
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ



Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών
Τομέας Ηλεκτρομαγνητικών Εφαρμογών Ηλεκτροοπτικής και Ηλεκτρονικών
Υλικών

Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής

**Συγκριτικές μελέτες φωτοφυσικών
ιδιοτήτων παραγώγων της κουρκουμίνης
για ενδεχόμενη χρήση τους στη
φωτοδυναμική θεραπεία**

Αικατερίνη Κουτσονικολή

Επιβλέπουσα:

Διδώ Γιόβα, Ομότιμη Καθηγήτρια ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ 2015

.....
Αικατερίνη Κουτσονικολή

Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών ΕΜΠ

Copyright © Αικατερίνη Κουτσονικολή, 2015.

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 το συγγραφέα.

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

Περίληψη

Η επίδραση του φωτός στους βιολογικούς ιστούς, η κατανόηση των μηχανισμών της και η δυνατότητα αξιοποίησης των αποτελεσμάτων για διαγνωστικούς ή και θεραπευτικούς σκοπούς απασχολούσε ανέκαθεν την ανθρωπότητα. Τα τελευταία χρόνια συστηματική έρευνα διεξάγεται στην κατεύθυνση τόσο της διάγνωσης, όσον και στην κατεύθυνση της θεραπείας του καρκίνου με τη χρήση φωτός. Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μια νέα ερευνητική προσέγγιση θεραπείας του καρκίνου με δυνατότητα ευρείας εφαρμογής σε πολλές ιατρικές ειδικότητες και κατά κύριο λόγο στην ογκολογία. 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.

Αρκετές φωτοευαίσθητες ουσίες με διαφορετικά χαρακτηριστικά, χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία και πολλές άλλες είναι υπό εξέταση για την προοπτική της χρήσης τους. Η κουρκουμίνη είναι μια φυσική χρωστική ουσία που χρησιμοποιείται ευρέως στην Ασιατική παραδοσιακή ιατρική και τις γαστρονομικές παραδόσεις για τουλάχιστον 4000 έτη. Πρόκειται για μια σταθερή ουσία με χαμηλή τοξικότητα, γνωστή για τις θεραπευτικές της αξίες σε μια ποικιλία παθήσεων εξαιτίας των βιολογικών και φαρμακολογικών ιδιοτήτων της.

Η παρούσα εργασία στοχεύει στη συγκριτική μελέτη τριών παραγώγων της κουρκουμίνης ως προς τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες με στόχο τη διερεύνηση της χρήσης τους ως φωτοευαισθητοποιητές στη φωτοδυναμική θεραπεία. Στα πλαίσια αυτά, μελετήθηκε η απορρόφηση και ο φθορισμός των ουσιών σε διάφορες συγκεντρώσεις αλλά και διαφορετικούς διαλύτες καθώς επίσης και η συμπεριφορά τους όσον αφορά τη φωτολεύκανση μετά από ακτινοβόληση. Τέλος, μελετήθηκε η ικανότητά τους στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου μετά από ακτινοβόληση, προκαλώντας κατ' αυτό τον τρόπο την κυτταροτοξικότητα που είναι απαραίτητη στη φωτοδυναμική θεραπεία.

Στη συγκεκριμένη εργαστηριακή μελέτη χρησιμοποιήθηκαν παράγωγα της κουρκουμίνης σε μορφή διαλύματος. Αυτό το στάδιο είναι απαραίτητο να προηγηθεί πριν τη μελέτη των ουσιών σε κύτταρα ή πειραματόζωα καθώς καθιστά την πειραματική διαδικασία περισσότερο ελέγξιμη. Τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν ότι η κουρκουμίνη είναι μια πολλά υποσχόμενη ουσία καθώς παρουσιάζει σε μεγάλο βαθμό κάποια από τα φωτοφυσικά χαρακτηριστικά ενός φωτοευαισθητοποιητή για τη φωτοδυναμική διάγνωση αλλά και θεραπεία.

Λέξεις κλειδιά

Φως, φωτοδυναμική, κουρκουμίνη, φωτοευαισθητοποιητής, διαλύματα.



Abstract

The effect of light in biological tissues, the understanding of the mechanisms and the potential use of its results for diagnostic or therapeutic purposes has always occupied mankind. In the recent years, a systematic investigation is being conducted in the direction of both the diagnosis and the treatment of cancer using light. Photodynamic therapy is a new research approach to cancer therapy with broad application in many medical fields and primarily in oncology. PDT is based on the combined action of the following three elements: light, photosensitizer and oxygen. Each of these elements, if used individually in the same dose as in PDT, does not cause absolutely any damage to the tissue as the tissue destruction is based on the combined action of all the three.

Several photosensitive substances with different characteristics are currently used in photodynamic therapy and the potential use of many others is being studied, too. Curcumin is a natural pigment widely known in Asian traditional medicine and culinary traditions for at least 4000 years. It is a stable substance with low toxicity, famous for the therapeutic effects it causes in a variety of diseases due to its biological and pharmacological properties.

The present thesis aims to conduct a comparative study of three novel synthesized curcumin derivatives using photophysical methods in order to investigate their potential use as photosensitizers in photodynamic therapy. Therefore, we studied the absorption and fluorescence properties of the derivatives in various concentrations as well as different solvents and their behaviour regarding photobleaching. Finally, we also examined their ability to produce reactive oxygen species (ROS) after irradiation which is essential for the cytotoxicity in the photodynamic therapy.

During the laboratory tests, the three novel synthesized curcumin derivatives were studied in solution. This procedure enables a higher level of control over the experiment, thus it is a necessary step before any further *in vitro* or *in vivo* studies of a given substance. It is a fact that the studies in solution tend to be affected by less environmental variables compared to *in vitro* or *in vivo* studies, so the scientists can examine every separate mechanism involved in the process and reach clear conclusions regarding the properties of the given substances.

The results of this study revealed that curcumin is promising as it presents some of the basic photophysical characteristics of a photosensitizer both for the photodynamic diagnosis and therapy as well.

Keywords

PDT, light, Curcumin, photosensitizer, solutions.



Αντί προλόγου

“I may not have gone where I intended to go but I think I have ended up where I intended to be.”

~ Douglas Adams, *The Long Dark Tea-Time of the Soul*.

Η ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας σηματοδοτεί το τέλος μιας εποχής. Νιώθω, λοιπόν, την ανάγκη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όσους συνετέλεσαν στο να κλείσει αυτός ο κύκλος, και ιδίως στα άτομα που με βοήθησαν να διανύσω το τελευταίο τόξο της διαδρομής.

Ευχαριστώ, αρχικά, την κ. Διδώ Γιόβα, ομότιμη καθηγήτρια ΕΜΠ και διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής, για την ευκαιρία που μου προσέφερε να εμβαθύνω στα αντικείμενα μελέτης του εργαστηρίου και να ανακαλύψω τα ενδιαφέροντά μου. Χωρίς τη δυνατότητα που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη της προς το πρόσωπό μου, τίποτα δε θα ήταν το ίδιο.

Ευχαριστώ τη Δρ. Ελένη Αλεξανδράτου για την υπομονή της, την καθοδήγηση σε όλα τα στάδια της εργασίας και τις όποιες γνώσεις κατέχω πλέον για την πειραματική διαδικασία αφού τις οφείλω σε εκείνη και το χρόνο που μου διέθεσε. Ευχαριστώ, όμως, και τον άνθρωπο Ελένη που δημιούργησε συνθήκες ισότιμης συνεργασίας και επικοινωνίας όχι μόνο για την εκπόνηση της διπλωματικής αλλά και στη βάση μιας ανθρώπινης σχέσης φιλίας και εκτίμησης.

Ευχαριστώ τον επίκουρο καθηγητή κ. Κων/νο Πολιτόπουλο, το μηχανικό, που συνέβαλε τα μέγιστα στη δημιουργία και την εύρυθμη λειτουργία των πειραματικών διατάξεων, αντιμετωπίζοντας τα όχι λίγα προβλήματα που προέκυψαν. Ευχαριστώ προσωπικά και τον Κώστα Πολιτόπουλο, το δάσκαλο, που με τον τρόπο του ενθάρρυνε πάντα την κριτική σκέψη και την αμφισβήτηση.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής, τους ΥΔ κκ. Αναστάσιο Γεωργακόπουλο, Στέλιο Κοντομάρη, Γιώργο Μπαλογιάννη, Μαρία Ρεβύθη, Κυριακή Σαμπάνη και Αικατερίνη Τρικουράκη για την υποστήριξη, τις ιδέες και τη βοήθειά τους. Όμως, κυρίως θέλω να ευχαριστήσω τον Τάσο, το Στέλιο, το Γιώργο, τη Μαρία, τη Σάντυ και την Κατερίνα για την άμεση ένταξή μου στην ομάδα, το ενδιαφέρον τους όχι μόνο σε επιστημονικό επίπεδο αλλά πρωτίστως σε ανθρώπινο, τις συζητήσεις και τις στιγμές καθημερινής τρέλας που μοιραστήκαμε καθιστώντας το μικρόκοσμο του εργαστηρίου ένα περιβάλλον αγαπημένο το οποίο δύσκολα αποχωρίζομαι.

Ευχαριστώ ολόθερμα το Εργαστήριο Δομικών Μελετών Βιομορίων και Φαρμάκων με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» και πιο συγκεκριμένα τη Δρ. Μαρίνα Σαγνού, ερευνήτρια του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών & Εφαρμογών. Η συμβολή τους είναι καθοριστικής σημασίας τόσο λόγω της υλικής συνεισφοράς στην εργασία αυτή με την παροχή των

υπό μελέτη ουσιών αλλά και τη διάθεση των αποτελεσμάτων προγενέστερων μετρήσεων στις ουσίες, τα οποία υπήρξαν κρίσιμα για την ομαλή σχεδίαση και διεξαγωγή των πειραμάτων.

Ευχαριστώ – αν και ένα ευχαριστώ είναι ελάχιστο – την οικογένειά μου που με στηρίζει πάντα και παρείχε το καταλληλότερο πνευματικό και υλικό περιβάλλον για την ανάπτυξη και διαμόρφωσή μου, τη διεξαγωγή των σπουδών μου αλλά και όσων επιμέρους δραστηριοτήτων επέλεξα να ακολουθήσω παράλληλα. Ευχαριστώ τους φίλους μου, τους λίγους και καλούς αληθινούς, οι οποίοι ήταν, είναι και θα είναι η οικογένεια που η ίδια επέλεξα.

Ευχαριστώ τους ανθρώπους που πίστευαν σε μένα ακόμα και όταν εγώ η ίδια δεν πίστευα στον εαυτό μου. Ευχαριστώ, βέβαια, και όλους όσους επέλεξαν να μην πιστέψουν σε μένα ή να δυσκολέψουν το δρόμο μου γιατί κάθε απογοήτευση ή αποτυχία με έκανε λίγο δυνατότερη και κάθε εμπόδιο ή αλλαγή διαδρομής μου προσέφερε μια άλλη οπτική συντελώντας στο να γνωρίσω καλύτερα τον εαυτό μου και τον κόσμο.

Ένας κύκλος κλείνει εδώ και πιθανόν ακόμα και σήμερα να μην μπορώ να απαντήσω με σαφήνεια στο ερώτημα "Με τι θα ασχοληθείς στη ζωή σου;" (το αντίστοιχο "Τι θα γίνεις όταν μεγαλώσεις;" των παιδικών μας χρόνων). Όμως, αυτή τη στιγμή οι επιθυμίες μου είναι πιο ξεκάθαρες και βρίσκομαι ένα βήμα πιο κοντά στο να τις πραγματοποιήσω. Για το λόγο αυτό, οφείλω σε όλους όσους βρέθηκαν στο μονοπάτι μου, ένα ακόμα τεράστιο ευχαριστώ.







Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	iii
Abstract.....	v
Αντί προλόγου.....	vii
Πίνακας περιεχομένων	1
Κατάλογος Εικόνων.....	5
Κατάλογος Πινάκων	9
Κεφάλαιο 1: Φωτοδυναμική Θεραπεία.....	11
1.1 Ιστορική αναδρομή.....	12
1.2 Η φωτοδυναμική θεραπεία – Photodynamic Therapy (PDT)	15
1.3 Κβαντική ερμηνεία.....	18
1.3.1 Εσωτερική μετάπτωση.....	18
1.3.2 Εκπομπή φθορισμού.....	18
1.3.3 Δονητική αποδιέγερση (ή ταλαντωτική χαλάρωση)	19
1.3.4 Εξωτερική μετατροπή.....	19
1.3.5 Εσωτερική μετατροπή $S^* \rightarrow T^*$	19
1.3.6 Φωσφορισμός.....	19
1.3.7 Καθυστερημένος φθορισμός	20
1.3.8 Μεταφορά ενέργειας μέσω κρούσεων	20
1.3.9 Μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού	20
1.4 Μηχανισμοί φωτοδυναμικής δράσης	21
1.4.1 Φωτοφυσική διαδικασία	21
1.4.2 Φωτοχημική διαδικασία	21
1.4.3 Βιολογική διαδικασία	23
1.5 Μηχανισμός καταστροφής καρκινικών κυττάρων	25
1.5.1 Απόπτωση	25
1.5.2 Νέκρωση.....	26
1.5.3 Αυτοφαγία.....	26

1.5.4	Ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος	27
1.6	Προκλήσεις για τη φωτοδυναμική θεραπεία	29
Κεφάλαιο 2:	Φωτοευαισθητοποιητές	33
2.1	Φωτοευαίσθητες ουσίες	34
2.2	Φωτοφυσικά χαρακτηριστικά φωτοευαισθητοποιητών	36
2.3	Βασικά χαρακτηριστικά φωτοευαισθητοποιητών	38
2.4	Φωτολεύκανση (Photobleaching)	41
2.4.1	Φωτοτροποποίηση (Photomodification)	41
2.4.2	Φωτολεύκανση (True Photobleaching)	42
2.5	Κατηγορίες φωτοευαισθητοποιητών	43
2.5.1	Φωτοευαισθητοποιητές 1 ^{ης} γενιάς	43
2.5.2	Φωτοευαισθητοποιητές 2 ^{ης} γενιάς	44
2.5.3	Φωτοευαισθητοποιητές 3 ^{ης} γενιάς	45
Κεφάλαιο 3:	Η κουρκουμίνη	49
3.1	Η ουσία κουρκουμίνη	50
3.1.1	Δομή	51
3.1.2	Σύνθεση	52
3.1.3	Χρήση	53
3.2	Βιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες	54
3.3	Η κουρκουμίνη στη Φωτοδυναμική Θεραπεία	57
Κεφάλαιο 4:	Η πειραματική διαδικασία	61
4.1	Σκοπός της πειραματικής μελέτης	62
4.2	Πειραματικές διατάξεις	63
4.2.1	Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης	63
4.2.2	Φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού	68
4.2.3	Διατάξεις ακτινοβολήσης	74
4.3	Ουσίες	80
4.3.1	AX126 (Curcumin I)	80

4.3.2	AX127.....	80
4.3.3	AX136 (Curcumin III).....	80
4.3.4	DMSO.....	81
4.3.5	Αιθανόλη.....	81
4.3.6	PBS.....	81
4.3.7	NADH.....	82
4.3.8	EDTA.....	84
4.4	Πειραματικές μέθοδοι.....	85
4.4.1	Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης των παραγώγων κουρκουμίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις.....	85
4.4.2	Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης των παραγώγων κουρκουμίνης σε διάφορους διαλύτες.....	85
4.4.3	Φασματοσκοπικές μελέτες φθορισμού των παραγώγων κουρκουμίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις.....	86
4.4.4	Φασματοσκοπικές μελέτες φωτολεύκανσης των παραγώγων κουρκουμίνης.....	87
4.4.5	Μελέτη της ικανότητας των παραγώγων κουρκουμίνης για παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	88
Κεφάλαιο 5:	Αποτελέσματα.....	91
5.1	Υπολογισμός καμπυλών συγκέντρωσης – απορρόφησης των παραγώγων κουρκουμίνης.....	92
5.1.1	Διαδικασία.....	92
5.1.2	Μελέτη απορρόφησης της ουσίας AX126 (Curcumin I).....	93
5.1.3	Μελέτη απορρόφησης της ουσίας AX127.....	94
5.1.4	Μελέτη απορρόφησης της ουσίας AX136 (Curcumin III).....	95
5.1.5	Συμπεράσματα.....	96
5.2	Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης των παραγώγων κουρκουμίνης σε διάφορους διαλύτες.....	98
5.2.1	Διαδικασία.....	98
5.2.2	Φάσματα απορρόφησης των κουρκουμινών.....	99
5.2.3	Συμπεράσματα.....	100

5.3	Υπολογισμός καμπυλών συγκέντρωσης – φθορισμού των παραγώγων της κουρκουμίνης.....	102
5.3.1	Διαδικασία.....	102
5.3.2	Μελέτες ιδιοτήτων φθορισμού για διέγερση στα 405 nm.....	102
5.3.3	Συμπεράσματα για το φθορισμό με διέγερση στα 405 nm.....	105
5.3.4	Μελέτες ιδιοτήτων φθορισμού για διέγερση στο μέγιστο της απορρόφησης.....	106
5.3.5	Συμπεράσματα για το φθορισμό με διέγερση στη μέγιστη απορρόφηση 110	
5.4	Φασματοσκοπικές μελέτες φωτολεύκανσης της κουρκουμίνης.....	112
5.4.1	Υπολογισμός καμπυλών απορρόφησης – χρόνου των παραγώγων κουρκουμίνης.....	112
5.4.2	Υπολογισμός καμπυλών φθορισμού – χρόνου των παραγώγων κουρκουμίνης.....	113
5.5	Μελέτη της ικανότητας της κουρκουμίνης για παραγωγή ελευθέρων ριζών 115	
5.5.1	Διαδικασία.....	115
5.5.2	Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων μετά από ακτινοβολήση.....	115
5.5.3	Υπολογισμός καμπυλών απορρόφησης – χρόνου στα 340 nm μετά από ακτινοβολήση σε διάλυμα κουρκουμίνης με NADH.....	117
Κεφάλαιο 6:	Γενικά συμπεράσματα.....	121
6.1	Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	122
6.1.1	Συμπεράσματα σχετικά με την απορρόφηση και το φθορισμό.....	122
6.1.2	Συμπεράσματα για τη φωτολεύκανση.....	123
6.1.3	Συμπεράσματα σχετικά με τη φωτοδυναμική δράση και την κυτταροτοξικότητα.....	123
6.1.4	Συζήτηση για την κουρκουμίνη ως ενδεχόμενο φωτοευαισθητοποιητή 124	
6.2	Μια ματιά στο μέλλον.....	126
	Βιβλιογραφία.....	129

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.2-1: Διαδικασία φωτοδυναμικής θεραπείας.....	15
Εικόνα 1.2-2: Στάδια της φωτοδυναμικής θεραπείας ^[6]	17
Εικόνα 1.3-1: Διάγραμμα Jablonski ^[6]	18
Εικόνα 1.4-1: Γραφική αναπαράσταση των φωτοφυσικών και φωτοχημικών μηχανισμών της φωτοδυναμικής θεραπείας ^[17]	21
Εικόνα 1.4-2: Μηχανισμοί δράσης κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία ^[19]	22
Εικόνα 1.5-1: Μορφολογικά χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου: (α) απόπτωσης, (β) νέκρωσης, (γ) αυτοφαγοκυττάρωσης ^[19]	25
Εικόνα 1.5-2: Μηχανισμοί νέκρωσης καρκινικού όγκου επαγόμενοι από τη φωτοδυναμική θεραπεία ^[19]	27
Εικόνα 3.1-1: Φωτογραφική απεικόνιση της ρίζας <i>Curcuma longa</i> και της ουσίας Curcumin.....	50
Εικόνα 3.1-2: Οι μοριακές δομές των κουρκουμοειδών ^[45]	50
Εικόνα 3.1-3: Διαδρομή βιοσύνθεσης της κουρκουμίνης.....	52
Εικόνα 3.2-1: Σχηματική αναπαράσταση της βιολογικής δράσης της κουρκουμίνης ^[47]	56
Εικόνα 4.2-1: Σχηματική αναπαράσταση της πορείας της ακτινοβολίας μέσω της κυβέτας.....	63
Εικόνα 4.2-2: Φωτογραφική απεικόνιση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin – Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer.....	65
Εικόνα 4.2-3: Φωτογραφική απεικόνιση της υποδοχής κυβετών του οργάνου. Το δείγμα αναφοράς τοποθετείται επάνω και το προς εξέταση δείγμα στην κάτω υποδοχή.....	65
Εικόνα 4.2-4: Οπτικό διάγραμμα λειτουργίας του φασματοφωτόμετρου Perkin – Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer ^[35]	66
Εικόνα 4.2-5: Απεικόνιση από το λογισμικό πακέτο UV WinLab.....	67
Εικόνα 4.2-6: Απεικόνιση από το λογισμικό πακέτο UV WinLab.....	68
Εικόνα 4.2-7: Φωτογραφική απεικόνιση του φασματοφωτόμετρου φθορισμού Perkin – Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer.....	70
Εικόνα 4.2-8: Φωτογραφική απεικόνιση της υποδοχής κυβέτας του οργάνου.....	70
Εικόνα 4.2-9: Μπλοκ διάγραμμα λειτουργίας του Perkin – Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer.....	71

Εικόνα 4.2-10: Οπτικό διάγραμμα διέγερσης και συλλογής φθορισμού σύμφωνα με το οποίο λειτουργεί το φασματοφωτόμετρο φθορισμού.	71
Εικόνα 4.2-11: Απεικόνιση από το λογισμικό πακέτο UV WinLab.	73
Εικόνα 4.2-12: Απεικόνιση από το λογισμικό πακέτο UV WinLab.	73
Εικόνα 4.2-13: Φωτογραφική απεικόνιση της διάταξης ακτινοβόλησης που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα φωτολεύκανσης.	74
Εικόνα 4.2-14: Φωτογραφική απεικόνιση της πηγής D61UV-1-0-1.	75
Εικόνα 4.2-15: Διάγραμμα κατανομής της ακτινοβολίας της πηγής D61UV-1-0-1 στα διάφορα μήκη κύματος.	76
Εικόνα 4.2-16: Φωτογραφική απεικόνιση της πηγής Bridgelux Power LED 10W.	76
Εικόνα 4.2-17: Φωτογραφική απεικόνιση της προσαρμοσμένης διάταξη που δημιουργήθηκε για τα πειράματα παραγωγής ελευθέρων ριζών.	78
Εικόνα 4.2-18: Διάγραμμα κατανομής της ακτινοβολίας της πηγής Bridgelux Power LED 10W στα διάφορα μήκη κύματος.	78
Εικόνα 4.2-19: Φωτογραφική απεικόνιση της διάταξης ακτινοβόλησης που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα παραγωγής ελευθέρων ριζών σε συνθήκες πραγματικής λειτουργίας.	79
Εικόνα 4.3-1: Χημική δομή της κουρκουμίνης AX126 (Curcumin I).	80
Εικόνα 4.3-2: Χημική δομή της κουρκουμίνης AX127.	80
Εικόνα 4.3-3: Χημική δομή της κουρκουμίνης AX136 (Curcumin III).	80
Εικόνα 4.3-4: Χημική δομή του DMSO ^[60]	81
Εικόνα 4.3-5: Χημική δομή της αιθανόλης.	81
Εικόνα 4.3-6: Phosphate Buffered Saline ^[61]	82
Εικόνα 4.3-7: Χημική δομή της ουσίας NADH ^[62]	82
Εικόνα 4.3-8: Σχηματισμός NADH από NAD ⁺ και αντίστροφα ^[63]	83
Εικόνα 4.3-9: Διάγραμμα απορρόφησης NADH και NAD ⁺ ^[64]	83
Εικόνα 4.3-10: Χημική δομή της ουσίας EDTA ^[66]	84
Εικόνα 5.1-1: Φάσματα απορρόφησης της AX126 σε μήκη κύματος 300 – 700 nm, και συγκεντρώσεις 20 μM, 10 μM, 5 μM, 1μM και 0,5 μM.	93
Εικόνα 5.1-2: Καμπύλη μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης ανά συγκέντρωση της AX126.	93

Εικόνα 5.1-3: Φάσματα απορρόφησης της AX127 σε μήκη κύματος 300 – 700 nm, και συγκεντρώσεις 20 μM, 10 μM, 5 μM, 1μM και 0,5 μM.	94
Εικόνα 5.1-4: Καμπύλη μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης ανά συγκέντρωση της ουσίας AX127.....	94
Εικόνα 5.1-5: Φάσματα απορρόφησης της AX136 σε μήκη κύματος 300 – 700 nm, και συγκεντρώσεις 20 μM, 10 μM, 5 μM, 1μM και 0,5 μM.	95
Εικόνα 5.1-6: Καμπύλη μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης ανά συγκέντρωση της ουσίας AX136.....	95
Εικόνα 5.1-7: Συγκριτικές καμπύλες μεταβολής της απορρόφησης ανά συγκέντρωση για όλες τις κουρκουμίνες.	96
Εικόνα 5.2-1: Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων AX126, συγκέντρωσης 10μM, σε DMSO, αιθανόλη και PBS.	99
Εικόνα 5.2-2: Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων AX127, συγκέντρωσης 10μM, σε DMSO, αιθανόλη και PBS.	99
Εικόνα 5.2-3: Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων AX136, συγκέντρωσης 10μM, σε DMSO, αιθανόλη και PBS.	100
Εικόνα 5.3-1: Φάσματα φθορισμού της AX126 σε μήκη κύματος 455 – 700 nm, διέγερση στα 405 nm και συγκεντρώσεις 0,5 μM, 0,1 μM, 0,05 μM και 0,01 μM. ...	102
Εικόνα 5.3-2: Καμπύλη μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ανά συγκέντρωση της ουσίας AX126 για διέγερση στα 405 nm.....	103
Εικόνα 5.3-3: Φάσματα φθορισμού της AX127 σε μήκη κύματος 455 – 700 nm, διέγερση στα 405 nm και συγκεντρώσεις 0,5 μM, 0,1 μM, 0,05 μM και 0,01 μM. ...	103
Εικόνα 5.3-4: Καμπύλη μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ανά συγκέντρωση της ουσίας AX127 για διέγερση στα 405 nm.....	104
Εικόνα 5.3-5: Φάσματα φθορισμού της AX136 σε μήκη κύματος 440 – 700 nm, διέγερση στα 405 nm και συγκεντρώσεις 0,5 μM, 0,1 μM, 0,05 μM και 0,01 μM. ...	104
Εικόνα 5.3-6: Καμπύλη μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ανά συγκέντρωση της ουσίας AX136 για διέγερση στα 405 nm.....	105
Εικόνα 5.3-7: Συγκριτικές καμπύλες μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ανά συγκέντρωση όλων των κουρκουμινών για διέγερση στα 405 nm.	106
Εικόνα 5.3-8: Φάσματα φθορισμού της AX126 σε μήκη κύματος 455 – 700 nm, διέγερση στα 435 nm και συγκεντρώσεις 0,5 μM, 0,1 μM, 0,05 μM και 0,01 μM. ...	107
Εικόνα 5.3-9: Καμπύλη μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ανά συγκέντρωση της ουσίας AX126 για διέγερση στα 435 nm.....	107
Εικόνα 5.3-10: Φάσματα φθορισμού της AX127 σε μήκη κύματος 455 – 700 nm, διέγερση στα 435 nm και συγκεντρώσεις 0,5 μM, 0,1 μM, 0,05 μM και 0,01 μM. ...	108

- Εικόνα 5.3-11: Καμπύλη μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ανά συγκέντρωση της ουσίας AX127 για διέγερση στα 435 nm..... 108
- Εικόνα 5.3-12: Φάσματα φθορισμού της AX136 σε μήκη κύματος 440 – 700 nm, διέγερση στα 425 nm και συγκεντρώσεις 0,5 μM , 0,1 μM , 0,05 μM και 0,01 μM 109
- Εικόνα 5.3-13: Καμπύλη μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ανά συγκέντρωση της ουσίας AX136 για διέγερση στα 425 nm..... 109
- Εικόνα 5.3-14: Συγκριτικές καμπύλες μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ανά συγκέντρωση όλων των κουρκουμινών για διέγερση στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης. 110
- Εικόνα 5.4-1: Συγκριτικές καμπύλες μεταβολής μέγιστης απορρόφησης των κουρκουμινών, σε συγκέντρωση 10 μM , ανά χρόνο ακτινοβόλησης (0 min – 30 min) μελετώντας τη φωτολεύκανση. 112
- Εικόνα 5.4-2: Συγκριτικές καμπύλες μεταβολής μέγιστου φθορισμού των κουρκουμινών, σε συγκέντρωση 10 μM , με διέγερση στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης, ανά χρόνο ακτινοβόλησης (0 min – 30 min) μελετώντας τη φωτολεύκανση. 114
- Εικόνα 5.5-1: Φάσματα απορρόφησης διαλύματος AX126 με NADH μετά από ακτινοβόληση 0, 1, 5, 15 και 20 λεπτών. Επισήμανση της χαρακτηριστικής κορυφής του NADH στα 340 nm. 115
- Εικόνα 5.5-2: Φάσματα απορρόφησης διαλύματος AX127 με NADH μετά από ακτινοβόληση 0, 1, 5, 15 και 20 λεπτών. Επισήμανση της χαρακτηριστικής κορυφής του NADH στα 340 nm. 116
- Εικόνα 5.5-3: Φάσματα απορρόφησης διαλύματος AX136 με NADH μετά από ακτινοβόληση 0, 1, 5, 15 λεπτών. Επισήμανση της χαρακτηριστικής κορυφής του NADH στα 340 nm. 116
- Εικόνα 5.5-4: Συγκριτικές καμπύλες μεταβολής απορρόφησης των διαλυμάτων στα 340nm, ως προς το χρόνο ακτινοβόλησης (0 min – 20 min) μελετώντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών. 118
- Εικόνα 5.5-5: Συγκριτικές καμπύλες μεταβολής απορρόφησης των διαλυμάτων στα 340nm, ως προς το χρόνο ακτινοβόλησης (0 min – 10 min) μελετώντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών. 119

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1-1: Γεγονότα – σταθμοί στην ιστορία της φωτοδυναμικής θεραπείας μέχρι την επίσημη έγκριση και χρήση της στην ιατρική ^{[1] [2] [5] [6]} .	13
Πίνακας 1.6-1: Πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας ^{[9], [18], [19] [20], [23], [28], [29]} .	30
Πίνακας 1.6-2: Τα κυριότερα μειονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας ^{[9], [19], [28], [29]} .	31
Πίνακας 2.3-1: Κυριότερα χαρακτηριστικά των φωτοευαισθητοποιητών στη φωτοδυναμική θεραπεία ^{[2], [9], [17], [30]} .	40
Πίνακας 2.5-1: Μειονεκτήματα των φωτοευαισθητοποιητών 1 ^{ης} γενιάς ^[34] .	44
Πίνακας 2.5-2: Τα χαρακτηριστικά των φωτοευαισθητοποιητών 2ης γενιάς και η σημασία τους στη φωτοδυναμική θεραπεία ^[35] .	45
Πίνακας 3.1-1: Σύνοψη των βασικών χαρακτηριστικών της Κουρκουμίνης ^[41] .	51
Πίνακας 3.2-1: Σημαντικές μελέτες για τις ιδιότητες της κουρκουμίνης ^{[40], [46], [47]} .	55
Πίνακας 3.3-1: Συνοπτική παρουσίαση των σημαντικότερων αποτελεσμάτων από πρόσφατες έρευνες σχετικά με τη χρήση της κουρκουμίνης στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου του δέρματος ^[51] .	58
Πίνακας 4.2-1: Τεχνικά χαρακτηριστικά κατασκευαστή της πηγής ακτινοβολίας D61UV-1-0-1.	75
Πίνακας 4.2-2: Τεχνικά χαρακτηριστικά κατασκευαστή της πηγής ακτινοβολίας Bridgelux Power LED 10W.	77
Πίνακας 4.4-1: Παρασκευή διαλυμάτων για μετρήσεις απορρόφησης ανά συγκέντρωση.	85
Πίνακας 4.4-2: Παρασκευή διαλυμάτων για μετρήσεις απορρόφησης ανά διαλύτη.	86
Πίνακας 4.4-3: Προετοιμασία διαλυμάτων για μετρήσεις φθορισμού ανά συγκέντρωση.	86
Πίνακας 4.4-4: Παρασκευή διαλυμάτων για μετρήσεις φωτολεύκανσης απορρόφησης.	87
Πίνακας 4.4-5: Προετοιμασία διαλυμάτων για μετρήσεις φωτολεύκανσης φθορισμού.	88
Πίνακας 4.4-6: Προετοιμασία διαλυμάτων για μετρήσεις παραγωγής ROS.	90
Πίνακας 5.1-1: Μέγιστα απορρόφησης AX126, AX127 και AX136 σε DMSO και οι αντίστοιχοι μοριακοί συντελεστές απορρόφησης σε διάφορες συγκεντρώσεις.	97

Πίνακας 5.2-1: Μέγιστα απορρόφησης AX126, AX127 και AX136, συγκέντρωσης 10 μM και οι αντίστοιχοι μοριακοί συντελεστές απορρόφησης στους τρεις διαφορετικούς διαλύτες..... 100



Κεφάλαιο 1: Φωτοδυναμική Θεραπεία



1.1 Ιστορική αναδρομή

Η χρήση του φωτός ως θεραπευτικού παράγοντα σε συνδυασμό με φωτοευαίσθητες ουσίες μπορεί να εντοπιστεί κατά τη διάρκεια χιλιάδων ετών. Ο ακόλουθος Πίνακας 1.1-1, περιλαμβάνει τα σημαντικότερα γεγονότα – σταθμούς, στην πορεία αυτή από την αρχαιότητα ως τη σύγχρονη εποχή.

Οι πρώτες ενδείξεις για την εφαρμογή της ηλιακής ακτινοβολίας στον ανθρώπινο οργανισμό έγινε στην αρχαία Αίγυπτο, Ινδία και Κίνα για τη θεραπεία δερματολογικών παθήσεων, όπως ψωρίαση, λεύκη, καρκίνο και ραχίτιδα. Οι αρχαίοι Έλληνες συνήθιζαν να εκθέτουν ολόκληρο το σώμα τους στον ήλιο και να είναι γυμνοί. Ο Ορειβάσιος, διάσημος Έλληνας γιατρός που γεννήθηκε το 325 μ.Χ., στην Πέργαμο και ο ιατρός Ηρόδοτος θεωρούνται πατέρες της ηλιοθεραπείας διότι τόνισαν τη σημασία της έκθεσης στον ήλιο για την αποκατάσταση της υγείας ^[1].

Σημαντικά γεγονότα στην ιστορία της φωτοδυναμικής θεραπείας	
Αίγυπτος	Συνδυασμός βοτάνων και ηλιακής ακτινοβολίας για τη θεραπεία δερματικών παθήσεων.
Ινδιάνοι	Συνδυασμός ουσιών φυτικής προέλευσης και ηλιακής ακτινοβολίας για τη θεραπεία λεύκης.
1900 (Raab, Μόναχο)	Νέκρωση πρωτόζων τα οποία προκαλούσαν ελονοσία με συνδυασμό ακριδίνης και φωτός.
1900 (Prime, Γαλλία)	Πρώτη χορήγηση φωτοευαίσθητοποιητή σε ανθρώπους για τη θεραπεία της επιληψίας. Ο Γάλλος νευρολόγος χρησιμοποίησε ηωσίνη με στοματική αγωγή. Ανακάλυψε όμως, ότι αυτό προκαλεί δερματίτιδα σε περιοχές του δέρματος που είναι εκτεθειμένες στον ήλιο.
1903 (Von Tappeiner, Jesionek)	Πρώτη εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας (με ηωσίνη ως φωτοευαίσθητοποιητή) σε άνθρωπο για τη θεραπεία δερματικού καρκίνου.
1903 (Niels Finsen)	Βραβείο Νόμπελ για την εργασία του στη φωτοθεραπεία. Ανακάλυψε ότι η θεραπεία με χρήση φωτός θα μπορούσε να περιορίσει τις δερματικές παθήσεις που προκαλούσε η φυματίωση, μια πολύ κοινή ασθένεια της περιόδου.
1907 (Von Tappeiner, Jodlbauer)	Εισαγωγή του όρου «φωτοδυναμική δράση» για να περιγράψουν το φαινόμενο.
1908 (Hausman)	Καταγραφή φωτοδυναμικών ιδιοτήτων αιματοπορφυρίνης σε

	ζώα και ερυθροκύτταρα.
1913 (Meyer Betz, Γερμανία)	Χορήγηση αιματοπορφυρίνης και καταγραφή της φωτοευαισθησίας που παρουσιάστηκε μετά από έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία.
1957 (Schwartz, Lipson, Baldes, Winkelman)	Δημοσίευση εργασιών που αφορούσαν τον επιλεκτικό εντοπισμό της αιματοπορφυρίνης σε καρκινικούς – και γενικά πάσχοντες – ιστούς.
1970 (Dougherty)	Τυχαία τοποθέτηση μιας κυτταρικής καλλιέργειας, η οποία περιείχε φωτοευαισθητοποιητικούς παράγοντες, κοντά στα παράθυρα του εργαστηρίου του και παρατήρησε σημαντικό κυτταρικό θάνατο. Μελέτη στην ουσία αυτή (αιματοπορφυρίνη), η οποία μαζί με τα παράγωγά της χρησιμοποιήθηκε ευρέως μετέπειτα ως φωτοευαισθητοποιητής.
1970 – 1980 (Ομάδα του Roswell Park Cancer Institute)	Θεραπεία δερματικών καρκίνων και καρκίνων του στήθους με χρήση παράγωγου αιματοπορφυρίνης και λαμπτήρα τόξου ξένου εφοδιασμένο με κατάλληλα φίλτρα ώστε να εκπέμπεται κόκκινο φως.
1981	Ευρεία κυκλοφορία του σκευάσματος «καθαρού» παραγώγου αιματοπορφυρίνης με την εμπορική ονομασία Photofrin.
1985	Έναρξη διαδικασιών απόκτησης έγκρισης για χρήση του σκευάσματος Photofrin στην ιατρική πρακτική.
1993	Έγκριση πρωτοκόλλων φωτοδυναμικής θεραπείας καρκίνου της ουροδόχου κύστης από το Υπουργείο Υγείας του Καναδά.

Πίνακας 1.1-1: Γεγονότα – σταθμοί στην ιστορία της φωτοδυναμικής θεραπείας μέχρι την επίσημη έγκριση και χρήση της στην ιατρική ^{[1] [2] [5] [6]}.

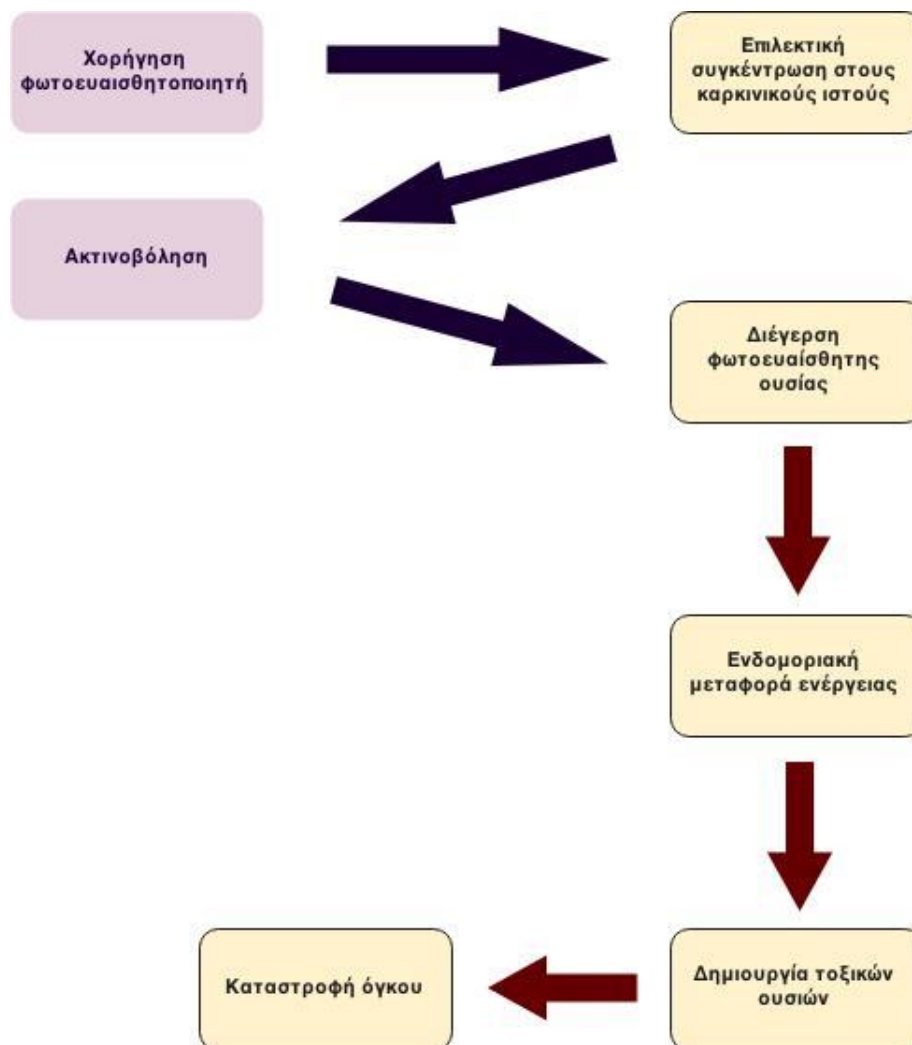
Ο θάνατος των κυττάρων που προκαλείται από την αλληλεπίδραση του φωτός και συγκεκριμένων χημικών ουσιών έχει αναγνωριστεί εδώ και 100 χρόνια. Μια από τις σημαντικές πρώτες αναφορές έγινε στα 1900 από τον Raab, έναν φοιτητή της ιατρικής, σε συνεργασία με τον καθηγητή Von Tarpeiner, στο Μόναχο. Ο Raab είχε ανακαλύψει την οπτική ιδιότητα του φθορισμού και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι δεν ευθύνεται το φως αλλά κάποιο προϊόν του φθορισμού ^[1]. Ανακάλυψε ότι ο φωτισμός μικροβιακών καλλιιεργειών με την παρουσία της ακριδίνης και των συναφών ενώσεων προκαλούσε θάνατο των μικροβίων ^[3]. Διατύπωσε την άποψη ότι το αποτέλεσμα αυτό προκλήθηκε από τη μεταφορά ενέργειας από το φως στην ακριδίνη, η οποία είναι παρόμοια με τη διαδικασία που παρατηρείται στα φυτά μετά την απορρόφηση του φωτός από τη χλωροφύλλη. Λίγο αργότερα, ο Herman Von Tarpeiner προέβλεψε τις μελλοντικές δυνατότητες για την εφαρμογή των φθορίζουσών ουσιών στην ιατρική ^[1].

Η πρώτη χορήγηση φωτοευαισθητοποιητή σε ανθρώπους πραγματοποιήθηκε το 1900, και στην πρώτη ιατρική εφαρμογή χρησιμοποιήθηκε η αλληλεπίδραση του λευκού φωτός με τη φθορίζουσα ουσία ηωσίνη για τη θεραπεία του όγκου στο δέρμα ^[1]. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά αλλά έλειπε η μακροχρόνια παρακολούθηση που οδήγησε στο να ξεχαστεί η φωτοδυναμική θεραπεία πιθανώς λόγω της τότε αυξανόμενης χρήσης άλλων τεχνικών στη θεραπεία του καρκίνου ^[4]. Στην πορεία της φωτοδυναμικής θεραπείας ανακαλύφθηκε ότι όλα όσα αναφέραμε ήταν περιοδικά και η σημερινή εποχή της φωτοδυναμικής θεραπείας ξεκίνησε από τους Lipson και Baldes στη Mayo Clinic. Η συνέχιση των ερευνών αποκάλυψε επίσης την εξάρτηση της φωτοδυναμικής θεραπείας από το οξυγόνο και το φως.

Ο Jodlbauer και ο Von Tarpeiner προσπάθησαν να αποδείξουν την απαίτηση του οξυγόνου και εισήγαγαν τον όρο «φωτοδυναμική δράση» για να περιγράψουν το φαινόμενο αυτό ^[1]. Όμως, ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιήθηκε η λέξη «δυναμική» δεν είναι σαφής. Στην πραγματικότητα, ο Von Tarpeiner δεν ήταν ικανοποιημένος με τον όρο αυτό, όπως αναφέρει στον πρόλογο του βιβλίου *Die Sensibilisierende Wirkung Fluoreszierender Substanzen*: “Whether or not the name is to be used further or dropped, must be left at the discretion of my colleagues”, δηλαδή «κατά πόσον ο ορισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω ή να αποχωρήσει, πρέπει να αφεθεί στην κρίση των συναδέλφων μου». Το ίδιο σκεπτικό είχαν και άλλοι συνάδελφοι του Von Tarpeiner όπως ο Blum ^[4].

1.2 Η φωτοδυναμική θεραπεία - Photodynamic Therapy (PDT)

Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) είναι μια νέα ερευνητική προσέγγιση θεραπείας του καρκίνου με δυνατότητα ευρείας εφαρμογής σε πολλές ιατρικές ειδικότητες και κατά κύριο λόγο στην ογκολογία εξαιτίας της επιλεκτικότητας που παρουσιάζει στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων σε σχέση με τους υγιείς ιστούς. Μπορεί να οριστεί ως η χορήγηση ενός φαρμάκου / φωτοευαίσθητης ουσίας σε έναν ασθενή που πάσχει από κάποια μορφή καρκίνου κι έπειτα η ακτινοβόλησή της πάσχουσας περιοχής με ορατό φως,



Εικόνα 1.2-1: Διαδικασία φωτοδυναμικής θεραπείας

Η φωτοδυναμική θεραπεία βασίζεται στη φωτοευαίσθητοποίηση καρκινικών κυττάρων, μετά τη χορήγηση κατάλληλης φωτοευαίσθητης ουσίας η οποία προσλαμβάνεται επιλεκτικά από τον κακοήγη όγκο, και τη μετέπειτα ενεργοποίηση αυτής χρησιμοποιώντας οπτική ακτινοβολία με επιλεγμένα φασματικά χαρακτηριστικά. Αυτή η διαδικασία, με την απαραίτητη παρουσία οξυγόνου, προκαλεί την παραγωγή μονήρους οξυγόνου ή ελεύθερων ριζών (ROS) με αποτέλεσμα τον

κυτταρικό θάνατο και την καταστροφή των καρκινικών ιστών λόγω της κυτταροτοξικότητας με την ελάχιστη δυνατή βλαβερή επίδραση στον περιβάλλοντα υγιή ιστό (Εικόνα 1.2-1).

Η φωτοδυναμική θεραπεία εξαρτάται από τρεις παράγοντες:

- τη φωτοευαίσθητη ουσία,
- τα χαρακτηριστικά της φωτεινής ακτινοβολίας και
- το οξυγόνο.

Μεμονωμένα, κανένας από τους ανωτέρω παράγοντες δεν επηρεάζει τα καρκινικά ούτε τα υγιή κύτταρα ^{[7], [8]}. Δηλαδή, αν κάποιος από τους παραπάνω τρεις παράγοντες είναι απών, ο ασθενής δεν υφίσταται καμία επίδραση. Συνεπώς, είναι προφανές ότι το τελικό αποτέλεσμα της χρήσης της μεθόδου στην αντιμετώπιση του καρκίνου εξαρτάται από τον τύπο του φωτοευαισθητοποιητή, τη συγκέντρωσή του, τα χαρακτηριστικά της φωτεινής ακτινοβολίας και τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου ^[9]. Η διαδικασία αυτή απαιτεί προσεκτικό σχεδιασμό στη δοσιμετρία της φωτοευαίσθητης ουσίας και του ακτινοβολούμενου φωτός. Αν και η φωτοδυναμική θεραπεία έχει ανακαλυφθεί εδώ και 100 χρόνια, η κλινική εφαρμογή της δεν ξεπερνάει τα 10 χρόνια ^[10].

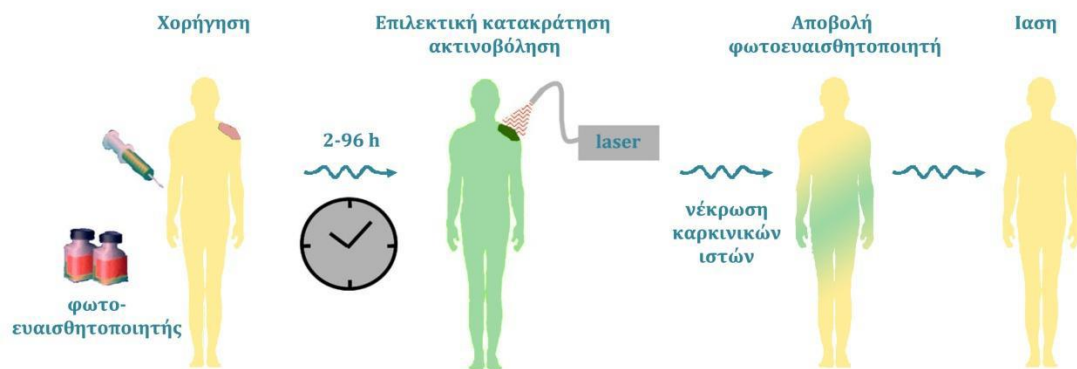
Κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία, η φωτοευαίσθητη ουσία απορροφά απευθείας την ενέργεια του ακτινοβολούμενου φωτός, η οποία μεταβιβάζεται στη συνέχεια στο μοριακό οξυγόνο για να δημιουργήσει μια ενεργό μορφή του (μονήρες οξυγόνο) ή ελεύθερες ρίζες ^[10]. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι το βιολογικό αποτέλεσμα είναι φωτοχημικό και όχι θερμικό, το οποίο σημαίνει ότι κατά τη διάρκεια της θεραπείας και μετά από αυτήν, η βλάβη στα συστατικά στοιχεία των συνδετικών ιστών (όπως το κολλαγόνο και η ελαστίνη) είναι μικρή ^{[9], [11]}.

Ένας περιορισμός της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι ότι δε μπορεί να θεραπεύσει τη νόσο όταν αυτή βρίσκεται σε προχωρημένο επίπεδο με πιθανές πολλαπλές μεταστάσεις, διότι δεν είναι δυνατή η ακτινοβόληση ολόκληρου του σώματος. Παρ' όλα αυτά, ακόμα και στην περίπτωση αυτή η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί βοηθώντας σημαντικά στην επιμήκυνση της ζωής του ασθενή αλλά και στη βελτίωση της ποιότητάς της.

Η καταστροφή του καρκινικού όγκου μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία γίνεται μέσω διαφόρων μηχανισμών. Πρώτον, η φωτοευαίσθητη ουσία μπορεί να στοχεύσει άμεσα στα καρκινικά κύτταρα προκαλώντας νέκρωση ή απόπτωση. Εναλλακτικά, μπορεί να προκαλέσει καταστροφή στα αγγεία του όγκου ή στα υγιή αγγεία γύρω από τον όγκο με αποτέλεσμα να σταματήσει η ροή του αίματος - και συνεπακόλουθα του οξυγόνου - προς τα καρκινικά κύτταρα ^[12]. Για να εξασφαλιστούν τα θετικά αποτελέσματα της διαδικασίας πρέπει το φως να στοχεύσει με ακρίβεια και αυτό μπορεί εύκολα να πραγματοποιηθεί με τη χρήση σύγχρονων οπτικών ινών και συστημάτων διαφόρων τύπων ενδοσκοπησης ^{[10], [13]}.

Συνοπτικά, η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να θεωρηθεί ως μια διαδικασία τεσσάρων σταδίων (Εικόνα 1.2-2). Μετά την επιλογή της φωτοδυναμικής θεραπείας

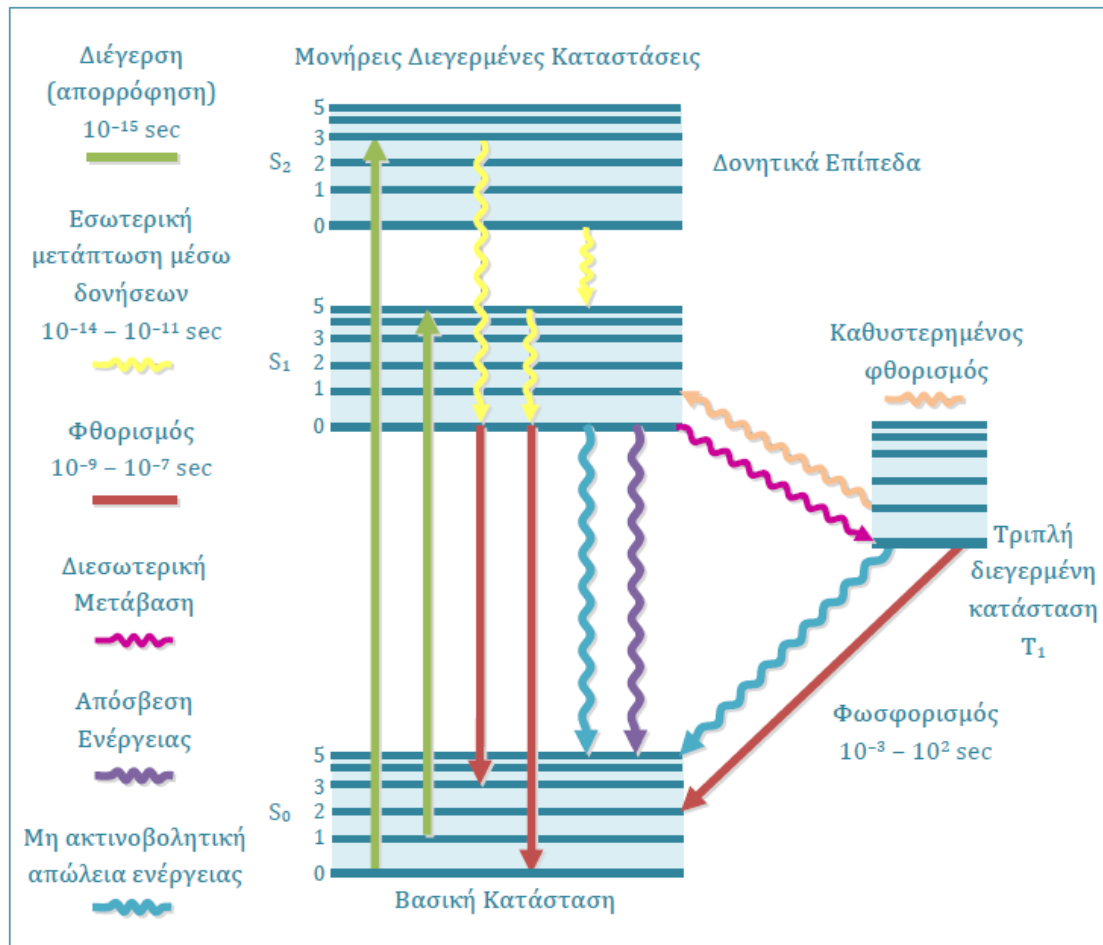
ως κατάλληλη μέθοδο θεραπείας για ασθενή με καρκινικό όγκο, το πρώτο στάδιο είναι η χορήγηση της φωτοευαίσθητης ουσίας. Στο δεύτερο στάδιο, γίνεται επιλεκτική κατακράτησή της από τους καρκινικούς όγκους και επιλεκτική ακτινοβολή του όγκου και των γύρω υγιών ιστών, μετά από προκαθορισμένο χρόνο. Στο τρίτο στάδιο, η φωτοευαίσθητη ουσία αποβάλλεται σταδιακά από όλους τους ιστούς ενώ ο όγκος αρχίζει να συρρικνώνεται ως αποτέλεσμα της φωτοδυναμικής θεραπείας και της καταστροφής των κυττάρων του. Ο όγκος καταστρέφεται γρήγορα και κάθε πιθανή βλάβη στους υγιείς ιστούς θεραπεύεται μέσα στις επόμενες 6 – 8 εβδομάδες. Στο τέταρτο στάδιο, γίνεται η πλήρης καταστροφή του όγκου και η αποβολή της φωτοευαίσθητης ουσίας από τον οργανισμό^[14].



Εικόνα 1.2-2: Στάδια της φωτοδυναμικής θεραπείας^[6].

1.3 Κβαντική ερμηνεία

Η απορρόφηση ενέργειας από ένα μόριο πραγματοποιείται μεταξύ των κοντινών δονητικών και περιστροφικών ενεργειακών επιπέδων των διεγερμένων καταστάσεων σε διαφορετικά μοριακά τροχιακά. Το διάγραμμα της Εικόνας 1.3-1 περιγράφει τις πιθανές πορείες διέγερσης και αποδιέγερσης ενός μορίου. Παρακάτω, υπάρχει αναλυτική ερμηνεία του κάθε μηχανισμού που επιτρέπει στο μόριο να επιστρέψει στη βασική του στάθμη.



Εικόνα 1.3-1: Διάγραμμα Jablonski ^[6].

1.3.1 Εσωτερική μετάπτωση

Το μόριο οδηγείται σε χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση, συγκεκριμένα σε κοντινό δονητικό επίπεδο της βασικής ενεργειακής κατάστασης, χωρίς καμία εκπομπή ακτινοβολίας. Η ενέργειά του χάνεται μέσω δονητικής αποδιέγερσης ^{[15], [16]}.

1.3.2 Εκπομπή φθορισμού

Η εκπομπή φθορισμού περιλαμβάνει πάντα μεταπτώσεις προς χαμηλότερα ενεργειακά επίπεδα. Το μόριο καταλήγει σε ένα δονητικό επίπεδο της βασικής

μονήρους κατάστασης (S_0) από τη βασική στάθμη της μονήρους διεγερμένης στάθμης (S^*), με εκπομπή ενός φωτονίου. Η ενέργεια του φωτονίου και άρα το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, καθορίζεται από την ενεργειακή διαφορά μεταξύ της διεγερμένης και του δονητικού επιπέδου της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η διάρκεια ζωής του φθορισμού είναι της τάξης των nsec. Κατόπιν, μέσω απόσβεσης και χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας, το μόριο επιστρέφει στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της βασικής κατάστασης.

Εξαιτίας της απώλειας ενέργειας κατά την παραμονή του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, η εκπεμπόμενη ενέργεια (φθορισμός) είναι μεγαλύτερου μήκους κύματος σε σχέση με την απορροφηθείσα ενέργεια. Το φάσμα φθορισμού (η κατανομή της έντασης της ακτινοβολίας φθορισμού για κάθε μήκος κύματος), εκφράζει τις διαφορετικές πιθανές μεταβάσεις από την μονήρη διεγερμένη κατάσταση στα διάφορα δονητικά επίπεδα της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η σχετική πιθανότητα να συμβεί κάποια από τις πιθανές διαδρομές διαφέρει από μόριο σε μόριο και εξαρτάται, όχι μόνο από τη δομή του, αλλά και από το τοπικό του περιβάλλον^[16].

1.3.3 Δονητική αποδιέγερση (ή ταλαντωτική χαλάρωση)

Το μόριο μπορεί να οδηγηθεί στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της ενεργειακής κατάστασης που βρίσκεται, χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας^[16].

1.3.4 Εξωτερική μετατροπή

Η μετάβαση από τη διεγερμένη κατάσταση στη βασική κατάσταση ή σε κάποια χαμηλότερη κατάσταση μπορεί να περιλαμβάνει αλληλεπίδραση με μεταφορά ενέργειας μεταξύ του μορίου και μορίων διαλύτη ή άλλου συστατικού^[15].

1.3.5 Εσωτερική μετατροπή $S^* \rightarrow T^*$

Το διεγερμένο μόριο μπορεί να μεταβεί από τη μονήρη διεγερμένη (S^*) στην πρώτη τριπλή διεγερμένη στάθμη. Η μετάβαση από τη βασική (S_0) στην τριπλή διεγερμένη (T^*) είναι απαγορευμένη (πολύ απίθανη) κβαντομηχανικά. Σε αντιδιαστολή, η μετάπτωση από την πρώτη διεγερμένη μονήρη στην τριπλή διεγερμένη στάθμη είναι περισσότερο πιθανή, αφού η ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της (T^*) είναι μικρότερη αυτής της (S^*).

Η άμεση επιστροφή στην βασική κατάσταση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας είτε με εκπομπή ακτινοβολίας, οπότε και έχουμε το φαινόμενο του φωσφορισμού. Εφόσον η πιθανότητα αντίστροφης μετάβασης από τη διεγερμένη τριπλή στη διεγερμένη μονήρη στάθμη είναι μικρή, η διεγερμένη τριπλή στάθμη είναι συνήθως μεγάλης διάρκειας ζωής (της τάξεως των msec). Επίσης η σχετικά μεγάλη παραμονή των μορίων σε αυτή την κατάσταση τα καθιστά πιο επιρρεπή σε διαδικασίες αποδιέγερσης χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας^[16].

1.3.6 Φωσφορισμός

Μετά από εσωτερική μετατροπή $S^* \rightarrow T^*$, το μόριο από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση (T^*) μπορεί να επιστρέφει άμεσα στη βασική κατάσταση (S_0) με εκπομπή ακτινοβολίας (φωσφορισμός)^[16].

1.3.7 Καθυστερημένος φθορισμός

Το διεγερμένο μόριο το οποίο βρίσκεται στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση (T^*) μπορεί εκτός από άμεσα να επιστρέψει και έμμεσα στη βασική μονήρη κατάσταση (S_0) μέσω της S_1 . Η μετάβαση από την τριπλή διεγερμένη στη μονήρη διεγερμένη προϋποθέτει απορρόφηση ενέργειας από το περιβάλλον. Από την μονήρη διεγερμένη το μόριο θα μεταβεί στη βασική μονήρη (S_0) εκπέμποντας φωτεινή ενέργεια ίση με τη ενεργειακή διαφορά των δύο σταθμών ^[16]. Πρόκειται, επομένως, για την ακτινοβολητική μετάβαση $S_0 \rightarrow S_1$, αλλά επειδή παρατηρείται σε χρόνους μεγαλύτερους του φθορισμού, καλείται καθυστερημένος φθορισμός.

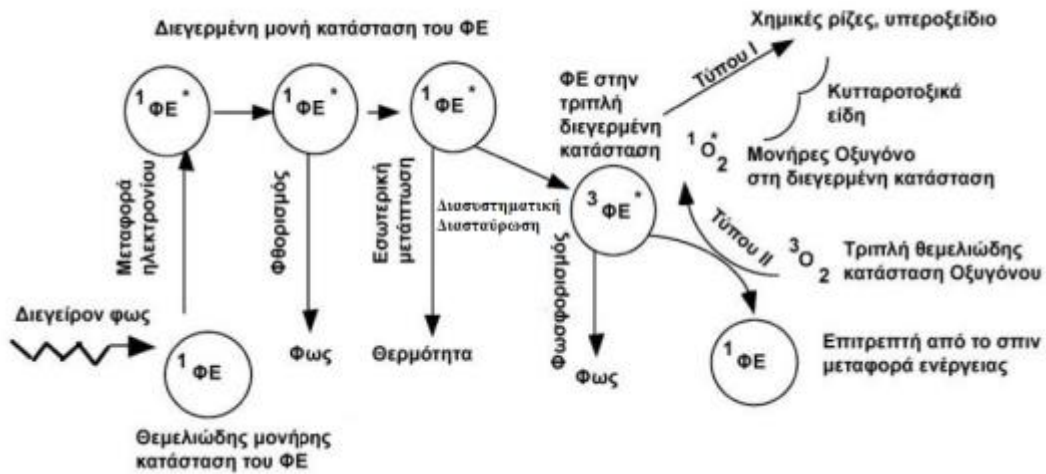
1.3.8 Μεταφορά ενέργειας μέσω κρούσεων

Εφόσον το διεγερμένο μόριο συγκρουστεί με άλλο μόριο χαμηλότερου ενεργειακού επιπέδου, η ενέργεια του διεγερμένου μορίου μεταφέρεται στο άλλο μόριο, χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας. Ο μηχανισμός αυτός αναφέρεται ως απόσβεση φθορισμού ^[16].

1.3.9 Μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού

Η ενέργεια μπορεί να μεταφερθεί σε άλλο μόριο χωρίς επαφή μέσω μιας σύζευξης διπόλου – διπόλου ανάμεσα στα μόρια. 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 ^[16].

1.4 Μηχανισμοί φωτοδυναμικής δράσης



Εικόνα 1.4-1: Γραφική αναπαράσταση των φωτοφυσικών και φωτοχημικών μηχανισμών της φωτοδυναμικής θεραπείας [17].

1.4.1 Φωτοφυσική διαδικασία

Οι διαδικασίες απορρόφησης του φωτός και μεταφοράς ενέργειας που παρατηρούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία απεικονίζονται στην Εικόνα 1.4-1. Οι μηχανισμοί που επιτρέπουν στο μόριο να επιστρέψει στη βασική του στάθμη (S_0) έχουν αναλυθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο. Η φωτοφυσική διαδικασία της PDT περιλαμβάνει τρεις πιθανούς τρόπους αλληλεπίδρασης: φθορισμό, εσωτερική μετατροπή ή μετάβαση σε στάθμη διαφορετικής πολλαπλότητας.

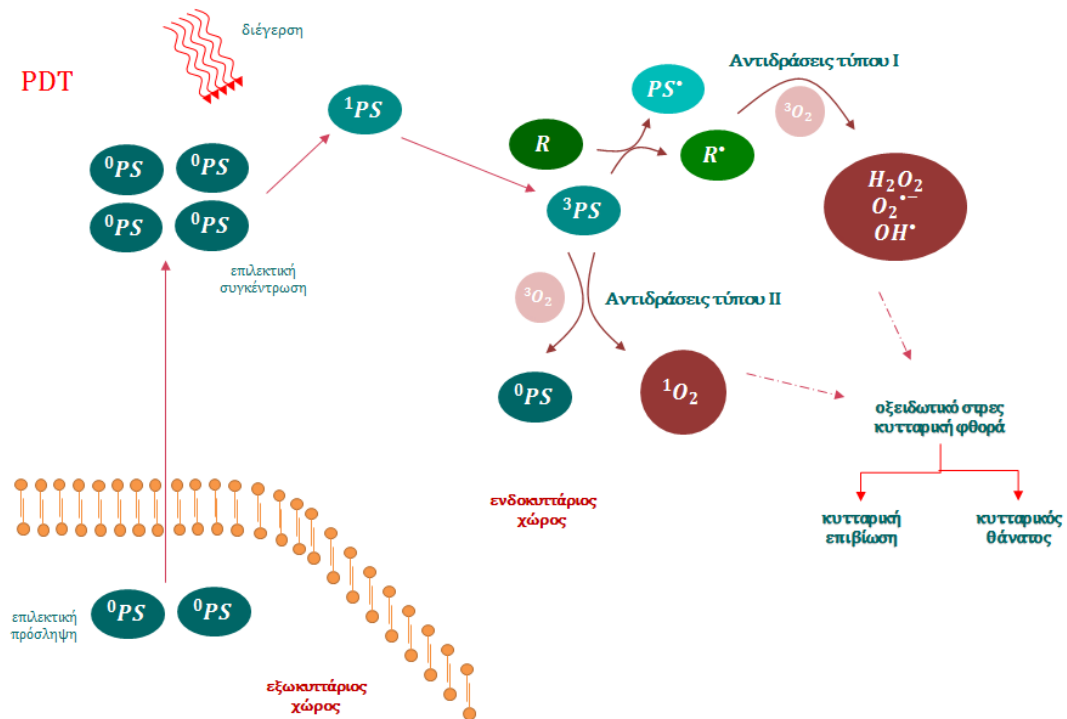
Η φωτοευαίσθητη ουσία έχει δυο ηλεκτρόνια με αντίθετα spin (απλή κατάσταση) στη χαμηλή ενεργειακή κατάσταση. Μετά την απορρόφηση του φωτός (φωτόνια), ένα από τα ηλεκτρόνια ενισχύεται σε υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση με ίδιο spin, δηλαδή μεταφέρεται στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση (S_1). Αυτή η διαδικασία είναι μικρής διάρκειας (κάποια nsec), όπου μπορεί να χάσει την ενέργειά της μέσω φθορισμού ή εσωτερικής μετατροπής [7].

Επίσης, το ηλεκτρόνιο στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση (S_1) της φωτοευαίσθητης ουσίας μπορεί να μεταβεί και σε διαδικασία η οποία αντιστρέφει το spin του διεγερμένου μορίου με αποτέλεσμα το μόριο να βρεθεί σε στάθμη διαφορετικής πολλαπλότητας. Αυτή η διαδικασία οδηγεί το ηλεκτρόνιο στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση (T_1) [7], [15]. Η παραμονή του ηλεκτρονίου στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση είναι απαραίτητη για τη φωτοδυναμική θεραπεία διότι αυξάνει την πιθανότητα αλληλεπίδρασης του διεγερμένου μορίου με το οξυγόνο [18].

1.4.2 Φωτοχημική διαδικασία

Τα βασικά βιοχημικά μονοπάτια, μέσω των οποίων ο συνδυασμός φωτοευαίσθητοποίησης, φωτός και οξυγόνου οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο, εμφανίζονται στην Εικόνα 1.4-2. Οι φωτοευαίσθητοποιητές που βρίσκονται στη

θεμελιώδη, μη διεγερμένη κατάσταση (S_0), έπειτα από απορρόφηση φωτός μεταπίπτουν αρχικά σε μια ηλεκτρονικά μονήρη διεγερμένη στάθμη (S_1) και στη συνέχεια, μέσω εσωτερικής μετατροπής, μεταβαίνουν στην τριπλή διεγερμένη στάθμη (T_1), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.3-1.



Εικόνα 1.4-2: Μηχανισμοί δράσης κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία ^[19].

Η αλληλεπίδραση των φωτοευαισθητοποιητών που βρίσκονται στην τριπλή διεγερμένη στάθμη με τα γειτονικά τους μόρια έχει ως αποτέλεσμα δυο τύπους φωτοχημικών αντιδράσεων, τις αντιδράσεις Τύπου I και Τύπου II ^[20].

1.4.2.1 Αντιδράσεις Τύπου I

Οι αντιδράσεις Τύπου I αφορούν τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το διεγερμένο μόριο της φωτοευαίσθητης ουσίας προς τα μόρια του περιβάλλοντος, δηλαδή την κυτταρική μεμβράνη ή το μόριο του υποστρώματος, σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες ^[7]. Η αντίδραση ανάμεσα στο φωτοευαισθητοποιητή (που βρίσκεται στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση) και ένα γειτονικό μόριο (που βρίσκεται στη βασική κατάσταση) μπορεί να παράγει ιοντικές ρίζες καθώς και ρίζες χωρίς ηλεκτρικό φορτίο.

Η πλειοψηφία των ριζών που παράγονται μέσω αυτής της αντίδρασης αλληλεπιδρά με το μοριακό οξυγόνο παράγοντας ένα μείγμα από τις αποκαλούμενες ως «δραστικές μορφές οξυγόνου». Το ανιόν του υπεροξειδίου (O_2^-), το υδροξύλιο (OH^\cdot) και το υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα δραστικών μορφών οξυγόνου από τα οποία ειδικότερα το υδροξύλιο μπορεί να οξειδώσει ταχύτατα ένα μεγάλο αριθμό βιομορίων. Οι αντιδράσεις Τύπου I είναι πιο

αποτελεσματικές σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου και υψηλής συγκέντρωσης υποστρώματος ^[21].

1.4.2.2 Αντιδράσεις Τύπου II

Οι αντιδράσεις Τύπου II αναφέρονται στην αλληλεπίδραση ανάμεσα στο φωτοευαισθητοποιητή που βρίσκεται στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση και το μοριακό οξυγόνο το οποίο βρίσκεται στη θεμελιώδη κατάσταση ^[21]. Το διεγερμένο μόριο του φωτοευαισθητοποιητή μεταφέρει την ενέργειά του απευθείας στο μοριακό οξυγόνο, σχηματίζοντας το κυτταροτοξικό μονήρες οξυγόνο, το οποίο βρίσκεται στη διεγερμένη κατάσταση ενώ ο φωτοευαισθητοποιητής επιστρέφει στη θεμελιώδη κατάστασή του ^[7].

Το μονήρες οξυγόνο είναι αρκετά αντιδραστικό είδος, ηλεκτροφιλικό και μπορεί να οξειδωθεί γρήγορα με βιομόρια. Είναι ασταθές, με διάρκεια ζωής που κυμαίνεται κάποιων δεκάδων μsec ^[22] με αποτέλεσμα να περιορίζεται η διάχυσή του στα κύτταρα σε απόσταση της τάξης των nm. Κατά συνέπεια, η πρόκληση φωτοδυναμικής βλάβης εντοπίζεται στα κύτταρα πολύ κοντά στη θέση που βρίσκεται ο φωτοευαισθητοποιητής ^[23], αυξάνοντας έτσι την επιλεκτικότητα της θεραπείας και ελαχιστοποιώντας τη βλάβη στους υγιείς ιστούς.

Παρόλο που οι μηχανισμοί της φωτοδυναμικής θεραπείας δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως ακόμα, είναι γενικά αποδεκτό ότι το μονήρες οξυγόνο που παράγεται από την αντίδραση Τύπου II είναι κυρίως υπεύθυνο για τον κυτταρικό θάνατο.

Οι αντιδράσεις **Τύπου I** και **Τύπου II** μπορούν να εμφανιστούν ταυτόχρονα και η σχέση μεταξύ αυτών των διαδικασιών καθώς και η συμβολή τους στο θάνατο των κυττάρων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των φωτοευαισθητοποιητών, της ενδοκυτταρικής κατανομής, του υποστρώματος και της παρουσίας οξυγόνου ^[18].

1.4.3 Βιολογική διαδικασία

Η φωτοδυναμική θεραπεία περιλαμβάνει όχι μόνο φωτοχημικές και φωτοφυσικές διαδικασίες αλλά και βιολογικές διαδικασίες, οι οποίες επάγονται στο βιολογικό σύστημα ως αποτέλεσμα της φωτοδυναμικής δράσης.

Η φωτοευαίσθητη ουσία πρέπει να είναι σε θέση να απορροφηθεί από το αίμα και αυτό εξασφαλίζεται συνήθως με τη χορήγησή της μέσω ενδοφλέβιας ένεσης ^[9]. Μόλις η φωτοευαίσθητη ουσία προστεθεί στο αίμα, τα μόρια της ουσίας αποσυντίθενται από τον διαλύτη που τα μεταφέρει. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες, τα ερυθρά και τα λευκά αιμοσφαίρια που υπάρχουν στο αίμα, παίζουν το ρόλο του μέσου με το οποίο θα μπορέσουν να μεταφερθούν τα μόρια της φωτοευαίσθητης ουσίας. Στη συνέχεια, τα μόρια αυτά πρέπει να αποκολληθούν από τα μέσα που τα μεταφέρουν και να διασχίσουν τα τοιχώματα των αγγείων, ώστε να διαχυθούν στον όγκο.

Επιπλέον, το μήκος κύματος του φωτός που φτάνει στον επιβλαβή ιστό θα πρέπει να απορροφάται από τη φωτοευαίσθητη ουσία. Το ποσοστό του φωτός που θα απορροφήσει η ουσία εξαρτάται από το ίδιο το φως και από τα χαρακτηριστικά του ιστού, τον οποίο διαπερνάει. Όταν εκτίθεται σε φως συγκεκριμένου μήκους κύματος, ο φωτοευαισθητοποιητής παράγει ένα ενεργό είδος οξυγόνου που οξειδώνει τα

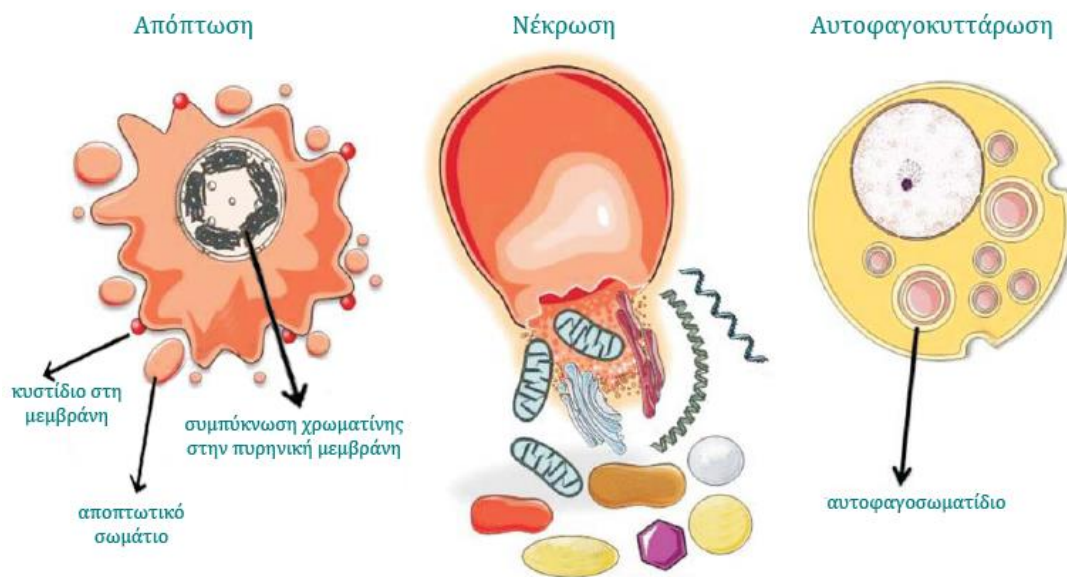
βασικά στοιχεία των κυττάρων. Αυτό σημαίνει ότι η φωτοδυναμική θεραπεία προκαλεί άμεσα τον κυτταρικό θάνατο και τον τραυματισμό των μικροαγγείων.

Δεδομένου ότι η διαδικασία της φωτοδυναμικής θεραπείας περιλαμβάνει φωτοχημική και όχι θερμική αντίδραση, η βλάβη στα συστατικά στοιχεία των συνδετικών ιστών (όπως το κολλαγόνο και την ελαστίνη) είναι μικρή κατά τη διάρκεια της θεραπείας και μετά από αυτήν. Αυτό το χαρακτηριστικό δεν το έχουν άλλες μέθοδοι θεραπείας όπως η χημειοθεραπεία ή η ακτινοθεραπεία ^[9].



1.5 Μηχανισμός καταστροφής καρκινικών κυττάρων

Ο κύριος στόχος της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι ο θάνατος των κυττάρων και η επίτευξή του καθορίζεται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φωτοευαισθητοποιητή, τη συγκέντρωση του οξυγόνου καθώς επίσης και από το μήκος κύματος αλλά και την ένταση του φωτός. Ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από τη φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να εμφανιστεί με τρεις διακριτές μορφές: απόπτωση, νέκρωση ή αυτοφαγία (Εικόνα 1.5-1). Η διάκριση αυτή βασίζεται στις διαφορές που εμφανίζουν οι μορφολογικές, βιοχημικές και μοριακές αλλαγές στις οποίες υπόκεινται τα κύτταρα κατά το θάνατό τους ^[20].



Εικόνα 1.5-1: Μορφολογικά χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου: (α) απόπτωσης, (β) νέκρωσης, (γ) αυτοφαγοκυττάρωσης ^[19].

1.5.1 Απόπτωση

Με τον όρο απόπτωση ορίζουμε τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, δηλαδή την ενεργοποίηση προϋπάρχουσας ρύθμισης κυτταρικού θανάτου η οποία είναι κωδικοποιημένη στο γενετικό υλικό. Η απόπτωση εμφανίζεται κατά την εμβρυική ανάπτυξη και κατά την ανάπτυξη των οργάνων ^[24].

Το πιο κοινό χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι η ενεργή συμμετοχή του κυττάρου στον αυτό-αφανισμό του. Το κύτταρο κινητοποιεί μια αλληλουχία γεγονότων που οδηγούν στην αποσύνθεσή του και το σχηματισμό «αποπτωτικών σωματίων» που στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονται από τα γειτονικά κύτταρα, χωρίς τη δημιουργία φλεγμονής. Η αυξημένη κυτταροπλασματική συγκέντρωση του ασβεστίου, η κυτταρική αφυδάτωση, η συμπύκνωση της χρωματίνης της περιφέρειας του πυρήνα, η πρωτεόλυση και ο κατακερματισμός του πυρήνα και του ίδιου του κυττάρου αποτελούν τα πιο χαρακτηριστικά μορφολογικά στοιχεία της απόπτωσης. Από την

άλλη πλευρά, ακόμα και κατά τα προχωρημένα στάδια της απόπτωσης, η δομική ακεραιότητα και η λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης διατηρούνται. Επίσης, διατηρούνται ενεργά το μιτοχόνδρια και τα λυσοσώματα ^[20].

1.5.2 Νέκρωση

Η νέκρωση είναι ο ξαφνικός θάνατος των κυττάρων, προκαλείται από τις απότομες βλάβες τους οι οποίες συνήθως προέρχονται από υπερβολική δόση κυτταροτοξικών παραγόντων, φυσικούς ή χημικούς τραυματισμούς, είτε από υποθερμία ή υπερθερμία.

Ενώ η απόπτωση απαιτεί την ενεργό συμμετοχή ολόκληρου του κυττάρου, η νέκρωση είναι μια παθητική και εκφυλιστική διαδικασία, η οποία in vivo προκαλεί τη δημιουργία φλεγμονής στους ιστούς. Το πρώιμο στάδιο της νέκρωσης είναι η διόγκωση των κυττάρων, ακολουθεί η ρήξη της πλασματικής μεμβράνης και τέλος η απελευθέρωση του κυτταροπλασματικού περιεχομένου ^[20].

Είναι γνωστό ότι οι δυο κύριοι τρόποι θανάτου των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι η **απόπτωση** και η **νέκρωση**. Υπάρχει επίσης και η κατάσταση που εμφανίζει το συνδυασμό των δυο και ονομάζεται νεκραπόπτωση ^[25]. Η κατάσταση που επιλέγει το κύτταρο για το θάνατό του εξαρτάται από τη διάρκεια και την ένταση των τραυμάτων και από τα ενεργειακά αποθέματα του κυττάρου. Η νέκρωση δεν απαιτεί ενέργεια, ενώ η απόπτωση απαιτεί. Επομένως, αν κάποια κύτταρα ακολουθήσουν τη διαδικασία της απόπτωσης μπορεί να οδηγηθούν σε κατάσταση νέκρωσης διότι δεν τους έχουν απομείνει ενεργειακά αποθέματα ^{[26], [27]}.

1.5.3 Αυτοφαγία

Η έκθεση των κυττάρων στη φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί επίσης να οδηγήσει στη διέγερση της διαδικασίας της αυτοφαγοκυττάρωσης ή αυτοφαγίας, η οποία ενισχύεται περισσότερο σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Η αυτοφαγία αποτελεί ένα λυσοσωμικό μονοπάτι που οδηγεί στην αποδόμηση και την ανακύκλωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών και των οργανιδίων. Η διαδικασία αυτή μπορεί να έχει τόσο κυτταροπροστατευτικό όσο και αντίθετο ρόλο μετά από χημειοθεραπείες κατά του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων εκείνων των θεραπειών που χρησιμοποιούν τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ) ως πρωταρχικούς παράγοντες για την πρόκληση της κυτταρικής καταστροφής. Πρόσφατες μελέτες οριοθετούν την αυτοφαγία ως ένα μηχανισμό για τη διατήρηση της βιωσιμότητας του κυττάρου μετά τη φωτοδυναμική επίδραση ^[23].

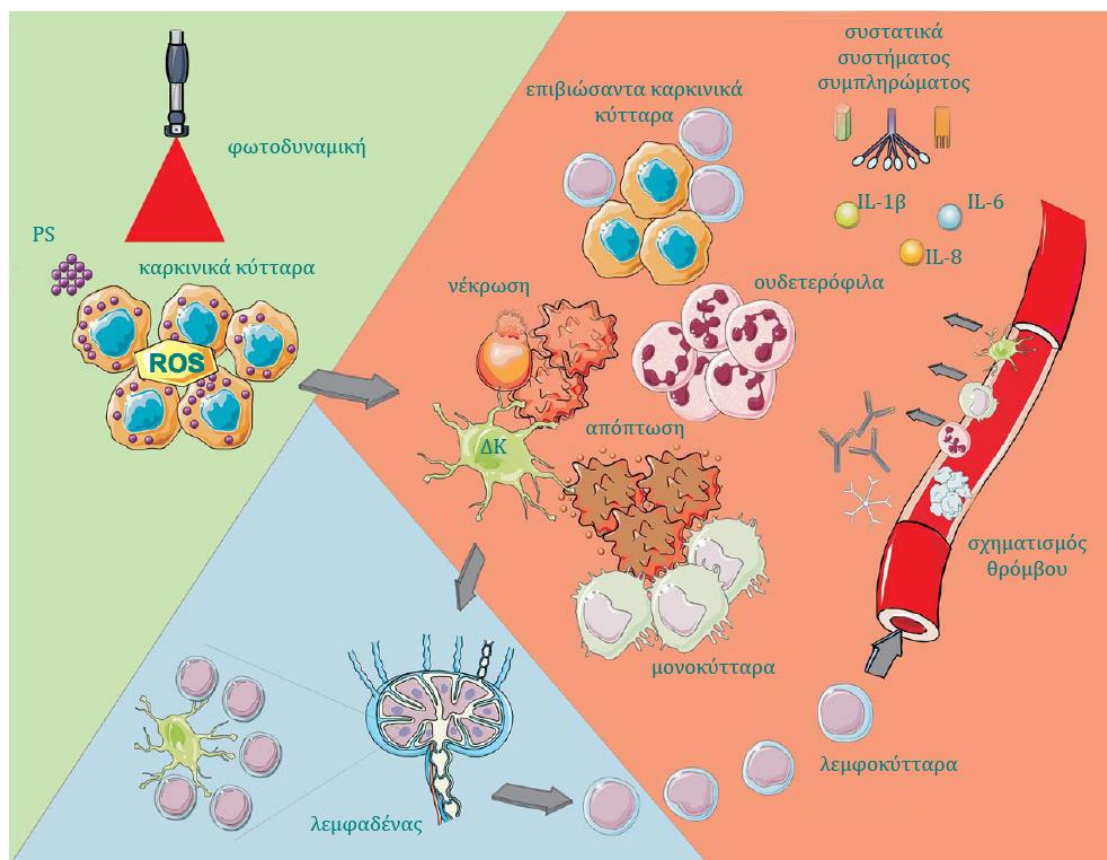
Πολλές έρευνες έχουν αποδείξει ότι η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας παίζει σημαντικό ρόλο στον τελικό τρόπο πρόκλησης του κυτταρικού θανάτου. Πιο συγκεκριμένα, οι φωτοευαίσθητοποιητές που εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο επάγουν κυτταρική απόπτωση σε σχέση με τους φωτοευαίσθητοποιητές που συσσωρεύονται στο σωμάτιο Golgi, τα λυσοσώματα, την κυτταρική μεμβράνη ή παραμένουν διάχυτοι στο κυτταρόπλασμα. Αντιθέτως, οι φωτοευαίσθητοποιητές που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και τα λυσοσώματα σχετίζονται με τη νέκρωση ^[18].

1.5.4 Ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος

Τα κύτταρα που έχουν απορροφήσει φωτοευαισθητοποιητή μετά τη διέγερσή του προκαλούν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ειδών. Με τη σειρά τους αυτά προκαλούν ^[19]:

- απευθείας κυτταρικό θάνατο κυρίως μέσω απόπτωσης και νέκρωσης,
- διάρρηξη του αγγειακού δικτύου του όγκου,
- ενεργοποίηση φλεγμονωδών αντιδράσεων.

Εκτός από τον απευθείας κυτταρικό θάνατο, θεωρείται πως η φωτοδυναμική θεραπεία συμβάλλει επιπλέον στη διάρρηξη των αγγείων και στερεί τον καρκινικό όγκο από οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά οδηγώντας τον σε κυτταρικό θάνατο. 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 κυττάρων φλεγμονής προκαλώντας περαιτέρω καταστροφή του καρκινικού όγκου ^{[7], [19], [23]}.



Εικόνα 1.5-2: Μηχανισμοί νέκρωσης καρκινικού όγκου επαγόμενοι από τη φωτοδυναμική θεραπεία ^[19].

Η φωτοδυναμική θεραπεία συνήθως προκαλεί άμεση, ισχυρή φλεγμονώδη αντίδραση η οποία γίνεται αντιληπτή καθώς σχηματίζεται οίδημα, περιορισμένο στην υπό θεραπεία περιοχή. Η ενεργοποίηση φλεγμονωδών αντιδράσεων από τη φωτοδυναμική θεραπεία ακολουθείται από μεγάλες αλλαγές στο αγγειακό δίκτυο του όγκου το οποίο γίνεται διαπερατό σε πρωτεΐνες του αίματος και ευπρόσιτο σε κύτταρα φλεγμονής τα οποία ταχύτατα και μαζικά εισβάλλουν στον υπό φωτοδυναμική θεραπεία καρκινικό όγκο. Βασικός τους στόχος είναι να αδρανοποιήσουν την πηγή σημάτων που σχετίζονται με την κυτταρική βλάβη και τον κυτταρικό θάνατο, εξουδετερώνοντας δομές του φωτοδυναμικά πληγμένου καρκινικού ιστού, περιλαμβάνοντας επίσης φθαρμένα ή νεκρά κύτταρα ^[19].

Συνοψίζοντας, στην Εικόνα 1.5-2 παρουσιάζονται οι μηχανισμοί νέκρωσης καρκινικού όγκου μέσω της φωτοδυναμικής θεραπείας. Τα νεκρά και φθαρμένα καρκινικά κύτταρα απομακρύνονται από τα φαγοκύτταρα, τα οποία επιστρέφουν στους 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 ^[23].

1.6 Προκλήσεις για τη φωτοδυναμική θεραπεία

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μια έξυπνη, εξαιρετικά επιλεκτική και αποτελεσματική θεραπευτική μέθοδος για τη θεραπεία 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), η φωτοδυναμική θεραπεία παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα αλλά και κάποια μειονεκτήματα που αποτελούν προκλήσεις για το μέλλον της. Στους Πίνακες 1.6-1 και 1.6-2 παρατίθενται συνοπτικά τα σημαντικότερα εξ αυτών.

Πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας
Ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδος. Οδηγεί σε $\approx 80\%$ κυτταρικό θάνατο.
Διατήρηση ακεραιότητας ιστού του εξωκυττάριου χώρου επιτρέποντας την αναγέννηση / ανάπλαση φυσιολογικού, υγιούς ιστού μετά τη φωτοδυναμική (σε αντίθεση με τη χειρουργική αφαίρεση).
Ειδική στόχευση και επιλεκτικότητα (συσσώρευση φωτοευαισθητοποιητή στους καρκινικούς ιστούς) σε σχέση με άλλες σύγχρονες μεθόδους θεραπείας του καρκίνου, με αποτέλεσμα να μην καταστρέφονται οι υγιείς ιστοί.
Μη επεμβατική θεραπεία.
Ο φθορισμός της φωτοευαίσθητης ουσίας επιτρέπει την ανίχνευση και τον εντοπισμό του νεοπλασματικού ιστού <i>in vivo</i> και παρέχει ένα εύχρηστο μέσο για τον έλεγχο της συγκέντρωσής του.
Δυνατότητα χορήγησης των φωτοευαισθητοποιητών και για τοπικές εφαρμογές της φωτοδυναμικής θεραπείας, ανάλογα με τον τύπου του όγκου και/ή τη θέση του. Τα αποτελέσματα ποικίλουν, από καθυστέρηση στην ανάπτυξη του όγκου στην περίπτωση προχωρημένων καρκινικών κυττάρων, οδηγώντας σε βελτίωση στην ποιότητα και τη διάρκεια ζωής των ασθενών, μέχρι και την πλήρη υποχώρηση του όγκου.
Επαναλαμβανόμενες δόσεις μπορούν να δοθούν χωρίς περιορισμό στη συνολική δόση, έτσι ώστε η θεραπεία να εφαρμοστεί ώσπου ο καρκίνος να εξαλειφθεί εντελώς.
Αντίθετα από την ακτινοθεραπεία, η φωτοδυναμική μπορεί να χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα. Συνεπώς, υπάρχει δυνατότητα για μακροχρόνια θεραπεία του καρκίνου ακόμα και σε περιπτώσεις όπου η πλήρης θεραπεία του ασθενή δεν είναι εφικτή. Με αυτό τον τρόπο, συμβάλλει στη βελτίωση της ποιότητας ζωής συγκεκριμένης κατηγορίας ασθενών με ανεγχείρητους όγκους, οι οποίοι έχουν εξαντλήσει άλλων ειδών θεραπείες.

Δυνατότητα συνδυαστικής χρήσης με άλλες μεθόδους θεραπείας (χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ανοσοθεραπεία, χειρουργική αφαίρεση όγκου) για την αποτελεσματικότερη καταπολέμηση του καρκίνου.

Δυνατότητα αντιμετώπισης πολλαπλών καρκινωμάτων ταυτόχρονα.

Δυνατότητα χρήσης ακόμα και εκεί που η χειρουργική επέμβαση δεν είναι δυνατή.

Η θεραπεία έχει χαμηλό κόστος, συγκρινόμενη με τις άλλες συμβατικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες θεραπείες καρκίνου.

Πρόκληση φωτοχημικής διεργασίας και όχι θερμικής, συνεπώς η βλάβη στα συστατικά στοιχεία των συνδετικών ιστών, όπως το κολλαγόνο και η ελαστίνη, είναι μικρή κατά τη διάρκεια της θεραπείας και μετά από αυτήν.

Πολύ χαμηλή συστηματική τοξικότητα, η οποία οφείλεται στο γεγονός ότι οι φωτοευαισθητοποιητές ενεργοποιούνται μόνο με την παρουσία φωτός. Παρατηρείται μόνο φωτοευαισθησία του δέρματος, η οποία στην περίπτωση των φωτοευαισθητοποιητών τρίτης γενιάς έχει περιοριστεί χρονικά.

Έλλειψη σημαντικής θνησιμότητας που να συνδέεται με τη φωτοδυναμική θεραπεία.

Υψηλά αισθητικά αποτελέσματα (ελάχιστη δερματική βλάβη, μικρή ή καθόλου ουλή) τα οποία είναι συχνά καλύτερα σε σχέση με τις συμβατικές θεραπείες.

Πολλές διαδικασίες σχετικές με τη φωτοδυναμική θεραπεία μπορούν να πραγματοποιηθούν σε εξωνοσοκομειακά περιβάλλοντα (π.χ. εξωτερικά ιατρεία). Το πλεονέκτημα αυτό καθιστά τη θεραπεία πιο φιλική προς τον ασθενή αλλά και πιο οικονομική σε κάποιες περιπτώσεις.

Δεν απαιτείται διαμονή σε νοσοκομείο.

Εφαρμόσιμη 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.

Μεγαλύτερα ποσοστά ίασης σε περιπτώσεις συγκεκριμένων καρκινικών τύπων (για παράδειγμα στον καρκίνο του οισοφάγου τύπου Barrett).

Τεράστιες δυνατότητες για περαιτέρω ανάπτυξη της.

Πίνακας 1.6-1: Πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας ^{[9], [18], [19] [20], [23], [28], [29]}.

Τα κυριότερα μειονεκτήματα και προκλήσεις της φωτοδυναμικής θεραπείας

Αδυναμία προσέγγισης όγκων μεγάλου βάθους και όγκων οι οποίοι βρίσκονται σε

εσωτερικά, συμπαγή όργανα.
Δύσκολη διάγνωση και αξιολόγηση της πορείας της θεραπείας.
Φωτοευαισθησία των ασθενών μετά τη θεραπεία λόγω της φωτοευαίσθητης ουσίας. Η διάρκεια της ευαισθησίας εξαρτάται από τον τύπο του φωτοευαισθητοποιητή και τον τρόπο χορήγησής του.
Ο χρόνος που μεσολαβεί από τη χορήγηση της φωτοευαίσθητης ουσίας και της ακτινοβολήσης είναι συχνά ενοχλητικός για τους ασθενείς. Η διάρκεια αυτού του χρόνου εξαρτάται από τον τύπο του φωτοευαισθητοποιητή.
Πιθανή βλάβη των γύρω ιστών κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας εφόσον η δοσιμετρία δεν είναι με ακρίβεια υπολογισμένη.
Άγνοια για το κόστος του εξοπλισμού, το οποίο θεωρείται μεγάλο.
Απουσία επίσημα καθορισμένων πρωτοκόλλων θεραπείας μετά από κλινικές δοκιμές μεγάλης κλίμακας.

Πίνακας 1.6-2: Τα κυριότερα μειονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας ^{[9], [19], [28], [29]}.

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. Συνεπώς, η καινοτόμος αυτή θεραπευτική μεθοδολογία μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγαλύτερη κλίμακα, να αποκτηθεί μεγαλύτερη κλινική εμπειρία και να βελτιστοποιηθούν τα θεραπευτικά πρωτόκολλα, λύνοντας κάποια από τα παραπάνω προβλήματα ^[19].

Οι μεγάλες προκλήσεις ωστόσο επικεντρώνονται στα εξής δυο σημεία ^[19]:

- Τη θεραπεία καρκινικών όγκων μεγάλου σχετικά πάχους σε εσωτερικά όργανα.
- Τον έλεγχο ή την εξάλειψη της παραμένουσας φωτοευαισθησίας που αποτελεί τη σοβαρότερη παρενέργεια της φωτοδυναμικής θεραπείας.

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 μεγάλου βάθους εξαλείφοντας παράλληλα την φωτοευαισθησία.

Συγκεκριμένα, η έρευνα αφορά τόσο την ενίσχυση των φωτοδυναμικών ιδιοτήτων των φωτοευαισθητοποιητών και την ανάπτυξη συστημάτων ακτινοβολήσης μεγάλου βάθους με ακριβή δοσιμετρία όσο και την ευαισθητοποίηση του υπό θεραπεία καρκινικού όγκου στη φωτοδυναμική θεραπεία.



Κεφάλαιο 2: Φωτοευαισθητοποιητές



2.1 Φωτοευαίσθητες ουσίες

Ως φωτοευαισθητοποιητές χαρακτηρίζονται οι ουσίες που έχουν την ιδιότητα να απορροφούν ενέργεια με τη μορφή φωτονίων όταν διεγερθούν από φως κατάλληλου μήκους κύματος και να ενεργοποιούν τις κυτταροτοξικές αντιδράσεις τύπου I και II παράγοντας χημικώς ενεργά προϊόντα όπως μονήρες οξυγόνο, ελεύθερες ρίζες, κ.α. τα οποία καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα παρέχοντας το επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα. Τα βασικά χαρακτηριστικά κάθε φωτοευαισθητοποιητή είναι η μεγάλη κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρους οξυγόνου και ο μεγάλος χρόνος παραμονής στην τριπλή διεγερμένη στάθμη ^[30].

Υπάρχουν εκατοντάδες φυσικές και συνθετικές χρωστικές που μπορούν να λειτουργήσουν ως φωτοευαισθητοποιητές οι οποίες κυμαίνονται από φυτικές ενώσεις μέχρι πολύπλοκα συνθετικά μακρομόρια. Η αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας εξαρτάται, μεταξύ άλλων, και από την επιλογή της φωτοευαίσθητης ουσίας, αυτή η επιλογή γίνεται με μεγάλη προσοχή και με βάση την κλινική κατάσταση του ασθενούς ^[6].

Από τη στιγμή που η φωτοευαίσθητη ουσία εισέλθει στον οργανισμό μέχρι να αποβληθεί από αυτόν, πραγματοποιούνται διάφορες βιολογικές διεργασίες. 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 ^{[7], [19]}.

Τα κύτταρα των καρκινικών ιστών πολλαπλασιάζονται με ταχύτερους ρυθμούς σε σχέση με τα υγιή, ενώ διαθέτουν περισσότερους υποδοχείς λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας. Εκμεταλλευόμενοι αυτή την ιδιότητα, πολλοί φωτοευαισθητοποιητές δένονται σε υψηλής ή χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες για να διαχυθούν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ^[19]. Μέσα στο αίμα υπάρχουν και διάφορα κύτταρα (ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια), τα οποία μπορούν να βοηθήσουν σε αυτή τη μεταφορά. Στη συνέχεια, τα μόρια της φωτοευαίσθητης ουσίας αποκολλούνται από τα κύτταρα και προσκολλούνται στα τοιχώματα των αγγείων, τα οποία και πρέπει να διασχίσουν ώστε να φτάσουν στο στόχο τους ^{[7], [17]}.

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 υπολειτουργεί 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 ή παρείσφρηση μακροφάγων τα οποία έλκουν και παγιδεύουν υδρόφοβους φωτοευαισθητοποιητές αυξάνοντας τη συγκέντρωσή τους σε αυτούς ^[19].

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 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 ^[7], ^[19]. Η δομή και οι ιδιότητες του μορίου του φωτοευαισθητοποιητή καθορίζουν την πρόσληψη και το μοτίβο της ενδοκυττάριας χωρικής κατανομής του ^[7].

Μετά από κάποιο διάστημα, το οποίο διαφέρει ανάλογα με το φωτοευαισθητοποιητή, τα μόρια της ουσίας θα απομακρυνθούν από το στόχο μέσω του λεμφικού συστήματος και θα ξαναβρεθούν στην κυκλοφορία του αίματος για να αποβληθούν από το ήπαρ στη χολή ή τα νεφρά και στο τελικό στάδιο να αποβληθούν από τον οργανισμό ^[7].



2.2 Φωτοφυσικά χαρακτηριστικά φωτοευαισθητοποιητών

Στη φωτοδυναμική θεραπεία, η φωτοευαίσθητη ουσία εκτελεί τη μεταφορά της ενέργειας ακτινοβολίας στο οξυγόνο ή στα κυτταρικά συστήματα με αποτέλεσμα την καταστροφή του όγκου.

Οι φωτοφυσικές παράμετροι που καθορίζουν τις ιδιότητες αυτής της διεργασίας του φωτοευαισθητοποιητή είναι οι παρακάτω ^{[3], [6], [17]}:

- **Ο συντελεστής απόδοσης μονήρους οξυγόνου** $\phi_{\Delta} = \frac{P_s}{f_t}$, όπου P_s το παραγόμενο μονήρες οξυγόνο και f_t τα φωτόνια που απορροφήθηκαν από τη φωτοευαίσθητη ουσία.
- **Ο συντελεστής απόδοσης της τριπλής διεγερμένης κατάστασης** $\phi_t = \frac{n_t}{f_t}$, όπου n_t ο αριθμός των μορίων της φωτοευαίσθητης ουσίας τα οποία βρίσκονται στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση και f_t τα φωτόνια που απορροφήθηκαν από τη φωτοευαίσθητη ουσία.
- Η ενέργεια του μορίου της φωτοευαίσθητης ουσίας στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση που καταναλώθηκε στην παραγωγή μονήρους οξυγόνου $S_{\Delta} = \frac{\phi_{\Delta}}{\phi_t}$, όπου ϕ_{Δ} ο συντελεστής απόδοσης μονήρους οξυγόνου και ϕ_t ο συντελεστής απόδοσης της τριπλής διεγερμένης κατάστασης.
- **Ο χρόνος παραμονής στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση** τ_t . Όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος τ_t τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα αλληλεπίδρασης του διεγερμένου μορίου με το οξυγόνο ή τα περιβάλλοντα μόρια.
- Η διαφορά ενέργειας μεταξύ της βασικής μονήρους κατάστασης και της τριπλής διεγερμένης κατάστασης του μορίου της φωτοευαίσθητης ουσίας ΔE_t . Πρέπει $\Delta E_t > \Delta E_{\Delta}$, όπου ΔE_{Δ} είναι η διαφορά ενέργειας μεταξύ της μονήρους κατάστασης του οξυγόνου και της βασικής τριπλής κατάστασής του.
- **Ο συντελεστής απόδοσης φθορισμού** $\phi_f = \frac{n_f}{f_t}$, όπου n_f ο αριθμός των μορίων της φωτοευαίσθητης ουσίας τα οποία πέρασαν από την πρώτη μονήρη διεγερμένη κατάσταση στη βασική εκπέμποντας φθορισμό και f_t τα φωτόνια που απορροφήθηκαν από τη φωτοευαίσθητη ουσία. Ο συντελεστής απόδοσης φθορισμού ϕ_f είναι χρήσιμος για τη διάγνωση του καρκίνου αφού η φωτοευαίσθητη ουσία είναι επιλεκτική στους καρκινικούς ιστούς.

- **Ο συντελεστής απορρόφησης της ουσίας** στα διάφορα μήκη κύματος ακτινοβολίας. Η απορρόφηση σε ορισμένα μήκη κύματος παίζει σημαντικό ρόλο τόσο για το βάθος διείσδυσης όσο και για την πιθανότητα τυχαίας ενεργοποίησης του φωτοευαισθητοποιητή από την ηλιακή ακτινοβολία.



2.3 Βασικά χαρακτηριστικά φωτοευαίσθητοποιητών

Ο διαχωρισμός των φωτοευαίσθητων ουσιών γίνεται ανάλογα με την καταλληλότητά τους για θεραπευτικούς ή διαγνωστικούς σκοπούς. Ουσίες με υψηλή απόδοση ενέργειας μετά από διέγερση είναι προτιμότερες για χρήση στη θεραπεία ενώ ουσίες με υψηλή ενέργεια φθορισμού είναι πιο κατάλληλες για διαγνωστική απεικόνιση. Οι φωτοευαίσθητες ουσίες πρέπει να παρουσιάζουν κάποια συγκεκριμένα επιπλέον χαρακτηριστικά για να είναι αποδεκτές αλλά και αποτελεσματικές στη φωτοδυναμική θεραπεία.

Η ιδανική φωτοευαίσθητη ουσία πρέπει να είναι απλή σε σύνθεση, μη τοξική, να αποτελεί σταθερό παράγωγο γνωστής χημικής δομής, η οποία να κατακρατείται με υψηλό βαθμό επιλεκτικότητας από καρκινικούς ιστούς σε σχέση με τους γειτονικούς υγιείς ιστούς. Είναι σημαντικό να προσλαμβάνεται και να κατακρατείται επιλεκτικά από τα κακοήθη κύτταρα ή γενικότερα από τους παθολογικούς ιστούς, ώστε να είναι μεγάλος ο λόγος της συγκέντρωσης της ουσίας στον παθολογικό ιστό σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό. Βέβαια είναι ουτοπικό να ψάχνει κανείς μια ουσία που να προσλαμβάνεται αποκλειστικά και μόνο από νεοπλασματικά κύτταρα αλλά εκείνο που διαφέρει ανάμεσα στους διάφορους ιστούς είναι ο χρόνος που επιτυγχάνεται η μέγιστη συγκέντρωση της χρωστικής. Η ουσία κατανέμεται αρχικά μέσω της αιματικής κυκλοφορίας σε όλο το σώμα αλλά μετά από κάποιο χρονικό διάστημα κατακρατείται επιλεκτικά από τον καρκινικό όγκο. Το διάστημα αυτό είναι συνήθως 24 – 72 ώρες από τη στιγμή της εισαγωγής της ουσίας στο σώμα και διαφέρει ανάλογα με την ουσία.

Επίσης, η ιδανική ουσία πρέπει να απορροφά σε εκείνη την περιοχή του φάσματος της οπτικής ακτινοβολίας όπου το φως παρουσιάζει σχετικά μεγάλο βάθος διείσδυσης στους ιστούς, και όπου η ενέργεια των φωτονίων είναι αρκετή για την παραγωγή ελευθέρων ριζών όπως το μονήρες οξυγόνο. Η απαίτηση του βάθους διείσδυσης του φωτός υπάρχει προκειμένου να επιτυγχάνεται αντιμετώπιση τόσο των όγκων σε εσωτερικά όργανα όσο και όγκων με μεγάλο πάχος. Εφόσον το φως μόνο του δε μπορεί να δημιουργήσει κυτταροτοξικά παράγωγα αν απουσιάζει ο φωτοευαίσθητοποιητής, αν όλοι οι ιστοί (τόσο οι φυσιολογικοί όσο και οι καρκινικοί) ακτινοβοληθούν με την ίδια δόση φωτός, θα ακολουθήσει επιλεκτική καταστροφή των νεοπλασματικών ιστών αφήνοντας τον υγιή ιστό πρακτικά ανέπαφο.

Εκτός από την όσο το δυνατό μικρότερη απορρόφησή της από τους υγιείς ιστούς, η φωτοευαίσθητη ουσία πρέπει να αποβάλλεται γρήγορα από αυτούς, με στόχο τη βελτίωση της ποιότητας ζωής του ασθενή. Όσο η φωτοευαίσθητη ουσία παραμένει στον οργανισμό, ο ασθενής θα πρέπει να προφυλάσσεται από την ηλιακή ακτινοβολία αλλά και κάθε άλλη πηγή φωτός (π.χ. λάμπες). Αυτή η διαδικασία μπορεί να διαρκέσει αρκετές εβδομάδες προκαλώντας προβλήματα στην καθημερινότητα του ασθενή ^{[2], [9]}.

Μεγάλη σημασία για την χορήγηση του φωτοευαίσθητοποιητή στον οργανισμό έχει και η διαλυτότητά του. Η αμφιφιλικότητα εξασφαλίζει αφενός τη μεταφορά του φωτοευαίσθητοποιητή μέσω του αίματος χωρίς το σχηματισμό συσσωματωμάτων, αφετέρου την 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 ^[19].

Επιπρόσθετα, τίθεται το ζήτημα της φωτοσταθερότητας των χρησιμοποιούμενων ουσιών. 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 ώστε να μπορούν να ακτινοβολούνται για μεγάλο χρόνο χωρίς να αλλοιώνονται οι φωτοδυναμικές τους ιδιότητες. 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 ^[19].

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των φωτοευαίσθητων ουσιών παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 2.3-1.

Βασικά χαρακτηριστικά ουσίας για τη χρήση της ως φωτοευαισθητοποιητή
Μη τοξική στις κλινικά χορηγούμενες δόσεις και με χαμηλή φωτοτοξικότητα στο αίμα.
Διαλυτότητα και σταθερότητα της φωτοευαίσθητης ουσίας στα υδατικά διαλύματα, σε φυσιολογικό pH, ώστε να επιτρέπεται η κυκλοφορία και η συγκέντρωσή της στα κύτταρα.
Αμφιφιλικότητα ώστε να εξασφαλίζεται τόσο η μεταφορά της ουσίας μέσω του αίματος χωρίς σχηματισμό συσσωματωμάτων, όσο και η διείσδυση διαμέσου του λιπιδικού στρώματος της κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου.
Σημαντική οπτική απορρόφηση στο ερυθρό τμήμα του φάσματος ή στο εγγύς υπέρυθρο, ώστε να ενεργοποιείται από ακτινοβολία που παρέχει ικανοποιητική διείσδυση στον ιστό (5 mm – 1 cm).
Φθορισμός για την ανίχνευση και ποσοτικοποίησή της με μεθόδους φθορισμού, φωτοδυναμική διάγνωση.
Φωτοαποδόμηση ώστε να χάνει την κυτταροτοξική δράση της στον υγιή ιστό λόγω χαμηλής συγκέντρωσης εξασφαλίζοντας κυτταροτοξική δράση στον όγκο.
Έλλειψη τοξικότητας με την απουσία ακτινοβολίας. Δε χρησιμοποιούνται τοξικές χημικές ουσίες, διότι δεν επιθυμούνται οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες.
Μη δημιουργία νέων τοξικών παραγώγων από το μεταβολισμό της ουσίας.
Μη πρόκληση μεταλλάξεων ή καρκινογενέσεων. Προφανώς δεν είναι επιθυμητή η

δημιουργία νέας ασθένειας.
Εύκολη και γρήγορη αποβολή της από τον οργανισμό μετά τη θεραπεία.
Επιλεκτική συσσώρευση στους ιστούς, οι οποίοι είναι προσβεβλημένοι από τη νόσο και μόνο. Αυτό σημαίνει ότι δεν επηρεάζονται οι υγιείς ιστοί με το φωτισμό και την ενεργοποίηση της φωτοευαίσθητης ουσίας.
Επιλεκτική και αξιόπιστη ενεργοποίηση της ουσίας με κατάλληλο μήκος κύματος.
Γρήγορη αποδέσμευσή της από τους υγιείς ιστούς ώστε να αποφεύγεται η ενεργοποίησή της από το φως του ήλιου, βοηθώντας στη χαμηλή παραμένουσα φωτοευαισθησία.
Εύκολη στη χορήγησή της (π.χ. τοπική εφαρμογή, εισπνοή, κατάποση ή ενδοφλέβια) ανάλογα με την κλινική κατάσταση.
Μη σχηματισμός συσσωματωμάτων. Δεν επιθυμείται η ουσία να προκαλέσει νοσηρότητα όπως θρόμβωση, εγκεφαλικό επεισόδιο, καρδιακή προσβολή κτλ.
Εμπορικά διαθέσιμη, για την άμεση πρόσβαση των ενδιαφερόμενων.
Καθαρή χημική ουσία και η σύνθεσή της αρκετά απλή, ώστε να μπορεί να παραχθεί από ένα τοπικό φαρμακείο.
Χαμηλό κόστος. Μια απαγορευτικά ακριβή ουσία θα αποτρέψει την ευρεία χρήση της.
Χημική σταθερότητα με σταθερή σύσταση και σταθερό χρόνο ζωής.
Υψηλή φωτοχημική δραστηριότητα, με υψηλές αποδόσεις και μεγάλο χρόνο ημιζωής της τριπλής διεγερμένης κατάστασης.
Αποτελεσματική παραγωγή μονήρους οξυγόνου και άλλων δραστικών μορφών οξυγόνου.

Πίνακας 2.3-1: Κυριότερα χαρακτηριστικά των φωτοευαισθητοποιητών στη φωτοδυναμική θεραπεία ^{[2], [9], [17], [30]}.

2.4 Φωτολεύκανση (Photobleaching)

Το φαινόμενο κατά το οποίο το χρωμοφόρο χάνει μόνιμα την ικανότητά του να φθορίζει, λόγω φωτοπαραγόμενης χημικής καταστροφής και τροποποίησης της χημικής δομής του, καλείται φωτολεύκανση (photobleaching). Εναλλακτικά, στην ελληνική βιβλιογραφία χρησιμοποιούνται και οι όροι φωτοκαταστροφή ή φωτοαποδόμηση^[19].

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 αντιστρέψιμες 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^[19].

Όπως παρουσιάστηκε στην ενότητα 2.3, οι φωτοευαισθητοποιητές θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένα 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 φωτολεύκανση είναι η σοβαρότερη από αυτές, ενώ η φωτοτροποποίηση και η αναδιάταξη της ενδοκυττάριας χωρικής κατανομής των φωτοευαισθητοποιητών επηρεάζουν επίσης την κβαντική απόδοσή τους, μειώνοντας τη φωτοδυναμική τους δράση^{[31], [32]}.

Για να χρησιμοποιηθεί μία φωτοευαίσθητη ουσία στη φωτοδυναμική θεραπεία και διάγνωση πρέπει εκ των προτέρων να είναι γνωστό το αν και κατά πόσο υφίσταται το φαινόμενο της φωτολεύκανσης (photobleaching), μεταβάλλεται δηλαδή η δομή της όταν ακτινοβοληθεί αφού τέτοιες μεταβολές συνεπάγονται και μεταβολές στη φωτοδυναμική της δράση. Οι συγκεκριμένες βλάβες συνήθως απεικονίζονται στα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού μιας ένωσης. Πιο συγκεκριμένα, όταν σε μία φωτοευαίσθητη ουσία προσπίπτει φωτεινή ακτινοβολία, μπορούν να προκληθούν μεταβολές στη δομή της οι οποίες μπορούν να καταταγούν στις δύο παρακάτω κατηγορίες^[6].

2.4.1 Φωτοτροποποίηση (Photomodification)

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^{[31], [32]}.

Το μόριο της ουσίας υφίσταται κάποιες αλλαγές χωρίς όμως να χάσει τη βασική του δομή. Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρούνται σημαντικές μειώσεις στην ένταση των

κορυφών στα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού χωρίς να δημιουργούνται κάποιες νέες καθαρές κορυφές ^[6].

2.4.2 Φωτολεύκανση (True Photobleaching)

Η φωτολεύκανση 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. Φωτολεύκανση 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 φωτολεύκανση χάνουν την ικανότητά τους να απορροφούν φως άρα και να δρουν φωτοδυναμικά ^{[31], [32], [33]}.

Γενικά η φωτολεύκανση μετράται ως η μείωση του φθορισμού σε σχέση με το χρόνο, αφού η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της φθορίζουσας ουσίας. Μέτρηση της φωτολεύκανσης 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 ^[33].

Στην περίπτωση της φωτολεύκανσης (true photobleaching) οι χημικές αλλαγές είναι σημαντικές. Το μόριο της φωτοευαίσθητης ουσίας διασπάται στις δομικές του ομάδες με αποτέλεσμα εκτός από μείωση της έντασης στις κύριες κορυφές του φάσματος να παρατηρούνται και νέες κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν στα νέα μόρια που δημιουργήθηκαν ^[6].

2.5 Κατηγορίες φωτοευαισθητοποιητών

Οι φωτοευαίσθητες ουσίες στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις γενιές. Η πρώτη γενιά περιλαμβάνει παράγωγα αιματοπορφυρίνης, η δεύτερη διαφορετικές ως προς τη δομή ενώσεις που εμφανίζουν απορρόφηση σε μεγάλα μήκη κύματος, όπως οι χλωρίνες και οι φθαλοκυανίνες και η τρίτη αποτελείται από τους φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς οι οποίοι δεσμεύονται ή ενσωματώνονται σε μόρια – μεταφορείς με σκοπό την πιο επιλεκτική στόχευση καρκινικών όγκων ^[34].

Ο διαχωρισμός των φωτοευαισθητοποιητών σε γενιές χρησιμοποιείται πολλές φορές και ως τρόπος αξιολόγησής τους. Ένας μεγάλος αριθμός κλινικών ιατρών, όμως, δε φαίνεται να συμμαρίζει αυτή την άποψη. Έτσι, ενώ οι φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς εμφανίζουν βελτιωμένες ιδιότητες ως προς αυτούς της 1^{ης} γενιάς, όπως υψηλότερους συντελεστές απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, μεγαλύτερους συντελεστές απόδοσης μονήρους οξυγόνου, βελτιωμένη στόχευση και επιλεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα, έχουν ακόμα πολύ μικρή πρακτική κλινική εφαρμογή ^{[2], [6]}.

2.5.1 Φωτοευαισθητοποιητές 1^{ης} γενιάς

Τα παράγωγα της αιματοπορφυρίνης, με εμπορικές ονομασίες όπως Photofrin και Photoheme, αποτελούν την πρώτη γενιά φωτοευαισθητοποιητών που εγκρίθηκαν για κλινική χρήση. Οι πρώτες αναφορές για την επίδρασή τους στη φωτοδυναμική θεραπεία εμφανίστηκαν κατά τα έτη 1970 με 1980. Η ουσία Photofrin είναι κλινικά αποδεκτή σε πολλές χώρες για τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα (σε πρώιμο αλλά και προχωρημένο στάδιο), του οισοφάγου, της ουροδόχου κύστης, του στομάχου και του τραχήλου της μήτρας (πρώιμο στάδιο) ^[34].

Οι φωτοευαισθητοποιητές 1^{ης} γενιάς έχουν μελετηθεί εκτενώς και έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές κλινικές εφαρμογές. Ωστόσο εμφανίζουν μια σειρά από μειονεκτήματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 2.5-1. Παρά τα μειονεκτήματά τους όμως, οι φωτοευαισθητοποιητές αυτής της γενιάς αποτέλεσαν ένα χρήσιμο εργαλείο για την καταπολέμηση του καρκίνου και δρομολόγησαν την έρευνα για τους νέους, δεύτερης γενιάς φωτοευαισθητοποιητές, με βελτιωμένα χαρακτηριστικά ^[34].

Σημαντικότερα μειονεκτήματα των φωτοευαισθητοποιητών 1 ^{ης} γενιάς	
Μικρή επιλεκτικότητα.	Στην πραγματικότητα μόνο το 0,1 – 3% του χορηγούμενου φωτοευαισθητοποιητή εντοπίζεται στον καρκινικό ιστό.
Αυξημένος χρόνος φωτοευαισθησίας.	Παρατηρείται υψηλός χρόνος παραμονής στους ιστούς αφού οι ενώσεις αυτές μπορούν να διατηρηθούν στο δερματικό ιστό ως και 10 εβδομάδες μετά τη χορήγησή τους, προκαλώντας έτσι φωτοευαισθησία στον ασθενή ο οποίος θα πρέπει να αποφύγει την έκθεσή του στο φως του ήλιου για αυτό το χρονικό διάστημα.

Χαμηλή απορρόφηση στην ερυθρή περιοχή του φάσματος.	Οι ενώσεις αυτές απορροφούν ασθενώς στο κόκκινο με αποτέλεσμα το πολύ χαμηλό βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας στο ανθρώπινο σώμα (της τάξεως των 5 mm). Συνεπώς, δεν είναι δυνατή η χρήση τους σε όγκους που βρίσκονται σε μεγαλύτερο βάθος.
Πολυπλοκότητα στη σύνθεση.	Χαρακτηρίζονται από σύνθετα μείγματα από τα οποία δεν έχει καταστεί δυνατό να απομονωθεί ένα ιδιαίτερα ενεργό συστατικό. Έτσι, εμφανίζονται δυσκολίες στη σύνθεσή τους.

Πίνακας 2.5-1: Μειονεκτήματα των φωτοευαισθητοποιητών 1^{ης} γενιάς [34].

2.5.2 Φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς

Η 2^η γενιά αναπτύχθηκε για να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα των ενώσεων της 1^{ης} γενιάς, κυρίως η χαμηλή κβαντική απόδοση και η μεγάλη περίοδος παραμένουσας φωτοευαισθησίας. Άρα, οι φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς αποτελούν χημικές τροποποιήσεις των πορφυρινών και τα διάφορα είδη τους χαρακτηρίζονται από τις διαφορετικές τροποποιήσεις που υπέστησαν στη χημική τους σύσταση. Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δυο βασικές χημικές ομάδες: τις κυανίνες και τις χλωρίνες αλλά η κατηγοριοποίηση αυτή δεν είναι εξαντλητική καθώς είναι διαθέσιμοι και άλλοι φωτοευαισθητοποιητές με διαφορετικές τροποποιήσεις [35].

Στον παρακάτω πίνακα 2.5-2 παρουσιάζονται οι κυριότερες ιδιότητες των φωτοευαισθητοποιητών 2^{ης} γενιάς καθώς και η ερμηνεία τους όσον αφορά τη χρήση των εν λόγω ενώσεων σε φωτοδυναμικές εφαρμογές για τη θεραπεία του καρκίνου.

Χαρακτηριστικά των φωτοευαισθητοποιητών 2^{ης} γενιάς	
Χημική σύνθεση.	Σε αντίθεση με τους φωτοευαισθητοποιητές 1 ^{ης} γενιάς, πρόκειται για καθαρές χημικές ενώσεις με σταθερή σύνθεση.
Επιλεκτικότητα και σύντομος χρόνος ζωής.	Ο χρόνος ζωής των φωτοευαισθητοποιητών 2 ^{ης} γενιάς είναι σύντομος και η συσσώρευσή τους στους ιστούς είναι επιλεκτική και γρήγορη (μέσα σε 1-6 ώρες μετά τη χορήγησή τους), και επομένως η θεραπεία μπορεί να διεξαχθεί την ίδια ημέρα με τη χορήγηση του φαρμάκου.
Μειωμένη φωτοευαισθησία.	Ιδιαίτερα μικρός κίνδυνος εγκαυμάτων από την έκθεση στο φως του ήλιου είναι καθώς η απομάκρυνση των ουσιών από τους φυσιολογικούς ιστούς είναι ταχεία.
Έλλειψη «σκοτεινής» τοξικότητας.	Μηδενική ή ελάχιστη τοξικότητα για το δέρμα και τα εσωτερικά όργανα σε συνθήκες έλλειψης φωτός.

Απορρόφηση στην ερυθρή περιοχή του φάσματος.	Υψηλοί συντελεστές απορρόφησης, με τις κορυφές απορρόφησης να εντοπίζονται στις φασματικές περιοχές 660 nm – 700 nm ή κοντά στην περιοχή του υπέρυθρου. Σε αυτές τις περιοχές, η ικανότητα διείσδυσης της ακτινοβολίας σε ιστούς θηλαστικών φτάνει σε βάθος ως 20 mm (τετραπλάσιο σε σχέση με τους φωτοευαισθητοποιητές 1 ^{ης} γενιάς).
Απορρόφηση κοντά στο υπέρυθρο.	Κάποιες ενώσεις της οικογένειας των χλωρινών απορροφούν κοντά στην υπέρυθρη περιοχή του φάσματος και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία μελαγχρωματικών όγκων όπου δεν είναι αποτελεσματική η χρήση ουσιών που απορροφούν στο ορατό φάσμα.

Πίνακας 2.5-2: Τα χαρακτηριστικά των φωτοευαισθητοποιητών 2ης γενιάς και η σημασία τους στη φωτοδυναμική θεραπεία ^[35].

Παρά το γεγονός ότι οι φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς είναι σημαντικά βελτιωμένοι σε σχέση με την 1^η γενιά, εξακολουθούν να παρουσιάζουν χαμηλή επιλεκτικότητα στους καρκινικούς όγκους και παρατεταμένη παραμένουσα φωτοευαισθησία, παρότι αποβάλλονται ταχύτερα από τον οργανισμό ^[19].

2.5.3 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 ^[19].

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. Επιπλέον, είναι αναγκαίο οι φωτοευαισθητοποιητές να συγκεντρώνονται επιλεκτικά στους καρκινικούς όγκους για να αποφεύγονται 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 3ης γενιάς φωτοευαισθητοποιητές έρχονται για να διευρύνουν τις δυνατότητες των φωτοευαισθητοποιητών της 2ης γενιάς. Η βασική διαφοροποίηση και εξέλιξη των φωτοευαισθητοποιητών 3^{ης} γενιάς, σε σχέση με τις προηγούμενες, είναι ότι

αναπτύσσονται για να βελτιώσουν τα φαρμακολογικά και φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά τους, με κυριότερα την επιλεκτικότητα και τη συγκέντρωσή τους στον καρκινικό όγκο ^{[2], [19]}.

Αυτό μπορεί να συμβεί μέσω της σύζευξής τους σε βιομόρια, όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα. Είναι γνωστό ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν στην επιφάνειά τους αντιγόνα διαφορετικά από εκείνα των φυσιολογικών κυττάρων. Έτσι, η επιλεκτική πρόσδεση πάνω στον καρκινικό ιστό προκαλεί την καταστροφή μόνο αυτού χωρίς να επηρεάζεται ο υγιής ιστός ^[34].

Επίσης, σύζευξη φωτοευαισθητοποιητών επιτυγχάνεται και με τη χρήση λιποπρωτεϊνών, πρόσδεση ή εγκλεισμό των ουσιών σε συστήματα μεταφοράς (π.χ. νανοσωματίδια) ^[19]. Ακόμα, ο συνδυασμός φωτοευαισθητοποιητή με λιποσώματα, αιωρήματα ελαίου, βιοδιασπώμενα πολυμερή και υδρόφιλα πολυμερή χρησιμοποιείται για την επιλεκτική στόχευση καρκινικών όγκων ^[35].

Τα λιποσώματα χρησιμοποιούνται σήμερα ως φορείς για τη μεταφορά των φωτοευαίσθητων ουσιών με στόχο τη βελτίωση της συμπεριφοράς τους, κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία. Γενικότερα, τα περισσότερα συμβατικά λιποσώματα δεν είναι σε θέση να επιδείξουν σημαντικές βελτιώσεις στην αποτελεσματικότητα των φωτοευαισθητοποιητών. Αντίθετα, τα λιποσώματα με ειδικά τροποποιημένο σχεδιασμό (π.χ. λιποσώματα μακράς κυκλοφορίας με ιδιαίτερα ενεργή στόχευση), παρουσιάζουν καλύτερες προδιαγραφές για τη βελτίωση της συμπεριφοράς των φωτοευαίσθητοποιητών, οι οποίοι συνήθως εγκλείονται σε αυτά ^[36].

Τα λιποσώματα είναι σφαιρικές δομές που σχηματίζονται από μία ή περισσότερες ομόκεντρες λιπιδικές διπλοστιβάδες που περιέχουν υδατικό μέσο στο εσωτερικό τους. Κάποιες ελκυστικές βιολογικές ιδιότητές τους παρατίθενται παρακάτω ^[37]:

- Τα λιποσώματα είναι βιοσυμβατά.
- Τα λιποσώματα μπορούν να εγκλωβίζουν υδατοδιαλυτές (υδρόφιλες) φαρμακευτικές ουσίες στις εσωτερικές υδατικές δομές τους και αδιάλυτες στο νερό (υδρόφοβες) ουσίες μέσα στην μεμβράνη τους.
- Οι φαρμακευτικές ουσίες που ενσωματώνονται σε λιποσώματα προστατεύονται από την επίδραση των εξωτερικών συνθηκών, αλλά δεν προκαλούν ανεπιθύμητες παρενέργειες.
- Τα λιποσώματα παρέχουν μια μοναδική ευκαιρία για να εισχωρήσει η μεταφερόμενη ουσία μέσα στα κύτταρα.
- Το μέγεθος, το φορτίο και οι επιφανειακές ιδιότητες των λιποσωμάτων μπορούν να αλλάξουν εύκολα και απλά με την προσθήκη νέων συστατικών στο μίγμα λιπιδίων πριν την παρασκευή λιποσωμάτων και / ή με παραλλαγή μεθόδων παρασκευής.

Εκτός από τα λιποσώματα, οι φωτοευαισθητοποιητές τρίτης γενιάς πολλές φορές χρησιμοποιούν πρόσδεση ή εγκλεισμό των ουσιών σε συστήματα μεταφοράς με πιο διαδεδομένο παράδειγμα τα νανοσωματίδια ^[19]. Η φωτοευαίσθητη ουσία μπορεί να

μεταφέρεται είτε διαλυμένη στη μήτρα, είτε απορροφημένη στην επιφάνεια του νανοσωματιδίου και το ενδιαφέρον όσον αφορά τα νανοσωματίδια σαν μεταφορείς ουσιών αυξάνεται συνεχώς τα τελευταία χρόνια, λόγω των ιδιοτήτων που παρουσιάζουν. Τα νανοσωματίδια μπορούν να μεταφέρουν υδρόφοβες ουσίες στο αίμα είναι ενώ επιτρέπουν την ελεγχόμενη απελευθέρωση της ουσίας και απορροφούνται σε μεγάλα ποσοστά από τα κύτταρα. Επίσης, υπάρχουν συγκεκριμένες στρατηγικές για τη σύνθεσή τους ενώ η επιφάνεια τους μπορεί να τροποποιηθεί ώστε να αποκτήσει επιπρόσθετες χημικές / βιοχημικές ιδιότητες ^[38].

Λειτουργικά, η χρήση των νανοσωματιδίων στους φωτοευαίσθητοποιητές 3ης γενιάς μπορεί εκτεταμένα να χωριστεί σε δύο κατηγορίες καθώς τα νανοσωματίδια δύνανται να δρουν ως παθητικοί αλλά και ως ενεργητικοί μεταφορείς στη διέγερση των φωτοευαίσθητων ουσιών. Οι παθητικοί μεταφορείς μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω με βάση τη σύνθεσή τους σε βιοδιασπάσιμα (βασισμένα σε πολυμερή) και μη-βασισμένα σε πολυμερή νανοσωματίδια, π.χ. κεραμικά και κρυσταλλικά νανοσωματίδια. Τα ενεργητικά νανοσωματίδια μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω με βάση το μηχανισμό διέγερσής τους ^[39].





Κεφάλαιο 3: Η κουρκουμίνη

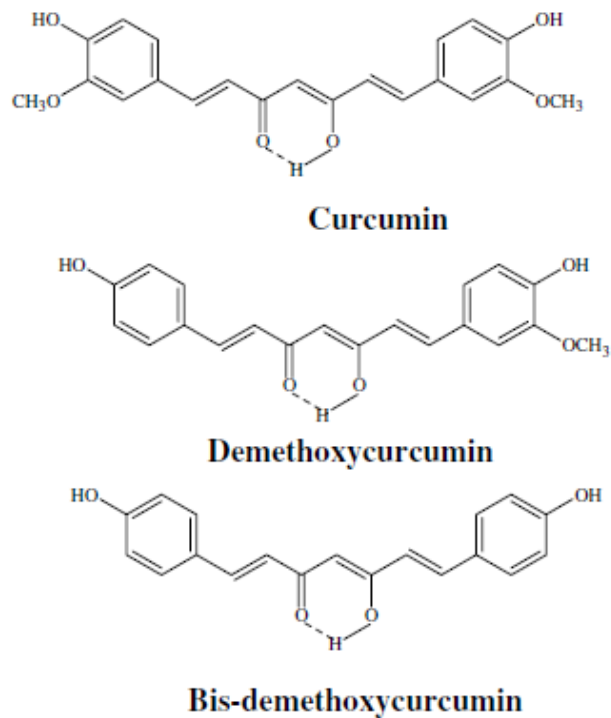


3.1 Η ουσία κουρκουμίνη

Η Κουρκουμίνη (βιβλιογραφικά γνωστή και ως curcumin, Cur ή diferuloylmethane) είναι η κύρια κουρκουμινοειδής ουσία στα ριζώματα του φυτού *Curcuma longa* (κουρκουμάς, κιτρινόριζα ή Turmeric).



Εικόνα 3.1-1: Φωτογραφική απεικόνιση της ρίζας *Curcuma longa* και της ουσίας Curcumin.



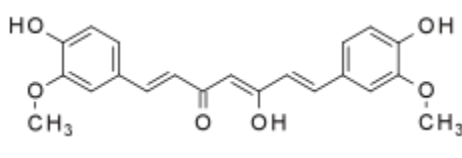
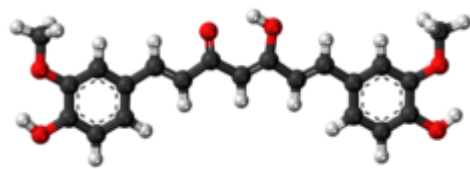
Εικόνα 3.1-2: Οι μοριακές δομές των κουρκουμινοειδών ^[45].

Το εν λόγω φυτό είναι μέλος της οικογένειας ginger (Zingiberaceae) και παρουσιάζει ισχυρές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, και αντισηπτικές ιδιότητες ^[40].

Στην εικόνα 3.1-1 παρουσιάζεται σε φωτογραφία το ρίζωμα του φυτού καθώς επίσης και η κίτρινη σκόνη που είναι η κουρκουμίνη ενώ τα βασικά χαρακτηριστικά της ουσίας συνοψίζονται στον πίνακα 3.1-1. Τα άλλα δύο είδη κουρκουμινολών του Curcuma longa είναι τα: desmethoxycurcumin και δις-desmethoxycurcumin (εικόνα 3.1-2). Τα κουρκουμινολόνη είναι φυσικές φαινόλες που είναι υπεύθυνες για το κίτρινο χρώμα του κουρκουμά.

3.1.1 Δομή

Η κουρκουμίνη ενσωματώνει διάφορες λειτουργικές ομάδες. Τα συστήματα αρωματικού δακτυλίου, τα οποία είναι φαινόλες, συνδέονται με δύο α, β-ακόρεστες καρβονυλικές ομάδες όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 3.1-2. Η δομή εντοπίστηκε για πρώτη φορά το 1910 από τον J. Miłobędzka, Stanisław Kostanecki και Wiktor Lampe ^[41]. Ταυτοποιήθηκε ως διφαιρουλοϋλμεθάνιο ή 1,6-heptadiene-3,5-dione-1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-(1E, 6E).

Η κουρκουμίνη	
	
Όνομασία IUPAC	
(1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione	
Άλλες ονομασίες	
Diferuloylmethane, Cur, Curcumin, C.I. 75300, Natural Yellow 3, Turmeric Yellow	
Ιδιότητες	
Μοριακός τύπος	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
Μοριακό βάρος	368.3799 g/mol
Εμφάνιση	Φωτεινή κίτρινο – πορτοκαλί σκόνη
Σημείο τήξης	183 °C
Αν δεν αναγράφεται διαφορετικά, τα δεδομένα αφορούν τις ουσίες στη σταθερή τους κατάσταση (στους 25 °C, 100 kPa).	

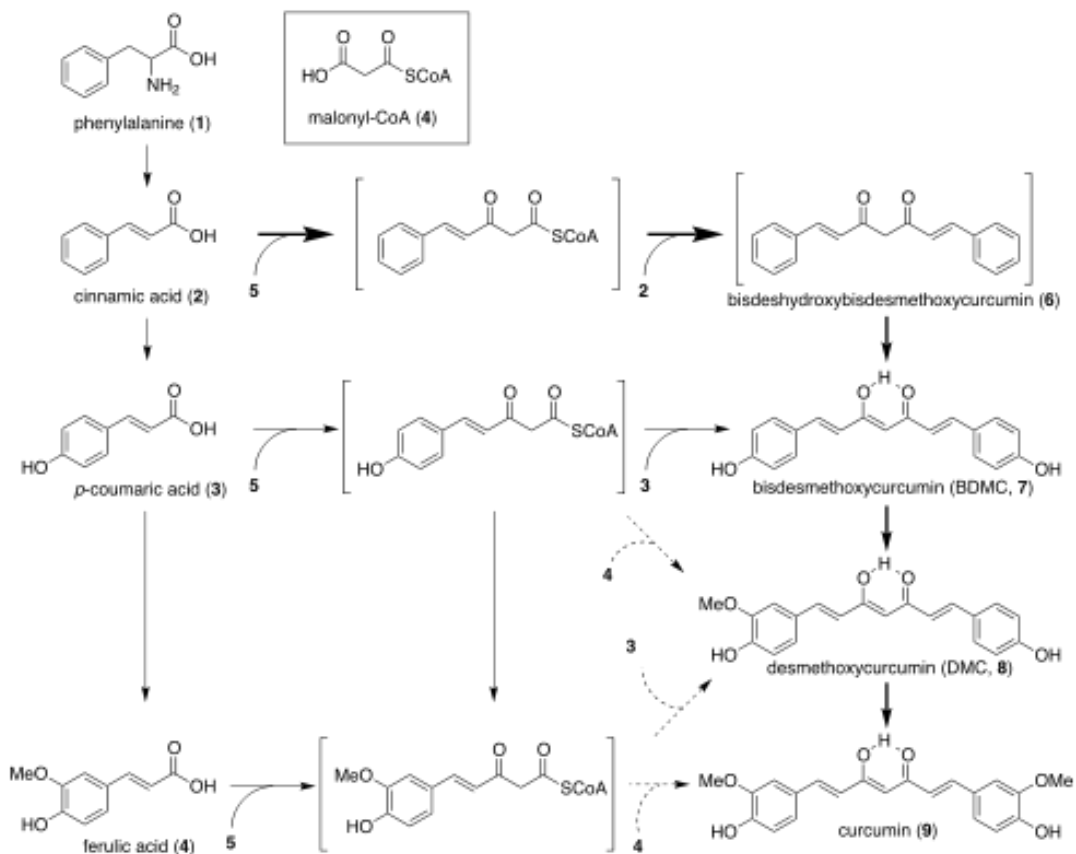
Πίνακας 3.1-1: Σύνοψη των βασικών χαρακτηριστικών της Κουρκουμίνης ^[41].

3.1.2 Σύνθεση

Ο προσδιορισμός της διαδρομής βιοσύνθεσης της κουρκουμίνης αποδείχθηκε ιδιαίτερα δύσκολος για τους ερευνητές. Το 1973, οι Roughly και Whiting πρότειναν δύο πιθανούς μηχανισμούς για τη βιοσύνθεση της κουρκουμίνης:

- Πρώτος μηχανισμός: αντίδραση επέκτασης αλυσίδας με $C_9H_8O_2$ (κινναμικό οξύ) και 5 μόρια malonyl-CoA για τη δημιουργία κουρκουμινοειδούς μορφής.
- Δεύτερος μηχανισμός: 2 μονάδες $C_9H_8O_2$ συνδεόμενες μεταξύ τους με malonyl-CoA.

Και οι δύο μηχανισμοί χρησιμοποιούν ως αφετηρία τους κινναμικό οξύ $C_9H_8O_2$, το οποίο προέρχεται από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη. Αυτό είναι αξιοσημείωτο επειδή το $C_9H_8O_2$ χρησιμοποιείται σπάνια ως σημείο εκκίνησης σε φυτικές βιοσυνθέσεις σε σύγκριση με το *p*-κουμαρικό οξύ που παρουσιάζει πιο κοινή χρήση. Έχουν αναγνωριστεί μόνο λίγες ενώσεις που χρησιμοποιούν $C_9H_8O_2$ ως μόριο εκκίνησης της βιοσύνθεσής τους (π.χ. anigorufone και pinosylvin).



Εικόνα 3.1-3: Διαδρομή βιοσύνθεσης της κουρκουμίνης.

Παρά τις προηγούμενες προτάσεις των Roughly και Whiting δεν παρουσιάστηκε καμία πειραματικά υποστηριζόμενη θεωρία για τη διαδρομή βιοσύνθεσης μέχρι το 2008. Τότε, μετά από μελέτες, προτάθηκε μια διαδρομή που ακολουθεί τόσο τον πρώτο όσο και το δεύτερο μηχανισμό των Roughley και Whiting. Η πειραματική διαδικασία αρχικά συνάδει με το πρώτο μοντέλο μηχανισμού στο οποίο 5 μόρια malonyl-CoA αντιδρούν με $C_9H_8O_2$ για να σχηματιστεί Κουρκουμίνη. Ωστόσο, η αλληλουχία σύμφωνα με την οποία οι λειτουργικές ομάδες, συντίθενται στο κουρκουμινοειδές φαίνεται να υποστηρίζει πιο έντονα το δεύτερο προτεινόμενο μηχανισμό. Ως εκ τούτου, συνάγεται το συμπέρασμα ότι ο δεύτερος μηχανισμός βιοσύνθεσης των Roughley και Whiting (Εικόνα 3.1-3) επιβεβαιώνεται ως ορθός.

3.1.3 Χρήση

Η κουρκουμίνη είναι μια χρωστική κίτρινο-πορτοκαλί και χρησιμοποιείται ευρέως στην Ασιατική παραδοσιακή ιατρική και τις γαστρονομικές παραδόσεις για τουλάχιστον 4000 έτη ^[40]. Η κουρκουμίνη είναι μια φυσική ουσία με χαμηλή τοξικότητα και καλή σταθερότητα και είναι ένα κοινό συστατικό που χρησιμοποιείται στα μπαχαρικά, τα καλλυντικά και παραδοσιακά κινέζικα φάρμακα στις ασιατικές χώρες. Επιπλέον, έχει καταδειχθεί ότι η κουρκουμίνη παρουσιάζει καλές οπτικές και ηλεκτρικές ιδιότητες ^[42].

Λόγω του φωτεινού κίτρινου χρώματός της μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χρωστική τροφίμων προσδίδοντάς τους από κίτρινο έως κόκκινο χρώμα, ανάλογα με την οξύτητα του τροφίμου (pH). Η κουρκουμίνη αποτελεί ένα από τα συστατικά του ινδικού αρτύματος Curry, το κίτρινο χρώμα του οποίου οφείλεται σ' αυτήν και χρησιμοποιείται ευρύτατα ως αρτυματική και χρωστική ουσία στην Ινδική, Ασιατική και Δυτική μαγειρική.

Η κουρκουμίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό του βορίου στη μέθοδο που είναι γνωστή ως Curcumin method. Αντιδρά με βορικό οξύ για να σχηματίσει μία ένωση κόκκινο χρώμα, rosocyanine.

Η κουρκουμίνη είναι ένα αντιοξειδωτικό που μπορεί να ανακουφίσει την οξειδωτική βλάβη στις ουσίες. Από το 1970, πολλές εκθέσεις δίνουν ενδείξεις ότι Cur θα μπορούσε να χρησιμεύσει στην θεραπεία του καρκίνου ως ένα φάρμακο, ή ένα ανοσοενισχυτικό για την παραδοσιακή χημειοθεραπεία λόγω της ικανότητάς της να αναστέλλει τους οξειδωτικούς καρκινογόνους παράγοντες. Είναι γνωστό ότι η κουρκουμίνη προστατεύει τις βιομεμβράνες των κανονικών κυττάρων από υπεροξειδική βλάβη (π.χ. απώλεια της ακεραιότητας των κυττάρων, γονιδιωματική σταθερότητα και λειτουργία του ενζύμων), που τελικά οδηγούν σε καρκίνο μέσω της παγίδευσης των αντιδραστικών ελευθέρων ριζών ^[40].

3.2 Βιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες

Η κουρκουμίνη είναι μια υδρόφοβη πολυφαινόλη, γνωστή για τις θεραπευτικές της αξίες σε μια ποικιλία παθήσεων ^{[43], [44]}. Διάφορες φαρμακολογικές επιδράσεις της, όπως αντι-αρθρικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντι-πολλαπλασιαστικές και αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες έχουν ερευνηθεί εκτενώς. Επιπλέον, τα κουρκουμινοειδή χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του ιού HIV, την πολλαπλή σκλήρυνση, τη νόσο του Alzheimer (AD), καθώς επίσης και μικροβιακές ή παρασιτικές λοιμώξεις. Η κουρκουμίνη και τα ανάλογά της έχουν μελετηθεί ως παράγοντες κατά του όγκου σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές γραμμές και συμπαγείς όγκους ^[44].

Οι φωτοφυσικές και φωτοχημικές ιδιότητες της κουρκουμίνης έχουν διερευνηθεί χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία UV-vis απορρόφησης, φασματοσκοπία φθορισμού και άλλες οπτικές μεθόδους. Η Κουρκουμίνη παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 420 nm με συντελεστή απόσβεσης $20000 - 50000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, και το μήκος κύματος διέγερσής της είναι στα 300 – 470 nm ^[40].

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για τις ιδιότητες της ουσίας και τα ενδεχόμενα πιθανής φαρμακευτικής χρήσης της. Κάποιες από αυτές παρουσιάζονται στον πίνακα 3.2-1 ενώ η εικόνα 3.2-1 απεικονίζει εποπτικά τα βασικά χαρακτηριστικά της βιολογικής δράσης της κουρκουμίνης.

Σημαντικές μελέτες για την κουρκουμίνη	
1988 (Huang et al.)	Μελέτησαν την επίδραση της κουρκουμίνης και κάποιων οξέων στην εξέλιξη όγκου σε δέρμα ποντικού. Παρατήρησαν ότι παρότι όλες οι ενώσεις αναστέλλουν την επιδερμική αποκαρβοξυλάση ορνιθίνης (ODC) και τη σύνθεση επιδερμικού DNA, η Κουρκουμίνη είναι η πιο αποτελεσματική.
1999 (Ahsan et al.)	Επιβεβαίωσαν ότι η κουρκουμίνη προκαλεί διάσπαση κλώνου DNA με την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), ιδιαίτερα την ρίζα υδροξυλίου.
2000 (Ozaki et al.)	Απέδειξαν ότι η κουρκουμίνη αναστέλλει δραστικά την οστική απορρόφηση και τη διέγερση της απόπτωσης στα κύτταρα. Πρότειναν ότι μπορεί να είναι χρήσιμη στη θεραπεία ασθενειών όπως ο καρκίνος και φλεγμονές των οστών.
2000 (Inano et al.)	Μελέτησαν την αντικαρκινική δράση της κουρκουμίνης σε ένα πρότυπο μοντέλο ακτινοβολούμενου όγκου σε μαστικό αδένα αρουραίου. Πρότειναν ότι η Κουρκουμίνη μπορεί να συντελέσει αποτελεσματικά στην πρόληψη της - προκαλούμενης από ακτινοβολία - καρκινογένεσης.

<p>2001 (Gescher, Sharma & Steward)</p>	<p>Ανέφεραν ότι η κουρκουμίνη έδειξε ιδιότητες καταστολής όγκων σε μοντέλα τρωκτικών με καρκινογένεση και έχει δυνατότητα παρέμβασης στις κυτταρικές διεργασίες που εμπλέκονται στην προώθηση και εξέλιξη όγκου.</p>
<p>2001 – 2002 (Bush et al., Anto et al. και Pan et al.)</p>	<p>Παρατήρησαν ότι η διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ενεργοποιήθηκε μέσω μιτοχονδριακής διαδρομής απόπτωσης σε μελάνωμα και HL-60 κύτταρα. Ως εκ τούτου, η Κουρκουμίνη εκτός από αντιοξειδωτική δράση, παρουσιάζει και προ-οξειδωτική επίδραση που μπορεί να οδηγήσει σε βιολογικές βλάβες.</p>
<p>2002 (Anupama, Madesh, Deepak, Dieter & Bharathi)</p>	<p>Μελέτησαν το μοριακό μηχανισμό της αντι-αγγειογενετικής δράσης της κουρκουμίνης. Ανέφεραν ότι η ουσία θα μπορούσε να αναπτυχθεί και να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία χρόνιων ασθενειών που σχετίζονται με εκτεταμένη νεοαγγείωση (π.χ. καρκίνος ωοθηκών).</p>
<p>2004 (Polasa, Naidu, Ravindranath & Krishnaswamy)</p>	<p>Ανέφεραν ότι η Κουρκουμίνη συντελεί στην πρόληψη βλάβης του DNA ακόμη και σε άτομα με γενετική προδιάθεση. Ακόμα και πολύ μικρή ποσότητα της ουσίας στη διατροφή μπορεί να επιδείξει αντιμεταλλαξιογόνες / αντικαρκινικές ιδιότητες.</p>
<p>2003 – 2005 (Calabrese et al., Yang et al.)</p>	<p>Πρότειναν ότι η χρήση συμπληρωμάτων διατροφής με Κουρκουμίνη μπορεί να είναι ευεργετική σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του Alzheimer.</p>
<p>2007 (Cao et al.)</p>	<p>Ανέφεραν ότι η κουρκουμίνη προκάλεσε απόπτωση μέσω μιτοχονδριακής υπερπόλωσης και ενεργοποίησε βλάβη του mtDNA σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος G2.</p>
<p>2008 (Li et al., Sahoo et al. και Lakowicz)</p>	<p>Χρησιμοποιώντας μεθόδους ανοσοκυταροχημείας, UV-vis φασματοσκοπία απορρόφησης, φασματοσκοπία φθορισμού και κυκλικού διχρωισμού, απέδειξαν ότι η Κουρκουμίνη μπορεί να αλλάξει τη διαμόρφωση και τη λειτουργία τόσο του DNA όσο και του ορού του αίματος μέσω διαμοριακών συνδέσεων.</p>

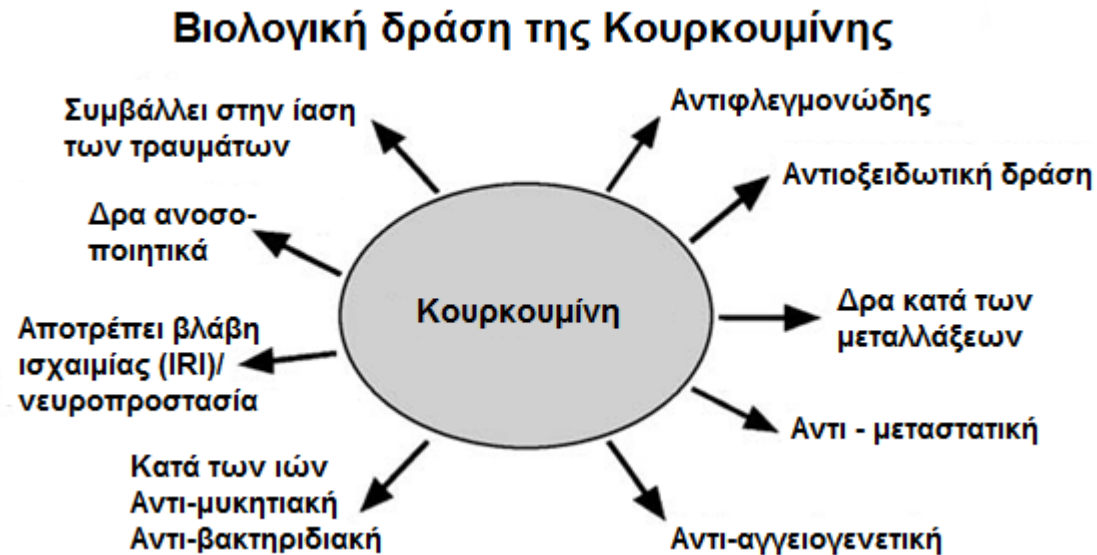
Πίνακας 3.2-1: Σημαντικές μελέτες για τις ιδιότητες της κουρκουμίνης ^{[40], [46], [47]}.

In vivo και in vitro μελέτες έχουν καταδείξει την ικανότητα της κουρκουμίνης να αναστέλλει την καρκινογένεση σε τρία στάδια: στην εξέλιξη / αύξηση του όγκου, την αγγειογένεση και την ανάπτυξη όγκων. Το άλλο εξαιρετικό χαρακτηριστικό της κουρκουμίνης είναι ότι παρά το γεγονός ότι καταναλώνονται καθημερινά για αιώνες στις χώρες της Ασίας, δεν έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί τοξικότητα ^[47].

Ως ένα πολλά υποσχόμενο αντικαρκινικό φάρμακο, η κουρκουμίνη θα μπορούσε να καταστείλει καρκινογενέσεις σε διάφορες διεργασίες με την ενεργοποίηση της απόπτωσης σηματοδότησης και την παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Για παράδειγμα, μπορεί να προκαλέσει απόπτωση σε κύτταρα HepG-2 μέσω άμεσης επίδρασης στα μιτοχόνδριά τους καθώς η κουρκουμίνη αυξάνει το σχηματισμό ROS και προκαλεί υπεροξειδωση των λιπιδίων στα κύτταρα. Επιπλέον, αρκετά ζωικά μοντέλα και ανθρώπινες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η κουρκουμίνη είναι εξαιρετικά ασφαλής με χαμηλή τοξικότητα *in vivo*, ακόμη και σε υψηλές δόσεις [43].

Από την άλλη πλευρά, η βιοδιαθεσιμότητά της είναι πολύ φτωχή, επειδή παρουσιάζει αρκετά χαμηλή διαλυτότητα σε καθαρό νερό. Συνεπώς, άπαξ και χορηγηθεί στον άνθρωπο υπάρχει κίνδυνος κακής απορρόφησης, ταχείας αποδόμησης και τελικά αποβολής της από τον οργανισμό. Για την αντιμετώπιση αυτής της πρόκλησης έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες τεχνικές φαρμακευτικών νανοσχηματισμών, όπως μικκύλια, νανοσωματίδια και λιποσώματα. Για παράδειγμα, οι Tsai *et al.* ενθυλάκωσαν την Κουρκουμίνη σε νανοσχηματισμό PLGA και παρατήρησαν ότι σημαντική αύξηση της από του στόματος βιοδιαθεσιμότητας σε ένα ζωικό μοντέλο μελέτης [43].

Εκτός από τη βιοδιαθεσιμότητα όμως, η κουρκουμίνη με όλες τις φαρμακευτικές αξίες της, παρουσιάζει και άλλους περιορισμούς όπως αστάθεια και ταχεία αποδόμηση στα βιολογικά μέσα, ευαισθησία στην οξειδωση, κλπ [44].



Εικόνα 3.2-1: Σχηματική αναπαράσταση της βιολογικής δράσης της κουρκουμίνης [47].

3.3 Η κουρκουμίνη στη Φωτοδυναμική Θεραπεία

Όπως έχουμε δει σε προηγούμενο κεφάλαιο, το οξυγόνο χρησιμοποιείται στη φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) του καρκίνου για να προκαλέσει το φωτοχημικό θάνατο του κυττάρου όταν οι φωτοευαισθητοποιητές εκτίθενται σε ακτινοβολήση. Οι μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας του φωτοευαισθητοποιητή περιλαμβάνουν την παραγωγή μονήρους οξυγόνου και τις ελεύθερες ρίζες (ROS), όταν ο φωτοευαισθητοποιητής στην τριπλή διεγερμένη στάθμη χάσει ή δεχτεί ηλεκτρόνιο.

Παρόλο που αποδεικνύεται *in vitro* ότι η κουρκουμίνη μπορεί να προκαλέσει φωτοτοξικό κυτταρικό θάνατο σε καρκινικά κύτταρα, ο μηχανισμός της φωτοπαραγόμενης βλάβης στη βιολογική ουσία παραμένει ασαφής. Με βάση την τεχνική ραδιόλυσης παλμού και άλλες βιοχημικές μετρήσεις επιβεβαιώθηκε η αντιοξειδωτική δράση της κουρκουμίνης κυρίως λόγω της φαινολικής υδροξυλομάδας της (ομάδα OH) ^[40].

Δεδομένου ότι η πρόσληψη της κουρκουμίνης είναι υψηλότερη σε κύτταρα όγκου, υπάρχει πιθανότητα οι φωτοεπαγόμενες ρίζες Cur να οδηγήσουν σε οξειδωτική βλάβη στα βιομόρια. Μέχρι στιγμής, είναι ακόμα άγνωστο αν οι δημιουργούμενες ουσίες από τη φωτοδιεγερμένη κουρκουμίνη μπορούν να προκαλέσουν άμεσα φωτοτοξικότητα. Επιπλέον, η ταυτότητα των φωτοπροϊόντων της δεν έχει διερευνηθεί πλήρως. Εν τω μεταξύ, η κβαντική απόδοση του φωτο-ιονισμού και οι αντιδράσεις μεταξύ κουρκουμίνης και αμινοξέων δεν έχουν προσδιοριστεί ακόμη ^[40].

Μολονότι η κουρκουμίνη έχει πολύ πλούσιες φωτοφυσικές και φωτοχημικές ιδιότητες, η ένωση αυτή δεν έχει χρησιμοποιηθεί στο σχεδιασμό φωτοενεργοποιούμενων χημειοθεραπευτικών παραγόντων (PACT) οι οποίοι θα μπορούσαν να δράσουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις με επιλεκτική φωτο-έκθεση στα καρκινικά κύτταρα αφήνοντας έτσι ανεπηρέαστα τα φυσιολογικά κύτταρα που δεν έχουν εκτεθεί.

Σε πρόσφατες μελέτες, η κουρκουμίνη και μεταλλικά σύμπλοκα της προσδέθηκαν στην επιφάνεια νανοπαραγώγων ZnO/PVA με τη μέθοδο εξάτμισης κενού. Το PVA επιλέχθηκε λόγω της βιοσυμβατότητάς του και τα νανοπαραγώγα χρησιμοποιήθηκαν ως φορέας της φωτοευαίσθητης ουσίας. Ένας πιθανός μηχανισμός φωτοευαισθητοποίησης προτάθηκε με τη χρήση τεχνικών οπτικής και παγίδευσης EPR-spin. Οι εν λόγω μελέτες κατέδειξαν ότι διαδικασίες όπως η φωτοπροκληθείσα διάσπαση του DNA, η *in vitro* κυτταροτοξικότητα των HeLa κυτταρικών σειρών και η φωτοαποδόμηση του κυανού μεθυλενίου με τη χρήση ZnO/PVA νανοπαραγώγων τροποποιημένων με Zn – κουρκουμίνη ήταν σημαντικά αυξημένες σε σχέση με τη χρήση της κουρκουμίνης σε διάλυμα ^{[48], [49]}.

Το 2013 παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν παράγωγα κουρκουμίνης με σύμπλοκα ακετυλακετόνης και συγκεκριμένες δομικές ιδιότητες. Τα υπό εξέταση παράγωγα κουρκουμίνης παρουσίασαν αξιοσημείωτη φωτοκυτταροτοξικότητα σε κύτταρα HeLa στο ορατό φως, ενώ οι ουσίες ήταν σχετικά μη-τοξικές στο σκοτάδι. Επίσης, η μικροσκοπία φθορισμού έδειξε σημαντικό εντοπισμό των ουσιών μέσα στα κύτταρα HeLa ^[50].

Οι μελέτες των τελευταίων ετών που αφορούν τη χρήση της κουρκουμίνης στη φωτοδυναμική θεραπεία έχουν επικεντρωθεί στη θεραπεία του καρκίνου του

δέρματος ^[51], ^[52]. Στα πλαίσια αυτά, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες ουσίες σε συνδυασμό με την κourkouμίνη και δοκιμάστηκαν διάφορες μέθοδοι. Τα πιο πρόσφατα αποτελέσματα των ερευνών στον τομέα αυτό, παρατίθενται στη συνέχεια, στον Πίνακα 3.3-1.

Αποτελέσματα πρόσφατων ερευνών για την κourkouμίνη στη Φωτοδυναμική Θεραπεία		
<u>Ουσίες</u>	<u>Μέθοδος</u>	<u>Σημαντικότερες Παρατηρήσεις</u>
Κourkouμίνη	Νανογέλη χιτίνης (Chitin nanogels)	<ul style="list-style-type: none"> - Η κourkouμίνη και το πολυμερές είναι αδιάλυτα στο νερό. - Μεγαλύτερη απελευθέρωση σε όξινο pH - Ειδικότερη τοξικότητα σε κυτταρικές σειρές CM - Η νανογέλη παρουσίασε τετραπλάσια αύξηση στη διαδερμική ροή της κourkouμίνης σε σύγκριση με το διάλυμα κourkouμίνης.
Κourkouμίνη / δοξορουβικίνη	MBCSPs (κourkouμίνη στον πυρήνα και δοξορουβικίνη στο κέλυφος)	<ul style="list-style-type: none"> - Θερμοευαίσθητο κέλυφος πολυμερούς και πυρήνας PLGA με ενσωματωμένα MNPs. - Σύμπλοκα MNPs με πεπτίδια που δεσμεύονται με συγκεκριμένους υποδοχείς των κυττάρων - Μηχανισμοί διπλής απελευθέρωσης φαρμάκου (μία παρατεταμένη απελευθέρωση των ουσιών μέσω της αποδόμησης του πυρήνα PLGA και μια ελεγχόμενη απελευθέρωση ανταποκρινόμενη στις αλλαγές της θερμοκρασίας μέσω του θερμοευαίσθητου πολυμερούς στο κέλυφος) - Διπλός μηχανισμός στόχευσης (μαγνητικός εντοπισμός και στόχευση με μεσολάβηση υποδοχέων).

Πίνακας 3.3-1: Συνοπτική παρουσίαση των σημαντικότερων αποτελεσμάτων από πρόσφατες έρευνες σχετικά με τη χρήση της κourkouμίνης στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου του δέρματος ^[51].

Τα παράγωγα κourkouμίνης σαν φωτοενεργοποιούμενοι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες νέας γενιάς θα μπορούσαν να αναπτυχθούν ως δυνητικά υποκατάστατα των μακροκυκλικών οργανικών χρωστικών που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) του καρκίνου (όπως πορφυρίνες και φθαλοκυανίνες). Ενδεχόμενα

παράγωγα κουρκουμίνης με κατάλληλη τροποποίηση (π.χ. ως σύμπλοκα μετάλλων) για καλύτερη σταθερότητα και βελτιωμένη διαλυτότητα στα βιολογικά μέσα, θα μπορούσαν να ξεπεράσουν τα προβλήματα της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας και της αστάθειας στον ανθρώπινο οργανισμό ^[44].

Στην παρούσα εργασία διενεργείται μελέτη σχετικά με τις φωτοφυσικές ιδιότητες συγκεκριμένων παραγώγων της κουρκουμίνης και την πιθανότητα χρήσης τους ως φωτοευαισθητοποιητές στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου.





Κεφάλαιο 4: Η πειραματική διαδικασία



4.1 Σκοπός της πειραματικής μελέτης

Στη φωτοδυναμική θεραπεία χρησιμοποιούνται αρκετές φωτοευαίσθητες ουσίες, οι οποίες διαφέρουν σε πολλά από τα χαρακτηριστικά τους ενώ σημαντικές διαφορές παρατηρούνται ακόμα και ανάμεσα σε παράγωγα της ίδιας ουσίας όταν αυτή χρησιμοποιείται σε σχετικά πειράματα. Για το λόγο αυτό, καθίσταται αναγκαία η αυτόνομη μελέτη κάθε ουσίας ή παραγώγου της προκειμένου να καθοριστούν με ακρίβεια οι φωτοφυσικές της ιδιότητες πριν προχωρήσουμε σε χρήση της στη φωτοδυναμική θεραπεία. Η διαδικασία αυτή αρχίζει από τα πειράματα σε διαλύματα της ουσίας, συνεχίζει με πειράματα σε κύτταρα και τέλος εξετάζεται και σε ζωντανούς οργανισμούς.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο, χρησιμοποιήθηκαν παράγωγα της κουρκουμίνης σε μορφή διαλύματος. Αυτό το στάδιο είναι απαραίτητο να προηγηθεί πριν τη μελέτη των ουσιών σε κύτταρα (*in vitro*) ή πειραματόζωα (*in vivo*) καθώς καθιστά την πειραματική διαδικασία περισσότερο ελέγξιμη. Είναι γεγονός ότι οι μελέτες των διαλυμάτων τείνουν να επηρεάζονται από λιγότερες μεταβλητές σε σχέση με τις μελέτες *in vitro* ή *in vivo*, συνεπώς, μπορούμε να εξετάσουμε ξεχωριστά κάθε μηχανισμό αλλά και τις ιδιότητες των ουσιών.

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία έχει ως στόχο τη συγκριτική μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων τριών παραγώγων της κουρκουμίνης προκειμένου να εξεταστεί η ενδεχόμενη χρήση τους ως φωτοευαίσθητοποιητές στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου. Στα πλαίσια αυτά, πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω μελέτες:

- Μελέτη της συμπεριφοράς της απορρόφησης που παρουσιάζουν τα διαλύματα των ουσιών σε διάφορες συγκεντρώσεις.
- Μελέτη της απορρόφησης που παρουσιάζουν τα διαλύματα των ουσιών όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικού τύπου διαλύτες.
- Μελέτη της συμπεριφοράς των διαλυμάτων των παραγώγων ως προς το φθορισμό σε διάφορες συγκεντρώσεις.
- Μελέτη της φωτολεύκανσης των διαλυμάτων σε συνθήκες ακτινοβολήσης.
- Μελέτη της ικανότητας των διαλυμάτων των ουσιών ως προς την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Το παρόν κεφάλαιο περιγράφει αναλυτικά την πειραματική διαδικασία καθώς επίσης και τις διατάξεις αλλά και τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των ανωτέρω πειραματικών μελετών.

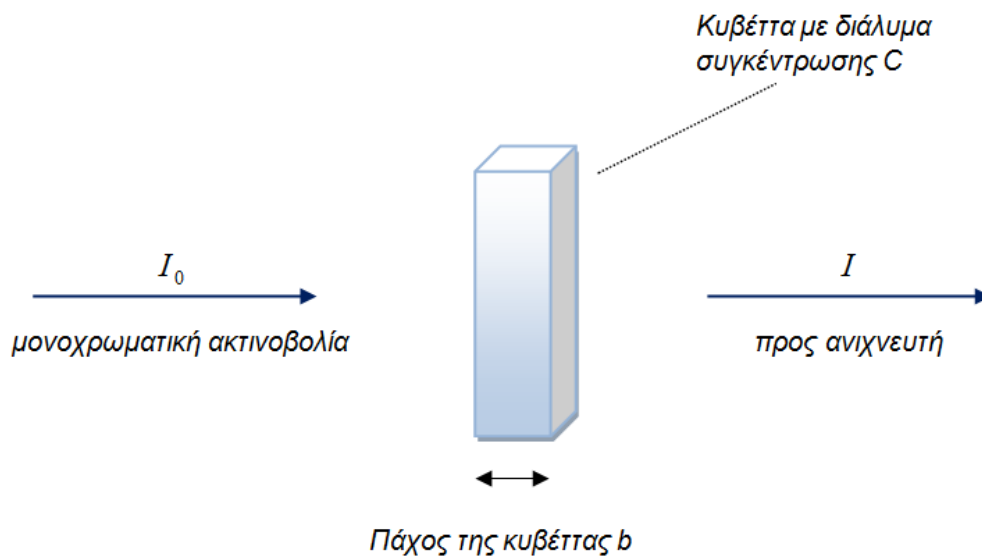
4.2 Πειραματικές διατάξεις

4.2.1 Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκαν φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης τόσο για τη μέτρηση του φάσματος απορρόφησης των παραγώγων της κουρκουμίνης όσο και για τον προσδιορισμό της φωτολεύκανσης που υφίστανται οι ουσίες και μπορεί να επηρεάσει τη φωτοδυναμική τους δράση.

4.2.1.1 Αρχή της απορρόφησης της ακτινοβολίας, νόμος Lambert – Beer

Μια δέσμη φωτεινής ακτινοβολίας I_0 κατευθύνεται προς ένα δείγμα και μετράται η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας I όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 4.2-1.



Εικόνα 4.2-1: Σχηματική αναπαράσταση της πορείας της ακτινοβολίας μέσω της κυβέτας.

Για να έχουμε απορρόφηση πρέπει τα φωτόνια που προσκρούουν στο δείγμα να έχουν ενέργεια ίση με αυτή που απαιτείται για την πρόκληση ηλεκτρονικής μεταβολής. Σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται απορρόφηση, η οποία ελαττώνει την ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας. Η ποσοτική έκφραση της απορρόφησης δίνεται από το νόμο Lambert – Beer, ο οποίος ορίζει τη σχέση μεταξύ της μείωσης της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και της συγκέντρωσης του διαλύτη, διαμέσου του οποίου διέρχεται η ακτινοβολία ^[35].

Για τη μειωμένη ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας ισχύει:

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

Και ακολούθως, ο νόμος Lambert – Beer:

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

όπου A η απορρόφηση, I_0 η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, I η ελαττωμένη ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας, ε η μοριακή απορροφητικότητα ή μοριακός συντελεστής απόσβεσης (με μονάδα μέτρησης $l/mol \times cm$), b το πάχος της κυβέτας (σε cm) και c η συγκέντρωση της απορροφούσας ουσίας (σε mol/l) [53].

4.2.1.2 Προϋποθέσεις για την ισχύ του νόμου Lambert – Beer

Οι βασικές προϋποθέσεις προκειμένου να ισχύει ο νόμος Lambert – Beer είναι οι παρακάτω:

- Η προσπίπτουσα ακτινοβολία πρέπει να είναι μονοχρωματική για να εξασφαλίζεται σταθερή μοριακή απορροφητικότητα. Αυτό επιτυγχάνεται με χρήση απόλυτα μονοχρωματικών πηγών.
- Οι χημικές ουσίες που απορροφούν πρέπει να δρουν ανεξάρτητα στη διαδικασία ώστε να μη σχηματίζονται σε παράλληλες αντιδράσεις απορρόφησης με διαφορετικές τιμές μοριακής απορροφητικότητας. Γι' αυτό, ο νόμος του Beer ισχύει σε αραιά διαλύματα με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ $10^{-2} mol/l$ και $10^{-7} mol/l$. Επίσης, ο δείκτης διάθλασης αραιών διαλυμάτων είναι ανεξάρτητος της συγκέντρωσης της χημικής ουσίας που απορροφά, πράγμα που προϋποθέτει και ο νόμος του Beer.
- Η απορρόφηση πρέπει να συμβαίνει σε όγκο ομοιόμορφης διατομής και αυτό επιτυγχάνεται με την κατάλληλη κατασκευή της κυβέτας που χρησιμοποιείται.
- Τα ηλεκτρόνια πρέπει να επανέρχονται γρήγορα στη θεμελιώδη τους κατάσταση και να μη μένουν σε ενδιάμεσες ενεργειακές καταστάσεις. Σε αντίθετη περίπτωση, παρατηρείται το φαινόμενο του φθορισμού και μειώνεται η παρατηρούμενη απορρόφηση.

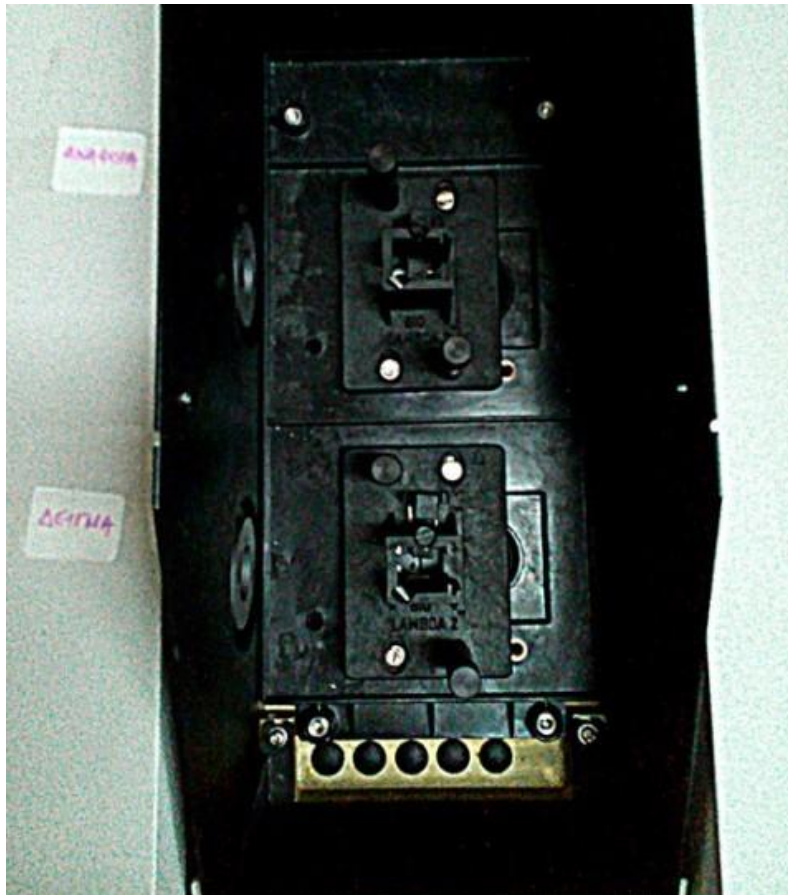
Στις περιπτώσεις που δεν ικανοποιούνται οι παραπάνω προϋποθέσεις, παρατηρείται απόκλιση από το νόμο Lambert – Beer και η απορρόφηση δε μεταβάλλεται γραμμικά ως προς τη συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας [53].

4.2.1.3 Το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης

Για τη λήψη και την καταγραφή των φασμάτων απορρόφησης των διαλυμάτων Κουρκουμίνης χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης Perkin – Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer [54] (Εικόνες 4.2-2 και 4.2-3).



Εικόνα 4.2-2: Φωτογραφική απεικόνιση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin – Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer

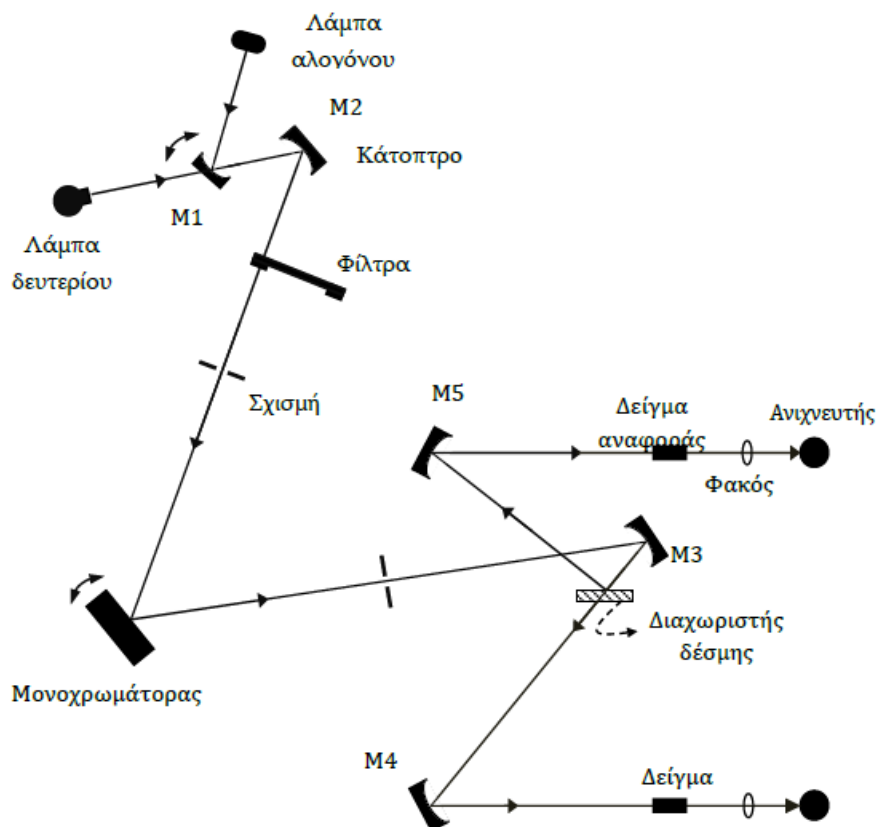


Εικόνα 4.2-3: Φωτογραφική απεικόνιση της υποδοχής κυβετών του οργάνου. Το δείγμα αναφοράς τοποθετείται επάνω και το προς εξέταση δείγμα στην κάτω υποδοχή.

Το όργανο διαθέτει δυο φωτεινές πηγές:

- Μια λυχνία δευτερίου, η οποία εκπέμπει στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος (200 nm – 400 nm).
- Μια λυχνία αλογόνου, η οποία εκπέμπει στην ορατή και κοντινή υπέρυθρη περιοχή (350nm – 900 nm).

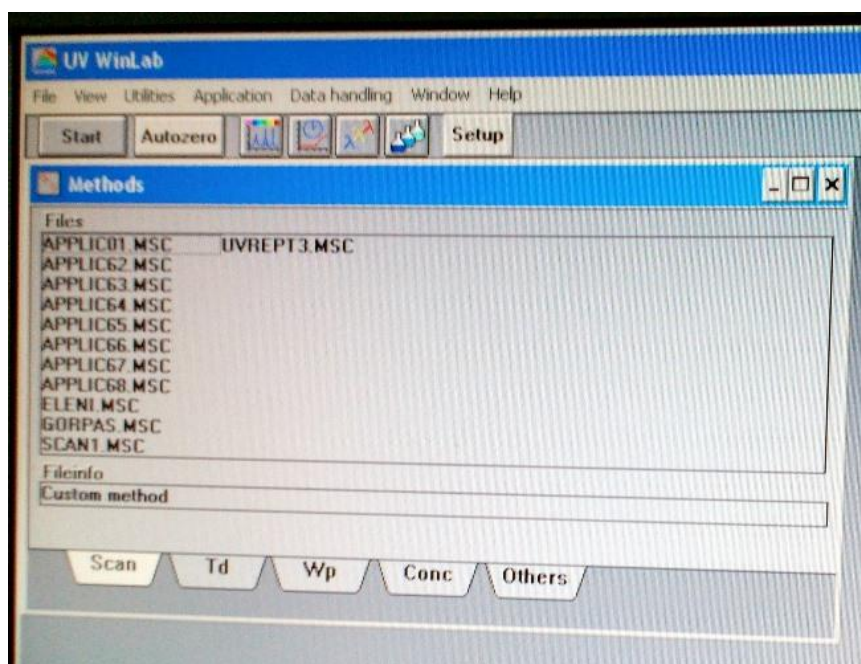
Η λειτουργία του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin – Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer απεικονίζεται στο διάγραμμα που ακολουθεί (Εικόνα 4.2-4). Όπως φαίνεται και στο εν λόγω διάγραμμα, το κάτοπτρο M1 ανασηκώνεται όταν η ακτινοβολία προέρχεται από τη λυχνία δευτερίου προκειμένου να επιτρέψει τη 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 μιας ευρείας περιοχής μηκών κύματος, τότε η μετακίνηση του κατόπτρου και η αλλαγή λυχνίας γίνεται αυτόματα, στα 326 nm.



Εικόνα 4.2-4: Οπτικό διάγραμμα λειτουργίας του φασματοφωτόμετρου Perkin – Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer ^[35].

Το κάτοπτρο M2 οδηγεί τη δέσμη σε ένα τροχό φίλτρων. 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 εισόδου του μονοχρωμάτορα και προσπίπτει σε αυτόν. Ο μονοχρωμάτορας είναι συγχρονισμένος με τον τροχό φίλτρων και κινούνται μέσω ενός βηματικού κινητήρα. Η δέσμη φωτός του εξεταζόμενου μήκους κύματος θα περάσει από τη σχισμή εξόδου και θα προσπέσει σε ένα νέο κάτοπτρο M3 που θα την οδηγήσει σε έναν διαχωριστή δέσμης.

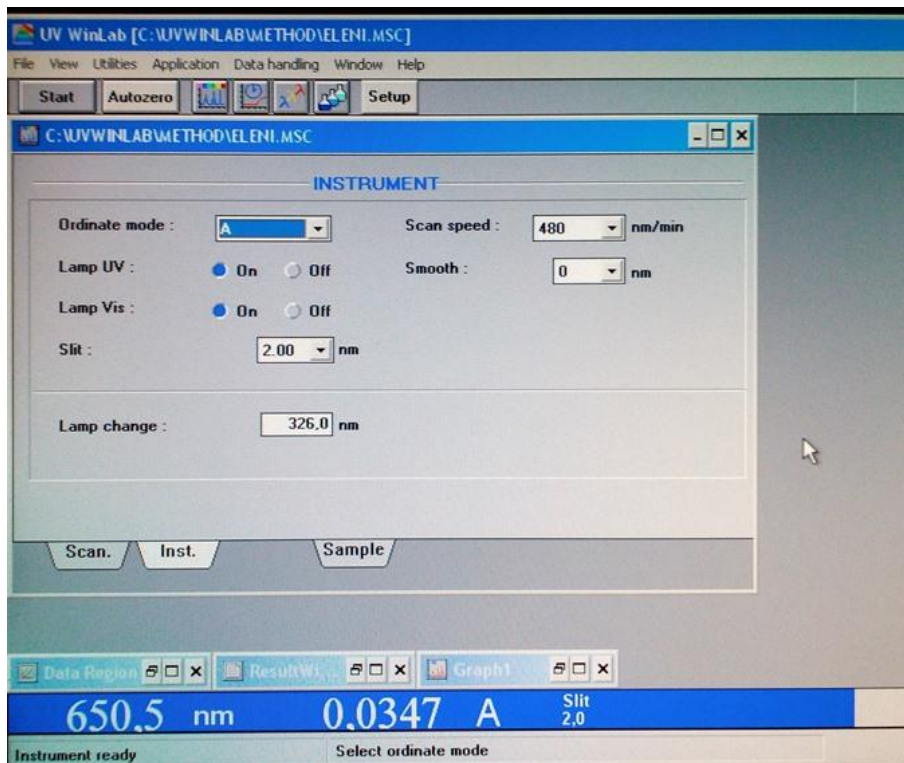
Το 50% της ακτινοβολίας ανακλάται από το διαχωριστή δέσμης και οδηγείται προς το κάτοπτρο M4 ενώ το υπόλοιπο 50% περνά προς το κάτοπτρο M5. Η δέσμη από το M5 θα οδηγηθεί προς το δείγμα αναφοράς και αφού περάσει μέσα από αυτό, θα οδηγηθεί στη φωτοδίοδο μέσω φακού εστίασης. Με παρόμοιο τρόπο, η δέσμη από το κάτοπτρο M4 θα οδηγηθεί στο δείγμα προς εξέταση και αφού διέλθει μέσα από αυτό, περνάει στη φωτοδίοδο μέσω φακών. Τα δυο δείγματα (δείγμα προς εξέταση και δείγμα αναφοράς) βρίσκονται σε όμοιες κυβέττες και τοποθετούνται στις υποδοχές του οργάνου όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 4.2-3.



Εικόνα 4.2-5: Απεικόνιση από το λογισμικό πακέτο UV WinLab.

Το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης ελέγχεται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή με τη χρήση του λογισμικού πακέτου UV WinLab, φωτογραφίες του οποίου απεικονίζονται στις Εικόνες 4.2-5 και 4.2-6. Με το εν λόγω λογισμικό, μπορούν να ρυθμίζονται οι παράμετροι του οργάνου και της μέτρησης καθώς και να εκτελούνται εργασίες όπως οι παρακάτω:

- Η επιλογή των μηκών κύματος, της ταχύτητας σάρωσης και του πλάτους της σχισμής του μονοχρωμάτορα.
- Ο μηδενισμός του σήματος που οφείλεται στο διαλύτη και το θόρυβο του φασματοφωτόμετρου, μέσω της επιλογής Autozero.
- Η επεξεργασία των διαγραμμάτων (φασμάτων απορρόφησης) που προκύπτουν από τις μετρήσεις.



Εικόνα 4.2-6: Απεικόνιση από το λογισμικό πακέτο UV WinLab.

4.2.2 Φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού

Το μόριο μπορεί να μεταβεί από ένα διεγερμένο δονητικό επίπεδο της πρώτης μονήρους διεγερμένης στάθμης στη βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση, με εκπομπή φωτονίου. Η ενέργεια του φωτονίου (άρα και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας) καθορίζεται από την ενεργειακή διαφορά μεταξύ της διεγερμένης και του δονητικού επιπέδου της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Το εκπεμπόμενο φως έχει μεγαλύτερο μήκος κύματος από την απορροφούμενη ακτινοβολία. Δηλαδή, η φασματοσκοπία φθορισμού διαγείρει τα ηλεκτρόνια των μορίων προκαλώντας εκπομπή φωτός^[55].

Μακροσκοπικά, φθορισμός ονομάζεται η εκπομπή φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος από μια ουσία που έχει απορροφήσει κάποια δέσμη φωτός διαφορετικού μήκους κύματος. Η διάρκεια ζωής του φθορισμού είναι της τάξης των nsec^[55].

Περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με το φθορισμό καθώς και κβαντική ερμηνεία σχετικών οπτικών φαινομένων παρατίθενται στο Κεφάλαιο 1 της παρούσας εργασίας.

4.2.2.1 Παράμετροι που επηρεάζουν το φθορισμό

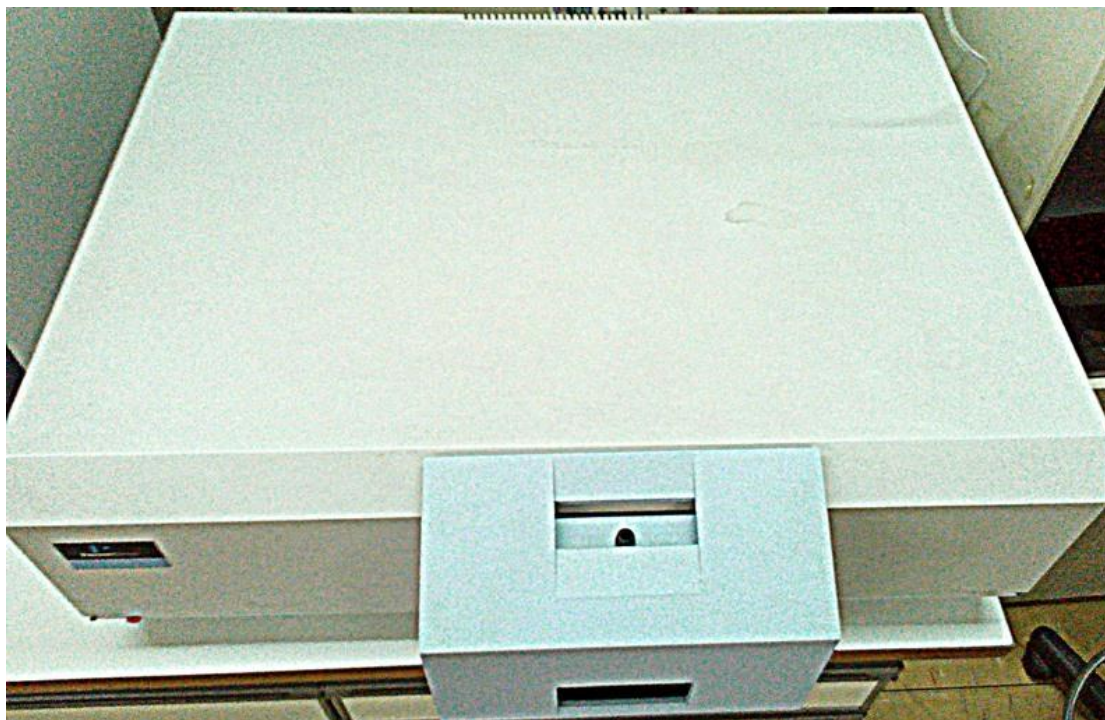
Παρακάτω, αναφέρονται συνοπτικά οι κυριότεροι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν το φθορισμό μιας ουσίας ^{[57], [58]}:

- Η κβαντική απόδοση Φ . Όσο μεγαλύτερη είναι, τόσο μεγαλύτερος θα είναι και ο φθορισμός.
- Η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας I_0 . Θεωρητικά, όσο αυξάνεται η ένταση τόσο μεγαλύτερος θα είναι και ο φθορισμός. Στην πράξη όμως, πολύ δυνατή ακτινοβολία διέγερσης μπορεί να προκαλέσει φωτοαποδόμηση του δείγματος.
- Η μοριακή απορροφητικότητα ε της ουσίας. Προκειμένου να εκπέμψει ακτινοβολία μια ουσία θα πρέπει πρώτα να απορροφήσει άρα όσο μεγαλύτερη είναι η μοριακή απορροφητικότητα, τόσο αυξάνεται και η ένταση φθορισμού.
- Η ένταση φθορισμού είναι αντιστρόφως ανάλογη της θερμοκρασίας. Η θερμότητα προκαλεί αύξηση της κινητικότητας άρα και των συγκρούσεων, αυξάνοντας την πιθανότητα αποδιέγερσης με εξωτερική μετατροπή.
- Η ένταση φθορισμού είναι αντιστρόφως ανάλογη με το ιξώδες του διαλύτη.
- Ο φθορισμός μειώνεται με την παρουσία οξειγόνου ή βαρέων ατόμων στο διαλύτη.

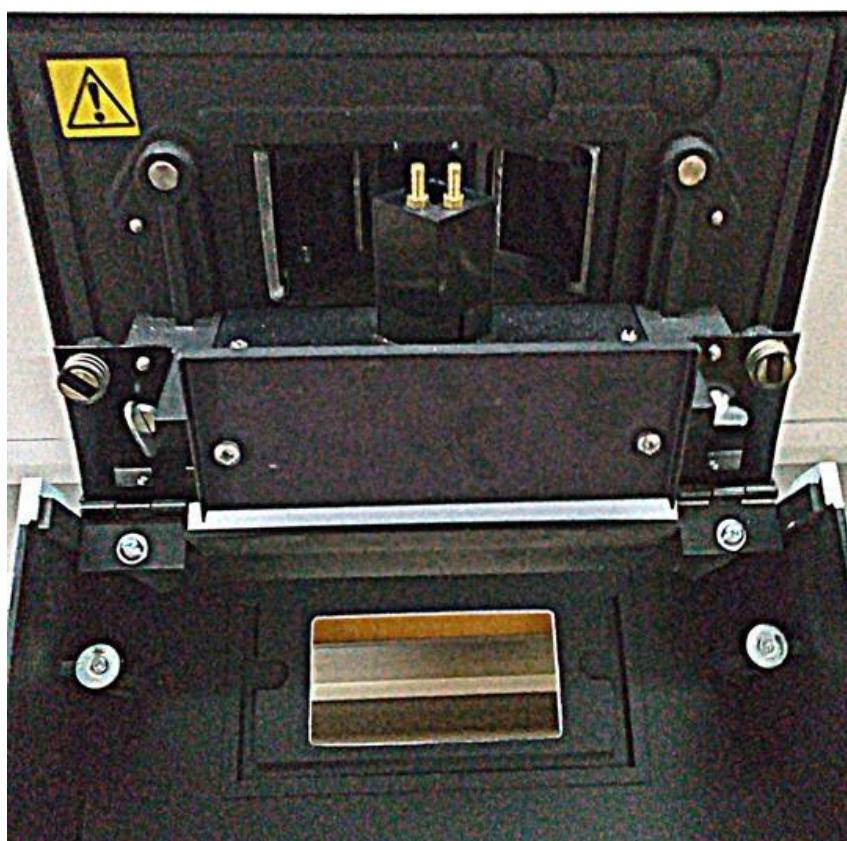
4.2.2.2 Το φασματοφωτόμετρο φθορισμού

Για τη λήψη και την καταγραφή των φασμάτων φθορισμού κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού Perkin – Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer ^[56] (Εικόνες 4.2-7 και 4.2-8). Στη συγκεκριμένη διάταξη, η μέτρηση του φθορισμού μπορεί να υλοποιηθεί είτε για συνεχή σάρωση σε όλο το εύρος των μηκών κύματος του οργάνου, είτε για κάποιο υποσύνολό της, είτε για συγκεκριμένο μήκος κύματος.

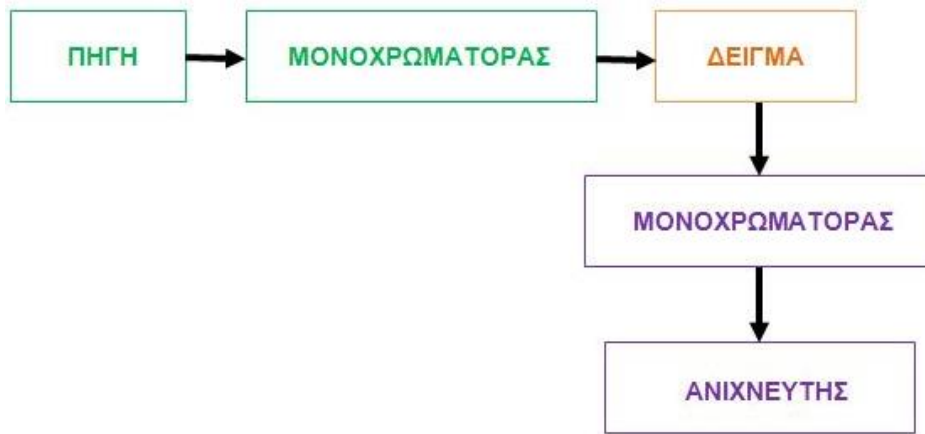
Η πορεία της ακτινοβολίας διαμέσου του φασματοφωτόμετρου παρουσιάζεται στο μπλοκ διάγραμμα της Εικόνας 4.2-9 αλλά και το λεπτομερές οπτικό διάγραμμα της Εικόνας 4.2-10. Μπορούμε να πούμε ότι η διάταξη χωρίζεται σε τρία μέρη: την περιοχή διέγερσης (πράσινο), την περιοχή εκπομπής (μωβ) και την περιοχή του δείγματος (πορτοκαλί). Οι περιοχές διέγερσης και εκπομπής βρίσκονται σε γωνία 90° μεταξύ τους ώστε στον ανιχνευτή να φτάνει μόνο η ακτινοβολία φθορισμού. Αυτό γίνεται εμφανές παρατηρώντας και τη θέση της υποδοχής για την κυβέττα του δείγματος όπως βλέπουμε και στην Εικόνα 4.2-8.



Εικόνα 4.2-7: Φωτογραφική απεικόνιση του φασματοφωτόμετρου φθορισμού Perkin – Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer.

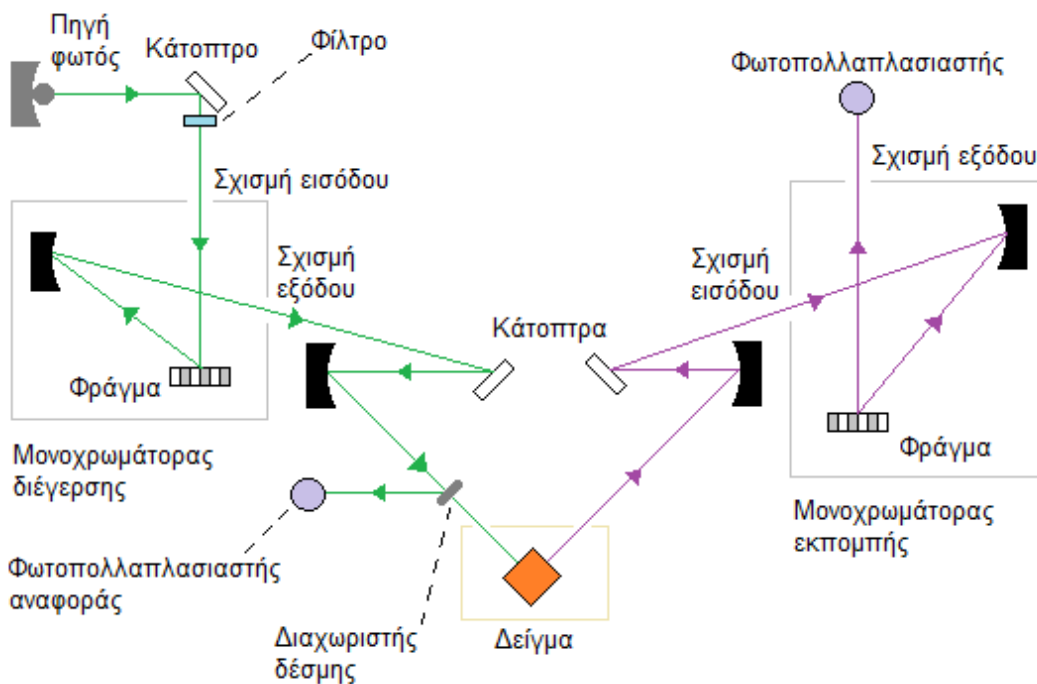


Εικόνα 4.2-8: Φωτογραφική απεικόνιση της υποδοχής κυβέτας του οργάνου.



Εικόνα 4.2-9: Μπλοκ διάγραμμα λειτουργίας του Perkin – Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer.

Όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 4.2-10, η ακτινοβολία από την πηγή φωτός (λυχνία ξένου μεγάλης έντασης, παλμική, με μικρό χρόνο διάρκειας παλμού), με τη βοήθεια κατόπτρων, εστιάζεται στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα διέγερσης, αφού πρώτα περάσει από φίλτρο καθώς ο μονοχρωμάτορας δε μπορεί να αναγνωρίσει πολλαπλάσια μήκη κύματος. Ο μονοχρωμάτορας διέγερσης περιλαμβάνει φράγμα περίθλασης 1440 lines/nm και σφαιρικό κάτοπτρο για την κάλυψη του φάσματος από τη φωτεινή δέσμη.



Εικόνα 4.2-10: Οπτικό διάγραμμα διέγερσης και συλλογής φθορισμού σύμφωνα με το οποίο λειτουργεί το φασματοφωτόμετρο φθορισμού.

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.

Στη συνέχεια, η μονοχρωματική δέσμη διέγερσης, με χρήση κατόπτρων, προσπίπτει στο διαχωριστή δέσμης. Με τη βοήθειά του, ένα μικρό μέρος της ακτινοβολίας μεταφέρεται στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς ενώ το υπόλοιπο οδηγείται στο δείγμα (όπου υπάρχει κατάλληλος υποδοχέας για την κυβέττα) υπό γωνία 45° . Προκειμένου να διορθώνεται η απόκλιση στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς, είναι αποθηκευμένη στο όργανο καμπύλη αναφοράς Ροδαμίνης Β, η οποία διατηρεί σχεδόν σταθερή την κβαντική της απόδοση για απορρόφηση μήκους κύματος 200 nm – 600 nm και εκπομπή 630 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 lines/nm και σφαιρικό κάτοπτρο. Δε χρειάζεται χρήση φίλτρου πριν της είσοδο της δέσμης στο μονοχρωμάτορα εκπομπής καθώς πλέον η ακτινοβολία φθορισμού έχει μικρό εύρος μηκών κύματος. Η στενή φασματική περιοχή ακτινοβολίας που εξέρχεται από τη σχισμή εξόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής (το φράγμα περίθλασης του οποίου ελέγχεται επίσης από βηματικό κινητήρα) τελικά συγκεντρώνεται στο φωτοπολλαπλασιαστή για περαιτέρω ανάλυση.

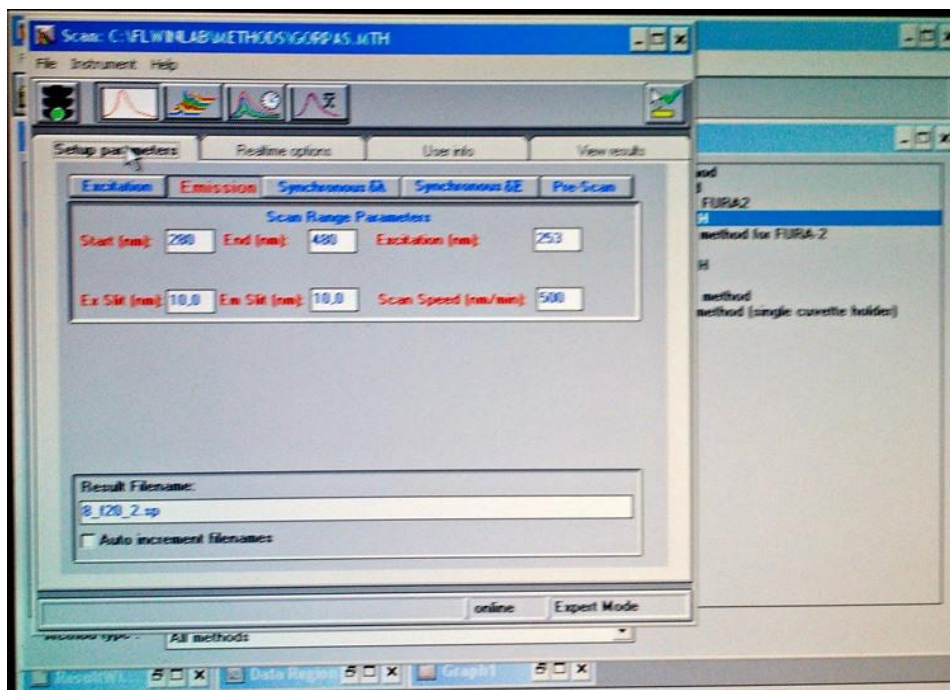
Το εύρος σάρωσης του μονοχρωμάτορα διέγερσης είναι 200 nm – 800 nm, ενώ αντίστοιχα του μονοχρωμάτορα εκπομπής 200 nm – 900 nm. Οι δυο μονοχρωμάτορες μπορεί να δουλεύουν είτε ανεξάρτητα μεταξύ τους είτε συνδυαστικά. Επίσης, υπάρχει δυνατότητα σύγχρονης σάρωσης, με σταθερή διαφορά μήκους κύματος διέγερσης και εκπομπής.

Το εύρος της σχισμής αποτελεί σημαντική παράμετρο που καθορίζει τη διακριτική ικανότητα της διάταξης. Βελτίωση της διακριτικής ικανότητας επιτυγχάνεται με την ελάττωση του εύρους της σχισμής, παρουσιάζοντας όμως 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 4 φορές). Ως ανιχνευτές χρησιμοποιούνται φωτοπολλαπλασιαστές λόγω της ευαισθησίας και της γρήγορης απόκρισής τους ^{[58], [59]}.

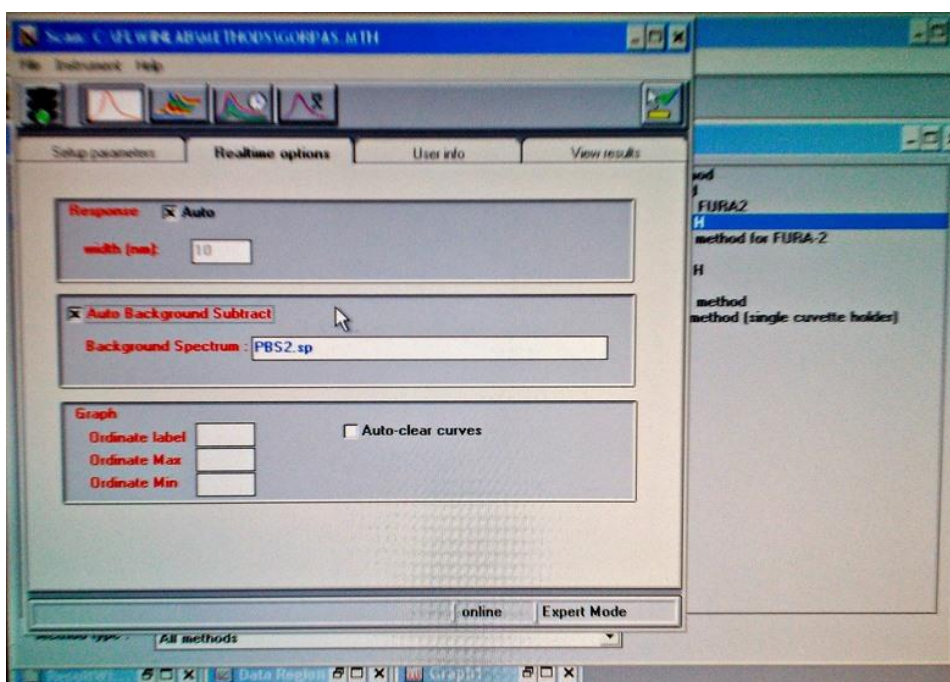
Το φασματοφωτόμετρο φθορισμού ελέγχεται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή με τη χρήση του λογισμικού πακέτου FL WinLab, φωτογραφίες του οποίου απεικονίζονται στις Εικόνες 4.2-11 και 4.2-12. Με το εν λόγω λογισμικό, μπορούν να ρυθμίζονται οι παράμετροι του οργάνου και της μέτρησης καθώς και να εκτελούνται εργασίες όπως παρακάτω ^[17]:

- Η επιλογή των μηκών κύματος, της ταχύτητας σάρωσης και του πλάτους της σχισμής για κάθε μονοχρωμάτορα.
- Η επιλογή του μήκους κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται για τη διέγερση του δείγματος.

- Ο μηδενισμός του σήματος που οφείλεται στο διαλύτη και το θόρυβο του φασματοφωτόμετρου, μέσω της κατάλληλης αφαίρεσης φάσματος φθορισμού της εν λόγω ουσίας (εικόνα 4.2-12).
- Η επεξεργασία των φασμάτων που προκύπτουν από τις μετρήσεις.



Εικόνα 4.2-11: Απεικόνιση από το λογισμικό πακέτο UV WinLab.

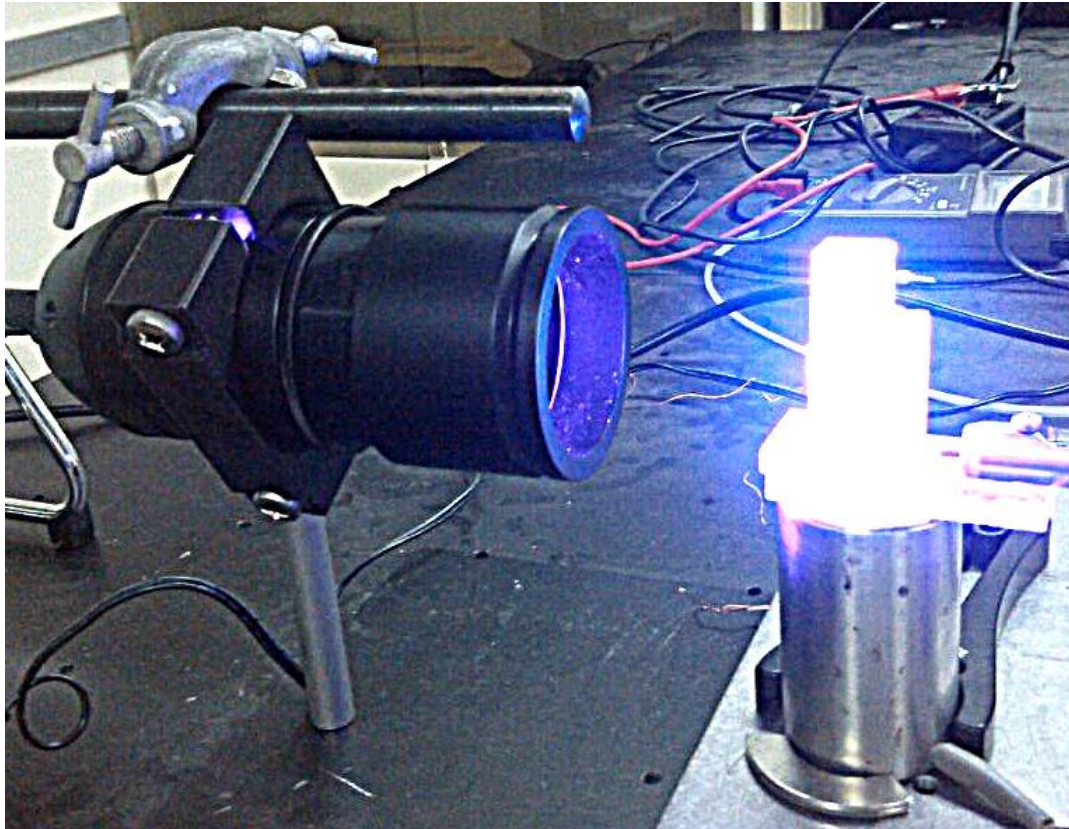


Εικόνα 4.2-12: Απεικόνιση από το λογισμικό πακέτο UV WinLab.

4.2.3 Διατάξεις ακτινοβολήσης

4.2.3.1 Διάταξη ακτινοβολήσης στα πειράματα φωτολεύκανσης

Η ακτινοβολήση του δείγματος για τα πειράματα φωτολεύκανσης πραγματοποιήθηκε με χρήση της διάταξης που δημιουργήθηκε ειδικά για τις ανάγκες του συγκεκριμένου πειράματος απεικονίζεται στην Εικόνα 4.2-13.



Εικόνα 4.2-13: Φωτογραφική απεικόνιση της διάταξης ακτινοβολήσης που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα φωτολεύκανσης.

Ως πηγή ακτινοβολήσης, χρησιμοποιήθηκε η πηγή φωτός D61UV-1-0-1 που, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.2-14, αποτελείται από 51 πομπούς LED, τοποθετημένους σε κυκλική διάταξη. Τα τεχνικά χαρακτηριστικά της παρατίθενται στον Πίνακα 4.2-1.

Προκειμένου να διεξαχθούν τα πειράματα, η πηγή συνδέθηκε με τροφοδοτικό και δημιουργήθηκε η ανωτέρω διάταξη που περιλαμβάνει:

- πηγή UV ακτινοβολίας D61UV-1-0-1
- σωλήνα στήριξης,
- φιλμ διάχυσης μέσα στο σωλήνα (διαχύτης δέσμης).

Τεχνικά χαρακτηριστικά της πηγής ακτινοβολίας D61UV-1-0-1	
Σύνολο Πομπών	51
Μοντέλο:	D61UV-1-0-1
Τάση (V):	4.5
Μήκος Κύματος (wavelength):	395 – 400nm
Καθαρό Βάρος (kg):	0,192

Πίνακας 4.2-1: Τεχνικά χαρακτηριστικά κατασκευαστή της πηγής ακτινοβολίας D61UV-1-0-1.

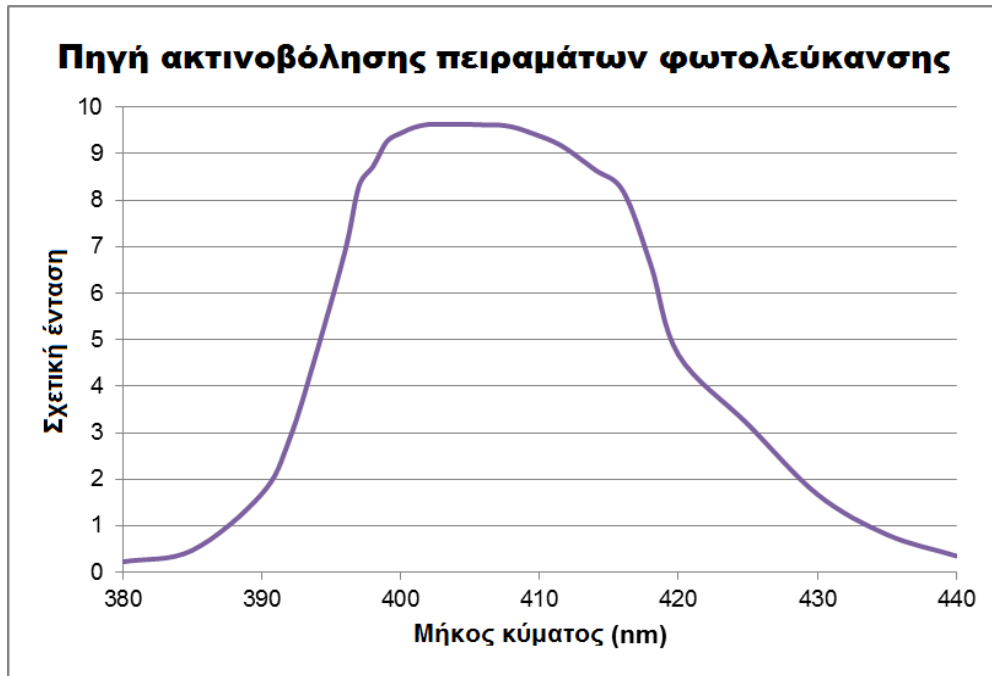


Εικόνα 4.2-14: Φωτογραφική απεικόνιση της πηγής D61UV-1-0-1.

Η διάταξη τοποθετήθηκε σε σταθερή επιφάνεια και το δείγμα σταθεροποιήθηκε σε βάση, στην ευθεία της πηγής. Η κυβέττα τοποθετήθηκε πάνω σε βάση η οποία αποτελείται από μαγνητικό αναδευτήρα που ενεργοποιεί μαγνήτη ο οποίος εισάγεται μέσα στο διάλυμα, προκειμένου να πραγματοποιείται ανάδευση του δείγματος κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης και να μην υπάρχουν καθιζήσεις των παραγόμενων φωτοπροϊόντων. Με τον τρόπο αυτό, εξασφαλίζεται ομοιογένεια στην ακτινοβολήση.

Πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων, μετρήθηκε η ένταση ακτινοβολήσης της διάταξης ως προς το μήκος κύματος. Για τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκε η πηγή, μονοχρωμάτορας, αντίσταση και πολύμετρο. Με τη βοήθεια του μονοχρωμάτορα, η προσπίπτουσα στην είσοδο του ακτινοβολία από την πηγή, αναλύεται και στην έξοδο του διαδοχικά επιλέγεται μια καθορισμένη στενή φασματική περιοχή. Η εξερχόμενη μονοχρωματική ακτινοβολία προκαλεί στη συνδεδεμένη αντίσταση την ανάπτυξη

τάσης ανάλογης με την ένταση ακτινοβολήσης και η μέτρηση αυτής της τάσης πραγματοποιήθηκε με το πολύμετρο. Το φάσμα της σχετικής έντασης ακτινοβολίας της πηγής ανά μήκος κύματος απεικονίζεται στην Εικόνα 4.2-15.



Εικόνα 4.2-15: Διάγραμμα κατανομής της ακτινοβολίας της πηγής D61UV-1-0-1 στα διάφορα μήκη κύματος.

4.2.3.2 Διάταξη ακτινοβόλησης στα πειράματα παραγωγής ελευθέρων ριζών



Εικόνα 4.2-16: Φωτογραφική απεικόνιση της πηγής Bridgelux Power LED 10W.

Η ακτινοβολήση του δείγματος για τα πειράματα παραγωγής ελευθέρων ριζών (ROS) πραγματοποιήθηκε με ειδική διάταξη η οποία δημιουργήθηκε ειδικά για τις ανάγκες του συγκεκριμένου πειράματος. Ως πηγή φωτός, χρησιμοποιήθηκε το Bridgelux Power LED 3W που απεικονίζεται στην Εικόνα 4.2-16, με τα τεχνικά χαρακτηριστικά κατασκευαστή που παρατίθενται στον Πίνακα 4.2-2.

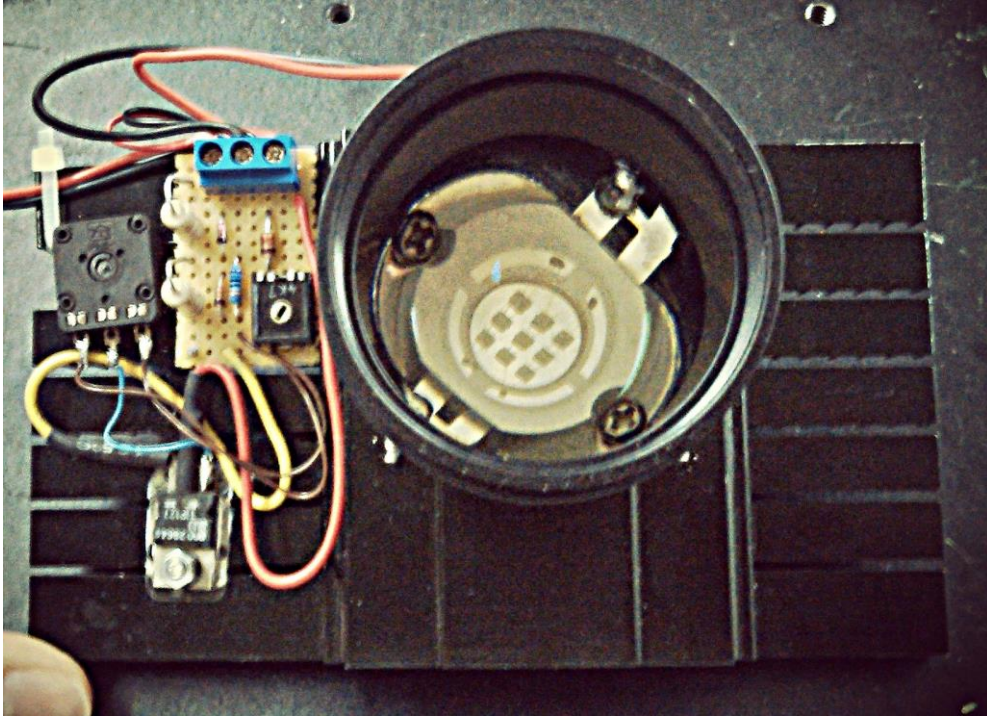
Τεχνικά χαρακτηριστικά της πηγής ακτινοβολίας Bridgelux Power LED 10W	
Θερμοκρασία Χρώματος:	Actinic Violet
Μήκος Κύματος (wavelength):	415 – 420nm
Voltage:	11V @1A
Radiant Flux:	1800 – 2000mW @1A
Μέγιστο Φορτίο:	1A (Προτεινόμενο)
Γωνία Φακού:	120 degrees
Θερμοκρασία Λειτουργίας:	-20C ~ +70C

Πίνακας 4.2-2: Τεχνικά χαρακτηριστικά κατασκευαστή της πηγής ακτινοβολίας Bridgelux Power LED 10W.

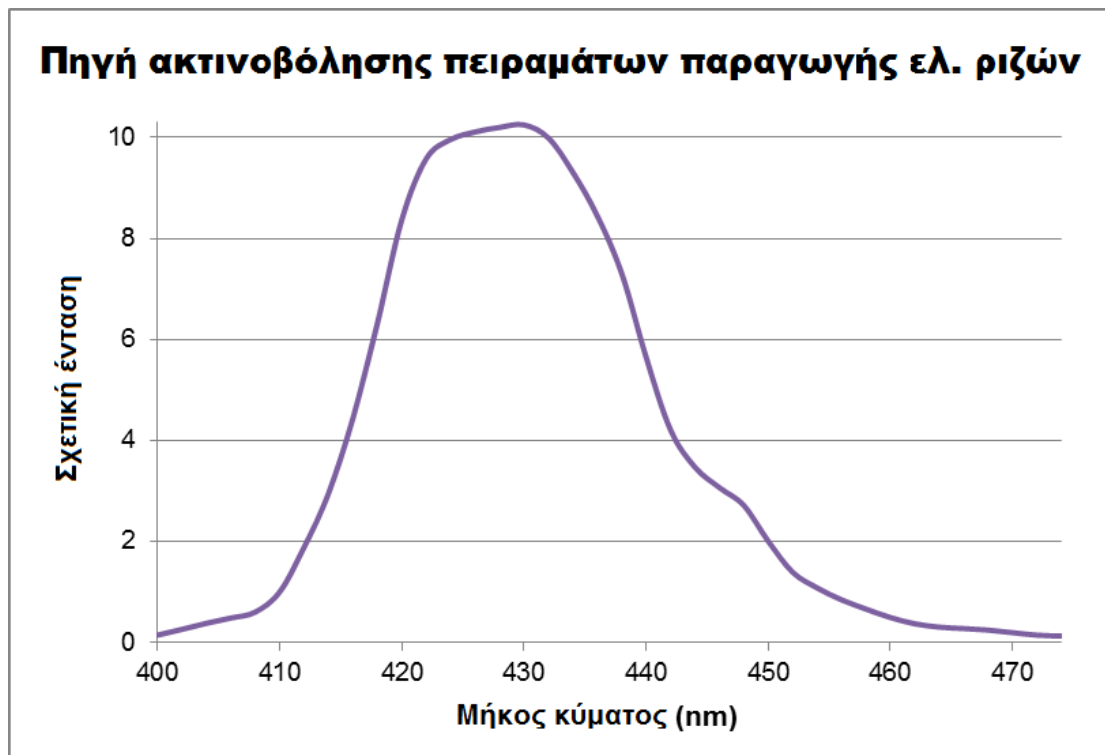
Προκειμένου να διεξαχθούν τα πειράματα ελευθέρων ριζών, η προαναφερθείσα πηγή συνδέθηκε με τροφοδοτικό και δημιουργήθηκε η διάταξη της Εικόνας 4.2-17, η οποία περιλαμβάνει:

- Πηγή Bridgelux Power LED 10W.
- Σωλήνα για τη συγκέντρωση της ακτινοβολίας στο δείγμα.
- Ποτενσιόμετρο που χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση της έντασης ακτινοβολήσης μέσω της αυξομείωσης της ισχύος.
- Βάση ψύξης με ενσωματωμένο ανεμιστήρα.

Η διάταξη τοποθετήθηκε σε σταθερή επιφάνεια και το δείγμα σταθεροποιήθηκε στην ευθεία της πηγής ακτινοβολήσης. Η κυβέττα τοποθετήθηκε πάνω σε βάση η οποία αποτελείται από μαγνητικό αναδευτήρα που ενεργοποιεί μαγνήτη ο οποίος εισάγεται μέσα στο διάλυμα, προκειμένου να πραγματοποιείται ανάδευση του δείγματος κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης και να μην υπάρχουν καθιζήσεις των παραγόμενων φωτοπροϊόντων. Με τον τρόπο αυτό, εξασφαλίζεται ομοιογένεια στην ακτινοβολήση.



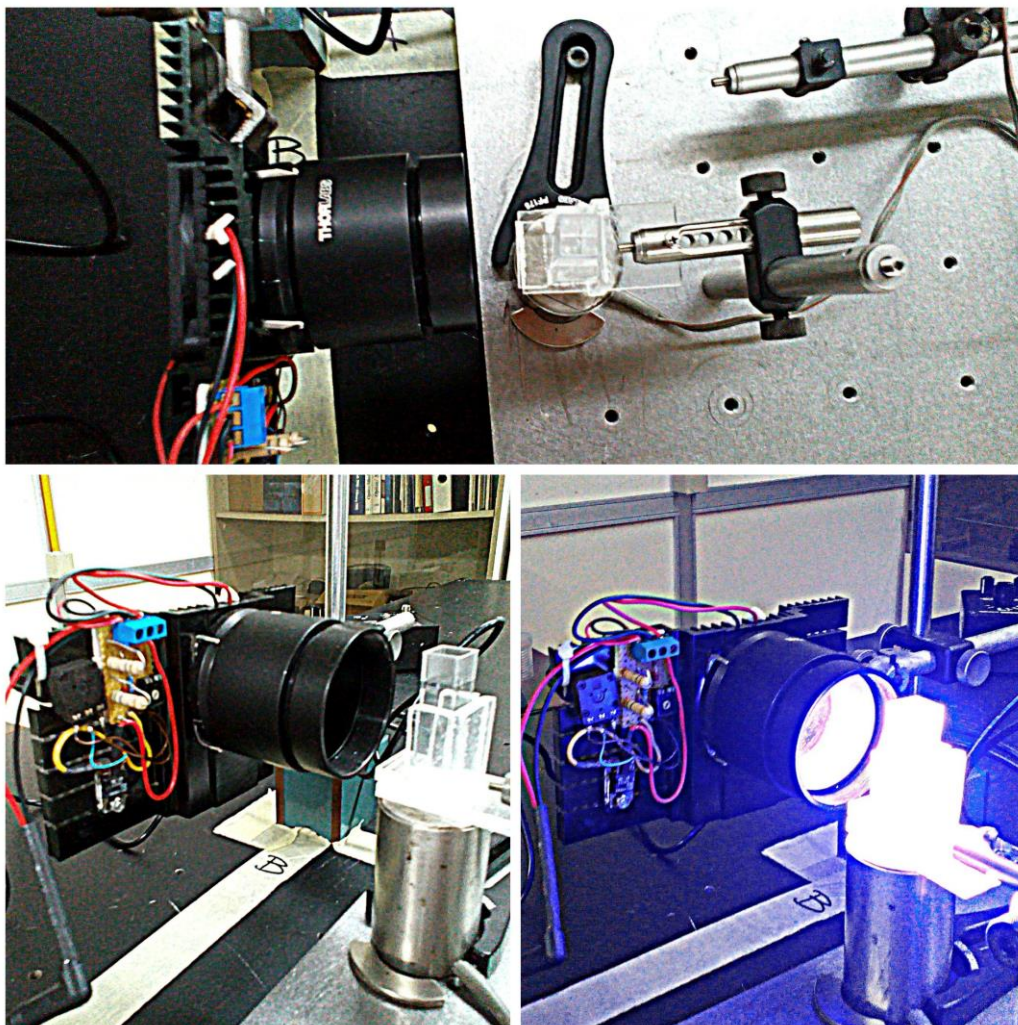
Εικόνα 4.2-17: Φωτογραφική απεικόνιση της προσαρμοσμένης διάταξη που δημιουργήθηκε για τα πειράματα παραγωγής ελευθέρων ριζών.



Εικόνα 4.2-18: Διάγραμμα κατανομής της ακτινοβολίας της πηγής Bridgelux Power LED 10W στα διάφορα μήκη κύματος.

Πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων, μετρήθηκε η ένταση ακτινοβολίας της διάταξης ως προς το μήκος κύματος. Για τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκε η πηγή, μονοχρωμάτορας, αντίσταση και πολύμετρο. Με τη βοήθεια του μονοχρωμάτορα, η προσπίπτουσα στην είσοδό του ακτινοβολία από την πηγή, αναλύεται και στην έξοδό του διαδοχικά επιλέγεται μια καθορισμένη στενή φασματική περιοχή. Η εξερχόμενη μονοχρωματική ακτινοβολία προκαλεί στη συνδεδεμένη αντίσταση την ανάπτυξη τάσης ανάλογης με την ένταση ακτινοβολίας και η μέτρηση αυτής της τάσης πραγματοποιήθηκε με το πολύμετρο. Το φάσμα της σχετικής έντασης ακτινοβολίας της πηγής ανά μήκος κύματος απεικονίζεται στην Εικόνα 4.2-18.

Στην Εικόνα 4.2-19, απεικονίζεται η διάταξη ακτινοβολίας στις πραγματικές συνθήκες εκτέλεσης της πειραματικής διαδικασίας.

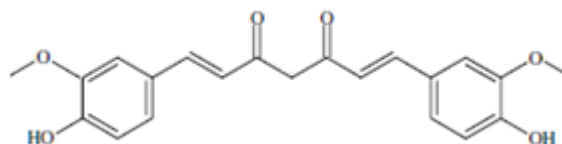


Εικόνα 4.2-19: Φωτογραφική απεικόνιση της διάταξης ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα παραγωγής ελευθέρων ριζών σε συνθήκες πραγματικής λειτουργίας.

4.3 Ουσίες

4.3.1 AX126 (Curcumin I)

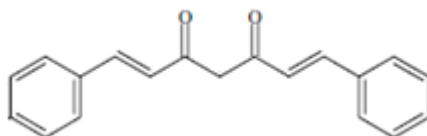
Το παράγωγο κουρκουμίνης AX126 (Curcumin I) έχει χημικό τύπο $C_{21}H_{20}O_6$ και πλήρη ονομασία 1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione. Το μοριακό βάρος της ουσίας είναι 368,38 και η χημική δομή της απεικονίζεται στην Εικόνα 4.3-1. Η AX126 είναι σκόνη με χρώμα κίτρινο – πορτοκαλί. Διατηρείται σε θερμοκρασίες 4 – 8 °C.



Εικόνα 4.3-1: Χημική δομή της κουρκουμίνης AX126 (Curcumin I).

4.3.2 AX127

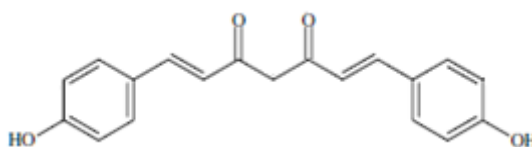
Το παράγωγο κουρκουμίνης AX127 έχει χημικό τύπο $C_{23}H_{20}O_2$ και πλήρη ονομασία (1E,3E,8E,10E)-1,11-diphenylundeca-1,3,8,10-tetraene-5,7-dione. Το μοριακό βάρος της ουσίας είναι 328,40 και η χημική δομή της απεικονίζεται στην Εικόνα 4.3-2. Η AX127 είναι σκόνη με χρώμα κίτρινο – πορτοκαλί και διατηρείται σε θερμοκρασίες 4 – 8 °C.



Εικόνα 4.3-2: Χημική δομή της κουρκουμίνης AX127.

4.3.3 AX136 (Curcumin III)

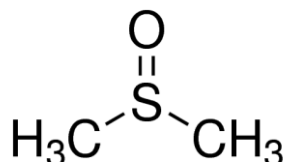
Το παράγωγο κουρκουμίνης AX136 (Curcumin III) έχει χημικό τύπο $C_{19}H_{16}O_4$ και πλήρη ονομασία 1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione. Το μοριακό βάρος της ουσίας είναι 308,33 και η χημική δομή της απεικονίζεται στην Εικόνα 4.3-3. Η AX136 είναι σκόνη με χρώμα κίτρινο – πορτοκαλί. Διατηρείται σε θερμοκρασίες 4 – 8 °C.



Εικόνα 4.3-3: Χημική δομή της κουρκουμίνης AX136 (Curcumin III).

4.3.4 DMSO

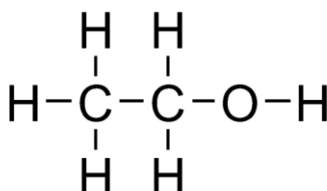
Το DMSO (Dimethyl sulfoxide), είναι άχρωμο και διατηρείται στους 20°C. Η οξείδωση του σουλφιδίου διμεθυλίου με διοξείδιο του οξυγόνου ή αζώτου δημιουργεί το DMSO^[17]. Η χημική δομή της ουσίας απεικονίζεται στην Εικόνα 4.3-4. Χρησιμοποιήσαμε το DMSO ως το βασικό διαλύτη της κουρκουμίνης σε όλα τα πειράματα.



Εικόνα 4.3-4: Χημική δομή του DMSO^[60].

4.3.5 Αιθανόλη

Η αιθανόλη, γνωστή και ως αιθυλική αλκοόλη, παράγεται από τη ζύμωση των σακχάρων. Η χημική δομή της ουσίας απεικονίζεται στην Εικόνα 4.3-5. Πρόκειται για ένα πτητικό, εύφλεκτο, άχρωμο υγρό με ελαφρά χημική οσμή, το οποίο χρησιμοποιείται ως αντισηπτικό, διαλύτης και καύσιμο. Ο συντακτικός τύπος CH₃CH₂OH, συχνά γράφεται σύντομα ως C₂H₅OH, C₂H₆O ή **EtOH**. Η αιθανόλη αναμειγνύεται με νερό και είναι ένας καλός διαλύτης γενικής χρήσης. Χρησιμοποιήσαμε την αιθανόλη ως διαλύτη της κουρκουμίνης σε πειράματα απορρόφησης με διάφορους διαλύτες.



Εικόνα 4.3-5: Χημική δομή της αιθανόλης.

4.3.6 PBS

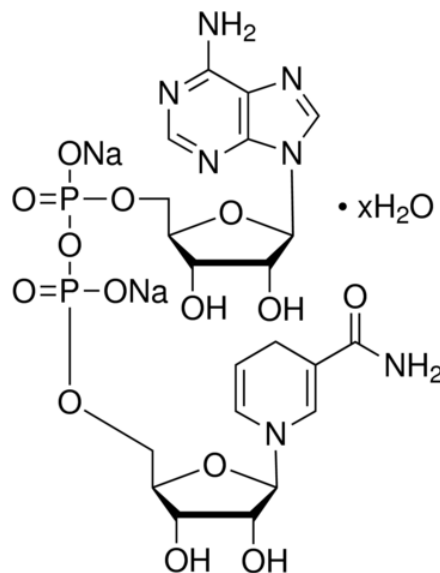
Το PBS (Phosphate Buffered Saline) είναι άχρωμο υγρό (Εικόνα 4.3-6) και διατηρείται στους 4 – 8°C. Πρόκειται για ένα ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διατηρήσει τις καλλιέργειες κυττάρων στο φυσιολογικό εύρος pH (7,0 – 7,6)^[17]. Το PBS χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης της κουρκουμίνης σε πειράματα απορρόφησης με διάφορους διαλύτες.



Εικόνα 4.3-6: Phosphate Buffered Saline ^[61].

4.3.7 NADH

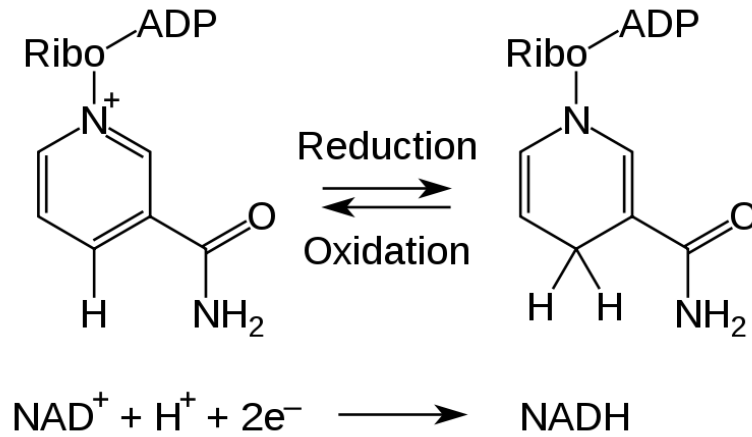
Το NADH είναι ένα συνένζυμο απαραίτητο για την καταλυτική αντίδραση ορισμένων ενζύμων. Η χημική δομή του NADH απεικονίζεται στην Εικόνα 4.3-7.



Εικόνα 4.3-7: Χημική δομή της ουσίας NADH ^[62].

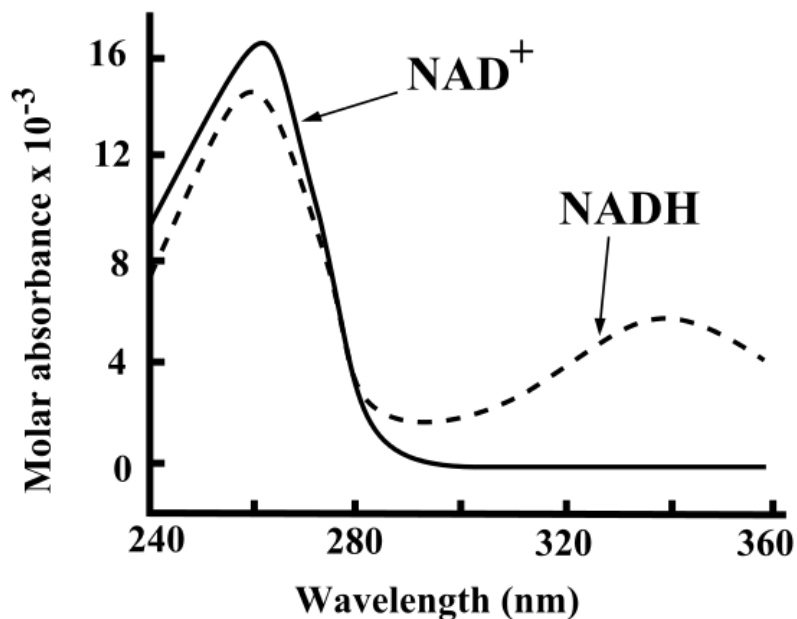
Το NAD⁺ είναι ένας φορέας ιόντων υδριδίων, που σχηματίζει NADH. Το ιόν υδριδίου απομακρύνεται ενζυματικά από ένα μόριο υποστρώματος λόγω της δράσης του αφυδρογονασών. Αυτά τα ένζυμα καταλύουν την αντιστρεπτή μεταφορά ενός ιόντος υδριδίου από την αφυδρογονάσα προς το NAD⁺, σχηματίζοντας έτσι το NADH ^[65]. Η

αντίθετη διαδικασία πραγματοποιείται με την οξείδωση του NADH που προκαλεί σχηματισμό NAD+. Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί, για παράδειγμα, αν το NADH βρεθεί σε περιβάλλον ελευθέρων ριζών. Στην Εικόνα 4.3-8, παρατίθεται αναπαράσταση της διαδικασίας σχηματισμού NADH από NAD+ και αντίστροφα.



Εικόνα 4.3-8: Σχηματισμός NADH από NAD+ και αντίστροφα [63].

Σε αντίθεση με το NAD+, το οποίο δεν παρουσιάζει καμία απορρόφηση στα 340 nm, το NADH απορροφά στα 340 nm, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.3-9. Η αύξηση της απορρόφησης (με το σχηματισμό του NADH) ή της μείωσης της απορρόφησης (με τον σχηματισμό NAD+) στα 340 nm είναι η βάση για τη μέτρηση της δραστηριότητας πολλών ουσιών [65].



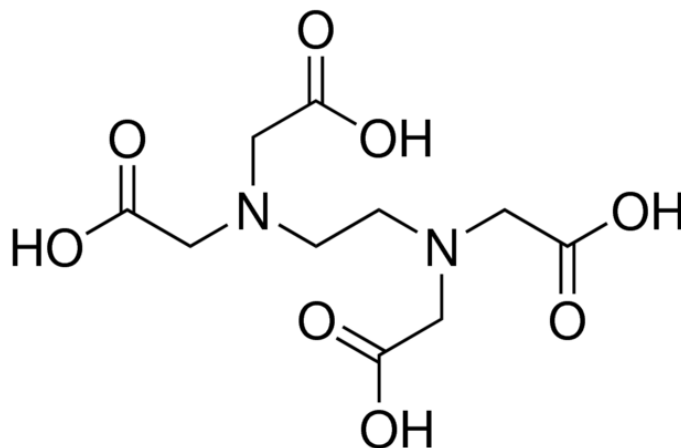
Εικόνα 4.3-9: Διάγραμμα απορρόφησης NADH και NAD+ [64].

Επίσης, δείκτη αποτελεί και η απορρόφηση στα 260 nm καθώς παρατηρείται ότι η κορυφή του NAD⁺ μειώνεται (με το σχηματισμό του NADH) ενώ η αυξάνεται (κατά τον σχηματισμό NAD⁺ από NADH). Το NADH χρησιμοποιήθηκε στα διαλύματα κουρκουμίνης που ακτινοβολήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ανίχνευσης ελευθέρων ριζών (ROS).

4.3.8 EDTA

Το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, ευρέως γνωστό ως EDTA, είναι ένα αμινοπολυκαρβοξυλικό οξύ με χημικό τύπο C₁₀H₁₆N₂O₈. Πρόκειται για ένα άχρωμο κρυσταλλικό στερεό, ελαφρώς διαλυτό στο νερό. Χρησιμοποιείται ευρέως για να διαλύσει τα άλατα. Η χημική δομή της ουσίας απεικονίζεται στην Εικόνα 4.3-10.

Η χρησιμότητα του EDTA προκύπτει λόγω του ρόλου του ως εξασδοντική συνδέτη και χηλικού παράγοντα, δηλαδή την ικανότητά του να "αποσπά" μεταλλικά ιόντα όπως Ca²⁺ και Fe³⁺. Εφόσον δεσμευτούν από το EDTA, τα μεταλλικά ιόντα παραμένουν στο διάλυμα, αλλά παρουσιάζουν μειωμένη αντιδραστικότητα ^[66].



Εικόνα 4.3-10: Χημική δομή της ουσίας EDTA ^[66].

Το EDTA χρησιμοποιήθηκε συμπληρωματικά μαζί με το NADH στα διαλύματα κουρκουμίνης που ακτινοβολήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ανίχνευσης ελευθέρων ριζών (ROS).

4.4 Πειραματικές μέθοδοι

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μέθοδοι. Σε αυτό το κεφάλαιο θα γίνει η αναλυτική περιγραφή τους.

4.4.1 Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης των παραγώγων κουρκουμίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις

Η κουρκουμίνη βρίσκεται σε μορφή σκόνης και διαλύεται σε DMSO προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις απορρόφησης. Αρχικά, σχηματίζεται το μητρικό διάλυμα, το οποίο αραιώνεται περαιτέρω ανάλογα με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις που θα μελετηθούν. Στον Πίνακα 4.4-1 παρατίθενται συνοπτικά πληροφορίες σχετικά με την παρασκευή των διαλυμάτων όγκου 3 ml για τη μέτρηση απορρόφησης ανά συγκέντρωση για όλες τις ουσίες.

Ουσία	Μοριακό Βάρος	Συγκέντρωση μητρικού διαλύματος
AX126 (Curcumin I)	368,38	$1,04 \cdot 10^{-3}$ M
AX127	328,40	$2,59 \cdot 10^{-3}$ M
AX136 (Curcumin III)	308,33	$2,27 \cdot 10^{-3}$ M

Πίνακας 4.4-1: Παρασκευή διαλυμάτων για μετρήσεις απορρόφησης ανά συγκέντρωση.

Για όλες τις κουρκουμίνες ελήφθησαν μετρήσεις απορρόφησης σε συγκεντρώσεις $2 \cdot 10^{-5}$ M, 10^{-5} M, $5 \cdot 10^{-6}$ M, 10^{-6} M και $5 \cdot 10^{-7}$ M σε DMSO. Οι μετρήσεις έγιναν σε μικρό χρονικό διάστημα από την παρασκευή των διαλυμάτων και μετά τη λήψη τους, τα διαλύματα πετάχτηκαν.

Οι μελέτες απορρόφησης πραγματοποιήθηκαν με χρήση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin – Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer (Ενότητα 4.2.1).

4.4.2 Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης των παραγώγων κουρκουμίνης σε διάφορους διαλύτες

Η κουρκουμίνη βρίσκεται σε μορφή σκόνης και διαλύεται σε διάφορους διαλύτες προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι συγκριτικές μετρήσεις απορρόφησης. Αρχικά, σχηματίζεται το μητρικό διάλυμα σε DMSO, το οποίο αραιώνεται περαιτέρω σε διάφορους διαλύτες στην επιθυμητή συγκέντρωση προς μελέτη.

Για όλες τις κουρκουμίνες ελήφθησαν συγκριτικές μετρήσεις απορρόφησης διαλυμάτων σε DMSO, αιθανόλη και PBS με σταθερή συγκέντρωση $C = 10^{-5}$ M. Τα διαλύματα όγκου 3 ml παρασκευάστηκαν εξ' αρχής, οι μετρήσεις έγιναν σε σύντομο χρονικό διάστημα από την παρασκευή και μετά την ολοκλήρωσή τους, τα διαλύματα πετάχτηκαν.

Στον Πίνακα 4.4-2 παρατίθενται συνοπτικά πληροφορίες σχετικά με την παρασκευή των διαλυμάτων μέτρησης απορρόφησης ανά διαλύτη.

Ουσία	Μοριακό Βάρος	Συγκέντρωση μητρικού διαλύματος	Τελική συγκέντρωση
AX126 (Curcumin I)	368,38	$1,7 \cdot 10^{-3}$ M	10^{-5} M
AX127	328,40	$1,62 \cdot 10^{-3}$ M	10^{-5} M
AX136 (Curcumin III)	308,33	$1,62 \cdot 10^{-3}$ M	10^{-5} M

Πίνακας 4.4-2: Παρασκευή διαλυμάτων για μετρήσεις απορρόφησης ανά διαλύτη.

Οι μελέτες απορρόφησης πραγματοποιήθηκαν με χρήση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin – Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer (Ενότητα 4.2.1).

4.4.3 Φασματοσκοπικές μελέτες φθορισμού των παραγώγων κουρκουμίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις

Η κουρκουμίνη βρίσκεται σε μορφή σκόνης και διαλύεται σε DMSO προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις φθορισμού. Αρχικά, σχηματίζεται το μητρικό διάλυμα, το οποίο αραιώνεται περαιτέρω ανάλογα με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις που θα μελετηθούν σε τελικό όγκο 3 ml. Στον Πίνακα 4.4-3 παρατίθενται συνοπτικά πληροφορίες σχετικά με την προετοιμασία των διαλυμάτων μέτρησης φθορισμού ανά συγκέντρωση για όλες τις ουσίες.

Ουσία	Μοριακό Βάρος	Συγκέντρωση μητρικού διαλύματος	Μήκος κύματος διέγερσης	
AX126 (Curcumin I)	368,38	$1,04 \cdot 10^{-3}$ M	405 nm	435 nm
AX127	328,40	$2,59 \cdot 10^{-3}$ M	405 nm	435 nm
AX136 (Curcumin III)	308,33	$2,27 \cdot 10^{-3}$ M	405 nm	425 nm

Πίνακας 4.4-3: Προετοιμασία διαλυμάτων για μετρήσεις φθορισμού ανά συγκέντρωση.

Για όλες τις κουρκουμίνες ελήφθησαν μετρήσεις απορρόφησης σε συγκεντρώσεις $5 \cdot 10^{-7}$ M, 10^{-7} M, $5 \cdot 10^{-8}$ M και 10^{-8} M σε DMSO. Τα διαλύματα διεγέρθηκαν στο μέγιστο της απορρόφησής τους και στα 405 nm όπου παρατηρήθηκε το μέγιστο της

πηγής ακτινοβολίας D61UV-1-0-1 (Εικόνα 4.2-15). Οι μετρήσεις έγιναν σε μικρό χρονικό διάστημα από την παρασκευή των διαλυμάτων και μετά τη λήψη τους, τα διαλύματα πετάχτηκαν.

Οι μελέτες φθορισμού πραγματοποιήθηκαν με χρήση του φασματοφωτόμετρου φθορισμού Perkin – Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer (Ενότητα 4.2.2).

4.4.4 Φασματοσκοπικές μελέτες φωτολεύκανσης των παραγώγων κουρκουμίνης

Τα πειράματα φωτολεύκανσης διακρίνονται σε δυο σειρές:

- Φωτολεύκανση απορρόφησης: μέτρηση της εξέλιξης του φάσματος απορρόφησης της ουσίας μετά από ακτινοβολήση.
- Φωτολεύκανση φθορισμού: μέτρηση της εξέλιξης του φάσματος φθορισμού της ουσίας μετά από ακτινοβολήση.

4.4.4.1 Μελέτες φωτολεύκανσης με μετρήσεις απορρόφησης

Η κουρκουμίνη βρίσκεται σε μορφή σκόνης και διαλύεται σε DMSO προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις της φωτολεύκανσης απορρόφησης. Αρχικά, σχηματίζεται το μητρικό διάλυμα, το οποίο αραιώνεται περαιτέρω σε DMSO στην επιθυμητή συγκέντρωση προς μελέτη, η οποία είναι $C = 10^{-5} \text{ M}$ για όλες τις κουρκουμίνες.

Στον Πίνακα 4.4-4 παρατίθενται συνοπτικά πληροφορίες σχετικά με την παρασκευή των διαλυμάτων μέτρησης φωτολεύκανσης απορρόφησης για όλες τις ουσίες.

Ουσία	Μοριακό Βάρος	Συγκέντρωση μητρικού διαλύματος	Τελική συγκέντρωση
AX126 (Curcumin I)	368,38	$1,04 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	10^{-5} M
AX127	328,40	$2,59 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	10^{-5} M
AX136 (Curcumin III)	308,33	$2,27 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	10^{-5} M

Πίνακας 4.4-4: Παρασκευή διαλυμάτων για μετρήσεις φωτολεύκανσης απορρόφησης.

Στη συνέχεια, το δείγμα όγκου 3 ml ακτινοβολείται με τη διάταξη της Εικόνας 4.2-13 και λαμβάνονται φάσματα απορρόφησης ανά λεπτό ακτινοβολίας για διάστημα 0 min – 10 min και ανά 5 λεπτά ακτινοβολίας για το διάστημα 10 min – 30 min. Η ισχύς της ακτινοβολίας είναι $12,41 \text{ mW/cm}^2$.

Οι μετρήσεις έγιναν σε μικρό χρονικό διάστημα από την παρασκευή των διαλυμάτων και μετά τη λήψη τους, τα διαλύματα πετάχτηκαν. Οι μελέτες φωτολεύκανσης

απορρόφησης πραγματοποιήθηκαν με χρήση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin – Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer (Ενότητα 4.2.1).

4.4.4.2 Μελέτες φωτολεύκανσης με μετρήσεις φθορισμού

Τα παράγωγα της κουρκουμίνης βρίσκονται σε μορφή σκόνης και διαλύονται σε DMSO προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις φωτολεύκανσης φθορισμού. Αρχικά, σχηματίζεται το μητρικό διάλυμα, το οποίο αραιώνεται περαιτέρω σε DMSO στην επιθυμητή συγκέντρωση. Μελετάμε $C = 2 \cdot 10^{-7}$ M για τις κουρκουμίνες AX127 και AX136 ενώ η AX126 παρουσιάζει πολύ χαμηλή απορρόφηση στην εν λόγω συγκέντρωση οπότε μελετάμε τη φωτολεύκανση φθορισμού για $C = 5 \cdot 10^{-7}$ M.

Στη συνέχεια, το δείγμα όγκου 3 ml ακτινοβολείται από την πηγή D61UV-1-0-1 με τη διάταξη της Εικόνας 4.2-13 και λαμβάνονται φάσματα φθορισμού ανά λεπτό ακτινοβολίας για διάστημα 0 min – 10 min και ανά 5 λεπτά ακτινοβολίας για το διάστημα 10 min – 30 min. Η ισχύς της ακτινοβολίας είναι $12,41 \text{ mW/cm}^2$. Για τη λήψη των φασμάτων φθορισμού, τα διαλύματα διεγέρθηκαν στο μέγιστο της απορρόφησής τους.

Στον Πίνακα 4.4-5 παρατίθενται συνοπτικά πληροφορίες σχετικά με την παρασκευή των διαλυμάτων μέτρησης φωτολεύκανσης φθορισμού για όλες τις ουσίες.

Ουσία	Μοριακό Βάρος	Συγκέντρωση μητρικού διαλύματος	Τελική συγκέντρωση	Διέγερση
AX126 (Curcumin I)	368,38	$1,04 \cdot 10^{-3}$ M	$5 \cdot 10^{-7}$ M	435 nm
AX127	328,40	$2,59 \cdot 10^{-3}$ M	$2 \cdot 10^{-7}$ M	435 nm
AX136 (Curcumin III)	308,33	$2,27 \cdot 10^{-3}$ M	$2 \cdot 10^{-7}$ M	425 nm

Πίνακας 4.4-5: Προετοιμασία διαλυμάτων για μετρήσεις φωτολεύκανσης φθορισμού.

Οι μετρήσεις έγιναν σε μικρό χρονικό διάστημα από την παρασκευή των διαλυμάτων και μετά τη λήψη τους, τα διαλύματα πετάχτηκαν. Οι μελέτες φωτολεύκανσης φθορισμού πραγματοποιήθηκαν με χρήση του φασματοφωτόμετρου φθορισμού Perkin – Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer (Ενότητα 4.2.2).

4.4.5 Μελέτη της ικανότητας των παραγώγων κουρκουμίνης για παραγωγή ελευθέρων ριζών

4.4.5.1 Οι ελεύθερες ρίζες

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί, με εξαίρεση τους αναερόβιους μικροοργανισμούς, έχουν ανάγκη το οξυγόνο για τη διατήρηση της ζωής. 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 ^{[19], [67]}.

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 ^{[19], [67]}.

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 ^{[19], [67]}.

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. 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 ^{[19], [67]}.

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 ^{[19], [67]}.

4.4.5.2 Παράγωγα κουρκουμίνης και ελεύθερες ρίζες

Τα παράγωγα κουρκουμίνης βρίσκονται σε μορφή σκόνης και διαλύονται προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών. Αρχικά, σχηματίζεται το μητρικό διάλυμα σε DMSO, και στη συνέχεια παρασκευάζεται το διάλυμα προς ακτινοβολήση το οποίο επιπλέον περιλαμβάνει NADH και EDTA. Η επιθυμητή συγκέντρωση του τελικού διαλύματος σε κουρκουμίνη είναι $C = 10^{-5}$ M για όλες τις κουρκουμίνες.

Το τελικό διάλυμα προς ακτινοβολήση έχει όγκο 3 ml και περιλαμβάνει:

- Φωτοευαίσθητοποιητή (AX126, AX127 ή AX136) σε συγκέντρωση 10^{-5} M.

- NADH σε συγκέντρωση 100 μM .
- EDTA σε συγκέντρωση 0,1 mM.

Στον Πίνακα 4.4-6 παρατίθενται συνοπτικά πληροφορίες σχετικά με την παρασκευή των διαλυμάτων μελέτης ελευθέρων ριζών για όλες τις ουσίες.

Ουσία	Μοριακό Βάρος	Συγκέντρωση μητρικού διαλύματος	Τελική συγκέντρωση
AX126 (Curcumin I)	368,38	$1,7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	10^{-5} M
AX127	328,40	$1,62 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	10^{-5} M
AX136 (Curcumin III)	308,33	$1,62 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	10^{-5} M

Πίνακας 4.4-6: Προετοιμασία διαλυμάτων για μετρήσεις παραγωγής ROS.

Στη συνέχεια, το δείγμα ακτινοβολείται στη διάταξη της Εικόνας 4.2-19 και λαμβάνονται φάσματα απορρόφησης ανά λεπτό ακτινοβολίας για διάστημα 0 min – 20 min. Η ισχύς της ακτινοβολίας είναι $4,65 \text{ mW/cm}^2$.

Οι μετρήσεις ελήφθησαν σε σύντομο χρονικό διάστημα από την παρασκευή των διαλυμάτων και μετά τη λήψη τους, τα διαλύματα πετάχτηκαν. Οι μελέτες παραγωγής ελευθέρων ριζών πραγματοποιήθηκαν με χρήση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin – Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer (Ενότητα 4.2.1).

Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα



5.1 Υπολογισμός καμπυλών συγκέντρωσης – απορρόφησης των παραγώγων κουρκουμίνης

5.1.1 Διαδικασία

Οι καμπύλες συγκέντρωσης – απορρόφησης συσχετίζουν τη συγκέντρωση του διαλύματος σε κουρκουμίνη με την παρατηρούμενη ένταση της απορρόφησης του.

Τα φάσματα απορρόφησης καταγράφηκαν με τη φασματοφωτομετρική διάταξη μέτρησης απορρόφησης που περιγράφηκε στην Ενότητα 4.2.1. 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 νέας ουσίας προηγείται ο μηδενισμός του σήματος για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω της απορρόφησης του DMSO 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 σε όλες τις μετρήσεις στα 480 nm/min.

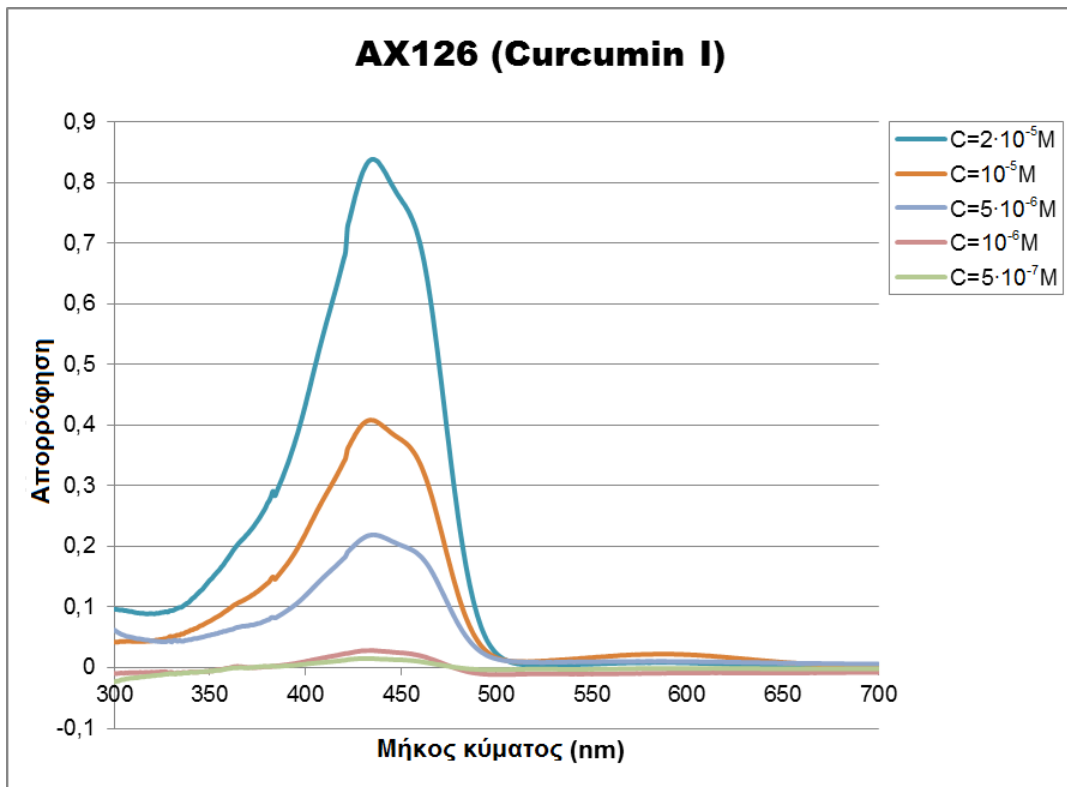
Η διαδικασία ολοκληρωνόταν βάσει των εξής βημάτων:

1. Τοποθετείτο στο φασματοφωτόμετρο ζεύγος κυβεττών με όμοιο περιεχόμενο, τον διαλύτη DMSO, προκειμένου να καταγραφεί το σήμα λόγω της απορρόφησης του αλλά και του θορύβου του οργάνου.
2. 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.
3. 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 ώστε να ληφθεί το φάσμα απορρόφησης κάθε διαλύματος.

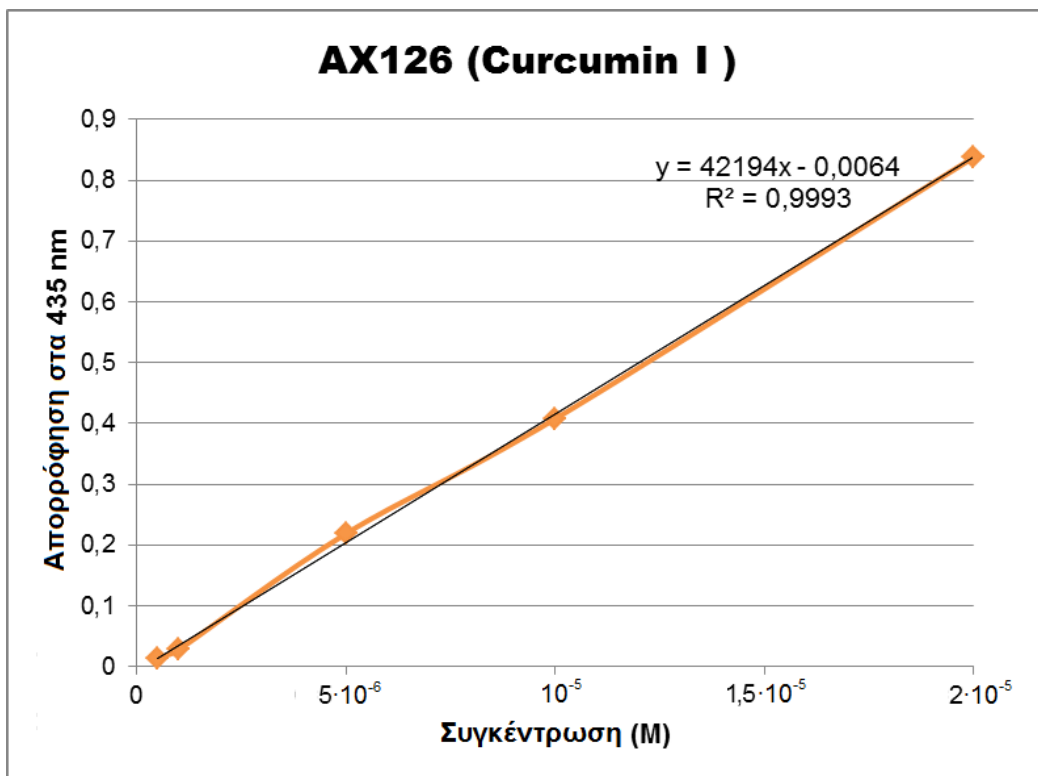
Στις Εικόνες 5.1-1, 5.1-3 και 5.1-5 παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης κάθε ουσίας για τις χρησιμοποιούμενες τιμές της συγκέντρωσης σε φάσμα 300 – 700 nm, ενώ στις Εικόνες 5.1-2, 5.1-4 και 5.1-6 απεικονίζονται οι καμπύλες μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης ως προς τη συγκέντρωση της αντίστοιχης κουρκουμίνης.

Τα φάσματα απορρόφησης χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό των συγκεντρώσεων στα επόμενα πειράματα (φωτολεύκανση, μελέτη παραγωγής ελευθέρων ριζών) ενώ η μεταβολή της απορρόφησης ως προς τη συγκέντρωση, χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την ισχύ του νόμου Lambert – Beer για το συγκεκριμένο φωτοευαίσθητοποιητή.

5.1.2 Μελέτη απορρόφησης της ουσίας AX126 (Curcumin I)

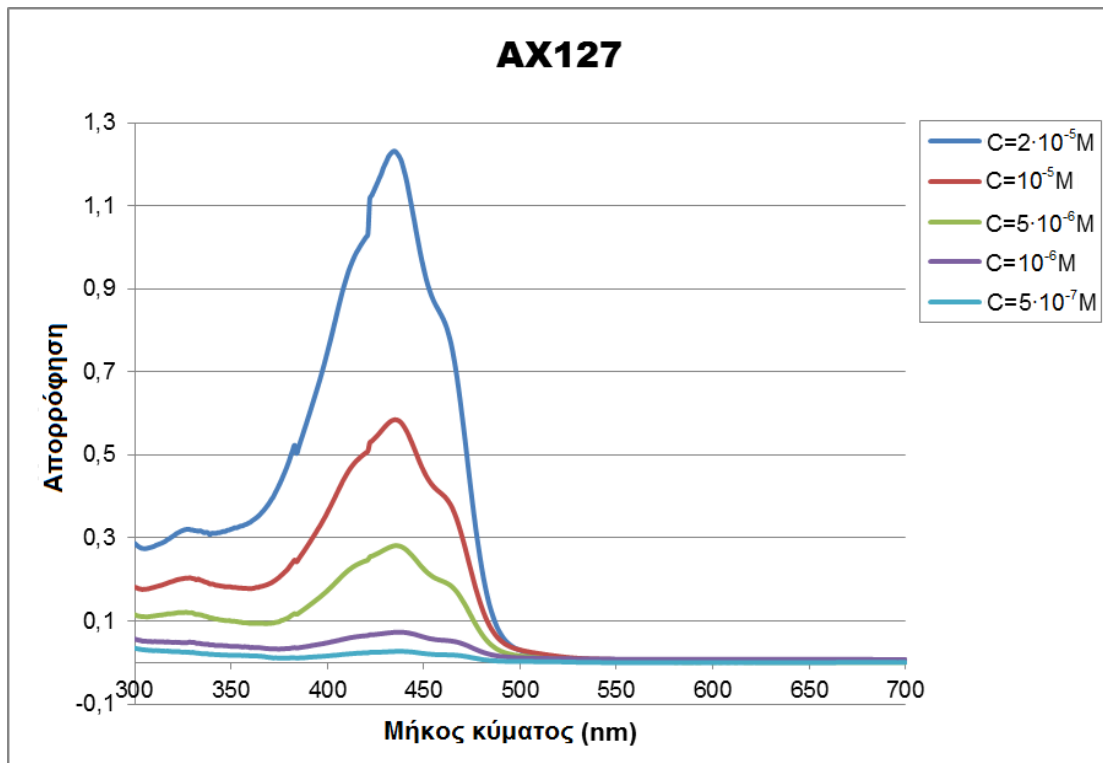


Εικόνα 5.1-1: Φάσματα απορρόφησης της AX126 σε μήκη κύματος 300 – 700 nm, και συγκεντρώσεις 20 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM και 0,5 μM .

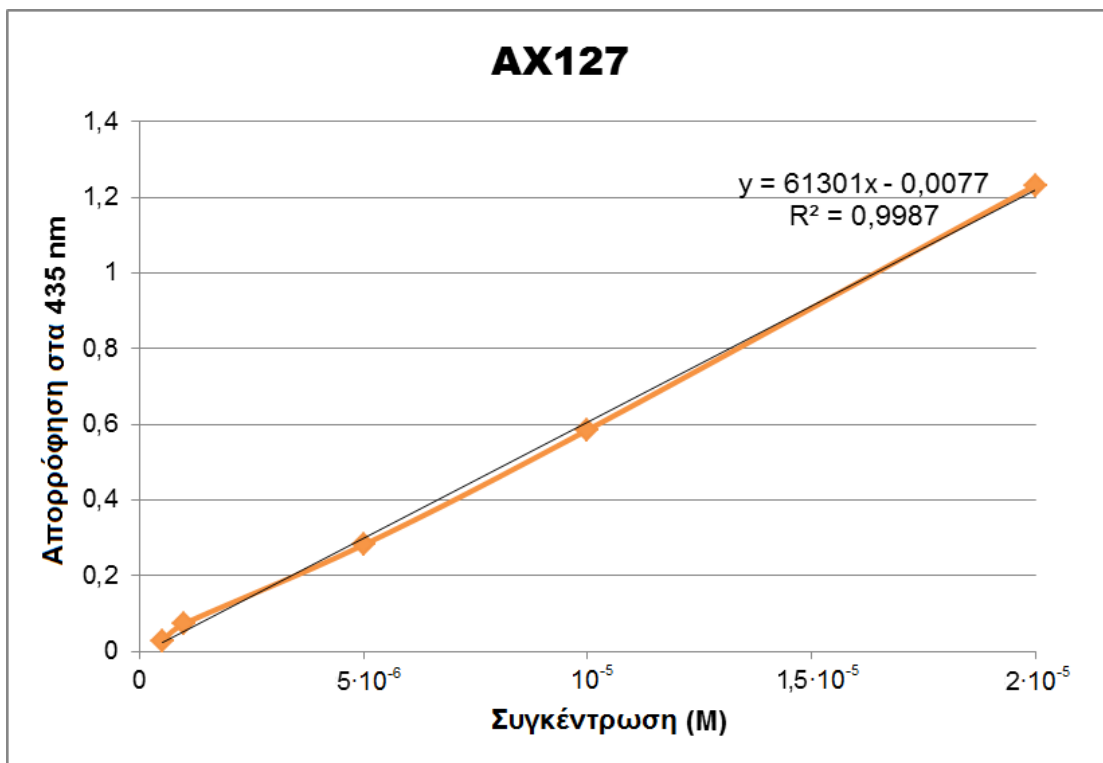


Εικόνα 5.1-2: Καμπύλη μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης ανά συγκέντρωση της AX126.

5.1.3 Μελέτη απορρόφησης της ουσίας AX127

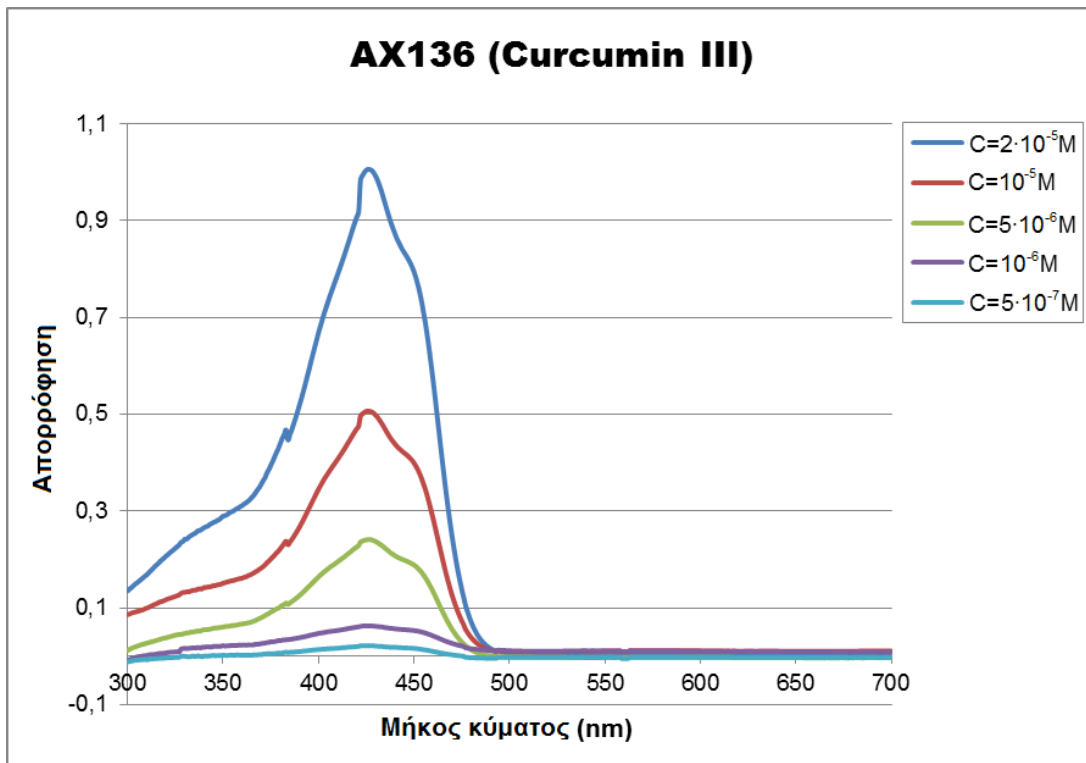


Εικόνα 5.1-3: Φάσματα απορρόφησης της AX127 σε μήκη κύματος 300 – 700 nm, και συγκεντρώσεις 20 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM και 0,5 μM .

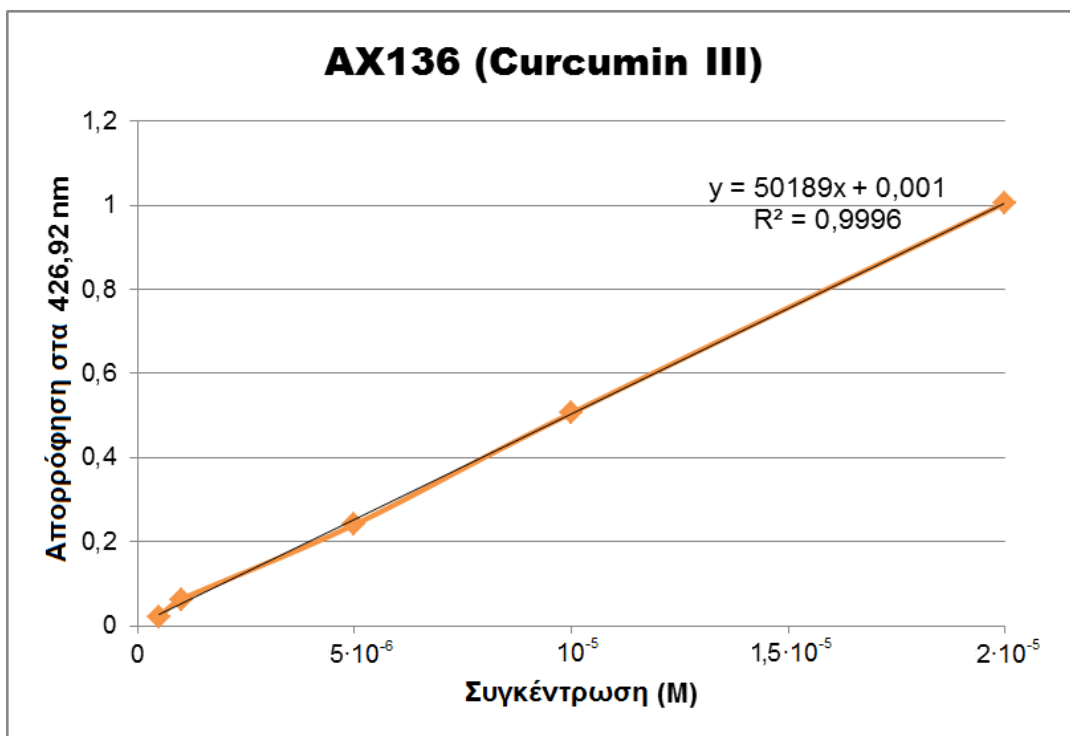


Εικόνα 5.1-4: Καμπύλη μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης ανά συγκέντρωση της ουσίας AX127.

5.1.4 Μελέτη απορρόφησης της ουσίας AX136 (Curcumin III)



Εικόνα 5.1-5: Φάσματα απορρόφησης της AX136 σε μήκη κύματος 300 – 700 nm, και συγκεντρώσεις 20 μM, 10 μM, 5 μM, 1μM και 0,5 μM.



Εικόνα 5.1-6: Καμπύλη μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης ανά συγκέντρωση της ουσίας AX136.

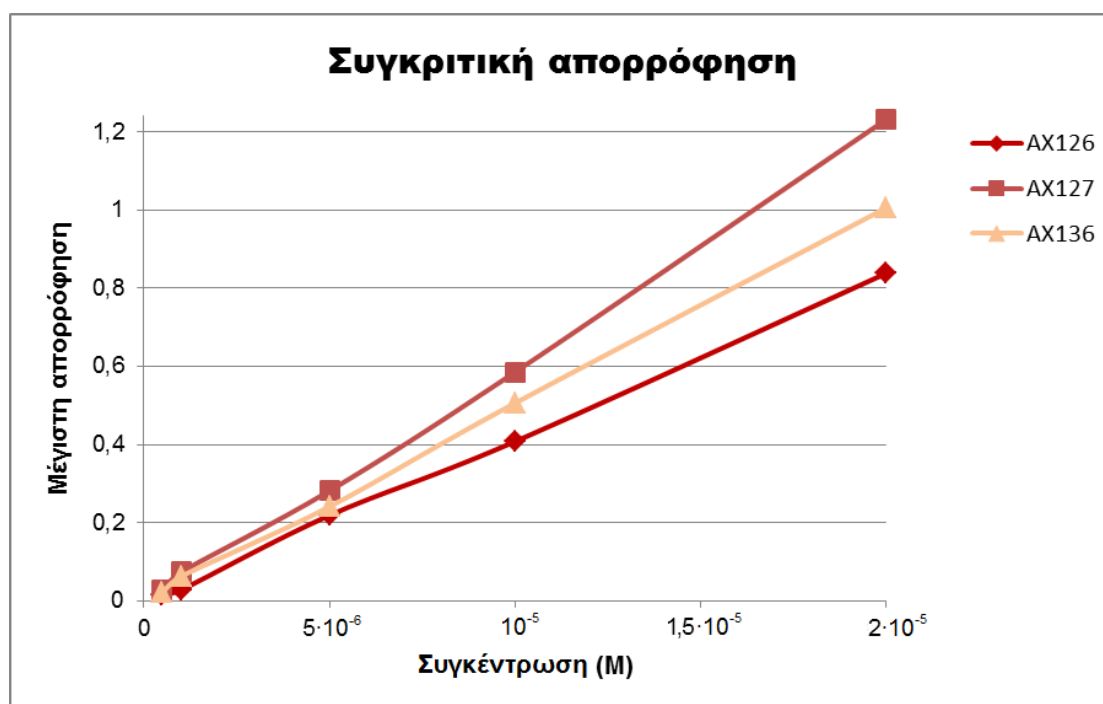
5.1.5 Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα, όπως απεικονίζονται στα διαγράμματα των Εικόνων 5.1-2, 5.1-4 και 5.1-6, οι καμπύλες απορρόφησης – συγκέντρωσης για τις τρεις κουρκουμίνες χαρακτηρίζονται από τις παρακάτω εξισώσεις:

- **AX126 (Curcumin I):** $y = 42194x + 0,0064$ με $R^2 = 0,9993$,
- **AX127:** $y = 61301x + 0,0077$ με $R^2 = 0,9987$,
- **AX136 (Curcumin III):** $y = 50189x + 0,001$ με $R^2 = 0,9996$,

όπου y το σήμα απορρόφησης που προκύπτει από τα μετρούμενα δείγματα και x η συγκέντρωσή τους.

Παρατηρούμε ότι και στις τρεις υπο εξέταση ουσίες, η απορρόφηση μεταβάλλεται γραμμικά ως προς τη συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας (Εικόνα 5.1-7). Κατά συνέπεια, ικανοποιούνται πλήρως οι προϋποθέσεις για την ισχύ του νόμου Lambert – Beer.



Εικόνα 5.1-7: Συγκριτικές καμπύλες μεταβολής της απορρόφησης ανά συγκέντρωση για όλες τις κουρκουμίνες.

Για τα τρία παράγωγα κουρκουμινών τα οποία μελετήθηκαν, παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.1-1 το μήκος κύματος μέγιστης παρατηρούμενης απορρόφησης καθώς και ο αντίστοιχος μοριακός συντελεστής απορρόφησης, ϵ , στις μελετώμενες συγκεντρώσεις σε DMSO.

	AX126 (Curcumin I)		AX127		AX136 (Curcumin III)	
C (M)	λ_{max} (nm)	ϵ ($cm^{-1} M^{-1}$)	λ_{max} (nm)	ϵ ($cm^{-1} M^{-1}$)	λ_{max} (nm)	ϵ ($cm^{-1} M^{-1}$)
$2 \cdot 10^{-5}$	435	42194	435	61301	426	50189
10^{-5}	434		435		426	
$5 \cdot 10^{-6}$	435		436		427	
10^{-6}	434		438		427	
$5 \cdot 10^{-7}$	430		435		425	

Πίνακας 5.1-1: Μέγιστα απορρόφησης AX126, AX127 και AX136 σε DMSO και οι αντίστοιχοι μοριακοί συντελεστές απορρόφησης σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης κάθε ουσίας υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τα πειραματικά δεδομένα όσον αφορά τις καμπύλες μεταβολής της απορρόφησης ανά συγκέντρωση για όλες τις κουρκουμίνες (Εικόνα 5.1-7).

Σε διαλύτη DMSO και οι τρεις κουρκουμίνες διατηρούν τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματός τους (τουλάχιστον για τις συγκεντρώσεις μεταξύ 1 μ M – 20 μ M) αν και παρατηρείται πολύ ελαφριά μετατόπιση της κορυφής τους κατά +/- 2 nm.

Συγκρίνοντας τις τρεις ουσίες, μπορούμε να πούμε με σχετική ασφάλεια ότι, για δεδομένο εύρος συγκέντρωσης, το παράγωγο της κουρκουμίνης AX127 είναι αυτό που εμφανίζει πιο έντονη απορρόφηση ενώ η AX126 (Curcumin I) την πιο χαμηλή. Αυτό το συμπέρασμα είναι ιδιαίτερα σημαντικό γιατί η συμπεριφορά των ουσιών κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία καθορίζεται κατά πολύ από την ικανότητα απορρόφησης που παρουσιάζουν.

5.2 Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης των παραγώγων κουρκουμίνης σε διάφορους διαλύτες

5.2.1 Διαδικασία

Στο επόμενο στάδιο των φωτοφυσικών μελετών καταγράφηκαν τα φάσματα απορρόφησης των κουρκουμινών (AX126, AX127 και AX136) σε οργανικούς διαλύτες όπως το δι-μεθυλ-σουλφοξειδίο (dimethyl sulfoxide, DMSO) και η αιθανόλη (ethanol, EtOH) αλλά και ανόργανους, όπως το PBS. Τα φάσματα απορρόφησης σε διαφορετικούς διαλύτες καταγράφηκαν με τη φασματοφωτομετρική διάταξη μέτρησης απορρόφησης που περιγράφηκε στην Ενότητα 4.2.1.

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.

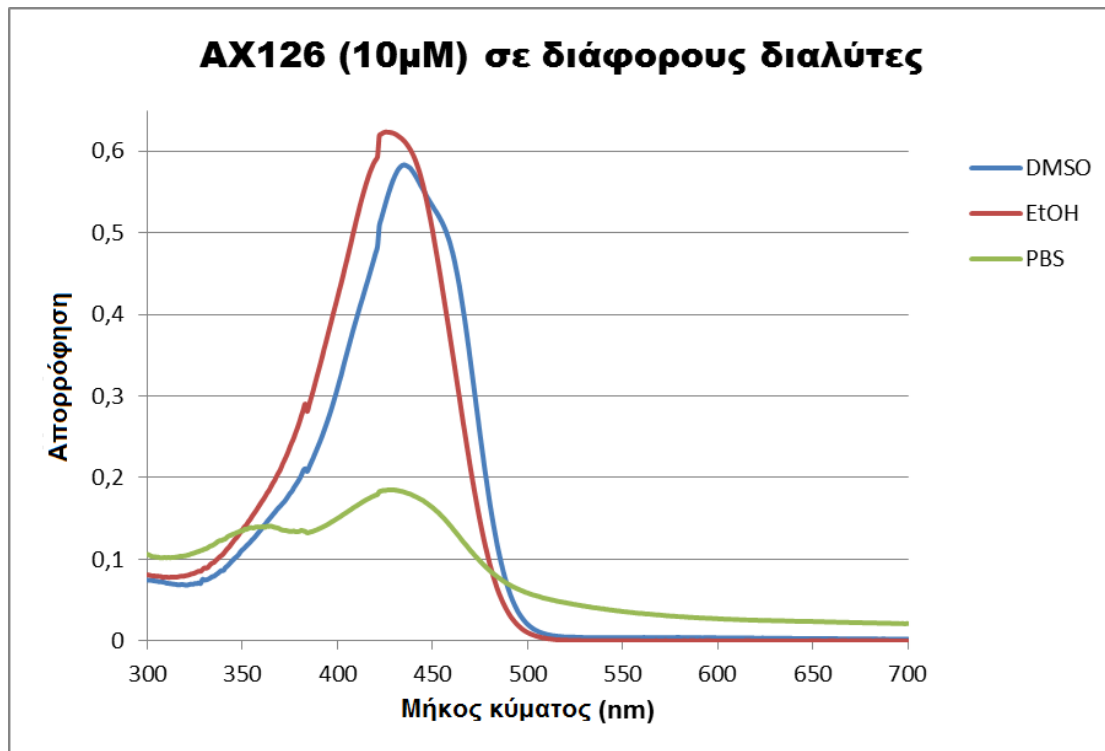
Σε κάθε μέτρηση με διαφορετικό διαλύτη προηγείτο ο μηδενισμός του σήματος για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω της απορρόφησης αυτού καθώς και του θορύβου του οργάνου και στη συνέχεια λαμβάνονταν τα φάσματα απορρόφησης κάθε διαλύματος με σάρωση στην υπεριώδη και ορατή περιοχή του φάσματος 300 - 700 nm. Η ταχύτητα σάρωσης παρέμενε σταθερή καθ' όλες τις μετρήσεις στα 480 nm/min.

Η διαδικασία ολοκληρωνόταν βάσει των εξής βημάτων:

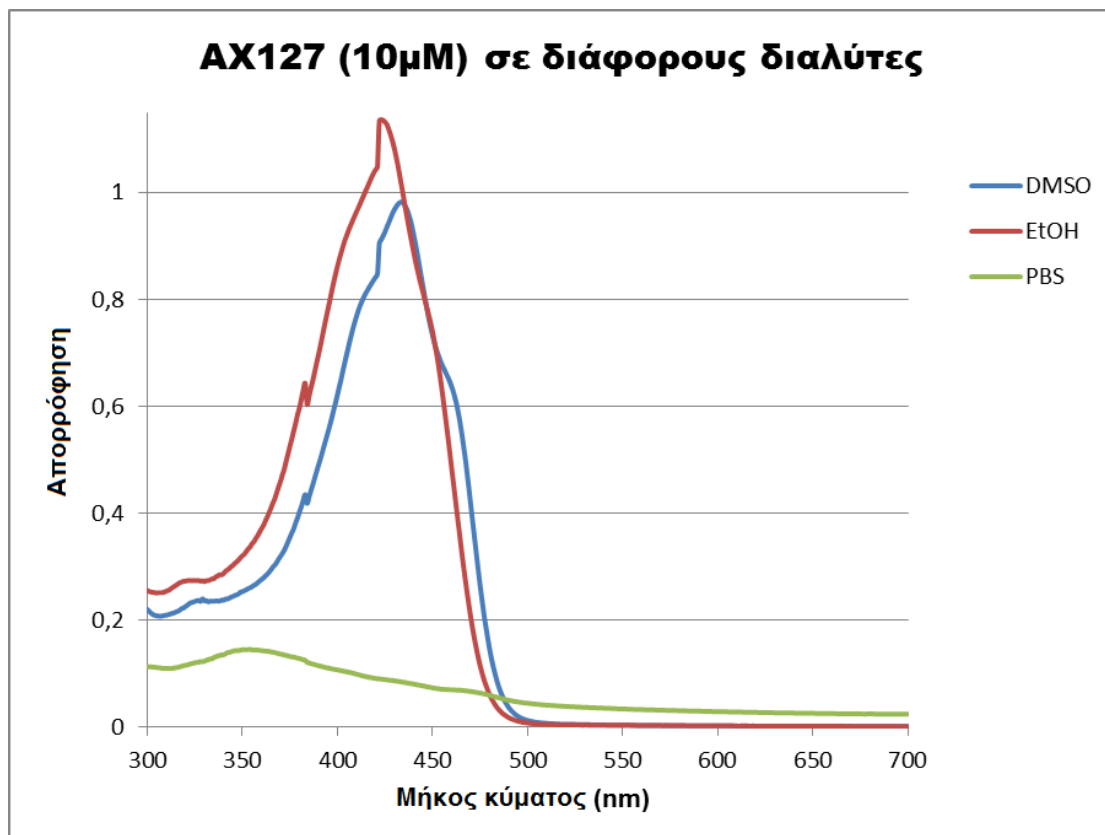
1. Τοποθετείτο στο φασματοφωτόμετρο ζεύγος κυβεττών με όμοιο περιεχόμενο, τον εκάστοτε διαλύτη, προκειμένου να καταγραφεί το σήμα λόγω της απορρόφησης του αλλά και του θορύβου του οργάνου.
2. Λαμβανόταν και αποθηκευόταν το σήμα απορρόφησης το φάσμα 300 - 700 nm το οποίο και αποτελούσε το σήμα μηδενισμού. Το σήμα αυτό αφαιρείτο από όλα τα ακόλουθα φάσματα διαλυμάτων που αφορούσαν τον ίδιο διαλύτη.
3. 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 ώστε να ληφθεί το φάσμα απορρόφησης κάθε διαλύματος.

Στις Εικόνες 5.2-1, 5.2-2 και 5.2-3 παρατίθενται συγκριτικά τα ληφθέντα φάσματα απορρόφησης κάθε εξεταζόμενης ουσίας για όλους τους διαλύτες (DMSO, αιθανόλη και PBS) και ακολουθούν τα συμπεράσματα και οι σχετικοί υπολογισμοί.

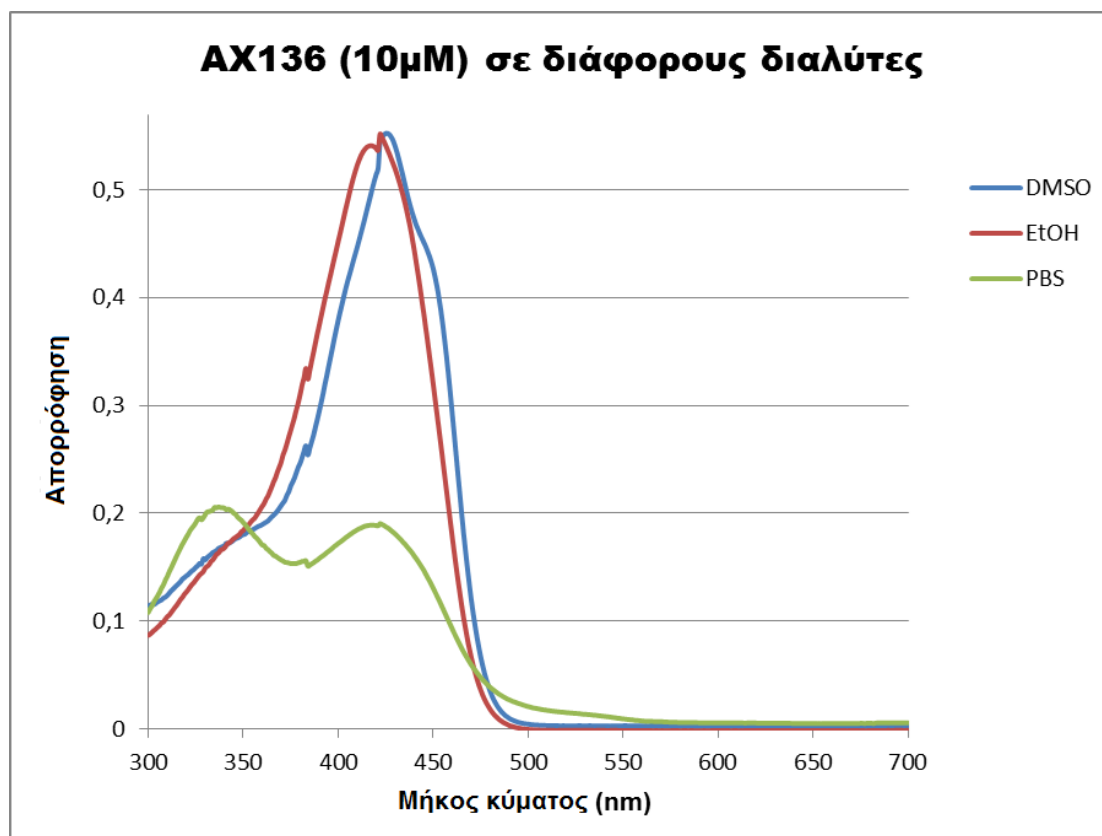
5.2.2 Φάσματα απορρόφησης των κουρκουμινών



Εικόνα 5.2-1: Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων AX126, συγκέντρωσης 10 μ M, σε DMSO, αιθανόλη και PBS.



Εικόνα 5.2-2: Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων AX127, συγκέντρωσης 10 μ M, σε DMSO, αιθανόλη και PBS.



Εικόνα 5.2-3: Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων AX136, συγκέντρωσης 10 μ M, σε DMSO, αιθανόλη και PBS.

5.2.3 Συμπεράσματα

Στον Πίνακα 5.2-1, για τις τρεις κουρκουμίνες, παρουσιάζονται το μήκος κύματος μέγιστης παρατηρούμενης απορρόφησης καθώς και ο αντίστοιχος μοριακός συντελεστής απορρόφησης, ϵ , σε κάθε διαλύτη για συγκέντρωση 10 μ M.

	AX126 (Curcumin I)		AX127		AX136 (Curcumin III)	
	λ_{max} (nm)	ϵ ($cm^{-1} M^{-1}$)	λ_{max} (nm)	ϵ ($cm^{-1} M^{-1}$)	λ_{max} (nm)	ϵ ($cm^{-1} M^{-1}$)
DMSO	435	58336	433	98179	426	55241
EtOH	426	62348	423	113632	422	55147
PBS	427	18522	354	14525	337	20600

Πίνακας 5.2-1: Μέγιστα απορρόφησης AX126, AX127 και AX136, συγκέντρωσης 10 μ M και οι αντίστοιχοι μοριακοί συντελεστές απορρόφησης στους τρεις διαφορετικούς διαλύτες.

Ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης κάθε ουσίας υπολογίστηκε βάσει του νόμου του Beer για αραιά διαλύματα:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot C \cdot d$$

όπου A η απορρόφηση, C η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα (M), d το πάχος του δείγματος (cm) και ε ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης ($cm^{-1} M^{-1}$).

Στους οργανικούς διαλύτες και οι τρεις κουρκουμίνες διατηρούν τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματός τους αν και παρατηρείται ελαφριά μετατόπιση της κορυφής τους (μεταξύ των μετρήσεων σε DMSO και αιθανόλη) ενδεχομένως λόγω διαφοράς στο pH. Αντίθετα, η χρήση του υδατικού μέσου (PBS) ως διαλύτη είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της απορρόφησης των κουρκουμινών με συνέπεια τη δυσκολία διάκρισης της χαρακτηριστικής κορυφής.

Ο μεγαλύτερος μοριακός συντελεστής απορρόφησης παρατηρείται γενικά όταν η αιθανόλη χρησιμοποιείται ως διαλύτης ενώ είναι πολύ κοντά στην αντίστοιχη τιμή και για το DMSO. Εντούτοις, μειώνεται σημαντικά όταν ο διαλύτης είναι το PBS (περίπου στο 30% του μεγίστου για την AX126, στο 13% για την AX127 και στο 37% για την AX136).

Η παρατήρηση αυτή, δηλαδή η εξαφάνιση της κορυφής απορρόφησης καθώς και η μείωση του μοριακού συντελεστή απορρόφησης στο μέγιστο μήκος κύματος είναι αποτέλεσμα της συσσωμάτωσης των μορίων της κουρκουμίνης σε υδατικά μέσα. Στα πλαίσια αυτά, συμπεραίνουμε ότι η AX126 και η AX136 συμπεριφέρονται αντίστοιχα όσον αφορά τη δημιουργία των συσσωματωμάτων ενώ η AX127 παρουσιάζει τάση συσσωμάτωσης αυξημένη περίπου κατά 50% σε σχέση με τις άλλες δυο ουσίες.

5.3 Υπολογισμός καμπυλών συγκέντρωσης - φθορισμού των παραγώγων της κουρκουμίνης

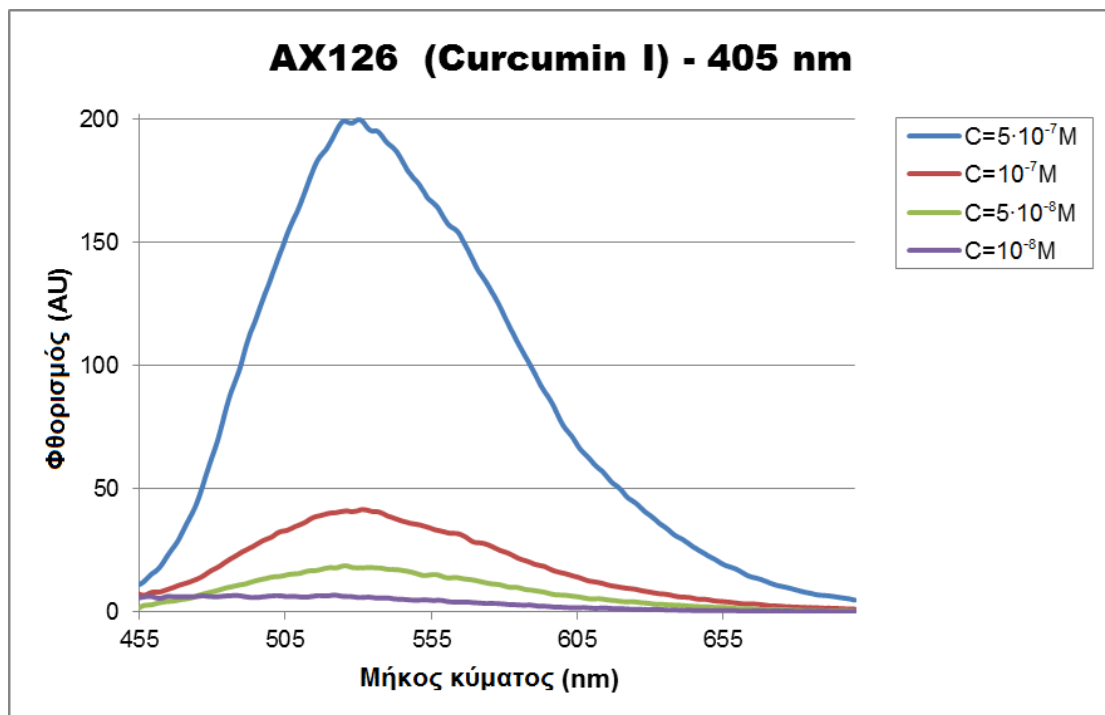
5.3.1 Διαδικασία

Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η φωτοφυσική συμπεριφορά των κουρκουμινών ελήφθησαν και τα φάσματα φθορισμού κάθε ουσίας σε διάφορες συγκεντρώσεις ($5 \cdot 10^{-7}$ M, 10^{-7} M, $5 \cdot 10^{-8}$ M και 10^{-8} M) σε διαλύτη DMSO. Τα φάσματα φθορισμού καταγράφηκαν για διέγερση:

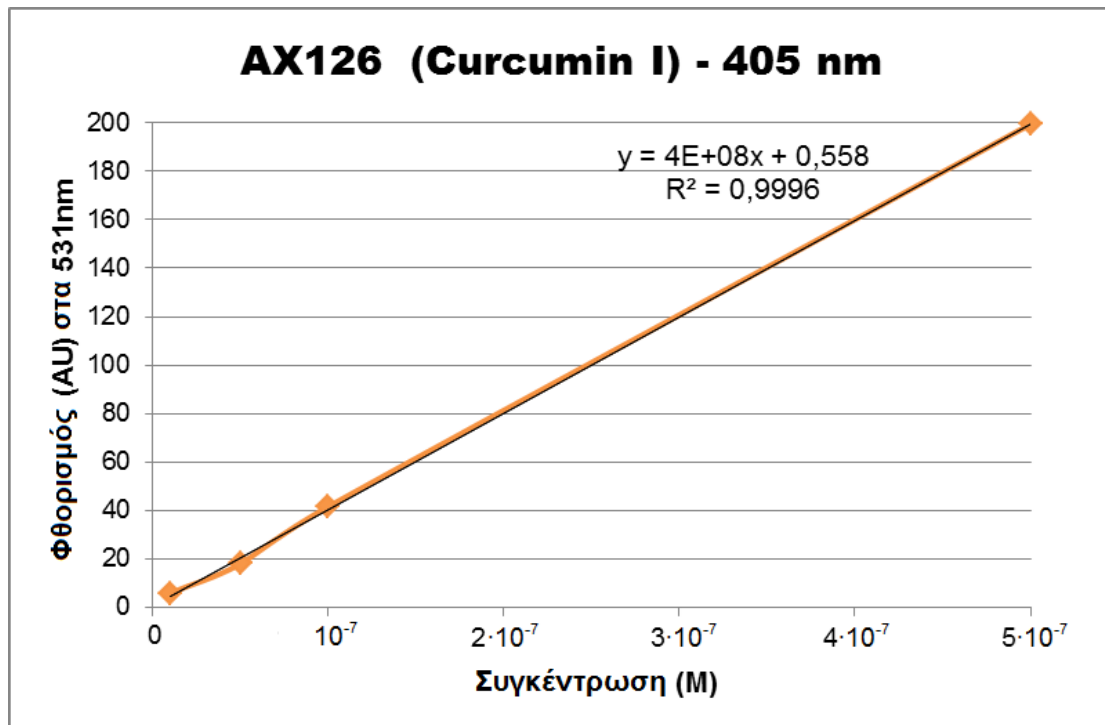
1. Στα 405 nm όπου βρίσκεται το μέγιστο της πηγής ακτινοβολίας D61UV-1-0-1.
2. Στο μέγιστο της παρατηρηθείσας απορρόφησης των ουσιών: στα 435 nm για την AX126 και την AX127, στα 425 για την AX136.

Τα φάσματα φθορισμού καταγράφησαν με τη φασματοφωτομετρική διάταξη μέτρησης φθορισμού που περιγράφηκε στην Ενότητα 4.2.2. Τα διαλύματα μεταγγίζονταν σε πλαστικές κυβέττες 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. Στην αρχή κάθε μέτρησης πραγματοποιούταν ο μηδενισμός του σήματος λόγω φθορισμού του διαλύτη καθώς και του θορύβου του οργάνου. Η ταχύτητα σάρωσης παρέμενε σταθερή σε όλα τα πειράματα, στα 480 nm/min. Το άνοιγμα του μονοχρωμάτορα διέγερσης όπως και του αντίστοιχου εκπομπής στη φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού είναι 10 nm.

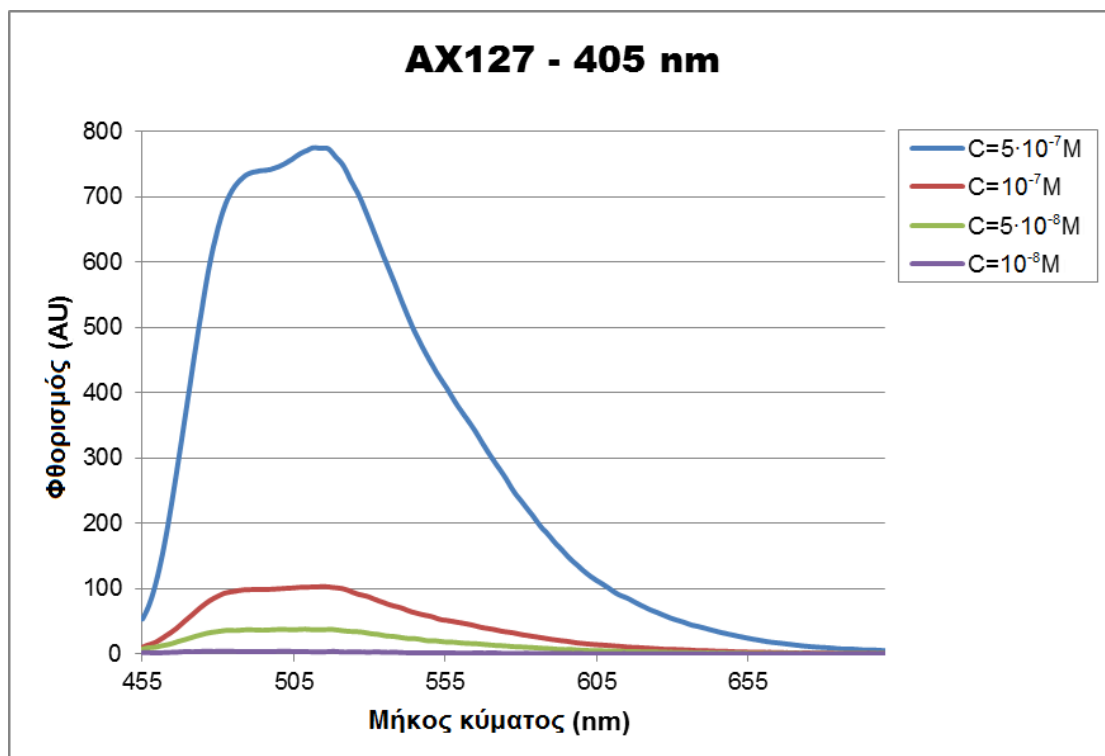
5.3.2 Μελέτες ιδιοτήτων φθορισμού για διέγερση στα 405 nm



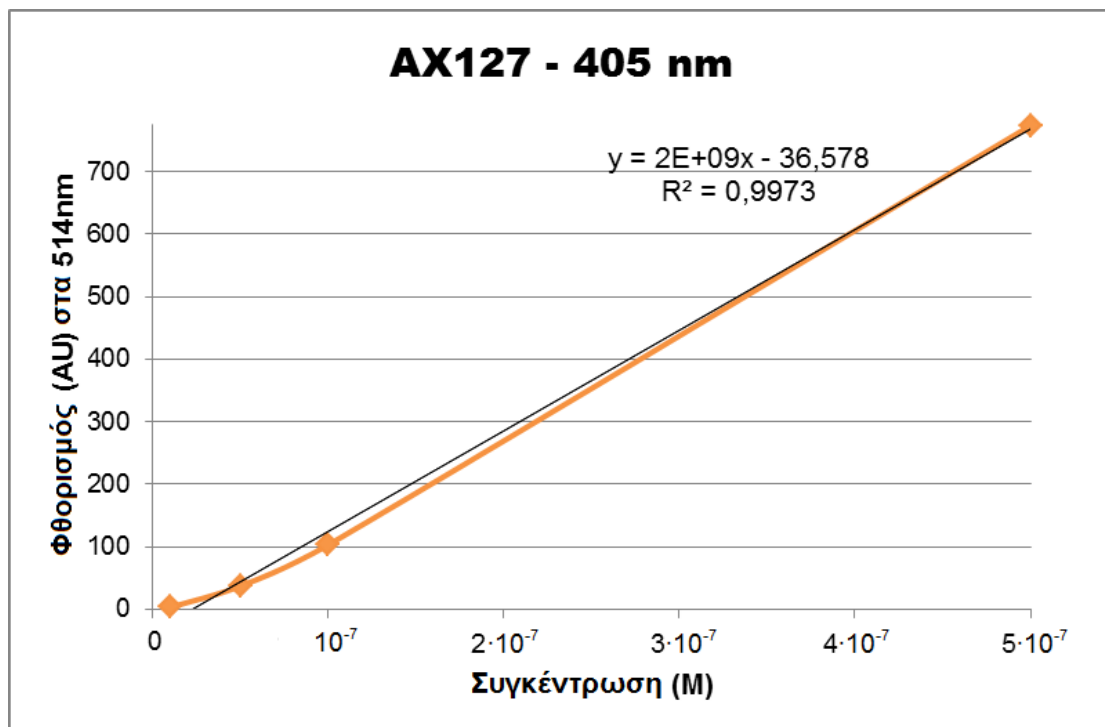
Εικόνα 5.3-1: Φάσματα φθορισμού της AX126 σε μήκη κύματος 455 – 700 nm, διέγερση στα 405 nm και συγκεντρώσεις 0,5 μM, 0,1 μM, 0,05 μM και 0,01 μM.



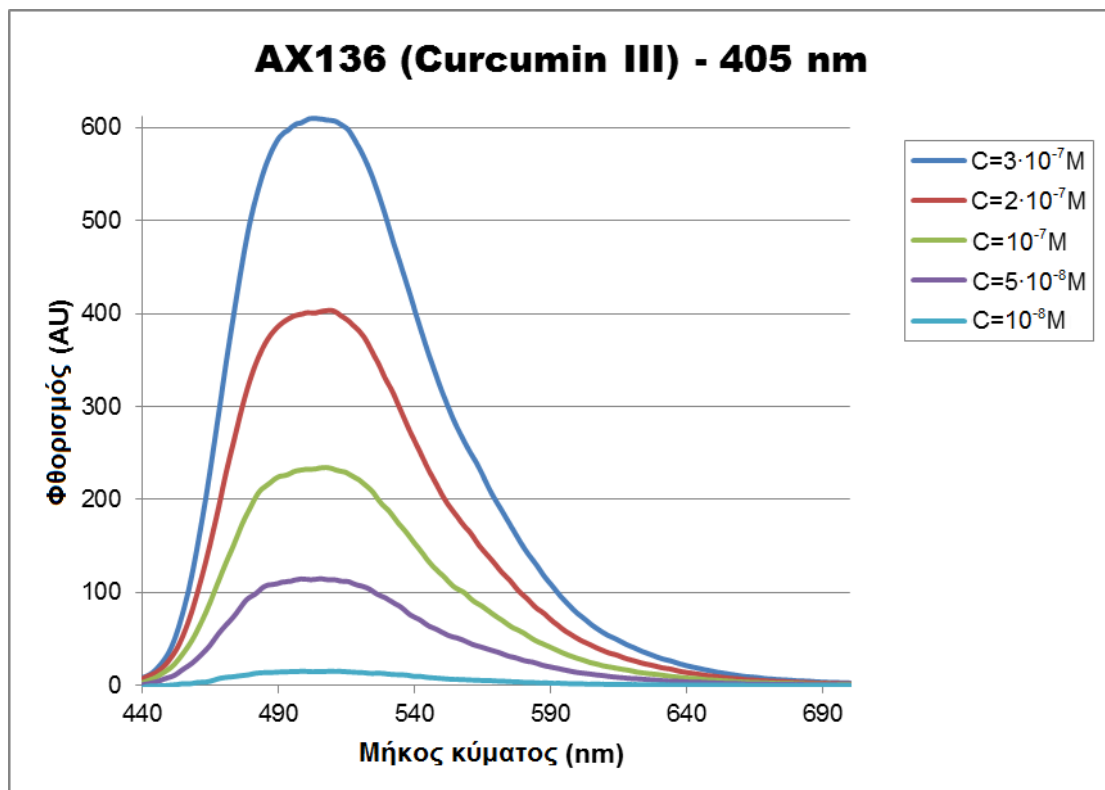
Εικόνα 5.3-2: Καμπύλη μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ανά συγκέντρωση της ουσίας AX126 για διέγερση στα 405 nm.



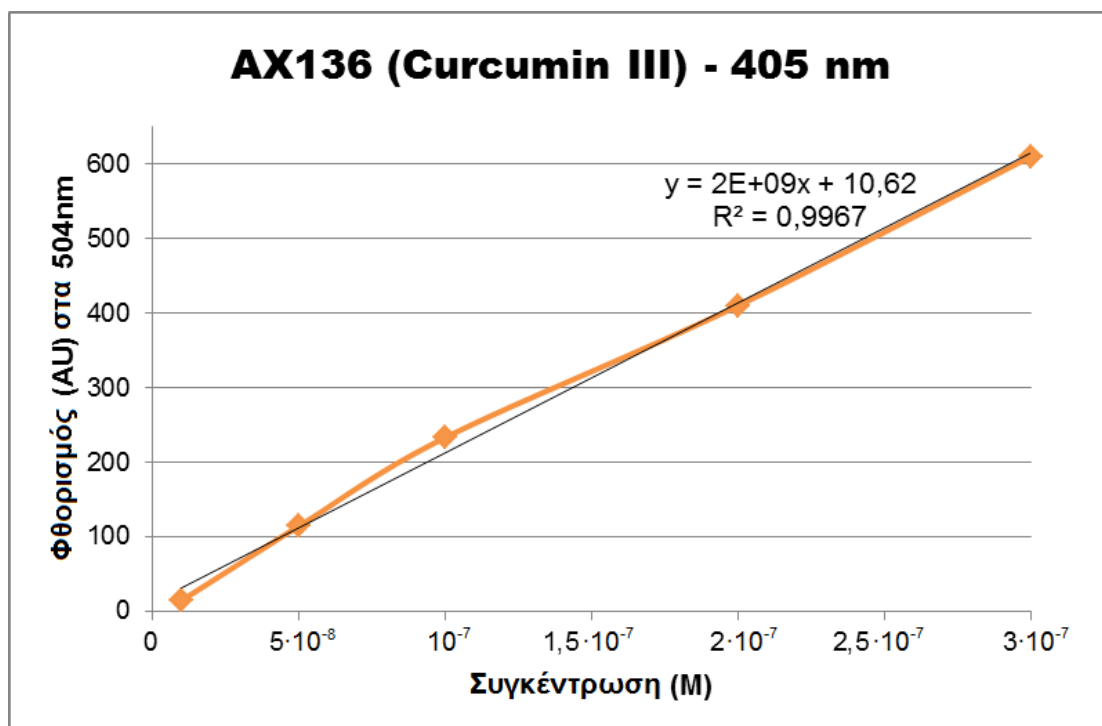
Εικόνα 5.3-3: Φάσματα φθορισμού της AX127 σε μήκη κύματος 455 – 700 nm, διέγερση στα 405 nm και συγκεντρώσεις 0,5 μM, 0,1 μM, 0,05 μM και 0,01 μM.



Εικόνα 5.3-4: Καμπύλη μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ανά συγκέντρωση της ουσίας AX127 για διέγερση στα 405 nm.



Εικόνα 5.3-5: Φάσματα φθορισμού της AX136 σε μήκη κύματος 440 – 700 nm, διέγερση στα 405 nm και συγκεντρώσεις 0,5 μ M, 0,1 μ M, 0,05 μ M και 0,01 μ M.



Εικόνα 5.3-6: Καμπύλη μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ανά συγκέντρωση της ουσίας AX136 για διέγερση στα 405 nm.

Στις Εικόνες 5.3-1, 5.3-3 και 5.3-5 παρατίθενται τα φάσματα φθορισμού κάθε ουσίας για τις χρησιμοποιούμενες τιμές της συγκέντρωσης με διέγερση στα 405 nm, ενώ στις Εικόνες 5.3-2, 5.3-4 και 5.3-6 απεικονίζονται οι καμπύλες μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ως προς τη συγκέντρωση της αντίστοιχης κουρκουμίνης.

5.3.3 Συμπεράσματα για το φθορισμό με διέγερση στα 405 nm

Παρατηρούμε ότι τα φάσματα φθορισμού για όλες τις κουρκουμίνες διατηρούν τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματος φθορισμού τους με μέγιστο εκπομπής φθορισμού στα παρακάτω μήκη κύματος:

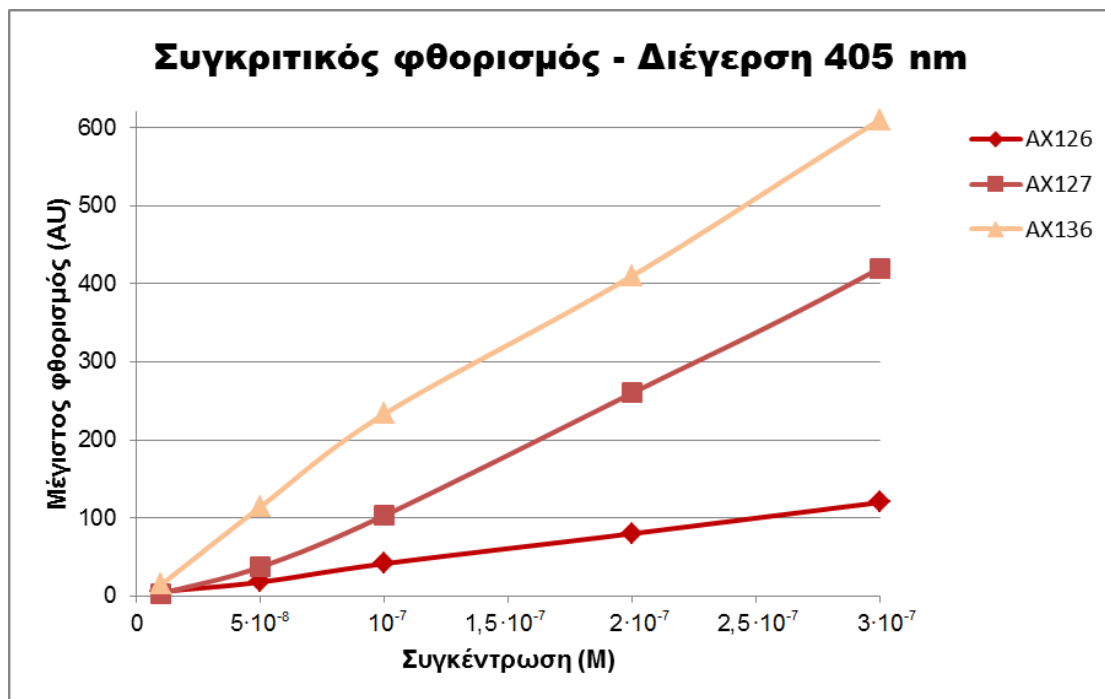
- 531 nm για την AX126
- 514 nm για την AX127
- 504 nm για την AX136.

Επιπλέον, η παρατηρούμενη τιμή της έντασης του φθορισμού για διέγερση στα 405 nm είναι σημαντική οπότε μπορούμε να μελετήσουμε και τη φωτολεύκανση στην επόμενη σειρά πειραμάτων.

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα, όπως απεικονίζονται στα διαγράμματα των Εικόνων 5.3-2, 5.3-4 και 5.3-6, οι καμπύλες φθορισμού – συγκέντρωσης για τις τρεις κουρκουμίνες με διέγερση στα 405 nm χαρακτηρίζονται από τις παρακάτω εξισώσεις:

- **AX126 (Curcumin I):** $y = 4E + 08x + 0,558$ με $R^2 = 0,9996$,
- **AX127:** $y = 2E + 09x - 36,578$ με $R^2 = 0,9973$,
- **AX136 (Curcumin III):** $y = 2E + 09x + 10,62$ με $R^2 = 0,9967$,

όπου y το σήμα φθορισμού που προκύπτει από τα μετρούμενα δείγματα και x η συγκέντρωσή τους.



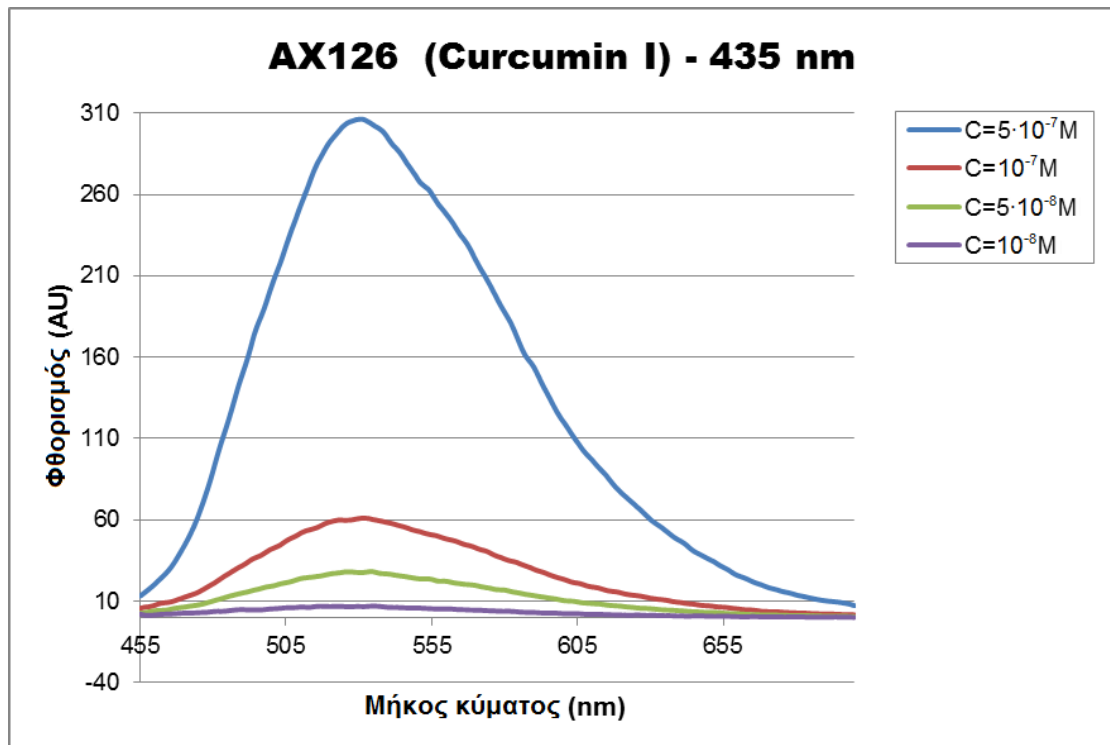
Εικόνα 5.3-7: Συγκριτικές καμπύλες μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ανά συγκέντρωση όλων των κουρκουμινών για διέγερση στα 405 nm.

Παρατηρούμε ότι και στις τρεις υπο εξέταση ουσίες, για το συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων η ένταση του σήματος φθορισμού είναι γραμμικά ανάλογη με τη συγκέντρωση των ουσιών (Εικόνα 5.3-7).

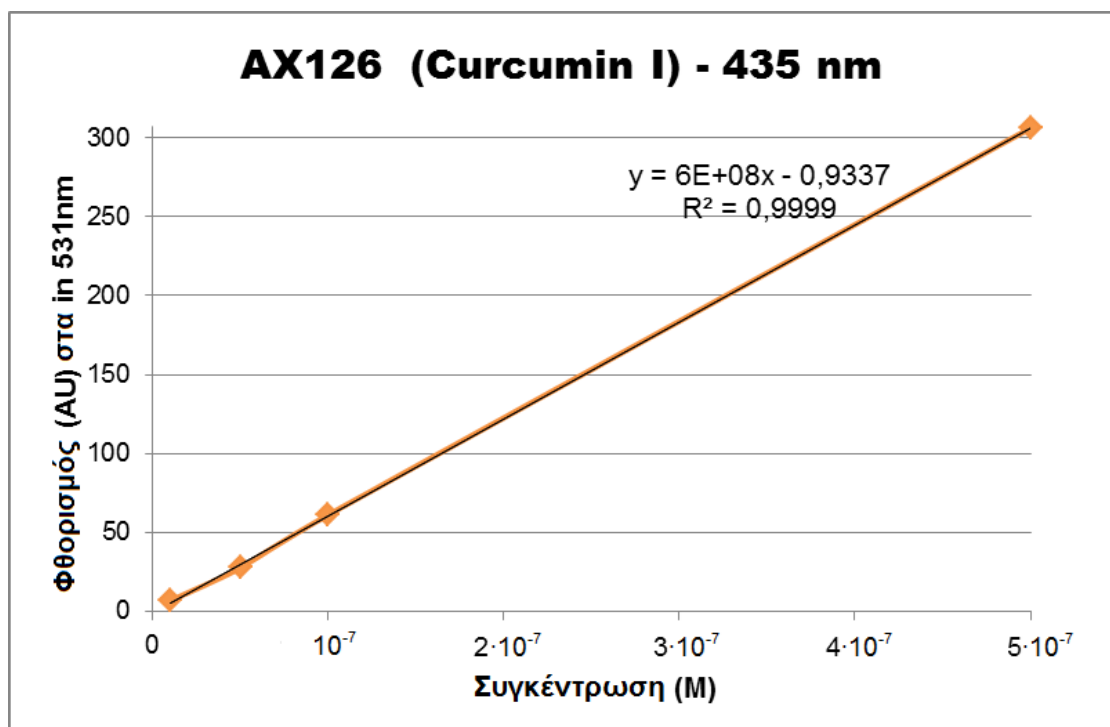
5.3.4 Μελέτες ιδιοτήτων φθορισμού για διέγερση στο μέγιστο της απορρόφησης

Παρομοίως, στις Εικόνες 5.3-8, 5.3-10 και 5.3-12, παρατίθενται τα φάσματα φθορισμού κάθε ουσίας για τις χρησιμοποιούμενες τιμές της συγκέντρωσης με διέγερση στο μήκος κύματος που καταγράφηκε η μέγιστη απορρόφηση κάθε κουρκουμίνης.

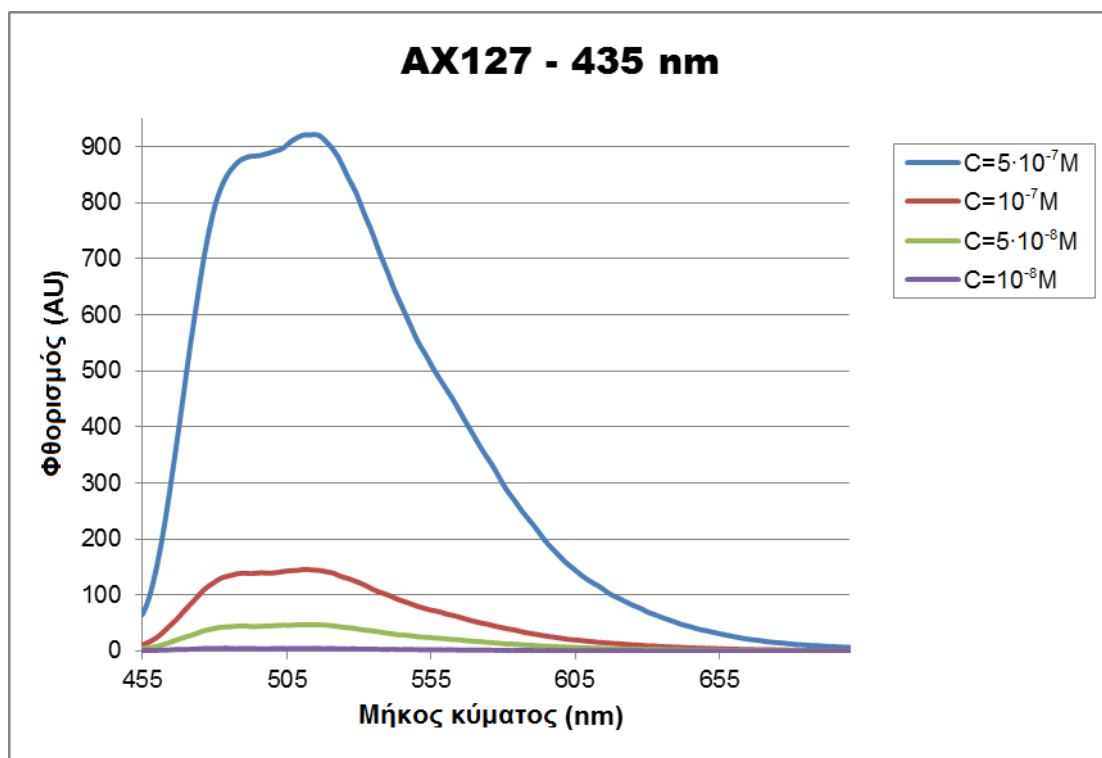
Αντίστοιχα, στις Εικόνες 5.3-9, 5.3-11 και 5.3-13, απεικονίζονται οι καμπύλες μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ως προς τη συγκέντρωση της αντίστοιχης ουσίας, στην εν λόγω διέγερση.



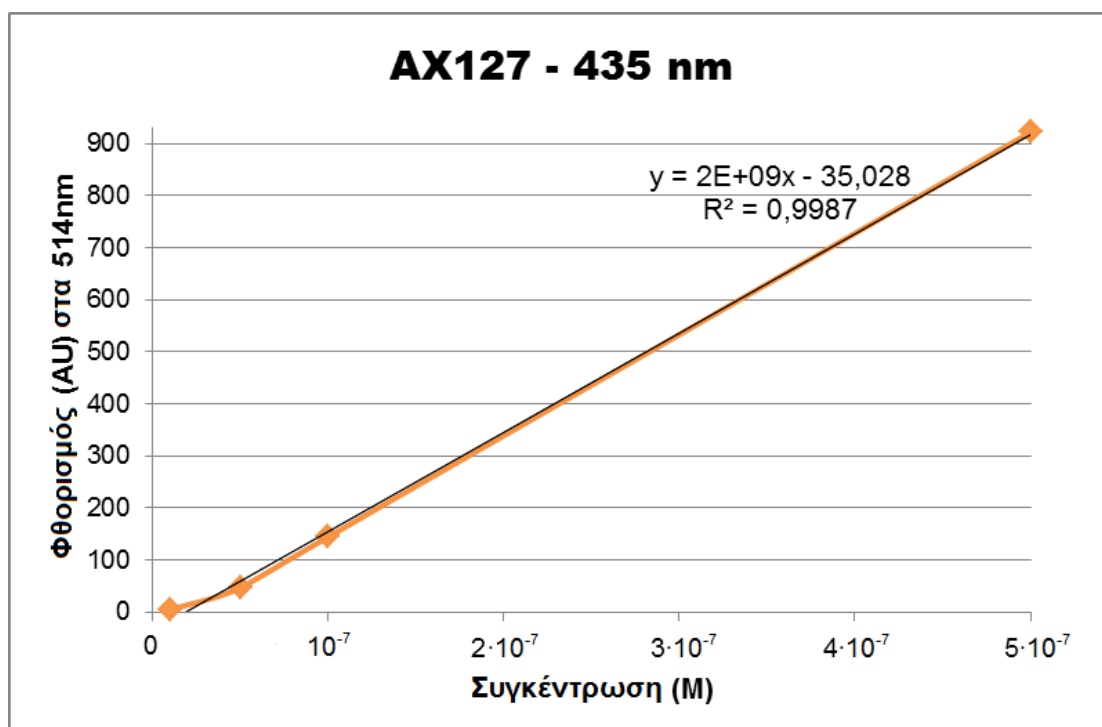
Εικόνα 5.3-8: Φάσματα φθορισμού της AX126 σε μήκη κύματος 455 – 700 nm, διέγερση στα 435 nm και συγκεντρώσεις 0,5 μM , 0,1 μM , 0,05 μM και 0,01 μM .



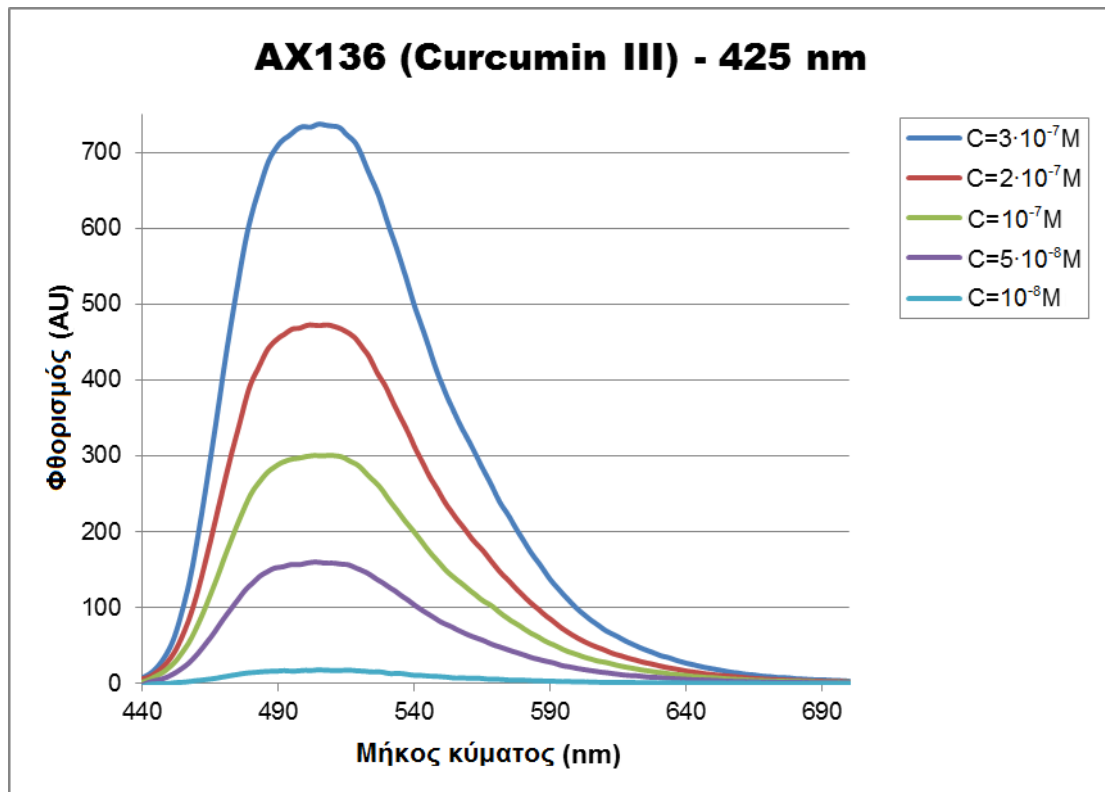
Εικόνα 5.3-9: Καμπύλη μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ανά συγκέντρωση της ουσίας AX126 για διέγερση στα 435 nm.



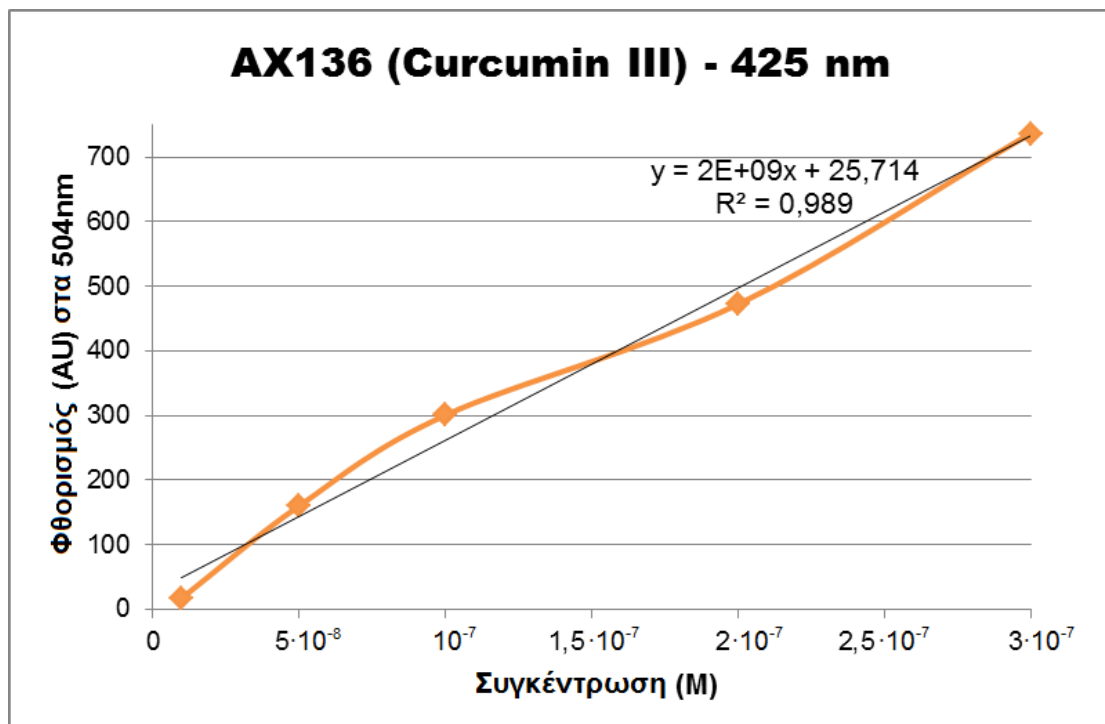
Εικόνα 5.3-10: Φάσματα φθορισμού της AX127 σε μήκη κύματος 455 – 700 nm, διέγερση στα 435 nm και συγκεντρώσεις 0,5 μM , 0,1 μM , 0,05 μM και 0,01 μM .



Εικόνα 5.3-11: Καμπύλη μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ανά συγκέντρωση της ουσίας AX127 για διέγερση στα 435 nm.



Εικόνα 5.3-12: Φάσματα φθορισμού της AX136 σε μήκη κύματος 440 – 700 nm, διέγερση στα 425 nm και συγκεντρώσεις 0,5 μ M, 0,1 μ M, 0,05 μ M και 0,01 μ M.

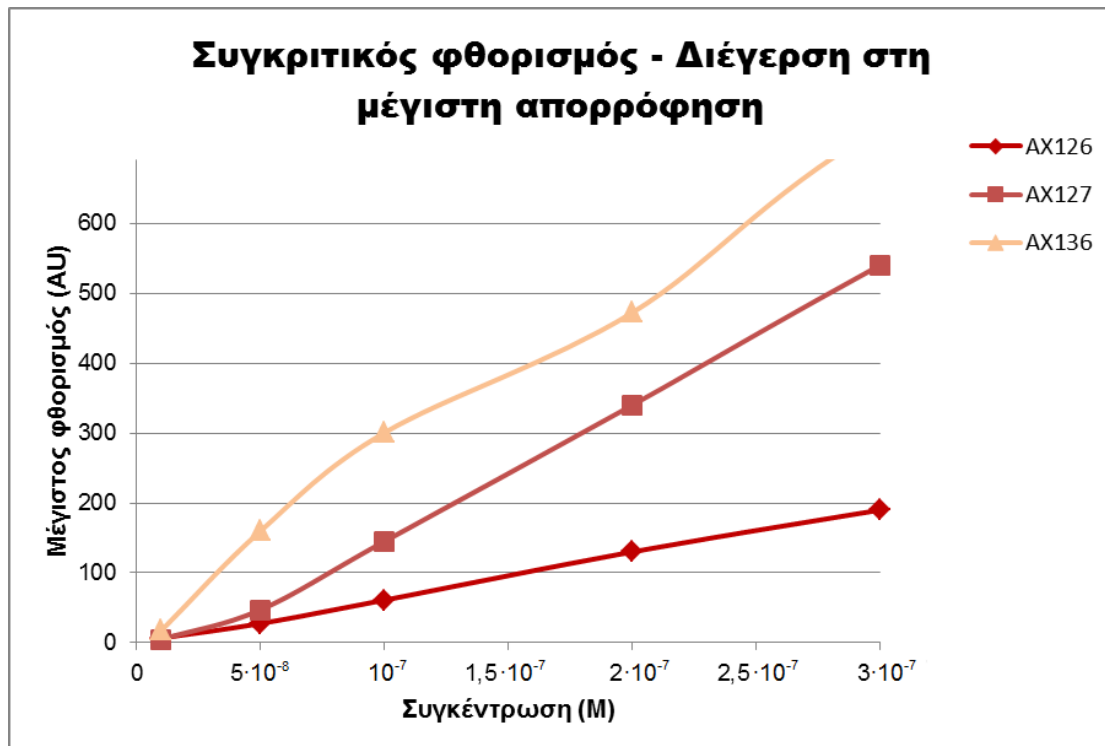


Εικόνα 5.3-13: Καμπύλη μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ανά συγκέντρωση της ουσίας AX136 για διέγερση στα 425 nm.

5.3.5 Συμπεράσματα για το φθορισμό με διέγερση στη μέγιστη απορρόφηση

Είναι εμφανές κι εδώ ότι τα φάσματα φθορισμού για όλες τις κουρκουμίνες διατηρούν τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματος φθορισμού τους με μέγιστο εκπομπής φθορισμού στα παρακάτω μήκη κύματος:

- 531 nm για την AX126, με διέγερση στα 435 nm.
- 514 nm για την AX127, με διέγερση στα 435 nm.
- 504 nm για την AX136, με διέγερση στα 425 nm.



Εικόνα 5.3-14: Συγκριτικές καμπύλες μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ανά συγκέντρωση όλων των κουρκουμινών για διέγερση στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης.

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα, όπως απεικονίζονται στα διαγράμματα των Εικόνων 5.3-9, 5.3-11 και 5.3-13, οι καμπύλες φθορισμού – συγκέντρωσης για τις τρεις κουρκουμίνες με διέγερση στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης χαρακτηρίζονται από τις παρακάτω εξισώσεις:

- **AX126 (Curcumin I):** $y = 6E + 08x - 0,9337$ με $R^2 = 0,9999$,
- **AX127:** $y = 2E + 09x - 35,028$ με $R^2 = 0,9987$,

- **AX136 (Curcumin III):** $y = 2E + 09x + 25,714$ με $R^2 = 0,989$,

όπου y το σήμα φθορισμού που προκύπτει από τα μετρούμενα δείγματα και x η συγκέντρωσή τους.

Παρατηρούμε ότι και στις τρεις υπο εξέταση ουσίες, για το συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων η ένταση του σήματος φθορισμού είναι γραμμικά ανάλογη με τη συγκέντρωση των ουσιών (Εικόνα 5.3-14).

Επιπρόσθετα, παρατηρείται ότι τα φάσματα φθορισμού καθώς και οι καμπύλες συγκέντρωσης – φθορισμού είναι ακριβώς ίδια με όσα καταγράφηκαν για διέγερση στα 405 nm με τη διαφορά ότι σημειώνονται υψηλότερες τιμές για διέγερση στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο καθώς όταν χρησιμοποιείται διέγερση στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης, η ουσία απορροφά το μέγιστο δυνατό αριθμό φωτονίων, επομένως και ο εκπεμπόμενος φθορισμός θα είναι μέγιστος.

Τέλος, η σειρά πειραμάτων για τη μελέτη του φθορισμού καταδεικνύει εμφανώς ότι όλες οι υπό μελέτη κουρκουμίνες παρουσιάζουν ικανοποιητικές τιμές φθορισμού για κατάλληλη διέγερση. Κατά συνέπεια, προκύπτει το συμπέρασμα ότι έχουν προοπτικές προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στη φωτοδυναμική διάγνωση όπου απαιτείται σημαντικός φθορισμός της ουσίας που συγκεντρώνεται στα καρκινικά κύτταρα.

5.4 Φασματοσκοπικές μελέτες φωτολεύκανσης της κουρκουμίνης

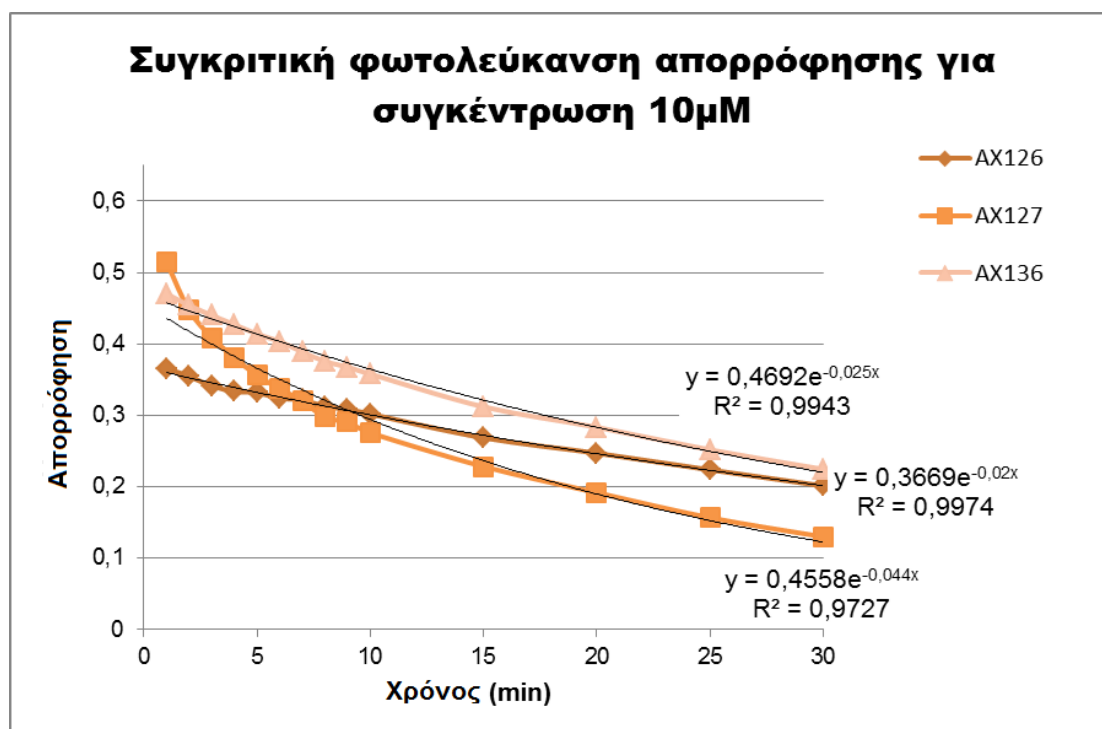
5.4.1 Υπολογισμός καμπυλών απορρόφησης - χρόνου των παραγώγων κουρκουμίνης

Για τη μελέτη της συμπεριφοράς των κουρκουμινών όσον αφορά το φαινόμενο της φωτολεύκανσης ελήφθησαν αρχικά τα φάσματα απορρόφησης κάθε ουσίας με συγκέντρωση 10 μM σε DMSO ύστερα από ακτινοβόληση.

Το δείγμα ακτινοβολήθηκε με ισχύ 10 mW/cm^2 χρησιμοποιώντας τη διάταξη της Ενότητας 4.2.3.1. Το φάσμα απορρόφησης καταγραφόταν ανά λεπτό ακτινοβόλησης στο χρονικό διάστημα 0 min – 30 min με τη φασματοφωτομετρική διάταξη μέτρησης απορρόφησης που περιγράφηκε στην Ενότητα 4.2.1.

Τα διαλύματα μεταγγίζονταν σε πλαστικές κυβέττες απορρόφησης 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 απορρόφησης. Στην αρχή κάθε σειράς μετρήσεων πραγματοποιούταν ο μηδενισμός του σήματος λόγω απορρόφησης του διαλύτη καθώς και του θορύβου του οργάνου. Η ταχύτητα σάρωσης παρέμενε σταθερή σε όλα τα πειράματα, στα 480 nm/min .

Οι καμπύλες μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης κάθε ουσίας με την πάροδο του χρόνου ακτινοβόλησης απεικονίζονται συγκεντρωτικά στην Εικόνα 5.4-1 για όλες τις κουρκουμίνες.



Εικόνα 5.4-1: Συγκριτικές καμπύλες μεταβολής μέγιστης απορρόφησης των κουρκουμινών, σε συγκέντρωση 10 μM , ανά χρόνο ακτινοβόλησης (0 min – 30 min) μελετώντας τη φωτολεύκανση.

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα, οι συγκεκριμένες καμπύλες χαρακτηρίζονται από τις παρακάτω εξισώσεις:

- **AX126 (Curcumin I):** $y = 0,3669e^{-0,02x}$ με $R^2 = 0,9974$,
- **AX127:** $y = 0,4558e^{-0,044x}$ με $R^2 = 0,9727$,
- **AX136 (Curcumin III):** $y = 0,4692e^{-0,025x}$ με $R^2 = 0,9943$,

όπου y το σήμα απορρόφησης που προκύπτει από τα μετρούμενα δείγματα και x ο χρόνος ακτινοβόλησης.

Παρατηρούμε ότι, για όλα τα παράγωγα της κουρκουμίνης, η μέγιστη ένταση του σήματος απορρόφησης του διαλύματος σημειώνει εκθετική πτώση ως προς το χρόνο ακτινοβόλησης. Η καμπύλη που αντιστοιχεί στην ουσία AX127 πέφτει εκθετικά με συντελεστή 0,044 και παρουσιάζει τη μέγιστη φωτολεύκανση απορρόφησης ενώ οι AX126 και AX136 έχουν συντελεστές περίπου ίσους και παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά.

5.4.2 Υπολογισμός καμπυλών φθορισμού – χρόνου των παραγώγων κουρκουμίνης

Για τη μελέτη της συμπεριφοράς των κουρκουμινών όσον αφορά το φαινόμενο της φωτολεύκανσης ελήφθησαν, στη συνέχεια, τα φάσματα φθορισμού κάθε ουσίας με συγκέντρωση 10 μM σε DMSO ύστερα από ακτινοβόληση.

Το δείγμα ακτινοβολήθηκε με τη διάταξη που περιγράφηκε στην Ενότητα 4.2.3.1 και λαμβανόταν φάσμα φθορισμού ανά λεπτό ακτινοβόλησης στο χρονικό διάστημα 0 min – 30 min. Τα φάσματα φθορισμού κατεγράφησαν με τη φασματοφωτομετρική διάταξη μέτρησης φθορισμού που περιγράφηκε στην Ενότητα 4.2.2, για διέγερση στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης κάθε ουσίας.

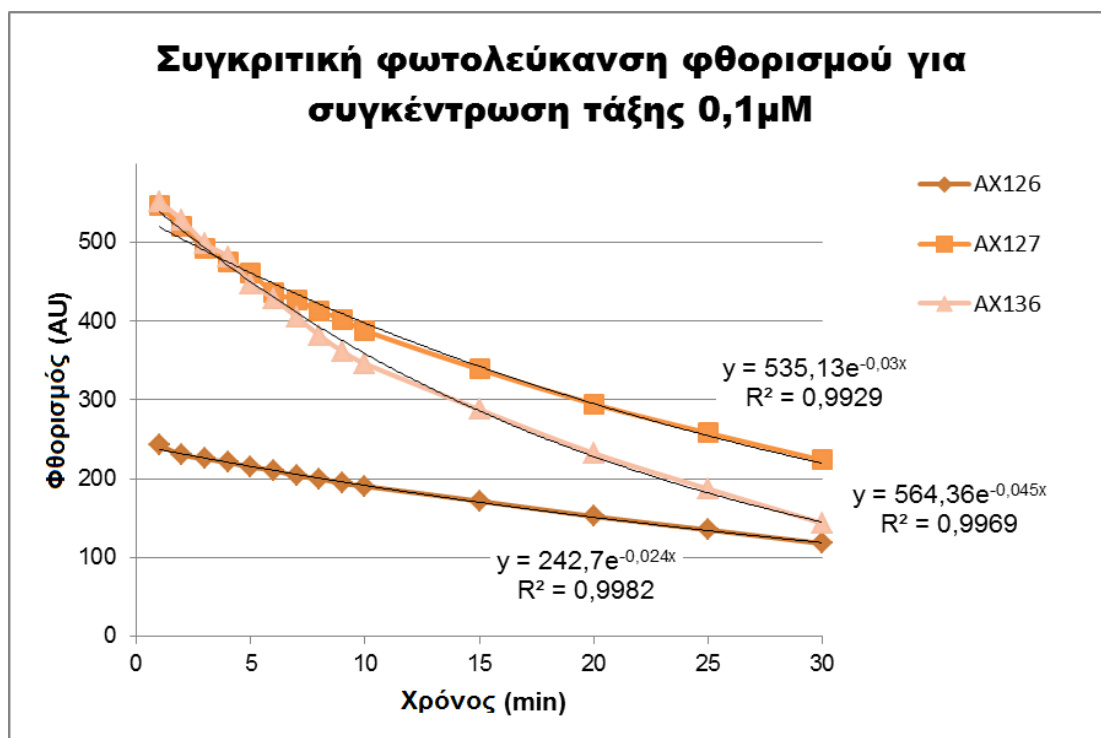
Τα διαλύματα μεταγγίζονταν σε πλαστικές κυβέττες φθορισμού των 4,5 ml, κατάλληλες για σάρωση στην υπεριώδη και στην ορατή περιοχή, οι οποίες πληρούνταν με 3 ml διαλύματος προκειμένου να ληφθούν τα φάσματα φθορισμού. Στην αρχή κάθε σειράς μετρήσεων πραγματοποιούταν ο μηδενισμός του σήματος λόγω φθορισμού του διαλύτη καθώς και του θορύβου του οργάνου. Η ταχύτητα σάρωσης παρέμενε σταθερή σε όλα τα πειράματα, στα 480 nm/min. Το άνοιγμα του μονοχρωμάτορα διέγερσης όπως και του αντίστοιχου εκπομπής στη φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού είναι 10 nm.

Οι καμπύλες μεταβολής του μέγιστου φθορισμού κάθε ουσίας με την πάροδο του χρόνου ακτινοβόλησης απεικονίζονται συγκεντρωτικά στην Εικόνα 5.4-2 για όλες τις κουρκουμίνες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι καμπύλες χαρακτηρίζονται από τις παρακάτω εξισώσεις:

- **AX126 (Curcumin I):** $y = 242,7e^{-0,024x}$ με $R^2 = 0,9982$,
- **AX127:** $y = 535,13e^{-0,03x}$ με $R^2 = 0,9929$,

- **AX136 (Curcumin III):** $y = 564,36e^{-0,045x}$ με $R^2 = 0,9969$,

όπου y το σήμα φθορισμού που προκύπτει από τα μετρούμενα δείγματα και x ο χρόνος ακτινοβολήσης.



Εικόνα 5.4-2: Συγκριτικές καμπύλες μεταβολής μέγιστου φθορισμού των κουρκουμινών, σε συγκέντρωση 10 μM, με διέγερση στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης, ανά χρόνο ακτινοβολήσης (0 min – 30 min) μελετώντας τη φωτολεύκανση.

Είναι εμφανές ότι για όλα τα παράγωγα της κουρκουμίνης η μέγιστη ένταση του σήματος φθορισμού του διαλύματος σημειώνει εκθετική πτώση ως προς το χρόνο ακτινοβολήσης. Η καμπύλη που αντιστοιχεί στην ουσία AX136 πέφτει εκθετικά με συντελεστή 0,045 και παρουσιάζει τη μέγιστη φωτολεύκανση φθορισμού ενώ η καμπύλη που αντιστοιχεί στην AX126 πέφτει με το χαμηλότερο συντελεστή -0,024 και έχει τη μικρότερη σχετική φωτολεύκανση.

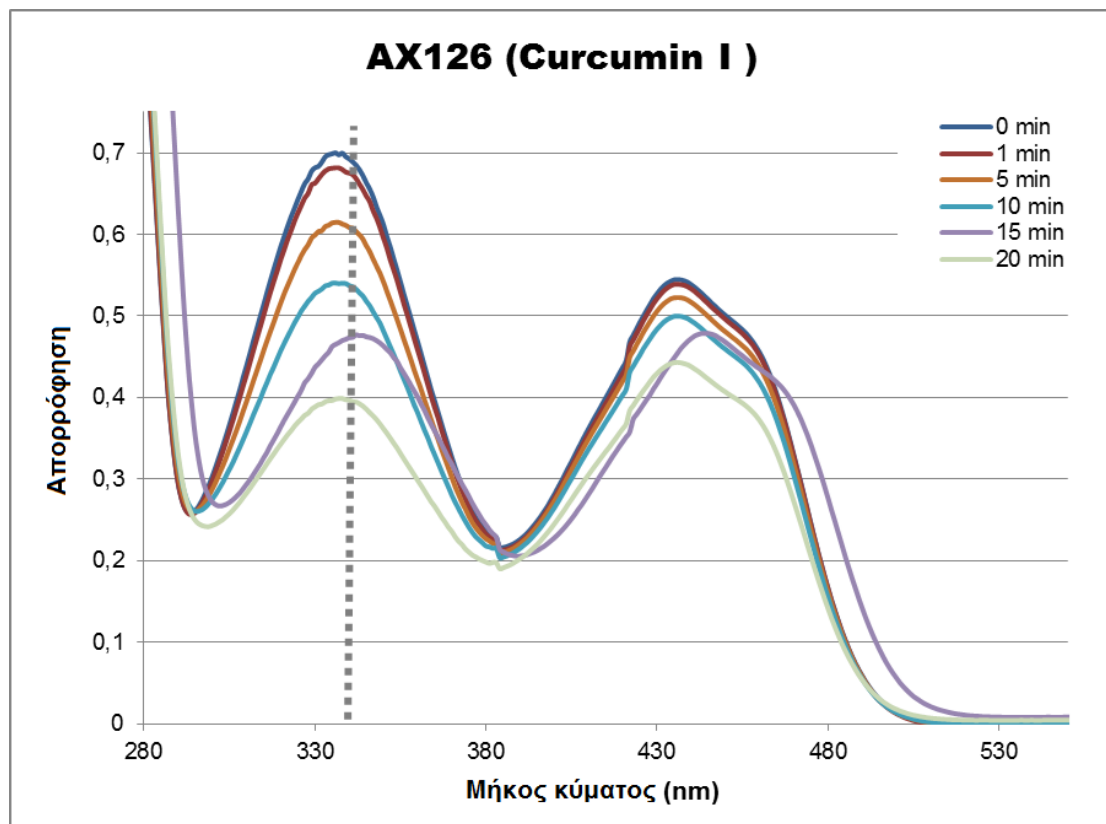
5.5 Μελέτη της ικανότητας της κουρκουμίνης για παραγωγή ελευθέρων ριζών

5.5.1 Διαδικασία

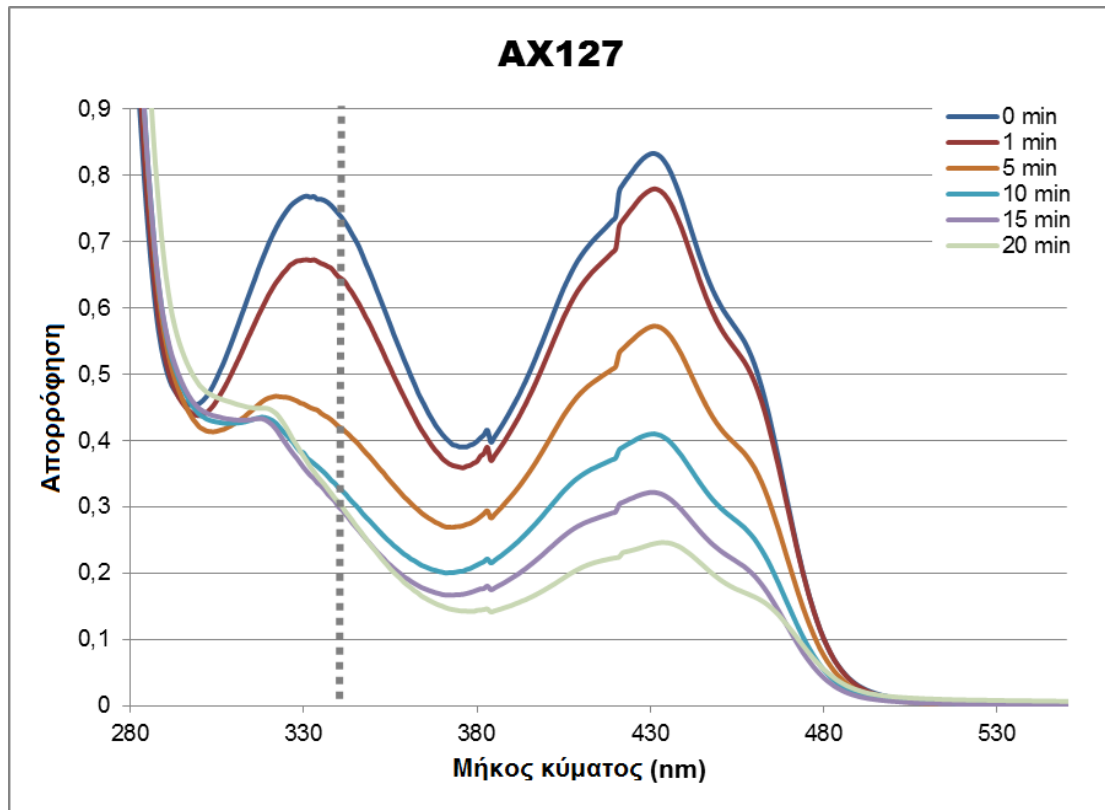
Η τελευταία σειρά πειραμάτων αφορά την ικανότητα των παραγώγων κουρκουμίνης να παράγουν ελεύθερες ρίζες. Για την ανίχνευση τους, χρησιμοποιήθηκε η ουσία NADH που παρουσιάζει σχετικές ιδιότητες όπως έχουν αναπτυχθεί στην Ενότητα 4.3.7. Αρχικά, παρασκευάστηκε το διάλυμα κάθε παραγώγου προς ακτινοβόληση το οποίο επιπλέον περιλαμβάνει NADH και EDTA, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Ενότητας 4.4.5.2. Το κάθε δείγμα ακτινοβολήθηκε με τη διάταξη που περιγράφηκε στην Ενότητα 4.2.3.2 και λαμβανόταν φάσμα απορρόφησης ανά λεπτό ακτινοβόλησης στο χρονικό διάστημα 0 min – 20 min (όσο είναι δυνατό). Η ισχύς της ακτινοβολίας είναι $4,65 \text{ mW/cm}^2$. Τα φάσματα απορρόφησης κατεγράφησαν με τη φασματοφωτομετρική διάταξη μέτρησης απορρόφησης της Ενότητας 4.2.1.

Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε κυβέττες Quartz απορρόφησης 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 απορρόφησης. Στην αρχή κάθε σειράς μετρήσεων πραγματοποιούνταν ο μηδενισμός του σήματος λόγω απορρόφησης του διαλύτη καθώς και του θορύβου του οργάνου. Η ταχύτητα σάρωσης παρέμενε σταθερή σε όλα τα πειράματα, στα 480 nm/min.

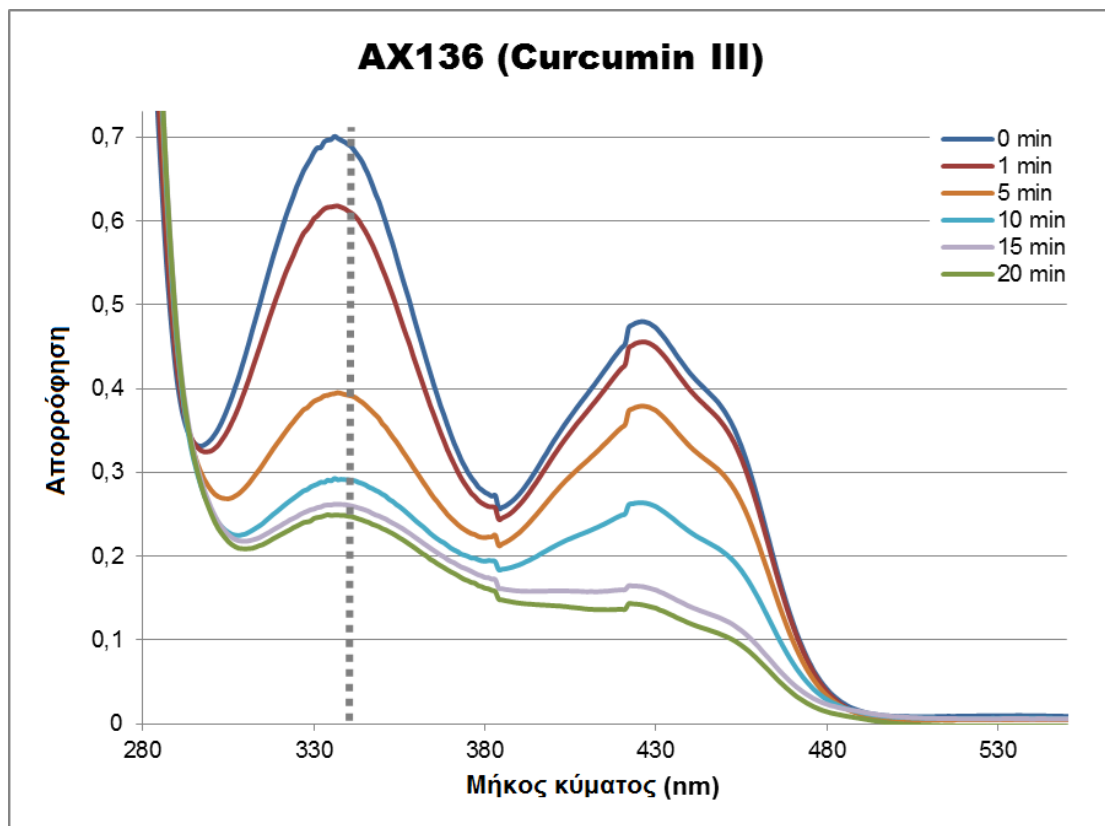
5.5.2 Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων μετά από ακτινοβόληση



Εικόνα 5.5-1: Φάσματα απορρόφησης διαλύματος AX126 με NADH μετά από ακτινοβόληση 0, 1, 5, 15 και 20 λεπτών. Επισήμανση της χαρακτηριστικής κορυφής του NADH στα 340 nm.



Εικόνα 5.5-2: Φάσματα απορρόφησης διαλύματος AX127 με NADH μετά από ακτινοβολήση 0, 1, 5, 15 και 20 λεπτών. Επισήμανση της χαρακτηριστικής κορυφής του NADH στα 340 nm.



Εικόνα 5.5-3: Φάσματα απορρόφησης διαλύματος AX136 με NADH μετά από ακτινοβολήση 0, 1, 5, 15 λεπτών. Επισήμανση της χαρακτηριστικής κορυφής του NADH στα 340 nm.

Τα φάσματα απορρόφησης κάθε διαλύματος κουρκουμίνης – NADH χωρίς ακτινοβολία αλλά και μετά από χρόνο ακτινοβολήσης 1, 5, 10, 15 και 20 λεπτά απεικονίζονται στις Εικόνες 5.5-1, 5.5-2 και 5.5-3.

Παρατηρούμε ότι τα φάσματα παρουσιάζουν δυο κορυφές:

- τη χαρακτηριστική κορυφή της εκάστοτε κουρκουμίνης (στα 435 nm για τις AX126 και AX127 και στα 425 για την AX136),
- τη χαρακτηριστική κορυφή του NADH περίπου στα 340 nm.

Σύμφωνα με τα πειράματα, είναι εμφανές ότι όλα τα παράγωγα παρουσιάζουν πτώση των κορυφών τους μετά από την ακτινοβολήση. Η μείωση της χαρακτηριστικής κορυφής απορρόφησης της εκάστοτε κουρκουμίνης είναι αναμενόμενη καθώς επέρχεται φωτολεύκανση της ουσίας. Από την άλλη πλευρά, η μείωση της κορυφής απορρόφησης του NADH στα 340 nm καταδεικνύει το σχηματισμό NAD⁺, φαινόμενο που υποδηλώνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών στο διάλυμα. Συνεπώς, όλα τα παράγωγα παρουσιάζουν δραστηριότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών μετά την ακτινοβολήση.

Η πτώση των κορυφών του φάσματος απορρόφησης στα 340 nm παρατηρείται από το πρώτο κίολας λεπτό ακτινοβολίας και είναι ραγδαία στο διάστημα 1 – 10 min ενώ μετέπειτα συνεχίζεται με αργότερους ρυθμούς και οι κορυφές (όσο ακόμα διακρίνονται) τείνουν να σταθεροποιηθούν. Προκύπτει, λοιπόν, ότι οι κουρκουμίνες παράγουν περισσότερες ελεύθερες ρίζες στο διάστημα ακτινοβολίας 1 – 10 min. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται εντονότερο στα παράγωγα AX127 και AX136 ενώ φαίνεται λιγότερο στην AX126.

5.5.3 Υπολογισμός καμπυλών απορρόφησης – χρόνου στα 340 nm μετά από ακτινοβολήση σε διάλυμα κουρκουμίνης με NADH

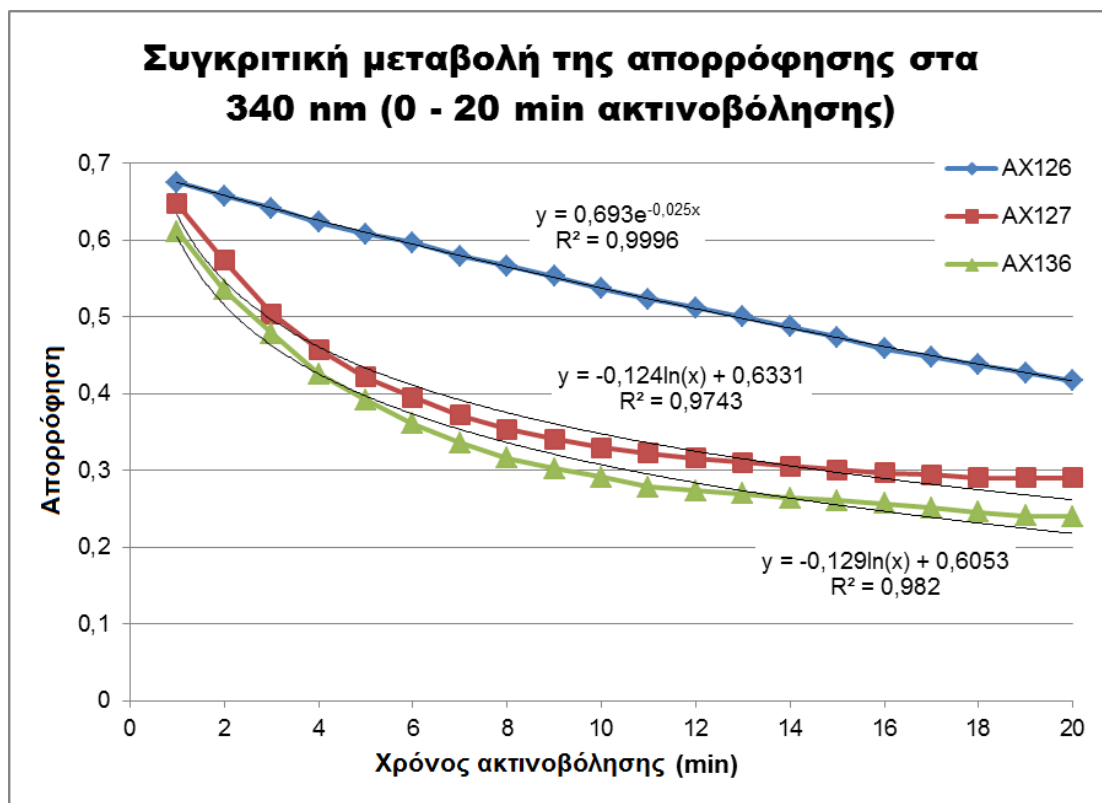
Λαμβάνοντας υπόψη την επισκόπηση των φασμάτων απορρόφησης που αναλύθηκε στην προηγούμενη ενότητα, θα εστιάσουμε στις μεταβολές της κορυφής των 340 nm καθώς αποτελεί το δείκτη παραγωγής ελευθέρων ριζών στα διαλύματα. Η συμπεριφορά της εν λόγω κορυφής μας επιτρέπει να εξάγουμε συμπεράσματα σχετικά με τη δραστηριότητα του κάθε παραγωγού κουρκουμίνης όσον αφορά τις ελεύθερες ρίζες.

Οι καμπύλες μεταβολής της απορρόφησης των διαλυμάτων κουρκουμίνης – NADH στα 340 nm με την πάροδο του χρόνου ακτινοβολήσης (0 min – 20 min) απεικονίζονται συγκεντρωτικά στην Εικόνα 5.5-4 για όλες τις κουρκουμίνες. Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα, οι συγκεκριμένες καμπύλες χαρακτηρίζονται από τις παρακάτω εξισώσεις:

- **AX126 (Curcumin I):** $y = 0,693e^{-0,025x}$ με $R^2 = 0,9996$,
- **AX127:** $y = -0,124 \ln(x) + 0,6331$ με $R^2 = 0,9743$,

- **AX136 (Curcumin III):** $y = -0,129\ln(x) + 0,6053$ με $R^2 = 0,982$,

όπου y το σήμα απορρόφησης που προκύπτει από τα μετρούμενα δείγματα και x ο χρόνος ακτινοβολήσης.

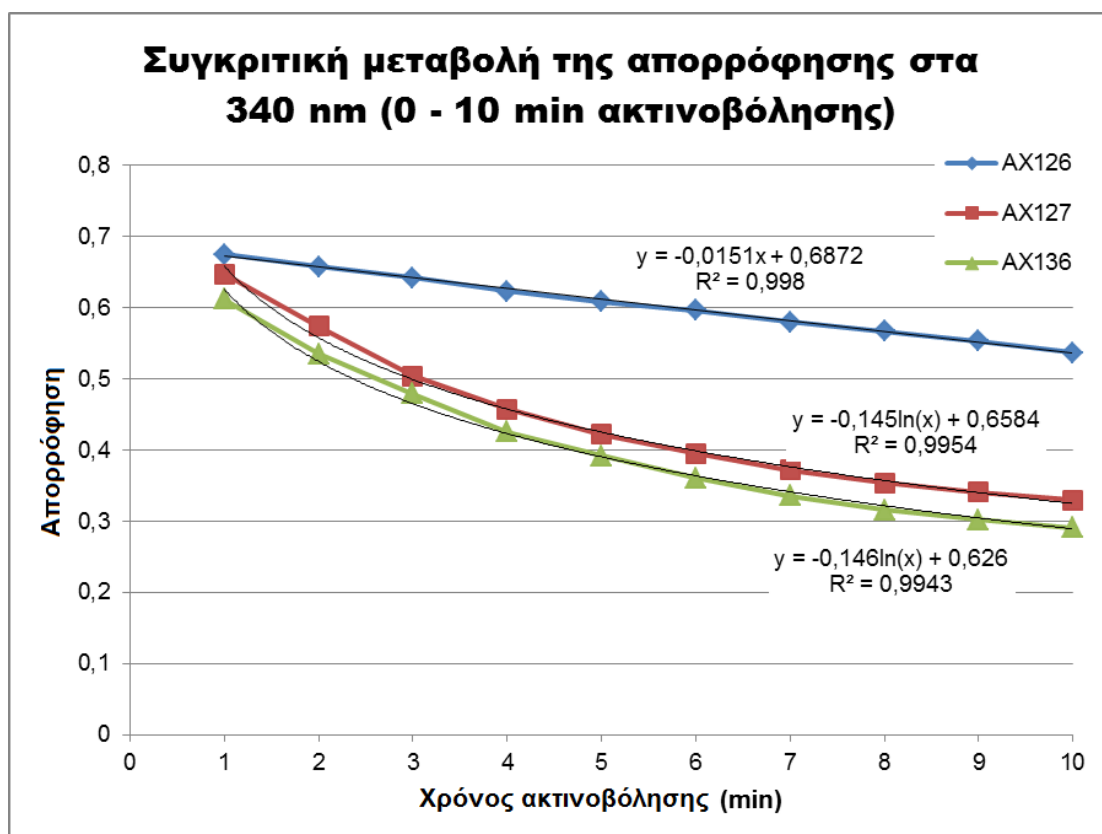


Εικόνα 5.5-4: Συγκριτικές καμπύλες μεταβολής απορρόφησης των διαλυμάτων στα 340nm, ως προς το χρόνο ακτινοβολήσης (0 min – 20 min) μελετώντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Παρατηρούμε ότι για την AX126 η ένταση του σήματος απορρόφησης του διαλύματος στα 340 nm παρουσιάζει εκθετική πτώση ως προς το χρόνο ενώ για τις AX127 και AX136 η πτώση προσεγγίζεται λογαριθμικά ως προς το χρόνο ακτινοβολίας.

Επιπροσθέτως, βλέπουμε ότι με την πάροδο του χρόνου η κορυφή στα 340 nm δεν εξαφανίζεται εντελώς αλλά τείνει να σταθεροποιηθεί σε μια τιμή της τάξης των 0,2 – 0,3 (για τις AX127 και AX136). Αυτό το φαινόμενο συμβαίνει γιατί το τελικό φάσμα απορρόφησης επηρεάζεται τόσο από την απορρόφηση του NADH / NAD⁺ αλλά και την αντίστοιχη απορρόφηση της κουρκουμίνης. Συνεπώς, ανατρέχουμε στα πειράματα φωτολεύκανσης απορρόφησης (Εικόνα 5.4-1) και παρατηρούμε ότι μετά από 15 – 20 min ακτινοβολήσης, τα παράγωγα παρουσιάζουν μια μέγιστη απορρόφηση της τάξης του 0,2 – 0,3 που συνάδει με τα αποτελέσματα της παρούσας σειράς πειραμάτων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Ενότητας 5.5.2, προηγούμενα, η πτώση των κορυφών του φάσματος απορρόφησης στα 340 nm είναι ραγδαία στο διάστημα 1 – 10 min. Για το λόγο αυτό, προκειμένου να εξαγουν ακριβέστερα αποτελέσματα όσον αφορά την παραγωγή ελευθέρων ριζών, θα εστιάσουμε στο συγκεκριμένο τμήμα των μετρήσεών μας. Στο διάγραμμα της Εικόνας 5.5-5, υπολογίζονται συγκεντρωτικά οι καμπύλες μεταβολής της απορρόφησης των διαλυμάτων στα 340 nm με την πάροδο του χρόνου ακτινοβολήσης μόνο για το διάστημα 1 min – 10 min.



Εικόνα 5.5-5: Συγκριτικές καμπύλες μεταβολής απορρόφησης των διαλυμάτων στα 340nm, ως προς το χρόνο ακτινοβολήσης (0 min – 10 min) μελετώντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα, οι συγκεκριμένες καμπύλες χαρακτηρίζονται ακριβέστερα από τις παρακάτω εξισώσεις:

- **AX126 (Curcumin I):** $y = -0,0151x + 0,6872$ με $R^2 = 0,998$,
- **AX127:** $y = -0,145 \ln(x) + 0,6584$ με $R^2 = 0,9954$,
- **AX136 (Curcumin III):** $y = -0,146 \ln(x) + 0,626$ με $R^2 = 0,9943$,

όπου y το σήμα απορρόφησης που προκύπτει από τα μετρούμενα δείγματα και x ο χρόνος ακτινοβολήσης.

Παρατηρούμε ότι για την AX126 η ένταση του σήματος απορρόφησης του διαλύματος στα 340 nm για ακτινοβολία 1 min – 10 min παρουσιάζει γραμμική πτώση σε σχέση με το χρόνο ενώ για τις AX127 και AX136 η πτώση προσεγγίζεται λογαριθμικά ως προς το χρόνο ακτινοβολίας με σχεδόν ίσο συντελεστή (-0,145 ή -0,146). Συνεπώς, οι AX127 και AX136 συμπεριφέρονται σχεδόν με τον ίδιο τρόπο όσον αφορά την παραγωγή ελευθέρων ριζών στα πρώτα 10 λεπτά ακτινοβολίας ενώ η AX126 παράγει με πολύ αργότερους ρυθμούς.

Κεφάλαιο 6: Γενικά συμπεράσματα



6.1 Συμπεράσματα - Συζήτηση

6.1.1 Συμπεράσματα σχετικά με την απορρόφηση και το φθορισμό

Όπως είδαμε και στην ενότητα 5.1, οι τρεις κουρκουμίνες παρουσιάζουν σημαντική απορρόφηση στην περιοχή 320 nm – 480 nm και διατηρούν τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματός τους αν και παρατηρείται πολύ ελαφριά μετατόπιση της κορυφής τους. Συγκρίνοντας τις τρεις ουσίες, μπορούμε να πούμε με σχετική ασφάλεια ότι, για δεδομένο εύρος συγκέντρωσης, οι μεγαλύτερες τιμές του μοριακού συντελεστή απορρόφησης παρατηρούνται στην AX127 ενώ οι χαμηλότερες στην AX126 (Curcumin I).

Οι ανωτέρω παρατηρήσεις είναι ιδιαίτερα σημαντικές γιατί η συμπεριφορά των ουσιών κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία καθορίζεται κατά πολύ από την ικανότητα απορρόφησης που παρουσιάζουν. Κατά συνέπεια, εφόσον οι φωτοευαίσθητοποιητές δρουν με την απορρόφηση επαρκούς φωτός, οι AX126, AX127 και AX136 κρίνονται ικανοποιητικές όσον αφορά το εν λόγω χαρακτηριστικό του για περαιτέρω μελέτη στη φωτοδυναμική θεραπεία.

Στη συνέχεια, η μελέτη των κουρκουμινών σε διαφορετικούς διαλύτες (ενότητα 5.2) κατέδειξε ότι στους οργανικούς διαλύτες και τα τρία παράγωγα διατηρούν τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματός τους. Αντίθετα, η χρήση υδατικού μέσου ως διαλύτη προκάλεσε τη μείωση της απορρόφησης των ουσιών με συνέπεια τη δυσκολία διάκρισης της χαρακτηριστικής κορυφής. Η παρατήρηση αυτή, δηλαδή η εξαφάνιση της κορυφής απορρόφησης καθώς και η μείωση του μοριακού συντελεστή απορρόφησης στο μέγιστο μήκος κύματος είναι αποτέλεσμα της συσσωμάτωσης των μορίων της κουρκουμίνης σε υδατικά μέσα.

Το συμπέρασμα αυτό αποτελεί ιδιαίτερα κρίσιμη πληροφορία καθώς η διαλυτότητα και σταθερότητα της ουσίας στα υδατικά διαλύματα είναι βασικό απαιτούμενο χαρακτηριστικό ενός φωτοευαίσθητοποιητή ώστε να επιτρέπεται η κυκλοφορία και η συγκέντρωσή του στα κύτταρα. Επίσης, η φωτοευαίσθητη ουσία απαιτείται να μη σχηματίζει συσσωματώματα αφού δεν επιθυμείται να προκαλέσει νοσηρότητα όπως θρόμβωση, εγκεφαλικό επεισόδιο, καρδιακή προσβολή κτλ. Ως εκ τούτου, τα υπό εξέταση παράγωγα κουρκουμίνης δεν ικανοποιούν αυτές τις απαιτήσεις και ενδεχομένως θα ήταν χρήσιμη η μελέτη της πιθανότητας εγκλεισμού τους σε ουσία με διαφορετικές ιδιότητες στους εν λόγω τομείς (π.χ. υδρόφιλες ουσίες, τροποποιημένο κέλυφος, νανοσωματίδια κτλ.).

Έπειτα, όπως είδαμε και στην ενότητα 5.3, οι τρεις κουρκουμίνες παρουσιάζουν εκπομπή φθορισμού στην περιοχή 440 nm – 640 nm για διεγέρσεις τόσο στα 405 nm όσο και στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησής τους. Παρατηρήσαμε ότι τα φάσματα φθορισμού για όλες τις κουρκουμίνες διατηρούν τη χαρακτηριστική μορφή τους και η ένταση του σήματος φθορισμού είναι γραμμικά ανάλογη με τη συγκέντρωση των ουσιών. Η μελέτη του φθορισμού των παραγώγων κατέδειξε εμφανώς ότι όλες οι υπό μελέτη κουρκουμίνες παρουσιάζουν ικανοποιητικές τιμές φθορισμού για κατάλληλη διέγερση. Κατά συνέπεια, προκύπτει το συμπέρασμα ότι έχουν προοπτικές προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στη φωτοδυναμική διάγνωση

όπου απαιτείται σημαντικός φθορισμός της ουσίας που συγκεντρώνεται στα καρκινικά κύτταρα.

6.1.2 Συμπεράσματα για τη φωτολεύκανση

Μελετώντας τη φωτολεύκανση των ουσιών στην ενότητα 5.4, παρατηρήσαμε ότι για όλα τα παράγωγα της κουρκουμίνης η μέγιστη ένταση του σήματος απορρόφησης του διαλύματος σημειώνει εκθετική πτώση ως προς το χρόνο ακτινοβολήσης. Συγκρίνοντας τις υπό εξέταση ουσίες, είδαμε ότι η AX127 παρουσιάζει τη γρηγορότερη και εντονότερη φωτολεύκανση κατά τις μετρήσεις απορρόφησης ενώ οι AX126 και AX136 έχουν περίπου την ίδια συμπεριφορά.

Στη συνέχεια, όσον αφορά τη φωτολεύκανση με μεθόδους φθορισμού, παρατηρήσαμε ότι η μέγιστη ένταση του σήματος φθορισμού του διαλύματος σημειώνει εκθετική πτώση ως προς το χρόνο ακτινοβολήσης για όλα τα παράγωγα της κουρκουμίνης. Συγκρίνοντας τις υπό εξέταση ουσίες, είδαμε ότι η AX136 παρουσιάζει την εντονότερη φωτολεύκανση κατά τις μετρήσεις φθορισμού ενώ η AX126 έχει την πιο σταθερή συμπεριφορά όσον αφορά τη σχετική φωτολεύκανση.

Η παρατηρούμενη διαφορετική συμπεριφορά φωτολεύκανσης των ουσιών μεταξύ των μετρήσεων απορρόφησης και φθορισμού, οφείλεται κατά ένα μεγάλο μέρος στη διαφορετική φύση των δυο φαινομένων αλλά και στα όργανα μέτρησης. Το φασματοφωτόμετρο φθορισμού είναι πολύ πιο ευαίσθητο από το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης και μπορεί να καταγράψει ακόμα και πολύ μικρές αλλαγές πιο αποτελεσματικά.

Η συμπεριφορά ενός φωτοευαίσθητοποιητή όσον αφορά τη φωτολεύκανση είναι μείζονος σημασίας καθώς καθορίζει την επιτυχία της θεραπείας ενώ συνδέεται άρρηκτα με την παραμένουσα φωτοευαίσθησία στον οργανισμό του ασθενή μετά από την φωτοδυναμική θεραπεία. Συνεπώς, η δράση της φωτοευαίσθητης ουσίας πρέπει να παραμένει σταθερή στα πρώτα λεπτά της ακτινοβολήσης κατά τη διάρκεια των οποίων εφαρμόζεται η φωτοδυναμική θεραπεία. Στη συνέχεια, όμως, είναι επιθυμητή η μείωση της φωτοφυσικής δράσης της ουσίας μετά την ολοκλήρωση της ακτινοβολήσης που συμβαίνει κατά την εφαρμογή της PDT ώστε να αποφεύγεται ενδεχόμενη κατά λάθος διέγερση μετέπειτα. Συνεπώς, τα παράγωγα της κουρκουμίνης που μελετήθηκαν ικανοποιούν το παραπάνω ζητούμενο αφού η ικανότητά τους να απορροφούν φως αλλά και να εκπέμπουν φθορισμό μειώνεται εκθετικά με το χρόνο ακτινοβολήσής τους.

6.1.3 Συμπεράσματα σχετικά με τη φωτοδυναμική δράση και την κυτταροτοξικότητα

Εξετάζοντας την ικανότητα των ουσιών για παραγωγή ελευθέρων ριζών (Ενότητα 5.5), παρατηρήσαμε ότι όλα τα παράγωγα παρουσιάζουν σημαντική δραστηριότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών μετά την ακτινοβολήσή τους. Συγκεκριμένα, είδαμε ότι η δραστηριότητα αυτή παρατηρείται από το πρώτο κίολας λεπτό ακτινοβολίας και είναι ραγδαία στο διάστημα 1 – 10 min ενώ μετέπειτα συνεχίζεται με αργότερους ρυθμούς και οι ουσίες τείνουν να σταθεροποιηθούν. Προκύπτει, λοιπόν, ότι οι κουρκουμίνες παράγουν το μεγαλύτερο ποσοστό ελεύθερων ριζών στο διάστημα

ακτινοβολίας 1 – 10 min και αυτό παρατηρείται εντονότερο στα παράγωγα AX127 και AX136 ενώ λιγότερο στην AX126.

Εστιάζοντας στο διάστημα ακτινοβολίας 1 – 10 min, όπου καταγράφεται η μεγαλύτερη δραστηριότητα των ουσιών, είδαμε ότι για την AX126 η παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι γραμμική σε σχέση με το χρόνο ενώ για τις AX127 και AX136 προσεγγίζεται λογαριθμικά ως προς το χρόνο ακτινοβολίας. Τέλος, συγκρίνοντας τα τρία παράγωγα, παρατηρήσαμε ότι οι AX127 και AX136 συμπεριφέρονται σχεδόν με τον ίδιο τρόπο όσον αφορά το ρυθμό παραγωγής ελευθέρων ριζών στα πρώτα 10 λεπτά ακτινοβολίας ενώ η AX126 παράγει με πολύ αργότερους ρυθμούς.

Στο κεφάλαιο 2 όπου μελετήσαμε – μεταξύ άλλων – τα χαρακτηριστικά μιας φωτοευαίσθητης ουσίας για τη φωτοδυναμική θεραπεία, αναφέραμε ότι η αποτελεσματική παραγωγή μονήρους οξυγόνου και άλλων δραστικών μορφών οξυγόνου συνιστά βασικότατη ιδιότητα. Ως εκ τούτου, η μελέτη μας κατέδειξε ότι οι υπό εξέταση ουσίες ικανοποιούν το ανωτέρω χαρακτηριστικό καθώς παράγουν ελεύθερες ρίζες (Reactive Oxygen Species) αποτελεσματικά ως προς το χρόνο ακτινοβολίας (λογαριθμικά οι AX127 και AX136 και γραμμικά η AX126) ενώ δεν υπάρχει παραγωγή ελευθέρων ριζών με την απουσία ακτινοβολίας.

6.1.4 Συζήτηση για την κourκουμίνη ως ενδεχόμενο φωτοευαίσθητοποιητή

Μια συνολική θεώρηση της εργασίας μας επιτρέπει να εξετάσουμε σε ποιο βαθμό τα παράγωγα κourκουμίνης που χρησιμοποιήσαμε έχουν ιδιότητες ανάλογες με τα χαρακτηριστικά ενός φωτοευαίσθητοποιητή αλλά και ποια σημεία χρήζουν περαιτέρω μελέτης. Συνολικά λοιπόν, συμπεραίνουμε ότι οι AX126, AX127 και AX136 παρουσιάζουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά των φωτοευαίσθητοποιητών:

- Παρατηρείται επιλεκτική, αξιόπιστη ενεργοποίηση των ουσιών με κατάλληλο μήκος κύματος.
- Σημειώνουν σημαντική απορρόφηση σε μήκη κύματος του ορατού φάσματος, ενώ διεγείρονται με ευκολία.
- Εκπομπή επαρκούς φθορισμού στο ορατό φάσμα, ιδιότητα χρήσιμη για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των ουσιών με μεθόδους φθορισμού και τη φωτοδυναμική διάγνωση.
- Διαπιστώνεται η εκθετική φωτολεύκανσή τους ως προς το χρόνο ακτινοβολίας τόσο μέσω μετρήσεων απορρόφησης όσο και φθορισμού.
- Είναι αποτελεσματικές στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου υπό κατάλληλες συνθήκες ακτινοβολίας.
- Η κourκουμίνη, βάση παραγωγής των υπό μελέτη ουσιών είναι φυσική ουσία, εμπορικά διαθέσιμη, με απλή σύνθεση και χαμηλό κόστος στη φυσική μορφή της.

Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν κάποια σημεία όπου οι ιδιότητες των υπό εξέταση παραγώγων έρχονται σε αντίθεση με τα βασικά χαρακτηριστικά των

φωτοευαισθητοποιητών. Τα σημαντικότερα είναι ότι οι μελέτες στις κουρκουμίνες κατέδειξαν:

- Χαμηλή διαλυτότητα στα υδατικά διαλύματα και σημαντικός σχηματισμός συσσωματωμάτων. Δεν υπάρχει αμφιφιλικότητα χωρίς προσμίξεις ή εγκλεισμό της ουσίας.
- Χαμηλή οπτική απορρόφηση στο ερυθρό και εγγύς υπέρυθρο τμήμα του φάσματος (τα παράγωγα απορροφούν στα 320 nm – 480 nm). Συνεπώς, επιτυγχάνεται χαμηλή διείσδυση στον ιστό.



6.2 Μια ματιά στο μέλλον

Τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να φαίνονται ευρέως οι δυνατότητες και προοπτικές της φωτοδυναμικής θεραπείας είτε ως μια εναλλακτική είτε ως μια συνεπικουρική μέθοδος θεραπείας του καρκίνου. Στη φωτοδυναμική θεραπεία χρησιμοποιούνται αρκετές φωτοευαίσθητες ουσίες οι οποίες διαφέρουν σε αρκετά χαρακτηριστικά τους. Η κουρκουμίνη και τα παράγωγά της αποτελούν ουσίες αρκετά υποσχόμενες όσον αφορά τη χρήση τους σε αυτή τη θεραπεία, πράγμα το οποίο γίνεται εμφανές από τα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης.

Η διαδικασία μελέτης μιας ουσίας προκειμένου να καθοριστούν με ακρίβεια οι φωτοφυσικές της ιδιότητες πριν προχωρήσουμε σε χρήση της στη φωτοδυναμική θεραπεία, αρχίζει από τα πειράματα σε διαλύματα της ουσίας, συνεχίζει με πειράματα σε κύτταρα και τέλος εξετάζεται και σε ζωντανούς οργανισμούς. Στη συγκεκριμένη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκαν παράγωγα της κουρκουμίνης σε μορφή διαλύματος. Κατ' ακολουθία, τα επόμενα βήματα της έρευνας για τα εν λόγω παράγωγα θα περιλαμβάνουν και τη μελέτη των ουσιών σε κύτταρα (*in vitro*) αλλά και πειραματόζωα (*in vivo*).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η προοπτική της εξέτασης των ουσιών σε κύτταρα προκειμένου να μελετηθούν εις βάθος οι παρακάτω παράμετροι, οι οποίες δεν αποτελούν στόχο της παρούσας εργασίας:

- **Επιλεκτικότητα των ουσιών στα υγιή και καρκινικά κύτταρα.** Οι φωτοευαισθητοποιητές θα πρέπει να συσσωρεύονται επιλεκτικά στους ιστούς, οι οποίοι είναι προσβεβλημένοι από τη νόσο και μόνο. Αυτό σημαίνει ότι δεν επηρεάζονται οι υγιείς ιστοί με το φωτισμό και την ενεργοποίηση της φωτοευαίσθητης ουσίας.
- **Χρόνος μέγιστης συγκέντρωσης των ουσιών στα κύτταρα (uptake).** Οι φωτοευαισθητοποιητές θα πρέπει να συγκεντρώνονται γρήγορα στα καρκινικά κύτταρα και η εξέταση αυτού του χρόνου καθώς και η ενδεχόμενη τροποποίησή του αποτελούν σημαντικό τμήμα των μελλοντικών μελετών στο πεδίο αυτό.
- **Χρόνος αποδέσμευσης από τους υγιείς ιστούς.** Είναι απαραίτητη η γρήγορη αποδέσμευσή της φωτοευαίσθητης ουσίας από τους υγιείς ιστούς ώστε να αποφεύγεται η ενεργοποίησή της από το φως του ήλιου, βοηθώντας στη χαμηλή παραμένουσα φωτοευαισθησία.
- **Βιοτοξικότητα (dark toxicity).** Οι φωτοευαισθητοποιητές θα πρέπει να ενεργοποιούνται μόνο με την παρουσία φωτός ενώ σε συνθήκες έλλειψής του, η τοξικότητα για το δέρμα και τα εσωτερικά όργανα πρέπει να είναι μηδενική ή ελάχιστη. Συνεπώς, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον να μελετηθεί η τοξικότητα των παραγώγων κουρκουμίνης χωρίς την παρουσία φωτός.

Στη συνέχεια, μετά την ολοκλήρωση των μελετών σε κύτταρα, αποτελεί πρόκληση αλλά και προοπτική, η εξέταση της χρήσης των εν λόγω ουσιών σε πειραματόζωα. Αρχικά, το ενδεχόμενο της χρήσης των παραγώγων κουρκουμίνης στη φωτοδυναμική θεραπεία καθιστά απαραίτητη τη **μελέτη και βελτιστοποίηση των παραμέτρων της μεθόδου** (π.χ. χρόνος και ισχύς ακτινοβόλησης) ώστε να

επιτευχθούν τα μέγιστα αποτελέσματα σε ζωντανούς οργανισμούς. Επιπλέον, είναι ιδιαίτερα χρήσιμο να εξεταστεί ενδελεχώς η **παραμένουσα φωτοευαισθησία** στα πειραματόζωα, καθώς αποτελεί τη σοβαρότερη παρενέργεια της φωτοδυναμικής θεραπείας. Κατά συνέπεια, υπάρχουν προοπτικές για μελέτες που θα συμβάλουν στον έλεγχο ή και την πλήρη εξάλειψη της παραμένουσας φωτοευαισθησίας.

Εκτός των ανωτέρω, η παρούσα μελέτη κατέδειξε την προοπτική των παραγώγων κουρκουμίνης όχι μόνο για τη φωτοδυναμική θεραπεία αλλά και για τη μέθοδο της **φωτοδυναμικής διάγνωσης**. Επομένως, προκύπτει ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης και μελέτης αυτής της προοπτικής με πειράματα επιλεκτικότητας των παραγώγων κουρκουμίνης ανάμεσα σε υγιή και καρκινικά κύτταρα όπου λόγω των διαφορετικών συγκεντρώσεων αναμένεται και διαφορά της έντασης του παρατηρούμενου φθορισμού.

Μέσω νέων πειραμάτων και περαιτέρω εξέτασής της σε κύτταρα και ζωντανούς οργανισμούς, τόσο μόνη της όσο και σε συνδυασμό με άλλες ουσίες, η κουρκουμίνη μπορεί να διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο στο μέλλον της φωτοδυναμικής θεραπείας.





Βιβλιογραφία

- [1] Ackroyd R, Kelty C, Brown N. and Reed M. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology* Volume 74, Issue 5, pages 656–669, November 2001.
- [2] Photosensitizers in clinical PDT *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Volume 1, Issue 1, May 2004, Pages 27-42 Allison, R.R.; Downie, G.H.; Cuenca, R.; Hu, X.-H.; Childs, C.J.; Sibata, C.H.
- [3] Kessel D. Photodynamic therapy: from the beginning. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* Volume 1, Issue 1, May 2004, Pages 3–7.
- [4] J. Moan and Q. Peng An outline of the history of PDT Thierry Patrice, Copyright Year:2003
- [5] Michael R. Hamblin, Ying-Ying Huang. Handbook of Photomedicine. Taylor & Francis, Oct 22, 2013
- [6] Κυριαζή Μ. Μελέτη συνδυαστικής δράσης φωτοδυναμικής θεραπείας και αντιοξειδωτικών σε καρκίνο του δέρματος με χρήση φωτοφυσικών μεθόδων. Διδακτορική διατριβή, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2007.
- [7] Ana P. Castano, Tatiana N. Demidova, Michael R. Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* December 2004 Volume 1, Issue 4, Pages 279–293
- [8] Tayyaba Hasan, Bernhard Ortel, Anne C.E. Moor and Brian W. Pogue. Chapter 40 Photodynamic Therapy of Cancer. Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition.
- [9] Luis Amselem, Kaan Gündüz, Alfredo Adan, Melisa Zişan Karslıoğlu, Amanda Rey, Noelia Sabater, Xavier Valdeperas. Photodynamic therapy of symptomatic choroidal nevi . *Middle East African Journal of Ophthalmology* Year : 2011, Volume : 18, Issue : 4, Page : 309-313
- [10] Brown SB1, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The lancet oncology*. Volume 5, No. 8, p497–508, August 2004
- [11] Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 1998 Jun 17;90(12):889-905
- [12] Arumainayagam, Nimalan; Moore, C. M.; Ahmed, Hashim U.; Emberton, M. Photodynamic therapy for focal ablation of the prostate. *World Journal of Urology*. October 2010 Vol: 28(5):571-576

- [13] Kubler, A.C. Photodynamic therapy. *Medical Laser Application*, Volume 20, Issue 1, May 2005, Pages 37-45
- [14] Katrin Kalka, Hans Merk, Hasan Mukhtar. Photodynamic therapy in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, March 2000 Volume 42, Issue 3, Pages 389–413
- [15] Εκπαιδευτικό υλικό μαθήματος «Ενόργανη Χημική Ανάλυση II», Τμήμα Χημείας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- [16] Εργαστηριακός οδηγός άσκησης «Διάγνωση καρκινικών μορφωμάτων σε ιστούς στην περιοχή του μακράν ερυθρού». Εκπαιδευτικό υλικό μαθήματος «Εισαγωγή στην Εμβιομηχανική και Εφαρμοσμένη Βιοφυσική», Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
- [17] Κανλή Γεωργία. Συγκριτική μελέτη αποδέσμευσης φωτοευαισθητοποιητών Foscan και Fospeg από καρκινικά κύτταρα με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού. Διπλωματική εργασία, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2012.
- [18] Juarranz A, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clinical and Translational Oncology*. 10(3):148-54. 2008 Mar
- [19] Α. Πετρή. Διερεύνηση μηχανισμών συνδυαστικής δράσης φωτός, φωτοευαίσθητων ουσιών & φυσικών αντιοξειδωτικών σε μοντέλα νεοπλασιών με ανάπτυξη οπτικών μεθόδων. Διδακτορική διατριβή, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2013.
- [20] Luksiene Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina (Kaunas)*. 2003;39(12):1137-50.
- [21] Alexander S. Sobolev, David A. Jans, Andrey A. Rosenkranz. Targeted intracellular delivery of photosensitizers. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 73 (1) 51-90, 2000.
- [22] Abraham Katzir. Lasers and Optical Fibers in Medicine. Elsevier, pages 92-93, Dec 2, 2012
- [23] 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: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011 Jul-Aug;61(4):250-81
- [24] Haanen C, Vermes I. Apoptosis: programmed cell death in fetal development. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. January 1996 Volume 64, Issue 1, Pages 129–133 (1996 Jan;64(1):129-33)
- [25] Andrikoula M, Vartholomatos G. Apoptosis: Cell death necessary for life. *Archives of Hellenic Medicine* 18 (5): 496-513 (Sep 2001)

- [26] Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology*. 2001 Feb;33(2):397-405.
- [27] Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2002 Jan;1(1):1-21.
- [28] Aladin Milutinovic. Application of Photodynamic Therapy to Lung Cancer Treatment. Tufts University, BME 101: Biomedical Optics, Spring 2007. Pages 1-16.
- [29] <http://omlc.ogi.edu/pdt> (Oregon Medical Website)
- [30] Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today*. 1999 Nov;4(11):507-517.
- [31] Bonnet R, Martinez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* 2001;57:9513-9547.
- [32] 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.
- [33] MacDonald IJ, Dougherty TJ. Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyrins Phthalocyanines* 2001;5:105–129
- [34] DeRosa MC, Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*. Volumes 233–234, 1 November 2002, Pages 351–371.
- [35] Μ Σπανάκης. Μελέτη δράσης φωτοδυναμικής θεραπείας σε συνδυασμό με καταστολή της ενδοκυττάριας αντιοξειδωτικής άμυνας σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Διπλωματική εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2012.
- [36] Derycke AS, de Witte PA. Liposomes for photodynamic therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004 Jan 13;56(1):17-30.
- [37] Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 145-160 (February 2005).
- [38] Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008 Dec 14;60(15):1627-37.
- [39] Konan YN, Gurny R, Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 66 (2002) 89-106.
- [40] Qian T, Kun L, Gao B, Zhu R, Wu X, Wang S. Photo-ionization and photo-excitation of curcumin investigated by laser flash photolysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Volume 116, December 2013, Pages 6–12.

- [41] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/curcumin>
- [42] Guoyong Xu, Dong Wei, Jiafeng Wang, Bo Jiang, Mahong Wang, Xuan Xue, Shuangsheng Zhou, Baoxing Wu, Minghua Jiang. Crystal structure, optical properties and biological imaging of two curcumin derivatives. *Dyes and Pigments*. Volume 101, February 2014, Pages 312–317.
- [43] Zhang L, Qi Z, Huang Q, Zeng K, Sun X, Li J, Liu YN. Imprinted-like biopolymeric micelles as efficient nanovehicles for curcumin delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Volume 123, 1 November 2014, Pages 15–22.
- [44] Tridib K. Goswami, Sudarshan Gadadhar, Bappaditya Gole, Anjali A. Karande, Akhil R. Chakravarty. Photocytotoxicity of copper(II) complexes of curcumin and N-ferrocenylmethyl-L-amino acids. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Volume 63, May 2013, Pages 800–810.
- [45] G.K. Jayaprakasha, L. Jaganmohan Rao, K.K. Sakariah. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chemistry*. Volume 98, Issue 4, 2006, Pages 720–724
- [46] G.K. Jayaprakasha, L. Jagan Mohan Rao, K.K. Sakariah. Chemistry and biological activities of *C. longa*. *Trends in Food Science & Technology*. Volume 16, Issue 12, December 2005, Pages 533–548.
- [47] Radha K. Maheshwari, Anoop K. Singh, Jaya Gaddipati, Rikhab C. Srimal. Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sciences*. Volume 78, Issue 18, 27 March 2006, Pages 2081–2087.
- [48] Hariharan R, Senthilkumar S, Suganthi A, Rajarajan M. Photodynamic action of curcumin derived polymer modified ZnO nanocomposites. *Materials Research Bulletin*, Volume 47, Issue 11, November 2012, Pages 3090–3099.
- [49] Diego Portes, Vieira Leite, Ricardo S. Navarro, Cristina F. Ortolani, Hérica Ricci, Fernanda Rossi Paolillo, Vanderlei Salvador Bagnato. PDT with blue light and curcumin for oral disinfection. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Volume 12, Issue 3, September 2015, Page 356.
- [50] Balaji B, Somyajit K, Banik B, Nagaraju G, Chakravarty AR. Photoactivated DNA cleavage and anticancer activity of oxovanadium(IV) complexes of curcumin. *Inorganica Chimica Acta*, Volume 400, 1 May 2013, Pages 142–150.
- [51] Simões MCF, Sousa JJS, Pais AC. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer Letters*, Volume 357, Issue 1, 1 February 2015, Pages 8–42.
- [52] Fernanda Rossi Paolillo, Phamilla Gracielli Sousa Rodrigues, Adalberto Vieira Corazza, Cristina Kurachi, Vanderlei Salvador Bagnato. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in the treatment of infected cutaneous wounds in rats. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Volume 12, Issue 3, September 2015, Page 354.
- [53] Prasad P.N. Introduction to Biophotonics. *Wiley Publishers*. 2003.

- [54] Perkin – Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer User’s Guide.
- [55] Lakowitz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Edition, *Springer*. 2006.
- [56] Perkin – Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer User’s Guide.
- [57] Γιόβα Δ. Εισαγωγή στη βιοϊατρική και κυτταρική μηχανική. *Εκδόσεις ΕΜΠ*. Αθήνα 2004. Σελ. 139 – 175.
- [58] Γιόβα Δ. Εισαγωγή στη νανοβιοφυσική και οπτική απεικόνιση. *Εκδόσεις Συμμετρία*. Αθήνα 2011.
- [59] Γιόβα Δ. Μετρήσεις και Έλεγχοι στη Βιοϊατρική Τεχνολογία. *Εκδόσεις ΕΜΠ*. Αθήνα 2009. Σελ. 87 – 100.
- [60] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/472301>
- [61] <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/14190250>
- [62] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n8129>
- [63] <http://www.curezone.org/ig/i.asp?i=62044>
- [64] <http://www.bmglabtech.com/media/35216/1043734.pdf>
- [65] http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/n8129pis.pdf
- [66] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/1233508>
- [67] Halliwell B. Gutteridge J. M. C. Free radicals in biology and medicine, 3rd edition. *Oxford Science Publications*, 1998.

