



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ,
ΗΛΕΚΤΡΟΟΠΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ, ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΩΝ
ΟΥΣΙΩΝ & ΦΥΣΙΚΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΑ ΝΕΟΠΛΑΣΙΩΝ ΜΕ
ΑΝΑΠΤΥΧΗ ΟΠΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

της **ΑΣΠΑΣΙΑΣ Γ. ΠΕΤΡΗ**

Διπλωματούχου Ηλεκτρολόγου Μηχανικού
και Μηχανικού Υπολογιστών Ε.Μ.Π.

Αθήνα 2013



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ


ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ, ΗΛΕΚΤΡΟΟΠΤΙΚΗΣ &
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ, ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ & ΦΥΣΙΚΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΑ ΝΕΟΠΛΑΣΙΩΝ ΜΕ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΟΠΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
της ΑΣΠΑΣΙΑΣ Γ. ΠΕΤΡΗ


Διπλωματούχου Ηλεκτρολόγου Μηχανικού και Μηχανικού Υπολογιστών Ε.Μ.Π.

Συμβουλευτική Επιτροπή: Καθ. Διδώ Γιόβα (επιβλέπουσα)
Καθ. Βασίλειος Ρούσσης
Επ. Καθ. Μιχαήλ Ράλλης


Δ. Γιόβα
Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.



Β. Ρούσσης
Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.


Μ. Ράλλης
Επίκουρος Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α


Δ. Κουτσούρης
Καθηγητής Ε.Μ.Π.


Κ. Πολιτόπουλος
Επίκουρος Καθηγητής Ε.Μ.Π.


Κ. Δέβρος
Καθηγητής Ε.Μ.Π


Δ. Κέκος
Καθηγητής Ε.Μ.Π

Αθήνα 2013

.....
Ασπασία Γ. Πετρή

Διπλωματούχος Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών Ε.Μ.Π. (2004)

Διδάκτωρ Ηλεκτρολόγος Μηχανικός ΕΜΠ (2013)

Copyright © Ασπασία Γ. Πετρή, 2013.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

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

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

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Η/Υ Ε.Μ.Π. υπό την επίβλεψη της διευθύντριας του εργαστηρίου καθηγήτριας κ. Διδούς Γιόβα. Τμήμα του πειραματικού μέρους, πειράματα σε *in vivo* μοντέλα νεοπλασιών αλλά και *in vitro* μελέτες, πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την καθοδήγηση του επίκουρου καθηγητή κ. Μιχαήλ Ράλλη. Η συλλογή, επεξεργασία και επιλογή των φυσικών αντιοξειδωτικών, για μελέτες δράσης τους σε κυτταρικά μοντέλα καθώς και σε μοντέλα πειραματοζώων, έγινε σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την καθοδήγηση του καθηγητή κ. Βασιλείου Ρούσση.

“In my beginning is my end”⁽ⁱ⁾

Χρόνια πριν, απλά, αβίαστα η έρευνα αναδύθηκε ως η μόνη προοπτική με νόημα... Υπόσταση στη βαθύτατη επιθυμία για έρευνα έδωσε η κ. Διδώ Γιόβα, καθηγήτρια ΕΜΠ. Ως ουσιαστικός Δάσκαλος ενθάρρυνε το προσωπικό ενδιαφέρον, λείανε τις αδυναμίες, καθοδήγησε την έρευνα και εξασφάλισε την ολοκλήρωση της. Με ενέταξε στο δυναμικό του Εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής ΕΜΠ και με περισσή γενναιοδωρία, πολύ κόπο και προσωπικό αγώνα παρείχε τα μέσα και

τους πόρους για την υλοποίηση της έρευνας. Η παρουσία και επιστημονική της καθοδήγηση υπήρξε καθοριστική για τη διερεύνηση και διαπραγμάτευση του θέματος της παρούσας διατριβής, για την συνεχή βελτίωση του έργου και την ολοκλήρωση της μελέτης. Αισθάνομαι τη βαθύτατη ανάγκη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου για την ανάληψη της ευθύνης επίβλεψης της παρούσας διατριβής, για την καθοδήγηση που εξασφάλισε την ολοκλήρωση της διατριβής αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επίκουρο καθηγητή της Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ, κ. Μιχαήλ Ράλλη, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την εμπιστοσύνη και την ελευθερία πειραματισμού στα εργαστήρια της Φαρμακευτικής Σχολής, την τεχνογνωσία που μου μετέδωσε και την πολύτιμη, άοκνη βοήθεια στον σχεδιασμό και την υλοποίηση των πειραμάτων σε βιολογικά συστήματα. Πάντοτε παρόν όποτε χρειάστηκε βοήθεια, δίνοντας λύση στο κάθε πρόβλημα, απαντώντας σε κάθε ερώτηση, προκαλώντας με να εργαζομαι πάντοτε καλύτερα.

Με συναίσθημα ιδιαίτερης ευγνωμοσύνης απευθύνομαι στον καθηγητή της Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ κ. Βασίλειο Ρούσση, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, ο οποίος υποστήριξε αμέριστα το ερευνητικό μου έργο και παρείχε τα φυσικά προϊόντα από ανανεώσιμο φυτικό υλικό, απαραίτητα για τη μελέτη στα πλαίσια της διατριβής. Η συμβολή του, κυρίως μέσω της ηθικής υποστήριξης, της ουσιαστικής επικοινωνίας και των χρήσιμων συμβουλών, ήταν καταλυτική για την ολοκλήρωση της διατριβής.

Η υλοποίηση της διατριβής θα ήταν αδύνατη χωρίς την εφευρετικότητα και υποστήριξη του επίκουρου καθηγητή της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του ΕΜΠ κ. Κωνσταντίνο Πολιτόπουλο, μέλος της πενταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, ο οποίος κατέβαλε κάθε δυνατή προσπάθεια για να αντιμετωπιστούν και υπερβληθούν τα όσα, και ήταν πολλά, τεχνολογικά προβλήματα προέκυψαν κατά τη διάρκεια της μελέτης. Διέθεσε τις γνώσεις και το χρόνο του, κυρίως όμως την καλή του διάθεση και τον πολυμήχανο νου του στη μελέτη, κάνοντας την συνεργασία εξαιρετικά ευχάριστη. Οφείλω θερμές ευχαριστίες στον καθηγητή της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του ΕΜΠ κ. Δημήτριο Κουτσούρη, μέλος της πενταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις βασικές γνώσεις Βιοϊατρικής που απέκτησα μέσω των μεταπτυχιακών μαθημάτων του, τις χρήσιμες συμβουλές, τις ουσιαστικές παρατηρήσεις αλλά και για την υποστήριξη καθόλη τη διάρκεια της διατριβής.

Ανάλογες θερμές ευχαριστίες θεωρώ ότι οφείλω στον καθηγητή της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του ΕΜΠ κ. Κωνσταντίνο Δέρβο, με τον οποίο είχα την τιμή να έρθω σε επαφή μέσω των μεταπτυχιακών μαθημάτων, και στον καθηγητή της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ κ. Δημήτριο Κέκο, ο οποίος παρείχε τον εξοπλισμό του εργαστηρίου του για υλοποίηση μέρους των πειραματικών διαδικασιών, για την προθυμία με την οποία δέχτηκαν να συμμετέχουν στη διαδικασία κρίσης της διδακτορικής διατριβής, διατελώντας μέλη της επταμελούς επιτροπής. Οι συμβουλές και υποδείξεις τους ήταν πολύ σημαντικές για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Το διδακτορικό είναι ένας αγώνας προσωπικός, επίπονος, μοναχικός. Όσο όμως και αν παλεύει κανείς μόνος του δεν μπορεί να φτάσει στο τέρμα, πολλές φορές ούτε καν να ξεκινήσει, χωρίς την

παρουσία και τη βοήθεια χαρισματικών συνοδοιπόρων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά όλους όσους συνεργάστηκα κατά περιόδους και σε διαφορετικές φάσεις της διατριβής.

Με συναίσθημα ιδιαίτερης ευγνωμοσύνης στρέφομαι σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής για τη ηθική τους συμπαράσταση και ουσιαστική βοήθεια όλα αυτά τα χρόνια της διατριβής μου. Καταρχήν στην Δρ. Μαρία Κυριαζή στην οποία οφείλω την κατάρτισή μου σε όλες σχεδόν τις πειραματικές μεθοδολογίες, την καλλιέργεια της ερευνητικής σκέψης και της επιστημονικής εργασίας. Στην Δρ. Ελένη Αλεξανδράτου στην οποία οφείλω την αυστηρότητα και την ακρίβεια στον πειραματισμό και στον έλεγχο των υποθέσεων, αλλά κυρίως τη γνωριμία με το θαυμαστό κόσμο της απεικονιστικής μικροσκοπίας φθορισμού. Η μαθητεία κοντά τους υπήρξε μοναδική ευκαιρία τριβής στη μεθοδικότητα, στη σωστή οργάνωση και εκτέλεση πειραμάτων, στην αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Κυρίως όμως η παρουσία τους μου χάρισε μια εξαιρετική συνεργασία, ώτα εύηκοα προς ανακούφιση κάθε προβλήματος. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Ανδρέα Στυλιανού για την πολύτιμη βοήθεια σε πολλά πειραματικά αλλά και πρακτικά προβλήματα, για τις ωφέλιμες ιδέες αλλά και την ευχάριστη συνεργασία. Τέλος θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην αναφερθώ στα παλαιότερα αλλά και νεότερα μέλη του εργαστηρίου, τον κ. Σπύρο Θύμη, τον Δρ. Δημήτριο Γκόρπα, και τους ΥΔ κκ. Γεώργιο Μπαλογιάννη, Στέλιο Κοντομάρη, Σοφία Μπέτση και Κυριακή Σαμπάνη για το ευχάριστο και φιλικό περιβάλλον στο εργαστήριο, το οποίο συνετέλεσε τα μέγιστα στην ολοκλήρωση της διατριβής. Ξεχωριστή μνεία και ευχαριστία οφείλω στους κκ Μαρία Αναστασοπούλου (ΗΜΜΥ ΕΜΠ), Γεωργία Κανλή (ΜΕΜΦΕ ΕΜΠ), Μηνά Σπανάκη (ΧΜ ΕΜΠ), Αθηνά Καστανιά (ΧΜ ΕΜΠ, ΜSc), Ιωάννα Αντωνιάδου (Βιολόγο ΕΚΠΑ, ΜSc), Ζαχαρένια Νικητάκη (ΜΕΜΦΕ ΕΜΠ, ΜSc) με τους οποίους συνεργάστηκα στα πλαίσια εκπόνησης των διπλωματικών και μεταπτυχιακών εργασιών τους και από τους οποίους διδάχτηκα να διδάσκω, να μεταδίδω, να συνεργάζομαι, να έχω υπομονή. Τους ευχαριστώ γιατί με βοήθησαν να εμβαθύνω σε πεδία που δε γνώριζα ότι μου άρεσαν.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω με όλη μου την καρδιά τα μέλη του Εργαστηρίου Φαρμακευτικής Τεχνολογίας της Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ για τη συνεργασία, βοήθεια και καθοδήγηση όλα αυτά τα χρόνια. Την Δρ. Φωτεινή Δανιά με την οποία μοιραστήκαμε πολλά περισσότερα από τους κοινούς κόπους και αγωνίες που συνεπαγόταν το στήσιμο της αποικίας πειραματοζώων αλλά και συνεδρίων. Κληθήκαμε να συγκατοικήσουμε (ποικιλοτρόπως) και οφείλω να αναγνωρίσω πως χωρίς την παρουσία της η επιβίωση της αποικίας θα ήταν αδύνατη. Την ευχαριστώ για τη στήριξη και τη διέξοδο που μου παρείχε σε κάθε δυσκολία. Τη Δρ. Παναγούλα Παύλου και την κ. Νίνο Μπαζελίτζε για τη βοήθεια, την υποστήριξη και το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο. Τον Δρ Αλέξιο Ματραλή και την κ. Ελένη Λαδοπούλου γιατί η παρουσία τους ήρε το βάρος πολύ δύσκολων εποχών. Τους ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθεια. Τέλος τον Λέκτορα του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας της Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ, κ. Ιωάννη Ντότσικα για την προθυμία και τη βοήθεια στην υλοποίηση των μετρήσεων με τη φασματοφωτομετρική διάταξη πολλαπλών μετρήσεων.

Ολόθερμες ευχαριστίες οφείλω στη Λέκτορα κ. Ευσταθία Ιωάννου και στον εκλιπόντα αναπληρωτή καθηγητή Κωνσταντίνο Βάγια, του τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ, για τη συλλογή, επεξεργασία και διάθεση των φυσικών προϊόντων

(φλοιός, χλωρές και ξηρές βελόνες) τριών ειδών πεύκων τα οποία φύονται σε ελληνικά εδάφη, των *P.brutia*, *P.pinea* και *P.halerpensis*, τα οποία μελετήθηκαν στα πλαίσια της διατριβής.

Οι δυσκολίες της έρευνας και της συνεργασίας όλα αυτά τα χρόνια ήταν μεγάλες αλλά με τη χάρη του Θεού και την εμπνευσμένη καθοδήγηση όλων όσων με βοήθησαν ξεπεράστηκαν και οδήγησαν στην ολοκλήρωση της διατριβής. Δεδομένο είναι πως τα εύσημα για την ολοκλήρωση της εργασίας ανήκουν σε όσους με την καλή τους διάθεση και τις εμπειριστατωμένες γνώσεις τους με βοήθησαν. Οι αδυναμίες και οι ελλείψεις βαρύνουν αποκλειστικά και μόνο εμένα.

Για το τέλος άφησα την αναφορά σε αυτούς στους οποίους οφείλω τα πάντα και δεν μπορώ να βρω λόγια για να τους ευχαριστήσω. Τους γονείς μου για την αγάπη και την ελευθερία, τον π.Ηλία για την αμέριστη στήριξη, τα αδέρφια μου για την υπομονή και τη συμπαράσταση, τις χαρές και τις λύπες που μοιραστήκαμε όλα αυτά τα χρόνια, τον αδερφό μου, που μπορεί σωματικά να μη βρίσκεται κοντά μας, στέκεται πάντα στο πλευρό μας. Η χάρη και το έλεος του Θεού έδωσε και ολοκληρώθηκε ο αγώνας αυτός. Ας είναι δοξασμένο το όνομά Του.

“In my end is my beginning”⁽ⁱ⁾



Δόξα τω Θεώ πάντων ένεκεν.

Ασπασία Γ. Πετρή

Αθήνα, Μάρτιος 2013

ⁱ T.S.Eliot, Four Quartets

ⁱⁱ «Ωσπερ Πελεκάν». Λεπτομέρεια από το ξυλόγλυπτο τέμπλο του καθολικού της Ι.Μ. Αγ. Νικολάου Καρυάς, Πραστός Αρκαδίας.

Περιεχόμενα

Πρόλογος		i
Περιεχόμενα		v
Κατάλογος Πινάκων		xv
Κατάλογος Σχημάτων		xvii
Κατάλογος Εικόνων		xxv
Περίληψη		xxix
Abstract		xxxv
Κεφάλαιο I	Φωτοδυναμική Θεραπεία	1
1.1	Εισαγωγή	1
1.2	Βασικές αρχές Φωτοδυναμικής Θεραπείας	3
1.3	Αλληλεπιδράσεις φωτός με την ύλη	5
1.3.1	Φως	5
1.3.2	Αλληλεπιδράσεις φωτός - ιστού	8
1.3.3	Αλληλεπιδράσεις φωτός με μόρια	11
1.4	Μηχανισμοί φωτοδυναμικής θεραπείας	16
1.4.1	Το μονήρες οξυγόνο στη φωτοδυναμική θεραπεία.	20

1.4.2	Φωτοδυναμική δόση	22
1.4.3	Οξυγόνωση ιστού	23
1.5	Φωτοδυναμικά επαγόμενοι μηχανισμοί νέκρωσης καρκινικών όγκων	24
1.5.1	Απευθείας κυτταρικός θάνατος.	24
1.5.1.1	Απόπτωση	25
1.5.1.2	Νέκρωση	27
1.5.1.3	Αυτοφαγία / Αυτοφαγοκυττάρωση	28
1.5.2	Καταστροφή αγγειακού δικτύου του καρκινικού ιστού.	31
1.5.3	Ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος	33
1.6	Σύγχρονες προκλήσεις στη Φωτοδυναμική Θεραπεία	33
Κεφάλαιο II	Φωτοευαισθητοποιητές	37
2.1	Εισαγωγή	37
2.2	Ιδιότητες ιδανικού φωτοευαισθητοποιητή	40
2.2.1	Φωτοφυσικά και φωτοχημικά χαρακτηριστικά	40
2.2.2	Φαρμακολογικά χαρακτηριστικά	41
2.2.3	Φωτοθεραπευτικά χαρακτηριστικά	42
2.3	Κατηγοριοποίηση φωτοευαισθητοποιητών	42
2.3.1	Οικογένεια πορφυρινών	43
2.3.2	Οικογένεια χλωρινών	46
2.2.3	Οικογένεια χρωστικών	50
2.4	Πρόσληψη φωτοευαισθητοποιητών από τους καρκινικούς ιστούς	53
2.5	Φωτοευαισθητοποιητές 3 ^{ης} γενιάς	56
2.5.1	Νανοσωματίδια ως φορείς μεταφοράς φωτοευαισθητοποιητών	56
2.5.2	Λιποσώματα	59
2.5.3	Αποδέσμευση φωτοευαισθητοποιητών από τα λιποσώματα	66
2.5.4	Πρόσληψη λιποσωμάτων από τα κύτταρα	68
2.5.5	Φωτοδυναμική δράση με εγκλεισμένους σε λιποσώματα φωτοευαισθητοποιητές	69
Κεφάλαιο III	Πηγές Φωτός & Συστήματα Ακτινοβολήσης	71

3.1	Εισαγωγή	71
3.2	Διοδικά lasers	72
3.2.1	Αρχή λειτουργίας	73
3.3	Πηγές μη σύμφωνου φωτός	77
3.3.1	Λυχνίες	77
3.3.2	LEDs	78
3.3.3	Σύνοψη συστημάτων ακτινοβολίας στη Φωτοδυναμική	78
3.4	Συστήματα μεταφοράς ακτινοβολίας	80
3.4.1	Συστήματα επιφανειακής ακτινοβολίας	80
3.4.2	Συστήματα ενδοϊστικής ακτινοβολίας	80
Κεφάλαιο IV	Συνέργεια φωτοδυναμικής & ελευθέρων ριζών - δραστικών οξυγονούχων ειδών	87
4.1	Εισαγωγή	87
4.2	Οξειδωτικό στρες	89
4.2.1	Πηγές προ-οξειδωτικών	90
4.2.1.1	Ενδογενείς πηγές προ-οξειδωτικών	90
4.2.1.2	Εξωγενείς πηγές προ-οξειδωτικών	91
4.3	Ελεύθερες ρίζες	93
4.4	Δραστικά είδη	93
4.4.1	Δραστικά οξυγονούχα είδη	93
4.4.2	Δραστικά χλωριούχα είδη	98
4.4.3	Δραστικά αζωτούχα είδη	98
4.5	Βιολογικοί στόχοι ελευθέρων ριζών	99
4.6	Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας	100
4.6.1	Ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας	101
4.6.1.1	Υπεροξειδίο της δισμουτάσης	101
4.6.1.2	Καταλάση	101
4.6.1.3	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	102
4.6.2	Μη ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας	102
4.6.2.1	Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)	103

4.6.2.2	Βιταμίνη Ε	103
4.6.2.3	Καροτενοειδή	103
4.6.2.4	Πολυφαινόλες	104
4.6.2.4.α	Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών	104
4.6.2.4.β	Αντιοξειδωτική / προ-οξειδωτική δράση πολυφαινολών	107
4.6.2.4.γ	Προ-οξειδωτική δράση πολυφαινολών	108
4.6.2.5	Θειόλες / Γλουταθειόνη	111
4.6.2.5.α	Δομή και λειτουργίες γλουταθειόνης	112
4.6.2.5.β	Σύνθεση γλουταθειόνης	114
4.7	Συγκερασμός φωτοδυναμικής με αλλαγή στην ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία	116
4.7.1	Ενδογενής τακτική	117
4.7.2	Εξωγενής τακτική	118
Κεφάλαιο V	Ενδοϊστική Φωτοδυναμική Θεραπεία & Καρκίνος του Προστάτη	121
5.1	Εισαγωγή	121
5.2	Ο προστάτης	123
5.3	Παθήσεις του προστάτη	124
5.4	Καρκίνος του προστάτη	124
5.5	Προ-κλινικές μελέτες φωτοδυναμικής σε μοντέλα πειραματοζώων καρκίνου του προστάτη	127
5.6	Κλινικές μελέτες φωτοδυναμικής θεραπείας στον καρκίνο του προστάτη	127
Κεφάλαιο VI	Ανάπτυξη Διατάξεων & Πειραματικών Μοντέλων	133
6.1	Εισαγωγή	133
6.2	Διατάξεις	137
6.2.1	Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης	137
6.2.2	Φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού	140
6.2.3	Φασματοφωτομετρική διάταξη πολλαπλών λειτουργιών	143
6.2.4	Σύστημα Απεικονιστικής Μικροσκοπίας	144
6.2.5	Σύστημα Μικροσκοπίας Φθορισμού	145

6.2.5.1	Αρχή λειτουργίας	146
6.2.5.2	Τύποι φωτισμού	147
6.2.5.3	Πηγές φωτός	151
6.2.5.4	Οπτικά φίλτρα	152
6.2.5.5	Αντικειμενικοί φακοί	155
6.2.5.6	Ανάπτυξη μεθοδολογίας για την καταγραφή του οξειδωτικού στρες μέσω μικροσκοπίας φθορισμού	156
6.2.5.6.α	Χαρακτηριστικά μικροσκοπίου φθορισμού	157
6.2.5.6.β	Θαλαμίσκος μικροσκοπικής παρατήρησης ζωντανών κυττάρων.	158
6.2.5.6.γ	Ιχνηθέτες φθορισμού	160
6.2.6	Σύστημα Συνεστιακής Μικροσκοπίας Σάρωσης με Laser	160
6.2.7	Σύστημα ψηφιακής απεικόνισης ιστών	163
6.2.8	Διάταξη διοδικού laser για φωτοδυναμική θεραπεία	164
6.2.9	Συστήματα ακτινοβολήσης για φωτοδυναμική θεραπεία	166
6.2.10	Διάταξη UV για ακτινοβολήση κύτταρων	168
6.3	Ανάπτυξη μοντέλων για πειραματικές μελέτες	168
6.3.1	Ανάπτυξη πρωτογενούς καλλιέργειας κερατινοκυττάρων ως μοντέλο δέρματος για μελέτες αντιοξειδωτικής προστασίας έναντι φωτοεπαγομένου οξειδωτικού στρες	168
6.3.1.1	Πρωτόκολλο λήψης κερατινοκυττάρων από δέρμα νεογνών άτριχων μυών τύπου SKH-HR1 και SKH-HR2	168
6.3.2	Ανάπτυξη μοντέλου κυττάρου καρκίνου του προστάτη για μελέτες φωτοδυναμικής δράσης	170
6.3.2.1	Μεθοδολογία απόψυξης κυτταρικής σειράς LNCaP	171
6.3.2.2	Μεθοδολογία ανακαλλιέργειας κυτταρικής σειράς LNCaP	171
6.3.2.3	Μεθοδολογία κατάψυξης των κυττάρων	172
6.3.3	Ανάπτυξη μοντέλου μυός καρκίνου του προστάτη για προκλινικές μελέτες ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας.	173
6.4	Πρωτόκολλα και μεθοδολογίες μελετών	175
6.4.1	Πρωτόκολλο μελέτης ενδοκυττάριας χωρικής κατανομής του φωτοευαισθητοποιητή με Συνεστιακή Απεικονιστική Μικροσκοπία	175
6.4.2	Μεθοδολογία μελέτης φωτοδυναμικής δράσης στο μοντέλο κυττάρου καρκίνου του προστάτη.	176
6.5	Πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας – βιοχημικός έλεγχος MTT	177
6.6	Μεθοδολογία ποσοτικοποίησης οξειδωτικού στρες μέσω μικροσκοπίας φθορισμού	178

6.6.1	Ιχνηθέτες φθορισμού	178
6.6.2	Πρωτόκολλο επώασης ζωντανών κυττάρων με τον ιχνηθέτη φθορισμού 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H2DCFDA)	180
6.6.3	Μεθοδολογία ποσοτικοποίησης εκπεμπόμενου από το δείγμα φθορισμού μέσω επεξεργασίας εικόνων φθορισμού από το μικροσκόπιο φθορισμού	181
6.7	Μεθοδολογία και πρωτόκολλο μέτρησης ενδοκυττάριας γλουταθειόνης	183
6.8	Μεθοδολογία και σκεπτικό μελέτης αντιοξειδωτικής προστασίας έναντι φωτοεπαγομένου οξειδωτικού στρες.	185
6.8.1	Πρωτόκολλο πρόκλησης οξειδωτικού στρες μέσω UV ακτινοβολίας και αντιοξειδωτικής προστασίας έναντι του φωτοεπαγομένου οξειδωτικού στρες	186
6.9	Μεθοδολογία λήψης εκχυλίσματος φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένου από φλοιό P.halepensis	187
6.10	Ανάπτυξη μεθόδων για μελέτες στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη	188
6.10.1	Πρωτόκολλο Ενδοϊστικής Φωτοδυναμικής Θεραπείας	188
6.10.2	Πρωτόκολλο συνδυαστικής δράσης της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών	189
6.10.3	Παρακολούθηση όγκων και αξιολόγηση θεραπείας	189
Κεφάλαιο VII	Αποτελέσματα & Συμπεράσματα Μελετών στο Μοντέλο Κυττάρου	191
7.1	Αποτελέσματα μελέτης φωτοφυσικών ιδιοτήτων της ελεύθερης και της εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC	191
7.1.1	Φάσματα απορρόφησης ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC	193
7.1.1.1	Φάσματα απορρόφησης ελεύθερης m-THPC σε διαφορετικούς διαλύτες	194
7.1.1.2	Φάσματα απορρόφησης εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC σε διαφορετικούς διαλύτες	195
7.1.1.3	Συμπεράσματα	196
7.1.2	Φάσματα φθορισμού ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC	198
7.2	Αποτελέσματα μελετών επίδρασης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC στη βιωσιμότητα των κυττάρων	201
7.3	Αποτελέσματα μελετών προσδιορισμού ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC στα LNCaP κύτταρα	203

7.3.1	Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επωάστηκαν με την ελεύθερη m-THPC για διαφορετικούς χρόνους επώασης	204
7.3.2	Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επωάστηκαν με την εγκλεισμένη λιποσωμιακή m-THPC για διαφορετικούς χρόνους επώασης	206
7.3.3	Αποτελέσματα υπολογισμού ενδοκυττάριας συγκέντρωσης m-THPC	207
7.3.4	Συμπεράσματα	208
7.4	Αποτελέσματα μελετών ενδοκυττάριας χωρικής κατανομής ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC με συνεστιακή απεικονιστική μικροσκοπία.	209
7.5	Μελέτες βιωσιμότητας κυττάρων μετά από φωτοδυναμική δράση	212
7.5.1	Αποτελέσματα μελετών επίδρασης φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων	212
7.5.2	Αποτελέσματα μελετών φωτοδυναμικής δράσης ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC στη βιωσιμότητα των κυττάρων	214
7.5.3	Αποτελέσματα μελετών φωτοδυναμικής σε συνδυασμό με μεταβολή της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας, ενδογενώς, στη βιωσιμότητα των κυττάρων	221
7.5.3.1	Αποτελέσματα μελετών επίδρασης του αναστολέα της σύνθεσης της γλουταθειόνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων	222
7.5.3.2	Αποτελέσματα μελετών επίδρασης του αναστολέα της σύνθεσης της γλουταθειόνης σε συνδυασμό με το φως διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων	223
7.5.3.3	Αποτελέσματα μελετών συνδυαστικής δράσης της φωτοδυναμικής και του αναστολέα της σύνθεσης της γλουταθειόνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων.	225
7.5.3.4	Αποτελέσματα μελετών μέτρησης ενδοκυττάριας γλουταθειόνης	226
7.5.4	Αποτελέσματα μελετών συνέργειας φωτοδυναμικής με μεταβολή της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας, εξωγενώς, στη βιωσιμότητα των κυττάρων	229
7.5.4.1	Αποτελέσματα μελετών επίδρασης φυσικού μείγματος στη βιωσιμότητα των κυττάρων	231
7.5.4.2	Αποτελέσματα μελετών συνδυασμένης δράσης φωτοδυναμικής και φυσικού μείγματος πολυφαινολών στη βιωσιμότητα των κυττάρων	233
7.6	Μελέτες οξειδωτικού στρες	236
7.6.1	Αποτελέσματα μελετών οξειδωτικού στρες μετά από φωτοδυναμική	236
7.6.2	Αποτελέσματα μελετών επαγομένου οξειδωτικού στρες μετά από συνδυασμένη δράση φωτοδυναμικής με τον αναστολέα της σύνθεσης της γλουταθειόνης, BSO	240
7.6.3	Αποτελέσματα μελετών επαγομένου οξειδωτικού στρες μετά από συνδυασμένη δράση φωτοδυναμικής με φυσικό μείγμα πολυφαινολών	245

7.6.3.1	Αποτελέσματα μελετών επαγομένου οξειδωτικού στρες μετά από χορήγηση φυσικού μείγματος πολυφαινολών	246
7.6.3.2	Αποτελέσματα μελετών επαγομένου οξειδωτικού στρες από συνδυασμένη δράση φωτοδυναμικής και φυσικού μείγματος πολυφαινολών	250
Κεφάλαιο VIII	Αποτελέσματα & Συμπεράσματα Μελετών στο Μοντέλο Μυός	255
8.1	Αποτελέσματα μελέτης Ενδοϊστικής Φωτοδυναμικής Θεραπείας στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη	255
8.1.1	Αποτελέσματα μελέτης Ενδοϊστικής Φωτοδυναμικής Θεραπείας στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη με δόση ενέργειας 10 J	256
8.1.2	Αποτελέσματα μελέτης Ενδοϊστικής Φωτοδυναμικής Θεραπείας στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη με δόση ενέργειας 15 J	257
8.1.3	Αποτελέσματα μελέτης Ενδοϊστικής Φωτοδυναμικής Θεραπείας στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη με δόση ενέργειας 30 J	260
8.1.4	Αποτελέσματα ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας σχετικά με τη φωτοευαισθησία	262
8.1.5	Συμπεράσματα μελετών ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας	264
8.2	Αποτελέσματα μελετών ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας σε συνδυασμό με φυσικό μείγμα πολυφαινολών στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη	265
8.2.1	Αποτελέσματα μελετών επίδρασης του φυσικού μείγματος πολυφαινολών στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη	266
8.2.2	Αποτελέσματα μελετών συνδυασμένης δράσης της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας και του φυσικού μείγματος πολυφαινολών σε συγκέντρωση 1 mg/ml, στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη	265
8.2.3	Αποτελέσματα μελετών συνδυασμένης δράσης της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας και του φυσικού μείγματος πολυφαινολών σε συγκέντρωση 100 μg/ml, στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη	269
8.2.4	Συμπεράσματα μελετών συνδυασμένης δράσης της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας και του φυσικού μείγματος πολυφαινολών στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη	270
8.2.5	Αποτελέσματα συνδυασμού ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας & φυσικού μείγματος πολυφαινολών στη φωτοευαισθησία	271
Κεφάλαιο IX	Ανακεφαλαίωση & Συζήτηση Προοπτικές	273
9.1	Ανακεφαλαίωση στόχων	273

9.2	Ενσωμάτωση φωτοευαισθητοποιητών σε λιποσώματα - Χαρακτηριστικά	281
9.2.1	Φωτοφυσικές ιδιότητες	281
9.2.2	Ενδοκυττάρια χωρική κατανομή	281
9.2.3	Φωτοδυναμική δράση	283
9.3	Μελέτες Ενδοϊστικής Φωτοδυναμικής Θεραπείας στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη	284
9.4	Μελέτες συνδυασμού φωτοδυναμικής δράσης με τον αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης.	287
9.5	Μελέτες συνδυασμού φωτοδυναμικής δράσης με φυσικό μείγμα πολυφαινολών	302
9.5.1	Μελέτες σε επίπεδο κυττάρου	304
9.5.1.1	Δράση φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένων φλοιό P.halpernsis σε κύτταρα της καρκινικής σειράς κυττάρων του προστάτη LNCaP	305
9.5.1.2	Φωτοδυναμική δράση σε συνδυασμό με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών, σε επίπεδο κυττάρου	307
9.5.1.3	Πιθανός μηχανισμός συνεργειακής δράσης φωτοδυναμικής θεραπείας με την m-THPC και φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένων από εκχύλισμα φλοιού P.halpernsis	309
9.5.2	Μελέτες στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη	311
9.5.2.1	Μελέτη επίδρασης του φυσικού μείγματος πολυφαινολών στον καρκινικό όγκο, σε μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη	311
9.5.2.2	Μελέτη ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη σε συνδυασμό με φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχόμενο από εκχύλισμα φλοιού πέυκου P.halpernsis	312
9.5.2.3	Δράση φυσικού μείγματος πολυφαινολών για τον περιορισμό της φωτοευαισθησίας	314
9.6	Καινοτομικότητα - Προοπτική	317
	Βιβλιογραφία	321
	Δημοσιεύσεις	337

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1	Οπτική περιοχή του φάσματος	7
Πίνακας 1.2	Διαδικασίες και χαρακτηριστικά τους μετά την απορρόφηση φωτός από ένα μόριο	15
Πίνακας 2.1	Συγκεντρωτικός πίνακας φωτοευαισθητοποιητών και χαρακτηριστικών τους	52
Πίνακας 3.1	Συστήματα lasers που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία	79
Πίνακας 4.1	Συγκεντρωτικός πίνακας ελευθέρων ριζών και δραστικών ειδών	99
Πίνακας 5.1	Κλινικές δοκιμές ενδοϊστικής φωτοδυναμικής για τη θεραπεία καρκίνου του προστάτη	132
Πίνακας 6.1	Στοιχεία κύβων του μικροσκοπίου φθορισμού Olympus BX-50	158
Πίνακας 6.2	Τεχνικά χαρακτηριστικά CCD αισθητήρα της κάμερας της απεικονιστικής διάταξης	163
Πίνακας 6.3	Τεχνικά χαρακτηριστικά συστήματος φωτισμού	164
Πίνακας 6.4	Χαρακτηριστικά διοδικού laser 652 nm	165
Πίνακας 6.5	Χαρακτηριστικά ενεργόμετρου	166
Πίνακας 6.6	Βασικά χαρακτηριστικά οπτικής ίνας για το σύστημα ακτινοβολήσης κυττάρων	167
Πίνακας 6.7	Βασικά χαρακτηριστικά οπτικής ίνας για το σύστημα ενδοϊστικής ακτινοβολήσης	167
Πίνακας 6.8	Διάταξη τοποθέτησης διαλυμάτων στο πλακίδιο για μέτρηση ενδοκυττάριας γλουταθειόνης.	184

Πίνακας 7.1 *Μέγιστα απορρόφησης ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC, 5 μ M, στην περιοχή Soret και οι αντίστοιχοι μοριακοί συντελεστές απορρόφησης στους τρεις διαφορετικούς διαλύτες.*

196

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1.1	Στάδια εφαρμογής φωτοδυναμικής θεραπείας.	3
Σχήμα 1.2	Φαινόμενα που ακολουθούν τη διέγερση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή	4
Σχήμα 1.3	Ηλεκτρομαγνητικό πεδίο	5
Σχήμα 1.4	Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα, ορατή περιοχή του φάσματος	6
Σχήμα 1.5	Πιθανές αλληλεπιδράσεις φωτός – ιστού: ανάκλαση, απορρόφηση, σκέδαση.	8
Σχήμα 1.6	Οπτικό παράθυρο βιολογικών ιστών	10
Σχήμα 1.7	Διάγραμμα Jablonski	13
Σχήμα 1.8	Μετατόπιση Stokes	14
Σχήμα 1.9	Απορρόφηση φωτός από φωτοευαισθητοποιητή και μετάβασή του στην τριπλή διεγερμένη στάθμη $^3PS^*$	17
Σχήμα 1.10	Πρωτογενείς φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου I	17
Σχήμα 1.11	Δευτερογενείς αντιδράσεις	18
Σχήμα 1.12	Πρωτογενείς φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου II (α) και δευτερογενείς αντιδράσεις (β)	18

Σχήμα 1.13	<i>Μηχανισμοί δράσης κατά τη φωτοδυναμική</i>	19
Σχήμα 1.14	<i>Κατάταξη ηλεκτρονίων στα εξωτερικά τροχιακά στο μοριακό και μονήρες οξυγόνο</i>	20
Σχήμα 1.15	<i>Μορφολογικά χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου</i>	26
Σχήμα 1.16	<i>Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου στη φωτοδυναμική.</i>	29
Σχήμα 1.17	<i>Μηχανισμοί νέκρωσης καρκινικού όγκου επαγόμενοι από τη φωτοδυναμική.</i>	32
Σχήμα 2.1	<i>Δομή παραγώγου αιματοπορφυρίνης (α) και της Photofrin (β)</i>	44
Σχήμα 2.2	<i>Δομή Verteporfin</i>	45
Σχήμα 2.3	<i>Δομή ALA (α) και πρωτοπορφυρίνης IX (β)</i>	46
Σχήμα 2.4	<i>Δομή m-THPC (α)</i>	47
Σχήμα 2.5	<i>Δομή tin-ethyl-etioirpurin</i>	48
Σχήμα 2.6	<i>Δομή monoaspartyl chlorine e6</i>	49
Σχήμα 2.7	<i>Δομή Lutetium texaphyrin</i>	49
Σχήμα 2.8	<i>Δομή palladium bacteriopheophorbide α</i>	50
Σχήμα 2.9	<i>Δομή μεταλλοφθαλοκυανίνης (α) ναφθαλοκυανίνης (β)</i>	51
Σχήμα 2.10	<i>Ενδεικτικά είδη νανοσωματιδίων</i>	59
Σχήμα 2.11	<i>Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας λιποσώματος.</i>	60
Σχήμα 2.12	<i>(α) λιπόσωμα φέρον ενθυλακωμένη υδρόφιλη ουσία στον πυρήνα του και ενσωματωμένη λιπόφιλη ουσία στη λιπιδική στοιβάδα. (β). πολυστοιβαδικό λιπόσωμα.</i>	61
Σχήμα 2.13	<i>Κατηγοριοποίηση λιποσωμάτων ανάλογα με το μέγεθός τους</i>	62
Σχήμα 2.14	<i>Συμβατικά λιποσώματα (α) λιπιδικές διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων (β) λιπιδικές διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων / χοληστερόλης</i>	63
Σχήμα 2.15	<i>(α) λιπόσωμα με επικάλυψη πολυαιθυλενογλυκόλης (β) στερεοχημικά σταθεροποιημένο λιπόσωμα</i>	64
Σχήμα 2.16	<i>Απελευθέρωση φωτοευαισθητοποιητών από λιποσώματα</i>	67
Σχήμα 2.17	<i>Αλληλεπιδράσεις λιποσώματος κυττάρου</i>	68
Σχήμα 3.1	<i>Διοδικό laser ημιαγωγών</i>	72

Σχήμα 3.2	<i>(α) Ενεργειακές ζώνες ημιαγωγού χωρίς νοθεύσεις σε 0K. (β) Δημιουργία και επανασύνδεση ζευγών ηλεκτρονίων οπών στον ημιαγωγό.</i>	73
Σχήμα 3.3	<i>Αντιστροφή πληθυσμών σε ημιαγωγό. (α) Θερμική ισορροπία. (β) Μετά από οπτική ή ηλεκτρική άντληση</i>	74
Σχήμα 3.4	<i>(α) διάταξη διόδου $p - n$. (β) Εσωτερικό ηλεκτρικό πεδίο συναρτήσει της απόστασης x σε μια επαφή $p - n$. (γ) Εσωτερικό δυναμικό συναρτήσει της απόστασης x σε μια επαφή $p - n$.</i>	75
Σχήμα 3.5	<i>(α) ορθή πόλωση διόδου $p - n$. (β) Χαρακτηριστική καμπύλη ρεύματος τάσης μιας διόδου $p - n$</i>	76
Σχήμα 3.6	<i>(α) ορθή πόλωση διόδου $p - n$. (β) Χαρακτηριστική καμπύλη ρεύματος τάσης μιας διόδου $p - n$</i>	77
Σχήμα 3.7	<i>(α) επιφανειακή ακτινοβολήση (β) ενδοϊστική ακτινοβολήση</i>	80
Σχήμα 3.8	<i>Διάταξη ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας μη επιφανειακών δερματικών καρκινικών όγκων</i>	82
Σχήμα 3.9	<i>Διάταξη ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας καρκινικών όγκων μεγάλου σχετικά βάθους.</i>	83
Σχήμα 3.10	<i>Προσομοίωση μετά από μοντελοποίηση της κατανομής της ακτινοβολήσης στον προστάτη μέσω πολλαπλών οπτικών ινών.</i>	84
Σχήμα 4.1	<i>Κατάταξη ηλεκτρονίων στα εξωτερικά τροχιακά στις διάφορες μορφές οξυγόνου</i>	94
Σχήμα 4.2	<i>Βασική δομή φλαβονοειδούς</i>	104
Σχήμα 4.3	<i>Βασικά δομικά χαρακτηριστικά φλαβονοειδούς ώστε να δρα αντιοξειδωτικά.</i>	105
Σχήμα 4.4	<i>Εκκαθάριση ελευθέρων ριζών (R^\bullet) από ένα φλαβονοειδές ($Fl - OH$).</i>	106
Σχήμα 4.5	<i>Θέσεις σύνδεσης μεταβατικών μετάλλων (M^{n+}) στη δομή φλαβονοειδούς</i>	107
Σχήμα 4.6	<i>Προ-οξειδωτική δράση φλαβονοειδών</i>	110
Σχήμα 4.7	<i>Προ-οξειδωτική και αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών</i>	110
Σχήμα 4.8	<i>Ανηγμένη γλουταθειόνη GSH και δισουλφίδιο της γλουταθειόνης GS₂G</i>	111
Σχήμα 4.9	<i>Το τριπεπτίδιο L- γ-γλουταμυλο-L-κυστεΐνυλο-γλυκίνη ή γλουταθειόνη</i>	112
Σχήμα 4.10	<i>Ο κύκλος της γλουταθειόνης.</i>	114
Σχήμα 4.11	<i>Σύνθεση και δράση γλουταθειόνης</i>	115

Σχήμα 5.1	<i>Σχηματική αναπαράσταση ενδοϊστικής ακτινοβόλησης σε καρκινικό όγκο στον προστάτη.</i>	122
Σχήμα 5.2	<i>(α) Μετωπιαία διατομή (β) Οβελιαία διατομή (γ) Οπίσθια άποψη (δ) Εγκάρσια διατομή προστάτη</i>	123
Σχήμα 5.3	<i>Το φως για την ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή συνήθως καθοδηγείται στον προστάτη με τεχνικές ανάλογες της βραχυθεραπείας.</i>	128
Σχήμα 5.4	<i>Διάταξη ιδανικού συστήματος ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας.</i>	129
Σχήμα 6.1	<i>Η πορεία της φωτεινής δέσμης και το οπτικό διάγραμμα φασματοφωτομετρικής διάταξης απορρόφησης</i>	138
Σχήμα 6.2	<i>Οπτικό διάγραμμα διέγερσης και συλλογής φθορισμού</i>	140
Σχήμα 6.3	<i>Ενεργειακή φασματική κατανομή πηγής ξένου.</i>	141
Σχήμα 6.4	<i>Φασματοφωτομετρική διάταξη πολλαπλών λειτουργιών για πλακίδιο πολλαπλών κυψελίδων. Απλοποιημένη γραφική αναπαράσταση</i>	143
Σχήμα 6.5	<i>Το ανάστροφο μικροσκόπιο Axiovert 25 (α) και το οπτικό διάγραμμα (β)</i>	144
Σχήμα 6.6	<i>Το φάσμα απορρόφησης και το φάσμα εκπομπής της φθορίζουσας ουσίας Alexa Fluor 555 και η περιοχή επικάλυψής τους.</i>	145
Σχήμα 6.7	<i>Οπτικό διάγραμμα μικροσκοπίου φθορισμού με φωτισμό διέλευσης πλήρους πεδίου..</i>	148
Σχήμα 6.8	<i>Οπτικό διάγραμμα μικροσκοπίου φθορισμού με φωτισμό διέλευσης σκοτεινού πεδίου.</i>	149
Σχήμα 6.9	<i>Οπτικό διάγραμμα μικροσκοπίου φθορισμού με προσπίπτοντα φωτισμό..</i>	150
Σχήμα 6.10	<i>Διαγράμματα σχετικών εντάσεων εξόδου (α) λυχνίας υδραργύρου (β) λυχνίας ξένου (γ) λυχνίας υδραργύρου (δ) διαφόρων LEDs</i>	152
Σχήμα 6.11	<i>Ανάκλαση και διέλευση φωτός από ένα φίλτρο παρεμβολής</i>	153
Σχήμα 6.12	<i>Τυπικά φίλτρα μικροσκοπίας φθορισμού</i>	154
Σχήμα 6.13	<i>(α) κύβος φίλτρων σε μικροσκόπιο φθορισμού και το αντίστοιχο φάσμα διέγερσης και εκπομπής (β)</i>	155
Σχήμα 6.14	<i>Olympus BX-51</i>	157
Σχήμα 6.15	<i>Θαλαμίσκος μικροσκοπικής παρατήρησης ζωντανών κυττάρων</i>	159
Σχήμα 6.16	<i>Βασική αρχή συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με laser</i>	161

Σχήμα 6.17	<i>Ανίχνευση δύο διαφορετικών σημάτων φθορισμού ταυτόχρονα από το ίδιο δείγμα με τη χρήση του συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού σάρωσης με laser.</i>	162
Σχήμα 6.18	<i>(α) διοδικό laser, (β) το laser που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα</i>	164
Σχήμα 6.19	<i>Διάγραμμα βαθμονόμησης του διοδικού laser Ceralas PDT 652 nm</i>	166
Σχήμα 6.20	<i>Καμπύλη βαθμονόμησης βιοχημικού ελέγχου βιωσιμότητας MTT</i>	178
Σχήμα 6.21	<i>Η μη φθορίζουσα H₂DCFDA η οποία όταν οξειδώνεται από ελεύθερες ρίζες ή δραστικά οξυγονούχα είδη μετατρέπεται στην DCF η οποία φθορίζει ισχυρά.</i>	179
Σχήμα 6.22	<i>Ο ιχνηθέτης φθορισμού 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA)</i>	179
Σχήμα 6.23	<i>Φάσμα απορρόφησης και εκπομπής φθορισμού του ιχνηθέτη CM-H₂DCFDA σε pH=9.0</i>	180
Σχήμα 6.24	<i>Η μη-φθορίζουσα monochlorobimane η οποία όταν ενώνεται με θειόλες, κυρίως τη γλουταθειόνη, GSH, φθορίζει ισχυρά</i>	183
Σχήμα 6.25	<i>Φάσμα απορρόφησης και εκπομπής φθορισμού του ιχνηθέτη monochlorobimane συζευγμένου σε γλουταθειόνη σε pH=8.0</i>	185
Σχήμα 7.1	<i>Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων ελεύθερης m-THPC δυο διαφορετικών συγκεντρώσεων σε αιθανόλη.</i>	194
Σχήμα 7.2	<i>Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων ελεύθερης m-THPC, 5 x 10⁻⁶ M, σε DMSO, αιθανόλη και πλήρες θρεπτικό μέσο</i>	195
Σχήμα 7.3	<i>Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων εγκλεισμένης σε PEG-επικαλυμμένα - λιποσώματα m-THPC σε αιθανόλη.</i>	195
Σχήμα 7.4	<i>Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων εγκλεισμένης σε PEG-επικαλυμμένα - λιποσώματα m-THPC, 5 x 10⁻⁶ M, σε DMSO, αιθανόλη και πλήρες θρεπτικό μέσο</i>	196
Σχήμα 7.5	<i>Φάσματα απορρόφησης ελεύθερης και εγκλεισμένης σε PEG-επικαλυμμένα -λιποσώματα m-THPC (5x10⁻⁶ M) σε πλήρες θρεπτικό μέσο.</i>	198
Σχήμα 7.6	<i>Φάσματα έντασης φθορισμού ελεύθερης m-THPC με διέγερση στα 420 nm.</i>	199
Σχήμα 7.7	<i>Φάσματα έντασης φθορισμού εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC με διέγερση στα 420 nm.</i>	199
Σχήμα 7.8	<i>Διάγραμμα συγκέντρωσης - έντασης φθορισμού ελεύθερης m-THPC στα 650 nm με διέγερση στα 420 nm.</i>	200

Σχήμα 7.9	Διάγραμμα συγκέντρωσης - έντασης φθορισμού εγκλεισμένης λιποσωμακικής <i>m</i> -THPC στα 650 nm με διέγερση στα 420 nm.	200
Σχήμα 7.10	Διάγραμμα συγκέντρωσης <i>m</i> -THPC – βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων, μετά από 24h επώασης με την εγκλεισμένη λιποσωμακική <i>m</i> -THPC.	202
Σχήμα 7.11	Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επώαστηκαν με 0.22μM ελεύθερης <i>m</i> -THPC, για διαφορετικούς χρόνους επώασης με διέγερση στα 420nm.	205
Σχήμα 7.12	Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επώαστηκαν με 1.8μM ελεύθερης <i>m</i> -THPC, για διαφορετικούς χρόνους επώασης με διέγερση στα 420nm.	205
Σχήμα 7.13	Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επώαστηκαν με 0.22μM εγκλεισμένης λιποσωμακικής <i>m</i> -THPC, για διαφορετικούς χρόνους επώασης με διέγερση στα 420nm.	206
Σχήμα 7.14	Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επώαστηκαν με 1.8μM εγκλεισμένης λιποσωμακικής <i>m</i> -THPC, για διαφορετικούς χρόνους επώασης με διέγερση στα 420nm.	207
Σχήμα 7.15	Ενδοκυττάρια συγκέντρωση <i>m</i> -THPC σε κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με 0.22μM ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωμακικής <i>m</i> -THPC για 3, 24 και 48h.	208
Σχήμα 7.16	Ενδοκυττάρια συγκέντρωση <i>m</i> -THPC σε κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με 1.8μM ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωμακικής <i>m</i> -THPC για 3, 24 και 48h.	208
Σχήμα 7.17	Διάγραμμα διάρκειας ακτινοβολήσης - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων όταν η ακτινοβολήση τέθηκε στα 3 mW /cm ²	213
Σχήμα 7.18	Διάγραμμα διάρκειας ακτινοβολήσης - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων όταν η ακτινοβολήση τέθηκε στα 6 mW /cm ²	214
Σχήμα 7.19	Διάγραμμα δόσης ενέργειας - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων τα οποία επώαστηκαν για 24h με 0.22μM ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωμακικής <i>m</i> -THPC.	215
Σχήμα 7.20	Διάγραμμα δόσης ενέργειας - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων τα οποία επώαστηκαν για 24h με 1.8μM ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωμακικής <i>m</i> -THPC.	216
Σχήμα 7.21	Διάγραμμα συγκέντρωσης BSO - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων.	223
Σχήμα 7.22	Διάγραμμα συγκέντρωσης BSO - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων μετά από ακτινοβολήση με το φως διέγερση με δόση ενέργειας 180 mJ /cm ² .	224

Σχήμα 7.23	Διάγραμμα συγκέντρωσης BSO - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων μετά από φωτοδυναμική με 0.22 μM <i>m</i> -THPC και δόση ενέργειας 180 mJ/cm^2 .	225
Σχήμα 7.24	Καμπύλη αναφοράς γλουταθειόνης – έντασης φθορισμού	227
Σχήμα 7.25	Διάγραμμα συγκέντρωσης BSO – ενδοκυττάριας γλουταθειόνης	228
Σχήμα 7.26	Διάγραμμα συγκέντρωσης φυσικού αντιοξειδωτικού μείγματος από εκχύλισμα φλοιού πεύκου <i>P. halepensis</i> – βιωσιμότητας κερατινοκυττάρων μετά από έκθεσή τους σε UV ακτινοβολία, 5 mW/cm^2 , 3 s.	229
Σχήμα 7.27	Διάγραμμα συγκέντρωσης φυσικού αντιοξειδωτικού μείγματος από εκχύλισμα φλοιού πεύκου <i>P. halepensis</i> – βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων μετά από 1h επώασής τους με αυτό. * $P < 0.05$, (t-test)	231
Σχήμα 7.28	Διάγραμμα συγκέντρωσης φυσικού αντιοξειδωτικού μείγματος από εκχύλισμα φλοιού πεύκου <i>P. halepensis</i> – βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων μετά από 24h επώασής τους με αυτό. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (t-test)	232
Σχήμα 7.29	Διάγραμμα συγκέντρωσης φυσικού μείγματος πολυφαινολών από φλοιό πεύκου <i>P. halepensis</i> – βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων μετά από 1h επώασης με αυτό και φωτοδυναμική με 0.22 μM <i>m</i> -THPC, 180 mJ/cm^2 .	234
Σχήμα 7.30	Διάγραμμα συγκέντρωσης φυσικού μείγματος πολυφαινολών από φλοιό πεύκου <i>P. halepensis</i> – βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων μετά φωτοδυναμική και 24h επώασης με το εκχύλισμα.	235
Σχήμα 7.31	Διάγραμμα παραγωγής ελευθέρων ριζών στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα LNCaP κυττάρων μετά από φωτοδυναμική, σε σχέση με τις ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά οξυγονούχα είδη της ομάδας ελέγχου.	239
Σχήμα 7.32	Διάγραμμα παραγωγής ελευθέρων ριζών στο κυτταρόπλασμα LNCaP κυττάρων μετά από χορήγηση BSO για 24h.	242
Σχήμα 7.33	Διάγραμμα παραγωγής ελευθέρων ριζών στο κυτταρόπλασμα LNCaP κυττάρων μετά από φωτοδυναμική σε συνδυασμό με χορήγηση BSO για 24h	245
Σχήμα 7.34	Διάγραμμα παραγωγής ελευθέρων ριζών στο κυτταρόπλασμα LNCaP κυττάρων μετά από 1h χορήγηση 25, 30 και 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ <i>P.halepensis</i> .	248
Σχήμα 7.35	Διάγραμμα παραγωγής ελευθέρων ριζών στο κυτταρόπλασμα LNCaP κυττάρων μετά από 1h και 24h επώασης με 25 και 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ <i>P.halepensis</i> . Το φαινόμενο στον πυρήνα ακολουθεί ακριβώς την συμπεριφορά που καταγράφεται στο κυτταρόπλασμα	249
Σχήμα 7.36	Διάγραμμα παραγωγής ελευθέρων ριζών στο κυτταρόπλασμα LNCaP κυττάρων μετά από 1h επώασης με 0, 30, 35 και 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ <i>P.halepensis</i> σε	253

συνδυασμό με φωτοδυναμική με 0.22 μM *m*-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 nm, 3 mW/cm² για 60 s.

Σχήμα 8.1	<i>Εκατοστιαία μεταβολή του μεγέθους του όγκου ως προς το χρόνο μετά την Ενδοϊστική Φωτοδυναμική Θεραπεία με ενέργεια ακτινοβολήσης 10J.</i>	256
Σχήμα 8.2	<i>Εκατοστιαία μεταβολή του μεγέθους του όγκου ως προς το χρόνο μετά την Ενδοϊστική Φωτοδυναμική Θεραπεία με ενέργεια ακτινοβολήσης 15J.</i>	258
Σχήμα 8.3	<i>Εκατοστιαία μεταβολή του μεγέθους του όγκου ως προς το χρόνο μετά την Ενδοϊστική Φωτοδυναμική Θεραπεία με ενέργεια ακτινοβολήσης 30J.</i>	260
Σχήμα 8.4	<i>Εκατοστιαία μεταβολή του μεγέθους του όγκου ως προς το χρόνο μετά τη χορήγηση δυο διαφορετικών συγκεντρώσεων φυσικού μείγματος πολυφαινολών, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και 1mg/ml.</i>	267
Σχήμα 8.5	<i>Εκατοστιαία μεταβολή του μεγέθους του όγκου στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη ως προς το χρόνο μετά τη χορήγηση 1mg/ml φυσικού μείγματος πολυφαινολών, καθώς και του συνδυασμού αυτού με την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία.</i>	268
Σχήμα 8.6	<i>Εκατοστιαία μεταβολή του μεγέθους του όγκου στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη ως προς το χρόνο μετά τη χορήγηση 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ φυσικού μείγματος πολυφαινολών, καθώς και του συνδυασμού αυτού με την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία.</i>	269
Σχήμα 8.7	<i>Εκατοστιαία μεταβολή του μεγέθους του όγκου στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη ως προς το χρόνο μετά την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία και τη συνδυασμένη χορήγηση φυσικού μείγματος πολυφαινολών.</i>	271
Σχήμα 9.1:	<i>Ενδοκυττάρια η οξειδοαναγωγική ισορροπία διατηρείται καθώς οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί εξισορροπούν τη δράση των προ-οξειδωτικών..</i>	289
Σχήμα 9.2	<i>Αντιοξειδωτική δράση γλουταθειόνης.</i>	290
Σχήμα 9.3	<i>Μηχανισμός σύνθεσης της γλουταθειόνης</i>	291
Σχήμα 9.4	<i>Μηχανισμός συνδυασμένης δράσης της φωτοδυναμικής θεραπείας με τον αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης BSO</i>	297
Σχήμα 9.5	<i>Μηχανισμός συνεργειακής δράσης φωτοδυναμικής θεραπείας και φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχόμενο από φλοιό <i>P.halperensis</i></i>	310

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1:	<i>Φωτογραφίες του F.Meyer-Betz πριν (α) και μετά (β) τη χορήγηση στον εαυτό του, από τον ίδιο, 200mg αιματοπορφυρίνης. Η χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή είχε ως αποτέλεσμα εκτεταμένη φωτοευαισθησία στο δέρμα του έως και 2 μήνες μετά τη χορήγηση</i>	2
Εικόνα 6.1	<i>Πρωτογενής καλλιέργεια κερατινοκυττάρων. Η εικόνα ελήφθη με αντικειμενικό φακό 40X</i>	170
Εικόνα 6.2	<i>Καλλιέργεια LNCaP κυττάρων. (α) αντικειμενικός 10X. (β) 40X</i>	172
Εικόνα 6.3	<i>Ανάπτυξη του καρκινικού όγκου του προστάτη σε μετά την εμφύτευση των καρκινικών κυττάρων</i>	174
Εικόνα 7.1	<i>Ενδοκυττάρια χωρική κατανομή m-THPC σε κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με 0.22μM ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC 24h. (α) πρωτότυπες εικόνες συστήματος συνεστιακής μικροσκοπίας (β) οι ίδιες εικόνες μετά από επεξεργασία</i>	210
Εικόνα 7.2	<i>Ενδοκυττάρια χωρική κατανομή m-THPC σε κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με 1.8μM ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC 24h. (α) πρωτότυπες εικόνες συστήματος συνεστιακής</i>	211

	<i>μικροσκοπίας (β) οι ίδιες εικόνες μετά από επεξεργασία</i>	
Εικόνα 7.3	<i>Φωτοδυναμικά επαγόμενες αλλαγές στη μορφολογία των LNCaP κυττάρων και στη συνοχή των αποικιών μετά από επώαση με 0,22μM ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC.(α) 180 mJ/cm² (β) 360 mJ/cm² (γ) 540 mJ/cm²</i>	218
Εικόνα 7.4	<i>Φωτοδυναμικά επαγόμενες αλλαγές στη μορφολογία των LNCaP κυττάρων και στη συνοχή των αποικιών μετά από επώαση με 1.8μM ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC.(α) 180 mJ/cm² (β) 360 mJ/cm² (γ) 540 mJ/cm²</i>	220
Εικόνα 7.5	<i>(α) Ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη σε LNCaP κύτταρα απουσία οιοδήποτε ερεθίσματος σε φυσιολογικές συνθήκες (κύτταρα ομάδας ελέγχου). (β) Ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη σε LNCaP κύτταρα μετά από φωτοδυναμική με 0.22 μM m-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 nm, 3 mW/cm² για 60 s. Ιχνηθέτης φθορισμού η CM-H₂DCFDA, 5 μM, διέγερση και συλλογή φθορισμού με τον κύβο FITC (διέγερση στα 488 nm και εκπομπή φθορισμού στα 512 nm). Στην πρώτη σειρά παραθέτονται οι αντίστοιχες εικόνες με προσπίπτοντα φωτισμό.</i>	237
Εικόνα 7.6	<i>Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων του οξειδωτικού στρες. (α) Ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη σε LNCaP κύτταρα απουσία οιοδήποτε ερεθίσματος σε φυσιολογικές συνθήκες (κύτταρα ομάδας ελέγχου). (β) Ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη σε LNCaP κύτταρα μετά από φωτοδυναμική.</i>	238
Εικόνα 7.7	<i>Ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη σε LNCaP κύτταρα (α) απουσία BSO. (β) (γ) και (δ) μετά από επώαση με 0.001mM, 0.01mM και 10 mM BSO αντίστοιχα για 24h.</i>	240
Εικόνα 7.8	<i>Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών μετά από επώαση με 0.001mM, 0.01mM και 10 mM BSO για 24h εικόνες (β), (γ) και (δ) αντίστοιχα. (α) απουσία BSO.</i>	241
Εικόνα 7.9	<i>Ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη σε LNCaP κύτταρα μετά από φωτοδυναμική με 0.22 μM m-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 nm, 3 mW/cm² για 60 s. (α) απουσία BSO. (β) (γ) και (δ) μετά από επώαση με 0.001mM, 0.01mM και 10 mM BSO αντίστοιχα για 24h.</i>	243
Εικόνα 7.10	<i>Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων της παραγωγής ελευθέρων</i>	244

ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών μετά από επώαση με 0.001mM, 0.01mM και 10 mM BSO για 24h εικόνες (β), (γ) και (δ) αντίστοιχα. (α) απουσία BSO και φωτοδυναμική με 0.22 μM m-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 nm, 3 mW/cm² για 60 s.

- Εικόνα 7.11** *Ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη σε LNCaP κύτταρα μετά από 1h χορήγησης 25 μg/ml (β), 30 μg/ml (γ) και 50 μg/ml (δ) φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχόμενου από εκχύλισμα φλοιού του πεύκου P.halepensis. (α) ομάδα ελέγχου.* 246
- Εικόνα 7.12** *Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών μετά από 1h χορήγηση 25 μg/ml (β), 30 μg/ml (γ) και 50 μg/ml (δ) φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχόμενου από εκχύλισμα φλοιού του πεύκου P.halepensis. (α) ομάδα ελέγχου* 247
- Εικόνα 7.13** *Παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών μετά από 1h και 24h χορήγηση 25 μg/ml (α) και (γ) αντίστοιχα, και 50 μg/ml (β) και (δ) αντίστοιχα φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχόμενου από εκχύλισμα φλοιού του πεύκου P.halepensis.* 249
- Εικόνα 7.14** *Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών μετά από 1h και 24h χορήγηση 25 μg/ml (α) και (γ) αντίστοιχα, και 50 μg/ml (β) και (δ) αντίστοιχα φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχόμενου από εκχύλισμα φλοιού του πεύκου P.halepensis.* 250
- Εικόνα 7.15** *Ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη σε LNCaP κύτταρα μετά από φωτοδυναμική με 0.22 μM m-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 nm, 3 mW/cm² για 60 s. (α) μόνο φωτοδυναμική. (β) (γ) και (δ) μετά από επώαση για 1h με 30, 35 και 50 μg/ml P.halepensis αντίστοιχα.* 251
- Εικόνα 7.16** *Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών μετά από φωτοδυναμική με 0.22 μM m-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 nm, 3 mW/cm² για 60 s. (α) μόνο φωτοδυναμική. (β) (γ) και (δ) μετά από επώαση για 1h με 30, 35 και 50 μg/ml P.halepensis αντίστοιχα.* 252
- Εικόνα 7.17** *Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών μετά από φωτοδυναμική με 0.22 μM m-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 nm, 3 mW/cm² για 60 s. (α) και (γ) μετά από επώαση για 1h* 254

και 24h με 30 $\mu\text{g/ml}$ *P.halepensis* αντίστοιχα. (β) και (δ) μετά από επώαση για 1h και 24h με 35 $\mu\text{g/ml}$ *P.halepensis* αντίστοιχα.

Εικόνα 8.1	<i>Ενδεικτικές εικόνες των μεταβολών στον όγκο μυός σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά από ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με ενέργεια ακτινοβολήσης 10J.</i>	257
Εικόνα 8.2	<i>Ενδεικτικές εικόνες των μεταβολών στον όγκο μυός σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά από ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με ενέργεια ακτινοβολήσης 15J.</i>	259
Εικόνα 8.3	<i>Ενδεικτικές εικόνες των μεταβολών στον όγκο μυός σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά από ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με ενέργεια ακτινοβολήσης 30J.</i>	261
Εικόνα 8.4	<i>Ενδεικτικές εικόνες αντιπροσωπευτικές της εξέλιξης της φωτοευαισθησίας στην ουρά μυός μετά τη χορήγηση φωτοευαισθητοποιητή. Η φωτοευαισθησία παρέμενε έως και δυο μήνες μετά τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή.</i>	263
Εικόνα 8.5	<i>Ενδεικτικές εικόνες αντιπροσωπευτικές της εξέλιξης της φωτοευαισθησίας στην ουρά μυός μετά τη χορήγηση φωτοευαισθητοποιητή παρουσία μείγματος πολυφαινολών φλοιού <i>P.halepensis</i>. Ούτε οίδημα εντοπίστηκε, ούτε ερύθημα και για τις δυο συγκεντρώσεις εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν.</i>	272
Εικόνα 9.1	<i>Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών (α) απουσία φωτοδυναμικής και BSO. (β) μετά από επώαση με 0.001mM BSO για 24h (γ) μετά από φωτοδυναμική με 0.22 μM m-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 nm, 3 mW / cm² για 60 s. (δ) μετά από συνδυασμό επώασης με 0.001mM BSO για 24h και φωτοδυναμικής με 0.22 μM m-THPC (επώαση 24h) και δόση ενέργειας 180 mJ / cm²</i>	296
Εικόνα 9.2	<i>Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών (α) απουσία φωτοδυναμικής και BSO. (β) μετά από επώαση με 10 mM BSO για 24h (γ) μετά από φωτοδυναμική με 0.22 μM m-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 nm, 3 mW / cm² για 60 s. (δ) μετά από συνδυασμό επώασης με 10 mM BSO για 24h και φωτοδυναμικής με 0.22 μM m-THPC (επώαση 24h) και δόση ενέργειας 180 mJ / cm²</i>	298

Περίληψη

Οι αλληλεπιδράσεις του φωτός με βιολογικούς ιστούς, η κατανόηση των μηχανισμών που τις διέπουν και η δυνατότητα αξιοποίησης αυτών για διαγνωστικούς ή και θεραπευτικούς σκοπούς απασχολεί την ανθρωπότητα σχεδόν από την απαρχή της ιστορίας. Τα τελευταία χρόνια συστηματική έρευνα διεξάγεται στην κατεύθυνση τόσο της διάγνωσης, αναπτύσσοντας τεχνολογίες «οπτικής βιοψίας», όσον και στην κατεύθυνση της θεραπείας νεοπλασιών και μη καρκινικών αλλοιώσεων. Κυρίαρχο ρόλο στις μεθοδολογίες θεραπείας, μέσω της αξιοποίησης των δυνατοτήτων του φωτός, κατέχει η φωτοδυναμική θεραπεία.

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μια ελάχιστα επεμβατική, εξαιρετικά επιλεκτική μεθοδολογία αντιμετώπισης καρκινικών και μη καρκινικών αλλοιώσεων. Βασίζεται στη συνδυασμένη δράση τριών στοιχείων, του φωτός, του φωτοευαισθητοποιητή και του οξυγόνου. Μεμονωμένο, κάθε ένα από τα στοιχεία αυτά, στις δόσεις στις οποίες χρησιμοποιείται στη φωτοδυναμική, δεν μπορεί να προκαλέσει καμία απολύτως φθορά στον ιστό και η καταστροφή του ιστού βασίζεται στη συνδυασμένη δράση τους. Μέχρι τώρα έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε επιφανειακούς δερματικούς καρκινικούς όγκους. Το ενδιαφέρον πλέον της επιστημονικής κοινότητας στρέφεται στην επέκταση της εφαρμογής της σε καρκινικούς όγκους σε εσωτερικά όργανα καθώς και στην ανάπτυξη μεθοδολογιών βελτιστοποίησης της δράσης της και του θεραπευτικού αποτελέσματος.

Σκοπό της παρούσας διατριβής απετέλεσε η διερεύνηση των μηχανισμών δράσης φωτός και φωτοευαίσθητων ουσιών με μοντέλα νεοπλασιών, όπως αυτοί τροποποιούνται με την εισαγωγή μεθόδων νανοτεχνολογίας και αξιοποίηση της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Εφαρμογή της έρευνας απετέλεσε η βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής δράσης σε καρκινικούς όγκους τριών διαστάσεων εν τω βάθει, με παράλληλη άρση της παραμένουσας φωτοευαισθησίας, της σοβαρότερης παρενέργειας της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Συγκεκριμένα αξιοποιήθηκε η πλέον πρόσφατη τεχνολογική εξέλιξη, στην τομή νανοτεχνολογίας - φωτοδυναμικής, ο εγκλεισμός φωτοευαισθητοποιητών σε νανοσωματίδια. Η νανοτεχνολογία προσφέρει την απαραίτητη τεχνολογία για τον εγκλεισμό συμβατικών φωτοευαισθητοποιητών σε νανοσωματιδιακά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, προκειμένου να βελτιωθούν οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες (μεγαλύτερος χρόνος ζωής, μεγαλύτερη συγκέντρωση στον καρκινικό όγκο) αλλά και η φωτοδυναμική τους δράση. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε ο αποδοτικότερος φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς, η 5,10,15,20-τέτρα(3-υδροξυφαινυλ)χλωρίνη (5,10,15,20- tetrakis(3-hydroxy phenyl) chlorin, m-THPC ή Temoporfin), εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα, ένα από τα επικρατέστερα νανοσωματιδιακά συστήματα μεταφοράς.

Διερευνήθηκαν επίσης οι μηχανισμοί τροποποίησης της συγκέντρωσης των ενδοκυττάριαρων ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών, σε μοντέλα νεοπλασιών, τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσον και σε πειραματόζωα, με σκοπό την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών και την καταστολή της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας ώστε να καμφθεί ο ανταγωνισμός που δέχεται η φωτοδυναμική και να ενισχυθεί η δράση της. Η φωτοδυναμική θεραπεία βασίζει τη δράση της στο επαγόμενο, μετά τη διέγερση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή, οξειδωτικό στρες και στους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου που αυτό ενεργοποιεί. Οι ενδοκυττάρια αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί ανταγωνίζονται την αύξηση των ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών προκειμένου να διασφαλίζουν την κυτταρική επιβίωση. Για να επέλθει συνεπώς ο κυτταρικός θάνατος θα πρέπει το εγγενές οξειδωτικό στρες αλλά και το επαγόμενο από τη θεραπεία οξειδωτικό στρες να ξεπεράσει το κατώφλι δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών.

Επιπροσθέτως, διερευνήθηκε η δυνατότητα άρσης της παραμένουσας φωτοευαισθησίας. Η σοβαρότατη αυτή παρενέργεια της φωτοδυναμικής οφείλεται σε μόρια του φωτοευαισθητοποιητή τα οποία συγκρατούνται από υγιείς ιστούς στα εξωτερικά όργανα του σώματος. Κατόπιν διέγερσής τους από το φυσικό φως προκαλούν

κυτταροτοξικές αντιδράσεις στον υγιή ιστό. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες έχουν την ικανότητα, ανάλογα με τη συγκέντρωση χορήγησής τους, να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη ή να δρουν προ-οξειδωτικά. Η συμπεριφορά τους επιπλέον διαφοροποιείται ανάλογα με το είδος του ιστού, υγιούς ή καρκινικού, στον οποίο επιδρούν. Φυσικό μείγμα δευτερογενών μεταβολιτών, με πλούσιες αντιοξειδωτικές ιδιότητες, επιλέχθηκε να μελετηθεί ως προς την ικανότητά του να δεσμεύσει τις ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά οξυγονούχα είδη στον υγιή πλέον ιστό, αίροντας με τον τρόπο αυτό την παραμένουσα φωτοευαισθησία.

Τα αποτελέσματα των ερευνών μελετήθηκαν και αναλύθηκαν διεξοδικά. Παράμετροι, οι οποίες συμβάλλουν στη φωτοδυναμική δράση ή επιδρούν στην ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία, όπως καθορίστηκαν βάσει των αποτελεσμάτων των ερευνών και των μετρήσεων, υιοθετήθηκαν για τη βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Προκειμένου να επεκταθεί η εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας σε μη επιφανειακούς καρκινικούς όγκους σε εσωτερικά όργανα του σώματος τέθηκε ως στόχος η ανάπτυξη συστήματος ενδοϊστικής φωτοδυναμικής ακτινοβολήσης. Με την τεχνική αυτή το φως για τη διέγερση του φωτοευαισθητοποιητή μπορεί να καθοδηγηθεί ακριβώς μέσα στον καρκινικό όγκο. Με τον τρόπο αυτό ακτινοβολείται μόνο ο καρκινικός όγκος και όχι οι παρακείμενοι υγείς ιστοί, διατηρώντας ακέραια όχι μόνο την αρχιτεκτονική τους αλλά και τις λειτουργίες του οργάνου. Ως βιολογικό μοντέλο για την ανάπτυξη διάταξης ενδοϊστικής ακτινοβολήσης αλλά και για τη μελέτη των μηχανισμών ενίσχυσης της φωτοδυναμικής δράσης επιλέχθηκε ο καρκίνος του προστάτη, καθώς συγκεντρώνει τα κατάλληλα χαρακτηριστικά για την εφαρμογή της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας.

Η παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε σε τέσσερις άξονες:

Αρχικά ανεπτύχθησαν μοντέλα καρκίνου του προστάτη τόσο σε επίπεδο κυττάρου (in vitro) όσο και σε επίπεδο μυός (in vivo). Τα μοντέλα αυτά είναι απαραίτητα για τη μελέτη των μηχανισμών δράσης αλλά και για την ανάπτυξη μεθοδολογιών θεραπείας της νόσου. Τα μοντέλα σε επίπεδο κυττάρου επιτρέπουν τη μελέτη των επιδράσεων διαφόρων ερεθισμάτων, ακόμα και σε μοριακό επίπεδο, διευκολύνοντας την εις βάθος κατανόηση των μηχανισμών δράσης διαφόρων παραγόντων. Τα μοντέλα πειραματοζώων είναι ιδιαίτερος σημαντικά καθώς εξασφαλίζουν την ανάπτυξη καρκινικών όγκων οι οποίοι φαινοτυπικά παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες με τους καρκινικούς όγκους που απαντώνται στον άνθρωπο και επιτρέπουν την ανάπτυξη θεραπευτικών σχημάτων.

Ακολούθως ανεπτύχθησαν μεθοδολογίες και μελετήθηκαν οι φωτοφυσικές ιδιότητες και η φωτοδυναμική δράση της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα

λιποσώματα m-THPC οι οποίες συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες της ελεύθερης m-THPC. Ο εγκλεισμός φωτοευαισθητοποιητών σε νανοσωματίδια είναι πρόσφατη εξέλιξη στην κατεύθυνση της βελτιστοποίησης των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των μορίων αυτών. Διαπιστώθηκε η υπεροχή της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC έναντι της ελεύθερης τόσο ως προς τις φωτοφυσικές ιδιότητες όσο και ως προς τη φωτοδυναμική δράση, γεγονός που επιτρέπει τη χορήγηση μικρότερων ποσοτήτων φωτοευαισθητοποιητή για την πρόκληση κυτταρικού θανάτου.

Για την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη αναπτύχθηκε σύστημα ενδοϊστικής ακτινοβόλησης. Μέσω του συστήματος αυτού γινόταν η μεταφορά του φωτός διέγερσης μέσα στον καρκινικό όγκο με τρόπο τέτοιο ώστε να καλύπτεται όλη η έκταση του καρκινικού όγκου, χωρίς να εκτείνεται εκτός των ορίων αυτού. Το σύστημα αποτελείτο από διοδικό laser στα 652 nm με ισχύ εξόδου έως 2 W στο οποίο συνδεόταν οπτική ίνα με γυμνό ακροδέκτη για τη μεταφορά του φωτός μέσα στον καρκινικό όγκο. Παράλληλα, μέσω απεικονιστικού συστήματος αποτελούμενου από CCD κάμερα με κατάλληλη διάταξη φωτισμού προσαρτημένων σε στερεοτακτική διάταξη καταγραφόταν η απόκριση των καρκινικών όγκων στη θεραπεία. Διαπιστώθηκε πως ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με την εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC μπορεί να θεραπεύσει πλήρως τον καρκινικό όγκο στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη. Η παρατήρηση αυτή, σε συνδυασμό με την υπεροχή της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC και σε επίπεδο κυττάρου, συνηγορούν στην επέκταση των μελετών ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας με την εγκλεισμένη λιποσωματική m-THPC σε κλινικό επίπεδο για τη θεραπεία καρκίνου του προστάτη.

Εν συνεχεία διερευνήθηκε η βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων της φωτοδυναμικής δράσης και η ταυτόχρονη άρση της παραμένουσας φωτοευαισθησίας, η οποία αποτελεί το σοβαρότερο πρόβλημα της φωτοδυναμικής θεραπείας. Ανεπτύχθησαν δυο προσεγγίσεις με στόχο κοινό, τη μεταβολή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας.

Η πρώτη προσέγγιση αφορούσε τη ρήξη της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας μέσω χορήγησης του αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης, L-buthionine sulfoximine (BSO). Μολονότι ο παράγοντας BSO χρησιμοποιείται για να κάψει την αντίσταση του οργανισμού στις αντικαρκινικές θεραπείες (π.χ. χημειοθεραπεία) και υπάρχουν δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν ότι πράγματι ενισχύει την αποτελεσματικότητα των θεραπειών, η δράση του σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά. Απουσιάζουν δε από τη βιβλιογραφία μελέτες της συνδυασμένης δράσης της φωτοδυναμικής με τον αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης στην περίπτωση

καρκίνου του προστάτη. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής διερευνήθηκε η πιθανότητα συνέργειας του αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης (BSO) με τη φωτοδυναμική θεραπεία σε επίπεδο μοντέλου κυττάρου καρκίνου του προστάτη. Ο παράγοντας BSO, ανάλογα με τη συγκέντρωση χορήγησης, έδρασε σε ορισμένες περιπτώσεις ανταγωνιστικά ως προς τη φωτοδυναμική, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις ενίσχυσε τη φωτοδυναμική δράση.

Η δεύτερη προσέγγιση, στην κατεύθυνση τροποποίησης της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, αφορούσε στη χορήγηση φυσικού μείγματος δευτερογενών μεταβολιτών με πλούσιες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Τα μείγματα αυτά σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις δρουν αντιοξειδωτικά, δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη. Σε μεγαλύτερες ωστόσο συγκεντρώσεις η δράση τους είναι προ-οξειδωτική. Ισχυρή αντιοξειδωτική / προ-οξειδωτική δράση παρουσιάζουν φυσικά μείγματα πολυφαινολών προερχόμενα από συστατικά φυτών. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής διερευνήθηκε και καθορίστηκε ότι μείγμα πολυφαινολών προερχόμενο από φλοιό πεύκου *P.halepensis* παρουσίαζε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και στη συνέχεια ήταν αυτό το οποίο ελέγχθηκε σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική. Στο μοντέλο κυττάρου καρκίνου του προστάτη το φυσικό μείγμα πολυφαινολών έδρασε σε συνέργεια με τη φωτοδυναμική, σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, ενισχύοντας τη δράση της. Σε συνδυασμό με την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη κατόρθωσε να διατηρήσει τη θεραπευτική δράση της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής αίροντας πλήρως την παραμένουσα φωτοευαισθησία.

Το ζήτημα της βελτίωσης των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των φωτοευαισθητοποιητών μέσω του εγκλεισμού τους σε νανοσωματίδια και η διερεύνηση του αν όντως ενισχύουν τη φωτοδυναμική δράση είναι από αυτά που προβληματίζουν εντονότερα την επιστημονική κοινότητα. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ανεδείχθη η υπεροχή της φωτοδυναμικής δράσης της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα *m-THPC* σε σύγκριση με την ελεύθερη *m-THPC*. Τα αποτελέσματα της έρευνας επεξεργάστηκαν τόσο θεωρητικά όσον και στατιστικά και έγινε συγκριτική αντιπαράθεση με αντίστοιχα δεδομένα της βιβλιογραφίας.

Η παρούσα διατριβή συνεισφέρει στη βελτιστοποίηση της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας καρκίνου του προστάτη εισάγοντας την τεχνολογία εγκλεισμένων σε νανοσωματίδια φωτοευαισθητοποιητών.

Από τα σοβαρότερα προβλήματα τα οποία η φωτοδυναμική θεραπεία καλείται να αντιπαλέψει επιτυχώς για να γίνει ευρύτερα αποδεκτή είναι η παραμένουσα φωτοευαισθησία. Έως τώρα δεν έχει διατυπωθεί επιτυχής μεθοδολογία αντιμετώπισης του

προβλήματος. Οι μελέτες στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ανέδειξαν πως φυσικό μείγμα πολυφαινολών διατήρησε τη δράση της φωτοδυναμικής αίροντας πλήρως την παραμένουσα φωτοευαισθησία. Επομένως, η παρούσα διατριβή συνεισφέρει στη βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής δράσης και στην άρση της παραμένουσας φωτοευαισθησίας μέσω της χορήγησης φυσικού μείγματος πολυφαινολών. Το αποτέλεσμα είναι διεθνώς πρωτότυπο καθώς δεν υπάρχει αναφορά άλλη στην οποία να παρουσιάζεται θεραπεία του καρκινικού όγκου με παράλληλη άρση της παραμένουσας φωτοευαισθησίας. Η άρση της παραμένουσας φωτοευαισθησίας μέσω της χορήγησης του φυσικού μείγματος πολυφαινολών θα συμβάλλει σημαντικά στην ευρύτερη αποδοχή της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Παρέχει, τέλος, νέα δεδομένα στην κατανόηση των μηχανισμών δράσης παραγόντων που τροποποιούν την ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής είναι διεθνώς πρωτότυπα ενώ πέρα από τη βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής μπορούν να αξιοποιηθούν και σε άλλες αντικαρκινικές θεραπείες που δρουν μέσω οξειδωτικού στρες.

Abstract

Light tissue interactions have been puzzling human kind almost from the very beginning of history. Enormous efforts have been made for developing methodologies, utilizing the advances that light offers, both for diagnostic as well as therapeutic purposes. Among the latter, photodynamic therapy holds the most promising qualities.

Photodynamic therapy (PDT) is a minimally invasive, extremely selective modality for treatment of cancerous and non-cancerous diseases. PDT consists of three essential elements, light, photosensitizer (PS), and oxygen, each one individually is non-toxic. PDT involves administration of a PS followed by irradiation at a specific wavelength, corresponding to the PS's absorption maximum. In the presence of oxygen a series of photochemical reactions are evoked leading to the destruction of the target malignant tissue through direct tumor cell death, damage to the microvasculature, or induction of a local inflammatory reaction. PDT has successfully been used for the treatment of superficial skin tumors. Recently research focuses in the amplification of PDT in solid tumors in internal organs and in the development of methodologies that would enhance the photodynamic efficacy and maximize the therapeutic outcome.

The aim of the present thesis was to investigate the mechanisms that govern photodynamic interactions with cancer models (both in vitro and in vivo) and their modulation through adaptation of nanotechnological methods and shifting of intracellular

redox equilibrium. Implementation of research evolved the optimization of PDT efficacy on solid tumors in internal organs with parallel total elimination of prolonged photosensitivity, the most severe side effect of PDT.

More specifically, recent advances in nanotechnology were incorporated for drug encapsulation. Nanotechnology offers the necessary methodology for encapsulation of common PSs in nanocarrier drug systems in order to further improve their pharmacokinetic properties and photodynamic action. In the present thesis the most effective 2nd generation PS, 5,10,15,20-tetrakis(3-hydroxy phenyl) chlorin, m-THPC or Temoporfin encapsulated in a nanocarrier system, the stereochemically stabilized liposomes (PEGylated liposomes) and was studied for its photophysical characteristics and photodynamic properties.

The mechanisms of shifting the intracellular redox equilibrium in the pro-oxidant, through the increase of the intracellular reactive oxygen species (ROS), and the suppression of the intracellular antioxidant defense system in order to bend the resistance in photodynamic action, were also studied in cancer models both *in vitro* and *in vivo*. PDT action is based on the oxidative stress that is evoked upon the photosensitizer excitation and the consequent activation of cell death mechanisms. Intracellular antioxidant defense systems antagonize the increase in ROS levels in order to preserve cellular integrity and viability. Cell death is inevitable only when the intrinsic oxidative stress and the PDT induced oxidative stress overcome the intracellular antioxidant defense system.

Moreover the potentiality of eliminating severe prolonged photosensitivity was also studied. This severe PDT side effect holds its origin in PS molecules that are preserved in the skin and are activated by natural light resulting in photodamage of the healthy tissue. Antioxidant compounds, according to their dose, act engaging ROS or they act as pro-oxidants. Their behavior is also governed by the tissue type, healthy or cancerous. A natural mixture of secondary metabolites, rich in antioxidant properties, was chosen to be studied for its potential to deactivate ROS protecting healthy tissue from photosensitivity.

Results from the above mentioned research were thoroughly studied, analyzed and turned into advantage of PDT efficacy optimization.

Furthermore, an interstitial photodynamic therapy system was developed in order to treat solid (non-superficial) tumors in internal organs. Light for PS activation was delivered through optical fibers right inside the tumor. This technique reassured that only the PS molecules inside the tumor were excited leaving the surrounding healthy tissue unaffected, preserving both its structure and the organ's usual functionality. Prostate

cancer was chosen as a deep seated tumor model, to test the interstitial photodynamic therapy system and further improve the photodynamic therapy efficacy.

The present thesis developed in four axes:

Firstly, prostate cancer in vitro and in vivo models were developed. These models preserve phenotypic similarities with human prostate cancer, are essential in the development of therapeutic methodologies and in the study of their mechanisms of action.

Hereupon methodologies have been developed to study the photophysical properties and the photodynamic efficiency of the PEGylated liposomal formulated of m-THPC. Results were compared with the corresponding from m-THPC. PS encapsulation in nanocarriers is a recent development in the direction of their pharmacokinetic properties optimization. The superiority of the PEGylated liposomal m-THPC was raised both on the photophysical properties and the photodynamic activity, implying that less PS dose was needed to cause cells death.

For the interstitial photodynamic therapy in the prostate cancer animal model a system for interstitial illumination was developed. Light for the activation of the PS was delivered through that system inside the tumor boundaries. The system composed of a 652 nm diode laser with adjustable output power up to 2 W. A bare tip optical fiber was connected to the laser system and thus light was delivered into the tumor. By using a digital imaging system, consisting of a CCD camera, stereotactic devices and appropriate software, treatment outcome was monitored. IPDT with the PEGylated liposomal m-THPC succeeded in total elimination of the tumor, in the prostate cancer animal model. Results gave evidence that IPDT with the PEGylated liposomal m-THPC could be amplified in clinical studies for the treatment of prostate cancer.

Research regarding the improvement of photodynamic efficacy with concomitant removable of photosensitivity followed. Two methodologies were developed in this direction, with common aim, the alteration of intracellular redox potential in favor of PDT.

Firstly, intracellular antioxidant defense system was suppressed utilizing the inhibitor of glutathione synthesis L-buthionine sulfoximine (BSO). The combined action of BSO with PDT has not been thoroughly studied, although it has been extensively used to moderate the organism resistance in anticancer therapies. Till now there have been no results of other researchers concerning the combined effect of PDT-BSO in prostate cancer. In the present thesis the potential synergistic effect of BSO with PDT was studied in a prostate cancer model in vitro. The results have shown that the effect was depended on BSO dose.

Lower doses resulted in an antagonistic effect while higher doses improved the PDT efficacy, resulting in higher levels of cells death, providing evidence of synergy.

The second methodology, regarding manipulation of intracellular redox state, involved administration of an antioxidant agent, a mixture of secondary metabolites rich in polyphenolic compounds. Those mixtures, in relatively low doses act as antioxidants, detoxifying ROS while in relative high doses they act as pro-oxidants. In the present thesis a mixture of polyphenolic compounds from *P.halepensis* bark extract was studied for its potential synergy with PDT, both in vitro and in vivo. Results revealed strong evidence of synergy in the in vitro model of prostate cancer. IPDT with the mixture of polyphenolic compounds from *P.halepensis* bark extract in the animal model of prostate cancer preserved the therapeutic outcome of IPDT while totally eliminated photosensitivity.

The optimization of the pharmacokinetic properties of the PS, by their encapsulation in nanocarriers, as well as the exploration of whether this technique truly contributed to the enhancement of the photodynamic efficacy puzzles researchers. *In the present study, the superiority of the PEGylated liposomal m-THPC over m-THPC, regarding photodynamic efficacy, was proven.* The results of the abovementioned studies were processed theoretically and statistically, and compared with the results of relevant studies in the literature.

The present thesis contributes in the improvement of interstitial photodynamic therapy of prostate cancer by importing encapsulated in nanocarriers PS.

Among the severe side effects and defects that PDT has to overcome in order to be wider approved and used is prolonged photosensitivity. Up to now, there has never been proposed any methodology that could successfully treat this side effect. Research in the present thesis showed that a natural mixture of polyphenolic compounds preserved PDT efficacy while totally eliminated prolonged photosensitivity. *Therefore, the present research contributes in the improvement of the photodynamic efficacy and in the total elimination of prolonged photosensitivity through the administration of a mixture of polyphenolic compounds. This result is worldwide original as, up to now, there hasn't been any other report referring to both total elimination of cancer tumor and removal of photosensitivity.* The removal of prolonged photosensitivity through the administration of the mixture of natural polyphenolic compounds significantly contributes in the wider acceptance and utilization of PDT.

The results provide, finally, new insight towards understanding of the mechanisms by which agents modulate intracellular redox equilibrium. The results of the present thesis are

original and, besides improvement of the photodynamic therapy efficacy, they could be exploited to the improvement of other anticancer therapies, like chemotherapy, that act through oxidative stress mechanisms.

Κεφάλαιο I

Φωτοδυναμική Θεραπεία

1.1

Εισαγωγή

Οι θεραπευτικές ιδιότητες του φωτός είχαν ήδη ανακαλυφθεί στην αρχαιότητα^[1]. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι, Κινέζοι και Ινδοί χρησιμοποιούσαν το ηλιακό φως είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με ψωραλένια για τη θεραπεία ασθενειών του δέρματος (λεύκη και ψωρίαση αντίστοιχα)^[2, 3]. Οι αρχαίοι Έλληνες επίσης εκμεταλλεύονταν τις θεραπευτικές ιδιότητες του φωτός, όπου εξέθεταν όλο το σώμα στις ηλιακές ακτίνες και εισήγαγαν τον όρο ηλιοθεραπεία^[4].

Ενώ το φως ως μέσο θεραπείας χρησιμοποιείται αδιαλείπτως από την αρχαιότητα, μόλις στις αρχές του 20^{ου} αιώνα η θεραπευτική χρήση του φωτός έλαβε τη μορφή με την οποία αναγνωρίζεται στις μέρες μας. Σε αυτό συνέβαλαν δυο ανεξάρτητα μεταξύ τους γεγονότα τα οποία έλαβαν χώρα στις αρχές του 1900. Το 1903 το βραβείο Nobel απονεμήθηκε στον Finsen για την επιτυχημένη έρευνά του η οποία αφορούσε τη θεραπεία της ευλογιάς και της φυματίωσης με χρήση φωτός. Την ίδια περίπου περίοδο, στο Μόναχο, στην ερευνητική ομάδα του καθηγητή von Tarrpeiner ο φοιτητής ιατρικής Oscar Raab διέπραττε ένα εργαστηριακό σφάλμα. Κατά λάθος έριξε ισχυρό φως σε καλλιέργεια των μονοκύτταρων μικροοργανισμών *Paramecium* οι οποίοι επωάζονταν με τη χρωμοφόρα ουσία ακριδίνη. Παρατήρησε ότι τα πρωτόζωα καταστράφηκαν τελείως. Η ερευνητική ομάδα προσανατόλισε στη συνέχεια την έρευνά της προς την κατεύθυνση

αυτή, μελετώντας τη συνδυασμένη δράση του φωτός με εξωγενή χρωμοφόρα και ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν (1904) ότι για να υπάρξει η δράση αυτή ήταν απαραίτητο το οξυγόνο. Ο von Tarpeiner ήταν ο πρώτος που εισήγαγε τον όρο Φωτοδυναμική Δράση για να περιγράψει τα φαινόμενα της εξαρτωμένης από το οξυγόνο φωτοευαισθητοποίησης, όπως επίσης και τον όρο Φωτοδυναμική Θεραπεία, την οποία εφάρμοσε πειραματικά σε ασθενείς με καρκίνο του δέρματος^[1, 4, 5].

Το 1908 περιγράφηκαν οι ιδιότητες του φωτοευαισθητοποιητή αιματοπορφυρίνη, η βιολογική δράση του οποίου μελετήθηκε αργότερα. Ο Γερμανός επιστήμονας F.Meyer-Betz χορήγησε το 1913 στον εαυτό του 200mg αιματοπορφυρίνης και για τους επόμενους δυο μήνες ήταν ευαίσθητος στο φως. Η δράση της αιματοπορφυρίνης στο δέρμα του ιατρού αποτυπώθηκε σε φωτογραφίες της εποχής (Εικόνα 1.1):



(α)



(β)

Εικόνα 1.1: Φωτογραφίες του F.Meyer-Betz πριν (α) και μετά (β) τη χορήγηση στον εαυτό του, από τον ίδιο, 200mg αιματοπορφυρίνης. Η χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή είχε ως αποτέλεσμα εκτεταμένη φωτοευαισθησία στο δέρμα του έως και 2 μήνες μετά τη χορήγηση^[5].

Το 1924 ο Policard παρατήρησε ότι ο καρκινικός ιστός δίνει διαφορετικό φθορισμό από τον υγιή και για να βελτιώσει την αντίθεση χρησιμοποίησε ένα παράγωγο πορφυρίνης, ενώ το 1948 οι Figge και Weinland χρησιμοποίησαν διάφορες άλλες πορφυρίνες για να εντοπίσουν με μεγαλύτερη ακρίβεια τα όρια του καρκινικού όγκου^[6]. Μέχρι όμως τη δεκαετία του 1960, οπότε και ξεκίνησαν οι πρώτες συστηματικές δοκιμές, το πεδίο της φωτοδυναμική ήταν μάλλον σε λήθη. Οι Lipson και Schwartz, με τις ερευνητικές τους ομάδες, χρησιμοποίησαν αιματοπορφυρίνη και μείγματα ολιμερών πορφυρίνης αντίστοιχα για τη φωτοδυναμική θεραπεία καρκινικών όγκων. Χρειάστηκε

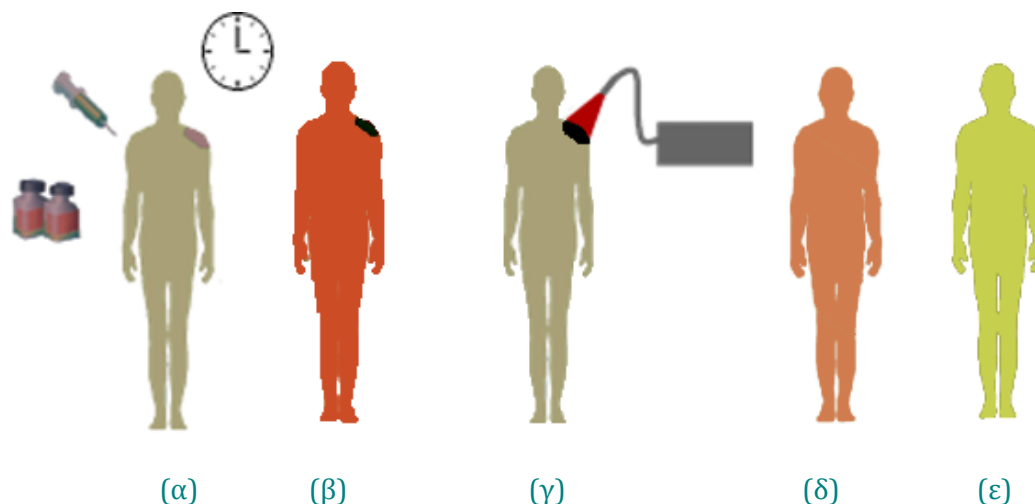
ωστόσο η επίμονη ερευνητική εργασία ενός ιατρού, του Dougherty, οποίος βελτίωσε τη σύνθεση του μείγματος αιματοπορφυρίνης (1978) και πειραματίστηκε εκτεταμένα στην εφαρμογή της φωτοδυναμικής. Ήταν αυτός ουσιαστικά που εισήγαγε τη φωτοδυναμική θεραπεία την κλινική πράξη τη δεκαετία του 1980 [4, 5, 6].

Η πρώτη επίσημη κρατική έγκριση δόθηκε το 1993 από την κυβέρνηση του Καναδά για τη φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνου στην ουροδόχο κύστη με τον φωτοευαισθητοποιητή Photofrin, παράγωγο πορφυρίνης^[4]. Τα τελευταία χρόνια συστηματική έρευνα γίνεται στο πεδίο της βελτιστοποίησης των ιδιοτήτων των φωτοευαισθητοποιητών καθώς και στην ανάπτυξη λειτουργικών και εύχρηστων πηγών φωτός.

1.2

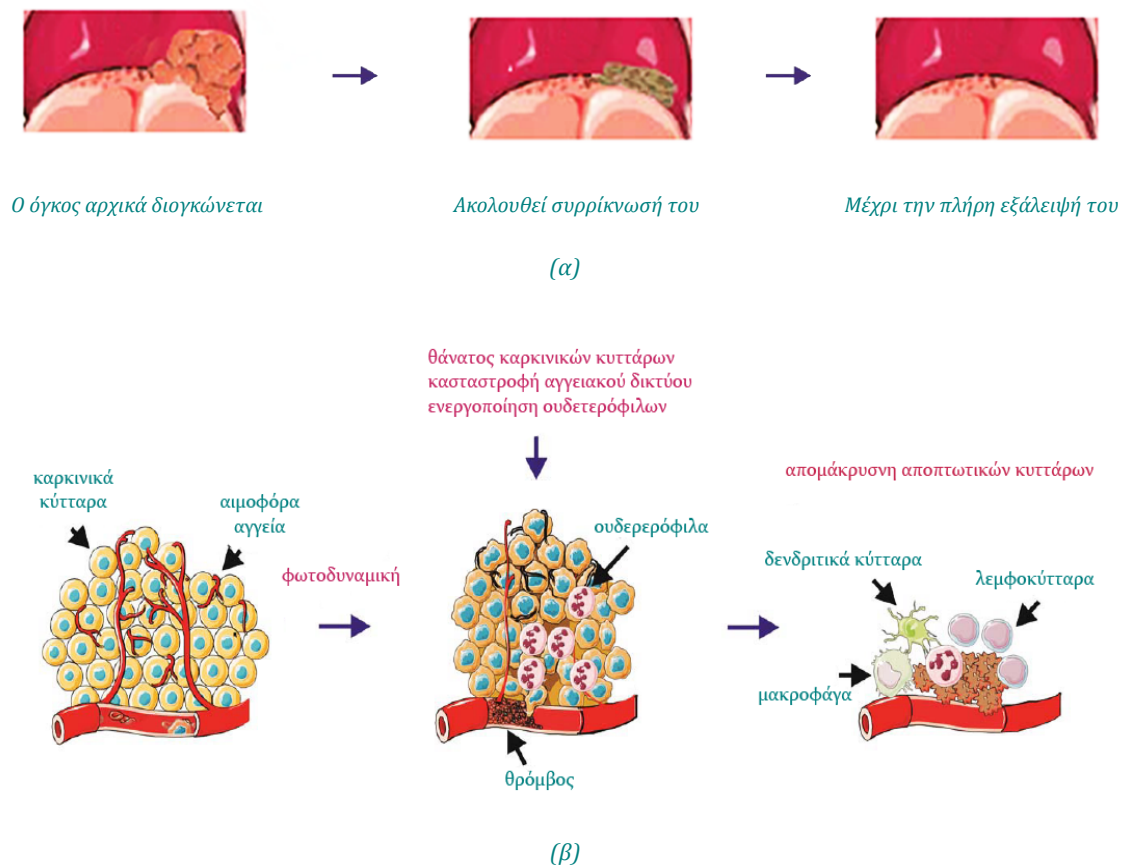
Βασικές αρχές Φωτοδυναμικής Θεραπείας

Με τον όρο «Φωτοδυναμική Θεραπεία» περιγράφεται μια εξειδικευμένη μεθοδολογία η οποία εφαρμόζεται για την επιλεκτική καταστροφή τόσο μη φυσιολογικών αλλά και καρκινικών κυττάρων^[7]. Η Φωτοδυναμική Θεραπεία θεμελιώνεται στη συνδυασμένη δράση τριών παραγόντων: του φωτός, του φωτοευαισθητοποιητή και του οξυγόνου. Κάθε ένας από τους παράγοντες αυτούς δεν είναι καθεαυτού τοξικός στις δόσεις που χρησιμοποιείται στη Φωτοδυναμική Θεραπεία και η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων οφείλεται στη συνέργειά τους ^[8, 9].



Σχήμα 1.1.: Στάδια εφαρμογής φωτοδυναμικής θεραπείας. (α) χορήγηση φωτοευαισθητοποιητή. (β) επιλεκτική συγκέντρωσή του στον καρκινικό ιστό. (γ) καθοδήγηση φωτός στον καρκινικό όγκο, διέγερση φωτοευαισθητοποιητή, ενεργοποίηση κυτταροτοξικών αντιδράσεων καταστροφής καρκινικού όγκου (δ) περίοδος φωτοευαισθησίας. (ε) πλήρης ίαση

Η μεθοδολογία εφαρμογής της θεραπείας ξεκινά με τη συστηματική χορήγηση ενός εξωγενούς χρωμοφόρου, του φωτοευαισθητοποιητή, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να γίνει και επάλειψή του πάνω στον καρκινικό όγκο. Μετά την πάροδο χρονικού διαστήματος ικανού να συγκεντρωθεί ο φωτοευαισθητοποιητής επιλεκτικά στον καρκινικό όγκο, χαμηλής ισχύος φως κατάλληλων φασματικών χαρακτηριστικών καθοδηγείται ακριβώς επάνω στον όγκο. Τα μόρια της φωτοευαίσθητης ουσίας με την απορρόφηση κβάντων φωτός ενεργοποιούν μια σειρά φωτοφυσικών διεργασιών οι οποίες οδηγούν στη δημιουργία κυτταροτοξικών ειδών τα οποία με τη σειρά τους δρουν ενδοκυττάρια οξειδώνοντας κυτταρικά οργανίδια και οδηγούν τελικά στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων^[7]. Ο ασθενής για κάποιο χρονικό διάστημα μετά τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή θα πρέπει να αποφεύγει την άμεση έκθεσή του στο φως για να αποφύγει τη φωτοευαισθησία. Τα στάδια εφαρμογής της φωτοδυναμικής γραφικά δίνονται στο Σχήμα 1.1.



Σχήμα 1.2.: Φαινόμενα που ακολουθούν τη διέγερση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή (α) μακροσκοπικά, στον όγκο (β) σε επίπεδο κυττάρου^[8]

Συγκεκριμένα, ο φωτοευαισθητοποιητής διεγείρεται απορροφώντας φως μήκους κύματος ίσου με το μήκος κύματος που παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στην περιοχή

600 – 850 nm. Αλληλεπιδρά στη συνέχεια με το περιβάλλον του παράγοντας ελεύθερες ρίζες ή μεταφέρει την ενέργειά του στο μοριακό οξυγόνο παράγοντας το μονήρες οξυγόνο, ένα εξαιρετικά δραστικό οξυγονούχο είδος με μικρό χρόνο ζωής, $< 0.04\mu s$, και μικρή ακτίνα δράσης, $< 0.02\mu m$ ^[10, 11]. Η καταστροφή του καρκινικού όγκου οφείλεται τόσο στις διαδικασίες της απόπτωσης ή/και της νέκρωσης που οδηγούν τα καρκινικά κύτταρα στον κυτταρικό θάνατο όσο και στην καταστροφή του μικροαγγειακού συστήματος το οποίο τροφοδοτεί τον όγκο. Αρχικά παρατηρείται διόγκωση του όγκου και σχηματισμός νεκρωτικού ιστού για να ακολουθήσει στη συνέχεια απομάκρυνση του νεκρωτικού ιστού και επούλωση της περιοχής. Καθώς η φωτοδυναμική είναι «ψυχρή» φωτοχημική διαδικασία ο υπό θεραπεία ιστός δεν θερμαίνεται διατηρώντας αναλλοίωτο τον συνδετικό ιστό (ο συνδετικός ιστός αποτελείται κυρίως από μόρια ελαστίνης και κολλαγόνου τα οποία αλλοιώνονται με αύξηση της θερμοκρασίας). Έτσι διατηρείται η ακεραιότητα και η λειτουργικότητα των υποκείμενων δομών^[10]. Τα φαινόμενα που ακολουθούν τη διέγερση του φωτοευαίσθητοποιητή σε επίπεδο όγκου και επίπεδο κυττάρου αναπαριστούνται γραφικά στο Σχήμα 1.2.

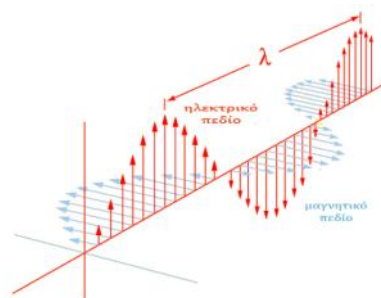
Διαδικασίες κλειδιά στη φωτοδυναμική είναι η απορρόφηση του φωτός από τα μόρια του φωτοευαίσθητοποιητή και η ακόλουθη μεταφορά ενέργειας στο μοριακό οξυγόνο.

1.3

Αλληλεπιδράσεις φωτός με την ύλη

1.3.1 Φως

Φως ως κύμα: Ανέκαθεν το φως γοήτευε την ανθρωπότητα και προκάλεσε κορυφαίους επιστήμονες όλων των εποχών να ανακαλύψουν τη φύση του. Σύμφωνα με την κλασική ηλεκτρομαγνητική θεωρία το φως εκφράζει χαρακτηριστικά ηλεκτρομαγνητικού κύματος, αποτελείται δηλαδή από ταλαντευόμενα ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία, κάθετα μεταξύ τους και κάθετα στη διεύθυνση διάδοσης. Η διάδοσή του γίνεται τόσο στο κενό όσο και σε υλικά μέσα.



Σχήμα 1.3.: Ηλεκτρομαγνητικό πεδίο

Οι περισσότερες αλληλεπιδράσεις του φωτός με τα βιολογικά μόρια είναι ηλεκτρικές. Έτσι λοιπόν το οπτικό κύμα περιγράφεται συνήθως από το ταλαντευόμενο ηλεκτρικό πεδίο E . Η διάδοση του φωτός στην κατεύθυνση z με ταλαντευόμενο ηλεκτρικό πεδίο $E(z, t)$ περιγράφεται μαθηματικά:

$$E(z, t) = E_0 \cos(\omega t - kz)$$

$$k^2 = \frac{\varepsilon \omega^2}{c^2}$$

Όπου: E_0 το πλάτος του ηλεκτρικού πεδίου,

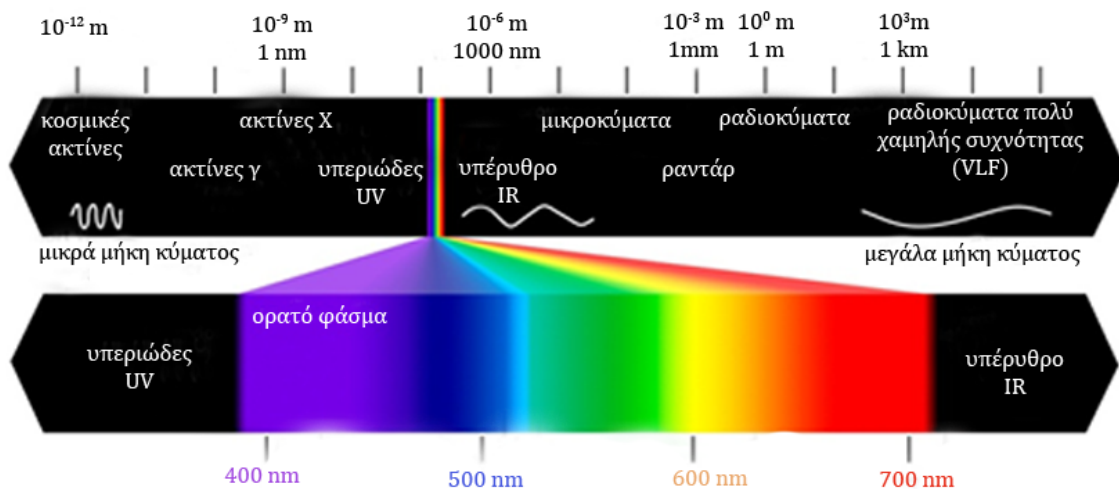
$\omega = 2\pi f$ η γωνιακή συχνότητα

$k = \frac{2\pi}{\lambda}$ ο τανυστής διάδοσης, ο οποίος χαρακτηρίζει τη φάση του οπτικού κύματος ως προς ένα σημείο αναφοράς ($z = 0$). Έτσι ο παράγοντας kz περιγράφει τη μετατόπιση φάσης σε σχέση με το σημείο αναφοράς.

Ο όρος ε στην εξίσωση είναι η διηλεκτρική σταθερά του υλικού αλλά στα οπτικά κύματα αντιστοιχεί στον όρο n^2 , όπου n ο δείκτης διάθλασης του υλικού^[12, 13]. Ο λόγος της ταχύτητας διάδοσης του κύματος στο κενό, c_0 , προς την ταχύτητα διάδοσης του φωτός μέσω κάποιου υλικού μέσου, c , ορίζει το δείκτη διάθλασης του συγκεκριμένου μέσου, n :

$$n = \frac{c_0}{c}$$

Στο κενό όλα τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα (και το φως) διαδίδονται με την ίδια ταχύτητα, την ταχύτητα του φωτός. Όταν ωστόσο το φως διέλθει μέσα από κάποιο μέσο, όπως για παράδειγμα το γυαλί ή ο βιολογικός ιστός, η ταχύτητά του μειώνεται.



Σχήμα 1.4: Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα, ορατή περιοχή του φάσματος

Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα καλύπτουν ένα ευρύτατο φάσμα μηκών κύματος και συχνοτήτων: Τα ραδιοφωνικά και τηλεοπτικά κύματα, το ορατό φως, η υπέρυθη και υπεριώδης ακτινοβολία, οι ακτίνες X και γ αποτελούν τμήματα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (Σχήμα 1.4).

Πίνακας 1.1: Οπτική περιοχή του φάσματος

Υπεριώδης	Ορατή	Υπέρυθρο
UVC: 100 – 280 nm	Ίωδες: 400 – 430 nm	Εγγύς υπέρυθρο: 780 – 1400 nm
UVB: 280 – 315 nm	Μπλε: 430 – 480 nm	Υπέρυθρο: 1400 – 3000 nm
UVA: 315 – 400 nm	Κυανό: 480 – 520 nm	Μακράν υπέρυθρο: 3 – 10.6 μm
	Πράσινο: 520 – 570 nm	
	Κίτρινο: 570 – 600 nm	
	Πορτοκαλί: 600 – 630 nm	
	Κόκκινο: 630 – 780 nm	

Η αίσθηση της όρασης επιτρέπει να ανιχνεύουμε με γυμνό οφθαλμό μόνο μια πολύ μικρή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, την οποία ονομάζουμε ορατό φως, με μήκος κύματος από 400 έως 780 nm περίπου. Η ορατή περιοχή συνορεύει με την περιοχή της υπεριώδους, UV, ακτινοβολίας, η οποία κυμαίνεται από 100 έως 400 nm και με την περιοχή της υπέρυθρου ακτινοβολίας (IR) η οποία κυμαίνεται από 780 έως 10.600 nm. Κάθε μια από τις περιοχές αυτές υποδιαιρείται όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.1

Φως ως σωματίδιο: Τα φαινόμενα της συμβολής και της περίθλασης εξηγούνται από τη θεώρηση του φωτός ως ηλεκτρομαγνητικό κύμα. Η θεώρηση αυτή ωστόσο δεν εξηγεί επαρκώς τα φαινόμενα της απορρόφησης και της σκέδασης, φαινόμενα που σχετίζονται με την μεταφορά ενέργειας από το φως στο υλικό με το οποίο αλληλεπιδρά. Η αλληλεπίδραση του φωτός με υλικά σωματίδια, όπως τα ηλεκτρόνια, περιλαμβάνει εκτός από ανταλλαγή ενέργειας και ανταλλαγή ορμής. Οι διαδικασίες αυτές μπορούν να περιγραφούν μόνο αν το φως θεωρηθεί ότι συμπεριφέρεται ως σωματίδιο. Η ενέργεια του ηλεκτρομαγνητικού – οπτικού κύματος είναι κβαντισμένη και το κβάντο ενέργειας καλείται φωτόνιο. Η ενέργεια κάθε φωτονίου δίδεται από τη σχέση^[12, 13]:

$$E = hf$$

Όπου h η σταθερά του Planck. Η συχνότητα f , και το μήκος κύματος λ , του ηλεκτρομαγνητικού κύματος συνδέονται με την ταχύτητα διάδοσης του κύματος μέσω της σχέσης:

$$c = f * \lambda$$

και ο αριθμός των φωτονίων N :

$$N = \frac{E}{hf}$$

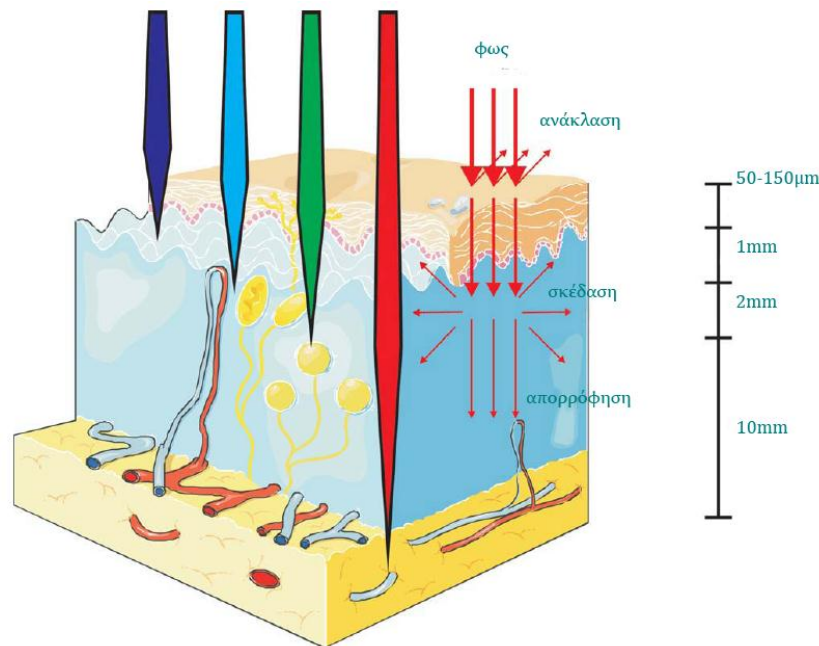
1.3.2

Αλληλεπιδράσεις φωτός - ιστού

Ο βιολογικός ιστός είναι ένα πολύπλοκο, ανομοιογενές μέσο. Η εγγενής ανομοιογένεια του βιολογικού ιστού, αποτέλεσμα της δομής του (μακρομόρια, κυτταρικά οργανίδια, κύτταρα, κυτταρικές δομές, διαφορετικά στρώματα), κάνει δύσκολη την ακριβή περιγραφή της διάδοσης του φωτός μέσα σε αυτόν.

Ορισμένα μήκη κύματος προσπίπτοντος φωτός μπορεί να διέλθουν μέσα από τον ιστό χωρίς να προκαλέσουν κανένα θερμικό ή άλλο αποτέλεσμα. Ο ιστός είναι διάφανος γι' αυτά τα μήκη κύματος. Επίσης το προσπίπτον φως μπορεί να υποστεί ανάκλαση και να μην προκαλέσει καμία επίδραση στον ιστό.

Όταν το φως εισέλθει στον ιστό και διαδίδεται μέσα σε αυτόν μπορεί να σκεδαστεί πολλαπλά ή/και να απορροφηθεί. Το ποιο από τα δυο φαινόμενα, η απορρόφηση ή η σκέδαση, θα κυριαρχήσει εξαρτάται από το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός και τις οπτικές ιδιότητες του ιστού (Σχήμα 1.5).



Σχήμα 1.5: Πιθανές αλληλεπιδράσεις φωτός - ιστού: ανάκλαση, απορρόφηση, σκέδαση. Μήκη κύματος στην περιοχή του μπλε, μικρά μήκη κύματος, παρουσιάζουν το μικρότερο βάθος διείσδυσης, ενώ μήκη κύματος στην περιοχή του κόκκινου το μεγαλύτερο^[8].

Σκέδαση

Ο ιστός είναι κατεξοχήν σκεδαστικό μέσο, ιδιότητα που οφείλεται στην πολλαπλή σκέδαση από τα διαφορετικά μόρια και δομές που περιέχει, όπως μακρομόρια, κυτταρικά οργανίδια αλλά και νερό. Η σκέδαση οδηγεί στη διασπορά της παράλληλης και εστιασμένης δέσμης του φωτός μέσα στον ιστό, με αποτέλεσμα απώλεια της αρχικής του κατευθυντικότητας και εστίασης.

Ο συντελεστής σκέδασης μ_s έχει διαστάσεις αντιστρόφου μήκους ενώ το $1/\mu_s$ δηλώνει τη μέση ελεύθερη διαδρομή που διανύει το φωτόνιο μέχρι να σκεδαστεί. Η σκέδαση στον ιστό είναι πολύπλοκο φαινόμενο και είναι το φαινόμενο εκείνο που εμποδίζει τη διάδοση του φωτός σε μεγαλύτερο βάθος μέσα στον ιστό^[12].

Απορρόφηση

Η απορρόφηση του φωτός από τον ιστό μπορεί να προκαλέσει τη θέρμανση του, φωτοχημικές αντιδράσεις ή/και εκπομπή φθορισμού. Η απορρόφηση εξαρτάται από το είδος και τη σύσταση του βιολογικού ιστού, και οφείλεται τόσο σε ενδοκυττάρια όσο και σε εξωκυττάρια μόρια. Η ικανότητα του ιστού να απορροφά το φως χαρακτηρίζεται από το συντελεστή απορρόφησης, μ_a . Ο συντελεστής απορρόφησης ορίζεται από την εξίσωση:

$$dI = \mu_a I dx$$

όπου dI είναι η μεταβολή της έντασης I μιας σύμφωνης δέσμης φωτός που διασχίζει μια απειροελάχιστη διαδρομή dx μέσω ενός ομογενούς μέσου, με συντελεστή απορρόφησης μ_a . Ο συντελεστής απορρόφησης μ_a έχει διαστάσεις αντιστρόφου μήκους και η αντίστροφη ποσότητα, $1/\mu_a$, εκφράζει τη μέση ελεύθερη διαδρομή ενός φωτονίου μέχρι να συμβεί απορρόφηση.

Ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης, ε , χρησιμοποιείται συχνά κατά την περιγραφή του φαινομένου της απορρόφησης. Ο συντελεστής αυτός συνδέεται με το συντελεστή απορρόφησης μέσω της ακόλουθης έκφρασης:

$$\varepsilon = \log_{10}(e) \frac{\mu_a}{C}$$

όπου C είναι η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα. Από την έκφραση αυτή ορίζονται και οι μονάδες του μοριακού συντελεστή απορρόφησης ως $M^{-1}cm^{-1}$

Βάθος διείσδυσης

Η ένταση του φωτός, I_x , σε βάθος x μέσα στον ιστό μειώνεται εκθετικά σε σχέση με το βάθος και δίνεται από τη σχέση :

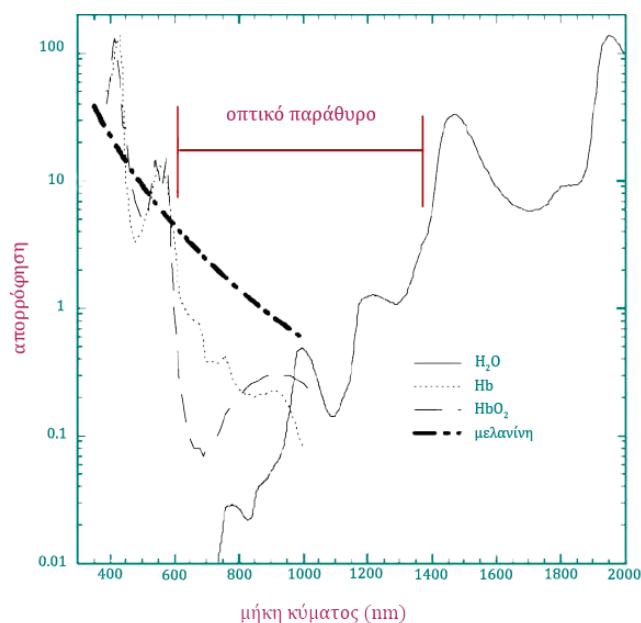
$$I_x = I_0 e^{-(\mu_a + \mu_s)x}$$

Όπου I_0 η ένταση του προσπίπτοντος φωτός. Το άθροισμα των δύο αυτών συντελεστών δίνει τον ολικό συντελεστή εξασθένησης μ_{eff} .

Ως **βάθος διείσδυσης** ορίζεται το πάχος εκείνο του ιστού στο οποίο η ένταση του φωτός ελαττώνεται στο $1/e$, (37%) της αρχικής προσπίπτουσας τιμής. Το βάθος διείσδυσης είναι το αντίστροφο του ολικού συντελεστή εξασθένησης $\mu_{eff}^{[12]}$.

Οπτικό παράθυρο

Η οξυαιμοσφαιρίνη (HbO_2) και η μελανίνη, τα πιο σημαντικά χρωμοφόρα στον οργανισμό, απορροφούν ισχυρά σε μήκη κύματος μικρότερα από 600 nm. Το νερό, το οποίο υπάρχει σε μεγάλο ποσοστό στους βιολογικούς ιστούς, απορροφά ισχυρά σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από 1300 nm. Το φαινόμενο της σκέδασης κυριαρχεί σε μήκη κύματος 600 – 1300 nm καθώς η απορρόφηση των βιολογικών μορίων είναι μικρή σε αυτή την περιοχή. Ο συνδυασμός των παραπάνω φαινομένων οδήγησε στο να οριστεί το «οπτικό παράθυρο» των βιολογικών ιστών (Σχήμα 1.6)^[14, 15].



Σχήμα 1.6: Οπτικό παράθυρο βιολογικών ιστών.

Στην περιοχή που βρίσκεται το οπτικό παράθυρο των βιολογικών ιστών, 600 – 1300 nm, η απορρόφηση των κυριότερων χρωμοφόρων του οργανισμού, του νερού, καθώς και το φαινόμενο της σκέδασης ελαχιστοποιούνται, οπότε το βάθος διείσδυσης του φωτός στον ιστό μεγιστοποιείται. Έχει υπολογιστεί ότι για φως μήκους κύματος 630 nm το βάθος διείσδυσης στον ιστό είναι 1 – 3 mm ενώ διπλασιάζεται περίπου στα 700 – 850 nm^[14]. Για το λόγο αυτό τα μήκη κύματος στην περιοχή του κόκκινου φωτός παρουσιάζουν μεγαλύτερο βάθος διείσδυσης μέσα στον ιστό (Σχήμα 1.6)

1.3.3

Αλληλεπιδράσεις φωτός με μόρια

Κάθε μόριο κατέχει μία σειρά ενεργειακών σταθμών, κάθε μια από τις οποίες απαρτίζεται από ένα πλήθος δονητικών επιπέδων. Μπορεί δε να μεταβεί από μία στάθμη χαμηλότερης ενέργειας E_1 , σε μία ενεργειακή στάθμη υψηλότερης ενέργειας E_2 , με την απορρόφηση κβάντου φωτεινής ακτινοβολίας, ενέργειας ΔE , ίσης με τη διαφορά ενέργειας των δύο ενεργειακών επιπέδων.

$$\Delta E = E_2 - E_1$$

Η πολλαπλότητα M μιας στάθμης εκφράζει την τροχιακή στροφορμή και σχετίζεται με το συνολικό spin της στάθμης, S , μέσω της σχέσης: $M = 2S + 1$. Έτσι στην περίπτωση ενός πολυατομικού μορίου του οποίου τα ηλεκτρόνια βρίσκονται σε ζεύγη με αντιπαράλληλα spin το συνολικό spin είναι 0 και η πολλαπλότητά του είναι ίση με 1. Αυτή η κατάσταση ονομάζεται μονήρης (singlet). Όταν το spin ενός ηλεκτρονίου αντιστραφεί, τότε στην κατάσταση αυτή υπάρχουν δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με παράλληλα spin και ολικό spin 1, άρα η πολλαπλότητα της στάθμης είναι 3. Αυτή η ηλεκτρονιακή στάθμη καλείται τριπλή (triplet).

Στη σταθερή τους κατάσταση τα περισσότερα μόρια βρίσκονται στη μονήρη κατάσταση (singlet state) S_0 . Η βασική αυτή στάθμη χαρακτηρίζεται από τη μικρότερη δυνατή ενέργεια που μπορεί να έχει το μόριο. Αυτό επιτυγχάνεται όταν όλα τα ηλεκτρόνια είναι συζευγμένα και έχουν αντιπαράλληλα spins, δεν υπάρχει δηλαδή ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Η τριπλή κατάσταση είναι για τα περισσότερα μόρια μία ασταθής κατάσταση στην οποία μεταβαίνουν όταν διεγερθούν και η οποία χαρακτηρίζεται από δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια τα οποία έχουν παράλληλα spins. Το οξυγόνο αποτελεί εξαίρεση των παραπάνω, όντας μία από τις σπάνιες ενώσεις οι οποίες στη βασική τους κατάσταση βρίσκονται στην τριπλή στάθμη, ενώ όταν διεγερθούν μεταβαίνουν στην πολύ σημαντική για τη φωτοδυναμική θεραπεία μονήρη κατάσταση.

Τα περισσότερα μόρια, ανάμεσά τους και οι φωτοευαισθητοποιητές, στη φυσιολογική του κατάσταση έχουν στην εξωτερική τους στιβάδα ζεύγη ηλεκτρονίων (ηλεκτρόνια με αντιπαράλληλο spin $\uparrow\downarrow$) έτσι $S = 0$ και $M = 1$. Η διάταξη αυτή ορίζεται ως μονήρης (singlet). Επιπλέον ενεργειακά, τα ηλεκτρόνια καταλαμβάνουν τα χαμηλότερα επιτρεπόμενα τροχιακά, βρίσκονται δηλαδή στη βασική στάθμη, S_0 .

Σε φυσιολογικές συνθήκες, η θερμική ενέργεια δεν είναι ικανή να προκαλέσει μετάβαση ηλεκτρονίου από τη βασική στάθμη σε κάποια διεγερμένη στάθμη. Μετά όμως από την πρόσπτωση φωτός στο μόριο η ενέργεια που μεταφέρεται σε αυτό είναι ικανή να προκαλέσει διέγερση του ηλεκτρονίου σε, κενό από ηλεκτρόνια, τροχιακό υψηλότερης ενέργειας. Ανάλογα με την ενέργεια που μεταφέρεται, το μόριο υφίσταται μετάβαση σε μια διεγερμένη μονήρη στάθμη S_x ($x = 1, 2, 3, \dots$) υψηλότερης ενέργειας. Οπτική ακτινοβολία στην ορατή περιοχή του φάσματος προκαλεί συνήθως διέγερση στην πρώτη μονήρη διεγερμένη στάθμη, ενώ υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί διέγερση στην δεύτερη μονήρη διεγερμένη στάθμη. Κάθε διεγερμένη στάθμη S_x απαρτίζεται με τη σειρά της από πλήθος διεγερμένων επιπέδων διαφορετικής ενέργειας. Κατά τη διάρκεια παραμονής του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, η πλεονάζουσα ενέργεια σε σχέση με την ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της στάθμης διοχετεύεται μέσω συγκρούσεων σε άλλα μόρια. Με τη διαδικασία αυτή το μόριο καταλαμβάνει το χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της διεγερμένης μονήρους στάθμης. Ο χρόνος ζωής αυτής της στάθμης είναι πολύ μικρός, της τάξεως του $1 \mu s$. Καθώς κάθε διεγερμένη στάθμη είναι λιγότερο προτιμητέα ενεργειακά σε σχέση με τη βασική στάθμη S_0 , το μόριο επιστρέφει σε αυτή μετά από λίγο χρονικό διάστημα.

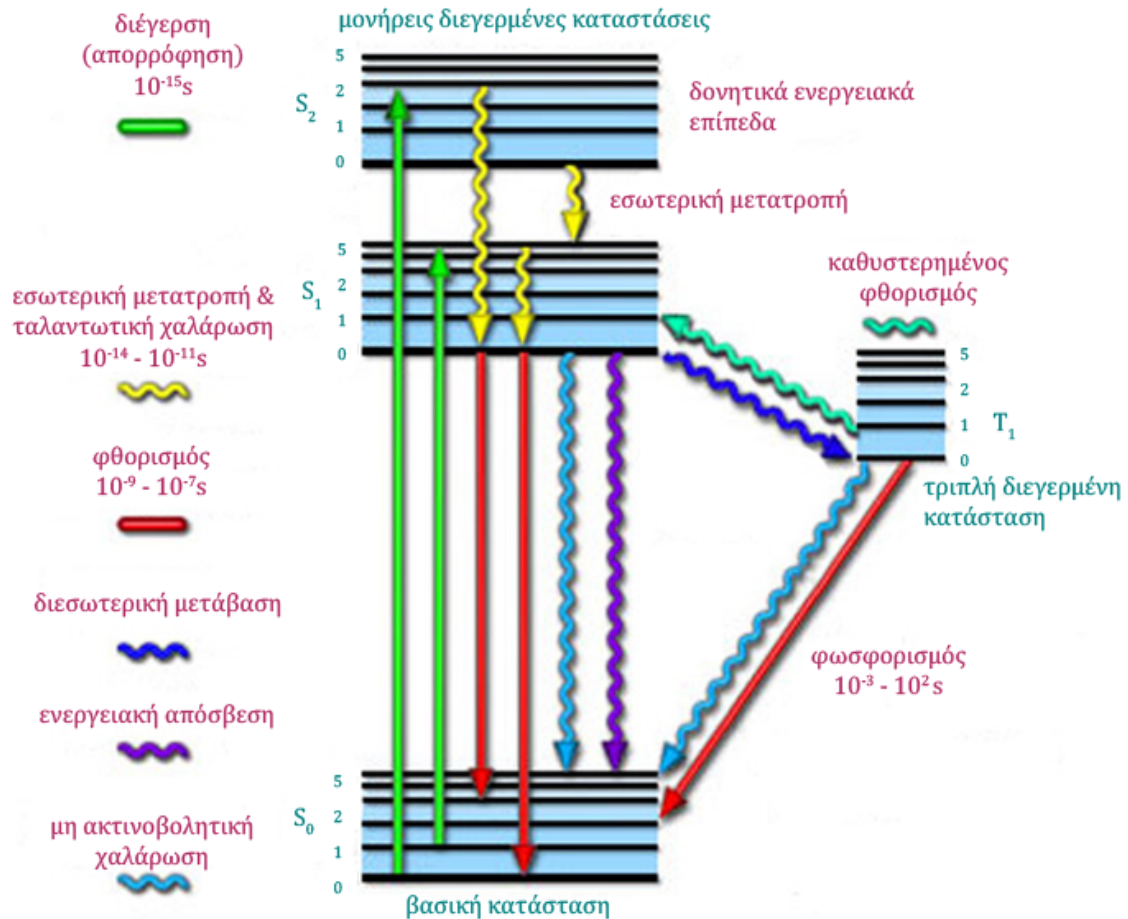
Η επιστροφή από τη διεγερμένη στάθμη S_x στη βασική μπορεί να γίνει μέσω μηχανισμών οι οποίοι συνοψίζονται γραφικά στο διάγραμμα Jablonski (Σχήμα 1.7) και ανακεφαλαιώνονται στον Πίνακα 1.2

Μόριο το οποίο βρίσκεται στο υψηλότερο ενεργειακά δονητικό επίπεδο μιας διεγερμένης στάθμης (π.χ. S_1) άμεσα μεταβαίνει στο ενεργειακά χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της στάθμης αυτής. Η μετάβαση αυτή καλείται **ταλαντωτική χαλάρωση** (vibrational relaxation (VR)) και η ενέργεια εκλύεται ως θερμότητα. Εάν το μόριο έχει μεταβεί σε διεγερμένη στάθμη υψηλότερης ενέργειας (S_x) τότε ακολουθεί η **εσωτερική μετατροπή** στην πρώτη διεγερμένη στάθμη S_1 , αφού πρώτα υποστεί ταλαντωτική χαλάρωση.

Φθορισμός

Η επιστροφή του μορίου στη βασική στάθμη, S_0 , μπορεί να συμβεί είτε με εκπομπή φωτονίου (φθορισμός) ή με έκλυση θερμότητας. Η **εκπομπή φθορισμού** πάντοτε ξεκινά από το χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης στάθμης, S_1 . Έτσι

η μορφή (όχι η κατανομή της έντασης) του φάσματος εκπομπής δεν εξαρτάται από το μήκος κύματος διέγερσης. Η ένταση φθορισμού στο φάσμα εκπομπής εξαρτάται από το μήκος κύματος της διεγείρουσας ακτινοβολίας.

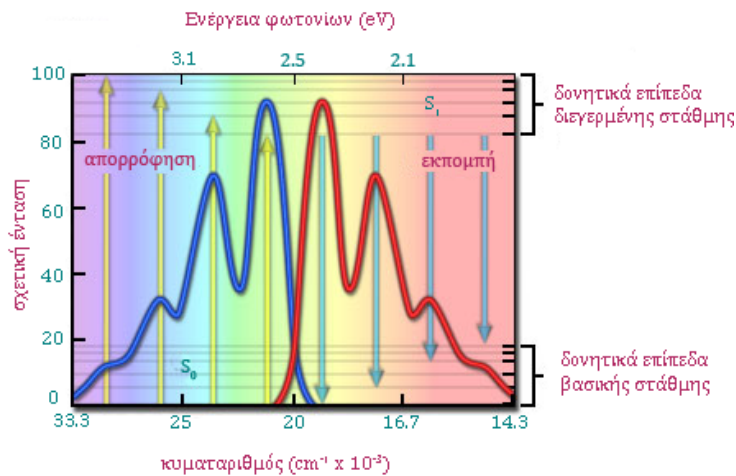


Σχήμα 1.7: Διάγραμμα Jablonski

Η ενέργεια του φωτονίου άρα και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, καθορίζεται από την ενεργειακή διαφορά ανάμεσα στο χαμηλότερο ενεργειακά δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης στάθμης και του δονητικού επιπέδου της βασικής κατάστασης στο οποίο καταλήγει. Στη συνέχεια κατόπιν απόσβεσης, χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας μεταβαίνει στο χαμηλότερο ενεργειακά επίπεδο της βασικής στάθμης.

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. Η διαφορά αυτή ανάμεσα στο μήκος κύματος που αντιστοιχεί στη μέγιστη εκπομπή και σε αυτό που αντιστοιχεί στη μέγιστη απορρόφηση ονομάζεται μετατόπιση Stokes (Σχήμα 1.8) και δηλώνει την ενέργεια η

οποία χάνεται κατά την παραμονή του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, πριν επιστρέψει στη βασική.



Σχήμα 1.8: Μετατόπιση Stokes

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.

Το φάσμα διέγερσης εκφράζει τη σχετική απόδοση των διαφόρων μηκών κύματος διεγείρουσας ακτινοβολίας στο να προκαλέσουν φθορισμό. Η εξέταση του φάσματος διέγερσης κάθε μορίου, δείχνει τις θέσεις του φάσματος απορρόφησης, οι οποίες μπορούν να επάγουν εκπομπή φθορισμού. Γενικά η υψηλότερη κορυφή μήκους κύματος του φάσματος διέγερσης είναι αυτή που επιλέγεται για τη διέγερση του δείγματος.

Από την πρώτη διεγερμένη στάθμη, S_1 , το μόριο μπορεί να μεταπέσει σε ένα δονητικό επίπεδο της τριπλής κατάστασης, T_1 . Στην τριπλή κατάσταση T_1 δυο ηλεκτρόνια είναι ασύζευκτα, έχουν δηλαδή παράλληλο spin. Αυτή η μη ακτινοβολητική διαδικασία καλείται **εσωτερική μετάπτωση** και η ενέργεια χάνεται μέσω δονητικής αποδιέγερσης.

Η μετάβαση από τη βασική S_0 στην τριπλή διεγερμένη στάθμη είναι απαγορευμένη (πολύ απίθανη). Σε αντιδιαστολή, η μετάπτωση από τη μονήρη στην τριπλή διεγερμένη στάθμη είναι περισσότερο πιθανή, αφού η ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της T_x είναι μικρότερη αυτής της S_x . Στη συνέχεια, το μόριο μπορεί είτε να επανέλθει άμεσα στη βασική κατάσταση S_0 , είτε προσλαμβάνοντας ενέργεια από το

περιβάλλον να μεταβεί στην S_x και στη συνέχεια να επιστρέψει στη βασική, **καθυστερημένος φθορισμός**. Η άμεση επιστροφή στην βασική κατάσταση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας είτε με εκπομπή ακτινοβολίας, φαινόμενο το οποίο καλείται **φωσφορισμός**. Η μετάβαση από τη διεγερμένη τριπλή στη διεγερμένη μονήρη στάθμη είναι κβαντομηχανικά «απαγορευμένη», ωστόσο συμβαίνει σε πολύ μικρό ποσοστό. Καθώς η πιθανότητα αντίστροφης μετάβασης είναι εξαιρετικά μικρή, η διεγερμένη τριπλή στάθμη είναι συνήθως μεγάλης διάρκειας ζωής (από msec ως λεπτά). Επίσης η σχετικά μεγάλη παραμονή των μορίων σε αυτή την κατάσταση τα καθιστά πιο επιρρεπή σε διαδικασίες αποδιέγερσης χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας.

Πίνακας 1.2: Διαδικασίες και χαρακτηριστικά τους μετά την απορρόφηση φωτός από ένα μόριο^[7].

Διαδικασία	Αντίδραση	Χρονική διάρκεια (s)	Σταθερά
Διέγερση (Excitation)	$h\nu + S_0 \rightarrow S_1, S_2, \dots, S_x$	$\sim 10^{-15} - 10^{-12}$	k_{Exc}
Εσωτερική μετατροπή (Internal conversion)	$S_x, \dots, S_2 \rightarrow S_1 + \text{θερμότητα}$	$\sim 10^{-13} - 10^{-10}$	$k_{IC^*}[S_x]$
Εσωτερική μετατροπή (Internal conversion)	$S_1 \rightarrow S_0 + \text{θερμότητα}$	$\sim 10^{-13}$	$k_{IC^*}[S_1]$
Εσωτερική μετατροπή (Intersystem crossing)	$S_1 \rightarrow T_1 + \text{θερμότητα}$	$\sim 10^{-7}$	$k_{ISC^*}[S_1]$
Χημική αντίδραση (Chemical reaction)	$S_1 \rightarrow S_0 + \text{αντίδραση}$		$k_{React(S)^*}[S_1]$
Φθορισμός (Fluorescence)	$S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{Fluor}$	$10^{-11} - 10^{-8}$	$k_{Fluo^*}[S_1]$
Εσωτερική μετατροπή (Intersystem crossing)	$T_1 \rightarrow S_0 + \text{θερμότητα}$	$10^{-2} - 10^2$	$k_{ISC(T)^*}[T_1]$
Φωσφορισμός (Phosphorescence)	$T_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{Phosp}$	10^{-6}	$k_{Phosp^*}[T_1]$
Χημειοφωταύγεια (Chemiluminescence)	$E + S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{Chem}$	10^{-6}	$k_{Chem^*}[S_1]$
Χημική αντίδραση (Chemical reaction)	$T_1 \rightarrow S_0 + \text{αντίδραση}$		$k_{React(T)^*}[T_1]$

Εάν το διεγερμένο μόριο συγκρουστεί με άλλο μόριο που βρίσκεται σε χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο, τότε η ενέργεια μπορεί να μεταφερθεί σε αυτό το μόριο χωρίς εκπομπή ακτονοβολίας, **μεταφορά ενέργειας μέσω κρούσεων**. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως απόσβεση φθορισμού.

Μπορεί να μεταφερθεί ενέργεια σε άλλο μόριο, χωρίς επαφή, μέσω μιας σύζευξης διπόλου-διπόλου ανάμεσα στα μόρια, **μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού**. Αν και αυτή η σύζευξη μειώνεται ανάλογα με την έκτη δύναμη της απόστασης ανάμεσα στα μόρια, στα βιολογικά συστήματα μπορεί να επιτευχθεί ικανοποιητική μεταφορά ενέργειας για αποστάσεις μέχρι και 5 nm. Το μόριο που δέχεται την ενέργεια, πρέπει να έχει και μια κατάλληλη ενεργειακή δομή. Το φαινόμενο αυτό είναι μια παραλλαγή της απόσβεσης φθορισμού.

Η ενέργεια μπορεί να επάγει μια χημική αντίδραση, **φωτοχημική αντίδραση**, δηλαδή τη δημιουργία ενός νέου είδους μορίου. Η ενέργεια καταναλώνεται κατά τη δημιουργία αυτών των ενώσεων, που έχουν διαφορετικές ιδιότητες φθορισμού από τις αρχικές^[7, 12, 16].

1.4

Μηχανισμοί φωτοδυναμικής θεραπείας

Η απορρόφηση του φωτός από τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή αποτελεί την απαρχή των φωτοφυσικών και φωτοχημικών αντιδράσεων που εμπλέκονται στη φωτοδυναμική θεραπεία. Τα φωτόνια που απορροφώνται πρέπει να έχουν επαρκή ενέργεια για να προκαλέσουν την ηλεκτρονική διέγερση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή. Ενέργεια που ικανοποιεί την προϋπόθεση αυτή βρίσκεται στην περιοχή του υπεριώδους, του ορατού ή του εγγύς υπέρυθρου. Ακτινοβολία μικρότερου μήκους κύματος (μεγαλύτερη ενέργεια) είναι ιονίζουσα, ενώ μεγαλύτερου μήκους κύματος είναι ανεπαρκής για να προκαλέσει ηλεκτρονιακή διέγερση^[8, 14].

Το μήκος κύματος του φωτός που χρησιμοποιείται για τη διέγερση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή επιλέγεται με βάση το φάσμα απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή. Για να εξασφαλιστεί μέγιστη απορρόφηση του φωτός επιλέγεται εκείνο το μήκος κύματος, κυρίως στην περιοχή του κόκκινου, στο οποίο παρουσιάζεται κορυφή απορρόφησης.

Μετά από την απορρόφηση φωτός κατάλληλου μήκους κύματος, το μόριο του φωτοευαισθητοποιητή (photosensitizer, *PS*) διεγείρεται σε δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης μονήρους στάθμης και καταλήγει τελικά στο χαμηλότερο ενεργειακά δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης στάθμης, S_1 . Ο χρόνος

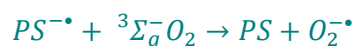
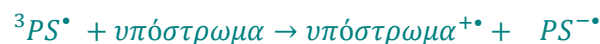
παραμονής του μορίου στη στάθμη αυτή είναι εξαιρετικά μικρός, της τάξεως μερικών nanosecond, και η τάξη αυτή λειτουργεί κυρίως ως πρόδρομος που θα οδηγήσει το μόριο μέσω της εσωτερικής μετάβασης στην τριπλή στάθμη T_1 (Σχήμα 1.9). Καθώς η μετάβαση $T_1 \rightarrow S_1$ είναι κβαντομηχανικά απαγορευμένη, η τριπλή στάθμη έχει μεγάλη διάρκεια ζωής (μπορεί να φτάσει έως και millisecond)^[14, 17].



Σχήμα 1.9: Απορρόφηση φωτός από φωτοευαισθητοποιητή και μετάβασή του στην τριπλή διεγερμένη στάθμη ${}^3PS^{\bullet}$

Ο μεγάλος χρόνος παραμονής στην τριπλή διεγερμένη στάθμη είναι απαραίτητος για να αντιδράσει το διεγερμένο μόριο του φωτοευαισθητοποιητή με τα συστατικά του βιολογικού ιστού και να παράξει τα κυτταροτοξικά είδη. Ιδανικά, η κβαντική απόδοση της τριπλής διεγερμένης στάθμης του φωτοευαισθητοποιητή, θα πρέπει να είναι άπειρη. Τα διεγερμένα στην τριπλή στάθμη μόρια του φωτοευαισθητοποιητή μπορούν να προκαλέσουν χημικές αλλαγές στα περιβάλλοντα μόρια μέσω δύο μηχανισμών: τις αντιδράσεις τύπου I και τις αντιδράσεις τύπου II ^[2, 6].

Κατά τις **φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου I** άτομα υδρογόνου αφαιρούνται ή ηλεκτρόνια μεταφέρονται από τον διεγερμένο στην τριπλή διεγερμένη στάθμη φωτοευαισθητοποιητή ${}^3PS^{\bullet}$, σε γειτονικά μόρια υποστρώματος (περιλαμβανομένων και μορίων οξυγόνου), σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες (Σχήμα 1.10). Οι ρίζες αυτές είναι πιθανό να αντιδράσουν με το μοριακό οξυγόνο παράγοντας δραστικά οξυγονούχα είδη. Οι φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου I συχνά οδηγούν στο σχηματισμό υπεροξειδικού ανιόντος, $O_2^{\bullet-}$, μέσω μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου από τον φωτοευαισθητοποιητή στο μοριακό οξυγόνο^[6, 7, 11, 14, 17, 18].

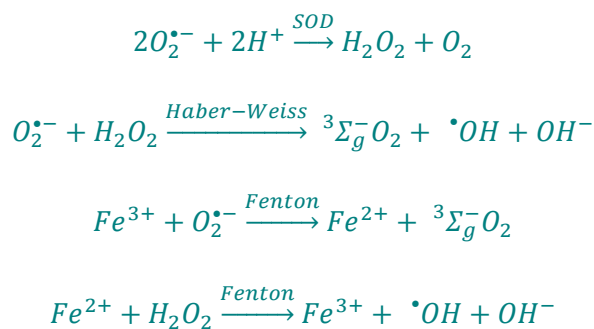


Σχήμα 1.10: Πρωτογενείς φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου I

Τα υπεροξειδικά ανιόντα δεν είναι πολύ ενεργά στα βιολογικά συστήματα συμμετέχουν ωστόσο στις αντιδράσεις παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου, H_2O_2 ,

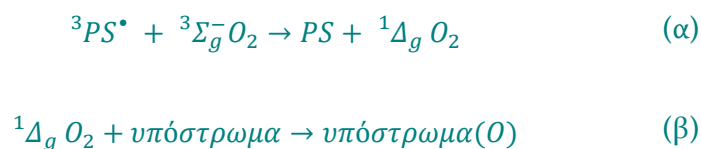
ενός δραστικού οξυγονούχου είδους. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να αντιδράσει με υπεροξειδικά ανιόντα σχηματίζοντας την εξαιρετικά δραστική ρίζα υδροξυλίου, $\cdot OH$. Η ρίζα υδροξυλίου, από τις δραστικότερες ελεύθερες ρίζες, μπορεί να επιτεθεί και να οξειδώσει οποιοδήποτε οργανίδιο στο εσωτερικό του κυττάρου, ενώ απαιτείται πολύ χαμηλή ενέργεια για να συμβούν αυτές οι οξειδωτικές αντιδράσεις. Παρουσία ιόντων μετάλλων, όπως του σιδήρου ή του χαλκού, οι ρίζες αυτές μπορούν να παραχθούν και μέσω της αντίδρασης Fenton^[6, 7, 11, 17]. (Σχήμα 1.11)

Οι ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά οξυγονούχα είδη προσβάλλουν ενδοκυττάρια οργανίδια και δομές προκαλώντας μεταβολές ή αναστολή της φυσιολογικής τους λειτουργίας και επακόλουθα τον κυτταρικό θάνατο.



Σχήμα 1.11: Δευτερογενείς αντιδράσεις

Οι **φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου II** αφορούν τη μεταφορά ενέργειας από τον διεγερμένο στην τριπλή διεγερμένη στάθμη φωτοευαίσθητοποιητή, ${}^3PS^*$, στο μοριακό οξυγόνο, 3O_2 . Κατά τη μεταφορά ενέργειας στις φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου II, σχηματίζεται το εξαιρετικά δραστικό μονήρες οξυγόνο 1O_2 (Σχήμα 1.12)^[6].



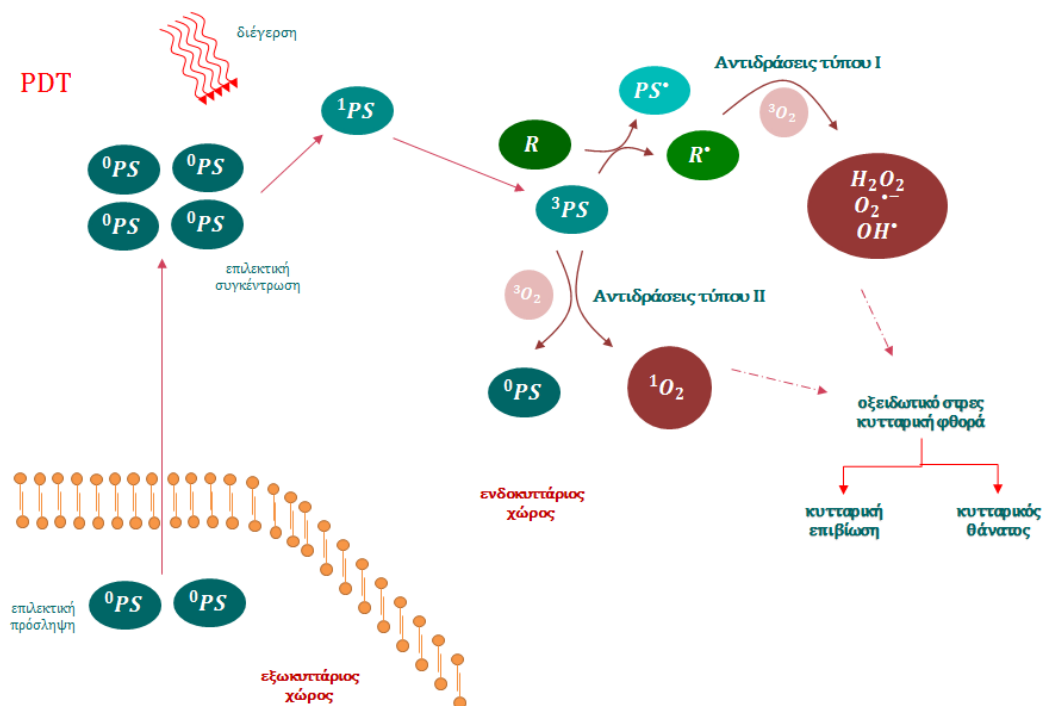
Σχήμα 1.12: Πρωτογενείς φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου II (α). Δευτερογενείς αντιδράσεις (β)

Το μονήρες οξυγόνο είναι ένα εξαιρετικά δραστικό οξυγονούχο είδος, με πολύ μικρό χρόνο ημιζωής και πολύ μικρή ακτίνα δράσης. Έχει δε τη δυνατότητα να προκαλέσει την οξείδωση όλων σχεδόν των βιομορίων που βρίσκονται στην ακτίνα δράσης του. Η αλληλεπίδραση του μονήρους οξυγόνου με ενδοκυττάρια στόχους

καταστρέφει ζωτικά για τη λειτουργία του κυττάρου οργανίδια και δομές, μιτοχόνδρια, μεμβράνες, λυσοσώματα, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο^[14, 17].

Κάθε μόριο φωτοευαισθητοποιητή μπορεί να παράξει περίπου $10^3 - 10^5$ μόρια μονήρους οξυγόνου, $^1\Delta_g O_2$ προτού αποδομηθεί μέσω της φωτολευκανσης^[19].

Οι φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου I και II συμβαίνουν παράλληλα. Το ποσοστό που η κάθε μία συμμετέχει στο τελικό κυτταροτοξικό αποτέλεσμα εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους, με τις πιο σημαντικές από αυτές να είναι το είδος του φωτοευαισθητοποιητή και η συγκέντρωση του οξυγόνου^[14]. Έχει προταθεί ότι σε περιπτώσεις η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή είναι μεγάλη ή σε συνθήκες υποξίας ($< 5\% O_2$) κυριαρχούν οι αντιδράσεις τύπου I^[6]. Οι φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου II είναι ωστόσο οι κυρίαρχες για τους περισσότερους φωτοευαισθητοποιητές που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία^[6, 7, 11].



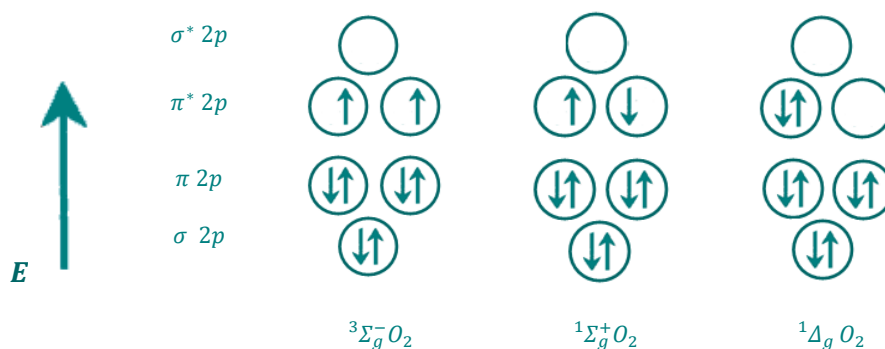
Σχήμα 1.13: Μηχανισμοί δράσης κατά τη φωτοδυναμική. Αφού συγκεντρωθεί επιλεκτικά στον καρκινικό ιστό ο φωτοευαισθητοποιητής από τη μονήρη στάθμη PS, διεγείρεται από φως κατάλληλου μήκους κύματος και καταλήγει τελικά στην τριπλή διεγερμένη στάθμη PS*. Εκεί μπορεί να αντιδράσει με μόρια του περιβάλλοντος R (αντιδράσεις τύπου I) παράγοντας πρωτογενή R* και δευτερογενή $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$ κυτταροτοξικά είδη ή να μεταφέρει την ενέργειά του στο μοριακό οξυγόνο O_2 , (αντιδράσεις τύπου II) διεγείροντάς το στο εξαιρετικά δραστικό μονήρες οξυγόνο 1O_2 . Αυτά τα κυτταροτοξικά είδη προκαλούν κυτταρική φθορά και ανάλογα με την έκτασή της είτε το κύτταρο μπορεί να την επιδιορθώσει είτε αδυνατεί να το κάνει και ενεργοποιούνται μηχανισμοί που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο^[18]

1.4.1

Το μονήρες οξυγόνο στη φωτοδυναμική θεραπεία.

Το μονήρες οξυγόνο, το κυρίαρχο κυτταροτοξικό είδος το οποίο παράγεται κατά τη φωτοδυναμική, είναι μια εξαιρετικά δραστική μορφή του οξυγόνου η οποία δημιουργείται με αντιστροφή spin ενός ηλεκτρονίου της εξώτατης στοιβάδας του μορίου του οξυγόνου. Το μόριο του οξυγόνου ανήκει σε εκείνη την κατηγορία των ελάχιστων μορίων τα οποία στη βασική τους κατάσταση βρίσκονται στην τριπλή στάθμη, $^3\Sigma_g^-$. Στη βασική του κατάσταση το μοριακό οξυγόνο έχει δυο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με παράλληλο spin σε δυο αντιδεσμικά π^* τροχιακά (Σχήμα 1.14). Έχει συνεπώς συνολικό κβαντικό αριθμό spin $S = 1$ καθώς κάθε ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει κβαντικό αριθμό spin $S = 1/2$, και πολλαπλότητα spin $M = 3$ ^[6, 20].

Κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης με τον διεγερμένο φωτοευαισθητοποιητή το spin ενός ηλεκτρονίου αντιστρέφεται, επιτρέποντας έτσι στα ηλεκτρόνια να σχηματίσουν ζεύγος στο αντιδεσμικό τροχιακό, γεγονός που αποσταθεροποιεί το μόριο του οξυγόνου και σχηματίζεται το μονήρες οξυγόνο^[6].



Σχήμα 1.14: Κατάταξη ηλεκτρονίων στα εξωτερικά τροχιακά στο μοριακό και μονήρες οξυγόνο

Στην πραγματικότητα, μετά από απορρόφηση ενέργειας το μοριακό οξυγόνο μπορεί διεγερθεί σε δυο μονήρεις διεγερμένες στάθμες, $^1\Delta_g O_2$ και $^1\Sigma_g^+ O_2$, ενέργειας 95 και 158 $kJ mol^{-1}$ αντίστοιχα. Οι στάθμες αυτές διαφέρουν μόνο στη διάταξη των ηλεκτρονίων στο εξωτερικό π^* τροχιακό. Στην πρώτη στάθμη, $^1\Delta_g$, τα ηλεκτρόνια σχηματίζουν ένα ζεύγος ενώ στη δεύτερη μονήρη διεγερμένη στάθμη, $^1\Sigma_g^+$, τα ηλεκτρόνια στα αντιδεσμικά τροχιακά έχουν αντιπαράλληλο spin σε μεγάλη απόσταση μεταξύ τους. Η μετάβαση από την πρώτη στάθμη $^1\Delta_g$ στην $^3\Sigma_g^-$ είναι απαγορευμένη λόγω spin και έτσι το μονήρες οξυγόνο $^1\Delta_g O_2$ έχει σχετικά μεγάλο χρόνο ζωής. Το διεγερμένο οξυγόνο στη δεύτερη μονήρη στάθμη, $^1\Sigma_g^+ O_2$, έχει μικρό χρόνο ζωής καθώς μεταβαίνει ταχύτατα στη στάθμη $^1\Delta_g$ η μετάβαση αυτή δεν υπόκειται σε περιορισμό

λόγω spin. Λόγω όμως της μετασταθερότητας της στάθμης $^1\Delta_g$, παρόλο τον περιορισμό λόγω spin, παρατηρούνται αντινοβολητικές μεταβάσεις $^1\Delta_g \leftrightarrow ^3\Sigma_g^-$ περίπου στα $1270 (1268.7)nm^{[17, 19, 20]}$.

Ο φωτοευαισθητοποιητής μετά τη διέγερση και εσωτερική μετάπτωση του στην τριπλή διεγερμένη στάθμη, θα πρέπει να έχει ενέργεια ικανή να διεγείρει το μοριακό οξυγόνο σε μονήρες οξυγόνο. Για να μεταβούν τα μόρια του οξυγόνου από τη βασική, τριπλή, στάθμη στη μονήρη διεγερμένη στάθμη χρειάζονται ενέργεια περίπου $94.5kJ mol^{-1}$, κβαντικό ισοδύναμο $1270 nm^{[7, 19]}$. Ο διεγερμένος στην τριπλή στάθμη φωτοευαισθητοποιητής καλείται να ξεπεράσει αυτή την ενέργεια. Συνυπολογίζοντας και τις θερμικές απώλειες κατά τη διάρκεια των φωτοφυσικών διεργασιών έχει υπολογιστεί ότι το ανώτατο ωφέλιμο μήκος κύματος απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή για την αποδοτική παραγωγή μονήρους οξυγόνου είναι $850nm^{[7, 19]}$.

Ο συνδυασμός του οπτικού παραθύρου των βιολογικών ιστών με το γεγονός ότι φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι απορροφούν σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από $850 nm$ δεν έχουν ικανοποιητική ενέργεια ώστε να προκαλέσουν στη συνέχεια διέγερση του μοριακού οξυγόνου επέβαλε οι φωτοευαισθητοποιητές που επιλέγονται για φωτοδυναμική θεραπεία να παρουσιάζουν μέγιστα απορρόφησης στην περιοχή $600 - 850nm^{[2, 6, 7]}$.

Η ικανότητα ενός φωτοευαισθητοποιητή να προκαλέσει την παραγωγή μονήρους οξυγόνου ορίζει την κβαντική απόδοση, φ , παραγωγής μονήρους οξυγόνου, η οποία υπολογίζεται από τον τύπο^[7]:

$$\varphi = \frac{k_{React(T)}[T_1][S]}{k_{Phosp}[T_1] + k_{ISC(T)}[T_1] + k_{React(T)}[T_1][S]}$$

Η κβαντική απόδοση μονήρους οξυγόνου εξαρτάται από το ρυθμό με τον οποίο αντιδρά ο διεγερμένος στην τριπλή φωτοευαισθητοποιητής και μειώνεται από διαδικασίες όπως είναι ο φωσφορισμός, η εσωτερική μετάπτωση από τριπλές σε μονήρης στάθμες ή από χημικές αντιδράσεις του διεγερμένου στη μονήρη στάθμη φωτοευαισθητοποιητή^[7].

Καθώς το μονήρες οξυγόνο δεν είναι φορτισμένο μόριο, μπορεί να διαχυθεί μέσα στο κυτταρόπλασμα και διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών. Ο χρόνος ζωής του, τ , σε καθαρό νερό έχει υπολογιστεί περίπου στα $3 \times 10^{-6} s$. Στο κυτταρόπλασμα ο χρόνος ζωής μειώνεται περισσότερο από μια τάξη μεγέθους λόγω της παρουσίας αντιδρώντων μορίων, αγγίζοντας μέγιστο χρόνο ζωής $1 \times 10^{-7} s$. Η ακτίνα διάχυσης του μονήρους οξυγόνου στο εσωτερικό του κυττάρου δίνεται από την εξίσωση:

$$\delta = \sqrt{6D\tau}$$

Για το μονήρες οξυγόνο η σταθερά διάχυσης D είναι $1.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, συνεπώς η μέγιστη ακτίνα δράσης του μονήρους οξυγόνου είναι 30 nm . Η διάμετρος των κυττάρων του ανθρώπου κυμαίνεται από $10 - 100 \mu\text{m}$. Ο συνδυασμός αυτών των ιδιοτήτων καθορίζει πρακτικά ότι το μονήρες οξυγόνο θα προκαλέσει φθορά στο ενδοκυττάριο σημείο που δημιουργείται. Κατά συνέπεια η ενδοκυττάρια κατανομή του φωτοευαισθητοποιητή καθορίζει το ποιο ενδοκυττάριο οργανίδιο θα υποστεί φωτοδυναμική δράση και τελικά μέσω ποιου μηχανισμού θα προκληθεί ο κυτταρικός θάνατος^[6, 7]. Η εκπομπή του μονήρους οξυγόνου στα 1270 nm μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση της παραγωγής μονήρους οξυγόνου κατά τις φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου II.

1.4.2

Φωτοδυναμική δόση

Η επιλεκτική καταστροφή του καρκινικού όγκου επιτυγχάνεται εάν ο καρκινικός όγκος απορροφήσει επιλεκτικά και σε μεγαλύτερο ποσοστό τον φωτοευαισθητοποιητή σε σχέση με τον περιβάλλοντά του υγιή ιστό. Επιπλέον, η επιλεκτικότητα της φωτοδυναμικής ενισχύεται καθοδηγώντας το φως για την ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή ακριβώς πάνω ή μέσα στον καρκινικό όγκο, περιορίζοντας τη διατομή της δέσμης ώστε να επιδρά το ελάχιστο δυνατό στον υγιή ιστό.

Ως μέτρο της ενέργειας του φωτός η οποία απορροφάται από τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή στον καρκινικό όγκο έχει οριστεί η φωτοδυναμική δόση, D_{PDT} , ως συνάρτηση του ρυθμού ροής ενέργειας ακτινοβολίας $\Phi(\lambda, q, t)$, του μοριακού συντελεστή απορρόφησης $\varepsilon(\lambda)$ του φωτοευαισθητοποιητή, και της συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή στον υπό θεραπεία όγκο $C(q, t)$.

$$D_{PDT} = \int_0^t \int_q \varepsilon(\lambda) C(q, t) \Phi(\lambda, q, t) dt dq$$

όπου t η διάρκεια της ακτινοβολήσης, λ το μήκος κύματος του φωτός διέγερσης (= μέγιστο απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή), q το σύστημα χωρικών συντεταγμένων.

Ο ρυθμός ροής ισχύος ακτινοβολίας ή ροή ακτινοβολήσης (radiant energy fluence rate) $\Phi(\vec{r})$ ($W \text{ cm}^{-2}$) ορίζεται ως το άθροισμα της ακτινοβολήσης σε όλες τις γωνίες σε ένα σημείο \vec{r} :

$$\Phi(\vec{r}) = \int_{4\pi} I(\vec{r}, \hat{s}) d\omega$$

Όπου η ακτινοβολήση (radiance) $I(\vec{r}, \hat{s})$ ($W \text{ cm}^{-2} \text{ sr}^{-1}$) είναι η μέση πυκνότητα ροής ισχύος σε δοθείσα κατεύθυνση \hat{s} ανά μονάδα στερεάς γωνίας $d\omega$ στη θέση r .

Θεωρητικά η φωτοδυναμική δόση θα μπορούσε να υπολογιστεί εάν ήταν γνωστά η ακτινοβολία, η συγκέντρωση και ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή σε κάθε σημείο του υπό θεραπεία όγκου κάθε χρονική στιγμή^[6].

1.4.3

Οξυγόνωση ιστού

Η σημασία της οξυγόνωσης του ιστού στο κυτταροτοξικό αποτέλεσμα έχει αναδειχθεί από πολλές μελέτες. Κύτταρα σε υποξία, κύτταρα δηλ στα οποία το ποσοστό του οξυγόνου είναι μικρότερο από 5%, έχει δείχτεί ότι παρουσιάζουν αυξημένη αντίσταση στη φωτοδυναμική. Μελετητές υποστηρίζουν ότι καθώς η κατανάλωση του οξυγόνου στη φωτοδυναμική εξαρτάται από την ακτινοβολία, η καταστροφή του ιστού θα μπορούσε να ενισχυθεί υιοθετώντας χαμηλότερους ρυθμούς ροής ενέργειας ακτινοβολίας. Ο χαμηλότερος ρυθμός ακτινοβολίας συμβάλει στο να μην καταναλωθούν άμεσα όλα τα αποθέματα οξυγόνου του ιστού με αποτέλεσμα το ιστός κατά τη διάρκεια της θεραπείας να εκτίθεται για περισσότερο χρόνο στο μονήρες οξυγόνο^[6].

Ο ρυθμός παραγωγής μονήρους οξυγόνου $\frac{d[{}^1O_2]}{dt}$, εξαρτάται από τη συγκέντρωση μονήρους οξυγόνου, από τη φωτοδυναμική δόση D_{PDT} , και από το ρυθμό ακτινοβολίας Φ . Επιπλέον μεταβάλλεται ανάλογα με τη συγκέντρωση C , το μοριακό συντελεστή απορρόφησης ε , και την κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρους οξυγόνου φ του φωτοευαισθητοποιητή:

$$\frac{d[{}^1O_2]}{dt} = \frac{\varepsilon C \Phi}{E_\Phi} \varphi = \frac{D_{PDT}}{t E_\Phi} \varphi = k[{}^3O_2]$$

Σύμφωνα με την εξίσωση, ο ρυθμός με τον οποίο καταναλώνεται το μοριακό οξυγόνο, 3O_2 είναι ανάλογος με τον ρυθμό ακτινοβολίας. Στην κλινική πράξη οι μεγάλοι ρυθμοί ακτινοβολίας ήταν προτιμητέοι λόγω του μικρού χρόνου θεραπείας που αυτού συνεπάγονταν. Έχει αποδειχθεί ωστόσο ότι οι μεγάλοι ρυθμοί ακτινοβολίας δεν προκαλούν κατ' ανάγκην το βέλτιστο κυτταροτοξικό αποτέλεσμα. Μελέτη σε μοντέλο καρκινικού όγκου σε αρουραίους με τον φωτοευαισθητοποιητή Photofrin (5 mg/kg) έδειξε ότι ακτινοβολία με 50 mW/cm^2 έδωσε καλύτερη θεραπευτική δράση σε σχέση με τα 200 mW/cm^2 , ενώ η δόση ενέργειας κρατήθηκε σταθερή, (360 J/cm^2)^[6]. Επιπρόσθετα, πειραματικά δεδομένα αλλά και αποτελέσματα υπολογιστικών μοντέλων διάχυσης οξυγόνου συγκλίνουν στο ότι χαμηλότεροι ρυθμοί ακτινοβολίας εκθέτουν μεγαλύτερο τμήμα του καρκινικού όγκου στο μονήρες οξυγόνο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα^[6].

1.5

Φωτοδυναμικά επαγόμενοι μηχανισμοί νέκρωσης καρκινικών όγκων

Η έκταση της φωτοκαταστροφής και της κυτταροτοξικότητας μετά τη φωτοδυναμική σε επίπεδο οργανισμού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Το είδος του φωτοευαισθητοποιητή, το ενδοκυττάριο σημείο χωρικού εντοπισμού του κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης, η συγκέντρωσή του, η συνολική δόση ενέργειας, η ακτινοβόληση, ο χρόνος που μεσολαβεί από τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή μέχρι την έκθεσή του στο φως, το είδος του καρκινικού ιστού και η οξυγόνωσή του καθορίζουν το είδος αλλά και το αποτέλεσμα της φωτοδυναμικής δράσης^[6, 11, 18, 21-24].

Στην πραγματικότητα, οι παραπάνω συνιστώσες της φωτοδυναμικής δράσης καθορίζουν τον ρόλο τριών ανεξάρτητων μηχανισμών στην φωτοδυναμικά επαγόμενη καταστροφή του καρκινικού όγκου: του απευθείας θανάτου των καρκινικών κυττάρων, της ρήξης του αγγειακού δικτύου το οποίο τροφοδοτεί τον καρκινικό όγκο και της ενεργοποίησης ανοσολογικών αντιδράσεων^[6, 11, 18, 21].

1.5.1

Απευθείας κυτταρικός θάνατος.

Καθώς το μονήρες οξυγόνο έχει πολύ μικρό χρόνο ζωής και πολύ μικρή ακτίνα δράσης, η διάχυσή του σε άλλα σημεία πέραν του σημείου δημιουργίας του είναι πρακτικά ασήμαντη. Έτσι, τα σημεία στο εσωτερικό κυττάρου και στον ιστό τα οποία πλήττονται πρώτα από τη φωτοδυναμική είναι εκείνα στα οποία χωρικά εντοπίζεται ο φωτοευαισθητοποιητής. Καθώς οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές δεν διαπερνούν την πυρηνική μεμβράνη για να συγκεντρωθούν στον πυρήνα, η φωτοδυναμική έχει ελάχιστες πιθανότητες να προκαλέσει φθορά στο DNA, μεταλλάξεις ή καρκινογενέσεις σε σχέση για παράδειγμα με τις ακτίνες Χ^[11, 18].

Φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι συγκεντρώνονται στα μιτοχόνδρια ή παράγονται σε αυτά, (Photofrin, πρωτοπορφυρίνη IX) επάγουν κυτταρικό θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης, εάν βέβαια τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες που θα προκαλέσουν είναι ικανά για να ενεργοποιήσουν το μηχανισμό αυτό^[11, 18]. Οι υδρόφιλοι φωτοευαισθητοποιητές ή συσσωματώματά τους προσλαμβάνονται από τα κύτταρα μέσω της πινοκύττωσης ή / και της ενδοκύττωσης, έτσι συγκεντρώνονται σε λυσοσώματα ή ενδοσώματα. Οι φωτοευαισθητοποιητές αυτοί, όπως επίσης και όσοι συγκεντρώνονται στην κυτταρική μεμβράνη, θεωρείται ότι δρουν εμποδίζοντας ή αναστέλλοντας τη διαδικασία της απόπτωσης, ενισχύοντας παράλληλα το φαινόμενο της νέκρωσης^[11, 18, 25]. Έρευνες των τελευταίων ετών αναφέρουν ότι μέσω της αυτοφαγοκυττάρωσης, η οποία προκαλείται ως απόκριση στη φωτοδυναμική,

προσπαθεί το κύτταρο να επιδιορθώσει τη φωτοκαταστροφή που έχει υποστεί σε ζωτικά οργανίδια και να επιβιώσει, εάν ωστόσο αποτύχει τότε ο μηχανισμός αυτός οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο^[18]. Θεωρείται ότι οι φωτοευαισθητοποιητές που συγκεντρώνονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο προκαλούν κυτταρικό θάνατο μέσω της αυτοφαγοκυττάρωσης^[26].

Γενικά θεωρείται ότι χαμηλότερες δόσεις ενέργειας επάγουν αποπτωτικό θάνατο ενώ μεγαλύτερες δόσεις νεκρωτικό^[23, 25, 27]. Επίσης ο μηχανισμός κυτταρικού θανάτου εξαρτάται και από τη συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή. Μικρής συγκέντρωσης φωτοευαισθητοποιητής πυροδοτεί το μηχανισμό της απόπτωσης, ενώ μεγάλης συγκέντρωσης προκαλεί βίαιο θάνατο μέσω της νέκρωσης^[25]. Το μηχανισμό της απόπτωσης ανταγωνίζεται η αυτοφαγοκυττάρωση η οποία τείνει να επιδιορθώσει τις αλλαγές που οδηγούν σε απόπτωση. Έτσι τόσο η δόση ενέργειας όσο και η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή θα πρέπει να είναι ικανές ώστε να ξεπεραστεί το ενδεχόμενο πρόκλησης μικρού οξειδωτικού στρες και η πιθανότητα κυτταρικής επιβίωσης^[18, 25, 26]

Ο χρόνος επώασης των καρκινικών κυττάρων με τον φωτοευαισθητοποιητή είναι μια επιπλέον παράμετρος η οποία καθορίζει το είδος του κυτταρικού θανάτου. Με αύξηση του χρόνου επώασης ο φωτοευαισθητοποιητής διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη στην οποία πρωταρχικά εντοπίζεται και σταδιακά συγκεντρώνεται σε ενδοκυττάρια οργανίδια^[27]. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι μετά από την ακτινοβόληση ορισμένοι φωτοευαισθητοποιητές αλλάζουν μοτίβο κατανομής στο εσωτερικό του κυττάρου, ενεργοποιώντας με τον τρόπο αυτό περισσότερους του ενός μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου, προσβάλλοντας και άλλα ενδοκυττάρια οργανίδια, πέραν των αρχικών ^[25, 28]

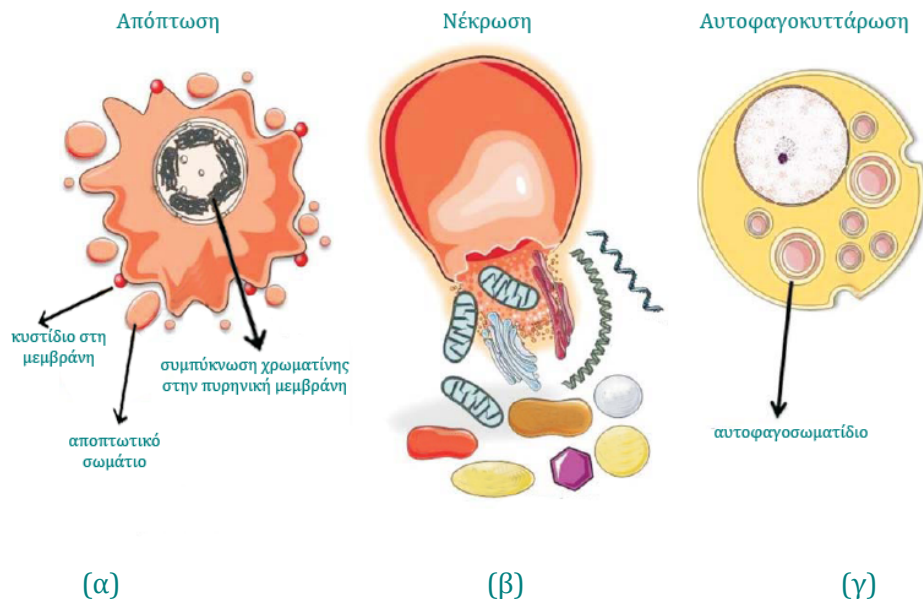
Οι μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου που ενεργοποιούνται από τη φωτοδυναμική περιλαμβάνουν και τους τρεις μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου: την απόπτωση, την αυτοφαγοκυττάρωση και τη νέκρωση.

1.5.1.1

Απόπτωση

Ο μηχανισμός της απόπτωσης είναι μια φυσιολογική κυτταρική λειτουργία απαραίτητη για τον έλεγχο της ανάπτυξης του ιστού και τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού ^[29]. Είναι μια αυστηρά καθορισμένη και ελεγχόμενη κυτταρική λειτουργία η οποία πυροδοτείται από ποικίλα ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια ερεθίσματα. Καταναλώνει ενέργεια (ATP) για να υλοποιηθεί και μπορεί να επηρεάσει μεμονωμένα κύτταρα ή ομάδες κυττάρων, ενώ τα γειτονικά συνεχίζουν να λειτουργούν φυσιολογικά ^[23]. Δυσλειτουργία ή αναστολή του μηχανισμού απόπτωσης διαταράσσει

την ισορροπία ανάμεσα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στον κυτταρικό θάνατο, αποτελώντας την απαρχή διαφόρων ασθενειών ακόμα και καρκίνου [18, 29].



Σχήμα 1.15: Μορφολογικά χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου: (α) απόπτωσης, χαρακτηρίζεται από συμπύκνωση της χρωματίνης, σχηματισμό κυστιδίων στη μεμβράνη και αποπτωτικών σωματίων, ενώ η κυτταρική μεμβράνη εξακολουθεί να συγκροτεί το κύτταρο. (β) νέκρωσης, χαρακτηρίζεται από διόγκωση, διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης και έκλυση κυτταροπλάσματος καθώς και ενδοκυττάρων οργανιδίων στον εξωκυττάριο χώρο. (γ) αυτοφαγοκυττάρωσης, χαρακτηρίζεται από δημιουργία αυτοφαγοσωματιδίου και διάσπαση ενδοκυττάρων οργανιδίων^[8].

Μια αλληλουχία μορφολογικών και βιοχημικών αλλαγών χαρακτηρίζει την απόπτωση. Μορφολογικά χαρακτηρίζεται από συμπύκνωση της χρωματίνης στον πυρήνα και συγκέντρωσή της στην πυρηνική μεμβράνη, διάσπαση του χρωμοσωμικού DNA σε νουκλεοσωματιδιακά κλάσματα, συρρίκνωση του κυττάρου, ανάπτυξη κυστιδίων στη μεμβράνη και σχηματισμό αποπτωτικών σωματίων χωρίς ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης (Σχήμα 1.15). Οι μεμβράνες των οργανιδίων και του κυττάρου τείνουν να διατηρήσουν τη συνοχή τους για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα, χωρίς το περιεχόμενο του κυττάρου να εκλύεται στον εξωκυττάριο χώρο. Τα αποπτωτικά σωματίδια, στα οποία διασπώνται τα αποπτωτικά κύτταρα περιβάλλονται από κυτταρική μεμβράνη. Τα αποπτωτικά σωματίδια απομακρύνονται γρήγορα από φαγοκύτταρα ή αποσυντίθενται. Αποτρέπεται με αυτόν τον τρόπο η δημιουργία φλεγμονής και τα κύτταρα υφίστανται έναν φυσιολογικό θάνατο, ο οποίος ελέγχεται από το ανοσοποιητικό σύστημα^[18, 23, 29].

Βιοχημικά η απόπτωση χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση των κασπασών, μιας οικογένειας πρωτεασών με πολύ εξειδικευμένη δράση, οι οποίες εξαρτώνται από την κυστεΐνη, συνθέτονται σαν πρόδρομα ένζυμα και ενεργοποιούνται ως απόκριση σε αποπτωτικά σήματα^[18]. Έχουν αναγνωριστεί 11 κασπάσες στον ανθρώπινο οργανισμό και δρουν μέσω δυο συγκλινουσών αποπτωτικών οδών σηματοδότησης, οι οποίες καλούνται εξωτερική και εσωτερική οδός σηματοδότησης^[18,30].

Κατά την εσωτερική οδό σηματοδότησης, οι εναρκτήριες κασπάσες -8 / -10 και -9 ενεργοποιούν άμεσα τις εκτελεστικές προ-κασπάσες -3 και -7. Η εξωτερική οδός σηματοδότησης ενεργοποιείται με την πρόσδεση συνδεδών θανάτου σε υποδοχείς κυτταρικού θανάτου στη επιφάνεια των μεμβρανών. Οι υποδοχείς αυτοί ανήκουν στην οικογένεια υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκου (tumor necrosis factor (TNF)). Η διέγερση των υποδοχέων προκαλεί μέσω πρωτεϊνών προσαρμογής και «αναμετάδοσης» το σχηματισμό ενός συμπλέγματος σηματοδότησης θανάτου, το οποίο εμπλέκει τις εναρκτήριες πρόδρομες κασπάσες -8 και -10 προκαλώντας το διμερισμό τους και μέσω αυτού την ενεργοποίησή τους. Η κασπάση -8 /-10 με τη σειρά της διασπάται και ενεργοποιεί τις εκτελεστικές πρόδρομες κασπάσες -3 και -7^[18,22,30,31].

Και στους δυο μηχανισμούς η ενεργοποίηση των εναρκτήριων κασπασών (-8/-10 και -9 αντίστοιχα) οδηγεί στην ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασών (κασπάσες -3, -6 και -7)^[30]. Η φωτοδυναμική έχει αναφερθεί ότι προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου Ca^{2+} . Η δράση των ιόντων αυτών παραμένει αδιευκρίνιστη καθώς ορισμένοι ερευνητές τους αποδίδουν προαποπτωτικό ρόλο ενώ άλλοι προστατευτικό^[31].

1.5.1.2 Νέκρωση

Η νέκρωση είναι ένας βίαιος και άμεσος τύπος καταστροφής, ο οποίος μπορεί να επηρεάσει κυτταρικούς πληθυσμούς στο σύνολό τους. Χαρακτηρίζεται από διόγκωση του κυτταροπλάσματος, καταστροφή των οργανιδίων και ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης οδηγώντας σε απελευθέρωση ενδοκυττάριων συστατικών στον εξωκυττάριο χώρο. Στο επίπεδο του ιστού η νέκρωση ενεργοποιεί φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Θεωρείται το τελικό αποτέλεσμα της βιο-ενεργειακής καταστροφής η οποία προκαλείται από μείωση της ATP σε επίπεδα απαγορευτικά για την κυτταρική επιβίωση. Συνήθεις περιγραφές της νέκρωσης ήταν τυχαίος, παθητικός θάνατος, νεότερα ωστόσο δεδομένα υποστηρίζουν ότι το κύτταρο μπορεί ενεργά να προγραμματίσει την νέκρωσή του^[18,22,23].

Αύξηση της φωτοδυναμικής δόσης (δόση ενέργειας, δόση φωτοευαισθητοποιητή) μπορεί να προκαλέσει τροποποίηση του μηχανισμού κυτταρικού θανάτου και το

κύτταρο να οδηγηθεί σε αυτόν μέσω της νέκρωσης και όχι της απόπτωσης. Η μεγάλη παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών στις συνθήκες αυτές προκαλούν δραματική μείωση των επιπέδων της ATP και γενική αναστολή του μεταβολισμού, επάγοντας νέκρωση. Φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι συγκεντρώνονται στην κυτταρική μεμβράνη επάγουν φωτοδυναμικά τη νέκρωση λόγω ρήξης της ακεραιότητας της μεμβράνης, αδυναμίας διατήρησης της ροής των ιόντων διαμέσου αυτής και μείωσης της ενδοκυττάριας ATP. Νέκρωση έχει ωστόσο παρατηρηθεί και από φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι έχουν συγκεντρωθεί και σε ενδοκυττάρια οργανίδια^[18].

1.5.1.3

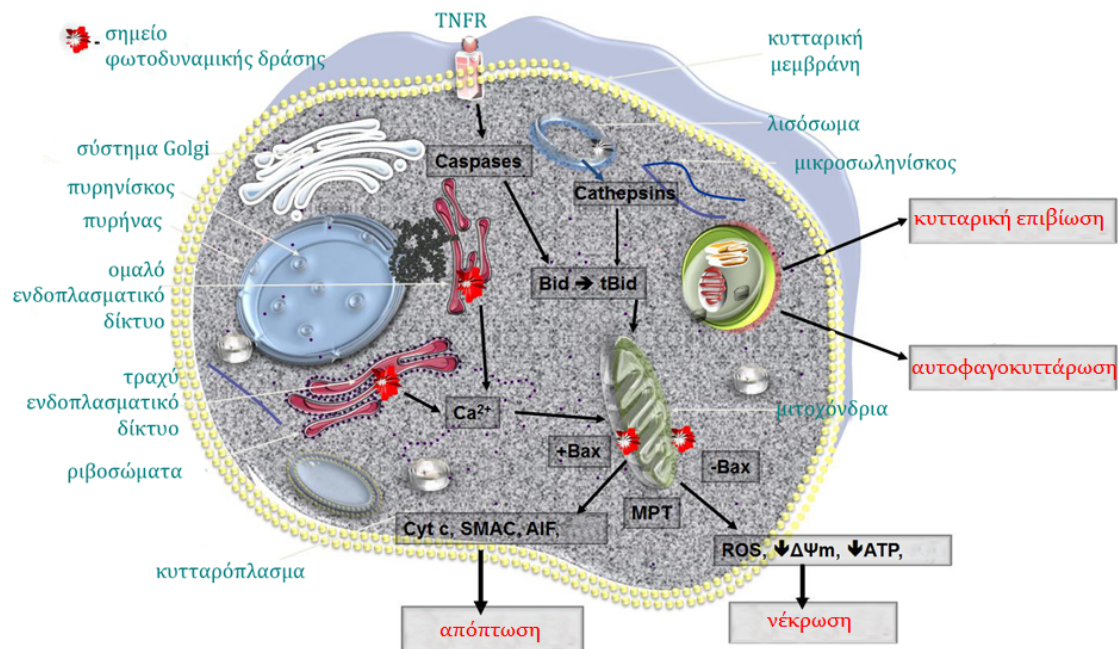
Αυτοφαγία / Αυτοφαγοκυττάρωση

Η αυτοφαγοκυττάρωση είναι μια φυσιολογική διαδικασία του κυττάρου κατά την οποία το κυτοσόλιο και ολόκληρα οργανίδια εσωκλείονται σε ένα κενοτόπιο το οποίο περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη και καλείται αυτοφαγόσωμα (Σχήμα 1.15). Σύντηξη των αυτοφαγοσωμάτων με τα λυσοσώματα προκαλεί διάσπασή τους. Η αυτοφαγοκυττάρωση λειτουργεί ως μηχανισμός επιβίωσης ή προσαρμογής για τη διατήρηση ζωτικών λειτουργιών σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών (έλλειψη τροφής). Επιπλέον μπορεί να δράσει ως μηχανισμός άμυνας, απομακρύνοντας ελαττωματικά οργανίδια, τοξικούς μεταβολίτες ή ενδοκυττάρια παθογόνα, εξασφαλίζοντας την κυτταρική επιβίωση. Σε περιπτώσεις ωστόσο παρατεταμένης αστίας και όχι μόνο, η αυτοφαγοκυττάρωση μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο μέσω εκτεταμένης διάσπασης ζωτικών οργανιδίων αλλά και του κυττάρου, απέλπιδος απόπειρας του οργανισμού να τραφεί από τα ίδια του τα συστατικά^[18, 22, 32].

Καθώς η φωτοδυναμική δρα μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών και μονήρους οξυγόνου η αυτοφαγοκυττάρωση ενεργοποιείται για να απομακρύνει οξειδωτικά φθαρμένα οργανίδια ή για να διασπάσει μεγάλα συσσωματώματα πρωτεϊνών που έχουν σχηματίσει σταυροδεσμούς τα οποία δεν μπορεί άλλος μηχανισμός να διαχειριστεί. Καθώς η αυτοφαγοκυττάρωση είναι μια διαδικασία αυτό-περιορισμού, διατήρησή της έχει ως αποτέλεσμα μεταβολική και ενεργειακή κατάρρευση, αιτίες και οι δύο κυτταρικού θανάτου^[18].

Μελέτες έχουν παρουσιάσει ότι δρα τόσο ως μηχανισμός άμυνας απέναντι στη φωτοδυναμική όσο και ως μηχανισμός κυτταρικού θανάτου επαγόμενος από τη φωτοδυναμική. Σε μικρές φωτοδυναμικές δόσεις η αυτοφαγοκυττάρωση δρα προστατευτικά, πιθανότατα απομακρύνοντας άμεσα φωτο-φθαρμένα μιτοχόνδρια ή ενδοπλασματικό δίκτυο αποτρέποντας τη σηματοδότηση της απόπτωσης η οποία ενεργοποιείται κυρίως από τα οργανίδια αυτά. Σε φωτοδυναμικές δόσεις ικανές να επάγουν κυτταρικό θάνατο η αυτοφαγοκυττάρωση δρα επικουρικά της απόπτωσης,

ενώ κυριαρχεί σε περιπτώσεις κυττάρων που παρουσιάζουν μεγάλη αντίσταση στην απόπτωση^[32].



Σχήμα 1.16: Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου στη φωτοδυναμική. Το είδος του κυτταρικού θανάτου που επάγεται από τη φωτοδυναμική εξαρτάται από την κατανομή του φωτοευαισθητοποιητή, το υποκυττάριο οργανίδιο στο οποίο έχει συγκεντρωθεί και τη φθορά που προκαλεί στο συγκεκριμένο οργανίδιο. Φωτοδυναμική με φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι συγκεντρώνονται στα μιτοχόνδρια οδηγεί σε ρήξη της διαπερατότητας της μεμβράνης και στην έκλυση προ-αποπτωτικών παραγόντων ενώ φθορά στο ενδοπλασματικό δίκτυο θα επιφέρει αποδέσμευση ενδοκυττάρων κοιτασμάτων ασβεστίου. Οι φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι συγκεντρώνονται στα λυσοσώματα θα προκαλέσουν τη αποδέσμευση πρωτεολυτικών ενζύμων μετά την ακτινοβολήσή τους. Τα λυσοσώματα μπορούν επίσης να συντηχηθούν μαζί με τα αυτοφαγοσωμάτια για να υδρολύσουν κατεστραμμένα οργανίδια και να τα ανακυκλώσουν κατά τη διάρκεια της αυτοφαγίας. Όταν η βλάβη είναι εκτεταμένη το κύτταρο δε θα επιβιώσει παρά τη ενεργοποίηση της αυτοφαγίας. Η νέκρωση κ η αυτοφαγία κυριαρχούν όταν ο μηχανισμός της απόπτωσης υπολειτουργεί ή δεν έχει ενεργοποιηθεί. Καθώς όμως οι φωτοευαισθητοποιητές συγκεντρώνονται σε περισσότερο από ένα ενδοκυττάρια οργανίδια είναι πιθανό και οι τρεις μηχανισμοί πρόκλησης κυτταρικού θανάτου να συμβαίνουν ταυτόχρονα^[31].

Σύνοψη

Οι τρόποι με τους οποίους η φωτοδυναμική δράση προκαλεί άμεσο κυτταρικό θάνατο περιλαμβάνουν και τους τρεις παραπάνω μηχανισμούς. Το ποιος από τους τρεις, νέκρωση, απόπτωση ή αυτοφαγοκυττάρωση, θα κυριαρχήσει ή το ποσοστό με το οποίο θα συμμετέχει ο καθένας στο τελικό κυτταροτοξικό αποτέλεσμα εξαρτάται από:

το είδος του κυττάρου, την ενδοκυττάρια κατανομή του φωτοευαισθητοποιητή, τον χρόνο επώασης του φωτοευαισθητοποιητή με τα κύτταρα πριν διεγερθεί από κατάλληλη ακτινοβολία, καθώς και τη δόση ενέργειας που εφαρμόζεται για την ενεργοποίησή του.

Ενδοκυττάρια οργανίδια

Μιτοχόνδρια: Τα μιτοχόνδρια καθορίζουν ίσως περισσότερο από κάθε άλλο οργανίδιο τον επαγόμενο από τη φωτοδυναμική απευθείας κυτταρικό θάνατο^[14]. Τα μιτοχόνδρια, απαραίτητα οργανίδια για τη ζωή καθώς σε αυτά παράγεται η ενέργεια για το μεταβολισμό με τη μορφή της ATP, αποκρίνονται σε εσωτερικά και εξωτερικά ερεθίσματα θανάτου μέσω διαφόρων μηχανισμών με κοινή ωστόσο έκφραση, την αύξηση της διαπερατότητας των μιτοχονδριακών μεμβρανών. Η διαπερατότητα των μεμβρανών προκαλεί έκλυση στο κυτταρόπλασμα διαφόρων αποπτωτικών πρωτεϊνών, αποθηκευμένων στον ενδιάμεσο χώρο των μιτοχονδριακών μεμβρανών^[18].

Κατά την επαγομένη από τη φωτοδυναμική απόπτωση, το δυναμικό της μεμβράνης των μιτοχονδρίων $\Delta\psi_m$ βαθμιαία καταρρέει, τα ενδοκυττάρια αποθέματα ενέργειας (ATP) συνεχώς μειώνονται, η καταστροφή των μιτοχονδρίων καθίσταται πλέον μη αντιστρεπτή και ο κυτταρικός θάνατος μονόδρομος. Η φωτοδυναμική δράση προκαλεί την απελευθέρωση από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα του κυττοχρώματος c, διαδικασία που ελέγχεται από την οικογένεια πρωτεϊνών *Bcl - 2*. Στο κυτοσόλιο το κυτταρόχρωμα c προκαλεί τη σύνδεση του παράγοντα Araf-1 (apoptotic-protease activating factor-1) με την πρόδρομη κασπάση-9 σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο το οποίο καλείται αποπτωσωμάτιο και οδηγεί στην αυτο-διάσπαση και αυτο-ενεργοποίηση της κασπάσης-9. Η ενεργοποιημένη κασπάση-9 ενεργοποιεί με τη σειρά της την κασπάση-3. Η ενεργοποίηση αυτών των ενζύμων μετά τη φωτοδυναμική, οδηγεί στο να διασπαστούν πολλές κυτταρικές πρωτεΐνες, στον κατακερματισμό του DNA και τελικά στον κυτταρικό θάνατο^[18, 22, 31]. Τα μιτοχόνδρια προκαλούν επίσης την ενεργοποίηση θανατηφόρων μονοπατιών και σε άλλα κυτταρικά σημεία και οργανίδια, παρόλο που η απελευθέρωση αποπτωτικών πρωτεϊνών από τα μιτοχόνδρια καθυστερεί^[18].

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας *Bcl - 2* διακρίνονται σε δυο ομάδες ανάλογα με τη δράση τους. Οι *Bcl - 2*, *Bcl - X_L*, *Bcl - w*, *Mcl* και *A1* είναι αντι-αποπτωτικές ενώ οι *Bax*, *Boc*, *Bfm*, *Bcl - X_S* και άλλες προάγουν την απόπτωση. Η ισορροπία ανάμεσα στις δυο αυτές ομάδες καθορίζει το αν το κύτταρο θα επιβιώσει ή εάν θα οδηγηθεί στον κυτταρικό θάνατο. Υπάρχουν αναφορές ότι χορήγηση πρωτεϊνών της προαποπτωτικής ομάδας κατά τη φωτοδυναμική προστάτευσε το κύτταρο από τον επαγόμενο από τη φωτοδυναμική αποπτωτικό θάνατο^[31]. Βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, αλλά και στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στον πυρηνικό φάκελο. Οι

ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται μετά τη φωτοδυναμική πλήττουν τις πρωτεΐνες αυτές οξειδώνοντάς τες και ακυρώνοντας με αυτό τον τρόπο την αντιαποπτωτική τους δράση.

Ενδοπλασματικό δίκτυο: Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το ενδοπλασματικό δίκτυο εκτελεί δυο λειτουργίες. Αποθηκεύει και ελέγχει τη σηματοδότηση του Ca^{2+} . Η δεύτερη λειτουργία σχετίζεται με την αναδίπλωση, την τροποποίηση και την αποικοδόμηση καινούργιων πρωτεϊνών. Διαταραχές στις λειτουργίες αυτές οδηγούν σε στρες το οποίο μπορεί να αλλάξει τον τρόπο αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και ενεργοποίηση του μηχανισμού απόκρισης σε μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response, UPR). Ο μηχανισμός αυτός είναι κυρίως μια αντίδραση με στόχο την επιβίωση. Ενεργοποιείται για να μειώσει τη συγκέντρωση και συσσωμάτωση ελαττωματικών πρωτεϊνών και να αποκαταστήσει τη λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου. Εάν ωστόσο το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο επιμένει τότε μπορεί να ενεργοποιηθεί κυτταρικός θάνατος μέσω μιας αλληλουχίας σημάτων από κασπάσες. Μελέτες έχουν δείξει ότι η φωτοδυναμική διαταράσσει τις λειτουργίες του ενδοπλασματικού δικτύου και προκαλεί κυτταρικό θάνατο μάλλον μέσω του μηχανισμού απόκρισης σε μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες.

Κυτταρόπλασμα: Μετά τη φωτοδυναμική παρατηρούνται αλλαγές τόσο στο σχήμα των κυττάρων και στη δομή του κυτταροσκελετού. Η φωτοδυναμική μπορεί να προκαλέσει φθορά στα ινίδια ακτίνης, δομικά συστατικά του κυτταροσκελετού.

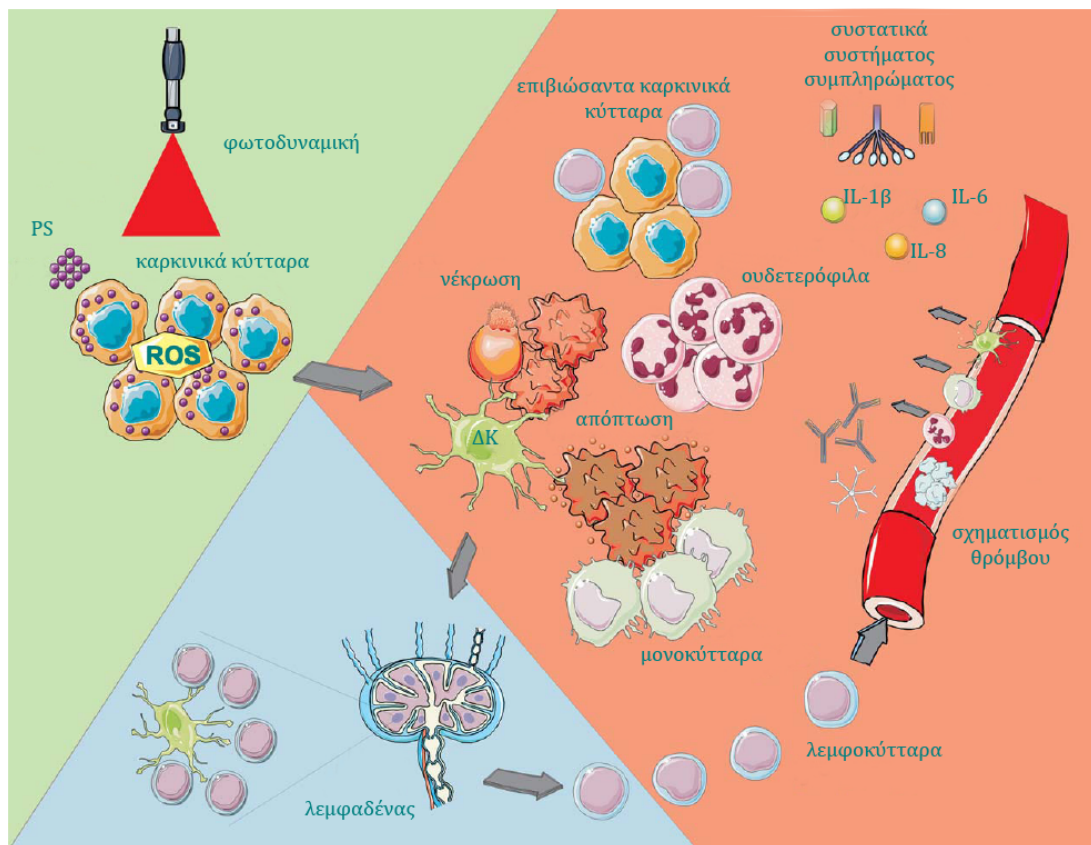
Κυτταρική μεμβράνη: Ο μικρός χρόνος επώασης (3h) των φωτοευαισθητοποιητών με τα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα τη συγκέντρωσή του στην κυτταρική μεμβράνη^[14]. Έχει αναφερθεί διαφορετικό φωτοδυναμικό αποτέλεσμα με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων του ίδιου φωτοευαισθητοποιητή για τον ίδιο χρόνο επώασης. Μικρή δόση είχε ως αποτέλεσμα αναστολή του πολλαπλασιασμού ενώ μεγαλύτερη δόση οδήγησε σε διόγκωση του κυττάρου και ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης^[14].

1.5.2

Καταστροφή αγγειακού δικτύου του καρκινικού ιστού.

Θεωρείται πως η φωτοδυναμική προκαλεί απευθείας καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων του επιθηλιακού τοιχώματος των αγγείων η οποία οδηγεί σε διάρρηξη των αγγείων. Η επίδραση της φωτοδυναμικής στο αγγειακό δίκτυο εξαρτάται από το είδος του φωτοευαισθητοποιητή που χρησιμοποιείται και οι επιδράσεις που έχουν αναφερθεί περιλαμβάνουν στένωση των αιμοφόρων αγγείων, σχηματισμό θρόμβων, διάρρηξη των αγγείων και αιμορραγία. Επιπλέον η φωτοδυναμική εμποδίζει

την έκλυση οξειδίου του αζώτου από τα επιθηλιακά κύτταρα συμβάλλοντας επιπλέον στη διάρρηξη των αγγείων. Η καταστροφή του αγγειακού δικτύου στερεί τον καρκινικό όγκο από οξυγόνο (υποξία) οδηγώντας κυτταρικό θάνατο λόγω ισχαιμίας. Σε αυτό το περιβάλλον με ελλιπές οξυγόνο ευνοούνται μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων οι οποίες συνοδεύονται από έκλυση μεγάλων ποσοτήτων δραστικών οξυγονούχων ειδών. Το οξειδωτικό στρες προκαλεί ενεργοποίηση ουδετερόφιλων και άλλων κυττάρων φλεγμονής προκαλώντας περαιτέρω καταστροφή του καρκινικού όγκου^[8, 18, 21, 33].



Σχήμα 1.17: Μηχανισμοί νέκρωσης καρκινικού όγκου επαγόμενοι από τη φωτοδυναμική. Κύτταρα που έχουν απορροφήσει φωτοευαισθητοποιητή μετά τη διέγερσή του προκαλούν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών. Με τη σειρά τους αυτά προκαλούν: απευθείας κυτταρικό θάνατο κυρίως μέσω απόπτωσης και νέκρωσης, διάρρηξη του αγγειακού δικτύου του όγκου στερώντας από αυτόν οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, ενεργοποίηση φλεγμονωδών αντιδράσεων (ουδετερόφιλα, μακροφάγα και денδριτικά κύτταρα (ΔΚ) επιστρατεύονται). Τα νεκρά και φθαρμένα καρκινικά κύτταρα απομακρύνονται από τα φαγοκύτταρα, τα οποία επιστρέφουν στο τοπικούς κόμβους της λέμφου και διαφοροποιούνται σε κύτταρα με εξειδικευμένα αντιγόνα όπου συμβάλλουν στη δημιουργία λεμφοκυττάρων ευαισθητοποιημένων στον συγκεκριμένο καρκινικό όγκο. Τα εξειδικευμένα λεμφοκύτταρα επιστρέφουν στον καρκινικό όγκο και καταστρέφουν τα εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα^[8].

1.5.3

Ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος

Η φωτοδυναμική συνήθως προκαλεί άμεση, ισχυρή φλεγμονώδη αντίδραση η οποία γίνεται αντιληπτή καθώς σχηματίζεται οίδημα, περιορισμένο στην υπό θεραπεία περιοχή. Η αντίδραση αυτή είναι αποτέλεσμα του επαγομένου από τη φωτοδυναμική οξειδωτικού στρες. Η ενεργοποίηση φλεγμονωδών αντιδράσεων από τη φωτοδυναμική ακολουθείται από μεγάλες αλλαγές στο αγγειακό δίκτυο του όγκου το οποίο γίνεται διαπερατό σε πρωτεΐνες του αίματος και ευπρόσιτο σε κύτταρα φλεγμονής. Τα ουδετερόφιλα κυρίως και λιγότερο τα μονοκύτταρα / μακροφάγα ταχύτατα και μαζικά εισβάλλουν στον υπό φωτοδυναμική θεραπεία καρκινικό όγκο (Σχήμα 1.17). Βασικός τους στόχος είναι να αδρανοποιήσουν την πηγή σημάτων που σχετίζονται με την κυτταρική βλάβη (damage-associated molecular patterns, DAMPDs) και τον κυτταρικό θάνατο (cell death-associated molecular patterns, CDAMPDs), εξουδετερώνοντας δομές του φωτοδυναμικά πληγμένου καρκινικού ιστού που περιέχουν δένδριτες, περιλαμβάνοντας επίσης φθαρμένα ή νεκρά κύτταρα. Η μείωση των κυττάρων αυτών ή η αναστολή της δράσης τους μετά τη φωτοδυναμική έχει φανεί ότι περιορίζει τη δράση της. Ανάμεσα στις κυτταροκίνες ελέγχου των φλεγμονωδών αντιδράσεων αυτές που παίζουν το μεγαλύτερο ρόλο στη φωτοδυναμική καταστροφή του καρκινικού όγκου είναι οι ιντερλευκίνες IL-1β και IL-6^[8, 21].

1.6

Σύγχρονες προκλήσεις στη Φωτοδυναμική Θεραπεία

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μια έξυπνη, εξαιρετικά επιλεκτική και αποτελεσματική θεραπευτική μέθοδος για τη θεραπεία καρκινικών και μη καρκινικών όγκων. Η εμπειρία από τα τελευταία 30 χρόνια κατά τη διάρκεια των οποίων ερευνάται συστηματικά και εφαρμόζεται με επιτυχία αναδεικνύει ότι πρόκειται περί μιας ελκυστικής και αποτελεσματικής καινοτόμου θεραπευτικής μεθόδου. Σε σχέση με τις συμβατικές αντικαρκινικές θεραπείες (π.χ. ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία)

- ☺ Παρουσιάζει μεγάλη επιλεκτικότητα στον καρκινικό όγκο
- ☺ Διατηρεί την ακεραιότητα του ιστού του εξωκυττάρου χώρου γεγονός που επιτρέπει την αναγέννηση / ανάπλαση φυσιολογικού, υγιούς ιστού μετά τη φωτοδυναμική (σε αντίθεση με τη χειρουργική αφαίρεση)

- ☺ Παρουσιάζει μεγαλύτερα ποσοστά ίασης σε περιπτώσεις συγκεκριμένων καρκινικών τύπων (για παράδειγμα στον καρκίνο του οισοφάγου τύπου Barrett)
- ☺ Μπορεί να επαναληφθεί όσες φορές κρίνεται απαραίτητο χωρίς να υπάρχει ο κίνδυνος αύξησης της τοξικότητας (εν αντιθέσει με την ακτινοθεραπεία)
- ☺ Σχετικά χαμηλό κόστος
- ☺ Δεν απαιτεί διαμονή σε νοσοκομείο
- ☺ Μπορεί να εφαρμοστεί σε διαφορετικά στάδια του καρκίνου, από ανακουφιστική θεραπεία σε περιπτώσεις επιθετικών καρκίνων ή επικουρικά μετά τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου ή ως βασικό πρωτόκολλο τόσο για την προληπτική αντιμετώπιση δυσπλασιών όσο και για τη θεραπεία όγκων^[34, 35].

Η ευρύτερη αποδοχή και εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας περιορίζεται από:

- ☞ Την άγνοια για το κόστος του εξοπλισμού, το οποίο θεωρείται μεγάλο
- ☞ Την απουσία επίσημα καθορισμένων πρωτοκόλλων θεραπείας μετά από κλινικές δομικές μεγάλης κλίμακας
- ☞ Την αδυναμία προσέγγισης όγκων μεγάλου βάθους και όγκων οι οποίοι βρίσκονται σε εσωτερικά, συμπαγή όργανα
- ☞ Την παρατεταμένη φωτοευαισθησία, για μεγάλα χρονικά διαστήματα μετά τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή.

Συστήματα ακτινοβολήσης, όπως αυτά των διοδικών lasers με κατάλληλες οπτικές ίνες, μειώνουν σημαντικά το κόστος του εξοπλισμού συμβάλλοντας στην απόκτησή τους από περισσότερα νοσοκομεία και κλινικές. Έτσι η καινοτόμος αυτή θεραπευτική μεθοδολογία μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγαλύτερη κλίμακα, να αποκτηθεί μεγαλύτερη κλινική εμπειρία και να βελτιστοποιηθούν τα θεραπευτικά πρωτόκολλα, αίροντας τα δυο πρώτα προβλήματα^[34].

Οι μεγάλες προκλήσεις ωστόσο επικεντρώνονται στα εξής δυο σημεία:

- ☞ Στην θεραπεία καρκινικών όγκων μεγάλου σχετικά πάχους σε εσωτερικά όργανα
- ☞ Στον έλεγχο ή στην εξάλειψη της σοβαρότερης παρενέργειας της φωτοδυναμικής θεραπείας, της παραμένουσας φωτοευαισθησίας^[34]

Οι προκλήσεις αυτές έθεσαν την έρευνα σε νέες κατευθύνεις ερευνώντας στρατηγικές αντιμετώπισης των προβλημάτων σε διαφορετικά επίπεδα. Όλες οι στρατηγικές ωστόσο συγκλίνουν στη βελτιστοποίηση της απόδοσης της φωτοδυναμικής σε όγκους εν τω βάθει εξαλείφοντας παράλληλα την φωτοευαισθησία. Συγκεκριμένα η έρευνα αφορά τόσο την ενίσχυση των φωτοδυναμικών ιδιοτήτων των φωτοευαισθητοποιητών και την ανάπτυξη συστημάτων ενδοϊστικής ακτινοβόλησης με ακριβή δοσιμετρία όσο και την ευαισθητοποίηση του υπό θεραπεία καρκινικού όγκου στη φωτοδυναμική θεραπεία.

Φωτοευαισθητοποιητές

Η επιτυχία της φωτοδυναμικής εξαρτάται κυρίως από τις φωτοφυσικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες των φωτοευαισθητοποιητών, από την κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρους οξυγόνου και από την ικανότητά τους να συγκεντρώνονται επιλεκτικά και σε μεγάλο ποσοστό στον καρκινικό ιστό ενώ παράλληλα να απομακρύνονται γρήγορα από τον υγιή οργανισμό. Η χρήση νανοσωματιδιακών συστημάτων μεταφοράς των φωτοευαισθητοποιητών και η μετάβαση με αυτόν τον τρόπο στους φωτοευαισθητοποιητές 3^{ης} γενιάς μπορεί να καλύψει τις απαιτήσεις αυτές^[34, 35].

Σύστημα ακτινοβόλησης

Επιπλέον, το σύστημα ακτινοβόλησης είναι καθοριστικό για την επιτυχία της θεραπείας. Μέχρι τώρα η επιτυχία της θεραπείας περιορίζεται σε περιπτώσεις κυρίως επιφανειακών καρκίνων, στο δέρμα, στον οισοφάγο, στον πνεύμονα. Σε όργανα δηλαδή στα οποία η καθοδήγηση του φωτός είναι σχετικά απλή (το φως μέσω ενδοσκοπίων οδηγείται στο υπό θεραπεία όργανο) αλλά κυρίως σε περιπτώσεις καρκινικών όγκων μικρού πάχους.

Καθώς δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν φωτοευαισθητοποιητές με μήκη κύματος απορρόφησης $> 800nm$ (εκεί απορροφούν ασθενώς τα περισσότερα χρωμοφόρα (αιμοσφαιρίνη, μελανίνη) του βιολογικού ιστού και θα μπορούσε να επιτευχθεί μεγαλύτερο βάθος διείσδυσης μέσα στον καρκινικό ιστό, όμως η ενέργεια του

φωτοευαισθητοποιητή δεν επαρκεί για τη διέγερση του μοριακού οξυγόνου σε μονήρες) είναι αναγκαίο να υιοθετηθούν μεθοδολογίες ακτινοβόλησης οι οποίες θα εξασφαλίζουν τη διείσδυση του φωτός σε μεγαλύτερο πάχος μέσα στον ιστό. Στην κατεύθυνση αυτή βρίσκεται η ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία, όπου το φως για την ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή καθοδηγείται ενδοϊστικά στο υπό θεραπεία εσωτερικό όργανο μέσα στον καρκινικό όγκο^[5, 8, 10].

Συνδυαστική φωτοδυναμική – Συνέργια με άλλους παράγοντες

Η φωτοδυναμική θεραπεία προκαλεί την νέκρωση των κυττάρων μέσω των ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών, προϊόντα των φωτοχημικών αντιδράσεων τύπου I και II, τη δράση της ωστόσο ανταγωνίζονται κυτταρικοί μηχανισμοί προστασίας. Οι μηχανισμοί αυτοί ευθύνονται για την ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής άμυνας του κυττάρου απέναντι στο επαγόμενο από τη φωτοδυναμική οξειδωτικό στρες οδηγώντας στην κυτταρική επιβίωση, αναστέλλοντας τη δράση της φωτοδυναμικής^[36].

Η ρήξη της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων είναι μια στρατηγική η οποία θα μπορούσε να ενισχύσει τα θεραπευτικά αποτελέσματα της φωτοδυναμικής, αλλά και των υπόλοιπων θεραπειών οι οποίες λειτουργούν μέσω της πρόκλησης οξειδωτικού στρες^[37].

Η ρήξη της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας και η ευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων στο επαγόμενο από τη φωτοδυναμική οξειδωτικό στρες μπορεί να επιτρέψει τη χορήγηση μικρότερης δόσης φωτοευαισθητοποιητή, μειώνοντας έτσι τη σοβαρότατη παρενέργεια της φωτοευαισθησίας.

Κεφάλαιο II

Φωτοευαίσθητοποιητές

2.1

Εισαγωγή

Μόρια τα οποία παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στην οπτική περιοχή του φάσματος και έχουν την ικανότητα να προκαλούν την παραγωγή μονήρους οξυγόνου υπάρχουν πολλά. Απαραίτητα ωστόσο χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτει μια ουσία για να χρηστεί φωτοευαίσθητοποιητής είναι:

- ☞ *Μέγιστο απορρόφησης στην περιοχή 600 – 850 nm . Η ένταση του προσπίπτοντος φωτός, καθώς διαδίδεται μέσα στον ιστό, μειώνεται εξαιτίας της απορρόφησης από τα εγγενή χρωμοφόρα του ιστού και από τη σκέδαση. Συνέπεια αυτού είναι το περιορισμένο βάθος διείσδυσης δ ($\sim 3mm$). Εξαιρέση αποτελεί το οπτικό παράθυρο των βιολογικών ιστών, περιοχή 600 – 1300 nm, όπου η απορρόφηση από τα χρωμοφόρα μειώνεται και η σκέδαση κυριαρχεί επιτρέποντας τη διείσδυση του φωτός σε μεγαλύτερα βάθη μέσα στον ιστό. Το κάτω όριο της περιοχής μέγιστου απορρόφησης, 600 nm, ορίζεται από αυτό το γεγονός. Το άνω όριο, 850 nm, καθορίζεται από δυο φαινόμενα. Το πρώτο αφορά την απορρόφηση των μορίων του νερού στον ιστό η οποία αυξάνεται σε μήκη κύματος $> 800 nm$. Το δεύτερο καθορίζεται από την ελάχιστη απαραίτητη*

ενέργεια των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή στην τριπλή διεγερμένη στάθμη για να προκαλέσει τη διέγερση του μοριακού οξυγόνου και την παραγωγή μονήρους οξυγόνου. Η ελάχιστη ενέργεια για τη διέγερση του μονήρους οξυγόνου είναι 95kJ mol^{-1} και έχει υπολογιστεί ότι για μήκη κύματος $> 850\text{nm}$ η ενέργεια των φωτοευαισθητοποιητών στην τριπλή διεγερμένη στάθμη δεν επαρκεί για να διεγείρει το μοριακό οξυγόνο καθώς είναι $< 95\text{kJ mol}^{-1}$ [2, 7, 38, 39]. Με τη λογική αυτή προέκυψε η απαραίτητη προϋπόθεση το μέγιστο απορρόφησης να εντοπίζεται στην περιοχή του κόκκινου και εγγύς υπέρυθρου, $600 - 850\text{nm}$.

- ☞ *Ελάχιστη απορρόφηση στην περιοχή $400 - 600\text{nm}$. Μολονότι το βάθος διείσδυσης του φως στην περιοχή αυτή είναι μικρό, μικρότερο από 3mm ανάλογα με το μήκος κύματος, η ένταση του ηλιακού φωτός στη συγκεκριμένη περιοχή έχει τις μέγιστες τιμές της και είναι ικανή να διεγείρει φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι διατηρούν μέγιστα απορρόφησης και σε αυτά τα μήκη κύματος. Η διέγερση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή που έχουν κατακρατηθεί από τα εξωτερικά όργανα του σώματος, το δέρμα και τους οφθαλμούς, οδηγεί σοβαρότερη παρενέργεια της φωτοδυναμικής θεραπείας, τη φωτοευαισθησία^[14, 38].*
- ☞ *Μεγάλη κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρους οξυγόνου ($\Phi_{\Delta} > 0.4$). Η κβαντική απόδοση των περισσοτέρων φωτοευαισθητοποιητών εντοπίζεται στα όρια: $0.3 \leq \Phi_{\Delta} \leq 0.8$ και καθορίζει, μαζί με παράγοντες όπως ο βαθμός συσσωμάτωσης των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή, την ποσότητα μονήρους οξυγόνου που παράγεται κατά τη φωτοδυναμική. Η μεγάλη κβαντική απόδοση εξασφαλίζει μεγάλη αποδοτικότητα παραγωγής κυτταροτοξικών προϊόντων κατά συνέπεια καλύτερη φωτοδυναμική δράση. Η μεγάλη κβαντική απόδοση προαπαιτεί επαρκώς μεγάλη κβαντική απόδοση τριπλής διεγερμένης στάθμης Φ_T , ενέργεια τριπλής διεγερμένης στάθμης $E_T > 95\text{kJ mol}^{-1}$ ικανής για την παραγωγή μονήρους οξυγόνου καθώς και σχετικά μεγάλο χρόνο ζωής τριπλής διεγερμένης στάθμης ($\tau_T > 1\mu\text{s}$). Επιπροσθέτως, οι φωτοευαισθητοποιητές θα πρέπει να έχουν και μεγάλο μοριακό συντελεστή απορρόφησης, μεγαλύτερο από $20000 - 30000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η δόση χορήγησής τους. Όσο μικρότερη η δόση του φωτοευαισθητοποιητή τόσο μικρότερος ο κίνδυνος φωτοευαισθησίας^[14, 38, 39].*
- ☞ *Φωτοσταθερότητα. Οι φωτοευαισθητοποιητές θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα ανθεκτικοί στη φωτοκαταστροφή και στην οξειδωση τόσο από το μονήρες οξυγόνο όσο και από τα υπόλοιπα δραστικά είδη τα οποία δημιουργούνται στο*

σημείο της φωτοδυναμικής δράσης. Οι φωτοσταθεροί φωτοευαισθητοποιητές είναι προτιμητέοι καθώς να μπορούν να ακτινοβολούνται για μεγάλο χρόνο χωρίς να αλλοιώνονται οι φωτοδυναμικές τους ιδιότητες^[7, 40]. Από την άλλη ωστόσο, ανάλογα και με το ρυθμό απομάκρυνσης του φωτοευαισθητοποιητή από τα κύτταρα και τους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού, η μεγάλη φωτοσταθερότητα δε συμβάλει στον περιορισμό της φωτοευαισθησίας^[38].

Φωτοκαταστροφή

Το φαινόμενο κατά το οποίο το χρωμοφόρο χάνει μόνιμα την ικανότητά του να φθορίζει λόγω φωτο-παραγόμενης χημικής καταστροφής και τροποποίησης της χημικής δομής του καλείται φωτοκαταστροφή ή φωτολεύκανση (photobleaching). Τα μόρια κατά τη διέγερσή τους από τη βασική στη μονήρη διεγερμένη στάθμη και κατόπιν κατά τη μετάβασή τους στην τριπλή διεγερμένη στάθμη αλληλεπιδρούν με μόρια του περιβάλλοντός τους με συνέπεια να υφίστανται μη αντιστρεπτές τροποποιήσεις στη χημική τους δομή. Ο μέσος αριθμός κύκλων διέγερσης εκπομπής πριν τη φωτοκαταστροφή του μορίου εξαρτάται από τη χημική δομή του και από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται. Μερικά χρωμοφόρα φωτοκαταστρέφονται σχεδόν αμέσως με τη διέγερσή τους ενώ άλλα είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά σε αυτή και εκτελώντας χιλιάδες κύκλους προτού φωτοκαταστραφούν. Η φωτοκαταστροφή συμβαίνει μετά από παρατεταμένο φωτισμό του χρωμοφόρου στο μήκος κύματος διέγερσής του. Ο ρυθμός φωτοκαταστροφής είναι ανάλογος της έντασης του φωτός διέγερσης.

Οι φωτοευαισθητοποιητές θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από τα παραπάνω γνωρίσματα για να εξασφαλίζουν αποτελεσματική φωτοδυναμική δράση. Κατά την έκθεσή τους ωστόσο στο φως διέγερσης είναι ευάλωτοι σε φωτοχημικές διεργασίες οι οποίες μπορούν τελικά να μειώσουν την κβαντική τους απόδοση. Η φωτοκαταστροφή είναι η σοβαρότερη από αυτές, ενώ η φωτο-τροποποίηση και η φωτο-αναδιάταξη της ενδοκυττάριας χωρικής κατανομής των φωτοευαισθητοποιητών επηρεάζουν επίσης την κβαντική απόδοσή τους, μειώνοντας τη φωτοδυναμική τους δράση^[7, 40].

Η φωτοκαταστροφή προκαλεί μη αναστρέψιμη φθορά στον φωτοευαισθητοποιητή, συγκεκριμένα τη διάσπαση του μορίου φωτοευαισθητοποιητή σε μικρότερα τμήματα τα οποία δε διατηρούν τις οπτικές ιδιότητες του μητρικού μορίου. Φωτοκαταστροφή μπορεί να προκύψει μετά από έκθεση του φωτοευαισθητοποιητή σε έντονο φως διέγερσης ή μετά από παρατεταμένη έκθεσή του σε αυτό. Κατά συνέπεια οι φωτοευαισθητοποιητές που υφίστανται φωτοκαταστροφή χάνουν την ικανότητά τους να απορροφούν φως άρα και να δρουν φωτοδυναμικά ^[6, 7, 40].

Γενικά η φωτοκαταστροφή μετράται ως η μείωση του φθορισμού σε σχέση με το χρόνο, αφού η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της φθορίζουσας ουσίας. Μέτρηση της φωτοκαταστροφής σε επίπεδο ιστού είναι μάλλον άτοπη καθώς εκεί η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή επηρεάζεται και από άλλα φαινόμενα όπως είναι ο βαθμός συσσωμάτωσης των μορίων του και το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού^[6].

Κατά την φωτοτροποποίηση η χημική αλλαγή είναι μικρότερη. Οι επιθέσεις που δέχονται τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή από ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη οδηγούν στην τροποποίηση των πλευρικών ομάδων ή / και του μοριακού σκελετού του φωτοευαισθητοποιητή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αλλάζουν οι οπτικές του ιδιότητες^[7, 40].

2.2

Ιδιότητες ιδανικού φωτοευαισθητοποιητή

Οι παραπάνω ιδιότητες είναι απαραίτητο να πληρούνται για να χρησιμοποιηθεί μια ουσία στη φωτοδυναμική. Επιπλέον των χαρακτηριστικών αυτών έχουν επισημανθεί ιδιότητες τις οποίες θα πρέπει να φέρει η ουσία αυτή ώστε να προσεγγίζει τα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού φωτοευαισθητοποιητή^[2, 41]. Οι ιδιότητες αυτές καλύπτουν όλο το φάσμα των φυσικών, χημικών και φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων του φωτοευαισθητοποιητή και επεκτείνονται και στο κατά πόσο μπορεί εύκολα και με το χαμηλότερο κόστος να παραχθεί για εμπορική χρήση^[42, 43].

2.2.1

Φωτοφυσικά και φωτοχημικά χαρακτηριστικά

Οι πλέον σημαντικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τον ιδανικό φωτοευαισθητοποιητή είναι η μεγάλη κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρους οξυγόνου στην τριπλή διεγερμένη στάθμη και ο μεγάλος χρόνος ζωής στην τριπλή διεγερμένη στάθμη. Οι ιδιότητες αυτές εξασφαλίζουν υψηλή αποδοτικότητα στην παραγωγή κυτταροτοξικών προϊόντων. Επιπλέον όσο το μήκος κύματος πλησιάζει το ανώτατο όριο, τα 850nm , το βάθος διείσδυσης αυξάνει αγγίζοντας και τα 8m . Τα βιολογικά φαινόμενα που παράγονται από τη δράση του φωτός εκτείνονται στο διπλάσιο ή και τριπλάσιο βάθος φτάνοντας ακόμα και σε 2.5cm βάθος^[43].

Φθορισμός: Φωτοευαισθητοποιητής ο οποίος διαθέτει και την ιδιότητα του φθορισμού μπορεί να αξιοποιηθεί πολλαπλά κατά τη φωτοδυναμική. Καταρχήν μπορεί

να χρησιμοποιηθεί για ακριβή εντοπισμό του καρκινικού όγκου αλλά και για δοσιμετρία. Αλλαγές στον φθορισμό μπορούν να ενσωματωθούν σε ένα σύστημα δοσιμετρίας επιτρέποντας στον θεράποντα να διαπιστώσει πόσο αποτελεσματικό είναι το θεραπευτικό πρωτόκολλο σε πραγματικό χρόνο. Επιπλέον μπορεί να αξιοποιηθεί και για οπτική διάγνωση^[38, 41, 42].

Αμφιφιλικότητα: Μεγάλη σημασία για την χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή στον οργανισμό έχει η διαλυτότητά του. Η αμφιφιλικότητα εξασφαλίζει αφενός τη μεταφορά του φωτοευαισθητοποιητή μέσω του αίματος χωρίς το σχηματισμό συσσωματωμάτων ή καθίζηση των μορίων, αφετέρου αποτελεσματική διείσδυση διαμέσου του λιπιδικού στρώματος της κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου. Επιπλέον, τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή θα πρέπει να έχουν χαμηλή τάση για σχηματισμό συσσωματωμάτων καθώς η συσσωμάτωση μειώνει την ικανότητα του φωτοευαισθητοποιητή στο να απορροφήσει φως, το χρόνο ζωής και την κβαντική απόδοση στην τριπλή διεγερμένη στάθμη^[42].

Χημική καθαρότητα: Ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να έχει χημική καθαρότητα, συγκεκριμένη δηλαδή χημική σύσταση καθώς αυτό κάνει περισσότερο εύκολες τις μελέτες του μεταβολισμού και της φαρμακοκινητικής του. Ιδανικά θα πρέπει να είναι καθαρή ουσία και όχι μείγμα ουσιών για να είναι εύκολη, οικονομική και πρακτική σε βιομηχανική κλίμακα η παρασκευή του^[38, 39].

2.2.2

Φαρμακολογικά χαρακτηριστικά

Επιλεκτικότητα: Η σημαντικότερη φαρμακολογική ιδιότητα που πρέπει να έχει ένας φωτοευαισθητοποιητής είναι η επιλεκτικότητα. Να έχει δηλαδή την ικανότητα να συγκεντρώνεται επιλεκτικά στον καρκινικό ιστό και όχι στον περιβάλλοντά του υγιή ιστό, αποτρέποντας με τον τρόπο αυτό τη φωτοκαταστροφή των γειτονικών φυσιολογικών περιοχών. Η επιλεκτικότητα του φωτοευαισθητοποιητή στους καρκινικούς ιστούς έχει αναφερθεί ότι οφείλεται: στη μεγάλη αγγειακή διαπερατότητα του φωτοευαισθητοποιητή προς τον καρκινικό όγκο, στο χαμηλό pH στον εξωκυττάριο χώρο του όγκου, στην ισχυρή «έλξη» του από τα συνεχώς πολλαπλασιαζόμενα ενδοθηλιακά/καρκινικά κύτταρα, καθώς τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση υποδοχέων λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας, στη μειωμένη λειτουργία του λεμφικού συστήματος των όγκων ή τέλος στο μεγάλο αριθμό σχετιζόμενων με τον όγκο μακροφάγων τα οποία προκαλούν φαγοκύτωση και μονομερισμό του συσσωματωμένου φωτοευαισθητοποιητή^[7, 38, 41].

Έλλειψη τοξικότητας: Ο ιδανικός φωτοευαισθητοποιητής στις δόσεις που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική, δεν θα πρέπει να είναι τοξικός χωρίς να έχει

διεγερθεί. Επιπλέον ούτε η φωτοκαταστροφή ούτε ο κυτταρικός του μεταβολισμός θα πρέπει να παράγουν τοξικά προϊόντα. Κυρίως όμως ο φωτοευαισθητοποιητής δεν θα πρέπει να προκαλεί μεταλλάξεις ανεξάρτητα από το αν έχει δεχτεί φως ή όχι. Αυτό με τη σειρά του εξαρτάται από την ασθενή τάση του να εισέρχεται ή να επαναδιαχέεται στον κυτταρικό πυρήνα^[7, 38, 39, 41].

Ταχεία αποδέσμευση: Μετά τη φωτοδυναμική, η αποδέσμευση του φωτοευαισθητοποιητή από τον οργανισμό θα πρέπει να είναι ταχύτατη για να ελαχιστοποιηθεί η περίοδος της φωτοευαισθησίας^[14].

2.2.3

Φωτοθεραπευτικά χαρακτηριστικά

Χαμηλή παραμένουσα φωτοευαισθησία: Το βασικότερο μειονέκτημα της φωτοδυναμικής θεραπείας στην παρούσα της μορφή είναι η παραμένουσα φωτοευαισθησία, η οποία μπορεί να διαρκέσει αρκετές εβδομάδες μειώνοντας την ποιότητα ζωής του ασθενούς. Ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει επομένως να εξασφαλίζει ελάχιστη συγκέντρωση στο δέρμα ώστε να αποφεύγεται η δερματική φωτοευαισθησία^[14, 41].

Ιδανικά, τέλος, θα πρέπει να είναι εμπορικά διαθέσιμος.

2.3

Κατηγοριοποίηση φωτοευαισθητοποιητών

Οι φωτοευαισθητοποιητές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με τη χημική τους σύσταση, τη γενιά τους, καθώς και το που στοχεύουν.

Γενιές

Η 1^η γενιά φωτοευαισθητοποιητών ουσιαστικά αναφέρεται στις πορφυρίνες και περιλαμβάνει την αιματοπορφυρίνη και τα παράγωγά της. Με μέγιστο απορρόφησης στα 630nm το βάθος διείσδυσης στον καρκινικό όγκο ήταν μικρό. Επιπλέον η επιλεκτικότητά τους και η κβαντική τους απόδοση ήταν χαμηλή, ενώ η απομάκρυνσή τους από τον οργανισμό του ασθενούς εξαιρετικά αργή γεγονός που συνεπαγόταν μεγάλη περίοδο φωτοευαισθησίας^[41, 42].

Η 2^η γενιά αναπτύχθηκε για να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα των φωτοευαισθητοποιητών της 1^{ης} γενιάς, κυρίως η χαμηλή κβαντική απόδοση και η μεγάλη περίοδος παραμένουσας φωτοευαισθησίας. Οι φωτοευαισθητοποιητές της 2^{ης}

γενιάς δεν ήταν πολύπλοκα μείγματα διαφορετικών συστατικών, αλλά «καθαρές» ουσίες γεγονός που βοηθά την ανάπτυξη και παραγωγή τους σε μεγάλη κλίμακα. Έχουν μεγάλους συντελεστές απορρόφησης και μεγαλύτερη κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρους οξυγόνου. Έχουν κορυφές απορρόφησης στο κόκκινο (660 – 700nm) ή στο εγγύς υπέρυθρο (700 – 850nm). Αν και σημαντικά βελτιωμένοι σε σχέση με την 1^η γενιά, εξακολουθούν να παρουσιάζουν χαμηλή επιλεκτικότητα στους καρκινικούς όγκους και παρατεταμένη φωτοευαισθησία, παρότι αποβάλλονται ταχύτερα από τον οργανισμό.

Η 3^η γενιά περιλαμβάνει φωτοευαισθητοποιητές της 1^{ης} και της 2^{ης} γενιάς οι οποίοι προσδένονται ή εγκλείονται σε συστήματα μεταφοράς, για παράδειγμα αντισώματα ή νανοσωματίδια. Αναπτύσσεται για να βελτιώσει τα φαρμακολογικά και φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά των φωτοευαισθητοποιητών της 1^{ης} και της 2^{ης} γενιάς, την επιλεκτικότητα και τη συγκέντρωσή τους στον καρκινικό όγκο^[41, 42].

Οικογένειες φωτοευαισθητοποιητών

Ανάλογα με τη χημική τους σύσταση οι φωτοευαισθητοποιητές κατατάσσονται σε τρεις μεγάλες οικογένειες. Η πρώτη οικογένεια που ανακαλύφθηκε ήταν οι πορφυρίνες και περιλαμβάνει κυρίως παράγωγα της αιματοπορφυρίνης. Μείγματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις μονομερών, διμερών και ολιγομερών παραγώγων της αιματοπορφυρίνης παρασκευάζονταν και κυκλοφορούσαν εμπορικά κυρίως μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1980. Παρότι οι φωτοευαισθητοποιητές αυτοί είχαν τελικά διαφορετικές φωτοφυσικές ιδιότητες η συμπεριφορά τους, ωστόσο, ως προς το φωτοδυναμική θεραπευτικό αποτέλεσμα ήταν παρόμοια.

Στη δεύτερη οικογένεια ανήκουν φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι είναι παράγωγα χλωροφύλλης ή η χημική τους σύσταση είναι παρόμοια με αυτή. Η οικογένεια αυτή ονομάζεται οικογένεια των χλωρινών και περιλαμβάνει επίσης και τις πουρίνες, προϊόντα αποδόμησης της χλωροφύλλης.

Τέλος η τρίτη οικογένεια είναι η οικογένεια των χρωστικών στην οποία ανήκουν οι φθαλοκυανίνες και οι ναφθαλοκυανίνες^[6, 41].

2.3.1

Οικογένεια πορφυρινών

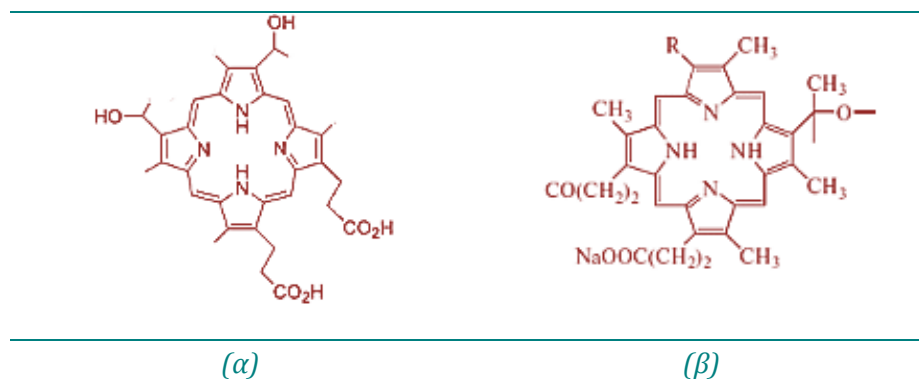
α. Photofrin

Ο πλέον χρησιμοποιούμενος, μελετημένος και γνωστός φωτοευαισθητοποιητής είναι η Photofrin (εμπορική ονομασία) αλλιώς γνωστός και ως Porfimer sodium. Είναι

επίσης ο πρώτος φωτοευαισθητοποιητής ο οποίος πήρε έγκριση από τον αρμόδιο οργανισμό έγκρισης φαρμάκων στον Καναδά το 1993 για φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνου στην κύστη^[11, 39].

Ακολούθησε έγκριση από τους αντίστοιχους οργανισμούς των Η.Π.Α., της Ευρώπης και της Ιαπωνίας για φωτοδυναμική θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνων, μεταξύ των οποίων καρκίνου του τραχήλου και του οισοφάγου.

Η Photofrin αποτελούνταν από ένα πολύπλοκο μείγμα μονομερών, διμερών και ολιγομερών της αιματοπορφυρίνης. Τροποποιήσεις στη σύσταση του μείγματος έδωσαν κατά καιρούς φωτοευαισθητοποιητές με ελαφρώς διαφορετικές φωτοφυσικές ιδιότητες^[41, 42]. Το βασικό μείγμα της Photofrin αποτελείται από περίπου 60 συστατικά-παράγωγα πορφυρίνης γενογός που καθιστά τη βιομηχανική του παραγωγή δύσκολη^[43]



Σχήμα 2.1: Δομή παραγώγου αιματοπορφυρίνης (α) και της Photofrin (β)

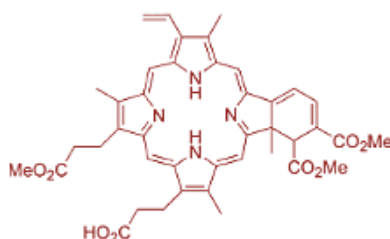
Η Photofrin, όπως και άλλοι φωτοευαισθητοποιητές - παράγωγα αιματοπορφυρίνης, παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στα 630nm , στο κάτω όριο του οπτικού παραθύρου, όπου το βάθος διείσδυσης είναι περιορισμένο, $\sim 1.6\text{mm}$ ^[6, 39]. Επιπλέον η κβαντική τους απόδοση είναι χαμηλή ($\varphi \sim 0.5$ ή $\varphi \sim 0.01$ σε *PBS*) με συντελεστή μοριακής απορρόφησης σύμφωνα με ορισμένες αναφορές $\varepsilon \sim 3000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ενώ σύμφωνα με άλλες $\varepsilon \sim 1170\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ έτσι απαιτούνται μεγαλύτεροι χρόνοι ακτινοβόλησης για να παραχθεί το μονήρες οξυγόνο^[2, 6, 43]. Τέλος η χαμηλή επιλεκτικότητα του φωτοευαισθητοποιητή στους καρκινικούς ιστούς κυρίως όμως ο μεγάλος χρόνος απομάκρυνσης του από τον οργανισμό έχουν ως αποτέλεσμα την εξαιρετικά σοβαρή παρενέργεια της παραμένουσας φωτοευαισθησίας, έως και 8 εβδομάδες μετά τη χορήγησή του^[2, 6, 42, 43]. Στην κλινική πράξη συνήθως χορηγείται στα $2 - 5\text{mg/kg}$ και η διέγερσή του γίνεται 48h αργότερα με δόσεις ενέργειας $100 - 200\text{J/cm}^2$. Το πρωτόκολλο αυτό με τροποποιήσεις ως προς τις φωτοδυναμικές παραμέτρους έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε περιπτώσεις καρκίνων στο δέρμα, στους πνεύμονες, στην κύστη και στον οισοφάγο^[2, 39, 41, 42]. Αν και αυτές οι δόσεις του φωτοευαισθητοποιητή θεραπεύουν τον καρκινικό όγκο η σημαντική φωτοευαισθησία

που προκαλείται, αποτέλεσμα της μεγάλης δόσης του και του αργού ρυθμού απομάκρυνσής του από τον οργανισμό προβληματίζει ισχυρά για το κατά πόσο είναι ωφέλιμος τελικά^[43].

β. Παράγωγα Βενζοπορφυρίνης (BPD)

Η Verteporfin (εμπορικό όνομα Visudyne) είναι το πλέον γνωστό παράγωγο βενζοπορφυρίνης. Στην κλινική πράξη χρησιμοποιείται η εγκλεισμένη σε λιποσώματα μορφή της Verteporfin καθώς από τη φύση της είναι πρακτικά αδιάλυτη σε υδατικά μέσα^[42].

Παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 690nm, εξασφαλίζοντας διείσδυση σε μεγαλύτερο βάθος μέσα στον ιστό, σχετικά μεγάλο συντελεστή μοριακής απορρόφησης, $\varepsilon \sim 35000 M^{-1}cm^{-1}$, καθώς και κβαντική απόδοση $\Phi_{\Delta} = 0.7$ (σε μεθανόλη) [2, 43].



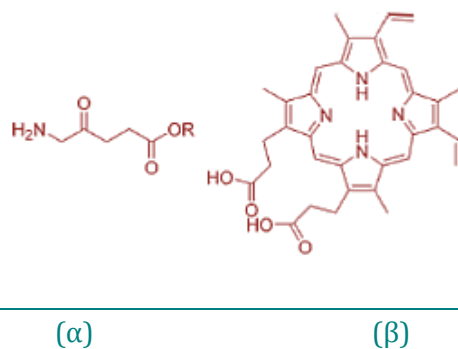
Visudyne

Σχήμα 2.2: Δομή Verteporfin

Αποβάλλεται σχετικά γρήγορα από τον οργανισμό με περίοδο παραμένουσας φωτοευαισθησίας της τάξης των μερικών ημερών (3 – 5 ημέρες)^[43]. Η Verteporfin χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη για την θεραπεία της εκφύλισης της ωχράς κηλίδας. Ένα τυπικό πρωτόκολλο περιλαμβάνει την ενδοφλέβια χορήγηση 6mg/kg Verteporfin 30min πριν την ακτινοβολήση με δόση ενέργειας 100 J/cm²^[41].

γ. 5-Αμινολεβουλινικό οξύ (ALA)

Ο πιο γνωστός φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς είναι το 5 - Αμινολεβουλινικό οξύ, ALA, ένα φυσικό αμινοξύ το οποίο είναι πρόδρομη ένωση της πρωτοπορφυρίνης IX (Pp IX) στη μεταβολική πορεία της αίμης. Η πρωτοπορφυρίνη IX μετατρέπεται σε αίμη μέσω της δράσης του ενζύμου σιδηροχηλιτάση (ferrochelatase). Υπό κανονικές συνθήκες, η βιοσύνθεση της πρωτοπορφυρίνης IX από το μεταβολισμό περιορίζεται σε μικρές ποσότητες, ακατάλληλες για τη φωτοδυναμική θεραπεία.



Σχήμα 2.3: Δομή ALA (α) και πρωτοπορφυρίνης IX (β)

Όταν όμως περισσότερη ποσότητα ALA χορηγηθεί στον ασθενή η δράση του ενζύμου αυτού εξουδετερώνεται. Επιπρόσθετα, σε ορισμένους καρκινικούς όγκους τα επίπεδα του ενζύμου είναι χαμηλότερα σε σχέση με τον υγιή ιστό. Ο συνδυασμός των δυο αυτών στοιχείων επιτρέπει την επιλεκτική υψηλή συσσώρευση της πρωτοπορφυρίνης IX στον καρκινικό όγκο σε σχέση με τους περιβάλλοντές του υγιείς ιστούς. Η μέγιστη συγκέντρωση της πρωτοπορφυρίνης IX στον καρκινικό όγκο ολοκληρώνεται μέσα σε 1 – 6h από τη χορήγηση του ALA^[42, 43].

Το 5-ALA έχει μέγιστο απορρόφησης στα 635nm άρα και μικρό βάθος διείσδυσης μέσα στον ιστό. Επιπλέον ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης είναι σχετικά μικρός, $\epsilon < 5000 M^{-1} cm^{-1}$, γεγονός που το καθιστά αδύναμο στο να προκαλέσει ικανοποιητική παραγωγή μονήρους οξυγόνου και χρειάζονται σχετικά υψηλές ενέργειες και μεγάλοι χρόνοι ακτινοβόλησης για την ενεργοποίησή του^[41, 43]. Λόγω του πόνου που συνοδεύει την τοπική χορήγησή του είναι απαραίτητη η αναισθησία της υπό θεραπείας περιοχής^[41]. Η φωτοδυναμική θεραπεία με το 5-ALA έχει πάρει έγκριση από την Ευρωπαϊκή Ένωση και εφαρμόζεται με επιτυχία σε περιπτώσεις δερματικών καρκίνων (βασοκυτταρικό και ανανθοκυτταρικό) που δεν ξεπερνούν σε βάθος τα 0.2cm^[44]. Ένα συνηθισμένο πρωτόκολλο σε αυτές τις περιπτώσεις είναι επάλειψη σκευάσματος που περιέχει 20% ALA στην καρκινική περιοχή ~4h πριν την ακτινοβόληση με δόση ενέργειας 150 J/cm²^[41].

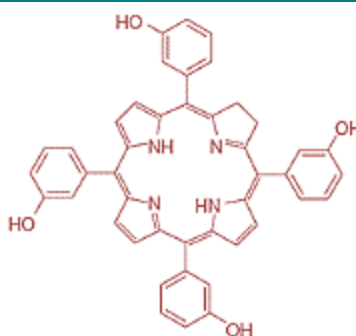
2.3.2

Οικογένεια χλωρινών

α. m-THPC

Η 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροχλωρίνη (m-THPC) γνωστή και ως Temoporfin ή με τη εμπορική ονομασία Foscan[®] είναι ένας από τους πλέον αποδοτικούς, αν όχι ο αποδοτικότερος, φωτοευαισθητοποιητές^[43, 45, 46]

Η m-THPC συγκεντρώνει τα περισσότερα χαρακτηριστικά γνωρίσματα, όπως αυτά ορίστηκαν προηγούμενα, τα οποία ιδανικά θα έπρεπε να έχει ένας ιδανικός φωτοευαίσθητοποιητής. Μπορεί να παρασκευαστεί χημικά με σχετική ευκολία, καθώς είναι ένα «καθαρό» μόριο και όχι πολύπλοκο μείγμα πολλών συστατικών (όπως η Photofrin). Συγκεντρώνεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στον καρκινικό ιστό σε σχέση με τον υγιή, ποσοστό μεγαλύτερο από των υπολοίπων φωτοευαίσθητοποιητών. Με μέγιστο απορρόφησης στα 652 nm εξασφαλίζει μεγαλύτερο βάθος διείσδυσης μέσα στον όγκο. Επιπλέον ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης $\varepsilon \sim 30\,000\,M^{-1}cm^{-1}$ είναι μεγάλος. Παρόλο που η κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρους οξυγόνου είναι σχετικά μικρή, $\Phi_{\Delta} \sim 0.4$ σε DMSO, η μεγάλη αποδοτικότητα της m-THPC στη φωτοδυναμική οφείλεται τη μεγάλη ικανότητά της να προκαλεί φωτοκυτταροτοξικές αντιδράσεις^[2, 6, 39, 43, 45, 46]. Η αποδοτικότητά του στη φωτοδυναμική είναι 100 φορές περίπου καλύτερη από τη Photofrin στις ίδιες πειραματικές συνθήκες (ίδια δόση φωτοευαίσθητοποιητή και ενέργειας) επιτρέποντας τη χρήση μικρότερων δόσεων m-THPC και λιγότερο χρόνου ακτινοβολήσης^[2, 39]. Έχει δειχτεί, πράγματι, ότι προκαλεί εκτεταμένες βλάβες στο καρκινικό κύτταρο σε μικρές συγκεντρώσεις και δόσεις ενέργειας^[47].



m-THPC

Σχήμα 2.4: Δομή m-THPC

Στην κλινική πράξη συνήθως χορηγείται ενδοφλέβια, σε υδατικό διάλυμα πολυαιθυλενογλυκόλης, σε δόση 0.15mg/kg. Ακολουθεί ακτινοβολήση στα 652 nm, 24 – 96h αργότερα, με δόσεις ενέργειας 5 – 10 J/cm². Η περίοδος φωτοευαισθησίας διαρκεί έως έξι εβδομάδες αλλά οι περισσότερες αναφορές συγκλίνουν στις 2 – 4 εβδομάδες^[2, 41, 42].

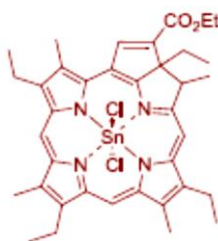
Έχει πάρει έγκριση από την Ευρωπαϊκή Ένωση για συμπληρωματική-ανακουφιστική θεραπεία καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου σε προχωρημένο στάδιο^[48, 49]. Κλινικά δοκιμάζεται και σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως ο βασοκυτταρικός και ο καρκίνος του προστάτη^[50, 51]. Η m-THPC είναι ένα εξαιρετικά υδρόφοβο μόριο και σε αυτήν την ιδιότητά της οφείλεται η αυξημένη δέσμευσή της

στην κυτταρική μεμβράνη και στις πρωτεΐνες του πλάσματος. Αντίθετα με τους περισσότερους φωτοευαισθητοποιητές, τα μιτοχόνδρια δεν είναι το κύριο οργανίδιο ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της *m*-THPC. Το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύστημα Golgi είναι τα σημεία στα οποία παρατηρείται η μεγαλύτερη ενδοκυττάρια συγκέντρωση της *m*-THPC^[52].

β. Purpurin

Η tin-ethyl-etiorpurin (SnET2, Purlytin) είναι ένα προϊόν διάσπασης της χλωροφύλλης.

Το μόριο αυτό, αν και συντίθεται εργαστηριακά, είναι «καθαρό», δεν είναι πολύπλοκο μείγμα, αλλά η σύνθεσή του είναι ιδιαίτερα απαιτητική καθώς είναι εξαιρετικά ασταθές, πρακτικά αδιάλυτο στο νερό, και πρέπει να εγκλείεται σε λιποσώματα για να χορηγηθεί στον ασθενή^[53]. Έχει μέγιστο απορρόφησης στα 660nm, εξασφαλίζοντας ικανοποιητικό βάθος διείσδυσης και μοριακό συντελεστή απορρόφησης $\epsilon \sim 28\,000\,M^{-1}cm^{-1}$ ^[39].



Purlytin

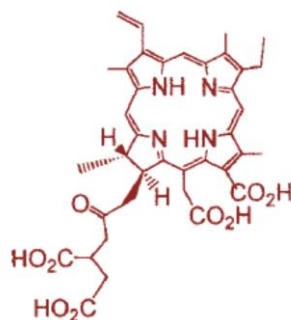
Σχήμα 2.5: Δομή tin-ethyl-etiorpurin

Χρειάζεται σχετικά μικρούς χρόνους ακτινοβόλησης για να ενεργοποιηθεί και ένα τυπικό πρωτόκολλο περιλαμβάνει χορήγηση 1.2 mg/kg, 24h πριν την ακτινοβόληση με δόση ενέργειας 200 J/cm². Έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε περιπτώσεις μη μελανωματικών καρκίνων του δέρματος, δίνοντας πολύ καλά κοσμετολογικά αποτελέσματα. Ωστόσο προκαλεί αλλεργικές αντιδράσεις^[2, 42, 43]

γ. NPe6

Ένα ακόμα παράγωγο της χλωροφύλλης είναι η mono-L-aspartyl chlorine ε6, NPe6. Έχει πάρει έγκριση για φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνου στον πνεύμονα στην

Ιαπωνία. Είναι υδατοδιαλυτή και παρουσιάζει πολύ χαμηλή παραμένουσα φωτοευαισθησία καθώς αποβάλλεται πολύ γρήγορα από τον οργανισμό^[6, 39].



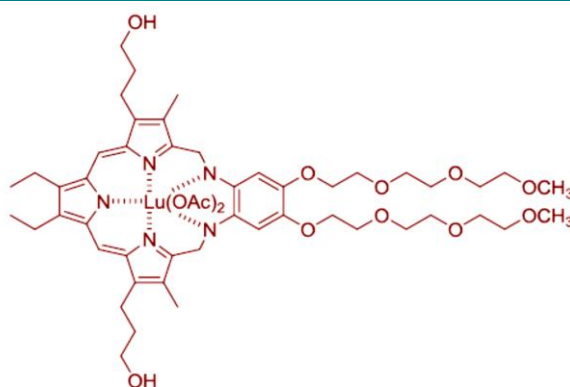
NPe6

Σχήμα 2.6: Δομή *monoaspartyl chlorophyll a*

Διεγείρεται στα 664nm με μοριακό συντελεστή απορρόφησης $\epsilon \sim 40\,000\,M^{-1}cm^{-1}$ ^[39]. Οι πρώτες δοκιμές περιελάμβαναν χορήγηση 2.5 – 3.5 mg/kg και ακτινοβολήση με δόση ενέργειας 100 J/cm² 4h αργότερα. Παρουσιάζει ωστόσο χαμηλή επιλεκτικότητα στον καρκινικό ιστό^[41].

δ. Lutrin®

Ο Lutetium texaphyrin (Lutrin®, Lu-Tex) είναι ένας υδατοδιαλυτός φωτοευαισθητοποιητής 2^{ης} γενιάς με μεγάλη επιλεκτικότητα στον καρκινικό ιστό.



Lutrin

Σχήμα 2.7: Δομή Lutetium texaphyrin

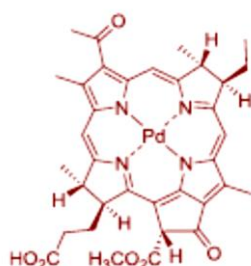
Έχει μέγιστο απορρόφησης στα 732nm, με μεγάλο μοριακό συντελεστή απορρόφησης $\epsilon \sim 42\,000\,M^{-1}cm^{-1}$. Η κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρους οξυγόνου ωστόσο είναι χαμηλή $\Phi_{\Delta} \sim 0.11$ σε μεθανόλη. Ένα τυπικό πρωτόκολλο

περιλαμβάνει χορήγηση $0.6 - 7.2 \text{ mg/kg}$ και ακτινοβολήση με δόση ενέργειας 120 J/cm^2 3h αργότερα. Έχει πάρει έγκριση για φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνου του προστάτη μετά από υποτροπή. Επιπλέον γίνονται κλινικές δοκιμές για καρκίνο του στήθους και μελάνωμα^[2, 39].

ε. Tookad® (WSTo9)

Ο palladium bacteriopheophorbide α (Tookad®) είναι ένας λιπόφιλος φωτοευαισθητοποιητής με το μεγάλο πλεονέκτημα της ταχύτατης αποδέσμευσης από τον οργανισμό, γεγονός που συνεπάγεται ελάχιστη παραμένουσα φωτοευαισθησία.

Έχει μέγιστο απορρόφησης στα 763 nm (βάθος διείσδυσης έως 4 mm), μεγάλο συντελεστή μοριακής απορρόφησης $88 \text{ 500 M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ και μεγάλη κβαντική απόδοση οξυγόνου σε οργανικό διαλύτη. Ένα τυπικό πρωτόκολλο περιλαμβάνει χορήγηση $2 - 4 \text{ mg/kg}$ και ακτινοβολήση με δόση ενέργειας 360 J/cm^2 περίπου 0.5 h ώρα αργότερα. Ελέγχεται για τη φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνου του προστάτη^[2, 39, 43].



Tookad

Σχήμα 2.8: Δομή palladium bacteriopheophorbide α

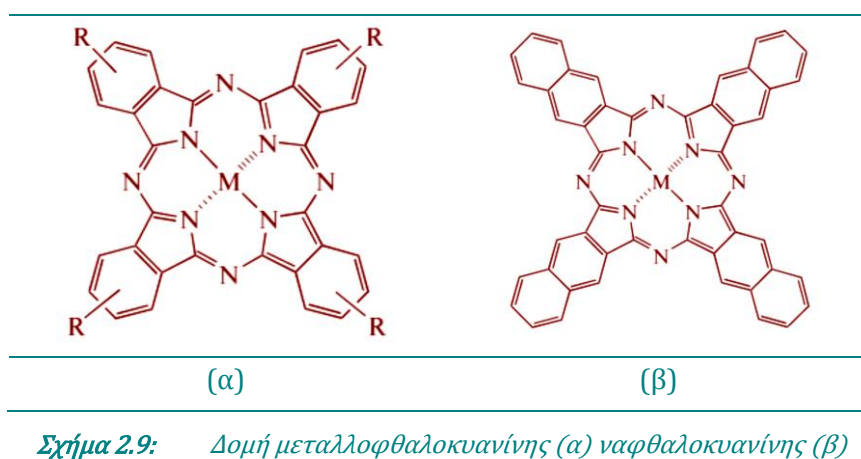
2.2.3

Οικογένεια χρωστικών

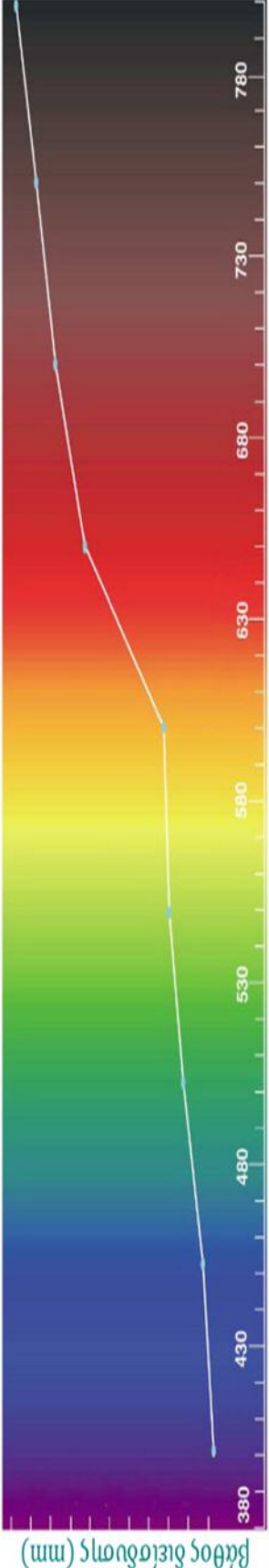
α. Φθαλοκυανίνες / Ναφθαλοκυανίνες

Οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές της οικογένειας των χρωστικών ανήκουν στις φθαλοκυανίνες και τα παράγωγά τους, τις ναφθαλοκυανίνες. Οι φωτοευαισθητοποιητές αυτής της οικογένειας παρουσιάζουν μέγιστα απορρόφησης στην περιοχή $650 - 850 \text{ nm}$ και ενεργοποιούνται με δόση ενέργειας γύρω στα 100 J/cm^2 . Πρόκειται περί υδρόφοβων φωτοευαισθητοποιητών. Για να βελτιωθεί η υδατοδιαλυτότητά τους συνδέονται με διάφορα μέταλλα, όπως αλουμίνιο, ψευδάργυρος ή πυρίτιο, καθώς τα μέταλλα αυτά έχει δειχτεί ότι προσφέρουν την καλύτερη φωτοδυναμική δράση^[41, 43, 53]. Επιπλέον, για να αντιμετωπιστεί η

υδροφοβικότητά τους συνδέονται και με κάποιο σύστημα μεταφοράς, για παράδειγμα λιποσώματα. Οι φωτοευαίσθητοποιητές αυτοί συγκεντρώνονται στα μιτοχόνδρια προκαλώντας κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης. Ανάλογα με τη σύνθεσή τους απομακρύνονται σχετικά γρήγορα από τον οργανισμό του ασθενούς, περίπου 24h μετά τη χορήγησή τους^[42].



Πίνακας 2.1: Συγκεντρωτικός πίνακας φωτοεναισθητοποιητών και χαρακτηριστικών τους



Φωτοεναισθητοποιητής	Photofrin	ALA	Foscan	Purlytin	NPe6	Zn Phth	Visudyne	Lutrin	Tookad®
Μήκος κύματος απορρόφησης	630	635	652	660	664	674	690	732	763
<i>nm</i>									
Μοριακός συντελεστής απορρόφησης	1170	< 5000	30 000	28 000	40 000	40 000	35000	42 000	88 500
$M^{-1}cm^{-1}$									
Δόση χορήγησης	2	τοπική	0.15	1.2	2.5 – 3.5	6	0.6 – 7.2	2 – 4	
<i>mg/kg</i>									
Δόση ενέργειας	150	150	10	200	100	100	100	120	360
J/cm^2									

2.4

Πρόσληψη φωτοευαισθητοποιητών από τους καρκινικούς ιστούς

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μια εξαιρετικά επιλεκτική θεραπεία και αυτό οφείλεται τόσο στην ιδιότητα των φωτοευαισθητοποιητών να συγκεντρώνονται επιλεκτικά και σε μεγάλο ποσοστό στους καρκινικούς ιστούς όσο και στην εστίαση του φωτός διέγερσης του φωτοευαισθητοποιητή ακριβώς πάνω στον καρκινικό ιστό. Οι θεωρίες οι οποίες εξηγούν την μεγάλη επιλεκτικότητα των φωτοευαισθητοποιητών στα καρκινικά κύτταρα και το μεγάλο ποσοστό συγκέντρωσής τους στους καρκινικούς ως προς τους υγιείς ιστούς βασίζονται στις ιδιότητες των φωτοευαισθητοποιητών, των καρκινικών κυττάρων αλλά και στις διαφορές του καρκινικού σε σχέση με τον υγιή ιστό^[21].

Τα κύτταρα των καρκινικών ιστών πολλαπλασιάζονται με ταχύτερους ρυθμούς σε σχέση με τα υγιή, ενώ διαθέτουν περισσότερους υποδοχείς λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (Low Density Lipoproteins, LDLs)· πολλοί φωτοευαισθητοποιητές για να διαχυθούν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος δένονται σε υψηλής ή χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες. Οι καρκινικοί όγκοι περιέχουν μακροφάγα τα οποία μπορούν να εγκολπώνουν και να διασπούν φωτοευαισθητοποιητές συνδεδεμένους σε λιποπρωτεΐνες, αλλά και συσσωματωμένους φωτοευαισθητοποιητές, προκαλώντας το μονομερισμό τους^[54]

Το χαμηλό pH του καρκινικού όγκου προκαλεί επιλεκτική συγκέντρωση μορίων τα οποία γίνονται περισσότερο λιπόφιλα καθώς εισέρχονται στο όξινο περιβάλλον του όγκου μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Επιπλέον το αγγειακό σύστημα που τροφοδοτεί τον όγκο είναι πυκνότερο, με αυξημένη διαπερατότητα, ενώ από την άλλη το λεμφικό σύστημα εκκαθάρισης υπολειπόμενων ή είναι τελείως αδρανές. Διαφορές στο ποσοστό του νερού καθώς και άλλων φυσιολογικών παραμέτρων ανάμεσα στους καρκινικούς και υγιείς ιστούς επιδρούν στην κατανομή των φωτοευαισθητοποιητών. Τέλος, το στρώμα του όγκου έχει μη φυσιολογική δομή η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλο ενδοϊστικό χώρο και αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου (στο οποίο δένονται οι πορφυρίνες) ή παρείσφρηση μακροφάγων τα οποία έλκουν και παγιδεύουν υδρόφοβους φωτοευαισθητοποιητές αυξάνοντας, τη συγκέντρωσή τους σε αυτούς^[54, 55].

Η πρόσληψη και η ενδοκυττάρια χωρική κατανομή των φωτοευαισθητοποιητών στα κύτταρα είναι καθοριστική για το είδος του κυτταρικού θανάτου που επάγεται, κατά συνέπεια και για την αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας. Τα δευτερογενή προϊόντα των φωτοχημικών αντιδράσεων τύπου I και II, τα δραστικά οξυγονούχα είδη και οι ελεύθερες ρίζες, έχουν πολύ μικρούς χρόνους ζωής γεγονός που πρακτικά σημαίνει ότι δρουν στο σημείο που παράγονται. Για το λόγο αυτό το είδος της κυτταρικής βλάβης καθώς και το είδος του κυτταρικού θανάτου που επάγεται μετά τη

φωτοδυναμική συνδέεται άμεσα με το ενδοκυττάριο σημείο εντοπισμού του φωτοευαισθητοποιητή^[14, 27].

Η δομή και οι ιδιότητες του μορίου του φωτοευαισθητοποιητή:

- Το ιοντικό σθένος του, το οποίο μπορεί να κυμαίνεται από +4 έως -4
- Οι υδροφοβικές ή υδροφιλικές του ιδιότητες
- Ο βαθμός ασυμμετρίας
- Το ποσοστό συσσωμάτωσης των μορίων

καθορίζουν την πρόσληψη και το μοτίβο της ενδοκυττάριας χωρικής κατανομής του^[14].

Σθένος και βαθμός ασυμμετρίας

Γενικά, υδρόφοβοι φωτοευαισθητοποιητές, με σθένος ≤ -2 , μπορούν με ευκολία να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη μέσω διάχυσης και να καταλήξουν σε μεμβράνες ενδοκυττάρων οργανιδίων. Αυτοί οι φωτοευαισθητοποιητές προσλαμβάνονται ευκολότερα από τα κύτταρα. Αντίθετα, οι περισσότερο υδρόφιλοι φωτοευαισθητοποιητές, με σθένος ≥ -2 , δεν μπορούν να διαχυθούν μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω της ενδοκύττωσης. Η συμμετρία ή ασυμμετρία της κατανομής του σθένους επηρεάζει την ενδοκυττάρια κατανομή, με τη συμμετρική κατανομή να προκαλεί συγκέντρωση σε λυσοσώματα^[14, 27].

Ισορροπία υδροφοβικότητας / υδροφιλικότητας

Οι φωτοευαισθητοποιητές χορηγούνται συνήθως ενδοφλέβια. Ο μηχανισμός μεταφοράς ενός υδρόφοβου φωτοευαισθητοποιητή, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, στον καρκινικό όγκο και ο επακόλουθος μηχανισμός νέκρωσης αυτού, διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με τους αντίστοιχους ενός υδρόφιλου.

Υδρόφοβοι / Λιπόφιλοι φωτοευαισθητοποιητές: Μετά την ενδοφλέβια χορήγησή τους τα μόρια ενός υδρόφοβου φωτοευαισθητοποιητή δένονται σε υψηλής και χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (High Density Lipoproteins (HDLs) και Low Density Lipoproteins (LDLs) αντίστοιχα) και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρονται στον οργανισμό, παρουσιάζοντας σαφώς μεγαλύτερη επιλεκτικότητα στους καρκινικούς ιστούς σε σχέση με τους υγιείς. Η επιλεκτικότητα είναι ανάλογη με το πόσο λιπόφιλο είναι το μόριο, καθώς οι μεμβράνες των καρκινικών κυττάρων φέρουν περισσότερους υποδοχείς LDLs σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Μέσω της ενδοκύττωσης, στη συνέχεια, ο φωτοευαισθητοποιητής εισέρχεται στο κύτταρο όπου και συγκεντρώνεται στις λιπόφιλες ενδοκυττάριας δομές, τα μιτοχόνδρια, το

ενδοπλασματικό δίκτυο, την πυρηνική και τις λυσοσωμικές μεμβράνες. Το χαμηλό pH του καρκινικού ιστού ενισχύει την ενδοκυττάρια πρόσληψη των υδρόφοβων φωτοευαισθητοποιητών. Έχειδειχτεί ότι και η τεχνητή μείωση των επιπέδων του pH (χορηγώντας γλυκόζη, η οποία αυξάνει την παραγωγή γαλακτικού οξέως (σε αναερόβιες συνθήκες), το περιβάλλον γίνεται περισσότερο όξινο) ενισχύει την επιλεκτικότητα στον καρκινικό ιστό^[17].

Υδρόφιλοι / Λιπόφοβοι φωτοευαισθητοποιητές: Μετά την ενδοφλέβια χορήγησή τους, τα μόρια των υδρόφιλων φωτοευαισθητοποιητών μεταφέρονται κυρίως από την αλβουμίνη και άλλες πρωτεΐνες του πλάσματος. Οι φωτοευαισθητοποιητές αυτοί συγκεντρώνονται κυρίως στο στρώμα που περιβάλλει τον καρκινικό ιστό και στο αγγειακό σύστημα που τον τροφοδοτεί. Η τάση τους να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και να εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα είναι μικρή λόγω του λιπόφοβου χαρακτήρα τους^[17].

Το μοτίβο κατανομής των φωτοευαισθητοποιητών στους καρκινικούς ιστούς, άρα και ο μηχανισμός νέκρωσης του καρκινικού όγκου, εξαρτάται ισχυρά από τα ηλεκτροχημικά χαρακτηριστικά των φωτοευαισθητοποιητών, κυρίως από το πόσο υδρόφοβο ή όχι είναι το μόριο. Οι υδρόφοβοι φωτοευαισθητοποιητές συγκεντρώνονται περισσότερο σε ενδοκυττάρια οργανίδια (λυσοσώματα, μιτοχόνδρια, σύστημα Golgi, ενδοπλασματικό δίκτυο) προκαλώντας απευθείας θάνατο των καρκινικών κυττάρων ενεργοποιώντας, ανάλογα με το οργανίδιο που προτιμούν, τον αντίστοιχο μηχανισμό κυτταρικού θανάτου. Οι υδρόφιλοι φωτοευαισθητοποιητές συγκεντρώνονται κυρίως στις μεμβράνες όπου και προκαλούν τη λιπιδική υπεροξειδωσή τους. Συγκεντρώνονται επίσης και στο αγγειακό σύστημα που περιβάλλει τον όγκο και προκαλούν τη νέκρωση του καρκινικού ιστού έμμεσα, καταστρέφοντας τα αιμοφόρα αγγεία και διακόπτοντας με τον τρόπο αυτό την παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στον όγκο^[17, 56].

Βαθμός συσσωμάτωσης

Η ισορροπία ανάμεσα στα υδρόφιλα και υδρόφοβα χαρακτηριστικά καθορίζει και τη συμπεριφορά του φωτοευαισθητοποιητή σε υδατικά μέσα, όπου μόρια υδρόφοβων φωτοευαισθητοποιητών έχουν την τάση να ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας συσσωματώματα. Τα συσσωματώματα δε διατηρούν τα φωτοφυσικά χαρακτηριστικά του φωτοευαισθητοποιητή στη μονομερή του μορφή, με αποτέλεσμα η κβαντική απόδοση μονήρους οξυγόνου άρα και η φωτοδυναμική δράση να μειώνονται δραματικά. Επιπλέον τα συσσωματώματα αλλάζουν και τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες του φωτοευαισθητοποιητή καθώς και τον τρόπο πρόσληψής του από τα κύτταρα^[27].

2.5

Φωτοευαισθητοποιητές 3^{ης} γενιάς

Αν και έχουν αναπτυχθεί πολλοί φωτοευαισθητοποιητές λίγοι, έχουν φτάσει στο επίπεδο των κλινικών δομικών και μόνο τρεις έχουν πάρει έγκριση και κυκλοφορούν εμπορικά για τη φωτοδυναμική θεραπεία συγκεκριμένων καρκινικών τύπων. Η χαμηλή επιλεκτικότητα στους καρκινικούς όγκους σε σχέση με τους υγιείς ιστούς, η μικρή κβαντική απόδοση και η απορρόφηση σε χαμηλά μήκη κύματος, αλλά κυρίως ο μεγάλος χρόνος συγκέντρωσης σε εξωτερικά όργανα του σώματος, το δέρμα και τα μάτια, που οδηγεί σε παρατεταμένη φωτοευαισθησία, έχουν περιορίσει την εφαρμογή της φωτοδυναμικής.

Οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές είναι υδρόφοβα μόρια και συσσωματώνονται εύκολα σε υδατικά μέσα. Η υδροφοβικότητα οδηγεί σε ισχυρές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή οι οποίες επηρεάζουν τις φωτοφυσικές (μείωση κβαντικής απόδοσης μονήρους οξυγόνου), χημικές (μείωση της διαλυτότητάς τους) και βιολογικές τους ιδιότητες^[57]. Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια να αλλοιώνονται οι φωτοφυσικές αλλά και φαρμακολογικές και φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες. Επιπλέον είναι αναγκαίο οι φωτοευαισθητοποιητές να συγκεντρώνονται επιλεκτικά στους καρκινικούς όγκους για να αποφεύγεται παράπλευρες φθορές (για παράδειγμα βλάβη των γειτονικών υγιών ιστών σε περίπτωση που το φως πέσει και σε αυτούς). Κυρίως όμως για να προλαμβάνεται η σοβαρότερη παρενέργεια της φωτοδυναμικής, η παραμένουσα φωτοευαισθησία.

Οι 3^{ης} γενιάς φωτοευαισθητοποιητές έρχονται για να διευρύνουν τις δυνατότητες των φωτοευαισθητοποιητών της 2^{ης} γενιάς. Στην περίπτωση αυτή δεν μιλάμε για καινούργια μόρια που ανακαλύπτονται ή συντίθεται αλλά για την πρόσδεση ή ενσωμάτωση υπαρχόντων, πολλά υποσχόμενων φωτοευαισθητοποιητών σε νανοσωματιδιακά συστήματα μεταφοράς^[41,42].

2.5.1

Νανοσωματίδια ως φορείς μεταφοράς φωτοευαισθητοποιητών

Σωματίδια διαστάσεων 1 – 100nm, καλούνται νανοσωματίδια. Έχουν μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες, μικρό μέγεθος, μεγάλη επιφάνεια σε σχέση με τη μάζα τους και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς μεταφοράς φαρμάκων βελτιώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Τα νανοσωματίδια μπορούν να αυξήσουν τη διαλυτότητα σε υδατικά μέσα υδρόφοβων ουσιών, να παρατείνουν τον χρόνο ημιζωής τους στην κυκλοφορία του αίματος, να αποτρέψουν τη διάσπαση του φαρμάκου αμέσως μετά τη χορήγηση του και να ελαχιστοποιήσουν τις παρενέργειες. Μπορούν να σχεδιαστούν

ώστε να παρουσιάζουν μεγάλη επιλεκτικότητα στον στόχο, με ελάχιστη συγκέντρωση του φαρμάκου σε περιοχές που δεν ενδιαφέρουν. Το μέγεθός τους είναι υπεύθυνο για την επιλεκτική συγκέντρωσή τους σε παθολογικές περιοχές, όπως είναι και οι καρκινικοί όγκοι. Στις περιοχές αυτές το ελαττωματικό αγγειακό σύστημα προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων σε συστατικά και σωματίδια ορισμένου, μικρού, μεγέθους τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν διαπερνούν τα αγγεία. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ενισχυμένη διαπερατότητα και κατακράτηση (enhanced permeability and retention effect (EPR)). Το μέγεθος των πόρων στους καρκινικούς όγκους ποικίλει από 100 – 780 nm επιτρέποντας την άμεση συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στον καρκινικό ιστό^[35].

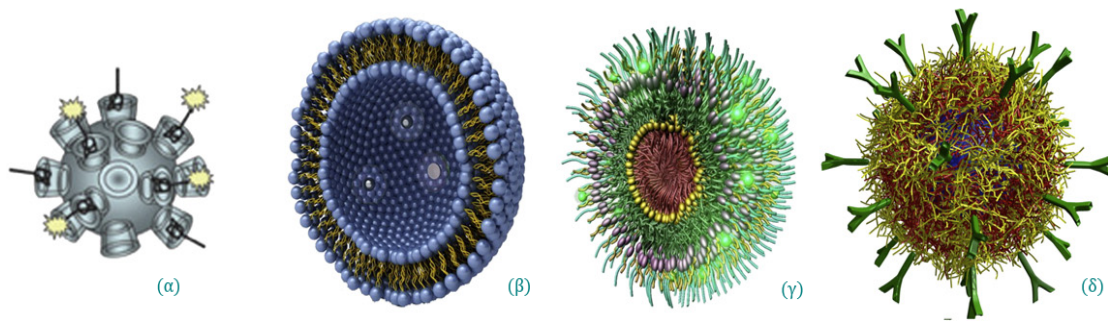
Η ενθυλάκωση του φωτοευαίσθητοποιητή σε νανοσωματίδια είναι πολλά υποσχόμενη στρατηγική βελτιστοποίησης της βιοδιαθεσιμότητάς του και της συγκέντρωσής του στον καρκινικό όγκο. Τα νανοσωματίδια μπορούν να αυξήσουν τη διαλυτότητα, σε υδατικά μέσα, των υδρόφοβων φωτοευαίσθητοποιητών παρέχοντας τα πλεονεκτήματα των υδρόφιλων μορίων. Επιπλέον, αποτρέποντας τη συσσωμάτωση των μορίων, σε συνδυασμό με το φαινόμενο της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης, μπορούν να αυξήσουν την επιλεκτική συγκέντρωση των φωτοευαίσθητοποιητών στον καρκινικό όγκο^[34]. Η επιλεκτική συγκέντρωση μπορεί περαιτέρω να ενισχυθεί, προσθέτοντας εξειδικευμένους συνδέτες στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, οι οποίοι στοχεύουν συγκεκριμένους υποδοχείς των καρκινικών όγκων αγνοώντας τους υγιείς ιστούς^[35]. Οι διαφορές (ανατομικές, φυσιολογικές, βιοχημικές) στο μικροαγγειακό σύστημα ανάμεσα σε καρκινικές και μη καρκινικές περιοχές έχουν χρησιμοποιηθεί στο σχεδιασμό και στην ανάπτυξη συστημάτων στοχευμένης μεταφοράς και στην ενίσχυση της επιλεκτικότητας και της εξειδίκευσης των φωτοευαίσθητοποιητών^[58].

Ιδανικά ένα νανοσωματίδιο θα πρέπει να είναι βιοδιασπώμενο, να έχει μικρό μέγεθος και μεγάλη χωρητικότητα, να προκαλεί ελάχιστη ανοσογονικότητα και να μην παρουσιάζει καμία τοξικότητα ή παρενέργεια. Ακόμη να παρουσιάζει μεγάλους χρόνους ημιζωής στην κυκλοφορία του αίματος μετά τη χορήγησή του και ελάχιστη τάση για σχηματισμό συσσωματωμάτων^[35]. Ειδικά τα νανοσωματίδια μεταφοράς φωτοευαίσθητοποιητών θα πρέπει να ενθυλακώνουν το φορτίο τους (τον φωτοευαίσθητοποιητή) χωρίς να μειώνουν ή να αλλοιώνουν τις φωτοφυσικές του ιδιότητες και να εξασφαλίζουν μεταφορά των μορίων του φωτοευαίσθητοποιητή χωρίς συσσωμάτωσή τους (όταν τα μόρια του φωτοευαίσθητοποιητή είναι συσσωματωμένα μειώνεται η κβαντική του απόδοση). Κυρίως όμως το σύστημα μεταφοράς θα πρέπει να εξασφαλίζει την επιλεκτική συγκέντρωσή των μορίων του φωτοευαίσθητοποιητή στον καρκινικό όγκο με ταυτόχρονη ελάχιστη (ιδανικά μηδενική) συγκέντρωση σε υγιείς ιστούς^[34].

Η μεγαλύτερη πρόκληση και ταυτόχρονα πρόβλημα στο σχεδιασμό και στη σύνθεση νανοσωματιδιακών συστημάτων μεταφοράς είναι η ταχύτατη εκκαθάρισή τους από τους μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού. Η εκκαθάριση από τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος, από τα μονοκύτταρα του φαγοκυτταρικού συστήματος ή από μακροφάγα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (reticuloendothelial system (RES)), όπως αλλιώς αναφέρεται, καθώς και από το νεφρικό σύστημα των συστημάτων μεταφοράς μειώνει δραματικά την αποδοτικότητά τους. Συνήθως τα νανοσωματιδιακά συστήματα εγχέονται ενέσιμα στον οργανισμό και διαχέονται σε αυτόν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, αν και υπάρχουν συστήματα για διαδερμική ή ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση. Όταν ένα ξένο σώμα εισέρχεται στον κυκλοφορία του αίματος, πρωτεΐνες του πλάσματος, όπως είναι τα οψόνια, άμεσα προσφύονται στην επιφάνειά του καθιστώντας το αναγνωρίσιμο από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα φαγοκύτταρα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος είναι ο πρώτος αμυντικός μηχανισμός που ενεργοποιείται απέναντι σε έναν ξένο εισβολέα. Ένας επιπλέον αμυντικός μηχανισμός είναι τα εξειδικευμένα μακροφάγα κύτταρα στους νεφρούς και στο σπλήνα. Οι μηχανισμοί άμυνας του οργανισμού έναντι ξένων σωμάτων που εισέρχονται σε αυτόν είναι το σοβαρότερο εμπόδιο που τα νανοσωματιδιακά συστήματα μεταφοράς πρέπει να ξεπεράσουν^[59]

Διάφορα νανοσωματιδιακά συστήματα μεταφοράς φωτοευαισθητοποιητών, επιτυχημένα ή λιγότερο αποτελεσματικά, έχουν αναπτυχθεί. Λιποσώματα, μικκύλια από συνθετικά αμφίφιλα πολυμερή, νανοσωματίδια χρυσού, πολυμερών ή κεραμικών βρίσκονται ανάμεσα στα συστήματα μεταφοράς που έχουν αναπτυχθεί (Σχήμα 2.10). Τα λιποσώματα έχουν την ικανότητα να ενθυλακώνουν τόσο υδρόφοβα όσο και υδρόφιλα μόρια, αποτρέπουν τη συσσωμάτωση των μορίων και ενισχύουν την επιλεκτικότητα του φωτοευαισθητοποιητή στον καρκινικό όγκο. Τα μικκύλια είναι ανθεκτικά στις επιθέσεις των μακροφάγων του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος ιδιότητα που αυξάνει το χρόνο ημιζωής τους στην κυκλοφορία του αίματος άρα και ενισχύει τη μεταφορά του φορτίου τους στον στόχο. Μπορούν να ενθυλακώσουν ουσίες πρακτικά αδιάλυτες σε υδατικά μέσα και παρουσιάζουν πολύ καλή βιοσυμβατότητα. Τα βιοδιασπώμενα και μη –βιοδιασπώμενα νανοσωματίδια δεν απομακρύνονται από τα μακροφάγα, έτσι αυξάνεται ο χρόνος κυκλοφορίας τους στον οργανισμό. Είναι συμβατά με τα βιολογικά συστήματα και η επιφάνειά τους μπορεί εύκολα να τροποποιηθεί ενσωματώνοντας αντισώματα ή άλλους συνδέτες για να βελτιωθεί η επιλεκτικότητα^[35].

Σκοπός ενός συστήματος μεταφοράς είναι να ρυθμίσει τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες, την κατανομή και συγκέντρωση του φαρμάκου που μεταφέρει στον καρκινικό ιστό, με τον βέλτιστο τρόπο. Ανάμεσα στα συστήματα μεταφοράς τα οποία κατά καιρούς έχουν μελετηθεί ως φορείς μεταφοράς φωτοευαισθητοποιητών, τα λιποσώματα αναδεικνύονται ως τα πλέον κατάλληλα.



Σχήμα 2.10: Ενδεικτικά είδη νανοσωματιδίων. (α) νανοσωματίδια πολυμερών. (β) λιποσώματα. (γ) μικύλια. (δ) πολυστρωματικές Lbl κάψουλες

Η δομική απλότητα, η εύκολη σύνθεση και το χαμηλό κόστος παρασκευής τους, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα νανοσωματιδιακά συστήματα μεταφοράς, η βιοσυμβατή (μη τοξική) φύση των δομικών συστατικών τους αλλά κυρίως η μεγάλη χωρητικότητα και η ευελιξία των λιποσωμάτων να ενθυλακώνουν φωτοευαίσθητοποιητές με ποικίλες φωτοφυσικές και φυσικοχημικές ιδιότητες τα ξεχώρισε ως συστήματα μεταφοράς^[35, 60].

2.5.2

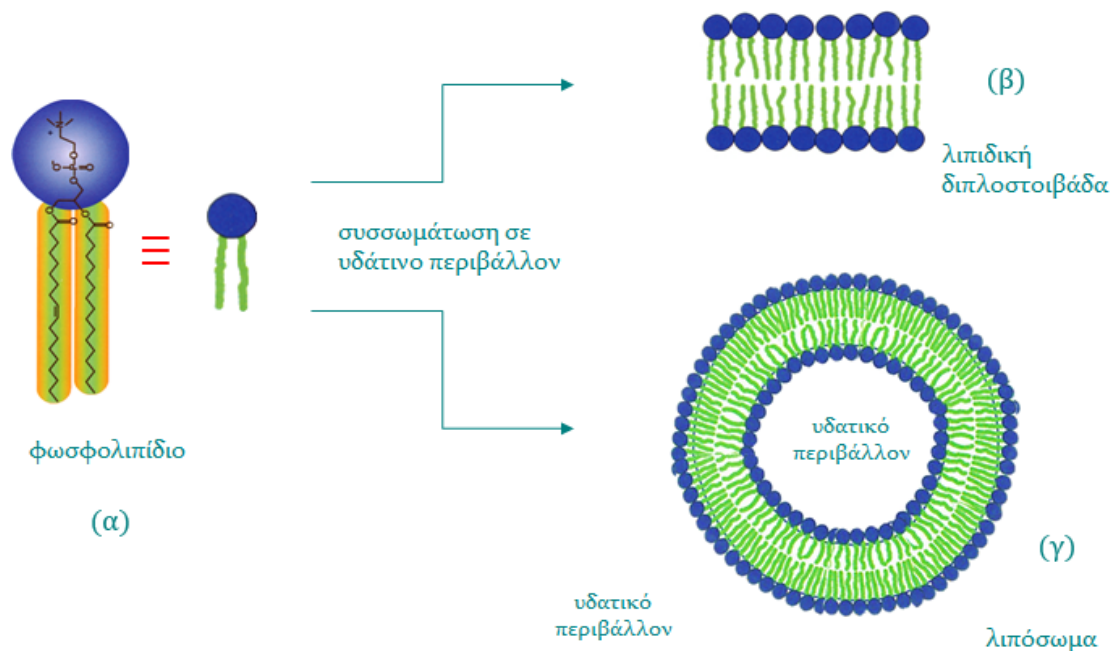
Λιποσώματα

α. Δομή

Τα λιποσώματα είναι κολλοειδής σφαιρικές δομές λιπιδικών διπλοστοιβάδων στο εσωτερικό των οποίων εγκλείεται μέρος του υδάτινου μέσου στο οποίο διασπείρονται. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 20 nm έως μερικές δεκάδες μm ενώ το πάχος της λιπιδικής διπλοστοιβάδας περίπου 4 nm. Παρασκευάζονται από φυσικά και συνθετικά μόρια λιπιδίων, συνηθέστερα είναι τα φωσφολιπίδια και λιγότερο η χοληστερόλη και αυτή τους η σύνθεση τα καθιστά ιδιαίτερα βιοσυμβατούς και βιοδιασπώμενους νανομεταφορείς^[61].

Τα φωσφολιπίδια είναι αμφίφιλα μόρια τα οποία αποτελούνται από μια πολική κεφαλή (υδρόφιλο τμήμα) και δυο υδρογονανθρακικές αλυσίδες (λιπόφιλο τμήμα, το οποίο αναφέρεται και ως ουρά). Όταν τα φωσφολιπίδια διασπείρονται σε υδατικά μέσα οι υδρόφιλες κεφαλές συνδέονται με το μέσο ενώ οι λιπόφιλες ουρές έλκονται μεταξύ τους. Σχηματίζεται με τον τρόπο αυτό μια μεμβράνη διπλοστοιβάδας λιπιδίων η οποία αποτελείται από αυτοσυγκρατούμενα μόρια φωσφολιπιδίων. Σε υδατικό μέσο με τις κατάλληλες συνθήκες οι λιπιδικές μεμβράνες αυτές κάμπτονται εγκλωβίζοντας στον πυρήνα τους μέρος του υδατικού μέσου και με αυτόν τον τρόπο σχηματίζονται σφαιρικές δομές, τα λιποσώματα (Σχήμα 2.11)^[62, 63].

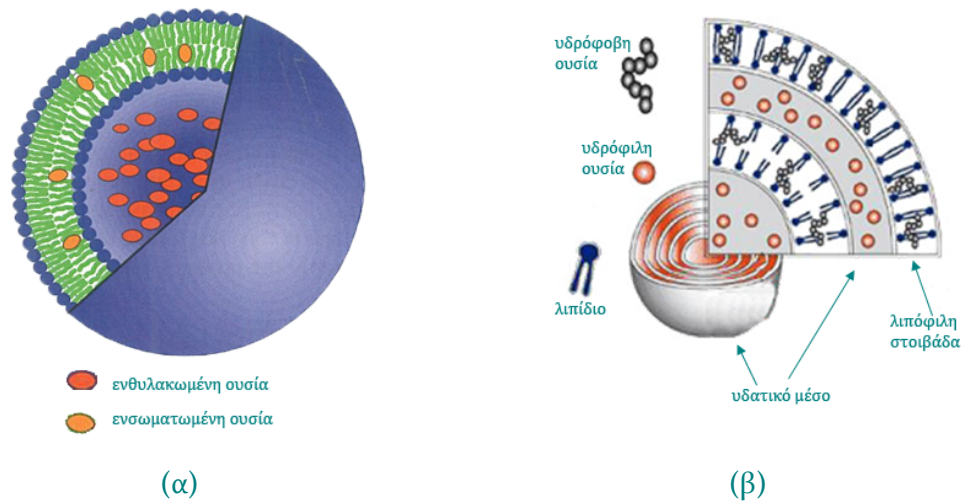
Τα λιποσώματα κατασκευάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να παγιδεύουν ποσότητες υλικών τόσο στον υδατικό πυρήνα τους όσο και στο εσωτερικό της λιπιδικής διπλοστοιβάδας (Σχήμα 2.12 α.). Οι διπλοστοιβάδες μπορούν να περικλείουν διαδοχικά η μία την άλλη σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο τα λεγόμενα πολυστοιβαδικά λιποσώματα (Σχήμα 2.12 β.)^[62].



Σχήμα 2.11: Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας λιποσώματος. Σε υδατικό μέσο τα φωσφολιπίδια (α) διατάσσονται αυθόρμητα με τέτοιο τρόπο ώστε οι υδρόφοβες ουρές έλκονται μεταξύ τους ενώ οι υδρόφιλες κεφαλές στρέφονται προς το υδατικό μέσο σχηματίζοντας δομή διπλοστοιβάδας λιπιδίων (β). Υπό κατάλληλες συνθήκες η διπλοστοιβάδα κάμπτεται εγκλωβίζοντας το υδατικό μέσο στον πυρήνα της σχηματίζοντας μια σφαιρική δομή, το λιπόσωμα (γ)^[63].

Η αξία των λιποσωμάτων οφείλεται στον τρόπο παρασκευής τους. Τα λιποσώματα φτιάχνονται από συστατικά φυσικής προέλευσης τα οποία σχηματίζουν δομή λιπιδικής διπλοστοιβάδας, η οποία είναι σχεδόν όμοια με τις φυσικές μεμβράνες των κυττάρων, σύμφωνα με το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού κατά Singer και Nicholson.

Ο τρόπος ενσωμάτωσης του φαρμάκου στο λιπόσωμα εξαρτάται από τις ιδιότητες του φαρμάκου. Υδρόφιλες ουσίες παγιδεύονται ή ενθυλακώνονται στον υδατικό πυρήνα του λιποσώματος ή στα υδατικά τμήματα ανάμεσα στις λιπιδικές διπλοστοιβάδες εάν πρόκειται για πολυστοιβαδικά λιποσώματα. Αμφίφιλες ή λιπόφιλες ουσίες ενσωματώνονται στο εσωτερικό της λιπιδικής διπλοστοιβάδας (Σχήμα 2.12)^[63].



Σχήμα 2.12: (α) λιπόσωμα φέρον ενθυλακωμένη υδροφιλή ουσία στον πυρήνα του και ενσωματωμένη λιπόφιλη ουσία στη λιπιδική στοιβάδα. (β). πολυστοιβαδικό λιπόσωμα.

β. Είδη λιποσωμάτων

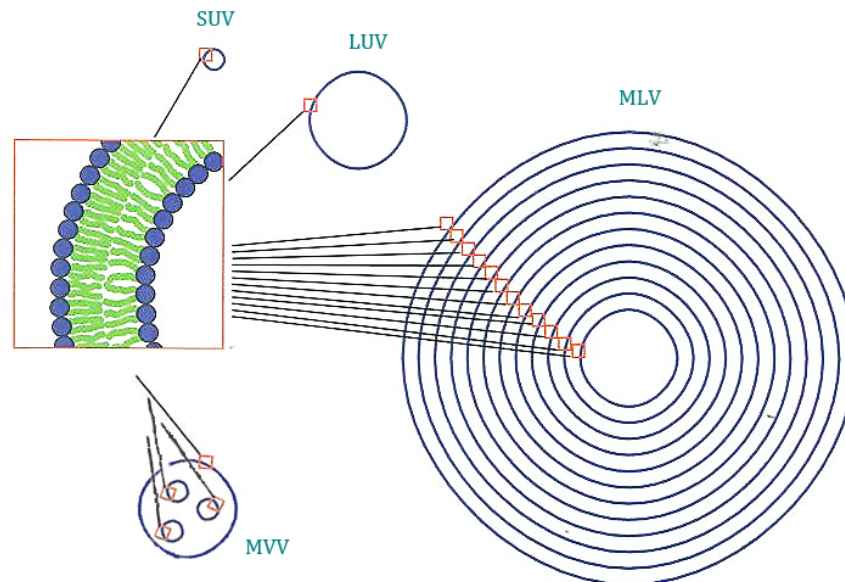
Τα λιποσώματα κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθός τους, τον τρόπο παρασκευής τους, τη σύνθεση και τον τρόπο στόχευσής τους.

ι Μέγεθος

Τα λιποσώματα διακρίνονται ανάλογα με τον αριθμό των διπλοστοιβάδων από τις οποίες αποτελούνται καθώς και από το μέγεθός τους. Υπάρχουν τα μικρά και μεγάλα μονοστοιβαδικά σωματίδια (small unilamellar vesicles (SUV) και large unilamellar vesicles (LUV)) με διαμέτρους της τάξης των 20 – 100 nm και < 1 μm αντίστοιχα, αλλά και τα μεγάλα πολυστοιβαδικά και πολυσφαιρικά σωματίδια (multivesicular vesicles (MLV) και multi vesicular vesicles (MVV) αντίστοιχα) με διαμέτρους > 0.5 μm και > 1 μm αντίστοιχα (Σχήμα 2.13)^[64].

Το μέγεθος των λιποσωμάτων καθορίζει τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες και τη διάχυση του φαρμάκου. Λιποσώματα παρόμοιας σύνθεσης αλλά μεγαλύτερου μεγέθους αναγνωρίζονται ευκολότερα από πρωτεΐνες του συμπληρώματος στο αίμα και απομακρύνονται από τα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Παρουσιάζουν ταχύτερους ρυθμούς αποβολής από τον οργανισμό. Τα λιποσώματα αντίθετα που έχουν σχετικά μικρότερη διάμετρο προτιμώνται, καθώς λόγω του φαινομένου της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης συγκεντρώνονται στον καρκινικό ιστό. Επιπλέον ο ρυθμός πρόσληψης και συγκέντρωσης των φωτοευαίσθητοποιητών στο εσωτερικό των κυττάρων είναι ανάλογος με τον ρυθμό απορρόφησης των λιποσωμάτων από το κύτταρο. Μικρότερα σε μέγεθος λιποσώματα

εύκολα ενσωματώνονται στις κυτταρικές μεμβράνες και εισέρχονται στο κύτταρο μέσω του φαινομένου της ενδοκύττωσης^[65].



Σχήμα 2.13: Κατηγοριοποίηση λιποσωμάτων ανάλογα με το μέγεθός τους

ii Ανάλογα με τη σύσταση και τις εφαρμογές

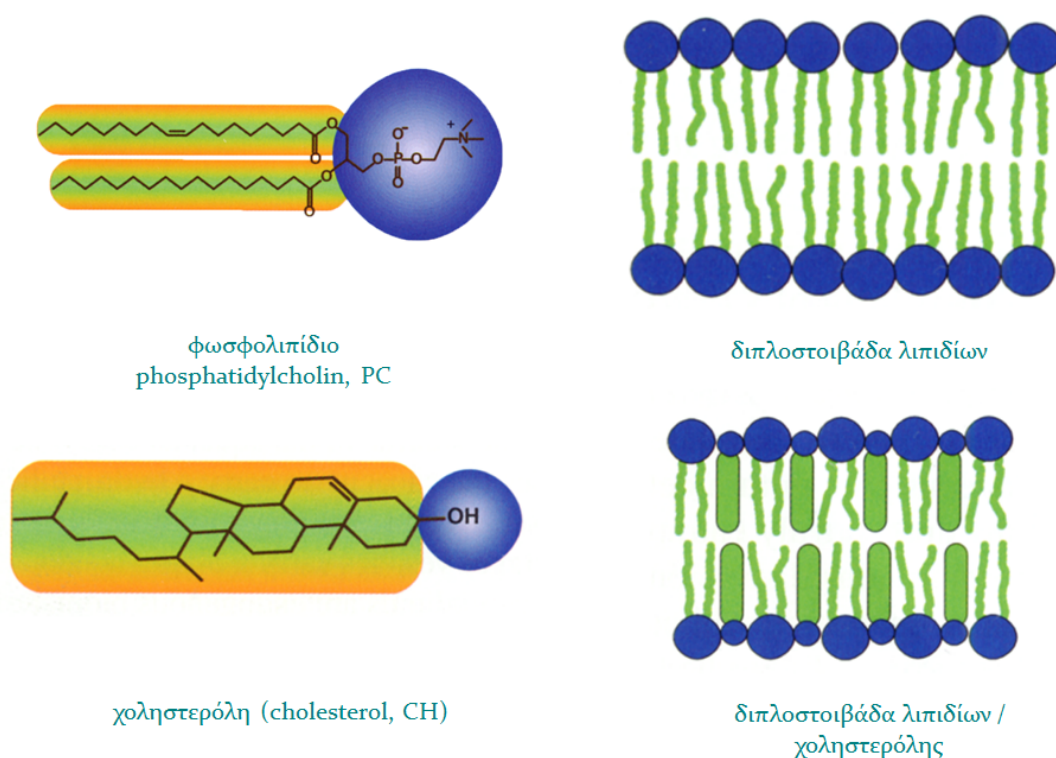
Τα λιποσώματα ως συστήματα μεταφοράς παρέχουν το μεγάλο πλεονέκτημα του να μπορούν να μεταβληθούν σχετικά εύκολα τα δομικά και φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά και να προσαρμοστούν στις ανάγκες του κάθε φαρμάκου που μεταφέρουν αλλά και στα ιδιαίτερες απαιτήσεις του θεραπευτικού στόχου. Παρόλη όμως τη βιοσυμβατότητά τους και την ποικιλότητα εφαρμογών που προσφέρουν, τα λιποσώματα απειλούνται από χημικές και φυσικές αλλοιώσεις οι οποίες μειώνουν το χρόνο ημιζωής τους περιορίζοντας κατά συνέπεια τη σταθερότητά τους. Αποσταθεροποίηση του λιποσώματος από φυσικούς παράγοντες οδηγεί σε αύξηση της διαπερατότητάς του η οποία προκαλεί αλλαγή ή αύξηση του ρυθμού έκλυσης της εσωκλειόμενης ουσίας. Συχνά προστίθεται χοληστερόλη για να ενισχύσει την σταθερότητα της λιπιδικής διπλοστοιβάδας μειώνοντας παράλληλα και τη διαπερατότητα της μεμβράνης. Η αποσταθεροποίηση από χημικούς παράγοντες σχετίζεται με υδρόλυση, οξείδωση ή υπεροξείδωση των λιπιδίων που απαρτίζουν τις διπλοστοιβάδες και αποτρέπεται είτε με την προσθήκη αντιοξειδωτικών μορίων είτε με συντήρηση των λιποσωμάτων σε χαμηλές θερμοκρασίες^[66].

Η σύνθεση και η δομή των λιποσωμάτων επηρεάζει επίσης και την διάχυσή τους στην κυκλοφορία του αίματος. Η ενσωμάτωση διαφόρων τύπων φωσφολιπιδίων ή / και

χοληστερόλης μειώνει τη διαπερατότητα της λιπιδικής μεμβράνης, αποτρέπει την απομάκρυνσή τους από τα φαγοκύτταρα και παρατείνει την κυκλοφορία τους στο αίμα^[35].

Με βάση την εφαρμογή και τα δομικά χαρακτηριστικά τους τα λιποσώματα διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες: στα συμβατικά, στα στερεοχημικά σταθεροποιημένα ή μακράς κυκλοφορίας, στα στοχευμένα και στα κατιονικά.

Συμβατικά λιποσώματα (conventional liposomes): Τα πιο κοινά λιποσώματα τα οποία χρησιμοποιούνται στη μεταφορά ουσιών.



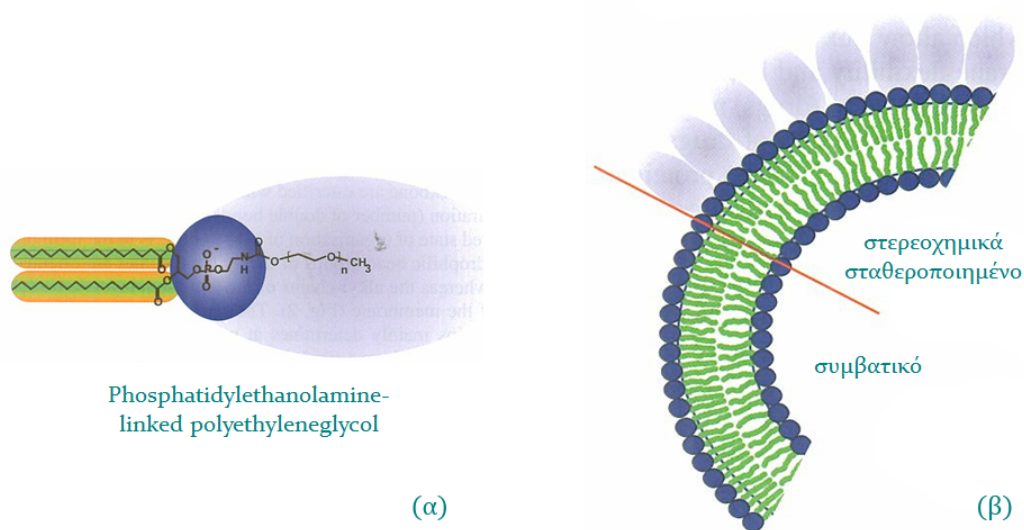
Σχήμα 2.14: Συμβατικά λιποσώματα (α) λιπιδικές διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων (β) λιπιδικές διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων / χοληστερόλης^[63]

Είναι λιποσώματα τα οποία αποτελούνται μόνο από φωσφολιπίδια (κυρίως (phosphatidylcholine, PC), ή / και χοληστερόλη (cholesterol, CH) η οποία προστίθεται να σταθεροποιήσει τη λιπιδική διπλοστοιβάδα (Σχήμα 2.14). Διαφέρουν ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ο μικρός χρόνος κυκλοφορίας τους στο αίμα. Το χαρακτηριστικό αυτό αποδίδεται σε δυο φαινόμενα: Στην ανταλλαγή λιπιδίων ανάμεσα στο λιπόσωμα και στις λιποπρωτεΐνες του αίματος, κυρίως στις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες, η οποία οδηγεί σε μη αναστρέψιμη

αποδόμηση του λιποσώματος. Στην περίπτωση που μεταφέρουν φωτοευαίσθητοποιητές, το φαινόμενο αυτό οδηγεί στην πολύ γρήγορη απελευθέρωσή τους στην κυκλοφορία του αίματος και στην επακόλουθη σύνδεσή τους με πρωτεΐνες του αίματος εμποδίζοντάς τη διάχυσή τους στον καρκινικό όγκο. Η χοληστερόλη σταθεροποιεί το λιπόσωμα αποτρέποντας την διάχυση της ουσίας που μεταφέρει καθώς και την αλληλεπίδραση με τις λιποπρωτεΐνες [35, 65].

Το δεύτερο φαινόμενο στο οποίο οφείλεται ο μικρός χρόνος κυκλοφορίας στο αίμα είναι η δέσμευσή τους από τα μονοκύτταρα του φαγοκυτταρικού συστήματος (μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος). Αποτέλεσμα είναι η συγκέντρωσή τους σε όργανα όπως είναι το ήπαρ. Επιπλέον και το φορτίο της εξωτερικής επιφάνειας του λιποσώματος καθορίζει τη διάχυσή του και τις φαρμακοκινητικές του ιδιότητες. Αρνητικά φορτισμένα λιποσώματα απομακρύνονται ταχύτατα από την κυκλοφορία μέσω της φαγοκύττωσης. Η επίδραση ωστόσο του φορτίου στην κυκλοφορία του λιποσώματος είναι μάλλον πολύπλοκο φαινόμενο [65].

Στεροχημικά σταθεροποιημένα ή μακράς κυκλοφορίας λιποσώματα (*sterically stabilized, stealth[®], or long-circulating liposomes*): Τα λιποσώματα της κατηγορίας αυτής αναπτύχθηκαν για να βελτιωθούν οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες των συμβατικών λιποσωμάτων. Η εξωτερική επιφάνεια του λιποσώματος περιβάλλεται με ένα στρώμα υδροφιλικών υδρογονανθράκων ή πολυμερών με στόχο την αύξηση της κυκλοφορίας τους στο αίμα (Σχήμα 2.15). Ο συνήθης τρόπος παρασκευής τέτοιων λιποσωμάτων είναι με τη σύνδεση του πολυμερούς πολυαιθυλενογλυκόλη (polyethylene glycol (PEG)) στην εξωτερική τους επιφάνεια [35, 63, 65].



Σχήμα 2.15: (α) λιπόσωμα με επικάλυψη πολυαιθυλενογλυκόλης (β) στεροχημικά σταθεροποιημένο λιπόσωμα [63]

Η πολυαιθυλενογλυκόλη είναι ένα υδατοδιαλυτό πολυμερές το οποίο εκδηλώνει μεγάλη αντίσταση απέναντι στις πρωτεΐνες του πλάσματος, έχει αμελητέα τοξικότητα, δεν προκαλεί ανοσολογικές αντιδράσεις, μπορεί να παρασκευαστεί σε μεγάλες ποσότητες με υψηλό βαθμό καθαρότητας, ιδιότητες την κατέστησαν το πολυμερές που κατεξοχήν χρησιμοποιείται για την παρασκευή στερεοχημικά σταθεροποιημένων λιποσωμάτων^[35].

Η επικάλυψη μειώνει τις αλληλεπιδράσεις του λιποσώματος με τις πρωτεΐνες του αίματος και εμποδίζει την απομάκρυνσή από τα φαγοκύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, αυξάνοντας έτσι την κυκλοφορία των λιποσωμάτων στο αίμα. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό των στερεοχημικά σταθεροποιημένων λιποσωμάτων είναι ότι βγαίνουν εκτός κυκλοφορίας σε περιοχές όπου η διαπερατότητα του αγγειακού συστήματος είναι αυξημένη. Καθώς ο χρόνος κυκλοφορίας των λιποσωμάτων είναι μεγαλύτερος, αυξάνεται η συγκέντρωση των λιποσωμάτων στον καρκινικό ιστό λόγω του φαινομένου της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης. Κατά συνέπεια αυξάνεται και η συγκέντρωση του φωτοευαίσθητοποιητή που μεταφέρουν στα καρκινικά κύτταρα του όγκου, ενισχύοντας τελικά τη φωτοδυναμική δράση^[65].

Στοχευμένα λιποσώματα: τα λιποσώματα αυτής της κατηγορίας διαθέτουν ειδικούς συνδέτες (αντισώματα ή κλάσματα αντισωμάτων, πεπτίδια ή γλυκοπρωτεΐνες) στην εξωτερική επιφάνειά τους προκειμένου να ενισχύσουν τη στοχευμένη πρόσδεση σε συγκεκριμένους υποδοχείς στους καρκινικούς όγκους. Ωστόσο δύσκολα εγκαταλείπουν την κυκλοφορία του αίματος παρουσιάζοντας ως επακόλουθο μεγάλη συγκέντρωση στη σπλήνα και στο ήπαρ.

Κατιονικά λιποσώματα (*cationic liposomes*): Χρησιμοποιούνται ως συστήματα μεταφοράς γενετικού υλικού, DNA, λόγω των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους, κατιονικά συστατικά αλληλεπιδρούν και εξουδετερώνουν το αρνητικά φορτισμένο DNA, συμπυκνώνοντάς το σε πιο συμπαγή δομή.

pH-εξαρθώμενα λιποσώματα (*pH-sensitive liposomes*): Τα pH-εξαρθώμενα λιποσώματα αναπτύχθηκαν για τη μεταφορά υδρόφιλων μορίων στο κυτταρόπλασμα. Μόρια ευαίσθητα στις αλλαγές του pH τα οποία είναι φορτισμένα σε ουδέτερο pH και αποφορτίζονται όταν βρεθούν σε περιβάλλον με όξινο pH προστίθενται σε συνήθεις δομές λιποσωμάτων δημιουργώντας έτσι εξαρθώμενα από το pH λιποσώματα. Παθολογικές περιοχές ή περιοχές με φλεγμονή έχουν χαμηλότερο pH από ότι ο υγιής ιστός. Η λιπιδική διπλοστοιβάδα των λιποσωμάτων αποσταθεροποιείται σε αυτό το ελαφρώς όξινο περιβάλλον και η ενθυλακωμένη ουσία απελευθερώνεται λόγω αυξημένης διαπερατότητας της λιποσωμικής μεμβράνης^[65, 67].

iii. Ενεργητικής και παθητικής στόχευσης λιποσώματα

Τα συμβατικά λιποσώματα και τα λιποσώματα μακράς κυκλοφορίας, τα οποία εκμεταλλεύονται το φαινόμενο της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης αναφέρονται αλλιώς και ως λιποσώματα **παθητικής στόχευσης**.

Τα λιποσώματα **ενεργητικής στόχευσης** κατασκευάζονται τροποποιώντας την εξωτερική τους επιφάνεια με τέτοιο τρόπο ώστε να συνδέονται σε συγκεκριμένα κύτταρα ή να αναγνωρίζονται από συγκεκριμένες κυτταρικές λειτουργίες. Ένα αντίσωμα ή συνδέτης συγκεκριμένης κυτταρικής λειτουργίας προσαρτείται στην εξωτερική τους επιφάνεια προκαλώντας σύνδεση του λιποσώματος με το αντίστοιχο κυτταρικό σημείο. Το πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι μπορούν να στοχευθούν διαφορετικοί στόχοι με ένα μόνο είδος λιποσώματος^[59].

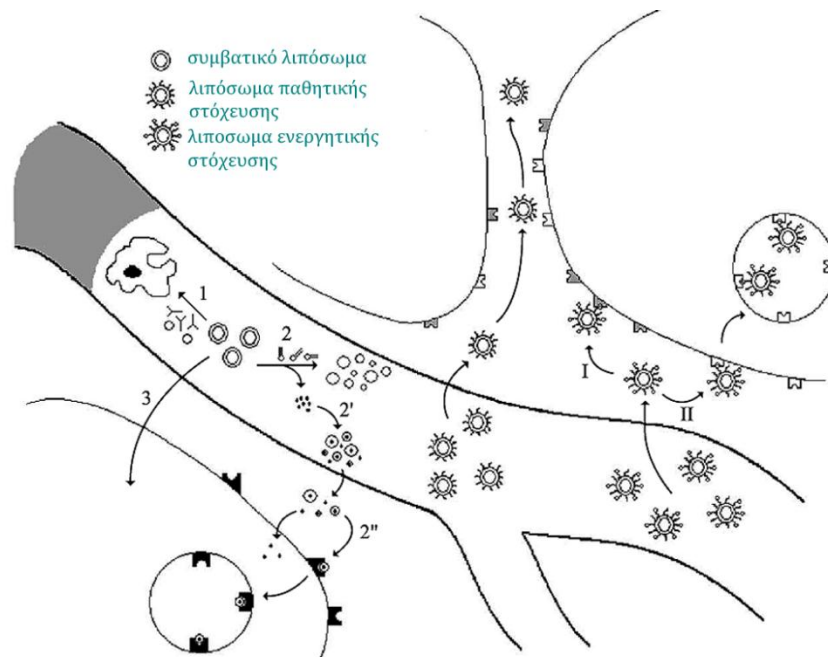
2.5.3

Αποδέσμευση φωτοευαισθητοποιητών από τα λιποσώματα.

Η συμπεριφορά των λιποσωμάτων όταν εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος καθορίζεται κυρίως από τη σύστασή τους. Τα συμβατικά λιποσώματα έχουν πολύ μικρούς χρόνους ημιζωής στο αίμα καθώς απορροφώνται από μακροφάγα κύτταρα ή λόγω της ανταλλαγής λιπιδίων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος με επακόλουθα την αποδόμησή τους και την πρόωρη απελευθέρωση των φωτοευαισθητοποιητών. Τα απελευθερωμένα μόρια των φωτοευαισθητοποιητών μπορούν να συνδεθούν στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και κατόπιν να εισχωρήσουν στα καρκινικά κύτταρα κυρίως μέσω της ενδοκύττωσης αλλά και με παθητική διάχυση (Σχήμα 2.16)^[60, 64].

Τα κύτταρα των καρκινικών όγκων έχουν αυξημένες απαιτήσεις σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά για να υποστηρίξουν τον γρήγορο πολλαπλασιασμό τους. Για το λόγο αυτό στους καρκινικούς ιστούς παρατηρείται ταχύτατη, αν και ελαττωματική, νεοαγγειογένεση. Τα επιθηλιακά κύτταρα δεν ευθυγραμμίζονται σωστά και δημιουργούνται οπές (πόροι) στην επιφάνεια των αγγείων, το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται από 100 έως 780 nm αλλά μπορεί να φτάσει έως και 2 μm ανάλογα με το είδος και την ηλικία του καρκινικού όγκου^[35, 59]. Επιπρόσθετα, ο καρκινικός ιστός στερείται λειτουργικού λεμφικού συστήματος και τα μακρομόρια τα οποία βρίσκονται εκτός του αγγειακού συστήματος δεν επιστρέφουν εύκολα στην κυκλοφορία του αίματος.

Εξαιτίας του φαινομένου της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης, το φορτίο που μεταφέρουν τα λιποσώματα διατηρείται στον καρκινικό ιστό περισσότερο



Σχήμα 2.16: Απελευθέρωση φωτοευαισθητοποιητών από λιποσώματα. Τα **συμβατικά λιποσώματα** (1) έχουν πολύ μικρούς χρόνους ημιζωής στο αίμα καθώς απορροφώνται από μακροφάγα κύτταρα ή λόγω της ανταλλαγής λιπιδίων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος με επακόλουθα την αποδόμησή τους και την πρόωρη απελευθέρωση των φωτοευαισθητοποιητών. Τα απελευθερωμένα μόρια των φωτοευαισθητοποιητών (2) μπορούν να συνδεθούν στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος (2') και κατόπιν να εισχωρήσουν στα καρκινικά κύτταρα κυρίως μέσω της ενδοκύττωσης (2''). Ένα μικρό ποσοστό τους φτάνει τελικά στον καρκινικό όγκο (3). **Λιποσώματα παθητικής στόχευσης** συγκεντρώνονται αρχικά στον εξωκυττάριο χώρο στον καρκινικό όγκο από όπου στη συνέχεια μέσω διαφόρων μηχανισμών μπορούν και να εισέλθουν στο κύτταρο. **Λιποσώματα ενεργητικής στόχευσης** είτε προσδένονται σε κυτταρικούς στόχους στο εξωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης (I) είτε διαπερνούν τη μεμβράνη και καταλήγουν σε ενδοκυττάρους στόχους (II)^[60].

χρόνο, σε αντίθεση με το αντίστοιχο ελεύθερο φορτίο το οποίο λόγω του χαμηλού μοριακού βάρους διαχέεται ξανά εύκολα στην κυκλοφορία του αίματος^[59]. Με τον τρόπο αυτό τα λιποσώματα συγκεντρώνονται σε μεγάλο ποσοστό στον καρκινικό ιστό σε σχέση με τον περιβάλλοντα υγιή

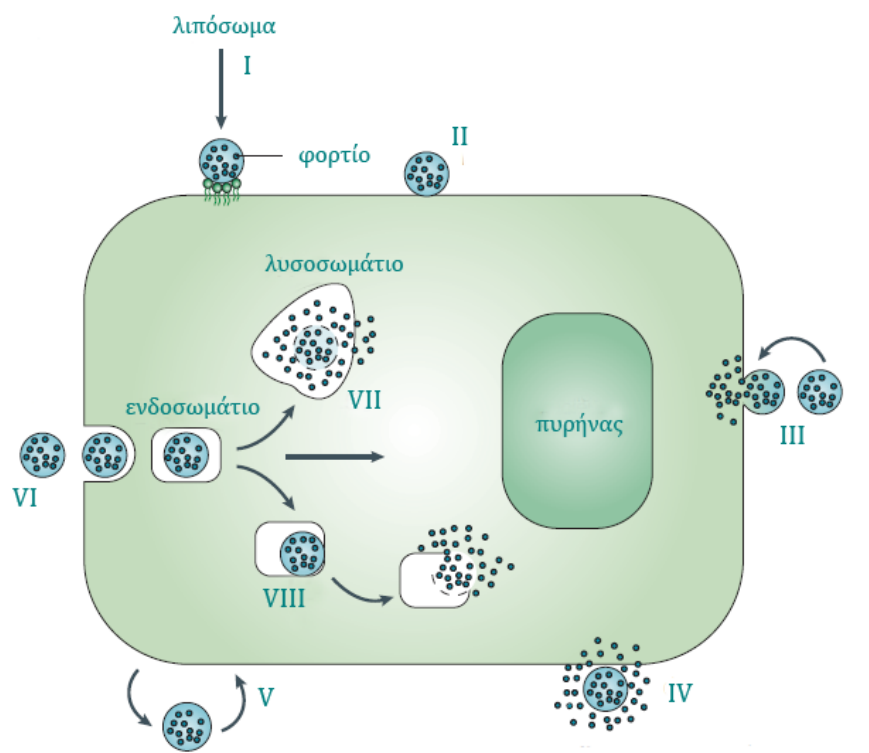
Τα στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα τα οποία λόγω της επικάλυψής τους «ξεγελούν» το ανοσοποιητικό σύστημα αλλά και όσα συμβατικά λιποσώματα καταφέρνουν τελικά και κατευθύνονται στον καρκινικό όγκο, εγκλωβίζονται σε αυτόν λόγω του φαινομένου της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης.

2.5.4

Πρόσληψη λιποσωμάτων από τα κύτταρα

Οι τρόποι με τους οποίους τα λιποσώματα εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου και εξαρτώνται από τη σύσταση και το μέγεθος των λιποσωμάτων, τον τύπο του κυττάρου καθώς και την παρουσία συγκεκριμένων υποδοχέων. Τα στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα καθώς και το μικρό ποσοστό των συμβατικών λιποσωμάτων το οποίο φτάνει τελικά ανέπαφο στον όγκο αλληλεπιδρούν και απελευθερώνουν το φορτίο τους στο κύτταρο με συγκεκριμένους τρόπους (Σχήμα 2.17)^[67].

Καθώς τα λιποσώματα έχουν παρόμοια σύσταση με τη φωσφολιπιδική στοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, οι πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων στην κυτταρική μεμβράνη αναγνωρίζουν τα λιποσώματα και ενεργοποιούν ανταλλαγή λιπιδίων ανάμεσα το λιπόσωμα και στην κυτταρική μεμβράνη.



Σχήμα 2.17: Αλληλεπιδράσεις λιποσώματος κυττάρου: I, II Εξειδικευμένη και μη εξειδικευμένη απορρόφηση από την κυτταρική μεμβράνη. III Σύντηξη με την κυτταρική μεμβράνη και απελευθέρωση περιεχομένου στο κυτταρόπλασμα. IV. Αποδόμηση από συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης και το απελευθερωμένο φορτίο τους εισχωρεί στο κύτταρο μέσω της μικροκλινοκύττωσης. V Άμεση ή μέσω πρωτεϊνών μεταφοράς ανταλλαγή λιπιδίων με την κυτταρική μεμβράνη. VI Ενδοκύττωση. Το λιπόσωμα μέσω του ενδοσώματος μπορεί να μεταφερθεί στο λυσοσωμάτιο, VII, ή κατά τη μεταφορά του μπορεί να προκαλέσει αποσταθεροποίηση του ενδοσώματος και απελευθέρωση του φορτίου του στο κυτταρόπλασμα, VIII^[67].

Η ενδοκύττωση είναι ίσως ο πλέον συνηθής τρόπος αλληλεπίδρασης λιποσώματος κυττάρου. Τα λιποσώματα «απορροφώνται» από την επιφάνεια των κυττάρων και στη συνέχεια ενσωματώνονται στα ενδοσώματα μέσω των οποίων μεταφέρονται στα λυσοσώματα. Τα λυσοσώματα αφομοιώνουν τα λιπίδια και οι ενθυλακωμένες ουσίες απελευθερώνονται με αυτόν τον τρόπο στο κυτταρόπλασμα.

Υπάρχει επίσης και η διαδικασία της σύντηξης κατά την οποία η λιπιδική στοιβάδα των λιποσωμάτων συντήκεται με την κυτταρική μεμβράνη. Έτσι το ενθυλακωμένο περιεχόμενο των λιποσωμάτων απελευθερώνεται απευθείας στο κυτταρόπλασμα. Το φαινόμενο αυτό είναι σπάνιο και ελέγχεται από τις πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων της μεμβράνης.

Η σύνθεση του λιποσώματος μπορεί να τροποποιήσει την ενδοκυττάρια κατανομή του φωτοευαίσθητοποιητή αλλάζοντας τον τρόπο αλληλεπίδρασής του με τις κυτταρικές μεμβράνες, άρα και τον επαγόμενο από τη φωτοδυναμική κυτταρικό θάνατο^[67].

2.5.5

Φωτοδυναμική δράση με εγκλεισμένους σε λιποσώματα φωτοευαίσθητοποιητές

Μελέτες που έχουν γίνει συγκρίνοντας τη φωτοδυναμική δράση ενθυλακωμένων και μη ενθυλακωμένων σε λιποσώματα φωτοευαίσθητοποιητών, στις ίδιες πειραματικές συνθήκες, έδειξαν ότι ο εγκλεισμός σε λιποσώματα πλεονεκτεί. Για παράδειγμα φωτοδυναμική θεραπεία γλοιώματος με ενθυλακωμένη σε λιποσώματα Photofrin ήταν περισσότερο αποτελεσματική σε σχέση με την ελεύθερη στην επαγωγή κυτταρικού θανάτου^[60]. Ο εγκεκριμένος για φωτοδυναμική θεραπεία της εκφύλισης της ωχράς κηλίδας φωτοευαίσθητοποιητής με το εμπορικό όνομα Visudyne®, (QLT Ophthalmics, Inc.) είναι η εγκλεισμένη σε λιποσώματα βερτεπορφυρίνη. Το Foslip είναι η λιποσωματική μορφή της m-THPC. Μελέτες και στην περίπτωση αυτή αποδεικνύουν τη φωτοδυναμική υπεροχή της λιποσωματικής μορφής σε σχέση με την ελεύθερη^[35].

Κεφάλαιο III

Πηγές Φωτός & Συστήματα Ακτινοβολήσης

3.1

Εισαγωγή

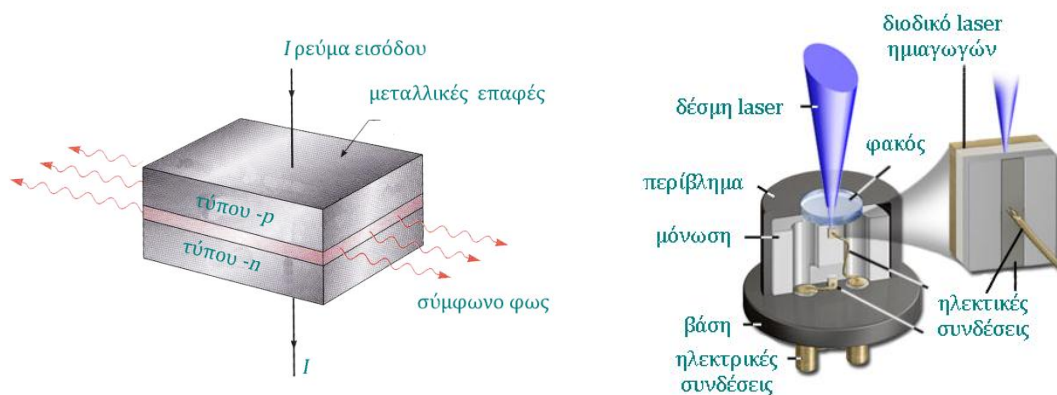
Η αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής, εκτός από τις ιδιότητες του φωτοευαισθητοποιητή, εξαρτάται επίσης και από το φως το οποίο επιλέγεται για τη διέγερσή του καθώς και από τον τρόπο μεταφοράς του φωτός στον καρκινικό ιστό. Η εφαρμογή της φωτοδυναμικής περιορίζεται σε εκείνους τους καρκινικούς ιστούς στους οποίους μπορεί να φτάσει το φως, είτε άμεσα είτε μέσω οπτικών ινών. Η φωτοδυναμική μέχρι πρόσφατα περιορίστηκε κυρίως στη θεραπεία επιφανειακών δερματικών καρκινικών όγκων λόγω του περιορισμένου βάθους διείσδυσης του φωτός. Με τη χρήση ωστόσο οπτικών ινών το φως από lasers μπορεί να μεταφερθεί και σε εσωτερικά όργανα του σώματος επεκτείνοντας την εφαρμογή της φωτοδυναμικής σε καρκινικούς όγκους και σε εσωτερικά όργανα. Αν και παραδοσιακά στη φωτοδυναμική χρησιμοποιούνται lasers για τη διέγερση του φωτοευαισθητοποιητή, η διαθεσιμότητα και ευκολία στη χρήση των λυχνιών τις καθιστά προτιμητέες σε περιπτώσεις όπου το φως μπορεί να μεταφερθεί άμεσα στον καρκινικό όγκο. Τα τελευταία χρόνια ελέγχεται και η χρήση των LEDs ως πιθανές πηγές φωτός στη φωτοδυναμική^[68].

Η επιλογή της πηγής φωτός καθορίζεται από δύο παράγοντες: από το φάσμα απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή, συγκεκριμένα το μέγιστο απορρόφησης του στην περιοχή $600 - 850nm$, καθώς και από το σημείο στο οποίο βρίσκεται ο καρκινικός όγκος. Ανεξάρτητα από το ποια πηγή θα επιλεγεί τελικά, το μήκος κύματος του φωτός που θα παράγει θα πρέπει να αντιστοιχεί στο μέγιστο απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή. Επιπλέον θα πρέπει να εξασφαλίζεται ομοιόμορφη ένταση ακτινοβολίας σε όλο το πεδίο ακτινοβολήσης^[69]

3.2

Διοδικά lasers

Η νέα γενιά lasers, που έφερε επανάσταση στην Ιατρική και η χρήση τους εισάγεται πλέον και στη φωτοδυναμική θεραπεία, είναι τα διοδικά lasers. Τα διοδικά lasers διαφοροποιούνται τελείως ως προς τον τρόπο κατασκευής και λειτουργίας τους σε σχέση με τα υπόλοιπα lasers. Το «ενεργό» τους μέσο είναι ένας ημιαγωγικός κρύσταλλος, εξαιρετικά μικρού μεγέθους, που βασίζεται κυρίως στο GaAs και σε παρόμοιες ουσίες. Τα συστήματα διοδικών lasers είναι μικρά σε μέγεθος, χρησιμοποιούν για τροφοδοσία 120 ή 220 V (δεν απαιτείται εξειδικευμένο τροφοδοτικό), το σύστημα ψύξης χρησιμοποιεί αέρα και δεν χρειάζονται τις οπτικές διατάξεις των προηγούμενων συστημάτων laser που χρησιμοποιούνταν στη φωτοδυναμική. Τα χαρακτηριστικά αυτά συμβάλλουν στη φορητότητα και ευελιξία των συστημάτων διοδικών lasers. Το μήκος κύματος εκπομπής εξαρτάται από τον ημιαγωγικό κρύσταλλο και η ισχύς εξόδου φτάνει τα $2 \mu e 4 W$. Το εύρος της δέσμης εξόδου είναι συνήθως $6mm$. Είναι τα πλέον φιλικά στη χρήση συστήματα laser που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία και τείνουν να κυριαρχήσουν έναντι των υπολοίπων^[68].



Σχήμα 3.1: Διοδικό laser ημιαγωγών

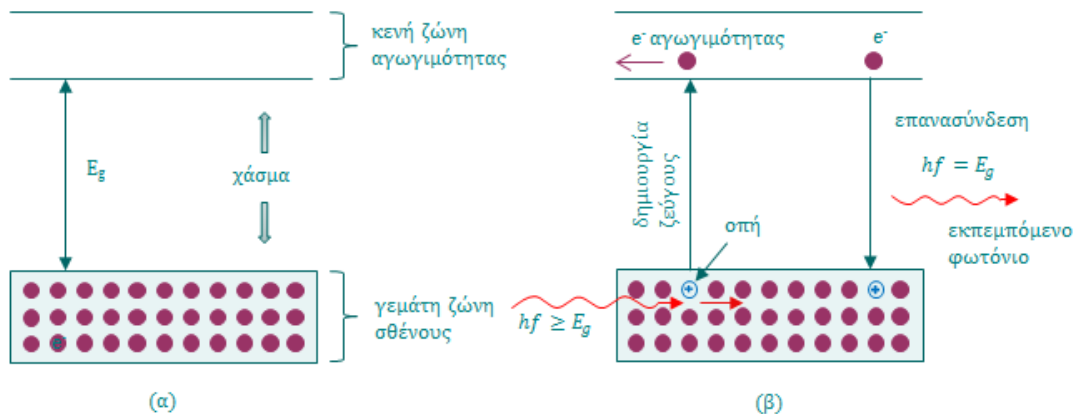
3.2.1

Αρχή λειτουργίας

Τα διοδικά laser, ή laser ημιαγωγών, είναι παρόμοια με τα υπόλοιπα στο γεγονός ότι πρέπει να δημιουργηθεί αναστροφή πληθυσμών μεταξύ κβαντικών ενεργειακών σταθμών για να προκληθεί δράση laser. Διαφέρουν ωστόσο σημαντικά ως προς την αρχή λειτουργίας τους καθώς εκμεταλλεύονται τις ιδιότητες των ημιαγωγών και των διόδων για να παράξουν φως.

Ενεργειακές ζώνες και αντιστροφή πληθυσμών σε ημιαγωγούς

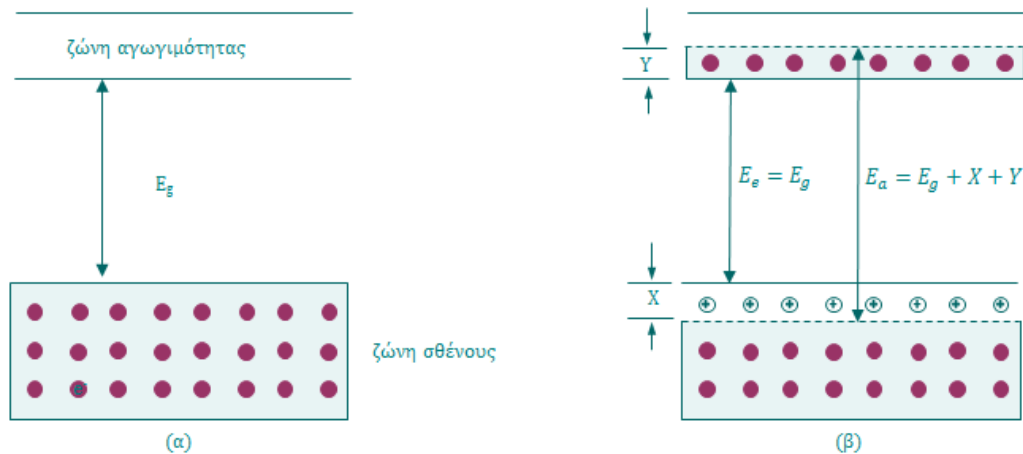
Στα στερεά οι διακριτές ενεργειακές στάθμες που απαντώνται σε μεμονωμένα άτομα διαπλώνονται σε ζώνες, εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων των ατόμων στο πλέγμα του ημιαγωγού. Το ενδιαφέρον περιορίζεται στις δυο εξωτερικές ενεργειακές ζώνες, τη ζώνη σθένους και τη ζώνη αγωγιμότητας. Σε έναν ημιαγωγό σε θερμική ισορροπία, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, η ζώνη σθένους είναι πλήρης με ηλεκτρόνια ενώ η ζώνη αγωγιμότητας κενή.



Σχήμα 3.2: (α) Ενεργειακές ζώνες ημιαγωγού χωρίς νοθεύσεις σε 0K. (β) Δημιουργία και επανασύνδεση ζευγών ηλεκτρονίων οπών στον ημιαγωγό. ^{170]}

Οι δυο ζώνες χωρίζονται από μια απαγορευμένη ενεργειακή περιοχή, ενεργειακό χάσμα, έτσι πολύ λίγα ηλεκτρόνια μπορούν να υπερπηδήσουν το χάσμα σε κανονικές συνθήκες και να γίνουν φορείς αγωγιμότητας. Συνεπώς οι ημιαγωγοί, υπό κανονικές συνθήκες, δεν είναι καλοί αγωγοί του ηλεκτρισμού. Μια διέγερση όμως (οπτική, θερμική, ηλεκτρική) μπορεί να προκαλέσει μετάβαση των ηλεκτρονίων από τη ζώνη σθένους στη ζώνη αγωγιμότητας αφήνοντας στη ζώνη σθένους μια οπή. Το διεγερμένο στη ζώνη αγωγιμότητας ηλεκτρόνιο αποδιεγειρόμενο επιστρέφει στη ζώνη σθένους και εάν επανασυνδεθεί με μια οπή τότε εκπέμπεται φως ενέργειας ίσης με την ενέργεια του

ενεργειακού χάσματος. Οι ημιαγωγοί αυτοί χαρακτηρίζονται άμεσου ενεργειακού χάσματος. Στους ημιαγωγούς έμμεσου ενεργειακού χάσματος μέρος της ενέργειας επανασύνδεσης προκαλεί ταλαντώσεις στο κρυσταλλικό πλέγμα του ημιαγωγού (θερμότητα). Στις οπτοηλεκτρονικές διατάξεις προτιμώνται οι ημιαγωγοί άμεσου ενεργειακού χάσματος^[70].



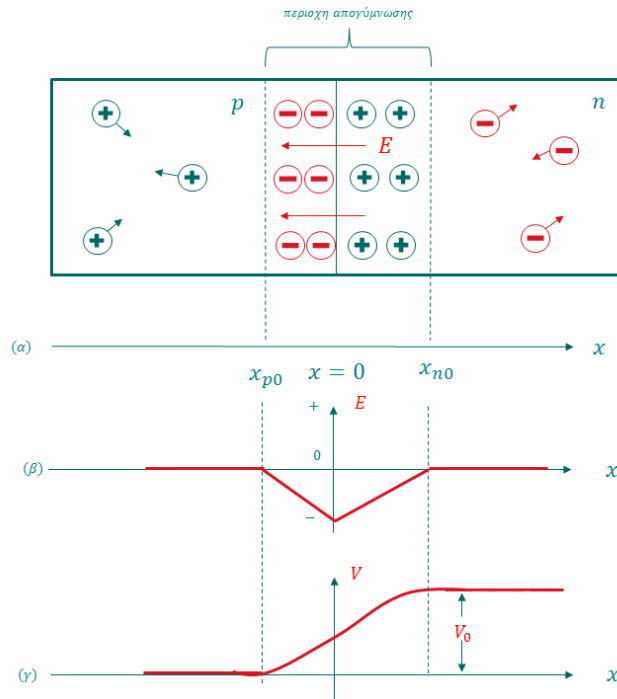
Σχήμα 3.3: Αντιστροφή πληθυσμών σε ημιαγωγό. (α) Θερμική ισορροπία. (β) Μετά από οπτική ή ηλεκτρική άντληση^[70].

Εάν εφαρμοστεί ισχυρή οπτική ή ηλεκτρική διέγερση είναι δυνατό να προκληθεί αναστροφή πληθυσμών στον ημιαγωγό. Η ζώνη σθένους αδειάζει από ηλεκτρόνια έως ένα βάθος X (πλήρης οπών) ενώ η ζώνη αγωγιμότητας γεμίζει από ηλεκτρόνια μέχρι ένα ύψος Y. Η αναστροφή πληθυσμών οδηγεί σε εξαναγκασμένη εκπομπή.

Δίοδος επαφής p-n

Οι ημιαγωγοί εμπλουτίζονται με προσμίξεις ώστε να τροποποιούνται οι ιδιότητές τους ανάλογα με την εφαρμογή. Βάση για την ανάπτυξη των διοδικών lasers αποτελούν οι δίοδοι τύπου p-n. Πρόκειται για δυο ημιαγωγούς, έναν ημιαγωγό τύπου -p και έναν ημιαγωγό τύπου -n οι οποίοι έχουν έρθει σε επαφή. Στις επαφές τύπου p-n διακρίνονται τρεις περιοχές: η περιοχή τύπου -p, η περιοχή απογύμνωσης και η περιοχή τύπου -n (Σχήμα 3.4(α)). Η περιοχή απογύμνωσης προκύπτει στη σύνδεση των ημιαγωγών τύπου -p και -n, όπου ευκίνητα ηλεκτρόνια δότη διαχέονται προς την περιοχή -p της διάταξης αφήνοντας πίσω τους ακίνητα θετικά ιόντα ενώ ταυτόχρονα, αντίστροφα, μερικές οπές διαχέονται προς την πλευρά -n της διάταξης και αφήνουν πίσω τους ακίνητα αρνητικά ιόντα. Το εσωτερικό ηλεκτρικό πεδίο της περιοχής απογύμνωσης αναγκάζει τα ευκίνητα φορτία να εξέρχονται από αυτή, διατηρώντας με τον τρόπο αυτό απογυμνωμένη την περιοχή από ευκίνητους φορείς (Σχήμα 3.4 (β)). Αυτό το ηλεκτρικό πεδίο δημιουργεί

ένα φράγμα δυναμικού V_0 , το οποίο εμποδίζει την περεταίρω διάχυση των οπών και των ηλεκτρονίων διαμέσου της επιφάνειας επαφής (Σχήμα 3.4 (γ)). Επιπλέον εξασφαλίζει μηδενικό ρεύμα διαμέσου της επαφής όταν δεν εφαρμόζεται εξωτερική ηλεκτρική τάση^[70].

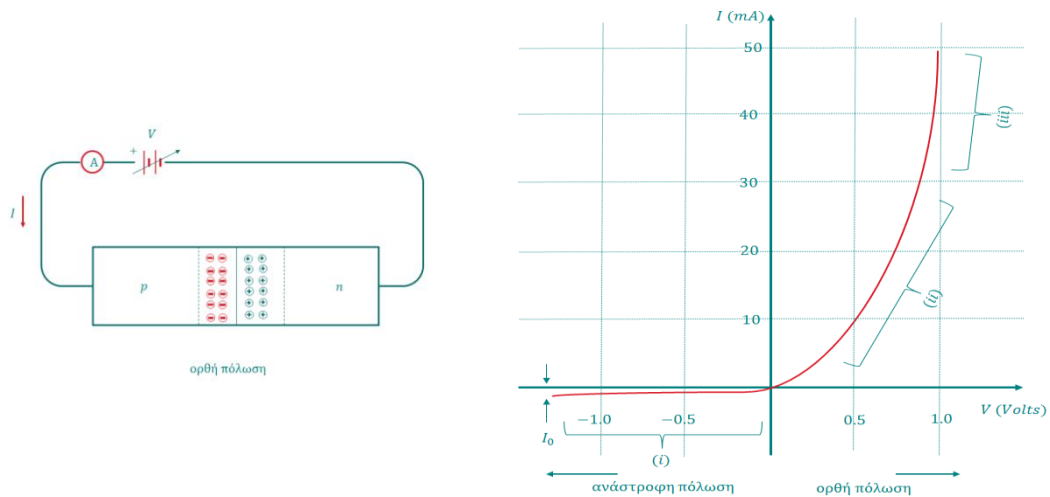


Σχήμα 3.4: (α) διάταξη διόδου $p - n$. (β) Εσωτερικό ηλεκτρικό πεδίο συναρτήσει της απόστασης x σε μια επαφή $p - n$. (γ) Εσωτερικό δυναμικό συναρτήσει της απόστασης x σε μια επαφή $p - n$ ^[70].

Εάν στα άκρα της επαφής εφαρμοστεί εξωτερική ηλεκτρική τάση με ορθή πόλωση (αντίθετη πολικότητα από τη V_0) (Σχήμα 3.5(α)), το φράγμα ελαττώνεται με αποτέλεσμα τα εμφανίζεται ένα ρεύμα το οποίο αυξάνει εκθετικά όσο αυξάνει η εξωτερική τάση (Σχήμα 3.5 (β)). Όταν η πολικότητα της εξωτερικής τάσης αλλάξει, ανάστροφη πόλωση (Σχήμα 3.5 (β) περιοχή (i)), τότε το φράγμα δυναμικού μεγαλώνει με αποτέλεσμα να δυσκολεύει ακόμα περισσότερο η διάχυση φορέων αντίθετου τύπου προς τις δυο πλευρές της επαφής. Το πολύ μικρό ρεύμα αντίθετης φοράς που δημιουργείται λόγω της ανάστροφης πόλωσης φτάνει γρήγορα σε κορεσμό, I_0 , καθώς αυξάνεται η ανάστροφη πόλωση. Η σχέση μεταξύ ρεύματος και τάσης σε μια ιδανική δίοδο δίνεται από τη σχέση:

$$I = I_0(e^{qV/kT} - 1)$$

Όπου q το ηλεκτροκινικό φορτίο, k η σταθερά Boltzmann, T η θερμοκρασία σε (K). Η χαρακτηριστική καμπύλη ρεύματος - τάσης σε μια δίοδο παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.5(β).



Σχήμα 3.5: (α) ορθή πόλωση διόδου $p - n$. (β) Χαρακτηριστική καμπύλη ρεύματος τάσης μιας διόδου $p - n$ [70].

Υπό συνήθη ορθή πόλωση (Σχήμα 3.5(β) περιοχή (ii)) τα ηλεκτρόνια σε μια δίοδο $p - n$ άγουν το ρεύμα στην πλευρά της n επαφής και οι οπές στην πλευρά p , έτσι μειώνονται οι φορείς αγωγιμότητας στην περιοχή απογύμνωσης. Εάν εφαρμοστεί ισχυρή ορθή πόλωση (Σχήμα 3.5(β) περιοχή (iii)) τότε τα ηλεκτρόνια και οι οπές εγχέονται διαμέσου της περιοχής απογύμνωσης μέσα στις περιοχές p και n αντίστοιχα. Η έγχυση των φορέων διαμέσου της περιοχής απογύμνωσης, ηλεκτρονίων στη ζώνη αγωγιμότητας στην πλευρά p και οπών στη ζώνη σθένους στην πλευρά n , οδηγεί στο σχηματισμό ενός στρώματος γύρω από την επαφή στο οποίο υπάρχει αντιστροφή πληθυσμών. Η διεύδυση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την επανασύνδεση ηλεκτρονίων οπών με εκπομπή ακτινοβολίας, η ένταση της οποίας αυξάνεται με αύξηση της πυκνότητας του ορθού ρεύματος.

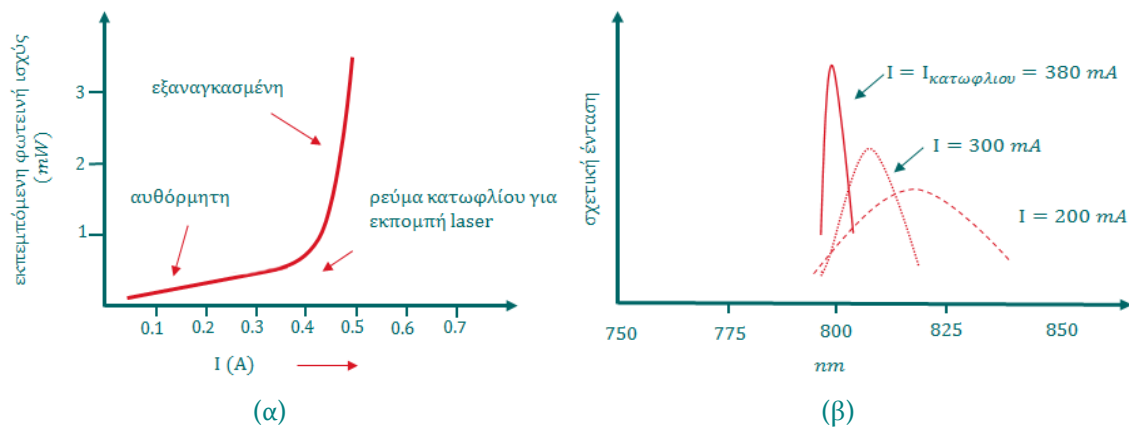
LEDs

Για χαμηλές τιμές του ρεύματος (Σχήμα 3.5(β) περιοχή (ii)) η μέτρια αντιστροφή πληθυσμών που σχηματίζεται γύρω από την επαφή $p - n$ δημιουργεί ένα ευρύ φάσμα εκπομπής το οποίο οφείλεται στην αυθόρμητη εκπομπή φωτός. Σε τέτοιες χαμηλές τιμές ρεύματος λειτουργούν οι δίοδοι φωτοεκπομπής, LEDs (Σχήμα 3.6(α)).

Διοδικά lasers

Μεγαλύτερης πυκνότητας ρεύμα ορθής πόλωσης (Σχήμα 3.5(β) περιοχή (iii)) δημιουργεί εντονότερη αντιστροφή πληθυσμών η οποία οδηγεί σε κατ' εξοχήν εξαναγκασμένη εκπομπή, σε εκλέπτυνση του φάσματος εκπομπής και τελικά σε σχεδόν

μονοχρωματική ακτινοβολία (Σχήμα 3.6(α) και (β)). Σύμφωνα φως laser λαμβάνεται τοποθετώντας τη δίοδο σε ένα οπτικό αντηχείο, όπως και στα υπόλοιπα lasers.



Σχήμα 3.6: (α) ορθή πόλωση διόδου $p - n$. (β) Χαρακτηριστική καμπύλη ρεύματος τάσης μιας διόδου $p - n$ [70].

Η περιγραφή αφορούσε έναν τυπικό διοδικό laser, το laser GaAs. Ανάλογα με τον τύπο του ημιαγωγού και τον τρόπο νόθευσής του προκύπτουν διοδικά lasers με διαφορετικά φασματικά χαρακτηριστικά.

3.3

Πηγές μη σύμφωνου φωτός

3.3.1

Λυχνίες

Οι πρώτες πηγές φωτός που χρησιμοποιήθηκαν στη φωτοδυναμική ήταν πηγές ασύμφωνου φωτός, συμβατικές λάμπες. Οι πηγές αυτές είναι πιο ασφαλείς και εύκολες στη χρήση, δεν χρειάζονται εξειδικευμένη συντήρηση και έχουν χαμηλότερο κόστος. Το φως τους καλύπτει μεγάλο φάσμα μηκών κύματος γεγονός που καθιστά αναγκαία το συνδυασμό τους με κατάλληλο συνδυασμό βαθυπερατών, υψηπερατών ή ζωνοπερατών φίλτρων. Τα ζωνοπερατά φίλτρα επιτρέπουν μήκη κύματος σε εύρος 10 nm , τα υψηπερατά φίλτρα συνεισφέρουν στο να αποκοπεί η υψηλής ισχύος UV ακτινοβολία της δέσμης εξόδου της λάμπας, ενώ τα βαθυπερατά φίλτρα συνήθως χρειάζονται για να αποκόψουν την υπέρυθη ακτινοβολία της δέσμης εξόδου η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε θέρμανση της περιοχής που βρίσκεται υπό θεραπεία. Οι λάμπες έχουν το μειονέκτημα ότι παράγουν χαμηλής ισχύος φως, είναι δύσκολο να ελεγχθεί η δόση της ακτινοβολίας. Τέτοιες πηγές ήταν οι λυχνίες χαλαζία, ξένου, βολφραμίου και αλογόνου[68, 71, 72]

3.3.2

LEDs

Πέρα από τις συμβατικές πηγές φωτός, τα laser και τις λυχνίες, τα τελευταία χρόνια ενισχύεται η χρήση φωτοδιόδων (Light Emitting Diodes, LEDs) στη φωτοδυναμική θεραπεία^[12, 68, 71]. Τα LEDs προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα τόσο στην κλινική όσο για στην εργαστηριακή πράξη. Τα μήκη κύματος εκπομπής τους κυμαίνονται από τη UVA περιοχή, $350nm$, μέχρι το εγγύς υπέρυθρο, $1100nm$, είναι πολύ ικανοποιητικές πηγές φωτός για δερματικές εφαρμογές της φωτοδυναμικής. Το εύρος της δέσμης εξόδου τους είναι $5 - 10nm$ και η ισχύς εξόδου τους μπορεί να παρέχει έως $150mW/cm^2$, καλύπτοντας επιφάνεια έως $20cm^2$. Η ισχύς εξόδου που έως τώρα επιτυγχάνουν τα LEDs είναι ένας παράγοντας που περιορίζει την εκτεταμένη χρήση τους στη φωτοδυναμική, η εξέλιξη ωστόσο της τεχνολογίας θα τον αναιρέσει. Τα δυο συγκριτικά πλεονεκτήματα των LEDs είναι η ευελιξία τους και το μικρό τους κόστος. Επιπλέον μπορούν να τροφοδοτηθούν από μπαταρίες γεγονός το οποίο τα καθιστά τις κατεξοχήν φορητές πηγές φωτός στη φωτοδυναμική^[68].

Καθώς οι φωτοευαίσθητοποιητές έχουν διαφορετικά μέγιστα απορρόφησης, η αγορά laser για την ενεργοποίηση του καθενός από αυτούς είναι ιδιαίτερα ακριβή. Επιπλέον η τεχνολογία έχει προχωρήσει στην κατασκευή μικροσκοπικών LEDs τα οποία μπορούν να διαταχθούν σε διάφορες γεωμετρίες και μεγέθη καθιστώντας τα εξαιρετικά εύχρηστες και ευέλικτες πηγές φωτός. Για παράδειγμα μεγάλες διατάξεις LEDs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ακτινοβολήση μεγάλης έκτασης επιφανειακού όγκου, ενώ ένα LED μπορεί να προσαρμοστεί σε έναν διαχύτη και να εισαχθεί ακριβώς μέσα στον καρκινικό όγκο για ενδοϊστική ακτινοβολήση^[73, 74].

3.3.3

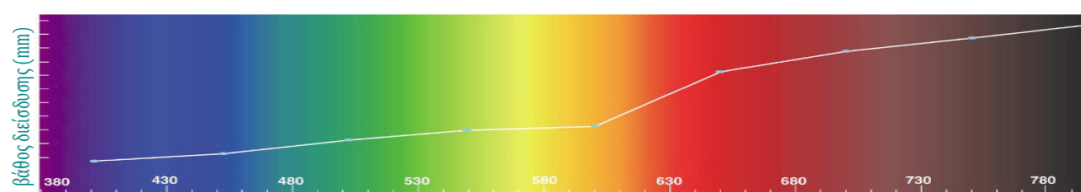
Σύνοψη συστημάτων ακτινοβολήσης στη Φωτοδυναμική

Τα lasers πλεονεκτούν έναντι των συμβατικών λυχνιών και των LEDs καθώς έχουν τις παρακάτω ιδιότητες:

- **Μονοχρωματικότητα:** δυνατότητα επιλογής μηκών κύματος, από το υπεριώδες μέχρι το υπέρυθρο, με ακρίβεια $0.2 nm$. Λόγω της μονοχρωματικότητας αυτών των πηγών δεν απαιτούνται φίλτρα τα οποία θα έκοβαν τα ανεπιθύμητα μήκη κύματος ενώ επίσης δεν υπάρχουν απώλειες στην ένταση της διεγείρουσας ακτινοβολίας.
- **Κατευθυντικότητα:** η ενέργεια παραμένει συγκεντρωμένη και με σύστημα κατόπτρων να εστιάζεται στο στόχο.

- Συμφωνία: επιτρέπει στην ακτινοβολία να εστιάζεται. Έτσι επιτρέπεται η μέσω οπτικών ινών μεταφορά-οδήγηση της ακτινοβολίας.
- Υψηλή ένταση: υψηλή συγκέντρωση φωτεινής ενέργειας στο δείγμα για να συμβούν οι επιθυμητές φωτοχημικές διεργασίες.
- Δυνατότητα συνεχούς ή παλμικής ακτινοβολίας, η οποία δίνει την δυνατότητα χρησιμοποίησης της σε ποικίλες εφαρμογές. Έτσι είναι δυνατή η συγκέντρωση ενέργειας σε μικρούς χρονικά παλμούς, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα διέγερσης του δείγματος με ταυτόχρονη προστασία από πιθανή φωτοκαταστροφή / φωτολεύκανση [12, 68, 75] .

Πίνακας 3.1: Συστήματα lasers που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία



laser	αργού	χρωστικών αντλούμενα από laser αργού	ατμών μετάλλων	χρωστικών αντλούμενα από laser ατμών μετάλλων	σταθερής κατάστασης	χρωστικών αντλούμενα από laser σταθερής κατάστασης	διοδικά laser ημιαγωγών
Μήκος κύματος εκπομπής nm	488 και 514.5	500 – 750 ανάλογα με τη χρωστική	UV ή ορατό ανάλογα με το μέταλλο	500 – 700 ανάλογα με τη χρωστική	1064, 532, 355, 266 για το Nd:Yag	400 – 750 ανάλογα με τη χρωστική	600 – 950
Εύρος nm	μονοχρωματικό	5-10	μονοχρωματικό	5-10	μονοχρωματικό	5-10	~6
Διάρκεια παλμού	CW	CW	10-50ns παλμικό	10-50ns παλμικό	10ps-30ns παλμικό	10ps-30ns παλμικό	CW
Ακτινοβολία	0.5-1 W/cm ²	10-200 mW/cm ²	έως 10 W/cm ²	10-500 mW/cm ²	έως 10 W/cm ²	10-500 mW/cm ²	έως 700 mW/cm ²

Στις πρώτες εφαρμογές της φωτοδυναμικής τα lasers που κυρίως χρησιμοποιούνταν ήταν τα lasers αργού και ατμών μετάλλων, καθώς συνδύαζαν μεγάλη ισχύ εξόδου και μήκη κύματος εκπομπής στην περιοχή του κόκκινου. Το ενδιαφέρον όμως και η ανάγκη για μικρές σε όγκο, φορητές και εύκολες στη χρήση πηγές lasers οδήγησε στην χρήση των διοδικών lasers ως πηγές φωτός στη φωτοδυναμική θεραπεία. Η ανάπτυξη και η πρόοδος που συντελείται τα τελευταία χρόνια στην τεχνολογία των lasers έχει καλύψει ένα μεγάλο φάσμα των φωτοευαίσθητοποιητών (Πίνακας 3.1).

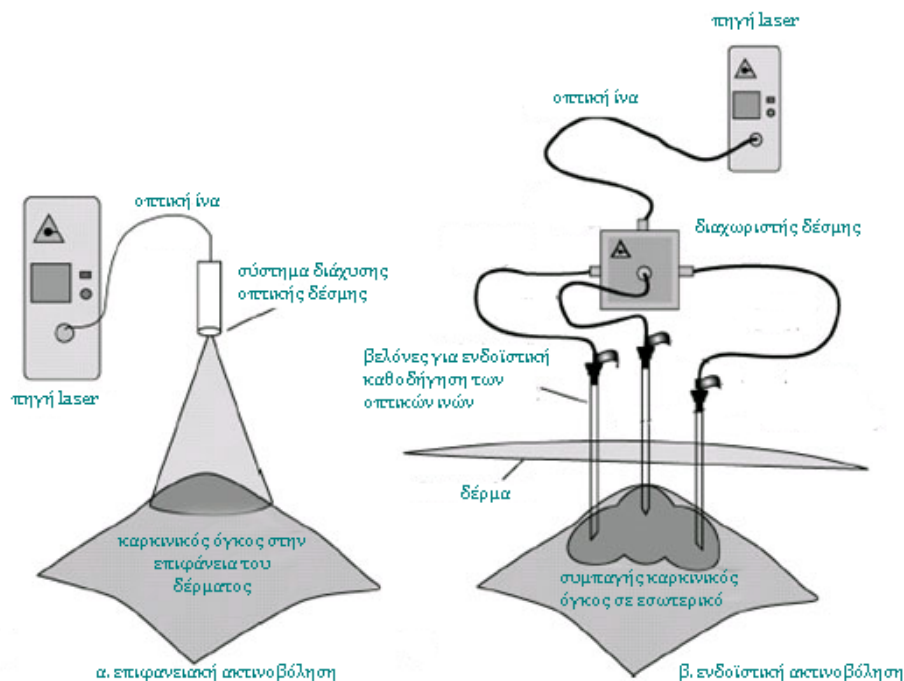
3.4

Συστήματα μεταφοράς ακτινοβολίας

3.4.1

Συστήματα επιφανειακής ακτινοβολήσης

Καρκινικοί όγκοι με μικρό πάχος που δεν ξεπερνά το βάθος διείσδυσης του φωτός (ανάλογα με το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται) και βρίσκονται στην επιφάνεια του δέρματος ή στην στοματική κοιλότητα αντιμετωπίζονται με επιφανειακή ακτινοβολήση (Σχήμα 3.7(α)). Το φως μεταφέρεται μέσω οπτικής ίνας με σύστημα διάχυσης της οπτικής δέσμης που εξασφαλίζει την κυκλική συμμετρία της ακριβώς πάνω στην καρκινική περιοχή (Σχήμα 3.7(α)).



Σχήμα 3.7: (α) επιφανειακή ακτινοβολήση (β) ενδοϊστική ακτινοβολήση^[76]

Η διάμετρος της δέσμης του φωτός ρυθμίζεται ώστε να καλύπτεται η καρκινική περιοχή και να εξασφαλίζεται η απαιτούμενη ισχύς ακτινοβολήσης ανά cm^2 .

3.4.2

Συστήματα ενδοϊστικής ακτινοβολήσης

Τα τελευταία χρόνια καθώς υπήρχε το ενδιαφέρον για εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας σε καρκινικούς όγκους πάχους $> 0.5cm$, οι οποίοι βρίσκονται και σε εσωτερικά όργανα, αναπτύχθηκε η τεχνική της ενδοϊστικής

ακτινοβόλησης. Κατάλληλες χειρουργικές βελόνες τοποθετούνται ενδοϊστικά μέσα στον καρκινικό όγκο. Η τοποθέτηση των βελόνων γίνεται υπό την καθοδήγηση εικόνων υπερήχων, αξονικής και μαγνητικής τομογραφίας. Ο αριθμός και το μήκος των βελόνων ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του καρκινικού όγκου και το βάθος μέσα στο σώμα του ασθενούς. Συνήθως ο αριθμός των βελόνων που χρησιμοποιούνται είναι 4, 8 ή 12. Ένας διαχωριστής δέσμης χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει την αρχική δέσμη laser κατάλληλου μήκους κύματος σε κατάλληλο αριθμό (4, 8 ή 12) δεσμών ίσης έντασης. Κάθε δέσμη καθοδηγείται σε οπτική ίνα και οι οπτικές ίνες διαμέσου των βελόνων εισέρχονται στον καρκινικό όγκο (Σχήμα 3.7(β)). Με την τεχνική αυτή καθοδηγείται το κατάλληλου μήκους κύματος φως για την ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή μέσα στον καρκινικό όγκο. Ωστόσο μια από τις οπτικές ίνες δεν εισέρχεται στον οργανισμό του ασθενούς αλλά καθοδηγείται σε ένα ενεργόμετρο για τη διαρκή παρακολούθηση της ισχύος εξόδου της δέσμης του laser. Ο αριθμός των οπτικών ινών επιλέγεται τέτοιος ώστε να εξασφαλίζεται η ομοιόμορφη ακτινοβόληση όλου του καρκινικού όγκου, χωρίς να δέχονται υψηλές δόσεις ακτινοβολίας οι γειτονικοί υγιείς ιστοί. Συνήθως οι βελόνες τοποθετούνται μέσα στον όγκο έτσι ώστε να σχηματίζεται ένα μοτίβο με ισόπλευρα τρίγωνα.

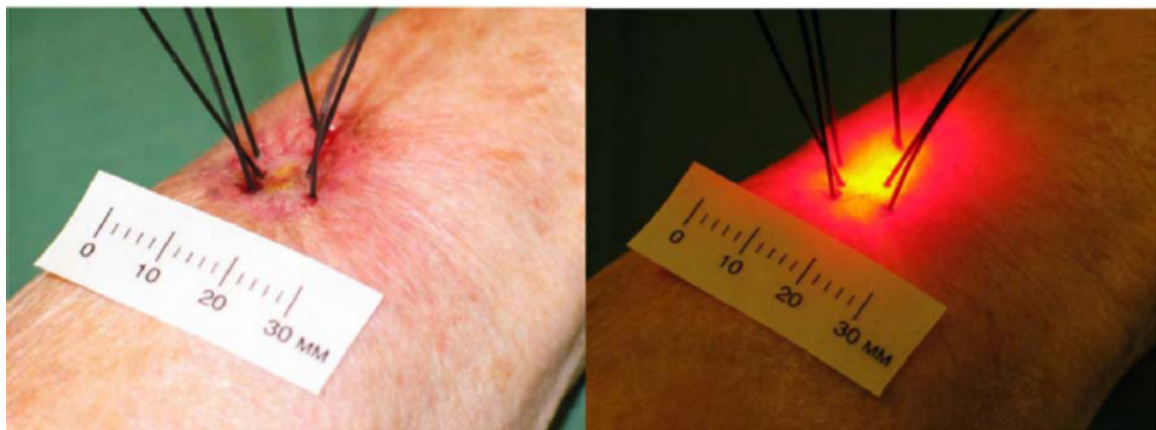
Υπολογιστική δοσιμετρία πραγματοποιείται πριν και κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης. Η δοσιμετρία είναι απαραίτητη για να υπολογιστούν της κατάλληλης δόσης του φωτός για την ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή. Κυρίως όμως χρειάζεται για να καθοριστεί ο αριθμός και η διάταξη των οπτικών ινών (άρα και των χειρουργικών βελόνων) μέσα στον καρκινικό όγκο ώστε να μην επηρεάζονται οι γειτονικοί υγιείς ιστοί από την ακτινοβολία. Στις εφαρμογές της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας συνήθως χρησιμοποιούνται οπτικές ίνες με συστήματα διάχυσης κυλινδρικής συμμετρίας ή οπτικές ίνες με γυμνό άκρο (Σχήμα 3.7(β)). Ο κυλινδρικός διαχύτης εξασφαλίζει ομοιόμορφη ακτινοβόληση κατά μήκος του, το οποίο μπορεί να είναι έως και 1cm . Επιλέγεται τέτοιο μήκος διαχύτη ώστε να εξασφαλίζεται η ομοιόμορφη ακτινοβόληση σε όλο το ύψος του όγκου. Εάν το μήκος του είναι μικρό, τότε οι ίνες εισάγονται αρχικά στο βαθύτερο σημείο του όγκου γίνεται η ακτινοβόληση και στη συνέχεια απομακρύνονται από την αρχική τους θέση και πραγματοποιείται ξανά ακτινοβόληση ώστε να διεγερθούν και τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή που έχουν κατακρατηθεί πιο ψηλά μέσα στον όγκο [76].

Δοσιμετρία

Η έννοια της δοσιμετρίας είναι κεφαλαιώδης στη φωτοδυναμική, ιδιαίτερα δε στην ενδοϊστική φωτοδυναμική. Στόχος ενός συστήματος δοσιμετρίας είναι να υπολογίσει την ελάχιστη δόση ενέργειας που απαιτείται για τη διέγερση του φωτοευαισθητοποιητή μέσα στον καρκινικό ιστό εξασφαλίζοντας ταυτόχρονα ότι το φως θα περιορίζεται στα

όρια του καρκινικού όγκου ώστε να αποφευχθεί η διέγερση μορίων φωτοευαισθητοποιητή τα οποία έχουν κατακρατηθεί από τους γειτονικούς υγιείς ιστούς. Ο υπολογισμός αφορά την εύρεση του αριθμού των οπτικών ινών και της διάταξής τους μέσα στον καρκινικό όγκο ώστε να εξασφαλίζεται ότι η ελάχιστη απαραίτητη ενέργεια θα κατανέμεται σε όλον τον όγκο του καρκινικού ιστού. Επιπλέον θα πρέπει να υπολογίζει τη συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή καθώς και συνυπολογίζει και την οξυγόνωση του καρκινικού όγκου κατά τη διάρκεια της θεραπείας.

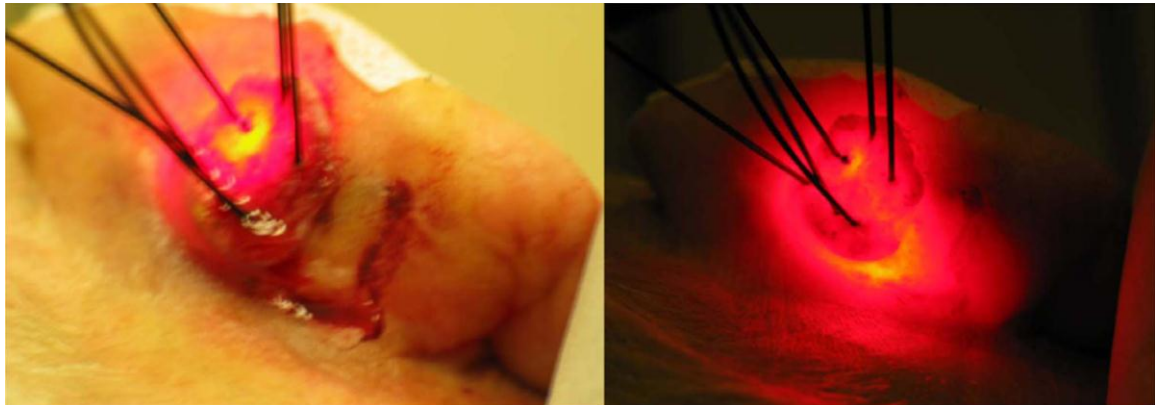
Ένα από τα πρώτα συστήματα που αναπτύχθηκε για την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία περιελάμβανε τη διαίρεση της ισχύος εξόδου ενός laser σε έξι ίσα μέρη και την καθοδήγησή της μέσα από έξι οπτικές ίνες μέσα στον καρκινικό όγκο. Η κλινική εμπειρία από αυτό το σύστημα αποκτήθηκε με εφαρμογές σε δερματικούς καρκινικούς όγκους μεγάλου σχετικά πάχους. Το φως εκπομπής κάθε οπτικής ίνας μετρήθηκε τοποθετώντας ανιχνευτές στα άκρα των υπόλοιπων πέντε ινών. Σε αυτές έχει διακοπεί η παροχή φωτός. Παρακολουθώντας και καταγράφοντας το φως το οποίο διαχέεται ανάμεσα στα άκρα των οπτικών ινών είναι δυνατή η μοντελοποίηση η κατανομή της ενέργειας του φωτός μέσα στον όγκο (Σχήμα 3.8)^[5].



Σχήμα 3.8: Διάταξη ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας μη επιφανειακών δερματικών καρκινικών όγκων όπου το φως καθοδηγείται σε αυτούς μέσω έξι οπτικών ινών. Μια οπτική ίνα χρησιμοποιείται για μεταφορά φωτός ενώ οι υπόλοιπες πέντε δρουν ως ανιχνευτές καταγράφοντας τη δόση ενέργεια στο σημείο που είναι τοποθετημένες. Στόχος του συστήματος ήταν να μετρηθεί η κατανομή της ενέργειας του φωτός μέσα στον καρκινικό ιστό ως προς την απόσταση από την οπτική ίνα διέγερσης^[5].

Η τεχνολογία εξελίχθηκε ώστε κάθε ίνα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για μεταφορά του φωτός διέγερσης αλλά και για ανίχνευση του φωτός που φτάνει σε αυτή.

Τα βασικά στοιχεία από τα οποία απαρτίζεται η διάταξη παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα, για την περίπτωση συστήματος με έξι ίνες (Σχήμα 3.9).



Σχήμα 3.9: Διάταξη ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας καρκινικών όγκων μεγάλου σχετικά βάθους. Στην αριστερή εικόνα η μια ίνα χρησιμοποιείται για να μεταφέρει το φως διέγερσης και οι υπόλοιπες πέντε λειτουργούν ως ανιχνευτές ενώ στη δεξιά εικόνα και οι έξι ίνες χρησιμοποιούνται για να μεταφέρουν το φως διέγερσης κατά τη θεραπεία^[5].

Το παραπάνω σύστημα είναι βασίζεται σε προηγμένους υπολογιστικούς αλγορίθμους δοσιμετρίας. Το λογισμικό λαμβάνει τα σήματα από τις οπτικές ίνες στον όγκο και τα τροφοδοτεί ως είσοδο σε ένα πρόγραμμα υπολογισμού δόσης, το οποίο ουσιαστικά βασίζεται στην ιδέα του προσδιορισμού της δόσης κατωφλίου. Η ιδέα αυτή αφορά στο να εξασφαλιστεί ότι η ελάχιστη απαραίτητη δόση ενέργειας, π.χ. για πρόκληση άμεσου κυτταρικού θανάτου, φτάνει σε όλα τα σημεία-στόχους του υπό θεραπεία οργάνου. Απαραίτητη επίσης είναι η προσομοίωση του οργάνου μέσα στο οποίο εντοπίζεται ο καρκινικός όγκος. Για την περίπτωση του προστάτη, η μοντελοποίηση της κατανομής της ενέργειας του φωτός από ένα σύστημα 18-ινών παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (Σχήμα 3.10)^[5].

Η φωτοδυναμική δόση ορίζεται ως ο αριθμός των φωτονίων που απορροφώνται από τον φωτοευαισθητοποιητή ανά μονάδα ιστού. Μπορεί να υπολογιστεί σύμφωνα με τον τύπο:

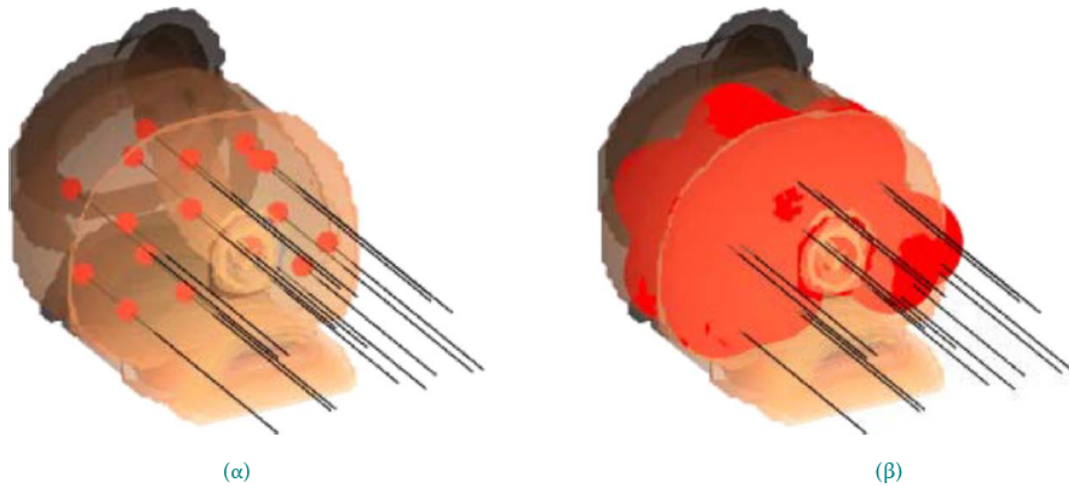
$$D_{PDT} = \int_0^t \epsilon C_{PS} \Phi(t) dt$$

Όπου ϵ ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή, C_{PS} η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή, Φ η ροή ακτινοβολίας (ροή ενέργειας ακτινοβολίας) (fluence rate), και t ο χρόνος που διαρκεί η ακτινοβολία. Στην περίπτωση ενδοϊστικής φωτοδυναμικής, η D_{PDT} πρέπει να είναι μεγαλύτερη από τη δόση κατωφλίου σε όλο το χώρο που καταλαμβάνει ο καρκινικός όγκος - στόχος. Αυτό

συνεπάγεται ότι η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή και η ακτινοβολήση θα πρέπει να ποσοτικοποιηθούν και στις τρεις διαστάσεις^[5, 77].

Εάν θεωρηθεί ότι η κατανομή του φωτοευαισθητοποιητή στον καρκινικό όγκο είναι ομογενής τότε η φωτοδυναμική δόση, η συνολική δόση ενέργειας, απλοποιείται στην^[5, 77]:

$$D_{PDT} = \int_0^t \Phi dt \quad \text{ή} \quad D_{PDT} = \Phi * t$$



Σχήμα 3.10: Προσομοίωση μετά από μοντελοποίηση της κατανομής της ακτινοβολήσης στον προστάτη μέσω πολλαπλών οπτικών ίνων. Οι εικόνες (α) και (β) παρουσιάζουν δυο διαφορετικές περιπτώσεις κατά τη διάρκεια της ίδιας συνεδρίας όπου οι ισο-επιφάνειες δηλώνουν τμήματα του αδένα τα οποία έχουν λάβει τουλάχιστον τη δόση κατωφλίου^[5].

Η ροή ακτινοβολήσης μπορεί να μετρηθεί πειραματικά χρησιμοποιώντας καλιμπραρισμένες οπτικές ίνες, και με ολοκλήρωση του σήματος για όλη τη διάρκεια της θεραπείας προκύπτει η δόση ακτινοβολήσης. Οι σημειακές αυτές μετρήσεις είναι πολύτιμες για να παρέχουν αντιπροσωπευτικές τιμές της δόσης του φωτός σε ένα σημείο.

Πυρήνας ενός συστήματος υπολογιστικής δοσιμετρίας είναι ο υπολογισμός, η προσομοίωση της κατανομής της έντασης του φωτός, της ακτινοβολήσης, στον ιστό. Ως πηγές φωτός θεωρούνται συνήθως οπτικές ίνες με διαχύτη κυλινδρικής συμμετρίας. Η κατανομή της έντασης του φωτός μοντελοποιείται χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές για τη λύση της προσέγγισης διάχυσης της εξίσωσης μεταφοράς θεωρία για τον υπολογισμό της έντασης σε κάθε σημείο του υπό θεραπεία στόχου.

Κατά την προσέγγιση διάχυσης η κατανομή του φωτός στον ιστό περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\nabla(D(\vec{x}) \nabla \varphi(\vec{x}, t)) - \mu_a \varphi(\vec{x}, t) + S(\vec{x}, t) = \frac{1}{v} \frac{\partial \varphi(\vec{x}, t)}{\partial t}$$

Όπου φ ($W\ cm^{-2}$) η ροή ακτινοβολήσης (fluence rate) σε ένα σημείο, S η ισχύς της πηγής φωτός, t ο χρόνος (s), D ο συντελεστής διάχυσης $D = [3(\mu_a + \mu'_s)]^{-1}$, μ_a και μ'_s ο συντελεστής απορρόφησης και ενεργός συντελεστής σκέδασης του ιστού (cm^{-1}) και v η ταχύτητα του φωτός στον ιστό ($cm\ s^{-1}$)^[77, 78].

Για την ενδοϊστική φωτοδυναμική οι οπτικές ιδιότητες συνήθως υπολογίζονται θεωρώντας ομογενή κατανομή της απορρόφησης και της σκέδασης, επιλύοντας χωρικά συστήματα σταθερής κατάστασης. Πρόσφατα έχουν αναφερθεί ανομοιογενή μοντέλα τα οποία χρησιμοποιούν τοπογραφικά σχήματα μέτρησης. Οι οπτικές ιδιότητες στην περίπτωση αυτή ανακατασκευάζονται χρησιμοποιώντας δομική πληροφορία από απεικονιστικές τεχνικές, υπέρηχους ή MRI.

Μετά τον υπολογισμό των οπτικών ιδιοτήτων το θεωρητικό μοντέλο αναλαμβάνει τον υπολογισμό της ακτινοβολήσης σε όλον τον υπό θεραπεία ιστό. Για τη δοσιμετρία κατά την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία έχουν αναπτυχθεί διάφορα υπολογιστικά μοντέλα. Για παράδειγμα μέθοδοι Monte Carlo, προσεγγίσεις της εξίσωσης μεταφοράς, μέθοδοι πεπερασμένων στοιχείων και ομογενή μοντέλα της εξίσωσης διάδοσης.

Ο υπολογισμός της ακτινοβολήσης σε κάθε σημείο μέσα στον υπό θεραπεία όγκο είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με τον σχεδιασμό του θεραπευτικού πρωτοκόλλου. Το πρόβλημα έγκειται στο να προσαρμοστεί η κατανομή του φωτός έτσι ώστε κάθε σημείο μέσα στον όγκο να λαμβάνει ακτινοβολήση πάνω από το κατώφλι. Επιπλέον και άλλες παράμετροι οι οποίες αφορούν τη βελτιστοποίηση της θέσης, του σχήματος και της ισχύος εξόδου των πηγών μέσα στον όγκο θα πρέπει να συνεκτιμηθούν^[5, 77-79].

Κεφάλαιο IV

Συνέργεια φωτοδυναμικής & ελευθέρων ριζών- δραστικών οξυγονούχων ειδών

4.1

Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότερο υιοθετείται ο συνδυασμός κάποιας συμπληρωματικής ή εναλλακτικής θεραπείας παράλληλα με τις συμβατικές αντικαρκινικές θεραπείες, με κύριο στόχο να μειωθούν οι παρενέργειές τους. Συχνά ο συνδυασμός διαφορετικών θεραπειών μπορεί να περιλαμβάνει την ταυτόχρονη χρήση θεραπευτικών μεθόδων κάθε μια από τις οποίες στοχεύει διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίας ή μοριακούς μηχανισμούς κυτταρικής σηματοδότησης για να αυξηθούν οι πιθανότητες καταστροφής των καρκινικών κυττάρων^[37].

Θεμελιώδης αρχή της σύνθεσης, του συγκερασμού θεραπειών, είναι ο συνδυασμός μεθοδολογιών κάθε μια από τις οποίες επιτυγχάνει θεραπεία μέσω διαφορετικού μηχανισμού. Ο συνδυασμός θεραπειών μπορεί να πυροδοτήσει διαφορετικούς μηχανισμούς σηματοδότησης για να προκληθεί κυτταρικός θάνατος ενώ ταυτόχρονα να κάμπτει την αντίσταση του κυττάρου στη θεραπεία. Το τελικό θεραπευτικό αποτέλεσμα μπορεί να αθροιστικό, κάθε μια από τις επιμέρους μεθοδολογίες συμβάλει κατά ένα

ποσοστό στο συνολικό αποτέλεσμα ή αποτέλεσμα συνέργειας των θεραπειών. Στην περίπτωση της συνέργειας η λογική είναι μια μεθοδολογία να ευαισθητοποιεί τον υπό θεραπεία ιστό με τέτοιο τρόπο ώστε να απαιτείται μικρότερη δόση από τον πιο τοξικό παράγοντα μιας άλλης. Επιπρόσθετα δε, να εξαφανίζει ή τουλάχιστον να ελαχιστοποιεί τις παρενέργειες της άλλης^[37]

Τα καρκινικά κύτταρα ανταποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα με τελείως διαφορετικό τρόπο από ότι τα αντίστοιχα φυσιολογικά, για παράδειγμα διακρίνονται για τον γρήγορο πολλαπλασιασμό τους και για μειωμένο κυτταρικό θάνατο. Η απορύθμιση του ρυθμού πολλαπλασιασμού έχει αποδοθεί σε μετάλλαξη των ογκογονιδίων και γονιδίων καταστολής των όγκων. Η μείωση της απόκρισης σε ερεθίσματα κυτταρικού θανάτου σχετίζεται με ανωμαλίες στην έκφραση συγκριμένων πρωτεϊνών σχετικών με τον κυτταρικό θάνατο^[80].

Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα αντίστοιχά τους φυσιολογικά παρουσιάζουν αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών, γεγονός που αντικατοπτρίζει τη διαταραχή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης ισορροπίας σε αυτά. Η αύξηση αποδίδεται τόσο σε ενδογενείς μηχανισμούς (ενεργοποίηση ογκογονιδίων, δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων) όσο και σε εξωγενείς (κυτταροκίνες, διαταραχή στην παροχή θρεπτικών συστατικών), οι οποίοι δρουν ενισχύοντας την παραγωγή δραστικών οξυγονούχων ειδών αλλά και καταστέλλοντας τους μηχανισμούς εκκαθάρισής τους^[36, 81, 82].

Τα καρκινικά κύτταρα προσαρμόζονται στο παρατεταμένο οξειδωτικό στρες αναπτύσσοντας μηχανισμούς ενίσχυσης της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας. Η έκταση της προσαρμογής είναι ανάλογη της επιθετικότητας του καρκίνου. Ταυτόχρονα όμως ενισχύουν την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στις αντικαρκινικές θεραπείες οι οποίες στηρίζονται στην πρόκληση οξειδωτικού στρες^[36].

Αντικαρκινικές θεραπείες, όπως η φωτοδυναμική, η χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία κ.α. οι οποίες δρουν κυτταροτοξικά μέσω ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών, είναι αποτελεσματικές μόνο όταν τα επίπεδα του ενδοκυττάρου οξειδωτικού στρες που προκαλούν δεν εξουδετερώνονται από την αντιοξειδωτική άμυνα και ξεπεραστεί το κατώφλι εκείνο πέραν του οποίου ο κυτταρικός θάνατος είναι μη αναστρέψιμος. Τα επίπεδα του αναγκαίου και ικανού, επαγομένου από τις αντικαρκινικές θεραπείες, οξειδωτικού στρες για την καταστροφή του καρκινικού όγκου εξαρτώνται από το ενδογενές και εξωγενώς προκαλούμενο οξειδωτικό στρες στα καρκινικά κύτταρα και τον ανταγωνισμό που αυτά δέχονται από τους αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς^[36, 81].

4.2

Οξειδωτικό στρες

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί, με εξαίρεση τους αναερόβιους μικροοργανισμούς, έχουν ανάγκη το οξυγόνο για τη διατήρηση της ζωής^[20, 83]. Τα κύτταρα των αερόβιων οργανισμών καταναλώνουν οξυγόνο για να παράξουν ενέργεια στην αναπνευστική αλυσίδα παραγωγής ενέργειας στα μιτοχόνδρια. Παραπροϊόντα της μεταβολικής διαδικασίας παραγωγής ενέργειας στα μιτοχόνδρια καθώς και διαφόρων άλλων φυσιολογικών κυτταρικών μεταβολικών διαδικασιών είναι οι ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά οξυγονούχα είδη. Έχει υπολογιστεί ότι ο μέσος άνθρωπος δέχεται καθημερινά την επίθεση από 10000 – 20000 ελεύθερες ρίζες την οποία αντισταθμίζει με αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άμυνας^[84].

Τα προ-οξειδωτικά προϊόντα ατελούς αναγωγής του οξυγόνου κατά την αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια και διαφόρων κυτταρικών οξειδοαναγωγικών διαδικασιών, δραστικά οξυγονούχα (κυρίως) είδη και ελεύθερες ρίζες, διαδραματίζουν διπλό ρόλο καθώς δρουν τόσο τοξικά όσο και ωφέλιμα στον οργανισμό^[85]. Η ευαίσθητη ισορροπία ανάμεσα στους δυο ρόλους των προ-οξειδωτικών είναι καθοριστική για τη ζωή. Σε μικρές σχετικά συγκεντρώσεις ο ρόλος τους είναι ωφέλιμος, καθώς συμμετέχουν σε κρίσιμες κυτταρικές λειτουργίες και ανοσολογικές αντιδράσεις, για παράδειγμα προστασία από μολύνσεις και σηματοδότηση κυτταρικών διαδικασιών (ενεργοποίηση μίτωσης). Σε υψηλές συγκεντρώσεις ωστόσο προκαλούν οξειδωτικό στρες, ένα φαινόμενο το οποίο μπορεί να καταστρέψει όλες τις κυτταρικές δομές, μεμβράνες, λιπίδια, πρωτεΐνες καθώς και νουκλεϊκά οξέα^[83, 85].

Στα βιολογικά συστήματα οι βλαβερές επιδράσεις που οφείλονται στην παραγωγή προ-οξειδωτικών αντισταθμίζονται από ενζυματικούς και μη ενζυματικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άμυνας^[85, 86]. Όταν για κάποιο λόγο υπερπαραγονται προ-οξειδωτικά προϊόντα για μεγάλο σχετικά χρονικό διάστημα και / ή οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας αδυνατούν να ανταποκριθούν εξισορροπώντας αυτή τη διαταραχή τότε προκαλείται οξειδωτικό στρες. Οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας προ-οξειδωτικών – αντιοξειδωτικών, υπέρ των προ-οξειδωτικών^[87].

Το οξειδωτικό στρες παίζει κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη χρόνιων και εκφυλιστικών ασθενειών, μεταξύ των οποίων γήρανσης, αυτοάνοσων νοσημάτων, καρδιακών και νευροεκφυλιστικών ασθενειών καθώς και καρκίνου^[83, 85]. Ο οργανισμός διαθέτει πληθώρα μηχανισμών αντιοξειδωτικής άμυνας απέναντι στο οξειδωτικό στρες μέσω ενδογενών και εξωγενών αντιοξειδωτικών παραγόντων. Τα αντιοξειδωτικά είδη δρουν ως εκκαθαριστές των προ-οξειδωτικών, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την

ανοσολογική άμυνα και μειώνοντας παράλληλα τον κίνδυνο ανάπτυξης διαφόρων ασθενειών^[83].

4.2.1

Πηγές προ-οξειδωτικών

Οι ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά είδη παράγονται τόσο ως παραπροϊόντα ενδοκυττάρων διαδικασιών όσο και ως απόκριση του οργανισμού σε εξωτερικά ερεθίσματα. Ενδογενείς πηγές αποτελούν τα μιτοχόνδρια, ο μεταβολισμός του κυτοχρώματος P450 καθώς και φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Εξωγενείς πηγές είναι η UV ακτινοβολία, οι ακτίνες γ και X, καθώς και διάφοροι περιβαλλοντολογικοί παράγοντες, όπως είναι η μόλυνση της ατμόσφαιρας^[84-86].

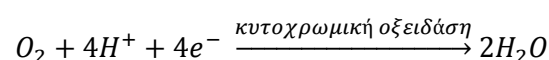
4.2.1.1

Ενδογενείς πηγές προ-οξειδωτικών

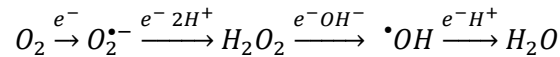
Μιτοχόνδρια

Το 85 – 90% του οξυγόνου το οποίο απορροφάται από τους αερόβιους οργανισμούς, ανάμεσά τους και ο άνθρωπος, χρησιμοποιείται από τα μιτοχόνδρια. Τα οργανίδια αυτά είναι η κύρια πηγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine triphosphate (ATP)) δηλαδή μεταβολικής ενέργειας. Οι θρεπτικές ουσίες οξειδώνονται στα μιτοχόνδρια και η ενέργεια απελευθερώνεται σταδιακά, μέσω του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια^[20].

Η αναπνευστική αλυσίδα ή αλλιώς σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων ανάγει περίπου το 95% του μοριακού οξυγόνου σε νερό^[88, 89]. Στα μιτοχόνδρια η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό γίνεται στο τελευταίο στάδιο της αναπνευστικής αλυσίδας από το ένζυμο κυτοχρωμική οξειδάση. Τα συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας είναι οργανωμένα σε διακριτά σύμπλοκα τα οποία αριθμούνται από I έως IV. Το τελικό ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας, IV, είναι το ένζυμο κυτοχρωμική οξειδάση. Αποσπά ένα ηλεκτρόνιο από καθένα από τα τέσσερα μόρια του ανηγμένου κυτοχρώματος c, οξειδώνοντάς το σε σιδηρούχο κυτόχρωμα c και προσθέτοντας τέσσερα ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση ^[20, 89, 90]:



Χημικά είναι αδύνατο να προστεθούν τέσσερα ηλεκτρόνια άμεσα στο μοριακό οξυγόνο^[20, 89]. Η διαδικασία αυτή γίνεται σε διακριτά διαδοχικά στάδια και το νερό σχηματίζεται μετά από διαδοχική τετρασθενή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου^[84]:



Η κυτοχρωμική οξειδάση ωστόσο είναι ένα μεγάλο και περίπλοκο σύμπλοκο πολυπρωτεϊνών το οποίο καταλύει πολλά αναγωγικά στάδια^[20, 89].

Μερικές φορές ωστόσο το μοριακό οξυγόνο ανάγεται ατελώς σε υπεροξειδικό ανιόν, υπεροξείδιο του υδρογόνου καθώς και σε διάφορα δραστικά οξυγονούχα είδη τα οποία οξειδώνουν το περιβάλλον τους. Τα μιτοχόνδρια παράγουν περίπου 2 – 3nmol $O_2^{\bullet -}$ / min /mg πρωτεΐνης, γεγονός που τα καθιστά την κύρια πηγή αυτής της ρίζας στον οργανισμό^[85]. Θεωρείται ότι το 5% περίπου του μοριακού οξυγόνου ανάγεται ατελώς στα μιτοχόνδρια οδηγώντας στην δημιουργία ελευθέρων ριζών καθώς και δραστικών ειδών^[88]

Κυτόχρωμα P450:

Ο μεταβολισμός του κυτοχρώματος P450 έχει ενοχοποιηθεί επίσης για την παραγωγή προ-οξειδωτικών. Το κυτόχρωμα P450 εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων. Ο ρόλος του είναι η διάσπαση τοξικών ουσιών σε λιγότερο βλαπτικά για τον οργανισμό στοιχεία, διαδικασία την οποία εκτελεί χρησιμοποιώντας οξυγόνο για την οξείδωση των ξένων, τοξικών ουσιών. Το ένζυμο αυτό εμπλέκεται επιπλέον και σε αντιδράσεις υδροξυλίωσης οι οποίες επίσης απενεργοποιούν / απομακρύνουν τοξικές ουσίες για τον οργανισμό. Κατά τη διάρκεια αυτών των αντιδράσεων οξείδωσης και υδροξυλίωσης ηλεκτρόνια διαρρέουν σε οξυγονούχα μόρια σχηματίζοντας ρίζες υπεροξειδικού ανιόντος, $O_2^{\bullet -}$ ^[84]

Μικροσωμάτια / Υπεροξεισωμάτια

Επιπρόσθετα, τα μικροσωμάτια και τα υπεροξεισωμάτια είναι πηγές ελευθέρων ριζών. Τα μικροσωμάτια είναι υπεύθυνα για το 80% του υπεροξειδίου του υδρογόνου το οποίο υπάρχει σε όλα τα υπεροξειδωμένα σημεία. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα υπεροξεισωμάτια, τα οποία εντοπίζονται κυρίως στο ήπαρ, παράγουν H_2O_2 αλλά όχι $O_2^{\bullet -}$ ^[84, 85]

4.2.1.2

Εξωγενείς πηγές προ-οξειδωτικών

Εκτός όμως από τα οξειδωτικά είδη τα οποία παράγονται στον οργανισμό από ατελείς λειτουργίες του, πολλοί εξωγενείς παράγοντες μπορούν να δράσουν οξειδωτικά ή ως πρόδρομοι οι οποίοι ενεργοποιούν δευτερογενείς οξειδωτικές αντιδράσεις. Οι

τροφές περιέχουν προ-οξειδωτικά συστατικά, με το περιβάλλον (μόλυνση, ρύποι, ακτινοβολίες) να είναι η κύρια πηγή εξωγενών προ-οξειδωτικών^[86].

Ρύποι του περιβάλλοντος, ο καπνός του τσιγάρου περιέχουν προ-οξειδωτικά στοιχεία τα οποία όταν έρχονται σε επαφή με το δέρμα προκαλούν οξειδωτικές αντιδράσεις υπεύθυνες από τη γήρανση μέχρι τον καρκίνο ή μπορούν να εισέλθουν και στον εσωτερικό του οργανισμού προκαλώντας οξειδωτική φθορά. Η UV ηλιακή ακτινοβολία είναι ένα ισχυρό προ-οξειδωτικό ερέθισμα. Όταν απορροφάται από τα χρωμοφόρα του δέρματος προκαλεί οξειδωτικές αντιδράσεις οι οποίες οδηγούν από ερύθημα και φλεγμονή μέχρι καρκίνο^[86].

Οι καταστάσεις αυτές οδηγούν στην παραγωγή διαφόρων προ-οξειδωτικών και αν ο οργανισμός αδυνατεί να τα εξουδετερώσει τότε τα προ-οξειδωτικά υπερτερούν και αντιδρούν με διάφορα βιομόρια προκαλώντας φθορές σε ζωτικές για τον οργανισμό λειτουργίες. Προκαλούν δηλαδή οξειδωτικό στρες.

4.3

Ελεύθερες ρίζες

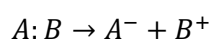
Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια τα οποία φέρουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στα ατομικά ή μοριακά τους τροχιακά και μπορούν να επιβιώσουν ανεξάρτητα για μικρό χρονικό διάστημα^[20]. Μπορεί να είναι ηλεκτρικά ουδέτερες (π.χ. OH^{\bullet}) ή να είναι κατιόντα (θετικό φορτίο π.χ. $NAD^{\bullet+}$) ή ανιόντα (αρνητικό φορτίο π.χ. $O_2^{\bullet-}$). Η απλούστερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Οι ελεύθερες ρίζες ανάλογα με την προέλευσή τους κατατάσσονται κυρίως σε ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου, λιγότερο σε άλλες οργανικές ουσίες.

Τρεις είναι οι πιθανοί μηχανισμοί δημιουργίας ελευθέρων ριζών^[20]:

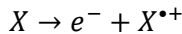
- I. Με ομολυτική διάσπαση του ομοιοπολικού δεσμού σε ένα μόριο, όπου τα δυο ηλεκτρόνια που συγκροτούν τον ομοιοπολικό δεσμό μοιράζονται στα δυο νέα μέρη, ρίζες, που προκύπτουν:



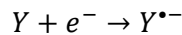
Η ετερολυτική διάσπαση δεν παράγει ελεύθερες ρίζες αλλά μόνο ιόντα, καθώς τα ηλεκτρόνια του ομοιοπολικού δεσμού δεσμεύονται από ένα από τα δυο καινούργια μέρη που προκύπτουν:



- II. Με απώλεια ενός ηλεκτρονίου από το μόριο (ελεύθερη ρίζα με θετικό φορτίο):



- III. Με προσθήκη ηλεκτρονίου σε ένα μόριο, «μεταφορά ηλεκτρονίου» όπως αλλιώς απαντάται, συνήθως αντίδραση στα βιολογικά συστήματα (ελεύθερη ρίζα αρνητικά φορτισμένη):



Οι ελεύθερες ρίζες είναι εξαιρετικά δραστικές και αποσπούν με μεγάλη ευκολία ηλεκτρόνιο/α από άλλα στοιχεία προκαλώντας έτσι την οξειδωση των τελευταίων. Σχηματίζονται με τον τρόπο αυτό καινούργιες ελεύθερες ρίζες οι οποίες με τη σειρά τους προσπαθούν να επιστρέψουν στη βασική στάθμη (χαμηλότερη ενεργειακά στάθμη) δεσμεύοντας ηλεκτρόνιο/α με αντιπαράλληλα spin από γειτονικούς δότες. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται μια αλυσιδωτή αντίδραση διαδοχικής παραγωγής ελευθέρων ριζών η οποία μπορεί να οδηγήσει σε πληθώρα φαινομένων. Επιπλέον οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν τη δημιουργία και άλλων δραστικών μεταβολιτών, οι οποίοι μπορεί να είναι περισσότερο δραστικοί και από τη μητρική ρίζα.

Στα βιολογικά συστήματα κυριαρχούν οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (υδροξυλίου $\cdot OH$, υπεροξειδικό ανιόν $O_2^{\cdot-}$) και τα δραστικά οξυγονούχα είδη (υπεροξειδίο του υδρογόνου H_2O_2 , μονήρες οξυγόνο 1O_2). Οι ελεύθερες ρίζες αζώτου και τα δραστικά αζωτούχα είδη (οξειδίο του αζώτου NO^{\cdot} , διοξειδίο του αζώτου NO_2^{\cdot} , υπεροξυνιτρώδης ρίζα $ONOO^{\cdot}$), όπως και τα δραστικά χλωριούχα είδη απαντώνται σε μικρότερο ποσοστό^[85].

Ο Πίνακας 4.1 συνοψίζει τις ελεύθερες ρίζες και τους δραστικούς μεταβολίτες που απαντώνται στα βιολογικά συστήματα.

4.4

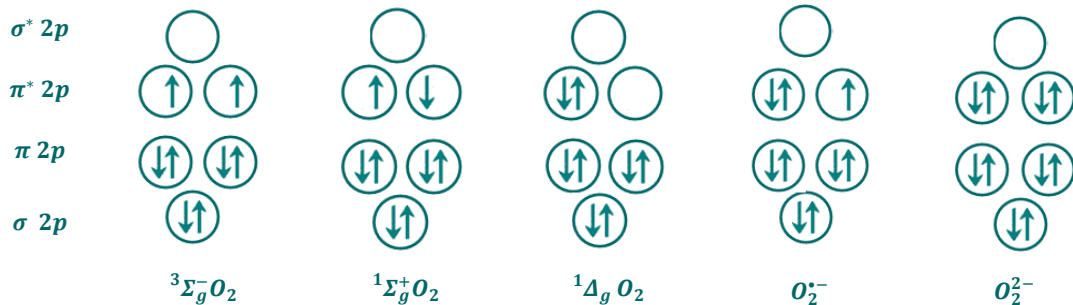
Δραστικά είδη

4.4.1

Δραστικά οξυγονούχα είδη

Τα δραστικά οξυγονούχα είδη προέρχονται από το μοριακό οξυγόνο. Το μοριακό οξυγόνο, O_2 , έχει μοναδική ηλεκτρονιακή δομή και από τη φύση του είναι ρίζα. Στη βασική του κατάσταση είναι διρίζα με δυο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με παράλληλο spin σε αντιδεσμικά π^* τροχιακά, έχει συνολικό κβαντικό αριθμό spin $S = 1$ (κάθε ασύζευκτο

ηλεκτρόνιο έχει κβαντικό αριθμό spin $S = 1/2$) και πολλαπλότητα spin $M = 3$, καθώς $2S + 1 = 3$. Έτσι στη βασική του κατάσταση, στην πλέον σταθερή δηλαδή κατάσταση, το O_2 βρίσκεται στην τριπλή στάθμη, ${}^3\Sigma_g^-$ (Σχήμα 4.1)^[20]

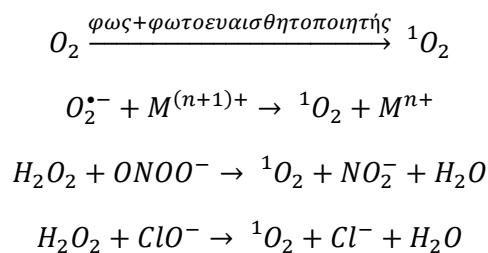


Σχήμα 4.1: Κατάταξη ηλεκτρονίων στα εξωτερικά τροχιακά στις διάφορες μορφές οξυγόνου^[20]

α. Μονήρες οξυγόνο

Απορρόφηση ενέργειας από το μοριακό οξυγόνο οδηγεί σε αναδιάταξη των ηλεκτρονίων στα π^* τροχιακά, σχηματίζοντας έτσι μια από τις πιο δραστικές μορφές οξυγόνου, το μονήρες οξυγόνο, Σχήμα 4.1. Το μονήρες οξυγόνο μπορεί να υπάρξει με δυο μορφές ${}^1\Delta_g O_2$ και ${}^3\Sigma_g^+ O_2$. Ο περιορισμός λόγω spin αίρεται και στις δυο μορφές και η οξειδωτική ικανότητα αυξάνεται κατά πολύ. Ο χρόνος ζωής του ${}^3\Sigma_g^+ O_2$ είναι εξαιρετικά μικρός και μετασχηματίζεται πολύ γρήγορα στο μονήρες ${}^1\Delta_g O_2$, έτσι σχεδόν μόνο αυτή η μορφή απαντάται στα βιολογικά συστήματα. Το μονήρες οξυγόνο καθώς δεν έχει ασύζευκτα ηλεκτρόνια δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά δραστικό οξυγονούχο είδος^[20, 89].

Το μονήρες οξυγόνο μπορεί να παραχθεί από διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις που περιλαμβάνουν υπεροξειδάσες και λιποοξυγενάσες, από αντιδράσεις ανάμεσα σε δραστικά οξυγονούχα είδη καθώς και από τις φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου II κατά τη φωτοδυναμική^[86]:



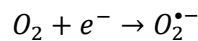
Το μονήρες οξυγόνο μπορεί να οξειδώσει άμεσα πρωτεΐνες, λιπίδια και το DNA. Έχει μεγάλο χρόνο ζωής μέσα στο κύτταρο, σε σχέση με τα υπόλοιπα δραστικά οξυγονούχα είδη, και έτσι μπορεί να διαχυθεί σε μεγάλες αποστάσεις, τόσο μέσα στο

κύτταρο όσο και στον εξωκυττάριο χώρο. Εξουδετερώνεται επιστρέφοντας στη βασική του στάθμη μέσω φωσφορισμού του στα $1270nm$ ^[91]

Τα υπόλοιπα δραστικά οξυγονούχα είδη προκύπτουν από ενζυματικές και μη-ενζυματικές αντιδράσεις, με αυστηρά καθορισμένο τρόπο και κοινή αφετηρία, τη δημιουργία ρίζας υπεροξειδικού ανιόντος.

β. Ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος, $O_2^{\bullet-}$ (μονοσθενής αναγωγή μοριακού οξυγόνου)

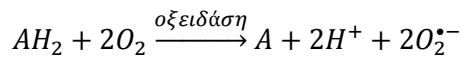
Η ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος, $O_2^{\bullet-}$, προέρχεται από ατελή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, όπου το οξυγόνο δέχεται ένα ηλεκτρόνιο στη θέση μιας μεταλλοπρωτεΐνης της αναπνευστικής αλυσίδας:



Επιπλέον μπορεί να παραχθεί και από αντιδράσεις οι οποίες καταλύονται από ένζυμα, από την NADPH οξειδάση σε ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα ή μακροφάγα κατά τη διάρκεια φλεγμονωδών αντιδράσεων^[82, 86] :



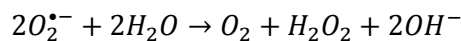
Στην πραγματικότητα, όλες οι ενδογενείς οξειδάσες μπορούν να παράξουν υπεροξειδικό ανιόν και υπεροξείδιο του υδρογόνου^[20, 86]:



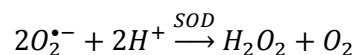
Οι οξειδάσεις είναι ένζυμα τα οποία μπορούν να προκαλέσουν άμεση δισθενή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου μεταφέροντας από το υπόστρωμα δυο ηλεκτρόνια σε αυτό.

Εξουδετέρωση:

Η ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος ανάγεται σε μοριακό οξυγόνο, O_2 , και υπεροξείδιο του υδρογόνου, H_2O_2 , είτε αυθόρμητα, σε όξινο pH:



είτε μέσω αντίδρασης καταλυόμενης από το ένζυμο υπεροξείδιο της δισμουτάσης (superoxide dismutase (SOD)) (συνήθως αυτή η αντίδραση κυριαρχεί)^[82, 84, 86]:



Το υπεροξείδιο της δισμουτάσης είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό το οποίο επιταχύνει την παραπάνω αντίδραση κατά τέσσερις τάξεις μεγέθους και εξουδετερώνει την πρώτη ελεύθερη ρίζα η οποία παράγεται κατά την αλληλουχία των οξειδωτικών αντιδράσεων. Περαιτέρω παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου ωστόσο μπορεί να

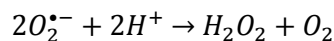
προκαλέσει οξειδωτικό στρες, εάν αυτό με τη σειρά του δεν εξουδετερωθεί από τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό άμυνας του οργανισμού (καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης)^[84].

Δράση:

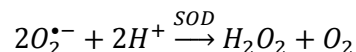
Η αντίδραση της ρίζας υπεροξειδικού ανιόντος με άλλα μόρια εκτός από ρίζες είναι απαγορευμένη λόγω spin. Έτσι στα βιολογικά συστήματα οι κύριες αντιδράσεις της ρίζας αυτής είναι με τον εαυτό της ή με άλλες ελεύθερες ρίζες που απαντώνται σε αυτά, όπως είναι το οξείδιο του αζώτου, αντίδραση η οποία οδηγεί στο τοξικό υπεροξυνιτρίδιο. Το υπεροξειδικό ανιόν απενεργοποιεί ένζυμα τα οποία περιέχουν σύμπλοκα σιδήρου, προκαλώντας έτσι την απελευθέρωση ελεύθερου σιδήρου ο οποίος με τη σειρά του εμπλέκεται στις αντιδράσεις τύπου Fenton, οδηγώντας στο σχηματισμό της ρίζας του υδροξυλίου. Επιπλέον, το υπεροξειδικό ανιόν ενεργοποιεί τη λιπιδική υπεροξειδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Η δραστηριότητά του, τέλος, είναι ασθενής, έτσι το υπεροξειδικό ανιόν μπορεί να διαχυθεί σε απόσταση μακριά από το σημείο δημιουργίας του, προκαλώντας ενεργοποίηση οξειδωτικού στρες σε όλο το κύτταρο^[82].

γ. Υπεροξείδιο του υδρογόνου, H_2O_2 (δισθενής αναγωγή του μοριακού οξυγόνου)

Σχηματίζεται είτε με άμεση δισθενή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου:



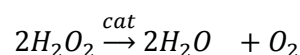
Είτε μέσω του υπεροξειδικού ανιόντος και αντίδρασης ελεγχόμενης από το ένζυμο υπεροξείδιο της δισμουτάσης:



συνήθως συμβαίνει αυτή η αντίδραση.

Εξουδετέρωση:

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου εξουδετερώνεται ταχύτατα σε νερό μέσω αντίδρασης ελεγχόμενης από το ένζυμο καταλάση:



Η καταλάση βρίσκεται συγκεντρωμένη στα υπεροξυσώματα, τα οποία βρίσκονται παντού μέσα στο κύτταρο. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ανάγει το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταφέροντας την ενέργεια των δραστηκών υπεροξειδίων στη

γλουταθειόνη. Ένζυμα τα οποία περιέχουν σελήνιο μεταφέρουν επίσης ηλεκτρόνια (αναγωγή) από τα υπεροξειδία στη γλουταθειόνη. Οι υπεροξυρεντοξίνες αδρανοποιούν το υπεροξειδίο του υδρογόνου στα μιτοχόνδρια, στο κυτοσόλιο και στον πυρήνα^[82].

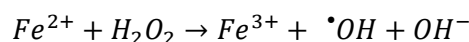
Δράση:

Θεωρείται ότι περίπου το 2% του συνολικού οξυγόνου που καταναλώνει ο οργανισμός διατίθεται στο σχηματισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου^[85]. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι απαραίτητο για τη δημιουργία περισσότερο τοξικών δραστικών οξυγονούχων ειδών, όπως είναι η ρίζα του υδροξυλίου (αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss) και το υποχλωριώδες οξύ (αντίδραση η οποία καταλύεται από την μυελο-υπεροξειδάση). Αντιδρά με τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι λιπόφιλο και λόγω της δομικής του ομοιότητας με το νερό και της χαμηλής του δραστηριότητας, διαχέεται εύκολα μέσα και έξω από τα κύτταρα καθώς και διαμέσου των ιστών, αλληλεπιδρώντας έτσι με βιολογικούς στόχους σε μεγάλη απόσταση από το σημείο δημιουργίας του^[82].

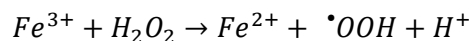
δ. Ρίζα υδροξυλίου, $\cdot OH$ (τρισθενής αναγωγή μοριακού οξυγόνου)

Παρουσία μεταβατικών μετάλλων (μέταλλα τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια), κυρίως σιδήρου και χαλκού, η ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος και το υπεροξειδίο του υδρογόνου αντιδρούν με ιόντα δισθενούς σιδήρου Fe^{2+} (ή ιόντα χαλκού Cu^+) προς παραγωγή της εξαιρετικά δραστικής ρίζας υδροξυλίου $\cdot OH$ ^[82, 84].

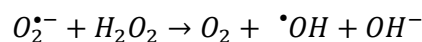
Η ρίζα υδροξυλίου σχηματίζεται από το υπεροξειδίο του υδρογόνου κατά την αντίδραση Fenton:



όπου ο δισθενής σίδηρος ανακυκλώνεται σύμφωνα με την αντίδραση:



αλλά και από τη ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος κατά την αντίδραση Haber-Weiss:



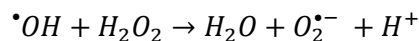
Εξουδετέρωση:

Αντίθετα με το υπεροξειδικό ανιόν το οποίο εξουδετερώνεται ενζυματικά, μέσω της δράσης του υπεροξειδίου της δυσμουτάσης, η ρίζα υδροξυλίου δε μπορεί να εξουδετερωθεί ενζυματικά καθώς αυτό θα απαιτούσε διάχυση της ρίζας μέχρι το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Καθώς ο χρόνος ημιζωής της ρίζας υδροξυλίου είναι μικρότερος

από το χρόνο που χρειάζεται για τη διάχυσή της, η ρίζα εξουδετερώνεται ουσιαστικά οξειδώνοντας οποιαδήποτε δομή μπορεί να υποστεί οξείδωση και βρίσκεται στην ακτίνα δράσης της^[82].

Δράση:

Παρουσία συμπλόκων σιδήρου η ρίζα υδροξυλίου αντιδρά με το υπεροξειδίο του υδρογόνου σχηματίζοντας εκ νέου υπεροξειδικό ανιόν:

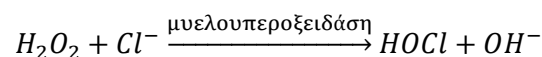


Είναι εξαιρετικά δραστική ρίζα, με χρόνο ημιζωής (σε υδατικό διάλυμα) μικρότερο από 1 ns, βλάπτοντας σχεδόν κάθε βιολογική δομή πρακτικά στο σημείο που δημιουργείται^[85]. Καθώς παράγεται από πληθώρα διαδικασιών, μπορεί να βλάψει όλες σχεδόν τις κυτταρικές δομές, υδρογονάνθρακες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια, πρωτεΐνες και ο μόνος τρόπος για να προστατευθεί το κύτταρο είναι να διαθέτει αποτελεσματικό σύστημα επιδιόρθωσης των βλαβών αυτών^[82].

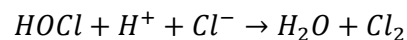
4.4.2

Δραστικά χλωριούχα είδη

Η μυελουπεροξειδάση, ένα ένζυμο που υπάρχει στα ουδετερόφιλα αλλά όχι στα μακροφάγα, μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή υποχλωριούδους οξέως, HOCl, οξειδώνοντας ιόντα χλωρίου με το υπεροξειδίο του υδρογόνου:



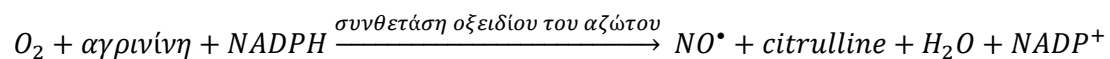
Το υποχλωριώδες οξύ είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό το οποίο επιτίθεται σε διάφορα βιομόρια, κυρίως δε σε αμινομάδες. Επιπλέον σε όξινο pH διασπάται εύκολα απελευθερώνοντας το ιδιαίτερα τοξικό αέριο χλώριο Cl₂^[86]



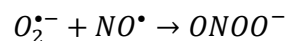
4.4.3

Δραστικά αζωτούχα είδη

Το οξειδίο του αζώτου, ένας ενδοκυττάριος αγγελιοφόρος, παράγεται από το οξυγόνο και διάφορες συνθετάσες:



Αυτή η ελεύθερη ρίζα, το οξείδιο του αζώτου, αντιδρά με το υπεροξειδικό ανιόν δίνοντας την εξαιρετικά οξειδωτική υπεροξυνιτρώδη ρίζα, $ONOO^-$ [86]:



Πίνακας 4.1: Συγκεντρωτικός πίνακας ελευθέρων ριζών και δραστικών ειδών

Ελεύθερες Ρίζες	Δραστικά Είδη
Οξυγόνου	
υπεροξειδικό ανιόν $O_2^{\bullet -}$	Μονήρες οξυγόνο, 1O_2
υδροξυλίου $\bullet OH$	Υπεροξείδιο του υδρογόνου, H_2O_2
υδροϋπεροξυλο ρίζα, $HO_2^{\bullet -}$	Οργανικά υπεροξείδια, $ROOH$
περοξυλο ρίζα, $RO_2^{\bullet -}$	Όζον, O_3
Αλκοξυλ, $HO_2^{\bullet -}$	
Carbonate $CO_3^{\bullet -}$	
Carbon dioxide $CO_2^{\bullet -}$	
Αζώτου	
Οξείδιο του αζώτου NO^{\bullet}	Υπεροξυνιτρώδης ρίζα $ONOO^-$
Διοξειδιο του αζώτου NO_2^{\bullet}	Υπεροξεινιτρώδες οξύ, $ONOOH$
	Νιτρικό οξύ, HNO_2
Χλωρίου	
Ατομικό χλώριο Cl^{\bullet}	Υποχλωριώδες οξύ $HOCl$
	Αέριο χλώριο, Cl_2

4.5

Βιολογικοί στόχοι ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών

Σε υψηλές συγκεντρώσεις οι ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά οξυγονούχα είδη μπορούν να προκαλέσουν φθορά σε κυτταρικές δομές, στις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA [91]. Η ρίζα υδροξυλίου αντιδρά με όλα τα συστατικά του DNA, βλάπτοντας τόσο την πουρίνη και την πυριμιδίνη όσο και τη δομή της δεοξυριβόσης. Μόνιμη τροποποίηση του γενετικού υλικού από το οξειδωτικό στρες αποτελεί το πρώτο βήμα γονιδιακών μεταλλάξεων, αλλαγής της έκφρασης των γονιδίων, της σύνθεσης των πρωτεϊνών, απόπτωσης και κυτταρικού θανάτου, αλλά και καρκινογένεσεων και γήρανσης [86, 91]. Οξείδωση των πρωτεϊνών οδηγεί σε αλλοίωση της λειτουργίας τους ή

πρόωρη διάσπασή τους σε πρωτεοσωματίδια. Η λιπιδική υπεροξειδωση, η οποία συμβαίνει κυρίως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ή στην κεράτινη στοιβάδα, την εξώτατη στοιβάδα της επιδερμίδας, αλλάζει τις φυσικές ιδιότητες των μεμβρανών ή της επιδερμίδας, κατά συνέπεια και τη βιολογική λειτουργία τους^[85].

4.6

Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας

Ο οργανισμός για να αποτρέψει την αλλαγή στην οξειδοαναγωγική ισορροπία και την οξειδωτική φθορά λόγω του οξειδωτικού στρες έχει αναπτύξει πλήθος αμυντικών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί ενάντια στο οξειδωτικό στρες περιλαμβάνουν: προληπτικούς μηχανισμούς, μηχανισμούς επιδιόρθωσης, φυσικούς και αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς^[91].

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας είναι εξαιρετικά σημαντικοί καθώς δεσμεύουν και εκκαθαρίζουν τα προ-οξειδωτικά (ελεύθερες ρίζες και δραστικά είδη) προστατεύοντας έτσι το βιολογικό σύστημα από την οξειδωτική φθορά. Διακρίνονται σε ενδογενείς (κυτταρικές λειτουργίες) και εξωγενείς (για παράδειγμα αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται από τη διατροφή)^[83]. Οι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί διακρίνονται σε ενζυμικούς και μη ενζυμικούς και για να χρηστεί μια λειτουργία αντιοξειδωτικός μηχανισμός θα πρέπει να διαθέτει τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- Να εξουδετερώνει αποκλειστικά και μόνο τις ελεύθερες ρίζες.
- Να αλληλεπιδρά με άλλα αντιοξειδωτικά εντός του οργανισμού ενεργοποιώντας νέους μηχανισμούς άμυνας.
- Να μην επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων
- Να απορροφάται εύκολα
- Η συγκέντρωσή του στους ιστούς και στον οργανισμό γενικά να μην υπερβαίνει τα φυσιολογικά πλαίσια.
- Να δρα τόσο σε υδατικό περιβάλλον αλλά και στις κυτταρικές μεμβράνες

Στους ποιο αποτελεσματικούς ενζυμικούς μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας περιλαμβάνονται το υπεροξειδίο της δισμουτάσης (superoxide dismutase, SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase, GPX), η καταλάση (catalase, CAT) και η ανηγμένη θειορεδοξίνη (thioredoxin reductase). Στους μη ενζυμικούς συγκαταλέγονται το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E), τα καρετονοειδή, οι θειόλες (γλουταθειόνη, θειορεδοξίνη, λιποϊκό οξύ), οι φυσικές πολυφαινόλες κ.α. Σε φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει ισορροπία τόσο στις λειτουργίες όσο και στη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών στον οργανισμό^[83, 91].

Μερικά αντιοξειδωτικά δρουν σε υδρόφοβο περιβάλλον, άλλα σε υδρόφιλο και άλλα και στα δυο περιβάλλοντα μέσα στο κύτταρο. Συγκεκριμένα αντιοξειδωτικά μπορούν να ενεργοποιήσουν την αναδημιουργία έτερων αντιοξειδωτικών και να αποκαταστήσουν τη δράση τους. Η διαδικασία αυτή καλείται «αντιοξειδωτικό δίκτυο».

4.6.1

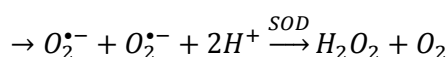
Ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας

Οι ενζυμικοί μηχανισμοί προκαλούν τη μετατροπή του υπεροξειδικού ανιόντος και του υπεροξειδίου του υδρογόνου, δυο εξαιρετικά τοξικών προ-οξειδωτικών, στο ακίνδυνο νερό. Το υπεροξείδιο της δισμουτάσης προκαλεί τη μετατροπή της ρίζας υπεροξειδικού ανιόντος σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, ενώ η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης τη μετασχηματίζουν σε νερό^[92].

4.6.1.1

Υπεροξείδιο της δισμουτάσης

Ένα από τα πλέον αποτελεσματικά ενζυμικά αντιοξειδωτικά, η πρώτη αντιοξειδωτική γραμμή άμυνας του οργανισμού, είναι το υπεροξείδιο της δισμουτάσης, το οποίο εξουδετερώνει την εξαιρετικά δραστική ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος, $O_2^{\bullet-}$, οδηγώντας στη δημιουργία του, λιγότερο δραστικού, υπεροξειδίου του υδρογόνου, H_2O_2 , και σε μοριακό οξυγόνο O_2 .

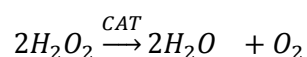


Το H_2O_2 εξουδετερώνεται στη συνέχεια από την καταλάση ή αντιδρώντας με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης σε νερό. Το υπεροξείδιο της δισμουτάσης εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα καθώς και στα μιτοχόνδρια^[85].

4.6.1.2

Καταλάση

Η καταλάση είναι ένα εξαιρετικά ενεργό ένζυμο το οποίο απαντάται σε φυτικά και ζωικά κύτταρα καθώς και σε ορισμένα αερόβια βακτήρια. Απαντάται κυρίως στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα, ενώ ενδοκυττάρια εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στα υπεροξυσώματα (ή μικροσώματα) και προκαλεί την μετατροπή του H_2O_2 σε νερό και μοριακό οξυγόνο:



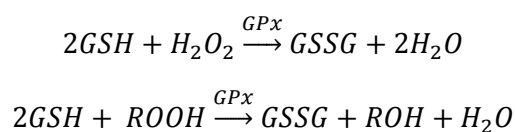
Η καταλάση είναι εξαιρετικά ενεργό ένζυμο καθώς ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει $\sim 6 * 10^6$ μόρια H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο κάθε λεπτό. Η αδυναμία της εξουδετέρωσης του H_2O_2 που εντοπίζεται σε πολλούς καρκινικούς όγκους συνδέεται με χαμηλά επίπεδα καταλάσης σε αυτούς^[85, 92].

4. 6. 1. 3

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

Το ένζυμο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης απαντάται σε δύο μορφές, την μη εξαρτώμενη από το σελήνιο γλουταθειόνη S-τρανσφεράση (glutathione-S-transferase, GST) και την εξαρτώμενη από το σελήνιο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Τα ένζυμα αυτά διαφέρουν στον αριθμό των υπομονάδων, στο είδος του δεσμού του σεληνίου στο ενεργό κέντρο και στους καταλυτικούς τους μηχανισμούς (π.χ. η GST καταλύει την διάσπαση διαφόρων ξενοβιοτιών χωρίς να μετέχει το σελήνιο στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό). Στον οργανισμό εντοπίζεται σε μεγάλη συγκέντρωση στο ήπαρ, λιγότερο στον εγκέφαλο, στην καρδιά και στους πνεύμονες ενώ ελάχιστα στους μύες^[85].

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης αντιδρά σε συνδυασμό με το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη (GSH), η οποία βρίσκεται σε μεγάλες (μmol) συγκεντρώσεις σε όλα τα κύτταρα. Απαραίτητο υπόστρωμα για να δράσει η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι διάφορα οργανικά υπεροξειδία ($ROOH$) ή το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και τα διασπά σε νερό και αλκοόλη με ταυτόχρονη οξείδωση της γλουταθειόνης (σε GSSG). Θεωρείται ότι η γλουταθειόνη ανάγει το σελήνιο στην υπεροξειδάση της γλουταθειόνης GPx και αυτή η ανηγμένη μορφή του ενζύμου καταλύει τη διάσπαση^[85]:



Η δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης. Ο μεταβολισμός της γλουταθειόνης είναι από τους σημαντικότερους μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας του κυττάρου προστατεύοντας τα κύτταρα των ζώντων οργανισμών από το οξειδωτικό στρες.

4. 6. 2

Μη ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας

Οι μη ενζυμικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά μόρια, υδατοδιαλυτές και λιπόφιλες βιταμίνες.

4.6.2.1

Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)

Η βιταμίνη C είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό το οποίο δρα σε υδατικά περιβάλλοντα στον οργανισμό, όπως αυτά στα μάτια και στους πνεύμονες. Θεωρείται ίσως το σημαντικότερο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό. Μετατρέπει τα δραστικά οξυγονούχα είδη σε ελάχιστα δραστικά παράγωγα ασκορβικού. Συνεργάζεται με τη βιταμίνη E, τα καροτενοειδή καθώς και αντιοξειδωτικά ένζυμα^[84]. Προστατεύει τις μεμβράνες από την οξείδωση. Η πλειοψηφία των μελετών συγκλίνει ότι κατόπιν χορήγησης βιταμίνης C μειώνονται οι δείκτες οξειδωτικού στρες στο DNA καθώς και η φθορά στα λιπίδια και στις πρωτεΐνες. Άλλες μελέτες δείχνουν προ-αποπτωτική δράση της βιταμίνης C και προστασία από τον κυτταρικό θάνατο μετά από έκθεση σε διάφορα οξειδωτικά ερεθίσματα^[85].

4.6.2.2

Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη η οποία υπάρχει σε οκτώ διαφορετικές μορφές. Η α-τοκοφερόλη είναι η πιο ενεργή από τις οκτώ μορφές της βιταμίνης E στους ανθρώπους και είναι εξαιρετικά ισχυρό αντιοξειδωτικό, θεωρείται δε το αντιοξειδωτικό το οποίο προστατεύει κατεξοχήν τις κυτταρικές μεμβράνες (λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα του)^[83]. Κύρια αντιοξειδωτική λειτουργία του είναι η προστασία από τη λιπιδική υπεροξείδωση. Θεωρείται ότι η α-τοκοφερόλη και το ασκορβικό οξύ λειτουργούν μαζί σε μια διαδικασία ανακύκλωσης της βιταμίνης E, με το ασκορβικό οξύ να είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση της α-τοκοφερόλης. Κατά την αντιοξειδωτική αντίδραση η α-τοκοφερόλη μετατρέπεται σε ρίζα α-τοκοφερόλης δίνοντας ένα υδρογόνο σε ένα λιπίδιο ή ρίζα λιπιδικού υπεροξειδίου. Η ρίζα α-τοκοφερόλης ανάγεται στη μητρική μορφή της α-τοκοφερόλης από το ασκορβικό οξύ^[84, 85].

4.6.2.3

Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι χρωστικές οι οποίες βρίσκονται στα φυτά και σε μικροοργανισμούς αλλά δεν μπορούν να συνθεθούν σε ζωικούς οργανισμούς. Ευθύνονται για το κόκκινο, κίτρινο και πορτοκαλί χρώμα των φρούτων και των λαχανικών. Περισσότερα από 600 είδη απαντώνται στη φύση με τα κυριότερα της κατηγορίας να είναι το β-καροτένιο και το λυκοπένιο. Ειδικά το β-καροτένιο είναι από τα πλέον ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία δεσμεύουν το μονήρες οξυγόνο^[83]. Επιπλέον δρουν σταθεροποιώντας τις υπεροξειδικές ρίζες^[85].

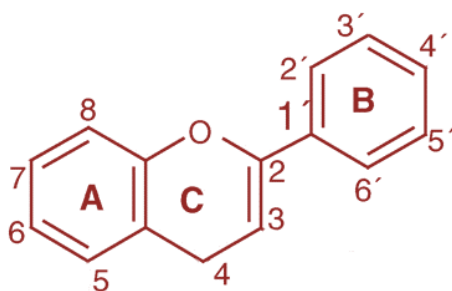
4.6.2.4

Πολυφαινόλες

Οι φυσικές πολυφαινόλες, ευρύτατα διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, είναι δευτερογενείς μεταβολίτες απαραίτητοι για τη φυσιολογία των φυτών. Συνιστούν την φυσική άμυνα του φυτού απέναντι σε μολύνσεις από βακτήρια μύκητες και ιούς αλλά τις βλαβερές επιδράσεις της UV ακτινοβολίας, του όζοντος καθώς και περιβαλλοντολογικών μολύνσεων^[93]. Επιπλέον επιδρούν στους μηχανισμούς ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού των φυτών.

Οι δευτερογενείς αυτοί μεταβολίτες προέρχονται από πρωτογενείς, κυρίως αμινοξέα και υδρογονάνθρακες, μέσω μεθυλίωσης, υδροξυλίωσης και γλυκοξυλίωσης. Μέχρι σήμερα χιλιάδες δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν αναγνωρισθεί, οι οποίοι κατατάσσονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες τα τερπένια, τις πολυφαινόλες και τα μόρια που περιέχουν άζωτο^[93]. Οι πολυφαινόλες αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία, έχουν αναγνωρισθεί πάνω από 8000 διαφορετικές δομές, διακρίνονται σε флаβονοειδή, φαινυλοπροπανοειδή, κουρκουμιοειδή, ταννίνες κ.α.^[94]. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των ειδών είναι ότι διαθέτουν μια κοινή δομή, αρωματικό δακτύλιο (ή και περισσότερους) υποκατεστημένο με τουλάχιστον μια υδροξυλομάδα, φαινολική ένωση^[95]. Ολοένα και περισσότερα στοιχεία αποδίδουν τις ωφέλιμες για την υγεία ιδιότητες των φυτών, των φρούτων, των βοτάνων, αλλά και τροφίμων και ποτών φυτικής προέλευσης στις πολυφαινόλες. Συνήθως οι πολυφαινόλες είναι περίπλοκα σύμπλοκα περισσότερων του ενός πολυφαινολικών μορίων τα οποία προέρχονται από διμερισμό ή πολυμερισμό απλούστερων μορίων^[93].

Τα флаβονοειδή (Σχήμα 4.2) είναι η σημαντικότερη υποκατηγορία των πολυφαινολών, με πάνω από 4000 αναγνωρισμένα μόρια τα οποία κατατάσσονται σε 13 τάξεις^[95].



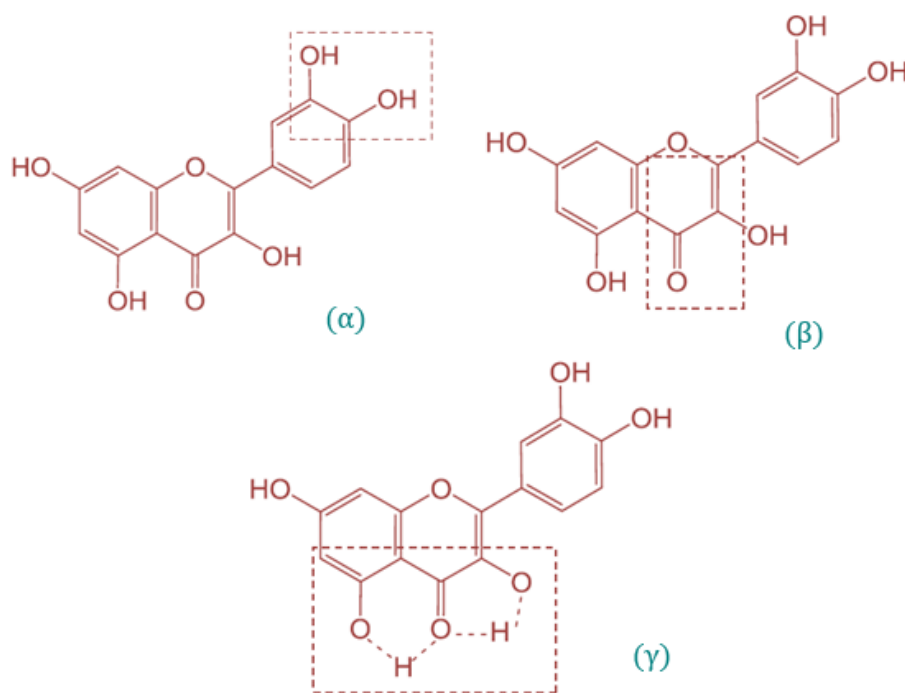
Σχήμα 4.2: Βασική δομή флаβονοειδούς

α. Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών

Η χημική σύνθεση των πολυφαινολών τις καθιστά ιδανικές αντιοξειδωτικές ενώσεις και έχει δείχτει ότι είναι περισσότερο αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά από τη

βιταμίνη E και το ασκορβικό σε επίπεδο κυττάρου^[96, 97]. Η βιολογική δράση των πολυφαινολών και των φλαβονοειδών ειδικότερα εξαρτάται άμεσα και ισχυρά από την έκταση, τη φύση και τη θέση των υποκαταστατών, κυρίως όμως από τον αριθμό των ομάδων υδροξυλίου στο μόριο του φλαβονοειδούς. Ειδικότερα, τα φλαβονοειδή τα οποία διαθέτουν υδροξυλομάδες στις θέσεις 3 και 4 του B δακτυλίου έχουν την ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα^[85, 97]. Τα απαραίτητα δομικά χαρακτηριστικά για να είναι αποτελεσματικό το φλαβονοειδές στη δέσμευση των ελευθέρων ριζών παραθέτονται στο Σχήμα 4.3.

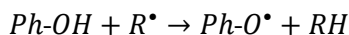
Τα φλαβονοειδή δρουν ενάντια στο οξειδωτικό στρες εκκαθαρίζοντας άμεσα δραστικά οξυγονούχα είδη αλλά και ενεργοποιώντας αντιοξειδωτικά ένζυμα. Επιπρόσθετα, προκαλούν αντιδράσεις χηλικοποίησης μετάλλων (κυρίως σιδήρου) και αυξάνουν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες αντιοξειδωτικών χαμηλού μοριακού βάρους. Άλλες αντιοξειδωτικές τους δράσεις περιλαμβάνουν καταστολή των οξειδασών και του νιτρικού στρες (οξειδωτικό στρες το οποίο προκαλείται από το νιτρικό οξύ)^[97].



Σχήμα 4.3: Βασικά δομικά χαρακτηριστικά φλαβονοειδούς ώστε να δρα αντιοξειδωτικά: (α) κατεχολική δομή στον B δακτύλιο. (β) διπλός δεσμός στο δακτύλιο C (γ) υδροξυλομάδες στις θέσεις 5 και 3 των δακτυλίων A και C.

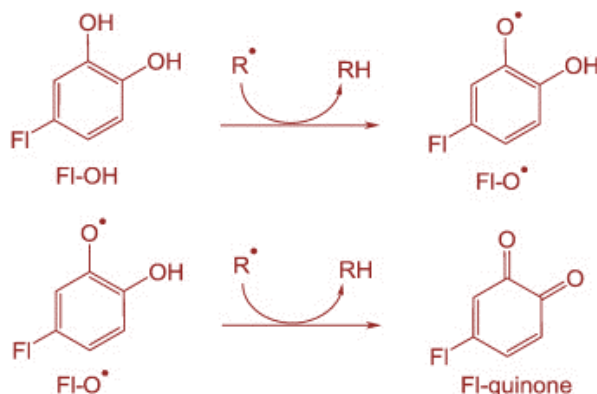
Η εξαιρετική τους ικανότητα να δεσμεύουν άμεσα δραστικά οξυγονούχα είδη οφείλεται στην εγγενή τους δυνατότητα να δρουν ως ισχυροί δότες ηλεκτρονίων ή υδρογόνου. Το δυναμικό οξειδοαναγωγής των πολυφαινολών είναι χαμηλό,

καθιστώντας τες δότες ηλεκτρονίων σε μόρια με υψηλότερο δυναμικό οξειδοαναγωγής, όπως για παράδειγμα είναι το υπεροξειδικό ανιόν $O_2^{\cdot-}$, η ρίζα υδροξυλίου $\cdot OH$, η ρίζα αλκξυλίου $RO\cdot$. Οι πολυφαινολικές ενώσεις δρουν αντιοξειδωτικά τερματίζοντας αντιδράσεις ελευθέρων ριζών. Αποτέλεσμα των αντιδράσεων αυτών είναι η εκκαθάριση ελευθέρων ριζών^[85, 93, 96]:



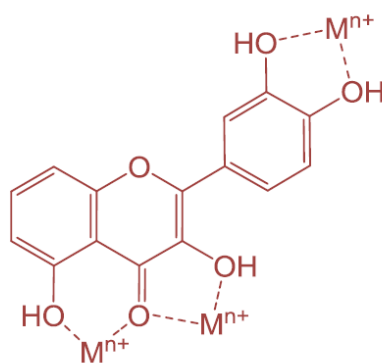
Όπου $R\cdot$ ελεύθερη ρίζα, $Ph-OH$ φαινολικό μόριο (γινικά) και $Ph-O\cdot$ φαινοξυλική ρίζα.

Η ικανότητα αυτή δεν θα ήταν σημαντική εάν δεν εξασφαλιζόταν ότι η φαινοξυλική ρίζα μπορεί να σταθεροποιηθεί με κάποιον τρόπο ώστε να μην ξεκινήσει έναν καινούργιο οξειδωτικό μηχανισμό. Η φαινοξυλική ρίζα, ή ημικινόνη, είναι σχετικά δραστική (αν και δεν συντηρεί επί μακρόν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών) και αντιδρά με δεύτερη ελεύθερη ρίζα για να αποκτήσει σταθερή δομή κινόνης^[93, 97]. Παραστατικά η εκκαθάριση των ελευθέρων ριζών από ένα φλαβονοειδές δίνεται στο παρακάτω Σχήμα 4.4.



Σχήμα 4.4: Εκκαθάριση ελευθέρων ριζών ($R\cdot$) από ένα φλαβονοειδές ($Fl-OH$). Η ημικινόνη $Fl-O\cdot$ αντιδρά με δεύτερη ρίζα αποκτώντας τη σταθερή δομή κινόνης

Επιπρόσθετα, τα φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα χηλικοποίησης μεταβατικών μετάλλων, κυρίως σιδήρου και χαλκού, απομακρύνοντας με αυτόν τον τρόπο έναν από τους αιτιώδεις παράγοντες δημιουργίας ελευθέρων ριζών (αντίδραση Fenton)^[96, 97]. Στο Σχήμα 4.5 παρουσιάζονται οι θέσεις στις οποίες δένονται τα μεταβατικά μέταλλα, στον δακτύλιο B η κατεχολική δομή, στον δακτύλιο C η υδροξυλομάδα στη θέση 3 και το οξυγόνο στη θέση 4 και τέλος ανάμεσα στο οξυγόνο του δακτυλίου C και της υδροξυλομάδας στη θέση 5 του δακτυλίου A^[97].



Σχήμα 4.5: Θέσεις σύνδεσης μεταβατικών μετάλλων (M^{n+}) στη δομή φλαβονοειδούς

Επιπλέον τα φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων και να αναστείλουν τη χαλάρωση και διαπερατότητα των μεμβρανών που προκαλείται λόγω της υπεροξειδωσης. Έτσι μπορούν να περιορίσουν την έκταση των αντιδράσεων υπεροξειδωσης^[96].

Η αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινική, ανοσολογική δράση αλλά και η προστασία που παρέχουν στις λειτουργίες της καρδιάς, του ήπατος και των νεύρων αποδίδεται στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινόλων. Η εκκαθάριση του υπεροξειδικού ανιόντος από τις πολυφαινόλες έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δημιουργίας του υπεροξυνιτριδίου μέσω του οποίου προκαλείται νιτρικό στρες το οποίο ενοχοποιείται ότι παρέχει το χημικό υπόστρωμα για καρκινογένεση^[93, 97].

Κάτω από ορισμένες συνθήκες ωστόσο, για παράδειγμα υψηλή συγκέντρωση πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών, παρουσία μεταβατικών μετάλλων (σιδήρου, χαλκού), υψηλό pH, μπορούν να δράσουν ως προ-οξειδωτικά. Τη βιολογική δράση, αντιοξειδωτική ή προ-οξειδωτική των πολυφαινόλων (τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και σε επίπεδο οργανισμού) καθορίζουν η θέση των υποκαταστάσεων καθώς και ο αριθμός των υδροξυλομάδων. Οι παράγοντες αυτοί καθορίζουν εάν η ένωση θα δράσει αντιοξειδωτικά και ως ρυθμιστής της ενζυμικής δραστηριότητας ή εάν θα εκφράσει κυτταροτοξικές ιδιότητες. Φλαβονοειδή με περισσότερες υδροξυλομάδες παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση^[85, 97].

β. Αντιοξειδωτική / προ-οξειδωτική δράση πολυφαινόλων

Σκοπός ενός «δικτύου αντιοξειδωτικής άμυνας» δεν είναι να εξαλείψει όλες τις ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά οξυγονούχα είδη σε ένα βιολογικό σύστημα αλλά να ελέγξει τα επίπεδά τους επιτρέποντας τη διατήρηση των φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών του συστήματος, μειώνοντας παράλληλα την οξειδωτική φθορά^[98]. Τα

αντιοξειδωτικά γενικά, και οι πολυφαινόλες ειδικότερα, ενεργοποιούν αντιδράσεις ανακύκλωσης των ελευθέρων ριζών εμποδίζοντας την οξειδωτική τους δράση. Πέραν όμως της ωφέλιμης για τα βιολογικά συστήματα δράσης τους υπάρχει πληθώρα ενδείξεων και αντίστοιχες μελέτες στις οποίες επισημαίνεται η καταστροφική / προ-οξειδωτική δράση των αντιοξειδωτικών γενικότερα αλλά και των πολυφαινολών ειδικότερα^[99]. Ημικινόνες ή άλλα υποπροϊόντα της αυτοοξείδωσης των πολυφαινολών μπορεί να αλληλεπιδράσουν με βιομόρια ενεργοποιώντας αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξείδωσης, οξείδωσης πρωτεϊνών και DNA και μείωσης των ενδογενών αντιοξειδωτικών. Οι αντιδράσεις αυτές τελικά οδηγούν σε καταστροφή κυτταρικών μεμβρανών, σε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και ενζύμων και στη σύνθεση του εξωκυττάριου χώρου. Τα φαινόμενα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο, ανώμαλες κυτταρικές λειτουργίες, καταστροφή της δομής του ιστού^[93].

Η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών στα βιολογικά συστήματα αποδίδεται στην εμπλοκή τους σε οξειδοαναγωγικό κύκλο και στην ικανότητά τους να υποστούν αυτοοξείδωση. Αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι ο κυτταρικός θάνατος αλλά και η καρκινογένεση. Οι σταθερές κινόνες από την άλλη, αλλά και ελεύθερες ρίζες – υποπροϊόντα της αυτοοξείδωσης των πολυφαινολών με μικρό χρόνο ζωής, μπορούν να δράσουν ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Ανάλογα με τη χημική τους δομή, το δυναμικό οξειδοαναγωγής τους και τις οξειδοαναγωγικές ιδιότητες του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται οι πολυφαινόλες μπορούν να δράσουν είτε αντιοξειδωτικά, δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες, είτε προ-οξειδωτικά δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες^[93, 97].

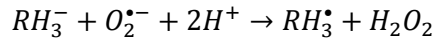
γ. Προ-οξειδωτική δράση πολυφαινολών

Η προ-οξειδωτική δράση θεωρείται ότι είναι ευθέως ανάλογη του αριθμού των υδροξυλομάδων στο μόριο του φλαβονοειδούς. Έχει αποδειχθεί ότι πολλαπλές υδροξυλομάδες, τουλάχιστον 3, κυρίως στον Β δακτύλιο αυξάνουν σημαντικά την παραγωγή ριζών υδροξυλίου μέσω αντίδρασης Fenton. Στην πραγματικότητα φαίνεται πως τα δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα είναι ταυτόχρονα υπεύθυνα και για την προ-οξειδωτική τους δράση. Για παράδειγμα τα φλαβονοειδή προκαλούν την αναγωγή του $Cu(II)$ σε $Cu(I)$ οδηγώντας στη δημιουργία πρόδρομων ελευθέρων ριζών^[97].

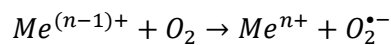
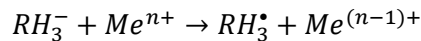
Η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών, των φλαβονοειδών ειδικότερα, είναι ανάλογη της συγκέντρωσής τους. Μετρήσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών μετά από αύξηση της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών αποδεικνύουν την σχέση αυτή^[97].

Παρουσία μοριακού οξυγόνου, πολυφαινόλες με χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής μπορούν να οξειδωθούν μέσω αυτοοξειδωσης, ακολουθώντας μια αλληλουχία αντιδράσεων ελευθέρων ριζών^[93].

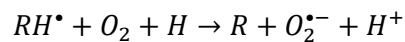
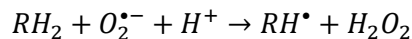
Αρχικά η πολυφαινολική ένωση οξειδώνεται παράγοντας ρίζα ημικινόνης:



Μεταβατικά μέταλλα καταλύουν την πρώτη αντίδραση της πορείας αυτοοξειδωσης των πολυφαινολών:

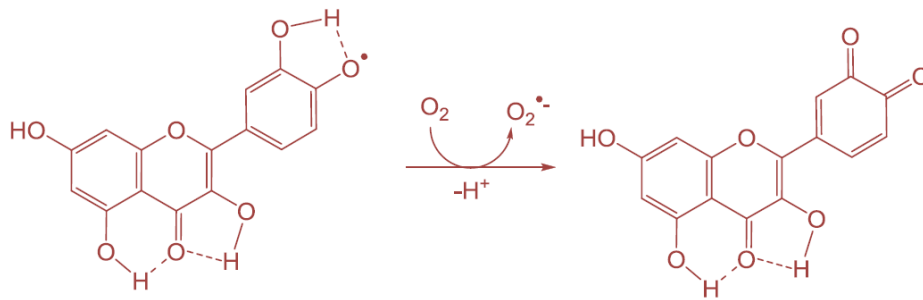


Πρωτογενείς ημικινόνες ή ρίζες φαινοξυλίου μπορούν επίσης να παραχθούν ενζυμικά, μέσω αντιδράσεων των πολυφαινολών με το H_2O_2 ή με το κυτόχρωμα P-450. Μόλις σχηματιστούν οι πρωτογενείς ημικινόνες εμπλέκονται σε αλυσιδωτές αντιδράσεις μετατροπής της πολυφαινολικής ένωσης σε κινόνη:



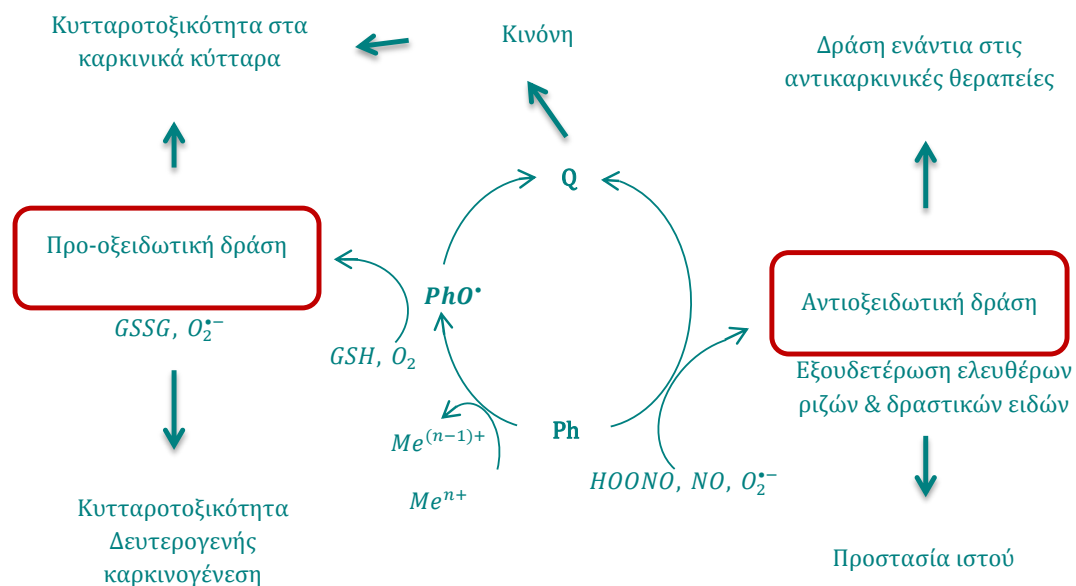
Ενδιάμεσα προϊόντα και παραπροϊόντα της αυτοοξειδωσης των πολυφαινολών μπορεί να αλληλεπιδράσουν με βιομόρια προκαλώντας λιπιδική υπεροξειδωση, οξειδωση πρωτεϊνών και DNA καθώς και μείωση των ενδογενών αντιοξειδωτικών. Οι αντιδράσεις αυτές οδηγούν σε μη αναστρέψιμη βλάβη στις μεμβράνες, αλλαγή στη λειτουργία ενζύμων και των υποδοχέων τους καθώς και σε μεταλλάξεις, με αποτέλεσμα αλλαγή στις κυτταρικές λειτουργίες μέχρι και κυτταρικό θάνατο. Για παράδειγμα φαινοξυλικές ρίζες μπορούν να οξειδώσουν τη γλουταθειόνη ή το NADH οδηγώντας στη δημιουργία ακόμα περισσότερων δραστικών οξυγονούχων ειδών. Αντίθετα, σταθεροποιημένες κινόνες και ελεύθερες ρίζες παραπροϊόντα της αυτοοξειδωσης των πολυφαινολών, μικρό χρόνου ημιζωής, δρουν ως αντικαρκινικοί παράγοντες^[93].

Οι φαινοξυλικές ρίζες, $Fl-O^\bullet$, τελικά προϊόντα των αντιδράσεων εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών από τα φλαβονοειδή, έχουν χρόνο ζωής $200\mu s$, είναι δραστικές, υποκείμενες σε περαιτέρω οξείδωση, οδηγώντας ανάμεσα σε άλλα και στις πιο σταθερές κινόνες. Μολονότι οι κινόνες είναι δραστικές εξουδετερώνονται καθώς συνδέονται σε μόρια όπως η γλουταθειόνη και η κυστεΐνη. Παρουσία μεταβατικών μετάλλων οι φαινοξυλικές ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με το οξυγόνο παράγοντας ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος και κινόνη, αντίδραση στην οποία οφείλεται η προ-οξειδωτική δράση των φλαβονοειδών (Σχήμα 4.6)^[97]:



Σχήμα 4.6: Προ-οξειδωτική δράση φλαβονοειδών^[97]

Οι αντιοξειδωτικές ή προ-οξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωσή τους. Επιπλέον η χημική δομή, οι χημικές ιδιότητες και οι οξειοαναγωγικές ιδιότητες του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται καθορίζουν το αν θα δράσουν αντιοξειδωτικά, εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες, ή προ-οξειδωτικά, ενεργοποιώντας την παραγωγή τους. Την ιδιότητα των πολυφαινολών να δρουν προ-οξειδωτικά αξιοποιεί μια καινούργια τάση που διέπει τις αντικαρκινικές θεραπείες. Η ιδέα αυτή αφορά το σχεδιασμό και τη χρήση φαινολικών προϊόντων για να ευαισθητοποιήσουν τον καρκινικό όγκο στις θεραπείες, με στόχο τη μείωση της δόσης του δραστικού (και τοξικού συνήθως) φαρμάκου. Παράλληλα υπάρχουν αναφορές ότι οι πολυφαινόλες δρουν κυτταροτοξικά στα καρκινικά κύτταρα αλλά και στο αγγειακό δίκτυο που τροφοδοτεί τον καρκινικό όγκο, γεγονός που συμβάλει στην κατεύθυνση αυτή^[93, 97]. Η δράση των πολυφαινολών συνοψίζεται στο παρακάτω σχεδιάγραμμα (Σχήμα 4.7):



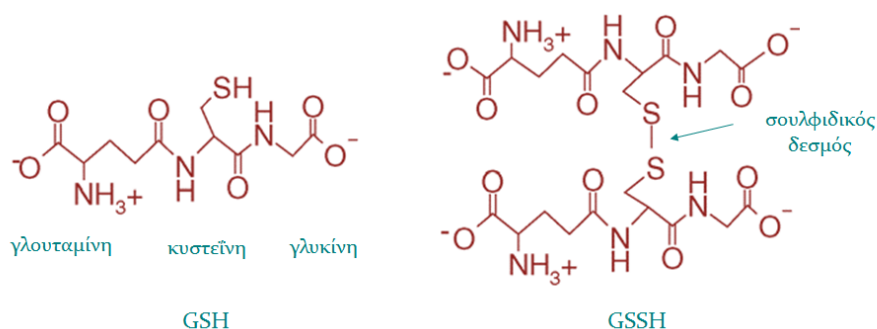
Σχήμα 4.7: Προ-οξειδωτική και αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών^[97]

4.6.2.5

Θειόλες / Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο το οποίο βρίσκεται σε όλους τους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού, ενώ οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της εντοπίζονται στο ήπαρ. Η γλουταθειόνη απαντάται ως ανηγμένη θειόλη (GSH) και ως δισουλφίδιο σε οξειδωση (GSSG) (Σχήμα 4.8)^[100].

Οι θειόλες ($R-SH$), ενώσεις οι οποίες περιέχουν την ομάδα $-SH$, και τα δισουλφιδιά τους ($R-S-S-R$) εξασφαλίζουν κυρίως τη σταθερότητα της δομής των πρωτεϊνών. Μόρια τα οποία περιέχουν θειόλες παίζουν κεντρικό ρόλο σε πληθώρα βιοχημικών κυτταρικών λειτουργιών, είτε φυσιολογικών είτε ως άμυνα απέναντι σε οξειδωτικές επιθέσεις ή ξενοβιοτικά. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί (ή δισουλφιδικές γέφυρες), ομοιοπολικοί δεσμοί ανάμεσα σε άτομα $-S$, είναι οι πλέον ισχυροί δεσμοί οι οποίοι καθορίζουν την τριτοταγή δομή πρωτεϊνών.



Σχήμα 4.8: Ανηγμένη γλουταθειόνη GSH και δισουλφίδιο της γλουταθειόνης GSSG (οξειδωμένη γλουταθειόνη, αν και ο όρος είναι αδόκιμος)

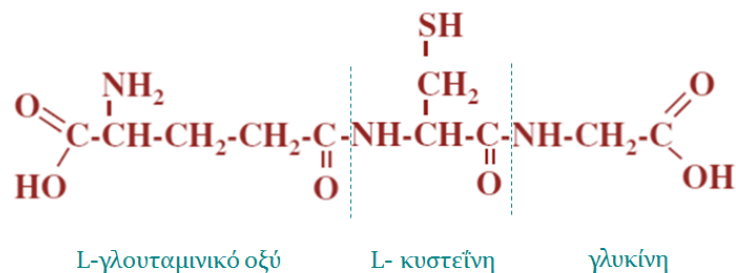
Το αμινοξύ κυστεΐνη είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη θειόλη στους ζωντανούς οργανισμούς και το κύριο δομικό συστατικό σημαντικότερων βιομορίων όπως είναι το συνένζυμο A και η γλουταθειόνη. Μόρια τα οποία περιέχουν κυστεΐνη είναι από αυτά που μεταβολίζονται πλέον εύκολα, είτε μέσω οξειδωσης παρουσία μεταβατικών μετάλλων είτε μετέχοντας σε αντιδράσεις θειολών δισουλφιδίων. Η γλουταθειόνη, η οποία περιέχει μια κυστεΐνη, και η θειορεδοξίνη, μια μικρή πρωτεΐνη η οποία περιέχει δυο, έχουν σημαντικότατο ρόλο στην προστασία του κυττάρου από το οξειδωτικό στρες^[101].

Η απόκριση του κυττάρου σε στρεσογόνα ερεθίσματα επιφέρει αλλαγές στη συγκέντρωση και στη δομή των θειολών που περιέχει. Οι θειόλες αρχικά συμμετέχουν σε αντιδράσεις προστασίας του κυττάρου απομακρύνοντας επικίνδυνα μόρια και στη συνέχεια ανακυκλώνονται μέσω ενζυμικής αναγωγής ενός δισουλφιδίου ή συνθέτονται

εκ νέου από τα δομικά τους συστατικά, έτσι ώστε η συγκέντρωσή τους να επανέλθει στα φυσιολογικά επίπεδα^[101]. Η αναλογία θειολών / δισουλφιδίων καθορίζει την οξειδοαναγωγική ισορροπία του κυττάρου. Οι μεταβολές στη συγκέντρωση των θειολών καθώς και στο μεταβολισμό τους αλλάζει την κυτταρική σηματοδότηση και την οξειδοαναγωγική ισορροπία. Ο όρος οξειδοαναγωγική κατάσταση περιγράφει την αναλογία οξειδωμένης μορφής σε σχέση με την μορφή σε αναγωγή ενός οξειδοαναγωγικού ζεύγους. Χρησιμοποιείται ευρέως για να περιγράψει τα φαινόμενα που επάγονται στο κύτταρο από τις ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες^[102].

α. Δομή και λειτουργίες γλουταθειόνης

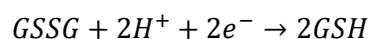
Η κυριότερη μη-πρωτεϊνική θειόλη, με πολλαπλές λειτουργίες, αντιοξειδωτικές και όχι μόνο, είναι το ενδοκυττάριο τριπεπτίδιο L- γ-γλουταμυλο-L-κυστεϊνυλο-γλυκίνη ή γλουταθειόνη (GSH) (Σχήμα 4.9). Θεωρείται το κυριότερο και μακράν το πιο αποδοτικό μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό το οποίο ρυθμίζει την ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία και συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της αντιστρεπτής οξείδωσης της ενεργής της θειολικής ομάδας^[102, 103].



Σχήμα 4.9: Το τριπεπτίδιο L- γ-γλουταμυλο-L-κυστεϊνυλο-γλυκίνη ή γλουταθειόνη (GSH)

Βρίσκεται σε αφθονία ενδοκυττάρια, στο κυτοσόλιο (1 – 11mM), στον πυρήνα (3 – 15mM) και στα μιτοχόνδρια (5 – 11mM), όπου είναι και το κυρίαρχο αντιοξειδωτικό. Στον εξωκυττάριο χώρο υπάρχει σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις, της τάξεως των μM (10 – 30μM στο πλάσμα)^[85, 104].

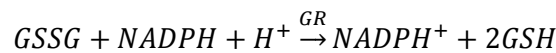
Η βιολογικά ενεργός μορφή είναι η ανηγμένη γλουταθειόνη GSH, στην οποία η -SH ομάδα της κυστεΐνης μεταφέρει αναγωγική δύναμη με τη μορφή ενός H ($H^+ + e^-$). Με την απόδοση ηλεκτρονίου η γλουταθειόνη μετατρέπεται σε μορφή δραστική η οποία αντιδρά με δεύτερη δραστική μορφή γλουταθειόνης για να μετατραπεί στην οξειδωμένη μορφή της, GSSG. Η αντίδραση αυτή διευκολύνεται καθώς στο κύτταρο η γλουταθειόνη βρίσκεται σε αφθονία. Η αναγέννηση της GSH από την GSSG καταλύεται από το ένζυμο της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR)^[90].



Η γλουταθειόνη συμβάλλει στην διατήρηση της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας μέσω της διατήρησης του οξειδοαναγωγικού σθένους πρωτεϊνών για την επιδιόρθωση και έκφραση του DNA. Επιπλέον εμπλέκεται στην κυτταρική σηματοδότηση, στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων και σε αντιδράσεις ανταλλαγής θειολών / δισουλφιδίων. Οξείδωση της γλουταθειόνης στο δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG διαταράσσει την ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία. Μέτρο της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας έχει οριστεί, ανάμεσα σε άλλα, το ζεύγος $GSH : GSSG$ ^[104].

Μείωση του λόγου $GSH / GSSG$ σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες. Κατά τη διάρκεια οξειδωτικού στρες το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης αλληλεπιδρά με ενεργές κυστεΐνες πρωτεϊνών σχηματίζοντας μείγματα δισουλφιδίων διαδικασία καθοριστική για κυτταρικές μεταβολικές διαδικασίες, ανάμεσά τους διαδικασίες που ορίζουν τον κυτταρικό θάνατο^[101, 104]. Στην πραγματικότητα, εκτός από το ενδοκυττάριο δυναμικό οξειδοαναγωγής η αναγωγική ικανότητα ενός κυττάρου εξαρτάται και από την απόλυτη συγκέντρωση της γλουταθειόνης^[102].

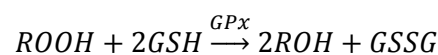
Για να διατηρηθεί υψηλός ο λόγος $GSH / GSSG$, η GSSG μπορεί είτε να αποβληθεί από το κύτταρο είτε μπορεί να υποστεί αναγωγή σε γλουταθειόνη μέσω του συνενζύμου NADPH, αντίδραση η οποία καταλύεται από την αναγωγή της γλουταθειόνης (glutathione reductase, GR)^[101]:



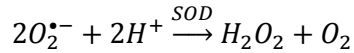
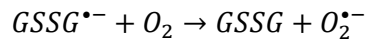
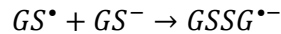
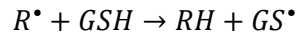
Η GSSG συνήθως διατηρείται σε ποσοστό λιγότερο από το 1% της συνολικής γλουταθειόνης^[101].

Οι κύριες λειτουργίες της γλουταθειόνης έναντι του οξειδωτικού στρες είναι^[85, 101]:

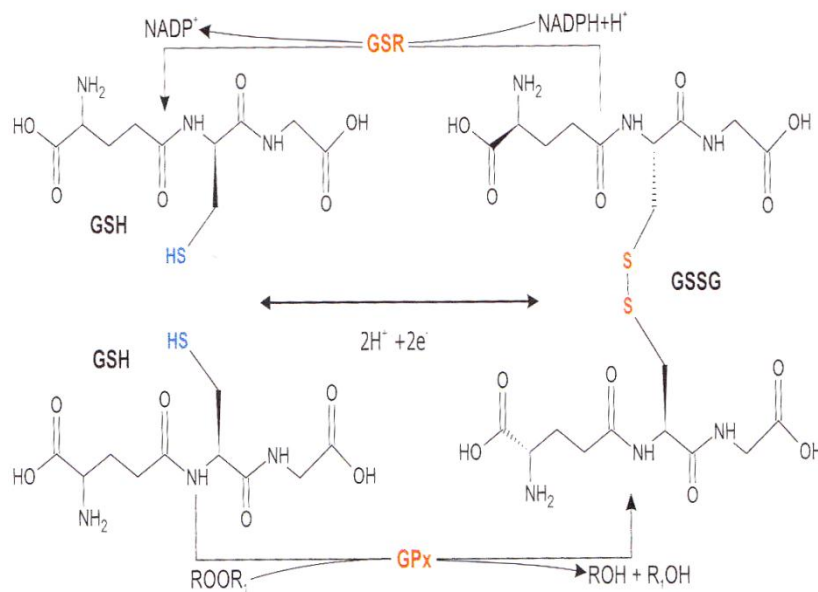
- Δράση σε συνέργεια με διάφορα αντιοξειδωτικά ένζυμα απέναντι στο οξειδωτικό στρες, για παράδειγμα με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης.
- Συμμετοχή στη μεταφορά αμινοξέων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης.
- Άμεση εξουδετέρωση της ρίζας υδροξυλίου και του μονήρους οξυγόνου, ενώ διασπά το υπεροξειδίο του υδρογόνου και λιπιδικές υπεροξειδάσεις μέσω της καταλυτικής δράσης της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης.



Η γλουταθειόνη δεν αντιδρά μη-ενζυμικά με το H_2O_2 , αλλά μπορεί να αντιδράσει άμεσα με ρίζες που έχουν στο κέντρο τους άνθρακα, R^\bullet καθώς και με την παρουσία του υπεροξειδίου της δισμουτάσης:



- Έχει την ικανότητα ανακύκλωσης και επαναφοράς των κυριότερων αντιοξειδωτικών, των βιταμινών C και E στις ενεργές τους μορφές.



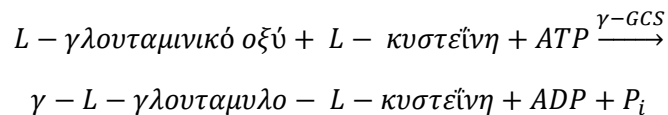
Σχήμα 4.10: Ο κύκλος της γλουταθειόνης. Η ανηγμένη GSH αποδίδοντας ηλεκτρόνιο μέσω αντίδρασης καταλυομένης από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, GPx, διασπά δραστικές μορφές οξυγόνου και λιπιδικές υπεροξειδάσες εξουδετερώνοντάς τις. Η ανηγμένη γλουταθειόνη αποδίδοντας ηλεκτρόνιο μετατρέπεται σε δραστική μορφή γλουταθειόνης η οποία ενώνεται με δισουλφιδικό δεσμό με δεύτερη δραστική μορφή γλουταθειόνης και μετατρέπεται σε δισουλφίδιο της γλουταθειόνης GSSG. Αναγωγή του GSSG μέσω αντίδρασης με το συνένζυμο NADPH, το οποίο δρα ως δότης ηλεκτρονίων, και η οποία καταλύεται από την αναγωγή της γλουταθειόνης GR αποδίδει ανηγμένη GSH.

β. Σύνθεση γλουταθειόνης

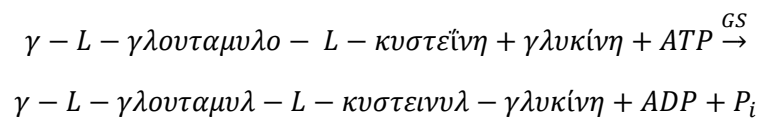
Ενώ η αναγωγή του δισουλφιδίου της γλουταθειόνης γίνεται εύκολα στα κύτταρα, η μείωση των επιπέδων της γλουταθειόνης απαιτεί εκ νέου σύνθεσή της. Τα επίπεδα της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης διατηρούνται από τη διαρκή σύνθεση καινούργιας γλουταθειόνης από τρία πρόδρομα αμινοξέα, από αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης, του δισουλφιδίου δηλαδή της γλουταθειόνης από την αναγωγή της γλουταθειόνης καθώς και από πρόσληψη εξωκυττάριας γλουταθειόνης μέσω της

πλασματικής μεμβράνης^[101, 104]. Η γλουταθειόνη συντίθεται από τρία αμινοξέα L-γλουταμινικό οξύ (L-glutamate), L-κυστεΐνη (L-cysteine) και γλυκίνη (glycine) στο κυτοσόλιο, σε δυο διακριτά στάδια με αντιδράσεις οι οποίες καταναλώνουν ενέργεια (ATP) και καταλύονται από δυο ένζυμα. Στο πρώτο στάδιο δρα η συνθετάση της γ-γλουταμυλο-κυστεΐνης ((γ-glutamyl-cysteine synthetase, γ-GCS)) και το δεύτερο στάδιο δρα η συνθετάση της γλουταθειόνης (glutathione synthetase, GS) η οποία καταλύει το σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού με τη γλυκίνη^[101, 104].

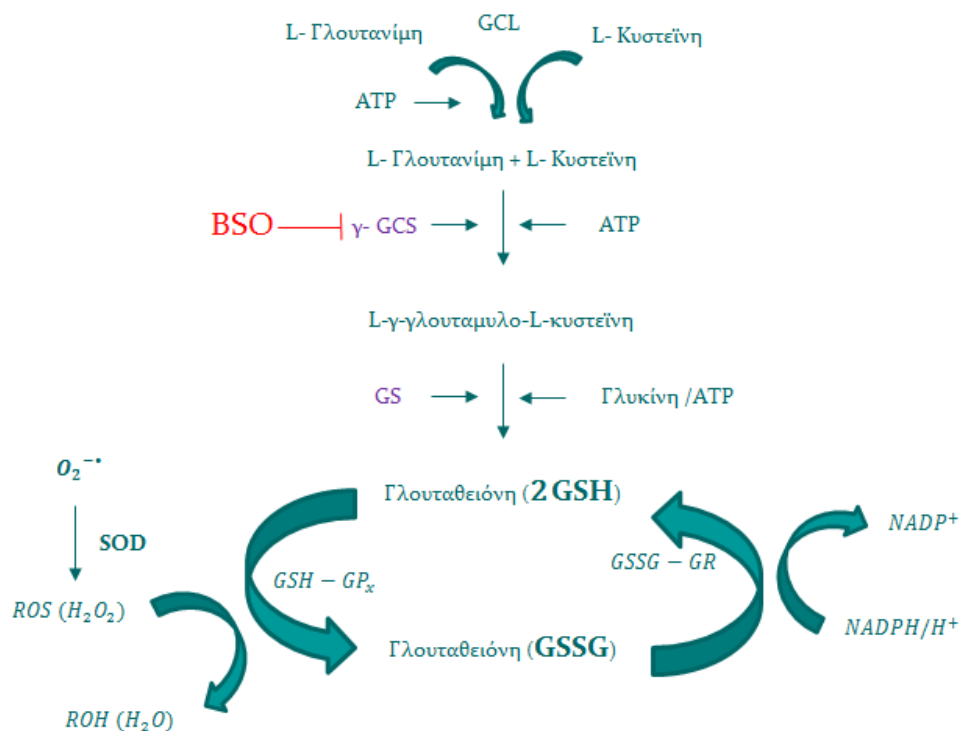
1ο στάδιο:



2ο στάδιο:



Ο έλεγχος της λειτουργίας της συνθετάσης γ-γλουταμυλο-κυστεΐνης είναι καθοριστικός για την ενδοκυττάρια ισορροπία του μεταβολισμού της γλουταθειόνης.



Σχήμα 4.11: Σύνθεση και δράση γλουταθειόνης σε σχέση και με τα αντιοξειδωτικά ένζυμα^[103]

4.7

Συνδυασμός φωτοδυναμικής με αλλαγή στην ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία

Η φωτοδυναμική θεραπεία προκαλεί τη νέκρωση των κυττάρων μέσω των ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών, προϊόντα των φωτοχημικών αντιδράσεων τύπου I και II. Τη δράση της φωτοδυναμικής ανταγωνίζονται κυτταρικοί μηχανισμοί προστασίας. Οι μηχανισμοί αυτοί ευθύνονται για την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι προκαλούν αύξηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, ενεργοποίηση μηχανισμών αντι-αποπτωτικής σηματοδότησης καθώς και για την αναπροσαρμογή της παραγωγής μορίων κυτταροπροστασίας απέναντι στο οξειδωτικό στρες. Κυρίως όμως τη δράση της φωτοδυναμικής ανταγωνίζονται οι ενδοκυττάρια μηχανισμοί άμυνας, το υπεροξειδίο της δισμουτάσης, η καταλάση και το σύστημα της γλουταθειόνης. Αλλά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, το ασκορβικό οξύ, η βιταμίνη E έχουν ενοχοποιηθεί για εξουδετέρωση των επαγομένων από τη φωτοδυναμική ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών [36,105].

Η ρήξη της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων είναι μια στρατηγική η οποία θα μπορούσε να ενισχύσει τα θεραπευτικά αποτελέσματα της φωτοδυναμικής, αλλά και των υπόλοιπων θεραπειών οι οποίες λειτουργούν μέσω της πρόκλησης οξειδωτικού στρες. Έχουν δημοσιευτεί αποτελέσματα μελετών σύμφωνα με τις οποίες η χρήση παραγόντων αναστολής των ενδογενών αντιοξειδωτικών συστημάτων, της γλουταθειόνης για παράδειγμα, επαύξησε το θεραπευτικό αποτέλεσμα της χημειοθεραπείας και της ακτινοθεραπείας^[80].

Στόχος όπως αναφέρθηκε του συνδυασμού διαφορετικών μεθοδολογιών για την βελτιστοποίηση της θεραπείας του καρκίνου δεν είναι μόνο η επαύξηση του θεραπευτικού αποτελέσματος αλλά και η ελαχιστοποίηση των παρενεργειών της βασικής, συμβατικής θεραπείας. Στην περίπτωση της φωτοδυναμικής τέτοιο στόχο αποτελεί η εξάλειψη της παραμένουσας φωτοευαισθησίας, η οποία διατηρείται έως και μήνες μετά τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή. Η φωτοευαισθησία οφείλεται σε μόρια του φωτοευαισθητοποιητή τα οποία έχουν διατηρηθεί στα εξωτερικά όργανα του σώματος και διεγείρονται από κοινό φως προκαλώντας φωτοτοξικότητα σε αυτά. Τα όργανα που πλήττονται είναι το δέρμα και τα μάτια και ο ασθενής θα πρέπει να τα προστατεύει από την έκθεσή τους στο φως. Η φωτοευαισθησία περιορίζει την ποιότητα της ζωής του ασθενούς και μπορεί να προκαλέσει σοβαρές φθορές στον υγιή ιστό, ερύθημα, φλεγμονή, έγκαυμα, εάν αμελήσει τα μέτρα προστασίας. Η ελαχιστοποίηση της φωτοευαισθησίας θα μπορούσε να επιτευχθεί με δυο τρόπους. Με ευαισθητοποίηση του καρκινικού όγκου στη φωτοδυναμική ώστε να χρειάζεται λιγότερη ποσότητα φωτοευαισθητοποιητή και με τη χρήση αντιοξειδωτικών για να δεσμεύουν τα προϊόντα των φωτοχημικών αντιδράσεων τύπου I και II στα εξωτερικά όργανα.

Ο συνδυασμός της φωτοδυναμικής με τη ρήξη της αντιοξειδωτικής άμυνας είναι πολλά υποσχόμενη στρατηγική με στόχο τη βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής. Η βελτιστοποίηση αφορά τόσο την ενίσχυση της φωτοδυναμικής δράσης όσο και την ελαχιστοποίηση της φωτοευαισθησίας και θα μπορούσε να υλοποιηθεί ακολουθώντας δυο τακτικές. Η πρώτη αφορά την καταστολή των ενδοκυττάρων μηχανισμών άμυνας, μέσω της χορήγησης αναστολέων τους. Η δεύτερη στοχεύει τους εξωγενείς μηχανισμούς με χορήγηση αντιοξειδωτικών σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις.

4.7.1

Ενδογενής τακτική

Συνδυασμός φωτοδυναμικής με καταστολή του μηχανισμού της γλουταθειόνης.

Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα, τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών είναι αυξημένα σε πολλά είδη καρκινικών κυττάρων, σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Σε αναλογία, έχει παρατηρηθεί ότι και τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών μορίων και ενζύμων είναι αυξημένα στα καρκινικά κύτταρα και η αύξηση αυτή θεωρείται ότι οφείλεται στην προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες^[36, 80].

Η γλουταθειόνη είναι σημαντικότερη στην αντιοξειδωτική άμυνα έναντι των προ-οξειδωτικών, τα αυξημένα όμως επίπεδά της στα καρκινικά κύτταρα έχουν ενοχοποιηθεί για την αυξημένη αντίσταση που αυτά παρουσιάζουν στις αντικαρκινικές θεραπείες. Η μείωση των επιπέδων της γλουταθειόνης με τη χρήση εξωτερικών παραγόντων έχει χρησιμοποιηθεί για να αυξήσει την ευαισθησία των κυττάρων των καρκινικών όγκων στις αντικαρκινικές θεραπείες. Καρκινικά κύτταρα που περιείχαν χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης (< 10% από τις τιμές της ομάδας ελέγχου) βρέθηκε ότι ήταν πιο ευαίσθητα από τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου στην επίδραση της ακτινοβολίας γ^[80].

Ρόλο κλειδί στη σύνθεση της γλουταθειόνης κατέχει η συνθετάση γ-γλουταμυλο-κυστεΐνη, ένζυμο το οποίο καταλύει το πρώτο στάδιο της σύνθεσής της. Η αναστολή της δράσης του ενζύμου αυτού εμποδίζει, αποτελεσματικότερα ίσως από οποιονδήποτε άλλο τρόπο, τη βιοσύνθεση της γλουταθειόνης. Η χημική ένωση L-βουτυλοθειονίνη-S,R-σουλφοξιμίνη (L-buthionine-S,R-sulfoximine, BSO) είναι ο εξειδικευμένος αναστολέας του ενζύμου γ-γλουταμυλο-κυστεΐνη. Η χρήση του BSO προκαλεί μείωση των επιπέδων της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης και επακόλουθη αύξηση των ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών^[106]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι καταστολή των επιπέδων της γλουταθειόνης μέσω της χορήγησης BSO αυξάνει την κυτταροτοξικότητα αντικαρκινικών θεραπειών^[80].

Μελέτες ελέγχου της συνέργειας της φωτοδυναμικής με τον εξειδικευμένο αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης έχουν γίνει τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και σε επίπεδο οργανισμού^[36]. Χρήση του BSO σε συνδυασμό με τη Photofrin έδειξε ότι ενίσχυσε τη φωτοδυναμική δράση στις U87 και U251n κυτταρικές σειρές γλοιώματος αλλά και στο αντίστοιχο μοντέλο ζώου η καταστροφή του καρκινικού όγκου ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με όσους μύες δεν χορηγήθηκε BSO^[107]. Άλλη μελέτη παρουσίασε ότι ο συνδυασμός του φωτοευαισθητοποιητή Motexafin lutetium και του αναστολέα της σύνθεσης της γλουταθειόνης ενίσχυσε τη φωτοδυναμική δράση σε μακροφάγα κύτταρα αρουραίων^[108]. Μια πρόσφατη τέλος μελέτη με παρουσίασε πως η χρήση BSO σε τρισδιάστατα μοντέλα νευρώνων ευαισθητοποίησε κύτταρα στη φωτοδυναμική με m-THPC, γεγονός αξιοσημείωτο καθώς τα μοντέλα αυτά παρουσίαζαν ιδιαίτερη αντίσταση στη φωτοδυναμική με m-THPC^[109].

Μολονότι η χρήση του BSO έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί τη μείωση των επιπέδων της γλουταθειόνης καθιστώντας τα κύτταρα ευάλωτα στο οξειδωτικό στρες, αρκετές μελέτες αναφέρουν πως η χορήγησή του προκάλεσε κυτταροτοξικότητα, επάγοντας απόπτωση, σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Το κύτταρο για να αντιμετωπίσει την απειλή που δέχεται μέσω του BSO μπορεί να προκαλέσει υπερπαραγωγή γλουταθειόνης ή να αντλήσει γλουταθειόνη από άλλες ενδοκυττάριας πηγές με συνέπεια αντίθετη από την αναμενόμενη δράση. Επιπλέον η αύξηση των επιπέδων των ελευθέρων ριζών και των δραστικών οξυγονούχων ειδών στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να ενισχύσει περαιτέρω την ανάπτυξή τους. Έχει επίσης αναφερθεί πως οι παράγοντες καταστολής της σύνθεσης της γλουταθειόνης έχουν ανεπιθύμητες παρενέργειες στους υγιείς ιστούς περιορίζοντας ενδεχομένως τη δυναμική της τακτικής αυτής για συνέργεια με αντικαρκινικές θεραπείες. Τέλος η μείωση της γλουταθειόνης φαίνεται πως έχει αποτελέσματα μόνο όταν επιτυγχάνονται πολύ χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων^[80].

Οι παραπάνω αντενδείξεις αυτές υποδεικνύουν την προσεκτική μελέτη της συνέργειας ώστε να εξασφαλιστεί ενίσχυση της φωτοδυναμικής.

4.7.2

Εξωγενής τακτική

Συνδυασμός φωτοδυναμικής με χορήγηση αντιοξειδωτικών σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις.

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά μπορούν να δράσουν τόσο προ-οξειδωτικά προκαλώντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά και αντιοξειδωτικά, εξουδετερώνοντάς τες. Ο τρόπος με τον οποίο θα δράσουν φαίνεται ότι καθορίζεται από τη συγκέντρωσή τους καθώς έχει διαπιστωθεί ότι αντιοξειδωτικά σε χαμηλές

συγκεντρώσεις δρουν αντιοξειδωτικά προστατεύοντας τα βιολογικά συστήματα ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δρουν ενισχύοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Ο τρόπος δράσης τους διαφοροποιείται από κύτταρο σε κύτταρο καθώς εξαρτάται και από τις ιδιότητες και τη συγκέντρωσή του^[36].

Η συνέργεια των αντιοξειδωτικών με τις αντικαρκινικές θεραπείες είναι πεδίο μετωπικής έρευνας. Τα αποτελέσματα των ερευνών είναι μάλλον αντιφατικά. Ορισμένες αναφέρουν ότι τα αντιοξειδωτικά προστατεύουν τον υγιή ιστό από τις παρενέργειες των αντικαρκινικών θεραπειών χωρίς ωστόσο να μειώνουν την αποτελεσματικότητά τους στη θεραπεία του καρκινικού όγκου. Αντίθετα άλλες μελέτες αναφέρουν ότι η χρήση αντιοξειδωτικών μείωσε τη δράση αντικαρκινικών θεραπειών απέναντι στον καρκινικό όγκο^[107].

Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών στη φωτοδυναμική θεραπεία έχει ελάχιστα μελετηθεί μέχρι τώρα. Υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ότι η χρήση αντιοξειδωτικών ενίσχυσε τη φωτοδυναμική δράση, η βιταμίνη E τη φωτοδυναμική με HpD-ALA σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας^[110] καθώς και τη δράση της m-THPC σε κύτταρα αδενικαρκινώματος^[111], το ασκορβικό οξύ τη φωτοδυναμική με Verteporfin κύτταρα λευχαιμίας^[112]. Υπάρχουν ωστόσο και μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν ότι η δόση στην οποία χορηγούνται τα αντιοξειδωτικά καθορίζει το αν θα ενισχύσουν ή θα μειώσουν τη φωτοδυναμική δράση: το ασκορβικό οξύ και ένα φλαβονοειδές, η κουερκετίνη, χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική με τον φωτοευαισθητοποιητή υπερσίνη^[113]. Επιπλέον των μελετών σε κύτταρα, έχει αναφερθεί ότι μια υδατοδιαλυτή μορφή της βιταμίνης E όταν χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με φωτοδυναμική με m-THPC σε μοντέλο μύος αδενοκαρκινώματος προκάλεσε μεγαλύτερη καταστροφή του καρκινικού όγκου σε σχέση με τους μύες οι οποίοι δεν είχαν λάβει το αντιοξειδωτικό^[114].

Η τακτική της χρήσης των αντιοξειδωτικών παραγόντων σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη.

Κεφάλαιο V

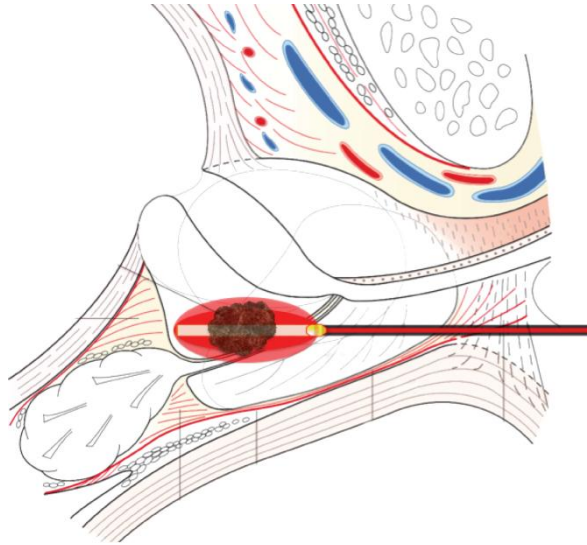
Ενδοϊστική Φωτοδυναμική Θεραπεία & Καρκίνος του Προστάτη

5.1

Εισαγωγή

Η επιτυχία της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι μάλλον δεδομένη πλέον σε περιπτώσεις επιφανειακών καρκίνων, στο δέρμα, στον οισοφάγο, στον πνεύμονα. Σε όργανα δηλαδή στα οποία η καθοδήγηση του φωτός είναι σχετικά απλή (το φως μέσω ενδοσκοπίων οδηγείται στο υπό θεραπεία όργανο) αλλά κυρίως σε περιπτώσεις καρκινικών όγκων μικρού πάχους^[115].

Καθώς δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν φωτοευαισθητοποιητές με μήκη κύματος απορρόφησης $> 800nm$ (εκεί απορροφούν ασθενώς τα περισσότερα χρωμοφόρα (αιμοσφαιρίνη, μελανίνη) του βιολογικού ιστού και θα μπορούσε να επιτευχθεί μεγαλύτερο βάθος διείσδυσης μέσα στον καρκινικό ιστό, όμως η ενέργεια του φωτοευαισθητοποιητή δεν επαρκεί για τη διέγερση του μοριακού οξυγόνου σε μονήρες) είναι αναγκαίο να υιοθετηθούν μεθοδολογίες ακτινοβόλησης οι οποίες θα εξασφαλίζουν τη διείσδυση του φωτός σε μεγαλύτερο βάθος μέσα στον ιστό. Στην κατεύθυνση αυτή βρίσκεται η Ενδοϊστική Φωτοδυναμική Θεραπεία, όπου το φως για την ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή καθοδηγείται ενδοϊστικά στο υπό θεραπεία εσωτερικό όργανο μέσα στον καρκινικό όγκο.



Σχήμα 5.1: Σχηματική αναπαράσταση ενδοϊστικής ακτινοβόλησης σε καρκινικό όγκο στον προστάτη. Το φως μέσω οπτικής ίνας με διαχύτη κυλινδρικής συμμετρίας καθοδηγείται ακριβώς μέσα στον καρκινικό ιστό

Η φωτοδυναμική θεραπεία πλεονεκτεί σε σχέση με τις παραδοσιακές αντικαρκινικές θεραπείες όπως η χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία ή η χειρουργική αφαίρεση του καρκινικού όγκου, κυρίως γιατί δεν συνοδεύεται από σοβαρές για την ποιότητα ζωής του ασθενούς παρενέργειες. Η θεραπεία μπορεί να εστιαστεί ακριβώς στον καρκινικό όγκο στο υπό θεραπεία όργανο καθώς το φως μπορεί να καθοδηγηθεί μέσα σε αυτόν. Με τον τρόπο αυτό ακτινοβολείται μόνο ο καρκινικός όγκος και όχι οι παρακείμενοι υγιείς ιστοί. Επιπλέον καθώς η φωτοδυναμική φαίνεται ότι μάλλον περιορίζεται στο επιθήλιο του οργάνου διατηρώντας ακέραια την αρχιτεκτονική του στρώματος του οργάνου, οι λειτουργίες του οργάνου διατηρούνται και μετά τη θεραπεία^[115].

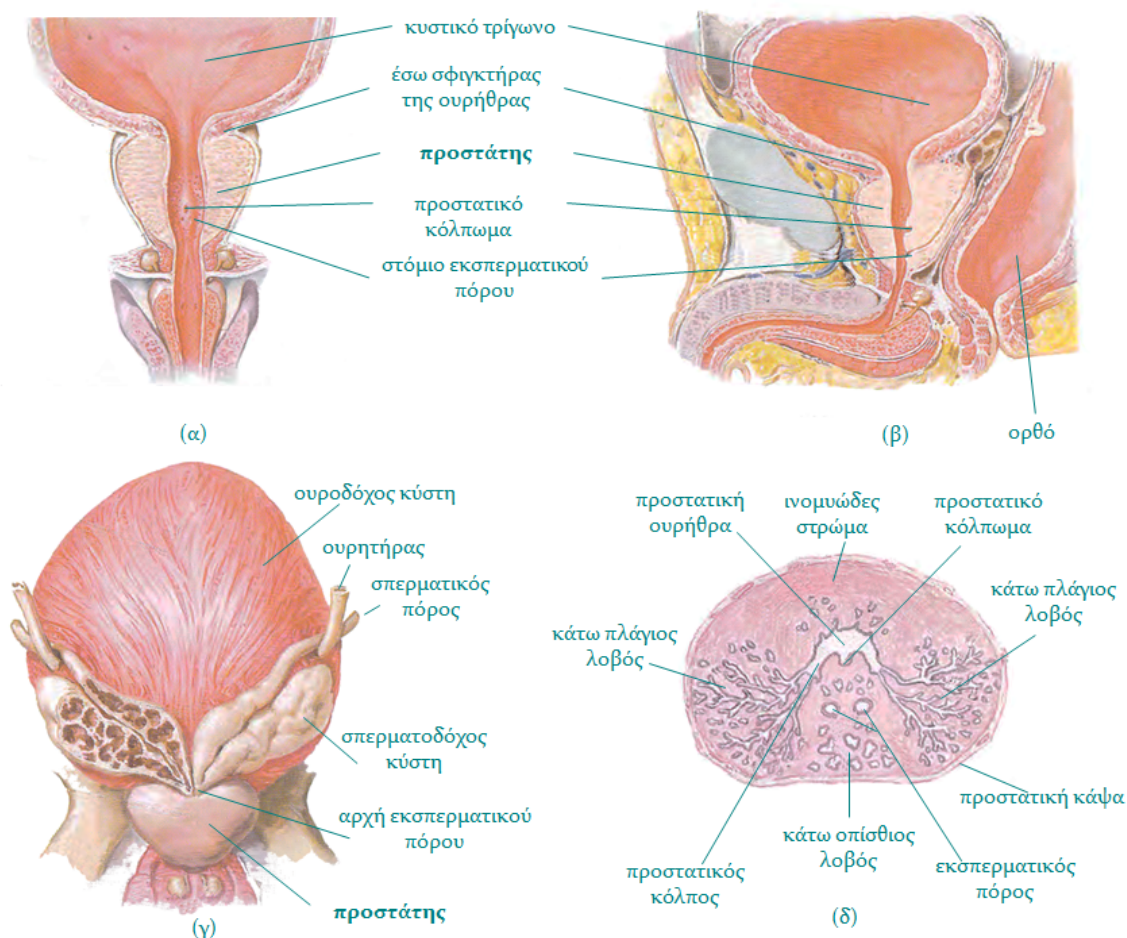
Ο προστάτης είναι ένα ελκυστικό όργανο για την εφαρμογή της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας:

- Ο καρκίνος του προστάτη είναι ο δεύτερος σε εμφάνιση καρκίνος στους άνδρες της καυκάσιας φυλής.
- Οι συμβατικές θεραπείες συνοδεύονται με σοβαρότατες παρενέργειες στην ποιότητα ζωής του ασθενούς.
- Υπάρχει η τεχνογνωσία από τη βραχυθεραπεία για την τοποθέτηση και εισαγωγή στον προστάτη οπτικών ινών μεταφοράς του φωτός διέγερσης.
- Η πλειοψηφία των ασθενών πάσχει από χωρικά εντοπισμένο καρκινικό όγκο.
- Η φωτοδυναμική θεραπεία, λόγω της εγγενούς της επιλεκτικότητας, διατηρεί τη λειτουργικότητα του αδένος καθώς δεν βλάπτει μη παθολογικές δομές^[115].

5.2

Ο προστάτης

Ο προστάτης είναι ο μεγαλύτερος επικουρικός αδένας του γεννητικού συστήματος του άνδρα. Αποτελείται από αδενικό και ινομυώδες τμήμα, έχει το μέγεθος καστανού και περιβάλλει την προστατική μοίρα της ουρήθρας. Επενδύεται από λεπτή κάψα, η οποία συνίσταται από πυκνό συνδετικό ιστό, τον ίδιο χιτώνα (αληθής κάψα) και περικλείεται μέσα σε μια χαλαρή, ατελή κάψα η οποία προέρχεται από την πυελική περιτονία, την κάψα του προστάτη (ψευδής κάψα).



Σχήμα 5.2: (α) Μετωπιαία διατομή (β) Οβελιαία διατομή (γ) Οπίσθια άποψη (δ) Εγκάρσια διατομή προστάτη^[119]

Ο προστάτης εμφανίζει βάση, κορυφή και τέσσερις επιφάνειες (πρόσθια, οπίσθια, και δυο πλάγιες-κάτω). Η βάση του προστάτη (η κυστική του επιφάνεια) έρχεται σε στενή σχέση με τον αυχένα της ουροδόχου κύστης. Η προστατική ουρήθρα διατρύπαι τη μέση μοίρα της βάσης του προστάτη, κοντά στην πρόσθια επιφάνειά του. Η κορυφή του προστάτη βρίσκεται προς τα κάτω και έρχεται σε σχέση με την άνω περιτονία του

ουρογεννητικού διαφράγματος. Η κορυφή ακουμπά στον σφιγκτήρα μυ της ουρήθρας και περιβάλλεται από τα έσω χείλη των ανελκτήρων μυών του πρωκτού. Η οπίσθια επιφάνεια είναι τριγωνική και αποπλατυσμένη από εμπρός προς τα πίσω. Συνήθως διαιρείται με μια αβαθή αύλακα κατά τη μέση γραμμή και σε δυο πλάγιους λοβούς. Η πρόσθια επιφάνεια είναι κυρτή και εκτείνεται από τη βάση έως την κορυφή. Οι πλάγιες-κάτω επιφάνειες συνεχονται εμπρός με την κυρτή πρόσθια επιφάνεια και επικάθονται στην περιτονία που περιβάλλει τους ανελκτήρες μύες του πρωκτού. Το προστατικό έκκριμα, ένα λεπτόρρευστο γαλακτοειδές υγρό, αποβάλλεται μέσα στην προστατική μοίρα της ουρήθρας με τη σύσπαση των λείων μυικών ινών του προστάτη. το προστατικό υγρό αποτελεί περίπου το 20% του όγκου του σπέρματος^[116-118].

5.3

Παθήσεις του προστάτη

Ο προστάτης έχει μικρό μέγεθος κατά τη γέννηση αλλά κατά την εφηβεία μεγαλώνει γρήγορα. Στους περισσότερους άνδρες μετά το 50^ο έτος της ηλικίας ο προστάτης προοδευτικά υπερτρέφεται. Καθώς η προστατική μοίρα της ουρήθρας διέρχεται μέσα από αυτόν, οι παθήσεις του προστάτη είναι δυνατό να προκαλέσουν προβλήματα στην κένωση της κύστης. Η καλοήθης αδενική υπερπλασία του προστάτη προσβάλλει σε μεγάλο ποσοστό τους ηλικιωμένους άνδρες και αποτελεί συνήθη αιτία απόφραξης της ουρήθρας η οποία οδηγεί σε μια σειρά ανωμαλιών στην ούρηση (νυκτουρία, δυσουρία, έπειξη προς ούρηση).

Η μερική ή πλήρης χειρουργική αφαίρεση του προστάτη εφαρμόζεται για να αντιμετωπιστούν οι παθήσεις του. Σε σοβαρότερες καταστάσεις αφαιρείται ολόκληρος ο αδένας, οι εκσπερματικοί πόροι και τη τελική μοίρα του σπερματικού πόρου με αποτέλεσμα την αδυναμία εκσπερμάτισης. Τα προβλήματα που συνοδεύουν στις παραδοσιακές τεχνικές αντιμετώπισης των παθήσεων του προστάτη αφορούν ανωμαλίες στην ούρηση και ανικανότητα^[116].

5.4

Καρκίνος του προστάτη

Ο καρκίνος του προστάτη είναι ο συχνότερος σε εμφάνιση μη δερματικός τύπος καρκίνου στους άνδρες του δυτικού κόσμου^[117]. Πάνω από 200000 νέα περιστατικά διαγιγνώσκονται με τη νόσο μόνο στις ΗΠΑ κάθε χρόνο και περίπου ένας στους έξι

Αμερικανούς πολίτες νοσεί^[120, 121]. Στην Ευρώπη περίπου 80000 ασθενείς καταλήγουν στο θάνατο κάθε χρόνο^[121]. Τα μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης της νόσου απαντώνται στις χώρες του Δυτικού κόσμου (Αμερική, Δυτική Ευρώπη, Αυστραλία) ενώ τα χαμηλότερα στην Ασία. Η ανάπτυξη του καρκίνου στον προστάτη ξεκινά αρκετά χρόνια προτού γίνει η διάγνωσή του και είναι αποτέλεσμα τόσο γενετικών όσο και επιγενετικών τροποποιήσεων οι οποίες προκαλούν στο φυσιολογικό επιθήλιο του αδένος προκαρκινικές αλλοιώσεις οι οποίες με το πέρασμα των χρόνων εξελίσσονται σε επιθετικό μεταστατικό καρκίνο^[122]. Τα πρώτα συμπτώματα της νόσου είναι ουρολογικές διαταραχές και αύξηση των επιπέδων του PSA. Το ειδικό προστατικό αντιγόνο (prostate-specific antigen (PSA)) υπερεκφράζεται όταν υπάρχει κάποια αλλοίωση στον προστάτη, κυρίως δε όταν υπάρχει καρκίνος. Ο εντοπισμός αυξημένων τιμών PSA αποτελεί ένδειξη για κάποια παθολογική κατάσταση στον προστάτη, από προστατίτιδα και υπερπλασία μέχρι καρκίνο του προστάτη.

Με την υιοθέτηση του βιοχημικού ελέγχου προσδιορισμού του PSA, προηγμένων τεχνικών βιοψίας και απεικονιστικών τεχνικών (MRI), έγινε εφικτή η έγκαιρη διάγνωση χωρικά καλά οριοθετημένου, μικρού μεγέθους και μικρής διαφοροποίησης καρκινικού όγκου στον προστάτη σε αρχικό στάδιο^[120, 123]. Φαίνεται ίσως παράδοξο πως παρόλη την έγκαιρη διάγνωση που επιτεύχθηκε με τη μέτρηση του PSA τα ποσοστά εμφάνισης της νόσου αυξήθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες (26%)^[124]. Στη διαπίστωση αυτή δε θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερο βάρος καθώς δεν υπάρχουν δεδομένα προηγούμενων ετών, πολλοί άνδρες έφεραν τη νόσο σε όλη τη ζωή τους χωρίς να γίνει ποτέ αντίστοιχη διάγνωση. Η πρόοδος που συντελέστηκε με τη μέτρηση PSA είναι ότι μειώθηκαν τα ποσοστά εμφάνισης μετάστασης (75%) όπως επίσης και τα ποσοστά θνησιμότητας (30%) εξαιτίας της νόσου^[120].

Ο καρκίνος του προστάτη είναι ένας μάλλον ιδιότυπος τύπος καρκίνου. Μπορεί να διατηρηθεί σε ανενεργή μορφή για πολλά χρόνια, εντοπισμένα σε ένα σημείο του αδένος (ή σε περισσότερα εάν πρόκειται περί πολυεστιακό καρκίνο) έως ότου πυροδοτηθεί η ταχύτατη ανάπτυξή του η οποία συνήθως ακολουθείται από μετάσταση του καρκίνου στα οστά. Η θεραπεία που ακολουθείται για την αντιμετώπισή του καθορίζεται από το στάδιο της νόσου, την ηλικία και το προσδόκιμο ζωής του ασθενούς^[117, 125].

Η συνήθης αγωγή που συστήνεται στους ασθενείς είναι η ενεργός παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου και αφορά στην μέτρηση των επιπέδων του PSA, σε απεικόνιση του καρκινικού όγκου μέσω υπερήχων ή ακτινογραφιών σε τακτά χρονικά διαστήματα. Η ενεργός παρακολούθηση αποσκοπεί στο να ελαχιστοποιήσει τις επεμβατικές θεραπείες. Ασθενείς με χωρικά καθορισμένους καρκινικούς όγκους μπορούν να παρακολουθούνται για αρκετά χρόνια, με ασφάλεια, χωρίς να υποστούν κάποια επέμβαση. Η ενεργός παρακολούθηση ωστόσο οδηγεί σε αύξηση του άγχους των

ασθενών και οι θεράποντες ιατροί διστάζουν να την εφαρμόσουν σε ασθενείς μικρής ηλικίας^[120, 123].

Όταν διαπιστωθεί αλλαγή στις συνήθειες για τον κάθε ασθενή τιμές τότε ακολουθείται μια από τις κλασικές θεραπείες για την αντιμετώπιση του καρκινικού όγκου, ολική εκτομή του προστατικού αδένου, ακτινοθεραπεία ή βραχυθεραπεία. Συνήθως προτιμάται η ολική εκτομή του αδένου. Η ακτινοθεραπεία μπορεί να εφαρμοστεί με δυο τεχνικές. Ραδιενεργές κάψουλες εισάγονται μέσα στον προστάτη, βραχυθεραπεία, ή μια εξωτερική ραδιενεργός δέσμη κατευθύνεται στον αδένου^[117].

Οι παρενέργειες που συνοδεύουν τις κλασικές θεραπείες κάθε άλλο παρά αμελητέες είναι και σχετίζονται κυρίως με απώλεια ελέγχου της ούρησης και ανικανότητα, παρενέργειες που μειώνουν δραματικά την ποιότητα ζωής του ασθενούς. Επιπλέον το κόστος των θεραπειών αυτών είναι αρκετά υψηλό, στην περίπτωση της προστατεκτομής πρόκειται για χειρουργική επέμβαση με όλες τις παρενέργειες, το υψηλό κόστος εξοπλισμού και την παραμονή σε νοσοκομείο, που αυτή συνεπάγεται. Πρόκληση όσον αφορά την επιλογή και εφαρμογή τελικά κάποιας κλασικής θεραπείας είναι η εξισορρόπηση ανάμεσα στη θεραπεία του καρκινικού όγκου και στη διατήρηση της λειτουργικότητας του αδένου με στόχο την ελαχιστοποίηση των ενοχλητικών και επώδυνων για την ποιότητα ζωής του ασθενούς παρενεργειών^[126]. Οι παρενέργειες οφείλονται στις βλάβες που υφίστανται οι παρακείμενες στον προστατικό αδένου υγιείς δομές, κυρίως η κύστη, η ουρήθρα και δομές που σχετίζονται με τον αναπαραγωγικό μηχανισμό.

Η ενεργός παρακολούθηση, επιπλέον, ενέχει τον κίνδυνο λανθασμένης διάγνωσης του τρόπου εξέλιξης της νόσου, έτσι για παράδειγμα ασθενείς υψηλού κινδύνου λανθασμένα να χαρακτηριστούν χαμηλού χωρίς περεταίρω θεραπεία. Έχει προταθεί ότι ο ρυθμός ανάπτυξης του χωρικά εντοπισμένου καρκινικού όγκου είναι χαμηλός την πρώτη δεκαετία από τη διάγνωση ενώ μετά τα 15 με 20 χρόνια ο ρυθμός αυξάνεται ταχύτατα οδηγώντας και σε μεταστάσεις^[127].

Η έγκαιρη διάγνωση ολοένα και περισσότερων χαμηλού κινδύνου περιστατικών εντοπισμένου καρκίνου του προστάτη σε άνδρες μικρότερης ηλικίας έχει ενισχύσει τον προβληματισμό όσον αφορά την επιλογή της βέλτιστης θεραπείας. Ζητούμενο είναι η διατήρηση του ισοζυγίου ανάμεσα στην επιτυχή θεραπεία του καρκινικού όγκου, που επιτυγχάνεται με τις κλασικές θεραπείες, και στην αποφυγή των επώδυνων και ενοχλητικών για την ποιότητα ζωής του ασθενούς παρενεργειών, που αποφεύγονται μέσω της ενεργού παρακολούθησης. Τη χρυσή τομή φαίνεται πως μπορεί να εξασφαλίσουν υβριδικές τεχνολογίες που αναπτύσσονται τα τελευταία χρόνια και καλούνται εστιακές θεραπείες. Οι εστιακές θεραπείες στοχεύουν στην εξάλειψη των καρκινικών εστιών μέσα στον προστατικό αδένου με τις ελάχιστες δυνατές παράπλευρες φθορές σε υγιείς δομές, ζωτικές για τη διατήρησης της λειτουργικότητας του αδένου.

Έτσι και η καταπολέμηση της νόσου θα επιτυγχάνεται και η ποιότητα της ζωής του ασθενούς δε θα θυσιάζεται^[117, 120, 123].

Για να είναι επιτυχείς οι εστιακές θεραπείες θα πρέπει^[120, 123, 124]:

- Να έχει εντοπιστεί ο καρκινικός όγκος (τόσο το μέγεθός του όσο και τα όριά του) με τη μέγιστη δυνατή ακρίβεια μέσα στο υπό θεραπεία όργανο. Η λεπτομερής χαρτογράφηση του καρκινικού όγκου μέσα στο όργανο επιτυγχάνεται συνδυάζοντας δεδομένα από απεικονιστικές τεχνικές και βιοψίες.
- Να στοχεύει μόνο τον καρκινικό όγκο αφήνοντας ανέπαφους τους περιβάλλοντες υγιείς ιστούς διατηρώντας τη λειτουργικότητα του οργάνου.

Η φωτοδυναμική θεραπεία ενέχει όλες τις προϋποθέσεις για να εφαρμοστεί στην περίπτωση του καρκίνου του προστάτη.

5.5

Προ-κλινικές μελέτες φωτοδυναμικής σε μοντέλα πειραματοζώων καρκίνου του προστάτη

Οι πρώτες προκλινικές μελέτες ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας έγιναν στο μοντέλο καρκίνου του προστάτη σε αρουραίο Dunning. Το πλέον σύνηθες πειραματόζωο στις προκλινικές μελέτες είναι το μοντέλου σκύλου, καθώς ο προστάτης του παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με τον ανθρώπινο σε σχέση με το μέγεθος, την ανατομία και τις οπτικές ιδιότητες *in vivo*. Οι μελέτες αυτές εστιάζουν σε παραμέτρους της φωτοδυναμικής όπως είναι ο φωτοευαισθητοποιητής που χρησιμοποιείται, η συνολική δόση ενέργειας καθώς και το βάθος της νέκρωσης που προκαλείται από τη θεραπεία^[115].

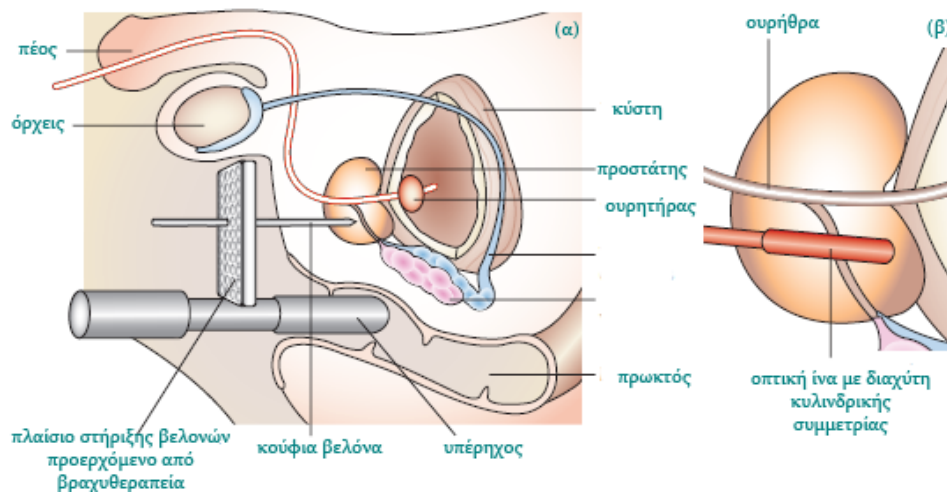
5.6

Κλινικές μελέτες φωτοδυναμικής θεραπείας στον καρκίνο του προστάτη

Η κλινική εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας ξεκινά συνήθως με την ενδοφλέβια χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή. Στη συνέχεια οπτικές ίνες εισάγονται μέσω του περιτόναιου στον αδένα χρησιμοποιώντας δεδομένα υπερήχων και πλαίσιο

στήριξης για την ακριβή τοποθέτησή τους στον καρκινικό όγκο. Χρησιμοποιούνται όσο οπτικές ίνες με γυμνό άκρο όσο και οπτικές ίνες με κυλινδρικό διαχύτη στο άκρο τους για τη μεταφορά του φωτός. Εάν το μήκος του αδένος είναι μεγάλο και μια μόνο συνεδρία δε φτάνει να το καλύψει, τότε οι ίνες μπορούν να μετατοπιστούν κατά μήκος του, ώστε να ακολουθήσει εκ νέου φωτοδυναμική της περιοχής που δεν δέχτηκε φως κατά την πρώτη διαδικασία. Η τεχνική αυτή δεν εφαρμόζεται στους νέους φωτοευαίσθητοποιητές για τους οποίους ο χρόνος ακτινοβόλησης μετά τη χορήγησή τους είναι πολύ σύντομος^[126].

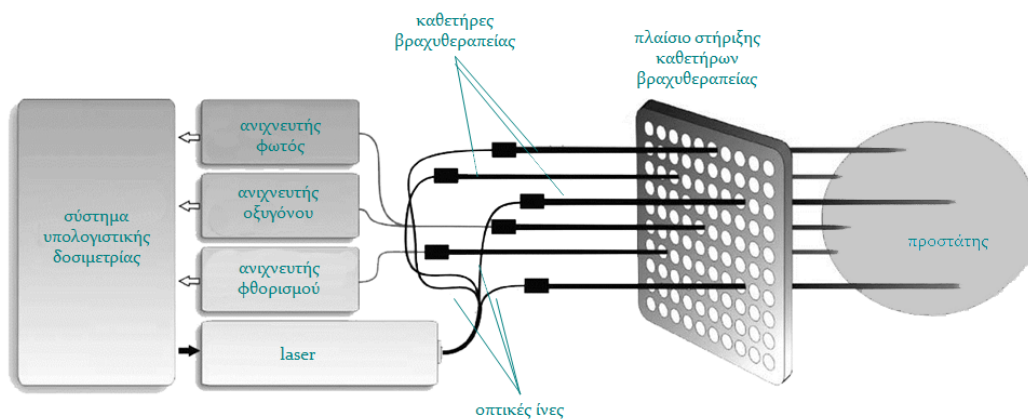
Η διαδικασία λαμβάνει χώρα υπό γενική αναισθησία του ασθενούς. Κάλυψη του σώματος του ασθενούς καθώς και των ματιών του κατά τη διάρκεια της θεραπείας είναι απαραίτητη. Οι προφυλάξεις αυτές διατηρούνται και μετά το τέλος της θεραπείας ανάλογα με τον φωτοευαίσθητοποιητή που χορηγήθηκε, 6 εβδομάδες για φωτοευαίσθητοποιητές που συγκεντρώνονται στον καρκινικό όγκο ή για μερικές ώρες για φωτοευαίσθητοποιητές που συγκεντρώνονται στο αγγειακό δίκτυο για να αποφευχθεί η φωτοευαισθησία.



Σχήμα 5.3: (α) Το φως για την ενεργοποίηση του φωτοευαίσθητοποιητή συνήθως καθοδηγείται στον προστάτη με τεχνικές ανάλογες της βραχυθεραπείας. Ένα πλαίσιο στήριξης και καθοδήγησης τοποθετείται στο περιτόναιο. Κούφιας βελόνες εισέρχονται μέσα από αυτό στον προστάτη. Μέσα από τις κούφιας βελόνες καθοδηγούνται στον καρκινικό όγκο οπτικές ίνες είτε με κυλινδρικό διαχύτη είτε με γυμνό άκρο. (β) ίνα με διαχύτη κυλινδρικής συμμετρίας όπως έχει τοποθετηθεί μέσα στον προστάτη για ακτινοβόληση του καρκινικού όγκου^[124].

Σε πολλές περιπτώσεις έχει προηγηθεί υπολογιστική προσομοίωση μέσω υπολογιστικής δοσιμετρίας ώστε να ελεγχθούν οι παράμετροι της θεραπείας. Για να εξασφαλιστεί η επιτυχία της θεραπείας συνυπολογίζονται διάφορες παράμετροι. Η αιμάτωση του αδένος, το είδος του φωτοευαίσθητοποιητή, η συγκέντρωσή του και η χωρική κατανομή του στον καρκινικό όγκο, η συγκέντρωση του οξυγόνου μέσα στον

προστάτη καθώς και οι οπτικές του ιδιότητες, όπως επίσης το μέγεθος και η παθολογία του προστατικού αδένου. Επιπλέον όργανα παρακείμενα του προστάτη θα πρέπει να προστατεύονται από ενδεχόμενη φωτοδυναμική φθορά, γεγονός που επίσης ελέγχει ένα σύστημα υπολογιστικής δοσιμετρίας. Τέλος θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται και δεδομένα της γενικότερης κατάστασης του ασθενούς, το χρόνο ακτινοβολήσης καθώς και τη φωτοευαισθησία του ασθενούς. Μολονότι πρωτόκολλα και εξοπλισμός είναι διαθέσιμα για τέτοιου είδους δοσιμετρία, πρέπει να αναπτυχθούν πολύπλοκοι αλγόριθμοι οι οποίοι με ακρίβεια θα προσδιορίζουν τη φωτοδυναμική δόση (Σχήμα 5.4)^[115].



Σχήμα 5.4: Διάταξη ιδανικού συστήματος ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας. Ακολουθώντας τις τεχνικές στήριξης καθετήρων που εφαρμόζονται στη βραχυθεραπεία οπτικές ίνες καθοδηγούνται μέσα στον προστάτη. Ανιχνευτές φθορισμού, για να μετρηθεί η ποσότητα του φωτοευαισθητοποιητή, οξυγόνου και φωτός τοποθετούνται στον προστάτη και οι μετρήσεις τους συλλέγονται και αναλύονται σε πραγματικό χρόνο. Τα δεδομένα αυτά τροφοδοτούν το σύστημα υπολογιστικής δοσιμετρίας για να επανεκτιμάται ανάλογα το φως που μεταφέρεται στον προστάτη^[115].

α. Παράγωγα αιματοπορφυρίνης

Η πρώτη αναφορά για κλινική εφαρμογή της φωτοδυναμικής στον καρκίνο του προστάτη έγινε το 1990 όταν ο Windahl και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν τη Photofrin για τη φωτοδυναμική θεραπεία καρκινικών όγκων σε δυο ασθενείς οι οποίοι είχαν ήδη υποστεί εκτομή του όγκου σε δυο στάδια. 6 εβδομάδες μετά την επέμβαση εφαρμόστηκε και φωτοδυναμική με την εισαγωγή στον προστάτη οπτικής ίνας με σφαιρικό διαχύτη για τη διέγερση του φωτοευαισθητοποιητή. Ο ένας ασθενής κατέληξε 6 μήνες αργότερα από άλλη αιτία και η ιστολογική εξέταση του προστάτη δεν έδειξε κάποιο σημάδι καρκίνου. Στο δεύτερο ασθενή ελήφθη βιοψία 3 μήνες μετά τη φωτοδυναμική η οποία και πάλι δεν έδειξε κάποιο σημάδι καρκίνου^[127-129].

β. ALA

Μια δεκαετία αργότερα ελέγχθηκε κατά πόσο το ALA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και στον καρκίνο του προστάτη. Ο Zaak και οι συνεργάτες του ερεύνησαν εάν τα κύτταρα στον καρκινικό όγκο στον προστάτη απορροφούν το ALA. Το χορήγησαν από το στόμα σε δόση 20 mg/kg , 4 h πριν οι ασθενείς υποστούν ολική προστατεκτομή. Τα δείγματα που έλαβαν από τον καρκινικό όγκο μετά τη χειρουργική αφαίρεση του αδένος τα εξέτασαν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Ενώ ALA ανιχνεύθηκε στα καρκινικά κύτταρα δεν παρατηρήθηκε καθόλου στα γειτονικά επιθηλιακά κύτταρα. Το ενδιαφέρον της μελέτης αυτής εστιάζεται στην επιλεκτικότητα του φωτοευαισθητοποιητή στα καρκινικά κύτταρα έναντι τα υπόλοιπα. Στη συνέχεια οι ερευνητές εφάρμοσαν ενδοϊστικά φωτοδυναμική θεραπεία σε έξι ασθενείς χρησιμοποιώντας φως στα 633 nm μέσω μιας οπτικής ίνας με κυλινδρικό διαχύτη μήκους 1 cm και δόση ενέργειας 250 J/cm . 6 εβδομάδες μετά τη θεραπεία καταγράφηκε 30% μείωση των επιπέδων του PSA σε όσους ασθενείς η οπτική ίνα καθοδηγήθηκε περιτονείκτα στον προστάτη ενώ σε όσους καθοδηγήθηκε μέσω της ουρήθρας η μείωση ήταν 55% κατά μέσο όρο^[128, 129].

γ. Motexafin lutetium

Ο Hahn και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν το φωτοευαισθητοποιητή motexafin lutetium (MLu, LuTex) σε ασθενείς οι οποίοι χρειάζονταν ανακουφιστική θεραπεία μετά από ακτινοθεραπεία ή βραχυθεραπεία. 17 ασθενείς έλαβαν διαφορετικές δόσεις φωτοευαισθητοποιητή ($0.5 - 2 \text{ mg/kg}$) και ακολούθησε διέγερσή του, σε διαφορετικούς χρόνους μετά τη χορήγησή του ($3 - 24 \text{ h}$), με διαφορετικές δόσεις ενέργειας ($25 - 150 \text{ J/cm}^2$). Η μείωση των επιπέδων του PSA ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς οι οποίοι δέχτηκαν 2 mg/kg , 3 h πριν την ακτινοβολία με δόση ενέργειας 150 J/cm^2 . Οι παρενέργειες που αναφέρθηκαν αφορούσαν διαταραχές της ούρησης^[126, 128, 129].

δ. Palladium bacteriopheophorbide

Ο Trachtenberg και οι συνεργάτες του εφάρμοσαν φωτοδυναμική θεραπεία με την palladium bacteriopheophorbide, Padoporfin (*WST - 09* εμπορική ονομασία Tookad). Η Padoporfin είναι ένας λιπόφιλος φωτοευαισθητοποιητής και χρειάζεται να προσδεθεί σε κατάλληλο σύστημα μεταφοράς για να χορηγηθεί ενδοφλέβια. Η ενδοφλέβια χορήγηση διαρκεί 20 min ενώ ταυτόχρονα ακτινοβολείται η υπό θεραπεία καρκινική περιοχή. Η κλινική δοκιμή έγινε σε 28 ασθενείς οι οποίοι επανεμφάνισαν καρκίνο του προστάτη μετά από αντινοθεραπεία. Η δόση που κρίθηκε βέλτιστη ήταν τα 2 mg/kg . Το 60% των ασθενών οι οποίοι δέχτηκαν δόση ενέργειας 23 J/cm^2 παρουσίασαν

εκτεταμένη καταστροφή του αγγειακού δικτύου στο 90% του όγκου μια εβδομάδα μετά τη θεραπεία ενώ βιοψίες που ελήφθησαν 6 μήνες αργότερα ήταν αρνητικές για καρκίνο. Οι ασθενείς παρουσίασαν παροδικές διαταραχές της ούρησης χωρίς φωτοευαισθησία^[126, 128]. Μια καινούργια υδατοδιαλυτή εκδοχή, Padeliporfin, WST-11, Tookad Soluble, αναπτύχθηκε πρόσφατα και βρίσκεται αυτήν την εποχή σε στάδιο κλινικών δοκιμών, στην Ευρώπη και στις ΗΠΑ, σε ασθενείς με χαμηλού κινδύνου καρκίνο του προστάτη^[127].

ε. m-THPC

Η m-THPC ήταν ο πρώτος φωτοευαισθητοποιητής ο οποίος χρησιμοποιήθηκε σε επίσημη κλινική μελέτη της φωτοδυναμικής θεραπείας καρκίνου του προστάτη. Η κλινική αυτή μελέτη έγινε από τον Nathan και τους συνεργάτες του το 2002 σε ασθενείς οι οποίοι υποτροπίασαν μετά από ακτινοθεραπεία. Στους ασθενείς χορηγήθηκε ενδοφλέβια η m-THPC, 0.15 mg/kg, και η ακτινοβολία ακολούθησε 3-5 ημέρες αργότερα. Το φως καθοδηγήθηκε στην καρκινική περιοχή με τη βοήθεια απεικόνισης MRI, σύμφωνα με τη μεθοδολογία εισαγωγής καθετήρων κατά τη βραχυθεραπεία. Οι πρώτοι 5 ασθενείς έλαβαν χαμηλή δόση ενέργειας (20J/cm) και τα πρώτα σημάδια φθοράς του αγγειακού δικτύου φάνηκαν σε ακτινογραφίες μετά τη θεραπεία. Τέσσερις από τους ασθενείς αυτούς έλαβαν και δεύτερη φωτοδυναμική με μεγαλύτερη δόση ενέργειας 3 μήνες αργότερα καθώς τα αποτελέσματα της βιοψίας ήταν θετικά για την ύπαρξη καρκίνου, ενώ χορηγήθηκε m-THPC σε καινούργιους εννέα ασθενείς και η ακτινοβολία έγινε με 50J/cm. Η απόκριση των ασθενών στη φωτοδυναμική έγινε με απεικονιστικές τεχνικές και με μέτρηση των επιπέδων του PSA. Τα επίπεδα του PSA μειώθηκαν έως και 67% ενώ απεικόνιση της περιοχής έδειξε σημάδια νέκρωσης. Αναφέρθηκαν παρενέργειες οι οποίες αφορούσαν ενοχλήσεις στην ούρηση, αντιμετωπίστηκαν ωστόσο με αντιβίωση και εξαφανίστηκαν 4 μήνες αργότερα^[128].

Η ίδια ερευνητική ομάδα το 2006 διενέργησε πιλοτική μελέτη θεραπείας του καρκίνου του προστάτη αποκλειστικά και μόνο με φωτοδυναμική. Έξι ασθενείς περιελήφθησαν στη μελέτη οι οποίοι έλαβαν συνολικά 10 φωτοδυναμικές θεραπείες. Ορισμένοι ασθενείς έλαβαν και δεύτερη θεραπεία επειδή επανεμφανίστηκε καρκινικός όγκος. Για την καθοδήγηση του φωτός χρησιμοποιήθηκαν οπτικές ίνες και με γυμνό άκρο και με κυλινδρικό διαχύτη. Μετά τη θεραπεία οι περιοχές της νέκρωσης καταγράφονταν μέσω MRI απεικόνισης ενώ αναφέρθηκαν ελάχιστες παρενέργειες. Το μειονέκτημα ωστόσο της m-THPC είναι η παραμένουσα φωτοευαισθησία για εβδομάδες μετά τη χορήγησή της.

Οι δυο αυτές μελέτες αναδεικνύουν την δυναμική της m-THPC για τη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου του προστάτη.

Τα πρώιμα αυτά αποτελέσματα δεν είναι αντιπροσωπευτικά της προόδου του έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, τόσο λόγω της ανάπτυξης των απεικονιστικών τεχνικών όσο και της βελτιστοποίησης της μεθοδολογίας τοποθέτησης των καθετήρων καθοδήγησης του φωτός.

Πίνακας 5.1. Κλινικές δοκιμές ενδοϊστικής φωτοδυναμικής για τη θεραπεία καρκίνου του προστάτη

Φωτοευαίσθη- τοποιητής λ (nm) συγκέντρωση	Δόση (mg/kg) και τρόπος χορήγησης	DLI	Δόση ενέργειας	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
HrD / Photofrin 638 nm Καρκινικός ιστός	1.50 / 2.50 ενδοφλέβια	48 / 72 h	15 J/cm ²	Η Photofrin λιγότερο ανομοιογενής από την HrD - «ευκολότερη» παρασκευή για εμπορικούς λόγους.	Μεγάλη δυσκολία αξιόπιστης παρασκευής της HrD Παρατεταμένη φωτοευαισθησία Μεγάλο DLI
mTHPC 652 nm Καρκινικός ιστός	0.15 ενδοφλέβια	3 – 5 ημέρες	20 και 50 J/cm	Υψηλή κβαντική απόδοση (χρειάζεται ελάχιστη ποσότητα για να προκληθεί φωτοδυναμική δράση)	Παρατεταμένη φωτοευαισθησία, έως 6 εβδομάδες Μεγάλο DLI
ALA 633 nm Καρκινικός ιστός	20.00 κατάποση	4 h	250 J/cm	Επιλεκτικότητα στον καρκινικό ιστό σε σχέση με τον υγιή Μικρό DLI	-
Motexafin lutetium 732 nm αγγειακό δίκτυο	0.5/1.00/2.00 ενδοφλέβια	3/ 6 / 24 h	25 – 150 J/cm ²	Μικρό DLI Δεν έχει αναφερθεί φωτοευαισθησία	-
WST09 (Padoporfin) 763 nm αγγειακό δίκτυο	0.1 – 2.00 ενδοφλέβια	10 min	έως 360 J/cm	Μικρό DLI Δεν έχει αναφερθεί φωτοευαισθησία	Επιδράσεις και εκτός προστάτη

Κεφάλαιο VI

Ανάπτυξη Διατάξεων & Πειραματικών Μοντέλων

6.1

Εισαγωγή

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μια θεραπεία η οποία παρουσιάζει συγκριτικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές αντικαρκινικές θεραπείες. Η εξαιρετική της επιλεκτικότητα την καθιστά ιδανική θεραπευτική μέθοδο συμπαγών καρκινικών όγκων. Η έρευνα στρέφεται στην εφαρμογή της φωτοδυναμικής ενδοϊστικά, για τη θεραπεία καρκινικών όγκων μέσα στα προσβληθέντα όργανα με τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρείται η λειτουργικότητα του οργάνου μετά τη θεραπεία και να ελαχιστοποιούνται οι παρενέργειες των συμβατικών θεραπειών. Η καθολική αποδοχή της φωτοδυναμικής θεραπείας και η συστηματική εφαρμογή της στην κλινική πράξη περιορίζεται από την παρατεταμένη φωτοευαισθησία, απόρροια της κατακράτησης των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή και από τους υγιείς ιστούς.

Ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη φωτοευαισθητοποιητών τρίτης γενιάς στοχεύει στη μεγιστοποίηση της συγκέντρωσης των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή αποκλειστικά και μόνο στα καρκινικά κύτταρα και ταυτόχρονα ελάχιστη δέσμευσή τους από τους υγιείς ιστούς. Οι φωτοευαισθητοποιητές τρίτης γενιάς είναι ιδιαίτερος σημαντικοί στην

περίπτωση της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας, όπου η χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή γίνεται μόνο ενδοφλέβια. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να εξασφαλιστεί συγκέντρωση μορίων του στον καρκινικό όγκο ικανή να προκαλέσει τελικά τη φωτοκαταστροφή του, παράλληλα ωστόσο θα πρέπει να αποτρέπει τη διατήρηση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή από τους υγιείς ιστούς.

Ο καρκίνος του προστάτη είναι μια νόσος η οποία προσβάλλει σχεδόν όλους τους άνδρες του δυτικού κόσμου σε όλο και μικρότερη ηλικία. Οι συμβατικές θεραπείες αν και αποτελεσματικές στον έλεγχο ή και στη θεραπεία της νόσου συνοδεύονται από παρενέργειες οι οποίες υποβιβάζουν δραματικά την ποιότητα ζωής των ασθενών και έχουν σοβαρότατες επιπτώσεις και στην ψυχική τους διάθεση. Η ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία πληροί τις προδιαγραφές να εφαρμοστεί για την αντιμετώπιση του καρκινικού όγκου μέσα στον προστατικό αδένα διατηρώντας ακέραιες τις παρακείμενες του όγκου δομές άρα και τη λειτουργικότητα του οργάνου. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται και η θεραπεία της νόσου και αποφεύγονται οι δυσάρεστες παρενέργειες.

Τελικός σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη μεθοδολογίας για εφαρμογή της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας στην περίπτωση καρκίνου του προστάτη. Προς την κατεύθυνση αυτή κατά το σχεδιασμό και ανάπτυξη της μεθοδολογίας ηγέρθησαν μια σειρά από ζητήματα – επιμέρους στόχοι τα οποία έπρεπε να επιλυθούν προκειμένου να θεμελιωθεί η ενδοϊστική φωτοδυναμική.

Η επιλογή του κατάλληλου φωτοευαισθητοποιητή ήταν το πρώτο από αυτά καθώς θα έπρεπε να είναι ένα μόριο με υψηλή κβαντική απόδοση ικανό σε μικρές δόσεις χορήγησης να προκαλεί φωτοκαταστροφή. Ο πλέον αποδοτικός φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς είναι η m-THPC με μέγιστο απορρόφησης στα 652 nm και υπερέχουσες φωτοδυναμικές ιδιότητες (υψηλή κβαντική απόδοση, μικρή δόση χορήγησης, μικρή δόση ενέργειας ενεργοποίησης) σε σχέση με τους υπόλοιπους φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς. Επομένως ήταν και ο φωτοευαισθητοποιητής που επιλέχθηκε. Ιδιαίτερος σημαντικό, για τη διατήρηση της ακεραιότητας και λειτουργικότητας των παρακείμενων του όγκου δομών μετά τη φωτοδυναμική, είναι ο φωτοευαισθητοποιητής να συγκεντρώνεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στον καρκινικό ιστό από ότι στον υγιή. Έτσι οδηγηθήκαμε στην επιλογή της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC. Ο εγκλεισμός σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα παρατείνει το χρόνο κυκλοφορίας των λιποσωμάτων στη συστηματική κυκλοφορία και αυξάνει τη συγκέντρωση των λιποσωμάτων άρα και του φωτοευαισθητοποιητή στον καρκινικό ιστό λόγω του φαινομένου της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης. Η επιλογή της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC θα συμβάλει και στην κατεύθυνση άρσης της

παραμένουσας φωτοευαισθησίας καθώς μικρότερη ποσότητα φωτοευαισθητοποιητή θα χρειάζεται για τη νέκρωση του καρκινικού ιστού.

Στα πλαίσια αυτά τέθηκε ο έλεγχος της ελεύθερης και της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC τόσο ως προς τα φωτοφυσικά τους χαρακτηριστικά όσο και ως προς τη φωτοδυναμική τους δράση. Η σύγκριση των δυο σκευασμάτων της m-THPC ως προς τα φωτοδυναμικά τους χαρακτηριστικά ήταν ο πρώτος, χρονικά, στόχος που τέθηκε και αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκε μοντέλο σε επίπεδο κυττάρου καρκίνου του προστάτη.

Η φωτοδυναμική θεραπεία δρα μέσω δυο φωτοχημικών αντιδράσεων, των αντιδράσεων τύπου I και τύπου II. Τελικά προϊόντα των αντιδράσεων αυτών είναι ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη τα οποία διαταράσσουν την ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία και εάν καταφέρουν να υπερισχύσουν των αντιοξειδωτικών μηχανισμών άμυνας ενεργοποιούν μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει διεθνώς, σε όλο το φάσμα των αντικαρκινικών θεραπειών οι οποίες δρουν μέσω οξειδωτικού στρες, η ευαισθητοποίηση του υπό θεραπεία βιολογικού συστήματος στο επαγόμενο από τη θεραπεία οξειδωτικό στρες με τελικό αποτέλεσμα την αποτελεσματικότερη δράση της εκάστοτε θεραπείας στον καρκινικό στόχο. Η ρήξη της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας μέσω καταστολής του μηχανισμού της γλουταθειόνης, του σημαντικότερου ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικού συστήματος, είναι μια τακτική που ακολουθείται στη λογική αυτή. Μια άλλη τακτική αφορά στη χορήγηση φυσικών μειγμάτων δευτερογενών μεταβολιτών (ισχυροτάτων φυσικών αντιοξειδωτικών) σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις με στόχο τη διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του υπό θεραπεία στόχου και τη μετατόπιση σε προ-οξειδωτική συμπεριφορά.

Έτσι λοιπόν αναζητήθηκαν, σχεδιάστηκαν και ερευνήθηκαν οι δυο μηχανισμοί διαταραχής της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική. Επιλέχθηκε ο εξειδικευμένος αναστολέας του ενζύμου το οποίο καταλύει το πρώτο στάδιο της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης L-βουτυλοθειονίνη-S,R-σουλφοξείμίνη, BSO, ο οποίος χρησιμοποιείται ήδη στην περίπτωση της χημειοθεραπείας. Η δράση του ωστόσο σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά, απουσιάζουν δε από τη βιβλιογραφία οι μελέτες της συνδυασμένης αυτής δράσης στην περίπτωση καρκίνου του προστάτη τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και σε μοντέλα πειραματοζώων. Παρουσιάζει συνεπώς ενδιαφέρον να μελετηθεί η συμπεριφορά της φωτοδυναμικής σε συνδυασμό με τον αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης σε μοντέλα καρκίνου του προστάτη.

Ο έτερος μηχανισμός απαιτούσε την προσεκτική επιλογή του φυσικού μείγματος δευτερογενών μεταβολιτών με πλούσιες αντιοξειδωτικές ιδιότητες το οποίο να

ενισχύσει τη φωτοδυναμική δράση. Παρελθούσες μελέτες στην κατεύθυνση αυτή είχαν αναδείξει φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχόμενου από το φλοιό του πεύκου *P.maritima* ως ιδιαιτέρως υποσχόμενο στη συνεργειακή προσέγγιση της φωτοδυναμικής. Στην κατεύθυνση αυτή αναζητήθηκε φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχόμενου από είδη πεύκων τα οποία φύονται σε ελληνικά εδάφη. Εκχυλίσματα δευτερογενών μεταβολιτών προερχομένων από συστατικά διαφόρων πεύκων ελέγχθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα σε μοντέλο δερματικών κυττάρων. Από τη μελέτη αυτή προέκυψε ως το πλέον ισχυρό αντιοξειδωτικό το φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχόμενο από εκχύλισμα φλοιού *P.halepensis*. Η συνέργεια του φυσικού αυτού μείγματος πολυφαινολών με τη φωτοδυναμική δράση ελέγχθηκε σε μοντέλο καρκίνου του προστάτη, έρευνα η οποία δεν έχει απαντηθεί στη βιβλιογραφία. Για την ακρίβεια έως τώρα έχει ελεγχθεί η συνέργεια της φωτοδυναμικής σε αντιοξειδωτικές ουσίες όπως η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) και το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C). Καθώς τα φυσικά μείγματα δευτερογενών μεταβολιτών είναι ισχυρότατα αντιοξειδωτικά παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η έρευνα στην κατεύθυνση αυτή. Τα χαρακτηριστικά εκείνα που καθορίζουν πόσο ισχυρό προ-οξειδωτικό είναι μια φαινολική ουσία καθορίζουν ταυτόχρονα και πόσο ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία είναι. Αυτό που μεταβάλλει τη δράση της είναι η συγκέντρωση στην οποία χορηγείται.

Για τις προκλινικές μελέτες ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας αναπτύχθηκε μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη. Στο μοντέλο αυτό ελέγχθηκε και η συνέργεια των παραγόντων που επιδρούν στην ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία με την ενδοϊστική φωτοδυναμική.

Την επιτυχία της φωτοδυναμικής δεν την εξασφαλίζει μόνο η επιλογή του καταλληλότερου φωτοευαισθητοποιητή. Το σύστημα ακτινοβολήσης είναι εξίσου σημαντικό καθώς θα πρέπει αφενός να μεταφέρει το φως διέγερσης στον καρκινικό όγκο αφετέρου να παρέχει επαρκή δόση ενέργειας για την ενεργοποίηση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή. Η μεταφορά του φωτός πρέπει να είναι προσεκτικά σχεδιασμένη ώστε το φως διέγερσης να καλύπτει όλη την έκταση του καρκινικού όγκου χωρίς να εκτείνεται εκτός των ορίων αυτού για να αποφευχθεί η φωτοδυναμική δράση σε παρακείμενους υγιείς ιστούς στους οποίους ενδεχομένως υπάρχουν μόρια φωτοευαισθητοποιητή. Η ακτινοβολήση επίσης θα πρέπει να παρέχει την κατάλληλη δόση ενέργειας για τη διέγερση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή και τη νέκρωση του καρκινικού όγκου. Βασική βέβαια προϋπόθεση είναι η πηγή φωτός να παρέχει φως μήκους κύματος ίδιου με το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή στην περιοχή του κόκκινου. Έτσι επιλέχθηκε εκείνη η πηγή φωτός και το σύστημα μεταφοράς ακτινοβολίας για να πληροί τις παραπάνω προϋποθέσεις και καθορίστηκαν οι παράμετροι δοσιμετρίας που εξασφαλίζουν

φωτοδυναμική δράση και θεραπεία τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και σε επίπεδο μοντέλου μυός καρκίνου του προστάτη.

Παράλληλος στόχος ο οποίος διέπε καθολικά τη μελέτη στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ήταν η άρση της παραμένουσας φωτοευαισθησίας, της σοβαρότερης παρενέργειας της φωτοδυναμικής. Η επιλογή της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC και η έρευνα αναφορικά με τη συνέργεια φωτοδυναμικής – παραγόντων αλλαγής ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας συνέκλιναν στη μελέτη τρόπων ελαχιστοποίησης της παραμένουσας φωτοευαισθησίας.

Η έρευνα διορθώθηκε από τις εξής επιμέρους μελέτες:

- ☞ Μελέτες φωτοφυσικών ιδιοτήτων δυο σκευασμάτων της m-THPC
- ☞ Μελέτες φωτοδυναμικής δράσης των δυο σκευασμάτων της m-THPC σε επίπεδο κυττάρου
- ☞ Μελέτες συνδυασμένης δράσης παραγόντων που μεταβάλλουν την ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία με τη φωτοδυναμική σε επίπεδο κυττάρου
- ☞ Μελέτες ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας σε μοντέλο μυός
- ☞ Μελέτες συνδυασμένης δράσης παραγόντων που μεταβάλλουν την ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία με την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία σε επίπεδο μοντέλου μυός.

Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν οι μεθοδολογίες και χρησιμοποιήθηκαν οι διατάξεις που περιγράφονται στη συνέχεια. Επιπλέον αναπτύσσεται και το σκεπτικό πίσω από κάθε μελέτη.

6.2

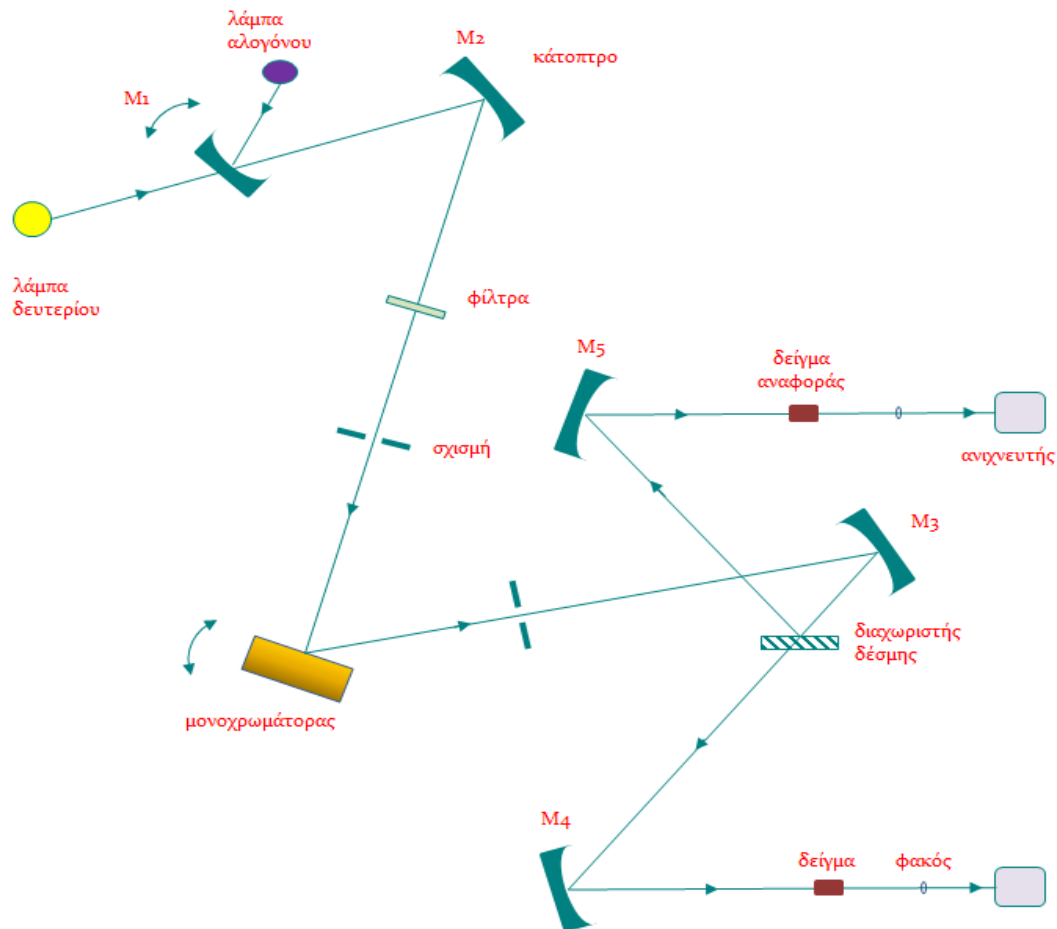
Διατάξεις

6.2.1

Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης

Για τη λήψη και καταγραφή των φασμάτων απορρόφησης διαλυμάτων φωτοευαισθητοποιητή τόσο στην ελεύθερη μορφή του όσο και στην εγκλεισμένη λιποσωματική μορφή χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης. Η διάταξη μέτρησης απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε επίσης και σε

φυσικοχημικές μεθόδους μέτρησης δεικτών της φωτοδυναμικής δράσης των δυο μορφών φωτοευαισθητοποιητή σε μοντέλο κυττάρων..



Σχήμα 6.1: Η πορεία της φωτεινής δέσμης και το οπτικό διάγραμμα φασματοφωτομετρικής διάταξης απορρόφησης

Περιγραφή διάταξης απορρόφησης

Το συγκεκριμένο όργανο, Lambda 35, UV/VIS Spectrometer, Perkin Elmer 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, Σχήμα 6.1, 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.

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 M₂ 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.

Διαχείριση σήματος

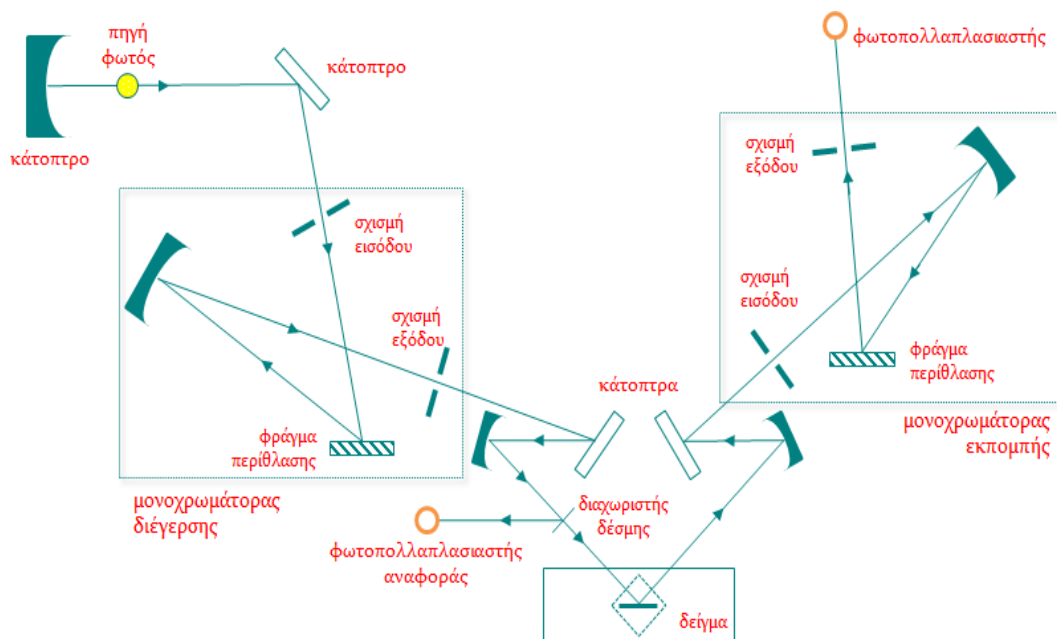
Ο έλεγχος του φασματοφωτόμετρου πραγματοποιείται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή, με την χρήση του λογισμικού πακέτου UV WinLab. Μέσω του λογισμικού αυτού, προσφέρεται η δυνατότητα ρύθμισης κάποιων παραμέτρων που επηρεάζουν τόσο τη μέθοδο φασματοφωτομετρίας όσο και το φασματοφωτόμετρο. Η απόκριση του φασματοφωτόμετρου σε αυτές τις αλλαγές είναι άμεση. Ορισμένες από τις παραμέτρους αυτές είναι η επιλογή μηκών κύματος, η ταχύτητα σάρωσης (εάν πρόκειται για μέθοδο σάρωσης) και το πλάτος της σχισμής του μονοχρωμάτορα.

Μία άλλη δυνατότητα που προσφέρει το λογισμικό αυτό είναι 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 είτε πρόκειται για μετρήσεις διέλευσης είτε για μετρήσεις απορρόφησης. Έτσι τα φάσματα ή 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.

Στο λογισμικό αυτό υπάρχουν επίσης και αρκετές άλλες εντολές που αναφέρονται στην εξομάλυνση (smoothing) και γενικά στην επεξεργασία των καμπυλών-φασμάτων που προκύπτουν. Τέλος, εφόσον έχουν καταχωρηθεί στα αρχεία του οργάνου οι διελεύσεις ή απορροφήσεις δειγμάτων αναφοράς, παρέχεται η δυνατότητα άμεσης εξαγωγής της συγκέντρωσης των διαφόρων ουσιών που υπάρχουν στα δείγματα μέσω καμπυλών συγκέντρωσης-διέλευσης ή απορρόφησης των δειγμάτων αναφοράς.

6.2.2

Φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού

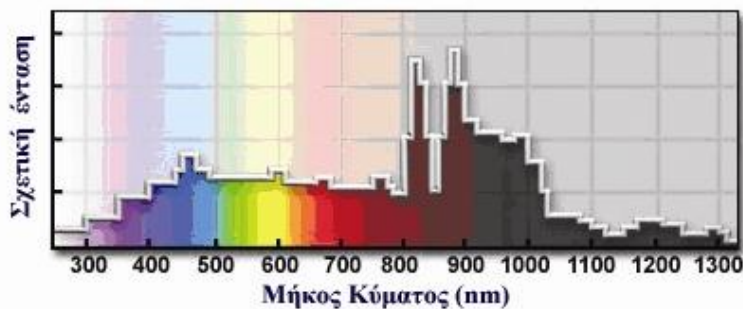


Σχήμα 6.2: Οπτικό διάγραμμα διέγερσης και συλλογής φθορισμού

Για τις φωτοφυσικές μελέτες προσδιορισμού της συμπεριφοράς των δυο μορφών του φωτοευαισθητοποιητή σε διαφορετικούς διαλύτες καθώς και για τον υπολογισμό της ενδοκυττάριας συγκέντρωσής τους σε μοντέλο κυττάρων χρησιμοποιήθηκε διάταξη φασματοσκοπίας φθορισμού. Η συγκεκριμένη διάταξη, LS 45 Luminescence Spectrometer, Perkin Elmer, μπορεί να ανιχνεύσει φθορισμό, φωσφορισμό, χημειο- ή βιο-φωταύγεια (chemi- ή bio-luminescence).

Η μέτρηση σημάτων φθορισμού από τη συγκεκριμένη διάταξη μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε για συνεχή σάρωση σε όλο το εύρος των μηκών κύματος του οργάνου (ή σε μέρος αυτής της περιοχής) είτε σε επιλεγμένα μήκη κύματος. Το οπτικό σύστημα της διάταξης (Σχήμα 6.2) αποτελείται από δύο μονοχρωμάτορες (διέγερσης και εκπομπής), μια σειρά από κάτοπτρα και δύο φωτοπολλαπλασιαστές (δείγματος και αναφοράς). Τα σήματα από τους δύο ανιχνευτές επεξεργάζονται από τα ηλεκτρονικά του οργάνου και μπορούν να παρατηρηθούν στην οθόνη ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Η πηγή φωτός διέγερσης είναι μια ειδική λυχνία αναλαμπής ξένου (Xenon flash tube), η οποία παράγει παλμούς μικρής χρονικής διάρκειας (μέση διάρκεια 8 μ s) και μεγάλης έντασης. Η ενεργειακή φασματική κατανομή της, φαίνεται στο Σχήμα 6.3.



Σχήμα 6.3: Ενεργειακή φασματική κατανομή πηγής ξένου.

Η ακτινοβολία από τη λυχνία ξένου, με τη βοήθεια κατόπτρων εστιάζεται στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα διέγερσης, ο οποίος περιλαμβάνει φράγμα 1440 γραμμών / mm και σφαιρικό κάτοπτρο για τη σωστή κάλυψη του φράγματος από τη φωτεινή δέσμη. Από τη σχισμή εξόδου εξέρχεται το μονοχρωματικό φως, σε συγκεκριμένη στενή φασματική περιοχή, με κεντρικό μήκος κύματος που καθορίζεται από τη γωνιακή θέση σάρωσης του φράγματος περίθλασης, που ελέγχεται από βηματικό κινητήρα (stepping motor). Η μονοχρωματική δέσμη διέγερσης προσπίπτει με τη βοήθεια κατόπτρων στο δείγμα (υπάρχει κατάλληλος υποδοχέας για κυψελίδα 10 mm) υπό γωνία 45°. Παράλληλα, μέσω ενός διαχωριστή δέσμης (beam splitter), ένα μικρό μέρος από τη δέσμη διέγερσης εστιάζεται στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς. Για τη διόρθωση της απόκρισης του φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς, χρησιμοποιείται καμπύλη αναφοράς ροδαμίνης Β, η οποία είναι αποθηκευμένη στο όργανο και διατηρεί σχεδόν σταθερή τη κβαντική απόδοση για απορρόφηση σε μήκη κύματος από 230 έως 630 nm και εκπομπή στα 650 nm.

Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το δείγμα, σε γωνία 90° ως προς τη δέσμη διέγερσης, εστιάζεται από κάτοπτρα στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής, ο οποίος περιλαμβάνει οπτικό φράγμα περίθλασης 1200 γραμμών / mm και σφαιρικό κάτοπτρο. Η στενή φασματική περιοχή που εξέρχεται από τη σχισμή εξόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής - η κίνηση του φράγματος του οποίου επίσης ελέγχεται από βηματικό κινητήρα - αναλύεται τελικά από φωτοπολλαπλασιαστή.

Οι μονοχρωμάτορες μπορούν να σαρώνουν ανεξάρτητα είτε συνδυαστικά και για εύρος πεδίου, το οποίο κυμαίνεται για μεν το μονοχρωμάτορα διέγερσης από 200 έως 800 nm, για δε το μονοχρωμάτορα εκπομπής από 200 έως 900 nm. Επίσης υπάρχει η δυνατότητα σύγχρονης σάρωσης, με σταθερή διαφορά μήκους κύματος διέγερσης και εκπομπής.

Η ταχύτητα σάρωσης του φράγματος περίθλασης, μπορεί να επιλεγεί από 10 έως 1500 nm/min, με βήμα 1 nm. Επιλογή μικρότερης τιμής για την ταχύτητα σάρωσης επιτρέπει την επίτευξη καλύτερου λόγου σήματος προς θόρυβο, αλλά σε

περιπτώσεις που το εξεταζόμενο δείγμα δεν είναι φωτοσταθερό, για να αποφευχθούν φαινόμενα φωτολεύκανσης (photobleaching) επιλέγεται μεγαλύτερη τιμή ταχύτητας σάρωσης.

Το εύρος της σχισμής αποτελεί σημαντική παράμετρο που καθορίζει τη διακριτική ικανότητα της διάταξης (στο συγκεκριμένο όργανο και οι δύο σχισμές έχουν εύρος 10 nm). Βελτίωση της διακριτικής ικανότητας επιτυγχάνεται με την ελάττωση του εύρους της σχισμής. Στην περίπτωση αυτή όμως παρουσιάζεται το μειονέκτημα μείωσης του φωτός που είτε διεγείρει το δείγμα είτε συλλέγεται για καταγραφή (υποδιπλασιασμός του εύρους της σχισμής συνεπάγεται μείωση του διερχόμενου φωτός κατά τέσσερις φορές).

Ως ανιχνευτές χρησιμοποιούνται φωτοπολλαπλασιαστές λόγω της ευαισθησίας και της γρήγορης απόκρισης τους. Η ευαισθησία του φασματοφωτόμετρου φθορισμού υπολογίζεται με βάση το λόγο σήματος προς θόρυβο, χρησιμοποιώντας τη ζώνη Raman του νερού για καθορισμένο μήκος κύματος διέγερσης. Έτσι για το συγκεκριμένο όργανο, είναι $500:1\text{ r.m.s}$, για διέγερση στα 350 nm , εκπομπή στα 397 nm και φασματικό εύρος διέγερσης και εκπομπής (που καθορίζεται από το εύρος των σχισμών στους μονοχρωμάτορες διέγερσης και εκπομπής) 10 nm .

Διαχείριση σήματος

Για κάθε κύκλο συλλογής των σημάτων φθορισμού πραγματοποιούνται τέσσερις ολοκληρώσεις: δύο για το σήμα από το φωτοπολλαπλασιαστή δείγματος και δύο για το σήμα από το φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς. Οι ολοκληρώσεις αυτές πραγματοποιούνται σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα ως προς την τελευταία αναλαμπή της λυχνίας ξένου. Οι δεύτερες ολοκληρώσεις πραγματοποιούνται στους δύο φωτοπολλαπλασιαστές για τη συλλογή του σήματος υποβάθρου (σήμα που παράγεται όταν δεν προσπίπτει φως στη φωτοκάθοδο του φωτοπολλαπλασιαστή, dark current), το οποίο και αφαιρείται από τα σήματα εξόδου των φωτοπολλαπλασιαστών. Τα σήματα που λαμβάνονται από τους φωτοπολλαπλασιαστές υποβάλλονται σε ενίσχυση και στη συνέχεια ψηφιοποιούνται.

Έπειτα σχηματίζεται ο λόγος του σήματος από το φωτοπολλαπλασιαστή δείγματος ως προς το αντίστοιχο αναφοράς, για τη βελτίωση του λόγου σήματος προς θόρυβο και για τη διόρθωση λόγω διακυμάνσεων στην εκπομπή της πηγής φωτισμού. Στη συνέχεια πολλαπλασιάζεται το σήμα με την καμπύλη διόρθωσης της ροδαμίνης που είναι αποθηκευμένη στο όργανο, για τη διόρθωση της φασματικής απόκρισης των φωτοπολλαπλασιαστών και την απόκριση διέλευσης του διαχωριστή δέσμης.

6.2.3

Φασματοφωτομετρική διάταξη πολλαπλών λειτουργιών

Για τη μέτρηση σημάτων απορρόφησης και φθορισμού από μικροποσότητες διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτομετρική διάταξη πολλαπλών λειτουργιών. Η διάταξη FLUOstar Galaxy διαθέτει κατάλληλη υποδοχή για πλακίδιο πολλαπλών θέσεων και μπορεί να ανιχνεύσει φθορισμό, απορρόφηση, φωταύγεια καθώς και να μετρήσει χρόνο ζωής φθορισμού. Διαθέτει ένα ευέλικτο οπτικό σύστημα το οποίο επιτρέπει αλλαγές στα οπτικά, ανάλογα με το είδος της μέτρησης. Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιεί λυχνία ξένου, καλύπτοντας ευρύ φάσμα μηκών κύματος. Έχει την ικανότητα να πραγματοποιεί μετρήσεις σε πλακίδια με έως και 384 κυψελίδες και για διαφορετικές γεωμετρίες των θέσεων.

Το όργανο διαθέτει ένα διαμέρισμα στο κάτω μέρος του οποίου έχει προσαρτηθεί η κεφαλή μέτρησης. Όταν τα κατάλληλα οπτικά προσαρτηθούν στην κεφαλή τότε οπτικές ίνες εξέρχονται από την κεφαλή και προσεγγίζουν το πλακίδιο πολλαπλών κυψελίδων για τη μέτρηση των δειγμάτων. Η κεφαλή είναι ακίνητη, το πλακίδιο κινείται με τη βοήθεια βηματικού κινητήρα ο οποίος έχει ρυθμιστεί από το λογισμικό που συνοδεύει τη διάταξη με τέτοιο τρόπο ώστε μια κυψελίδα κάθε φορά να βρίσκεται στις οπτικές ίνες μέτρησης.



Σχήμα 6.4: Φασματοφωτομετρική διάταξη πολλαπλών λειτουργιών για πλακίδιο πολλαπλών κυψελίδων. Απλοποιημένη γραφική αναπαράσταση

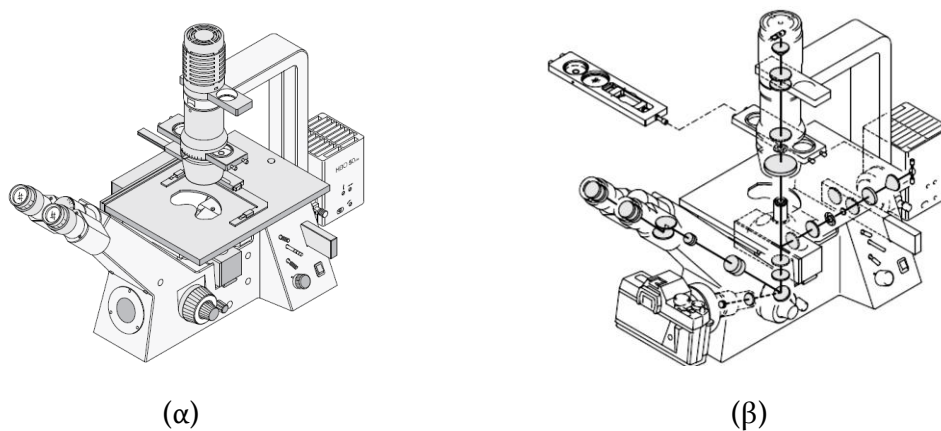
Το φως από τη λυχνία ξένου οδηγείται σε έναν περιστρεφόμενο κυκλικό δίσκο στον οποίο έχουν προσαρτηθεί οπτικά φίλτρα τα οποία απομονώνουν την περιοχή μηκών κύματος διέγερσης. Στην έξοδο του φίλτρου το φως διέγερσης συλλέγεται και καθοδηγείται μέσω οπτικής ίνας στο δείγμα στην κυψελίδα του πλακιδίου. Εάν

πρόκειται περί μέτρησης απορρόφησης το φως εξόδου από το δείγμα συλλέγεται από οπτικά τα οποία βρίσκονται κάτω από το πλακίδιο, ανιχνεύεται και αποδίδεται η απορρόφηση του δείγματος από το λογισμικό. Εάν πρόκειται περί μέτρησης φθορισμού το φως εκπομπής συλλέγεται από δεύτερη οπτική ίνα, καθοδηγείται σε δεύτερο περιστρεφόμενο κυκλικό δίσκο στον οποίο έχουν προσαρτηθεί οπτικά φίλτρα εκπομπής και αφού ανιχνευθεί και ενισχυθεί μέσω ενός φωτοπολλαπλασιαστή το λογισμικό που συνοδεύει το όργανο αποδίδει την ένταση φθορισμού σε αυθαίρετες μονάδες.

6.2.4

Σύστημα Απεικονιστικής Μικροσκοπίας

Για την παρατήρηση των κυττάρων στο μοντέλο καρκίνου του προστάτη σε επίπεδο κυττάρου χρησιμοποιήθηκε το ανάστροφο μικροσκόπιο φωτισμού διέλευσης Axiovert 25 Inverted transmitted light Microscope με HAL 6 V 25 W illumination της ZEISS με πηγή φωτισμού λαμπτήρα αλογόνου, το οποίο έχει φακούς μεγεθύνσεως 5x, 10x και 40x και εικονίζεται παρακάτω.



Σχήμα 6.5: Το ανάστροφο μικροσκόπιο Axiovert 25 (α) και το οπτικό διάγραμμα (β)

Για τη λήψη εικόνων από τα κύτταρα προσαρτήθηκε στο μικροσκόπιο με ειδικό σύστημα φακών-στερέωσης φωτογραφική μηχανή (Canon PowerShot GS).

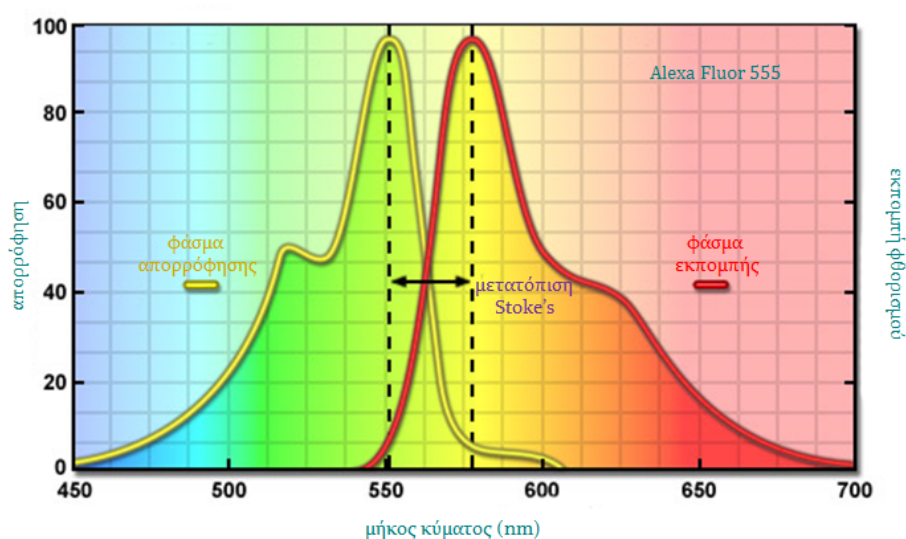
Το συγκεκριμένο μικροσκόπιο έχει τις προδιαγραφές και για μικροσκοπία φθορισμού, καθώς διαθέτει λυχνία και κατάλληλα οπτικά φίλτρα για τέτοιου είδους παρατήρηση. Στα πλαίσια ωστόσο της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε μόνο για οπτική παρατήρηση.

6.2.5

Σύστημα Μικροσκοπίας Φθορισμού

Η μικροσκοπία φθορισμού αποτελεί πλέον βασικό εργαλείο σε όλο το φάσμα των βιοϊατρικών επιστημών, αλλά και στις επιστήμες της τεχνολογίας των υλικών, καθώς παρέχει δυνατότητες που δεν απαντώνται στη συμβατική οπτική μικροσκοπία. Κατά τη συμβατική οπτική μικροσκοπία η παρατήρηση του δείγματος γίνεται μέσω των ιδιοτήτων της απορρόφησης και της διάθλασης του φωτός ενώ περιορίζεται μόνο σε μορφολογικά - δομικά συστατικά, ούσα φύσει στατική. Η μικροσκοπία φθορισμού επεκτείνει τις δυνατότητες μικροσκοπικής παρατήρησης και καταγραφής σε δυναμικές λειτουργίες πέρα από την παρατήρηση μικροσκοπικών δομών.

Η χρήση χρωμοφόρων φθορισμού αλλά και ιχνηθετών φθορισμού καθιστά εφικτή την απεικόνιση κυττάρων, υποκυττάρων δομών, αλλά και μεταβολικών κυτταρικών λειτουργιών με μεγάλη ακρίβεια και εξειδίκευση. Ο όρος «χρωμοφόρο» αναφέρεται στα μόρια εκείνα που έχουν εγγενώς την ικανότητα φθορισμού εάν διεγερθούν με φως κατάλληλου μήκους κύματος, ενώ ο όρος «ιχνηθέτης» αναφέρεται στα μόρια εκείνα τα οποία αποκτούν την ικανότητα φθορισμού μόνο εφόσον ενωθούν με τον κατάλληλο στόχο. Με την ταυτόχρονη χρήση διαφορετικών χρωμοφόρων ή ιχνηθετών φθορισμού είναι δυνατό να απεικονιστούν στον ίδιο χρόνο διαφορετικές δομές. Επιπλέον μπορούν να καταγραφούν και δυναμικές μεταβολικές λειτουργίες είτε ως μέρος του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού είτε ως απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα, όπως για παράδειγμα αλληλεπιδράσεις μεταξύ βιομορίων, αλλά και αλλαγές στο pH, στο ιξώδες, στη συγκέντρωση ιόντων ή στο δυναμικό της μεμβράνης σε ζωντανά κύτταρα ή ιστό.



Σχήμα 6.6: Το φάσμα απορρόφησης και το φάσμα εκπομπής της φθορίζουσας ουσίας Alexa Fluor 555 και η περιοχή επικάλυψής τους.

Τα φθορίζοντα μόρια μπορούν να απορροφούν φως μόνο σε μια περιορισμένη περιοχή μηκών κύματος, χαρακτηριστική για το κάθε μόριο. Οι ιδιότητες εκείνες που διακρίνουν ένα φθορίζον μόριο ως καλύτερο σε σχέση με κάποιο άλλο είναι ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης ϵ , η κβαντική απόδοση Φ , και ο χρόνος ζωής φθορισμού τ . Κάθε χρωμοφόρο ή ιχνηθέτης φθορισμού έχει το αντίστοιχο χαρακτηριστικό φάσμα διέγερσης και εκπομπής το οποίο καθορίζεται από τη χημική δομή του αλλά και από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται (Σχήμα 6.6).

Η κβαντική απόδοση φθορισμού είναι μια σταθερά, χαρακτηριστική για κάθε φθορίζουσα ουσία και ορίζεται ως το ποσοστό των φωτονίων που εκπέμπονται ως προς το ποσοστό των φωτονίων που απορροφώνται. Το χρονικό διάστημα κατά το οποίο το φθορίζον μόριο αφού διεγερθεί παραμένει στην διεγερμένη στάθμη προτού επιστρέψει στη βασική στάθμη εκπέμποντας φωτόνιο ονομάζεται χρόνος ζωής φθορισμού. Η εκτεταμένη χρήση της μικροσκοπίας φθορισμού οφείλεται στην εξέλιξη φυσικών και στη σύνθεση καινούργιων ιχνηθετών φθορισμού οι οποίοι παρουσιάζουν μεγάλη κβαντική απόδοση και εξειδίκευση

6.2.5.1

Αρχή λειτουργίας

Βασική λειτουργία του μικροσκοπίου φθορισμού είναι να φωτίζει το υπό εξέταση δείγμα με φως συγκεκριμένων φασματικών χαρακτηριστικών και στη συνέχεια να διαχωρίζει τον εξαιρετικά ασθενέστερο εκπεμπόμενο φθορισμό από το φως διέγερσης. Σε ένα σωστά κατασκευασμένο μικροσκόπιο φθορισμού, στους προσοφθάλμιους ή στον αισθητήρα της κάμερας θα πρέπει να φτάνει μόνο το φως εκπομπής φθορισμού από το δείγμα και η ακτινοβολία διέγερσης να αποκόπτεται πλήρως. Η προκύπτουσα εικόνα φθορισμού συνίσταται από φθορίζουσες δομές υπερτιθέμενες σε ένα σκοτεινό ή μαύρο (ιδανικά) υπόβαθρο ώστε να εξασφαλιστεί μεγάλη αντίθεση (contrast). Ως αντίθεση ορίζεται ο λόγος του εκπεμπόμενου φθορισμού, από τις επισημασμένες με τον ιχνηθέτη φθορισμού δομές, προς το φως το οποίο παρατηρείται στο υπόβαθρο. Καθώς το φως διέγερσης έχει μεγαλύτερη ένταση, κατά αρκετές τάξεις μεγέθους, από τον εκπεμπόμενο φθορισμό, είναι αναγκαίο να εξασφαλίζεται ότι θα επιτρέπεται η διέλευση μόνο στο φως εκπομπής, ώστε η αντίθεση των συλλεγόμενων εικόνων φθορισμού να είναι μέγιστη.

Ο ιχνηθέτης διεγείρεται με φως κατάλληλου μήκους κύματος, όσον το δυνατό πιο κοντά στο μέγιστο απορρόφησής του. Διέγερση του ιχνηθέτη φθορισμού με φως διαφορετικού μήκους κύματος μπορεί να προκαλέσει ασθενή φθορισμό ή ανεπιθύμητο αυτοφθορισμό του δείγματος μειώνοντας την αντίθεση της εικόνας.

Για τον καλύτερο διαχωρισμό του εκπεμπόμενου φωτός από το φως διέγερσης χρησιμοποιούνται οπτικά φίλτρα στενού εύρους τα οποία επιτρέπουν τη διέλευση ενός μικρού ποσοστού φωτός. Η χρήση των φίλτρων έχει ως αποτέλεσμα μια εικόνα με σκοτεινό υπόβαθρο (ακριβώς επειδή έχει ελαχιστοποιηθεί η διέλευση φωτός) αλλά με καλή αντίθεση.

Συνήθως σε μια φθορίζουσα ουσία παρατηρείται επικάλυψη της περιοχής των υψηλότερων μηκών κύματος του φάσματος διέγερσής της με την περιοχή χαμηλότερων μηκών κύματος του φάσματος εκπομπής της. Η περιοχή αυτή είναι απαραίτητο να ελαχιστοποιηθεί καθώς το φως διέγερσης, το οποίο έχει σαφώς μεγαλύτερη ένταση από το φως εκπομπής, θα υπερκαλύψει τον συγκριτικά ασθενή φθορισμό μειώνοντας την αντίθεση στην εικόνα. Η ελαχιστοποίηση επιτυγχάνεται με τη χρήση κατάλληλων φίλτρων διέγερσης, διχρωικών κατόπτρων και φίλτρων εκπομπής.

Ένα σύστημα μικροσκοπίας φθορισμού περιλαμβάνει το σύστημα φωτισμού με την πηγή διέγερσης, κατάλληλα οπτικά για τη διέγερση αλλά και τη συλλογή του εκπεμπόμενου φθορισμού, φίλτρα για το εκπεμπόμενο φως αλλά και ανιχνευτή αυτού.

6.2.5.2

Τύποι φωτισμού

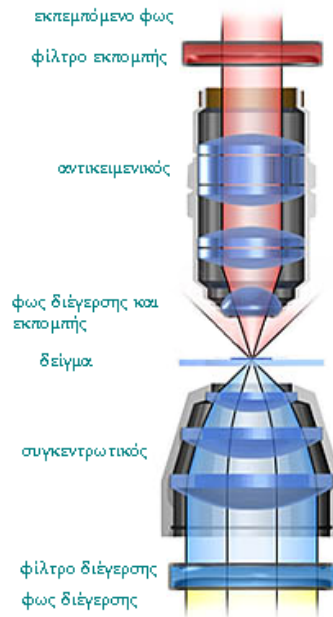
Στη μικροσκοπία φθορισμού απαντώνται τρεις τρόποι φωτισμού:

Φωτισμός διέλευσης πλήρους πεδίου (transmitted light illumination full aperture)

Κατά τη μικροσκοπία φθορισμού με φωτισμό διέλευσης πλήρους πεδίου η οπτική διάταξη είναι παρόμοια με αυτή ενός συμβατικού οπτικού μικροσκοπίου φωτεινού πεδίου, με την προσθήκη φίλτρων διέγερσης μεταξύ της πηγής φωτός και του συγκεντρωτικού φακού, και την προσθήκη φίλτρων εκπομπής ανάμεσα στον αντικειμενικό φακό και το σύστημα παρατήρησης – καταγραφής (Σχήμα 6.7).

Τα φίλτρα διέγερσης είναι φίλτρα ευρείας ζώνης τα οποία επιλέγονται ώστε να επιτρέπουν τη διέλευση μηκών κύματος φωτός κοντά στο μέγιστο απορρόφησης του ιχνηθέτη φθορισμού ενώ εμποδίζουν τη διέλευση μεγαλύτερων μηκών κύματος. Τα φίλτρα εκπομπής επιλέγονται ώστε να αποκόπτουν τη διέλευση του φωτός διέγερσης επιτρέποντας τη διέλευση του φωτός εκπομπής.

Στο σύστημα φωτισμού διέλευσης πλήρους πεδίου χρησιμοποιούνται δύο φακοί. Ένας συγκεντρωτικός για να συγκεντρώσει, να εστιάσει το φως διέγερσης στο δείγμα και ένας αντικειμενικός για να συλλέγει τον εκπεμπόμενο φθορισμό. Οι φακοί θα πρέπει να είναι ευθυγραμμισμένοι για την καλύτερη δυνατή παρατήρηση, αλλά πρακτικά δεν είναι απόλυτα εφικτό.



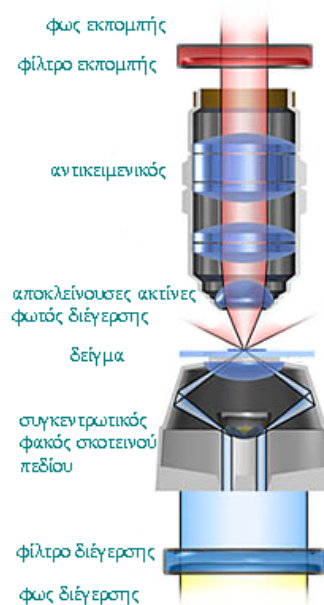
Σχήμα 6.7: Οπτικό διάγραμμα μικροσκοπίου φθορισμού με φωτισμό διέλευσης πλήρους πεδίου. Η διάταξη υλοποιείται τροποποιώντας ένα συμβατικό μικροσκόπιο οπτικού πεδίου με την προσθήκη ενός φίλτρου διέγερσης και ενός φίλτρου αποκοπής. Με την έντονη γραμμή απεικονίζεται το φως διέγερσης ενώ με τη λεπτή ο εκπεμπόμενος φθορισμός^[131].

Επιπλέον, στους περισσότερους ιχνηθέτες φθορισμού τα φάσματα εκπομπής και διέλευσης όχι μόνο επικαλύπτονται αλλά και τα αντίστοιχα μέγιστα βρίσκονται αρκετά κοντά. Φίλτρα εύρους ζώνης (bandpass) με απότομα όρια αποκοπής θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να αποκόψουν το ισχυρότερο φως διέγερσης από τον ασθενέστερο φθορισμό, αλλά πρακτικά είναι πολύ δύσκολο. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκαν άλλες τεχνικές για να εμποδίσουν το φως διέγερσης να εισέλθει στον αντικειμενικό^[130].

Φωτισμός διέλευσης σκοτεινού πεδίου (darkfield illumination)

Στα μικροσκόπια φθορισμού με φωτισμό διέλευσης σκοτεινού πεδίου ο διαχωρισμός του φωτός διέγερσης από τον εκπεμπόμενο φθορισμό γίνεται με τη χρήση διατάξεων φωτισμού σκοτεινού πεδίου. Ένας συγκεντρωτικός φακός σκοτεινού πεδίου παράγει έναν δακτυλιοειδή κώνο φωτός το αριθμητικό άνοιγμα του οποίου είναι μεγαλύτερο από το αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού. Με τον τρόπο αυτό ασκέδατο φως από τη δέση φωτισμού δεν εισέρχεται στον αντικειμενικό φακό. Η αντίθεση της εικόνας με τον φωτισμό αυτό είναι πολύ καλύτερη σε σχέση με το φωτισμό διέλευσης πλήρους πεδίου (Σχήμα 6.8).

Η ικανότητα ωστόσο συλλογής του εκπεμπόμενου φθορισμού από τον αντικειμενικό μειώνεται σημαντικά, με συνέπεια ασθενή σήματα φθορισμού να είναι δύσκολο να ανιχνευθούν. Το αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού θα πρέπει να είναι μικρότερο από το αριθμητικό άνοιγμα του συγκεντρωτικού φακού σκοτεινού πεδίου συστήματος φθορισμού ενώ η ικανότητα του αντικειμενικού να συλλέγει το φως εκπομπής από το δείγμα εξαρτάται από το τετράγωνο του αριθμητικού ανοίγματος του αντικειμενικού φακού. Για το λόγο αυτό είναι δύσκολη η ανίχνευση δειγμάτων με ασθενή εκπομπή φθορισμού.

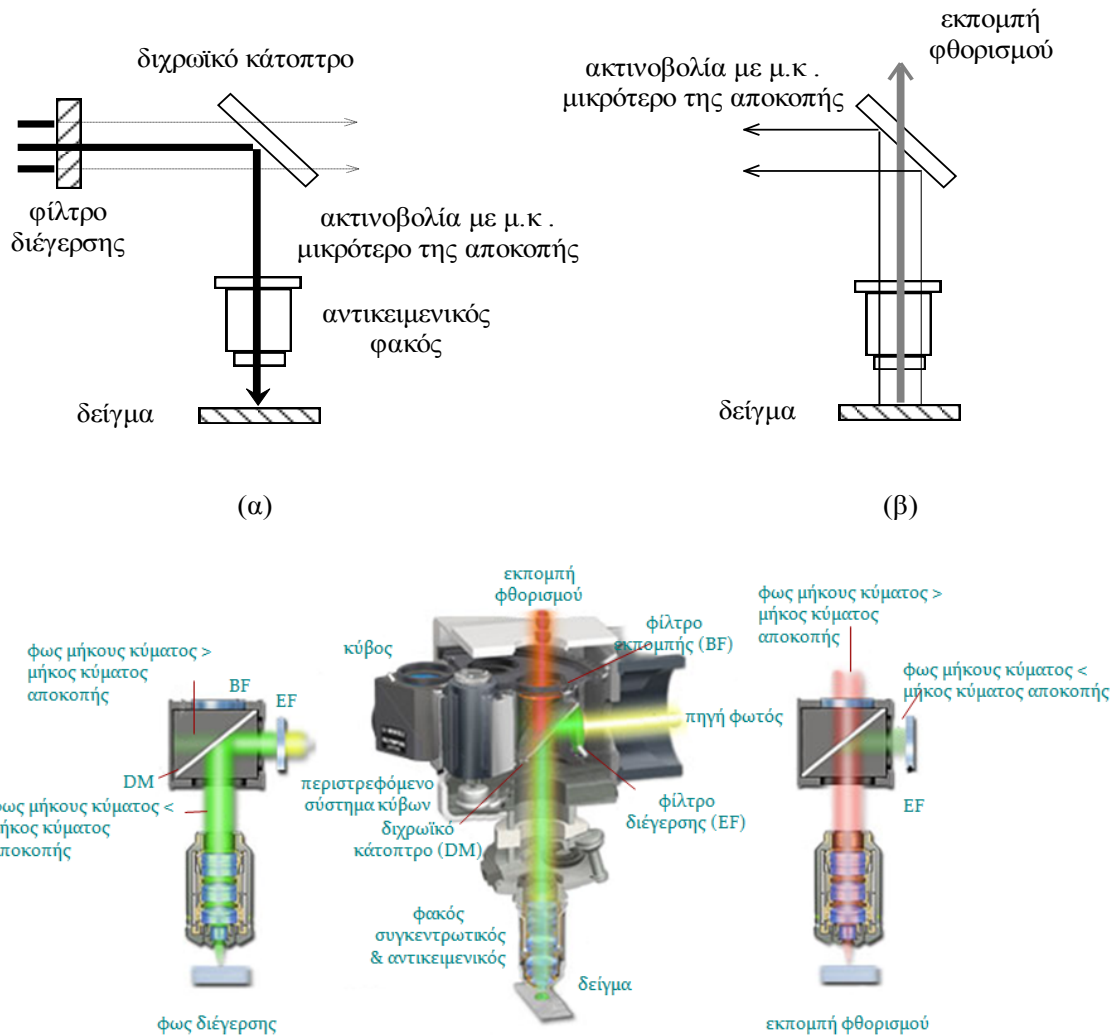


Σχήμα 6.8: Οπτικό διάγραμμα μικροσκοπίου φθορισμού με φωτισμό διέλευσης σκοτεινού πεδίου. Το αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού είναι τέτοιο που δεν συλλέγει φως διέγερσης, παρά μόνο τον εκπεμπόμενο φθορισμό^[131].

Και στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται δυο φακοί. Ένας συγκεντρωτικός για να εστιάζει το φως διέγερσης στο δείγμα και ένας αντικειμενικός για να συλλέγει τον εκπεμπόμενο φθορισμό. Η διάταξη αυτή ωστόσο δεν χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στη μικροσκοπία φθορισμού βιολογικών δειγμάτων^[130].

Προσπίπτων φωτισμός (incident illumination ή epiillumination)

Στην μικροσκοπία φθορισμού με προσπίπτοντα φωτισμό η εστίαση του φωτός διέγερσης στο δείγμα πραγματοποιείται διαμέσου του αντικειμενικού φακού του μικροσκοπίου ο οποίος επακόλουθα συλλέγει και τον εκπεμπόμενο φθορισμό του δείγματος. Ο αντικειμενικός φακός του μικροσκοπίου δηλαδή δρα ταυτόχρονα και ως συγκεντρωτικός.



Σχήμα 6.9: Οπτικό διάγραμμα μικροσκοπίου φθορισμού με προσπίπτοντα φωτισμό. (α) διέγερση του δείγματος. Ο αντικειμενικός δρα ως συγκεντρωτικό. (β) συλλογή εκπεμπόμενου φθορισμού. Ο φακός δρα ως αντικειμενικός. Το εκπεμπόμενο φως έχει μήκος κύματος μεγαλύτερο από το κατώφλι του διχρωϊκού έτσι μπορεί και διέρχεται διαμέσου αυτού^[131].

Η διάταξη αυτή εξασφαλίζει τη σωστή ευθυγράμμιση του μικροσκοπίου καθώς η εστίαση του αντικειμενικού στο δείγμα είναι ίδια τόσο για τη διέγερση όσο και για την παρατήρηση του φθορισμού. Επιπλέον το πεδίο του δείγματος το οποίο ακτινοβολείται είναι το ίδιο με το παρατηρούμενο πεδίο.

Το φως οδηγείται στο δείγμα μέσω διχρωϊκού κατόπτρου, ενός κατόπτρου με ειδική επίστρωση που ανακλά μήκη κύματος μικρότερα από μια τιμή κατωφλίου ενώ επιτρέπει τη διέλευση σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από την τιμή κατωφλίου. Το διχρωϊκό κάτοπτρο τοποθετείται σε γωνία 45° ως προς τον οπτικό δρόμο, πάνω από τον αντικειμενικό φακό (Σχήμα 6.9). Η διάταξη αυτή προκαλεί ανάκλαση του φωτός διέγερσης προς το δείγμα ενώ τα μεγαλύτερα μήκη κύματος εκπομπής διέρχονται μέσω

του κατόπτρου με κατεύθυνση προς τους προσοφθάλμιους φακούς του μικροσκοπίου ή τον ανιχνευτή. Το διχρωϊκό κάτοπτρο συνδυάζεται με φίλτρα συμβολής για τη διέγερση και την εκπομπή παρέχοντας έτσι πολύ καλή αντίθεση ακόμα και για δείγματα με ασθενή φθορισμό.

Η τεχνική αυτή συνδυάζεται και με συμβατικές τεχνικές οπτικής παρατήρησης, όπως είναι η αντίθεση φάσης, για να συνδυάζεται η πληροφορία φθορισμού με τη μορφολογική πληροφορία. Λόγω των συγκριτικών πλεονεκτημάτων της, η τεχνική προσπίπτοντος φωτισμού είναι η κυρίαρχη διάταξη φωτισμού στη μικροσκοπία φθορισμού^[130, 131].

6.2.5.3

Πηγές φωτός

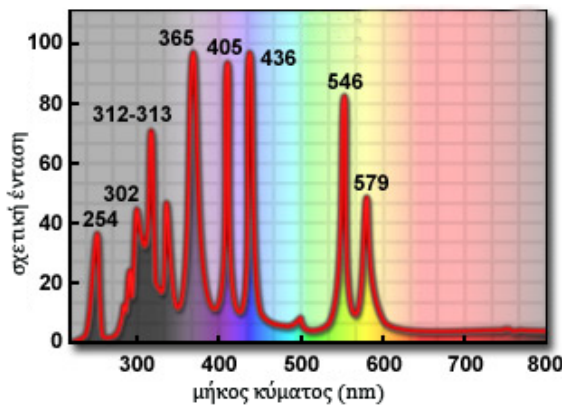
Στη μικροσκοπία φθορισμού τα βασικά χαρακτηριστικά επιλογής πηγής φωτός είναι η φασματική κατανομή της σε σχέση με την κβαντική απόδοση και την απορρόφηση των χρωμοφόρων φθορισμού που μελετώνται. Επιπροσθέτως, η πηγή θα πρέπει να είναι συμβατή με την ευαισθησία του αισθητήρα του συστήματος παρατήρησης και καταγραφής εικόνων, είτε πρόκειται περί του ανθρώπινου οφθαλμού είτε αφορά ψηφιακή κάμερα. Στη μικροσκοπία φθορισμού αρκούν λυχνίες τόξου ή φωτοδίοδοι εκπομπής (LEDs), ενώ στη συνεστιακή και στην πολυφωτονική μικροσκοπία απαιτείται laser πως πηγή φωτός για τη διέγερση του χρωμοφόρου.

Τα περισσότερα χρωμοφόρα απορροφούν ισχυρά σε μήκη κύματος της περιοχής του υπεριώδους, του μπλε και του πράσινου γεγονός που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην επιλογή της πηγής φωτός. Τα βασικά χαρακτηριστικά τα οποία μια πηγή λευκού φωτός πρέπει να διαθέτει για να χρησιμοποιηθεί στη μικροσκοπία φθορισμού είναι ομοιομορφία του παραγόμενου φωτισμού στο πεδίο του μικροσκοπίου καθώς και χρονική και χωρική σταθερότητα. Ο φωτισμός δηλαδή του δείγματος πρέπει να διατηρείται σταθερός με την πάροδο του χρόνου και στο χώρο σε όλη την έκταση του παρατηρούμενου πεδίου.

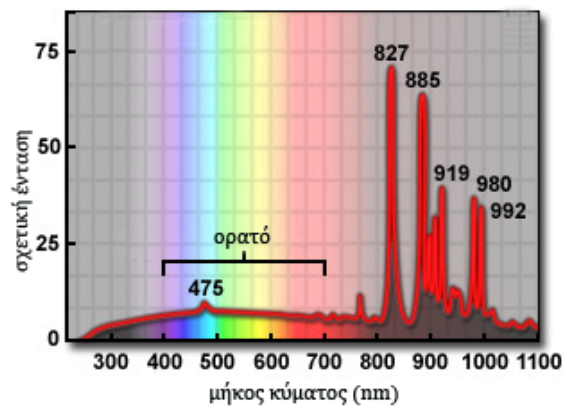
Οι κυριότερες πηγές λευκού φωτός που χρησιμοποιούνται είναι λυχνίες αλογόνου, βολφραμίου, υδραργύρου και ξένου. Οι υδραργύρου και ξένου είναι οι πλέον διαδεδομένες. Πλέον οι φωτοδίοδοι εκπομπής φωτός LEDs αναδύονται εναλλακτικές πηγές αντί των λυχνιών, με μεγάλη αξιοπιστία και σταθερότητα.

Η ποικιλομορφία των εφαρμογών μικροσκοπίας φθορισμού συχνά απαιτεί διαφορετικές πηγές φωτός ώστε να καλυφθούν οι ανάγκες των χρωμοφόρων φθορισμού που χρησιμοποιούνται. Υπάρχουν περιπτώσεις που απαιτείται ασθενής ακτινοβολία ενώ σε άλλες εφαρμογές χρειάζεται ισχυρή ακτινοβολία για να

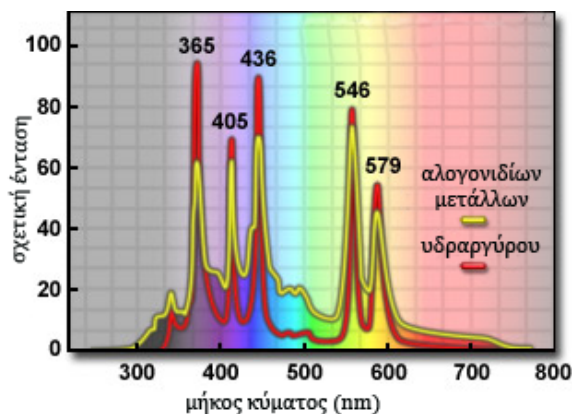
προκαλέσει κυτταρικό θάνατο ή για να προκαλέσει εντοπισμένα και ελεγχόμενα φωτολεύκανση ενός χρωμοφόρου.



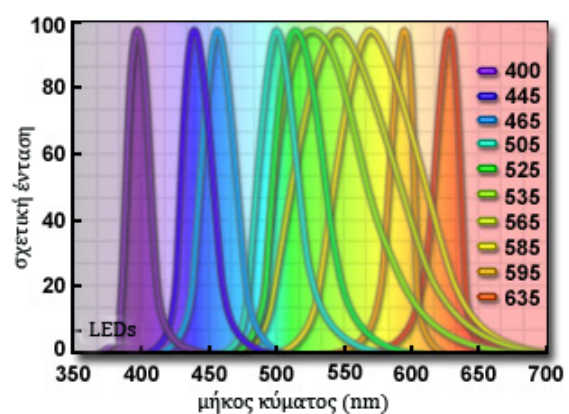
(α) λυχνία υδραργύρου



(β) λυχνία ξένου



(γ) λυχνία μεταλογονιδίων



(δ) LEDs

Σχήμα 6.10: Διαγράμματα σχετικών εντάσεων εξόδου (α) λυχνίας υδραργύρου (β) λυχνίας ξένου (γ) λυχνίας υδραργύρου (δ) διαφόρων LEDs^[131].

Επιπλέον υπάρχει συχνά η απαίτηση για μήκη κύματος διέγερσης που εκτείνονται σε όλο το ορατό φάσμα και επεκτείνονται τόσο στην υπεριώδη όσο και στην υπέρυθη περιοχή. Καθώς δεν υπάρχει κάποια πηγή φωτός που καλύπτει αυτές τις πολλαπλές απαιτήσεις οι κατασκευαστές πλέον έχουν προβλέψει ειδικούς προσαρμογείς για εξασφαλίζεται η εναλλαγή πηγών φωτός καλύπτοντας όλες τις πειραματικές απαιτήσεις.

6.2.5.4

Οπτικά φίλτρα

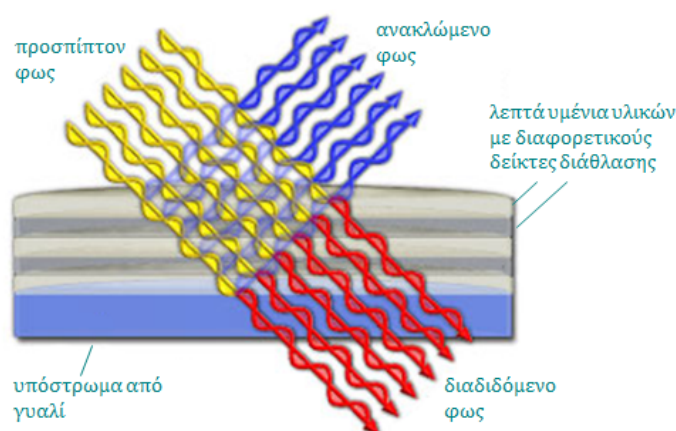
Κλειδί στη μικροσκοπία φθορισμού είναι η ενσωμάτωση κατάλληλων οπτικών φίλτρων τα οποία διαχωρίζουν το έντονο φως διέγερσης από τον αρκετά ασθενέστερο

εκπεμπόμενο φθορισμό από τα χρωμοφόρα. Για τον επιτυχή διαχωρισμό επιλέγονται κατάλληλα οπτικά φίλτρα τα οποία παρεμβάλλονται στον οπτικό δρόμο τόσο του φωτός διέγερσης όσο και του εκπεμπόμενου φωτός και επιτρέπουν ή εμποδίζουν τη διέλευση συγκεκριμένων μηκών κύματος. Η επιλογή των φίλτρων εξαρτάται από τα φασματικά χαρακτηριστικά της πηγής φωτός διέγερσης και από τα φασματικά χαρακτηριστικά του χρωμοφόρου φθορισμού, την κβαντική του απόδοση και την απόσταση Stokes, την απόσταση δηλαδή ανάμεσα στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης και στο μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής.

Οι κυριότεροι τύπου φίλτρων οι οποίοι χρησιμοποιούνται είναι τα ουδέτερα φίλτρα (neutral density, ND), τα φίλτρα από χρωματιστό γυαλί (colored glass filter) και τα φίλτρα παρεμβολής (interference filter), φίλτρα με επίστρωση από ειδικό μείγμα υλικών. Ειδική κατηγορία των φίλτρων παρεμβολής αποτελούν τα διχρωμικά κάτοπτρα (dichroic mirror).

Τα ουδέτερα φίλτρα μειώνουν την ένταση του προσπίπτοντος φωτός επιτρέποντας ωστόσο τη διέλευση όλων των μηκών κύματος ή συγκεκριμένης περιοχής μηκών κύματος χωρίς να αλλοιώνουν το φασματικό προφίλ του φωτός της πηγής διέγερσης. Χρησιμοποιούνται για να μειώσουν την ένταση του φωτός διέγερσης ώστε να αποτρέπεται η ταχύτατη φωτοκαταστροφή του χρωμοφόρου φθορισμού.

Τα φίλτρα από χρωματιστό γυαλί είναι επιστρωμένα με οξειδία διαφόρων μετάλλων επιτρέποντας τη διάδοση φωτός μιας στενής περιοχής μηκών κύματος γύρω από ένα κεντρικό μήκος. Στο κεντρικό μήκος κύματος η διάδοση του φωτός είναι μέγιστη ενώ εξασθενεί στα πλευρικά μήκη. Τα φίλτρα αυτά καθώς επιτρέπουν τη διέλευση εύρους μηκών κύματος είναι γνωστά και ως φίλτρα ευρείας ζώνης (broad band filters).



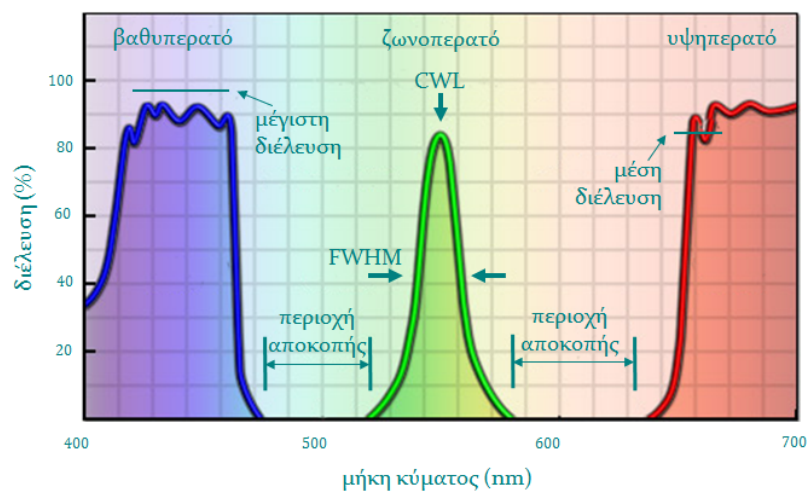
Σχήμα 6.11: Ανάκλαση και διέλευση φωτός από ένα φίλτρο παρεμβολής^[131].

Τα φίλτρα παρεμβολής κατασκευάζονται από διαδοχικά στρώματα λεπτών φιλμ με διαφορετικούς δείκτες διάθλασης τα οποία τοποθετούνται πάνω σε γυάλινη επίπεδη επιφάνεια. Επιτρέπουν τη διάδοση φωτός μιας στενής περιοχής μηκών κύματος η οποία προκύπτει από τα διαδοχικά περάσματα του φωτός από τα διάφορα φιλμ. Το φως το οποίο δεν διαδίδεται μέσα από ένα φίλτρο παρεμβολής ανακλάται. Ειδική κατηγορία φίλτρων παρεμβολής είναι το διχρωϊκό κάτοπτρο.

Γενικά τα φίλτρα διακρίνονται ανάλογα με τη λειτουργία τους και τα χαρακτηριστικά απορρόφησης ή διέλευσης φωτός. Δυο είναι οι κύριες κατηγορίες φίλτρων για τη διέλευση συγκεκριμένων μηκών κύματος. Τα ζωνοπερατά φίλτρα (bandpass filters) τα οποία επιτρέπουν τη διέλευση μιας περιοχής μηκών κύματος εμποδίζοντας τη διέλευση μικρότερων και μεγαλύτερων μηκών κύματος. Χαρακτηρίζονται από την απόδοσή τους στο κεντρικό μήκος κύματος και από το εύρος ζώνης ή αλλιώς τη μέση φασματική απόσταση στο μισό του μεγίστου (full width at half maximum transmission, FWHM). Επιπλέον υπάρχουν και τα φίλτρα με απότομα όρια αποκοπής, υπερπερατά και βαθυπερατά φίλτρα τα οποία κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το μήκος κύματος αποκοπής ή διέλευσης στο 50% του μεγίστου διάδοσης.

Στη μικροσκοπία φθορισμού ανάλογα με τη λειτουργία τους διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: φίλτρα διέγερσης, φίλτρα εκπομπής και διχρωϊκά κάτοπτρα. Τα φίλτρα διέγερσης και εκπομπής καθώς και το διχρωϊκό κάτοπτρο ενσωματώνονται σε έναν μηχανικό κύβο ο οποίος παρεμβάλλεται στον οπτικό δρόμο πάνω από τον αντικειμενικό.

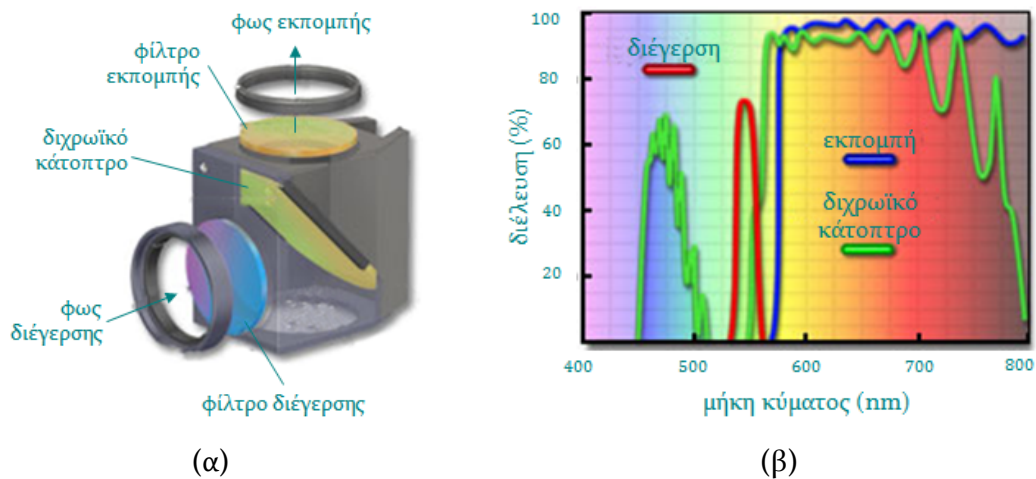
Τα φίλτρα διέγερσης χρησιμοποιούνται για να απομονώσουν και να επιτρέψουν τη διέλευση σε εκείνη την περιοχή μηκών κύματος του φωτός διέγερσης η οποία αντιστοιχεί στο μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης του χρωμοφόρου. Επιπλέον θα πρέπει να αποκόπτουν την περιοχή μηκών κύματος του φωτός διέγερσης η οποία συμπίπτει με την περιοχή των μηκών κύματος του φωτός εκπομπής από το χρωμοφόρο.



Σχήμα 6.12: Τυπικά φίλτρα μικροσκοπίας φθορισμού^[131].

Τα φίλτρα εκπομπής (ή αποκοπής) χρησιμοποιούνται για να αποκόψουν το ανεπιθύμητο φως διέγερσης από την περιοχή του εκπεμπόμενου φθορισμού. Συνήθως χρησιμοποιούνται φίλτρα τα οποία επιτρέπουν τη διάδοση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος εμποδίζοντας (ιδανικά απαγορεύοντας) τη διέλευση χαμηλότερων μηκών κύματος.

Τα διχρωϊκά κάτοπτρα τοποθετούνται υπό γωνία 45° τόσο ως προς τον οπτικό δρόμο του φωτός διέγερσης όσο και ως προς τον εκπεμπόμενο φθορισμό. Ανακλούν μήκη κύματος φωτός διέγερσης μικρότερα από ένα μήκος κύματος κατωφλίου υπό γωνία 90° κατευθύνοντάς τα στο δείγμα ενώ επιτρέπουν τη διέλευση του φωτός εκπομπής.



Σχήμα 6.13: (α) κύβος φίλτρων σε μικροσκόπιο φθορισμού και το αντίστοιχο φάσμα διέγερσης και εκπομπής (β)^[131].

Συνήθως στα συστήματα μικροσκοπίας φθορισμού υπάρχει ένας περιστρεφόμενος δίσκος στον οποίο ενσωματώνονται περισσότεροι του ενός κύβοι ώστε να μπορούν να απεικονίζονται διάφορα χρωμοφόρα.

6.2.5.5

Αντικειμενικοί φακοί

Η φωτεινότητα μιας εικόνας φθορισμού όπως αυτή ανιχνεύεται από ένα σύστημα μικροσκοπίας φθορισμού εξαρτάται από τον αντικειμενικό φακό του συστήματος, καθώς αυτός συλλέγει τον εκπεμπόμενο από το δείγμα φθορισμό. Το αριθμητικό άνοιγμα, NA , ενός φακού ορίζεται από τη σχέση: $NA = n \cdot \sin \theta$, όπου n ο δείκτης διάθλασης του υλικού που παρεμβάλλεται ανάμεσα στον αντικειμενικό και στο δείγμα

και 2θ η γωνία του κώνου των ακτίνων που εξέρχονται από το δείγμα και εισέρχονται στον αντικειμενικό.

Στη μικροσκοπία φθορισμού προσπίπτοντος φωτισμού, όπου ο αντικειμενικός λειτουργεί και ως συγκεντρωτικός, η φωτεινότητα της εικόνας (η ένταση φθορισμού στην εικόνα) μεταβάλλεται ανάλογα με την τέταρτη δύναμη του αριθμητικού ανοίγματος του αντικειμενικού φακού και αντιστρόφως ανάλογα από το τετράγωνο της μεγέθυνσης:

$$\text{φωτεινότητα εικόνας} \propto \frac{(NA \text{ αντικειμενικού})^4}{\text{μεγέθυνση}^2}$$

Συνεπώς αντικειμενικοί φακοί με μεγαλύτερο αριθμητικό άνοιγμα συλλέγουν εικόνες φθορισμού μεγαλύτερης φωτεινότητας σε σχέση με φακούς ίδιας μεγέθυνσης αλλά μικρότερου αριθμητικού ανοίγματος.

Σημαντικό επίσης στοιχείο είναι και η διακριτική ικανότητα του αντικειμενικού φακού, η δυνατότητα δηλαδή να διαχωρίσει δυο γειτονικές σημειακές πηγές ως ξεχωριστές. Θεωρώντας ανεξάρτητο το φως από δυο γειτονικές σημειακές πηγές ισχύει το κριτήριο Raleigh's για τη διακριτική ικανότητα:

$$d = \frac{0.61 \lambda}{NA}$$

Η σχέση αυτή ισχύει μόνο για την εγκάρσια διακριτική ικανότητα, επίπεδο xy . Η αξονική διακριτική ικανότητα, άξονας z , περιγράφεται από το βάθος πεδίου. Το βάθος πεδίου για ένα οπτικό σύστημα ορίζεται ως η απόσταση κατά μήκος του άξονα z μέσα στο δείγμα που είναι εστιασμένο στο επίπεδο του ειδώλου. Εξαρτάται από το δείκτη διάθλασης του μέσου, n , το αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού NA , και το μήκος κύματος του φωτός διέγερσης: $D = \frac{\lambda}{4n \sin^2(\theta/2)}$

6.2.5.6

Ανάπτυξη μεθοδολογίας για την καταγραφή του οξειδωτικού στρες μέσω μικροσκοπίας φθορισμού.

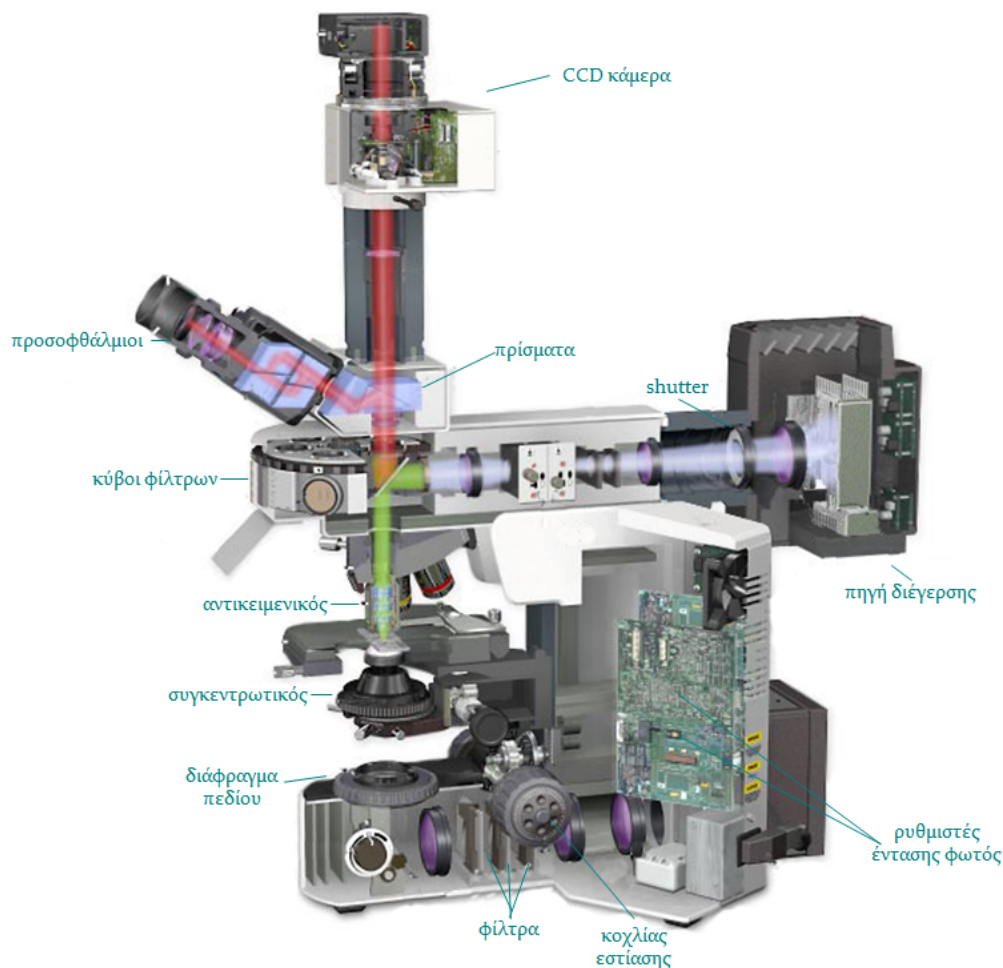
Για τις πειραματικές μελέτες καταγραφής και ποσοτικοποίησης του επαγομένου από τη φωτοδυναμική δράση (και όχι μόνο) οξειδωτικού στρες σε επίπεδο κυττάρου είναι απαραίτητο αυτά να διατηρούνται ζωντανά σε όλη τη διάρκεια της μέτρησης, καθώς η διαδικασία είναι δυναμική. Επιπλέον θα πρέπει και οι συνθήκες του περιβάλλοντος για είναι σταθερές ώστε να μην υπερτίθεται και άλλο στρες πέραν αυτού που θέλουμε να μελετηθεί. Για τις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα μικροσκοπίας φθορισμού με φωτισμό διέλευσης στο οποίο προσαρτήθηκε μικροθαλαμίσκος διατήρησης ζωναντών κυττάρων. Για την μελέτη επιλέχθηκε ο

εξειδικευμένος ιχνηθέτης φθορισμού dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA).

6.2.5.6α

Χαρακτηριστικά μικροσκοπίου φθορισμού

Στις πειραματικές μελέτες χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο φθορισμού Olympus BX-50 με προσπίπτοντα φωτισμό. Το διάγραμμα του μικροσκοπίου και οι οπτικοί δρόμοι παρουσιάζονται στο παρακάτω Σχήμα 6.14 (στην πραγματικότητα στο σχήμα απεικονίζεται το αμέσως επόμενο μοντέλο Olympus BX-51, οι οπτικοί δρόμοι δε διαφέρουν).



Σχήμα 6.14: Olympus BX-51

Για τη διέγερση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε λυχνία υδραργύρου 100 W και κατάλληλα οπτικά φίλτρα. Το σύστημα είναι εξοπλισμένο με τα σετ κύβων που παραθέτονται στον παρακάτω Πίνακα 6.1:

Για τη συλλογή των εικόνων φθορισμού χρησιμοποιήθηκε ένας 40x UPlanFl (NA=0.75) αντικειμενικός φακός, με διορθώσεις για σφαιρικές και χρωματικές εκτροπές.

Πίνακας 6.1: Στοιχεία κύβων του μικροσκοπίου φθορισμού Olympus BX-50

Κωδικός Κύβου	Φίλτρο διέγερσης (ζωνοδιαβατό) (nm)	Διχρωϊκό κάτοπτρο (nm)	Φίλτρο εκπομπής (υψιπερατό) (nm)
U-MWU	330-385	400	420
U-MWBV	400-440	455	475
U-MNB	470-490	500	515
U-MWG	510-550	570	590

Η συλλογή των εικόνων έγινε από μια έγχρωμη CCD κάμερα (KP-C571, Hitachi) κατάλληλα προσαρμοσμένης στην άκρη του σωλήνα φωτογραφικής καταγραφής του μικροσκοπίου. Μέσω μετακινούμενου πρίσματος μπορούσε να γίνει αποκλειστική ή ταυτόχρονη με τους προσοφθάλμιους φακούς παρατήρηση. Για την ψηφιοποίηση των συλλεγόμενων εικόνων φθορισμού χρησιμοποιήθηκε ένας έγχρωμος PCI ψηφιοποιητής πεδίων (frame grabber) (Matrox Meteor, Matrox Electronics Systems Ltd.). Ο έλεγχος της λήψης και μεταφοράς εικόνων έγινε με τη χρήση του προγράμματος Analysis getIT.

6.2.5.6.β

Θαλαμίσκος μικροσκοπικής παρατήρησης ζωντανών κυττάρων.

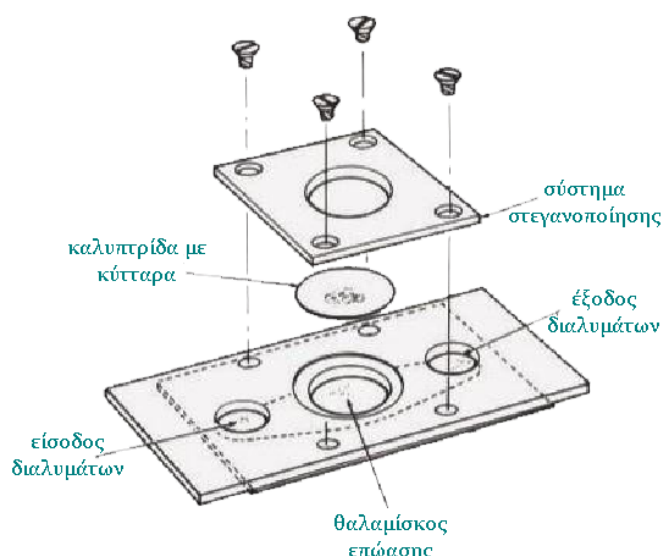
Η μικροσκοπία επιτρέπει την παρατήρηση και ζωντανών κυττάρων. Ειδικά δε η μικροσκοπία φθορισμού επιτρέπει την παρατήρηση και καταγραφή της απόκρισης ζωντανών κυττάρων σε διάφορα ερεθίσματα και ως προς τον χρόνο (χωρική και χρονική πληροφορία δηλαδή). Για να διατηρούνται ζωντανά τα κύτταρα κατά τη διάρκεια της παρατήρησης θα πρέπει να εξασφαλίζονται οι κατάλληλες συνθήκες pH, θερμοκρασίας, οξυγόνου, CO_2 . Τα ανάστροφα μικροσκόπια επιτρέπουν την παρατήρηση ζωντανών κυττάρων καθώς αυτά αναπτύσσονται στον πυθμένα ειδικών δοχείων επώασης (φλάσκες, τριβλία, κτλ.) και υπάρχει ο χώρος ώστε οι αντικειμενικοί φακοί να προσεγγίσουν σε πολύ μικρή απόσταση το δείγμα και συλλέξουν τον εκπεμπόμενο φθορισμό.

Στην περίπτωση ωστόσο που χρησιμοποιείται μικροσκόπιο με φωτισμό διέλευσης, όπως και το μικροσκόπιο της παρούσας διάταξης, ο αντικειμενικός φακός θα πρέπει να προσεγγίσει σε εξαιρετικά μικρή απόσταση το δείγμα ώστε να εστιάσει σε αυτό. Για να είναι δυνατή η παρατήρηση των κυττάρων στην περίπτωση αυτή υπάρχει η ανάγκη ανάπτυξης ειδικού θαλαμίσκου μικροσκοπικής παρατήρησης ο οποίος θα διατηρεί

σταθερές τις απαραίτητες συνθήκες για να είναι τα κύτταρα ζωντανά. Στην περίπτωση αυτή τα κύτταρα επωάζονται σε συνήθη δοχεία επώασης πάνω σε ειδικές καλυπτρίδες και μεταφέρονται στον θαλαμίσκο για την πειραματική μελέτη (πρόκληση ερεθίσματος και καταγραφή της απόκρισης).

Οι θαλαμίσκοι μικροσκοπικής παρατήρησης πρέπει να καλύπτουν ένα φάσμα προδιαγραφών και εφαρμογών. Πρέπει να είναι ένα τελείως κλειστό σύστημα το οποίο περιέχει το δείγμα πάνω στην καλυπτρίδα εξασφαλίζοντας ταυτόχρονα τον απαραίτητο χώρο ώστε μπαίνει θρεπτικό μέσο ή ρυθμιστικό διάλυμα για να διατηρούνται τα κύτταρα ζωντανά. Οι θαλαμίσκοι θα πρέπει να ασφαλίζουν πλήρως το δείγμα ώστε να αποφεύγεται η διαρροή των υγρών και να έχουν το κατάλληλο σύστημα ροής ώστε να επιτρέπεται η προσθήκη και η αφαίρεση υγρών (διαλυμάτων, ιχνηθετών κτλ). Τα υλικά κατασκευής τους θα πρέπει να είναι αδρανή και η κατασκευή τους τέτοια που να επιτρέπει πολλαπλή και εύκολη χρήση. Επιπλέον, εάν πρόκειται για παρατηρήσεις που διαρκούν μεγάλο χρονικό διάστημα τότε θα πρέπει να ενσωματώνονται σε συστήματα τα οποία διατηρούν τη θερμοκρασία σταθερή, όπως επίσης σταθερό pH στο μέσο μέσα στον θαλαμίσκο και σταθερό CO_2 ^[132, 133].

Εμπορικά υπάρχουν διαθέσιμα εξεζητημένα πολύπλοκα συστήματα παρατήρησης ζωντανών κυττάρων. Στην περίπτωση ωστόσο των μελετών της παρούσας διατριβής, όπου ενδιέφερε το οξειδωτικό στρες αμέσως μετά την πρόκληση του ερεθίσματος, η διατήρηση των κυττάρων ζωντανών για μεγάλο χρονικό διάστημα δεν ήταν απαραίτητη. Έτσι χρησιμοποιήθηκε ένας θαλαμίσκος παρατήρησης ο οποίος είχε αναπτυχθεί στα πλαίσια παλαιότερης διατριβής (Σχήμα 6.15).



Σχήμα 6.15: Θαλαμίσκος μικροσκοπικής παρατήρησης ζωντανών κυττάρων

Οι διαστάσεις του θαλαμίσκου είναι $25 \times 75 \times 1.5 \text{ mm}$ και είναι κατασκευασμένος από εποξικό υλικό. Στο κέντρο του υπάρχει μια οπή διαμέτρου 13 mm . Στο κάτω μέρος του πλακιδίου, στο σημείο της οπής, έχει επικολληθεί καλυπτρίδα ώστε αφενός να εξασφαλιστεί η στεγανοποίηση του θαλαμίσκου αφετέρου να επιτρέπεται η διέλευση του φωτός του μικροσκοπίου. Στο επάνω μέρος της οπής τοποθετείται η καλυπτρίδα στον οποία προσφύονται τα κύτταρα. Πάνω από την καλυπτρίδα τοποθετείται το πλαίσιο στεγανοποίησης της διάταξης ώστε να ασφαρίζεται ο θαλαμίσκος από τις διαρροές.

Στις πειραματικές μας συνθήκες, δεν χρειάστηκε περαιτέρω μέριμνα για σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας ή του pH καθώς η παρατήρηση και η καταγραφή της απόκρισης των κυττάρων ολοκληρωνόταν σε μικρό χρονικό διάστημα. Η θερμοκρασία διατηρείτο σταθερή με τη χρήση της κλιματιστικής μονάδας του χώρου. Πειράματα ελέγχου της επίδρασης των συνθηκών του περιβάλλοντος χώρου στη βιωσιμότητα και στη μορφολογία των κυττάρων είχαν πραγματοποιηθεί προγενέστερα, όπου και διαπιστώθηκε ότι στο χρονικό διάστημα ολοκλήρωσης των μελετών οι συνθήκες του περιβάλλοντος δεν επηρεάζουν τα κύτταρα.

6.2.5.6.γ

Ιχνηθέτες φθορισμού.

Από τους πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενους και εξειδικευμένους ιχνηθέτες οξειδωτικού στρες είναι ο ιχνηθέτης 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA). Στις πειραματικές μας μελέτες χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης φθορισμού η 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester ($\text{CM-H}_2\text{DCFDA}$) ένα παράγωγο χλωρομεθυλίου της H_2DCFDA .

6.2.6

Σύστημα Συνεστιακής Μικροσκοπίας Σάρωσης με Laser

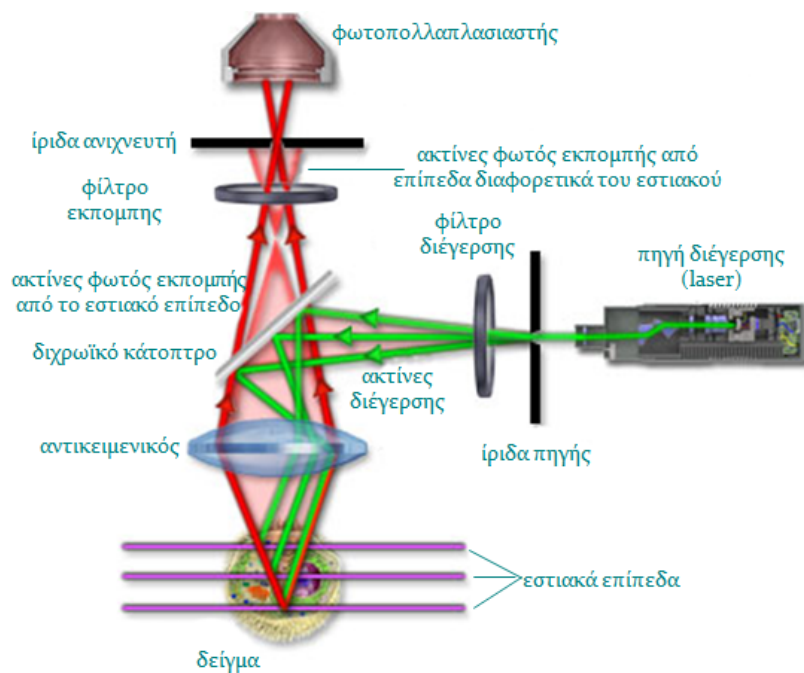
Εξέλιξη της μικροσκοπίας φθορισμού αποτελεί η συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM). Μία από τις σημαντικές εφαρμογές της Συνεστιακής Μικροσκοπίας Σάρωσης στις βιοϊατρικές επιστήμες αφορά απεικόνιση ζωντανών ή στερεωμένων ιστών, οι οποίοι έχουν επισημανθεί με έναν ή περισσότερους ιχνηθέτες. Η συνεστιακή μικροσκοπία αξιοποιεί ένα ζεύγος ιριδών ώστε να περιορίσει το εστιακό επίπεδο σε ένα πολύ μικρό όγκο της τάξης του $1 \mu\text{m}$.

Βασικό πλεονέκτημα της μικροσκοπίας σάρωσης είναι η διέγερση φθορισμού κάθε φορά από ένα απειροστό όγκο του δείγματος, με τη χρήση laser. Με την ακτινοβολήση

«ενός σημείου» κάθε φορά, η ένταση της ακτινοβολήσης μειώνεται απότομα, πάνω και κάτω από το επίπεδο εστίασης, καθώς η δέσμη του φωτός συγκλίνει ή αποκλίνει. Με αυτό τον τρόπο μειώνεται η διέγερση του φθορισμού των «αντικειμένων» που βρίσκονται εκτός του εξεταζόμενου εστιακού επιπέδου, έως το πολύ το όριο το οποίο ορίζεται από την περίθλαση και επομένως η διακριτική ικανότητα του συνεστιακού μικροσκοπίου είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή του συμβατικού μικροσκοπίου.

Ο εκπεμπόμενος φθορισμός περνά πίσω μέσω του διχρωμικού κατόπτρου και στη συνέχεια μέσω μιας οπής η οποία βρίσκεται σε συζευγμένο εστιακό επίπεδο με το δείγμα. Οποιοδήποτε φως το οποίο προέρχεται από σημείο που δεν ανήκει στο εστιακό επίπεδο εμποδίζεται από την οπή προσφέροντας έτσι επιπλέον εξασθένηση της συνεισφοράς του μη εστιασμένου φωτός (οπτικός θόρυβος). Τελικά το φως το οποίο περνά από την οπή ανιχνεύεται από έναν φωτοανιχνευτή.

Υπάρχει η δυνατότητα για ανίχνευση φθορισμού που προέρχεται από δύο διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης με τη χρήση κατάλληλου διχρωμικού κατόπτρου το οποίο να τα διαχωρίζει και να τα οδηγεί σε δύο διαφορετικούς φωτοπολλαπλασιαστές (Σχήμα 6.16).



Σχήμα 6.16: Βασική αρχή συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με laser

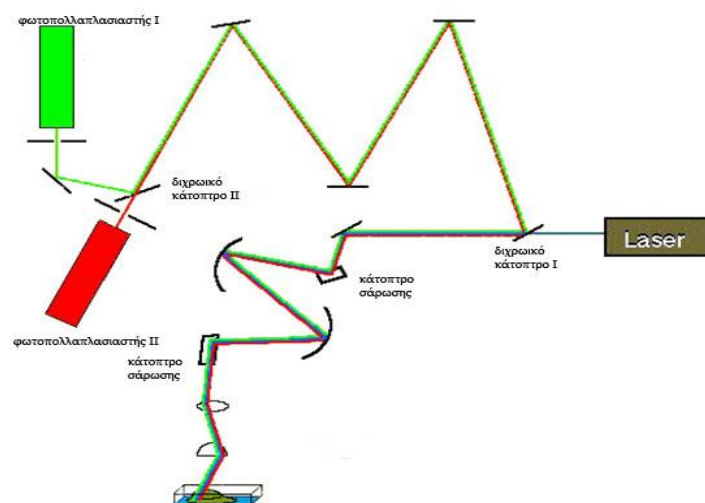
Σε ένα σύστημα συνεστιακής σάρωσης σημείου η εικόνα του αντικειμένου δεν παράγεται κατευθείαν. Η απεικόνιση μιας περιοχής στο δείγμα και όχι ενός μόνο σημείου πραγματοποιείται με τη σάρωση του δείγματος και τη συλλογή του φωτός από όλα τα σημεία του οπτικού πεδίου. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε μετακινώντας το

δείγμα και διατηρώντας σταθερή την ακτίνα του laser (stage scanning), είτε μετακινώντας τη δέσμη του laser κατά μήκος του δείγματος (beam scanning) με τη βοήθεια γαλβανομετρικών κατόπτρων.

Το εστιακό επίπεδο επιλέγεται μέσω ενός κινητήρα υψηλής ακρίβειας, ελεγχόμενο από υπολογιστή, μετακινώντας την αντικειμενοφόρο πλάκα. Κατά αυτόν τον τρόπο, λαμβάνεται μια ακολουθία από διδιάστατες εικόνες σε διαφορετικό βάθος στο δείγμα, οι οποίες δίνουν μια τρισδιάστατη απεικόνιση του αντικειμένου. Οι εικόνες τριών διαστάσεων οι οποίες συλλέγονται με τη μορφή z-σειρών, ονομάζονται «οπτικές τομές», σε αντιδιαστολή με τις τομές δείγματος που γίνονται με χρήση μικροτόμου. Σημαντικό στοιχείο είναι ο μικροκινητήρας, ο οποίος επιτρέπει την ακριβή γνώση του βάθους μέσα στο δείγμα στο οποίο βρίσκεται το απεικονιζόμενο επίπεδο. Ο μικροκινητήρας ελέγχει τα διαστήματα ανάμεσα στα διαδοχικά επίπεδα και ο υπολογιστής είναι υπεύθυνος για την καταγραφή τους.

Κατά κάποιο τρόπο η συνεστιακή μικροσκοπία λειτουργεί σαν τομογραφική τεχνική, σε επίπεδο κυττάρου, με δυνατότητες και αποθήκευσης των εικόνων. Έτσι είναι δυνατή η περαιτέρω επεξεργασία της εικόνας και ο εντοπισμός μικρών αλλαγών στα χαρακτηριστικά πολυμεταβλητών στατιστικών κατανομών σε πληθυσμούς κυττάρων.

Οι δύο σημαντικοί περιοριστικοί παράγοντες αυτής της μεθόδου: Η φωτοκαταστροφή του δείγματος, όπου το δείγμα υπόκειται σε αλλοιώσεις, τόσο στη σύσταση όσο και στα οπτικά χαρακτηριστικά του, λόγω της αλληλεπίδρασης του με την υψηλή ακτινοβολία, που υφίσταται, και ο φωτοαποχρωματισμός του ιχνηθέτη φθορισμού όπου λόγω ισχυρής αλληλεπίδρασης του ιχνηθέτη με την ακτινοβολία διέγερσης αλλοιώνονται οι οπτικές του ιδιότητες και η ικανότητα του να φθορίζει.



Σχήμα 6.17: Ανίχνευση δύο διαφορετικών σημάτων φθορισμού ταυτόχρονα από το ίδιο δείγμα με τη χρήση του συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού σάρωσης με laser.

6.2.7

Σύστημα ψηφιακής απεικόνισης ιστών

Πριν και μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας κρίθηκε απαραίτητη η λήψη και επεξεργασία εικόνων από την περιοχή του όγκου, προκειμένου αυτές να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της θεραπείας. Για το λόγο αυτό προσαρμόστηκε το σύστημα απεικόνισης δερματικών ιστών για την παρακολούθηση των καρκινικών όγκων του προστάτη.

Το σύστημα περιλαμβάνει μία ψυχόμενη CCD κάμερα και η οποία καταγράφει ψηφιοποιεί και μεταφέρει εικόνες σε έναν υπολογιστή. Ο CCD αισθητήρας της κάμερας είναι υψηλής ποιότητας ενώ η ψηφιοποίηση γίνεται με μετατροπέα σήματος από αναλογικό σε ψηφιακό στα 12 bit με χαμηλού θορύβου ηλεκτρονικά, για την παραγωγή έγχρωμων ψηφιακών εικόνων 36 bit ανάλυσης μεγαλύτερης από $1k \times 1k$. Τα κύρια χαρακτηριστικά της κάμερας παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.2.

Για τη λήψη εικόνων με τη συγκεκριμένη απεικονιστική διάταξη χρησιμοποιήθηκε διάχυτος ομοαξονικός φωτισμός. Το σύστημα φωτισμού που χρησιμοποιήθηκε παρέχει ομοιόμορφο και χωρίς σκιάσεις φωτισμό 360° , υψηλής συχνότητας (85 kHz) και ελεγχόμενης έντασης (10 – 100%). Το σύστημα φωτισμού περιλαμβάνει τροφοδοτικό, λαμπτήρα (σχήματος δακτυλίου) φθορισμού και βάση κατάλληλη για τη στερέωση του δακτυλίου σε φακούς μικροσκοπίου ή κάμερας. Τα τεχνικά χαρακτηριστικά του συστήματος αναφέρονται στον Πίνακα 6.3. Για τη λήψη και επεξεργασία των εικόνων χρησιμοποιούνται εκτός από το λογισμικό που συνοδεύει την κάμερα το πρόγραμμα Adobe Photoshop.

Πίνακας 6.2 Τεχνικά χαρακτηριστικά CCD αισθητήρα της κάμερας της απεικονιστικής διάταξης

Χαρακτηριστικό	Τιμή
Ανάλυση	1392×1040
Μέγεθος pixel	$4.65 \mu\text{m} \times 4.65 \mu\text{m}$
Ρυθμός ψηφιοποίησης	5 MHz
Ψύξη	Θερμοηλεκτρικά, 5°C κάτω από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος

Κατά τη διάρκεια της λήψης εικόνων από τους όγκους των ζώων ήταν απαραίτητη λόγω της μεγάλης ευαισθησίας της κάμερας η στήριξή της και η διατήρηση μιας σταθερής θέσης ως προς τον όγκο. Για τη στερέωση του συστήματος ψηφιακής

απεικόνισης χρησιμοποιήθηκε ειδική στερεοτακτική τράπεζα η οποία παρέχει δυνατότητα μετακίνησης της ψηφιακής κάμερας σε τρεις διαστάσεις, ώστε να μπορεί να ρυθμίζεται το ύψος και η σχετική της θέση ως προς το ακίνητο σώμα του πειραματόζωου.

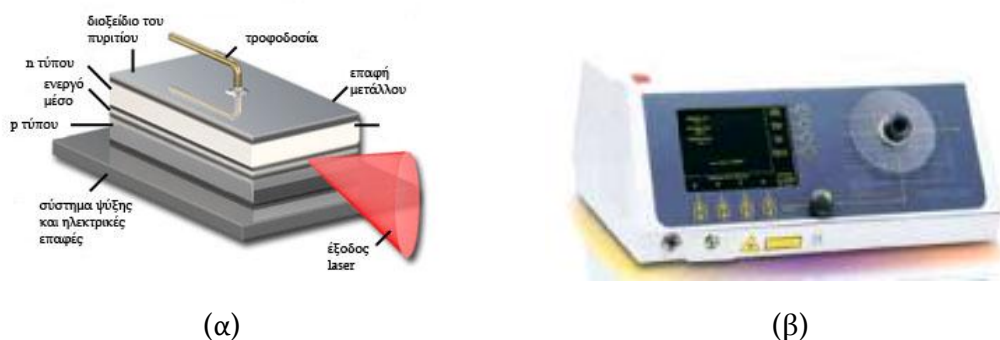
Πίνακας 6.3: Τεχνικά χαρακτηριστικά συστήματος φωτισμού

Χαρακτηριστικό	Τιμή
Συχνότητα	85 kHz
Ισχύς λαμπτήρα	13 W
Θερμοκρασία χρώματος	5100 K (<i>deluxe light</i>)
Χρόνος ζωής λαμπτήρα	7000 h
Θερμοκρασία λειτουργίας	0 – 40 °C
Εύρος ρυθμιζόμενης έντασης φωτός	10 – 100 %

6.2.8

Διάταξη διοδικού laser για φωτοδυναμική θεραπεία

Τα διοδικά lasers είναι αξιόπιστες, μικρού μεγέθους και υψηλής φωτεινότητας πηγές και βρίσκουν πολύ σημαντικές εφαρμογές πέρα από τις τηλεπικοινωνίες και τα συστήματα αποθήκευσης και αντιγραφής της πληροφορίας, και στην υγεία. Τα διοδικά lasers έχουν αναδυθεί τα τελευταία χρόνια ως τα πλέον χρησιμοποιούμενα lasers στη φωτοδυναμική θεραπεία λόγω του χαμηλού κόστους αγοράς και συντήρησης τους σε σχέση με τα υπόλοιπα lasers, αλλά και γιατί είναι πιο εύχρηστα από συμβατικά ιατρικά lasers.



Σχήμα 6.18: (α) διοδικό laser, (β) το laser που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα

Η έρευνα γύρω από την κατασκευή διοδικών lasers με βελτιωμένα χαρακτηριστικά όπως υψηλότερη λαμπρότητα, υψηλότερη ισχύ εξόδου αλλά και νέα μήκη κύματος τα οποία θα καλύψουν τις ανάγκες που υπάρχουν ή εμφανίζονται σε όλες τις προαναφερθείσες εφαρμογές είναι συνεχής και με πολύ σημαντικά αποτελέσματα τα τελευταία χρόνια.

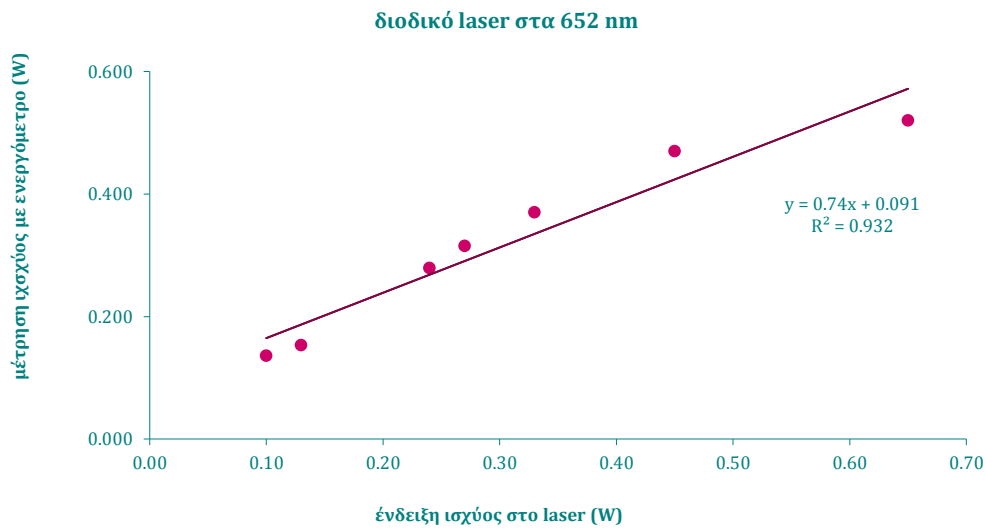
Σε μία επαφή διόδου όταν διέρχεται ρεύμα δημιουργούνται ενώσεις μεταξύ των οπών και των ηλεκτρονίων. Η διαφορά ενέργειας (gap) συχνά μετατρέπεται σε φως (led, laser). Όταν το ρεύμα της διόδου περάσει ένα ορισμένο κατώφλι τότε δημιουργείται αντιστροφή πληθυσμών και έχουμε εξαναγκασμένη εκπομπή (laser). Το υλικό κατασκευής της διόδου λόγω της διαφορετικής διηλεκτρικής σταθεράς που έχει ως προς τον αέρα αποτελεί και την κοιλότητα του laser. Για μεγαλύτερη ανακλαστικότητα στην κοιλότητα συχνά προστίθεται Al (Αργίλιο).

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης αναπτύχθηκαν δυο διατάξεις ακτινοβολίας με διοδικό laser στα 652nm . Η πρώτη αφορούσε τις μελέτες της φωτοδυναμικής δράσης σε κυτταρικό επίπεδο και η δεύτερη αναπτύχθηκε για ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία σε μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη. Τα χαρακτηριστικά του διοδικού laser στα 652nm παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 6.4:

Πίνακας 6.4 Χαρακτηριστικά διοδικού laser 652nm

Χαρακτηριστικό	Τιμή
Τύπος διόδου	GaAs
Ισχύς εξόδου (W)	2W
Μήκος Κύματος (λ) (nm)	$652 \pm 4\text{nm}$
Αριθμητικό Άνοιγμα	0.37
Συζευκτής Ίνας	SMA 905
Τρόπος Λειτουργίας	συνεχές
Ψύξη	με αέρα
Βαθμονόμηση ισχύος	σφαίρα ολοκλήρωσης

Για το διοδικό laser στα 652nm σχεδιάστηκε διάγραμμα ισχύος αναγραφόμενης στην οθόνη του οργάνου ως προς την πραγματική ισχύ εξόδου.



Σχήμα 6.19: Διάγραμμα βαθμονόμησης του διοδικού laser Ceralas PDT 652 nm

Η πραγματική ισχύς εξόδου μετριόταν μέσω ενεργόμετρου. Τα βασικά τεχνικά χαρακτηριστικά του ενεργόμετρου παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.5

Πίνακας 6.5: Χαρακτηριστικά ενεργόμετρου

Χαρακτηριστικό	Τιμή
Μήκη κύματος	0.19 – 20 μm
Διάμετρος	16 mm
Κλίμακες Ισχύος	10W/5W/0.5W
Όριο ισχύος/ cm^2	30KW/ cm^2
Επίπεδο θορύβου	1 mW
Ακρίβεια	$\pm 3\%$
Χρόνος απόκρισης	0.8s
Κλίμακες Ενέργειας	2J/200mJ

6.2.9

Συστήματα ακτινοβολήσης για φωτοδυναμική θεραπεία

Η πρώτη διάταξη ακτινοβολήσης αφορούσε τις μελέτες φωτοδυναμικής θεραπείας στο μοντέλο κυττάρου καρκίνου του προστάτη ενώ η δεύτερη αναπτύχθηκε για την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία για το μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη.

Στο σύστημα ακτινοβολήσης για τη φωτοδυναμική θεραπεία σε κυτταρικό επίπεδο η ακτινοβολία του laser μεταφερόταν στα κύτταρα μέσω μιας οπτικής ίνας. Τα βασικά τεχνικά χαρακτηριστικά της ίνας φαίνονται στον Πίνακα 6.6.

Πίνακας 6.6: Βασικά χαρακτηριστικά οπτικής ίνας για το σύστημα ακτινοβολήσης κυττάρων

Χαρακτηριστικό	Τιμή
Υλικό	QUARTZ
Διάμετρος	600 μm
Αριθμητικό άνοιγμα	0.37
Οπτικός προσαρμογέας	SMA 905

Στην έξοδο της ίνας ήταν προσαρμοσμένος ένας διαχύτης κυκλικής συμμετρίας. Επειδή κατά τη μεταφορά της ακτινοβολίας μέσω της ίνας υπάρχει μία σημαντική μείωση της ισχύος, η ισχύς μετρούνταν και μετά την έξοδό της από το διαχύτη της ίνας. Η ισχύς εξόδου ρυθμιζόταν από το σύστημα του διοδικού laser παρακολουθώντας τις ενδείξεις του ενεργόμετρου ώστε να είναι η κατάλληλη κάθε φορά ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες. Το άκρο της ίνας στηρίζονταν σε μία στερεοτακτική διάταξη που επέτρεπε την τρισδιάστατη κίνησή της έτσι ώστε να είναι κάθετη στα υπό ακτινοβολήση κύτταρα και η απόστασή της να είναι τόση ώστε η φωτεινή κηλίδα που δημιουργεί να έχει ακτίνα 5 cm ώστε να καλύπτει επαρκώς 3 τριβλία Petri εμβαδού 12.5 cm² το κάθε ένα.

Πίνακας 6.7 Βασικά χαρακτηριστικά οπτικής ίνας για το σύστημα ενδοϊστικής ακτινοβολήσης

Χαρακτηριστικό	Τιμή
Υλικό	QUARTZ
Διάμετρος	400 μm
Αριθμητικό άνοιγμα	0.37
Οπτικός προσαρμογέας	SMA 905

Για την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία στο διοδικό laser στα 652 nm προσαρμόστηκε οπτική ίνα με γυμνό άκρο (RBFSF 404 Reusable bare fiber Ceramoptics). Τα βασικά χαρακτηριστικά της ίνας φαίνονται στον Πίνακα 6.7. Η ίνα εισαγόταν ενδοϊστικά 5mm μέσα στον όγκο. Και στην περίπτωση αυτή η ισχύς εξόδου της ίνας μετρούταν με το ενεργόμετρο και για τα πειράματα ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας ρυθμίστηκε στα 145mW.

6.2.10

Διάταξη UV για ακτινοβολήση κύτταρων

Για την πρόκληση οξειδωτικού στρες στα κύτταρα μέσω UV ακτινοβολήσης χρησιμοποιήθηκε η διάταξη Oriol Ultraviolet Light (Xe). Η διάταξη αυτή περιλαμβάνει μια λυχνία ξένου, το τροφοδοτικό 68820 Universal Power Supply 400 – 1000 Watts της Oriol, ειδικά φίλτρα που επιτρέπουν τη διέλευση μόνο της UV ακτινοβολίας και συγκεντρωτικό φακό για εστίαση του διάχυτου φωτός της λυχνίας στο δείγμα. Η διάταξη περιλαμβάνει επίσης και ειδικό σύστημα ψύξης με αέρα και νερό.

6.3

Ανάπτυξη μοντέλων για πειραματικές μελέτες.

Τα μοντέλα κυττάρων είναι εξαιρετικά χρήσιμα καθώς επιτρέπουν τη μελέτη των επιδράσεων διαφόρων ερεθισμάτων ακόμα και σε μοριακό επίπεδο επιτρέποντας την εις βάθος κατανόηση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης και εξέλιξης διαφόρων φαινομένων. Είναι δε ιδιαιτέρως χρήσιμα όντας περισσότερο ελέγξιμα και σχετικά εύκολα στο χειρισμό σε σχέση με τα μοντέλα πειραματοζώων, προσφέροντας μεγαλύτερη ευελιξία στον πειραματισμό καθώς επίσης και τη δυνατότητα μελέτης επιδράσεων περισσότερων παραγόντων. Η έρευνα άλλωστε τείνει να περιορίσει, αν όχι να απαγορεύσει, τον πειραματισμό σε πειραματόζωα επικαλούμενη λόγους ηθικής.

6.3.1

Ανάπτυξη πρωτογενούς καλλιέργειας κερατινοκυττάρων ως μοντέλο δέρματος για μελέτες αντιοξειδωτικής προστασίας έναντι φωτοεπαγομένου οξειδωτικού στρες

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις καλλιέργειες των κερατινοκυττάρων αποτελείται από 50% θρεπτικό μέσο κερατινοκυττάρων με ασβέστιο (Keratinocytes CFM 0,09mM Calcium, Gibco) και 50% θρεπτικό μέσο χωρίς ασβέστιο (Keratinocytes CFM without Calcium, Gibco), έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του ασβεστίου στο μέσο να είναι 0,045mM.

6.3.1.1

Πρωτόκολλο λήψης κερατινοκυττάρων από δέρμα νεογνών άτριχων μυών τύπου SKH-HR1 και SKH-HR2

Επιλέγονται 5 νεογνά ηλικίας 0 έως 48 ωρών. Κάθε νεογνό τοποθετείται σε ηθμό φιάλης ο οποίος περιέχει διάλυμα αιθέρα και αφήνεται περίπου για 10min σε αυτόν, με κλειστό το πώμα της φιάλης, προκειμένου να θανατωθεί. Μόλις διαπιστωθεί ο θάνατός

του, το νεογνό απομακρύνεται από τη φιάλη αιθέρα και εμβαπτίζεται για 5 – 6sec σε πολύ αραιό διάλυμα cetanlon προκειμένου να απομακρυνθούν με πολύ ελαφριά τριβή από το δέρμα ακαθαρσίες. Ακολούθως πλένεται με νερό βρύσης για 1min. Η ροή του νερού κατά το πλύσιμο αυτό, καθώς και για όλα τα πλυσίματα που ακολουθούν, πρέπει να είναι σχετικά χαμηλή γιατί το δέρμα των νεογνών είναι πάρα πολύ ευαίσθητο. Στη συνέχεια, κόβονται τα άκρα του και η ουρά του και πλένεται πάλι με νερό βρύσης προκειμένου να απομακρυνθεί το αίμα. Εμβαπτίζεται στιγμιαία σε μικρό τριβλίο με διάλυμα ισοπροπανόλης-νερού 70:30 και ακολούθως σε διάλυμα φυσιολογικού ορού-Gentamicin (Gentamicin sulfate 80mg/vial, Schering-Plough) (7μg/ml). Το δέρμα πλέον είναι έτοιμο προς απομάκρυνση από το σώμα του νεογνού.

Το δέρμα αφαιρείται με χειρουργικά εργαλεία και εμβαπτίζεται σε καθαρό διάλυμα φυσιολογικού ορού-Gentamicin (7μg/ml), όπου καθαρίζεται από λιπώδη ιστό και αγγεία. Εμβαπτίζεται πάλι σε καθαρό διάλυμα φυσιολογικού ορού-Gentamicin (7μg/ml).

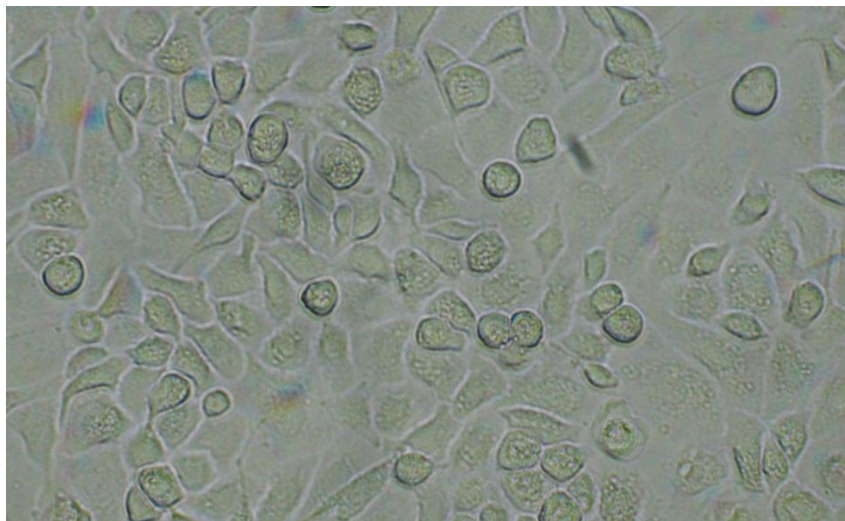
Όταν καθαριστούν τα δέρματα όλων των ζώων εμβαπτίζονται σε μικρό τριβλίο το οποίο περιέχει 7ml διαλύματος Dispase (Gibco/Invitrogen) -φυσιολογικού ορού-Gentamicin (0.2U/ml), όπου και τεμαχίζονται σε μικρά κομμάτια. Τα δέρματα παραμένουν σε αυτό το διάλυμα 30min χωρίς ανάδευση. Το διάλυμα Dispase-φυσιολογικού ορού-Gentamicin απορρίπτεται και στο τριβλίο προστίθενται 5ml νέου διαλύματος Dispase-φυσιολογικού ορού-Gentamicin (0.2U/ml). Η παραπάνω διαδικασία της λήψης των δερμάτων γίνεται με τη χρήση μεταλλικού ηθμού με διαδοχικά χτυπήματα του ηθμού στο τριβλίο και όχι με τη χρήση λαβίδας για να μην καταστραφούν τα κύτταρα. Το τριβλίο με τους ιστούς και το διάλυμα Dispase-φυσιολογικού ορού-Gentamicin αναδεύεται στις 250rps σε vortex για 30min και στη απορρίπτεται με τον ίδιο τρόπο. Στο τριβλίο προστίθενται 5ml νέου διαλύματος Dispase-φυσιολογικού ορού-Gentamicin (0.2U/ml). Το περιεχόμενο του τριβλίου αναδεύεται στις 250rps σε vortex για 30min. Και αυτό το διάλυμα Dispase-φυσιολογικού ορού-Gentamicin απορρίπτεται με τον ίδιο τρόπο.

Στο τριβλίο προστίθενται 5ml νέου διαλύματος Dispase-φυσιολογικού ορού-Gentamicin (0.1U/ml). Το περιεχόμενο του τριβλίου αναδεύεται στις 250rps σε vortex για 2min. Αυτή τη φορά τα διαλύματα Dispase-φυσιολογικού ορού-Gentamicin μεταγγίζονται με τον ίδιο τρόπο (με τη βοήθεια δηλαδή του μεταλλικού ηθμού) σε ένα πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρωσης των 50ml στον οποίο προηγουμένως έχουν προστεθεί 15ml φυσιολογικού ορού-Gentamicin (7μg/ml) και 700μl FBS. Οι ιστοί επιστρέφονται στο τριβλίο και προστίθενται σ' αυτούς 5ml νέου διαλύματος Dispase-φυσιολογικού ορού-Gentamicin (0.1U/ml). Το περιεχόμενο του τριβλίου αναδεύεται στις 250rps σε vortex για 2min και μεταγγίζεται στον πλαστικό σωλήνα της φυγοκέντρωσης. Τα δύο παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται συνολικά 4 φορές, μέχρι

δηλαδή ο συνολικός όγκος του διαλύματος στο σωλήνα φυγοκέντρησης να γίνει 35ml. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου και το περιεχόμενο ενός δεύτερου σωλήνα φυγοκέντρησης φτάσει τα 35ml.

Οι δύο σωλήνες τοποθετούνται στη φυγόκεντρο στις 1000rpm για 8min. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται με τη βοήθεια κενού. Στους σωλήνες προστίθεται διάλυμα φυσιολογικού ορού-Gentamicin (7μg/ml) μέχρι ο όγκος του διαλύματος στους σωλήνες να φτάσει τα 7.5ml. Οι σωλήνες φυγοκεντρούνται στις 1000rpm για 2 – 3 min. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται με τη βοήθεια κενού.

Μετά από τις δύο αυτές φυγοκεντρήσεις, τα ζωντανά κερατινοκύτταρα, τα οποία θέλουμε να συλλέξουμε, έχουν κατακαθίσει σαν ίζημα στον πυθμένα του κάθε σωλήνα. Προσθέτουμε σε αυτά μικρή ποσότητα θρεπτικού μέσου κερατινοκυττάρων (περίπου 200 – 300μl) και συλλέγουμε τα κύτταρα σε έναν σωλήνα των 50ml, όπου θα τοποθετηθούν τα κύτταρα που θα ληφθούν μετά από όλες τις φυγοκεντρήσεις. Συνολικά γίνονται 7 με 8 περίπου ζεύγη φυγοκεντρήσεων. Τελικά προκύπτει ένας σωλήνας όπου έχουμε συλλέξει όλα τα κερατινοκύτταρα μέσα σε μικρή ποσότητα θρεπτικού μέσου κερατινοκυττάρων



Εικόνα 6.1: Πρωτογενής καλλιέργεια κερατινοκυττάρων. Η εικόνα ελήφθη με αντικειμενικό φακό 40X

6.3.2

Ανάπτυξη μοντέλου κυττάρου καρκίνου του προστάτη για μελέτες φωτοδυναμικής δράσης

Για την ανάπτυξη του μοντέλου καρκίνου του προστάτη σε κυτταρικό επίπεδο, επιλέχθηκαν κύτταρα της καρκινικής σειράς κυττάρων του προστάτη LNCaP (American Type Tissue Collection, USA). Τα κύτταρα της συγκεκριμένης κυτταρικής

σειράς προέρχονται από έναν άνδρα (50 ετών) της Καυκάσιας φυλής με διαγνωσμένο μεταστατικό καρκίνο του προστάτη. Επιλέχθηκαν καθώς διατηρούν τα χαρακτηριστικά της νόσου και την εξάρτηση από τα ανδρογόνα. Κυρίως όμως γιατί όταν εμφυτεύονται σε μύες διατηρούν τις καρκινικές τους ιδιότητες και δημιουργούν ένα μοντέλο καρκίνου του προστάτη που παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με τον ανθρώπινο καρκίνο του προστάτη.

Τα LNCaP κύτταρα διατηρούνται σε ειδικά φιαλίδια κρυοδιατήρησης (5×10^6 σε $1ml$ πλήρους θρεπτικού μέσου με $50\mu l$ DMSO) κατεψυγμένα σε υγρό άζωτο μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

6.3.2.1

Μεθοδολογία απόψυξης κυτταρικής σειράς LNCaP

Για την καλλιέργεια των καρκινικών κυττάρων LNCaP χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο RPMI 1640, (LGC Standards), εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοδιού, Fetal Bovine Serum, FBS (Invitrogen) και 0.1% Antibiotic-Antimitotic (Gibco).

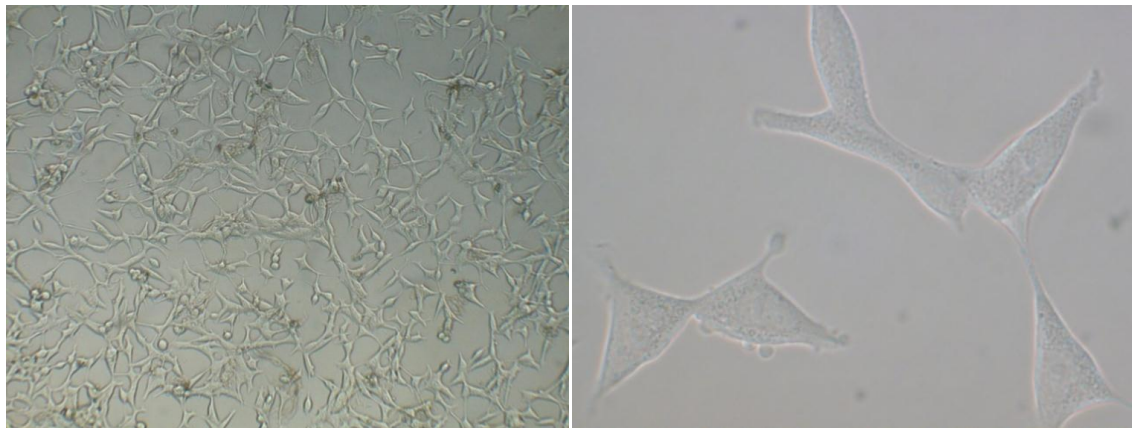
Το φιαλίδιο με τα κατεψυγμένα κύτταρα αφήνεται στον κλίβανο επώασης για περίπου $5min$ μέχρις ότου ξεπαγώσει. Αμέσως μόλις ξεπαγώσει το περιεχόμενο του φιαλιδίου τοποθετείται σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρησης ο οποίος περιέχει $9ml$ διαλύματος φυσιολογικού ορού – 10% FBS. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στα $125 \times g$ για $7min$. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και τα κύτταρα τοποθετούνται σε φλάσκα (Corning) των $25cm^2$ η οποία περιέχει $5ml$ εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου. Γίνεται πολύ καλό pipetting ώστε να σπάσει το συσσωμάτωμα των κυττάρων που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση και να προκύψουν μεμονωμένα κύτταρα. Ελέγχεται η φλάσκα σε οπτικό μικροσκόπιο και αφήνεται στον κλίβανο να επωαστεί για $48h$ χωρίς να κουνηθεί, καθώς με οποιαδήποτε κίνηση της φλάσκας δημιουργούνται συσσωματώματα και δεν αναπτύσσονται τα κύτταρα.

6.3.2.2

Μεθοδολογία ανακαλλιέργειας κυτταρικής σειράς LNCaP

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται όταν η πληρότητα στην αρχική φλάσκα φτάσει στο 70%. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά στις δεδομένες συνθήκες ανακαλλιεργείται με ρυθμό 1:3, δηλαδή τα κύτταρα της αρχικής φλάσκας μοιράζονται σε τρεις καινούργιες φλάσκες ίδιου εμβαδού με την αρχική. Η διαδικασία που ακολουθείται για να γίνει ανακαλλιέργεια των κυττάρων είναι η εξής: αφαιρείται πολύ προσεκτικά το μέσο από την αρχική φλάσκα και γίνονται με προσοχή δυο ξεπλύματα με διάλυμα φυσιολογικού ορού-αντιβιοτικού. Στη συνέχεια προστίθεται στη φλάσκα το

ένζυμο τρυψίνη (Trypsin – EDTA solution, Sigma) το οποίο έχει την ιδιότητα να αποκολλά τα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας. Η τρυψίνη παραμένει στη φλάσκα για 2 – 3min, χρονικό διάστημα που χρειάζεται ώστε να δράσει και να είναι ορατή η αποκόλληση των αποικιών με γυμνό μάτι, αλλά όχι τόσο ώστε να αρχίσει να προκαλεί βλάβες στα κύτταρα λόγω της κυτταροτοξικότητας της. Για την αναστολή της δράσης της τρυψίνης και την αποφυγή της κυτταροτοξικότητας προστίθενται στη φλάσκα 5ml διαλύματος φυσιολογικού ορού -10% FBS και το διάλυμα συλλέγεται σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρησης. Ακολουθούν ακόμα δυο ξεπλύματα με διάλυμα φυσιολογικού ορού-10% FBS, τα οποία συλλέγονται στον ίδιο πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρησης φροντίζοντας ο τελικός όγκος στον πλαστικό σωλήνα να μην ξεπερνά τα 15ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 125 x g για 12min. Το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και τα κύτταρα μοιράζονται σε φλάσκες των 25 cm² που περιέχουν 5ml εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου. Ελέγχονται οι φλάσκες στο οπτικό μικροσκόπιο και τοποθετούνται στον κλίβανο επώασης για 48h.



(α)

(β)

Εικόνα 6.2: Καλλιέργεια LNCaP κυττάρων. (α) αντικειμενικός 10X. (β) αντικειμενικός 40X

6.3.2.3

Μεθοδολογία κατάψυξης των κυττάρων

Η διατήρηση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα είναι δυνατή με την αποθήκευσή τους σε υγρό άζωτο σε θερμοκρασίες έως $-190^{\circ}C$. Η ψύξη των κυττάρων θα πρέπει να γίνεται σταδιακά ώστε, να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό τους και να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια νερού. Για το λόγο αυτό καταψύχονται παρουσία του παράγοντα διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO, D2650).

Τα κύτταρα αφού αποκολληθούν από τη φλάσκα με τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγούμενα μεταφέρονται σε κατάλληλο φιαλίδιο για διατήρηση σε υγρό άζωτο, 5×10^6 κύτταρα σε 1ml εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου. Προστίθενται

50μl DMSO και το φιαλίδιο τοποθετείται στους $-80^{\circ}C$ για 24h προκειμένου να επιτευχθεί σταδιακή ψύξη των κυττάρων στη θερμοκρασία αυτή. Κατόπιν τοποθετείται στο κατάλληλο δοχείο αποθήκευσης με υγρό άζωτο. Στις συνθήκες αυτές μπορεί να διατηρηθεί για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα.

6.3.3

Ανάπτυξη μοντέλου μυός καρκίνου του προστάτη για προκλινικές μελέτες ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας.

Τα μοντέλα των πειραματοζώων που χρησιμοποιούνται παίζουν σημαντικό ρόλο στην μελέτη των μηχανισμών της εξέλιξης του καρκίνου και στην έρευνα για τη θεραπεία του. Στοχεύουν στην προσομοίωση της ανάπτυξης του καρκίνου, επιβαρύνονται όμως από την ανεπαρκή γνώση των βιολογικών μηχανισμών ανάπτυξης του καρκίνου στον άνθρωπο. Θεωρητικά το μοντέλο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη σε πειραματόζωα πρέπει να προσομοιάζει όλες τις ιδιότητες του καρκίνου όπως αυτός εμφανίζεται στον προστάτη του ανθρώπου. Στην πράξη όμως κάτι τέτοιο είναι δύσκολο να επιτευχθεί.

Μέχρι στιγμής δεν έχει αναπτυχθεί κάποιο μοντέλο το οποίο να προσομοιώνει όλα τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του καρκίνου. Αντιθέτως, έχουν αναπτυχθεί μοντέλα τα οποία επικεντρώνονται στην ανάπτυξη κάποιου συγκεκριμένου χαρακτηριστικού του καρκίνου. Δημιουργήθηκαν *in vivo*, *in vitro* και μαθηματικά-υπολογιστικά μοντέλα, καθένα από τα οποία διαφέρει τόσο στο σχεδιασμό όσο και στον σκοπό για τον οποίο έχει αναπτυχθεί. Για παράδειγμα άλλα είναι τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση των ορμονικών διαταραχών που οδηγούν σε καρκινώματα ενώ άλλα χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των μεταστάσεων.

Για τη μελέτη της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας χρησιμοποιήθηκαν Σοβαρά Ανοσοκατεσταλμένοι Μύες (Severe Combined Immunodeficient Mice, SCID, Charles River). Στους μύες αυτούς το ανοσοποιητικό τους σύστημα είναι κατασταλμένο και έτσι έχουν την ικανότητα να γίνονται ξενιστές για ανθρώπινες ασθένειες, κυρίως για την ανάπτυξη καρκινικών όγκων. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η παρακολούθηση και η μελέτη της εξέλιξης του καρκίνου *in vivo*, χωρίς να υπάρχει ο κίνδυνος της απόρριψης των εμφυτευμένων καρκινικών κυττάρων.

Ο συγκεκριμένος τύπος μυός είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στο χειρισμό και τη χρήση καθώς είναι απαραίτητο να διατηρεί κατασταλμένο το ανοσοποιητικό του σύστημα για τη δημιουργία του μοντέλου καρκίνου του προστάτη. Έτσι οι μύες διατηρούνταν σε ειδικές, ελεύθερες από παθογόνα, εγκαταστάσεις οι οποίες εξασφάλιζαν τη διατήρηση των χαρακτηριστικών του είδους. Η υγεία, η φυσική κατάσταση και η συμπεριφορά των μυών παρακολουθούνταν διαρκώς και η φροντίδα και ανάπτυξή τους ακολουθούσε τις

οδηγίες που ορίστηκαν από την Ευρωπαϊκή Ένωση 2003/65/EC και την Ελληνική Επιτροπή για τον πειραματισμό σε ζώα.

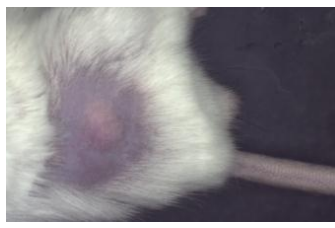
Για την ανάπτυξη του μοντέλου μυός καρκίνου του προστάτη επιλέχθηκαν αρσενικοί SCID μύες ηλικίας 6-8 εβδομάδων και βάρους ~20g. Στους μύες αυτούς έγινε υποδόρια ένεση 100μl διαλύματος που περιείχε 3×10^6 LNCaP κύτταρα σε εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο και Matrigel (Sigma), έναν επιφανειοδραστικό παράγοντα που ενισχύει την προσκόλληση των κυττάρων, σε αναλογία 1:1.

Περίπου 8 εβδομάδες μετά την εμφύτευση των κυττάρων οι όγκοι έχουν φτάσει τις κατάλληλες διαστάσεις για την εφαρμογή της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας.

Η ανάπτυξη του μοντέλου αυτού είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς εξασφαλίζει την ανάπτυξη του όγκου σε 3 διαστάσεις. Με τον τρόπο αυτό προσομοιώνονται με μεγαλύτερη ακρίβεια οι πραγματικές συνθήκες (αγγειογένεση, ορμονικοί παράγοντες και αλληλεπιδράσεις με τον περιβάλλοντα ιστό) σε σχέση με τα μοντέλα κυττάρων, τα οποία τείνουν να επικρατήσουν στη διεθνή ερευνητική κοινότητα για τη μελέτη του καρκίνου και των θεραπειών του. Στην Εικόνα 6.3 παρουσιάζεται η εξέλιξη της ανάπτυξης του όγκου μετά την εμφύτευση των κυττάρων.



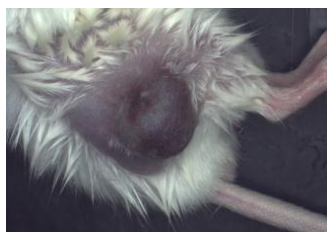
2 εβδομάδες
Βάρος: 24.0gr



4 εβδομάδες
Βάρος: 22.5gr
Διαστάσεις: **31 x 36 mm**



6 εβδομάδες
Βάρος: 21.8 gr
Διαστάσεις: **53 x 49 mm**



8 εβδομάδες
Βάρος: 20gr
Διαστάσεις: **66 x 54 x 55mm**



10 εβδομάδες
Βάρος: 18gr
Διαστάσεις: **73 x 69 x 55 mm**

Εικόνα 6.3 Ανάπτυξη του καρκινικού όγκου του προστάτη σε μετά την εμφύτευση των καρκινικών κυττάρων

6.4

Πρωτόκολλα και μεθοδολογίες μελετών

6.4.1

Πρωτόκολλο μελέτης ενδοκυττάριας χωρικής κατανομής του φωτοευαισθητοποιητή με Συνεστιακή Απεικονιστική Μικροσκοπία

Για τη μελέτη της ενδοκυττάριας χωρικής κατανομή της ελεύθερης και της εγκλεισμένης λιποσωματικής *m*-THPC στα LNCaP με Συνεστιακή Απεικονιστική Μικροσκοπία, αναπτύχθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

10,000 LNCaP κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδα μέσα σε τριβλίο εμβαδού 12.5 cm^2 . Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24h με $0.22 \mu\text{M}$ και $1.8 \mu\text{M}$ ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής *m*-THPC. Είναι σημαντικό στην Συνεστιακή Μικροσκοπία να μην υπάρχει μεγάλη πυκνότητα κυττάρων στην καλυπτρίδα, γι αυτό το λόγο επιλέχθηκε να κύτταρα να καλλιεργηθούν αρκετά αραιά. Μετά την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης αφαιρέθηκε το μέσο με τον φωτοευαισθητοποιητή από τα τριβλία και έγιναν 2 πλύσεις των κυττάρων με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Στη συνέχεια σε κάθε τριβλίο προστέθηκε φρέσκο διάλυμα παραφορμαλδεΐδης (formalin solution, Sigma) 4% και τα τριβλία αφέθηκαν στον επωαστικό κλίβανο για 30min. Αφαιρέθηκε κατόπιν το διάλυμα παραφορμαλδεΐδης και έγιναν δυο πλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα έως ότου στεγνώσουν πλήρως. Η διαδικασία αυτή αφορούσε στη στερεοποίηση των κυττάρων, διαδικασία συνήθης στη μικροσκοπία καθώς διατηρεί αναλλοίωτη τη μορφολογία των κυττάρων και επιτρέπει τοπογραφικές ή χωρικές μελέτες.

Οι φωτοευαισθητοποιητές, όπως και όλα τα φθορίζοντα χρωμοφόρα, όταν εκτίθενται στο φως διέγερσης κινδυνεύουν από φωτολεύκανση. Ο βαθμός της φωτολεύκανσης εξαρτάται τόσο από την ένταση όσο και από τη διάρκεια της ακτινοβόλησης. Αποτέλεσμα της φωτολεύκανσης είναι η πτώση στην ένταση του φθορισμού του χρωμοφόρου. Η φωτολεύκανση οφείλεται στο γεγονός ότι η διεγερμένη κατάσταση ενός μορίου είναι γενικά πολύ πιο ενεργή χημικά από τη βασική του κατάσταση. Η πτώση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα κατά την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Για να αποφευχθεί η φωτολεύκανση, είναι απαραίτητο να προστατευθεί ο φωτοευαισθητοποιητής. Έτσι τα κύτταρα μετά τη στερεοποίηση τους πέρασαν από μια διαδικασία θωράκισης από τη φωτολεύκανση. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το ProLong Antifade Kit (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας.

Συγκεκριμένα η μεθοδολογία περιελάμβανε τα εξής βήματα: Το σετ περιελάμβανε δυο στοιχεία. Μια ουσία «θωράκισης» και το διάλυμα στο οποίο διαλυόταν. Ακολουθούσε πολύ καλή ανάδευση για να πάρουμε ομοιογενές διάλυμα. Κατά τη φάση

αυτή δημιουργούνται πολλές φυσαλίδες όπου για να σπάσουν τοποθετούσαμε το διάλυμα το οποίο έπρεπε να είναι σε θερμοκρασία $50^{\circ}C$ σε λουτρό υπερήχων για $1 - 2 \text{ min}$. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβανόταν έως ότου ληφθεί ομογενές διάλυμα χωρίς φυσαλίδες. Κατόπιν μικροποσότητα του διαλύματος λαμβάνεται με πιπέτα με πολύ αργές κινήσεις ώστε να μη δημιουργηθούν εκ νέου φυσαλίδες και ρίπτεται σε καλυπτρίδα με στερεωμένα κύτταρα η οποία βρίσκεται υπό κλίση $\sim 90^{\circ}$. Ακουμπώντας την καλυπτρίδα σε διηθητικό χαρτί απομακρύνεται η περίσσεια του διαλύματος και τοποθετούνται σε απόλυτο σκοτάδι στον ξηραντήρα για τουλάχιστον 12 h . Προτού γίνει η μικροσκοπική παρατήρηση, η καλυπτρίδα στερεωνόταν σε πλακίδιο μικροσκοπίου και ακολουθούσε η παραρήρηση.

6.4.2

Μεθοδολογία μελέτης φωτοδυναμικής δράσης στο μοντέλο κυττάρου καρκίνου του προστάτη.

Προκειμένου να μελετηθεί η φωτοδυναμική δράση μετρήθηκε τόσο η βιωσιμότητα των κυττάρων όσο και το επαγόμενο οξειδωτικό στρες μετά τη φωτοδυναμική. Καθώς κάθε μελέτη διαφοροποιείται ελαφρώς ανάλογα με τις ιδιαίτερες απαιτήσεις της ως προς την καλλιέργεια και το χειρισμό των κυττάρων, η περιγραφή των μεθοδολογιών προηγείται των αντιστοίχων αποτελεσμάτων για λόγους σαφήνειας. Σε γενικές γραμμές η μεθοδολογία μελέτης της φωτοδυναμικής δράσης είναι η εξής:

Προκειμένου να μελετηθεί η φωτοδυναμική δράση της ελεύθερης και της εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC LNCaP κύτταρα, 2×10^5 / τριβλίο, επώαστηκαν για 24 h σε τριβλία Petri εμβαδού 9.6 cm^2 με εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο. Ακολούθως αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και στα κύτταρα προστέθηκε φρέσκο διάλυμα θρεπτικού μέσου - φωτοευαισθητοποιητή. Ελέχθησαν δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC οι οποίες προέκυψαν με διαδοχικές αραιώσεις των αντίστοιχων μητρικών διαλυμάτων. Ο χρόνος επώασης με τον φωτοευαισθητοποιητή ήταν 24 h . Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης το διάλυμα επώασης απορριπτόταν και γίνονταν δυο πλύσεις των κυττάρων με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα φωτοευαισθητοποιητή - μέσου. Στη συνέχεια ελάχιστο PBS προσθέτονταν στα τριβλία ($300 \mu\text{l}$) για να προστατεύσει τα κύτταρα από το στρες της έκθεσης στο περιβάλλον και ακολουθούσε η ακτινοβόλησή του με το σύστημα διοδικού laser στα 652 nm . Η ακτινοβόληση ήταν 3 mW/cm^2 και οι χρόνοι ακτινοβόλησης $60, 120, \text{ και } 180 \text{ sec}$, συνεπώς συνολικές δόσεις ενέργειας $180, 360 \text{ και } 540 \text{ mJ/cm}^2$ αντίστοιχα. Με το πέρας της ακτινοβόλησης φρέσκο εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο προσθέτονταν στα τριβλία και τα κύτταρα επέστρεφαν στον επωαστικό κλίβανο όπου και διατηρούνταν

για 24h. Κατόπιν ακολουθούσε η μέτρηση της βιωσιμότητας με τον βιοχημικό έλεγχο MTT.

Η μεθοδολογία αυτή με τις απαραίτητες κάθε φορά τροποποιήσεις ανάλογα με τις ιδιαίτερες απαιτήσεις κάθε μελέτης εφαρμόστηκε καθολικά σε όλες τις μελέτες φωτοδυναμικής δράσης είτε μόνη της είτε σε συνέργεια με παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία.

6.5

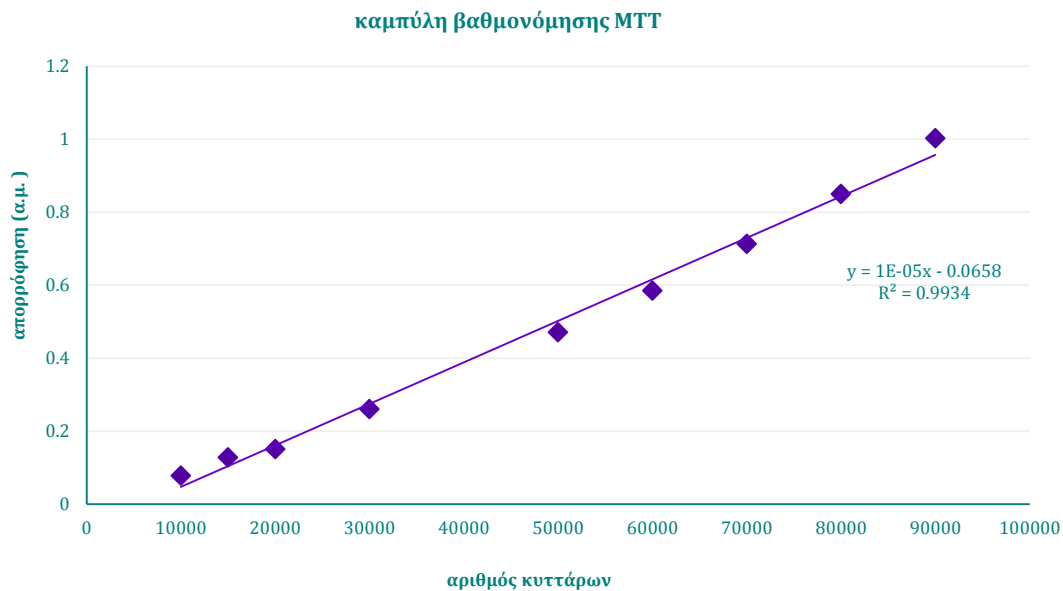
Πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας – βιοχημικός έλεγχος MTT

Για τη μέτρηση της βιωσιμότητας ή του αριθμού των κυττάρων χρησιμοποιείται ευρέως ο βιοχημικός έλεγχος βιωσιμότητας MTT (33-(4,5-διμεθυλοδιαζόλη-2)-2,5-διφαινυλοτετραζολικού βρωμιδίου bromide; Sigma).

Το αντιδραστήριο MTT (κίτρινη χρωστική) χρωματίζει μόνο υγιή κύτταρα ή κύτταρα τα οποία βρίσκονται στα πρώτα στάδια της απόπτωσης. Πιο συγκεκριμένα, οι μιτοχονδριακές δεϋδρογενάσες των ζώντων κυττάρων αντιδρούν με το MTT και σχηματίζουν μωβ κρυστάλλους formazan. Οι κρύσταλλοι αυτοί διαλύονται σε οξινομένη ισοπροπανόλη δίνοντας ένα μωβ διάλυμα, του οποίου η απορρόφηση μετράται φωτομετρικά στα 550 – 570 nm. Τα νεκρά κύτταρα δεν έχουν μιτοχονδριακή δραστηριότητα και άρα δεν μπορούν να παράξουν κρυστάλλους formazan. Αύξηση ή μείωση στον αριθμό των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα αντίστοιχη αλλαγή στο ποσό των κρυστάλλων formazan που παράγονται, φανερώνοντας το βαθμό της κυτταροτοξικότητας που προκαλείται από τον παράγοντα που μελετάται.

Το πρωτόκολλο εφαρμογής του ελέγχου MTT είναι το εξής: αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από τα κύτταρα και γίνονται δυο πλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Στη συνέχεια προστίθεται στα κύτταρα το διάλυμα της χρωστικής MTT (5mg/ml MTT σε PBS) και τα κύτταρα αφήνονται να επωαστούν με αυτήν για 3h στον επωαστικό κλίβανο, προφυλαγμένα από το φως. Όταν ολοκληρωθεί ο χρόνος επώασης απορρίπτεται το διάλυμα της χρωστικής και τα κύτταρα λύνονται με διαλύτη που αποτελείται από 10% Triton X (Sigma) και 0.1N HCl σε καθαρή ισοπροπανόλη. Το διάλυμα με τα λυμένα κύτταρα συλλέγεται και μεταφέρεται στο φασματοφωτόμετρο απορρόφησης (Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer) για να γίνει η μέτρηση. Συλλέγεται το φάσμα για μήκη κύματος από 380 έως 700 nm. Από κάθε φάσμα αφαιρείται η απορρόφηση στα 690 nm (θόρυβος) από την απορρόφηση στα 565 nm (μέγιστο απορρόφησης των κρυστάλλων formazan).

Για να μπορούν να γίνουν επαναλήψιμες μετρήσεις και για να μπορεί να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων είναι ιδιαίτερα σημαντικό να διατηρούνται σταθερές οι συνθήκες της μεθόδου.



Σχήμα 6.20: Καμπύλη βαθμονόμησης βιοχημικού ελέγχου εκτίμησης βιωσιμότητας MTT

Η καμπύλη αναφοράς απορρόφησης – αριθμού κυττάρων για τη βαθμονόμηση των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκε με την παρακάτω μεθοδολογία:

Έγινε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων οπτικά με το Σύστημα Απεικονιστικής Μικροσκοπίας και με το πλακίδιο Neubauer. Εφαρμόστηκε σε γνωστό αριθμό κυττάρων ο έλεγχος MTT και μετρήθηκε η απορρόφηση με το φασματοφωτόμετρο. Κατασκευάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης αριθμού κυττάρων –απορρόφηση.

6.6

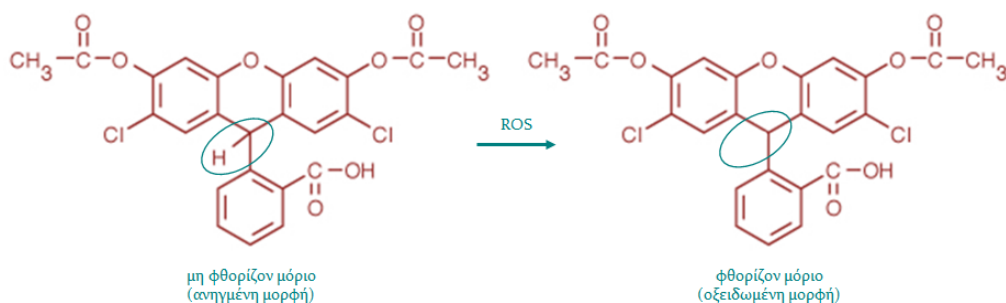
Μεθοδολογία ποσοτικοποίησης οξειδωτικού στρες μέσω μικροσκοπίας φθορισμού

6.6.1

Ιχνηθέτες φθορισμού

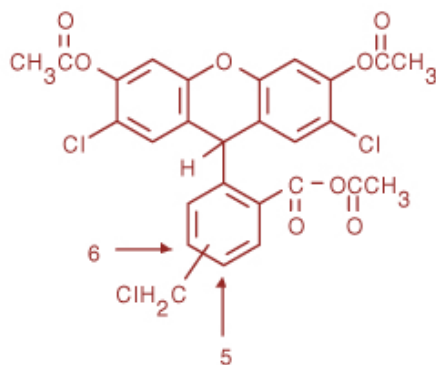
Από τους πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενους και εξειδικευμένους ιχνηθέτες οξειδωτικού στρες είναι ο ιχνηθέτης 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA). Η H₂DCFDA είναι η χημική μορφή της φλουορεσκεΐνης σε αναγωγή η

οποία χρησιμοποιείται ως ενδοκυττάριος ιχνηθέτης δραστικών οξυγονούχων ειδών και ελεύθερων ριζών. Ο ιχνηθέτης αυτός επισημαίνει τις κυριότερες ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη, το μονήρες οξυγόνο, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, τη ρίζα υδροξυλίου κ.α. μετά από κάποιο οξειδωτικό ερέθισμα. Στην πραγματικότητα η H₂DCFDA δεν φθορίζει. Ενδοκυττάρια ωστόσο παρουσία ενδοκυττάρων εστερασών και δραστικών οξυγονούχων ειδών οι ομάδες οξικού άλατος στο μόριό της διασπώνται και η μη φθορίζουσα H₂DCFDA μετατρέπεται στην 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) η οποία φθορίζει ισχυρά.

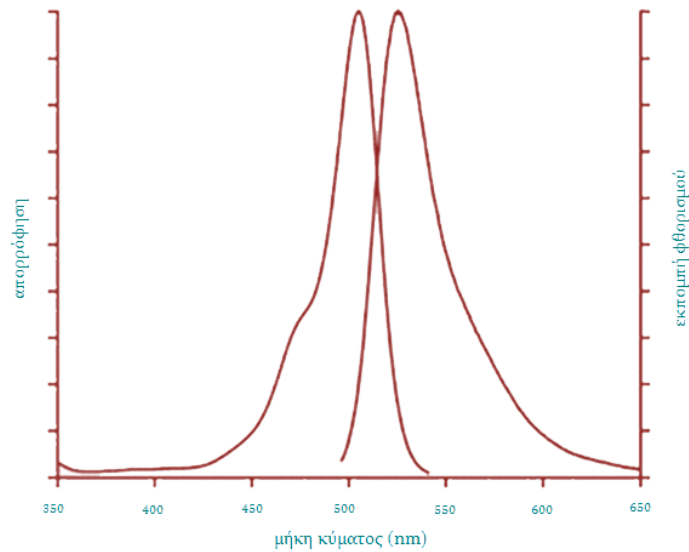


Σχήμα 6.21: Η μη φθορίζουσα H₂DCFDA η οποία όταν οξειδώνεται από ελεύθερες ρίζες ή δραστικά οξυγονούχα είδη μετατρέπεται στην DCF η οποία φθορίζει ισχυρά.

Στις πειραματικές μας μελέτες χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης φθορισμού η 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA) ένα παράγωγο χλωρομεθυλίου της H₂DCFDA. Η CM-H₂DCFDA εισέρχεται στα κύτταρα μέσω παθητικής διάχυσης και ενώ οι ομάδες οξικού άλατος διασπώνται από τις ενδοκυττάρια εστεράσες μετατρέποντας το μόριο σε φθορίζον, η χλωρομεθυλομάδα αντιδρά και ενώνεται με τις ενδοκυττάρια θειόλες κυρίως με τη γλουταθειόνη. Καθώς η CM-H₂DCFDA ενώνεται με ενδοκυττάρια συστατικά διατηρείται ενδοκυττάρια για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με την H₂DCFDA.



Σχήμα 6.22: Ο ιχνηθέτης φθορισμού 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA)



Σχήμα 6.23: Φάσμα απορρόφησης και εκπομπής φθορισμού του ιχνηθέτη 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA) σε pH=9.0

Η διέγερση του ιχνηθέτη πραγματοποιείται με τον κύβο U-MNB. Για τη φλουορεσκείνη μήκος κύματος διέγερσης στα 488 nm και εκπομπή φθορισμού στα 512 nm.

6.6.2

Πρωτόκολλο επώασης ζωντανών κυττάρων με τον ιχνηθέτη φθορισμού 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA)

Η 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA) (Molecular Probes, Invitrogen, Life Technologies Corporation) διατηρείται σε μορφή σκόνης σε φιαλίδιο στους -20°C , απολύτως προφυλαγμένη από το φως. Αρχικά δημιουργείται μητρικό διάλυμα της ουσίας 0.576 mM σε αιθανόλη (50 μg CM-H₂DCFDA σε 150 μl EtOH). Τα κύτταρα που είχαν συμφηθεί στην καλυπτρίδα, $\sim 3 \times 10^3 / \text{cm}^2$, επώαστηκαν με την CM-H₂DCFDA, 5 μM , σε πλήρες θρεπτικό μέσο, σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι για 30 min. Στη συνέχεια στα κύτταρα ξεπλύθηκαν δυο φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS και τοποθετήθηκαν στον θαλαμίσκο. Ο κενός χώρος στον θαλαμίσκο πληρώθηκε με PBS για να διατηρηθούν ζωντανά τα κύτταρα για το χρόνο της παρατήρησης. Ακολούθησε η μικροσκοπική παρατήρηση με το μικροσκόπιο φθορισμού. Ο χρόνος ολοκλήρωσης για τη λήψη των εικόνων φθορισμού, όπως και η ανάλυση των εικόνων διατηρήθηκε σταθερός σε όλες τις πειραματικές μελέτες ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση των σημάτων φθορισμού.

6.6.3

Μεθοδολογία ποσοτικοποίησης εκπεμπόμενου από το δείγμα φθορισμού μέσω επεξεργασίας εικόνων φθορισμού από το μικροσκόπιο φθορισμού

Η ένταση φθορισμού είναι γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης του ιχνηθέτη στο συγκεκριμένο σημείο όταν το φως διέγερσης έχει σταθερή ένταση και μήκος κύματος. Η γραμμικότητα δε διατηρείται για πολύ μεγάλη συγκέντρωση του ιχνηθέτη περιοχή ενώ για πολύ μεγάλη ένταση φωτός διέγερσης μπορεί να προκληθεί φωτοκαταστροφή του ιχνηθέτη. Η φωτοκαταστροφή του ιχνηθέτη προκαλείται μετά από παρατεταμένη έκθεσή του σε φως στο μήκος κύματος διέγερσής του. Η φωτοκαταστροφή διακρίνεται σε φωτοτροποίηση και σε μόνιμη φωτοκαταστροφή (ή φωτολεύκανση, photobleaching). Στην πρώτη περίπτωση η έκθεση του χρωμοφόρου στο φως προκαλεί αλλοιώσεις σε αυτό χωρίς ωστόσο να χάσει τη βασική του δομή. Αποτέλεσμα είναι η μείωση της έντασης στις κορυφές στα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού. Κατά τη μόνιμη φωτοκαταστροφή προκαλείται φωτοχημική καταστροφή στη δομή του μορίου του χρωμοφόρου με αποτέλεσμα το μόριο να διασπάται στις δομικές του ομάδες. Στην περίπτωση αυτή πέρα από τη μείωση στην ένταση παρατηρούνται και νέες κορυφές στα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού, τα οποία οφείλονται στα νέα μόρια που δημιουργήθηκαν [40].

Η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη των ελευθέρων ριζών και των δραστικών οξυγονούχων ειδών στο εσωτερικό του κυττάρου αφού η CM-H₂DCFDA φθορίζει μόνον εφόσον υποστεί οξειδωση από αυτές. Η φωτεινότητα στις εικόνες φθορισμού οι οποίες καταγράφονται από το μικροσκόπιο φθορισμού είναι ανάλογη της έντασης φθορισμού. Άρα μέσω του της φωτεινότητας των εικόνων φθορισμού μπορεί να ποσοτικοποιηθεί το ενδοκυττάριο οξειδωτικό στρες.

Για την ποσοτικοποίηση του ενδοκυττάρου οξειδωτικού στρες ακολουθήθηκε η εξής μεθοδολογία.

Οι εικόνες φθορισμού ελήφθησαν με το μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιώντας τον ίδιο χρόνο ολοκλήρωσης 5 s, και την ίδια ανάλυση 688 x 514 *pixels*, μέγεθος 1.3MB. Η λήψη ελεγχόταν μέσω του λογισμικού Analysis getIT. Μετά την αποθήκευση των εικόνων η επεξεργασία τους έγινε με το λογισμικό Mac Biophotonics Image J, το οποίο φέρει ενσωματωμένες πρόσθετες εφαρμογές απαραίτητες στην επεξεργασία εικόνων μικροσκοπίας.

Μέσω του λογισμικού η εικόνα από έγχρωμη RGB μετατρέπονταν σε 8-bit μονόχρωμη εικόνα στις αποχρώσεις του γκρι. Καθώς τα κύτταρα διατηρούνταν ζωντανά σε υγρό περιβάλλον κατά τη διάρκεια λήψης των εικόνων, υπήρχαν ανάμεσα στις εικόνες μικρές διαφορές στην ένταση φθορισμού του υποβάθρου καθώς η φθορίζουσα υπήρχε και στον εξωκυττάριο χώρο αποβαλλόμενη από το κύτταρο. Έτσι ήταν

απαραίτητο να αφαιρεθεί ο φθορισμός του υποβάθρου ο οποίος υπερτίθεται και στο φθορισμό των κυττάρων. Επιλέγονταν τρεις περιοχές ενδιαφέροντος (Region of Interest, ROI) ίδιου εμβαδού στο υπόβαθρο σε κάθε εικόνα και υπολογίζονταν η μέση τιμή φωτεινότητας η οποία αφαιρούταν από τη φωτεινότητα όλης της εικόνας.

Κατόπιν σε κάθε κύτταρο στην εικόνα επιλέγονταν τρεις περιοχές ενδιαφέροντος (ROI) ίδιου εμβαδού στο κυτταρόπλασμα και ακόμα τρεις στον πυρήνα, αντιπροσωπευτικής έντασης φθορισμού του κάθε υποκυττάριου χώρου. Ο λόγος ήταν ότι συστηματικά η ένταση φθορισμού σε όλες τις πειραματικές συνθήκες ήταν μεγαλύτερη στο κυτταρόπλασμα σε σχέση με τον πυρήνα. Ακολουθώντας υπολογιζόταν η μέση τιμή φωτεινότητας σε κάθε περιοχή ενδιαφέροντος, ξεχωριστά για τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα.

Για κάθε πειραματική συνθήκη λαμβάνονταν ένας μεγάλος αριθμός εικόνων, στον ίδιο χρόνο, οπότε προέκυπτε ένα μεγάλο στατιστικό δείγμα κυττάρων τα οποία είχαν υποστεί το ίδιο ερέθισμα. Έτσι προέκυπτε η τελική μέση φωτεινότητα για την κάθε συνθήκη.

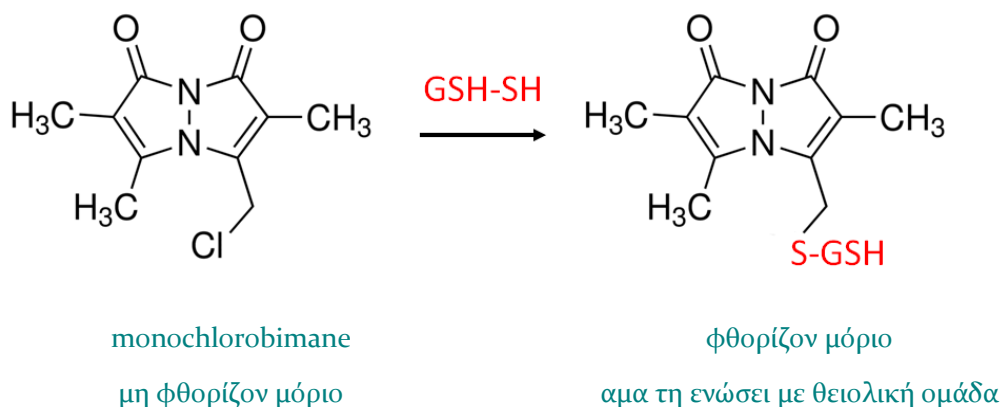
Η επίδραση της κάθε πειραματικής συνθήκης στο ενδοκυττάριο οξειδωτικό στρες αξιολογήθηκε σε σχέση με το οξειδωτικό στρες των κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες μετά από στατιστική επεξεργασία και ανάλυση των αντίστοιχων τιμών φωτεινότητας όπως αυτές προέκυπταν μετά από επεξεργασία των αντίστοιχων εικόνων φθορισμού.

Πέραν της ποσοτικοποίησης του οξειδωτικού στρες μέσω της επεξεργασίας των εικόνων φθορισμού και του αντίστοιχου σήματος, έγινε και η εποπτική απεικόνιση αυτού μέσω χρήσης ψευδοχρωμάτων. Το ανθρώπινο μάτι δεν έχει μεγάλη ευαισθησία στο να διακρίνει τις διαβαθμίσεις της έντασης του γκρι και έτσι έχουν αναπτυχθεί απεικονίσεις μέσω ψευδοχρωμάτων. Η απεικόνιση με ψευδοχρώματα αντιστοιχεί αυθαίρετα μια τιμή φωτεινότητας του γκρι σε ένα χρώμα και έτσι είναι απαραίτητο να συνοδεύονται από την αντίστοιχη κλίμακα χρωμάτων. Η τιμή φωτεινότητας της κλίμακας του γκρι είναι ανάλογη της έντασης του σήματος φθορισμού του ιχνηθέτη και με αυτό τον τρόπο, με τη χρήση δηλαδή ψευδοχρωμάτων, καθίσταται ευκολότερο για το ανθρώπινο μάτι να διακρίνει τις διαβαθμίσεις της έντασης φθορισμού αφού κάθε μια αντιστοιχεί σε διαφορετικό χρώμα. Η τεχνική αυτή είναι ευρύτατα διαδεδομένη στη μικροσκοπία φθορισμού.

6.7

Μεθοδολογία και πρωτόκολλο μέτρησης ενδοκυττάριας γλουταθειόνης

Προκειμένου να προσδιοριστούν τα ενδοκυττάρια επίπεδα γλουταθειόνης χρησιμοποιήθηκε φθορισμομετρική μέθοδος προσδιορισμού βασισμένη στον ιχνηθέτη μονοχλωρομπιμίνη (monochlorobimane).



Σχήμα 6.24: Η μη-φθορίζουσα monochlorobimane η οποία όταν ενώνεται με θειόλες, κυρίως τη γλουταθειόνη, GSH, φθορίζει ισχυρά

Ο ιχνηθέτης αυτός διαπερνά με ευκολία τις κυτταρικές μεμβράνες και ενώνεται με τις ενδοκυττάριας θειόλες. Η ελεύθερη μορφή του παρουσιάζει ελάχιστο φθορισμό. Όταν όμως ενωθεί με τις ενδοκυττάριας θειόλες κυρίως με την γλουταθειόνη, αντίδραση η οποία καταλύεται από το ένζυμο γλουταθειόνη - S - τρανσφεράση (glutathione - S - transferase, GST), σχηματίζει ένα προϊόν το οποίο φθορίζει ισχυρά.

Για τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκε φθορισμομετρικό σετ μέτρησης γλουταθειόνης το οποίο περιείχε πρότυπη γλουταθειόνη για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, διάλυμα υποστρώματος και διάλυμα λύσις των κυττάρων καθώς και το ένζυμο GST. Το σετ αγοράστηκε από την εταιρία Sigma και για τη μέτρηση της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο μέτρησης σύμφωνα με τις προδιαγραφές της εταιρίας.

Κύτταρα LNCaP 40×10^6 συλλέχθηκαν με τη συνήθη διαδικασία αποκόλλησης κυττάρων από φλάσκες των 75 cm^2 στις οποίες είχαν καλλιεργηθεί. Έγιναν δυο πλύσεις των κυττάρων με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Ο όγκος του υποκείμενου συσσωματώματος μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης κατά την οποία απορρίφθηκε το διάλυμα πλύσης μετρήθηκε με τη βοήθεια κατάλληλου ογκομετρικού. Για τη διάλυση των κυττάρων απαιτούνται $150 \mu\text{l}$ διαλύματος λύσις ανά $65 \mu\text{l}$ όγκου κυττάρων. Για το λόγο αυτό ήταν απαραίτητο να γνωρίζουμε τον όγκο του

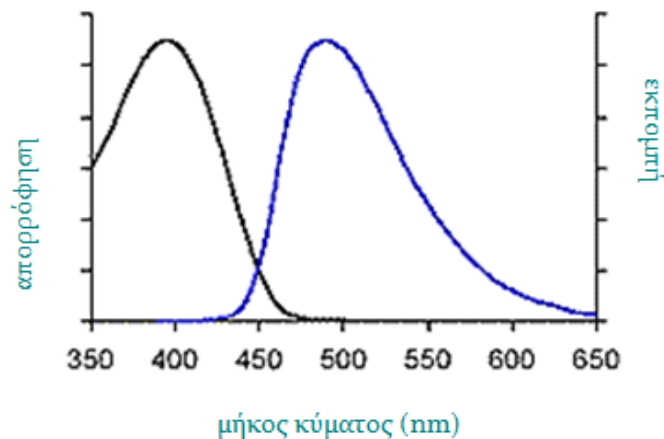
συσσωματώματος. Εάν ήταν μεγαλύτερος ο όγκος του διαλύματος λύσις αυξανόταν ανάλογα. Ακολουθούσε πολύ καλή ανάδευση του διαλύματος λύσις – κυττάρων με συσκευή vortex και κατόπιν επώζονταν σε πάγο για 15 min. Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης στον πάγο το διάλυμα φυγοκεντρείτο για 10 min στα 16,000 x g. Το υπερκείμενο διάλυμα συλλεγόταν και ακολουθούσε αμέσως η μέτρηση της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης.

Για τη μέτρηση ήταν απαραίτητο μαύρο πλακίδιο πολλαπλών θέσεων. Κάθε θέση πληρούταν με τον κατάλληλο, για την κάθε συνθήκη, όγκο ρυθμιστικού διαλύματος. Στη συνέχεια στις θέσεις των διαλυμάτων αναφοράς συμπληρωνόταν κατάλληλος όγκος διαλύματος γλουταθειόνης γνωστής συγκέντρωσης. Τα άγνωστα προς μέτρηση δείγματα τοποθετούταν στις αντίστοιχες θέσεις. Στη συνέχεια σε κάθε θέση έμπαινε το ένζυμο GST και τέλος το διάλυμα υποστρώματος με τον ιχνηθέτη για να ενεργοποιήσει την αντίδραση. Ακολουθούσε επώαση του πλακιδίου με τα άγνωστα δείγματα και τα δείγματα αναφοράς για 1 h στον επωαστικό κλίβανο στους 37° C. Η διάταξη και οι όγκοι κάθε διαλύματος και παράγοντα παραθέτονται στον Πίνακα 6.8.

Πίνακας 6.8 Διάταξη τοποθέτησης διαλυμάτων στο πλακίδιο για μέτρηση ενδοκυττάριας γλουταθειόνης.

Δείγμα	1 mM GSH μητρικό διάλυμα (μ l)	άγνωστο δείγμα (μ l)	ρυθμιστικό διάλυμα (μ l)	Ένζυμο GST (μ l)	διάλυμα υποστρώματος (μ l)
τυφλό	-	-	92.5	5	2.5
GSH 1.3 nmol	1.3	-	91.0	5	2.5
GSH 2.5 nmol	2.5	-	90.0	5	2.5
GSH 5 nmol	5	-	87.5	5	2.5
GSH 10 nmol	10	-	82.5	5	2.5
άγνωστο δείγμα		5	87.5	5	2.5

Η μέτρηση πραγματοποιείται στην φασματοφωτομετρική διάταξη πολλαπλών λειτουργιών στην οποία είχαν τοποθετηθεί κατάλληλα οπτικά φίλτρα για τη διέγερση και εκπομπή φθορισμού. Τα βέλτιστα σύμφωνα με το πρωτόκολλο, μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής ήταν $\lambda_{exc} = 390 \text{ nm}$ και $\lambda_{em} = 478 \text{ nm}$. Τα φίλτρα αντίστοιχα φίλτρα τα οποία προσαρτήθηκαν στη διάταξη ήταν: $\lambda_{exc} = 390 \text{ nm}$ και $\lambda_{em} = 470 \pm 12 \text{ nm}$. Η μέτρηση ελέγχθηκε από το λογισμικό το οποίο συνόδευε τη διάταξη.



Σχήμα 6.25: Φάσμα απορρόφησης και εκπομπής φθορισμού του ιχνηθέτη *monochlorobimane* συζευγμένου σε γλουταθειόνη σε pH=8.0

Η διαχείριση των μετρήσεων έγινε ως εξής. Από όλα τα δείγματα αφαιρέθηκε η τιμή φθορισμού του ρυθμιστικού διαλύματος με την GST και το διάλυμα υποστρώματος. Με βάση τις τιμές της έντασης φθορισμού και τις αντίστοιχες γνωστές συγκεντρώσεις γλουταθειόνης κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς γλουταθειόνης – έντασης φθορισμού. Με βάση την καμπύλη αυτή και το φθορισμό των δειγμάτων άγνωστης περιεχόμενης γλουταθειόνης γινόταν ο υπολογισμός τελικά της ποσότητας της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης των δειγμάτων.

6.8

Μεθοδολογία και σκεπτικό μελέτης αντιοξειδωτικής προστασίας έναντι φωτοεπαγομένου οξειδωτικού στρες

Κεντρικό αίτημα της παρούσας διατριβής αποτελούσε η βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής δράσης. Μια προσέγγιση στην κατεύθυνση αυτή αποτελούσε η εύρεση εκείνου του φυσικού μείγματος αντιοξειδωτικών το οποίο χορηγούμενο σε κατάλληλες συγκεντρώσεις θα συνέβαλε στην ενίσχυση της φωτοδυναμικής δράσης. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι ένα μείγμα φυσικών δευτερογενών μεταβολιτών δρα είτε προ-οξειδωτικά είτε αντιοξειδωτικά ανάλογα με τη συγκέντρωση χορήγησής του. Το πόσο ισχυρή είναι η προ-οξειδωτική ή αντιοξειδωτική του δράση του καθορίζεται από τη σύστασή του σε φλαβονοειδή, κυρίως σε πολυφαινόλες και είναι ανάλογη του αριθμού των υδροξυλομάδων στο μόριο του φλαβονοειδούς. Στην πραγματικότητα φαίνεται πως τα δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα είναι ταυτόχρονα υπεύθυνα και για την προ-οξειδωτική τους δράση.

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει συγκεντρώσει ένα φυσικό προϊόν προερχόμενο από το φλοιό του πεύκου *P.maritima* το οποίο φύεται στη Νότια Γαλλία, γνωστό με την εμπορική ονομασία *Ruscogenol*. Το προϊόν αυτό είναι ένα ισχυρότατο αντιοξειδωτικό μείγμα το οποίο χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής αλλά και ως φυσικό φάρμακο σε πολλές περιπτώσεις ασθενειών οι οποίες σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Αποτελείται κυρίως από φαινολικά συστατικά, αν και η κύρια σύστασή του δεν έχει αποσαφηνιστεί. Το φυσικό αυτό μείγμα πολυφαινολών όταν χορηγήθηκε σε άτριχους μύες τύπου SKH-HR1 και SKH-HR2 στους οποίους προκλήθηκε καρκινογένεση καθυστέρησε την εμφάνιση προκαρκινικών βλαβών, όπως ακτινική κεράτωση, αλλά και θηλωμάτων ενώ εμφάνισαν μικρότερο αριθμό μη μελανωματικών καρκίνων σε σχέση με τους μύες οι οποίοι δεν ελάμβαναν το μείγμα^[134].

Τα ευρήματα της μελέτης ήταν ιδιαίτερος σημαντικά και ενθαρρυντικά στο να αναζητηθεί παρόμοια δράση και σε εκχυλίσματα συστατικών πεύκων προερχομένων από δέντρα τα οποία φύονται σε ελληνικά εδάφη. Για το λόγο αυτό συλλέχθηκαν χλωρές και ξηρές βελόνες καθώς και φλοιός από έξι διαφορετικά είδη πεύκων που απαντώνται σε ελληνικά εδάφη για τα οποία έγινε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας με χημικές μεθόδους. Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε από το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών^[135]. Η ερευνητική ομάδα μας χορήγησε συστατικά (χλωρές και ξηρές βελόνες καθώς και φλοιός) τριών από τα πλέον ενδιαφέροντα είδη, *P.brutia*, *P.pinea* και *P.halepensis* σε λυοφιλοποιημένη μορφή με στόχο να τα ελέγξουμε ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα σε επίπεδο κυττάρου.

Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε πρωτογενής καλλιέργεια δερματικών κυττάρων προερχομένων από δέρμα νεογνών μυών τύπου SKH-HR1 και SKH-HR2. Κύτταρα του μοντέλου αυτού εκτέθηκαν σε οξειδωτικό στρες προερχόμενο από UV ακτινοβολία ενώ είχε προηγηθεί η επώασή τους με διάφορες συγκεντρώσεις των παραπάνω φυσικών μειγμάτων πολυφαινολών. Με μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με τον βιοχημικό έλεγχο MTT, 24 h μετά την έκθεση στη UV ακτινοβολία, προσδιοριζόταν η αντιοξειδωτική δράση κάθε συστατικού.

6.8.1

Πρωτόκολλο πρόκλησης οξειδωτικού στρες μέσω UV ακτινοβολίας και αντιοξειδωτικής προστασίας έναντι του φωτοεπαγομένου οξειδωτικού στρες

Κερατινοκύτταρα λαμβάνονται σύμφωνα με το πρωτόκολλο το οποίο περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 6.3.1.1. Μετά τη λήψη των κυττάρων 250000 κύτταρα τοποθετούνται σε τριβλίο εμβαδού 12.5 cm^2 , με θρεπτικό μέσο στο οποίο υπάρχει και φυσικό μείγμα πολυφαινολών από τα προαναφερθέντα συστατικά πεύκων. Ελέχθησαν τρεις

συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος $1\mu\text{g}/\text{ml}$, $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ και $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$. Η επώαση των κυττάρων με το διάλυμα θρεπτικού μέσου εκχυλίσματος διήρκησε για 48h. Το διάλυμα αυτό αναnevώθηκε στις 24h. Για την ακτινοβόληση των κυττάρων και την πρόκληση οξειδωτικού στρες, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο με το εκχύλισμα από το τριβλίο, έγιναν δυο πλύσεις των κυττάρων με φυσιολογικό ορό και προστέθηκαν σε κάθε τριβλίο 500μl PBS. Ακολούθησε η ακτινοβόληση των κυττάρων με τη διάταξη UV ακτινοβολίας.

Η μέση ισχύς εξόδου της διάταξης UV ακτινοβολίας ήταν $5\text{ mW}/\text{cm}^2$. Μετά από επανειλημμένους ελέγχους διαπιστώθηκε ότι αρκούν 3sec ακτινοβόλησης για να προκληθεί στα κερατινοκύτταρα οξειδωτικό στρες. Τα κύτταρα σε όλα τα πειράματα πρόκλησης οξειδωτικού στρες με UV ακτινοβολία δέχτηκαν συνολική ενέργεια $15\text{ mJ}/\text{cm}^2$.

Μετά το τέλος της ακτινοβόλησης, προστέθηκε στα κύτταρα φρέσκο διάλυμα θρεπτικού μέσου εκχυλίσματος και αφέθηκαν στον επωαστικό κλίβανο για 24h. Τότε έγινε εκτίμηση του οξειδωτικού στρες μέσω απεικονιστικής μικροσκοπίας και επεξεργασίας εικόνας αλλά και με μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων.

Οι μελέτες αυτές ανέδειξαν την αντιοξειδωτική υπεροχή του εκχυλίσματος προερχομένου από φλοιό του πεύκου *P.halepensis*. Κατόρθωσε να αναστείλει σχεδόν πλήρως την επαγομένη από τη UV ακτινοβολία κυτταροτοξικότητα κυρίως στη συγκέντρωση $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$. Τα εκχυλίσματα από τα υπόλοιπα συστατικά τόσο του ίδιου πεύκου όσο και των άλλων ειδών είτε δεν κατόρθωσαν να προστατεύσουν έναντι του φωτοεπαγομένου οξειδωτικού στρες είτε ήταν από μόνα τους τοξικά στα κύτταρα. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε για τις μελέτες της συνέργειας της φωτοδυναμικής με φυσικό μείγμα αντιοξειδωτικών το εκχύλισμα του φλοιού του πεύκου *P.halepensis*.

6.9

Μεθοδολογία λήψης εκχυλίσματος φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένου από φλοιό *P.halepensis*

Δείγματα φλοιού του πεύκου *P.halepensis* σε ικανές ποσότητες συλλέχθηκαν από την περιοχή της Πανεπιστημιούπολης, Ζωγράφου Αττικής, στους πρόποδες του Υμηττού, το έτος 2009. Της συλλογής του φλοιού ακολούθησαν σε πρώτη φάση η καταγραφή του βάρους του, ο καθαρισμός από επίφυτα και τέλος πλύσιμο. Ακολούθως έγινε κονιοποίηση του φλοιού και εκχύλιση στους 37°C για 48 hr. Κατόπιν έγινε διήθηση του υγρού σε βαμβάκι και συλλογή του διηθημένου διαλύματος. Ακολούθησε εξάτμιση του νερού σε ποσοστό 80 – 90 % σε rotor var υπό κενό. Από τη διαδικασία

αυτή προέκυψε ένα παχύρευστο κόκκινο υπόλειμμα το οποίο υπεβλήθη σε λυοφιλοποίηση και τέλος κονιοποίηση. Ο λυοφιλοποιημένος και κονιοποιημένος φλοιός *P.halepensis* διατηρείτο στους $-20^{\circ} C$ προφυλαγμένο από το φως.

Για την παρασκευή των διαλυμάτων φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένων από το λυοφιλοποιημένο φλοιό *P.halepensis* τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τόσο στις μελέτες σε επίπεδο κυττάρου όσο και στις μελέτες σε επίπεδο μυός καρκίνου του προστάτη ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία.

Μικρή ποσότητα λυοφιλοποιημένου και κονιοποιημένου φλοιού *P.halepensis* ζυγίζοταν σε ζυγό ακριβείας και διαλυόταν στο ρυθμιστικό διάλυμα PBS μετά από ζωνρή συνεχή ανάδευση σε συσκευή vortex. Στο αρχικό αυτό διάλυμα γινόταν διήθηση μέσω μηχανικού φίλτρου με διάμετρο πόρων $0.22 \mu m$ ώστε να ληφθεί το δυνατόν καθαρό διάλυμα απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς ή υπολείμματα κονιοποιημένου φλοιού. Στη συνέχεια από αυτό το μητρικό διάλυμα εκχυλίσματος φλοιού παρασκευαζόταν ενδιάμεσο διάλυμα σε PBS κατάλληλης συγκέντρωσης ώστε με διαδοχικές αραιώσεις να ληφθούν οι υπό έλεγχο κάθε φορά συγκεντρώσεις φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένου από φλοιό *P.halepensis*.

Αν και η σύσταση του μείγματος δεν έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια, μπορεί να σχετική βεβαιότητα να ειπωθεί πως αποτελείται από υψηλό ποσοστό πολυφαινολικών μεταβολιτών, πολύπλοκο μείγμα φλαβονολικών και φαινολικών οξέων, ενδεχομένων και από προανθοκυανιδίνες καθώς και από διάφορα άλλα φαινολικά οξέα.

6.10

Ανάπτυξη μεθόδων για μελέτες στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη

6.10.1

Πρωτόκολλο Ενδοϊστικής Φωτοδυναμικής Θεραπείας

Οι μελέτες σε κυτταρικό επίπεδο ανέδειξαν την υπεροχή της εγκλεισμένης λιποσωματικής *m*-THPC ως προς την ελεύθερη και έτσι ήταν αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη.

Ο μυς ναρκωνόταν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση γ -υδροξυβουτυρολακτόνης 50% σε φυσιολογικό ορό, ($\sim 20 \mu l$, $10 \mu l/g$ βάρους ζώου). Γινόταν ενδοφλέβια ένεση στην ουρά του ζώου $0.3 mg/kg$ εγκλεισμένης λιποσωματικής *m*-THPC 6h πριν την ακτινοβόληση. Η εγκλεισμένη λιποσωματική *m*-THPC χορηγήθηκε σε διάλυμα γλυκόζης 5% σε ενέσιμο νερό και $50 \mu l$ του διαλύματος αυτού χορηγήθηκαν ενδοφλέβια στην ουρά του ζώου. Τα

ζώα προστατεύονταν από το φως με μαύρα καλύμματα από τη στιγμή της χορήγησης του φωτοευαισθητοποιητή για την αποφυγή φωτοευαισθησίας.

Με την συμπλήρωση $6h$ από τη στιγμή χορήγησης του φωτοευαισθητοποιητή πραγματοποιείτο η ακτινοβόληση των όγκων. Με κατάλληλο χειρουργικό εργαλείο δημιουργείτο μικρή οπή στον όγκο μέσω της οποίας η οπτικής ίνας εισαγόταν μέσα στον όγκο σε βάθος $5mm$. Χρησιμοποιήθηκε το διοδικό laser στα $652nm$, η ισχύς εξόδου του ρυθμίστηκε με το ενεργόμετρο στα $145mW$ και μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές δόσεις ενέργειας 10, 15 και 30J.

Η κλινική εικόνα των ζώων καταγραφόταν καθόλη τη διάρκεια της παρακολούθησης ή μέχρι την ευθανασία του ζώου σε περίπτωση που αυτό κρινόταν απαραίτητο.

Η εξέλιξη της θεραπείας καταγραφόταν δυο φορές την εβδομάδα, λαμβάνοντας εικόνες με την απεικονιστική διάταξη και μετρώντας τις διαστάσεις των όγκων με μικρόμετρο από τις οποίες προέκυπτε το μέγεθος του όγκου. Για την εκτίμηση του θεραπευτικού αποτελέσματος θεωρήθηκε η σχετική αλλαγή του όγκου σε κάθε χρονικό διάστημα σε σχέση με το μέγεθος που είχε ακριβώς πριν τη θεραπεία. Η απόκριση των όγκων στα διάφορα θεραπευτικά σχήματα παρουσιάζεται γραφικά σε διαγράμματα της % αλλαγής του όγκου ως προς το χρόνο μετά τη θεραπεία.

6.10.2

Πρωτόκολλο συνδυαστικής δράσης της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών

Κατά τη μελέτη της συνδυαστικής δράσης της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας με το εκχύλισμα του φλοιού του πεύκου *P. halepensis* ελέχθησαν δυο συγκεντρώσεις $100 \mu g/ml$ και $1 mg/ml$. Στους μύες το φυσικό μείγμα πολυφαινολών χορηγήθηκε ενέσιμα, απευθείας μέσα στον όγκο, $1h$ πριν την ακτινοβόληση κατά την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία, ώστε να εξασφαλιστεί μέγιστη συγκέντρωσή του στον καρκινικό όγκο. Ακολούθησε το πρωτόκολλο της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας με δόση ενέργειας 15J, και η παρακολούθηση και αξιολόγηση του αποτελέσματος.

6.10.3

Παρακολούθηση όγκων και αξιολόγηση θεραπείας

Πριν την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία ή οποιαδήποτε επέμβαση στους μύες λαμβάνονται εικόνες από την περιοχή του όγκου για να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα της θεραπείας. Επιπλέον καταγράφονταν οι διαστάσεις του όγκου με μικρόμετρο.

Μετρούνταν οι δύο μεγαλύτερες διαμέτροι του όγκου (σε ορθή γωνία) καθώς και το ύψος του όγκου. Στους SCID μύες όταν γινόταν υποδόρια εμφύτευση καρκινικών κυττάρων ο όγκος αναπτυσσόταν κατά ύψος, ανάμεσα στο δέρμα και στο μύ του ζώου, χωρίς να γίνεται διήθησή του στο μύ (παρά μόνο σε περίπτωση μετάστασης). Έτσι ήταν δυνατό να μετρηθεί το ύψος του όγκου.

Εικόνες και μετρήσεις του όγκου λαμβάνονταν δυο φορές την εβδομάδα. Για τον υπολογισμό του μεγέθους του όγκου, καθώς το σχήμα του προσεγγίστηκε από το ελλειψοειδές μοντέλο, χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$V_{\text{όγκου}} (mm^3) = \pi/6 * (d_1 * d_2 * h)$$

όπου d_1 και d_2 οι διάμετροι και h το ύψος.

Η παρακολούθηση των ζώων διήρκεσε 30 ημέρες, εκτός όπου κρίθηκε ότι οι όγκοι είχαν μεγαλώσει πολύ, στα ζώα γινόταν ευθανασία για ηθικούς λόγους.

Υπολογιζόταν η σχετική αλλαγή στο μέγεθος του όγκου ως προς το μέγεθός του πριν τη θεραπεία. Ο υπολογισμός της σχετικής αλλαγής γινόταν με τον τύπο: $(V_t - V_0)/V_0$ όπου V_t είναι το μέγεθος του όγκου κάθε t χρονική στιγμή παρακολούθησης και V_0 το μέγεθος του όγκου την ημέρα 0, ακριβώς πριν τη θεραπεία. Η απόκριση των όγκων στα διάφορα θεραπευτικά σχήματα γινόταν αναπαριστώντας γραφικά τη σχετική αλλαγή του μεγέθους του όγκου ως προς το χρόνο μετά τη θεραπεία.

Κεφάλαιο VII

Αποτελέσματα & Συμπεράσματα

Μελετών στο «Μοντέλο Κυττάρου»

7.1

Αποτελέσματα μελέτης φωτοφυσικών ιδιοτήτων της ελεύθερης και της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC

Η 5,10,15,20-τέτρα(3-υδροξυφαινυλ)χλωρίνη (5,10,15,20-tetrakis(3-hydroxy phenyl) chlorin, m-THPC ή Temoporfin) είναι ο πλέον αποτελεσματικός φωτοευαισθητοποιητής 2^{ης} γενιάς με μήκος κύματος διέγερσης στα 652 nm. Εμφανίζει μεγάλη επιλεκτικότητα στον καρκινικό όγκο (συγκέντρωση στον όγκο /συγκέντρωση στον υγιή ιστό ~100/1) και υψηλή κβαντική απόδοση με μικρή δόση χορήγησης και χαμηλές δόσεις ενέργειας ακτινοβολίας. Θεωρείται, βάσει κλινικών μελετών, έως και 200 φορές πιο αποτελεσματική σε σχέση με την Photofrin, τον πλέον γνωστό και ευρέως χρησιμοποιούμενο 1^{ης} γενιάς φωτοευαισθητοποιητή. Το διάστημα παραμένουσας φωτοευαισθησίας έχει αναφερθεί ότι μπορεί να διαρκέσει έως και 2 εβδομάδες μετά τη χορήγησή της. Η m-THPC έχει πάρει έγκριση από την Ευρωπαϊκή Ένωση για φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνων της κεφαλής και του τραχήλου, ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει για την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου του προστάτη όπου πλέον επικεντρώνονται οι μελέτες^[14, 136, 137].

Όπως οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς, έτσι και η m-THPC είναι ένα εξαιρετικά υδρόφοβο μόριο^[138]. Μολονότι η υδρόφοβη φύση διευκολύνει τη

συγκέντρωση του μορίου στις μεμβράνες ενδοκυττάρων οργανιδίων, εμποδίζει ταυτόχρονα τη διαλυτότητα της m-THPC σε βιολογικά μέσα, όπως για παράδειγμα στο αίμα^[139, 140]. Οι υδρόφοβοι φωτοευαίσθητοποιητές συσσωματώνονται ισχυρά σε υδατικά μέσα γεγονός που περιορίζει τη βιοδιαθεσιμότητά τους και την επιλεκτική συγκέντρωσή τους στον καρκινικό όγκο^[141]. Επιπροσθέτως, τα συσσωματώματα καταστέλλουν την κβαντική απόδοση των φωτοευαίσθητοποιητών καθιστώντας ανεπαρκή την παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών, άρα μειώνουν τη φωτοδυναμική δράση^[27]. Η έρευνα έχει στραφεί στη χρήση νανοσωματιδίων ως συστημάτων μεταφοράς φωτοευαίσθητοποιητών καθώς αυτά έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρουν τα μόρια του φωτοευαίσθητοποιητή στον καρκινικό όγκο χωρίς να συσσωματώνονται, με στοχευμένη επιλεκτικότητα, βελτιώνοντας με τον τρόπο αυτό τη φωτοδυναμική δράση^[35, 48, 142].

Τα λιποσώματα είναι το προσφιλέστερο ίσως σύστημα μεταφοράς καθώς διαθέτουν τόσο συνθετικά (κατασκευαστικά) όσο και λειτουργικά συγκριτικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα υπόλοιπα νανοσωματιδιακά συστήματα μεταφοράς. Μπορούν να ενθυλακώσουν μεγάλες ποσότητες υδρόφοβων μορίων και να διαχέονται μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας χωρίς να δημιουργούνται συσσωματώματα^[60, 141]. Επιπλέον, καθώς έχουν την τάση να ενώνονται με υποδοχείς λιποπρωτεϊνών και σε συνδυασμό με το φαινόμενο της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης (enhanced permeability and retention, EPR) ενισχύουν τη συγκέντρωση υδρόφοβων φωτοευαίσθητοποιητών στον καρκινικό όγκο^[35, 60, 143]. ***Επομένως η φωτοδυναμική δράση θα μπορούσε να βελτιωθεί με τη χρήση εγκλεισμένων σε λιποσώματα φωτοευαίσθητοποιητών καθώς αφενός οι μορφές αυτές αποτρέπουν τη συσσωμάτωση των μορίων οπότε η κβαντική τους απόδοση δεν μειώνεται αφετέρου διευκολύνεται η συγκέντρωση μεγαλύτερης ποσότητας στον καρκινικό ιστό^[60].***

Η πρώτη λιποσωματική μορφή της m-THPC ήταν η Foslip, η οποία βασίστηκε σε συμβατικά μονοστοιβαδικά (unilamellar) λιποσώματα τύπου L-α-διπαλμιτοϋλογλυκεροφωσφατιδυλχολίνης (dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC) / διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλογλυκερόλης (dipalmitoylphosphatidylglycerol, DPPG), με αναλογία m-THPC:λιποσωμάτων 1:12 και αναλογία DPPC:DPPG 9:1 (w/w). Στη συνέχεια αναπτύχθηκε η στερεοχημικά σταθεροποιημένη μορφή Fospeg, η οποία επιπλέον στη σύστασή της περιέχει και το υδρόφιλο πολυμερές πολυαιθυλενογλυκόλη (polyethylene glycol, PEG) συζευγμένη με διστεαροϋλοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (distearoylphosphatidylethanolamine, DSPE), όπου η αναλογία DPPC:DSPE-PEG είναι 9:1 (w/w) και η αναλογία m-THPC:λιποσωμάτων 1:13 ^[138, 144]. Η προσθήκη πολυαιθυλενογλυκόλης σταθεροποιεί τη δομή του λιποσώματος, εμποδίζει περαιτέρω τη συσσωμάτωσή τους και αποτρέπει την αλληλεπίδραση του λιποσώματος με

πρωτεΐνες του πλάσματος εξασφαλίζοντας μεγαλύτερο χρόνο ζωής στην κυκλοφορία του αίματος άρα τελικά και υψηλότερη συγκέντρωση στον καρκινικό όγκο λόγω του φαινομένου ενισχυμένης διαπερατότητας κατακράτησης^[143, 145].

Σε όλα τα στάδια των μελετών χρησιμοποιήθηκε ο φωτοευαισθητοποιητής m-THPC. Για να διερευνηθεί η επίδραση του εγκλεισμού της σε λιποσώματα στις φωτοφυσικές και φωτοδυναμικές της ιδιότητες χρησιμοποιήθηκε η λιποσωματική μορφή με την επικάλυψη PEG, δηλ η Fospeg. Η ελεύθερη και η εγκλεισμένη λιποσωματική μορφή ήταν προσφορά από την εταιρία Biolitec. Η ελεύθερη m-THPC ήταν σε μορφή σκόνης ενώ η εγκλεισμένη λιποσωματική σε υδατικό διάλυμα.

7.1.1

Φάσματα απορρόφησης ελεύθερης και εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC

Στο πρώτο στάδιο των φωτοφυσικών μελετών καταγράφηκαν τα φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης λιποσωματικής μορφής της m-THPC σε οργανικούς διαλύτες όπως το δι-μεθυλ-σουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide, DMSO) και η αιθανόλη (ethanol, EtOH) αλλά και ανόργανους, όπως το πλήρες θρεπτικό μέσο επώασης των κυττάρων. Το πλήρες θρεπτικό μέσο αποτελείται από θρεπτικό μέσο RPMI 1640, εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοδιού, Fetal Bovine Serum, FBS και 0.1% Antibiotic-Antimitotic.

Για τις μελέτες της ελεύθερης m-THPC σε αιθανόλη, DMSO και πλήρες θρεπτικό μέσο παρασκευάστηκε μητρικό διάλυμα σε αιθανόλη συγκέντρωσης $1.5 \times 10^{-3} M$. Τα μητρικά διαλύματα φυλάσσονταν σε απόλυτο σκοτάδι σε θερμοκρασία $4 - 8 \text{ }^\circ C$. Η εγκλεισμένη λιποσωματική μορφή φυλασσόταν σε διάλυμα συγκέντρωσης $2.2 \times 10^{-3} M$ το οποίο επίσης διατηρείτο στους $4 - 8 \text{ }^\circ C$ σε απόλυτο σκοτάδι.

Με βάση αυτά τα μητρικά διαλύματα παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις διαλύματα ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC σε DMSO, αιθανόλη και πλήρες θρεπτικό μέσο συγκεντρώσεων $10^{-6} M$ και $5 \times 10^{-6} M$. Τα φάσματα απορρόφησης καταγράφηκαν με τη φασματοφωτομετρική διάταξη μέτρησης απορρόφησης. Προκειμένου να ληφθούν τα φάσματα τα διαλύματα μεταγγίζονταν σε πλαστικές κυβέττες απορρόφησης με χωρητικότητα $4.5 ml$ (ο όγκος του διαλύματος ήταν $3 ml$) κατάλληλες για σάρωση στην υπεριώδη και στην ορατή περιοχή του φάσματος. Σε κάθε μέτρηση με διαφορετικό διαλύτη προηγείτο ο μηδενισμός του σήματος για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω της απορρόφησης αυτού καθώς και του θορύβου του οργάνου και στη συνέχεια λαμβάνονταν τα φάσματα απορρόφησης κάθε διαλύματος με σάρωση στην υπεριώδη και ορατή περιοχή του φάσματος $300 - 700 nm$. Η ταχύτητα σάρωσης παρέμενε σταθερή καθόλες τις μετρήσεις στα $480 nm/min$.

Η διαδικασία ολοκληρωνόταν βάσει των εξής βημάτων:

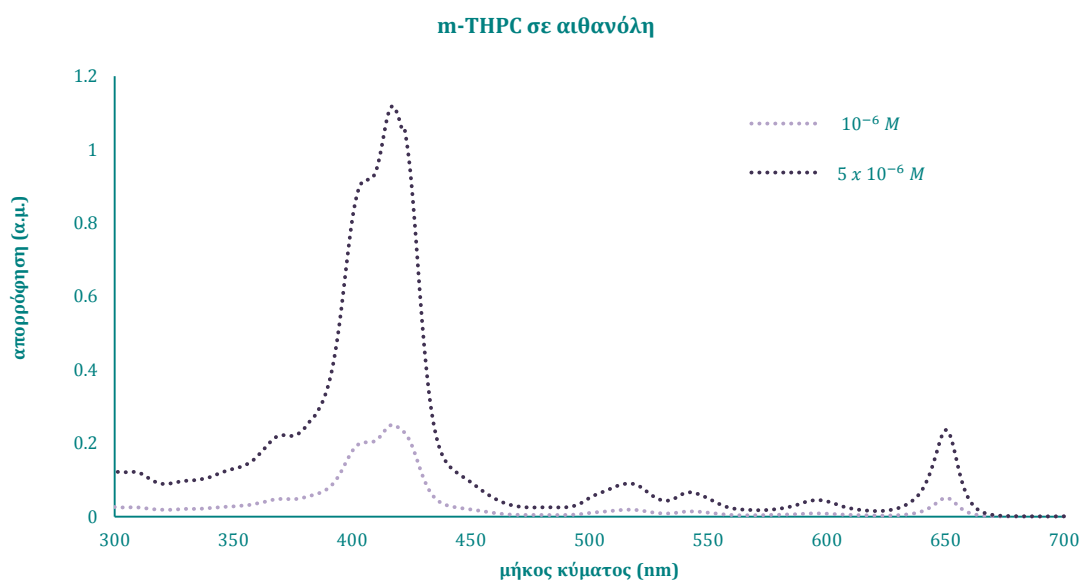
Τοποθετείτο στο φασματοφωτόμετρο ζεύγος κυβεττών με όμοιο περιεχόμενο, τον εκάστοτε διαλύτη, προκειμένου να καταγραφεί το σήμα λόγω της απορρόφησής του αλλά και του θορύβου του οργάνου. Λαμβανόταν και αποθηκευόταν το σήμα απορρόφησης το φάσμα 300 – 700 nm το οποίο και αποτελούσε το σήμα μηδενισμού. Το σήμα αυτό αφαιρείτο από όλα τα ακόλουθα φάσματα διαλυμάτων που αφορούσαν τον ίδιο διαλύτη.

Αντικαθίστατο στη συνέχεια η μια εκ των δυο κυβεττών με νέα, περιέχουσα το προς μέτρηση διάλυμα κυβέττα και πραγματοποιείτο η σάρωση σε όλο τα μήκη κύματος 300 – 700 nm ώστε να ληφθεί το φάσμα απορρόφησης κάθε διαλύματος.

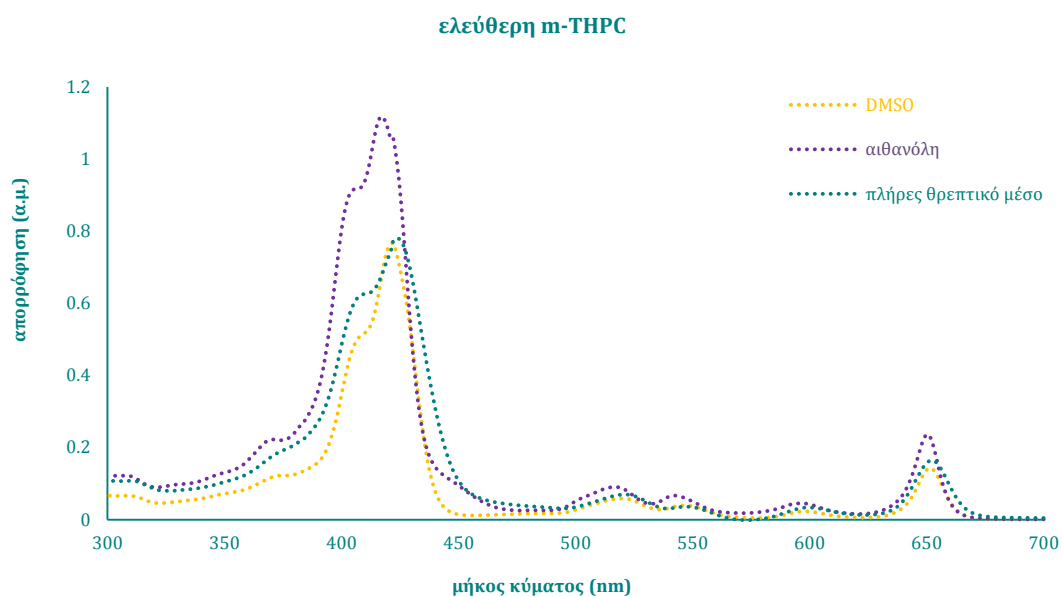
Η διαδικασία επαναλαμβάνόταν τρεις φορές για κάθε διάλυμα και τα τελικά φάσματα απορρόφησης στον εκάστοτε διαλύτη προέκυπταν από το μέσο όρο της απορρόφησης σε κάθε μήκος κύματος για κάθε μια από τις τρεις μετρήσεις.

7.1.1.1

Φάσματα απορρόφησης ελεύθερης m-THPC σε διαφορετικούς διαλύτες



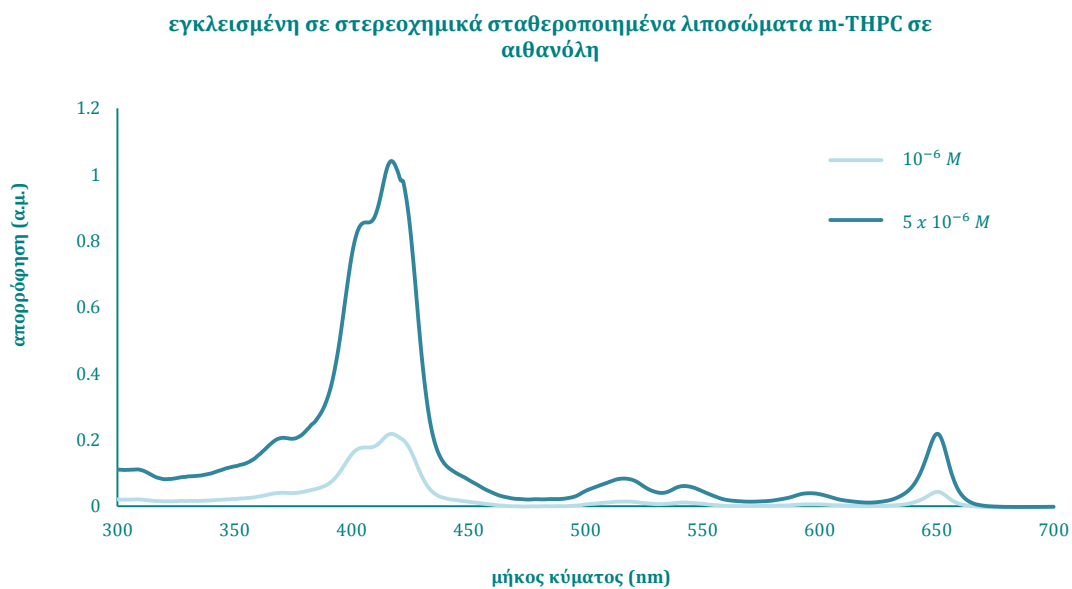
Σχήμα 7.1: Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων ελεύθερης m-THPC δυο διαφορετικών συγκεντρώσεων σε αιθανόλη.



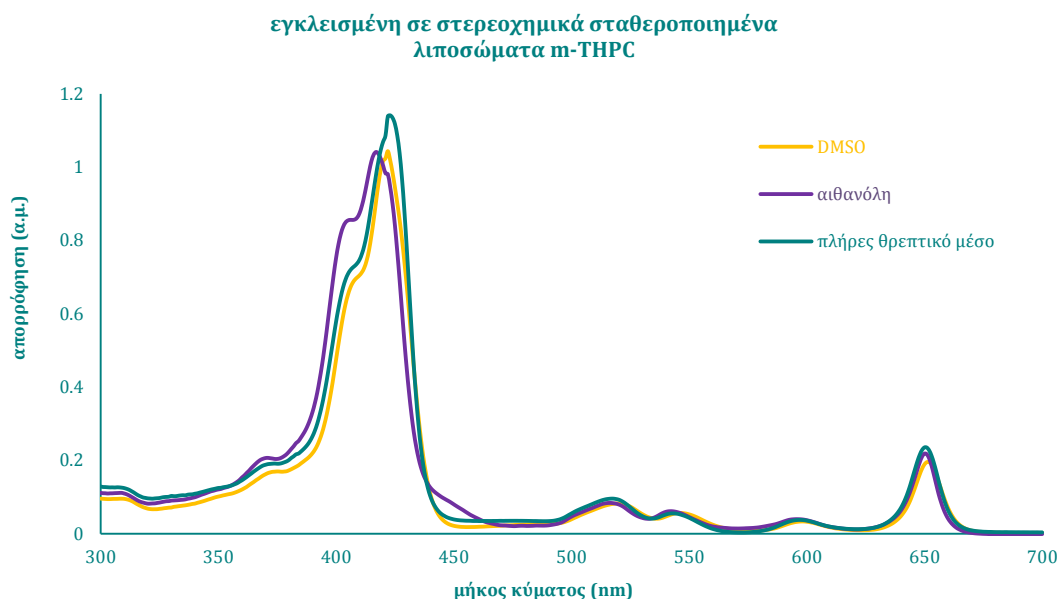
Σχήμα 7.2: Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων ελεύθερης *m*-THPC, $5 \times 10^{-6} M$, σε DMSO, αιθανόλη και πλήρες θρεπτικό μέσο

7.1.1.2

Φάσματα απορρόφησης εγκλεισμένης λιποσωματικής *m*-THPC σε διαφορετικούς διαλύτες



Σχήμα 7.3: Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα *m*-THPC σε αιθανόλη.



Σχήμα 7.4: Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC, $5 \times 10^{-6} M$, σε DMSO, αιθανόλη και πλήρες θεραπευτικό μέσο

7.1.1.3

Συμπεράσματα

Για τις δυο μορφές της m-THPC, την ελεύθερη και την εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα, παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.1 το μήκος κύματος απορρόφησης στην περιοχή Soret καθώς και ο αντίστοιχος μοριακός συντελεστής απορρόφησης, ϵ , σε κάθε διαλύτη για συγκέντρωση m-THPC $5 \times 10^{-6} M$.

Πίνακας 7.1: Μέγιστα απορρόφησης ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC, $5 \mu M$, στην περιοχή Soret και οι αντίστοιχοι μοριακοί συντελεστές απορρόφησης στους τρεις διαφορετικούς διαλύτες.

	ελεύθερη m-THPC		εγκλεισμένη λιποσωματική m-THPC	
	$\lambda_{max}(nm)$	$\epsilon (cm^{-1} M^{-1})$	$\lambda_{max}(nm)$	$\epsilon (cm^{-1} M^{-1})$
DMSO	422	153655.4	422	208749.4
αιθανόλη	417	223592	417	208296.0
πλήρες θεραπευτικό μέσο	424	156085.4	423	228285.4

Ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης υπολογίστηκε βάσει του νόμου του Beer για αραιά διαλύματα:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) * C * d$$

όπου C η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα (M), d το πάχος του δείγματος (cm) και ε ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης ($cm^{-1} M^{-1}$)

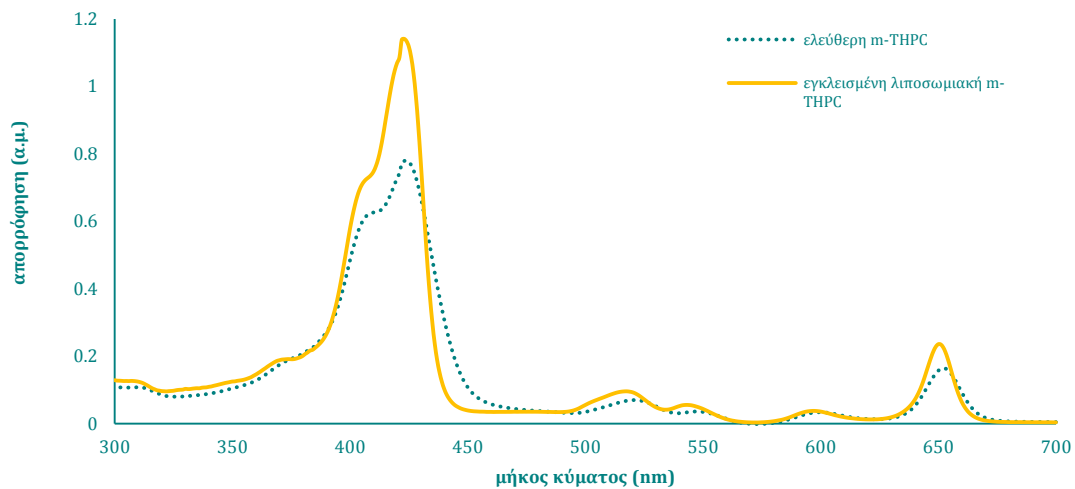
Σε όλους τους διαλύτες η ελεύθερη m-THPC διατηρεί τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματός της, με δυο κύριες κορυφές. Η πρώτη απαντάται στην Soret περιοχή, περίπου στα 420 nm , ενώ η δεύτερη στην περιοχή του κόκκινου περίπου στα 650 nm . Η χρήση του DMSO και του πλήρους θρεπτικού μέσου ως διαλυτών της m-THPC είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της απορρόφησης στη Soret περιοχή. Ο μεγαλύτερος μοριακός συντελεστής απορρόφησης παρατηρείται όταν η αιθανόλη χρησιμοποιείται ως διαλύτης ($223592\text{ cm}^{-1} M^{-1}$) ενώ μειώνεται κατά περίπου 30% στους υπόλοιπους δύο. Η παρατήρηση αυτή, η μείωση δηλαδή της απορρόφησης στην περιοχή Soret καθώς και η μείωση του μοριακού συντελεστή απορρόφησης στην ίδια περιοχή είναι αποτέλεσμα της συσσωμάτωσης των μορίων της m-THPC σε υδατικά μέσα^[146, 147].

Το φάσμα απορρόφησης, της εγκλεισμένης σε λιποσώματα με επικάλυψη PEG m-THPC και στους τρεις διαλύτες, διατηρεί τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματος απορρόφησης της m-THPC. Αντίθετα ωστόσο από την ελεύθερη m-THPC δε φαίνεται να επηρεάζεται από το μέσο στο οποίο διαλύεται, καθώς και στους τρεις διαλύτες η απορρόφηση στην περιοχή Soret όπως και οι αντίστοιχοι μοριακοί συντελεστές απορρόφησης είναι παρόμοιοι. Η εγκλεισμένη λιποσωματική m-THPC διατηρεί υψηλό μοριακό συντελεστή απορρόφησης ακόμα και όταν ως διαλύτης χρησιμοποιείται το πλήρες θρεπτικό μέσο το οποίο είναι εμπλουτισμένο με FBS. Το FBS (Foetal Bovine Serum, Εμβρυϊκός Ορός Βοΐου) είναι ένας αυξητικός παράγοντας πλούσιος σε πρωτεΐνες ο οποίος ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Θεωρείται ότι προκαλεί ισχυρή συσσωμάτωση στα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή.

Η διαφορά στα φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC όταν το πλήρες θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης φαίνεται χαρακτηριστικά στο Σχήμα 7.5.

Στην ίδια συγκέντρωση m-THPC στο πλήρες θρεπτικό μέσο η εγκλεισμένη λιποσωματική μορφή διατηρεί μεγαλύτερη απορρόφηση και μεγαλύτερο μοριακό συντελεστή απορρόφησης σε σύγκριση με την ελεύθερη. **Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι τα μόρια της εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC συσσωματώνονται σε μικρότερο ποσοστό άρα η βιοδιαθεσιμότητα του φωτοευαισθητοποιητή έχει βελτιωθεί.**

φάσματα απορρόφησης των δυο μορφών m-THPC σε πλήρες θρεπτικό μέσο



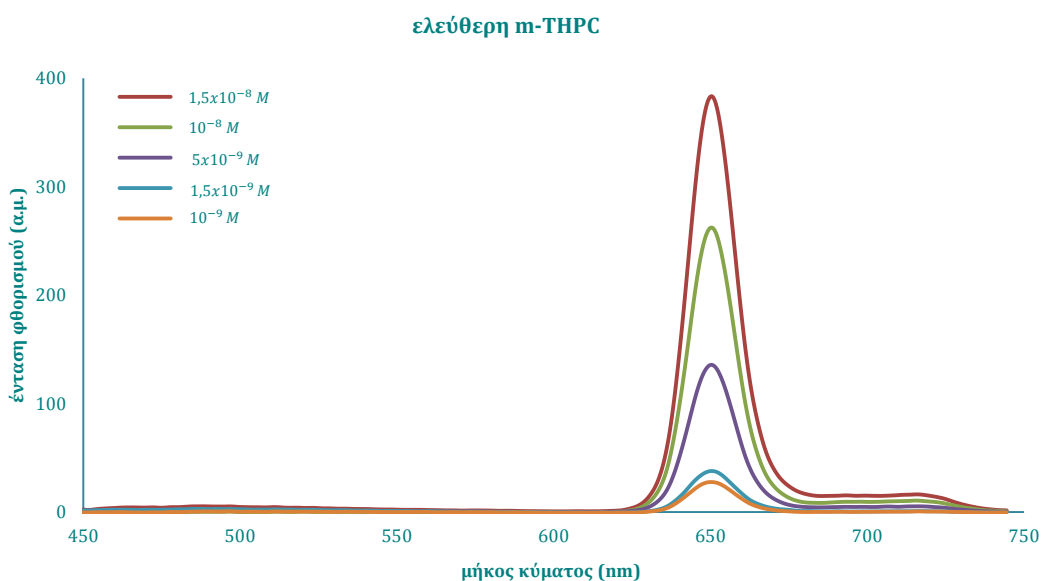
Σχήμα 7.5: Φάσματα απορρόφησης ελεύθερης και εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC ($5 \times 10^{-6} M$) σε πλήρες θρεπτικό μέσο.

7.1.2

Φάσματα φθορισμού ελεύθερης και εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC

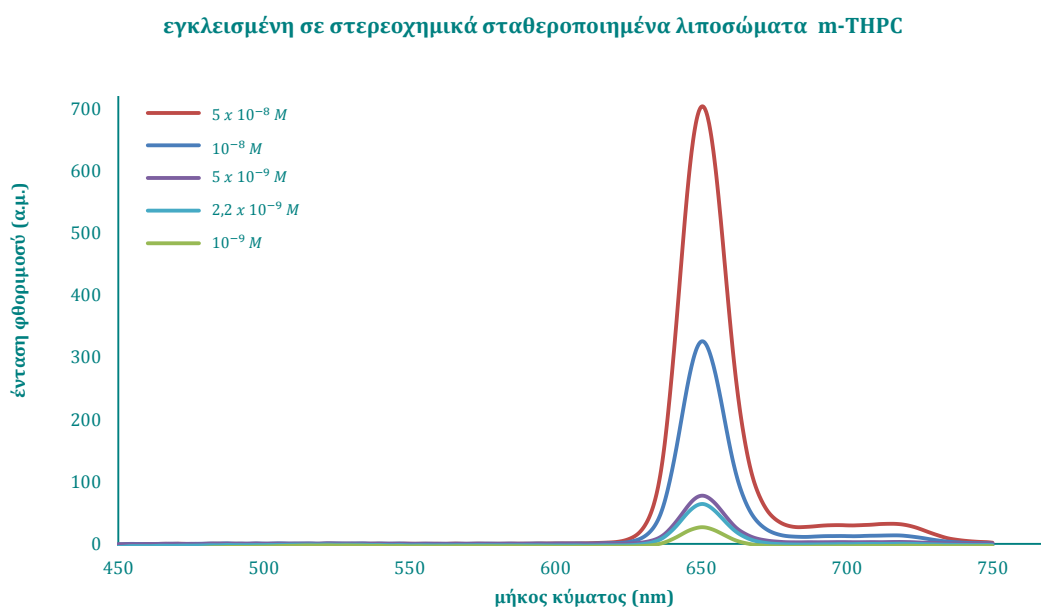
Για να μελετηθεί περαιτέρω η φωτοφυσική συμπεριφορά της ελεύθερης και της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC ελήφθησαν και τα φάσματα απορρόφησης κάθε μιας από τις δυο μορφές. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ισοπροπανόλης με 10% Triton X (επιφανειοδραστικός παράγοντας ο οποίος διευκολύνει τη λύση των κυττάρων) και 3×10^4 LNCaP κύτταρα/ml και βάση αυτού έγιναν οι μελέτες της πρόσληψης των δυο μορφών m-THPC από τα κύτταρα. Τα φάσματα φθορισμού κατεγράφησαν με τη φασματοφωτομετρική διάταξη μέτρησης φθορισμού. Τα διαλύματα μεταγγίζονταν σε πλαστικές κυβέτες φθορισμού των 4.5 ml, κατάλληλες για σάρωση στην υπεριώδη και στην ορατή περιοχή, οι οποίες πληρούνταν με 3 ml διαλύματος προκειμένου να ληφθούν τα φάσματα φθορισμού. Απαρχή κάθε μέτρησης αποτελούσε ο μηδενισμός του σήματος λόγω φθορισμού του διαλύτη καθώς και του θορύβου του οργάνου. Η ταχύτητα σάρωσης παρέμενε σταθερή σε όλα τα πειράματα, 480 nm/min.

Η m-THPC παρουσιάζει δυο κορυφές απορρόφησης, στα 420 nm και στα 650 nm. Ως μήκος κύματος διέγερσης χρησιμοποιήθηκαν τα 420 nm καθώς εάν χρησιμοποιούνταν τα 650 nm θα συνέπιπταν με την κορυφή φθορισμού η οποία επίσης εντοπίζεται περίπου στα 650 nm και ο διαχωρισμός των σημάτων θα ήταν αδύνατος. Το



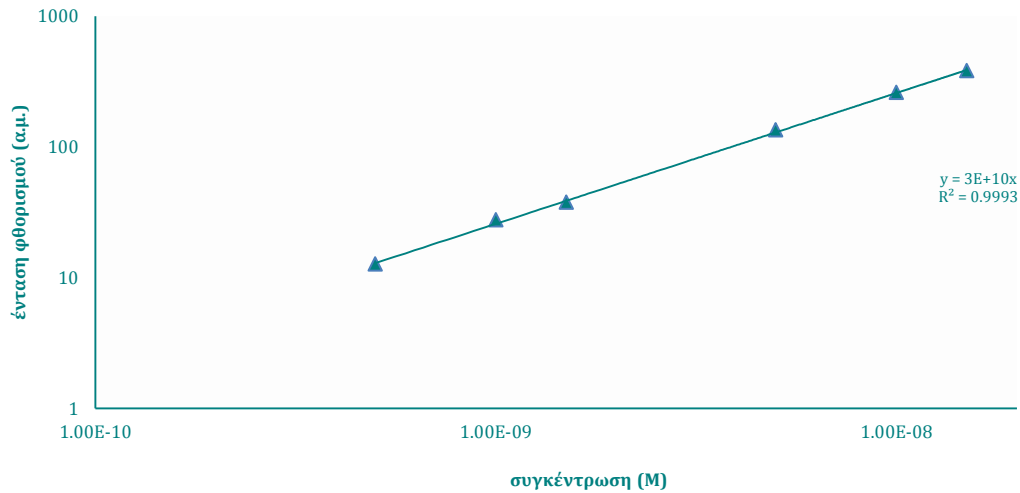
Σχήμα 7.6: Φάσματα έντασης φθορισμού ελεύθερης m-THPC με διέγερση στα 420 nm.

άνοιγμα του μονοχρωμάτορα διέγερσης όπως και του αντίστοιχου εκπομπής στη φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού είναι 10 nm, με συνέπεια την αδυναμία διαχωρισμού του φωτός διέγερσης στα 650 nm από τον εκπεμπόμενο φθορισμό στα 650 nm.



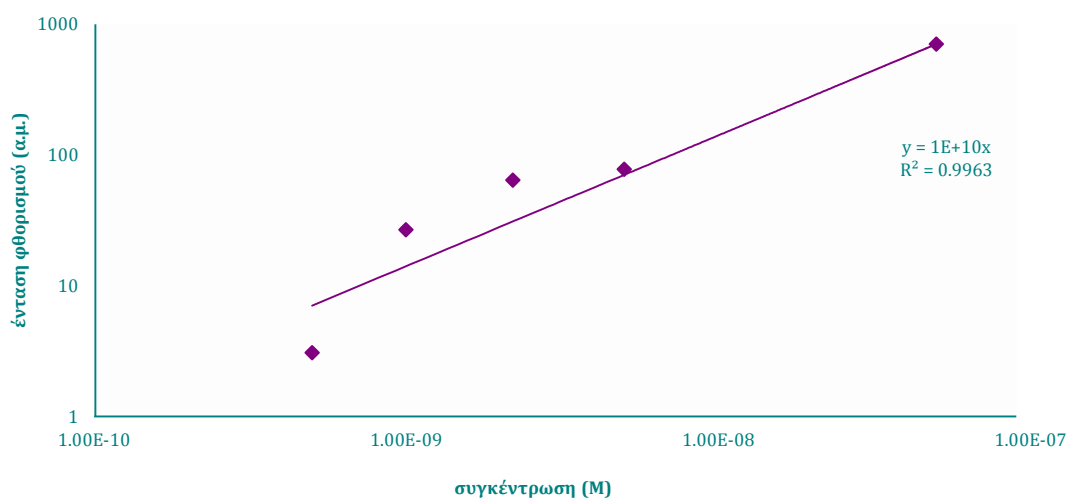
Σχήμα 7.7: Φάσματα έντασης φθορισμού εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιπосώματα m-THPC με διέγερση στα 420 nm.

Και για τις δυο μορφές κατασκευάστηκαν διαγράμματα έντασης φθορισμού ως προς τη συγκέντρωση της *m*-THPC (Σχήματα 7.8 και 7.9).



Σχήμα 7.8: Διάγραμμα συγκέντρωσης - έντασης φθορισμού ελεύθερης *m*-THPC στα 650 nm με διέγερση στα 420 nm.

Το φάσμα φθορισμού και για τις δύο μορφές διατηρεί τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματος φθορισμού της *m*-THPC με μέγιστο εκπομπής φθορισμού στα 650 nm. Για το συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων το σήμα φθορισμού είναι γραμμικά ανάλογο με την ένταση του φθορισμού. Τα διαγράμματα συγκέντρωσης - έντασης φθορισμού χρησιμοποιήθηκαν ως καμπύλες αναφοράς για τον προσδιορισμό της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φωτοευαίσθητοποιητή στις αντίστοιχες μελέτες.



Σχήμα 7.9: Διάγραμμα συγκέντρωσης - έντασης φθορισμού εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα *m*-THPC στα 650 nm με διέγερση στα 420 nm.

7.2

Αποτελέσματα μελετών επίδρασης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Προκειμένου να μελετηθούν οι φωτοδυναμικές ιδιότητες των δυο μορφών φωτοευαισθητοποιητή κρίθηκε αναγκαίο να εξασφαλιστεί ότι καμία από τις δυο μορφές, σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, δεν ήταν τοξική στα κύτταρα. Δηλαδή, καμία από τις δυο μορφές δεν επάγει κυτταρικό θάνατο όταν επωάζονται με αυτές τα κύτταρα απουσία φωτός διέγερσης. Για το λόγο αυτό κύτταρα της καρκινικής σειράς LNCaP, τα οποία καλλιεργήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε, επώαστηκαν με μια σειρά συγκεκριμένων συγκεντρώσεων ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC και μετρήθηκε η βιωσιμότητά τους με το βιοχημικό έλεγχο μέτρησης βιωσιμότητας MTT.

Η διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

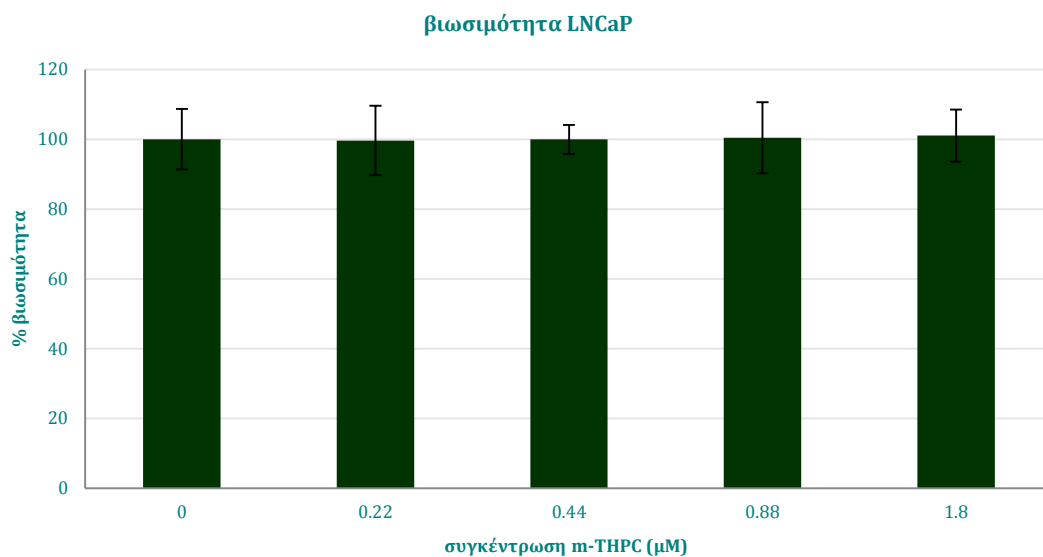
Αρχικά παρασκευάστηκαν μητρικά διαλύματα των δυο μορφών φωτοευαισθητοποιητή συγκέντρωσης 22μM. Η ελεύθερη m-THPC διατίθεται σε μορφή σκόνης και αρχικό διάλυμα αυτής παρασκευάζεται διαλύοντάς την σε απόλυτη αιθανόλη. Στη συνέχεια για να προκύψει το μητρικό διάλυμα αυτής, συγκέντρωσης 22μM, χρησιμοποιείται ως διαλύτης το ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Η εγκλεισμένη λιποσωματική m-THPC διατίθεται σε διάλυμα οπότε για την παρασκευή του μητρικού διαλύματος χρησιμοποιείται ως διαλύτης το πλήρες θρεπτικό μέσο. Με διαδοχικές αραιώσεις των μητρικών διαλυμάτων, σε πλήρες θρεπτικό μέσο, προέκυπταν τα διαλύματα πλήρους θρεπτικού μέσου-φωτοευαισθητοποιητή με τα οποία επωάζονταν τα κύτταρα.

Συγκεκριμένα, LNCaP κύτταρα επώαστηκαν για 24h με 0.22, 0.44, 0.88 και 1.8μM ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC. Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης των κυττάρων με τα διαλύματα των δύο μορφών του φωτοευαισθητοποιητή απορρίφθηκε το πλήρες θρεπτικό μέσο με τον φωτοευαισθητοποιητή και ακολουθούσαν δυο πλύσεις των κυττάρων με το ρυθμιστικό διάλυμα με στόχο να απομακρυνθούν τα υπολείμματα m-THPC τα οποία δεν είχαν απορροφηθεί από τα κύτταρα. Φρέσκο πλήρες θρεπτικό μέσο προσθέτοταν στα κύτταρα και ακολουθούσε επώαση για 24h ώστε να δοθεί ο χρόνος για να ολοκληρωθούν οι ενδεχόμενες κυτταροτοξικές αντιδράσεις οφειλόμενες στην επώαση με τον φωτοευαισθητοποιητή.

Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης με το πλήρες θρεπτικό μέσο εφαρμοζόταν το πρωτόκολλο του βιοχημικού ελέγχου μέτρησης βιωσιμότητας MTT με στόχο την εκτίμηση της κυτταρικής θνησιμότητας που προκαλείται κατόπιν της επώασης με τον φωτοευαισθητοποιητή.

Οι μετρήσεις βιωσιμότητας αποκάλυψαν ότι οι παραπάνω συγκεντρώσεις ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC δεν επάγουν κυτταροτοξικότητα στα LNCaP κύτταρα, καθώς η βιωσιμότητά τους δεν επηρεάστηκε στο παραμικρό από την επώαση με αυτές. Ενδεικτικά στο παρακάτω Σχήμα 7.10 παρατίθεται το διάγραμμα βιωσιμότητας – συγκέντρωσης εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC.

Όλες οι μετρήσεις γίνονταν τρεις φορές και στο διάγραμμα του Σχήματος 7.10 παρουσιάζεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων.



Σχήμα 7.10: Διάγραμμα συγκέντρωσης m-THPC – βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων, μετά από 24h επώασης με την εγκλεισμένη λιποσωματική m-THPC.

Η φωτοδυναμική δράση εξαρτάται και από τη συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή. Θεωρείται ότι επάγεται διαφορετικού είδους κυτταρικός θάνατος, μέσω της διαδικασίας της νέκρωσης, όταν χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φωτοευαισθητοποιητή. Από την άλλη, οι μεγάλες ποσότητες φωτοευαισθητοποιητή ενοχοποιούνται για την παρατεταμένη φωτοευαισθησία οπότε είναι σημαντικό να εξασφαλιστεί αποτελεσματική φωτοδυναμική δράση με μικρές ποσότητες φωτοευαισθητοποιητή. Για τους λόγους αυτούς στις επακόλουθες μελέτες φωτοδυναμικής δράσης επιλέχθηκαν να ελεγχθούν δυο ακραίες συγκεντρώσεις m-THPC, 0.22 και 1.8μM.

7.3

Αποτελέσματα μελετών προσδιορισμού ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC στα LNCaP κύτταρα

Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή εξαρτάται τόσο από την αρχική συγκέντρωση επώασης όσο και από τον χρόνο επώασης των κυττάρων με τον φωτοευαισθητοποιητή. Επιπλέον και η μορφή του επηρεάζει την πρόσληψή του από τα κύτταρα.

Προκειμένου να ελεγχθεί η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της ελεύθερης και της εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC κύτταρα επώαστηκαν με αυτές για 3, 24 και 48h. Οι αρχικές συγκεντρώσεις επώασης ήταν 0.22 και 1.8μM. Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης εξήχθη ο φωτοευαισθητοποιητής από τα κύτταρα και έγινε μέτρηση του σήματος φθορισμού με τη φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού. Ακολούθησε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της m-THPC βάση των καμπυλών αναφοράς συγκέντρωσης – έντασης φθορισμού (Σχήματα 7.8 και 7.9).

Αναλυτικά η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Με διαδοχικές αραιώσεις των μητρικών διαλυμάτων ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC σε εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο προέκυπταν τα διαλύματα επώασης των κυττάρων συγκεντρώσεων 0.22 και 1.8μM. Η επώαση γινόταν σε ειδικά δοχεία επώασης κυττάρων – φλάσκες επιφάνειας 25 cm² για 3, 24 ή 48h. Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης απορριπτόταν το διάλυμα επώασης (εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο με φωτοευαισθητοποιητή) και τα προσφυμένα στην επιφάνεια της φλάσκας κύτταρα πλένονταν με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1ml PBS σε κάθε πλύση) προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του διαλύματος επώασης.

Ακολουθούσε αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας. 1ml διαλύματος που περιείχε το ένζυμο τρυψίνη καθώς και τον παράγοντα EDTA αφήνεται να επιδράσει στα κύτταρα για περίπου 2min ώστε να αποκολληθούν από την επιφάνεια της φλάσκας. Για να εξουδετερωθεί η δράση του διαλύματος αποκόλλησης η φλάσκα πληρωνόταν με διάλυμα PBS περιέχον 10%FBS. Το εναιώρημα συλλεγόταν σε σωλήνα φυγοκέντρησης και φυγοκεντρείτο στα 125 x g. Το υπερκείμενο μετά το πέρας της φυγοκέντρησης απορριπτόταν και ακολουθούσαν ακόμα δυο φυγοκεντρήσεις-ξεπλύματα των κυττάρων με 5ml PBS κάθε φορά.

Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης προσθέτονταν στα κύτταρα 1ml PBS, και ακολουθούσε μέτρηση των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Κατόπιν το διάλυμα κυττάρων φυγοκεντρείτο για τελευταία φορά και απορριπτόταν το υπερκείμενο διάλυμα. Στο σωλήνα φυγοκέντρησης προσθέτονταν 3ml διαλύματος λύσης κυττάρων το οποίο αποτελείτο από ισοπροπανόλη με 10% Triton X-100. Ο παράγοντας Triton X-100 χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη λύση των κυττάρων καθώς,

μεταξύ των άλλων δράσεων, διαλύει τις πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης. Γινόταν καλό pipetting ώστε να διαλυθεί το συσσωμάτωμα κυττάρων και το διάλυμα λύσης μπορεί να καταστρέψει την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης ώστε να χαθεί η κυτταρική συνοχή. Με αυτόν τον τρόπο εξαγόταν ο φωτοευαισθητοποιητής από τα κύτταρα στο διάλυμα λύσης. Τα διαλύματα καλύπτονταν με αδιαφανή μεμβράνη προκειμένου να αποφευχθεί διέγερση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή και διατηρούνταν τους $4^{\circ}C$ έως τη μέτρηση της έντασης φθορισμού.

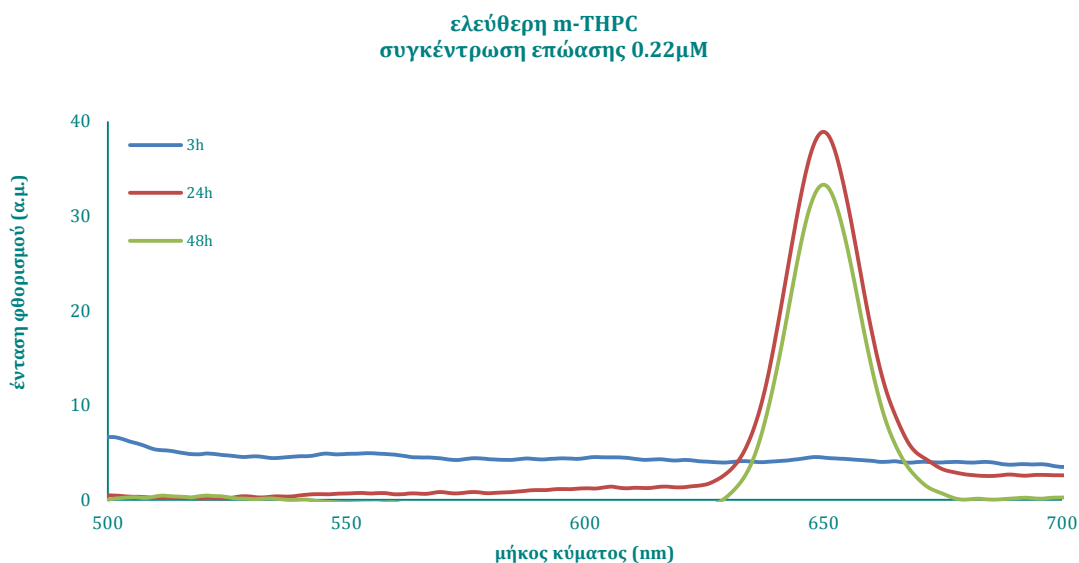
Προτού γίνει η μέτρηση της έντασης φθορισμού από υπό εξέταση διαλύματα, αυτά φυγοκεντρούνταν στις $6000rpm$ για $20min$ ώστε να διαχωριστούν τα υπολείμματα – θραύσματα κυττάρων από το διάλυμα. Το υπερκείμενο διάλυμα συλλεγόταν μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης ενώ το υποκείμενο συσσωμάτωμα υπολειμμάτων απορριπτόταν. Απαραίτητο για να μπορεί να γίνει η σύγκριση των εντάσεων φθορισμού κατά συνέπεια και της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης φωτοευαισθητοποιητή είναι τα διαλύματα να περιέχουν τον ίδιο αριθμό κυττάρων. Έτσι γινόταν αναγωγή και κατάλληλη αραίωση κάθε διαλύματος ώστε τελικά περιείχε $\sim 3 \times 10^4$ κύτταρα/ml διαλύτη (όπου διαλύτης εννοείται διάλυμα ισοπροπανόλης με 10% Triton X-100).

Κάθε διάλυμα μεταγγιζόταν σε κυβέττα φθορισμού των $4.5 ml$ η οποία πληρούταν έως τα $3ml$. Η μέτρηση της έντασης φθορισμού με τη φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού γινόταν με διέγερση στα $420 nm$ και συλλογή του φάσματος φθορισμού $450 - 750 nm$. Η ταχύτητα της σάρωσης διατηρείτο σταθερή σε όλη τη διάρκεια των μετρήσεων και σε όλες τις πειραματικές συνθήκες στα $480 nm/min$. Κάθε μέτρησης προηγείτο ο μηδενισμός του σήματος λόγω φθορισμού του διαλύτη καθώς και του θορύβου του οργάνου. Με τον τρόπο αυτό για κάθε συγκέντρωση επώασης προέκυπταν τα φάσματα έντασης φθορισμού ανάλογα με το χρόνο επώασης.

7.3.1

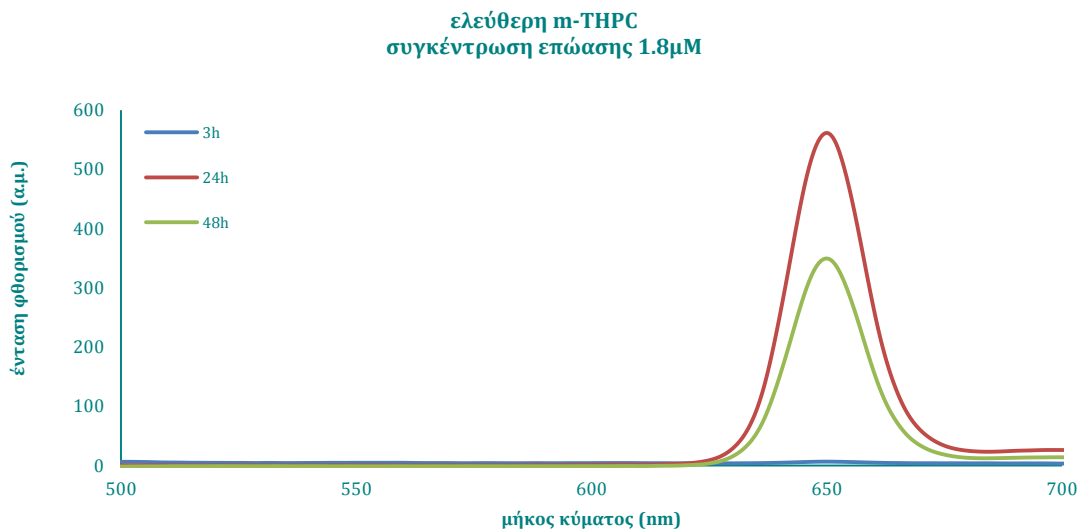
Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επώαστηκαν με την ελεύθερη m-THPC για διαφορετικούς χρόνους επώασης

Τα φάσματα εκπομπής φθορισμού κυττάρων τα οποία επώαστηκαν με 0.22 και $1.8 \mu M$ ελεύθερης m-THPC για $3, 24$ ή $48h$ παρουσιάζονται αντίστοιχα στα Σχήματα 7.11 και 7.12. Σε όλες τις πειραματικές συνθήκες τα φάσματα έντασης φθορισμού διατηρούν τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματος φθορισμού της m-THPC με μέγιστο εκπομπής φθορισμού στα $650 nm$. Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης επώασης. Η ένταση του σήματος φθορισμού αυξάνεται καθώς ο χρόνος επώασης αυξάνεται από τις 3 στις $24h$. Περαιτέρω ωστόσο αύξηση του χρόνου επώασης, $48h$, προκαλεί μείωση της έντασης του εκπεμπόμενου φθορισμού.



Σχήμα 7.11: Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επώαστηκαν με 0.22 μ M ελεύθερης m-THPC, για διαφορετικούς χρόνους επώασης με διέγερση στα 420nm.

Καθώς η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή συμπεραίνεται πως στις 48h λιγότερη ποσότητα φωτοευαισθητοποιητή ήταν συγκεντρωμένη στα κύτταρα σε σχέση με την επώαση διάρκειας 24h.



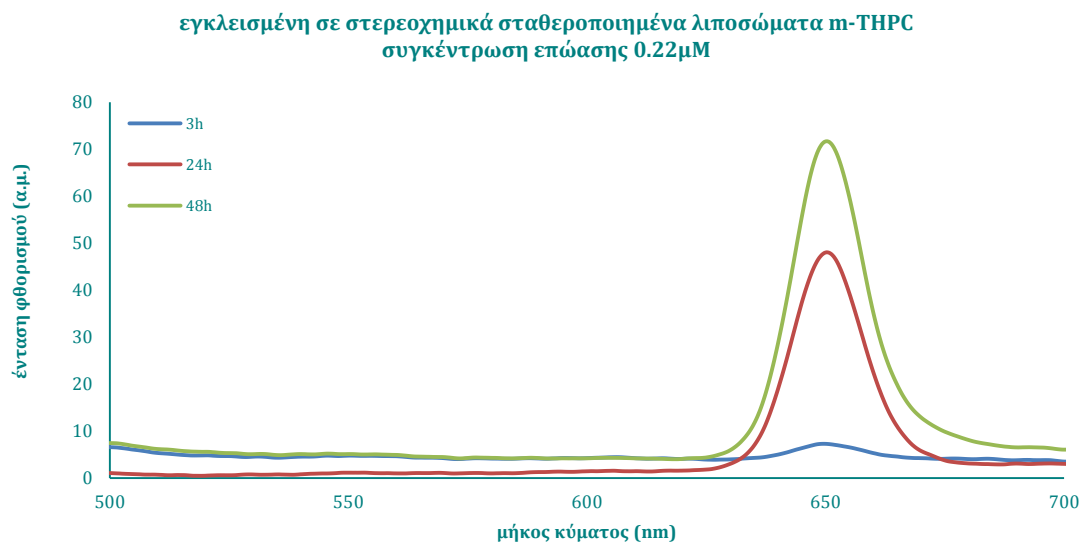
Σχήμα 7.12: Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επώαστηκαν με 1.8 μ M ελεύθερης m-THPC, για διαφορετικούς χρόνους επώασης με διέγερση στα 420nm.

Η μείωση της έντασης φθορισμού καθώς ο χρόνος επώασης ξεπερνά τις 24h μπορεί να οφείλεται τόσο σε αποβολή των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή από το κύτταρο όσο και σε συσσωμάτωση των μορίων της m-THPC ενδοκυττάρια. Ανεξαρτήτως της αιτίας μείωσης της έντασης φθορισμού, οι φωτοδυναμικές ιδιότητες του φωτοευαισθητοποιητή όταν ο χρόνος επώασης αγγίζει τις 48h υστερούν σε σχέση με τις 24h καθώς επηρεάζεται άμεσα η κβαντική απόδοση συνεπώς και η φωτοδυναμική δράση. Άρα ο βέλτιστος χρόνος επώασης με την ελεύθερη m-THPC ανάμεσα σε αυτούς που ελέγχθησαν είναι οι 24h καθώς εκεί η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της m-THPC μεγιστοποιείται.

7.3.2

Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επώαστηκαν με την εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC για διαφορετικούς χρόνους επώασης

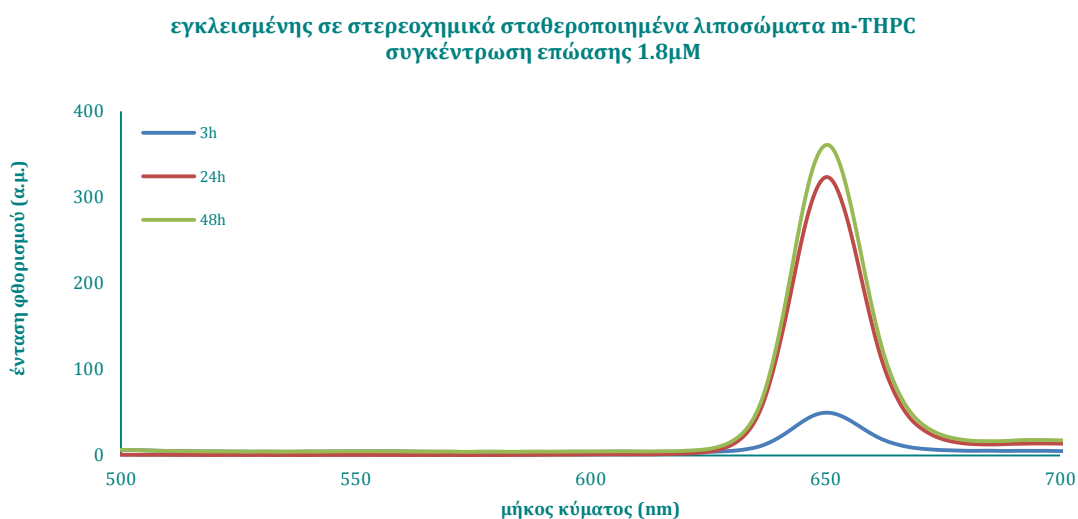
Τα φάσματα εκπομπής φθορισμού κυττάρων τα οποία επώαστηκαν με 0.22 και 1.8μM εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC για 3, 24 ή 48h παρουσιάζονται αντίστοιχα στα Σχήματα 7.13 και 7.14.



Σχήμα 7.13: Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επώαστηκαν με 0.22μM εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC, για διαφορετικούς χρόνους επώασης με διέγερση στα 420nm.

Σε όλες τις πειραματικές συνθήκες τα φάσματα έντασης φθορισμού διατηρούν τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματος φθορισμού της m-THPC με μέγιστο εκπομπής φθορισμού στα 650 nm. Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης επώασης. Η ένταση του σήματος φθορισμού αυξάνεται καθώς ο

χρόνος επώασης αυξάνεται, αντίθετα με τη διακύμανση της έντασης του εκπεμπόμενου φθορισμού η οποία παρατηρείται στην περίπτωση που τα κύτταρα έχουν επωαστεί με την ελεύθερη m-THPC. από τις 3 στις 24h. Καθώς η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή φαίνεται πως ο εγκλεισμός της m-THPC επιμήκυνε την πρόσληψή της από τα κύτταρα. Επιπλέον η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού από τα κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με την εγκλεισμένη λιποσωμιακή m-THPC είναι σε όλες τις συνθήκες, πλην μίας, σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη στην περίπτωση που τα κύτταρα επώαστηκαν με την ελεύθερη m-THPC. Συνεπώς ο εγκλεισμός της m-THPC σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα συμβάλει στην διατήρηση των φωτοδυναμικών χαρακτηριστικών της m-THPC ενδοκυττάρια (μεγαλύτερη συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιητή, αποτροπή σχηματισμού συσσωματωμάτων εξασφαλίζουν μεγαλύτερη κβαντική απόδοση) παρέχοντας τη δυνατότητα καλύτερης φωτοδυναμικής δράσης.

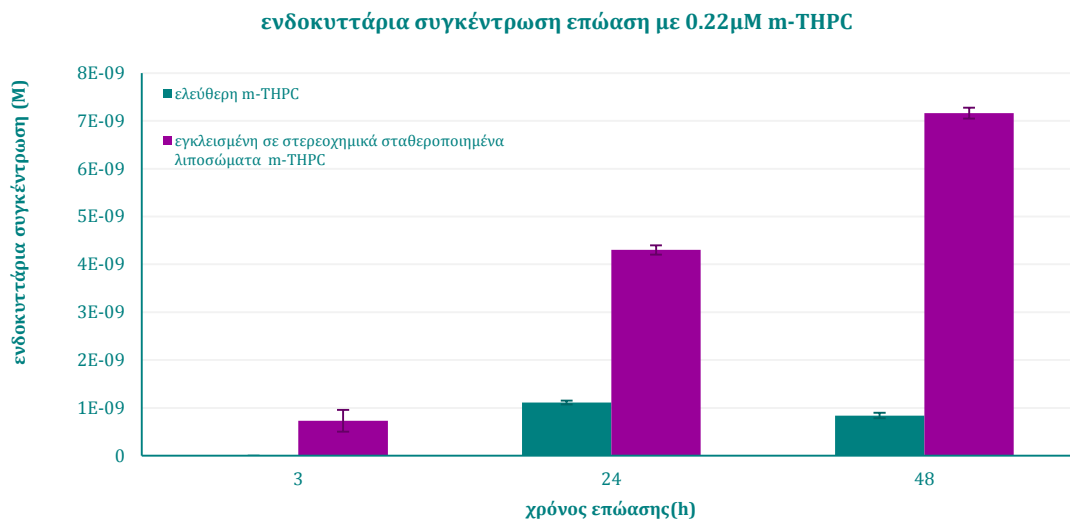


Σχήμα 7.14: Φάσματα έντασης φθορισμού σε κύτταρα που επώαστηκαν με 1.8μM εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC, για διαφορετικούς χρόνους επώασης με διέγερση στα 420nm.

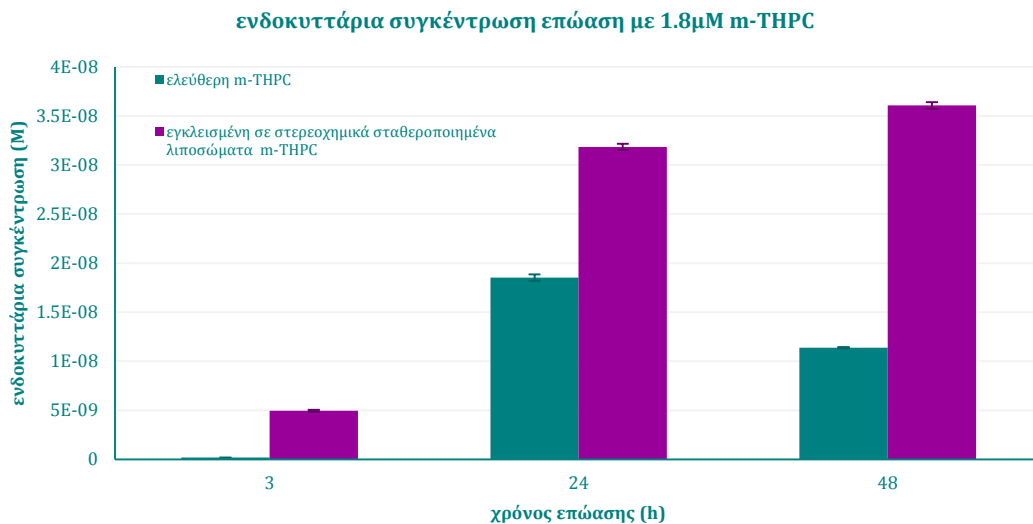
7.3.3

Αποτελέσματα υπολογισμού ενδοκυττάριας συγκέντρωσης m-THPC

Από την ένταση φθορισμού στα 650 nm και την καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης ελεύθερης ή εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC (Σχήματα 7.8 και 7.9) υπολογίστηκε η ενδοκυττάρια συγκέντρωση m-THPC για κάθε πειραματική συνθήκη. Βάση των τιμών αυτών κατασκευάστηκαν τα παρακάτω διαγράμματα ενδοκυττάριας συγκέντρωσης m-THPC ως προς το χρόνο επώασης και για τις δυο διαφορετικές μορφές φωτοευαισθητοποιητή, Σχήματα 7.15 και 7.16.



Σχήμα 7.15: Ενδοκυττάρια συγκέντρωση m-THPC σε κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με 0.22μM ελεύθερης και εγκλεισμένης σε στεροχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC για 3, 24 και 48h.



Σχήμα 7.16: Ενδοκυττάρια συγκέντρωση m-THPC σε κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με 1.8μM ελεύθερης και εγκλεισμένης σε στεροχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC για 3, 24 και 48h.

7.3.4

Συμπεράσματα

Σε κάθε χρονικό διάστημα επώασης η ενδοκυττάρια συγκέντρωση m-THPC στα κύτταρα που επώαστηκαν με την εγκλεισμένη σε στεροχημικά σταθεροποιημένα

λιποσώματα m-THPC ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των κυττάρων τα οποία επώαστηκαν με την ελεύθερη μορφή, και για τις δυο συγκεντρώσεις επώασης. Το γεγονός αυτό υπονοεί μεγαλύτερης έκτασης φωτοδυναμική δράση. Αυτό όμως που έχει ιδιαίτερη σημασία είναι το ότι μικρότερης συγκέντρωσης εγκλεισμένος σε λιποσώματα φωτοευαισθητοποιητής θα έχει την ικανότητα να προκαλέσει την ίδια φωτοδυναμική δράση με την ελεύθερη μορφή άρα μειώνεται ο κίνδυνος της παραμένουσας φωτοευαισθησίας. Είναι χαρακτηριστικό ότι για τη μικρότερη συγκέντρωση επώασης, $0.22\mu M$, και το μικρότερο χρονικό διάστημα επώασης, $3h$, η ενδοκυττάρια συγκέντρωση m-THPC στα κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με την ελεύθερη μορφή δεν μπορεί να ανιχνευθεί. Αντιθέτως στα κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με την εγκλεισμένη λιποσωματική μορφή η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της m-THPC ήταν μετρήσιμη, περίπου $0.5nM$.

Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση m-THPC στην περίπτωση που τα κύτταρα επώαστηκαν με την ελεύθερη μορφή παρουσίασε μέγιστη τιμή μετά από $24h$ ενώ μειώθηκε μετά από $48h$ ώρες επώασης. Στην περίπτωση που τα κύτταρα επώαστηκαν με την εγκλεισμένη λιποσωματική μορφή, η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της m-THPC συνέχιζε να αυξάνει με αύξηση του χρόνου επώασης.

Καθώς η μέγιστη συγκέντρωση m-THPC στα κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με την ελεύθερη μορφή εντοπίστηκε μετά από επώαση $24h$, ο χρόνος αυτός επιλέχθηκε ως χρόνος επώασης στις μελέτες φωτοδυναμικής δράσης των δυο μορφών φωτοευαισθητοποιητή στα LNCaP κύτταρα.

7.4

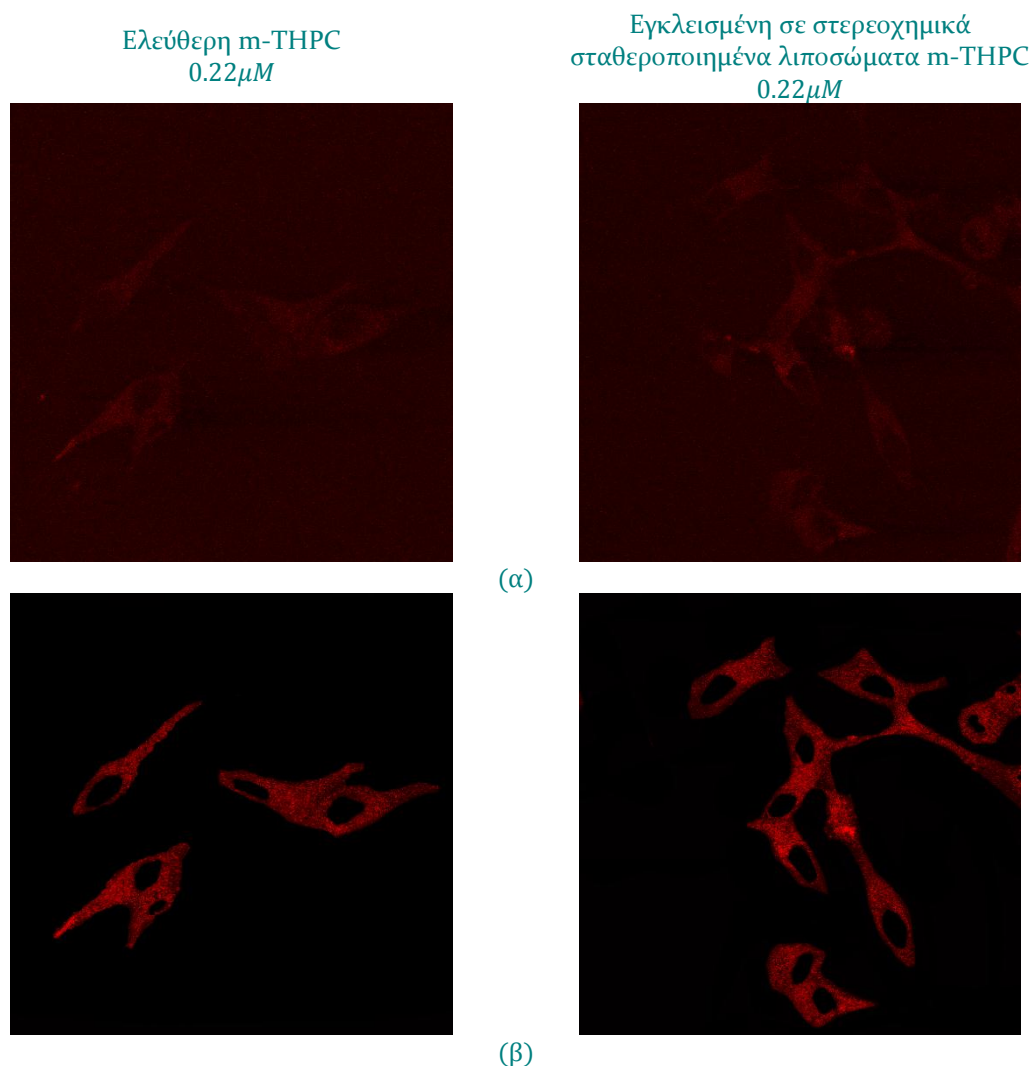
Αποτελέσματα μελετών ενδοκυττάριας χωρικής κατανομής ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC με συνεστιακή απεικονιστική μικροσκοπία.

Οι μελέτες με το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με Laser πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο ο εγκλεισμός της m-THPC σε λιποσώματα επηρεάζει το μοτίβο ενδοκυττάριας χωρικής κατανομής του φωτοευαισθητοποιητή στα κύτταρα.

Κύτταρα τα οποία είχαν συμφυθεί σε καλυπτρίδα επώαστηκαν για $24h$ με $0.22\mu M$ και $1.8\mu M$ ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC. Κατόπιν ακολούθησε στερεοποίηση των κυττάρων και θωράκισή τους έναντι της φωτολεύκανσης σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 6.4.1.

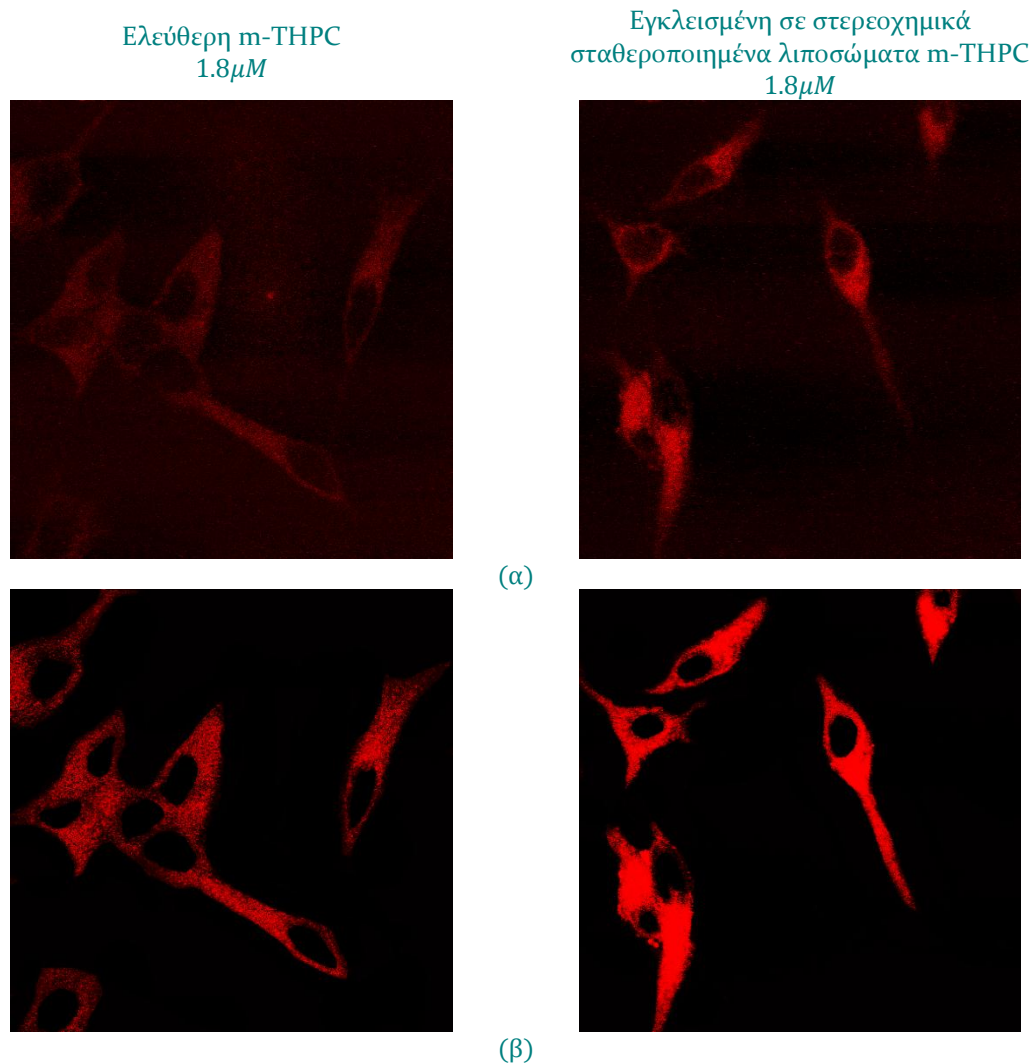
Η μελέτη των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό Ινστιτούτο «Δημόκριτος». Τα δείγματα εξετάστηκαν με ένα συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης

(MRC 1024 ES BioRad, Hercules, CA, USA) εξοπλισμένο με ένα Nikon E600 ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο (Nikon, Melville, NY, USA). Για τις εικόνες χρησιμοποιήθηκε φακός Nikon 40X, CFI Plan Fluor DLL, 0.75 NA. Το συνεστιακό μικροσκόπιο ήταν εξοπλισμένο με ένα laser ιόντων κρυπτού - αργού (15 mW), ψυχόμενο με τον αέρα και γραμμές εκπομπής στα 488,568 και 647nm. Η ισχύς ακτινοβολήσης μειώθηκε στο 3% της μέγιστης ισχύος (5 mW) για να αποφευχθεί ο κορεσμός και η φωτολεύκανση. Η λήψη των εικόνων έγινε με ένα φίλτρο Kalman, παίρνοντας μέσο όρο 5 frames. Ο χρόνος λήψης των εικόνων ήταν 1s (μέγεθος frame 512x512 pixels). Για λήψη όλων των εικόνων χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες ρυθμίσεις φωτοπολλαπλασιαστή και ίριδας προκειμένου να μπορούν να συγκριθούν ως προς την ένταση.



Εικόνα 7.1: Ενδοκυττάρια χωρική κατανομή m-THPC σε κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με 0.22μM ελεύθερης και εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC 24h.(α) πρωτότυπες εικόνες συστήματος συνεστιακής μικροσκοπίας (β) οι ίδιες εικόνες μετά από επεξεργασία

Χαρακτηριστικές εικόνες της χωρικής κατανομής των δυο μορφών του φωτοευαισθητοποιητή, οι οποίες ελήφθησαν από στο σύστημα συνεστιακής μικροσκοπίας και όπως προέκυψαν μετά από επεξεργασία κατά την οποία αφαιρέθηκε ο διάχυτος θόρυβος του υποστρώματος και ενισχύθηκε η φωτεινότητα, παρουσιάζονται στις Εικόνες 7.1 και 7.2.



Εικόνα 7.2: Ενδοκυττάρια χωρική κατανομή *m*-THPC σε κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με 1.8μM ελεύθερης και εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα *m*-THPC 24h. (α) πρωτότυπες εικόνες συστήματος συνεστιακής μικροσκοπίας (β) οι ίδιες εικόνες μετά από επεξεργασία

Ο φωτοευαισθητοποιητής κατανέμεται στο κυτταρόπλασμα και γύρω από την πυρηνική μεμβράνη. Δε φαίνεται να εισέρχεται καθόλου στον πυρήνα. Το μοτίβο αυτό είναι ταυτόσημο και στις δυο μορφές, άρα ο εγκλεισμός σε λιποσώματα δεν επηρέασε την ενδοκυττάρια χωρική κατανομή της *m*-THPC. Η μόνη διαφορά εντοπίζεται στην

ένταση του φθορισμού, ανάλογη του κόκκινου χρώματος στις εικόνες, η οποία είναι σαφώς μεγαλύτερη στην περίπτωση κατά την οποία τα κύτταρα επώαστηκαν με $1.8\mu M$ εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC. Μεγαλύτερη ένταση φθορισμού αντιστοιχεί σε μεγαλύτερη ενδοκυττάρια συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιητή. Επιπλέον το ποσοστό συσσωμάτωσης είναι μικρότερο, τα μόρια διατηρούνται σε μονομερή μορφή άρα η κβαντική απόδοση δεν επηρεάζεται. Και οι δυο αυτές συνθήκες εξασφαλίζουν καλύτερη φωτοδυναμική δράση.

7.5

Μελέτες βιωσιμότητας κυττάρων μετά από φωτοδυναμική δράση

7.5.1

Αποτελέσματα μελετών επίδρασης φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Η επαγόμενη από τη φωτοδυναμική κυτταροτοξικότητα οφείλεται στη συνδυασμένη δράση τριών παραγόντων, του φωτός του φωτοευαισθητοποιητή και του οξυγόνου. Κάθε ένας από τους παράγοντες αυτούς δεν είναι από μόνος του τοξικός στις δόσεις που χρησιμοποιείται στη φωτοδυναμική και η κυτταροτοξικότητα προέρχεται από τη συνδυασμένη δράση τους. Συνεπώς είναι σημαντικό να εξασφαλιστεί η προϋπόθεση αυτή. Ήδη έχουν εντοπιστεί εκείνες οι συγκεντρώσεις φωτοευαισθητοποιητή οι οποίες δεν προκαλούν κυτταροτοξικότητα. Απομένει να προσδιοριστεί και η κατάλληλη δόση ενέργειας φωτός διέγερσης. Για το λόγο αυτό μελέτες κυτταροτοξικότητας επαγόμενης από το φως διέγερσης προηγήθηκαν των μελετών φωτοδυναμικής δράσης.

Εκτός από το μήκος κύματος διέγερσης σημαντικά μεγέθη για τη φωτοδυναμική δράση είναι ο ρυθμός ροής ισχύος ακτινοβολίας ή ακτινοβολήση (fluence rate mW/cm^2) καθώς και η συνολική δόση ενέργειας (total energy dose, mJ/cm^2). Η ακτινοβολήση προκύπτει από την ισχύ της ακτινοβολίας διέγερσης στην έξοδο του διαχύτη στο άκρο της οπτικής ίνας η οποία μεταφέρει το φως διέγερσης διαιρούμενης με το εμβαδό της επιφάνειας που ακτινοβολείται. Η συνολική δόση ενέργειας προκύπτει ως το γινόμενο της ακτινοβολήσης επί τη χρονική διάρκεια ακτινοβολήσης.

Οι μελέτες έγιναν με το σύστημα διοδικού laser στα 652 nm στο οποίο είχε προσαρτηθεί οπτική ίνα με διαχύτη κυκλικής συμμετρίας για τη μεταφορά του φωτός διέγερσης στα κύτταρα. Το άκρο της ίνας στηρίζονταν σε μία στερεοτακτική διάταξη που επέτρεπε την τρισδιάστατη κίνησή της έτσι ώστε να είναι κάθετη στα υπό ακτινοβολήση κύτταρα ενώ η απόστασή της από αυτά ήταν τόση ώστε η φωτεινή κηλίδα που δημιουργείτο από τον διαχύτη κυκλικής συμμετρίας είχε ακτίνα 5 cm ώστε

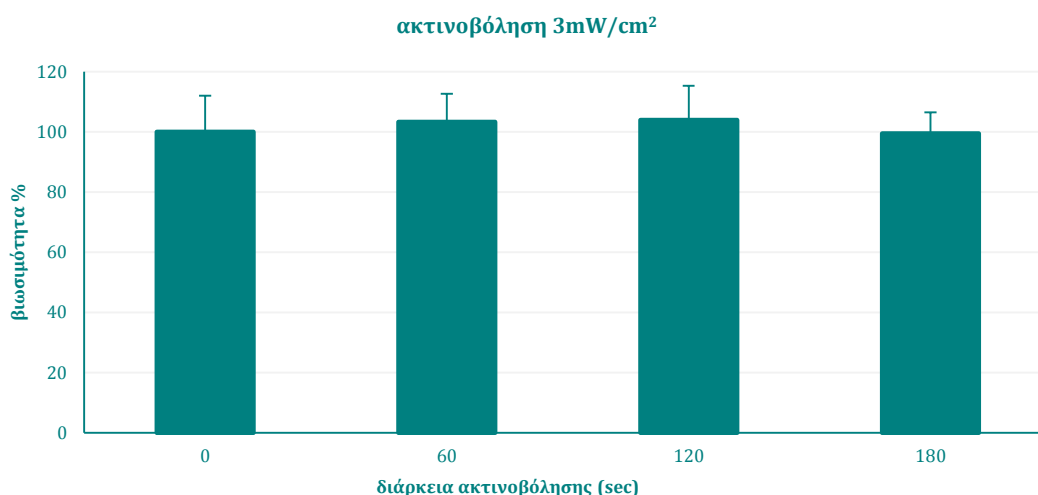
να καλύπτει επαρκώς 3 τριβλία Petri εμβαδού 12.5 cm^2 το κάθε ένα στα οποία επωάζονταν τα υπό μελέτη κύτταρα. Συνεπώς το εμβαδό της φωτεινής κηλίδας στο επίπεδο των κυττάρων ήταν:

$$E = \pi r^2 = 3.14 * (5 \text{ cm})^2 = 78.5 \text{ cm}^2$$

Η ισχύς του φωτός διέγερσης στην έξοδο του διαχύτη της οπτικής ίνας ρυθμιζόταν ώστε η ακτινοβολία στο επίπεδο των κυττάρων να είναι 3 mW/cm^2 και 6 mW/cm^2 , επομένως στην πρώτη περίπτωση η ισχύς εξόδου ήταν 235.5 mW ενώ στη δεύτερη 471 mW .

Ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικοί χρόνοι ακτινοβολίας 60, 120, και 180 sec . Επομένως στην περίπτωση ακτινοβολίας 3 mW/cm^2 οι συνολικές δόσεις ενέργειας ήταν 180, 360 και 540 mJ/cm^2 ενώ ήταν ακριβώς οι διπλάσιες στην περίπτωση ακτινοβολίας 6 mW/cm^2 .

Η διαδικασία ακτινοβολίας περιελάμβανε τα εξής βήματα: Τα κύτταρα αφήνονταν να συμφουθούν σε τριβλία Petri με εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο για 24h. Στη συνέχεια απορριπτόταν το θρεπτικό μέσο και γίνονταν δυο πλύσεις των κυττάρων με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του μέσου. Ελάχιστα μl PBS προσθέτονταν στα κύτταρα για να προφυλαχθούν από την επίδραση του περιβάλλοντος και ακολουθούσε η ακτινοβολία των κυττάρων στις προαναφερθείσες συνθήκες.

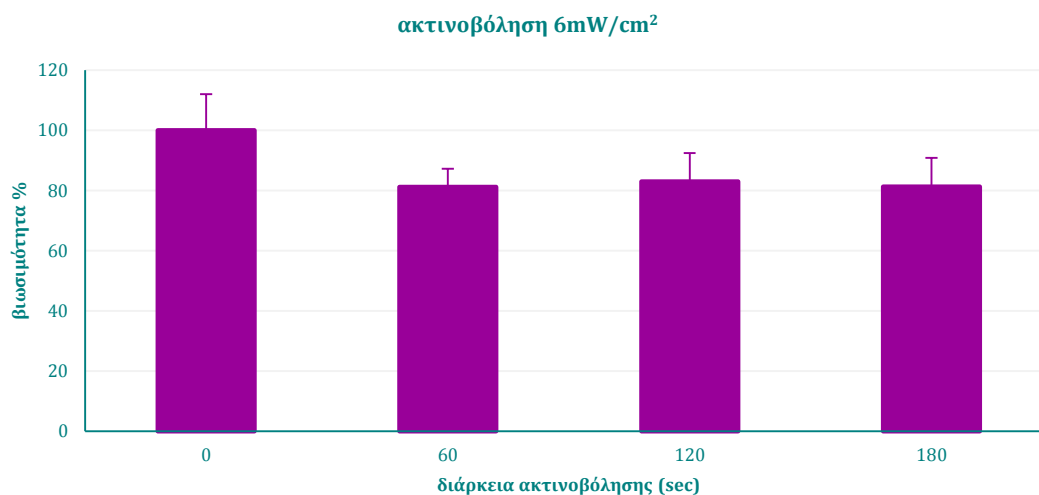


Σχήμα 7.17: Διάγραμμα διάρκεια ακτινοβολίας - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων όταν η ακτινοβολία τέθηκε στα 3 mW/cm^2

Σε κάθε συνθήκη αντιστοιχούσαν 3 τριβλία για λόγους επαναληψιμότητας. Στη συνέχεια φρέσκο εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο προσθέτονταν στα τριβλία και ακολουθούσε επώαση των κυττάρων για 24h. Με τη ολοκλήρωση του χρόνου αυτού

γίνονταν η μέτρηση βιωσιμότητας με τον βιοχημικό έλεγχο MTT. Τα διαγράμματα συνολικής δόσης ενέργειας – βιωσιμότητας παρουσιάζονται στα Σχήματα 7.17 και 7.18.

Ακτινοβόληση 3 mW/cm^2 δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στη βιωσιμότητα των κυττάρων, ανεξαρτήτως διάρκειας ακτινοβόλησης. Αντιθέτως όταν η ακτινοβόληση ρυθμίστηκε στα 6 mW/cm^2 υπήρξε 20% μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων για κάθε χρόνο ακτινοβόλησης. Συνεπώς για τις μελέτες της φωτοδυναμικής δράσης επιλέχθηκε ακτινοβόληση 3 mW/cm^2 καθώς δεν προκαλούσε καμία μεταβολή στη βιωσιμότητα των κυττάρων.



Σχήμα 7.18: Διάγραμμα διάρκειας ακτινοβόλησης - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων όταν η ακτινοβόληση τέθηκε στα 6 mW/cm^2

7.5.2

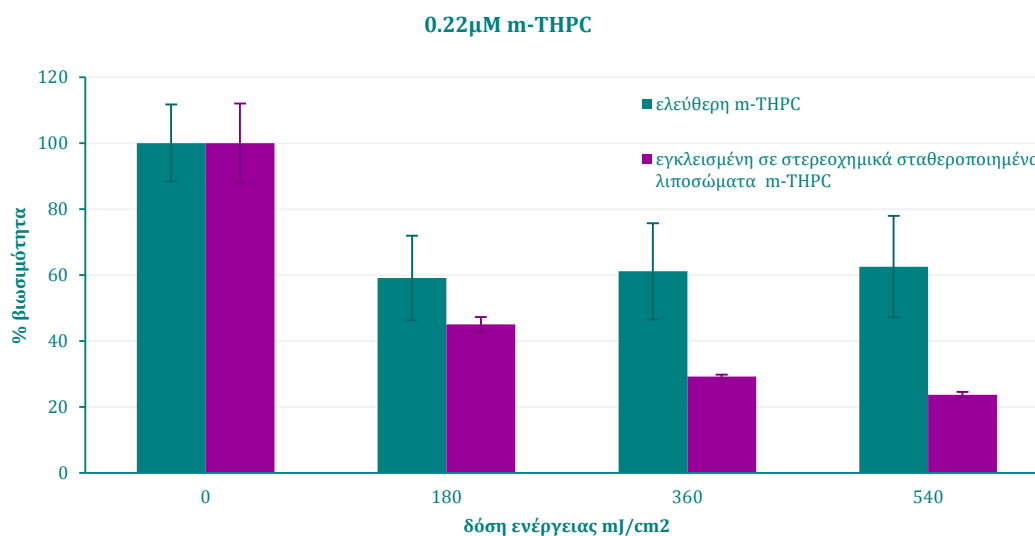
Αποτελέσματα μελετών φωτοδυναμικής δράσης ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Προκειμένου να μελετηθεί η φωτοδυναμική δράση της ελεύθερης και της εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC ακολουθήθηκε η εξής μεθοδολογία: LNCaP κύτταρα, 2×10^5 / τριβλίο, επώαστηκαν για 24h σε τριβλία Petri εμβαδού 9.6 cm^2 με εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο. Ακολούθως αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και στα κύτταρα προστέθηκε φρέσκο διάλυμα θρεπτικού μέσου – φωτοευαισθητοποιητή. Ελέχθησαν οι συγκεντρώσεις $0.22 \mu\text{M}$ και $1.8 \mu\text{M}$ ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC οι οποίες προέκυψαν με διαδοχικές αραιώσεις των αντίστοιχων μητρικών διαλυμάτων, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Ο χρόνος επώασης με τον φωτοευαισθητοποιητή ήταν 24h. Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης το διάλυμα επώασης απορριπτόταν και γίνονταν δυο πλύσεις των κυττάρων με 1ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα

φωτοευαισθητοποιητή – μέσου. Στη συνέχεια ελάχιστο PBS προσθέτονταν στα τριβλία (300μl) για να προστατεύσει τα κύτταρα από το στρες της έκθεση στο περιβάλλον και ακολουθούσε η ακτινοβόλησή τους, όπως περιγράφηκε προηγούμενα. Η ακτινοβόληση ήταν 3 mW/cm^2 και οι χρόνοι ακτινοβόλησης 60, 120, και 180 sec, συνεπώς συνολικές δόσεις ενέργειας 180, 360 και 540 mJ/cm^2 αντίστοιχα. Με το πέρας της ακτινοβόλησης φρέσκο εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο προσθέτονταν στα τριβλία και τα κύτταρα επέστρεφαν στον επωαστικό κλίβανο όπου και διατηρούνταν για 24h. Κατόπιν ακολουθούσε η μέτρηση της βιωσιμότητας με τον βιοχημικό έλεγχο MTT.

Σε κάθε συνθήκη αντιστοιχούσαν 3 τριβλία για λόγους επαναληψιμότητας. Στα διαγράμματα παρατίθεται η μέση τιμή των τριών μετρήσεων κάθε συνθήκης και η αντίστοιχη τυπική απόκλιση, ποσοστιαία ως προς τη βιωσιμότητα της ομάδας ελέγχου. Στατιστικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε βάση των μεθόδων Ανάλυση διακύμανσης μιας μεταβλητής και Student's t test, ανάλογα με τις υπό έλεγχο υποομάδες ώστε να διαπιστωθούν τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των παρατηρήσεων.

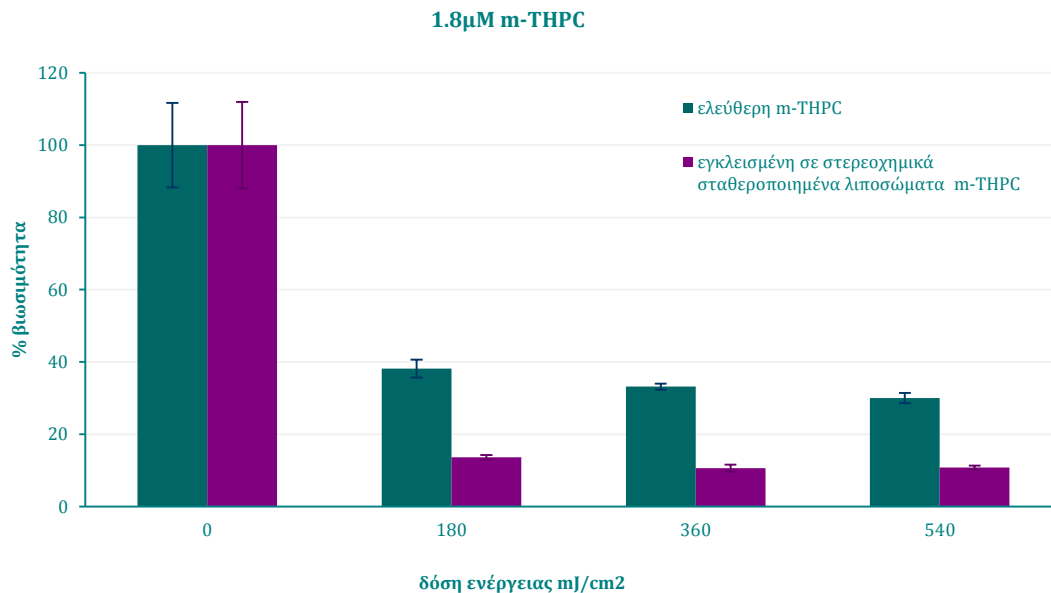
Σύμφωνα με τις μετρήσεις, ο επαγόμενος από τη φωτοδυναμική κυτταρικός θάνατος εξαρτάται ισχυρά από τη μορφή του φωτοευαισθητοποιητή και την συγκέντρωση επώασης.



Σχήμα 7.19: Διάγραμμα δόσης ενέργειας - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων τα οποία επώαστηκαν για 24h με 0.22μM ελεύθερης και εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC.

Επώαση με 0.22μM ελεύθερης m-THPC προκάλεσε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 40% ανεξαρτήτως συνολικής δόσης ενέργειας. Στην περίπτωση ωστόσο κατά την οποία τα κύτταρα επωάζονταν με την εγκλεισμένη λιποσωματική m-

THPC το ποσοστό του επαγομένου από τη φωτοδυναμική κυτταρικού θανάτου ήταν μεγαλύτερο ακόμα και στη χαμηλότερη δόση ενέργειας φωτός διέγερσης. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC, το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου αυξανόταν με αύξηση της συνολικής δόσης ενέργειας του φωτός διέγερσης, όπου στη χαμηλότερη δόση ενέργειας, $180 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, καταστράφηκε περίπου το 50% των LNCaP κυττάρων ενώ το ποσοστό αυξήθηκε στο 85% όταν η δόση ενέργειας τριπλασιαζόταν.



Σχήμα 7.20: Διάγραμμα δόσης ενέργειας - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων τα οποία επώαστηκαν για 24h με 1.8 μM ελεύθερης και εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC.

Όταν τα κύτταρα επωαζόταν με 1.8 μM m-THPC, ο φωτοδυναμικά επαγόμενος κυτταρικός θάνατος ενισχύθηκε, αγγίζοντας ποσοστό 70% στην περίπτωση της ελεύθερης, με δόση ενέργειας $540 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, και 90% στην περίπτωση της εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC. Φαίνεται πως αύξηση της συνολικής δόσης ενέργειας στην περίπτωση της ελεύθερης m-THPC προκάλεσε βαθμιαία μεγαλύτερη κυτταρική θνησιμότητα, καθώς τα ποσοστά του κυτταρικού θανάτου αυξάνονταν από 60% για δόση ενέργειας $180 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ σε 70% για δόση ενέργειας $540 \text{ mJ}/\text{cm}^2$. Αντιθέτα η αύξηση της συνολικής δόσης ενέργειας στην περίπτωση κατά την οποία τα κύτταρα επωαζόταν με την εγκλεισμένη λιποσωμιακή m-THPC δε φάνηκε ότι επιδρούσε ενισχυτικά στον κυτταρικό θάνατο, καθώς τα ποσοστά κυτταρικής θνησιμότητας διατηρούνταν περίπου στο 90% ανεξαρτήτως δόσης ενέργειας.

Η φωτοδυναμικά επαγόμενη κυτταροτοξικότητα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη όταν τα κύτταρα επωαζόταν με την εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα

λιποσώματα m-THPC για κάθε συγκέντρωση επώασης και συνολική δόση ενέργειας φωτός διέγερσης. Είναι δε χαρακτηριστικό ότι η LD_{50} επετεύχθη με τη χαμηλότερη συγκέντρωση επώασης, $0.22\mu M$, και με τη χαμηλότερη δόση ενέργειας, $180 mJ/cm^2$. Αντιθέτως, όταν τα κύτταρα επωαζόταν με την ελεύθερη m-THPC χρειάστηκε σχεδόν η δεκαπλάσια συγκέντρωση $1.8\mu M$ m-THPC (για την ακρίβεια οκταπλάσια) για να επιτευχθούν αυτά τα επίπεδα κυτταρικού θανάτου. Όπου LD_{50} (lethal dose 50), σύνηθες μέτρο εκτίμησης τοξικότητας ενός παράγοντα, ορίζεται ως εκείνη η δόση του παράγοντα η οποία προκαλεί την καταστροφή του 50% του αρχικού πληθυσμού.

Τα αποτελέσματα αναδεικνύουν την υπεροχή της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC έναντι της ελεύθερης m-THPC καθώς οδήγησε σε μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου σε όλες τις πειραματικές συνθήκες.

Πέραν του βιοχημικού ελέγχου MTT ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για να ποσοτικοποιηθεί η φωτοδυναμική δράση των δυο μορφών φωτοευαισθητοποιητή στα κύτταρα, αξιοποιήθηκε επιπλέον και το σύστημα απεικονιστικής μικροσκοπίας για την παρατήρηση και καταγραφή των φωτοδυναμικά επαγόμενων μορφολογικών αλλαγών σε αυτά. Εικόνες καταγράφονταν με το σύστημα απεικονιστικής μικροσκοπίας σε όλα τα στάδια των πειραματικών μελετών προκειμένου να ελέγχεται η μεθοδολογία. Οι εικόνες λαμβάνονταν με τις ίδιες συνθήκες, φωτισμού, αριθμητικού ανοίγματος αντικειμενικού, ώστε να είναι δυνατή η σύγκρισή τους. Στις παρακάτω Εικόνες 7.3 και 7.4 παρουσιάζονται οι αλλαγές στη μορφολογία και στη συνοχή των αποικιών 24h μετά τη φωτοδυναμική δράση τόσο για την ελεύθερη όσο και για την εγκλεισμένη λιποσωματική m-THPC, για κάθε δόση ενέργειας και κάθε συγκέντρωση επώασης.

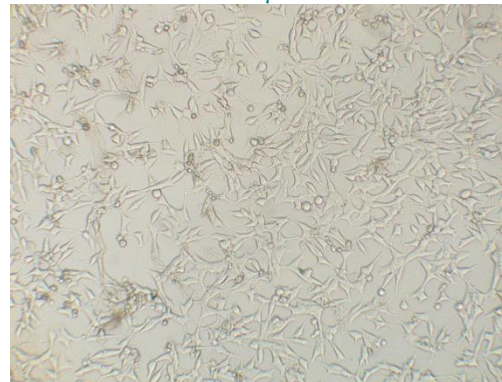
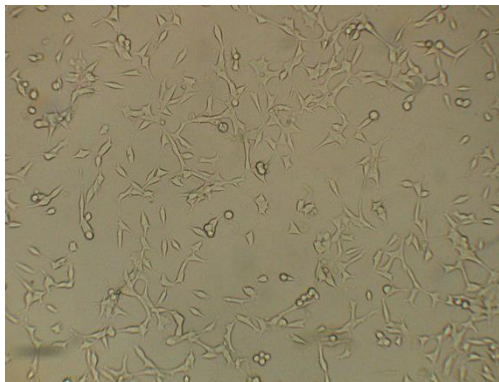
Οι εικόνες λαμβάνονταν με το σύστημα απεικονιστικής μικροσκοπίας με 24h μετά τη φωτοδυναμική, προτού υλοποιηθεί η μέτρηση βιωσιμότητας με τον βιοχημικό έλεγχο MTT. Παρατηρώντας τις εικόνες αυτές τα συμπεράσματα ακολουθούν εκείνα των μετρήσεων βιωσιμότητας. Η φωτοδυναμική δράση εξαρτάται ισχυρά από τη μορφή της m-THPC και από τη συγκέντρωση επώασης.

Στην περίπτωση κατά την οποία τα κύτταρα επωαζόταν με τη χαμηλότερη συγκέντρωση m-THPC φαίνεται πως η φωτοδυναμική δράση δεν εξαρτιόταν από τη συνολική δόση ενέργειας, όταν χρησιμοποιήθηκε η ελεύθερη μορφή. Η μορφολογία των κυττάρων διατηρούσε το χαρακτηριστικό σχήμα των LNCaP κυττάρων, δηλαδή το κυτταρικό τους σώμα είναι τριγωνικό ή οβάλ από το οποίο εκφύονταν άξονες οι οποίοι συνδέουν το ένα κύτταρο με το άλλο. Διαφορές ως προς την πυκνότητα των κυττάρων ανά τριβλίο ή τον αριθμό των κυττάρων ανά τριβλίο είναι αδύνατο να ποσοτικοποιηθούν μέσω της μικροσκοπικής παρατήρησης. Από τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις, συνυπολογίζοντας και τις μετρήσεις βιωσιμότητας, στην περίπτωση των κυττάρων τα οποία επωάστηκαν με $0.22\mu M$ ελεύθερης m-THPC η φωτοδυναμική δράση ήταν παρόμοια ανεξαρτήτως δόσης ενέργειας ακτινοβόλησης. Φαίνεται πως η

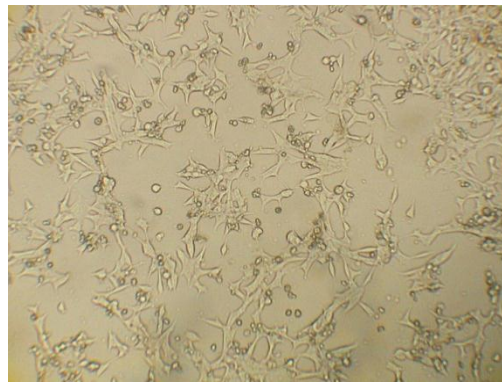
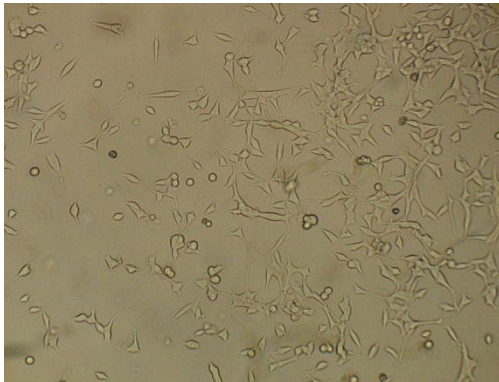
συγκέντρωση αυτή ήταν μάλλον ανεπαρκής στο να προκαλέσει περαιτέρω κυτταρικό θάνατο καθώς η ενέργεια αυξανόταν και η φωτοδυναμική δράση της ελεύθερης m-THPC εξαντλήθηκε μόλις στη χαμηλότερη δόση ενέργειας. Αύξηση του χρόνου ακτινοβολήσης δεν επέφερε αλλαγή στη φωτοδυναμική δράση ούτε ως προς τη βιωσιμότητα ούτε ως προς τη μορφολογία των κυττάρων άρα πολύ μικρή ποσότητα m-THPC απορροφήθηκε από τα κύτταρα για τη διέγερση της οποίας αρκούσε η χαμηλότερη δόση ενέργειας.

Ελεύθερη m-THPC
0.22μM

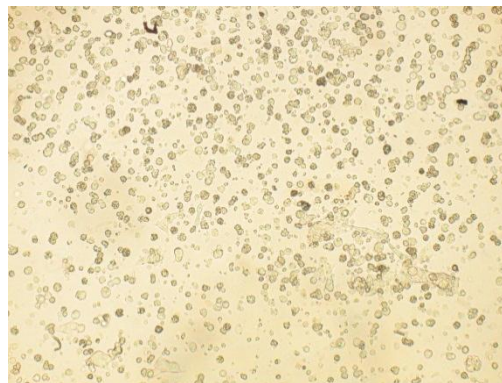
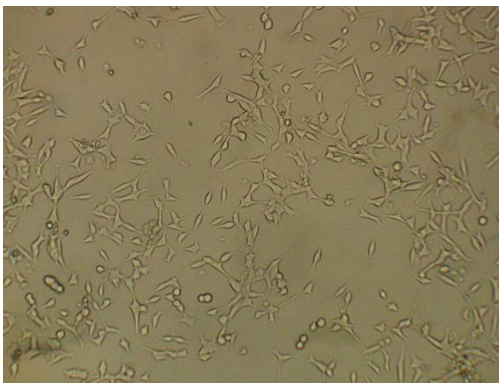
Εγκλεισμένη σε στερεοχημικά
σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC
0.22μM



(α)



(β)



(γ)

Εικόνα 7.3: Φωτοδυναμικά επαγόμενες αλλαγές στη μορφολογία των LNCaP κυττάρων και στη συνοχή των αποικιών μετά από επώαση με 0,22μM ελεύθερης και εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC.(α) 180 mJ/cm² (β) 360 mJ/cm² (γ) 540 mJ/cm²

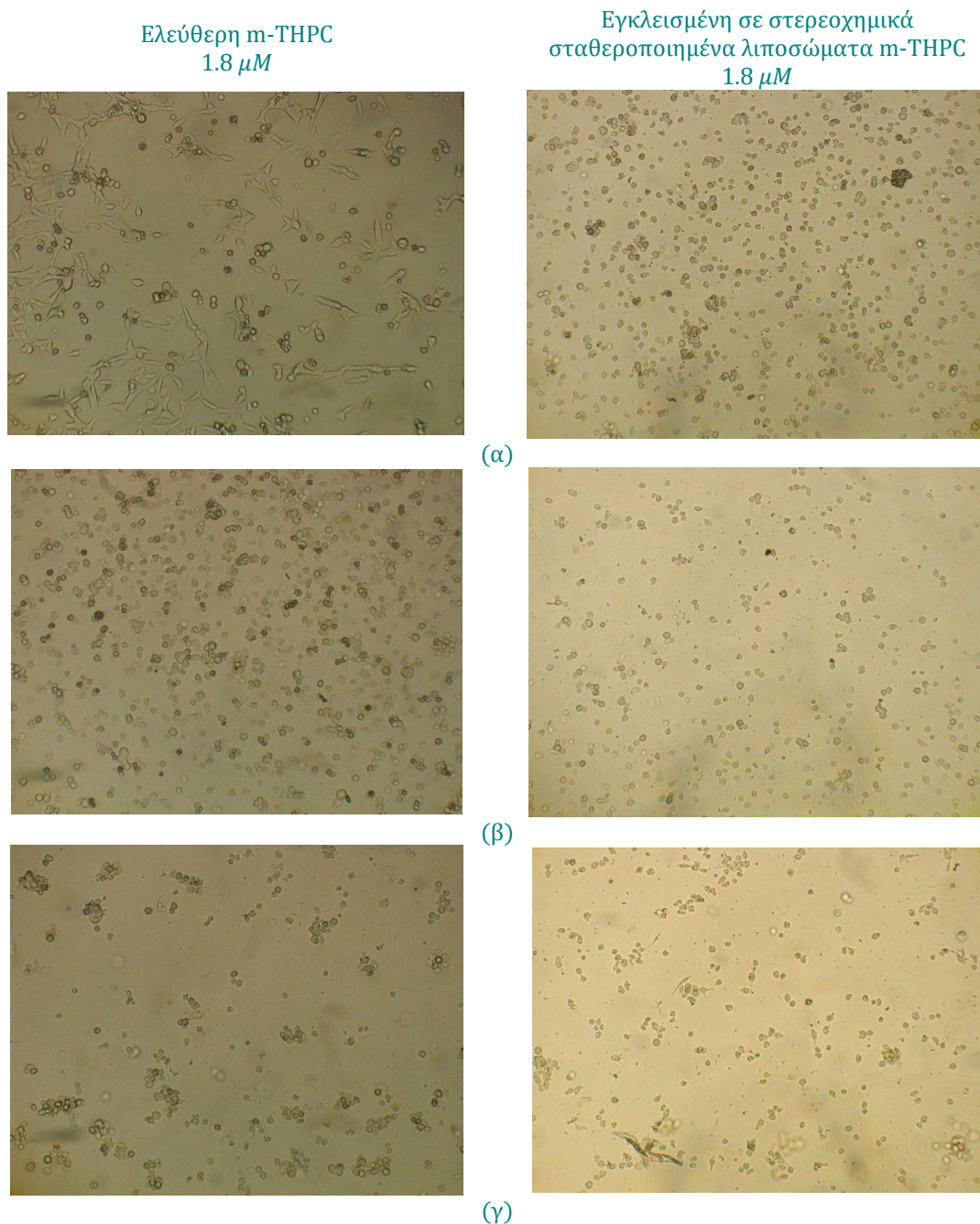
Αντίθετα σε κύτταρα τα οποία επώάζονταν με $0.22\mu M$ εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC η φωτοδυναμική δράση φάνηκε ότι εξαρτιόταν από τη δόση ενέργειας και από τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις. Ήδη από τη χαμηλότερη δόση ενέργειας εντοπίζονταν αποπτωτικά σωμάτια αιωρούμενα στο μέσο ενώ υπήρχαν ακόμα κύτταρα και αποικίες τα οποία διατηρούσαν τη φυσιολογική τους μορφολογία. Η απόπτωση μορφολογικά χαρακτηρίζεται από συρρίκνωση του κυττάρου, απώλεια του τριγωνικού σχήματος ενώ γίνονται στρογγυλά, δημιουργία κυστιδίων στην κυτταρική μεμβράνη και τελικά το σχηματισμό του αποπτωτικού σωμάτιου (Κεφάλαιο 1.5.1.1). Τα τυπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης εντοπίζονταν σε όλες τις δόσεις ενέργειας όπου αυξανόταν το ποσοστό των κυττάρων σε απόπτωση με αύξηση της δόσης ενέργειας. Είναι δε χαρακτηριστικό ότι μετά την ακτινοβόληση με τη μεγαλύτερη δόση ενέργειας, $540\text{ mJ}/\text{cm}^2$, δεν διακρίνονταν φυσιολογικά LNCaP κύτταρα παρά μόνο κύτταρα στρογγυλά, συρρικνωμένα, αιωρούμενα στο μέσο.

Από τις μελέτες πρόσληψης του φωτοευαισθητοποιητή από τα κύτταρα διαπιστώθηκε ότι μετά από 24h επώασης με την εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα μορφή σχεδόν τετραπλασιαζόταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της m-THPC σε σχέση με την ελεύθερη μορφή (από 1.1 nM σε 4.3 nM , για συγκέντρωση επώασης $0.22\mu M$). Τη διαπίστωση αυτή συνεπικουρούν και τα δεδομένα από τις μετρήσεις βιωσιμότητας και τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις όπου η φωτοδυναμική δράση ενισχύθηκε με αύξηση της δόσης ενέργειας άρα περισσότερα μόρια της ουσίας είχαν προσληφθεί από τα κύτταρα.

Επώαση με οκταπλάσια συγκέντρωση m-THPC, $1.8\mu M$, διατήρησε τις δράσεις των δύο μορφών επιφέροντας ωστόσο μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου. Η φωτοδυναμική δράση με την ελεύθερη m-THPC φαίνεται ότι εξαρτάται από τη δόση ενέργειας και από τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις. Υπάρχουν δηλαδή ενδοκυττάρια μόρια φωτοευαισθητοποιητή τα οποία εκτελούν πολλούς κύκλους φωτοδυναμικής δράσης καθώς αυξάνεται η διάρκεια της ακτινοβόλησης δίνοντας βαθμιαία περισσότερες κυτταροτοξικές αντιδράσεις άρα και μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου. Διακρίνονται αποπτωτικά σωμάτια μαζί με φυσιολογικά κύτταρα στη χαμηλότερη δόση ενέργειας ενώ καθώς αυξάνεται η δόση ενέργειας τα χαρακτηριστικά της απόπτωσης κυριαρχούν.

Η φωτοδυναμική δράση μετά από επώαση με $1.8\mu M$ εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC είναι σαφώς καταστροφική ακόμα και στη χαμηλότερη δόση ενέργειας. Ήδη από τις μελέτες πρόσληψης έχει διαπιστωθεί ότι ο εγκλεισμός σε λιποσώματα οδηγεί σε διπλασιασμό σχεδόν της ενδοκυττάριας m-THPC (από 18.5 nM σε 31.8 nM , επώαση 24h). Συνεπώς περισσότερα μόρια διεγείρονται ακόμα και κατά τη μικρότερη διάρκεια ακτινοβόλησης δίνοντας

τέτοιας έκτασης κυτταροτοξικές αντιδράσεις που επιφέρουν σχεδόν ολοκληρωτικό κυτταρικό θάνατο. Κατά το βιοχημικό έλεγχο μέτρησης βιωσιμότητας η χρωστική MTT αντιδρά με κύτταρα τα οποία διατηρούν μιτοχονδριακή δραστηριότητα. Εκτός από τα φυσιολογικά, μιτοχονδριακή δραστηριότητα διατηρείται και στα πρώτα στάδια της απόπτωσης. Στο γεγονός αυτό οφείλεται το μικρό ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας το οποίο μετρήθηκε μετά από τη φωτοδυναμική δράση με $1.8 \mu\text{M}$ εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC, ενώ από τη μικροσκοπική παρατήρηση δεν εντοπίστηκαν κύτταρα τα οποία να διατηρούν τη φυσιολογική μορφολογία των LNCaP κυττάρων.



Εικόνα 7.4: Φωτοδυναμικά επαγόμενες αλλαγές στη μορφολογία των LNCaP κυττάρων και στη συνοχή των αποικιών μετά από επώαση με $1.8 \mu\text{M}$ ελεύθερης και εγκλεισμένης σε λιποσώματα m-THPC. (α) $180 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ (β) $360 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ (γ) $540 \text{ mJ}/\text{cm}^2$

Μόνο αποπτωτικά σωματίδια παρατηρούνται η πυκνότητα των οποίων φαίνεται ότι μικραίνει καθώς αυξάνεται η δόση ενέργειας υποδεικνύοντας ότι ενδεχομένως πέραν της απόπτωσης η φωτοδυναμική δράση επάγει κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης. Η νέκρωση είναι ένας βίαιος κυτταρικός θάνατος ως συνέπεια οξέως ερεθίσματος κατά την οποία το κύτταρο αρχικά διογκώνεται και στη συνέχεια διαρρηγνύεται εγχέοντας το περιεχόμενό του στο περιβάλλον. Τα θραύσματα τα οποία διακρίνονται στις Εικόνες 7.4 (α) –(γ) για την εγκλεισμένη λιποσωμιακή m-THPC, αντιστοιχούν σε υπολείμματα νεκρωτικών κυττάρων.

7.5.3

Αποτελέσματα μελετών φωτοδυναμικής σε συνδυασμό με μεταβολή της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας, επιδρώντας στο μηχανισμό της γλουταθειόνης, στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Σε όλες τις μελέτες συνέργειας της φωτοδυναμικής με παράγοντες που αλλάζουν την ενδοκυττάρια αντιοξειδωτική ισορροπία χρησιμοποιήθηκε η ελεύθερη m-THPC ως φωτοευαισθητοποιητής στη μικρότερη συγκέντρωση 0.22 μM ενώ για τη διέγερσή της χρησιμοποιήθηκε η χαμηλότερη δόση ενέργειας, 180 mJ/cm^2 . Οι λόγοι οι οποίοι οδήγησαν σε αυτές τις παραμέτρους δοσιμετρίας είναι οι εξής:

Μέχρι σήμερα γίνονται μόνον ενδεικτικές κλινικές δοκιμές, μετά από έγγραφη συγκατάθεση του ασθενούς με την ελεύθερη m-THPC (Foscan) για την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνου του προστάτη. Η m-THPC ενέχεται για παρατεταμένη φωτοευαισθησία άρα είναι σημαντικό να χορηγείται σε χαμηλή συγκέντρωση. Επιπλέον είναι σημαντικό για την αποδοχή της θεραπείας και τη μείωση του άγχους και της ενόχλησης του ασθενούς οι χρόνοι ακτινοβόλησης να είναι οι μικρότεροι δυνατοί.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω και συνυπολογίζοντας το γεγονός ότι LD_{50} επετεύχθη με 0.22 μM εγκλεισμένης λιποσωμιακής m-THPC και δόση ενέργειας ακτινοβόλησης 180 mJ/cm^2 αναζητήθηκε εκείνος ο συνδυασμός ο οποίος θα εξασφάλισε μεγαλύτερη (παρόμοια στη χειρότερη περίπτωση) κυτταροτοξικότητα.

Αρχικά μελετήθηκε ο συνδυασμός της φωτοδυναμικής δράσης με ταυτόχρονη επίδραση στην ενδοκυττάρια αντιοξειδωτική άμυνα μέσω αποδιοργάνωσης του μηχανισμού της γλουταθειόνης. Το σύστημα της γλουταθειόνης είναι ο σημαντικότερος ίσως μηχανισμός ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας και θεωρείται υπεύθυνο για την αυξημένη αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στις αντικαρκινικές θεραπείες οι οποίες δρουν μέσω οξειδωτικού στρες. Ο παράγοντας BSO (L-buthionine-S,R-sulfoximine, BSO) είναι εξειδικευμένος αναστολέας της συνθετάσης γ-γλουταμυλοκυστεΐνης, ενζύμου το οποίο καταλύει το πρώτο στάδιο της σύνθεσης της

γλουταθειόνης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η καταστολή των επιπέδων της γλουταθειόνης η οποία επιτυγχάνεται μέσω της χορήγησης BSO αυξάνει την κυτταροτοξικότητα αντικαρκινικών θεραπειών. Η θεωρία αυτή παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον να μελετηθεί και στην περίπτωση της φωτοδυναμικής καθώς καταστολή της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας θα συνεπαγόταν χορήγηση μικρότερης δόσης φωτοευαισθητοποιητή άρα και μικρότερη παραμένουσα φωτοευαισθησία.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε για πρώτη φορά η συνδυασμένη δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας με την m-THPC (πλέον αναφερόμαστε αποκλειστικά και μόνο στην ελεύθερη m-THPC) και του αναστολέα της σύνθεσης της γλουταθειόνης σε κυτταρικό μοντέλο καρκίνου του προστάτη. Η μελέτη διαρθρώθηκε από τις επιμέρους μελέτες επίδρασης του BSO ως εξής:

1. Βιωσιμότητα των κυττάρων
2. Σε συνδυασμό με το φως διέγερσης, στη βιωσιμότητα των κυττάρων
3. Σε συνδυασμό της φωτοδυναμικής δράσης με την m-THPC στη βιωσιμότητα των κυττάρων
4. Ενδοκυττάρια επίπεδα γλουταθειόνης.

7.5.3.1

Αποτελέσματα μελετών επίδρασης του αναστολέα της σύνθεσης της γλουταθειόνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων

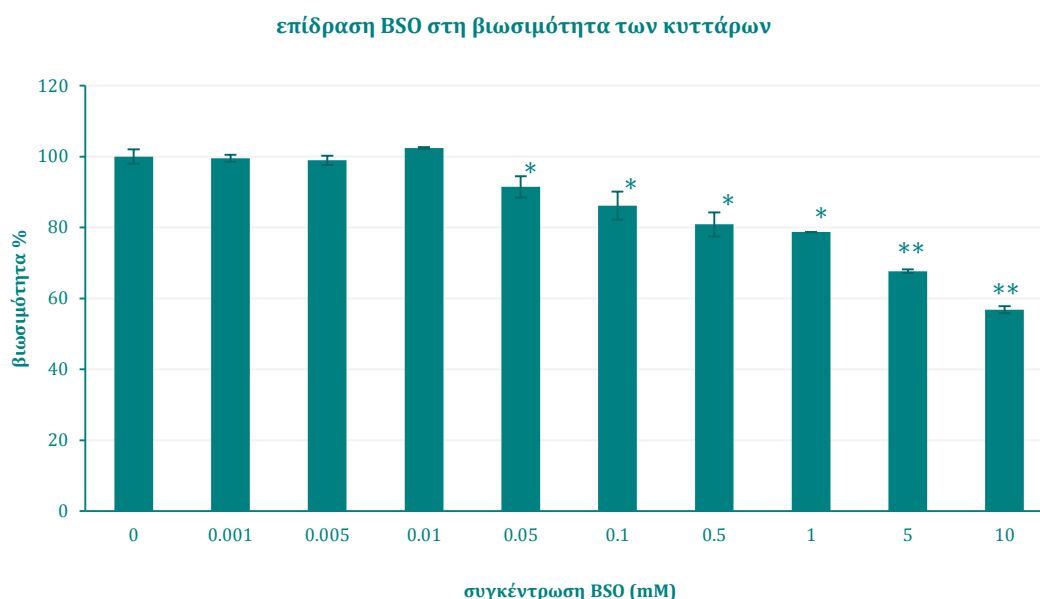
Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του αναστολέα της σύνθεσης της γλουταθειόνης BSO στη βιωσιμότητα των κυττάρων ακολουθήθηκε η εξής μεθοδολογία: LNCaP κύτταρα, 2×10^5 / τριβλίο, επώαστηκαν για 24h σε τριβλία Petri εμβαδού 9.6cm^2 με εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο. Ακολούθως αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και στα κύτταρα προστέθηκε φρέσκο διάλυμα θρεπτικού μέσου – BSO.

Ελέχθησαν συνολικά εννέα διαφορετικές συγκεντρώσεις BSO:

0.001mM , 0.005mM , 0.01mM , 0.05mM , 0.1mM , 0.5mM , 1mM , 5mM και 10mM

Παρασκευάστηκε μητρικό διάλυμα BSO σε PBS συγκέντρωσης 225mM . Από το μητρικό διάλυμα αυτό με διαδοχικές αραιώσεις προέκυπταν τα διαλύματα BSO σε εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο των παραπάνω συγκεντρώσεων. Στην κάθε συνθήκη αντιστοιχούσαν 3 τριβλία για λόγους επαναληψιμότητας.

Τα κύτταρα επώαζονταν για 24h με το διάλυμα BSO – εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου. Μετά την ολοκλήρωση των 24h επώασης πραγματοποιείτο ο βιοχημικός έλεγχος MTT για τη μέτρηση της βιωσιμότητας. Οι μετρήσεις παραθέτονται στο διάγραμμα του Σχήματος 7.21 ως ποσοστό της βιωσιμότητας της ομάδας ελέγχου.



Σχήμα 7.21: Διάγραμμα συγκέντρωσης BSO - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων που επώαστηκαν με BSO και της ομάδας ελέγχου είναι στατιστικά σημαντικές με επίπεδα βεβαιότητας: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (t-test)

Επώαση με 0.001, 0.005 και 0.01mM δεν επέφερε αλλαγή στη βιωσιμότητα των κυττάρων σε σχέση με τη βιωσιμότητα των κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Ωστόσο στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε μια βαθμιαία μείωση της βιωσιμότητας καθώς η συγκέντρωση BSO αυξάνεται. Η μείωση της βιωσιμότητας ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με τη βιωσιμότητα της ομάδας ελέγχου με επίπεδο βεβαιότητας $P < 0.05$ για τις συγκεντρώσεις 0.05, 0.1, 0.5 και 1mM (όπου η βιωσιμότητα μειώθηκε έως και κατά 20%). Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, 5 και 10mM, όπου η βιωσιμότητα μειώθηκε έως και κατά 40%, οι διαφορές ήταν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο βεβαιότητας $P < 0.01$.

7.5.3.2

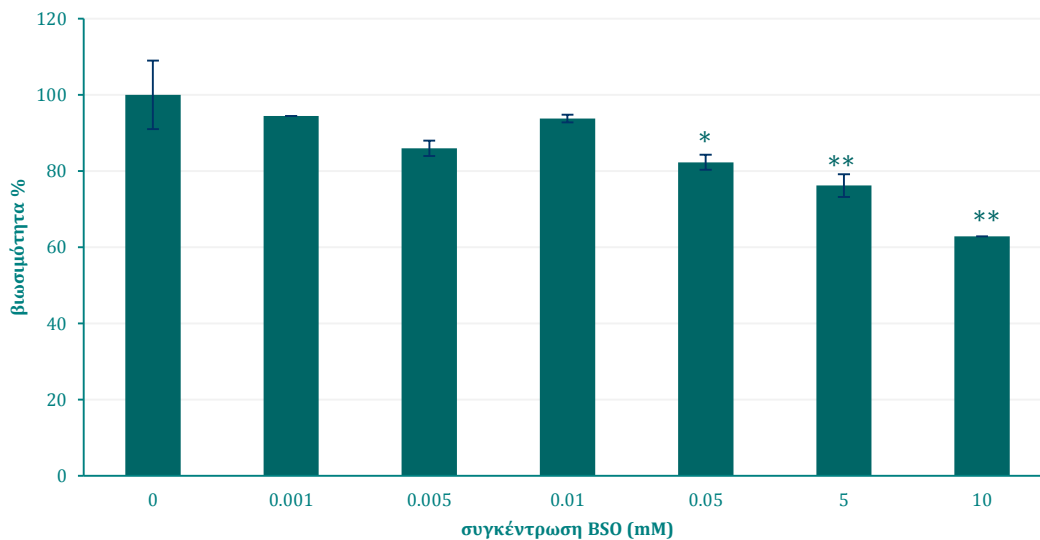
Αποτελέσματα μελετών επίδρασης του αναστολέα της σύνθεσης της γλουταθειόνης, σε συνδυασμό με το φως διέγερσης, στη βιωσιμότητα των κυττάρων.

Η μεθοδολογία επώασης των κυττάρων με τον αναστολέα της σύνθεσης γλουταθειόνης έγινε σύμφωνα με τα βήματα τα οποία αναπτύχθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις BSO:

0.001mM, 0.005mM, 0.01mM, 0.05mM, 5mM και 10mM

Με το πέρας των 24h επώασης με το BSO, απορρίφθηκε το διάλυμα μέσου – BSO και έγιναν δυο πλύσεις των κυττάρων με 1 ml PBS την κάθε φορά προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα αυτών από τα κύτταρα. Ακολούθως φρέσκο PBS, ~ 300 μ l, προστέθηκε στα κύτταρα με σκοπό να περιοριστεί κατά το δυνατό η άμεση επίδραση του περιβάλλοντος σε αυτά και πραγματοποιήθηκε η ακτινοβόλησή τους με φως από το διοδικό laser στα 652 nm και δόση ενέργειας 180 mJ/cm^2 . Συγκεκριμένα η ακτινοβόληση ήταν 3 mW/cm^2 και η διάρκεια αυτής 60s . Κατόπιν φρέσκο εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο συμπληρώθηκε στα τριβλία και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24h οπότε και έγινε η μέτρηση βιωσιμότητας με τον βιοχημικό έλεγχο MTT. Τα αποτελέσματα του ελέγχου παραθέτονται στο διάγραμμα του Σχήματος 7.22.

συνδυασμένη δράση φωτός διέγερσης και BSO



Σχήμα 7.22: Διάγραμμα συγκέντρωσης BSO - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων μετά από ακτινοβόληση με το φως διέγερση με δόση ενέργειας 180 mJ/cm^2 . Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων που επώαστηκαν με BSO και της ομάδας ελέγχου είναι στατιστικά σημαντικές με επίπεδα βεβαιότητας: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (t-test)

Ακτινοβόληση των κυττάρων με το φως διέγερσης παρουσία BSO δε φάνηκε να επιδρά περαιτέρω στη βιωσιμότητά τους σε σχέση με την επίδραση που είχε από μόνο του το BSO. Συγκρίνοντας τα δυο διαγράμματα στα Σχήματα 7.21 και 7.22, συγκέντρωσης BSO – βιωσιμότητα και ακτινοβόληση παρουσία BSO – βιωσιμότητα παρατηρήθηκε ότι έχουν την ίδια μορφή. Η βιωσιμότητα όχι μόνο μειώθηκε βαθμιαία με αύξηση της συγκέντρωσης του BSO αλλά και το ποσοστό μείωσης βιωσιμότητας ήταν το ίδιο στις ίδιες συγκεντρώσεις BSO. Άρα η έκθεση στο φως διέγερσης παρουσία BSO δεν επιδρά στη βιωσιμότητα των κυττάρων.

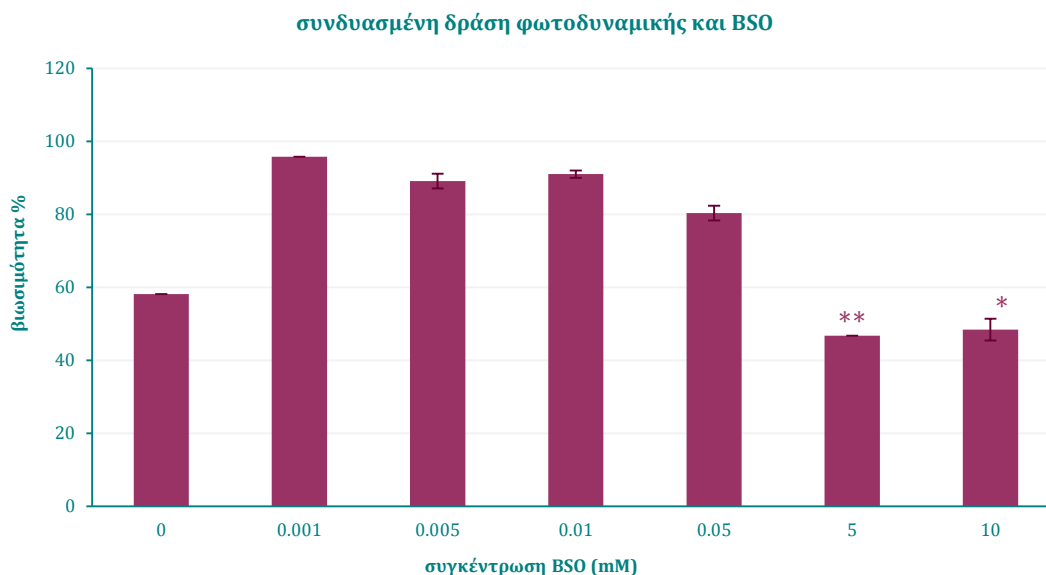
7.5.3.3

Αποτελέσματα μελετών συνδυαστικής δράσης της φωτοδυναμικής και του αναστολέα της σύνθεσης της γλουταθειόνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Προκειμένου να ελεγχθεί η συνδυαστική δράση της φωτοδυναμικής με τον αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης ακολουθήθηκε η εξής μεθοδολογία: LNCaP κύτταρα, 2×10^5 / τριβλίο, επώστηκαν για 24h σε τριβλία Petri εμβαδού 9.6cm^2 με εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο. Ακολούθως αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και στα κύτταρα προστέθηκε φρέσκο διάλυμα θρεπτικού μέσου - BSO - m-THPC. Οι συγκεντρώσεις BSO οι οποίες ελέχθησαν είναι:

0.001mM, 0.005mM, 0.01mM, 0.05mM, 5mM και 10mM

Η συγκέντρωση της m-THPC ήταν $0.22 \mu\text{M}$. Η επώαση με το BSO και τον φωτοευαισθητοποιητή ήταν ταυτόχρονη και διήρκησε 24h. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης αφαιρέθηκε το διάλυμα αυτό από τα κύτταρα και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με προηγούμενα προκειμένου να ακτινοβοληθούν τα κύτταρα. Η ακτινοβολήση έγινε με το σύστημα διοδικού laser στα 652nm με ισχύ ακτινοβολήσης $3 \text{mW}/\text{cm}^2$ και διάρκεια ακτινοβολήσης 60s. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων με εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο για 24h οπότε και έγινε η μέτρηση βιωσιμότητας με το βιοχημικό έλεγχο MTT. Τα αποτελέσματα της συνδυασμένης δράσης της φωτοδυναμικής με τον αναστολέα της γλουταθειόνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων παραθέτονται στο διάγραμμα του Σχήματος 7.23.



Σχήμα 7.23: Διάγραμμα συγκέντρωσης BSO - βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων μετά από φωτοδυναμική με $0.22 \mu\text{M}$ m-THPC και δόση ενέργειας $180 \text{mJ}/\text{cm}^2$. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων που επώστηκαν με BSO και της ομάδας ελέγχου είναι στατιστικά σημαντικές με επίπεδα βεβαιότητας: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (t-test)

Η πρώτη ράβδος στο διάγραμμα του Σχήματος 7.23 αντιστοιχεί στην επίδραση της φωτοδυναμικής στα κύτταρα απουσία BSO. Φωτοδυναμική με $0.22 \mu\text{M}$ m-THPC και δόση ενέργειας $180 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ προκάλεσε 40% μείωση στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Η χρήση του BSO σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική επέδρασε με δυο διαφορετικούς τρόπους στη βιωσιμότητα, ανάλογα με τη συγκέντρωσή του, οι οποίοι περιγράφονται παρακάτω:

Επώαση με τις μικρότερες συγκεντρώσεις BSO, 0.001 mM , 0.005 mM , 0.01 mM και 0.05 mM οδήγησε σε αναστολή της δράσης της φωτοδυναμικής όπου τα ποσοστά βιωσιμότητας που καταγράφηκαν προσέγγισαν σχεδόν το 100% ενώ η φωτοδυναμική απουσία BSO προκάλεσε τη μείωση των επιπέδων βιωσιμότητας στο 60%. Τα ποσοστά αυτά έχουν υπολογιστεί με βάση τη βιωσιμότητα της ομάδας ελέγχου, της ομάδας δηλαδή η οποία δεν έχει υποστεί την επίδραση κάποιου παράγοντα.

Η πτώση της βιωσιμότητας ακολουθεί την αύξηση της συγκέντρωσης του BSO για παράδειγμα στην περίπτωση κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε 0.001 mM BSO η βιωσιμότητα ήταν περίπου 95% ενώ μειώθηκε στο 80% όταν η συγκέντρωση BSO αυξήθηκε στα 0.05 mM . Σε κάθε περίπτωση ωστόσο η παρουσία του BSO σε αυτές τις συγκεντρώσεις φαίνεται πως ανταγωνίζεται τη δράση της φωτοδυναμικής, αίροντας την φωτοδυναμικά επαγόμενη κυτταροτοξικότητα και διατηρώντας τη βιωσιμότητα σε υψηλά επίπεδα.

Επώαση με τις δυο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις BSO, 5 mM και 10 mM , σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική προκάλεσε πτώση της βιωσιμότητας στο 47% και 48% αντίστοιχα. Επετεύχθησαν δηλαδή χαμηλότερα ποσοστά βιωσιμότητας από το συνδυασμό φωτοδυναμικής και BSO σε σχέση με τη φωτοδυναμική μόνη της.

Για την κατανόηση και ερμηνεία της παραπάνω δυικής συμπεριφοράς του BSO σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική μετρήθηκε η ενδοκυττάρια γλουταθειόνη τόσο σε κύτταρα ομάδας ελέγχου, κύτταρα δηλαδή τα οποία δεν είχαν δεχτεί τη δράση του BSO όσο και σε κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με ενδεικτικές συγκεντρώσεις BSO για 24h.

7.5.3.4

Αποτελέσματα μελετών μέτρησης ενδοκυττάριας γλουταθειόνης

Για τη μέτρηση των επιπέδων της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης ακολουθήθηκε η μεθοδολογία που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 6.7.

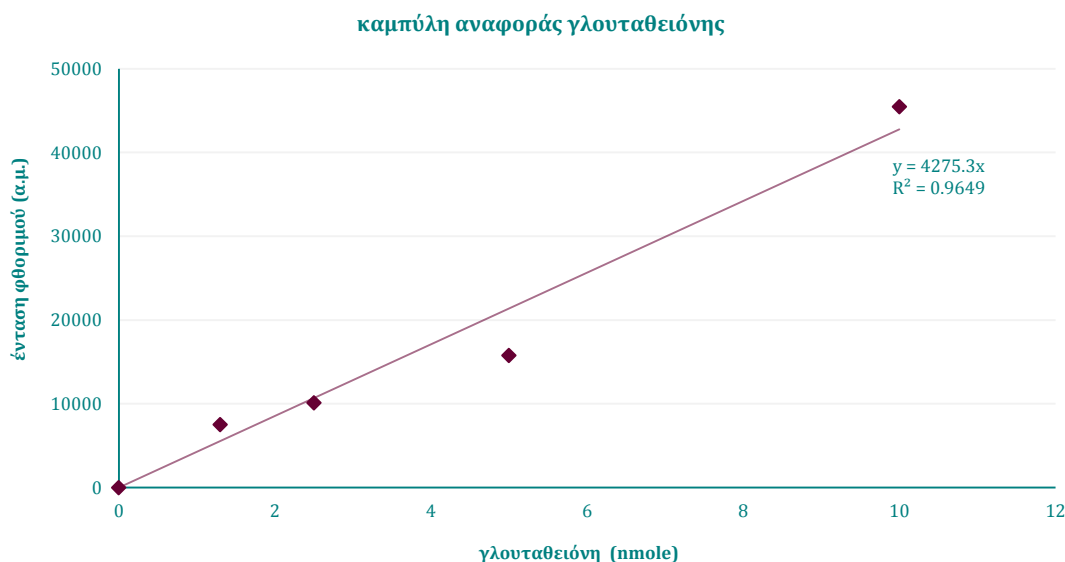
Συλλέγονταν 40×10^6 LNCaP κύτταρα, ο ελάχιστος απαραίτητος αριθμός κυττάρων για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου μέτρησης ενδοκυττάριας γλουταθειόνης. Η ενδοκυττάρια γλουταθειόνη μετρήθηκε σε τρεις περιπτώσεις. Σε κύτταρα ελέγχου, απουσία BSO ή οποιουδήποτε άλλου παράγοντα, και σε κύτταρα τα οποία επώαστηκαν

με $0.001mM$, $0.01mM$ και $10 mM$ BSO για 24h. Επιλέχθηκαν δηλαδή οι δυο ακραίες συγκεντρώσεις καθώς και μια ενδεικτική ενδιάμεση για μελέτη.

Η μεθοδολογία η οποία ακολουθήθηκε ήταν η εξής. Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης με το BSO γίνονταν 2 πλύσεις των φλασκών με PBS ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα θρεπτικού μέσου – BSO. Στη συνέχεια γινόταν η αποκόλληση των κυττάρων από τις φλάσκες και η μέτρηση των κυττάρων με το αιμοκυτταρομετρο Neubauer σύμφωνα με τη μεθοδολογία που έχει ήδη περιγραφεί προηγούμενα. Το διάλυμα των κυττάρων ρυθμιζόταν με τέτοιο τρόπο ώστε τελικά να περιέχει 40×10^6 κύτταρα. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση ώστε να απορριφθεί το υπερκείμενο διάλυμα και στα υποκείμενα κύτταρα να προστεθεί το διάλυμα λύσης. Στη συνέχεια τοποθετούνταν τα κύτταρα στους $0^{\circ}C$ για 15 min και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 15000 rpm για 10 min. Με το πέρας της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο διάλυμα συλλέγονταν ενώ το υποκείμενο ίζημα απορριπτόταν.

Αμέσως γινόταν η μέτρηση του σήματος φθορισμού των διαλυμάτων σύμφωνα με τη μεθοδολογία η οποία περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 6.7. Η μέτρηση του σήματος φθορισμού των υπό εξέταση διαλυμάτων καθώς και των πρότυπων διαλυμάτων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς πραγματοποιείτο ταυτόχρονα.

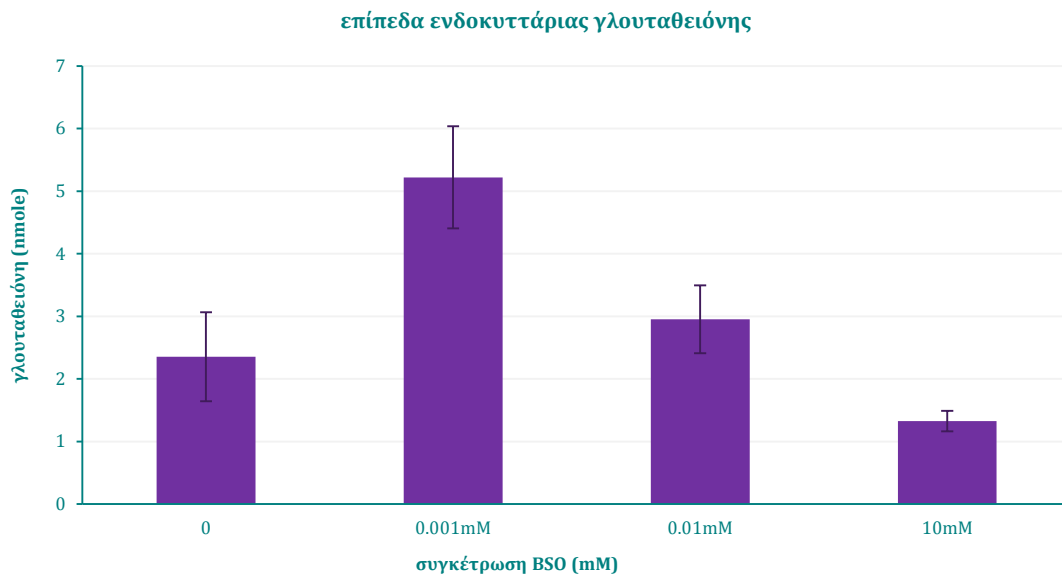
Βάση των μετρήσεων έντασης φθορισμού για τις πρότυπες γνωστές συγκεντρώσεις ανηγμένης γλουταθειόνης κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης γλουταθειόνης – έντασης φθορισμού η οποία παρουσιάζεται στο Σχήμα 7.24.



Σχήμα 7.24: Καμπύλη αναφοράς γλουταθειόνης – έντασης φθορισμού

Βάση της καμπύλης αναφοράς και της χαρακτηριστικής ευθείας $y = 4275.3 x$, $R^2 = 0.9649$, υπολογίστηκαν οι ποσότητες ενδοκυττάριας γλουταθειόνης

ανάλογα με την αντίστοιχη ένταση φθορισμού κάθε συνθήκης, και κατασκευάστηκε το διάγραμμα συγκέντρωσης BSO – ενδοκυττάριας γλουταθειόνης του Σχήματος 7.25.



Σχήμα 7.25: Διάγραμμα συγκέντρωσης BSO – ενδοκυττάριας γλουταθειόνης

Η πρώτη ράβδος στο διάγραμμα συγκέντρωσης BSO – γλουταθειόνης αντιστοιχεί σε κύτταρα της ομάδας ελέγχου, απουσία BSO. Επώαση για 24h με 0.001mM BSO οδήγησε σε υπερδιπλασιασμό της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης, από 2.35 nmole απουσία BSO σε 5.22 nmole. Η αμέσως χαμηλότερη συγκέντρωση που μετρήθηκε αύξησε ελαφρώς την ενδοκυττάρια γλουταθειόνη. Αντιθέτως στη μεγαλύτερη συγκέντρωση BSO, 10 mM, η ενδοκυττάρια γλουταθειόνη σχεδόν υποδιπλασιάστηκε, 1.32 nmole σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

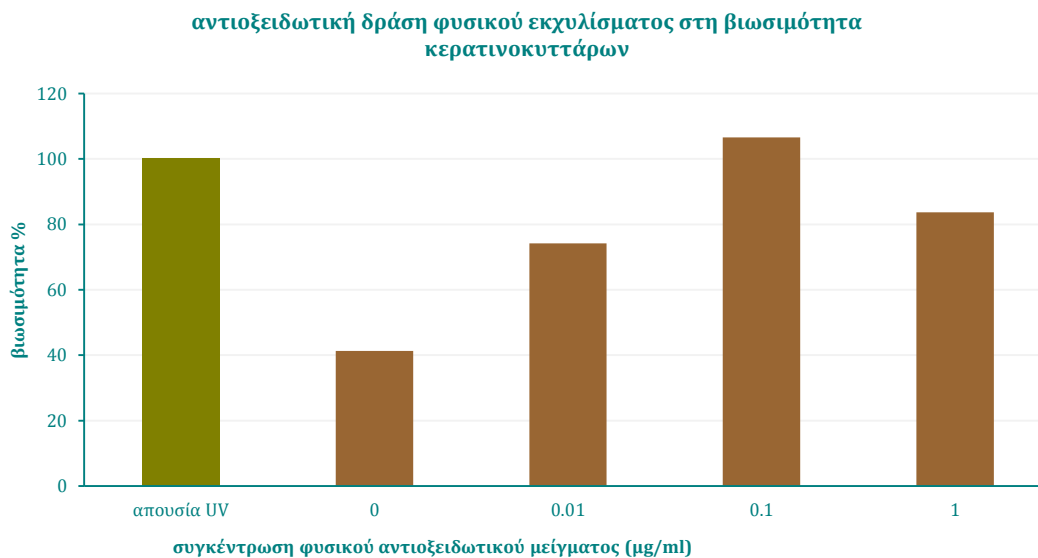
Φαίνεται πως οι μικρότερες συγκεντρώσεις BSO έδρασαν ως ήπια οξειδωτικά ερεθίσματα και ενεργοποίησαν τους ενδοκυττάριους μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας προς την κατεύθυνση υπερπαραγωγής γλουταθειόνης ώστε το κύτταρο να ανταποκριθεί στην αύξηση των επιπέδων οξειδωτικού στρες. Αντίθετα, όταν χορηγήθηκε μεγάλη συγκέντρωση BSO αυτή έδρασε καταστέλλοντας τη βιοσύνθεση της γλουταθειόνης και σε αυτό το μηχανισμό αποδίδεται η μείωση της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης σχεδόν στο μισό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

7.5.4

Αποτελέσματα μελετών συνέργειας φωτοδυναμικής με μεταβολή της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας μέσω χορήγησης φυσικού μείγματος σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις, στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Οι μελέτες αυτές αφορούν τη διερεύνηση της δυνατότητας συνδυασμού της φωτοδυναμικής με ένα φυσικό αντιοξειδωτικό μείγμα σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις με στόχο την ενίσχυση της φωτοδυναμικής δράσης. Και σε αυτό τον κύκλο μελετών οι παράμετροι δοσιμετρίας της φωτοδυναμικής ήταν: ελεύθερη m-THPC σε συγκέντρωση $0.22 \mu\text{M}$, ακτινοβολία $3 \text{ mW}/\text{cm}^2$, διάρκεια ακτινοβολίας 60 s για τους λόγους που αναφέρθηκαν προηγουμένα (Κεφάλαιο 7.5).

Προγενέστερες της φωτοδυναμικής μελέτες εύρεσης εκείνου του φυσικού αντιοξειδωτικού μείγματος το οποίο παρέχει την καλύτερη προστασία έναντι του επαγόμενου από την υπεριώδη ακτινοβολία οξειδωτικού στρες ανέδειξαν το εκχύλισμα από το φλοιό του πεύκου *Pinus halepensis* ως το βέλτιστο ανάμεσα σε φυσικά αντιοξειδωτικά μείγματα συναφούς προέλευσης. Στο διάγραμμα του Σχήματος 7.26 παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική – προστατευτική δράση του φυσικού αντιοξειδωτικού μείγματος, πλούσιου σε πολυφαινόλες, σε κερατινοκύτταρα τα οποία εκτέθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία.



Σχήμα 7.26: Διάγραμμα συγκέντρωσης φυσικού αντιοξειδωτικού μείγματος από εκχύλισμα φλοιού πεύκου *P. halepensis* – βιωσιμότητας κερατινοκυττάρων μετά από έκθεσή τους σε UV ακτινοβολία, $5 \text{ mW}/\text{cm}^2$, 3 s .

Στο διάγραμμα αποτυπώνεται η προστατευτική δράση του φυσικού αντιοξειδωτικού μείγματος προερχομένου από φλοιό του πεύκου *P. halepensis* σε όλες

τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Για συγκέντρωση $0.1 \mu\text{g/ml}$ επετεύχθη ουσιαστικά πλήρης αναστολή του επαγομένου από τη UV ακτινοβολία οξειδωτικού στρες καθώς η βιωσιμότητα των κερατινοκυττάρων διατηρήθηκε στα επίπεδα των κυττάρων της ομάδας ελέγχου, της ομάδας δηλαδή η οποία δεν υπέστη την επίδραση της UV ακτινοβολίας.

Κατά τις μελέτες της συνδυασμένης δράσης της φωτοδυναμικής με το φυσικό μείγμα, με στόχο να διερευνηθεί η δυνατότητα ενίσχυσης της φωτοδυναμικής δράσης, ελέγχθηκε καταρχήν η επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων του μείγματος για δυο διαφορετικούς χρόνους επώασης με τα κύτταρα. Ο χρόνος εφαρμογής του προ-οξειδωτικού ερεθίσματος είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Ένα προ - οξειδωτικό ερέθισμα διαταράσσει άμεσα την ενδοκυττάρια ισορροπία οξειδωτικών - αντιοξειδωτικών και το κύτταρο αντιδρά με στόχο την αποκατάσταση της ισορροπίας. Εάν ωστόσο το ερέθισμα έχει ικανά χαρακτηριστικά τότε μπορεί να ενεργοποιήσει μονοπάτια κυτταρικού θανάτου επαγόμενα από το οξειδωτικό στρες.

Καθώς η επίδραση του προ-οξειδωτικού ερεθίσματος είναι άμεση ακολουθήθηκαν δυο διαφορετικές προσεγγίσεις σχετικές με το χρόνο χορήγησης του φυσικού μείγματος. Παρουσιάζει ενδιαφέρον να μελετηθεί κατά πόσο η χορήγηση του φυσικού μείγματος, πριν την διέγερση του φωτοευαισθητοποιητή κατά τη φωτοδυναμική, έχει τη δυνατότητα να διαταράξει την ισορροπία του κυτταρικού συστήματος με τέτοιο τρόπο ώστε αυτό να βρεθεί σε προ-οξειδωτική κατάσταση. Ακτινοβόληση στο σημείο αυτό, όπου ήδη το κυτταρικό σύστημα είναι σε προ-οξειδωτική κατάσταση θα μπορούσε, ενδεχομένως, να ενισχύσει τη δράση της φωτοδυναμικής.

Η δεύτερη προσέγγιση αφορούσε τη χορήγηση του φυσικού μείγματος αμέσως μετά την ολοκλήρωση της φωτοδυναμικής, δηλαδή με το πέρας της ακτινοβόλησης, ώστε το κυτταρικό σύστημα το οποίο ήδη βρίσκεται σε οξειδωτικό στρες λόγω φωτοδυναμικής να αναπτύξει, ενδεχομένως, υψηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες καταλήγοντας σε υψηλότερα επίπεδα κυτταροτοξικότητας σε σχέση με τη φωτοδυναμική μόνη της.

Των μελετών συνδυασμένης δράσης φωτοδυναμικής με το φυσικό μείγμα προηγήθηκαν μελέτες επίδρασης διαφόρων συγκεντρώσεων του μείγματος στη βιωσιμότητα των κυττάρων για τους δυο χρόνους επώασης.

7.5.4.1

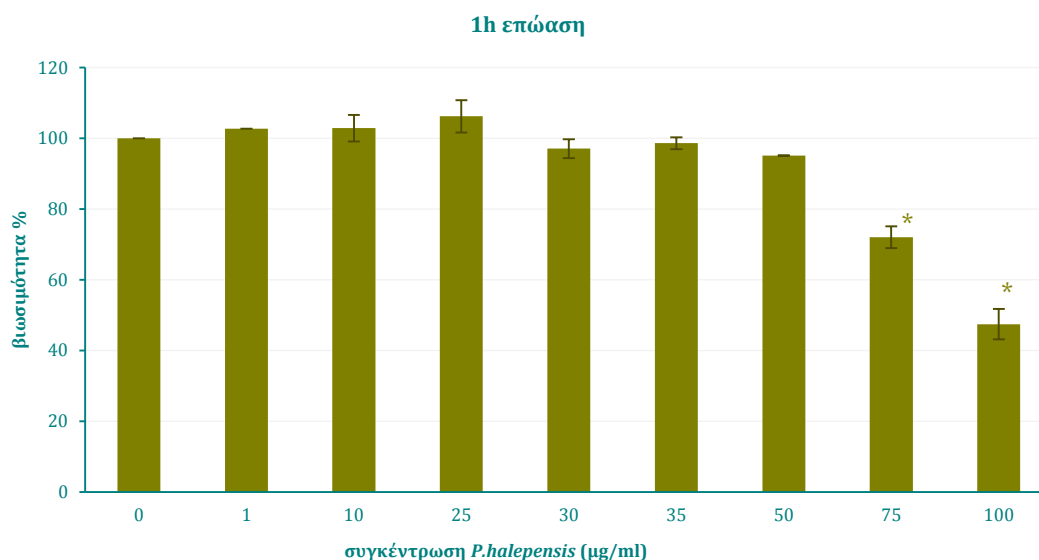
Αποτελέσματα μελετών επίδρασης φυσικού μείγματος στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Ελέγχθηκε η επίδραση των παρακάτω συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος του φλοιού στη βιωσιμότητα των κυττάρων:

1, 10, 25, 30, 35, 50, 75 και 100 $\mu\text{g/ml}$

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τη μελέτη ήταν η εξής: LNCaP κύτταρα, 2×10^5 / τριβλίο, επώαστηκαν για 24h σε τριβλία Petri εμβαδού 9.6cm^2 με εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο. Ακολούθως αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και στα κύτταρα προστέθηκε φρέσκο διάλυμα θρεπτικού μέσου – εκχυλίσματος στις κατάλληλες συγκεντρώσεις. Ελέχθησαν δυο χρόνοι επώασης των κυττάρων με το εκχύλισμα.

Στην πρώτη περίπτωση η διάρκεια της επώασης ήταν 1h, όπου μετά τον τερματισμό της το διάλυμα θρεπτικού μέσου – εκχυλίσματος αφαιρέθηκε από τα κύτταρα και προστέθηκε φρέσκο εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα αφέθηκαν με αυτό στον επωαστικό κλίβανο για 24h, οπότε και έγινε η μέτρηση της βιωσιμότητας με τον βιοχημικό έλεγχο MTT. Ο λόγος για αυτήν την επιλογή ήταν ότι κατά τη μελέτη του συνδυασμού της φωτοδυναμικής με το φυσικό αντιοξειδωτικό το εκχύλισμα θα προστίθετο στα κύτταρα 1h πριν την ακτινοβολήση των κυττάρων και η βιωσιμότητα θα μετριοτάνα 24h αργότερα.



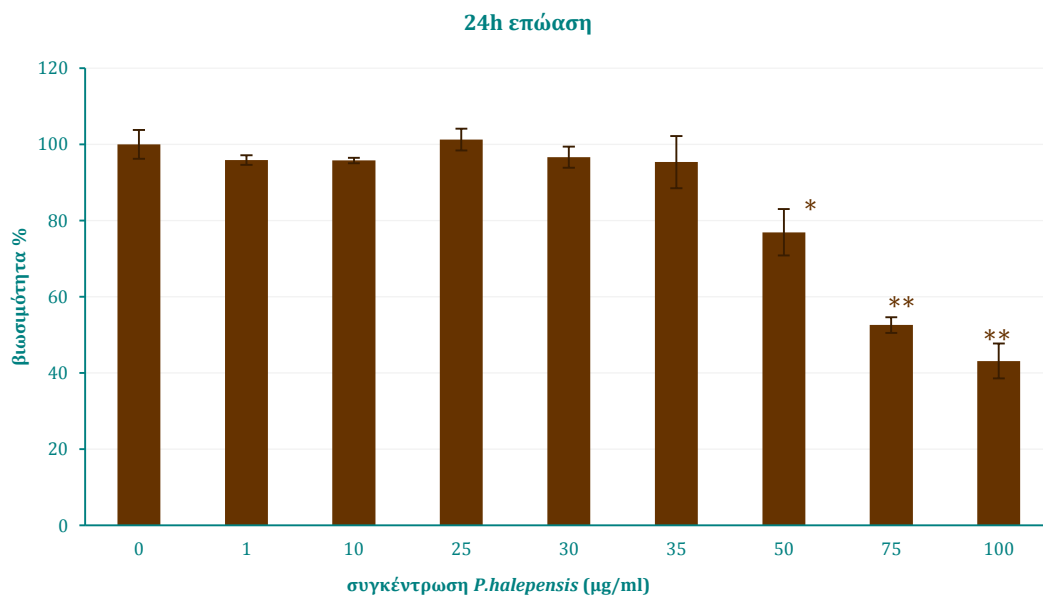
Σχήμα 7.27: Διάγραμμα συγκέντρωσης φυσικού αντιοξειδωτικού μείγματος από εκχύλισμα φλοιού πεύκου *P. halepensis* – βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων μετά από 1h επώασης. * $P < 0.05$, (*t*-test)

Στη δεύτερη περίπτωση η διάρκεια της επώασης ήταν 24h. Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης έγινε η μέτρηση βιωσιμότητας με το βιοχημικό έλεγχο MTT. Η επιλογή αυτή οφείλεται στο ότι ένα μέρος της μελέτης συνδυασμού της φωτοδυναμικής με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών αφορούσε τη χορήγηση του εκχυλίσματος αμέσως μετά την ακτινοβολήση και μέτρηση της βιωσιμότητας 24h αργότερα.

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των προαναφερθεισών συγκεντρώσεων του φυσικού μείγματος πολυφαινολών στη βιωσιμότητα των κυττάρων παραθέτονται στα διαγράμματα των Σχημάτων 7.27 και 7.28.

Επώαση 1h με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών συγκεντρώσεων από 1 έως 50 $\mu\text{g/ml}$ δεν επηρέασε τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Οι μεγαλύτερες ωστόσο συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας. Η συγκέντρωση 75 $\mu\text{g/ml}$ προκάλεσε μείωση της βιωσιμότητας κατά περίπου 30% ενώ η μεγαλύτερη συγκέντρωση που ελέγχθηκε 100 $\mu\text{g/ml}$ κατά περίπου 50%.

Επώαση των κυττάρων για 24h με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών ακολούθησε κατά κανόνα τη συμπεριφορά που καταγράφηκε και για 1h επώαση. Οι διαφορές που εντοπίζονταν αφορούσαν τη συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/ml}$ η οποία πλέον προκαλούσε στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας κατά περίπου 20%, ενώ οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, 75 και 100 $\mu\text{g/ml}$ προκαλούσαν ακόμα μεγαλύτερη πτώση της βιωσιμότητας (και σε σχέση με την επώαση μιας ώρας) κατά 50% και 60% αντίστοιχα.



Σχήμα 7.28: Διάγραμμα συγκέντρωσης φυσικού αντιοξειδωτικού μείγματος από εκχύλισμα φλοιού πεύκου *P. halepensis* – βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων μετά από 24h επώασης. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (t-test)

Με τις παραπάνω μετρήσεις βιωσιμότητας αποτυπώνεται χαρακτηριστικά η διαφορετική συμπεριφορά του φυσικού μείγματος πολυφαινολών ανάλογα με τη συγκέντρωση χορήγησής του. Σε χαμηλές σχετικά συγκεντρώσεις το φυσικό μείγμα δεν επηρεάζει στο παραμικρό τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Σε μεγαλύτερες ωστόσο συγκεντρώσεις συμπεριφέρεται προ-οξειδωτικά, ενεργοποιώντας ενδοκυττάριους μηχανισμούς οι οποίοι προκαλούν τελικά τον κυτταρικό θάνατο.

7.5.4.2

Αποτελέσματα μελετών της συνδυασμένης δράσης φωτοδυναμικής και φυσικού μείγματος πολυφαινολών στη βιωσιμότητα των κυττάρων

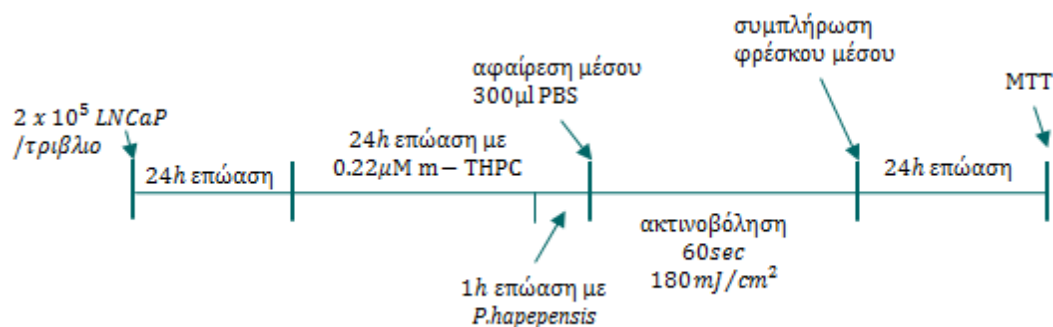
Με βάση τις παραπάνω μελέτες επιλέχθηκαν να μελετηθούν ως προς τη συνεργατική τους δράση με τη φωτοδυναμική οι συγκεντρώσεις:

25, 30, 35 και 50 $\mu\text{g/ml}$

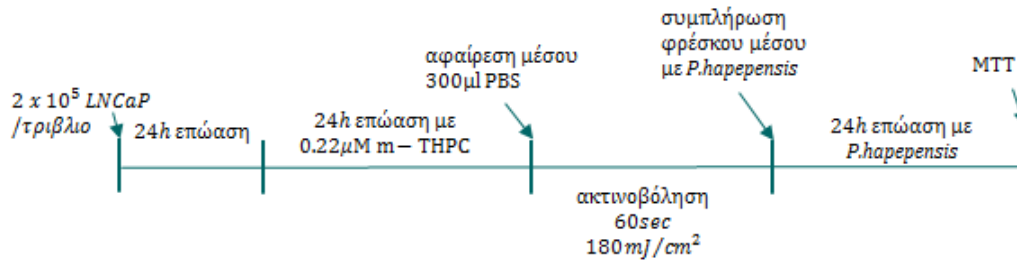
Η επιλογή αυτή έγινε καθώς θέλαμε να μελετήσουμε κατά πόσο συγκεντρώσεις οι οποίες δεν είναι τοξικές μπορούν να ευαισθητοποιήσουν το σύστημα των κυττάρων καθιστώντας τα περισσότερο ευάλωτα στο επαγόμενο από τη φωτοδυναμική δράση οξειδωτικό στρες. Με άλλα λόγια να ελεγχθεί η προ-οξειδωτική δράση του φυσικού μείγματος πολυφαινολών.

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τις μελέτες της συνεργατικής δράσης της φωτοδυναμικής με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών σε πιθανές προ-οξειδωτικές(;) συγκεντρώσεις για δυο διαφορετικούς χρόνους επώασης συνοπτικά παρατίθεται στα παρακάτω γραφήματα:

Μελέτες 1h επώασης:

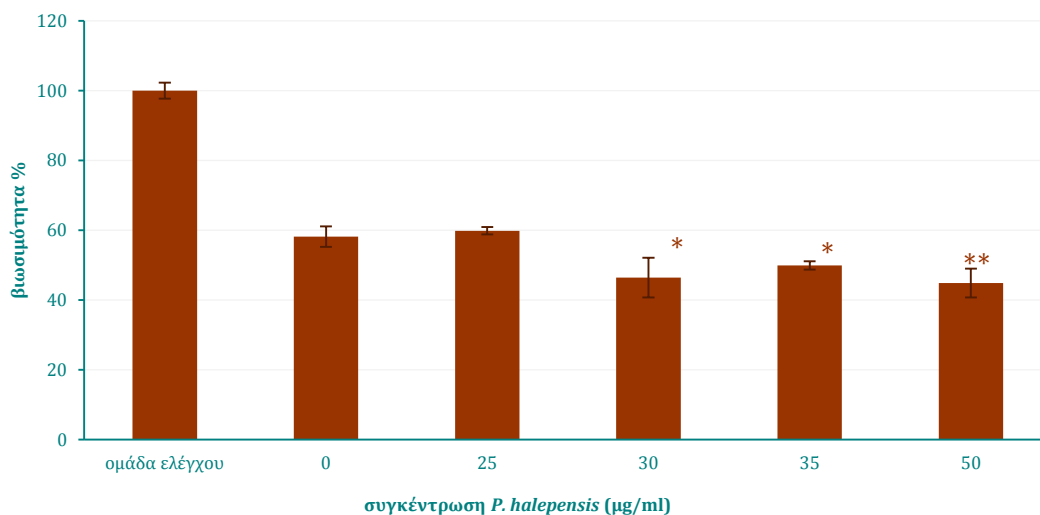


Μελέτες 24h επώασης:



Οι παράμετροι δοσιμετρίας για τη φωτοδυναμική ήταν: ελεύθερη m-THPC σε συγκέντρωση $0.22\mu M$, χρόνος επώασης 24h, ακτινοβόληση $3\text{ mW}/\text{cm}^2$, διάρκεια ακτινοβόλησης 60 s. Τα αποτελέσματα της συνδυαστικής δράσης της φωτοδυναμικής και των προαναφερθεισών συγκεντρώσεων του φυσικού μείγματος πολυφαινολών στη βιωσιμότητα των κυττάρων παραθέτονται στα διαγράμματα των Σχημάτων 7.29 και 7.30.

1h επώαση με *P. halepensis* πριν τη φωτοδυναμική

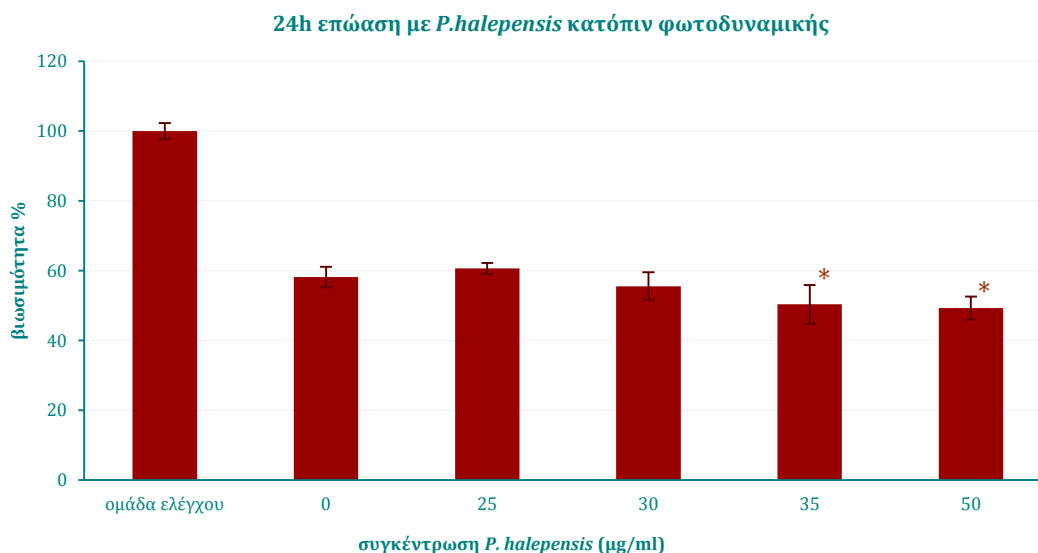


Σχήμα 7.29: Διάγραμμα συγκέντρωσης φυσικού μείγματος πολυφαινολών από φλοιό πεύκου *P. halepensis* – βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων μετά από 1h επώασης με αυτό και φωτοδυναμική με $0.22\mu M$ m-THPC, $180\text{ mJ}/\text{cm}^2$. Η στατιστική σημαντικότητα έχει ελεγχθεί ως προς τη βιωσιμότητα της ομάδας που δέχτηκε μόνο φωτοδυναμική, απουσία εκχυλίσματος. Η πρώτη στήλη στο διάγραμμα αντιστοιχεί στη βιωσιμότητα των κυττάρων που δεν υπέστησαν τη δράση της φωτοδυναμικής και του εκχυλίσματος. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (t-test)

Φωτοδυναμική δράση με $0.22\mu M$ m-THPC και δόση ενέργειας $180\text{ mJ}/\text{cm}^2$ προκάλεσε 40% μείωση της βιωσιμότητας σε σχέση με τη βιωσιμότητα της ομάδας ελέγχου. Χορήγηση του φυσικού μείγματος 1h πριν τη φωτοδυναμική σε συγκέντρωση $25\text{ μg}/\text{ml}$ δεν επέφερε καμία μεταβολή στα ποσοστά μείωσης της βιωσιμότητας. Όλες ωστόσο οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φυσικού μείγματος, οι οποίες ελέχθησαν,

προκάλεσαν σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική, στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας σε σχέση με την ομάδα κυττάρων που δέχτηκε την επίδραση μόνο της φωτοδυναμικής. Η μείωση αυτή ήταν πάνω από 50% για όλες τις συγκεντρώσεις, με επίπεδα στατιστικής βεβαιότητας $P < 0.05$ για 30 και 35 $\mu\text{g/ml}$ και $P < 0.01$ για 50 $\mu\text{g/ml}$. Καμία από αυτές τις συγκεντρώσεις όταν χορηγήθηκε στα κύτταρα μόνο το εκχύλισμα δεν προκάλεσε μείωση της βιωσιμότητάς τους.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις είναι ενδεικτικές της συνέργειας της φωτοδυναμικής με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών. Το σύστημα των κυττάρων, το οποίο λόγω της χορήγησης του φυσικού μείγματος πολυφαινολών φαίνεται πως τέθηκε σε προ-οξειδωτική κατάσταση, δεν μπορεί να ανταγωνιστεί μέσω των αντιοξειδωτικών αμυντικών του μηχανισμών το νέο οξειδωτικό ερέθισμα, δηλαδή τη φωτοδυναμική δράση, το οποίο επιδρά σε αυτό. Αποτέλεσμα της συνέργειας είναι τα μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου.



Σχήμα 7.30: Διάγραμμα συγκέντρωσης φυσικού μείγματος πολυφαινολών από φλοιό πεύκου *P. halepensis* – βιωσιμότητας LNCaP κυττάρων μετά φωτοδυναμική με 0.22 μM m-THPC, 180 mJ/cm^2 και 24h επώασης με το εκχύλισμα. Η στατιστική σημαντικότητα έχει ελεγχθεί ως προς τη βιωσιμότητα της ομάδας που δέχτηκε μόνο φωτοδυναμική, απουσία εκχυλίσματος. Η πρώτη στήλη στο διάγραμμα αντιστοιχεί στη βιωσιμότητα των κυττάρων που δεν υπέστησαν τη δράση της φωτοδυναμικής και του εκχυλίσματος. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (t-test)

Προσθήκη του εκχυλίσματος αμέσως μετά το πέρας της φωτοδυναμικής με 0.22 μM m-THPC και δόση ενέργειας 180 mJ/cm^2 διαφοροποίησε ελαφρώς τα φαινόμενα σε σχέση με την προηγούμενη περίπτωση όπου χορηγήθηκε μια ώρα πριν. Εκχύλισμα σε συγκεντρώσεις 25 και 30 $\mu\text{g/ml}$ δε φάνηκε να επηρεάζει τη δράση της φωτοδυναμικής καθώς η βιωσιμότητα των κυττάρων παρέμεινε στο 60%, ποσοστά που επιτυγχάνει από μόνη της η φωτοδυναμική. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις

εκχυλίσματος 35 και 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ φαίνεται ότι προκάλεσαν μείωση της βιωσιμότητας στο 50%, στατιστικά σημαντική μείωση ως προς τη βιωσιμότητα μετά από φωτοδυναμική μόνο, με επίπεδα βεβαιότητας $P < 0.05$. Η συγκέντρωση ωστόσο 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ προκάλεσε από μόνη της μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Άρα συνέργεια φωτοδυναμικής εκχυλίσματος λαμβάνουμε μόνο για τη συγκέντρωση 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ η οποία δεν προκαλεί μείωση της βιωσιμότητας αλλά δρα προ-οξειδωτικά.

7.6

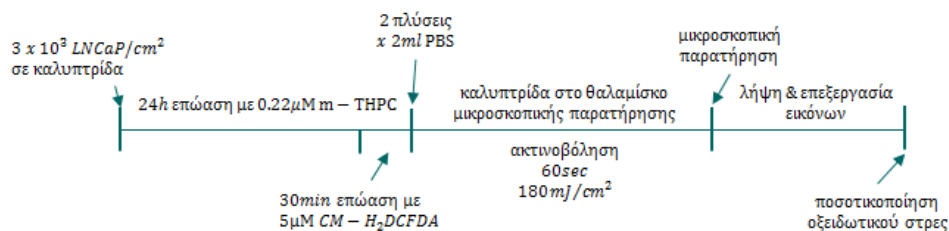
Μελέτες οξειδωτικού στρες

Για τις μελέτες του επαγομένου οξειδωτικού στρες κατόπιν διαφόρων ερεθισμάτων ακολουθήθηκε η μεθοδολογία η οποία περιγράφηκε στα Κεφάλαια 6.6.2 και 6.6.3. Μελετήθηκε η παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών μετά από φωτοδυναμική δράση, μετά από τη χορήγηση διαφόρων συγκεντρώσεων BSO και φυσικού μείγματος πολυφαινολών καθώς και μετά από το συνδυασμό αυτών των παραγόντων με τη φωτοδυναμική. Οι παράμετροι δοσιμετρίας κατά τη φωτοδυναμική, οι συγκεντρώσεις του BSO και του φυσικού μείγματος πολυφαινολών, καθώς και οι χρόνοι επώασης με τα κύτταρα, διατηρήθηκαν όμοιες με τις μελέτες βιωσιμότητας ώστε να είναι εφικτή η σύγκριση των αποτελεσμάτων και η εξαγωγή συμπερασμάτων.

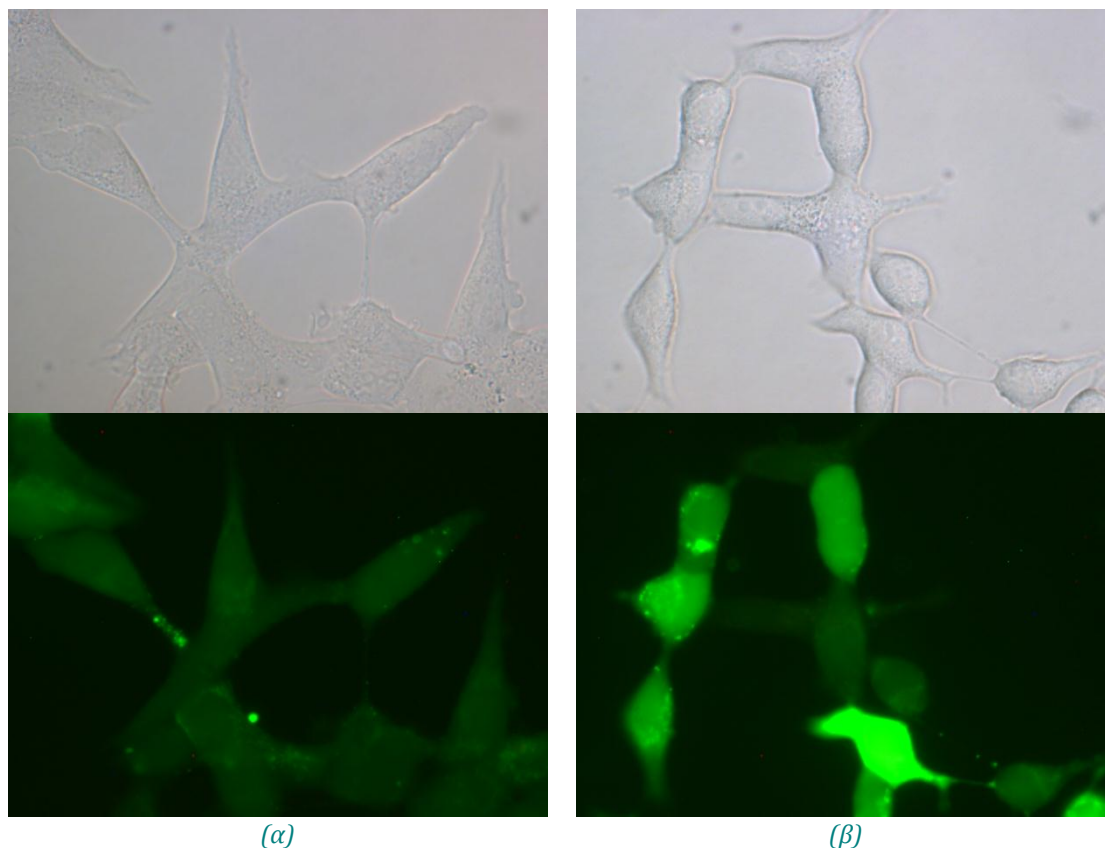
7.6.1

Αποτελέσματα μελετών οξειδωτικού στρες μετά από φωτοδυναμική δράση

Προκειμένου να μελετηθεί το επαγόμενο από τη φωτοδυναμική δράση ενδοκυττάριο οξειδωτικό στρες ακολουθήθηκαν τα πρωτόκολλα που περιγράφηκαν στα Κεφάλαια 6.4.2 και 6.6.2. Συνοπτικά η μεθοδολογία παραθέεται παραστατικά στο παρακάτω διάγραμμα:



Η επεξεργασία των εικόνων και η ποσοτικοποίηση του σήματος φθορισμού γινόταν κατόπιν επεξεργασίας των εικόνων φθορισμού σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 6.6.3.

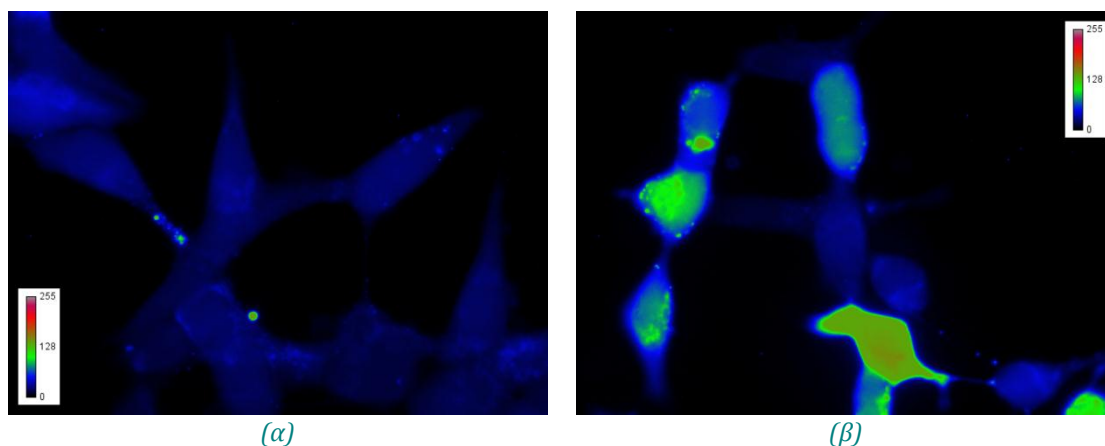


Εικόνα 7.5: (α) Ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη σε LNCaP κύτταρα απουσία οιοδήποτε ερεθίσματος σε φυσιολογικές συνθήκες (κύτταρα ομάδας ελέγχου). (β) Ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη σε LNCaP κύτταρα μετά από φωτοδυναμική με $0.22 \mu\text{M}$ m-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβόληση με διοδικό laser στα 652 nm , $3 \text{ mW}/\text{cm}^2$ για 60 s. Ιχνηθέτης φθορισμού η CM-H₂DCFDA, $5 \mu\text{M}$, διέγερση και συλλογή φθορισμού με τον κύβο FITC (διέγερση στα 488 nm και εκπομπή φθορισμού στα 512 nm). Στην πρώτη σειρά παραθέτονται οι αντίστοιχες εικόνες με προσπίπτοντα φωτισμό.

Στην Εικόνα 7.5 παρουσιάζεται μια τυπική καταγραφή της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών τόσο μετά από φωτοδυναμική δράση με $0.22 \mu\text{M}$ m-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβόληση με διοδικό laser στα 652 nm , $3 \text{ mW}/\text{cm}^2$ για 60 s όσο και σε φυσιολογικές συνθήκες. Στην Εικόνα 7.6 απεικονίζεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών από τα ίδια κύτταρα με την Εικόνα 7.5 με τη χρήση ωστόσο ψευδοχρωμάτων. Στις Εικόνες 7.6(α) και 7.6(β) γίνεται αντιληπτή η διακύμανση της έντασης φθορισμού. Το μαύρο χρώμα στις εικόνες αντιστοιχεί σε μηδενική ένταση φθορισμού, το μπλε στη χαμηλότερη ένταση φθορισμού, το πράσινο σε μεγαλύτερη και όσο το χρώμα πλησιάζει στο κόκκινο η ένταση φθορισμού μεγιστοποιείται.

Η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη του αριθμού των ελευθέρων ριζών και των δραστικών οξυγονούχων ειδών στο εσωτερικό του κυττάρου. Στα κύτταρα τα οποία δεν έχουν υποστεί κανένα οξειδωτικό ερέθισμα, κύτταρα της ομάδας ελέγχου (Εικόνα

7.6(α)), παρατηρείται χαμηλή ένταση φθορισμού. Μετά από φωτοδυναμική δράση ωστόσο η ένταση φθορισμού αυξάνει, Εικόνα 7.6(β), όπου το χρώμα στα κύτταρα γίνεται από πράσινο έως καφέ. Συνεπώς η φωτοδυναμική δράση αύξησε τον αριθμό των ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών στο εσωτερικό του κυττάρου.



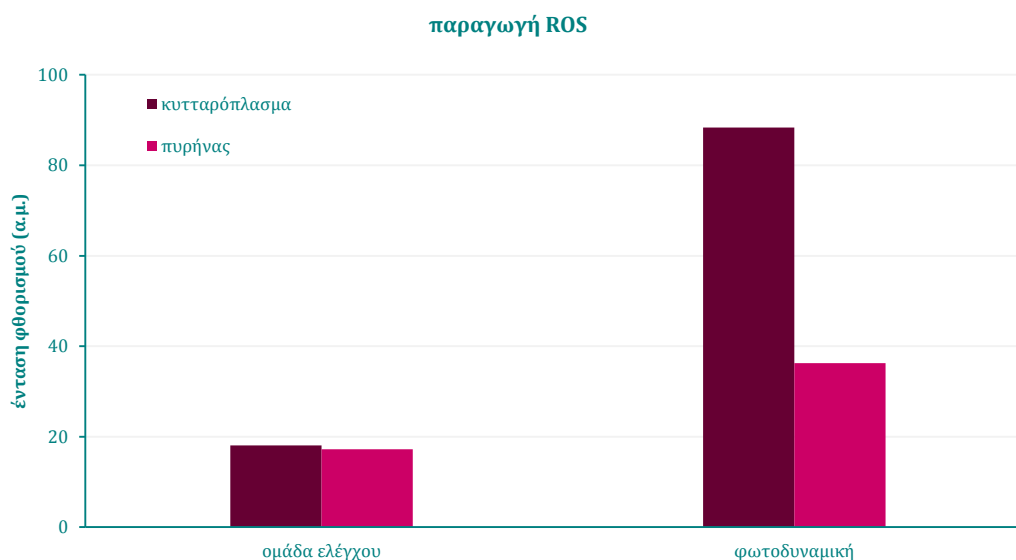
Εικόνα 7.6: Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων του οξειδωτικού στρες. (α) Ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη σε LNCaP κύτταρα απουσία οιοδήποτε ερεθίσματος σε φυσιολογικές συνθήκες (κύτταρα ομάδας ελέγχου). (β) Ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη σε LNCaP κύτταρα μετά από φωτοδυναμική.

Αξίζει να σημειωθεί πως η καταγραφή του εκπεμπόμενου φθορισμού έγινε αμέσως μετά τη φωτοδυναμική δράση άρα το φωτοδυναμικά επαγόμενο οξειδωτικό στρες είναι φαινόμενο άμεσο, ξεκινά δηλαδή αμέσως μετά την ολοκλήρωση της ακτινοβολήσης. Ο ιχνηθέτης $CM-H_2DCFDA$ αντιδρά χημικά με τις ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά οξυγονούχα είδη και έτσι αποκτά την ικανότητα να φθορίζει. Συγκεκριμένα αντιδρά με το μονήρες οξυγόνο, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, τη ρίζα υδροξυλίου και όχι μόνο, γεγονός που συνεπάγεται ότι η φωτοδυναμική δράση προκάλεσε αύξηση της παραγωγής 1O_2 , H_2O_2 , $\cdot OH$.

Στο διάγραμμα του Σχήματος 7.31 παρουσιάζεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ριζών στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα LNCaP κυττάρων μετά από φωτοδυναμική δράση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου όπως ποσοτικοποιήθηκε μετά από επεξεργασία των αντίστοιχων εικόνων. Τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα της ομάδας ελέγχου κυμαίνονται σε χαμηλές τιμές, κρίνοντας από την ένταση φθορισμού (18 α.μ.) και είναι παρόμοια τόσο για το κυτταρόπλασμα όσο και για τον πυρήνα.

Το οξειδωτικό στρες στα κύτταρα τα οποία υπέστησαν τη δράση της φωτοδυναμικής είναι σαφώς αυξημένο σε σχέση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου. Στην περίπτωση αυτή διαφοροποιείται η ένταση φθορισμού άρα και το οξειδωτικό

στρες ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα. Η ένταση φθορισμού μετρήθηκε 88 α. μ. και 32 α. μ. αντίστοιχα. Συνεπώς οι ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά οξυγονούχα είδη ήταν κατά 380% αυξημένα στο κυτταρόπλασμα και 77% στον πυρήνα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Φαινόμενο ενδεικτικό της φωτοδυναμικής δράσης.



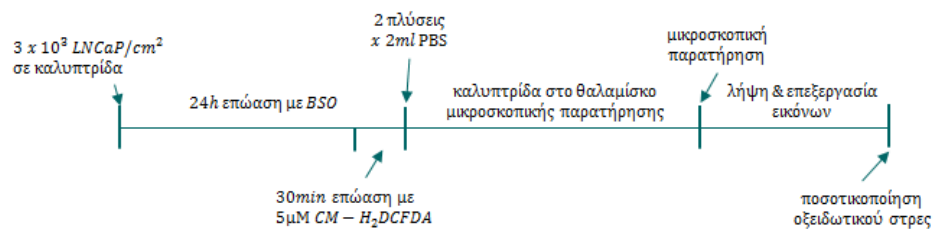
Σχήμα 7.31: Διάγραμμα παραγωγής ελευθέρων ριζών στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα LNCaP κυττάρων μετά από φωτοδυναμική με 0.22 μM m-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 nm, 3 mW/cm² για 60, σε σχέση με τις ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά οξυγονούχα είδη της ομάδας ελέγχου.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαφορά στην ένταση φθορισμού ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των κυττάρων τα οποία υπέστηκαν φωτοδυναμική. Η διαφορά απεικονίζεται στις εικόνες φθορισμού (αρχικές αλλά και κατόπιν επεξεργασίας τους και χρήσης ψευδοχρωμάτων (Εικόνες 7.5 και 7.6)) αλλά και αποτυπώνεται χαρακτηριστικά στο διάγραμμα του Σχήματος 7.31. Όπως έχει παρατηρηθεί από τις εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας (Εικόνες 7.1 και 7.2), αλλά και είναι βιβλιογραφικά καταγεγραμμένο, η m-THPC συγκεντρώνεται στο κυτταρόπλασμα (κατά προτίμηση στο ενδοπλασματικό δίκτυο) και στην πυρηνική μεμβράνη αλλά δεν εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου. Φωτοδυναμική δράση παρατηρείται ουσιαστικά στο σημείο όπου εντοπίζεται το μόριο του φωτοευαισθητοποιητή και η παραγωγή των ελευθέρων ριζών επεκτείνεται σε πολύ μικρή ακτίνα γύρω από το σημείο αυτό. Για το λόγο αυτό η διαφορά στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών ανάμεσα στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα είναι τόσο μεγάλη μετά τη φωτοδυναμική, καθώς η m-THPC δεν εισέρχεται στον πυρήνα άρα εκεί δεν εντοπίζεται φωτοδυναμική δράση.

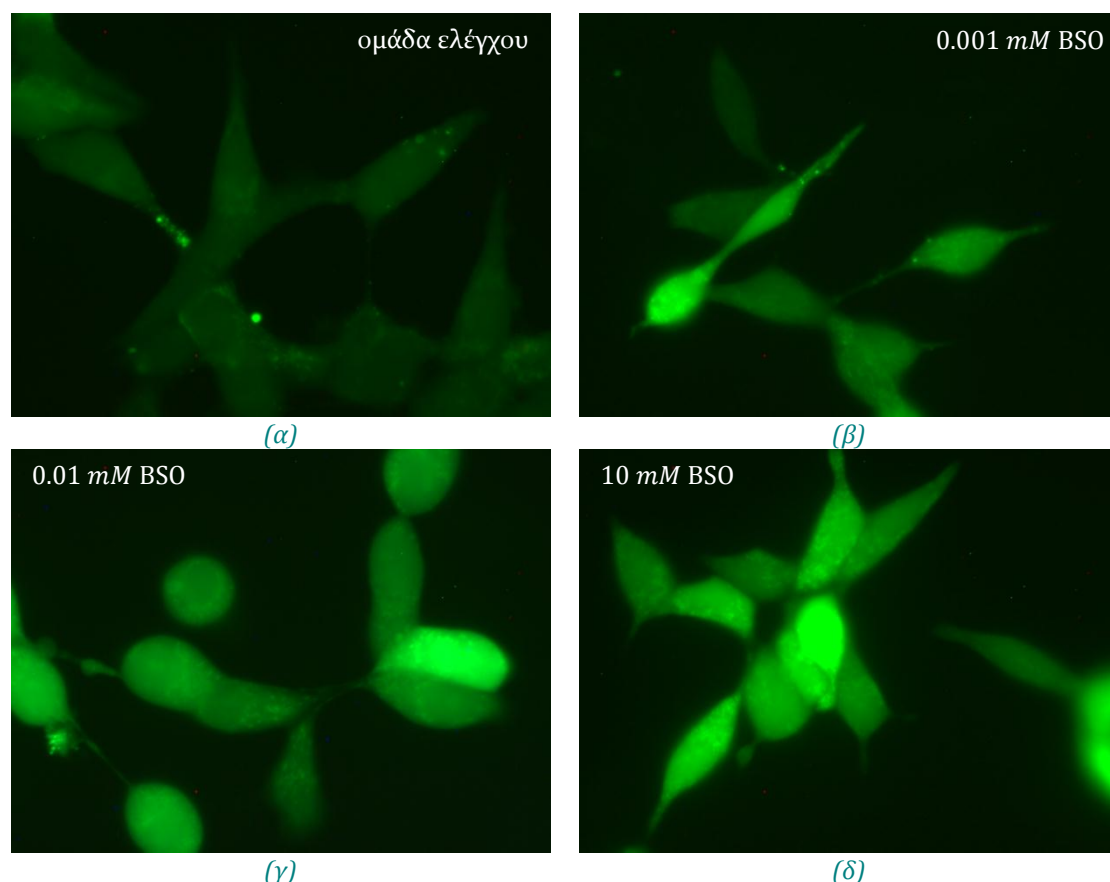
7.6.2

Αποτελέσματα μελετών επαγομένου οξειδωτικού στρες μετά από συνδυασμένη δράση φωτοδυναμικής με τον αναστολέα της σύνθεσης της γλουταθειόνης, BSO

Των μελετών συνδυασμένης δράσης της φωτοδυναμικής με τον αναστολέα της σύνθεσης της γλουταθειόνης προηγήθηκαν μελέτες επίδρασης μόνον αυτού στην παραγωγή ελεύθερων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών. Ελέχθησαν προς μελέτη οι συγκεντρώσεις BSO 0.001mM, 0.01mM και 10 mM καθώς για αυτές είχε επίσης πραγματοποιηθεί και η μέτρηση των επιπέδων της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης. Διαγραμματικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε:

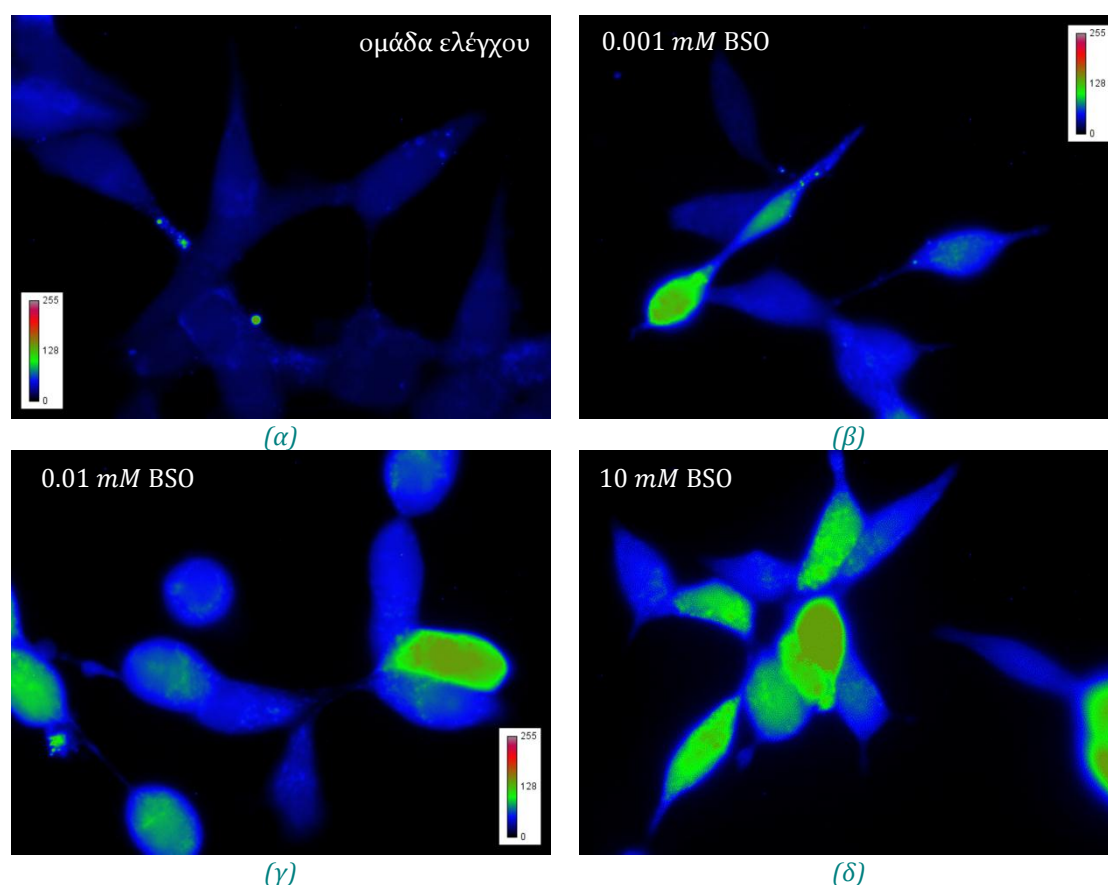


Η επεξεργασία των εικόνων και η ποσοτικοποίηση του σήματος φθορισμού έγινε κατόπιν επεξεργασίας των εικόνων φθορισμού σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 6.6.3.



Εικόνα 7.7: Ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη σε LNCaP κύτταρα (α) απουσία BSO. (β) (γ) και (δ) μετά από επώαση με 0.001mM, 0.01mM και 10 mM BSO αντίστοιχα για 24h.

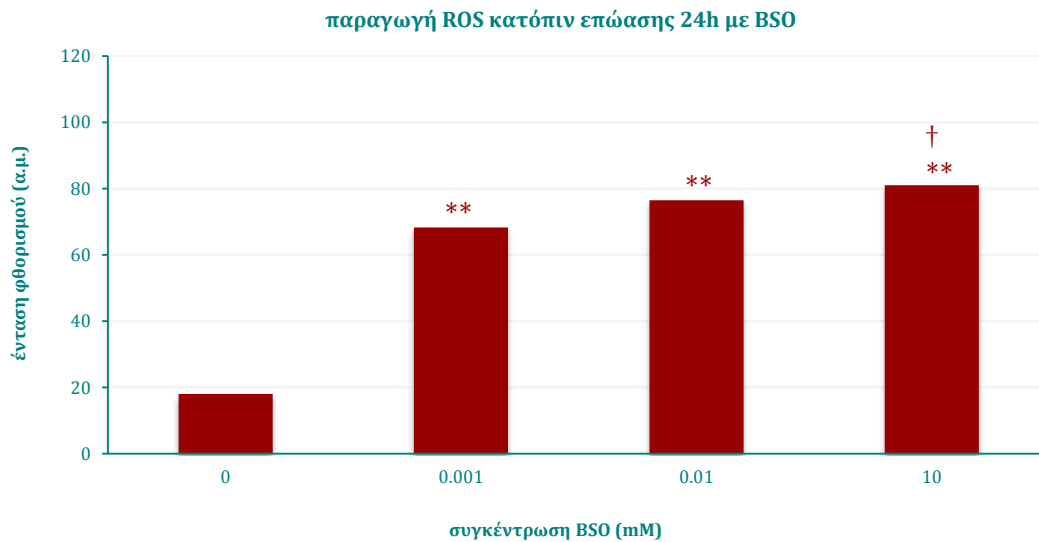
Στην Εικόνα 7.7 παρουσιάζεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών κατόπιν επώασης με $0.001mM$, $0.01mM$ και $10 mM$ BSO για 24 h. Στην Εικόνα 7.8 απεικονίζεται το φαινόμενο αυτό με τη χρήση ψευδοχρωμάτων. Είναι φανερό πως η χορήγηση του αναστολέα της σύνθεσης της γλουταθειόνης στα κύτταρα προκαλεί βαθμιαία αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών με αύξηση της συγκέντρωσής του. Μεγαλύτερης έντασης σήμα φθορισμού καταγράφεται στις εικόνες αλλά και περισσότερα κύτταρα με αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες εντοπίζονται στις εικόνες καθώς μεγαλώνει η συγκέντρωση του BSO. Οι εικόνες που παραθέτονται είναι αντιπροσωπευτικές και χαρακτηριστικές του συνόλου των εικόνων που μελετήθηκαν για τις δεδομένες συνθήκες.



Εικόνα 7.8: Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών μετά από επώαση με $0.001mM$, $0.01mM$ και $10 mM$ BSO για 24h εικόνες (β), (γ) και (δ) αντίστοιχα. (α) απουσία BSO.

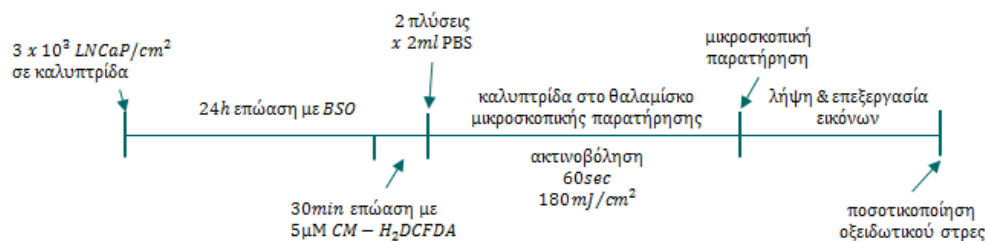
Μετά από ποσοτικοποίηση του οξειδωτικού στρες με επεξεργασία του σήματος φθορισμού των αντίστοιχων εικόνων προέκυψε το διάγραμμα του Σχήματος 7.32. Η χορήγηση BSO αυξάνει τα επίπεδα του ενδοκυττάρου οξειδωτικού στρες βαθμιαία με την αύξηση της συγκέντρωσής του. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών

οξυγονούχων ειδών είναι στατιστικά σημαντική με επίπεδο βεβαιότητας $P < 0.01$ για κάθε συγκέντρωση BSO ως προς τα επίπεδα της ομάδας ελέγχου και ανάμεσα στις συγκεντρώσεις BSO $0.001mM$ και $10 mM$ με επίπεδο βεβαιότητας $P < 0.05$. Τα επίπεδα οξειδωτικού στρες αυξάνονται κατά 270 % για $0.001mM$ BSO έως και 350 % για $10 mM$ BSO.

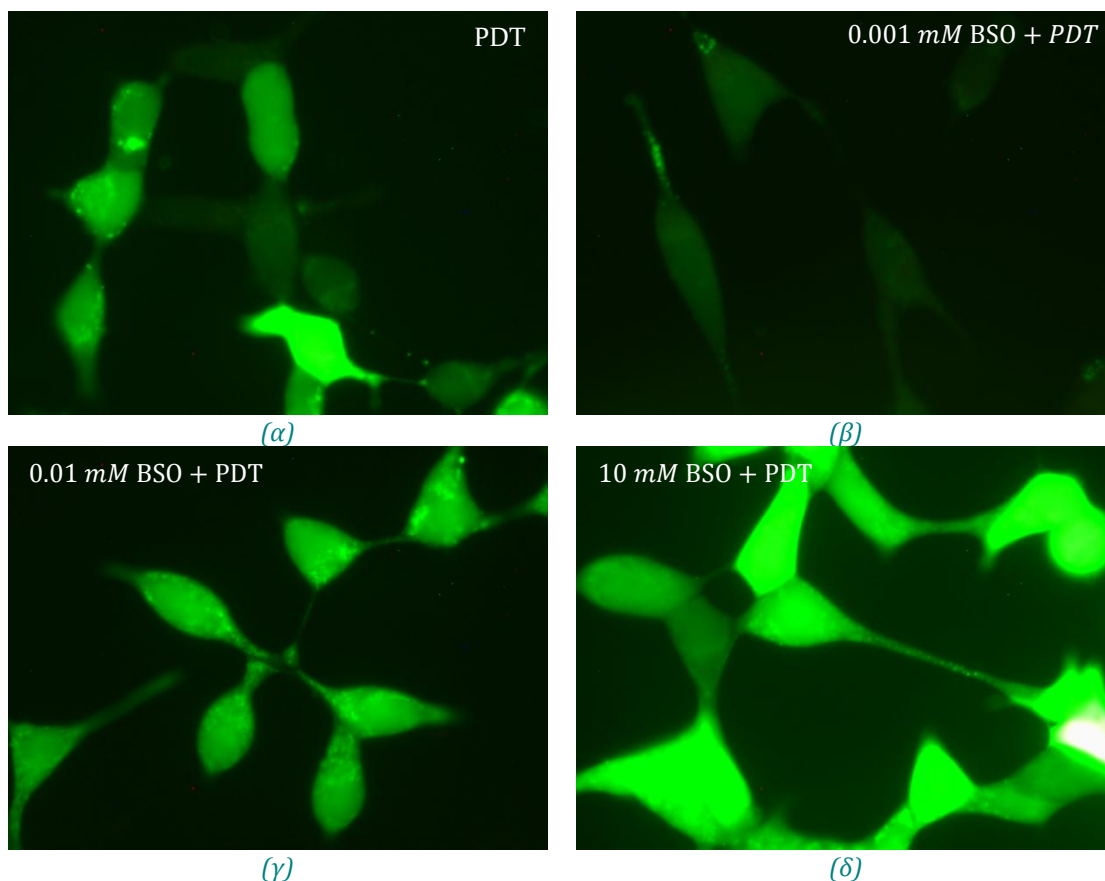


Σχήμα 7.32: Διάγραμμα παραγωγής ελευθέρων ριζών στο κυτταρόπλασμα LNCaP κυττάρων μετά από χορήγηση BSO για 24h. ** $P < 0.01$ (t-test) ως προς τα επίπεδα οξειδωτικού στρες της ομάδας ελέγχου. † $P < 0.05$ ως προς το $0.001mM$ BSO. Το φαινόμενο στον πυρήνα ακολουθεί ακριβώς την συμπεριφορά που καταγράφεται στο κυτταρόπλασμα

Ακολούθησε η μελέτη επαγόμενου οξειδωτικού στρες μετά από συνδυασμό φωτοδυναμικής και BSO. Διαγραμματικά η μεθοδολογία ήταν:



Η παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών κατόπιν φωτοδυναμικής σε συνδυασμό με τον αναστολέα της γλουταθειόνης εκδηλώνεται ποικιλοτρόπως ανάλογα με τη συγκέντρωση του BSO και παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον. Παρατηρώντας τις εικόνες 7.9 και 7.10 αλλά και το διάγραμμα του Σχήματος 7.33 είναι φανερό πως το οξειδωτικό στρες αμέσως μετά τη φωτοδυναμική συμπεριφέρεται διαφορετικά ανάλογα με τη συγκέντρωση BSO.

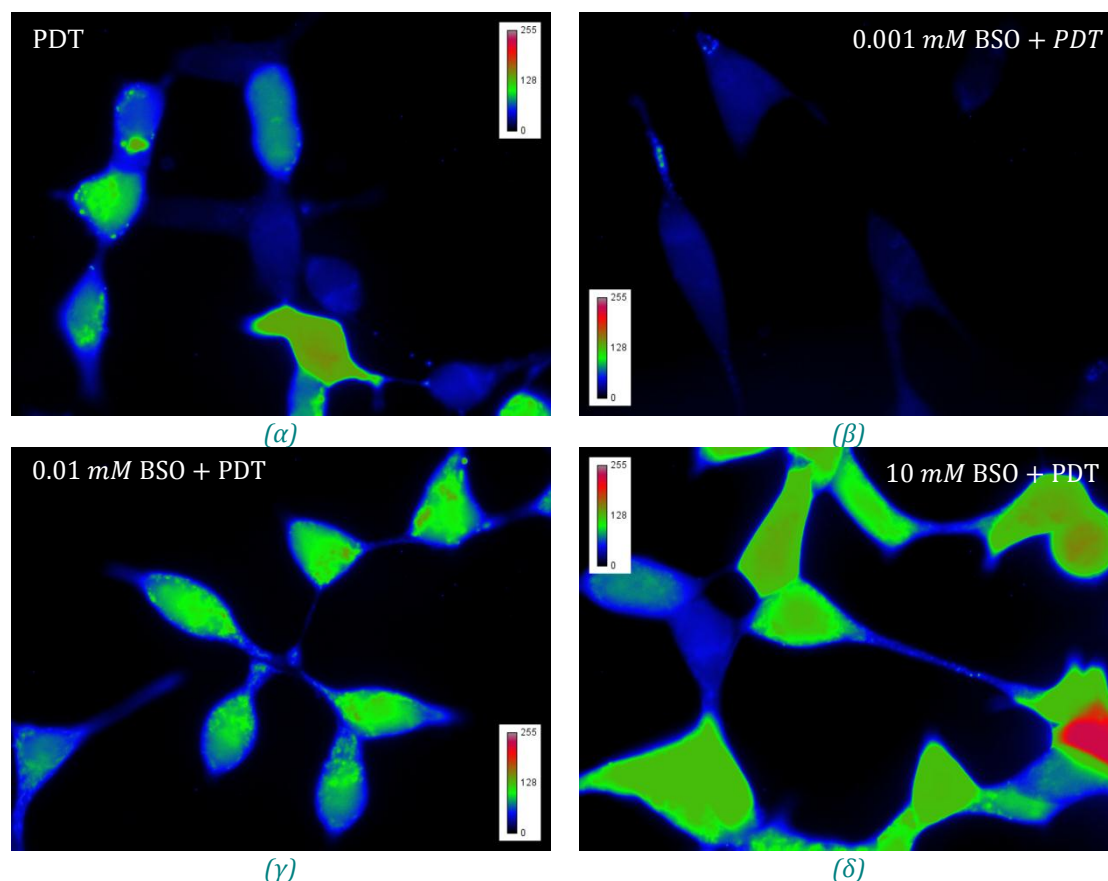


Εικόνα 7.9: Ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη σε LNCaP κύτταρα μετά από φωτοδυναμική με $0.22 \mu\text{M}$ *m*-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 nm , $3 \text{ mW}/\text{cm}^2$ για 60 s. (α) απουσία BSO. (β) (γ) και (δ) μετά από επώαση με 0.001 mM , 0.01 mM και 10 mM BSO αντίστοιχα για 24h.

Μολονότι η χορήγηση 0.001 mM BSO προκάλεσε αύξηση του οξειδωτικού στρες σε σχέση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου, η παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών αμέσως μετά τη φωτοδυναμική σε συνδυασμό με 0.001 mM BSO μειώθηκε κατά 65% σε σχέση με τα επίπεδα οξειδωτικού στρες αμέσως μετά τη δράση μόνο της φωτοδυναμικής (στατιστικά σημαντική μείωση με επίπεδο βεβαιότητας $P < 0.01$). Είναι φανερό ακόμα και από τις εικόνες φθορισμού (Εικόνες 7.9(α) και 7.9(β)) ιδιαίτερως δε αισθητό στις αντίστοιχες απεικονίσεις με ψευδοχρώματα (Εικόνες 7.10(α) και 7.10(β)) πως η παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι μειωμένη. Η ένταση φθορισμού, ανάλογη του αριθμού ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών, είναι εξαιρετικά αμυδρή στις παραπάνω εικόνες. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν πως η δράση της φωτοδυναμικής έχει ανασταλεί στην περίπτωση αυτή, κατά την οποία τα κύτταρα επώαστηκαν με 0.001 mM BSO.

Επώαση των κυττάρων με την αμέσως μεγαλύτερη συγκέντρωση BSO, 0.01 mM , σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική δεν επέφερε καμία ιδιαίτερη αλλαγή στην παραγωγή

ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών σε σχέση με τη δράση μόνο της φωτοδυναμικής αλλά και τη δράση μόνο του BSO στην ίδια συγκέντρωση. Η διαφορά της έντασης φθορισμού στο διάγραμμα του Σχήματος 7.33 δεν είναι στατιστικά σημαντική. Επιπλέον, η ένταση φθορισμού είναι παρόμοια, όπως φαίνεται τόσο στις Εικόνες 7.9(α) και 7.9(γ) όσο και στις απεικονίσεις με ψευδοχρώματα, Εικόνες 7.10(α) και 7.10(γ).

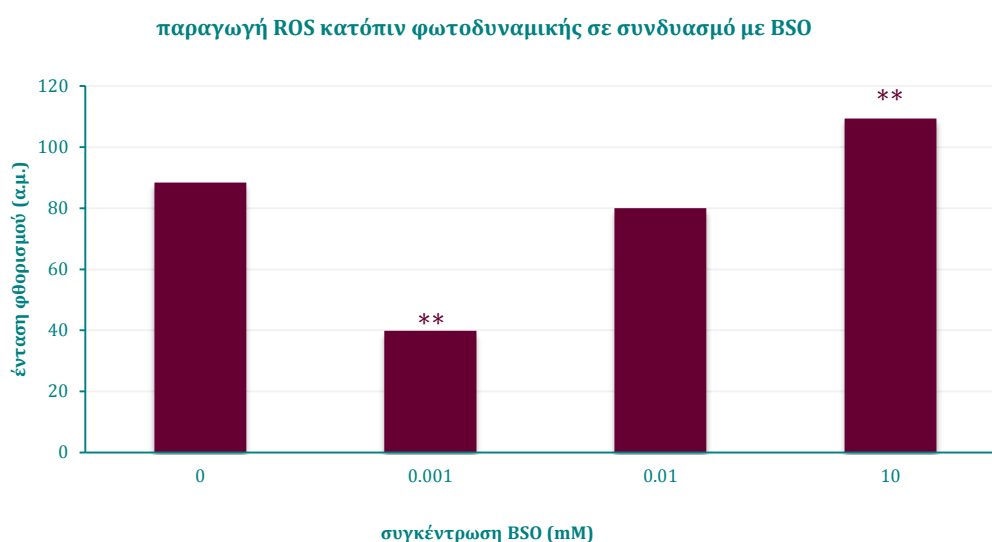


Εικόνα 7.10: Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών μετά από επώαση με 0.001mM, 0.01mM και 10 mM BSO για 24h εικόνες (β), (γ) και (δ) αντίστοιχα. (α) απουσία BSO και φωτοδυναμική με 0.22 μM *m*-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 nm, 3 mW/cm² για 60 s.

Επώαση των κυττάρων με 10 mM BSO σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική αύξησε κατά 24 % την παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών σε σχέση με τα επίπεδα οξειδωτικού στρες που παρήγαγε μόνη της η φωτοδυναμική. Η αύξηση είναι στατιστικά σημαντική με επίπεδο βεβαιότητας $P < 0.01$. Η αύξηση αποτυπώνεται χαρακτηριστικά και στην ένταση του φθορισμού, στις Εικόνες 7.9(α) και 7.9(δ) όπου το σήμα είναι όχι μόνο εντονότερο σε σχέση με το αντίστοιχο των κυττάρων που υπέστησαν φωτοδυναμική αλλά υπάρχουν περιοχές όπου είναι και κορεσμένο (λευκό χρώμα). Στις αντίστοιχες εικόνες με ψευδοχρώματα, Εικόνες 7.10(α) και 7.10(δ) η

ένταση φθορισμού στη συγκεκριμένη περιοχή αποτυπώνεται με κόκκινο χρώμα γεγονός που σημαίνει ότι εκεί παρατηρείται η μέγιστη τιμή του εκπεμπόμενου φθορισμού άρα και η μεγαλύτερη παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών. Η ένταση φθορισμού είναι μεγαλύτερη και από την ένταση που καταγράφηκε όταν χορηγήθηκε μόνο το BSO.

Συνεπώς η συνδυασμένη δράση της φωτοδυναμικής με τον αναστολέα της γλουταθειόνης σε συγκέντρωση 10 mM φαίνεται πως ενίσχυσε την παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών σε σχέση τόσο με τη δράση μόνο της φωτοδυναμικής, αλλά και τη δράση μόνο του BSO. Ενισχύθηκαν, πιθανότατα, οι ενδοκυτταρικοί μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου, υπόθεση την οποία ενισχύουν τα μεγαλύτερα ποσοστά κυτταροτοξικότητας τα οποία καταγράφησαν με τις μετρήσεις βιωσιμότητας.



Σχήμα 7.33: Διάγραμμα παραγωγής ελευθέρων ριζών στο κυτταρόπλασμα LNCaP κυττάρων μετά από φωτοδυναμική με 0.22 μM *m*-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 nm, 3 mW/cm² για 60 s σε συνδυασμό με χορήγηση BSO για 24h. ** $P < 0.01$ (t-test) ως προς τα επίπεδα οξειδωτικού στρες της ομάδας ελέγχου. Το φαινόμενο στον πυρήνα ακολουθεί ακριβώς την συμπεριφορά που καταγράφεται στο κυτταρόπλασμα

7.6.3

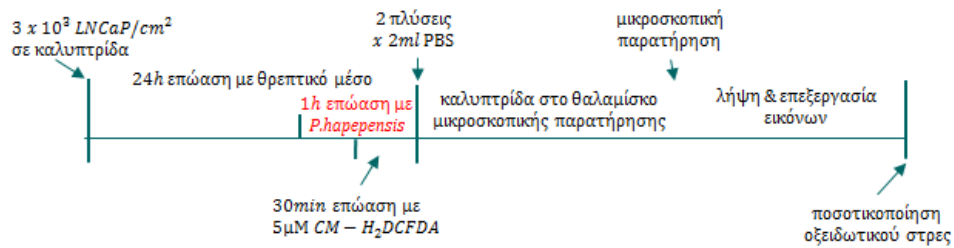
Αποτελέσματα μελετών επαγομένου οξειδωτικού στρες μετά από συνδυασμένη δράση φωτοδυναμικής με φυσικό μείγμα πολυφαινολών

Των μελετών συνδυασμένης δράσης της φωτοδυναμικής με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών προηγήθηκαν μελέτες επίδρασης αυτού στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών. Ελέγχθησαν προς μελέτη οι συγκεντρώσεις 25, 30, 35 και 50 $\mu\text{g/ml}$ καθώς σε συνδυασμό με αυτές είχε μελετηθεί η επίδραση της φωτοδυναμικής στη βιωσιμότητα των κυττάρων.

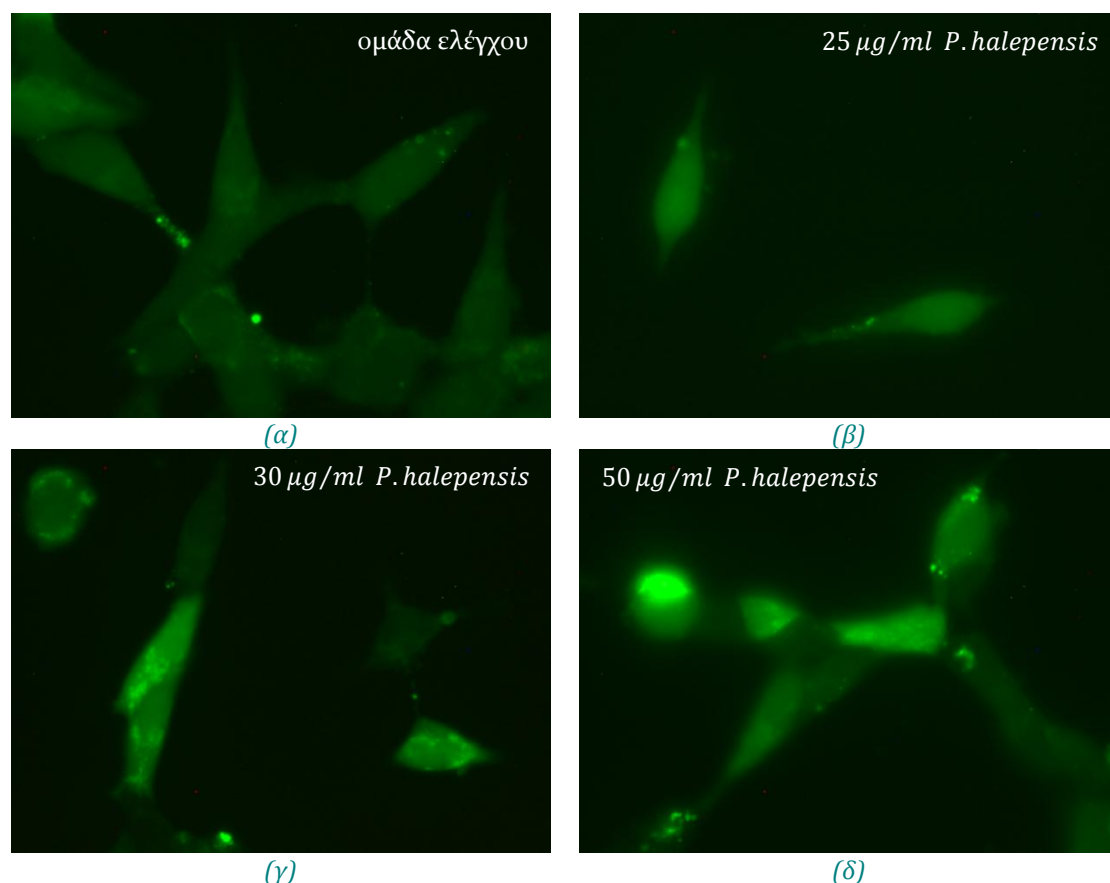
7.6.3.1

Αποτελέσματα μελετών επαγομένου οξειδωτικού στρες μετά από χορήγηση φυσικού μείγματος πολυφαινολών

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του φυσικού μείγματος πολυφαινολών στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών διαγραμματικά η μεθοδολογία ήταν η παρακάτω:



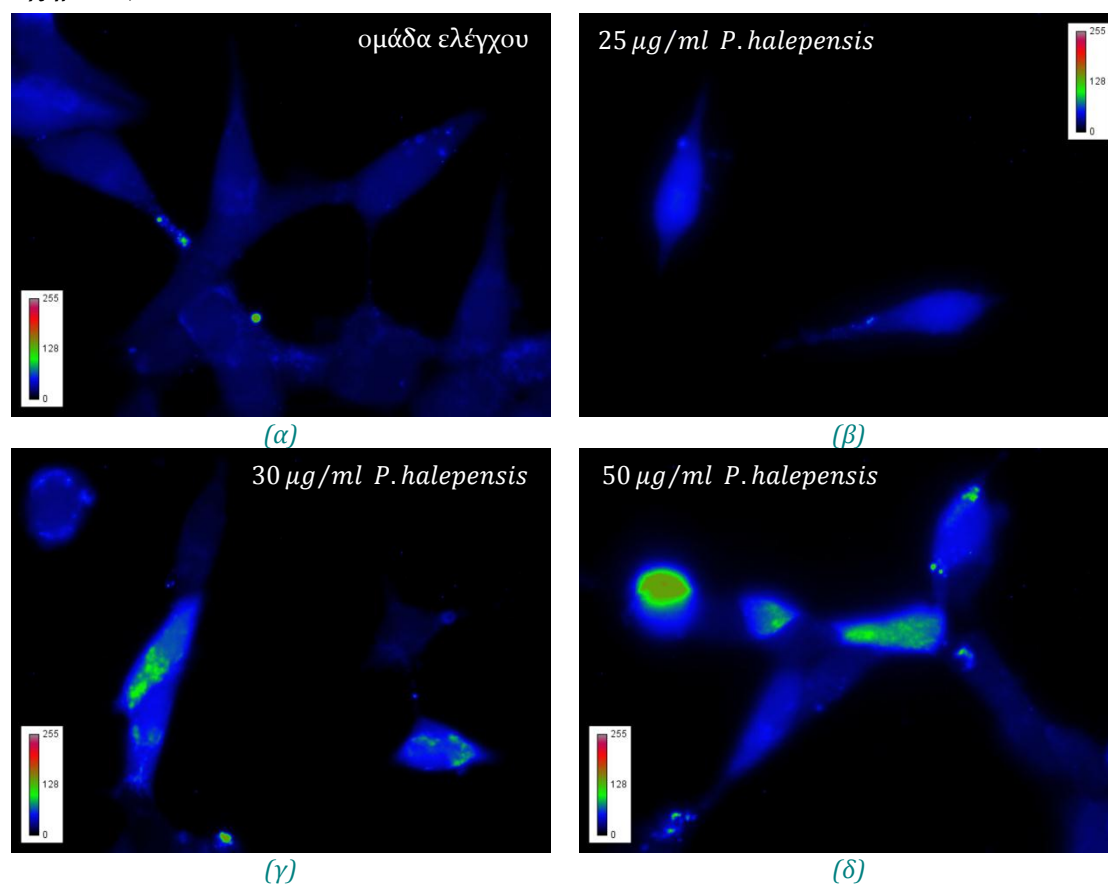
Η παραπάνω περιγραφή αφορούσε 1 h χρόνο επώασης με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών.



Εικόνα 7.11: Ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη σε LNCaP κύτταρα μετά από 1h χορήγησης 25 μg/ml (β), 30 μg/ml (γ) και 50 μg/ml (δ) φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχόμενου από εκχύλισμα φλοιού του πεύκου *P.halepensis*. (α) ομάδα ελέγχου.

Για τον έλεγχο των 24 h χρόνου επώασης ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια μεθοδολογία με τη μόνη διαφορά ότι τα κύτταρα είχαν αφεθεί να συμφθούν σε καλυπτρίδα η οποία είχε τοποθετηθεί μέσα σε τριβλίο επώασης με διάλυμα εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου – εκχυλίσματος στις παραπάνω συγκεντρώσεις για 24 h. 30 min προτού ολοκληρωθεί το χρονικό διάστημα των 24 h, αφαιρείτο το διάλυμα θρεπτικού μέσου – εκχυλίσματος και ακολουθούσε ακριβώς η ίδια διαδικασία επώασης με τον ιχνηθέτη και παρατήρησης και λήψης των εικόνων με το μικροσκόπιο φθορισμού. Η επεξεργασία των εικόνων και η ποσοτικοποίηση του σήματος φθορισμού και σε αυτή την περίπτωση έγινε κατόπιν επεξεργασίας των εικόνων φθορισμού σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 6.6.3.

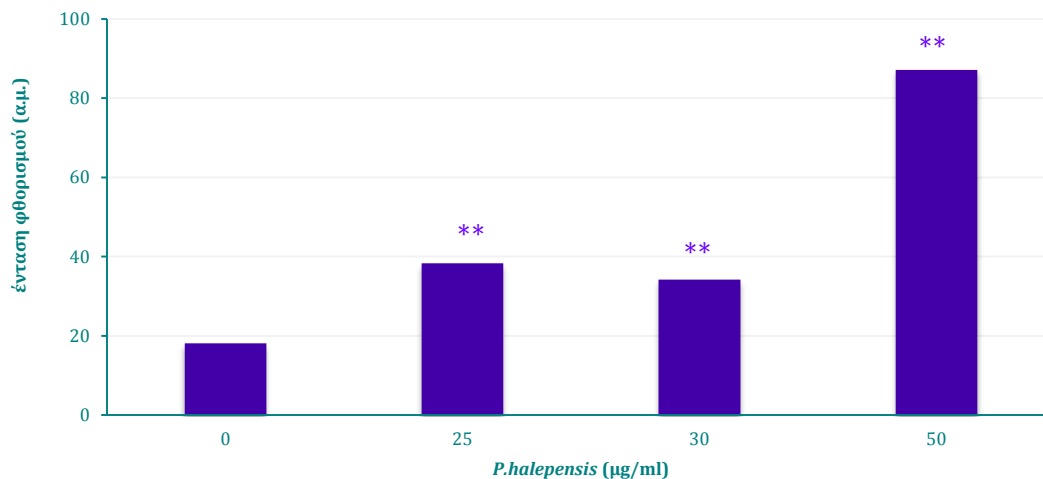
Από τις εικόνες φθορισμού, Εικόνες 7.11(α)-(δ), αλλά και από τις αντίστοιχες με ψευδοχρώματα, Εικόνες 7.12(α)-(δ), είναι φανερό πως η αύξηση της συγκέντρωσης του φυσικού μείγματος πολυφαινολών προκαλεί αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών. Ποσοτικοποίηση της μεταβολής μετά από επεξεργασία των εικόνων και του σήματος φθορισμού έδωσε το διάγραμμα του Σχήματος 7.34.



Εικόνα 7.12: Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών μετά από 1h χορήγηση 25 μg/ml (β), 30 μg/ml (γ) και 50 μg/ml (δ) φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχόμενου από εκχύλισμα φλοιού του πεύκου *P.halepensis*. (α) ομάδα ελέγχου.

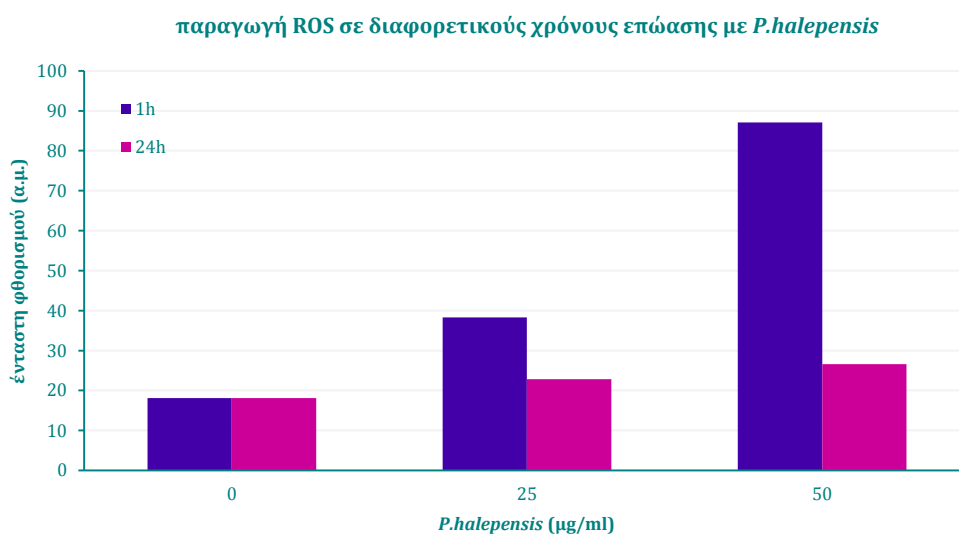
Τα 25 και 30 $\mu\text{g/ml}$ προκάλεσαν σχεδόν διπλασιασμό των επιπέδων οξειδωτικού στρες, αύξηση στατιστικά σημαντική σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, επίπεδο βεβαιότητας $P < 0.01$. Τα 50 $\mu\text{g/ml}$ προκάλεσαν πρακτικά τετραπλασιασμό της παραγωγής των ελευθέρων ριζών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και σχεδόν διπλασιασμό σε σχέση με τις δυο χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Μολονότι τα 50 $\mu\text{g/ml}$ προκάλεσαν την παραγωγή του ίδιου αριθμού ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών όπως και η φωτοδυναμική δράση με 0.22 μM m-THPC (επώαση 24h) και δόση ενέργειας, 180 mJ/cm^2 δεν επηρέασαν με τον ίδιο τρόπο τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Ενώ η φωτοδυναμική δράση προκάλεσε τη νέκρωση του 40% των κυττάρων το φυσικό μείγμα πολυφαινολών στα 50 $\mu\text{g/ml}$ διατήρησε τη βιωσιμότητα των κυττάρων στο 100%.

παραγωγή ROS κατόπιν 1h επώαση με *P.halepensis*

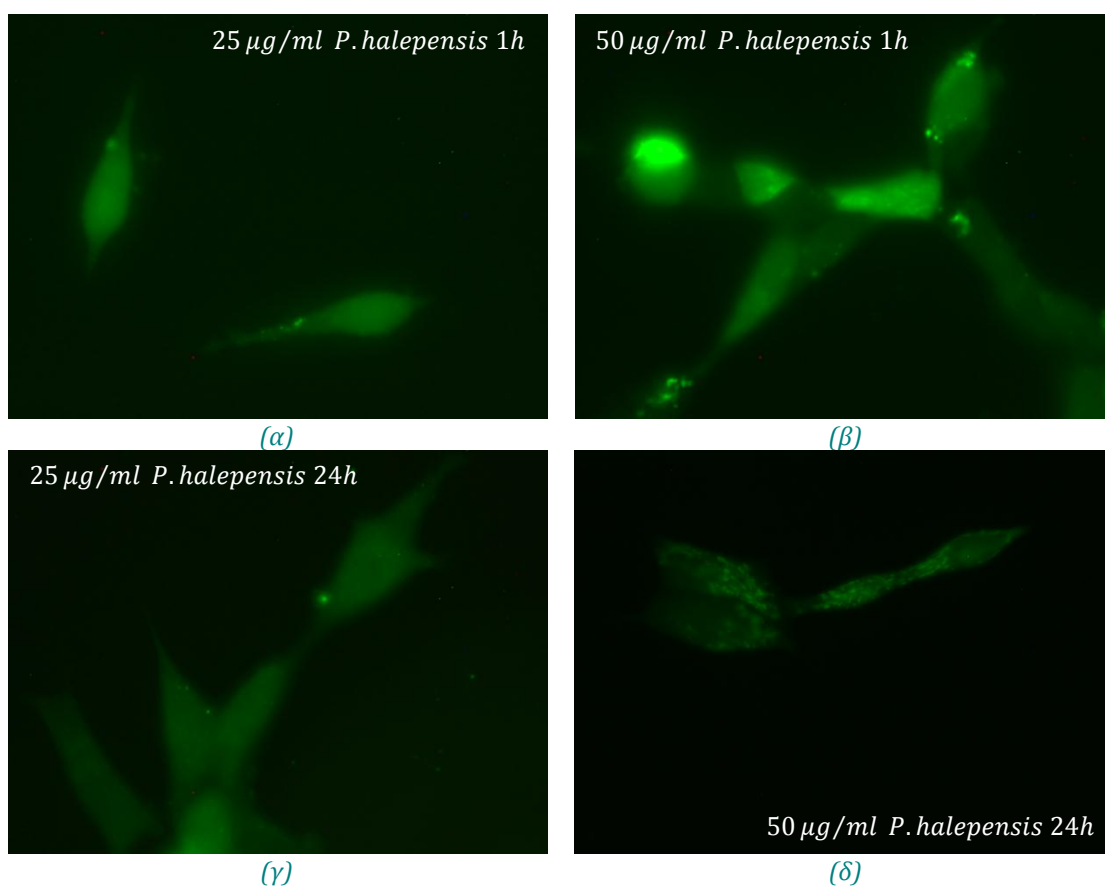


Σχήμα 7.34: Διάγραμμα παραγωγής ελευθέρων ριζών στο κυτταρόπλασμα LNCaP κυττάρων μετά από 1h χορήγηση 25, 30 και 50 $\mu\text{g/ml}$ *P.halepensis*. ** $P < 0.01$ (t-test) ως προς τα επίπεδα οξειδωτικού στρες της ομάδας ελέγχου. Το φαινόμενο στον πυρήνα ακολουθεί ακριβώς την συμπεριφορά που καταγράφεται στο κυτταρόπλασμα

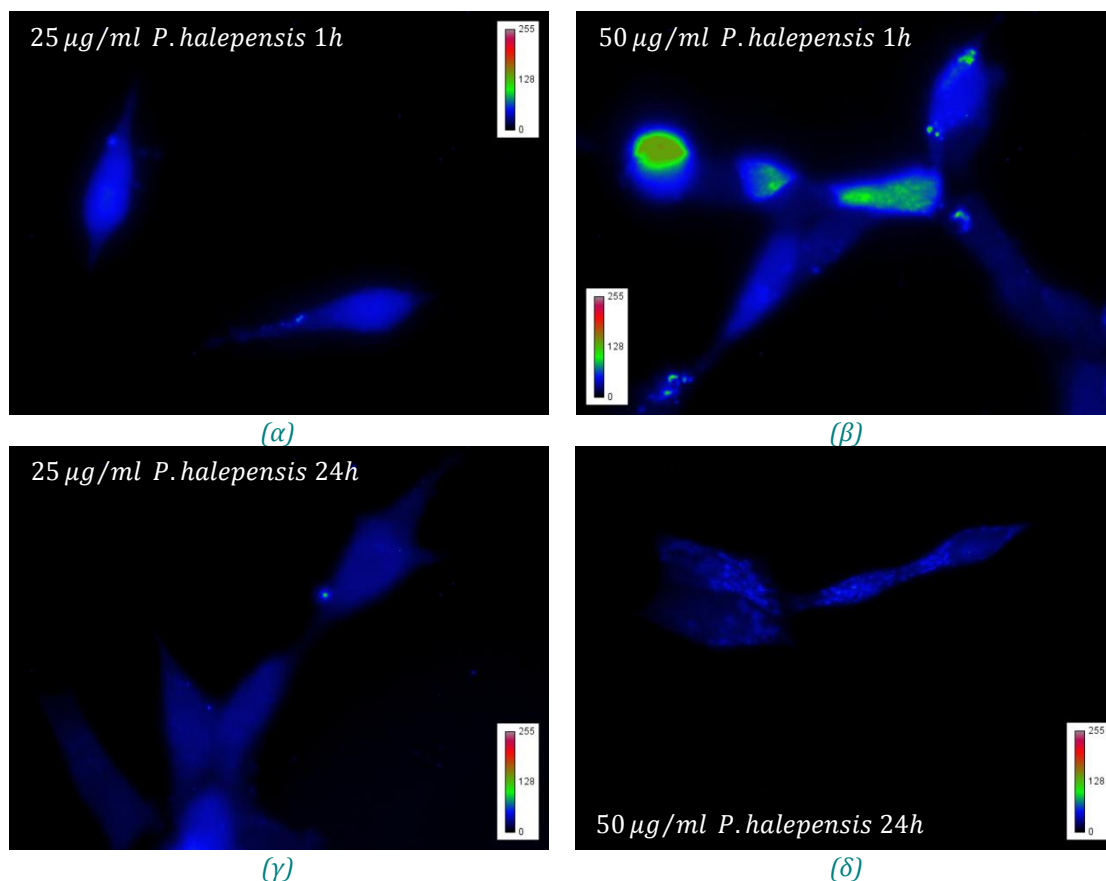
Ενδεικτικές εικόνες των κυττάρων μετά από επώαση για 24 h με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών παρουσιάζονται στη συνέχεια. Από τις εικόνες αυτές και από την επεξεργασία τους (Σχήμα 7.35) προέκυψε πως τα επίπεδα παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών μετά τη χορήγηση για 24 h του φυσικού μείγματος πολυφαινολών είναι σαφώς χαμηλότερα από τα αντίστοιχα της 1 h χορήγησης και έχουν επιστρέψει σχεδόν στα επίπεδα οξειδωτικού στρες των κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Για το λόγο αυτό η μελέτη δεν επεκτάθηκε περαιτέρω στις 24 h χορήγησης.



Σχήμα 7.35: Διάγραμμα παραγωγής ελευθέρων ριζών στο κυτταρόπλασμα LNCaP κυττάρων μετά από 1h και 24h επώασης με 25 και 50 μg/ml *P.halepensis*. Το φαινόμενο στον πυρήνα ακολουθεί ακριβώς την συμπεριφορά που καταγράφεται στο κυτταρόπλασμα



Εικόνα 7.13: Παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών μετά από 1h και 24h χορήγηση 25 μg/ml (α) και (γ) αντίστοιχα, και 50 μg/ml (β) και (δ) αντίστοιχα φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχόμενου από εκχύλισμα φλοιού του πεύκου *P.halepensis*.



Εικόνα 7.14: Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών μετά από 1h και 24h χορήγηση 25 μg/ml (α) και (γ) αντίστοιχα, και 50 μg/ml (β) και (δ) αντίστοιχα φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχόμενου από εκχύλισμα φλοιού του πεύκου *P.halepensis*.

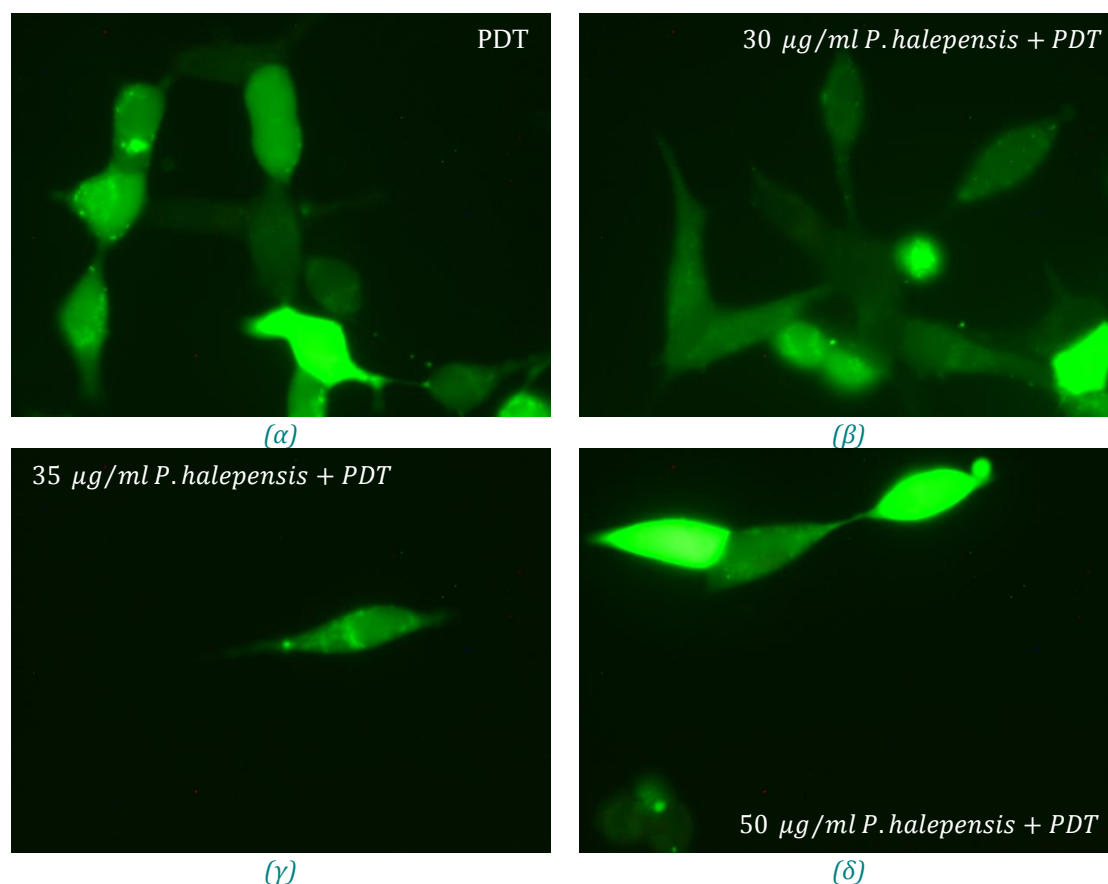
7.6.3.2

Αποτελέσματα μελετών επαγομένου οξειδωτικού στρες από συνδυασμένη δράση φωτοδυναμικής και φυσικού μείγματος πολυφαινολών

Προκειμένου να μελετηθεί η συνδυασμένη δράση της φωτοδυναμικής με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών LNCaP κύτταρα, $\sim 3 \times 10^3 / \text{cm}^2$, αφέθηκαν να συμφυθούν σε καλυπτρίδα η οποία είχε τοποθετηθεί μέσα σε τριβλίο επώασης με εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε $0.22 \mu\text{M}$ m-THPC για 24 h. 60 min προτού ολοκληρωθεί ο χρόνος επώασης με το φωτοευαισθητοποιητή αφαιρείτο το θρεπτικό μέσο και λαμβανόταν κατάλληλος όγκος αυτού ώστε μετά από προσθήκη κατάλληλου όγκου διαλύματος φυσικού μείγματος πολυφαινολών να προκύψουν 2 ml τελικού διαλύματος μέσου – εκχυλίσματος στις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις. Με το διάλυμα αυτό γινόταν η πλήρωση των τριβλίων και η επώαση των κυττάρων για 30 min στον επωαστικό κλίβανο. Τότε αφαιρείτο εκ νέου το διάλυμα όγκου 2 ml από τα τριβλία και προστίθετο

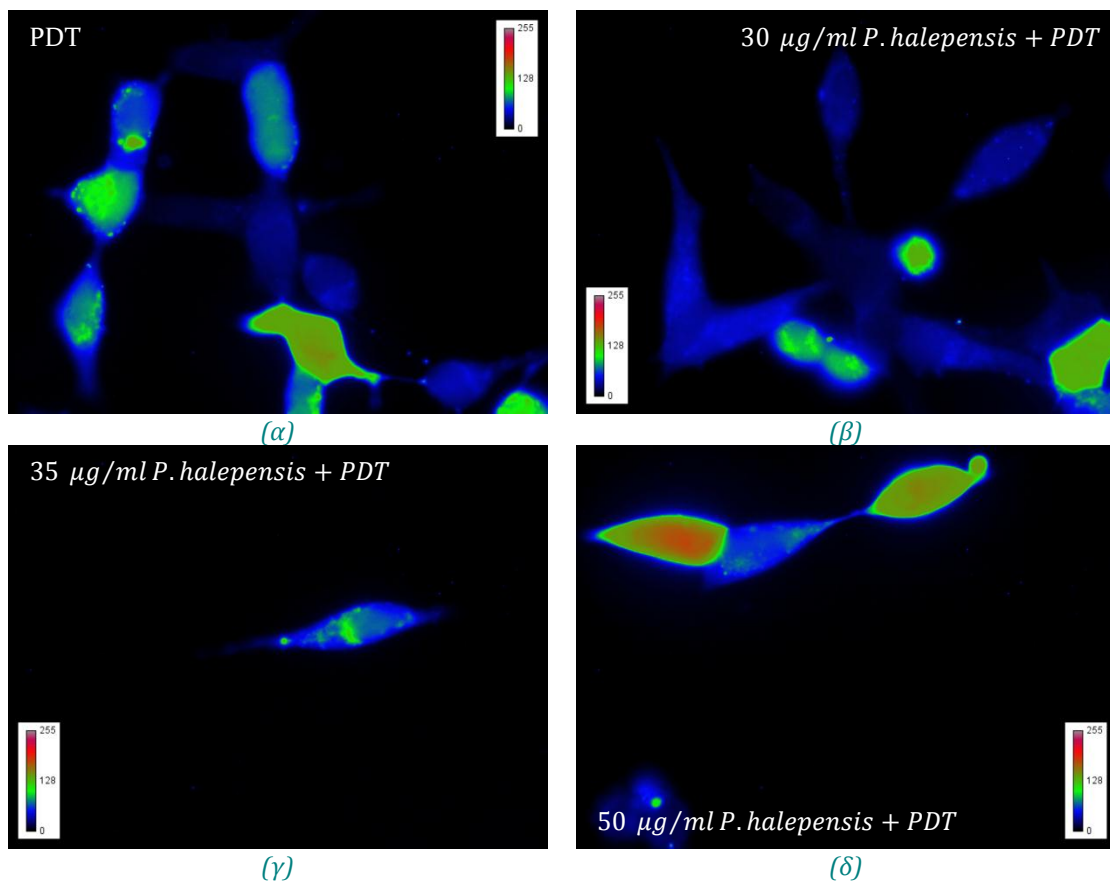
17 μl του ιχνηθέτη CM-H₂DCFDA, συγκέντρωση 5 μM . Αφού γινόταν πολύ καλή ανάδευση του διαλύματος αυτού σε συσκευή vortex προστίθετο στο τριβλίο με τα κύτταρα τα οποία αφήνονταν να επωαστούν με τον ιχνηθέτη για 30 *min* σε θερμοκρασία δωματίου σε απόλυτο σκοτάδι. Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης με τον ιχνηθέτη το διάλυμα απορριπτόταν από τα τριβλία και ακολουθούσαν δυο πλύσεις των κυττάρων με 2 *ml* PBS την κάθε φορά.

Η καλυπτρίδα μεταφερόταν στον θαλαμίσκο μικροσκοπικής παρατήρησης ο οποίος πληρούταν με PBS, σφραγιζόταν και μεταφερόταν στο σύστημα διοδικού laser όπου γινόταν η ακτινοβολήση των κυττάρων με ισχύ ακτινοβολήσης 3 mW/cm^2 και διάρκεια ακτινοβολήσης 60 *s*. Κατόπιν ο θαλαμίσκος προσαρτιόταν στην αντικειμενοφόρο βάση του μικροσκοπίου φθορισμού όπου γινόταν η διέγερση του ιχνηθέτη και η παρατήρηση και καταγραφή του σήματος φθορισμού από πολλά διαφορετικά πεδία. Η επεξεργασία των εικόνων και η ποσοτικοποίηση του σήματος φθορισμού και σε αυτή την περίπτωση έγινε κατόπιν επεξεργασίας των εικόνων φθορισμού σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 6.6.3.



Εικόνα 7.15: Ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη σε LNCaP κύτταρα μετά από φωτοδυναμική με 0.22 μM *m*-THPC (επώαση 24*h*) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 *nm*, 3 mW/cm^2 για 60 *s*. (α) μόνο φωτοδυναμική. (β) (γ) και (δ) μετά από επώαση για 1*h* με 30, 35 και 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *P.halepensis* αντίστοιχα.

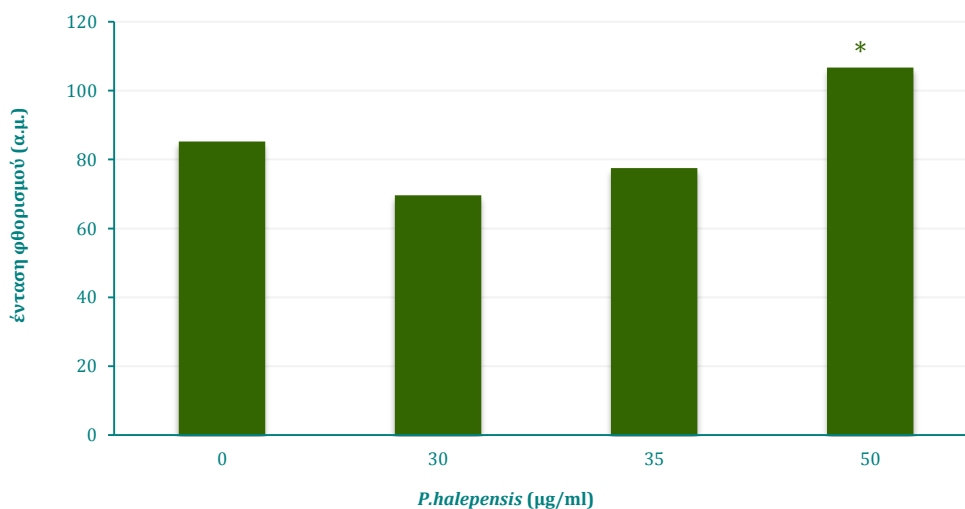
Φωτοδυναμική σε συνδυασμό με 30 και 35 $\mu\text{g/ml}$, επώαση 1h με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχόμενο από εκχύλισμα φλοιού του πεύκου *P.halepensis*, φαίνεται πως παράγει τα ίδια επίπεδα ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών όπως η φωτοδυναμική μόνη της. Η παρατήρηση αυτή εξάγεται τόσο από τις εικόνες φθορισμού (Εικόνες 7.15 (α)-(γ)) και τις αντίστοιχες εικόνες με ψευδοχρώματα (Εικόνες 7.16 (α)-(γ)), όσο και από την επεξεργασία τους και το διάγραμμα έντασης φθορισμού – συγκέντρωσης *P.halepensis*, Σχήμα 7.36. Οι συγκεντρώσεις αυτές δρουν προ-οξειδωτικά, καθώς ευαισθητοποιούν το σύστημα των κυττάρων στη φωτοδυναμική θεραπεία. Εάν θυμηθούμε τα αποτελέσματα της συνδυασμένης δράσης της φωτοδυναμικής με αυτές τις δυο συγκεντρώσεις φυσικού μείγματος όπου προκλήθηκε μεγαλύτερη μείωση της βιωσιμότητας, στατιστικά σημαντική σε σχέση με τη βιωσιμότητα των κυττάρων που υπέστησαν μόνο τη δράση της φωτοδυναμικής, τότε δικαιολογείται το χαρακτηρισμός των συγκεντρώσεων αυτών ως προ-οξειδωτικές.



Εικόνα 7.16: Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών μετά από φωτοδυναμική με $0.22 \mu\text{M}$ *m*-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 nm , 3 mW/cm^2 για 60 s. (α) μόνο φωτοδυναμική. (β) (γ) και (δ) μετά από επώαση για 1h με 30, 35 και $50 \mu\text{g/ml}$ *P.halepensis* αντίστοιχα.

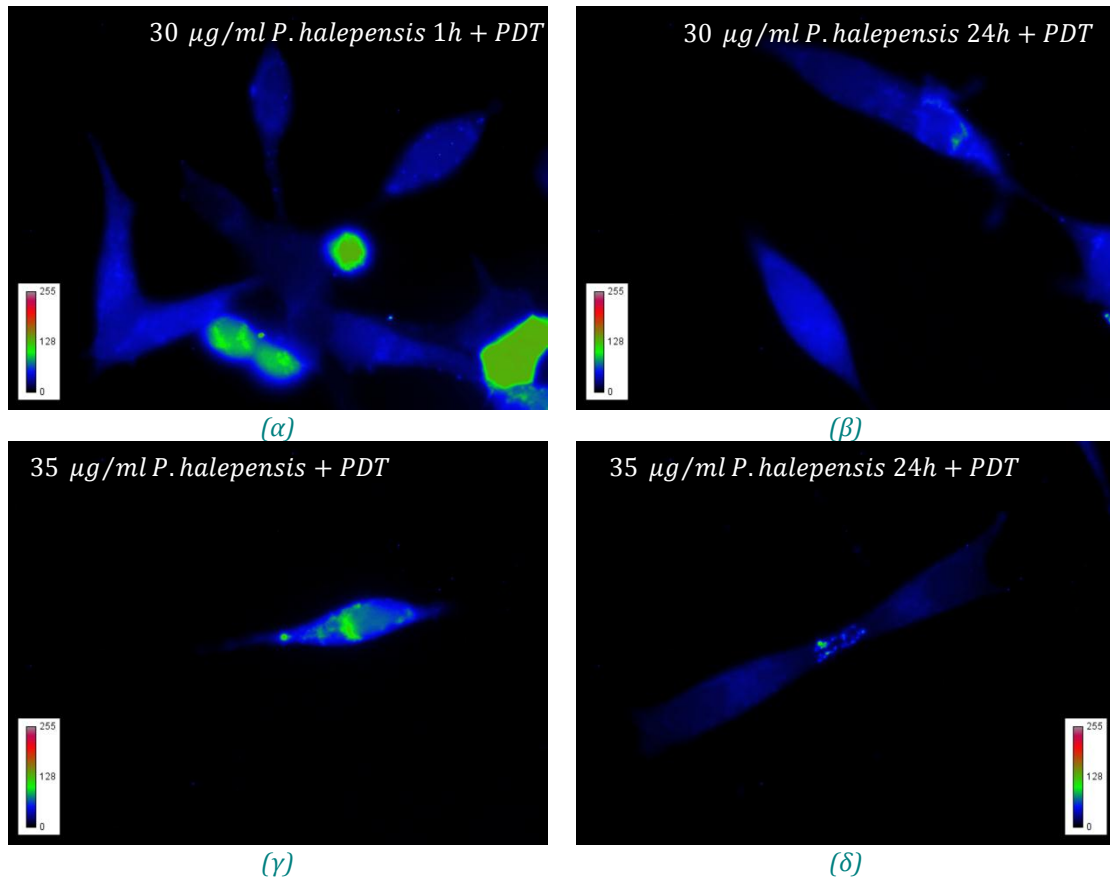
Αντιθέτως, φωτοδυναμική σε συνδυασμό με 50 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλίσματος *P.halepensis*, επώαση 1h, προκάλεσε την κατά 22 % αύξηση της παραγωγής των ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών σε σχέση με τη φωτοδυναμική μόνη της. Είναι σαφές από τις εικόνες φθορισμού (Εικόνες 7.15 (α) και (δ)) όπου παρατηρείται εντονότερος φθορισμός, αλλά κυρίως από τις αντίστοιχες με ψευδοχρώματα (Εικόνες 7.16 (α) και (δ)) όπου ο εντονότερος φθορισμός αποτυπώνεται με το κόκκινο χρώμα στην Εικόνα 7.16 (δ), ότι η χορήγηση του εκχυλίσματος ενίσχυσε την παραγωγή ελευθέρων ριζών σε σχέση με τη φωτοδυναμική μόνη της. Εάν συνυπολογιστούν και τα αποτελέσματα της συνδυασμένης δράσης της φωτοδυναμικής με τα 50 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλίσματος *P.halepensis*, επώαση 1h, στη βιωσιμότητα των κυττάρων η οποία προκάλεσε τη μείωση της βιωσιμότητας κατά 22% επιπλέον σε σχέση με τη μείωση που προκάλεσε μόνη της η φωτοδυναμική, τότε μπορούμε να συμπεράνουμε πως πρόκειται περί μιας προ-οξειδωτικής συγκέντρωσης η οποία δρα συνεργειακά με τη φωτοδυναμική. Υπενθυμίζεται πως η συγκέντρωση αυτή του *P.halepensis* όταν χορηγήθηκε μόνη της στα κύτταρα, με επώαση 1h, δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στη βιωσιμότητά τους.

παραγωγή ROS μετά από συνδυασμένη δράση φωτοδυναμικής και *P.halepensis*, επώαση 1h



Σχήμα 7.36: Διάγραμμα παραγωγής ελευθέρων ριζών στο κυτταρόπλασμα LNCaP κυττάρων μετά από 1h επώασης με 0, 30, 35 και 50 $\mu\text{g/ml}$ *P.halepensis* σε συνδυασμό με φωτοδυναμική με 0.22 μM *m*-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολία με διοδικό laser στα 652 nm, 3 mW/cm² για 60 s. Το φαινόμενο στον πυρήνα ακολουθεί ακριβώς την συμπεριφορά που καταγράφεται στο κυτταρόπλασμα. * $P < 0.05$ (t-test) ως προς τα επίπεδα οξειδωτικού στρες της ομάδας ελέγχου που στην περίπτωση αυτή είναι η ομάδα κυττάρων η οποία δέχτηκε την επίδραση μόνο της φωτοδυναμικής.

Επώαση με το εκχύλισμα του *P.halepensis* για 24h φαίνεται πως αναστέλλει την παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών σε σχέση με τη φωτοδυναμική μόνη της.



Εικόνα 7.17: Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών μετά από φωτοδυναμική με $0.22 \mu\text{M}$ *m*-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 nm , 3 mW/cm^2 για 60 s . (α) και (γ) μετά από επώαση για 1h και 24h με $30 \mu\text{g/ml}$ *P.halepensis* αντίστοιχα.. (β) και (δ) μετά από επώαση για 1h και 24h με $35 \mu\text{g/ml}$ *P.halepensis* αντίστοιχα.

Κεφάλαιο VIII

Αποτελέσματα & Συμπεράσματα

Μελετών στο «Μοντέλο Μυός»

8.1

Αποτελέσματα μελέτης Ενδοϊστικής Φωτοδυναμικής Θεραπείας στο μοντέλο μύος καρκίνου του προστάτη

Προκειμένου να μελετηθεί η δυναμική της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής δράσης στη θεραπεία καρκινικού όγκου στον προστάτη αναπτύχθηκε το μοντέλο μύος καρκίνου του προστάτη όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 6.3.3. Επιγραμματικά, σε ενήλικους μύες, ηλικίας 6-8 εβδομάδων, γινόταν υποδόρια εμφύτευση καρκινικών κυττάρων στην πλευρά του πειραματοζώου, πάνω από το δεξί πόδι. 6-8 εβδομάδες αργότερα ο καρκινικός όγκος που αναπτυσσόταν είχε τις ελάχιστες απαιτούμενες διαστάσεις για εφαρμογή της θεραπείας.

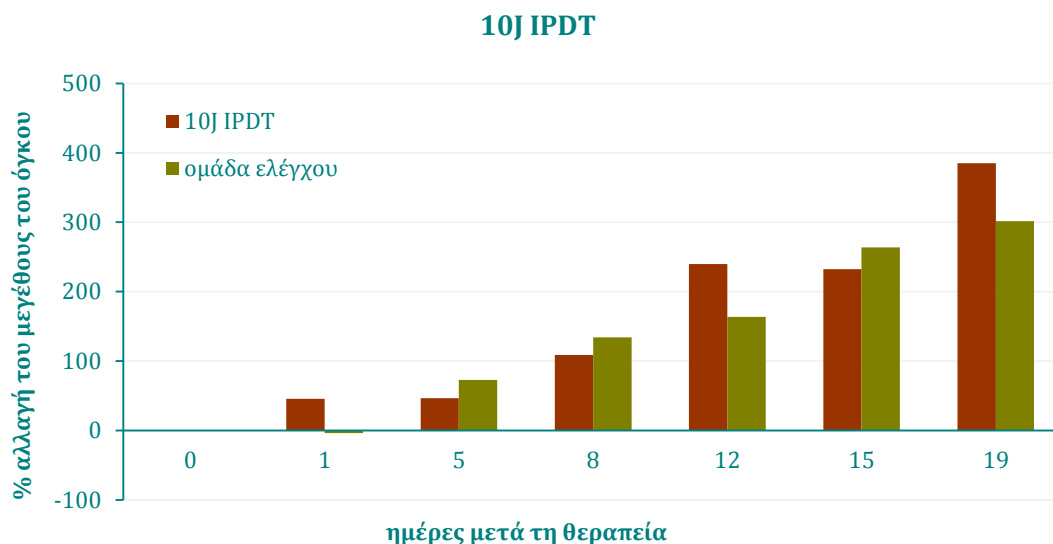
Μετά από νάρκωση του πειραματοζώου, γινόταν ενδοφλέβια χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή και 6h αργότερα ακολουθούσε η ακτινοβολήση. Ως φωτοευαισθητοποιητής επιλέχθηκε η εγκλεισμένη λιποσωματική m-THPC. Με τη συμπλήρωση των 6h οπτική ίνα με γυμνό άκρο εισαγόταν μέσα στον καρκινικό όγκο σε βάθος 0.5 cm. Η ισχύς ακτινοβολήσης είχε ρυθμιστεί με ένα ενεργόμετρο στα 145 mW. Ελέγχονταν τρεις διαφορετικοί χρόνοι ακτινοβολήσης δίνοντας τρεις διαφορετικές δόσεις ενέργειας, 10, 15 και 30 J. Οι διαστάσεις των όγκων στους μύες οι οποίοι δέχτηκαν θεραπεία μετρούνταν σε τακτική βάση και η μεταβολή του μεγέθους

του όγκου υπολογιζόταν βάση του μεγέθους του ακριβώς πριν τη θεραπεία. Η εξέλιξη των όγκων οι οποίοι δέχονταν ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία συγκρίνονταν με την εξέλιξη των όγκων σε μύες οι οποίοι δε δέχονταν καμία επίδραση.

8.1.1

Αποτελέσματα μελέτης Ενδοϊστικής Φωτοδυναμικής Θεραπείας στο μοντέλο μύος καρκίνου του προστάτη με δόση ενέργειας 10 J

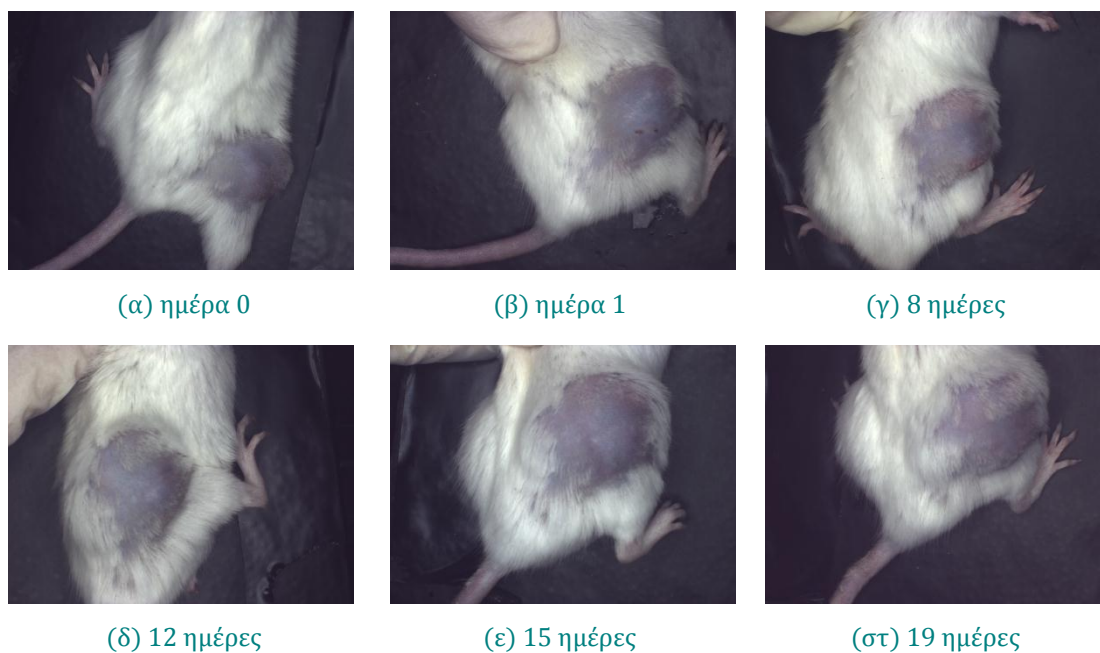
Η ενδοϊστική ακτινοβόληση με δόση ενέργειας 10J δεν κατάφερε να θεραπεύσει ή να αναστείλει την αύξηση των όγκων. Αντιθέτως φαίνεται πως ενίσχυσε την αύξηση των όγκων σε σχέση με τους όγκους των ζώων που δε δέχτηκαν θεραπεία, όπως φαίνεται στο διάγραμμα του Σχήματος 8.1.



Σχήμα 8.1: Εκατοστιαία % μεταβολή του μεγέθους του όγκου ως προς το χρόνο μετά την Ενδοϊστική Φωτοδυναμική Θεραπεία με ενέργεια ακτινοβόλησης 10J.

Καμία φλεγμονή, οίδημα ή νέκρωση (ενδεικτικά της φωτοδυναμικής δράσης) δεν παρουσιάστηκε στους όγκους καθόλη τη διάρκεια της παρακολούθησης των ζώων. Αντιθέτως προκλήθηκε αύξηση των όγκων κατά 388% μέσα σε 19 μέρες από την εφαρμογή της θεραπείας. Στα ζώα έγινε ευθανασία για ηθικούς λόγους, γι' αυτό δεν υπάρχουν αποτελέσματα μετά την 19^η ημέρα. Τα φαινόμενα αυτά προσιδιάζουν με βιολογικές επιδράσεις laser χαμηλής ισχύος όπου παρατηρείται ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Εικόνες, ληφθείσες με την απεικονιστική διάταξη, ενδεικτικές των επιδράσεων και της μεταβολής του όγκου στο μοντέλο μύος καρκίνου του προστάτη μετά από ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με δόση ενέργειας 10 J παραθέτονται στην Εικόνα 8.1.



Εικόνα 8.1: Ενδεικτικές εικόνες των μεταβολών στον όγκο μύος σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά από ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με ενέργεια ακτινοβολήσης 10J.

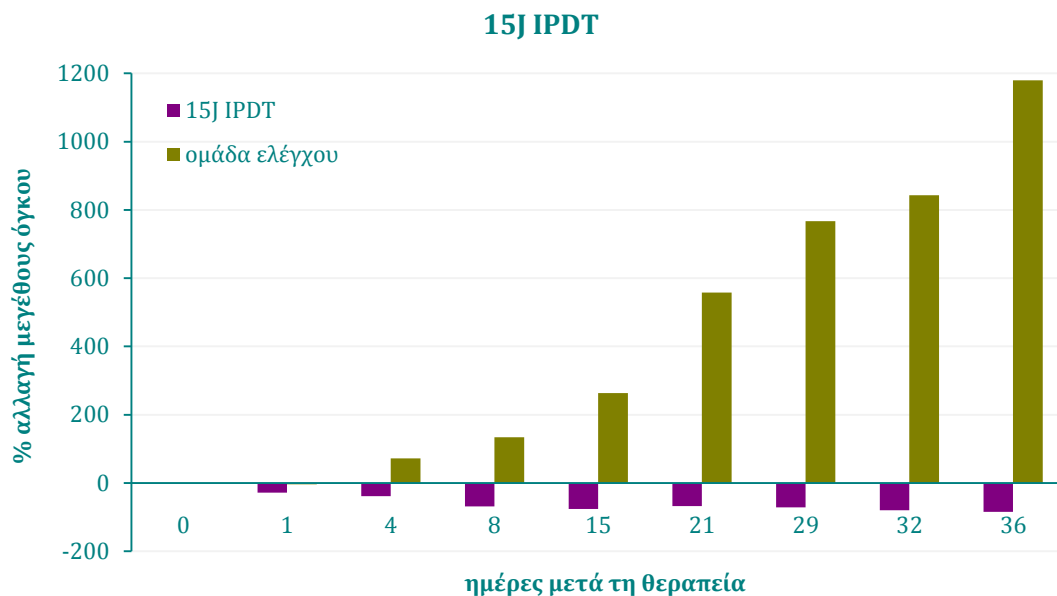
8.1.2

Αποτελέσματα μελέτης Ενδοϊστικής Φωτοδυναμικής Θεραπείας στο μοντέλο μύος καρκίνου του προστάτη με δόση ενέργειας 15 J

Στην ομάδα μυών η οποία δέχτηκε ενδοϊστική φωτοδυναμική δράση με δόση ενέργειας 15 J , παρατηρήθηκε μέση μείωση του όγκου 25% , 24h μετά την ακτινοβολήση. Η μείωση του μεγέθους του όγκου ήταν διαρκής καθώς προχωρούσαν οι ημέρες παρακολούθησης. Είναι χαρακτηριστικό ότι την 25^η ημέρα μετά την ενδοϊστική φωτοδυναμική σημειώθηκε μέση μείωση του όγκου που άγγιζε το 70 %. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στο 67 % των μυών οι οποίοι δέχτηκαν την ενδοϊστική φωτοδυναμική, παρατηρήθηκε πλήρης ίαση του όγκου (ο όγκος εξαλείφθηκε πλήρως) κατά μέσο όρο 11 ημέρες μετά την ακτινοβολήση. Οι μύες επανέκτησαν βάρος και στους 2 μήνες που διήρκησε η παρακολούθηση των ζώων δεν υπήρξε επανεμφάνιση του όγκου.

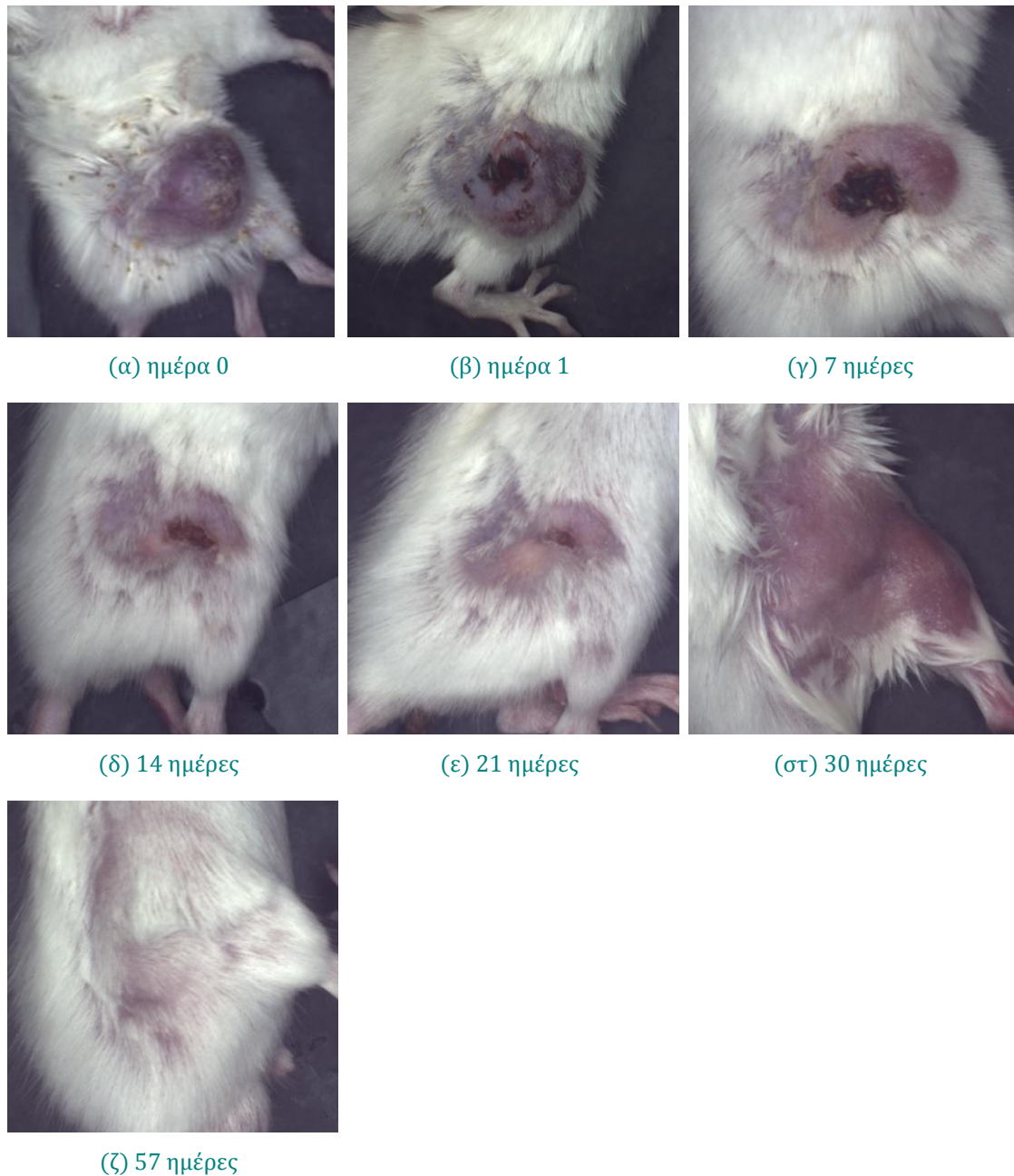
Στο διάγραμμα του Σχήματος 8.2 παρουσιάζεται η % αλλαγή του όγκου ως προς το χρόνο μετά την Ενδοϊστική Φωτοδυναμική Θεραπεία.

Εικόνες, ληφθείσες με την απεικονιστική διάταξη, ενδεικτικές της απόκρισης και των μεταβολών του όγκου σε μυ ο οποίος επεβλήθη σε ενδοϊστική φωτοδυναμική με δόση ενέργειας ακτινοβολήσης 15 J παρουσιάζονται στη συνέχεια, στις Εικόνες 8.2 (α)-(ε). Αρχικά, στην Εικόνα 8.2 (α), παρουσιάζεται η μορφή του καρκινικού όγκου προτού δεχτεί θεραπεία.



Σχήμα 8.2: Εκατοστιαία % μεταβολή του μεγέθους του όγκου ως προς το χρόνο μετά την Ενδοϊστική Φωτοδυναμική Θεραπεία με ενέργεια ακτινοβολήσης 15J.

Στη συνέχεια, στην Εικόνα 8.2 (β), ο όγκος 24 h μετά την ακτινοβολήση. Ήδη είναι εμφανείς οι πρώτες ενδείξεις απόκρισης του όγκου στη θεραπεία, και τα πρώτα σημάδια νέκρωσης του όγκου είναι ήδη παρόντα μια ημέρα μετά τη θεραπεία, όπου οι κυτταροτοξικές αντιδράσεις έχουν ενεργοποιήσει νεκρωτικές διεργασίες. Εμφανής είναι η συρρίκνωση του όγκου 7 ημέρες μετά την ακτινοβολήση, στην Εικόνα 8.2 (γ), ενώ έχει αυξηθεί η επιφάνεια της νέκρωσης. Δύο εβδομάδες μετά την ακτινοβολήση, στην Εικόνα 8.2 (δ), ο όγκος έχει ουσιαστικά εξαφανιστεί και διατηρείται μόνο μια μικρή πληγή η οποία προϊόντος του χρόνου βαθμιαία επουλώνεται, έως την πλήρη επούλωσή της 30 ημέρες μετά τη θεραπεία, στην Εικόνα 8.2 (στ). Το κοσμετολογικό αποτέλεσμα ήταν άψογο, δεν παρατηρήθηκε οιαδήποτε ένδειξη ουλής και το πειραματόζωο θεραπεύτηκε πλήρως. Παρακολούθηθηκε για ακόμα ένα μήνα, όπου το ζώο επανέκτησε πλήρως το βάρος του, ανέπτυξε ξανά το σύννητες τρίχωμα στην περιοχή και δεν επανεμφανίστηκε όγκος, στην Εικόνα 8.2 (ε).



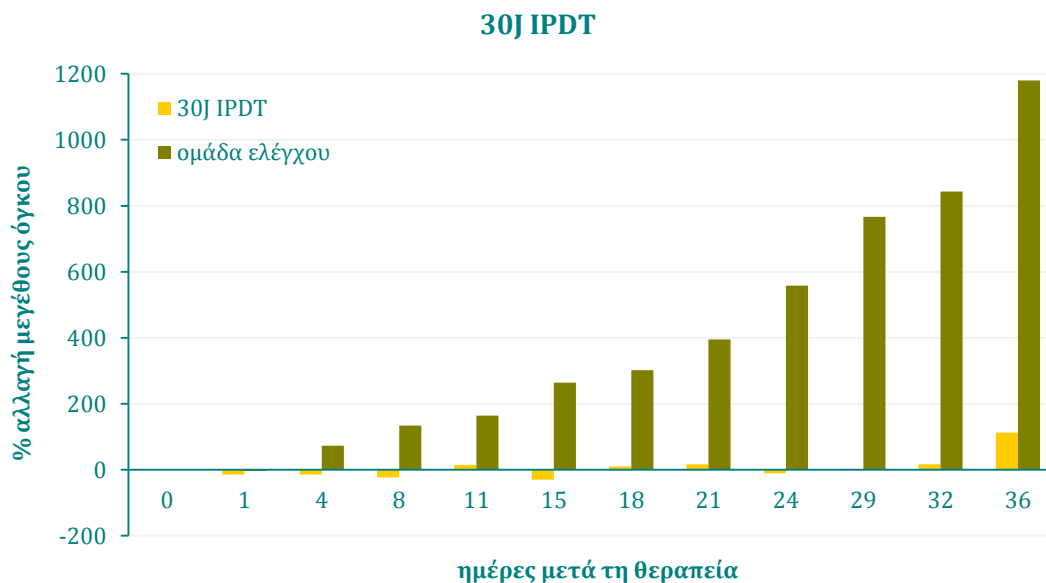
Εικόνα 8.2: Ενδεικτικές εικόνες των μεταβολών στον όγκο μύος σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά από ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με ενέργεια ακτινοβολήσης 15J.

Η ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με ενέργεια ακτινοβολήσης 15J απεδείχθη **επιτυχημένο θεραπευτικό σχήμα** για το μοντέλο καρκίνου του προστάτη που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη, προκαλώντας 68% μέση μείωση του όγκου και πλήρη ίαση του όγκου στο 67% των ζώων. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη βιβλιογραφία δεν γίνεται αναφορά σε ίαση ζώων αλλά σε ποσοστό νέκρωσης των καρκινικών όγκων μετά τη θεραπεία, γεγονός που καθιστά το συγκεκριμένο αποτέλεσμα εξαιρετικά σημαντικό.

8.1.3

Αποτελέσματα μελέτης Ενδοϊστικής Φωτοδυναμικής Θεραπείας στο μοντέλο μύος καρκίνου του προστάτη με δόση ενέργειας 30 J

Ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με δόση ενέργειας 30 J είχε ως πρώτο αποτέλεσμα 15 % μέση μείωση του όγκου 24 h μετά την ακτινοβόληση (Σχήμα 8.3). Η μείωση ωστόσο ήταν μικρότερη από την αντίστοιχη που παρατηρήθηκε 24 h μετά την ακτινοβόληση με 15 J (Σχήμα 8.2).

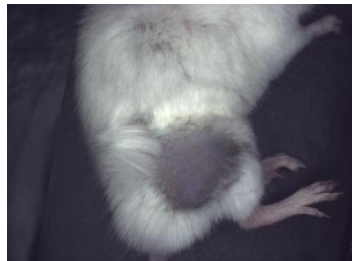


Σχήμα 8.3: Εκατοστιαία % μεταβολή του μεγέθους του όγκου ως προς το χρόνο μετά την Ενδοϊστική Φωτοδυναμική Θεραπεία με ενέργεια ακτινοβόλησης 30J.

Προϊόντος του χρόνου, καταγράφηκε μια διακύμανση του μεγέθους του όγκου μέχρι τη 14^η ημέρα μετά την ακτινοβόληση. Από την ημέρα αυτή και για όλο το επόμενο διάστημα παρακολούθησης, καταγραφόταν διαρκής αύξηση του μεγέθους του όγκου, αλλά σε κάθε περίπτωση ήταν σημαντικά μικρότερη από τις αντίστοιχες τιμές της ομάδας ελέγχου. Ενώ 21 ημέρες μετά την ακτινοβόληση η μέση αύξηση του όγκου στους μύες οι οποίοι δέχτηκαν 30 J ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία ήταν 16 %, την ίδια ημέρα η αντίστοιχη μέση αύξηση που καταγράφηκε στους μύες της ομάδας ελέγχου ήταν 415 %.

Μολονότι η ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με δόση ενέργειας 30 J δεν κατάφερε να θεραπεύσει πλήρως τον καρκινικό όγκο, το θεραπευτικό αυτό σχήμα θεωρείται επιτυχημένο καθώς μείωσε σημαντικά το ρυθμό αύξησης του καρκινικού όγκου σε σχέση με όσους μύες δεν υπεβλήθησαν σε θεραπεία.

Εικόνες, ληφθείσες με την απεικονιστική διάταξη, ενδεικτικές της απόκρισης και των μεταβολών του όγκου σε μυ ο οποίος επεβλήθη σε ενδοϊστική φωτοδυναμική με δόση ενέργειας ακτινοβολήσης 30 J παρουσιάζονται στη συνέχεια, στις Εικόνες 8.3 (α)-(ζ).



(α) ημέρα 0



(β) ημέρα 1



(γ) 4 ημέρες



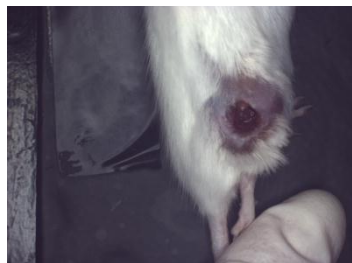
(δ) 8 ημέρες



(ε) 18 ημέρες



(στ) 23 ημέρες



(ζ) 32 ημέρες

Εικόνα 8.3: Ενδεικτικές εικόνες των μεταβολών στον όγκο μύος σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά από ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με ενέργεια ακτινοβολήσης 30J.

Οι διαδικασίες νέκρωσης είχαν ήδη ενεργοποιηθεί και πραγματοποιούνταν σημαντική μείωση του όγκου βαθμιαία καθώς περνούσαν οι ημέρες μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία. Στην 23^η ημέρα μετά την ακτινοβολήση ο όγκος ουσιαστικά υποχώρησε πλήρως αφήνοντας μια επιφανειακή πληγή, όμως μετά την 23^η ημέρα αυξανόταν ξανά το μέγεθος του όγκου. Κύτταρα του όγκου τα οποία άντεξαν στην επίδραση της φωτοδυναμικής άρχισαν να πολλαπλασιάζονται με ταχείς ρυθμούς αυξάνοντας έτσι το μέγεθος του καρκινικού όγκου ο οποίος διατηρήθηκε ωστόσο σε χαμηλότερα επίπεδα από ότι πριν την εφαρμογή της θεραπείας. Φαίνεται πως αυτό το

θεραπευτικό σχήμα έχει τη δυνατότητα ελέγχου αλλά κυρίως περιορισμού του ρυθμού ανάπτυξης του καρκινικού όγκου, καθώς η φωτοδυναμική κατόρθωσε να καταστείλει το ρυθμό αύξησης του καρκινικού όγκου σε σχέση με τους μύες οι οποίοι δεν υπεβλήθησαν σε θεραπεία.

8.1.4

Παρατηρήσεις σχετικές με τη φωτοευαισθησία, μετά από την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία

Η σοβαρότερη παρενέργεια της ενδοφλέβιας χορήγησης των φωτοευαισθητοποιητών είναι η φωτοευαισθησία. Τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή μέσω της κυκλοφορίας του αίματος συγκεντρώνονται στον καρκινικό όγκο, σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τους υγιείς ιστούς. Κατανέμονται ωστόσο σε όλα τα όργανα του σώματος. Τα όργανα εκείνα τα οποία είναι εκτεθειμένα στη φωτοευαισθησία είναι τα εξωτερικά όργανα του σώματος, το δέρμα και οι οφθαλμοί. Η m-THPC είναι ένας φωτοευαισθητοποιητής με μεγάλη κβαντική απόδοση και μικρές, σχετικά, δόσεις ενέργειας αρκούν για την ενεργοποίησή της. Για το λόγο αυτό μόριά της τα οποία έχουν κατακρατηθεί από τα εξωτερικά όργανα μπορεί να διεγερθούν από το φυσικό φως προκαλώντας ερεθισμούς ή και βλάβες σε αυτά. Ένας από τους σκοπούς της έρευνας ήταν η παρακολούθηση και καταγραφή πιθανής φωτοευαισθησίας στους μύες, ως παρενέργεια της χορήγησης του φωτοευαισθητοποιητή.

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC. Ο εγκλεισμός σε λιποσώματα παρατείνει το χρόνο ζωής του φωτοευαισθητοποιητή στην κυκλοφορία του αίματος κατά συνέπεια και στα εξωτερικά όργανα του σώματος. Η εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC χορηγήθηκε στους μύες ενδοφλεβίως, μέσω μίας εκ των δυο αρτηριών στην ουρά του ζώου. Η ουρά ήταν εκείνη η περιοχή του σώματος του μύς η οποία κυρίως κινδύνευε λόγω φωτοευαισθησίας καθώς: (α) το υπόλοιπο δέρμα του μύς καλύπτεται από πυκνό τρίχωμα, (β) στην ουρά βρίσκονται δυο αρτηρίες και δυο φλέβες άρα υπάρχει εκτεταμένη κυκλοφορία του αίματος και (γ) ο εγκλεισμός σε λιποσώματα αυξάνει το χρόνο ζωής στην κυκλοφορία του αίματος. Για τους λόγους αυτούς αφενός λήφθηκε ιδιαίτερη μέριμνα προκειμένου να αποφεύγεται η έκθεση των μυών στο φυσικό φως, αφετέρου η μορφολογία και οι αλλαγές της ουράς παρακολουθούνταν και καταγραφόταν συστηματικά μέσω του απεικονιστικού συστήματος.

Οι παρατηρήσεις και οι καταγραφές ανέδειξαν το κυριότερο μειονέκτημα σε όλα ανεξαιρέτως τα θεραπευτικά σχήματα, την παραμένουσα φωτοευαισθησία, η οποία

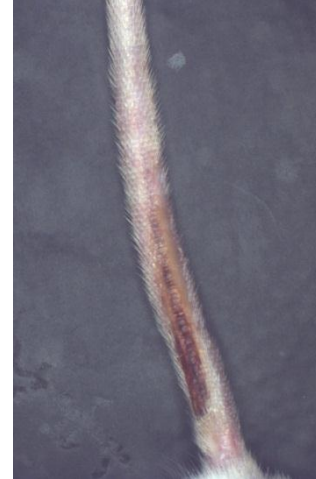
εκδηλώθηκε στην ουρά των μυών καθώς το υπόλοιπο σώμα τους ήταν καλυμμένο με πυκνό τρίχωμα.



(α) 3 ημέρες



(β) ημέρα 4



(γ) 18 ημέρες



(δ) 36 ημέρες



(ε) 43 ημέρες i



(στ) 43 ημέρες ii



(ζ) 50 ημέρες



(η) 60 ημέρες

Εικόνα 8.4: Ενδεικτικές εικόνες αντιπροσωπευτικές της εξέλιξης της φωτοευαισθησίας στην ουρά μυός μετά τη χορήγηση φωτοευαισθητοποιητή. Η φωτοευαισθησία παρέμεινε έως και δυο μήνες μετά τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή.

Μολονότι είχε ληφθεί μέριμνα οι μύες να διατηρούνται σε περιβάλλον χαμηλού φωτισμού (πλήρης απουσία φωτός δεν υιοθετήθηκε προκειμένου να μην αυξήσει επικίνδυνα το στρες στα πειραματόζωα), συνολικά το 90% των μυών, στους οποίους είχε χορηγηθεί φωτοευαισθητοποιητής και χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες, ανέπτυξε φωτοευαισθησία. Το φαινόμενο εκδηλώθηκε ως οίδημα αρχικά το οποίο επεκτάθηκε σε ερύθημα και κατέληξε στη δημιουργία πληγής με πολύ μεγάλο χρόνο επούλωσης. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της αλληλουχίας των επιδράσεων στην ουρά μύος ελήφθησαν με την απεικονιστική διάταξη και παραθέτονται στις Εικόνες 8.4 (α)-(η).

Τις πρώτες δέκα ημέρες μετά τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή, Εικόνες 8.4 (α) και (β), παρατηρήθηκε οίδημα στην ουρά του μύος. Στις επόμενες το αποτέλεσμα των φωτοτοξικών αντιδράσεων στην ουρά του ζώου έμοιαζε με εκτεταμένο ηλιακό έγκαυμα με χαρακτηριστικά έντονο ερύθημα και οίδημα (Εικόνα 8.4(γ)). Σε μερικές περιπτώσεις η φωτοτοξικότητα ήταν τόσο έντονη που οδήγησε στο σχηματισμό πληγής με πολύ μεγάλο χρόνο επούλωσης (Εικόνες 8.4(δ)-(ζ)). Ακόμα και δυο μήνες μετά τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή η φωτοευαισθησία ήταν έντονα παρούσα στην ουρά του μύος (Εικόνα 8.4(η)).

8.1.5

Συμπεράσματα μελετών ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας

Τα αποτελέσματα των τριών διαφορετικών θεραπευτικών σχημάτων τα οποία εφαρμόστηκαν κατά την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία στο μοντέλο μύος καρκίνου του προστάτη το οποίο αναπτύχθηκε για το σκοπό αυτό συνοψίζονται ως εξής:

- ☞ Η ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με την εγκλεισμένη λιποσωματική *m*-THPC και ενέργεια ακτινοβολίας 15J με το διοδικό laser στα 652nm, μπορεί να θεραπεύσει πλήρως τον καρκινικό όγκο στο συγκεκριμένο μοντέλο. 2 μήνες μετά τη θεραπεία δεν παρατηρήθηκε επανεμφάνιση του όγκου και το κοσμετολογικό αποτέλεσμα ήταν άψογο.
- ☞ Η Ενδοϊστική Φωτοδυναμική Θεραπεία με την εγκλεισμένη λιποσωματική *m*-THPC και ενέργεια ακτινοβολίας 30J με το διοδικό laser στα 652nm, μπορεί να όχι μόνο να ελέγξει αλλά και να μειώσει τον καρκινικό όγκο στο μοντέλο καρκίνου του προστάτη. Το θεραπευτικό αυτό σχήμα θεωρείται επιτυχημένο.
- ☞ Η Ενδοϊστική Φωτοδυναμική Θεραπεία με την εγκλεισμένη λιποσωματική *m*-THPC και ενέργεια ακτινοβολίας 10J με το διοδικό laser στα 652nm, δεν μπορεί να θεραπεύσει τον καρκινικό όγκο στο συγκεκριμένο μοντέλο, αντιθέτως προκαλεί αύξηση.

- ☞ Πολύ σοβαρή φωτοευαισθησία αναπτύσσεται μετά τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή στο 90% των ζώων.

Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές για πλήρη θεραπεία του καρκινικού όγκου μετά από ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία, παρά μόνο αποτελέσματα σχετικά με το ποσοστό νέκρωσης του καρκινικού ιστού μετά από αυτή. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τα οποία αποδεικνύουν πλήρη θεραπεία του καρκινικού όγκου και μη επανεμφάνισή του κατόπιν μακροχρόνιας παρακολούθησης, είναι εξαιρετικά σημαντικά και έχουν δημοσιευτεί.

8.2

Αποτελέσματα μελετών ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας σε συνδυασμό με φυσικό μείγμα πολυφαινολών στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ενδοκυττάριοι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας ενοχοποιούνται για την αντίσταση την οποία παρουσιάζουν τα καρκινικά κύτταρα σε εκείνες τις αντικαρκινικές θεραπείες οι οποίες δρουν μέσω οξειδωτικού στρες. Η φωτοδυναμική βασίζει τη δράση της κατεξοχήν στο οξειδωτικό στρες, οπότε είναι σημαντικό να αναπτυχθούν μεθοδολογίες τέτοιες οι οποίες θα καταστέλλουν την αντιοξειδωτική άμυνα και θα επιτρέπουν τη χωρίς αντίσταση ή ανταγωνισμό δράση του οξειδωτικού στρες. Επιπροσθέτως, το υπό θεραπεία σύστημα θα μπορούσε να τεθεί σε προ-οξειδωτική κατάσταση, μέσω της χορήγησης ουσιών σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις και με τον τρόπο αυτό να «ευαισθητοποιηθεί» στη θεραπεία, να απαιτείται ενδεχομένως μικρότερη ποσότητα φωτοευαισθητοποιητή για να προκληθεί η ίδια κυτταροτοξικότητα.

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά μπορούν να δράσουν τόσο προ-οξειδωτικά προκαλώντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά και αντιοξειδωτικά, εξουδετερώνοντάς τες. Ο τρόπος με τον οποίο θα δράσουν φαίνεται ότι καθορίζεται από τη συγκέντρωσή τους καθώς έχει διαπιστωθεί ότι φυσικά μείγματα σε χαμηλές συγκεντρώσεις δρουν αντιοξειδωτικά προστατεύοντας τα βιολογικά συστήματα ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δρουν ενισχύοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Το φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχόμενο από λυοφιλοποιημένο φλοιό του πεύκου *P.halepensis* έχει δειχθεί πως δρα ισχυρά αντιοξειδωτικά αλλά και ενισχύει τη δράση της φωτοδυναμικής στο μοντέλο κυττάρου, προκαλώντας ακόμα μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικής θνησιμότητας (Κεφάλαιο 7.5.4). Παρουσιάζει συνεπώς ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μελέτη του συνδυασμού της δράσης του με την ενδοϊστική φωτοδυναμική

θεραπεία στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη. Ενδεχομένως το εκχύλισμα, σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, θα μπορούσε να δράσει προ-οξειδωτικά, μετατοπίζοντας την ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία σε προ-οξειδωτική κατάσταση και να ενισχύσει την οξειδωτική δράση της φωτοδυναμικής. Σε άλλες συγκεντρώσεις ωστόσο θα μπορούσε να δράσει αντιοξειδωτικά προλαμβάνοντας τη φωτοευαισθησία.

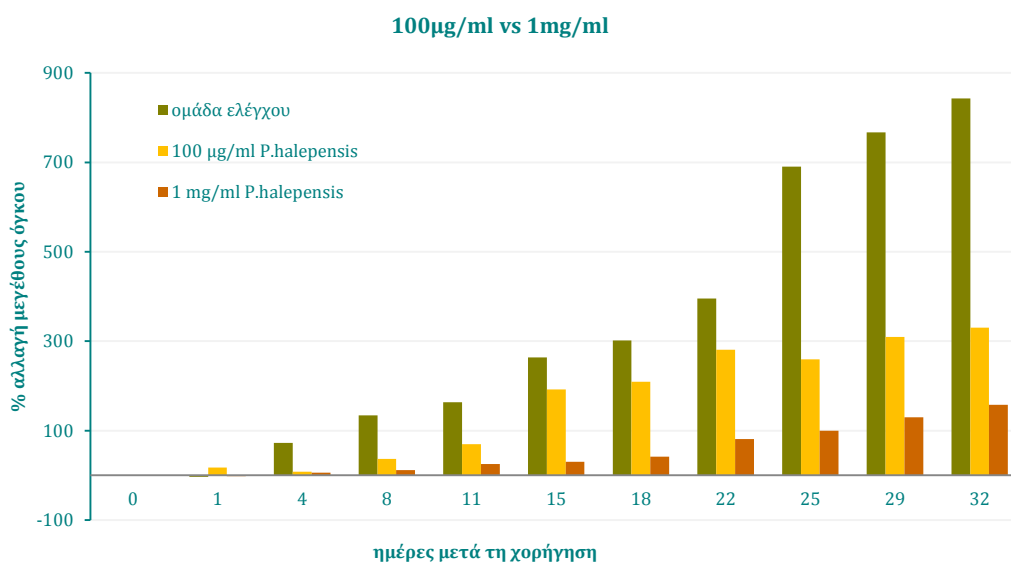
Μέχρι τώρα δεν υπάρχει αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία για τη συνδυασμένη δράση της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας με φυσικό μείγμα πολυφαινολών σε μοντέλο καρκίνου σε επίπεδο μυός. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής τέθηκε ως στόχος η διερεύνηση της πιθανότητας συνέργειας της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας, με την εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC, με φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχομένων από φλοιό *P.halepensis*. Η μεθοδολογία της μελέτης περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 6.10.3. Επιγραμματικά, το φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχόμενο από λυοφιλοποιημένο φλοιό του πεύκου *P.halepensis* χορηγήθηκε ενέσιμα στον καρκινικό όγκο 1 h πριν την ακτινοβολήση στα πλαίσια της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας. Ελέγχθησαν δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις, 1 mg/ml και 100 µg/ml. Αρχικά ελέγχθηκε η απόκριση των όγκων στο φυσικό μείγμα χωρίς φωτοδυναμική και στη συνέχεια η συνδυασμένη δράση της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών. Ως φωτοευαισθητοποιητής χρησιμοποιήθηκε η εγκλεισμένη λιποσωματική m-THPC 6 h πριν την ενδοϊστική ακτινοβολήση με συνολική δόση ενέργειας 15 J.

8.2.1

Αποτελέσματα μελετών επίδρασης του φυσικού μείγματος πολυφαινολών στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη

Χορηγήθηκαν σε ισάριθμες ομάδες μυών οι οποίοι έφεραν καρκινικούς όγκους δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις φυσικού μείγματος πολυφαινολών, 1 mg/ml και 100 µg/ml. Το διάλυμα με το φυσικό μείγμα χορηγήθηκε ενέσιμα μέσα στον καρκινικό όγκο. Η απόκριση των όγκων στο εκχύλισμα παρουσιάζεται στο διάγραμμα του Σχήματος 8.4.

Το φυσικό μείγμα πολυφαινολών, προερχόμενο από λυοφιλοποιημένο φλοιό του πεύκου *P.halepensis* και στις δυο συγκεντρώσεις χορήγησής του προκάλεσε σημαντική καθυστέρηση στην αύξηση των καρκινικών όγκων, στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση χορήγησής, 1 mg/ml, ανέστειλε ισχυρότερα την αύξηση του μεγέθους του όγκου σε σχέση με τη δέκα φορές μικρότερη συγκέντρωση, 100 µg/ml.



Σχήμα 8.4: Εκατοστιαία μεταβολή του μεγέθους του όγκου ως προς το χρόνο μετά τη χορήγηση δυο διαφορετικών συγκεντρώσεων φυσικού μείγματος πολυφαινολών, 100 μg/ml και 1mg/ml.

Ενδεικτικά, την 22^η ημέρα μετά την χορήγηση του φυσικού μείγματος πολυφαινολών, στους μύες στους οποίους χορηγήθηκε 1 mg/ml εκχυλίσματος *P.halepensis* καταγράφηκε μέση αύξηση του καρκινικού όγκου 81%, στους μύες στους οποίους χορηγήθηκε εκχύλισμα 100 μg/ml η μέση αύξηση των όγκων ήταν 281%, ενώ την ίδια στιγμή οι όγκοι των μυών της ομάδας ελέγχου παρουσίαζαν μέση αύξηση 395%. Η συμπεριφορά αυτή παρατηρήθηκε καθόλη τη διάρκεια της παρακολούθησης.

Τα αποτελέσματα παρέχουν ενδείξεις πως το φυσικό μείγμα πολυφαινολών, στις συγκεντρώσεις που χορηγήθηκε, ανταγωνίζεται την αύξηση του καρκινικού όγκου, προκαλώντας σημαντική καθυστέρηση στην αύξησή του.

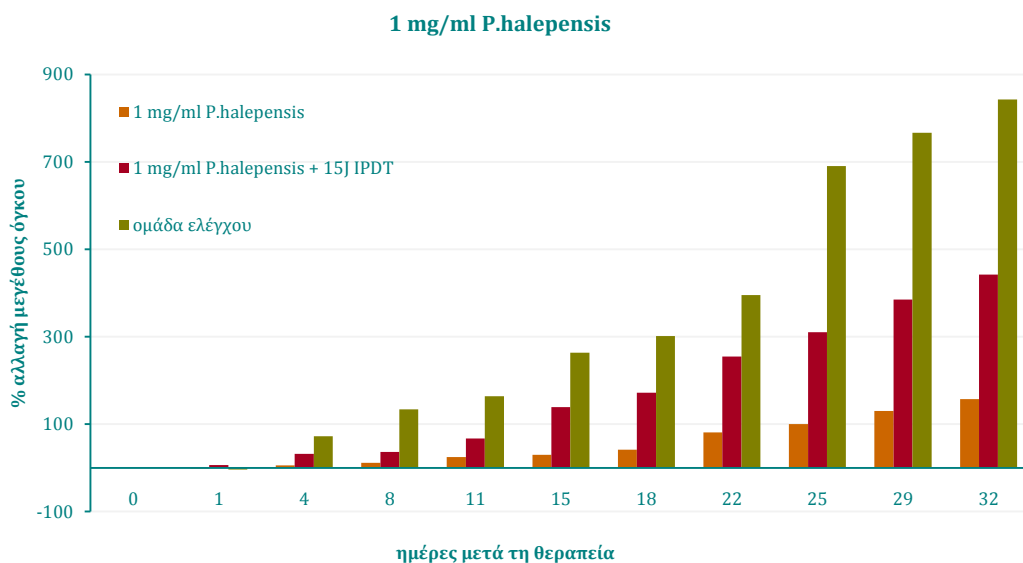
8.2.2

Αποτελέσματα μελετών συνδυασμένης δράσης της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας και του φυσικού μείγματος πολυφαινολών σε συγκέντρωση 1 mg/ml, στο μοντέλο μύος καρκίνου του προστάτη

Στο διάγραμμα του Σχήματος 8.5 παρουσιάζεται η απόκριση των καρκινικών όγκων στη συνδυασμένη δράση της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας με το φυσικό εκχύλισμα πολυφαινολών σε συγκέντρωση 1 mg/ml.

Ο συνδυασμός του φυσικού μείγματος πολυφαινολών με την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία ανέστρεψε πλήρως τη δράση της φωτοδυναμικής, όταν αυτή

εφαρμόστηκε μόνη της στο ίδιο μοντέλο μυός. Παρατηρείται ότι ο μέσος καρκινικός όγκος στους μύες οι οποίοι υπεβλήθησαν στο συνδυασμό φωτοδυναμικής – φυσικού μείγματος ακολουθεί την μέση αύξηση όγκου της ομάδας ελέγχου, αν και σε μικρότερα ποσοστά, καθόλη τη διάρκεια της παρακολούθησης. Τα ποσοστά αυτά ωστόσο είναι μεγαλύτερα από τα ποσοστά τα οποία κατεγράφησαν στους μύες στους οποίους χορηγήθηκε μόνο το φυσικό μείγμα. Το εκχύλισμα φλοιού του πεύκου *P.halepensis* προκάλεσε μεγαλύτερη καθυστέρηση στην ανάπτυξη των καρκινικών όγκων σε σχέση με το συνδυασμό ενδοϊστικής φωτοδυναμικής και φυσικού μείγματος πολυφαινολών σε συγκέντρωση 1mg/ml.



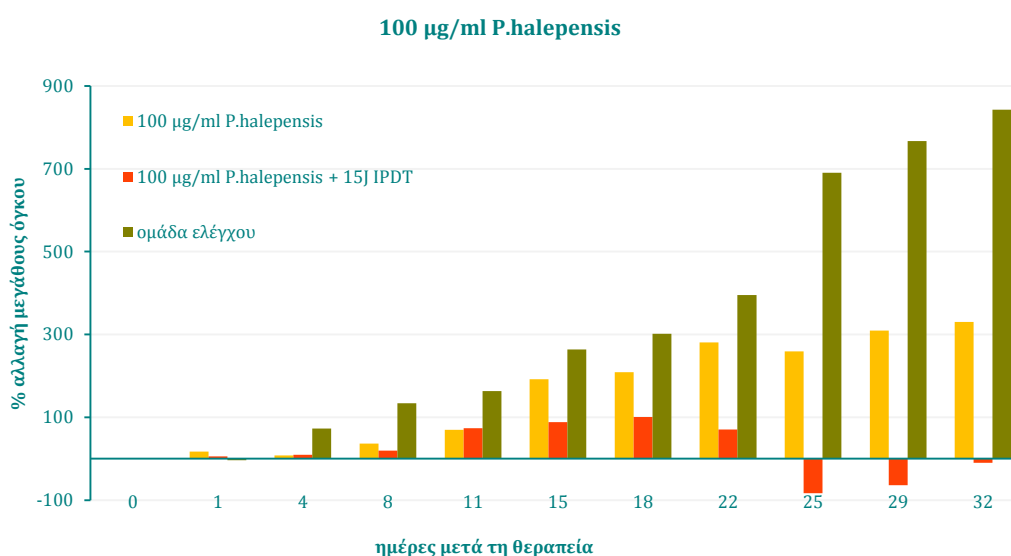
Σχήμα 8.5: Εκατοστιαία μεταβολή του μεγέθους του όγκου στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη ως προς το χρόνο μετά τη χορήγηση 1mg/ml φυσικού μείγματος πολυφαινολών, καθώς και του συνδυασμού αυτού με την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία.

Τα αποτελέσματα παρέχουν ενδείξεις πως τη δράση της φωτοδυναμικής ανταγωνίζεται ισχυρά το εκχύλισμα το οποίο δρώντας αντιοξειδωτικά, δέσμευσε τις ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά οξυγονούχα είδη προϊόντα των φωτοχημικών αντιδράσεων τύπου I και II της φωτοδυναμικής. Οπότε ανεστάλη η δημιουργία των κυτταροτοξικών αντιδράσεων καταστροφής του καρκινικού όγκου. Το φυσικό μείγμα πολυφαινολών, δρώντας αντιοξειδωτικά, ενεργοποίησε αντιδράσεις ενάντια στον καρκινικό όγκο, ενδεχομένως διεγείροντας ανοσολογικές αντιδράσεις κατά του καρκινικού όγκου, φαινόμενο στο οποίο ενδεχομένως οφείλεται η δράση του όταν χορηγήθηκε μόνο του στον καρκινικό όγκο.

8.2.3

Αποτελέσματα μελετών συνδυασμένης δράσης της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας και του φυσικού μείγματος πολυφαινολών σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$, στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη

Στο διάγραμμα του Σχήματος 8.6 παρουσιάζεται η απόκριση των καρκινικών όγκων στη συνδυασμένη δράση της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας με το φυσικό εκχύλισμα πολυφαινολών σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$.



Σχήμα 8.6: Εκατοστιαία μεταβολή του μεγέθους του όγκου στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη ως προς το χρόνο μετά τη χορήγηση 100 $\mu\text{g/ml}$ φυσικού μείγματος πολυφαινολών, καθώς και του συνδυασμού αυτού με την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία.

Ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία σε συνδυασμό με 100 $\mu\text{g/ml}$ φυσικού μείγματος πολυφαινολών κατόρθωσε να καθυστερήσει σημαντικά την αύξηση του καρκινικού όγκου στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη. Καταγράφηκε μια μικρή αύξηση του όγκου (σε κάθε περίπτωση μικρότερη από 100%) τις πρώτες είκοσι ημέρες της παρακολούθησης μετά τη θεραπεία. Στη συνέχεια, στις δέκα επόμενες ημέρες σημειώθηκε μείωση του όγκου αγγίζοντας ποσοστά έως και -83 % (25^η ημέρα). Το μέγεθός του δηλαδή ήταν κατά περίπου 80 % μικρότερο σε σχέση με το μέγεθος το οποίο είχε την ημέρα εφαρμογής της θεραπείας. Η μείωση ωστόσο αυτή δεν σταθεροποιήθηκε σε αυτό το επίπεδο, και αναιρέθηκε καθώς στο τέλος της παρακολούθησης καταγράφηκε ποσοστό μείωσης (-9 %), και ο μέσος καρκινικός όγκος επανέκτησε το μέγεθος το οποίο είχε στην αρχή της θεραπείας.

Ο συνδυασμός της φωτοδυναμικής με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών, προερχομένων από εκχύλισμα φλοιού *P.halepensis*, προκάλεσε περεταίρω μείωση της αύξησης του όγκου σε σχέση με την περίπτωση κατά την οποία χορηγήθηκε στου μύες μόνο το φυσικό μείγμα πολυφαινολών. Μολονότι η θεραπευτική ικανότητα της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής φαίνεται ότι υποβαθμίζεται (έως και την 22^η ημέρα σε σύγκριση με την περίπτωση κατά την οποία εφαρμόστηκε μόνο φωτοδυναμική, Σχήμα 8.9), κατόρθωσε ωστόσο να συγκρατήσει τελικά τον καρκινικό όγκο στα ίδια επίπεδα με εκείνα της έναρξης της θεραπείας (32^η ημέρα). Το αποτέλεσμα θεωρήθηκε θετικό καθώς αιτούμενο της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι και ο περιορισμός της ανάπτυξης του καρκινικού όγκου. Το αποτέλεσμα αυτό, σε συνδυασμό με την πλήρη απουσία φωτοευαισθησίας σε όλους τους μύες στους οποίους χορηγήθηκε ο φωτοευαισθητοποιητής και το φυσικό μείγμα πολυφαινολών, Κεφάλαιο 8.3.5, κρίνεται σημαντικό.

*Για πρώτη φορά παρέχονται σαφείς ενδείξεις συνέργειας της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας με φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχομένων από εκχύλισμα φλοιού *P.halepensis*. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία κατόρθωσε να συγκρατήσει την ανάπτυξη του όγκου στα επίπεδα έναρξης της θεραπείας αλλά κυρίως κατόρθωσε να άρει πλήρως την παραμένουσα φωτοευαισθησία.*

8.2.4

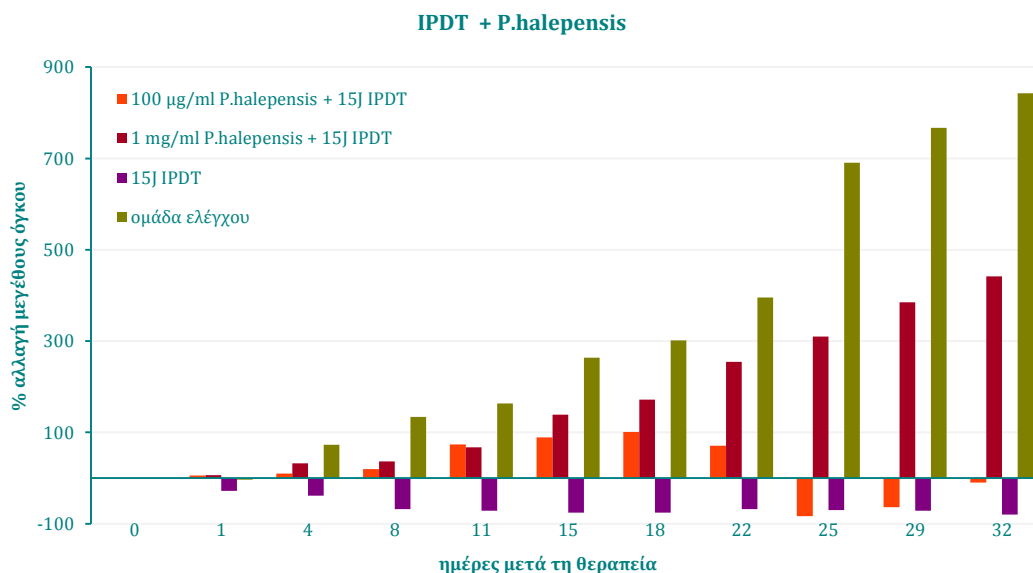
Συμπεράσματα μελετών συνδυασμένης δράσης της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας και του φυσικού μείγματος πολυφαινολών στο μοντέλο μύος καρκίνου του προστάτη

Στο διάγραμμα του Σχήματος 8.7 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της συνδυασμένης δράσης της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών στις δυο συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν στη θεραπεία ή στην αναστολή της αύξησης του καρκινικού όγκου στο μοντέλο μύος καρκίνου του προστάτη, σε σχέση με τα αποτελέσματα που επέφερε μόνη της η φωτοδυναμική.

Σε κάθε συγκέντρωση χορήγησης, το φυσικό μείγμα πολυφαινολών σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική θεραπεία προκάλεσε μείωση της μέσης αύξησης των καρκινικών όγκων σε σχέση με τους μύες της ομάδας ελέγχου. Σε συγκέντρωση 1 mg/ml αναίρεσε την θεραπευτική ικανότητα της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας με δόση ενέργειας 15 J, καθώς ο όγκος παρουσίαζε διαρκή αύξηση καθόλη τη διάρκεια της παρακολούθησης τη στιγμή που μόνη της η φωτοδυναμική είχε πετύχει μέση μείωση όγκου κατά 80% στο τέλος της θεραπείας.

Συγκέντρωση 100 μg/ml φυσικού μείγματος πολυφαινολών σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική θεραπεία φαίνεται τελικά πως επέφερε παρόμοιο αποτέλεσμα σε σχέση

με τη φωτοδυναμική μόνη της με μια χρονική καθυστέρηση. Παρατηρήθηκε αρχικά μια μικρή διόγκωση του όγκου στους μύες που δέχτηκαν τη συνδυασμένη θεραπεία για να ακολουθήσει στη συνέχεια συρρίκνωση του όγκου σε επίπεδα συγκρίσιμα με την ομάδα που δέχτηκε μόνο φωτοδυναμική (25^η ημέρα μετά τη θεραπεία).



Σχήμα 8.7: Εκατοστιαία μεταβολή του μεγέθους του όγκου στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη ως προς το χρόνο μετά την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία και τη συνδυασμένη χορήγηση φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένων από εκχύλισμα φλοιού *P.halepensis*.

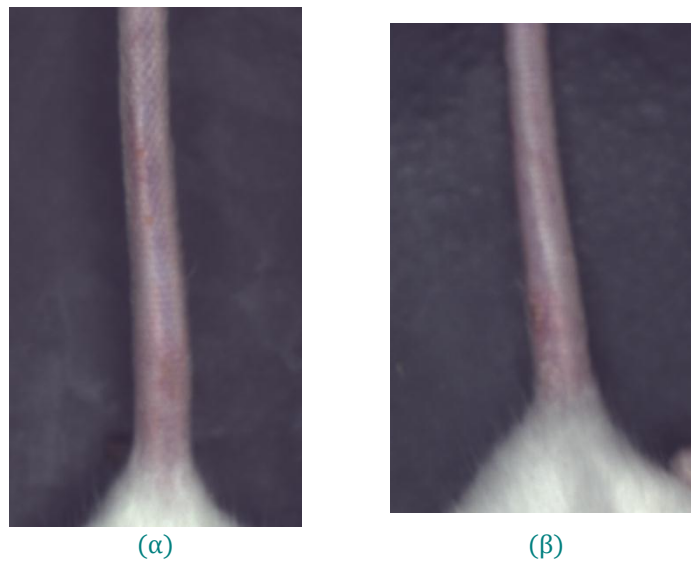
8.2.5

Αποτελέσματα συνδυασμού ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας και φυσικού μείγματος πολυφαινολών στη φωτοευαισθησία

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η χορήγηση μειγμάτων με αντιοξειδωτικές ιδιότητες σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική δεν αποσκοπούσε μόνο στην ευαισθητοποίηση και αύξηση της επιδεκτικότητας του καρκινικού όγκου στη θεραπεία. Κύριο αίτημα επίσης ήταν η άρση της σοβαρότερης παρενέργειας που συνοδεύει τη φωτοδυναμική θεραπεία, της παραμένουσας φωτοευαισθησίας. Η παραμένουσα φωτοευαισθησία οφείλεται σε μόρια φωτοευαισθητοποιητή τα οποία έχουν κατακρατηθεί από όργανα του σώματος και διεγείρονται από το φυσικό φως. Εκδηλώνεται στα εξωτερικά όργανα του σώματος, το δέρμα και τους οφθαλμούς, παρουσιάζοντας χαρακτηριστικά ερυθρήματος ή και εγκαύματος στις σοβαρότερες περιπτώσεις. Χαρακτηριστικές είναι οι Εικόνες 8.4 (α) – (η) στις οποίες παρουσιάζεται η εξέλιξη της φωτοευαισθησίας στην ουρά των μυών στους οποίους εφαρμόστηκε ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία.

Επιπλέον στόχος, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων συνδυασμού της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχομένων από εκχύλισμα φλοιού *P.halepensis*, τέθηκε η διερεύνηση της επίδρασης του εκχυλίσματος στη φωτοευαισθησία. Για το λόγο αυτό παρακολουθούνταν σχολαστικά οι ουρές των μυών για συμπτώματα φωτοευαισθησίας και λαμβάνονταν εικόνες μέσω του απεικονιστικού συστήματος.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως κανένα από τα πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε φωτοευαισθητοποιητής και φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχόμενο από το φλοιό του πεύκου *P.halepensis* δεν παρουσίασε την παραμικρή ένδειξη φωτοευαισθησίας. Σε καμία ουρά δεν εντοπίστηκε οίδημα, ούτε ερύθημα και για τις δυο συγκεντρώσεις εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν. Παρακάτω, στην Εικόνα 8.5, παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες της αντιοξειδωτικής δράσης του φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένων από φλοιό πεύκου *P.halepensis* ενάντια στη φωτοευαισθησία.



Εικόνα 8.5: Ενδεικτικές εικόνες αντιπροσωπευτικές της ανυπαρξίας φωτοευαισθησίας στην ουρά μυός μετά τη χορήγηση φωτοευαισθητοποιητή παρουσία μείγματος πολυφαινολών φλοιού *P.halepensis*. Ούτε οίδημα εντοπίστηκε, ούτε ερύθημα και για τις δυο συγκεντρώσεις εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν.

Κεφάλαιο ΙΧ

Ανακεφαλαίωση & Συζήτηση

Προοπτικές

9.1

Ανακεφαλαίωση στόχων

Η φωτοδυναμική είναι μια καινοτόμος, επιλεκτική και αποτελεσματική θεραπευτική μεθοδολογία για τη θεραπεία καρκινικών όγκων αλλά και μη καρκινικών νόσων. Βασίζεται στη δράση τριών στοιχείων, κάθε ένα από τα οποία μεμονωμένο και στις δόσεις στις οποίες εφαρμόζεται κατά τη φωτοδυναμική δεν επάγει καμία αλλοίωση στο βιολογικό σύστημα. Η επαγομένη από τη φωτοδυναμική κυτταροτοξικότητα προκαλείται από τη συνδυασμένη δράση των τριών στοιχείων, του φωτός, του φωτοευαισθητοποιητή και του οξυγόνου. Είναι δε αποτέλεσμα δυο τύπων φωτοχημικών αντιδράσεων, των αντιδράσεων τύπου Ι και των αντιδράσεων τύπου ΙΙ, μέσω των οποίων παράγονται ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη, κυρίως μονήρες οξυγόνο. Τα οξειδωτικά παράγωγα των δύο τύπων φωτοχημικών αντιδράσεων ενεργοποιούν μηχανισμούς νέκρωσης του καρκινικού ιστού.

Τα συγκριτικά πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής έναντι των συμβατικών αντικαρκινικών θεραπειών κάθε άλλο παρά αμελητέα είναι. Ανάμεσα στα σημαντικότερα πλεονεκτήματα εντοπίζεται η επιλεκτικότητα της μεθόδου, η οποία οφείλεται τόσο στην

επιλεκτική συγκέντρωση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή στον καρκινικό ιστό όσον και στην καθοδήγηση και εστίαση του φωτός διέγερσης ακριβώς στα όρια του καρκινικού όγκου. Επιπλέον, καθώς δεν πλήττει τον περιβάλλοντα του καρκινικού όγκου εξωκυττάριο χώρο, επιτρέπει την αναγέννηση και ανάπλαση φυσιολογικού, υγιούς ιστού στην περιοχή διατηρώντας τη λειτουργικότητα του οργάνου ακέραια. Στην περίπτωση δερματικών καρκινικών όγκων το κοσμετολογικό αποτέλεσμα είναι άψογο. Η εμπειρία των τελευταίων 30 χρόνια συστηματικής έρευνας και επιτυχούς εφαρμογής της αναδεικνύει ότι πρόκειται περί μιας ελκυστικής και αποτελεσματικής καινοτόμου θεραπευτικής μεθόδου.

Μολονότι τα πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής την αναδεικνύουν ως υπερέχουσα θεραπευτική μεθοδολογία έναντι των συμβατικών, σε ορισμένες περιπτώσεις, η ευρύτερη αποδοχή και εφαρμογή της περιορίζεται από μειονεκτήματα ή ασάφειες, τα οποία τη συνοδεύουν. Από αυτά, ο φόβος ότι το κόστος της θεραπείας είναι απαγορευτικά μεγάλο έχει ήδη ξεπεραστεί με την εισαγωγή των διοδικών lasers ως πηγών φωτός. Τα διοδικά lasers είναι τα πλέον οικονομικά και εύκολα στη χρήση. Έχουν μικρό μέγεθος και δεν απαιτούν εξειδικευμένη τροφοδοσία και σύστημα ψύξης, παρέχοντας ευελιξία και φορητότητα. Οι λόγοι αυτοί έχουν προσελκύσει ερευνητές και ιατρούς ώστε να τα επιλέγουν έναντι των υπολοίπων.

Μετωπική έρευνα γίνεται στην κατεύθυνση άρσης των μειονεκτημάτων της μεθόδου. Η αδυναμία εφαρμογής της μεθόδου σε καρκινικούς όγκους οι οποίοι εκτείνονται και στις τρεις διαστάσεις (έχουν δηλαδή σχετικά μεγάλο ύψος), καθώς και σε καρκινικούς όγκους οι οποίοι εντοπίζονται σε εσωτερικά όργανα του ανθρώπινου οργανισμού, αποτελεί ένα από αυτά.

Μια περίπτωση καρκινικού όγκου, ο οποίος διαθέτει τα παραπάνω χαρακτηριστικά και υπάρχει διεθνώς αυξημένο ενδιαφέρον για την επιτυχή ίασή του, είναι ο καρκίνος του προστάτη. Κοινή διαπίστωση αποτελεί ότι η πλειοψηφία των ηλικιωμένων και υπερηλίκων ανδρών του δυτικού κόσμου πάσχει από τη νόσο. Τις τελευταίες δεκαετίες ωστόσο έχει μειωθεί το όριο ηλικίας των ανδρών οι οποίοι διαγιγνώσκονται με τη νόσο. Οι συμβατικές θεραπευτικές προσεγγίσεις, παρότι αποτελεσματικές στην αντιμετώπιση του καρκινικού όγκου, έχουν σοβαρότατες παρενέργειες οι οποίες μειώνουν δραματικά την ποιότητα ζωής των ασθενών. ***Παρουσιάζει συνεπώς ιδιαίτερο ενδιαφέρον η ανάπτυξη καινοτόμων θεραπευτικών μεθόδων οι οποίες θα επιτυγχάνουν πλήρη ίαση και εξάλειψη του καρκινικού όγκου αλλά συγχρόνως θα αίρουν τις παρενέργειες των συμβατικών θεραπειών, διατηρώντας την ακεραιότητα και λειτουργικότητα του αδένα.***

Η φωτοδυναμική θεραπεία έχει τη δυναμική να αποτελέσει το αντίπαλο δέος στις συμβατικές θεραπείες, αφενός δεδομένης της εξαιρετικής επιλεκτικότητάς της, αφετέρου

καθώς δεν πλήττει τον εξωκυττάριο χώρο άρα μπορεί να εξασφαλίσει τη νέκρωση μόνο του καρκινικού όγκου μέσα στον αδένα, αφήνοντας τις υποκείμενες και περιβάλλουσες δομές ανέπαφες, διατηρώντας με τον τρόπο αυτό τη λειτουργικότητά του. Η πρόκληση που εγείρεται στην περίπτωση αυτή αναφορικά με τη μεθοδολογία εφαρμογής της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι η καθοδήγηση του φωτός διέγερσης ακριβώς μέσα στον καρκινικό όγκο του προστάτη. Η φωτοδυναμική υιοθετεί στην περίπτωση αυτή τεχνικές που εφαρμόζονται ήδη στη βραχυθεραπεία, για την ενδοϊστική καθοδήγηση του φωτός διέγερσης ακριβώς μέσα στον καρκινικό όγκο. Πλέον αναφερόμαστε στην Ενδοϊστική Φωτοδυναμική Θεραπεία.

Η Ενδοϊστική Φωτοδυναμική Θεραπεία είναι η τελευταία εξέλιξη της τεχνολογίας στην κατεύθυνση επέκτασης της φωτοδυναμικής δράσης σε καρκινικούς όγκους οι οποίοι εκτείνονται σε τρεις διαστάσεις και εντοπίζονται σε εσωτερικά όργανα του ανθρώπινου σώματος^[5, 148]. Στην περίπτωση της Ενδοϊστικής Φωτοδυναμικής Θεραπείας εγείρονται δυο κυρίως προκλήσεις, η αντιμετώπιση των οποίων καθορίζει την επιτυχία ή όχι της μεθόδου στην καταστροφή του καρκινικού όγκου αλλά και στη διατήρηση της ακεραιότητας και λειτουργικότητας του οργάνου.

Η πρώτη πρόκληση αφορά τη μεταφορά του φωτός διέγερσης στον καρκινικό όγκο. Κατά την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία, το φως για τη διέγερση του φωτοευαισθητοποιητή καθοδηγείται ενδοϊστικά, μέσω κατάλληλων διατάξεων ακριβώς μέσα στον καρκινικό όγκο. Καθετήρες, όμοιοι αυτών που χρησιμοποιούνται στη βραχυθεραπεία, προσαρμόζονται σε μια διάταξη στήριξης. Μέσω αυτής και υπό την καθοδήγηση εικόνων απεικονιστικών διατάξεων (CT, MRI), εισέρχονται και τοποθετούνται σε συγκεκριμένες θέσεις μέσα στον καρκινικό όγκο. Οπτικές ίνες καθοδηγούνται, μέσα από το εσωτερικό των καθετήρων, στον καρκινικό όγκο, μεταφέροντας με τον τρόπο αυτό το φως διέγερσης ακριβώς μέσα σε αυτόν^[115, 149].

Με την τεχνική αυτή αίρεται ένα μειονέκτημα της φωτοδυναμικής θεραπείας, το περιορισμένο βάθος διείσδυσης του φωτός. Εισάγοντας πολλαπλές οπτικές ίνες σε διαφορετικά σημεία μέσα στον καρκινικό όγκο επιτυγχάνεται η μεταφορά του φωτός διέγερσης σε όλη την έκταση του όγκου, εξασφαλίζοντας φωτοδυναμική δράση σε όλα τα σημεία αυτού. Με την τεχνική αυτή αντιμετωπίζεται η πρώτη πρόκληση η οποία εγείρεται για την επιτυχή εφαρμογή της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας.

Η δεύτερη πρόκληση αφορά τον καθορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης φωτοευαισθητοποιητή και δόσης ενέργειας για την διέγερσή του ώστε να επιτευχθεί φωτοδυναμική δράση ικανή να προκαλέσει την καταστροφή του καρκινικού όγκου. Παράμετροι όπως η συγκέντρωση και κατανομή του φωτοευαισθητοποιητή, η κατανομή

του φωτός διέγερση, η συγκέντρωση ή παροχή οξυγόνου μέσα στον καρκινικό όγκο είναι αυτές οι οποίες καθορίζουν την επιτυχία της θεραπείας. Δεδομένης της ετερογένειας του καρκινικού ιστού ανάλογα με το όργανο στο οποίο αναπτύσσεται αλλά και ανάμεσα σε διαφορετικούς ασθενείς χρειάζεται ξεχωριστή δοσιμετρία σε κάθε διαφορετική περίπτωση, ώστε να εξασφαλίζεται τόσο ότι θα συμβεί φωτοδυναμική δράση όσο και ότι αυτή θα περιοριστεί μόνο μέσα στα όρια του όγκου. Συστηματικές έρευνες διεξάγονται διεθνώς τα τελευταία χρόνια στην κατεύθυνση αυτή, ορισμού των βέλτιστων παραμέτρων δοσιμετρίας. Τα θεραπευτικά αποτελέσματα ποικίλουν, με τη διαφοροποίηση να αποδίδεται σε διαφορές στην οξυγόνωση του ιστού, τη συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή και την κατανομή του φωτός διέγερσης στον καρκινικό ιστό^[148, 149]. Παρόλα αυτά, μετωπική έρευνα διεξάγεται διεθνώς στην κατεύθυνση ορισμού των βέλτιστων παραμέτρων δοσιμετρίας, ικανών να εξασφαλίσουν την καταστροφή του καρκινικού όγκου του προστάτη με την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία αλλά και τη διατήρηση της ακεραιότητας των περιβαλλόντων αυτού υγιών ιστών.

Το σημαντικότερο μειονέκτημα της φωτοδυναμικής, είναι μια παρενέργεια η οποία εμποδίζει την ευρεία αποδοχή και εφαρμογή της μεθόδου, η παραμένουσα φωτοευαισθησία. Μόρια του φωτοευαισθητοποιητή συγκεντρώνονται και σε υγιείς ιστούς και διεγείρονται από το φυσικό φως ενεργοποιώντας κυτταροτοξικές αντιδράσεις στον υγιή πλέον ιστό. Τα όργανα τα οποία πλήττονται από τη φωτοευαισθησία είναι κυρίως το δέρμα και οι οφθαλμοί. Η φωτοευαισθησία εκδηλώνεται ως ερύθημα αρχικά και προχωρά σε εκτεταμένο έγκαυμα εάν δεν ληφθούν οι απαραίτητες προφυλάξεις. Στην κατεύθυνση άρσης της παραμένουσας φωτοευαισθησίας (αλλά και για τη βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής δράσης) διεξάγεται διεθνώς μετωπική έρευνα ακολουθώντας δυο διαφορετικές στρατηγικές.

Η πρώτη επικεντρώνεται στην ανάπτυξη φωτοευαισθητοποιητών 3^{ης} γενιάς ή νανοφωτοευαισθητοποιητών^[150]. Οι 3^{ης} γενιάς φωτοευαισθητοποιητές δεν είναι παρά φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς συζευγμένοι σε νανοσωματιδιακά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Η πλειονότητα των φωτοευαισθητοποιητών είναι υδρόφοβα μόρια με ανεπαρκή διαλυτότητα σε υδατικά μέσα, γεγονός το οποίο συνεπάγεται συσσωμάτωση των μορίων τους όταν χορηγηθούν σε βιολογικά μέσα. Η συσσωμάτωση των μορίων έχει ως αποτέλεσμα την αλλοίωση των φωτοφυσικών (κβαντική απόδοση άρα και φωτοδυναμική δράση), χημικών (διαλυτότητα) και φαρμακοκινητικών (βιοδιαθεσιμότητα) ιδιοτήτων του φωτοευαισθητοποιητή. Ακόμα όμως και στην περίπτωση υδρόφιλων φωτοευαισθητοποιητών, η επιλεκτική συγκέντρωσή τους στον καρκινικό ιστό δεν είναι ικανοποιητική. Η ενθυλάκωση φωτοευαισθητοποιητών σε νανοσωματίδια προκαλεί αύξηση της διαλυτότητάς τους σε υδατικά μέσα και της συγκέντρωσής τους στον καρκινικό ιστό.

Η αύξηση της συγκέντρωσης των νανο-φωτοευαισθητοποιητών στον καρκινικό ιστό συμβαίνει για δυο λόγους. Ο πρώτος αφορά στο ότι η ενθυλάκωση του φωτοευαισθητοποιητή στο νανοσωματιδιακό όχημα μεταφοράς αποτρέπει τη συσσωμάτωση των μορίων του. Ο δεύτερος σχετίζεται με τις ιδιαίτερες ιδιότητες του περιβάλλοντος του καρκινικού όγκου χώρου. Στις περιοχές αυτές το ελαττωματικό αγγειακό σύστημα προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων σε σωματίδια ορισμένου, μικρού, μεγέθους τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν διαπερνούν τα αγγεία. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ενισχυμένη διαπερατότητα και κατακράτηση (enhanced permeability and retention effect (EPR))^[34, 151, 152].

Έχουν αναπτυχθεί διάφορα νανοσωματιδιακά συστήματα μεταφοράς φωτοευαισθητοποιητών. Λιποσώματα, μικκύλια από συνθετικά αμφίφυλα πολυμερή, νανοσωματίδια χρυσού, πολυμερών ή κεραμικών βρίσκονται ανάμεσα στα συστήματα μεταφοράς που έχουν αναπτυχθεί. Από τα πλέον αποτελεσματικά και προτιμητέα νανοσωματιδιακά συστήματα μεταφοράς είναι τα λιποσώματα. Τα λιποσώματα διαθέτουν τόσο συνθετικά όσο και λειτουργικά συγκριτικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα υπόλοιπα νανοσωματιδιακά συστήματα μεταφοράς. Η δομική απλότητα, η εύκολη σύνθεση και το χαμηλό κόστος παρασκευής τους, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα νανοσωματιδιακά συστήματα μεταφοράς, η βιοσυμβατή (μη τοξική) φύση των δομικών συστατικών τους αλλά κυρίως η μεγάλη χωρητικότητα και η ευελιξία των λιποσωμάτων να ενθυλακώνουν φωτοευαισθητοποιητές με ποικίλες φωτοφυσικές και φυσικοχημικές ιδιότητες τα ξεχώρισε ως συστήματα μεταφοράς. Μπορούν να ενθυλακώσουν μεγάλες ποσότητες υδρόφοβων μορίων και διαχέονται μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας χωρίς το σχηματισμό συσσωματωμάτων^[5, 35, 60]. Επιπλέον, καθώς έχουν την τάση να ενώνονται με υποδοχείς λιποπρωτεϊνών, και σε συνδυασμό με το φαινόμενο της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης, ενισχύουν τη συγκέντρωση υδρόφοβων φωτοευαισθητοποιητών στον καρκινικό όγκο^[65, 143].

Τα λιποσώματα είναι κολλοειδής σφαιρικές δομές λιπιδικών διπλοστοιβάδων στο εσωτερικό των οποίων εγκλείεται μέρος του υδάτινου μέσου στο οποίο διασπείρονται. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 20 nm έως μερικές δεκάδες μm ενώ το πάχος της λιπιδικής διπλοστοιβάδας περίπου 4 nm. Παρασκευάζονται από φυσικά και συνθετικά μόρια λιπιδίων, συνηθέστερα είναι τα φωσφολιπίδια και λιγότερο η χοληστερόλη και αυτή τους η σύνθεση τα καθιστά ιδιαίτερα βιοσυμβατούς και βιοδιασπώμενους νανομεταφορείς^[61]. Τα συμβατικά λιποσώματα χαρακτηρίζονται από μικρό χρόνο ημιζωής στο πλάσμα καθώς απομακρύνονται άμεσα από τους μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού (λευκά αιμοσφαίρια, μονοκύτταρα, μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (reticuloendothelial system (RES))).

Για να βελτιωθούν οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες των συμβατικών λιποσωμάτων αναπτύχθηκαν τα στερεοχημικά σταθεροποιημένα ή μακράς κυκλοφορίας λιποσώματα. Η εξωτερική επιφάνεια των λιποσωμάτων αυτών περιβάλλεται με ένα πολυμερές, συνήθως πολυαιθυλενογλυκόλη (polyethylene glycol (PEG)). Η επικάλυψη αυτή οχυρώνει το λιπόσωμα από την αντίσταση που δέχεται από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού. Μειώνει τις αλληλεπιδράσεις του λιποσώματος με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και εμποδίζει την εκκαθάρισή του από φαγοκύτταρα, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό την κυκλοφορία των λιποσωμάτων στο αίμα και τη συγκέντρωσή τους στον καρκινικό ιστό^[35, 63, 65].

Η χρήση εγκλεισμένων σε λιποσώματα φωτοευαισθητοποιητών θεωρείται πως θα μπορούσε να βελτιώσει και τη φωτοδυναμική δράση. Η φωτοδυναμική δράση εξαρτάται από την ικανότητα του φωτοευαισθητοποιητή να μεταφέρει την ενέργειά του σε μοριακό οξυγόνο, να προκαλέσει την παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών. Ο εγκλεισμός σε λιποσώματα αποτρέπει τη συσσωμάτωση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή. Με τον τρόπο αυτό διατηρείται ακέραια η κβαντική απόδοση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή συνεπώς και η φωτοδυναμική δράση. Επιπρόσθετα, διευκολύνεται η συγκέντρωση μεγαλύτερου αριθμού μορίων του φωτοευαισθητοποιητή στον καρκινικό ιστό^[65]. Πιστεύεται πως με τον εγκλεισμό σε λιποσώματα θα απαιτείται μικρότερη ποσότητα φωτοευαισθητοποιητή για την επιτυχή θεραπεία του καρκινικού όγκου, άρα μικρότερη ποσότητα θα κατακρατείται από τους υγιείς ιστούς, συνεπώς μικρότερη παραμένουσα φωτοευαισθησία. Επιπλέον μικρότερη ποσότητα φωτοευαισθητοποιητή θα κατακρατείται από τους περιβάλλοντες του όγκου υγιείς ιστούς, περιορίζοντας στο ελάχιστο τη φθορά τους σε περίπτωση έκθεσής τους στο φως διέγερσης. Με τον τρόπο αυτό διατηρείται η ακεραιότητα των δομών που περιβάλλουν τον όγκο, συμβάλλοντας στη διατήρηση της λειτουργικότητας του οργάνου.

Παράλληλα, η χρήση εγκλεισμένων σε λιποσώματα φωτοευαισθητοποιητών θα μπορούσε να ενισχύσει σημαντικά την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία στην περίπτωση του καρκίνου του προστάτη. Η πρόκληση αλλά και κύρια απαίτηση των θεραπευτικών μεθόδων που αναπτύσσονται για την αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη είναι η διατήρηση της λειτουργικότητας του αδένου. Με τον τρόπο αυτό θα περιοριστούν ή, θα εξαιρεθούν, ιδανικά, οι παρενέργειες των συμβατικών θεραπειών, οι οποίες υποβαθμίζουν δραματικά την ποιότητα ζωής των ασθενών. Με την ενδοϊστική ακτινοβολία το φως διέγερσης μεταφέρεται ακριβώς μέσα στον καρκινικό όγκο. Η χορήγηση νανοφωτοευαισθητοποιητών ενισχύει τη συγκέντρωσή τους στον καρκινικό ιστό, ελαχιστοποιώντας την στους περιβάλλοντες του καρκινικού όγκου υγιείς ιστούς. Συνεπώς περιορίζεται το ενδεχόμενο φθοράς τους από πιθανή πρόσπτωση σε αυτούς του φωτός

διέγερσης, καθώς η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή σε αυτούς είναι ελάχιστη άρα και η επακόλουθη φωτοδυναμική δράση ασθενής.

Ο συνδυασμός νανο-φωτοευαισθητοποιητών με την ενδοϊστική ακτινοβολία θα μπορούσε να περιορίσει τη φωτοδυναμική δράση στα όρια του καρκινικού ιστού με μεγαλύτερη ασφάλεια και να εξασφαλίσει την ακεραιότητα των γειτονικών υγιών ιστών. Ακριβώς αυτή η υπόθεση ελέγχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής. ***Η χρήση εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC, του αποδοτικότερου φωτοευαισθητοποιητή 2^{ης} γενιάς, σε συνδυασμό με ενδοϊστική ακτινοβολία σε μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη με στόχο την πλήρη θεραπεία του καρκινικού ιστού ήταν ένας από τους στόχους της διατριβής.***

Μια καινοτόμος εναλλακτική τακτική στην κατεύθυνση άρσης της παραμένουσας φωτοευαισθησίας, καθώς και για τη βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής δράσης, αποτελεί ο συνδυασμός της φωτοδυναμικής με παράγοντες οι οποίοι επιδρούν στην ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία. Μετατόπιση του υπό θεραπεία συστήματος σε προ-οξειδωτική κατάσταση πιστεύεται πως ευαισθητοποιεί τον καρκινικό ιστό στο επαγόμενο από τη φωτοδυναμική δράση οξειδωτικό στρες.

Η φωτοδυναμική θεραπεία προκαλεί την νέκρωση των κυττάρων μέσω των ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών, προϊόντα των φωτοχημικών αντιδράσεων τύπου I και II, τη δράση της ωστόσο ανταγωνίζονται κυτταρικοί μηχανισμοί προστασίας. Οι μηχανισμοί αυτοί ευθύνονται για την ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής άμυνας του κυττάρου απέναντι στο επαγόμενο από τη φωτοδυναμική οξειδωτικό στρες οδηγώντας στην κυτταρική επιβίωση, αναστέλλοντας τη δράση της φωτοδυναμικής^[36].

Αντικαρκινικές θεραπείες (φωτοδυναμική, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία κ.α.) οι οποίες δρουν κυτταροτοξικά μέσω ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών, είναι αποτελεσματικές μόνο όταν τα επίπεδα του ενδοκυττάρου οξειδωτικού στρες που προκαλούν δεν εξουδετερώνονται από την αντιοξειδωτική άμυνα και ξεπεραστεί το κατώφλι εκείνο πέραν του οποίου ο κυτταρικός θάνατος είναι μη αναστρέψιμος. Τα επίπεδα του αναγκαίου και ικανού, επαγομένου από τις αντικαρκινικές θεραπείες, οξειδωτικού στρες για την καταστροφή του καρκινικού όγκου εξαρτώνται από το ενδογενώς και εξωγενώς προκαλούμενο οξειδωτικό στρες στα καρκινικά κύτταρα και τον ανταγωνισμό που αυτό δέχεται από τους αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς.

Η ρήξη της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων είναι μια στρατηγική η οποία θα μπορούσε να ενισχύσει τα θεραπευτικά αποτελέσματα της φωτοδυναμικής, αλλά και των υπόλοιπων θεραπειών οι οποίες λειτουργούν μέσω της πρόκλησης οξειδωτικού στρες^[37]. Η

ρήξη της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας με την παράλληλη μετατόπιση της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγική ισορροπίας σε προ-οξειδωτική κατάσταση ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα στο επαγόμενο από τη φωτοδυναμική οξειδωτικό στρες. Θα επαρκεί συνεπώς μικρότερη ποσότητα φωτοευαισθητοποιητή για την καταστροφή του καρκινικού όγκου, ελαχιστοποιώντας με τον τρόπο αυτό την πιθανότητα εκδήλωσης της σοβαρότερης παρενέργειας της φωτοδυναμικής, της παραμένουσας φωτοευαισθησίας.

Η βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής δράσης και η άρση της παραμένουσας φωτοευαισθησίας μέσω της ρύθμισης της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και της μετατόπισής της σε προ-οξειδωτική κατάσταση αποτέλεσαν κυρίαρχα αιτήματα-στόχους οι οποίοι τέθηκαν στα πλαίσια παρούσας διατριβής. Η μεταβολή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας επιχειρήθηκε μέσω δυο μηχανισμών. Ο πρώτος αφορούσε τη ρήξη της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας καταστέλλοντας τον κυριότερο μη ενζυμικό μηχανισμό αντιοξειδωτικής προστασίας, το σύστημα της γλουταθειόνης. Ο δεύτερος αφορούσε τη χορήγηση φυσικού μείγματος πολυφαινολών σε συγκεντρώσεις ικανές να δράσουν προ-οξειδωτικά και να ευαισθητοποιήσουν το σύστημα στο επαγόμενο από τη φωτοδυναμική οξειδωτικό στρες.

Τέθηκαν επιμέρους στόχοι, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, που αφορούσαν τη μελέτη των φωτοφυσικών χαρακτηριστικών ενός φωτοευαισθητοποιητή 3^{ης} γενιάς, της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC, και τη σύγκριση αυτών με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά της ελεύθερης m-THPC, φωτοευαισθητοποιητή 2^{ης} γενιάς. Στόχος ήταν να διερευνηθεί εάν ο εγκλεισμός σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα, επηρεάζει καταρχήν τα φωτοφυσικά χαρακτηριστικά της m-THPC, αποτρέπει τη συσσωμάτωση των μορίων της και ενισχύσει τη φωτοδυναμική της δράση σε κύτταρα της καρκινικής σειράς κυττάρων του προστάτη.

Συγκριτικές μελέτες νανο-φωτοευαισθητοποιητών και των αντίστοιχών τους συμβατικών φωτοευαισθητοποιητών στο ίδιο μοντέλο κυττάρων δεν απαντώνται συχνά. Η προσέγγιση αυτή μπορεί να αποκαλύψει τη δυναμική ενός σκευάσματος να ενισχύσει τη φωτοδυναμική δράση, καθώς αυτή εξαρτάται και από το βιολογικό σύστημα στο οποίο εφαρμόζεται. Η μελέτη αυτή αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην περίπτωση του καρκίνου του προστάτη καθώς θα μπορούσε να οδηγήσει στη χορήγηση μικρότερης συγκέντρωσης φωτοευαισθητοποιητή, με όφελος διπλό. Την ελαχιστοποίηση της φθοράς στους περιβάλλοντες του όγκου υγείς ιστούς, άρα τη διατήρηση της λειτουργικότητας του αδένα, και την ελαχιστοποίηση της παραμένουσας φωτοευαισθησίας.

9.2

Ενσωμάτωση φωτοευαισθητοποιητών σε λιποσώματα - Χαρακτηριστικά

9.2.1

Φωτοφυσικές ιδιότητες

Από τις φασματοφωτομετρικές μελέτες απορρόφησης κατέστη φανερό πως το φάσμα απορρόφησης της ελεύθερης m-THPC επηρεάζεται ισχυρά από το διαλύτη στον οποίο διαλύεται. Σε κάθε διαλύτη εκτός της αιθανόλης, το μέγιστο απορρόφησης παρουσίασε σημαντική μείωση σε σχέση με το μέγιστο απορρόφησης όταν διαλύτης ήταν η αιθανόλη. Η μείωση αυτή στο μέγιστο απορρόφησης είναι συνέπεια της συσσωμάτωσης των μορίων της m-THPC σε υδατικά μέσα. Η συμπεριφορά αυτή δεν απαντήθηκε εγκλεισμένη λιποσωματική m-THPC. Το φάσμα και το μέγιστο απορρόφησης της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC είναι το ίδιο, ανεξαρτήτως διαλύτη και προσεγγίζει αυτό της ελεύθερης m-THPC σε αιθανόλη.

Διερευνήθηκε αν ο εγκλεισμός σε λιποσώματα αποτρέπει τη συσσωμάτωση των μορίων της m-THPC, συγκρίνοντας τα φάσματα απορρόφησης στους διαφορετικούς διαλύτες. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε μείωση του μέγιστου απορρόφησης της, όταν χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το εμπλουτισμένο με 10% FBS θρεπτικό μέσο σε σχέση με οργανικό διαλύτη (αιθανόλη). Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει πως η ενθυλάκωση τα λιποσώματα εμπόδισε την συσσωμάτωση των μορίων της m-THPC. Σε μια εργασία τους οι Belitchenko I. et al^[146] έδειξαν πως το μέγιστο απορρόφησης της m-THPC μειώθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε PBS με FBS ως διαλύτης, σε σχέση με την περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε οργανικός διαλύτης (μεθανόλη). Τα ευρήματά τους ήταν αποδεικτικά της συσσωμάτωσης των μορίων της m-THPC σε υδατικά μέσα. Στην παρούσα εργασία αποδείχθηκε ότι **ο εγκλεισμός της m-THPC σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα διατήρησε τα φωτοφυσικά χαρακτηριστικά της m-THPC και σε υδατικό διαλύτη. Συνεπώς τα μόρια που φωτοευαισθητοποιητή παραμένουν σε μονομερή μορφή άρα διατηρείται η κβαντική απόδοση και η φωτοδυναμική ικανότητα της m-THPC**^[153].

9.2.2

Ενδοκυττάρια χωρική κατανομή

Συγκρίνοντας τις εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας, στις οποίες αποτυπώθηκε η ενδοκυττάρια χωρική κατανομή της ελεύθερης και της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά

σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC με αντίστοιχες μελέτες άλλων ερευνητικών ομάδων, παρατηρήθηκε πως το μοτίβο ενδοκυττάριας χωρικής κατανομής ήταν ουσιαστικά πανομοιότυπο. Καταγράφηκε διάχυτος φθορισμός στο κυτταρόπλασμα, με προτίμηση (εκεί δηλαδή παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ένταση φθορισμού άρα και συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιητή) στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα. Η περιοχή γύρω από τον πυρήνα περιέχει τα σημεία στα οποία κυρίως εντοπίζονται το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύστημα Golgi. Οι Yow et al^[154] παρατήρησαν πως τα μιτοχόνδρια ήταν το υποκυττάριο σημείο εντοπισμού της m-THPC σε ρινοφαρυγγικά καρκινικά κύτταρα, μετά από επώαση 24 h. Οι Teiten et al^[52] ανέφεραν πως η m-THPC σε κύτταρα αδenoκαρκινώματος MCF-7, μετά από επώαση 3 h, συγκεντρώθηκε κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύστημα Golgi, ενώ η συγκέντρωσή της στα λυσοσώματα και τα μιτοχόνδρια ήταν εξαιρετικά ασθενής. Τα αποτελέσματα αυτά σε πρώτη ανάγνωση φαντάζουν αντιφατικά. Ωστόσο αφορούν διαφορετικούς χρόνους επώασης με την m-THPC και είναι δεδομένο πως με αύξηση του χρόνου επώασης αλλάζει το ενδοκυττάριο σημείο συγκέντρωσης της m-THPC. Άλλη μελέτη κατέγραψε με ακρίβεια τη συμπεριφορά αυτή. Οι Marcal et al^[155] έδειξαν, με μελέτες συνεστιακής μικροσκοπίας, πως το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύστημα Golgi ήταν τα ενδοκυττάρια οργανίδια στα οποία συγκεντρώθηκε η m-THPC σε κύτταρα MCF-7 μετά από επώαση 3 h. Με αύξηση του χρόνου επώασης η m-THPC απομακρύνθηκε από το σύστημα Golgi για να καταλήξει μετά από επώαση 24 h στο ενδοπλασματικό δίκτυο κυρίως, και σε μικρότερο ποσοστό στα μιτοχόνδρια.

Πρόσφατες μελέτες διερεύνησης διαφορών ανάμεσα στην ενδοκυττάρια χωρική κατανομή της ελεύθερης και της εγκλεισμένης σε συμβατικά λιποσώματα m-THPC τόσο σε κύτταρα HeLa, Lassalle HP et al^[47], όσο και σε καρκινικά κύτταρα χοληδόχου κύστης (GBC) και χοληφόρου οδού (BDC), Keisslich T et al^[156] έδειξαν πως και τα δυο σκευάσματα m-THPC κατανεμήθηκαν με τον ίδιο τρόπο στον ενδοκυττάριο χώρο.

Η ενδοκυττάρια χωρική κατανομή της ελεύθερης αλλά και της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC, στην καρκινική σειρά κυττάρων του προστάτη LNCaP, όπως καταγράφηκε με τις μελέτες συνεστιακής μικροσκοπίας στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, δε διαφέρει, τοπογραφικά, από την κατανομή της m-THPC όπως αυτή έχει παρατηρηθεί και σε άλλες κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων. **Φαίνεται πως ενδοκυττάρια η m-THPC εντοπίζεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο και δευτερευόντως στα μιτοχόνδρια στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη LNCaP, μετά από 24 h επώασης, ανεξαρτήτως σκευάσματος.**

Επιπροσθέτως, ο τρόπος με τον οποίο οι φωτοευαισθητοποιητές εισέρχονται στα κύτταρα καθώς και η παρατηρούμενη διαφορά στην ένταση φθορισμού, συνηγορούν στην

ορθότητα του προηγούμενου συμπεράσματος. Η ένταση φθορισμού, όπως αυτή μετρήθηκε με φασματοσκοπία φθορισμού αλλά παρατηρήθηκε και στις εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας (κυρίως στην περίπτωση κατά την οποία τα κύτταρα επώαστηκαν με $1.8 \mu M$), ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στην περίπτωση της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC. Η m-THPC είναι εξαιρετικά υδρόφοβο μόριο το οποίο συσσωματώνεται ισχυρά σε υδατικά μέσα. Τα συσσωματώματα όπως και τα λιποσώματα εισέρχονται στο κύτταρο κυρίως μέσω ενδοκύττωσης. Τελικός στόχος του μηχανισμού της ενδοκύττωσης είναι το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύστημα Golgi. Στο μηχανισμό αυτό αποδίδεται η συγκέντρωση της m-THPC στα συγκεκριμένα οργανίδια. Η διαφορά στη μετρηθείσα και παρατηρηθείσα ένταση φθορισμού ήταν ενδεικτική της συσσωμάτωσης των μορίων της ελεύθερης m-THPC. Τα λιποσώματα διατηρούν μονομερή την m-THPC και κατά την εισαγωγή της στο κύτταρο όπου και αποδομούνται από τα λυσοσωμάτια και απελευθερώνουν μονομερή μόρια της m-THPC τα οποία καταλήγουν στα κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο και σύστημα Golgi και δευτερευόντως στα μιτοχόνδρια διατηρώντας στο ακέραιο τις φωτοδυναμικές ιδιότητες του φωτοευαισθητοποιητή^[21-23].

9.2.3

Φωτοδυναμική δράση

Από τις μελέτες φωτοδυναμικής δράσης της συμβατικής και της νανοσωματιδιακής m-THPC, σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις και διέγερση με τρεις διαφορετικές δόσεις ενέργειας, προέκυψε η συντριπτική υπεροχή της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC στο να προκαλέσει μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα σε σχέση με την ελεύθερη, στις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Είναι χαρακτηριστικό πως χρειάστηκαν μόλις $0.22 \mu M$ λιποσωματικής m-THPC και η χαμηλότερη δόση ενέργειας, $180 mJ/cm^2$, για να νεκρωθεί το 50 % των κυττάρων 24 h μετά τη φωτοδυναμική. Στην περίπτωση της ελεύθερης, τα ίδια ποσοστά κυτταρικού θανάτου επετεύχθησαν με οκταπλάσια συγκέντρωση m-THPC. Σε κάθε συγκέντρωση επώασης, ανεξαρτήτως δόσης ενέργειας τα ποσοστά κυτταρικού θανάτου με την εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC ήταν σαφώς μεγαλύτερα σε σχέση με τα αντίστοιχα της ελεύθερης.

Ο εγκλεισμός της m-THPC σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα είναι εξέλιξη των τελευταίων λίγων χρόνων στην κατεύθυνση της βελτιστοποίησης των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων της και επομένως δεν είναι διαθέσιμες στη βιβλιογραφία πολλές μελέτες σχετικές με τη δράση της. Σε πρόσφατη μελέτη τους οι Berlanda J et al^[157] συνέκριναν ως προς τη φωτοδυναμική δράση διαφορετικούς φωτοευαισθητοποιητές,

ανάμεσα στους οποίους και τα δύο σκευάσματα της m-THPC, στο ίδιο μοντέλο κυττάρων. Χορήγησαν, σε επιδερμικά καρκινικά κύτταρα A431, 0.4 μM ελεύθερης και εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC, 20 h πριν την ακτινοβόληση με διοδικό laser στα 660 nm, ισχύ ακτινοβόλησης 2.33 mW/cm^2 και δόσεις ενέργειας 0.07 – 1.5 J/cm^2 . Ένας δεύτερος έλεγχος αφορούσε σταθερή δόση ενέργειας 1.5 J/cm^2 και διάφορες συγκεντρώσεις m-THPC, 0 – 1 μM . Σε όλους τους ελέγχους 24 h μετά την ακτινοβόληση έγινε η μέτρηση βιωσιμότητας με τον βιοχημικό έλεγχο MTT. Σε κάθε περίπτωση η ελεύθερη m-THPC επέφερε μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας σε σχέση με την εγκλεισμένη λιποσωματική. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της έρευνας η οποία διεξήχθη στα πλαίσια της παρούσας διατριβής όπου σε κάθε πειραματική συνθήκη η υπεροχή της εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC ήταν αδιαμφισβήτητη έναντι της ελεύθερης. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει τη διαφορετική συμπεριφορά των φωτοευαισθητοποιητών ανάλογα με το βιολογικό σύστημα στο οποίο εφαρμόζονται και την εξάρτηση της φωτοδυναμικής δράσης από το βιολογικό στόχο. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής μόλις 0.22 μM ελεύθερης και εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC άρκεσαν για να νεκρωθεί το 40% και το 50% των κυττάρων, αντίστοιχα, 24 h μετά την ακτινοβόληση με δόση ενέργειας 180 mJ/cm^2 . Στην προαναφερθείσα εργασία για την ίδια δόση ενέργειας χρειάστηκε η διπλάσια ποσότητα φωτοευαισθητοποιητή για να επιτευχθεί νέκρωση του 60% των κυττάρων στην περίπτωση της ελεύθερης και του 30% στην περίπτωση της εγκλεισμένης λιποσωματικής m-THPC.

Ο εγκλεισμός της m-THPC σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα αύξησε την ενδοκυττάρια συγκέντρωση και ενίσχυσε τη φωτοδυναμική δράση της m-THPC στην καρκινική σειρά κυττάρων του προστάτη LNCaP. Μικρότερη συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιητή απαιτήθηκε για να επιτευχθεί ικανοποιητική φωτοδυναμική νέκρωση του καρκινικού στόχου.

9.3

Μελέτες Ενδοϊστικής Φωτοδυναμικής Θεραπείας στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη

Ο κύριος στόχος ο οποίος τέθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την επέκταση της φωτοδυναμικής δράσης σε καρκινικούς όγκους τριών διαστάσεων εν τω βάθει και η ανάπτυξη μεθοδολογίας εφαρμογής της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας. Ο καρκίνος του προστάτη έχει όλες τις απαραίτητες προδιαγραφές προκειμένου να ελεγχθεί η θεραπευτική ικανότητα της

ενδοϊστικής ακτινοβολήσης κατά τη φωτοδυναμική. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκε μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη. Ως φωτοευαισθητοποιητής χρησιμοποιήθηκε η εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC, 0.3 mg/kg , δεδομένης της υπερέχουσας φωτοδυναμικής δράσης που παρουσίασε στο κυτταρικό μοντέλο. Διερευνήθηκαν τρεις διαφορετικές δόσεις ενέργειας ως προς την ικανότητά τους να προκαλέσουν φωτοδυναμική δράση επαρκή για τη θεραπεία του καρκινικού όγκου.

Φωτοδυναμική θεραπεία με δόση ενέργειας 10 J απεδείχθη **ανεπαρκής** στο να προκαλέσει θεραπευτική δράση. Οι ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά οξυγονούχα είδη, προϊόντα των φωτοχημικών αντιδράσεων τύπου I και II της φωτοδυναμικής έδρασαν ενισχυτικά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, δημιουργώντας συνθήκες που ευνοούσαν ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα και ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες από ότι τα αντίστοιχα υγιή. Επιπλέον, είναι γνωστό πως το χαμηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες μπορεί να ενεργοποιήσουν είτε μηχανισμούς επιβίωσης είτε να προκαλέσουν αύξηση των ρυθμών κυτταρικού πολλαπλασιασμού^[81, 158]. Εν προκειμένω η ενδοϊστική φωτοδυναμική ακτινοβολήση με δόση ενέργειας 10 J επέφερε αποτελέσματα τα οποία μοιάζουν σε ήπιο οξειδωτικό στρες.

Ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με δόση ενέργειας 15 J ήταν το **βέλτιστο θεραπευτικό σχήμα** καθώς επέτυχε μέση μείωση του μεγέθους του όγκου κατά περίπου 70% και **πλήρη ίαση** στο 67% των μυών που δέχτηκαν τη θεραπεία. Αξιοσημείωτη παρατήρηση η μη επανεμφάνιση όγκου δύο μήνες μετά τη θεραπεία, όσο δηλαδή διήρκεσε η παρακολούθηση. Η δόση ενέργειας 15 J προκάλεσε διέγερση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή και επακόλουθη δημιουργία ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών ικανή να ενεργοποιήσει κυτταροτοξικές αντιδράσεις καταστροφής του καρκινικού όγκου. Φαίνεται πως οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας δεν κατάφεραν να υπερκεράσουν το επαγόμενο από τη φωτοδυναμική οξειδωτικό στρες με συνέπεια αυτό να ενεργοποιήσει μηχανισμούς νέκρωσης του καρκινικού όγκου.

Το αποτέλεσμα αυτό είναι ιδιαιτέρως σημαντικό καθώς στη βιβλιογραφία δεν απαντώνται περιπτώσεις πλήρους ίασης, αναφέρονται μόνο ποσοστά νέκρωσης του όγκου, τα οποία εκτιμώνται με ιστοπαθολογική εξέταση τομών του όγκου 24 h μετά τη θεραπεία, θυσιάζοντας το πειραματόζωο. Καθώς τόσο ο εγκλεισμός σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα φωτοευαισθητοποιητών όσο και η ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία είναι πρόσφατες επιστημονικές εξελίξεις, τα δεδομένα της βιβλιογραφίας σχετικά με τη συνδυασμένη δράση τους είναι ελάχιστα. Οι Bovis MJ et al^[159] σε μελέτη τους εφάρμοσαν ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με 0.05 mg/kg και

0.3 mg/kg εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC σε καρκινικούς όγκους ίνωσης σε μοντέλο αρουραίου. Οπτική ίνα με γυμνό ακροδέκτη μετέφερε την ακτινοβολία διοδικού laser στα 652 nm μέσα στον καρκινικό όγκο, με δόσεις ενέργειας 2 J ή 10 J. Οι μύες θυσιάστηκαν 24 h μετά τη φωτοδυναμική και εξετάστηκαν τομές των όγκων ιστοπαθολογικά, για να προσδιοριστούν τα ποσοστά νέκρωσης. Τα μεγαλύτερα ποσοστά νέκρωσης του καρκινικού όγκου επετεύχθησαν όταν χρησιμοποιήθηκαν η μικρότερη συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιητή και η μεγαλύτερη δόση ενέργειας. Δεν μπορούν να συγκριθούν ωστόσο με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής καθώς στη μια περίπτωση προσδιορίζεται ιστοπαθολογικά το ποσοστό νέκρωσης μια ημέρα μετά τη θεραπεία, ενώ στην έρευνα που διεξήχθη στα πλαίσια της διατριβής καταγράφηκε το ποσοστό αλλαγής του μεγέθους του όγκου ως προς το χρόνο μετά τη θεραπεία, παρακολούθηση η οποία διήρκησε σχεδόν ένα μήνα.

Η νέκρωση του καρκινικού όγκου μετά από την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με δόση ενέργειας 15 J πιθανότατα οφείλεται σε συνδυασμό μηχανισμών άμεσης νέκρωσης των καρκινικών κυττάρων αλλά και ρήξης του αγγειακού συστήματος τροφοδοσίας του όγκου και επακόλουθης υποξίας. Όπως προέκυψε από τις μελέτες φωτοφυσικών και φωτοδυναμικών ιδιοτήτων, ο εγκλεισμός λιποσώματα αύξησε την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της m-THPC. Άρα περισσότερα μόρια διεγείρονται παράγοντας ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη, αυξάνοντας περαιτέρω τα επίπεδα ενδοκυττάρια οξειδωτικού στρες ενεργοποιώντας μη αναστρέψιμους, από την ενδοκυττάρια αντιοξειδωτική άμυνα, μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου. Επιπλέον, ο εγκλεισμός σε λιποσώματα παρατείνει την παρουσία του φωτοευαισθητοποιητή στην κυκλοφορία του αίματος, άρα και στο πυκνό δίκτυο αιμοφόρων αγγείων το οποίο περιβάλλει και τροφοδοτεί τον καρκινικό όγκο. Κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης διεγείρονται και τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή στο αγγειακό δίκτυο προκαλώντας ρήξη αυτών και επακόλουθη υποξία^[35, 65, 149, 159].

Ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με δόση ενέργειας 30 J, τη μεγαλύτερη δόση ενέργειας η οποία εφαρμόστηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, δεν προκάλεσε θεραπεία του καρκινικού όγκου στο μοντέλο μύος καρκίνου του προστάτη, περιόρισε όμως την ανάπτυξη του όγκου. Η ανεπάρκεια της μεγαλύτερης δόσης ενέργειας στο να προκαλέσει το ίδιο θεραπευτικό αποτέλεσμα με την μικρότερη έχει αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία. Οι Foster TH et al^[160] ανέφεραν πως κατά τη φωτοδυναμική με μεγάλη δόση ενέργειας είναι δυνατό τμήμα του υπό θεραπεία όγκου να οδηγηθεί σε συνθήκες χαμηλού οξυγόνου προστατεύοντας τα καρκινικά κύτταρα από την καταστροφή μέσω μονήρους οξυγόνου. Στην ίδια κατεύθυνση οι Henderson BW et al^[161] ανέφεραν πως οι μεγάλες δόσεις ενέργειας αδυνατούσαν να μειώσουν τον καρκινικό όγκο, οι μικρές δόσεις ενέργειας

ωστόσο ήταν αποτελεσματικές στο να ελέγξουν την αύξηση του όγκου και απέδωσαν τη συμπεριφορά αυτή στη μείωση των επιπέδων οξυγόνου κατά τις μεγάλες δόσεις ενέργειας. Επιπροσθέτως, υπάρχουν αναφορές πως τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή φωτοκαταστρέφονταν καθώς αυξανόταν ο χρόνος ακτινοβολήσης. Οι ερευνητές διατηρώντας σταθερή την ισχύ ακτινοβολήσης κατέγραψαν αύξηση της φωτοκαταστροφής των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή με αύξηση του χρόνου ακτινοβολήσης^[162, 163]. Στην ίδια κατεύθυνση, έχει επισημανθεί ο υψηλός βαθμός φωτοκαταστροφής της m-THPC, ο οποίος έχει παρατηρηθεί τόσο με μελέτες σε επίπεδο κυττάρου αλλά και σε κλινικές δοκιμές^[146]. Η αδυναμία της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας με δόση ενέργειας 30 J, θα μπορούσε ενδεχομένως να αποδοθεί και σε φωτοκαταστροφή της m-THPC κατά την ακτινοβολήση με χρόνο διπλάσιο από αυτόν ο οποίος εφαρμόστηκε στη φωτοδυναμική με δόση ενέργειας 15 J.

*Τα αποτελέσματα της έρευνας τα πλαίσια της διατριβής είναι ιδιαίτερος σημαντικά καθώς για πρώτη φορά αναφέρεται **πλήρης ίαση** καρκινικού όγκου του προστάτη σε μοντέλο μυός μετά από ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με την εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC. Η αξία των αποτελεσμάτων ενισχύεται από το γεγονός ότι **δεν παρατηρήθηκε επανεμφάνιση του όγκου** για διάστημα δυο μηνών μετά τη θεραπεία και από την **πλήρη αισθητική και λειτουργική αποκατάσταση** του δέρματος στην περιοχή του όγκου.*

9.4

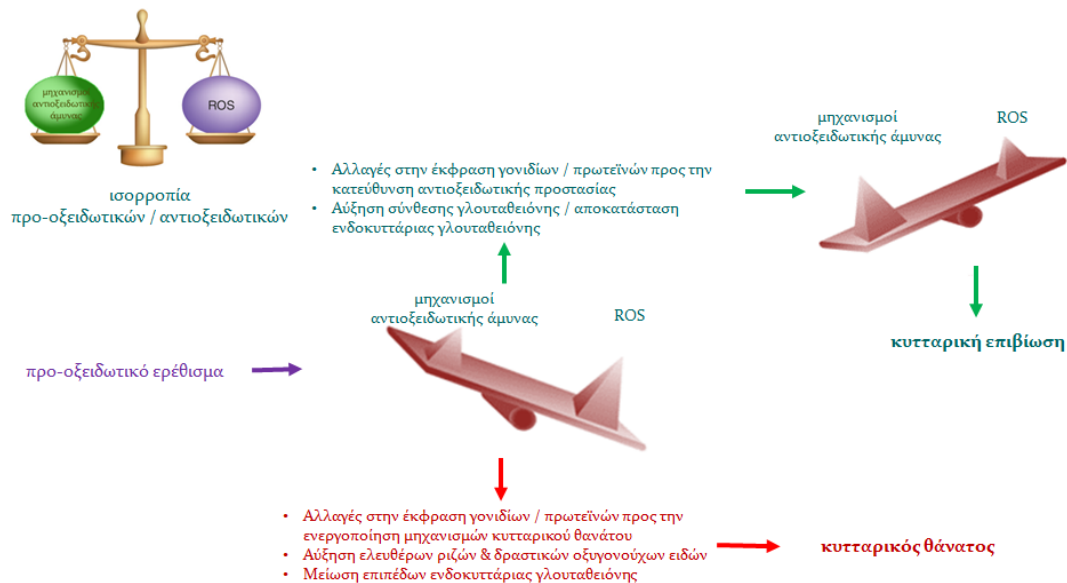
Μελέτες συνδυασμού φωτοδυναμικής δράσης με τον αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης.

Αίτημα κεντρικό, το οποίο τέθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, ήταν η βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής δράσης. Η φωτοδυναμική θεραπεία προκαλεί την καταστροφή του καρκινικού ιστού μέσω μιας αλληλουχίας ενδοκυττάρων αντιδράσεων ενεργοποίησης μηχανισμών κυτταρικού θανάτου. Οι αντιδράσεις αυτές ενεργοποιούνται από τις ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά οξυγονούχα είδη, προϊόντα της αλληλεπίδρασης των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή με το περιβάλλον του κατόπιν απορρόφησης ενέργειας κατά τη φωτοδυναμική^[7]. Τη δράση των ελευθέρων ριζών και των δραστικών οξυγονούχων ειδών ανταγωνίζονται ενδοκυττάριοι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας, οι οποίοι τείνουν να επαναφέρουν την ισορροπία προ-οξειδωτικών / αντιοξειδωτικών

μηχανισμών, προκειμένου το κύτταρο να διαφυλάξει την ακεραιότητά του και να αποτραπεί ο κυτταρικός θάνατος. Εάν ωστόσο το οξειδωτικό στρες υπερβεί ένα κρίσιμο κατώφλι, τότε οι ενδοκυττάριοι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί αδυνατούν να το εξισορροπήσουν και ο κυτταρικός θάνατος είναι πλέον αναπόφευκτος^[20, 80, 91].

Αυτή η εγγενής αντίδραση του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες, η άμεση δηλαδή ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών μηχανισμών, έχει ως αποτέλεσμα η δράση της φωτοδυναμικής, η οποία βασίζεται στις ελεύθερες ρίζες και στα δραστικά οξυγονούχα είδη, να συναντά αυξημένη αντίσταση. Οι ενδοκυττάριοι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής προστασίας ανταγωνίζονται τη φωτοδυναμική, μειώνοντας ή / και ακυρώνοντας τη δράση της. Βέβαια, σε αρκετές θεραπευτικές προσεγγίσεις προκειμένου να «θανατωθούν» τα καρκινικά κύτταρα απαιτούνται υψηλά επίπεδα ελευθέρων ριζών στο κύτταρο, ώστε να υπερβούν το κατώφλι που απαιτείται για τη θανάτωση. Επομένως σημαντική είναι η τελική συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών που εξαρτάται από την ισορροπία των ενδογενών ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών, των ROS που παράγονται από τη θεραπεία και της ικανότητας των καρκινικών κυττάρων να ανταγωνίζονται τους οξειδωτικούς μηχανισμούς. Πρόσφατα καλλιεργείται η ιδέα της καταστολής της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας με στόχο τη μείωση της αντίστασης απέναντι στη φωτοδυναμική δράση και απώτερο στόχο τη βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής θεραπείας^[36, 37].

Μια ενδιαφέρουσα τακτική στην κατεύθυνση καταστολής της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας, η οποία ήδη έχει δοκιμαστεί και σε άλλες αντικαρκινικές θεραπείες οι οποίες δρουν μέσω ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών, είναι η μείωση των ενδοκυττάριας επιπέδων γλουταθειόνης μέσω του εξειδικευμένου αναστολέα της βιοσύνθεσής της, της χημικής ένωσης L-βουτυλοθειονίνη-S,R-σουλφοξιμίνη (L-buthionine-S,R-sulfoximine, BSO)^[80, 164]. Η υπόθεση αυτή ελέγχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής. Συγκεκριμένα, **στόχο της έρευνας αποτέλεσε η διερεύνηση της πιθανότητας ενίσχυσης της φωτοδυναμικής δράσης, μέσω του συνδυασμού της με τον εξειδικευμένο αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης, BSO, ως προς την επαγωγή κυτταρικού θανάτου διαμεσολαβούμενου μέσω μηχανισμού ελευθέρων ριζών / φωτοδυναμικής.**

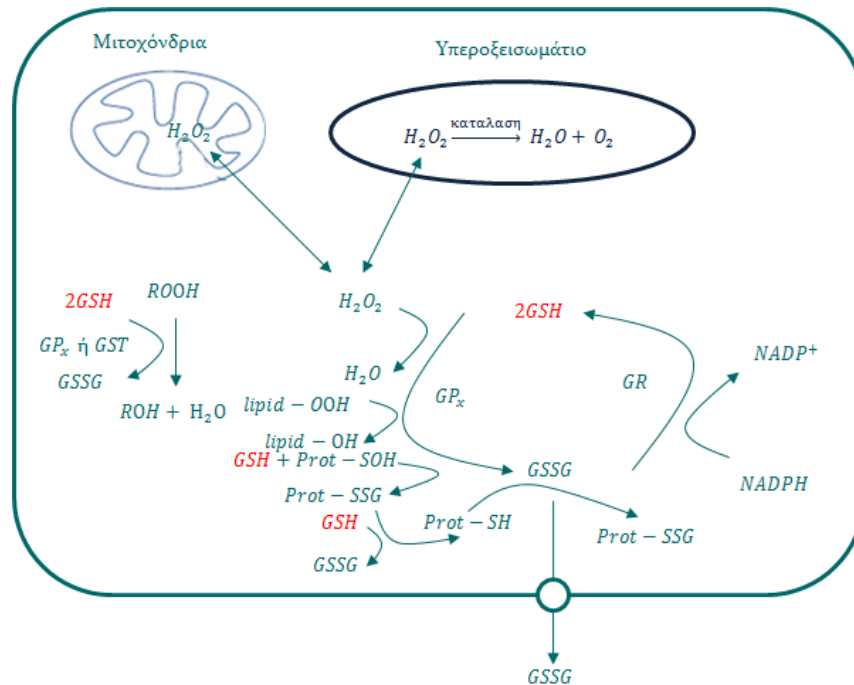


Σχήμα 9.1: *Ενδοκυττάρια η οξειδοαναγωγική ισορροπία διατηρείται καθώς οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί εξισορροπούν τη δράση των προ-οξειδωτικών. Διάφορα προ-οξειδωτικά ερεθίσματα μπορούν να επηρεάσουν τη δυναμική αυτή ισορροπία. Εάν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας δεν κατορθώσουν να υπερκεράσουν το οξειδωτικό ερέθισμα τότε ενεργοποιούνται μη αναστρέψιμοι μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου. Στην αντίθεση περίπτωση, κατά την οποία η αντιοξειδωτική άμυνα ελέγχει το οξειδωτικό ερέθισμα, η κυτταρική βιωσιμότητα διατηρείται^[80].*

Το σύστημα της γλουταθειόνης είναι ο κυριότερος ενδοκυττάριος μη-ενζυμικός μηχανισμός αντιοξειδωτικής άμυνας. Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο το οποίο απαντάται σε όλα τα ευκαριωτικά κύτταρα σε συγκεντρώσεις 1 – 10 mM. Τα κύτταρα διαθέτουν τρεις διακριτές αποθήκες γλουταθειόνης, η μεγαλύτερη εκ των οποίων απαντάται στο κυτοσόλιο (80 – 85%), η δεύτερη στα μιτοχόνδρια (10 – 15%) ενώ η μικρότερη εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο^[165]. Η γλουταθειόνη στα κύτταρα απαντάται σε δυο μορφές, ως θειόλη σε αναγωγή (γλουταθειόνη GSH) και ως οξειδωμένο δισουλφίδιο (GSSG) το οποίο αποτελεί περίπου το 1 – 2% της συνολικής γλουταθειόνης^[100, 165].

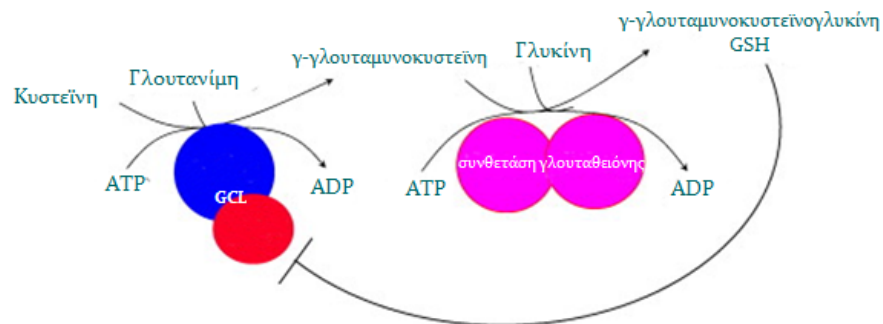
Η κύρια δράση της γλουταθειόνης είναι η διατήρηση της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, η ρύθμιση διαφόρων μηχανισμών σηματοδότησης, οι οποίοι μεταξύ άλλων ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Η γλουταθειόνη εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες και ανακυκλώνεται (Σχήμα 9.2) για να συνεχίσει την αντιοξειδωτική της δράση. Λόγω της χημικής δομής της, έχει ισχυρή τάση να προσφέρει ηλεκτρόνιο σε ελεύθερες ρίζες, κυρίως στο μονήρες οξυγόνο και σε λιπιδικές υπεροξειδάσες. Η δραστική μορφή γλουταθειόνης, η οποία προκύπτει μετά την απόδοση

ηλεκτρονίου σε ελεύθερη ρίζα, ενώνεται με μια δεύτερη δραστική μορφή γλουταθειόνης με δισουλφιδικό δεσμό, σχηματίζοντας το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG. Από αυτό, μέσω αντίδρασής του με το συνένζυμο NADPH προκύπτει και πάλι η γλουταθειόνη. Για να διατηρεί την αντιοξειδωτική του άμυνα το κύτταρο είτε συνθέτει γλουταθειόνη από πρόδρομα αμινοξέα (γλουταμίνη, κυστεΐνη, γλυκίνη), είτε ανάγει την GSSG μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης, ή προσλαμβάνει γλουταθειόνη από εξωτερικές πηγές, διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης^[102, 104].



Σχήμα 9.2: Αντιοξειδωτική δράση γλουταθειόνης. Κατά τον αερόβιο μεταβολισμό παράγεται υπεροξειδίο του υδρογόνου H₂O₂ το οποίο μεταβολίζεται από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) στο κυτταρόσολιο και στα μιτοχόνδρια, και από την καταλάση στο υπεροξεισωμάτιο. Το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG, μπορεί να αναχθεί σε γλουταθειόνη μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR) καταναλώνοντας NADPH, σχηματίζοντας έτσι έναν οξειδοαναγωγικό κύκλο. Οργανικές υπεροξειδάσες (ROOH) ανάγονται είτε από την GPx είτε από την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Η γλουταθειόνη παίζει σημαντικό ρόλο στην οξειδοαναγωγική σηματοδότηση πρωτεϊνών. Η ικανότητα του κυττάρου να ανάγει GSSG σε GSH μπορεί να μειωθεί κατά τη διάρκεια ισχυρού οξειδωτικού στρες οδηγώντας σε αύξηση της συγκέντρωσης GSSG. Για να αποτραπεί αυτή η μετατόπιση στην οξειδοαναγωγική ισορροπία, η GSSG μπορεί είτε να μεταφερθεί εκτός κυττάρου είτε να αντιδράσει με δισουλφίδια πρωτεϊνών (protein sulfhydryl, Prot-SH) σχηματίζοντας μεικτά δισουλφίδια (Prot-SG)^[165].

Το σύστημα της γλουταθειόνης θεωρείται ο σημαντικότερος ενδοκυττάριος μηχανισμός αντιοξειδωτικής άμυνας από προ-οξειδωτικά ερεθίσματα. Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάριας γλουταθειόνης σε σχέση με τα αντίστοιχά τους υγιή. Αυτή δε η αυξημένη παρουσία γλουταθειόνης στα καρκινικά κύτταρα θεωρείται υπεύθυνη για την ιδιαίτερη αντίσταση που αυτά παρουσιάζουν στις αντικαρκινικές θεραπείες. Η σύνθεση της γλουταθειόνης λαμβάνει χώρα αποκλειστικά και μόνο στο κυτοσόλιο μέσω μιας διαδικασίας δυο σταδίων (Σχήμα 9.3). Στο πρώτο στάδιο της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης η κυστεΐνη ενώνεται με τη γλουταμίνη μέσω αντίδρασης τη οποία καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση της γ-γλουταμιλο-κυστεΐνης^[100, 102, 165]. Η δέσμευση του ενζύμου αυτού εμποδίζει τη σύνθεση της γλουταθειόνης και θεωρείται ως ο αποτελεσματικότερος μηχανισμός μείωσης των ενδοκυττάριας επιπέδων της γλουταθειόνης. Καθώς δεν συνθέτεται καινούργια γλουταθειόνη, η μείωση των επιπέδων της επέρχεται καθώς καταναλώνονται τα ενδοκυττάρια αποθέματα αυτής στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών. Για την ευαισθητοποίηση των κυττάρων στις αντικαρκινικές θεραπείες έχει χρησιμοποιηθεί ο εξειδικευμένος αναστολέας της γ-γλουταμιλο-κυστεΐνης, του ενζύμου το οποίο καταλύει το πρώτο στάδιο της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης, η χημική ένωση L-βουτυλοθειονίνη-S,R-σουλφοξιμίνη (L-buthionine-S,R-sulfoximine, BSO^[80, 103, 166]).



Σχήμα 9.3: Μηχανισμός σύνθεσης της γλουταθειόνης. Η σύνθεση της γλουταθειόνης είναι αποτέλεσμα μιας διαδικασίας δυο σταδίων, τα οποία καταλύονται ενζυματικά και καταναλώνεται ενέργεια ATP. Το πρώτο στάδιο καταλύεται από τη συνθετάση της γλουταμινο-κυστεΐνης (glutamate-cysteine ligase, GCL), η οποία συνίσταται από μια καταλυτική (catalytic, GCLC) και μια τροποποιητική (modifier, GCLM) υπομονάδα και συζευγνύεται η κυστεΐνη με τη γλουταμίνη δημιουργώντας την γ-γλουταμινοκυστεΐνη. Το δεύτερο στάδιο καταλύεται από τη συνθετάση της γλουταθειόνης, η οποία προσθέτει γλυκίνη στην γ-γλουταμινοκυστεΐνη, σχηματίζοντας με τον τρόπο αυτό τη γ-γλουταμινοκυστεΐνογλυκίνη ή γλουταθειόνη^[165].

Ο αναστολέας της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης BSO προκαλεί μείωση των επιπέδων της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης, αύξηση των ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών, απορύθμιση της δράσης και των επιπέδων των ενδοκυττάρων αντιοξειδωτικών ενζύμων (υπεροξειδίου της δισμουτάσης, καταλάση) και ενεργοποιεί αποπτωτικούς μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου οδηγώντας σε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Ο παράγοντας BSO δηλαδή προκαλεί μείωση των επιπέδων της γλουταθειόνης αλλά και απόπτωση. Μελέτες έχουν δείξει πως η χορήγηση του παράγοντα BSO αυξάνει την κυτταροτοξικότητα αντικαρκινικών θεραπειών, κυρίως της χημειοθεραπείας, είτε λόγω απορύθμισης της αντιοξειδωτικής άμυνας είτε λόγω ενεργοποίησης μη αναστρέψιμων αποπτωτικών μηχανισμών κυτταρικού θανάτου^[103, 106]

Πέραν της συνέργειας του αναστολέα της σύνθεσης της γλουταθειόνης με τις αντικαρκινικές θεραπείες υπάρχουν αναφορές στις οποίες επισημαίνεται πως μπορεί να έχει ανεπιθύμητες παρενέργειες στους υγιείς ιστούς περιορίζοντας ενδεχομένως τη δυναμική της τακτικής αυτής για συνέργεια με αντικαρκινικές θεραπείες^[80]. Στην κατεύθυνση αυτή έχει αναφερθεί πως η μείωση της γλουταθειόνης φαίνεται να έχει αποτελέσματα μόνο όταν επιτυγχάνονται πολύ χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων^[80]. Επιπλέον, μερικά είδη καρκινικών κυττάρων παρουσιάζουν ιδιαίτερη αντίσταση στη δράση του παράγοντα BSO, αυξάνοντας την έκφραση διαφόρων ενδοκυττάρων μηχανισμών προάσπισης της κυτταρικής βιωσιμότητας, όπως είναι οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας πρωτεϊνών *Bcl - 2* καθώς και ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός ο οποίος συνδέεται με τον μεταγραφικό παράγοντα *Nrf2*, έναν ισχυρότατο παράγοντα έναντι του οξειδωτικού στρες^[167-169]. Αναφέρεται πως η δράση του αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης εξαρτάται από το είδος του κυττάρου και από τη συγκέντρωση χορήγησής του^[109, 167].

Στην παρούσα διατριβή ελέγχθηκε κατά πόσο χορήγηση του παράγοντα BSO θα μπορούσε να βελτιστοποιήσει τη φωτοδυναμική θεραπεία. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε εάν η χορήγηση του αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης θα μπορούσε να αυξήσει τα ενδοκυττάρια επίπεδα ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών πέραν του κατωφλίου εκείνου όπου οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας ανταγωνίζονται τη φωτοδυναμική δράση, ενισχύοντας τον φωτοδυναμικά επαγόμενο κυτταρικό θάνατο. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η φωτοδυναμική δράση ($0.22\mu M$ m-THPC, δόση ενέργειας $180 mJ/cm^2$) μέσω της μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας και του επαγομένου αυτής οξειδωτικού στρες, στο κυτταρικό μοντέλο καρκινικών κυττάρων του προστάτη LNCaP, σε συνδυασμό με τη χορήγηση του αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης. Αναλυτικά τα συμπεράσματα των μελετών αναφέρονται στη συνέχεια.

Το ενδεχόμενο συνέργειας της φωτοδυναμικής θεραπείας με τον εξειδικευμένο αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης έχει διερευνηθεί, αν και όχι εκτεταμένα, τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και σε επίπεδο οργανισμού. Οι Jiang F. et al^[107] ανέφεραν πως σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος (*U87* και *U251n*) η φωτοδυναμική, σε συνδυασμό με τον αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης, προκάλεσε μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα σε σχέση με τη φωτοδυναμική μόνη της. Ως φωτοευαισθητοποιητής στη μελέτη αυτή είχε χρησιμοποιηθεί η Photofrin. Οι συγκεντρώσεις BSO κυμαίνονταν από $2 \mu\text{M}$ έως $450 \mu\text{M}$, η συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιητή ($5 \mu\text{g/ml}$) όπως και η δόση ενέργειας (100 mJ/cm^2) διατηρήθηκαν σταθερές σε όλες τις επιμέρους μελέτες. Η επαγόμενη κυτταροτοξικότητα ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης του BSO και σε κάθε περίπτωση μεγαλύτερη της αντίστοιχης απουσίας αυτού.

Σε μια άλλη μελέτη οι Chen Z. et al^[108] ανέφεραν πως ο συνδυασμός φωτοδυναμικής με τον φωτοευαισθητοποιητή Motexafin lutetium και του αναστολέα της σύνθεσης της γλουταθειόνης, σε συγκεντρώσεις από $10 \mu\text{M}$ έως $100 \mu\text{M}$, ενίσχυσε τη φωτοδυναμική δράση σε μακροφάγα κύτταρα αρουραίων έως και 20 φορές σε σχέση με τη φωτοδυναμική μόνη της.

Σε μια πρόσφατη, τέλος, μελέτη οι Wright KE et al^[109] παρουσίασαν πως η χρήση BSO σε τρισδιάστατα μοντέλα νευρώνων ευαισθητοποίησε κύτταρα στη φωτοδυναμική με m-THPC, γεγονός αξιοσημείωτο καθώς τα μοντέλα αυτά παρουσίαζαν ιδιαίτερη αντίσταση στη φωτοδυναμική με m-THPC. Επιπλέον, η χορήγηση BSO δεν προκάλεσε νέκρωση των κυττάρων. Ωστόσο οι ερευνητές στην ίδια εργασία τους ανέπτυξαν και ένα μοντέλο τριών διαστάσεων των αντιστοιχών κυττάρων περιφερικής υποστήριξης νευρώνων και αισθητήριων οργάνων (satellite glia). Στο μοντέλο αυτό εφάρμοσαν φωτοδυναμική σε συνδυασμό με BSO, ακριβώς στις ίδιες πειραματικές συνθήκες όπως και στην περίπτωση του μοντέλου νευρώνων, συγκέντρωση BSO $500 \mu\text{M}$, επώαση με τα κύτταρα για 24h , συγκέντρωση m-THPC $5.8 \mu\text{M}$, χρόνος επώασης 4h , δόση ενέργειας 1 J/cm^2 . Ολοκληρωτικά αντίθετη ήταν η επίδραση του BSO στο μοντέλο κυττάρων περιφερικής υποστήριξης νευρώνων σε σχέση με το μοντέλο νευρώνων. Η χορήγηση $500 \mu\text{M}$ BSO για 24h προκάλεσε τη νέκρωση σχεδόν του 100% του κυτταρικού πληθυσμού στο μοντέλο τριών διαστάσεων των κυττάρων περιφερικής υποστήριξης νευρώνων. Επιπλέον και οι υπόλοιπες συνθήκες οι οποίες ελέγχθηκαν, δηλαδή χορήγηση BSO και ακτινοβόληση με το φως διεγερσης, χορήγηση BSO και m-THPC, καθώς και η συνδυασμένη δράση φωτοδυναμικής με BSO οδήγησαν στη νέκρωση του 100% των κυττάρων. Οι ερευνητές απέδωσαν αυτή τη συμπεριφορά στο γεγονός ότι το BSO ανέστειλε τη βιοσύνθεση της

γλουταθειόνης με έναν τρόπο ο οποίος απέβη τελικά θανατηφόρος για τα κύτταρα περιφερικής υποστήριξης νευρώνων^[109].

Ο στόχος, όπως αυτός τέθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, ήταν να καμφθούν οι ενδοκυττάριοι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας και να επιτευχθεί η υπέρβαση του ενδοκυττάρου κατωφλίου ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών, μέσω της χορήγησης του BSO, προκειμένου να ενισχυθεί η δράση της φωτοδυναμικής. Για το σκοπό αυτό ελέγχθηκε η φωτοδυναμική δράση σε συνδυασμό με διαφορετικές συγκεντρώσεις BSO ώστε να προσδιοριστούν οι συνθήκες εκείνες στις οποίες ο αναστολέας της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης συμβάλει στην αύξηση των ποσοστών του φωτοδυναμικά επαγόμενου κυτταρικού θανάτου. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, φωτοδυναμική με 0.22 μ M m-THPC και δόση ενέργειας 180 mJ/cm^2 είχε ως αποτέλεσμα τη νέκρωση του 40% των LNCaP κυττάρων.

In vitro μελέτες συνδυασμού της φωτοδυναμικής θεραπείας με τον αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης BSO, σε συγκεντρώσεις 1, 5, 10 και 50 μ M:

Ο συνδυασμός της φωτοδυναμικής δράσης, με 0.22 μ M m-THPC και δόση ενέργειας 180 mJ/cm^2 , με τον αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης BSO, σε συγκεντρώσεις 1, 5, 10 και 50 μ M, φαίνεται πως μάλλον **ακύρωσε** τη φωτοδυναμική δράση, καθώς τα ποσοστά νέκρωσης που καταγράφηκαν δεν ξεπερνούσαν το 20%.

In vitro μελέτες συνδυασμού της φωτοδυναμικής θεραπείας με τον αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης BSO, σε συγκεντρώσεις 5 και 10 mM:

Ο συνδυασμός της φωτοδυναμικής δράσης, με 0.22 μ M m-THPC και δόση ενέργειας 180 mJ/cm^2 , με τον αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης BSO, σε συγκεντρώσεις 5 και 10 mM **ενίσχυσε** τη φωτοδυναμική δράση, καθώς το ποσοστό νέκρωσης άγγιζε το 50% περίπου, μεγαλύτερο σε σχέση με την περίπτωση κατά την οποία είχε εφαρμοστεί μόνη της η φωτοδυναμική.

Η διττή δράση του αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική θεραπεία φαίνεται πως οφείλεται στη συγκέντρωση χορήγησής του.

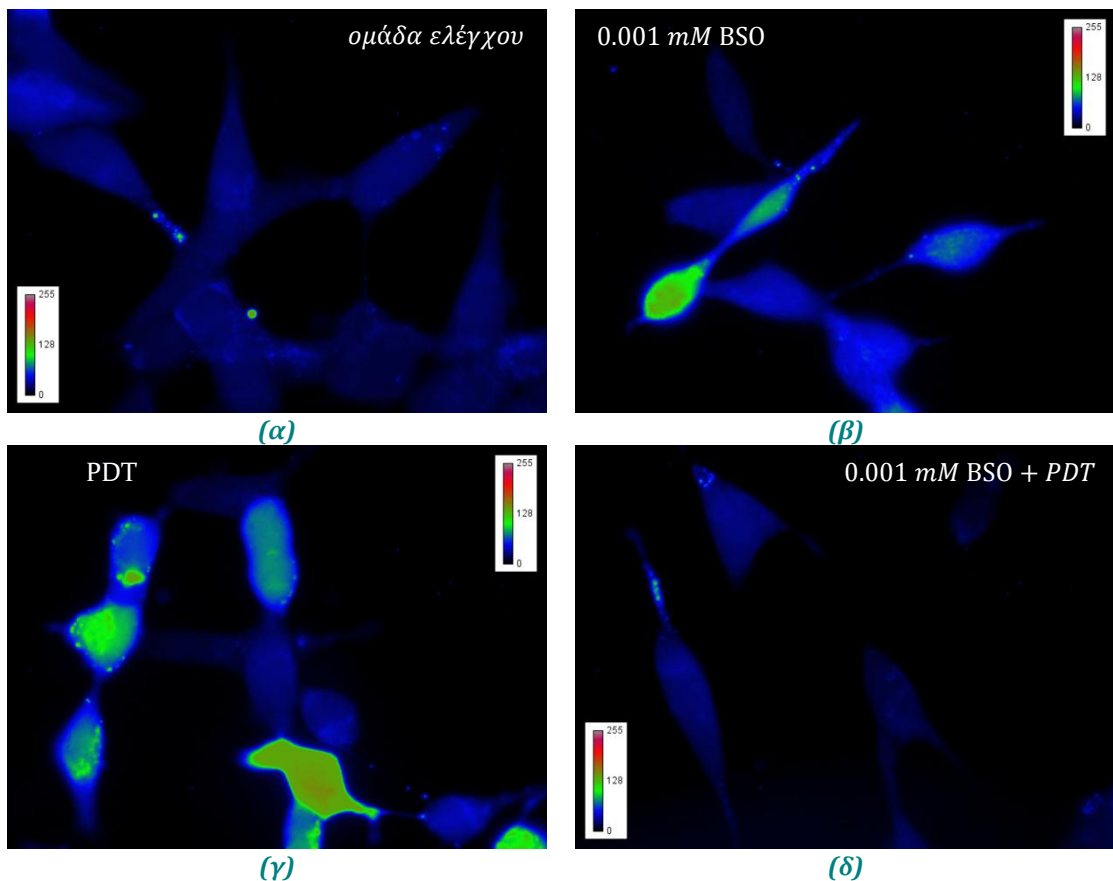
Υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία, πως η χορήγηση του BSO, σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις και ανάλογα με το είδος των κυττάρων, αυξάνει τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες σε αυτά χωρίς ωστόσο να επηρεάζεται η βιωσιμότητά τους^[109, 170, 171]. Θεωρείται πως υπερδραστηριοποιούνται ενδοκυττάριοι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας και

εξεισορροπούν το οξειδωτικό στρες αναστέλλοντας μηχανισμούς που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο^[80, 169, 172].

Η συμπεριφορά αυτή του αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης καταγράφηκε και στις μελέτες στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, για ορισμένες συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, όταν το BSO χορηγήθηκε στα κύτταρα σε συγκεντρώσεις 1,5 και 10 μM , δεν επηρέασε τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Οι μετρήσεις οξειδωτικού στρες ωστόσο κατέγραψαν αύξηση του ενδοκυττάρου οξειδωτικού στρες στα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί ο παράγοντας BSO, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ο συνδυασμός της φωτοδυναμικής θεραπείας με αυτές τις συγκεντρώσεις BSO (1,5 και 10 μM) ακύρωσε τη δράση της θεραπείας, καθώς τα ποσοστά βιωσιμότητας διατηρήθηκαν σε υψηλά επίπεδα (96,89 και 91 % αντίστοιχα) ενώ μόνη της η φωτοδυναμική είχε μειώσει το ποσοστό βιωσιμότητας περίπου στο 60%. Από τις μετρήσεις ενδοκυττάρου οξειδωτικού στρες καθώς και από την παρατήρηση των αντίστοιχων εικόνων έντασης φθορισμού (Εικόνες 9.1(α)-(δ)) προέκυψε μείωση του ενδοκυττάρου οξειδωτικού στρες μετά τη φωτοδυναμική σε συνδυασμό με το BSO. Η μείωση αυτή του ενδοκυττάρου οξειδωτικού στρες θα μπορούσε, ενδεχομένως, να αποδοθεί σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άμυνας, οι οποίοι υπερδραστηριοποιήθηκαν για την αναστολή των, επαγομένων από το BSO, μηχανισμών κυτταρικού θανάτου. Και σε αυτούς, τους υπερδραστηριοποιημένους ενδοκυττάρους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς ενδεχομένως να οφείλεται και η ακύρωση της φωτοδυναμικής δράσης κατά το συνδυασμό της με 1,5 και 10 μM BSO.

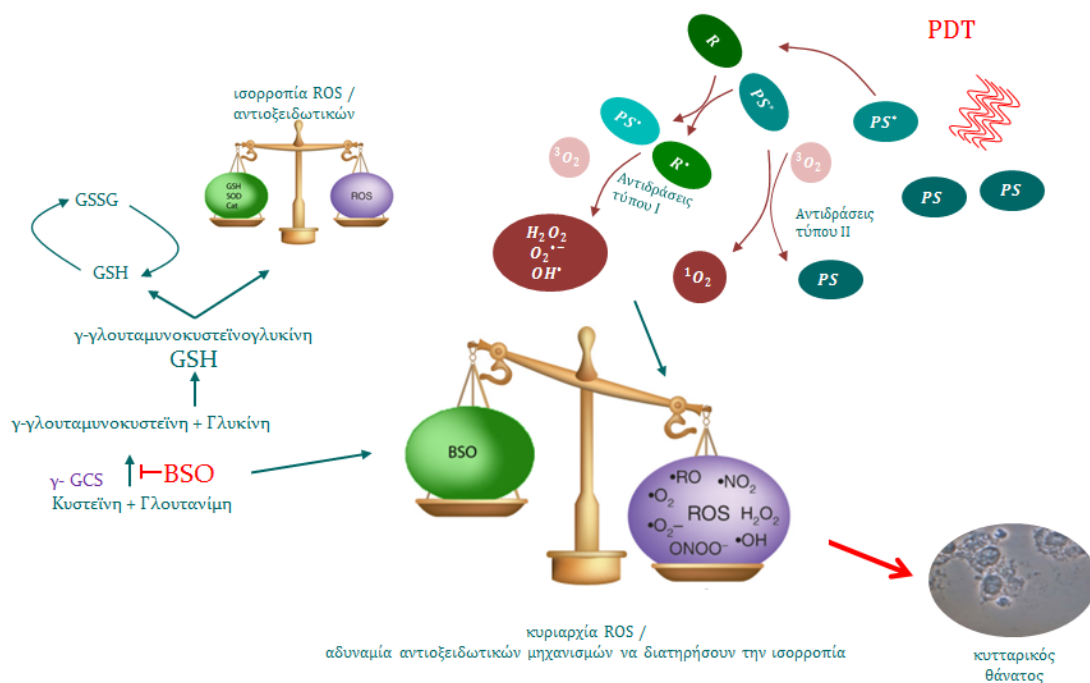
Χαρακτηριστικές είναι οι απεικονίσεις του ενδοκυττάρου οξειδωτικού στρες, όπως αυτό καταγράφηκε μέσω μικροσκοπίας φθορισμού, στις παρακάτω Εικόνες 9.1(α)-(δ) με ψευδοχρώματα. Στην Εικόνα 9.1(δ) παρουσιάζεται η μείωση του ενδοκυττάρου οξειδωτικού στρες μετά το συνδυασμό φωτοδυναμικής με τον αναστολέα της γλουταθειόνης σε συγκέντρωση 1 μM . Το χρώμα και η ένταση, τα οποία αντιστοιχούν στο οξειδωτικό στρες, είναι παρόμοια με την Εικόνα 9.1(α) στην οποία απεικονίζεται το οξειδωτικό στρες κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Εάν συνυπολογιστεί η μηδενική επίδραση στη βιωσιμότητα κατόπιν του συνδυασμού φωτοδυναμικής με τον αναστολέα της γλουταθειόνης σε συγκέντρωση 1 μM τότε φαίνεται πιθανό η ακύρωση της δράσης της φωτοδυναμικής να οφείλεται στην υπερδραστηριοποιημένη ενδοκυττάρια αντιοξειδωτική άμυνα.

*Φαίνεται πως στις συγκεντρώσεις αυτές, η χορήγηση του αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης σε συνδυασμό με φωτοδυναμική θεραπεία με 0.22 μM m-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολία με διοδικό laser στα 652 nm, 3 mW/cm² για 60 s προκάλεσε αναστολή της φωτοδυναμικής δράσης, δηλαδή έδρασε **ανταγωνιστικά** με αυτή.*



Εικόνα 9.1: Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών (α) απουσία φωτοδυναμικής και BSO. (β) μετά από επώαση με 0.001mM BSO για 24h (γ) μετά από φωτοδυναμική με 0.22 μM m-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 nm, 3 mW /cm² για 60 s. (δ) μετά από συνδυασμό επώασης με 0.001mM BSO για 24h και φωτοδυναμικής με 0.22 μM m-THPC (επώαση 24h) και δόση ενέργειας 180 mJ/cm²

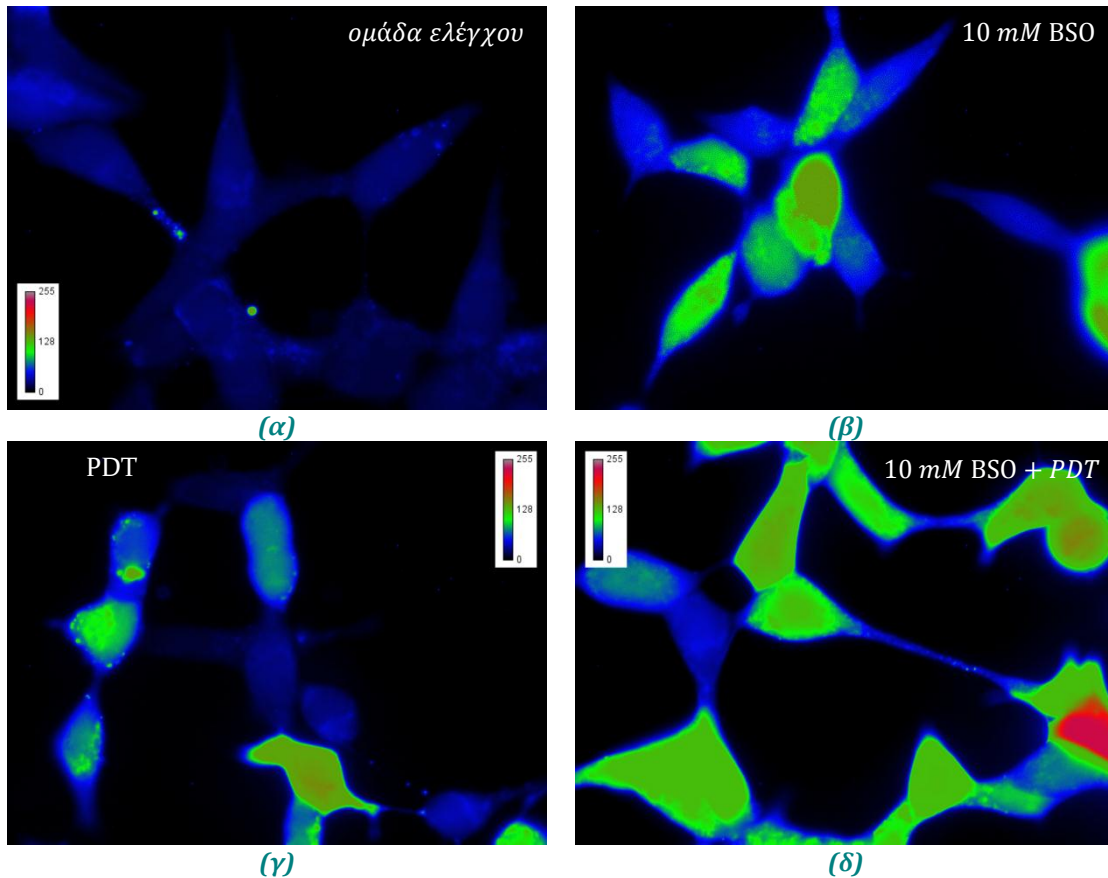
Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του αναστολέα της γλουταθειόνης, 5 και 10 mM, οι οποίες ελέγχθηκαν ως προς τη συνδυασμένη δράση τους με φωτοδυναμική, ενίσχυσαν την κυτταροτοξικότητα της θεραπείας καθώς τα ποσοστά βιωσιμότητας των κυττάρων μειώθηκαν περίπου στο 48%. Η φωτοδυναμική δράση με 0.22 μM m-THPC (επώαση 24h) και δόση ενέργειας 180 mJ/cm² είχε μειώσει τη βιωσιμότητα των κυττάρων στο 60%. Οι μετρήσεις βιωσιμότητας, όταν είχε χορηγηθεί μόνο ο παράγοντας BSO, φανέρωσαν μείωση της βιωσιμότητας στο 68% και 57%, για 5 και 10 mM BSO αντίστοιχα. Η μείωση της βιωσιμότητας ως αποτέλεσμα της δράσης του BSO αναφέρεται συχνά στη βιβλιογραφία και αποδίδεται σε ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών κυτταρικού θανάτου^[109, 166].



Σχήμα 9.4: Μηχανισμός συνδυασμένης δράσης της φωτοδυναμικής θεραπείας με τον αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης BSO: Ενδοκυττάρια η οξειδοαναγωγική ισορροπία διατηρείται καθώς οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί εξισορροπούν τη δράση των προ-οξειδωτικών. Ο παράγοντας BSO δεσμεύει τη συνθετάση της γλουταμυνο-κυστεΐνης (γ-GCS) εμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό τη σύνθεση γλουταθειόνης. Αποτέλεσμα είναι η καταστολή της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας και η ενδοκυττάρια αύξηση των ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών. Στην αύξηση αυτή του ενδοκυττάριου οξειδωτικού στρες υπερτίθεται και το επαγόμενο από τη φωτοδυναμική θεραπεία οξειδωτικό στρες, με συνέπεια ο συνδυασμός της καταστολής της αντιοξειδωτικής άμυνας και της αύξησης των ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών να οδηγεί σε μη αναστρέψιμους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου.

Ο συνδυασμός της φωτοδυναμικής δράσης με τον αναστολέα της γλουταθειόνης στις συγκεντρώσεις αυτές μείωσε περαιτέρω την κυτταρική βιωσιμότητα, τόσο σε σχέση μόνο με το BSO όσο και σε σχέση με τη φωτοδυναμική. Από τις μετρήσεις οξειδωτικού στρες κατόπιν της συνδυασμένης δράσης της φωτοδυναμικής και του αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης προέκυψε ότι αυτό είναι κατά 20% αυξημένο σε σχέση με την περίπτωση που εφαρμόστηκε μόνη της η φωτοδυναμική. Ενδεχομένως οι μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου οι οποίοι ενεργοποιήθηκαν μέσω των φωτοχημικών αντιδράσεων τύπου I και τύπου II κατόπιν της φωτοδυναμικής, υπερτέθηκαν στους αποπτωτικούς μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου, που η χορήγηση του BSO - έχει αναφερθεί πως - ενεργοποιεί, ενισχύοντας των κυτταρικό θάνατο. Επιπροσθέτως, βάση των μετρήσεων

ενδοκυττάριας γλουταθειόνης, η γλουταθειόνη μειώθηκε στο μισό περίπου σε σχέση με τα επίπεδα της ομάδας ελέγχου, μετά τη χορήγηση 10 mM BSO. Με τον κυριότερο αντιοξειδωτικό μηχανισμό σε καταστολή, κάμφθηκε η αντίσταση των κυττάρων στη φωτοδυναμική δράση, συμβάλλοντας και με τον τρόπο αυτό στην ενίσχυση των ποσοστών κυτταρικού θανάτου.



Εικόνα 9.2: Απεικόνιση με χρήση ψευδοχρωμάτων της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών (α) απουσία φωτοδυναμικής και BSO. (β) μετά από επώαση με 10 mM BSO για 24h (γ) μετά από φωτοδυναμική με 0.22 μM *m*-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολία με διοδικό laser στα 652 nm, 3 mW/cm^2 για 60 s. (δ) μετά από συνδυασμό επώασης με 10 mM BSO για 24h και φωτοδυναμικής με 0.22 μM *m*-THPC (επώαση 24h) και δόση ενέργειας 180 mJ/cm^2

Χαρακτηριστικές της επίδρασης του αναστολέα της γλουταθειόνης σε συγκέντρωση 10 mM, της φωτοδυναμικής αλλά και της συνδυασμένης δράσης τους στο ενδοκυττάριο οξειδωτικό στρες είναι οι ακόλουθες Εικόνες 9.2(α)-(δ). Στις εικόνες αυτές έχει αποτυπωθεί με χρήση ψευδοχρωμάτων το ενδοκυττάριο οξειδωτικό στρες κατόπιν της

επίδρασης κάθε επιμέρους παράγοντα αλλά και του συνδυασμού τους. Η αύξηση του ενδοκυττάριου οξειδωτικού στρες μετά τη συνδυασμένη δράση της φωτοδυναμικής με τον αναστολέα της γλουταθειόνης είναι εμφανής, αποτυπώνεται με κόκκινο χρώμα στην Εικόνα 9.2(δ)) και αποτελεί πιθανότατα την αιτία αύξησης των ποσοστών κυτταρικού θανάτου.

*Τα πειράματα παρέχουν ενδείξεις ότι στις συγκεντρώσεις αυτές, 5 και 10 mM, η χορήγηση του αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης σε συνδυασμό με φωτοδυναμική θεραπεία με 0.22 μ M m-THPC (επώαση 24h) και ακτινοβολήση με διοδικό laser στα 652 nm, 3 mW/cm² για 60 s προκάλεσε ενίσχυση της φωτοδυναμικής δράσης, έδρασε σε **συνέργεια** με αυτή.*

Αναφέρεται στη βιβλιογραφία πως η δράση του αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης τόσο στη μείωση των επιπέδων της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης και την αύξηση του οξειδωτικού στρες όσο και στην κυτταρική βιωσιμότητα, διαφοροποιείται ανάλογα με τη συγκέντρωση χορήγησής του και το είδος των κυττάρων στα οποία χορηγείται^[80, 109, 167, 171]. Η δράση του BSO έχει μελετηθεί εκτεταμένα σε καρκινικές σειρές νευροβλαστώματος. Ορισμένες από τις σειρές παρουσιάζουν αντίσταση στη δράση του BSO η οποία αποδίδεται στην ενισχυμένη ικανότητα των κυττάρων αυτών να συνθέτουν καινούργια γλουταθειόνη ή να τη διαφυλάσσουν^[173]. Επισημαίνεται επίσης πως η μείωση των επιπέδων της γλουταθειόνης μέσω της δράσης του αναστολέα της βιοσύνθεσής της διαφοροποιείται από καρκινική σειρά σε καρκινική σειρά και δεν συσχετίζεται με το βαθμό της επαγομένης από το BSO κυτταροτοξικότητας^[173]. Οι παρατηρήσεις όπως αποτυπώθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής συμφωνούν με τα παραπάνω δεδομένα, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση του οξειδωτικού στρες χωρίς καμία επίδραση στη βιωσιμότητα, για ορισμένες συγκεντρώσεις, για άλλες ωστόσο συγκεντρώσεις η αύξηση του οξειδωτικού στρες ήταν τέτοια που οδήγησε στον κυτταρικό θάνατο.

Ο συνδυασμός της φωτοδυναμικής θεραπείας με τον αναστολέα της γλουταθειόνης για συγκεντρώσεις 5 και 10 mM, επέκτεινε τα ποσοστά κυτταρικού θανάτου που είχε πετύχει μόνη της η φωτοδυναμική. Σε συμφωνία με την παρατήρηση αυτή βρίσκονται οι μελέτες των Wright et al^[109] καθώς και των Jiang et al^[107] οι οποίοι ανέφεραν ότι τα ποσοστά κυτταρικού θανάτου που επετεύχθησαν με το συνδυασμό φωτοδυναμικής θεραπείας και BSO ήταν μεγαλύτερα σε σχέση με τη φωτοδυναμική μόνη της ή το BSO μόνο του.

Αναφορές στις οποίες να καταγράφεται η αναστολή της δράσης της φωτοδυναμικής σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις του αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης δεν βρέθηκαν. Ενδεχομένως, στις συγκεντρώσεις που ο αναστολέας της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης χορηγήθηκε στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη LNCaP, προκάλεσε ήπιο οξειδωτικό στρες (μετρήσεις ενδοκυττάριου οξειδωτικού στρες) το οποίο ενεργοποίησε μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας με στόχο να εξισορροπήσουν την αύξηση αυτή των προ-οξειδωτικών. Υπάρχουν μελέτες στις οποίες αναφέρεται πως ένα οξειδωτικό ερέθισμα μπορεί να διεγείρει τη σύνθεση της γλουταθειόνης, πέρα από την υπερέκφραση και των υπολοίπων ενδοκυττάριων αντιοξειδωτικών μηχανισμών, με στόχο την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής του άμυνας^[80, 174]. Φαίνεται πιθανό, η ενισχυμένη ενδοκυττάρια αντιοξειδωτική άμυνα να έδρασε ανταγωνιστικά στη φωτοδυναμική, η οποία βασίζει τη δράση της στη δημιουργία ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών. Με τον τρόπο αυτό η δράση της φωτοδυναμικής ακυρώθηκε σχεδόν πλήρως όταν χορηγήθηκαν στα κύτταρα οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις BSO. Οι μετρήσεις της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης στις συγκεντρώσεις αυτές έδειξαν πως στα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί ο αναστολέας της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης παρουσίασαν μεγαλύτερα επίπεδα αυτής. Φαίνεται, ίσως, πως ανέπτυξαν προσαρμοστικούς μηχανισμούς υπερσύνθεσης γλουταθειόνης ως αντίδραση στην απειλή καταστολής της σύνθεσής της.

Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις BSO φαίνεται πως έδρασαν σε συνέργεια με τη φωτοδυναμική καθώς ενίσχυσαν την κυτταροτοξικότητα που αυτή προκάλεσε, επάγοντας μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου. Αναφέρεται εκτεταμένα στη βιβλιογραφία πως η χορήγηση του BSO προκαλεί μείωση των επιπέδων της γλουταθειόνης^[80, 102]. Το σύστημα της γλουταθειόνης αποτελεί τον κυριότερο ενδοκυττάριο μηχανισμό έναντι του οξειδωτικού στρες και η καταστολή του έχει αναφερθεί πως ενισχύει τη δράση αντικαρκινικών θεραπειών, καθώς τα επίπεδα ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών που οι θεραπείες επάγουν, υπερβαίνουν την αντιοξειδωτική αντίσταση από τους ενδοκυττάριους μηχανισμούς άμυνας καθιστώντας τον κυτταρικό θάνατο μη αναστρέψιμο^[36, 80]. Σύμφωνα με τα πειράματα στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, αυτές οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις BSO οδήγησαν σε μείωση των επιπέδων της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης. Η αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων ήταν συνεπώς σε καταστολή, αδυνατώντας να εξισορροπήσει το επαγόμενο από τη φωτοδυναμική οξειδωτικό στρες, οδηγώντας τελικά σε μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου. Ωστόσο οι συγκεντρώσεις αυτές ήταν από μόνες τους κυτταροτοξικές. Αναφέρεται στη βιβλιογραφία πως ο αναστολέας της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης ενεργοποιεί αποπτωτικούς μηχανισμούς οι οποίοι μπορεί να οδηγήσουν τελικά στον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης^[172, 173]. Έχει αναφερθεί πως χορήγηση του BSO εκκινεί τη διαδικασία της απόπτωσης μέσω

ενεργοποίησης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας *Bcl-2* και απελευθέρωσης του κυτοχρώματος *c* στο κυτταρόπλασμα^[106, 172]. Υπάρχει όμως περίπτωση, μετά την απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c*, προτού προλάβει να ενεργοποιήσει τις κασπάσες που προκαλούν αποπτωτικό θάνατο, το κύτταρο να αντιδράσει προσαρμοζόμενο στην απειλή που δέχεται αποδεσμεύοντας πρωτεΐνες οι οποίες αναστέλλουν την απόπτωση. Στην οικογένεια πρωτεϊνών *Bcl-2* ανήκουν τόσο προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες όσο και αντι-αποπτωτικές. Η χορήγηση του BSO φαίνεται πως διαταράσσει την ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία, δρώντας προ-οξειδωτικά και προκαλώντας είτε υπερπαραγωγή προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών οδηγώντας σε αποπτωτικό θάνατο είτε υπερπαραγωγή αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών διασφαλίζοντας την κυτταρική επιβίωση. Ποιος από τους δυο μηχανισμούς θα υπερισχύσει εξαρτάται κύρια από το είδος του κυττάρου και από τη συγκέντρωση του BSO^[172].

Στόχος, όπως αυτός τέθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, ήταν η καταστολή των ενδοκυττάρια αντιοξειδωτικών μηχανισμών άμυνας και η υπέρβαση του ενδοκυττάρια κατωφλίου ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών, μέσω της χορήγησης του αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης, BSO, προκειμένου να ενισχυθεί η δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας. Η φωτοδυναμική θεραπεία βασίζεται στη δράση της στις ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη, τα οποία παράγονται μετά τη διέγερση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή, και ενεργοποιούν μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου. Για να επιτευχθεί ωστόσο ο κυτταρικός θάνατος πρέπει τα ενδοκυττάρια επίπεδα ελευθέρων ριζών να ξεπεράσουν ένα ορισμένο κατώφλι πέραν του οποίου οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας αδυνατούν να τα εξουδετερώσουν. Η χρήση του αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης αποσκοπούσε ακριβώς σε αυτό το μηχανισμό, στην καταστολή του συστήματος της γλουταθειόνης, του σημαντικότερου ενδοκυττάρια αντιοξειδωτικού μηχανισμού, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η αντίσταση του κυττάρου στη φωτοδυναμική δράση και τελικά να ενισχυθεί ο κυτταρικός θάνατος. Βάση των πειραμάτων που διεξήχθησαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής προέκυψε πως η χορήγηση του αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης, BSO, σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, κατέστειλε την ενδοκυττάρια γλουταθειόνη και ενίσχυσε τον φωτοδυναμικά επαγόμενο κυτταρικό θάνατο. Ο συνδυασμός της φωτοδυναμικής δράσης με τον αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης φαίνεται πως είναι μια υποσχόμενη μεθοδολογία και παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον να μελετηθεί εκτενέστερα ώστε να εφαρμοστεί για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, αλλά και άλλων καρκινικών όγκων.

9.5

Μελέτες συνδυασμού φωτοδυναμικής δράσης με φυσικό μείγμα πολυφαινολών

Η βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής δράσης ήταν ένα από τα αιτήματα τα οποία τέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής. Στην κατεύθυνση αυτή, τεχνική η οποία υιοθετήθηκε και μελετήθηκε ήταν η χρήση φωτοευαισθητοποιητών εγκλεισμένων σε νανοσωματίδια. Οι συγκριτικές μελέτες της ελεύθερης και της εγκλεισμένης σε νανοσωματίδια m-THPC ανέδειξαν την υπεροχή της νανοσωματιδιακής μορφής. Μέσω αυτής αυξήθηκε η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή φαινόμενο στο οποίο θεωρείται πως οφείλονται τα μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου τα οποία επέφερε η νανοσωματιδιακή μορφή του φωτοευαισθητοποιητή μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία σε επίπεδο κυττάρου, σε σχέση με την ελεύθερη. Μολονότι η μεθοδολογία αυτή, ενισχύει την κυτταροτοξικότητα της φωτοδυναμικής, αδυνατεί να περιορίσει το φαινόμενο της φωτοευαισθησίας, η οποία αποτελεί τη σοβαρότερη παρενέργεια της φωτοδυναμικής θεραπείας, σε κλινικό επίπεδο.

Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον εστιάζεται στο συνδυασμό δύο ή περισσότερων μεθοδολογιών με στόχο την ενίσχυση της θεραπευτικής δράσης ενάντια στον καρκινικό όγκο. Αντικαρκινικές θεραπείες οι οποίες δρουν κυτταροτοξικά μέσω ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών, ανάμεσα σε αυτές και η φωτοδυναμική, είναι αποτελεσματικές εφόσον τα επίπεδα του ενδοκυττάριου οξειδωτικού στρες που προκαλούν δεν εξουδετερώνονται από την αντιοξειδωτική άμυνα και ξεπεραστεί το κατώφλι εκείνο πέραν του οποίου ο κυτταρικός θάνατος είναι μη αναστρέψιμος^[36]. Τα επίπεδα του αναγκαίου και ικανού, επαγομένου από τις αντικαρκινικές θεραπείες, οξειδωτικού στρες για την καταστροφή του καρκινικού όγκου εξαρτώνται από το ενδογενώς και εξωγενώς προκαλούμενο οξειδωτικό στρες στα καρκινικά κύτταρα και τον ανταγωνισμό που αυτό δέχεται από τους αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς^[36, 81]. Οι μεθοδολογίες οι οποίες συνδυάζονται για την ενίσχυση της θεραπευτικής δράσης θεωρείται ότι ενεργοποιούν διαφορετικούς ενδοκυττάριους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου αλλά και κάμπτουν την αντίσταση του κυττάρου στην κύρια αντικαρκινική θεραπεία. Το θεραπευτικό αποτέλεσμα μπορεί να είναι αθροιστικό ή ακόμα και συνεργειακό με ελαχιστοποίηση ή άρση των παρενεργειών της αντικαρκινικής θεραπείας^[37].

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ελέγχθηκε η δυνατότητα συνδυασμού της φωτοδυναμικής θεραπείας με παράγοντες οι οποίοι τροποποιούν την ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία με στόχο τη βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής δράσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης, BSO, προκειμένου να καμφθεί η ενδοκυττάρια αντιοξειδωτική άμυνα και ελέγχθηκε η

πιθανότητα συνέργειάς του με φωτοδυναμική, με στόχο την ενίσχυση της κυτταροτοξικότητάς της. Διαπιστώθηκε πως φωτοδυναμική θεραπεία σε συνδυασμό με υψηλές συγκεντρώσεις του αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης επέφερε μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου σε σχέση με τα ποσοστά κυτταρικού θανάτου που επέφεραν μεμονωμένα η φωτοδυναμική και ο αναστολέας της γλουταθειόνης. Δεν προέκυψαν ωστόσο ενδείξεις άρσης της σοβαρότερης παρενέργειας της φωτοδυναμικής, της παραμένουσας φωτοευαισθησίας.

Στις μελέτες συνέργειας, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η αναζήτηση εκείνου του παράγοντα, ο οποίος όταν χορηγείται σε συνδυασμό με την αντικαρκινική θεραπεία, ευαισθητοποιεί τον υπό θεραπεία καρκινικό στόχο στη θεραπεία (ενδεχομένως και με τέτοιο τρόπο ώστε να απαιτείται μικρότερη δόση από τον πιο τοξικό παράγοντα της άλλης) αλλά και να ελαχιστοποιεί τις παρενέργειες αυτής^[37].

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα βελτιστοποίησης της φωτοδυναμικής δράσης παράλληλα με άρση της παραμένουσας φωτοευαισθησίας, ελέγχθηκε η πιθανότητα συνέργειας της φωτοδυναμικής θεραπείας με μια εναλλακτική μεθοδολογία για τη μεταβολή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Η μεθοδολογία αυτή αφορούσε στη χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις^[175]. Χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών, σε κατάλληλες συγκεντρώσεις, μετατοπίζει την ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία σε προ-οξειδωτική κατάσταση. Θεωρείται ότι με τον τρόπο αυτό το κύτταρο καθίσταται ιδιαιτέρως ευπαθές (ευαισθητοποιείται) στη δράση οξειδωτικού στρες επαγομένου από αντικαρκινικές θεραπείες^[36, 37].

Από τα πλέον ισχυρά αντιοξειδωτικά είναι φυσικά μείγματα δευτερογενών μεταβολιτών, πλούσια σε φλαβονοειδή. Το πόσο ισχυρή είναι η προ-οξειδωτική ή αντιοξειδωτική δράση ενός μείγματος καθορίζεται από τη σύστασή του σε φλαβονοειδή, κυρίως σε πολυφαινόλες και είναι ανάλογη του αριθμού των υδροξυλομάδων στο μόριο του φλαβονοειδούς. Στην πραγματικότητα φαίνεται πως τα δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα είναι ταυτόχρονα υπεύθυνα και για την προ-οξειδωτική τους δράση^[93, 97]. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες προερχόμενοι από ανανεώσιμο φυσικό υλικό συγκεντρώνουν ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον. Η έρευνα εστιάζει στις προερχόμενες από φυσικά προϊόντα πολυφαινόλες, λόγω των εγγενών ισχυρών αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων. Πάμπολλες είναι οι μελέτες χρήσης τους, κυρίως προληπτικής, ως συμπληρώματα διατροφής έναντι ασθενειών, καρκινικών και μη καρκινικών καταστάσεων (π.χ. αθηροσκλήρωση, γήρανση). Η έρευνα

δεν εξαντλείται στην αξιοποίησή τους ως συμπληρωμάτων διατροφής (καθώς έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες) αλλά και επικουρικά για την πρόληψη ασθενειών^[93, 97].

Η χορήγηση πολυφαινολών σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις θεωρείται πως μπορεί να αυξήσει τα ενδοκυττάρια επίπεδα οξειδωτικού στρες και σε συνέργεια με τις παραγόμενες από τη θεραπεία ελεύθερες ρίζες να αυξήσει τα ποσοστά κυτταρικού θανάτου^[37, 93, 175].

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής επιλέχθηκε προς μελέτη φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχόμενο από ανανεώσιμο φυτικό υλικό, συγκεκριμένα από φλοιό *P.halepensis*. Προγενέστερες μελέτες του Εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής σχετικές με την αντικαρκινική αλλά και συνεργειακή δράση με τη φωτοδυναμική φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένου από φλοιό *P.maritima* ανέδειξαν την ικανότητα του μείγματος τόσο να μειώνει τα ποσοστά εμφάνισης θηλωμάτων και προκαρκινικών μορφωμάτων σε μοντέλο άτριχων μυών όσο και να ενισχύει τη φωτοδυναμική θεραπεία των καρκινωμάτων στο ίδιο μοντέλο^[134, 176]. Κατόπιν, εκτενέστερες μελέτες αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων φυσικών μειγμάτων πολυφαινολών, προερχομένων από φυτικό υλικό, έναντι επαγομένου από την υπεριώδη ακτινοβολία οξειδωτικού στρες σε κερατινοκύτταρα, οι οποίες ολοκληρώθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, ανέδειξαν ότι το φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχόμενο από φλοιό *P.halepensis* παρουσίαζε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση προστατεύοντας πλήρως τα κερατινοκύτταρα από τη φωτοκαταστροφή. Για το λόγο κρίθηκε κατάλληλο και θεωρήθηκε ενδιαφέρον να μελετηθεί σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική.

Συνοψίζοντας, στόχο της έρευνας αποτέλεσε η διερεύνηση της πιθανότητας ενίσχυσης της φωτοδυναμικής δράσης, μέσω συνέργειάς της με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών, προερχομένων από φλοιό *P.halepensis*, σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις, ως προς την επαγωγή κυτταρικού θανάτου μέσω μηχανισμού οξειδωτικού στρες. Επιπλέον στόχο αποτελούσε η διερεύνηση της πιθανότητας δράσης του ενάντια στην παραμένουσα φωτοευαισθησία.

9.5.1

Μελέτες σε επίπεδο κυττάρου.

Προκειμένου να διερευνηθεί, σε επίπεδο κυττάρου, η πιθανότητα ενίσχυσης της φωτοδυναμικής δράσης μέσω συνέργειάς της με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις, μελετήθηκε η δράση του φυσικού μείγματος πολυφαινολών

προερχομένων από εκχύλισμα φλοιού *P.halepensis* στα ενδοκυττάρια επίπεδα ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών καθώς και στην κυτταρική βιωσιμότητα σε κύτταρα της καρκινικής σειράς κυττάρων του προστάτη LNCaP. Επιπλέον, στην κατεύθυνση ενίσχυσης της φωτοδυναμικής δράσης, μελετήθηκε η συνδυασμένη δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας και του φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένων από εκχύλισμα φλοιού *P.halepensis* στα ενδοκυττάρια επίπεδα οξειδωτικού στρες αλλά και στην κυτταρική βιωσιμότητα, και προσεγγίστηκε ο πιθανός του μηχανισμός δράσης τους στα LNCaP κύτταρα.

9.5.1.1

Δράση φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένων φλοιού *P.halepensis* σε κύτταρα της καρκινικής σειράς κυττάρων του προστάτη LNCaP

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες στις Ηνωμένες Πολιτείες ενώ είναι ο πρώτος σε ποσοστά νέων καρκίνων που διαγιγνώσκονται (29%)^[177]. Οι διαφορές ανάλογα τη φυλή και τη γεωγραφική περιοχή εμφάνισης υποδεικνύουν πως η εμφάνιση της νόσου σχετίζεται με γενετικούς αλλά και περιβαλλοντολογικούς παράγοντες^[178]. Οι άνδρες της ασιατικής φυλής κατέχουν τα μικρότερα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, ενώ τα μεγαλύτερα ποσοστά απαντώνται στους άνδρες του δυτικού κόσμου. Θεωρείται πως τα συστατικά της διατροφής επηρεάζουν την παθογένεια της νόσου^[179]. Αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει διαφορετικά συστατικά της διατροφής, με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, τα οποία παρουσιάζουν δράση ενάντια στην εμφάνιση ή/και στην ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη. Πολλές από αυτές τις ουσίες (epigallocatechin gallate (EGCG), καρετονοειδή, βιταμίνες φαινολικές ουσίες) θεωρείται πως δρουν προλαμβάνοντας την εμφάνιση καρκίνου του προστάτη^[180, 181].

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ελέγχθηκε η επίδραση φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένων από φλοιό *P.halepensis* σε κύτταρα της καρκινικής σειράς κυττάρων του προστάτη LNCaP. Μελετήθηκε η επίδραση του μείγματος στην κυτταρική βιωσιμότητα και στο ενδοκυττάριο οξειδωτικό στρες.

Καρκινικά κύτταρα του προστάτη επώαστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις του φυσικού μείγματος πολυφαινολών (1, 10, 25, 30, 35, 50, 75 και 100 $\mu\text{g/ml}$) για 1 και 24 h. Ο τρόπος με τον οποίο επέδρασε το φυσικό μείγμα πολυφαινολών στη βιωσιμότητα των κυττάρων εξαρτήθηκε από τη συγκέντρωσή του και δευτερευόντως από το χρόνο χορήγησής του. Επώαση 1h με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών, με συγκεντρώσεις έως και

50 $\mu\text{g/ml}$, δεν επηρέασε τη βιωσιμότητα. Η συγκέντρωση 75 $\mu\text{g/ml}$ προκάλεσε μείωση της βιωσιμότητας κατά περίπου 30%, ενώ η μεγαλύτερη συγκέντρωση που ελέγχθηκε, 100 $\mu\text{g/ml}$, οδήγησε στη νέκρωση το 50% των κυττάρων. Η επώαση των κυττάρων με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών για 24h ακολούθησε κατά κανόνα τη συμπεριφορά που καταγράφηκε και για 1h επώαση. Οι διαφορές που εντοπίστηκαν αφορούν τη συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/ml}$ η οποία προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας κατά περίπου 20% ενώ οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, 75 και 100 $\mu\text{g/ml}$ προκάλεσαν ακόμα μεγαλύτερη πτώση της βιωσιμότητας (και σε σχέση με την επώαση μιας ώρας) κατά 50% και 60% αντίστοιχα. *Ανακεφαλαιώνοντας, το φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχόμενου από φλοιό *P.halerpensis* προκάλεσε μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων του προστάτη LNCaP ανάλογα με τη συγκέντρωση και το χρόνο χορήγησής του.*

Η δράση του συγκεκριμένου φυσικού μείγματος πολυφαινολών ελέγχθηκε επίσης στο παραγόμενο ενδοκυττάριο οξειδωτικό στρες, στα κύτταρα της καρκινικής σειράς LNCaP. Η χορήγηση του μείγματος πολυφαινολών αύξησε τα ενδοκυττάρια επίπεδα ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών ακόμα και όταν χορηγήθηκε σε συγκεντρώσεις οι οποίες δεν επηρέαζαν την κυτταρική βιωσιμότητα. Τα επίπεδα ωστόσο του οξειδωτικού στρες επανήλθαν στις τιμές της ομάδας ελέγχου μετά από επώαση 24 h. Μολονότι οι ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά οξυγονούχα είδη αυξήθηκαν μετά τη χορήγηση του φυσικού μείγματος, οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας του κυττάρου φαίνεται πως κατόρθωσαν να υπερκεράσουν την επίθεση αυτή καθώς η βιωσιμότητα διατηρήθηκε ανέπαφη (προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις). Μεγαλύτερες ωστόσο συγκεντρώσεις του μείγματος έδρασαν οξειδωτικά προκαλώντας μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας.

Τα αποτελέσματα, όπως αποτυπώθηκαν βάσει των μελετών στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, έρχονται σε συμφωνία με δεδομένα της βιβλιογραφίας σε σχέση με τη δράση πολυφαινολών στα κύτταρα της σειράς καρκινικών κυττάρων του προστάτη LNCaP. Οι Bennani H et al^[179] σε μελέτη τους για τη δράση διαφόρων πολυφαινολών στη βιωσιμότητα LNCaP κυττάρων αναφέρουν πως οι ουσίες που μελέτησαν, αλλά και τα κλάσματα αυτών, ανέστειλαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και παρουσίασαν προ-αποπτωτική δράση. Στην ίδια κατεύθυνση, οι Romero I et al^[182] ανέφεραν πως πολυφαινόλες ανέστειλαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προκάλεσαν απόπτωση σε LNCaP κύτταρα. Οι μελέτες συνέκλιναν στη διαπίστωση πως η δράση των πολυφαινολών εξαρτιόταν ισχυρά από τη συγκέντρωση χορήγησής τους. Επιπλέον, παρουσίαζαν τη δυνατότητα δράσης ως αντικαρκινικές ουσίες, προλαμβάνοντας ή εμποδίζοντας την ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη.

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων δρουν οι πολυφαινόλες αντικαρκινικά, μειώνοντας τη βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων δεν έχουν απολύτως αποκρυσταλλωθεί. Μελέτες

αναφέρουν πως οι πολυφαινόλες προκαλούν μεταβολές στην έκφραση γονιδίων τα οποία σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς μέσω υπερέκφρασης προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών *Bax* και *p21/waf* [183]. Άλλες μελέτες αναφέρουν πως οι πολυφαινόλες αποδομούν το DNA κυρίως παρουσία χαλκού. Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα χαλκού, και για το λόγο αυτό οι αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ χαλκού και πολυφαινολών προς σχηματισμό δραστικών οξυγονούχων ειδών συμβαίνουν σε μεγαλύτερο ποσοστό σε αυτά [184]. Επιπλέον αναφέρεται πως προκαλούν υπερέκφραση προ-οξειδωτικών ενζύμων και γονιδίων εμποδίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και προ-αποπτωτικών κασπασών ενισχύοντας τους αποπτωτικούς μηχανισμούς [185].

*Από τις μελέτες στα πλαίσια της παρούσας διατριβής αποτυπώνεται για πρώτη φορά η κυτταροτοξική δράση φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένου από φλοιό *P.halepensis*, σε κύτταρα της καρκινικής σειράς κυττάρων του προστάτη LNCaP, παρέχοντας ενδείξεις αντικαρκινικής δράσης του μείγματος.*

9.5.1.2

Φωτοδυναμική δράση σε συνδυασμό με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών, σε επίπεδο κυττάρου

Σκοπό της μελέτης της συνδυασμένης δράσης της φωτοδυναμικής θεραπείας και του φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένου από εκχύλισμα φλοιού *P.halepensis* απετέλεσε η διερεύνηση της πιθανής συνέργειάς τους στην κατεύθυνση ενίσχυσης της φωτοδυναμικής δράσης. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση της συνδυασμένης δράσης της φωτοδυναμικής θεραπείας και του φυσικού μείγματος πολυφαινολών στην κυτταρική βιωσιμότητα αλλά και στα ενδοκυττάρια επίπεδα οξειδωτικού στρες σε κύτταρα της καρκινικής σειράς κυττάρων του προστάτη LNCaP.

Φωτοδυναμική θεραπεία με $0.22\mu\text{M}$ m-THPC και δόση ενέργειας $180\text{ mJ}/\text{cm}^2$ είχε ως αποτέλεσμα τη νέκρωση του 40% των LNCaP κυττάρων, αποτέλεσμα το οποίο προέκυψε μετά από μέτρηση της βιωσιμότητας με τον έλεγχο MTT, 24h αργότερα. Ο συνδυασμός της φωτοδυναμικής με φυσικό μείγμα πολυφαινολών είχε τα παρακάτω αποτελέσματα:

Το φυσικό μείγμα πολυφαινολών έδρασε σε **συνέργεια** με τη φωτοδυναμική αυξάνοντας την κυτταρική θνησιμότητα περίπου στο 55%, όταν χορηγήθηκε πριν από τη φωτοδυναμική θεραπεία, συγκεντρώσεις 30, 35 και $50\mu\text{g}/\text{ml}$. Η δράση είναι συνεργειακή καθώς στις συγκεντρώσεις αυτές το φυσικό μείγμα από μόνο του δεν είχε καμία επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Οι συγκεντρώσεις αυτές παρουσίασαν προ-οξειδωτική

συμπεριφορά, καθώς αύξησαν τα επίπεδα ενδοκυττάριου οξειδωτικού στρες χωρίς να επηρεάσουν την κυτταρική βιωσιμότητα. Η αύξηση του ενδοκυττάριου οξειδωτικού στρες υπολογίστηκε κατόπιν ποσοτικοποίησης του σήματος φθορισμού, ανάλογο του ενδοκυττάριου οξειδωτικού στρες, μέσω επεξεργασίας των εικόνων φθορισμού. Φαίνεται πως το σύστημα των κυττάρων οδηγήθηκε σε προ-οξειδωτική κατάσταση μετά τη χορήγηση του φυσικού μείγματος πολυφαινολών σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις ευαίσθητοποιώντας τα κύτταρα στη φωτοδυναμική δράση. Ενδεχομένως, το σύστημα των κυττάρων ευρισκόμενο σε προ-οξειδωτική κατάσταση δεν μπόρεσε να ανταγωνιστεί μέσω των αντιοξειδωτικών αμυντικών του μηχανισμών το νέο οξειδωτικό ερέθισμα (τη φωτοδυναμική) το οποίο υπερτέθηκε σε αυτό, με αποτέλεσμα μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου.

Στην περίπτωση κατά την οποία το φυσικό μείγμα πολυφαινολών χορηγήθηκε αμέσως μετά τη φωτοδυναμική, η δράση φαίνεται να είναι επίσης συνεργειακή, συγκέντρωση $50 \mu\text{g/ml}$. Τα ποσοστά κυτταρικού θανάτου στην περίπτωση αυτή άγγιξαν το 50%, μικρότερα από την περίπτωση κατά την οποία είχε χορηγηθεί πριν τη φωτοδυναμική. Από τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις, τα $30 \mu\text{g/ml}$ δεν επέφεραν καμία επιπλέον μείωση της βιωσιμότητας (η βιωσιμότητα διατηρήθηκε περίπου στο 60%, παρόμοιο αποτέλεσμα με τη δράση μόνο της φωτοδυναμικής), ενώ τα $35 \mu\text{g/ml}$ προκάλεσαν μείωση της βιωσιμότητας κατά περίπου 10% σε σχέση με τα επίπεδα βιωσιμότητας που επέφερε η δράση μόνο της φωτοδυναμικής. Η διαφορά αυτή ως προς τη βιωσιμότητα, για τις ίδιες συγκεντρώσεις ανάλογα με το χρόνο χορήγησης σε σχέση με τη φωτοδυναμική δράση, υποδεικνύει ίσως πως το φυσικό μείγμα πολυφαινολών πιθανότατα δεν είχε τον απαραίτητο χρόνο προκειμένου να θέσει το βιολογικό σύστημα σε προ-οξειδωτική κατάσταση, ευαίσθητοποιώντας το για τη φωτοδυναμική.

Τα αποτελέσματα παρέχουν ενδείξεις συνέργειας, καθώς επετεύχθησαν μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου κατόπιν του συνδυασμού της φωτοδυναμικής θεραπείας με το φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχομένου από εκχύλισμα φλοιού *P.halepensis* σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις, σε σχέση με την περίπτωση κατά την οποία εφαρμόστηκε μόνο φωτοδυναμική. Προσεγγίστηκε συνεπώς ο στόχος ο οποίος είχε τεθεί, η βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής δράσης.

Αναφορικά με το συνδυασμό φωτοδυναμικής θεραπείας και αντιοξειδωτικών ουσιών σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις τα δεδομένα της βιβλιογραφίας είναι πεπερασμένα. Οι μελέτες που έχουν γίνει αφορούν στη δράση κυρίως του ασκορβικού οξέως και της α-τοκοφερόλης σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική και λιγότερο άλλες φυσικές αντιοξειδωτικές ουσίες ή μείγματα ουσιών. Οι Kelly EE et al^[186] εφάρμοσαν φωτοδυναμική

θεραπεία με Photofrin σε συνδυασμό με σίδηρο και ασκορβικό σε ακανθοκυτταρικά καρκινικά κύτταρα του στόματος . Η κυτταροτοξικότητα οφειλομένη στο συνδυασμό τους ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τη δράση μεμονωμένης φωτοδυναμικής και αποδόθηκε στο ότι τα ιόντα σιδήρου καταλύουν τις αντιδράσεις παραγωγής κυτταροτοξικών ελευθέρων ριζών από λιπιδικές υπεροξειδάσες, ενώ το ασκορβικό ανάγει το σίδηρο σε ιόν σιδήρου ενισχύοντας τη λιπιδική υπεροξειδωση. Το ασκορβικό οξύ έχει αναφερθεί ότι ενισχύει την κυτταροτοξικότητα της φωτοδυναμικής με την Verteporfin^[112] όπως και με το ALA^[187].

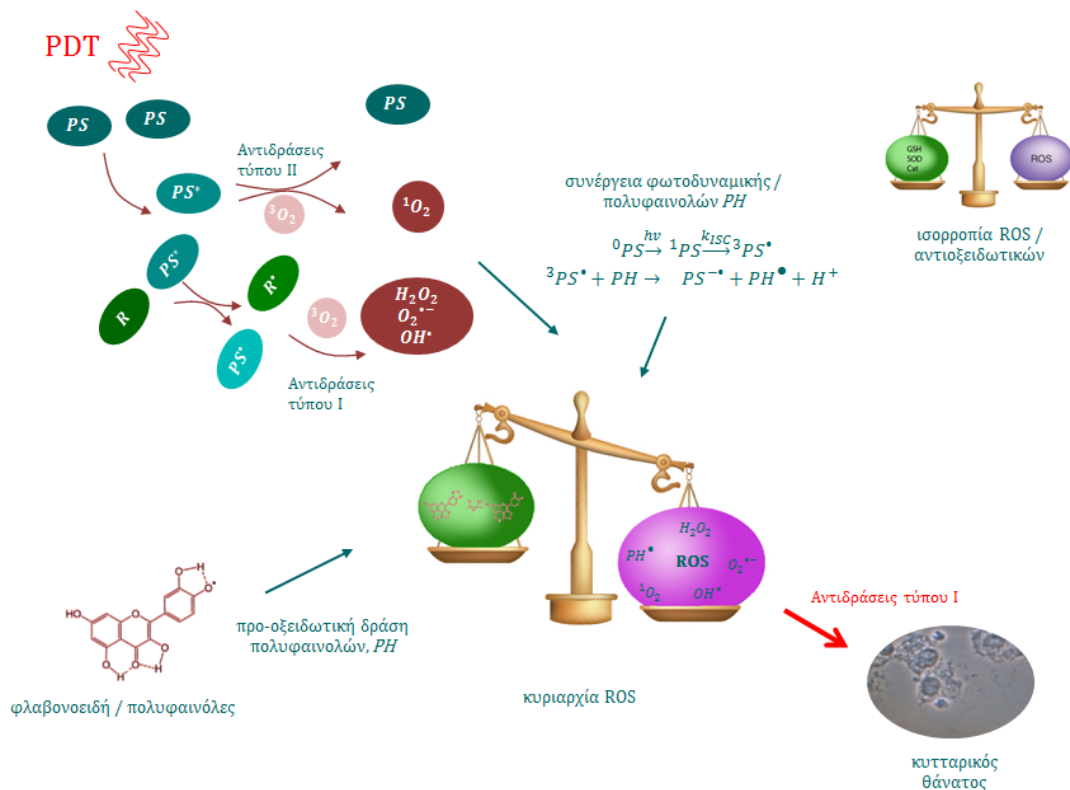
Μελέτες της βιταμίνης E (α-τοκοφερόλης) σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική, σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου, είχαν δείξει ότι η ενίσχυση ή όχι της φωτοδυναμικής εξαρτήθηκε από τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού και από το χρόνο χορήγησης^[188]. Ο χρόνος επώασης με το αντιοξειδωτικό σε σχέση με το χρόνο εφαρμογής της φωτοδυναμικής ήταν το αντικείμενο μελέτης των Shevchuk I et al^[189]. Κατέληξαν πως η χορήγηση του αντιοξειδωτικού 3(2)-t-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) πριν τη φωτοδυναμική έδρασε προσθετικά στην κυτταροτοξικότητα, ενώ η χορήγησή του αμέσως μετά τη φωτοδυναμική έδρασε σε συνέργεια με αυτή.

9.5.1.3

Πιθανός μηχανισμός συνεργειακής δράσης φωτοδυναμικής θεραπείας με την m-THPC και φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένων από εκχύλισμα φλοιού *P.halepensis*

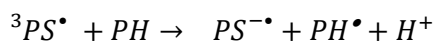
Στόχο της έρευνας αποτέλεσε ο προσδιορισμός των πιθανών μηχανισμών συνεργειακής δράσης της φωτοδυναμικής θεραπείας με την m-THPC και του φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένων από εκχύλισμα φλοιού *P.halepensis*.

Οι Chen Y et al^[46] σε μελέτη τους είχαν διερευνήσει το που οφείλεται η υπεροχή της φωτοδυναμικής με την m-THPC σε σχέση με τη Photofrin, παρότι η κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρους οξυγόνου της Photofrin (0.76) είναι μεγαλύτερη από αυτήν της m-THPC (0.4). Θεώρησαν πως η διαφορά οφείλεται στις διαφορετικές οξειδοαναγωγικές ιδιότητες των δυο φωτοευαισθητοποιητών. Πράγματι απέδειξαν την ισχυρή ικανότητα της m-THPC να προκαλεί το σχηματισμό ρίζας υπεροξειδικού ανιόντος $O_2^{\bullet-}$ και την μεγάλη ευκολία να δίδει ηλεκτρόνια όταν αντιδρά με τον βιολογικό ιστό, σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες μέσω μηχανισμού μεταφοράς ηλεκτρονίων, υποδεικνύοντας πως οι φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου I παίζουν σημαντικό ρόλο στην υψηλή αποδοτικότητα της m-THPC στη φωτοδυναμική. Σε συνδυασμό με τη χαμηλή κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρους οξυγόνου θεώρησαν πως η m-THPC δρα κυρίως μέσω του μηχανισμού των αντιδράσεων τύπου I κατά τη φωτοδυναμική.



Σχήμα 9.5: Μηχανισμός συνεργειακής δράσης φωτοδυναμικής θεραπείας και φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχόμενο από φλοιό *P.halerpensis*.

Μικρές συγκεντρώσεις πολυφαινολών έχει δειχθεί ότι προστατεύουν από τη φωτοδυναμικά επαγόμενη φωτοκαταστροφή. Αντιθέτως μεγαλύτερες συγκεντρώσεις πολυφαινολών έχει δειχθεί πως ενισχύουν τη φωτοδυναμικά επαγόμενη φωτοκαταστροφή^[113, 114]. Η προ-οξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολών αποδίδεται στο σχηματισμό πολυφαινολικών ριζών, προϊόντα είτε αυτο-οξειδωσης είτε αντιδράσεων των πολυφαινολών με άλλες ρίζες. Η προ-οξειδωτική ικανότητα μπορεί ωστόσο να προκύψει και από αντίδραση της πολυφαινολικής ουσίας (PH) με τον διεγερμένο στην τριπλή διεγερμένη στάθμη φωτοευαίσθητοποιητή ($^3PS^*$) σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες:



Οι πολυφαινολικές ρίζες (PH^{\bullet}) αυξάνονται με αύξηση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών προωθώντας τις αντιδράσεις τύπου I^[113, 114]. Τα δεδομένα συγκλίνουν πως η φωτοδυναμική δράση με την m-THPC σε συνδυασμό με πολυφαινόλες φαίνεται να οφείλεται κυρίως σε αντιδράσεις τύπου I.

9.5.2

Μελέτες στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη

9.5.2.1

Μελέτη επίδρασης του φυσικού μείγματος πολυφαινολών στον καρκινικό όγκο, σε μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη

Σκοπό της έρευνας αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένου από εκχύλισμα φλοιού *P.halepensis* στον καρκινικό όγκο σε μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη όπως αυτό αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής. Συγκεκριμένα ελέγχθηκε εάν η χορήγηση του μείγματος προκαλεί αλλαγή στο μέγεθος του όγκου. Μείωση του όγκου θα παρείχε ενδείξεις αντικαρκινικής δράσης ενώ αύξηση ενδείξεις ενίσχυσης του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του όγκου. Το μείγμα χορηγήθηκε σε δυο συγκεντρώσεις, 100 $\mu\text{g/ml}$ και 1 mg/ml . Και στις δυο συγκεντρώσεις μείωσε σημαντικά την αύξηση του όγκου σε σχέση με τους μύες οι οποίοι δεν έλαβαν το μείγμα. Η μείωση ήταν μεγαλύτερη όταν χορηγήθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση φυσικού μείγματος πολυφαινολών. Βιβλιογραφικές αναφορές της επίδρασης στο μέγεθος καρκινικών όγκων προστάτη φυσικών μειγμάτων πολυφαινολικών συστατικών προερχομένων από τσάι υπάρχουν. Για παράδειγμα, οι Henning et al^[190] χορήγησαν εκχύλισμα πράσινου τσαγιού καθώς και διάλυμα του συστατικού του epigallocatechin gallate (EGCG) (του σημαντικότερου συστατικού του τσαγιού στο οποίο κυρίως αποδίδεται η αντικαρκινική και αντιοξειδωτική του δράση) σε μοντέλο καρκίνου του προστάτη σε ανοσοκατεσταλμένους μύες. Οι ερευνητές ανέφεραν πως τα εκχυλίσματα καθυστέρησαν σημαντικά την αύξηση του όγκου στους μύες και απέδωσαν το φαινόμενο αυτό στη μείωση του οξειδωτικού στρες αλλά και στη μείωση της αγγειογένεσης λόγω της δράση των φυσικών μειγμάτων πολυφαινολών.

Η μελέτη στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ανέδειξε, για πρώτη φορά, ότι φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχομένου από εκχύλισμα φλοιού *P.halepensis* μπορεί να δράσει ενάντια στην αύξηση καρκινικού όγκου το προστάτη, παρέχοντας στοιχεία για περαιτέρω έρευνα στην κατεύθυνση ανάπτυξης μεθοδολογιών για την πρόληψη ή και θεραπεία καρκίνου του προστάτη. Ενδεχομένως η δράση του μείγματος να μπορεί να αποδοθεί σε μείωση των επιπέδων οξειδωτικού στρες ή στην ενεργοποίηση προ-αποπτωτικών μηχανισμών θανάτου των καρκινικών κυττάρων. Από τις μελέτες σε επίπεδο κυττάρου είχε φανεί πως η συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$ προκαλούσε σημαντική κυτταροτοξικότητα στα LNCaP κύτταρα.

*Η παρατήρηση πως το φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχόμενο από φλοιό *P.halepensis* μπορεί να καθυστερήσει σημαντικά την αύξηση του όγκου ανοίγει νέες προοπτικές ανάπτυξης συσκευασμάτων στην κατεύθυνση της πρόληψης και του ελέγχου της εξέλιξης της νόσου. Είναι δε η πρώτη αναφορά της προληπτικής/ θεραπευτικής δράσης φυσικών μειγμάτων πολυφαινολών προερχομένων από συστατικά πεύκων στην περίπτωση καρκίνου του προστάτη.*

9.5.2.2

*Μελέτη ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη σε συνδυασμό με φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχόμενο από εκχύλισμα φλοιού πεύκου *P.halepensis**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής δράσης σε επίπεδο καρκινικού ιστού, σε ζωντανό οργανισμό με παράλληλη η άρση της παραμένουσας φωτοευαισθησίας ήταν ένας από τους στόχους οι οποίοι τέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

Στις πειραματικές συνθήκες, όπως αυτές αναπτύχθηκαν και εκτελέστηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, η συνδυασμένη δράση της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας, με την εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC και δόση ενέργειας 15 J, και του φυσικού μείγματος πολυφαινολών, σε συγκέντρωση 1 mg/ml, προκάλεσε μείωση της αύξησης του καρκινικού όγκου σε μικρότερο ποσοστό σε σχέση με το ποσοστό μείωσης που προκάλεσε η χορήγηση μόνο του αντιοξειδωτικού μείγματος. Η αύξηση του όγκου ωστόσο ήταν και στις δυο περιπτώσεις μικρότερη της αύξησης που καταγράφηκε στους μύες οι οποίοι δεν είχαν λάβει κάποια θεραπεία.

*Η χορήγηση του φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχόμενου από φλοιό *P.halepensis* σε συγκέντρωση 1 mg/ml σε συνδυασμό με ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με την εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC και δόση ενέργειας 15 J έδρασε μάλλον **ανταγωνιστικά** με αυτή. Παρόλα αυτά, **ακύρωσε πλήρως την παραμένουσα φωτοευαισθησία.***

Η συνδυασμένη δράση της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας και του φυσικού μείγματος πολυφαινολών σε υποδεκαπλάσια συγκέντρωση, 100 μg/ml, φαίνεται πως τελικά κατόρθωσε να επιτύχει τα θεραπευτικά αποτελέσματα όπως όταν εφαρμόστηκε μόνο φωτοδυναμική, δηλαδή καταστροφή του καρκινικού όγκου, παρόλη τη χρονική καθυστέρηση στην επίτευξη αυτών. Κανένα από τα πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε

φωτοευαισθητοποιητής και φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχομένων από εκχύλισμα φλοιού *P.halepensis* δεν εμφάνισε φωτοευαισθησία.

Η χορήγηση του φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχόμενου από φλοιό P.halepensis σε συγκέντρωση 100 μg/ml σε συνδυασμό με ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με την εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC και δόση ενέργειας 15 J διατήρησε τη θεραπευτική δράση της φωτοδυναμικής προφυλάσσοντας πλήρως από την παραμένουσα φωτοευαισθησία.

Μελέτες συνδυασμένης δράσης της φωτοδυναμικής με αντιοξειδωτικό συστατικό σε επίπεδο πειραματόζωου είναι σπάνιες στη βιβλιογραφία. Οι Melnikova et al^[14] ανέφεραν πως η συνδυασμένη δράση της φωτοδυναμικής με το υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E, Trolox, σε μοντέλο μυός αδενοκαρκινώματος, προκάλεσε μεγαλύτερη μείωση των όγκων σε σχέση με τη φωτοδυναμική μόνη της, ενισχύθηκε δηλαδή η δράση της φωτοδυναμικής. Μολονότι οι ερευνητές χορήγησαν τον ίδιο φωτοευαισθητοποιητή στην ίδια συγκέντρωση όπως και στην παρούσα ερευνητική εργασία, τα αποτελέσματα είναι διαφορετικά. Ο λόγος για αυτό αποδίδεται στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, οι Melnikova et al χορήγησαν καθαρή ουσία ενώ στην περίπτωση μας χορηγήθηκε μείγμα πολυφαινολών, στους διαφορετικούς χρόνους και συγκέντρωση χορήγησης ανάμεσα στις δύο μελέτες και στις διαφορετικές παραμέτρους δοσιμετρίας κατά τη φωτοδυναμική.

Κοινό χαρακτηριστικό των ελευθέρων ριζών και των δραστικών οξυγονούχων ειδών με τα αντιοξειδωτικά είναι η διπλή δράση τους. Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν καρκινογένεση αλλά και δρουν θεραπευτικά εναντίον του καρκίνου. Τα αντιοξειδωτικά μπορεί μεν να δρουν αντικαρκινικά, υπάρχουν περιπτώσεις ωστόσο που ενισχύουν την καρκινογένεση. Αυτό το εγγενές παράδοξο, η διπλή δράση των ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών έχει μελετηθεί και μάλλον διευκρινιστεί σε επίπεδο κυττάρου, σε επίπεδο οργανισμού ωστόσο οι ακριβείς μηχανισμοί που διέπουν αυτή τη διπλή δράση παραμένουν ασαφείς^[19]. Θεωρείται δεδομένο ωστόσο πως η συγκέντρωση είναι αυτή η οποία καθορίζει τη δράση των ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών.

Τα κύτταρα, υγιή ή καρκινικά, διαθέτουν εγγενείς και εξωγενείς αμυντικούς μηχανισμούς οι οποίοι διατηρούν την ισορροπία ανάμεσα στις ενδοκυττάρια ελεύθερες ρίζες / δραστικά οξυγονούχα είδη και στα αντιοξειδωτικά. Η ισορροπία αυτή δεν είναι στατική, αλλά δυναμική και μεταβάλλεται ανάλογα με το ερέθισμα το οποίο δέχεται το κύτταρο, με στόχο τη διατήρηση της ενδοκυττάριας ισορροπίας προ-οξειδωτικών αντιοξειδωτικών. Στα κύτταρα των καρκινικών όγκων μικρό οξειδωτικό ερέθισμα μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, επακόλουθα και αύξηση του καρκινικού όγκου, αλλά και να διεγείρει την αντιοξειδωτική τους άμυνα αυξάνοντας με τον

τρόπο αυτό την αντίστασή τους στις αντικαρκινικές θεραπείες που εκφράζονται μέσω οξειδωτικού στρες. Καθώς το επίπεδο των ελευθέρων ριζών μέσα σε αυτά αυξάνει καταλήγει το σύστημα σε μια κατάσταση ισορροπίας κατά την οποία η καταστροφική δράση των ελευθέρων ριζών αντισταθμίζεται από την προστατευτική δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αύξηση των ελευθέρων ριζών πέραν αυτού του επιπέδου ή καταστολή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών έχει ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο^[65].

Η εξάρτηση της δράσης του αντιοξειδωτικού από τη συγκέντρωση χορήγησής του καταγράφηκε και στα πειράματα στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, τόσο στην περίπτωση κατά την οποία το φυσικό μείγμα πολυφαινολών χορηγήθηκε μόνο του στους μύες όσο και κατόπιν συνδυασμού του με την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία. Ο συνδυασμός της φωτοδυναμικής με 1 mg/ml φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχόμενου από φλοιό *P.halepensis* περιόρισε τη δράση της φωτοδυναμικής στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη. Φαίνεται πως το μείγμα πολυφαινολών έδρασε ισχυρά αντιοξειδωτικά, δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά οξυγονούχα είδη, προϊόντα των φωτοχημικών αντιδράσεων τύπου I και II κατά τη φωτοδυναμική, αποτρέποντας με τον τρόπο αυτό την ενεργοποίηση μηχανισμών κυτταρικού θανάτου προς την ολοκληρωτική καταστροφή του καρκινικού όγκου. Χορήγηση χαμηλότερης συγκέντρωσης φυσικού μείγματος πολυφαινολών σε συνδυασμό με την ενδοϊστική φωτοδυναμική δράση, οδήγησε στην εξάλειψη του καρκινικού όγκου. Φαίνεται πως η συγκέντρωση αυτή δεν αρκούσε για να δεσμεύσει τα κυτταροτοξικά προϊόντα των αντιδράσεων τύπου I και II, και έτσι οι μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου έδρασαν χωρίς να συναντήσουν παραπάνω αντίσταση. Αναδεικνύεται ωστόσο χαρακτηριστικά η καθοριστική σημασία της συγκέντρωσης χορήγησης του φυσικού μείγματος πολυφαινολών στο τελικό θεραπευτικό αποτέλεσμα.

9.5.2.3

Δράση φυσικού μείγματος πολυφαινολών για τον περιορισμό της φωτοευαισθησίας

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής η άρση της παραμένουσας φωτοευαισθησίας αποτέλεσε έναν από τους στόχους οι οποίοι τέθηκαν.

Η σοβαρότερη παρενέργεια της φωτοδυναμικής θεραπείας, αποτέλεσμα της ενδοφλέβιας χορήγησης των φωτοευαισθητοποιητών, είναι η παραμένουσα φωτοευαισθησία. Τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή μέσω της κυκλοφορίας του αίματος συγκεντρώνονται στον καρκινικό όγκο, σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τους υγιείς ιστούς. Κατανέμονται ωστόσο σε όλα τα όργανα του σώματος. Τα όργανα εκείνα τα οποία

είναι εκτεθειμένα στη φωτοευαισθησία είναι τα εξωτερικά όργανα του σώματος, το δέρμα και οι οφθαλμοί. Η m-THPC είναι ένας φωτοευαισθητοποιητής με μεγάλη κβαντική απόδοση και μικρές, σχετικά, δόσεις ενέργειας αρκούν για την ενεργοποίηση της^[43]. Για το λόγο αυτό μόριά της τα οποία έχουν κατακρατηθεί από τα εξωτερικά όργανα μπορεί να διεγερθούν από το φυσικό φως προκαλώντας ερεθισμούς ή και βλάβες σε αυτά.

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα (PEGylated liposomes) m-THPC. Ο εγκλεισμός των φωτοευαισθητοποιητών σε λιποσώματα, κυρίως σε όσα στη δομή τους διαθέτουν και μόρια χοληστερόλης, αποτρέπει δέσμευσή τους από μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (RES) και ως αποτέλεσμα παρατείνει το χρόνο ζωής του φωτοευαισθητοποιητή στην κυκλοφορία του αίματος. Για να βελτιωθούν ακόμη περισσότερο οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες των λιποσωμάτων, η εξωτερική τους επιφάνεια καλύπτεται με υδρόφιλους υδρογονάνθρακες ή πολυμερή, όπως είναι η πολυαιθυλενογλυκόλη (polyethylene glycol (PEG)), τα οποία παρατείνουν ακόμη περισσότερο τον χρόνο κυκλοφορίας τους στον οργανισμό. Η PEG επίστρωση αποτρέπει την δέσμευση του λιποσώματος από τις πρωτεΐνες του αίματος και κατά συνέπεια μειώνει ακόμα περισσότερο την απομάκρυνσή τους από τα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Με παρατεταμένο χρόνο κυκλοφορίας μεγαλύτερη ποσότητα φωτοευαισθητοποιητή συγκεντρώνεται στον καρκινικό όγκο, καθώς τα λιποσώματα εισέρχονται σε αυτόν λόγω του φαινομένου της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης. Πέραν αυτού, περισσότερο χρόνο διατηρείται στην κυκλοφορία του αίματος ο εγκλεισμένος στα στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα φωτοευαισθητοποιητής, χωρίς να συσσωματώνεται (διατηρούνται συνεπώς ακέραιες οι φωτοδυναμικές του ιδιότητες) και χωρίς να απομακρύνεται από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού. Παρατείνεται συνεπώς η παρουσία του και ο χρόνος ζωής του και στους υγιείς ιστούς ανάμεσα στους οποίους και στα εξωτερικά όργανα του σώματος^[35, 57, 59, 65].

Οι μελέτες ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας στο μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη ανέδειξαν τη σοβαρότερη παρενέργεια της ενδοφλέβιας χορήγησης του φωτοευαισθητοποιητή, την παραμένουσα φωτοευαισθησία, η οποία εκδηλώθηκε αρχικά ως ερύθημα και οίδημα και εξελίχθηκε σε εκτεταμένη πληγή με αδυναμία επούλωσης. Είναι γνωστή η διττή συμπεριφορά των αντιοξειδωτικών, τα οποία ανάλογα με τη συγκέντρωση χορήγησής τους δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη ή δρουν προ-οξειδωτικά. Επιπλέον η συμπεριφορά τους διαφοροποιείται ανάλογα με το είδος του ιστού, υγιής ή καρκινικός, στον οποίο επιδρούν^[65, 93]. Για το σκοπό αυτό, για τη διερεύνηση της δυνατότητας ανάπτυξης μεθοδολογίας άρσης της παραμένουσας φωτοευαισθησίας, επιλέχθηκε φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχομένων από εκχύλισμα φλοιού

P.halepensis, το οποίο διαθέτει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, για να ελεγχθεί σε συνδυασμό με την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία. Το μείγμα χορηγήθηκε ενέσιμα μέσα στον καρκινικό όγκο στο μοντέλο μυός, ώστε να εξασφαλιστεί μέγιστη συγκέντρωσή του στον όγκο (αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες προ-οξειδωτικής δράσης του). Ο καρκινικός όγκος διέθετε πυκνότητα αγγειακό σύστημα, μέσω του οποίου θα γινόταν διάχυση του μείγματος και στον υπόλοιπο οργανισμό, σε μικρότερη συγκέντρωση από τη συγκέντρωση χορήγησής του. Για τη διερεύνηση της δυνατότητας δράσης ενάντια στη φωτοευαισθησία, του φυσικού μείγματος πολυφαινολών σε συνδυασμό με την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία, παρακολουθούνταν σχολαστικά οι ουρές των μυών για συμπτώματα φωτοευαισθησίας και λαμβάνονταν εικόνες μέσω του απεικονιστικού συστήματος.

Σημαντικότερη επίτευξη της χορήγησης του φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένων από εκχύλισμα φλοιού P.halepensis σε συνδυασμό με την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία ήταν η πλήρης άρση της παραμένουσας φωτοευαισθησίας. Κανένα ζώο στο οποίο χορηγήθηκε το φυσικό μείγμα πολυφαινολών και φωτοευαισθητοποιητής δεν εμφάνισε φωτοευαισθησία.

Πρώτη φορά καταγράφεται πλήρης ίαση καρκινικού όγκου προστάτη με συνδυασμένη δράση ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας με την εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC και φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένων από εκχύλισμα φλοιού P.halepensis με ταυτόχρονη πλήρη άρση της παραμένουσας φωτοευαισθησίας.

Τα αποτελέσματα της έρευνας είναι εξαιρετικά σημαντικά, καθώς επετεύχθη ταυτόχρονη νέκρωση του καρκινικού όγκου και άρση της παραμένουσας φωτοευαισθησίας στον υγιή ιστό. Η παρατήρηση αυτή είναι χαρακτηριστική της διττής δράσης των αντιοξειδωτικών καθώς για την ίδια συγκέντρωση φυσικού μείγματος πολυφαινολών παρατηρήθηκε διαφορετική απόκριση ανάμεσα στον καρκινικό και υγιή ιστό^[65]. Στον καρκινικό ιστό το εκχύλισμα ενδεχομένως προκάλεσε ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών ή μείωση της νεοαγγείωσης με αποτέλεσμα τη μείωση του καρκινικού όγκου. Στο υγιή δερματικό ιστό ωστόσο φαίνεται πως έδρασε αντιοξειδωτικά, δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη προϊόντα της ενεργοποίησης των κατακρατηθέντων από τον υγιή ιστό μορίων του φωτοευαισθητοποιητή από το φυσικό φως. Η συμπεριφορά αυτή είναι σύμφωνη με τη διττή φύση των αντιοξειδωτικών όπου σε χαμηλή συγκέντρωση διατηρούν την κυτταρική βιωσιμότητα ενώ αν ξεπεραστεί ένα ορισμένο κατώφλι ενεργοποιούν τον κυτταρικό θάνατο^[65, 93, 97]. Στην προκειμένη

περίπτωση, το φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχόμενου από φλοιό *P.halepensis* χορηγήθηκε ενέσιμα μέσα στον καρκινικό όγκο. Τα αποτελέσματα παρέχουν ενδείξεις πως μέσα στον καρκινικό όγκο, όπου η συγκέντρωσή του ήταν μεγαλύτερη, ανέπτυξε προ-οξειδωτική / αποπτωτική δράση, ενώ κλάσμα αυτού, το οποίο μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρθηκε στο σώμα του μύος, έδρασε αντιοξειδωτικά, δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες και δραστικά οξυγονούχα είδη τα οποία δημιουργήθηκαν από διέγερση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή, τα οποία κατακρατήθηκαν από τον υγιή ιστό, από το φυσικό φως.

9.6

Καινοτομικότητα - Προοπτική

Τα αιτήματα-στόχοι οι οποίοι τέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ήταν:

1. **Η βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής δράσης.**

Για επίτευξη του σκοπού αυτού επιλέχθηκαν καινοτόμες μεθοδολογίες στην αιχμή της σύγχρονης επιστημονικής έρευνας:

- **Οι εγκλεισμένοι σε νανοσωματίδια φωτοευαισθητοποιητές:** τεχνολογική εξέλιξη των τελευταίων ετών προς την κατεύθυνση άρσης των προβλημάτων που δημιουργεί η υδρόφοβη φύση των περισσοτέρων φωτοευαισθητοποιητών. Ο εγκλεισμός των φωτοευαισθητοποιητών σε νανοσωματιδιακά συστήματα μεταφοράς θεωρείται πως αποτρέπει τη συσσωμάτωση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή, διατηρεί την κβαντική του απόδοση και αυξάνει την συγκέντρωσή του στον καρκινικό όγκο. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής επιλέχθηκε ο αποδοτικότερος φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς η 5,10,15,20-τέτρα(3-υδροξυφαινυλ)χλωρίνη (5,10,15,20- tetrakis(3-hydroxyphenyl) chlorin, m-THPC ή Temoporfin), εγκλεισμένη στο αποτελεσματικότερο νανοσωματιδιακό σύστημα μεταφοράς, σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα. Οι φωτοφυσικές και φωτοδυναμικές της ιδιότητες μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν με την ελεύθερη m-THPC. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν την υπεροχή της εγκλεισμένης σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC καθώς με αυτή επετεύχθη μεγαλύτερη ενδοκυττάρια συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή, γεγονός στο οποίο αποδίδονται τα μεγαλύτερα ποσοστά

κυτταρικού θανάτου που επέφερε η φωτοδυναμική δράση με την εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC.

Ο εγκλεισμός της m-THPC σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα αύξησε την ενδοκυττάρια συγκέντρωση και ενίσχυσε τη φωτοδυναμική δράση της m-THPC στην καρκινική σειρά κυττάρων του προστάτη LNCaP. Μικρότερη συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιητή απαιτήθηκε για να επιτευχθεί ικανοποιητική φωτοδυναμική νέκρωση του καρκινικού στόχου. Η μελέτη στα πλαίσια της παρούσας διατριβής παρέχει στοιχεία πως η χρήση ναοφωτοευαισθητοποιητών μπορεί να βελτιστοποιήσει τη φωτοδυναμική δράση.

Παρουσιάζει συνεπώς ενδιαφέρον να αναπτυχθούν μεθοδολογίες εγκλεισμού φωτοευαισθητοποιητών σε ναοσωματιδιακά συστήματα μεταφοράς καθώς υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις πως με την τεχνική αυτή βελτιώνονται οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες και διατηρούνται τα φωτοφυσικά χαρακτηριστικά των φωτοευαισθητοποιητών, γεγονός το οποίο ενισχύει τη φωτοδυναμική δράση.

- ▶ **Η συνέργεια της φωτοδυναμικής δράσης με παράγοντες οι οποίοι μεταβάλλουν την ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία:** Για να προκληθεί κυτταρικός θάνατος πρέπει να ενδοκυττάρια επίπεδα ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών να υπερβούν το κατώφλι δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, πέραν του οποίου ο κυτταρικός θάνατος είναι μη αναστρέψιμος. Καθοριστικής σημασίας είναι η τελική συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών η οποία εξαρτάται από την ισορροπία των ενδογενών ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών, των ROS που παράγονται από τη θεραπεία και της ικανότητας των καρκινικών κυττάρων να ανταγωνίζονται τους οξειδωτικούς μηχανισμούς. Τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται μεθοδολογίες δράσης σε συνέργεια με αντικαρκινικές θεραπείες με στόχο είτε την καταστολή της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας, ώστε να μειωθεί η αντίσταση απέναντι στην αντικαρκινική θεραπεία, είτε την αύξηση των ενδοκυττάρια ελευθέρων ριζών χορηγώντας αντιοξειδωτικές ουσίες σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις.

Η έρευνα η οποία υλοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής περιελάμβανε τη μελέτη της δυνατότητας συνέργειας της φωτοδυναμικής τόσο με τη ρήξη της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας, η οποία επετεύχθη με τη χορήγηση του αναστολέα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης BSO, όσο και με την προ-οξειδωτική δράση αντιοξειδωτικών ουσιών, η οποία επετεύχθη με τη χορήγηση μείγματος

πολυφαινολών προερχομένου από εκχύλισμα φλοιού *P.halepensis* σε μοντέλο κυττάρου. Τα αποτελέσματα παρείχαν στοιχεία πως και οι δυο προσεγγίσεις έδρασαν σε συνέργεια με τη φωτοδυναμική θεραπεία στο μοντέλο κυττάρου καρκίνου του προστάτη καθώς αυξήθηκαν τα ποσοστά κυτταρικού θανάτου σε σχέση με αυτά που η φωτοδυναμική είχε επιφέρει.

Σημαντικότητα συμβολή της έρευνας στην κατεύθυνση βελτιστοποίησης της φωτοδυναμικής δράσης είναι η ανάπτυξη δυο μεθοδολογιών οι οποίες δρουν μεταβάλλοντας την ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική ισορροπία και ενισχύουν την κυτταροτοξικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Η προσέγγιση αυτή θα μπορούσε να επεκταθεί και στις υπόλοιπες αντικαρκινικές θεραπείες, οι οποίες δρουν μέσω οξειδωτικού στρες, ενισχύοντας τη δράση τους.

2. Η επέκταση της φωτοδυναμικής δράσης σε καρκινικούς όγκους τριών διαστάσεων εν τω βάθει.

Στην κατεύθυνση αυτή αξιοποιήθηκαν οι πλέον σύγχρονες τεχνολογικές στο πεδίο της φωτοδυναμικής δράσης: ο αποδοτικότερος φωτοευαίσθητοποιητής δεύτερης γενιάς, η m-THPC, εγκλεισμένος σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα και σύστημα ενδοϊστικής μεταφοράς φωτός διέγερσης διοδικού laser με στόχο την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνου του προστάτη.

*Τα αποτελέσματα της έρευνας τα πλαίσια της διατριβής είναι ιδιαίτερα σημαντικά καθώς για πρώτη φορά αναφέρεται **πλήρης ίαση** καρκινικού όγκου του προστάτη σε μοντέλο μυός μετά από ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με την εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC. Η αξία των αποτελεσμάτων ενισχύεται από το γεγονός ότι **δεν παρατηρήθηκε επανεμφάνιση του όγκου** για διάστημα δυο μηνών μετά τη θεραπεία και από την **πλήρη αισθητική και λειτουργική αποκατάσταση** του δέρματος στην περιοχή του όγκου. Τα αποτελέσματα είναι εξαιρετικά σημαντικά καθώς στη βιβλιογραφία δεν απαντώνται περιπτώσεις πλήρους ίασης, αναφέρονται μόνο ποσοστά νέκρωσης του όγκου, τα οποία εκτιμώνται με ιστοπαθολογική εξέταση τομών του όγκου 24 h μετά τη θεραπεία, θυσιάζοντας το πειραματόζωο.*

Η ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία με την εγκλεισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα m-THPC θεράπευσε καρκινικό όγκο προστάτη σε μοντέλο πειραματόζωου και έχει την προοπτική να αξιοποιηθεί για τη θεραπεία και άλλων καρκινικών όγκων σε εσωτερικά όργανα

3. Η άρση της σοβαρότερης παρενέργειας της φωτοδυναμικής, της παραμένουσας φωτοευαισθησίας.

Για το σκοπό αυτό, για τη διερεύνηση της δυνατότητας ανάπτυξης μεθοδολογίας άρσης της παραμένουσας φωτοευαισθησίας, επιλέχθηκε φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχομένων από εκχύλισμα φλοιού *P.halepensis*, το οποίο διαθέτει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, για να ελεγχθεί σε συνδυασμό με την ενδοϊστική φωτοδυναμική θεραπεία σε μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη.

*Η συμβολή της παρούσας διατριβής στην κατεύθυνση άρσης της παραμένουσας φωτοευαισθησίας είναι σημαντικότερη. Πρώτη φορά καταγράφεται πλήρης ίαση καρκινικού όγκου προστάτη μετά από συνδυασμένη δράση της ενδοϊστικής φωτοδυναμικής θεραπείας και του φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένου από εκχύλισμα φλοιού *P.halepensis* με ταυτόχρονη πλήρη άρση της παραμένουσας φωτοευαισθησίας.*

Το φυσικό μείγμα πολυφαινολών προερχομένου από φλοιό *P.halepensis* θα μπορούσε να αξιοποιηθεί και στην περίπτωση άλλων θεραπειών καρκίνου που δρουν μέσω ελευθέρων ριζών αίροντας τις παρενέργειές τους ή βελτιώνοντας τη δράση τους.

4. Η μελέτη της δράσης φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένου από φλοιό *P.halepensis* σε βιολογικά μοντέλα καρκίνου του προστάτη.

Η μελέτη της δράσης του φυσικού μείγματος πολυφαινολών πραγματοποιήθηκε σε μοντέλο κυττάρου αλλά και σε μοντέλο μυός καρκίνου του προστάτη.

*Από τις μελέτες στα πλαίσια της παρούσας διατριβής αποτυπώνεται για πρώτη φορά η κυτταροτοξική δράση φυσικού μείγματος πολυφαινολών προερχομένου από φλοιό *P.halepensis*, σε κύτταρα της καρκινικής σειράς κυττάρων του προστάτη LNCaP, παρέχοντας ενδείξεις αντικαρκινικής δράσης του μείγματος σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις.*

Επιπλέον αποτυπώνεται πως το φυσικό μείγμα πολυφαινολών μπορεί να καθυστερήσει σημαντικά την αύξηση καρκινικού όγκου του προστάτη. Είναι δε η πρώτη αναφορά της προληπτικής/θεραπευτικής δράσης φυσικών μειγμάτων πολυφαινολών προερχομένων από συστατικά πεύκων στην περίπτωση καρκίνου του προστάτη.

Η παρατήρηση ανοίγει νέες προοπτικές ανάπτυξης σκευασμάτων στην κατεύθυνση της πρόληψης και του ελέγχου της εξέλιξης της νόσου.

Βιβλιογραφία

1. Juarranz Á, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol*. 2008;10:148-154.
2. Yano S, Hirohara S, Obata M, Hagiya Y, Ogura S, Ikeda A, Kataoka H, Tanaka M, Joh T. Current states and future views in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* 2011;12:46– 67.
3. Pervaiz S, Olivo M. Art and science of Photodynamic Therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33(5-6):551-6
4. Allison RR, Mota HC, Sibata CH. Clinical PD/PDT in North America: A historical review. *Photodiagn Photodynam Ther*. 2004;1:263-277.
5. Svanberg K, Bendsoe N, Axelsson J, Andersson-Engels S, Svanberg S. Photodynamic therapy: superficial and interstitial illumination. *J Biomed Opt*. 2010;15(4):041502.
6. MacDonald IJ, Dougherty TJ. Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyrins Phthalocyanines* 2001;5:105–129.
7. Plaetzer K, Krammer B., Berlanda J, Berr F., Kiesslich T., Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. *Lasers Med Sci* 2009;24:259–268.

8. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA Cancer J Clin* 2011;61:250–281.
9. Anand S, Ortel BJ, Pereira SP, Hasan T, Maytin EV. Biomodulatory approaches to photodynamic therapy for solid tumors. *Cancer Lett.* 2012;326(1):8-16
10. Hopper C, Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol* 2000;1:212–19.
11. Dougherty TJ, Comer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q. Photodynamic Therapy. *J Nat Cancer Inst.* 1998;90(12):889-905.
12. Prasad PN. Introduction to biophotonics. Wiley, Hoboken 2003.
13. Enderle JD, Blanchard SM, Bronzino JD. Introduction to Bio-Engineering. Academic Press 2000
14. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn Photodynam Ther.* 2004;1:279—293.
15. Wilson BC, Patterson MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.* 2008;53(9):R61–R109.
16. Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Role of Activated Oxygen Species in Photodynamic Therapy. *Methods Enzymol.* 2000;319:376-400.
17. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B.* 1997;39(1):1-18.
18. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1776(1):86-107.
19. DeRosa MC, Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev.* 2002;233-234:351-371.
20. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd edition., Oxford University Press, Oxford, 1999
21. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part three—photosensitizers, pharmacokinetics, biodistribution tumor localization, and modes of tumor destruction. *Photodiagn Photodynam Ther.* 2005;2:91—106.

22. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers*. 2011;3(2):2516-2539
23. 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;96(1):1-8
24. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagn Photodynam Ther*. 2005;2:1—23.
25. Chiaviello A, Postiglione I, Palumbo G. Targets and Mechanisms of Photodynamic Therapy in Lung Cancer Cells: A Brief Overview. *Cancers*. 2011;3(1):1014-1041.
26. Kessel D, Reiners JJ Jr. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochem Photobiol*. 2007; 83(5):1024-8.
27. Mojzisova H, Bonneau S, Brault D. Structural and physico-chemical determinants of the interactions of macrocyclic photosensitizers with cells *Eur Biophys J*. 2007;36:943–953.
28. Marchal S, François A, Dumas D, Guillemain F, Bezdetnaya L. Relationship between subcellular localisation of Foscan and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells. *Br J Cancer*. 2007;96(6):944-51.
29. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci*. 2002;1:1–21.
30. Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1704(2):59-86 4.
31. Nowis D, Makowski M, Stokłosa T, Legat M, Issat T, Gołab J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol*. 2005;52(2):339-52,
32. Kessel D, Reiners JJ Jr. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochem Photobiol*. 2007;83(5):1024-8.
33. Nowis D, Stokłosa T, Legat M, Issat T, Jakóbsiak M, Gołab J. The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagn Photodynam Ther* 2005;2:283—298.
34. Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(15):1627-37
35. Paszko E, Ehrhardt C, Senge MO, Kelleher DP, Reynolds JV. Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagn Photodynam Ther*. 2011;8(1):14-29.

36. Kimani SG, Phillips JB, Bruce JI, MacRobert AJ, Golding JP. Antioxidant Inhibitors Potentiate the Cytotoxicity of Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol*, 2012;88:175–187
37. Postiglione I, Chiaviello A, Palumbo G. Enhancing Photodynamic Therapy Efficacy by Combination Therapy: Dated, Current and Oncoming Strategies. *Cancers*. 2011;3(2):2597-2629.
38. Lang K, Mosinger J, Wagnerová DM. Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coord Chem Rev*. 2004;248(3-4):321-350.
39. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2009;85(5):1053-74.
40. Bonnet R, Martinez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* 2001;57:9513-9547.
41. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu XH, Childs CJH, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2004;1:27—42.
42. Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2010;7:61—75.
43. Detty M, Gibson S, Wagner S. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem* 2004;47:3897-3915.
44. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2007;21(3):293-302.
45. Senge MO, Brandt JC., Temoporfin (Foscan, 5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)—A Second-generation Photosensitizer. *Photochem Photobiol*, 2011;87:1240–1296.
46. Chen Y, Li L, Zhang M, Shen T. An explanation to the high efficiency of m-THPC (temporfin) used in photodynamic therapy. *Chin. Sci. Bull*. 2001;46(10):823-827.
47. Lassalle HP, Wagner M, Bezdetnaya L, Guillemin F, Schneckenburger H, Fluorescence imaging of Foscan and Foslip in the plasma membrane and in whole cells. *J Photochem Photobiol B*. 2008;92(1):47-53
48. D'Cruz AK, Robinson MH, Biel MA. mTHPC-mediated photodynamic therapy in patients with advanced, incurable head and neck cancer: A multicenter study of 128 patients. *Head Neck*. 2004;26(3):232-40.

49. Lorenz KJ, Maier H. Photodynamic therapy with meta-tetrahydroxyphenylchlorin (Foscan®) in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck: experience with 35 patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009;266:1937-1944.
50. Hopper C, Ubler AK, Lewis H, Tan IB, Putnam G. mTHPC-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*. 2004;111:138-146.
51. Moore CM, Nathan TR, Lees WR, Mosse CA, Freeman A, Emberton M, Bown SG. Photodynamic therapy using meso tetra hydroxy phenyl chlorin (mTHPC) in early prostate cancer. *Lasers Surg Med*. 2006;38(5):356-63.
52. Teiten MH, Bezdetnaya L, Morlière P, Santus R, Guillemin F. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localization in cultures tumor cells", *Br J Cancer*, 2003;88(1):146-152.
53. Kudinovaa NV, Berezova TT. Photodynamic therapy of cancer: search for ideal photosensitizer. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2010;4(1):95-103.
54. Juzeniene A, Peng Q, Moan J. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem Photobiol Sci*. 2007;6(12):1234-45.
55. Nowis D, Makowski M, Stokłosa T, Legat M, Issat T, Gołab J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol*. 2005;52(2):339-52.
56. Stewart F, Baas P, Star W. What does photodynamic therapy have to offer radiation oncologists (or their cancer patients)? *Radiother Oncol*. 1998;48(3):233-48.
57. Bechet D, Couleaud P, Frochot C, Viriot ML, Guillemin F, Barberi-Heyob M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol*. 2008;26(11):612-21.
58. Wojtyk JTC, Goyan R, Gudgin-Dickson E, Pottier R. Exploiting tumour biology to develop novel drug delivery strategies for PDT. *Med Laser Appl* 2006;21:225-238.
59. Johnston APR, Such GK, Leen Ng S, Caruso F, Challenges facing colloidal delivery systems: From synthesis to the clinic. *Curr Opin Colloid In* 2011;16:171-181.
60. Derycke AS, de Witte PA. Liposomes for photodynamic therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56(1):17-30.
61. Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int. J. Pharm* 1997;154:123-140

62. Vemuri S, Rhodes CT Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv.* 1995;70(2):95-111.
63. Brandl M. Liposomes as drug carriers: a technological approach. *Biotechnol Annu Rev.* 2001;7:59-85.
64. Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr Drug Deliv.* 2007;4(4):297-305.
65. Jin CS, Zheng G. Liposomal Nanostructures for Photosensitizer Delivery. *Lasers Surg Med.* 2011;43(7):734-48.
66. Elizondo E, Moreno E, Cabrera I, Córdoba A, Sala S, Veciana J, Ventosa N. Liposomes and other vesicular systems: structural characteristics, methods of preparation, and use in nanomedicine. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2011;104:1-52.
67. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(2):145-60.
68. Brancalion L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2002;17(3):173-86.
69. Alexiades-Armenakas M. Laser-mediated photodynamic therapy. *Clin Dermatol.* 2006;24(1):16-25
70. Serway RA, Moses CJ, Moyer CA. Σύγχρονη Φυσική, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2000
71. MacRobert AJ, Theodossiou T. Chemical Applications of Lasers | Photodynamic Therapy of Cancer. *Encyclopedia of Modern Optics*, 2005, 53–62.
72. Mang TS. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiag Photodyn Ther* 2004;1(1):43—48.
73. De Jode ML, McGilligan JA, Dilkes MG, Cameron I, Hart PB, Grahn MF. A Comparison of Novel Light Sources for Photodynamic Therapy. *Lasers Med Sci.* 1997;12(3):260-8
74. Bajic DM, Reichert KW, Martin T, Meyer G, Whelan H. Light-emitting Diodes as a Light Source for Intraoperative Photodynamic Therapy. *Neurosurgery.* 1996;38(3):552-6.
75. Haken H. Laser Light Dynamics. vol 2. North-Holland Physics Publishing, 1985
76. Kubler AC. Photodynamic Therapy. *Med Laser Appl*, 2005;20:37-45.
77. Zhu TC, Finlay JC. Prostate PDT dosimetry. *Photodiag Photodyn Ther.* 2006;3(4):234—246

78. Sean R H Davidson et all. Treatment planning and dose analysis for interstitial photodynamic therapy of prostate cancer. *Phys. Med. Biol.* 2009;54:2293-2313.
79. Johansson A, Axelsson J, Andersson-Engels S, Swartling J. Realtime light dosimetry software tools for interstitial photodynamic therapy of the human prostate. *Med Phys.* 2007;34(11):4309-21.
80. Ortega AL, Mena S, Estrela JM. Glutathione in Cancer Cell Death. *Cancers.* 2011;3(1):1285-1310
81. Wang J, Yi J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(12):1875-84
82. Manda G, Nechifor MT, Neagu TM. Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies. *Curr Chem Biol.* 2009;3:342-366.
83. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci* 2008;4(2):89-96.
84. Valko M, Izakovic I, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004;266(1-2):37-56.
85. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1-40.
86. Sorg O. Oxidative stress: A theoretical model or a biological reality? *C R Biol.* 2004;327(7):649-62.
87. Sies H. Oxidative Stress: From basic research to clinical application, *Am J Med.* 1991;91(3C):31S-38S
88. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 2004;61(3):461-470.
89. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006;141(2):312-22.
90. Δημόπουλος KA, Αντωνοπούλου Σ. Βασική Βιοχημεία, Αθήνα 2009
91. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Cronin. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.

92. Oberley TD, Oberley LW. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol.* 1997;12(2):525-35.
93. Korkina LG, De Luca C, Kostyuk VA, Pastore S. Plant Polyphenols and Tumors: From Mechanisms to Therapies, Prevention, and Protection Against Toxicity of Anti-Cancer Treatments. *Curr Med Chem.* 2009;16(30):3943-65
94. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(11):1439-52.
95. Duthie G, Gardner P, Kyle J. Plant polyphenols: are they the new magic bullet?". *Proceedings of the Nutrition Society.* 2003;62:599-603.
96. Blokhina O, Virolainen E, Facerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 2003; 91(2):179-194.
97. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* 2011; 82(4):513-23
98. Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys.* 2008;476(2):107-12.
99. Skibola CF, Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med.* 2000;(3-4):375-83.
100. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1-2):42-59.
101. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(5-6):1019-26.
102. Schafer QS, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(11):1191-212.
103. Haddad JJ, Harb HL. L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? *Mol Immunol.* 2005;42(9):987-1014.
104. Circu ML, Aw TY. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823(10):1767-77
105. Zhang SJ, Sun D, Hao JB, Wei YF, Yin LF, Liu X. The effect of dietary soyabean isoflavones on photodynamic therapy in K562 leukemia cells. *J Photochem Photobiol B.* 2012;110:28-33.

106. Armstrong JS, Steinauer KK, Hornung B, Irish JM, Lecane P, Birrell GW, Peehl DM, Knox SJ. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ*. 2002;9(3):252-63
107. Jiang F, Robin AM, Katakowski M, Tong L, Espiritu M, Singh G, Chopp M. Photodynamic therapy with photofrin in combination with Buthionine Sulfoximine (BSO) of human glioma in the nude rat. *Lasers Med Sci* 2003;18(3):128-33.
108. Chen Z, Woodburn KW, Shi C, Adelman DC, Rogers C, Simon DI. Photodynamic Therapy With Motexafin Lutetium Induces Redox-Sensitive Apoptosis of Vascular Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(5):759-64
109. Wright KE, MacRobert AJ, Phillips JB. Inhibition of Specific Cellular Antioxidant Pathways Increases the Sensitivity of Neurons to Meta-tetrahydroxyphenyl Chlorin-Mediated Photodynamic Therapy in a 3D Co-culture Model. *Photochem Photobiol*. 2012;88(6):1539-45
110. Al-Sherbini El-S, El Noury AH, El Roubay MN, Ibrahima T. Vitamin E (a-tocopherol) enhances the PDT action of hematoporphyrin derivatives on cervical cancer cells. *Med Laser Appl*. 2009;24(1):65-73
111. Melnikova V, Bezdetnaya L, Belitchenko I, Potapenko A, Merlin JL, Guillemin F. Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-sensitized photodynamic damage of cultured tumor and normal cells in the presence of high concentrations of a-tocopherol. *Cancer Lett*. 1999;139(1):89-95.
112. Kramarenko GG, Wilke WW, Dayal D, Buettner GR, Schafer FQ, Ascorbate enhances the toxicity of the photodynamic action of Verteporfin in HL-60 cells. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(9):1615-27.
113. Martirosyan AS, Vardapetyan HR, Tiratsuyan SG, Hovhannisyan AA. Biphasic dose-response of antioxidants in hypericin-induced photohemolysis. *Photodiagn Photodynam Ther* 2011;8:282-87.
114. Melnikova VO, Bezdetnaya L, Brault D, Potapenko AY, Guillemin F. Enhancement of meta-tetrahydroxyphenylchlorin-sensitized photodynamic treatment on human tumor xenografts using a water-soluble vitamin E analogue, Trolox. *Int J Cancer*. 2000;88(5):798-803.
115. Martin NE, Hahn SM. Interstitial photodynamic therapy for prostate cancer: a developing modality. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2004;1:123-136.
116. Moore KL. Κλινική ανατομία Ι. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 3η έκδοση, 1998

117. Selman SH. Photodynamic therapy for prostate cancer: One urologist's perspective. *Photodiagn Photodyn Ther* 2007; 4:26-30.
118. Aronson WJ, deKernion JB. Prostate. *Encyclopedia of Gerontology* 2nd Ed, Elsevier, 2007, 391-399.
119. Netter FH. Άτλας βασικών ιατρικών επιστημών. Ανατομία του Ανθρώπου. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 3η έκδοση, 2003.
120. Borofsky MS, Ito T, Rosenkrantz AB, Taneja SS. Focal therapy for prostate cancer -where are we in 2011? *Ther Adv Urol.* 2011;3(4):183-192.
121. Damder JE, Aus G. Prostate Cancer. *Lancet.* 2008;371:1710-1721.
122. Johnson JJ, Bailey HH, Mukhtar H. Green tea polyphenols for prostate cancer chemoprevention: A translational perspective. *Phytomedicine.* 2010;17(1):3-13.
123. Colin P, Mordon S, Nevoux P, Feras Marqa M, Ouzzane A, Puech P, Bozzini G, Leroux B, Villers A, Betrouni N. Focal Laser Ablation of Prostate Cancer: Definition, Needs, and Future. *Adv Urol.* 2012;2012:589160.
124. Eggener S, Salomon G, Scardino PT, De la Rosette J, Polascik T, Brewster S. Focal Therapy for Prostate Cancer: Possibilities and Limitations. *Eur Urol.* 2010;58:57-64
125. Kumar V, Anderson J. Prostate Cancer. The Medicine Publishing Company, 2002
126. Moore CM, Emberton M, Bown SG. Photodynamic Therapy for Prostate Cancer-An Emerging Approach for Organ-Confined Disease. *Lasers Surg Med.* 2011;43(7):768-775.
127. Lecornet E, Moore C, Ahmed HU, Emberton M. Focal therapy for prostate cancer: Fact or fiction?. *Urol Oncol.* 2010;28(5):550-556.
128. Moore C. M, Pendse D, Emberton M. Photodynamic therapy for prostate cancer-a review of current status and future promise. *Nat Clin Pract Urol.* 2009;6(1):18-30.
129. 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;18(3):219-232.
130. Taylor DL, Salmon ED. Basic Fluorescence Microscopy. In: Wang YL, Taylor DL. Fluorescence Microscopy of living cells in culture Part A, Fluorescent Analogs, Labeling Cells and Basic Microscopy. *Methods Cell Biol.* 1989;29:207-237

131. <http://www.olympusmicro.com/primer/echniques/fluorescence/anatomy/fluoromicroanatomy.html>
132. Waters JC. Live-Cell Fluorescence Imaging. *Methods Cell Biol.* 2007;81:115-40.
133. <http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/livecellmaintenance.html>
Maintaining Live Cells on the Microscope Stage
134. Kyriazi M, Yova D, Rallis M, Lima A. Cancer chemopreventive effects of Pinus Maritima bark extract on ultraviolet radiation and ultraviolet radiation-7,12,dimethylbenz(a)anthracene induced skin carcinogenesis of hairless mice. *Cancer Lett.* 2006;237(2):234-41
135. Guri A, Kefalas P, Roussis V. Antioxidant Potential of Six Pine Species. *Phytother. Res.* 2006;20:263-266
136. Senge MO. mTHPC - A drug on its way from second to third generation photosensitizer? *Photodiagn Photodyn Ther* 2012;9:170-179
137. Mitra S, Foster TH. Photophysical Parameters, Photosensitizer Retention and Tissue Optical Properties Completely Account for the Higher Photodynamic Efficacy of meso-Tetra-Hydroxyphenyl-Chlorin vs Photofrin. *Photochem Photobiol* 2005;81(4) 849-859.
138. Reshetov V, Zorin V, Siupa A, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L. Interaction of Liposomal Formulations of Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (Temoporfin) with Serum Proteins: Protein Binding and Liposome Destruction. *Photochem Photobiol.* 2012;88(5):1256-64.
139. Pegaza B, Debeve E, Ballini JP, et al. Photothrombic activity of m-THPC-loaded liposomal formulations: Pre-clinical assessment on chick chorioallantoic membrane model. *Eur J Pharm Sci.* 2006;28(1-2):134-140.
140. Hofman JW, Carstens MG, van Zeeland F, et al. Photocytotoxicity of mTHPC (Temoporfin) Loaded Polymeric Micelles Mediated by Lipase Catalyzed Degradation. *Pharm. Res.* 2008;25(9):2065-2073
141. Kachatkou D, Sasnouski S, Zorin V, et al. Unusual Photoinduced Response of mTHPC Liposomal Formulation (Foslip). *Photochem Photobiol.* 2009;85(3):719-724
142. Gyenge EB, Hiestand S, Graefe S, Walt H, Maake C. Cellular and molecular effects of the liposomal mTHPC derivative Foslipos in prostate carcinoma cells in vitro. *Photodiagn Photodyn Ther* 2011;8(2):86-96.

143. de Visscher SA, Kaščáková S, de Bruijn HS, et al. Fluorescence Localization and Kinetics of mTHPC and Liposomal Formulations of mTHPC in the Window-Chamber Tumor Model. *Lasers Surg Med* 2011;43(6):528–536
144. Kuntsche J, Freisleben I, Steiniger F, Fahr A. Temoporfin-loaded liposomes: Physicochemical characterization. *Eur J Pharm Sci* 2010;40(4):305–315.
145. Nawalany K, Rusin A, Kepczynski M, et al. Comparison of photodynamic efficacy of tetraarylporphyrin pegylated or encapsulated in liposomes: In vitro studies. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2009;97:8–17.
146. Belitchenko I, Melnikova V, Bezdetnaya L, et al. Characterization of Photodegradation of Meta-tetra (Hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC) in Solution: Biological Consequences in Human Tumor Cells. *Photochem Photobiol* 1998;67(5):584-590.
147. Kascakova S, Kruijt B, de Bruijn HS, et al. Ex vivo quantification of mTHPC concentration in tissue: Influence of chemical extraction on the optical properties. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2008;91(2-3):99–107.
148. Swartling J, Axelsson J, Ahlgren G, Kalkner KM, Nilsson S, Svanberg S, Svanberg K, Andersson-Engels S. System for interstitial photodynamic therapy with online dosimetry: first clinical experiences of prostate cancer. *J Biomed Opt.* 2010 Sep-Oct;15(5):058003. doi: 10.1117/1.3495720.
149. Du KL, Mick R, Busch TM, Zhu TC, Finlay JC, Yu G, Yodh AG, Malkowicz SB, Smith D, Whittington R, Stripp D, Hahn SM. Preliminary results of interstitial motexafin lutetium-mediated PDT for prostate cancer. *Lasers Surg Med.* 2006;38(5):427-34.
150. Lim CK, Heo J, Shin S, Jeong K, Seo YH, Jang WD, Park CR, Park SY, Kim S, Kwon IC. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. *Cancer Lett.* 2012 <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.09.012>
151. Allison RR, Mota HC, Bagnato VS, Sibata CH. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy--state of the art review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2008;1:19-28.
152. Konan YN, Gurny R, Allémann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2002;66(2):89-106.
153. Petri A, Yova D, Alexandratou E, Kyriazi M, Rallis M. Comparative characterization of the cellular uptake and photodynamic efficiency of Foscan® and Fospeg in a human prostate cancer cell line. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2012;(9)4:344–354
154. Yow CMN, Chen JY, Mak NK, Gheung NH, Leung AWN. Cellular uptake, subcellular localization and photodamaging effect of temoporfin (mTHPC) in nasopharyngeal

- carcinoma cells: comparison with hematoporphyrin derivative. *Cancer Lett.* 2000;157(2):123-31.
155. Marchal S, François A, Dumas D, Guillemin F, Bezdetnaya L. Relation between subcellular localization of Foscan and caspase activation in photosensitized MCF-7 cells. *Br J Cancer.* 2007;96:944-951
156. Kiesslich T, Berlanda J, Plaetzer K, Krammer B, Berr F. Comparative characterization of the efficiency and cellular pharmacokinetics of Foscan- and Foslip-based photodynamic treatment in human biliary tract cancer cell lines. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2007;6:619-627
157. Berland J, Kiesslich T, Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K, Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2010;100(3):173-180.
158. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010;49(11):1603-16.
159. Bovis MJ, Woodhams JH, Loizidou M, Scheglmann D, Bown SG, MacRobert AJ. Improved in vivo delivery of m-THPC via pegylated liposomes for use in photodynamic therapy. *J Control Release.* 2012;157(2):196-205.
160. Foster TH, Murant RS, Bryant RG, Knox RS, Gibson SL, Hilf R. Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy. *Radiat Res.* 1991;126(3):296-303.
161. Henderson BW, Busch TM, Snyder JW. Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms. *Lasers Surg Med.* 2006;38(5):489-93.
162. Jarvi MT, Niedre MJ, Patterson MS, Wilson BC. The influence of oxygen depletion and photosensitizer triplet-state dynamics during photodynamic therapy on accurate singlet oxygen luminescence monitoring and analysis of treatment dose response. *Photochem Photobiol.* 2011;87(1):223-34
163. Menezes PFC, Melo CAS, Bagnato VS, Imasato H, Perussi JR. Spectroscopic Studies of Photobleaching and Photoproduct of the Photosensitizer Photogem during Intense Illumination. *Laser Phys.* 2004;14(9):1214-18
164. Balendiran GK, Dabur R, Fraser D. The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem Funct.* 2004;22(6):343-52.
165. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Sep 17. pii: S0304-4165(12)00263-2. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008. [Epub ahead of print]

166. Marengo B, De Ciucis C, Verzola D, Pistoia V, Raffaghello L, Patriarca S, Balbis E, Traverso N, Cottalasso D, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C. Mechanisms of BSO (L-buthionine-S,R-sulfoximine)-induced cytotoxic effects in neuroblastoma. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(3):474-82.
167. Furfaro AL, Macay JR, Marengo B, Nitti M, Parodi A, Fenoglio D, Marinari UM, Pronzato MA, Domenicotti C, Traverso N. Resistance of neuroblastoma GI-ME-N cell line to glutathione depletion involves Nrf2 and heme oxygenase-1. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(2):488-96.
168. Speciale A, Anwar S, Ricciardi E, Chirafisi J, Saija A, Cimino F. Cellular adaptive response to glutathione depletion modulates endothelial dysfunction triggered by TNF- α . *Toxicol Lett.* 2011;207(3):291-7.
169. Lee HR, Cho JM, Shin DH, Yong CS, Choi HG, Wakabayashi N, Kwak MK. Adaptive response to GSH depletion and resistance to L-buthionine-(S,R)-sulfoximine: involvement of Nrf2 activation. *Mol Cell Biochem.* 2008;318(1-2):23-31.
170. Krifka S, Hiller KA, Spagnuolo G, Jewett A, Schmalz G, Schweikl H. The influence of glutathione on redox regulation by antioxidant proteins and apoptosis in macrophages exposed to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Biomaterials.* 2012;33(21):5177-86
171. You BR, Park WH. Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase. *Toxicol In Vitro.* 2010;24(5):1356-62.
172. D'Alessio M, Cerella C, Amici C, Pesce C, Coppola S, Fanelli C, De Nicola M, Cristofanon S, Clavarino G, Bergamaschi A, Magrini A, Gualandi G, Ghibelli L. Glutathione depletion up-regulates Bcl-2 in BSO-resistant cells. *FASEB J.* 2004;18(13):1609-11.
173. Anderson CP, Tsai JM, Meek WE, Liu RM, Tang Y, Forman HJ, Reynolds CP. Depletion of glutathione by buthionine sulfoxine is cytotoxic for human neuroblastoma cell lines via apoptosis. *Exp Cell Res.* 1999;246(1):183-92.
174. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(9-10):922-35.
175. Jakus J, Farkas O. Photosensitizers and antioxidants: a way to new drugs? *Photochem Photobiol Sci.* 2005;4(9):694-8..
176. Κυριαζή Μ. «Μελέτη Συνδυαστικής Δράσης Φωτοδυναμικής Θεραπείας και Αντιοξειδωτικών σε Καρκίνο του Δέρματος, με Χρήση Φωτοφυσικών Μεθόδων». Διδακτορική διατριβή, ΕΜΠ, Αθήνα 2007
177. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. (2012) Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2012;62:10–29

178. Pienta KJ, Goodson JA, Esper PS. Epidemiology of prostate cancer: molecular and environmental clues. *Urology*. 1996;48(5):676-83
179. Bennani H, Drissi A, Giton F, Kheuang L, Fiet J, Adlouni A. Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines. *Cancer Detect Prev*. 2007;31(1):64-9..
180. Cimino S, Sortino G, Favilla V, Castelli T, Madonia M, Sansalone S, Russo GI, Morgia G. Polyphenols: key issues involved in chemoprevention of prostate cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:632959. doi: 10.1155/2012/632959.
181. Khan N, Adhami VM, Mukhtar H. Review: green tea polyphenols in chemoprevention of prostate cancer: preclinical and clinical studies. *Nutr Cancer*. 2009;61(6):836-41.
182. Romero I, Páez A, Ferruelo A, Luján M, Berenguer A. Polyphenols in red wine inhibit the proliferation and induce apoptosis of LNCaP cells. *BJU Int*. 2002;89(9):950-4
183. Thakur VS, Gupta K, Gupta S. Green tea polyphenols causes cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells by suppressing class I histone deacetylases. *Carcinogenesis*. 2012;33(2):377-84.
184. Hadi SM, Bhat SH, Azmi AS, Hanif S, Shamim U, Ullah MF. Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties. *Semin Cancer Biol*. 2007;17(5):370-6.
185. Periasamy VS, Alshatwi AA. Tea Polyphenols Modulate Antioxidant Redox System on Cisplatin-induced ROS Generation in a Human Breast Cancer Cell. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012 Nov 12. doi: 10.1111/bcpt.12035.
186. Kelley EE, Domann FE, Buettner GR, Oberley LW, Burns CP. Increased efficacy of in vitro Photofrin photosensitization of human oral squamous cell carcinoma by iron and ascorbate. *J Photochem Photobiol B*. 1997;40(3):273-7.
187. Frank J, Flaccus A, Schwarz C, Lambert C, Biesalski HK. Ascorbic acid suppresses cell death in rat DS-sarcoma cancer cells induced by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(5):827-36.
188. Al-Sherbinia ES, El Nourya AH, El Roubyb MN, Ibrahima T. Vitamin E (α -tocopherol) enhances the PDT action of hematoporphyrin derivatives on cervical cancer cells. *Med Las Appl*. 2009;24(1):65-73.
189. Shevchuk, I.; Chekulayev, V.; Chekulayeva, L. Enhancement of the efficiency of photodynamic therapy of tumors by t-butyl-4-hydroxyanisole. *J. Photochem. Photobiol*. 1998, 45, 136-143.

190. Henning SM, Wang P, Said J, Magyar C, Castor B, Doan N, Tosity C, Moro A, Gao K, Li L, Heber D. Polyphenols in brewed green tea inhibit prostate tumor xenograft growth by localizing to the tumor and decreasing oxidative stress and angiogenesis *J Nutr Biochem*, 2012;3(11):1537-42.
191. Kong Q, Beel JA, Lillehei KO. A threshold concept for cancer therapy. *Med Hypotheses* 2000;55(1):29-35.

Δημοσιεύσεις

Έγκριτες Δημοσιεύσεις σε Επιστημονικά Περιοδικά:

1. Petri A, Alexandratou E, Rallis M, Yova D. Comparative characterization of the cellular uptake and photodynamic efficiency of Foscan® and Fospeg in a human prostate cancer cell line. *Photodiagn Photodyn Ther* 2012;9(4): 344-54
2. Petri A, Alexandratou E, Rallis M, Roussis V, Yova D. Combination of Fospeg-IPDT and a natural antioxidant compound prevents photosensitivity in a murine prostate cancer tumour model. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2012;9(2):100-8

Δημοσιεύσεις σε Πρακτικά Συνεδρίων με Κριτές:

1. Stylianou A, Yova D, Alexandratou E, Petri A. Atomic force imaging microscopy investigation of the interaction of ultraviolet radiation with collagen thin films. *Nanoscale Imaging, Sensing, and Actuation for Biomedical Applications X, Proc. SPIE 8594, 85940E, 2013; doi:10.1117/12.2002460*

2. Petri A, Kyriazi M, Alexandratou E, Rallis M, Gräfe S, Yova D. "Evaluation of the PDT effect of Foscan and Fospeg in the LNCaP human prostate cancer cell line", Therapeutic Laser Applications and Laser-Tissue Interactions IV, Proc. SPIE, 7373: 73731I, 2009

Ανακοινώσεις σε Έγκριτα Διεθνή Συνέδρια:

1. Petri A, Yova D, Alexandratou E. "Nanotechnology: A Novel Approach To Enhance Photodynamic Cancer Therapy". ELEVIT 2013, 5th Panhellenic Conference on Biomedical Technologies, International Federation for Medical and Biological Engineering, 4-6 April 2013, Athens
2. Petri A, Alexandratou E, Yova D. "A New Perspective of Antioxidants to Photodynamic Therapy" Photodynamic Therapy and Photodiagnosis in Clinical Practice - 9th International Symposium in conjunction with the 4th International Meeting of European Platform for Photodynamic Medicine, Brixen, October 2012
3. Stylianou A, Yova D, Petri A. "AFM Characterization of Collagen Thin Films for Assessing Fibroblasts Response on Collagen Nanotopography" 9th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN12), 3-6 July 2012, Thessaloniki, Greece
4. Petri A, Yova D, Alexandratou E. "The combination of Interstitial Photodynamic Therapy and liposomal nanoparticles as a new therapy for prostate cancer" ELEVIT 2012, 4th Panhellenic Conference on Biomedical Technologies, International Federation for Medical and Biological Engineering, 20-21 January, 2012, NTUA, Athens
5. Petri A, Yova D, Rallis M, Roussis V, Alexandratou E, "Fospeg and a natural antioxidant compound: a way to totally eliminate PDT prolonged photosensitivity", 5th International Conference of Oxidative Stress in Skin Biology and Medicine, Andros, Greece, 2011
6. Petri A, Yova D, Rallis M, Alexandratou E. "Pharmacokinetics and photodynamic efficacy of two formulations of m-THPC in a human prostate cancer cell line", 5th International Conference of Oxidative Stress in Skin Biology and Medicine, Andros, Greece, 2011

7. Petri A, Yova D, Rallis M, Roussis V, Alexandratou E. "Prevention of severe photosensitivity after m-THPC IPDT with a natural antioxidant agent", 13th IPA WORLD CONGRESS, International Photodynamic Association, Innsbruck, Austria, 2011
8. Antoniadou I, Petri A, Bajelidze N, Pavlou P, Dania F, Perraki A, Simati I, Moulas AN, Roussis V, Vagias C, Rallis M, Papaioannou G, Deliconstantinos G, Grando SA. "Some In Vitro Data on the Influence of Tobacco Smoke and UV light on Murine Keratinocytes and Skin: Protection by Berries and Pinus Extracts", 4th International Conference On Polyphenols And Health Uk, Leeds, 2009
9. Petri A, Kyriazi M, Alexandratou E, Rallis M, Grafe S, Yova D. "Effect of two formulations of m-THPC in photodynamic therapy of prostate cancer in vitro", 14th Panhellenic Pharmaceutical Congress, Athens, Greece, 2009
10. Antoniadou I, Perraki A, Petri A, Rallis M, Roussis V, Vagias C, Ntotsikas I, Papaioannou G, Deliconstantinos G, Grando S. "Oxidative effect of tobacco smoke in keratinocytes. Protection with P.halepensis", 14th Panhellenic Pharmaceutical Congress, Athens, Greece, 2009
11. Petri A, Kyriazi M, Alexandratou E, Antoniadou I, Dotsikas I, Rallis M, Yova D. "Cellular uptake and photodynamic activity of FOSPEG® in LNCaP cells", 4th International Conference of Oxidative Stress in Skin Medicine and Biology, Andros 2008
12. Antoniadou I, Perraki A, Petri A, Rallis M, Dotsikas Y, Papaioannou G, Deliconstantinos G, Grando SA. "Influence of tobacco smoke on murine keratinocytes: protection by Pinus Halepensis bark extract", 4th International Conference of Oxidative Stress in Skin Medicine and Biology, Andros, Greece 2008
13. Petri A, Kastania A, Kyriazi M, Rallis M, Yova D. "Assessment of the keratinocytes morphological characteristics alterations by image processing after UV radiation" 6th European Symposium on Biomedical Engineering, Chania 2008
14. Perraki A, Pavlou P, Antoniadou I, Petri A, Rallis M, Papaioannou G, Deliconstantinos G, Grando SA. "In vivo and in vitro data on the influence of tobacco smoke on murine skin" 1st International Conference on Environmental Stressors in Health, Siena Italy, 2008
15. Petri A, Bajelidze N, Dania F, Verikokidis A, Kastania A, Kyriazi M, Roussis V, Vagias C, Georgantea P, Rallis M, Papaioannou G. "The antioxidant protective

effect of *Pinus halepensis*”, 5th National Scientific Practical Conference with International Participation "Reactive Oxygen Species, Nitric Oxide, Antioxidants and Human Health", Smolensk Russia, 2007