κάλυψης της επιφάνειας της φλάσκας η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται παρακάτω. Να σημειωθεί ότι οι όγκοι των διαλυμάτων που περιγράφονται αναφέρονται σε κυτταρική καλλιέργεια εντός φλάσκας 25cm². Αντίστοιχα για φλάσκα 75cm², οι όγκοι που χρησιμοποιούνται είναι τριπλάσιοι. Εξαιρείται το διάλυμα αναστολής της δράσης της τρυψίνης όπου ο όγκος του είναι διπλάσιος. Αρχικά αφαιρείται το πλήρες θρεπτικό μέσο από το εσωτερικό της φλάσκας με μεγάλη προσοχή ώστε να μην αποκολληθούν τα κύτταρα, και απορρίπτεται στα απόβλητα. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ξέπλυμα δύο φορές με διάλυμα φυσιολογικού ορού-αντιβιοτικού.

Στη φιάσκα των 25cm² για κάθε ξέπλυμα απαιτείται περίπου 1ml διαλύματος. Μέσω του ξεπλύματος απομακρύνονται πιθανά αιωρούμενα συσσωματώματα που έχουν αποκολληθεί και τα οποία μπορεί να επιμολύνουν την καλλιέργεια σε επόμενο στάδιο. Ακολούθως εισάγεται 1ml από το ένζυμο τρυψίνη (Trypsin – EDTA solution) το οποίο προκαλεί αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φιάσκας. Η παραμονή της τρυψίνης δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 2-3 λεπτά γιατί προκαλεί τοξικότητα στα κύτταρα. Μετά το πέρας του χρόνου αυτού παρατηρείται μακροσκοπικά η αποκόλληση των κυττάρων. Τότε προστίθενται συνολικά 5ml διαλύματος το οποίο αναστέλλει τη δράση της τρυψίνης. Το διάλυμα αυτό περιέχει φυσιολογικό ορό -10% FBS και εισάγεται σε δύο δόσεις ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή συλλογή των κυττάρων με ξέπλυμα της φιάσκας. Το διάλυμα με τα κύτταρα μετά τη συλλογή του, εισάγεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και ακολουθεί η φυγοκέντρησή του για 10min σε 125rpm. Το υπερκείμενο διάλυμα από κάθε σωλήνα απορρίπτεται. Σε κάθε σωλήνα εισάγεται μικρή ποσότητα πλήρους θρεπτικού μέσου ώστε να πραγματοποιηθεί η συλλογή των κυττάρων έπειτα από pipetting. Τα κύτταρα μεταφέρονται και κατανέμονται ομοιόμορφα σε μεγάλη φιάσκα 75cm² με 15ml πλήρους θρεπτικού μέσου. Τέλος, αφού παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο η κατανομή των κυττάρων στο εσωτερικό της, η φιάσκα εισάγεται στον κλίβανο όπου ακολουθεί η επώαση των κυττάρων.

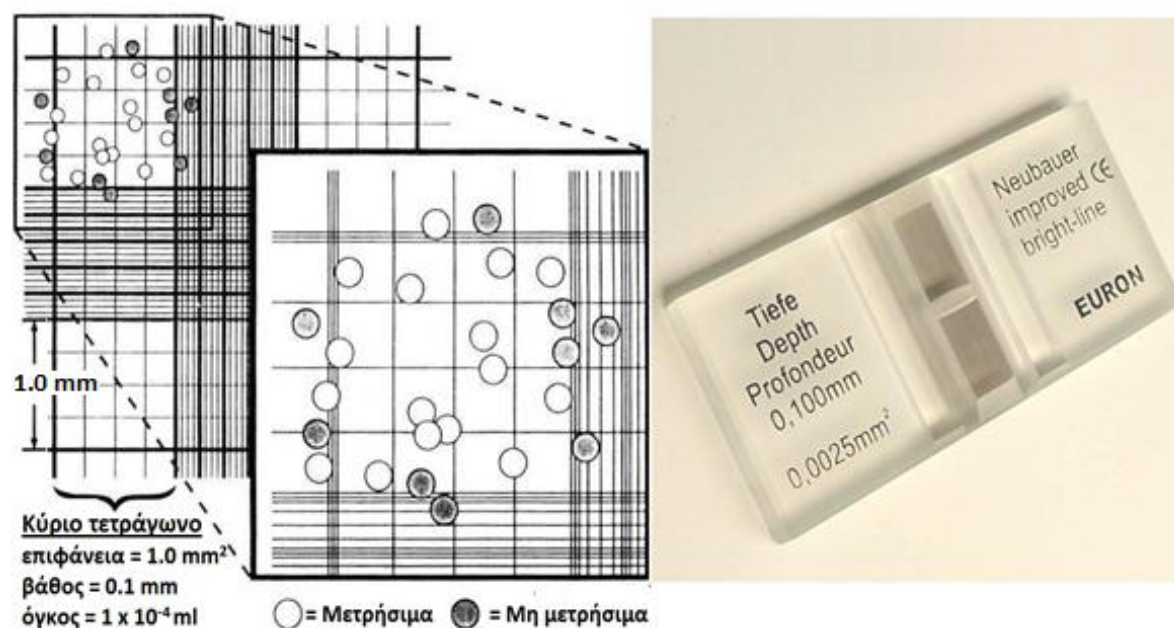
7.5 Μεθοδολογία μέτρησης κυτταρικού αριθμού στο μικροσκόπιο

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιείται με χρήση του αιματοκυτταρόμετρου Neubauer.

- ✓ Συνολικός αριθμός κυττάρων = Μέσος όρος μετρούμενων κυττάρων x αρχικό διάλυμα x αραιώση x 10000)

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Κάθε μια από αυτές έχει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm. Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2,5 μm, που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του εάν τα κύτταρα θα θεωρηθούν ότι βρίσκονται μέσα ή έξω από πλέγμα. Επίσης κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Από τα 9 κύρια τετράγωνα, μόνο τα 4 που βρίσκονται στις γωνίες του τετράγωνου πλέγματος χρησιμοποιούνται για την μέτρηση των κυττάρων.

Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0.1 mm χαμηλότερα από δύο «ράχες» στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό ελαιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια. [45]



Εικόνα 7.1: Αιματοκυτταρόμετρο Neubauer. [45],[46]

7.6 Επώαση των κυττάρων σε τριβλία με πλήρες θρεπτικό μέσο

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την επώαση των κυττάρων στα τριβλία αναφέρεται με παρακάτω:

Αρχικά πραγματοποιείται η συλλογή των κυττάρων μιας φλάσκας (75cm²) με τη συνήθη διαδικασία, σε μεγάλο σωλήνα με 5ml (5000μl) πλήρους θρεπτικού μέσου. Στη συνέχεια ακολουθεί η μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Για να διευκολυνθεί η διαδικασία της μέτρησης, λόγω του μεγάλου αριθμού κυττάρων στο Π.Θ.Μ., πραγματοποιήθηκε αραιώση σε ένα μικρό και αντιπροσωπευτικό όγκο κυττάρων. Σε 50μl κυττάρων έγινε προσθήκη 200μl PBS (αραιώση 1 : 5).

- Συνολικός αριθμός κυττάρων = Μέσος όρος μετρούμενων κυττάρων x 5ml αρχικού διαλύματος x 5 λόγω της αραιώσης x 10000).

Έπειτα έγινε προσθήκη 200000 κυττάρων περίπου σε κάθε τριβλίο, αριθμός ικανός για την ορθότητα της πειραματικής διαδικασίας που θα ακολουθήσει.

- Γνωρίζοντας τον αριθμό των κυττάρων στο αρχικό διάλυμα 5ml, με απλή μέθοδο των τριών προέκυψε ο όγκος διαλύματος ο οποίος περιέχει τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων (200000 κύτταρα) ο οποίος και θα προστεθεί σε κάθε τριβλίο.
- Το κάθε τριβλίο θα περιέχει συνολικά 2,5ml πλήρους θρεπτικού μέσου με κύτταρα. Για να επιτευχθεί ικανοποιητική διασπορά των κυττάρων στην επιφάνεια του τριβλίου αρχικά εισάγεται ένα μέρος πλήρους θρεπτικού μέσου, στη συνέχεια το διάλυμα που περιέχει τα κύτταρα και έπειτα το υπόλοιπο πλήρες θρεπτικό μέσο.

Τέλος ελέγχεται η διασπορά των κυττάρων ενδεικτικά σε μερικά από τα τριβλία με χρήση του μικροσκοπίου και όλα τα τριβλία εισάγονται στον κλίβανο με τυχαία σειρά όπου παραμένουν για επώαση μία ημέρα (24h).

7.7 Επώαση των κυττάρων σε τριβλία με διαφορετικές συγκεντρώσεις BSO σε πλήρες θρεπτικό μέσο

Για τη μελέτη της επίδρασης του BSO στη βιωσιμότητα των κυττάρων πραγματοποιήθηκε αρχικά επώαση των κυττάρων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις BSO, τα οποία είχαν ήδη παραμείνει στον κλίβανο για μία ημέρα εντός τριβλίων με σκέτο ΠΘΜ. Οι εννιά διαφορετικές συγκεντρώσεις του BSO που μελετήθηκαν είναι οι εξής: 0,001mM , 0,005mM , 0,01mM , 0,05mM , 0,1mM , 0,5 mM , 1mM , 5mM , 10mM. Για κάθε συνθήκη χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για λόγους επαναληψιμότητας. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την εισαγωγή του BSO είναι τα εξής:

1. Αφαίρεση του Π.Θ.Μ. που έχει παραμείνει για 24 ώρες από τα τριβλία με χρήση πιπέτας. Απαιτείται μεγάλη προσοχή για να αποφευχθεί πιθανή αποκόλληση των κυττάρων.
2. Προσθήκη, ανάλογα με την πειραματική συνθήκη, του αντίστοιχου διαλύματος όπως αυτά περιγράφονται παρακάτω.
3. Επώαση των τριβλίων στον κλίβανο για 24h.

7.7.1 Διαλύματα BSO

Το BSO βρίσκεται σε μορφή σκόνης. Για τη διάλυσή του χρησιμοποιείται ως διαλύτης το PBS. Σε 1ml διαλύτη PBS διαλύονται 50mg BSO. Η διάλυση επιτυγχάνεται με ανάδευση του διαλύματος στο Vortex.

Ο όγκος σε καθένα από τα διαλύματα που θα χρησιμοποιηθούν θα είναι 7,5ml εφόσον σε κάθε συνθήκη απαιτούνται 3 τριβλία και κάθε τριβλίο χρειάζεται 2,5 ml διαλύματος για να επωαστεί σωστά. Έτσι με κατάλληλη αναλογία διαλύματος BSO με πλήρες θρεπτικό μέσο προκύπτουν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις του BSO 0,001mM , 0,005mM , 0,01mM , 0,05mM , 0,1mM , 0,5 mM , 1mM , 5mM, 10mM.

Να σημειωθεί ότι:

- Οι συγκεντρώσεις BSO προέκυψαν από διαδοχικές αραιώσεις από τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, 10mM, προς τη μικρότερη 0,001mM.
- Ανάμεσα στην κάθε συνθήκη μεσολαβεί χρονικό διάστημα 10 min έτσι ώστε την επόμενη μέρα να διευκολυνθεί η πειραματική διαδικασία.
- Σημειώνεται πάνω σε κάθε τριβλίο η ακριβής ώρα κατά την οποία έγινε η προσθήκη καθενός από τα διαλύματα έτσι ώστε να τηρηθεί πιστά το πρωτόκολλο της επώασης για 24h.

7.8 Επώαση των κυττάρων σε τριβλία με m-THPC σε πλήρες θρεπτικό μέσο

Για τη μελέτη της φωτοδυναμικής θεραπείας, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων σε m-THPC, τα οποία είχαν ήδη παραμείνει στον κλίβανο για μία ημέρα εντός τριβλίων με σκέτο ΠΘΜ. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την εισαγωγή του m-THPC είναι τα εξής:

1. Αφαίρεση του Π.Θ.Μ. που έχει παραμείνει για 24 ώρες από τα τριβλία με χρήση πιπέτας. Απαιτείται μεγάλη προσοχή για να αποφευχθεί πιθανή αποκόλληση των κυττάρων.
2. Προσθήκη του διαλύματος m-THPC όπως αυτό περιγράφεται παρακάτω.
3. Επώαση των τριβλίων στον κλίβανο για 24h.

7.8.1 Διάλυμα m-THPC

Το m-THPC βρίσκεται σε μορφή σκόνης. Για να είναι εφικτή η χρήση του, διαλύεται αρχικά σε αιθανόλη (αρχικό διάλυμα) σε συγκέντρωση 1 mg/ml. Λόγω της τοξικότητας που εμφανίζει η αιθανόλη στα κύτταρα, παρασκευάζεται ενδιάμεσο διάλυμα m-THPC 1ml σε συγκέντρωση 15 µg/ml, όπου ως διαλύτης χρησιμοποιείται το PBS. Με κατάλληλη αραίωση του ενδιάμεσου διαλύματος με χρήση ΠΘΜ ως διαλύτη, προκύπτει συγκέντρωση m-THPC 0,15 µg/ml στην οποία πραγματοποιείται και η επώαση των κυττάρων.

7.9 Πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας MTT

7.9.1 Διάλυμα MTT

Διάλυση 5mg σκόνης MTT σε 1ml PBS. Από αυτό το διάλυμα σε κάθε τριβλίο εισάγεται 130 µl και 1170µl PBS. Τα τριβλία παραμένουν στον κλίβανο για επώαση για χρονικό διάστημα τριών ωρών (3h).

7.9.2 Πειραματική διαδικασία

- Λήψη εικόνων στο μικροσκόπιο ενδεικτικά από ένα τριβλίο κάθε ομάδας τριβλίων (3).
- Αφαίρεση Π.Θ.Μ. από τα τριβλία.
- Προσθήκη, σε κάθε τριβλίο, διαλύματος 1,3 ml (MTT + PBS) όπως αυτό παρασκευάστηκε προηγουμένως και σημείωση της ώρας.
- Επώαση στον κλίβανο για τρεις ώρες (3h).

Μετά το πέρας της επώασης (3h) παρατηρείται εντός των τριβλίων ο σχηματισμός κηλίδων μωβ χρώματος. Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση των ζωντανών κυττάρων με το MTT σχηματίζει μωβ κρυστάλλους formazan. Ο χρωματισμός αυτός (μακροσκοπικά) αποτελεί δείκτη της βιωσιμότητας των κυττάρων στο τριβλίο. Όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση του χρώματος, τόσο το επίπεδο βιωσιμότητας των κυττάρων παραμένει υψηλό.

- Αφαίρεση υπερκείμενου υγρού από τα τριβλία και φυγοκέντρωσή του για 5-6 min. Το υγρό από κάθε τριβλίο τοποθετείται χωριστά σε αντίστοιχο σωληνάκι.

- Μετά τη φυγοκέντριση, απόρριψη υπερκείμενου υγρού (κίτρινο χρώμα). Παρατηρείται επίσης κυτταρικό ίζημα μωβ χρώματος στη βάση των σωληνίσκων.
- Προσθήκη διαλύτη MTT 2ml συνολικά για κάθε τριβλίο. Ο διαλύτης αυτός, του οποίου η σύσταση παρατίθεται παρακάτω, προκαλεί τη λύση των κυττάρων.

Αρχικά εισάγουμε 1ml διαλύτη σε κάθε σωληνάκι όπου υπάρχει το κυτταρικό ίζημα και ακόμα 1ml διαλύτη σε κάθε τριβλίο όπου έχουν παραμείνει προσκολλημένα κύτταρα. Έπειτα από ελαφρύ pipetting εντός τριβλίου, πραγματοποιείται συλλογή των λυμένων κυττάρων στα σωληνάκια. Έτσι για κάθε τριβλίο έχουμε το αντίστοιχο σωληνάκι που περιέχει 2ml διαλύματος (μωβ χρώμα) λυμένων κυττάρων.

- Ακολουθεί η ανάδευση κάθε σωληνίσκου με χρήση Vortex, η επικάλυψή του με parafilm και το κλείσιμό του με πώμα.
- Τέλος, όλα τα σωληνάκια αποθηκεύονται εντός ψυγείου για μία ημέρα (ή και παραπάνω) και ακολουθεί η μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο.

7.9.3 Σύσταση διαλύτη MTT

89,178ml ισοπροπανόλη
10ml triton 100
0,822ml HCl (37%)

7.9.4 Μέτρηση απορρόφησης δειγμάτων

- Φυγοκέντρηση των σωληνίσκων ώστε το υπερκείμενο υγρό να είναι διαυγές κατά τη μέτρηση της απορρόφησης.
- Συλλογή υπερκείμενου υγρού (περίπου 2ml-μέχρι εγκοπή σωληνίσκου) και εισαγωγή του εντός κυψελίδας. Προσοχή ώστε να μη συλλεχθεί καθόλου κυτταρικό ίζημα.
- Εισαγωγή εντός κυψελίδας 1ml διαλύτη MTT και pipetting. Άρα συνολικά κατά τη μέτρηση η κυψελίδα περιέχει περίπου 3ml διαλύματος.
- Τοποθέτηση κυψελίδας εντός οργάνου (μπροστά θέση) και μέτρηση. Στην πίσω θέση υπάρχει κυψελίδα με σκέτο διαλύτη MTT (3ml).

Το όργανο που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση είναι ένα φασματοφωτόμετρο απορρόφησης (Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer). Τα φάσματα που συλλέγονται περιλαμβάνουν μήκη κύματος από 350 έως 700 nm.

Από κάθε φάσμα αφαιρείται η απορρόφηση στα 690 nm (θόρυβος) από την απορρόφηση στα 565nm (μέγιστο απορρόφησης των κρυστάλλων formazan). Για να είναι εφικτή η επαναληψιμότητα των μετρήσεων και για να μπορεί να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων είναι ιδιαίτερα σημαντικό να διατηρούνται σταθερές οι συνθήκες της μεθόδου.

7.10 Πρωτόκολλο μέτρησης επιπέδων γλουταθειόνης

Η μέτρηση της γλουταθειόνης βασίζεται στη χρήση του ιχνηθέτη μονοchlorobimane ο οποίος δένεται στη γλουταθειόνη. Ο ιχνηθέτης αυτός, όταν δε βρίσκεται δεσμευμένος πάνω σε κάποιο μόριο και είναι ελεύθερος, εμφανίζει πολύ μικρό φθορισμό. Κατά την πρόσδεσή του όμως στην ανηγμένη γλουταθειόνη, αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), προκαλεί έντονο φθορισμό. Η επεξεργασία του σήματος φθορισμού καθιστά εφικτή τη μέτρηση των επιπέδων της εκλυόμενης ενδοκυττάριας γλουταθειόνης.

7.10.1 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται, είναι συγκεντρωμένα σε ένα σετ φθορισμομετρικής ανάλυσης γλουταθειόνης, και έχουν ως εξής:

- Ρυθμιστικό διάλυμα
- Διάλυμα υποστρώματος
- Διάλυμα λύσης 10x
- Ένζυμο S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης
- Ανηγμένη γλουταθειόνη

7.10.2 Διαλύματα

- ✓ **Διάλυμα λύσης 1x**, το οποίο προέκυψε με αραιώση 10 φορές του διαλύματος λύσης 10x με το ρυθμιστικό διάλυμα.
- ✓ **Πρότυπο διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης 1mM**. Αρχικά παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 100mM (30,7 mg ανηγμένης γλουταθειόνης διαλυμένη σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος) και από αυτό ύστερα από αραιώση (10ml πρότυπου διαλύματος 100mM με 990 ml ρυθμιστικού διαλύματος) προέκυψε η επιθυμητή συγκέντρωση 1mM.

7.10.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Για την προετοιμασία των δειγμάτων ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Αρχικά πραγματοποιείται η αποκόλληση, η συλλογή και η καταμέτρηση των κυττάρων από τις φλάσκες, με τις συνήθεις διαδικασίες οι οποίες έχουν διατυπωθεί αναλυτικά σε προηγούμενο σημείο. Ο αριθμός θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ $1 - 6 \times 10^7$ κύτταρα.
2. Στη συνέχεια μετράται ο όγκος του κυτταρικού ιζήματος. Για να επιτευχθεί αυτό προστίθεται 1 ml PBS ώστε να διευκολυνθεί η διαδικασία. Η μέτρηση πραγματοποιείται με τη βοήθεια μικρής σύριγγας. Για την απομάκρυνση του PBS μετά τη μέτρηση, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για 5min σε 125rpm.
3. Επόμενο βήμα αποτελεί η προσθήκη, στον καταμετρημένο κυτταρικό όγκο, του διαλύματος λύσης των κυττάρων. Σε 65μl κυτταρικού όγκου αντιστοιχούν 150 μl διαλύματος λύσης 1x. Ανάλογα με τον κυτταρικό όγκο προστίθεται και η αντίστοιχη δόση του διαλύματος λύσης.
4. Ακολούθως πραγματοποιείται ανάδευση στο vortex και επώαση του διαλύματος στον πάγο για 15 λεπτά.
5. Τέλος, το διάλυμα φυγοκεντρείται σε υπερφυγόκεντρο για 10 λεπτά σε 15000rpm και θερμοκρασία 5 °C, συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό (δείγμα) σε erpendorf, και το κυτταρικό ίζημα απορρίπτεται.

7.10.4 Μέτρηση φθορισμού δειγμάτων

Η διαδικασία για τη μέτρηση φθορισμού των δειγμάτων και των πρότυπων διαλυμάτων, για την καμπύλη αναφοράς, πραγματοποιούνται την ίδια στιγμή.

Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής:

1. Καθορισμός των παραμέτρων στον αναγνώστη πλακιδίων για τη μέτρηση φθορισμού. Το μήκος κύματος διέγερσης ορίζεται στα 360 ± 40 nm και το μήκος κύματος εκπομπής στα 485 ± 20 nm. Να σημειωθεί ότι τα βέλτιστα μήκη κύματος για τη διέγερση και την εκπομπή είναι 390 nm και 478 nm αντίστοιχα.
2. Για την καμπύλη αναφοράς της ανηγμένης γλουταθειόνης, προστίθεται πρότυπο διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης συγκέντρωσης 1mM, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, στις διαφορετικές θέσεις του πλακιδίου (96 θέσεων).
3. Προστίθεται το άγνωστο δείγμα σε άλλες θέσεις ξεχωριστά όπως εικονίζεται στον πίνακα.
4. Ακολουθεί η προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος σε κατάλληλες ποσότητες και του ενζύμου (GST) σε ποσότητα 5μl.

5. Στη συνέχεια εισάγεται το διάλυμα υποστώματος που σηματοδοτεί την έναρξη της αντίδρασης, και το πλακίδιο εισάγεται σε κλίβανο για επώαση μιας ώρας σε θερμοκρασία 37°C.
6. Μετά την επώαση, σειρά έχει η μέτρηση φθορισμού των διαλυμάτων που περιέχει το πλακίδιο στον αναγνώστη πλακιδίων.
7. Τέλος, με βάση τις τιμές που προκύπτουν από τη μέτρηση του πρότυπου διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης, ορίζεται η καμπύλη αναφοράς μέσω της οποίας προκύπτει η ποσότητα της ανηγμένης γλουταθειόνης στα δείγματα.

Δείγματα	Πρότυπο διάλυμα 1mM ανηγμένης γλουταθειόνης (μl)	Άγνωστο δείγμα (μl)	Ρυθμιστικό διάλυμα (μl)	Ένζυμο GST (μl)	Διάλυμα υποστώματος (μl)
Τυφλό	-	-	92,5	5	2,5
1,3 nmoles ανηγμένης γλουταθειόνης	1,3	-	91,0	5	2,5
2,5 nmoles ανηγμένης γλουταθειόνης	2,5	-	90,0	5	2,5
5,0 nmoles ανηγμένης γλουταθειόνης	5	-	87,5	5	2,5
10 nmoles ανηγμένης γλουταθειόνης	10	-	82,5	5	2,5
Έλεγχος δείγματος	-	5	87,5	5	2,5
	-	5	87,5	5	2,5
	-	5	87,5	5	2,5

Πίνακας 7.1: Ποσότητες αντιδραστηρίων που συμμετέχουν στη μέτρηση της γλουταθειόνης μέσω φθορισμού

7.11 Ακτινοβόληση με χρήση laser των κυττάρων που έχουν επωαστεί σε BSO (24h)

Μετά την επώαση των κυττάρων σε BSO για μία ημέρα στις συνθήκες που έχουν περιγραφεί αναλυτικά σε προηγούμενο σημείο η διαδικασία που ακολουθείται για την ακτινοβόληση περιγράφεται παρακάτω σε βηματική μορφή.

1. Αφαίρεση πλήρους θρεπτικού μέσου από τα τριβλία με χρήση πιπέτας. Απαιτείται μεγάλη προσοχή για να αποφευχθεί πιθανή αποκόλληση των κυττάρων.
2. Ξέπλυμα των τριβλίων με χρήση PBS (2 φορές x 1ml τη φορά) και απόρριψη των αποβλήτων.
3. Προσθήκη 300μl PBS σε κάθε τριβλίο και ακτινοβόληση με laser για 1min. Η ακτινοβόληση πραγματοποιείται έχοντας αφαιρέσει προηγουμένως το πώμα του τριβλίου.
4. Προσθήκη 2,2 ml Π.Θ.Μ. σε κάθε τριβλίο και επανατοποθέτησή του εντός κλιβάνου για επώαση 24h.

Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθείται τόσο για τα κύτταρα που έχουν επωαστεί με σκέτο m-THPC όσο και για τα κύτταρα που έχουν επωαστεί με m-THPC και BSO μαζί.

7.11.1 Διαδικασία ακτινοβόλησης

Κατά τη διαδικασία της ακτινοβόλησης τηρήθηκε ακριβώς η σειρά με την οποία είχαν ετοιμαστεί τα τριβλία για τις διαφορετικές συνθήκες επώασης. Η τιμή της θερμοκρασίας της διόδου στην πειραματική διάταξη ακτινοβόλησης δεν ήταν εφικτό να παραμείνει σταθερή σε όλη τη διάρκεια της ακτινοβόλησης. Έτσι οι διακυμάνσεις που σημειώθηκαν ήταν μεταξύ $-5,7^{\circ}\text{C}$ και $-6,3^{\circ}\text{C}$. Να σημειωθεί επίσης ότι η ισχύς του laser στην επιφάνεια του τριβλίου, όπως μετρήθηκε με το ενεργόμετρο του αισθητήρα, κατά την έναρξη της ακτινοβόλησης ήταν στα 2,2 mW ενώ στο τέλος 2,1 mW, που αντιστοιχεί σε ακτινοβόληση $3\text{ mW}/\text{cm}^2$.

Κεφάλαιο 8.

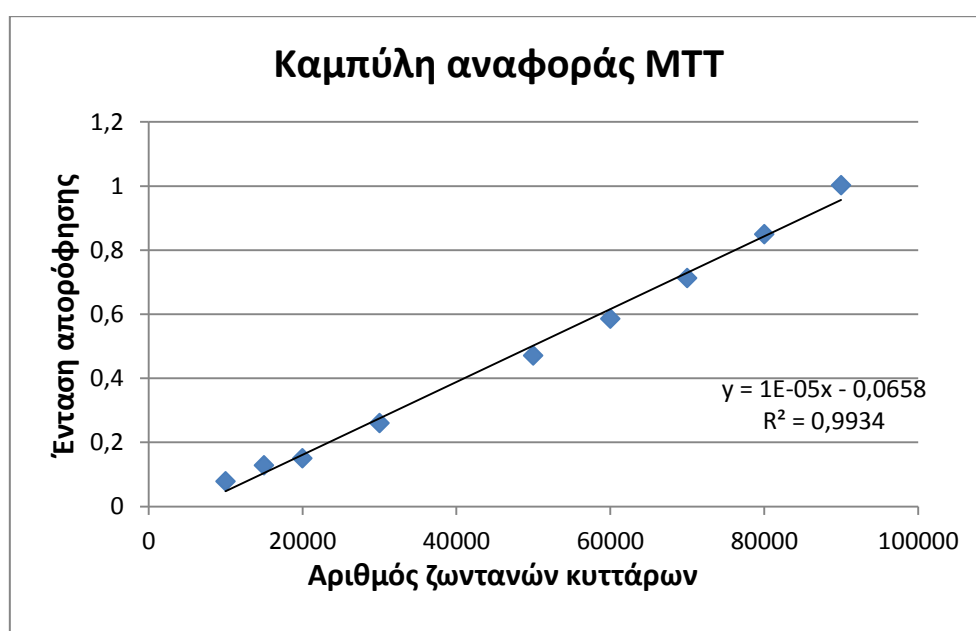
Αποτελέσματα

8.1 Στατιστικός έλεγχος πειραματικών αποτελεσμάτων

Κατά την επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος με χρήση του εργαλείου ανάλυσης διακύμανσης ANOVA κατά ένα παράγοντα. Η τιμή p η οποία προσδιορίζεται, αναφέρεται στο πόσο «μακρινή» είναι μια αρχική υπόθεση για τα εξεταζόμενα δεδομένα (περίπτωση απόρριψης της αρχικής υπόθεσης) ή στο πόσο πολύ υποστηρίζεται από αυτά η αρχική υπόθεση (περίπτωση αποδοχής της αρχικής υπόθεσης). Σε κάθε περίπτωση το επιθυμητό είναι η τιμή p να είναι όσο το δυνατόν πιο μικρή. [47]

8.2 Καμπύλη αναφοράς MTT

Η καμπύλη αναφοράς MTT, συσχετίζει την ένταση της απορρόφησης ενός διαλύματος λυμένων, μέσω της μεθόδου MTT, κυττάρων, με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων.

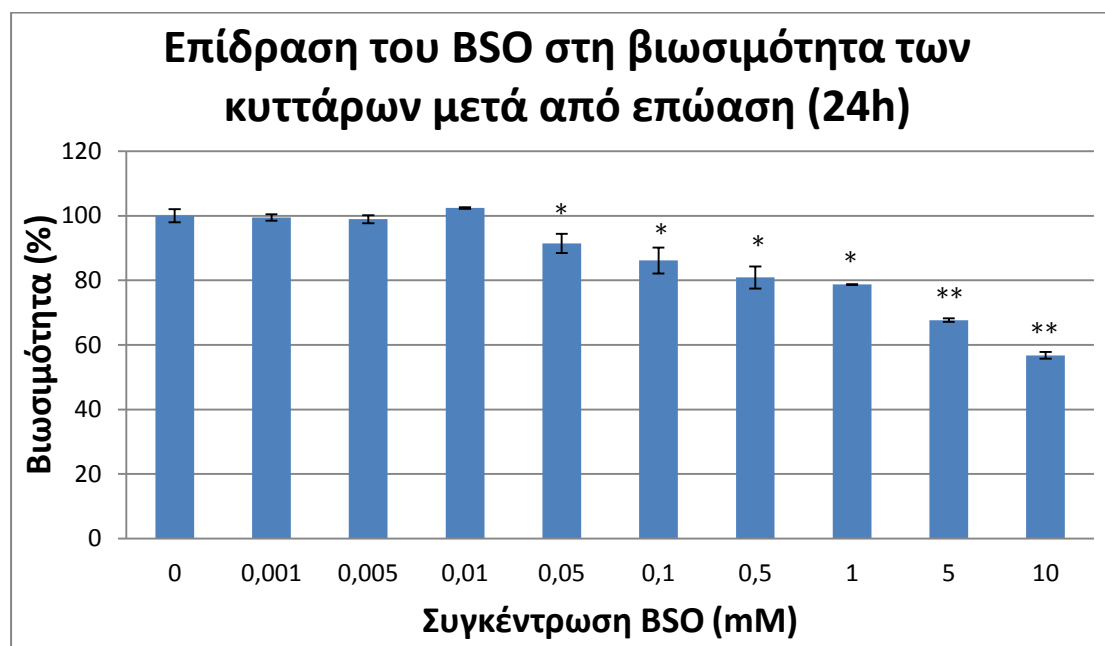


Διάγραμμα 8.1:
Καμπύλη αναφοράς MTT για τη βιωσιμότητα των κυττάρων

Όπως προέκυψε από τα πειραματικά αποτελέσματα η καμπύλη αναφοράς MTT, χαρακτηρίζεται από την εξίσωση $y = 10^{-5}x - 0,0658$ με $R^2 = 0,9934$. Όπου y αναφέρεται στο σήμα απορρόφησης που προκύπτει από τα μετρούμενα δείγματα, και x στον αριθμό των ζωντανών κυττάρων. Βάσει αυτής της εξίσωσης υπολογίζουμε τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε κάθε πειραματική συνθήκη.

8.3 Επίδραση του παράγοντα BSO στη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς LNCaP έπειτα από 24ωρη επώαση

Η επίδραση του παράγοντα BSO στη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων LNCaP μελετήθηκε υπό διάφορες συγκεντρώσεις BSO. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν εμφανίζονται συγκεντρωτικά στο διάγραμμα που ακολουθεί.



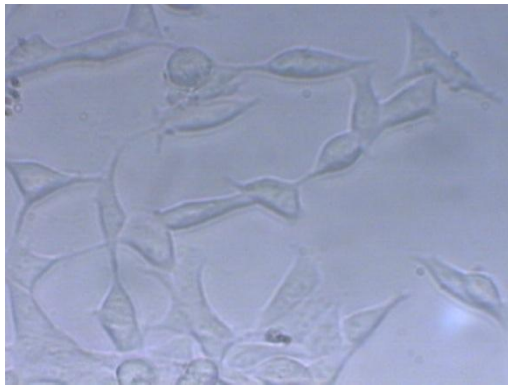
Διάγραμμα 8.2: Επίδραση του BSO στη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από επώαση (24h)

* $P < 0.05$ vs control

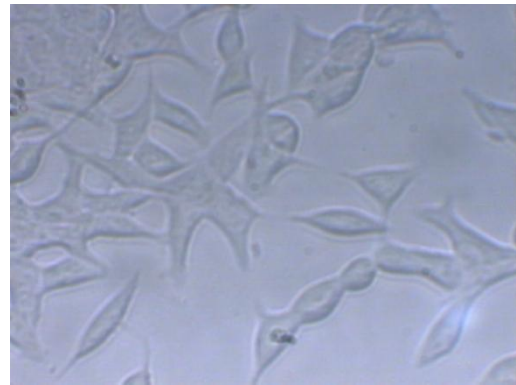
** $P < 0.01$ vs control

Η πρώτη στήλη του διαγράμματος, αναφέρεται στο δείγμα αναφοράς όπου δεν έχει προστεθεί BSO ενώ οι υπόλοιπες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις BSO που μελετήθηκαν. Όπως παρατηρείται υπάρχει μια τάση μείωσης της βιωσιμότητας των κυττάρων καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του παράγοντα BSO. Η τάση αυτή εμφανίζεται από τη συγκέντρωση BSO 0,05 mM και ακολουθεί για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις μέχρι και 10 mM, όπου η μείωση των επιπέδων βιωσιμότητας των κυττάρων είναι η μεγαλύτερη. Στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις BSO (0,001 – 0,01 mM) δεν παρατηρείται κάποια αλλαγή στη βιωσιμότητα καθώς αυτή παραμένει στα επίπεδα του δείγματος αναφοράς.

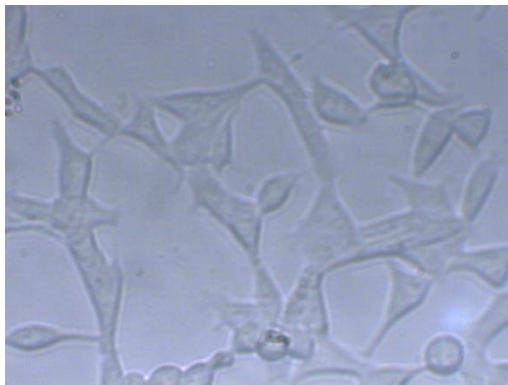
Παρακάτω ακολουθούν ενδεικτικά, μερικές εικόνες από τις καλλιέργειες της καρκινικής σειράς κυττάρων του προστάτη LNCaP, σε διάφορες συνθήκες επώασης που περιγράφηκαν προηγουμένως.



**Εικόνα 8.1: Δείγμα αναφοράς
(control)**



**Εικόνα 8.2: Επώαση με BSO 0,001
mM
24 ώρες**



**Εικόνα 8.3: Επώαση με BSO 0,01 mM
24 ώρες**

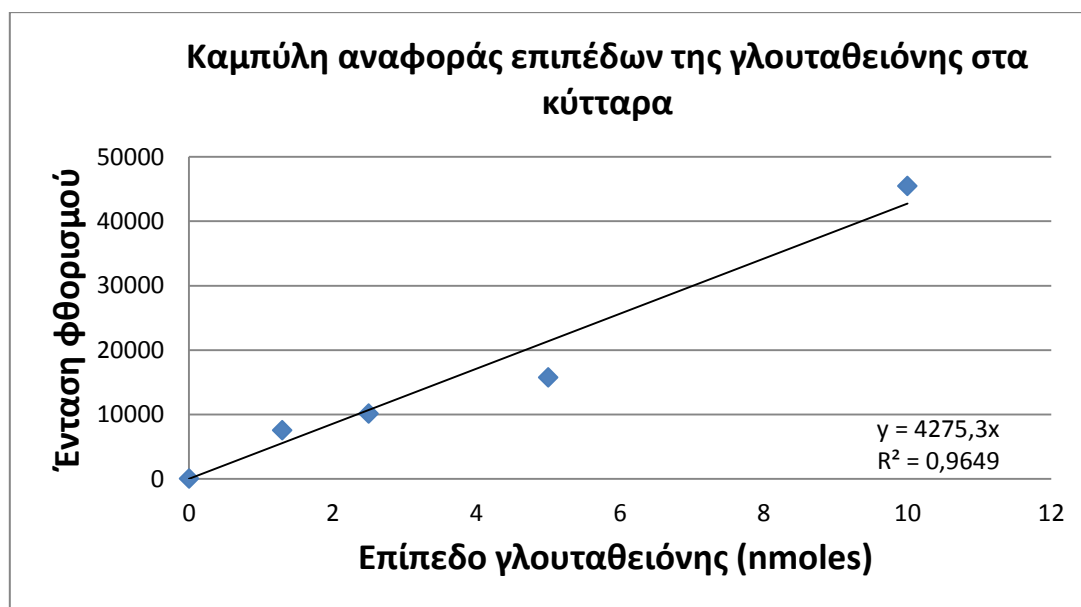


**Εικόνα 8.4: Επώαση με BSO 0,1 mM
24 ώρες**

Όπως παρατηρείται και από τις εικόνες, στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις BSO (0,001 – 0,01 mM) δεν παρατηρείται κάποια σημαντική αλλαγή στη βιωσιμότητα καθώς αυτή παραμένει στα επίπεδα του δείγματος αναφοράς. Τα κύτταρα εμφανίζονται με παρόμοια πυκνότητα και υγιή ανάπτυξη. Στη συγκέντρωση BSO 0,1 mM εντοπίζεται μια μικρή διαφορά καθώς ο αριθμός των κυττάρων φαίνεται να έχει μειωθεί.

8.4 Καμπύλη αναφοράς επιπέδων της γλουταθειόνης

Μέσω της καμπύλης αναφοράς της γλουταθειόνης μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα της γλουταθειόνης που έχει εκλυθεί από τα κύτταρα και υπάρχει στα ως προς μέτρηση δείγματα, βάσει της έντασης φθορισμού που παράγουν.

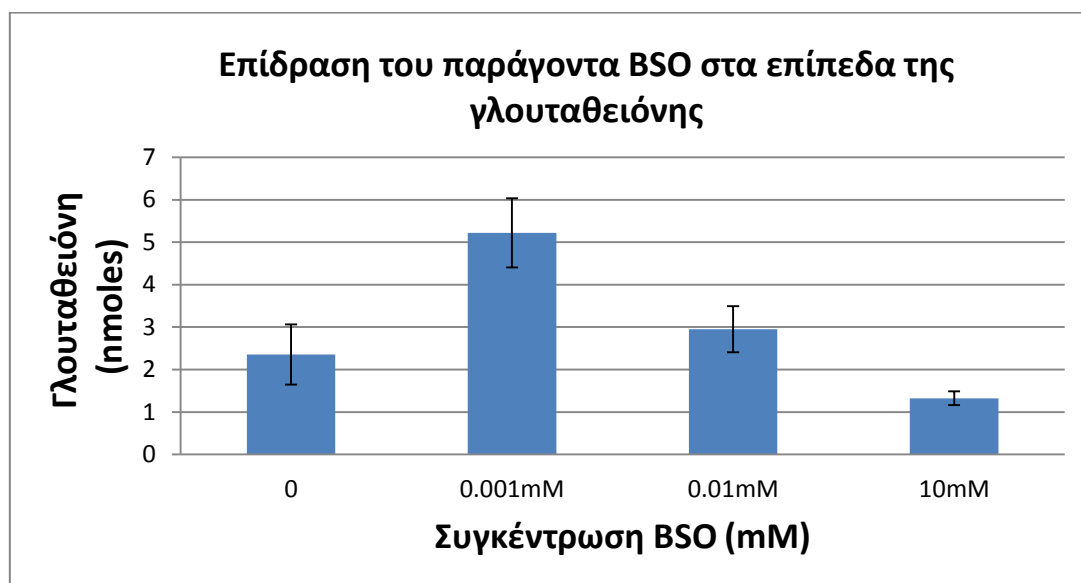


Διάγραμμα 8.3: Καμπύλη αναφοράς γλουταθειόνης (nmoles)

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς προστέθηκε σε διαφορετικές θέσεις του πλακιδίου μέτρησης, πρότυπο διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, οι μετρήσεις έγιναν για ποσότητες γλουταθειόνης 1,3 , 2,5 , 5 και 10 nmoles οι οποίες μαζί με τις αποκρίσεις της έντασης φθορισμού που προέκυψαν, συνθέτουν την παραπάνω καμπύλη αναφοράς. Η χαρακτηριστική ευθεία που την ορίζει είναι η $y = 4275,3x$ με $R^2=0,9649$.

8.5 Επίδραση του παράγοντα BSO στα επίπεδα της γλουταθειόνης της κυτταρικής σειράς LNCaP

Η επίδραση του παράγοντα BSO στα επίπεδα της γλουταθειόνης των καρκινικών κυττάρων LNCaP, μελετήθηκε υπό διάφορες συγκεντρώσεις BSO. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν εμφανίζονται συγκεντρωτικά στο διάγραμμα που ακολουθεί.

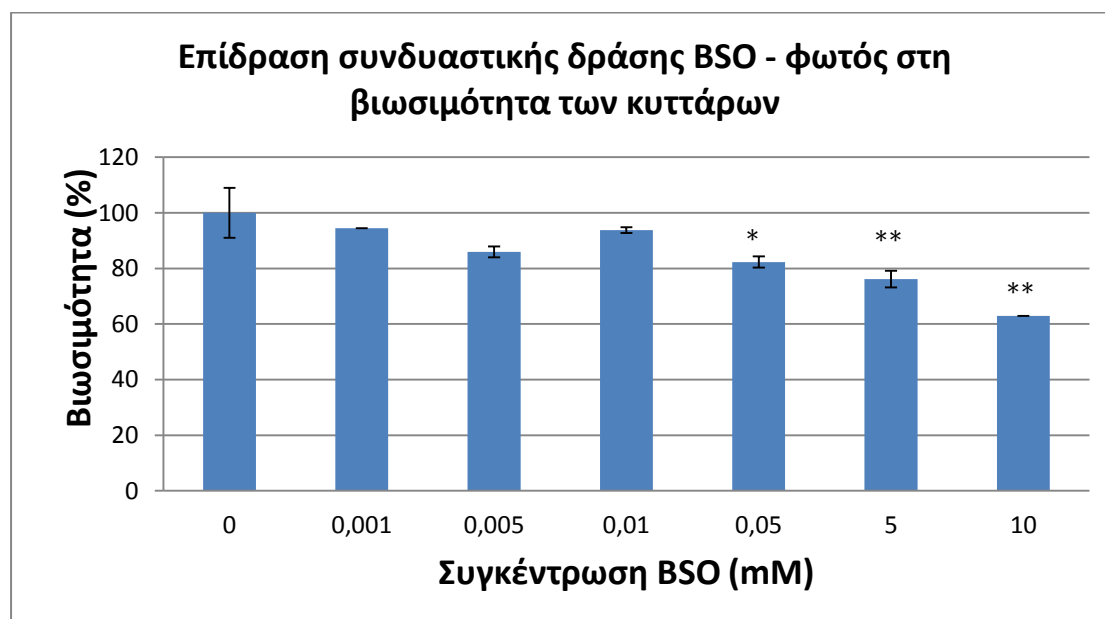


Διάγραμμα 8.4:
Επίδραση του παράγοντα BSO στα επίπεδα της γλουταθειόνης

Η πρώτη στήλη αναφέρεται στο δείγμα αναφοράς όπου η συγκέντρωση του BSO ήταν μηδενική. Οι άλλες αναφέρονται στις δύο ακραίες συνθήκες συγκέντρωσης BSO που μελετήθηκαν, 0,001 και 10 mM, καθώς και σε μία ενδιάμεση-ενδεικτική συνθήκη 0,01 mM. Στη χαμηλότερη συγκέντρωση BSO παρατηρείται σημαντική αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης η οποία εμφανίζεται περίπου 2,5 φορές περισσότερη συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς. Αντίθετα, στην υψηλότερη συγκέντρωση BSO, η ποσότητα της γλουταθειόνης μειώνεται περίπου κατά το ήμισυ ως προς το δείγμα αναφοράς.

8.6 Επίδραση συνδυαστικής δράσης του παράγοντα BSO - φωτός στη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς LNCaP

Η επίδραση που προκαλεί η έκθεση στο φως (λείζερ) στη βιωσιμότητα των κυττάρων μελετήθηκε για κύτταρα που έχουν επωαστεί σε διαφορετικές συγκεντρώσεις BSO για 24 ώρες. Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν.



Διάγραμμα 8.5:

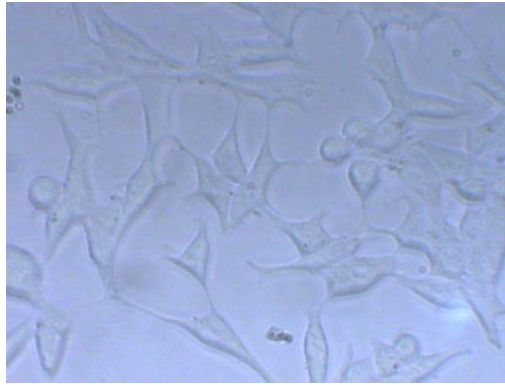
Επίδραση συνδυαστικής δράσης BSO - φωτός στη βιωσιμότητα των κυττάρων

* $P < 0.05$ vs control

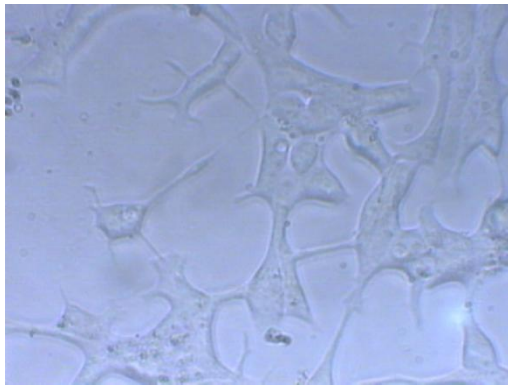
** $P < 0.01$ vs control

Η ακτινοβολία παρουσία BSO δε φαίνεται πως επηρεάζει τη βιωσιμότητα με τρόπο διαφορετικό από ότι το BSO Μόνο του. Η μικρότερη βιωσιμότητα εντοπίζεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση BSO 10mM. Συγκρίνοντας το διάγραμμα αυτό με το αντίστοιχο BSO – βιωσιμότητα χωρίς επίδραση φωτός, παρατηρούμε ότι η βιωσιμότητα ακολουθεί την ίδια σταδιακή μείωση καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του BSO.

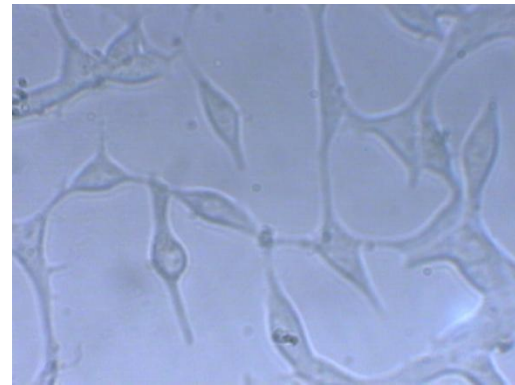
Στη συνέχεια παρατίθενται ενδεικτικά κάποιες εικόνες που συμφωνούν με τα παραπάνω.



Εικόνα 8.5: Δείγμα αναφοράς control



Εικόνα 8.6: 5 mM BSO (24 ώρες) και έκθεση στο φως (λείζερ)

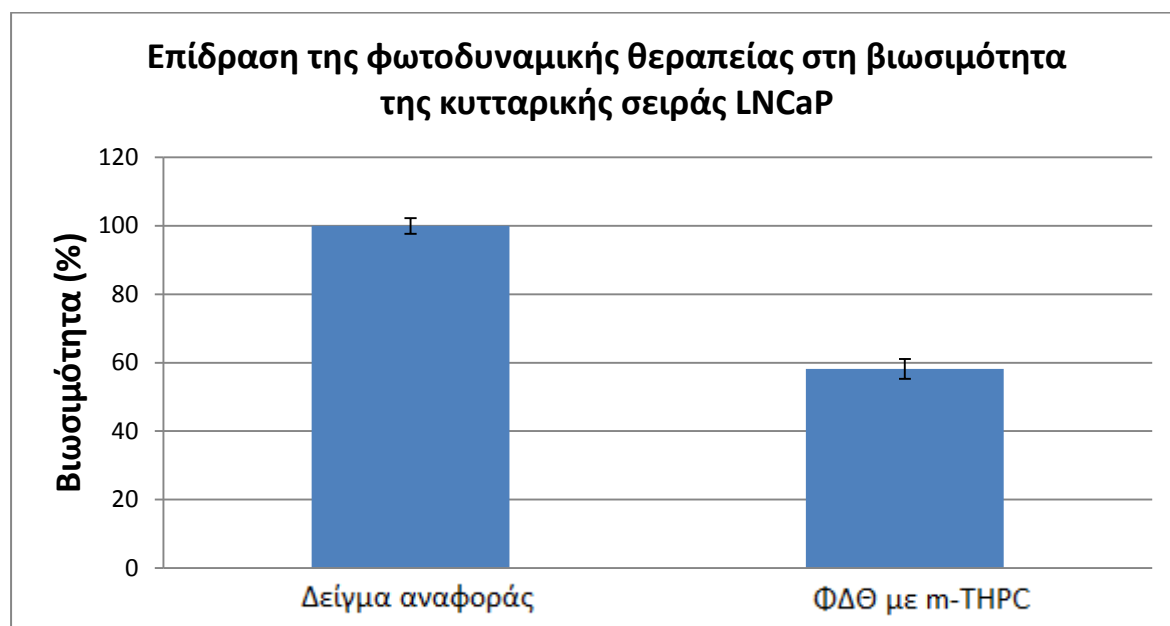


Εικόνα 8.7: 10 mM BSO (24 ώρες) και έκθεση στο φως (λείζερ)

Όπως παρουσιάζεται και στις εικόνες, η βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων στις συγκεντρώσεις 5 mM και 10 mM BSO, μετά από 24 ώρες επώαση και έκθεση σε φως, έχει μειωθεί. Στο δείγμα αναφοράς, τα κύτταρα εμφανίζουν υγιή ανάπτυξη, ικανοποιητική πυκνότητα, με τις απολήξεις τους γειτονικών κυττάρων να ενώνονται. Αντίθετα, η επώασή των κυττάρων με BSO υψηλής συγκέντρωσης, οδήγησε στην αισθητή μείωση του πληθυσμού τους. Παρατηρούνται σχεδόν απομονωμένα κύτταρα με αλλαγή της μορφολογίας τους η οποία χαρακτηρίζεται από έντονες απολήξεις - σημάδι του σοκ που έχουν υποστεί.

8.7 Επίδραση της φωτοδυναμικής θεραπείας στη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς LNCaP

Στο διάγραμμα που ακολουθεί εμφανίζεται η επίδραση της φωτοδυναμικής θεραπείας στη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς LNCaP η οποία έχει επωαστεί με τον φωτοευαίσθητοποιητή m-THPC (Foscan) για 24 ώρες.



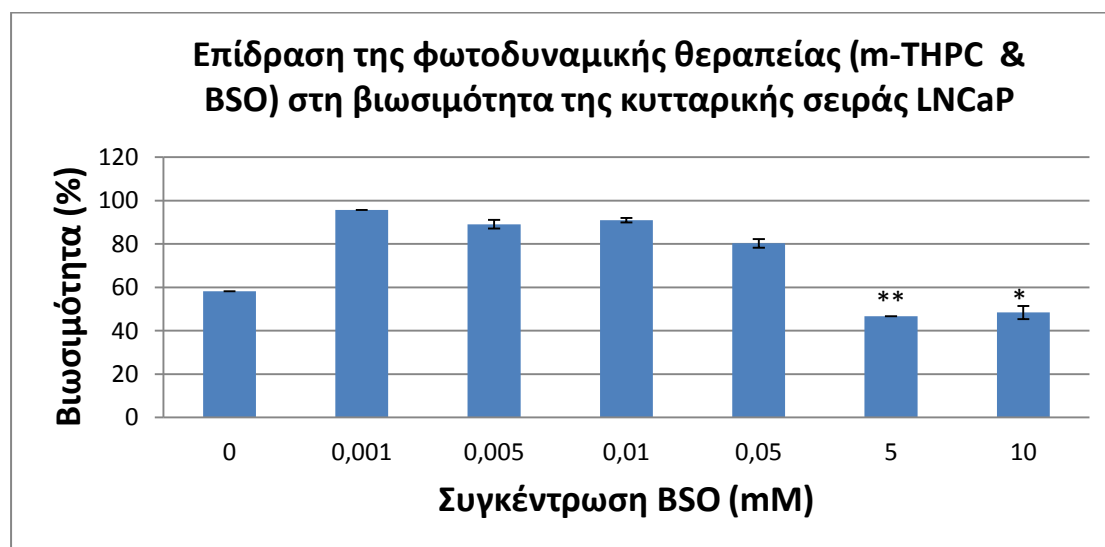
Διάγραμμα 8.6:

Επίδραση της φωτοδυναμικής θεραπείας στη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς LNCaP

Η πρώτη στήλη αναφέρεται στο δείγμα αναφοράς (control) με βάση το οποίο ελέγχεται η βιωσιμότητα. Η δεύτερη στήλη παρουσιάζει την επίδραση της φωτοδυναμικής δράσης στα κύτταρα που έχουν επωαστεί με τον φωτοευαίσθητοποιητή m-THPC για 24 ώρες. Όπως παρατηρείται, η φωτοδυναμική θεραπεία με χρήση m-THPC μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων περίπου κατά 40% σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (control).

8.8 Επίδραση της φωτοδυναμικής θεραπείας σε συνδυασμό με τον παράγοντα BSO στη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς LNCaP

Η επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων που προκαλεί η φωτοδυναμική θεραπεία, όταν αυτή συνδυάζεται με τον παράγοντα BSO μελετήθηκε για διαφορετικές συγκεντρώσεις BSO. Το παρακάτω διάγραμμα συγκεντρώνει τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν.



Διάγραμμα 8.7:

Επίδραση της φωτοδυναμικής θεραπείας (m-THPC & BSO) στη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς LNCaP

* $P < 0.05$ vs control(= Foscan PDT)

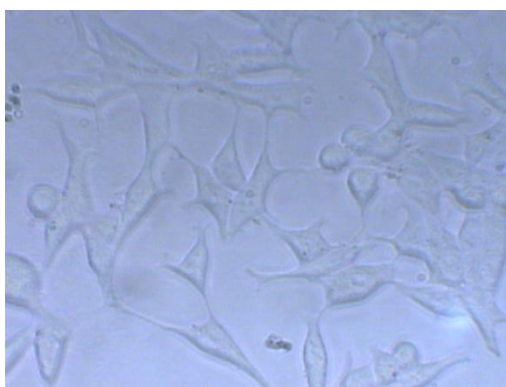
** $P < 0.01$ vs control(= Foscan PDT)

Η πρώτη στήλη παρουσιάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων τα οποία έχουν επωαστεί με το φωτοευαισθητοποιητή m-THPC για 24 ώρες, χωρίς τον παράγοντα BSO. Όπως παρατηρείται σε αυτήν την περίπτωση η βιωσιμότητα εντοπίζεται κοντά στο 60%. Στις υπόλοιπες στήλες εμφανίζεται η συνδυασμένη δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας με τον παράγοντα BSO σε συγκεντρώσεις από 0,001 – 10 mM. Οι συγκεντρώσεις 0,001 mM έως και 0,05 mM BSO φαίνεται πως ανέστρεψαν τη δράση της φωτοδυναμικής με το m-THPC καθώς η βιωσιμότητα των κυττάρων είναι σε υψηλά επίπεδα. Ενώ δηλαδή στην περίπτωση φωτοδυναμικής θεραπείας χωρίς BSO η βιωσιμότητα αγγίζει το 60%, κατά την παρουσία του BSO στις συγκεντρώσεις 0,001 mM έως και 0,05 mM, η βιωσιμότητα ξεπερνάει το 80%.

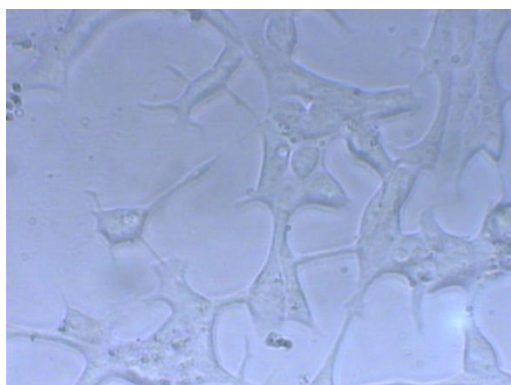
Παρατηρείται ουσιαστικά κάποια αναστολή στη φωτοδυναμική δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας με αποτέλεσμα η βιωσιμότητα των κυττάρων να ξεπερνάει το 60%.

Αντίθετα στις συγκεντρώσεις BSO 5 mM και 10 mM η συνεργιστική δράση του BSO με το m-THPC μειώνει τα επίπεδα βιωσιμότητας κάτω από 60%. Σε αυτές τις συγκεντρώσεις δηλαδή η φωτοδυναμική δράση εμφανίζεται ενισχυμένη.

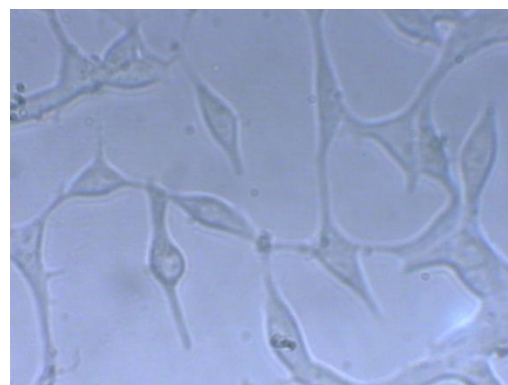
Στη συνέχεια ακολουθούν ενδεικτικά, μερικές εικόνες που ελήφθησαν μετά την φωτοδυναμική θεραπεία σε συνδυασμό με το BSO των καρκινικών κυττάρων του προστάτη LNCaP, στις διάφορες συνθήκες επώασης που περιγράφηκαν προηγουμένως. Μαζί με αυτές παρατίθενται ξανά οι προηγούμενες που αναφέρονται στην επίδραση φωτός-BSO, για διευκόλυνση της σύγκρισης ως προς την επίδραση στη βιωσιμότητα.



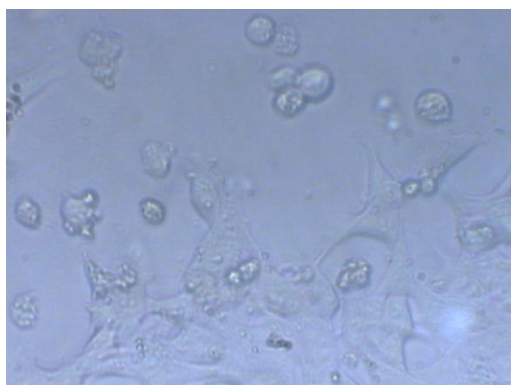
Εικόνα 8.8: Δείγμα αναφοράς control



Εικόνα 8.9:
5 mM BSO (24 ώρες) και έκθεση στο
φως (λείζερ)



Εικόνα 8.11:
10 mM BSO (24 ώρες) και έκθεση στο
φως (λείζερ)



**Εικόνα 8.10: Φωτοδυναμική
θεραπεία με 5mM BSO και m – THPC**



**Εικόνα 8.12: Φωτοδυναμική
θεραπεία με 10mM BSO και m –
THPC**

Όπως διακρίνεται και από τις εικόνες, στις συγκεντρώσεις 5 mM και 10 mM BSO η συνεργιστική δράση με το m-THPC μειώνει τα επίπεδα βιωσιμότητας. Στο δείγμα αναφοράς, τα κύτταρα παρουσιάζουν υγιή ανάπτυξη. Εμφανίζονται με ικανοποιητική πυκνότητα, διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά, με τις απολήξεις τους να ενώνονται. Αντίθετα, στις εικόνες όπου έχει εφαρμοστεί η φωτοδυναμική θεραπεία παρατηρούνται νεκρωτικά κύτταρα κυκλικής μορφής καθώς και πολλά αιωρήματα αποπτωτικών κυττάρων με ασαφή δομικά χαρακτηριστικά.

Κεφάλαιο 9.

Σχολιασμός αποτελεσμάτων - Συμπεράσματα

9.1 Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων BSO στη βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων προστάτη LNCaP μετά την επώασή του σε αυτά για 24 ώρες

Όπως παρατηρήσαμε από τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τη συγκεκριμένη καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων προστάτη LNCaP, η βιωσιμότητα των κυττάρων που είχαν επωαστεί με BSO για 24 ώρες παρέμεινε στα επίπεδα του δείγματος αναφοράς για συγκεντρώσεις BSO 0,001 mM έως και 0,01 mM. Αντίθετα, από τη συγκέντρωση 0,5 mM έως και 10 mM BSO, τα επίπεδα της βιωσιμότητας εμφάνισαν φθίνουσα πορεία η οποία έφτασε κοντά στο 50% στη μεγαλύτερη συγκέντρωση BSO, 10 mM, συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς.

Παράλληλα, η μέτρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης για τη συγκεκριμένη καλλιέργεια κυττάρων, μετά από 24 ώρες επώασης με BSO, στις δύο ακραίες πειραματικές συνθήκες συγκέντρωσης 0,001mM και 10mM BSO, καθώς και σε μία ενδεικτική ενδιάμεση 0,01mM, μας έδωσε το εξής αποτέλεσμα:

Για τις συγκεντρώσεις BSO 0,001mM και 0,01mM, οι οποίες, όπως προαναφέρθηκε ορίζουν το διάστημα όπου η βιωσιμότητα παραμένει στα επίπεδα του δείγματος αναφοράς, η γλουταθειόνη εμφανίστηκε αυξημένη συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς, κατά 2,5 και 1,5 φορές αντίστοιχα.

Από αυτές τις παρατηρήσεις και βασιζόμενοι σε βιβλιογραφικές αναφορές μπορούμε να οδηγηθούμε στην εξής υπόθεση – συμπέρασμα αναφερόμενοι πάντα στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη των καρκινικών κυττάρων προστάτη LNCaP:

Το BSO, εκτός από την ανασταλτική του δράση στη σύνθεση της γλουταθειόνης, η οποία έχει επισημανθεί στο θεωρητικό μέρος, έχει αναφερθεί και ως αιτία παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου κατά την επώαση του σε κυτταροκαλλιέργειες. [48], [35] Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί ότι σε περιπτώσεις οξειδωτικού στρες, δηλαδή κατά την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, ο αμυντικός μηχανισμός των κυττάρων ενεργοποιεί την υπερπαραγωγή γλουταθειόνης. Έτσι η ποσότητα της εκλυόμενης γλουταθειόνης υπό αυτές τις συνθήκες, εμφανίζεται αυξημένη συγκριτικά με την περίπτωση της φυσιολογικής κυτταρικής λειτουργίας, δηλαδή ελλείπει οξειδωτικού κινδύνου. [49]

Υπό αυτές τις παραδοχές, η επώαση των καρκινικών κυττάρων με BSO στις χαμηλές συγκεντρώσεις 0,001 mM έως και 0,01 mM, οδηγεί στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου που με τη σειρά τους ενεργοποιούν τον αντιοξειδωτικό-αμυντικό κυτταρικό μηχανισμό που υπερ-παράγει γλουταθειόνη η οποία τελικά καταστέλλει την οξειδωτική δράση των παραγόμενων ΔΜΟ.

Έτσι αυτή η «ισορροπία» ανάμεσα στη γλουταθειόνη και το BSO, στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, οδηγεί στη διατήρηση των επιπέδων βιωσιμότητας των κυττάρων στα επίπεδα του δείγματος αναφοράς.

Αντίθετα, όταν η συγκέντρωση του BSO αυξάνεται πέρα από 0,05 mM έως και 10 mM, η βιωσιμότητα των κυττάρων συνεχώς μειώνεται. Στην ακραία τιμή μάλιστα, 10 mM BSO, η βιωσιμότητα ανήλθε περίπου στο 50% συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς. Στην ίδια ακριβώς συνθήκη διεξήχθη μέτρηση του επιπέδου της γλουταθειόνης. Το αποτέλεσμα της μέτρησης έδειξε ότι η ποσότητά της υποδιπλασιάστηκε συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς. Βασισμένοι σε αυτά τα αποτελέσματα, μπορούμε να συμπεράνουμε πως για την συγκεκριμένη πειραματική μελέτη, ο ρόλος του BSO ως αναστολέας της σύνθεσης της γλουταθειόνης και η πρόκληση κυτταροτοξικότητας με την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, εξαρτάται από τη συγκέντρωση με την οποία χορηγείται κατά την επώασή του στην κυτταρική καλλιέργεια LNCaP. Για συγκεντρώσεις μέχρι και 0,01 mM δεν εμφάνισε καμία επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων, ενώ για συγκεντρώσεις από 0,05 mM μέχρι και 10 mM η επίδραση του ήταν σημαντική.

9.2 Επίδραση συνδυαστικής δράσης BSO - φωτός στη βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων προστάτη LNCaP

Όπως παρατηρήσαμε, η βιωσιμότητα των κυττάρων στις διάφορες συγκεντρώσεις BSO έπειτα από την έκθεση στο φως (λείζερ), εμφάνισε σταδιακή μείωση όσο η συγκέντρωση του BSO αυξανόταν. Αντίστοιχο αποτέλεσμα υπήρξε, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, και στην περίπτωση όπου δεν πραγματοποιήθηκε έκθεση των κυττάρων στο λείζερ. Θεωρούμε λοιπόν ότι δεν υπάρχει επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων έπειτα από την έκθεσή τους στο λείζερ, αφού οι διαφορές που εμφανίζονται παρουσία – απουσία του λείζερ δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

9.3 Επίδραση της φωτοδυναμικής θεραπείας με χρήση m-THPC στη βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων προστάτη LNCaP

Όπως παρατηρήθηκε, η φωτοδυναμική θεραπεία με χρήση του φωτοευαισθητοποιητή m-THPC προκάλεσε τη μείωση στη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων του προστάτη LNCaP. Ο φωτοευαισθητοποιητής ύστερα από την επώασή του στην κυτταροκαλλιέργεια για 24 ώρες εντός κλιβάνου, δεσμεύτηκε στα καρκινικά κύτταρα.

Η έκθεσή του στο φως (λείζερ) οδήγησε στη διέγερση του και στη μετέπειτα παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου οι οποίες προκάλεσαν οξειδωτικό στρες στα κύτταρα οδηγώντας τα στο θάνατο. Έτσι η βιωσιμότητα των κυττάρων ανήλθε στο 60% συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς.

9.4 Φωτοδυναμική θεραπεία με συνεργιστική δράση foscan - BSO και επίδραση στη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων προστάτη LNCaP

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, η βιωσιμότητα των κυττάρων έπειτα από τη ΦΔΘ με χρήση m-THPC, μειώθηκε στο 60% συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς. Η προσθήκη του παράγοντα BSO σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εμφάνισε δύο διαφορετικές συμπεριφορές ως προς τη φωτοδυναμική δράση και κατά συνέπεια τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων. Μεταξύ των συγκεντρώσεων BSO 0,001 mM και 0,05 mM η βιωσιμότητα ξεπερνάει το 60%, ποσοστό το οποίο είχε προκύψει από τη ΦΔΘ με χρήση m-THPC. Σε αυτές τις συγκεντρώσεις λοιπόν η φωτοδυναμική δράση αφενός δεν ενισχύεται αφετέρου φαίνεται ότι αναστέλλεται εφόσον η βιωσιμότητα των κυττάρων ξεπερνά το 60%. Σε αυτές τις συγκεντρώσεις όμως όπως είχαμε επισημάνει νωρίτερα, ο παράγοντας BSO εμφανίστηκε να επάγει μηχανισμό υπερπαραγωγής της γλουταθειόνης. Έτσι τα αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης, ενίσχυσαν την αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων. Κατά συνέπεια οι δραστικές μορφές οξυγόνου που παρήχθησαν μέσω της φωτοδυναμικής θεραπείας παρεμποδίστηκαν από τη γλουταθειόνη και η βιωσιμότητα των κυττάρων δεν μειώθηκε.

Αντίθετα στις συγκεντρώσεις BSO 5 mM και 10 mM, παρατηρήθηκε διαφορετική συμπεριφορά. Η συνεργιστική δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας με το BSO ενίσχυσε τη φωτοδυναμική δράση, μειώνοντας τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε ποσοστό χαμηλότερο του 60%. Έχοντας μετρήσει την ποσότητα της γλουταθειόνης στη συγκέντρωση BSO 10 mM, παρατηρήσαμε ότι είχε μειωθεί συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς. Κατά αυτόν τον τρόπο, μειώθηκε συνολικά η αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων σε οξειδωτικά ερεθίσματα. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου που παρήχθησαν από τη ΦΔΘ, προκάλεσαν οξειδωτικό στρες στα καρκινικά κύτταρα, οδηγώντας τα σε μείωση του αριθμού τους. Έτσι η βιωσιμότητα εμφανίστηκε κάτω του 60%.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι για την σειρά καρκινικών κυττάρων προστάτη LNCaP που μελετήθηκε με την παρούσα πειραματική διαδικασία, η συγκέντρωση του χορηγούμενου παράγοντα BSO έχει καθοριστική σημασία ως προς την ενίσχυση της ΦΔΘ. Παρατηρήθηκε ενίσχυση για συγκεντρώσεις BSO 5 mM και 10 mM.

9.5 Επίλογος

Η φωτοδυναμική θεραπεία αποτελεί μια νέου είδους θεραπεία, η οποία εμφανίζει συγκριτικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων συμβατικών θεραπευτικών μεθόδων, για την καταπολέμηση του καρκίνου του προστάτη. Προς αυτήν τη κατεύθυνση, η βελτιστοποίηση της αποτελεσματικότητάς της, αποτελεί ζητούμενο. Η εφαρμογή της σε κύτταρα των οποίων η αντιοξειδωτική άμυνα έχει προηγουμένως κατασταλεί, φαίνεται να βελτιώνει την αποτελεσματικότητά της, ενισχύοντας τη φωτοδυναμική δράση υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Η ενίσχυση αυτή, μπορεί να υποκαταστήσει εν μέρει τη χορηγούμενη δόση φωτοευαισθητοποιητή και κατά συνέπεια να μειώσει τη φωτοευαισθησία που προκαλείται στα υγιή κύτταρα, η οποία αποτελεί βασικό μειονέκτημα της φωτοδυναμικής θεραπείας. Νέες πειραματικές μελέτες σε παρόμοια κατεύθυνση, μπορούν να οδηγήσουν σε περαιτέρω βελτίωση της αποτελεσματικότητας της φωτοδυναμικής θεραπείας καθιστώντας την μελλοντικά, ως βασική μέθοδο καταπολέμησης του καρκίνου του προστάτη.

*

9.6 Παράρτημα – Πίνακας φωτοευαισθητοποιητών [16]

Φωτο ευαισθητο ποιητής	Μήκος κύματος (nm)	Συντελεστής εξάλειψης ($M^{-1} cm^{-1}$)	Τρόπος χορήγησης	Φορέας μεταφοράς	Τυπική δόση ($mg kg^{-1}$)	Δόση φωτός ($J cm^{-2}$)	Χρόνος μετά τη χορήγηση	Διάρκεια φωτο ευαισθησίας στο δέρμα	Εμπορική ονομασία	Κλινικές εφαρμογές
Παράγωγα αιματο πορφυρίνης	630	$3,0 \times 10^3$	Ενδοφλέβια ή τοπικά	5% Δεξτρόζη	2,0 – 5,0	100 - 200	24-48 ώρες	2 – 3 μήνες	Photofrin	Καρκίνος οισοφάγου, πνεύμονα, ουροδόχου κύστης, τραχήλου της μήτρας, κεφαλής και αυχένα, δέρματος, στήθους
									Photoheme	
5-Amino laevulinic Acid (ALA)	635	$< 5,0 \times 10^3$	Τοπικά, λήψη από το στόμα, ενδοφλέβια	Υδατοδιαλυτό	<60 (στοματικά) <30 ενδοφλέβια	100 - 200	-	1 – 2 ημέρες	Levulan	Ακτινική κεράτωση, αποτρίχωση, ακμή, καρκίνος οισοφάγου, γαστρεντερικός
Verteporfin	690	$3,5 \times 10^4$	Ενδοφλέβια	Λιποσώματα	0,1 – 2,0	100 - 200	30 – 150 λεπτά	3 – 5 ημέρες	Visudine Verteporfin	Καρκίνος δέρματος, ψωρίαση, πολλαπλή σκλήρυνση
Temoporfin	652	$3,0 \times 10^4$	Ενδοφλέβια	Peg/ ethanol/water	0,1 – 0,3	8 - 12	24 – 48 ώρες	>6 εβδομάδες	Foscan	Καρκίνος κεφαλής, αυχένα, οισοφάγου, προστάτη, υπερπλασία
Texaphyrins	732	$4,2 \times 10^4$	Ενδοφλέβια	Υδατοδιαλυτό	0,6 – 7,2	150	3 – 5 ώρες	Ελάχιστη	Lutrin Antrin Optrin	Καρκίνος στήθους, Εκφυλισμός της ωχράς κηλίδας
Phthalocyanines	670 - 680	$2,5 \times 10^5$	Ενδοφλέβια	Λιποσώματα ή υδατοδιαλυτό	0,5 – 2,0	100	24 – 72 ώρες	8 – 10 ημέρες	CGP55847 Photosense Pc4	Καρκίνος γαστρεντερικός, δέρματος, στήθους, πνεύμονα, ψωρίαση

Βιβλιογραφία

- [1] <http://www.prostate-cancer.com>.
- [2] http://www.prostatebladdercancer.org/about_prostate_gland.htm.
- [3] Αποστολίδης ΝΣ, Πανουσόπουλος ΔΓ. Ο καρκίνος σήμερα. *Χειρουργική Ογκολογική Θεώρηση*, 2^η έκδ, Αθήνα 2004:8.
- [4] Aronson WJ, deKernion JB. *Prostate*. Encyclopedia of Gerontology 2nd Ed, Elsevier, 2007, 391-399.
- [5] <http://www.pcf.org>.
- [6] Ahmed HU, Moore C, Emberton M. Minimally-invasive technologies in uro-oncology: The role of cryotherapy, HIFU and photodynamic therapy in whole gland and focal therapy of localised prostate cancer. *Surg Oncol*. 2009 Sep;18(3):219-32.
- [7] Juarranz A, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol*. 2008 Mar;10(3):148-54.
- [8] Kübler AC. Photodynamic therapy. *Med Laser Appl*. 2005;20:37–45.
- [9] Schmidt-Erfurth U, Hasan T. Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 2000 Nov-Dec;45(3):195-214.
- [10] Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu XH, Childs CJH, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2004;1:27–42.
- [11] http://www.chem.uoa.gr/courses/instrumental2/Spectro/7h-8h_SPECTR.pdf
- [12] Luksiene Z. Photodynamic therapy: Mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina (Kaunas)*. 2003;39(12):1137-50.
- [13] Sobolev AS, Jans DA, Rosenkranz AA. Targeted intracellular delivery of photosensitizers. *Prog Biophys Mol Biol*. 2000;73(1):51-90.

- [14] Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2007 Mar;21(3):293-302.
- [15] Agostinis P, Berg K, Cengel KA et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA Cancer J Clin*. 2011 Jul-Aug;61(4):250-81.
- [16] Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today*. 1999 Nov;4(11):507-517.
- [17] DeRosa MC, Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev*. 2002;233-234:351–371.
- [18] Konan YN, Gurny R, Allémann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2002 Mar;66(2):89-106.
- [19] Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B*. 2009 Jul 17;96(1):1-8.
- [20] Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW et al. Photodynamic Therapy review. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Jun 17;90(12):889-905.
- [21] Nawalany K, Rusin A, Kepczynski M et al. Novel nanostructural photosensitizers for photodynamic therapy : In vitro studies. *Int J Pharm*. 2012 Jul 1;430(1-2):129-40.
- [22] Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B*. 1997 May;39(1):1-18.
- [23] Marchal S, François A, Dumas D, Guillemin F, Bezdetsnaya L. Relation between subcellular localization of Foscan and caspase activation in photosensitized MCF-7 cells. *Br J Cancer*. 2007 Mar 26;96(6):944-51.
- [24] Chen Y, Zhang LLM, Shen T. An explanation to the high efficiency of m-THPC (Temporfin) used in photodynamic therapy. *Chin Sci Bull*. 2001;46(10):823—7.
- [25] MacRobert AJ, Theodossiou T. Photodynamic therapy of cancer. *Encyclopedia of Modern Optics*. 2005;53–62.

- [26] Nyst HJ, Tan IB, Stewart FA, Balm AJ. Is photodynamic therapy a good alternative to surgery and radiotherapy in the treatment of head and neck cancer? *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2009 Mar;6(1):3-11.
- [27] Γιαννακοπούλου Ε. Οξειδωτικό stress - αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί, κλινική σημασία. Τμήμα Βασικών Ιατρικών Μαθημάτων, Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας, ΤΕΙ Αθήνας, 2007.
- [28] Ortega A.L., Mena S., Estrela J.M. Glutathione in Cancer Cell Death. *Cancers.* 2011;3(1):1285-1310.
- [29] Abdalla Maher Y. Glutathione as potential target for cancer therapy; More or Less is Good? *JJBS.* 2011;4(3):119-124.
- [30] Perotti C, Casas A, Del C Batlle AM. Scavengers protection of cells against ALA-based photodynamic therapy-induced damage. *Lasers Med Sci.* 2002;17(4):222-9.
- [31] Armstrong JS, Steinauer KK, Hornung B et al. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ.* 2002 Mar;9(3):252-63.
- [32] Reliene R, Schiestl RH. Glutathione depletion by buthionine sulfoximine induces DNA deletions in mice. *Carcinogenesis.* 2006 Feb;27(2):240-4.
- [33] Tai DJ, Jin WS, Wu CS et al. Changes in intracellular redox status influence multidrug resistance in gastric adenocarcinoma cells *Exp Ther Med* 2012;291-296.
- [34] Bailey HH. L-S,R-buthionine sulfoximine historical development and clinical issues. *Chem Biol Interact.* 1998 Apr 24;111-112:239-54.
- [35] Anderson CP, Tsai JM, Meek WE et al. Depletion of glutathione by buthionine sulfoximine is cytotoxic for human neuroblastoma cell lines via apoptosis. *Exp Cell Res.* 1999 Jan 10;246(1):183-92.
- [36] Watanabe T, Sagisaka H, Arakawa S et al. A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-buthionine (S,R)-sulfoximine. *J Toxicol Sci.* 2003 Dec;28(5):455-69.
- [37] <http://www.thermoscientific.com>.

- [38] <http://www.bwoptics.com/proend.asp?id=115>.
- [39] Βανίδης ΕΔ. Παραγωγή, ανάλυση και ανίχνευση του φωτός. *Εργαστηριακή Οπτική*. Θεσσαλονίκη 2006: 114:116:123.
- [40] Svelto O. Αρχές των lasers. Μετάφραση και επιμέλεια Γ.Α. Κουρκούλης – Α.Α. Σεραφετινίδης, 2^η έκδ, εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα 1986 : 228-233.
- [41] Ώξενκιουν–Πετροπούλου Μ. Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης - Φασματομετρικές Μέθοδοι. 2^η έκδ, εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα 2008: 68-69:72:316.
- [42] <http://www.surpluscomputers.com/images/resources/43494/029affa6c09940bcaaebe326737df768.jpg>
- [43] Κουτσούρης Δ, Γιόβα Δ. Μετρήσεις και έλεγχοι στη βιοϊατρική τεχνολογία, εργαστηριακό μάθημα 7^{ου} εξαμήνου, ΣΗΜΜΥ, Αθήνα 2004:78.
- [44] <http://www.bmglabtech.com/images/products/fluostar-optima-background-200.jpg>.
- [45] <http://www.cf.ac.uk/biosi/staffinfo/kille/Methods/Cellculture/HAEMO.html>.
- [46] <http://lab-glassware.cn/counting%20chamber.htm>.
- [47] Σχεδιασμός Βιομηχανικών Τροφίμων - Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων, Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ, 9^ο εξάμηνο, Εργαστηριακές Ασκήσεις, Αθήνα 2010:19,21.
- [48] Day RM, Suzuki YJ. Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione. *Dose Response*. 2006 May 1;3(3):425-42.
- [49]. Ortega A.L., Mena S., Estrela J.M. Glutathione in Cancer Cell Death. *Cancers*. 2011; 3(1):1285-1310.