

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

ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Διδακτορική Διατριβή της Ελένης Γεωργιοπούλου Διπλωματούχου Φυσικού

AOHNA

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2024



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

ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Διδακτορική Διατριβή

της Ελένης Γεωργιοπούλου

Διπλωματούχου Φυσικού

Συμβουλευτική Επιτροπή: Αν. Καθ. Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος (Επιβλέπων) Καθ. Γεώργιος Ματσόπουλος Αν. Καθ. Μιχαήλ Ράλλης

Εγκρίθηκε από την επταμελή εξεταστική επιτροπή τη 12^η Δεκεμβρίου 2024.

Κ. Πολιτόπουλος

Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Μ.Π.

. Γ. Ματσόπουλος Μ. Ράλλης Καθηγητής Ε.Μ.Π. Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

Ε. Χριστοφόρου Καθηγητής Ε.Μ.Π.

. Η. Γλύτσης Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Ε. Χουρδάκης Επίκουρος Καθηγητής Ε.Μ.Π.

.

. Α. Δέτση Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

A Θ HNA, Δ EKEMBPIO Σ 2024

«Η υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», 2014-2020, στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας Υποδράση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ σε υποψηφίους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδας».



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

..... Ελένη Γεωργιοπούλου Διδάκτωρ Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών Ε.Μ.Π.

Copyright © Ελένη Γεωργιοπούλου, 2024. Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

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

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Φωτοδυναμική θεραπεία είναι μια σύγχρονη και επιλεκτική μέθοδος για την αντιμετώπιση του καρκίνου και άλλων μη καρκινικών παθήσεων, η οποία συνδυάζει τρεις παράγοντες: το φως, έναν φωτοευαισθητοποιητή και το οξυγόνο. Ο καθένας από αυτούς τους παράγοντες από μόνος του είναι αβλαβής, αλλά όταν συνδυάζονται, μπορούν να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο. Ο φωτοευαισθητοποιητής είναι ένα χημικό μόριο που απορροφάται επιλεκτικά από τους πάσχοντες ιστούς, ενώ τα οξειδωτικά προϊόντα που παράγονται κατά τις φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου Ι και ΙΙ οδηγούν στη νέκρωση των καρκινικών κυττάρων.

Το κύριο πλεονέκτημα της φωτοδυναμικής θεραπείας, σε σύγκριση με τις παραδοσιακές αντικαρκινικές θεραπείες, είναι η επιλεκτικότητά της η οποία οφείλεται: α) στην επιλεκτική συσσώρευση του φωτοευαισθητοποιητή στους πάσχοντες ιστούς, β) στην κατευθυνόμενη εφαρμογή του φωτός στις καρκινικές περιοχές και γ) στη δράση των οξειδωτικών προϊόντων τοπικά, χωρίς να επηρεάζονται υγιείς ιστοί.

Παρά τα πλεονεκτήματα της μεθόδου, η εφαρμογή της περιορίζεται, κυρίως λόγω της δυσκολίας εφαρμογής της σε όγκους που βρίσκονται σε εσωτερικά όργανα. Επιπλέον, η παραμένουσα φωτοευαισθησία αποτελεί σημαντικό εμπόδιο για την αποδοχή της θεραπείας, καθώς η ακούσια διέγερση του φωτοευαισθητοποιητή από το φυσικό φως μπορεί να προκαλέσει την καταστροφή του δέρματος και των ματιών. Η αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος και η βελτίωση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας μπορούν να ενισχυθούν μέσω της Νανοτεχνολογίας.

Η δημιουργία νανοσωματιδίων μεταφοράς των φωτοευαισθητοποιητών αποτελεί καινοτομία που μπορεί να βελτιώσει την δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας. Οι περισσότερες φωτοευαίσθητες ουσίες είναι υδρόφοβες, γεγονός που περιορίζει τη διαλυτότητά τους σε υδατικά διαλύματα άρα και την φωτοδυναμική τους δράση. Ο εγκλεισμός τους σε νανοσωματίδια μπορεί να βελτιώσει τη διαλυτότητά τους και να αυξήσει τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Ένας τύπος νανοσωματιδίων που παρουσιάζει ενδιαφέρον είναι οι κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες μπορούν να ενισχύσουν τη διαλυτότητα των υδρόφοβων φωτοευαισθητοποιητών και να παρατείνουν τη διάλυτότητα τους στον οργανισμό, προστατεύοντάς τους από την αποδόμηση και αυξάνοντας την επιλεκτικότητά τους ως προς τα καρκινικά κύτταρα.

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής τέθηκαν επιμέρους στόχοι που αφορούσαν: a) την ανάπτυξη νανοσωματιδίων μεταφοράς από φυσικές και χημικά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες για τον φωτοευαισθητοποιητή δεύτερης γενιάς SiCl₂Pc, και β) τη συγκριτική μελέτη των φωτοφυσικών και φωτοχημικών ιδιοτήτων της εγκλεισμένης και ελεύθερης φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc. Η παρούσα μελέτη επιδιώκει να διερευνήσει αν η ενσωμάτωση της φθαλοκυανίνης στις κυκλοδεξτρίνες: a) επηρεάζει τις φωτοφυσικές και φωτοχημικές ιδιότητες της SiCl₂Pc, β) μειώνει ή αποτρέπει τη συσσωμάτωση των μορίων της, γ) αυξάνει την υδατοδιαλυτότητα της, και δ) ενισχύει τη φωτοδυναμική της δράση σε καρκινικά κύτταρα της σειράς A431 του δέρματος. Στη σύγχρονη βιβλιογραφία, δεν υπάρχει μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης του SiCl₂Pc σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, ούτε έχει εγκλειστεί ο συγκεκριμένος φωτοευαισθητοποιητής σε νανοσωματίδια κυκλοδεξτρίνης.

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται πολλές διαφορετικές μέθοδοι για τη δημιουργία συμπλόκων εγκλεισμού. Στην παρούσα διατριβή, η τεχνική που επιλέχθηκε για τη δημιουργία των νανοσωματιδίων ήταν η μέθοδος kneading, η οποία θεωρείται ιδανική για τον εγκλεισμό υδρόφοβων μορίων όπως οι φθαλοκυανίνες. Η επίτευξη υψηλής απόδοσης εγκλεισμού είναι κρίσιμη για την ενίσχυση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία,

και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα χαρακτηριστικά των μορίων που εγκλείονται. Οι φθαλοκυανίνες, λόγω της έντονης υδροφοβικότητας και του μεγάλου μοριακού τους μεγέθους, εμφανίζουν περιορισμένη ικανότητα να εγκλειστούν αποτελεσματικά σε νανοσωματίδια. Παρά τις προκλήσεις αυτές, ο εγκλεισμός της SiCl₂Pc στις κυκλοδεξτρίνες επιτεύχθηκε, με σημαντική αύξηση της απόδοσης εγκλεισμού όταν χρησιμοποιήθηκε γ-κυκλοδεξτρίνη, γεγονός που καταδεικνύει τη σημασία του μεγέθους της κοιλότητας στην απόδοση.

Για τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων, μετρήθηκαν το μέγεθος, ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και το ζ-δυναμικό με τη μέθοδο δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS), ενώ οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της εκάστοτε κυκλοδεξτρίνης με την φθαλοκυανίνη, καθώς και η δομή των συμπλόκων, μελετήθηκαν με φασματοσκοπία FT-IR. Οι φωτοφυσικές μελέτες κατέδειξαν ότι ο εγκλεισμός της SiCl₂Pc στις φυσικές και τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες μείωσε τη συσσωμάτωση της στα υδατικά διαλύματα διατηρώντας τα φωτοφυσικά της χαρακτηριστικά χωρίς να επηρεάζεται η κβαντική απόδοση ή η φωτοδυναμική της ικανότητα. Οι φωτοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η SiCl₂Pc είναι χημικά σταθερή τόσο στην ελεύθερη όσο και στην εγκλεισμένη της μορφή. Επίσης, μελετήθηκε η ικανότητα παραγωγής ελεύθερων ριζών (ROS) των πέντε φθαλοκυανίνης κατάφεραν να μειώσουν την συσσωμάτωσή της βελτιώνοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών, καθιστώντας τα σύμπλοκα αποτελεσματικά για φωτοδυναμικές εφαρμογές.

Από τις μελέτες φωτοδυναμικής δράσης της ελεύθερης και εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες SiCl₂Pc, τα νανοσωματίδια παρουσίασαν ισχυρότερη φωτοδυναμική δράση συγκριτικά με την ελεύθερη μορφή. Αυτό αποδίδεται κυρίως στην αυξημένη διαλυτότητα του φωτοευαισθητοποιητή στο υδατικό περιβάλλον, η οποία προήλθε από την ενθυλάκωσή του στις κυκλοδεξτρίνες. Η βελτιωμένη διαλυτότητα και η μείωση της συσσωμάτωσης των μορίων αύξησαν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή και ενίσχυσαν την κυτταροτοξικότητά του στις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα της φθαλοκυανίνης με τις κυκλοδεξτρίνες β-CD και HP-β-CD παρουσίασαν σημαντική κυτταροτοξικότητα ακόμα και στις χαμηλότερες δόσεις ενέργειας, με την SiCl₂Pc-β-CD να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική, ενώ τα σύμπλοκα με τις Me-β-CD και γ-CD δεν εμφάνισαν σημαντικά αποτελέσματα σε χαμηλές δόσεις, αλλά έγιναν πιο αποτελεσματικά με την αύξηση της ισχύος ακτινοβόλησης, με το σύμπλοκο SiCl₂Pc-γ-CD να ξεγωρίζει. Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η φωτοδυναμική δράση της ελεύθερης SiCl₂Pc και των συμπλόκων με τις Me-β-CD και γ-CD ήταν δοσο-εξαρτώμενη: με την αύξηση της δόσης ενέργειας, αυξήθηκε και ο κυτταρικός θάνατος. Αντίθετα, τα σύμπλοκα με τις β-CD και HP-β-CD εμφάνισαν inverse dose dependent photodynamic effect, δηλαδή η αύξηση της ισχύος ακτινοβόλησης μείωσε τη φωτοδυναμική δράση. Αυτό το φαινόμενο, παρόλο που έχει παρατηρηθεί και στη βιβλιογραφία, δεν είναι πλήρως κατανοητό. Τέλος, η μελέτη του επαγόμενου οξειδωτικού stress 0 και 24 ώρες μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία επιβεβαίωσε το inverse dose dependent photodynamic effect για τους φωτοευαισθητοποιητές SiCl₂Pc-β-CD και SiCl₂Pc-HP-β-CD. Αυτός ο μηγανισμός ενδεγομένως να περιορίζει την παρατεταμένη φωτοευαισθησία που μπορεί να παρατηρείται μετά τη θεραπεία, καθιστώντας αυτά τα σύμπλοκα πιο ασφαλή για κλινική χρήση.

Η SiCl₂Pc, αν και διαθέτει σημαντικές δυνατότητες ως φωτοευαισθητοποιητής λόγω της χημικής της δομής, έχει παραμείνει ανεξερεύνητη στη φωτοδυναμική θεραπεία κυρίως λόγω της υδροφοβικότητάς της. Η παρούσα διατριβή καλύπτει αυτό το κενό στη βιβλιογραφία, συμβάλλοντας στην κατανόηση της φωτοδυναμικής δράσης των φθαλοκυανινών πυριτίου, ενώ αναδεικνύει τη σημασία της ενθυλάκωσης της SiCl₂Pc σε νανοσωματίδια μεταφοράς, όπως οι κυκλοδεξτρίνες.

Η μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης της SiCl₂Pc σε καρκινικά κύτταρα A431, τα οποία υπερεκφράζουν τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), προσθέτει μια σημαντική διάσταση στην έρευνα. Η υπερέκφραση του EGFR συνδέεται με την επιθετική ανάπτυξη όγκων και αντίσταση στις θεραπείες, καθιστώντας τα κύτταρα αυτά κατάλληλο μοντέλο για την αξιολόγηση της PDT σε καρκίνους που εμφανίζουν παρόμοια χαρακτηριστικά.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής ανοίγουν νέους δρόμους για τη χρήση παραγώγων της φθαλοκυανίνης πυριτίου, υποδεικνύοντας ότι η ενθυλάκωση σε κυκλοδεξτρίνες θα μπορούσε να είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για υδρόφοβα μόρια που μέχρι τώρα δεν είχαν μελετηθεί λόγω προβλημάτων διαλυτότητας.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Φωτοδυναμική θεραπεία, φθαλοκυανίνες, κυκλοδεξτρίνες, σύμπλοκα εγκλεισμού

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a selective, innovative, and effective approach for treating cancer and certain non-cancerous diseases. It relies on the combined action of three key components: light, a chemical compound called a photosensitizer, and oxygen. On their own, none of these factors are toxic to cells. However, when used together, they can induce cell death. The photosensitizer is an exogenous chromophore that selectively accumulates in diseased tissues. The oxidative by-products generated during type I and II photochemical reactions are responsible for activating mechanisms that lead to the necrosis of cancer cells.

Compared to conventional cancer treatments, the greatest advantage of photodynamic therapy is its high selectivity, which can be attributed to three main reasons: a) the photosensitizer selectively concentrates in cancer tissues and cells, b) the excitation light can be precisely guided and focused on the affected areas, and c) the oxidative by-products have very short lifetime (on the order of nanoseconds), meaning they act only in the area where they are produced, without damaging healthy tissues in other parts of the body.

Despite its significant advantages, the broader application of photodynamic therapy remains limited compared to traditional cancer treatments. One major challenge that prevents its widespread acceptance by the medical community is the difficulty in applying the method to tumors located in internal organs. Delivering the excitation light to the cancerous tumor and determining the optimal concentration of the photosensitizer and the necessary energy dose to achieve tumor destruction are key obstacles to the successful application of the method.

Another significant challenge to the effectiveness and broader adoption of PDT is residual photosensitivity. Although the photosensitizer is selectively absorbed by diseased tissues, a small portion of it can also accumulate in healthy tissues. Exposure to natural light can excite these residual photosensitizer molecules, triggering cytotoxic reactions that damage healthy skin and eye tissues. Thus, a major challenge lies in eliminating residual photosensitivity while simultaneously optimizing the photodynamic efficacy of the photosensitive compounds. Nanotechnology plays a crucial role in overcoming this challenge.

The development of nanoparticle drug delivery systems represents a major breakthrough in both photodynamic therapy and medicine more broadly. Most photosensitizers used in PDT are hydrophobic, meaning they have limited solubility in aqueous environments. This leads to the formation of molecular aggregates that alter the photophysical and photochemical properties of the photosensitizers, reducing their bioavailability and limiting their photodynamic efficacy in biological systems. Encapsulating these molecules in transport nanoparticles can enhance their solubility in aqueous solutions, thereby improving their effectiveness.

In recent years, there has been significant growth in the variety of nanoparticle systems used for delivering photosensitizers. Carbon-based nanoparticles, such as quantum dots, carbon nanotubes, fullerenes, and others, as well as liposomes, micelles, gold nanoparticles, and polymeric or ceramic nanoparticles, are just a few examples of the types of nanomaterials that have been developed. Among these, cyclodextrins, which are natural cyclic oligosaccharides, hold particular promise for photodynamic therapy. Encapsulating hydrophobic photosensitizers in the cavity of cyclodextrins enhances their solubility and, as a result, improves their photodynamic

performance. Moreover, cyclodextrins are biocompatible with the human body. This means that photosensitizer molecules encapsulated within their cavity remain stable for longer periods within the body, allowing them to effectively target cancer cells without being degraded.

The aim of this dissertation was to explore two main objectives: a) the creation of drug delivery nanoparticles using natural and chemically modified cyclodextrins for the second-generation photosensitizer SiCl₂Pc, and b) a comparative study of the photophysical and photochemical properties of encapsulated versus free phthalocyanine SiCl₂Pc. The research aims to determine whether the encapsulation of phthalocyanine in cyclodextrins: a) affects the photophysical and photochemical properties of SiCl₂Pc, b) reduces or, ideally, prevents the aggregation of its molecules, c) increases its water solubility, and d) enhances its photodynamic action of the photosensitizer SiCl₂Pc on any type of cancer cell line, nor has this specific photosensitizer been encapsulated in cyclodextrin nanoparticles.

Various methods for creating inclusion complexes are described in the literature. In this dissertation, the kneading technique was chosen for the creation of nanoparticles, as it is the preferred method for encapsulating hydrophobic molecules like phthalocyanines. Achieving a high encapsulation efficiency is critical to maximizing the therapeutic potential of nanoparticles in photodynamic therapy and is dependent on the properties of the molecules being encapsulated. Phthalocyanines, due to their strong hydrophobicity and large molecular size, typically exhibit lower encapsulation efficiency in nanoparticles. Despite these challenges, the encapsulation of SiCl2Pc in cyclodextrins was successfully achieved. Notably, encapsulation efficiency improved significantly when γ -cyclodextrin was used, highlighting that the cavity size of each cyclodextrin plays a crucial role in encapsulation success. In conclusion, despite the aforementioned limitations, the choice of the kneading technique proved to be effective.

Regarding the characterization of the delivery nanoparticles, the size, polydispersity index (PDI), and zeta potential were measured using dynamic light scattering (DLS). The results showed only minor variations in hydrodynamic diameter, while the PDI values were high, indicating moderate size distribution uniformity among the inclusion systems. This high PDI is likely due to the tendency of cyclodextrins to form aggregates in aqueous solutions at room temperature, resulting from insufficient surface charge. Additionally, non-inclusion interactions of phthalocyanine with the external surface of the cyclodextrins also contributed to the PDI values. Finally, the measured zeta potential values suggested that the nanoparticle systems exhibited moderate stability in aqueous environments, with the phthalocyanine complex with γ -CD being the most stable. The negative zeta potential values indicate that the alignment of the cyclodextrin molecules is such that the non-substituted hydroxyl (-OH) groups are oriented toward the aqueous environment, which could potentially make the cyclodextrin surface hydrophilic.

To complete the nanoparticle characterization, the interactions between the cyclodextrin molecules (host molecules) and the phthalocyanine (guest molecule), as well as the structure of the inclusion complexes, were examined using FT-IR spectroscopy. The spectra of the complexes showed similarities to those of pure cyclodextrins, with noticeable shifts in the wavenumbers of the characteristic peaks of the pure cyclodextrins, indicating interactions between the phthalocyanine and the cyclodextrins. The absence of the characteristic C-N stretching vibration

peak of the pyrrole structure found in pure phthalocyanine in all four inclusion complexes indicates that the phthalocyanine was encapsulated within the cyclodextrin cavities. However, only part of the phthalocyanine molecules appeared to be located within the cyclodextrin cavities.

From the photophysical absorption studies, it became evident that free SiCl₂Pc is a poorly soluble substance with a strong tendency to aggregate, even in organic solvents. Its absorption spectrum is significantly influenced by the solvent in which it is dissolved. Specifically, in the aqueous solvent PBS, the absorption maximum showed a considerable decrease compared to the absorption maximum observed in the organic solvents DMSO and ethanol. This reduction in the absorption maximum is a result of the aggregation of SiCl₂Pc molecules in aqueous media due to its hydrophobicity.

Regarding the absorption spectra of the phthalocyanine encapsulated in cyclodextrins, an increase in the intensity of the absorption maximum was observed. Additionally, in organic solvents, the absorption spectra were more defined, especially when the phthalocyanine was encapsulated in the chemically modified HP- β -CD and Me- β -CD. In these spectra, the absorption peak in the Q-band region is clearly visible. When comparing the absorption spectra of free and encapsulated phthalocyanine in PBS, an increase in the absorption intensity was observed. These observations suggest that encapsulating the phthalocyanine in cyclodextrins reduced the aggregation of SiCl₂Pc molecules.

Regarding the fluorescence of SiCl₂Pc, the corresponding spectra lead to the conclusion that the phthalocyanine interacts differently with each cyclodextrin. For the SiCl₂Pc- β -CD complex, a decrease in fluorescence intensity was observed due to encapsulation, whereas for the other three complexes, encapsulation resulted in an increased fluorescence emission. The increased fluorescence intensity indicates that the cyclodextrin cavity provides a better and more protective environment for the phthalocyanine, preventing its aggregation in the various solvents. It is worth noting that all five complexes exhibited strong fluorescence emission, and therefore, they can be used in both photodynamic diagnosis and therapy.

This work demonstrated that the encapsulation of SiCl₂Pc in both natural and chemically modified cyclodextrins reduced the degree of aggregation in all solvents, without affecting its photophysical properties. As a result, the photosensitizer molecules remain in a monomeric form, without altering the quantum yield or photodynamic ability of SiCl₂Pc.

Photochemical studies were conducted to investigate whether the structure of phthalocyanine, both in its free and encapsulated form, changes in the presence of light. This process, known as photobleaching, results in the molecule losing its fluorescence ability. For phthalocyanines, their photodegradation is attributed to the destruction of the C-N rings that form the molecule. The results of this dissertation revealed that all five photosensitizers are chemically stable molecules. In the case of photochemical degradation of their structures, either new peaks would have been observed in the fluorescence spectra, indicating the formation of new molecules, or a decrease in fluorescence intensity would have occurred. On the contrary, all the compounds exhibited a strong increase in fluorescence intensity, particularly during the first few minutes of irradiation. This increase can be attributed to several factors. According to the literature, laser radiation can break the phthalocyanine molecular aggregates in solutions. This mechanism has been described by other researchers, who noted that laser radiation can shift the equilibrium

between monomeric and dimeric phthalocyanine molecules in solution. Moreover, more phthalocyanine is released from the cyclodextrins during irradiation, leading to an increase in fluorescence intensity.

Next, the sufficient production of free radicals by SiCl₂Pc in both its free and encapsulated forms was investigated. The efficient generation of free radicals is one of the most crucial characteristics a photosensitizer must have to achieve a significant photodynamic effect. The results showed that all five compounds produced a desirable and significant amount of free radicals (ROS). The largest amount of free radicals was produced by SiCl₂Pc-Me- β -CD, while a substantial amount of ROS was also generated by SiCl₂Pc- γ -CD. In conclusion, the increased ability of the phthalocyanine-cyclodextrin complexes to produce free radicals is attributed to the reduction of the hydrophobicity of phthalocyanine.

Photodynamic studies of free and cyclodextrin-encapsulated phthalocyanine at a concentration of 0.75 μ M and irradiation with four different power doses (9, 12, 15, and 18 mW/cm²) revealed that the encapsulated forms of SiCl2Pc exhibited stronger photodynamic activity compared to the free phthalocyanine. Encapsulating the photosensitizer in cyclodextrins increased its solubility in aqueous environments, resulting in greater cytotoxicity under the same experimental conditions. The reduction in aggregation increased the intracellular concentration and enhanced its photodynamic action. Moreover, the encapsulation of SiCl₂Pc in β -CD and HP- β -CD cyclodextrins led to significant cytotoxicity even at lower energy doses. It is noteworthy that the phthalocyanine complex with β -cyclodextrin at lower energy doses reduced cell viability by 50% (LD50) and could be considered the most promising photosensitizer, as it reduced cell viability to 39% after just 3 minutes of irradiation at 12 mW/cm². The SiCl₂Pc-HP- β -CD complex showed lower cytotoxicity at lower energy doses, which is consistent with the ROS production studies. In contrast, the phthalocyanine complexes with Me- β -CD and γ -CD did not show significant cytotoxic effects at lower energy doses. However, when irradiated with higher energy doses, SiCl₂Pc- γ -CD proved to be a more effective photosensitizer.

From the above results, it is evident that the photodynamic effect of free SiCl2Pc was dosedependent, meaning that as the energy dose increased, cell death increased. The same behavior was observed with the phthalocyanine-cyclodextrin complexes with γ -CD and Me- β -CD. In contrast, the phthalocyanine complexes with β -CD and HP- β -CD exhibited a decrease in cell viability with increasing irradiation power (inverse dose-dependent photodynamic effect). Similar findings have been reported in the literature, but the biological mechanism explaining this phenomenon is not fully understood. It is likely that intracellular mechanisms block the increased production of free radicals by transforming them into non-reactive species, resulting in reduced photodynamic activity of the photosensitizer. It should be noted that this mechanism could limit the prolonged photosensitivity observed after each treatment. The inverse dose-dependent photodynamic effect observed with the two photosensitizers, SiCl₂Pc- β -CD and SiCl₂Pc-HP- β -CD, was confirmed by the study of induced intracellular oxidative stress 0 and 24 hours after photodynamic therapy.

In conclusion, SiCl₂Pc, although a highly hydrophobic molecule with a strong tendency to aggregate, exhibits relatively good photodynamic action against skin cancer, specifically on A431 cells. Encapsulation in natural and chemically modified cyclodextrins, such as β -CD, γ -CD, HP-

 β -CD, and Me- β -CD, improves its aqueous solubility, significantly reducing its tendency to aggregate. The encapsulation does not alter its photophysical characteristics; rather, it enhances free radical production, thereby improving its photodynamic effect. The phthalocyanine complexes with SiCl2Pc exhibit stronger photodynamic activity than free phthalocyanine. The inverse dose-dependent photodynamic effect observed with the two photosensitizers SiCl₂Pc- β -CD and SiCl₂Pc-HP- β -CD could limit the prolonged photosensitivity observed after each treatment, which is a major disadvantage of photodynamic therapy. All five photosensitizers emitted sufficient fluorescence in the visible region of the spectrum. This property makes them useful for photodynamic diagnosis as well.

KEYWORDS: Photodynamic therapy, PDT, phthalocyanines, cyclodextrins, inclusion complexes

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Η/Υ Ε.Μ.Π υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Κωνσταντίνου Πολιτόπουλου και της Δρ. Ελένης Αλεξανδράτου. Τους ευχαριστώ και τους δύο ολόψυχα για την δυνατότητα και την ευκαιρία που μου έδωσαν ώστε να πραγματοποιήσω τη διατριβή μου. Οι προκλήσεις που αντιμετώπισα ήταν πολλές και χωρίς τη συμβολή, την καθοδήγηση και τις συμβουλές τους δεν θα τα είχα καταφέρει. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την κα Αναστασία Δέτση, καθηγήτρια της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. η οποία με προθυμία δέχτηκε να συνεργαστούμε για την δημιουργία των νανοσωματιδίων παρέχοντάς μου τον απαραίτητο εξοπλισμό. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ελένη Καβέτσου, η οποία με καθοδήγησε σε ό, τι χρειαζόμουν σχετικά με την ανάπτυξη των νανοσωματιδίων. Ολόθερμες ευχαριστίες στέλνω σε όλους τους φίλους μου, αλλά και σε όσα άτομα πέρασαν, αλλά δεν έμειναν στη ζωή μου μέχρι το τέλος του ταξιδιού αυτού. Όλοι τους ήταν πολύ καλοί δάσκαλοι. Τελικά, η διαδρομή αυτή δεν ήταν παρά μια μάχη ανάμεσα σε μένα και τον εαυτό μου.

ΠΕΡΙΛ	.НΨН	5
EYXAF	ΡΙΣΤΙΕΣ	15
ΛΙΣΤΑ	ΕΙΚΟΝΩΝ	20
ΛΙΣΤΑ	ΠΙΝΑΚΩΝ	25
KEΦA/	ΔΑΙΟ 1. ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	26
1.1	Ιστορική αναδρομή	26
1.2	Αρχή της Φωτοδυναμικής θεραπείας	26
1.3	Μηχανισμός φωτοδυναμικής δράσης	27
1.4	Αλληλεπιδράσεις φωτός – ιστού	28
1.5	Αλληλεπιδράσεις φωτός με τα χρωμοφόρα μόρια	30
1.6	Μηχανισμοί επαγόμενης από την φωτοδυναμική θεραπεία νέκρωσης καρκινικών ό 32	όγκων
1.7	Πηγές φωτός στη Φωτοδυναμική θεραπεία	32
1.8	Περιορισμοί και προκλήσεις στη Φωτοδυναμική θεραπεία	33
ΚΕΦΑ/	ΛΑΙΟ 2. ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΕΣ	35
2.1	Τα βασικά χαρακτηριστικά των φωτοευαισθητοποιητών	35
2.2	Γενιές φωτοευαισθητοποιητών	36
2.2	2.1 1 ^η γενιά φωτοευαισθητοποιητών	36
2.2	2.2 2η γενιά φωτοευαισθητοποιητών	37
2.2.2.1	Φθαλοκυανίνες	38
2.2	2.3 3η γενιά φωτοευαισθητοποιητών	42
2.2.3.1	Κυκλοδεξτρίνες	46
2.3	Στόχος της παρούσας διατριβής	55
ΚΕΦΑ/	ΛΑΙΟ 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ	56
3.1	Φασματοσκοπία απορρόφησης	56
3.1	.1 Απορρόφηση φωτός - Νόμος Lambert – Beer	56
3.1	.2 Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης	57
3.2	Φασματοσκοπία φθορισμού	58
3.3	Οπτική μικροσκοπία	60
3.4	Συστήματα laser στην φωτοδυναμική θεραπεία	61
3.4 ελεύθερης	I.1 Πειραματική διάταξη laser για την μελέτη παραγωγής ελευθέρων ριζών της και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης SiCl ₂ Pc	64
3.4 και της εγκ	I.2 Πειραματική διάταξη laser για την μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης της ελεύ ελεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης SiCl ₂ Pc	θερης 65

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

3.5	Μικροσκοπία φθορισμού	65
3.5.	1 Θαλαμίσκος μικροσκοπικής παρατήρησης ζωντανών κυττάρων	67
3.6 Spectroscopy,	Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared FT-IR)	l 68
3.6.	1 Μέθοδος Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)	74
ΚΕΦΑΛ	ΑΙΟ 4. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ	77
4.1	Πρωτόκολλα και μεθοδολογίες μοντέλου καρκίνου του δέρματος	77
4.1. δράσης.	 Ανάπτυξη μοντέλου κυττάρου καρκίνου του δέρματος για μελέτες φωτοδυναμική 77 	is
4.1.2	2 Μεθοδολογία απόψυξης κυτταρικής σειράς Α431	77
4.1.	3 Μεθοδολογία ανακαλλιέργειας κυτταρικής σειράς A431	77
4.1.4	4 Μεθοδολογία κατάψυξης κυτταρικής σειράς Α431	78
4.1.	5 Μεθοδολογία προσδιορισμού του αριθμού των κυττάρων	78
4.1.	6 Πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας – βιοχημικός έλεγχος MTT	79
4.1.΄ κυττάρων.	7 Μεθοδολογία μελέτης της επίδρασης του φωτός διέγερσης στην βιωσιμότητα των 80	V
4.1.3 κυκλοδεξτρί	8 Μεθοδολογία μελέτης της επίδρασης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις ίνες SiCl2Pc στην βιωσιμότητα των κυττάρων απουσία φωτός διέγερσης	81
4.1.9 δέρματος.	9 Μεθοδολογία μελέτης φωτοδυναμικής δράσης στο μοντέλο κυττάρου καρκίνου τ 82	ου
4.1. θεραπεία εν	10 Μεθοδολογία και πρωτόκολλο μελέτης του επαγόμενου από την φωτοδυναμική δοκυττάριου οξειδωτικού στρες μέσω μικροσκοπίας φθορισμού	82
4.1.10.1	Ιχνηθέτης φθορισμού	82
4.1.10.2 chlorome	Πρωτόκολλο επώασης κυττάρων με τον ιχνηθέτη φθορισμού 5-(and-6)- thyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester, CM-H₂DCFDA	83
4.1.10.3 επεξεργα	Μεθοδολογία ποσοτικοποίησης εκπεμπόμενου από το δείγμα φθορισμού μέσω σίας εικόνων φθορισμού από το μικροσκόπιο φθορισμού	84
4.2	Μεθοδολογίες δημιουργίας και χαρακτηρισμού συμπλόκων εγκλεισμού	84
4.2. λειοτρίβισης	1 Μεθοδολογία δημιουργίας συμπλόκων εγκλεισμού με την μέθοδο της υγρής 5 με τον σχηματισμό πάστας (kneading)	84
4.2.2	2 Απόδοση διεργασίας	84
4.2.	3 Απόδοση εγκλεισμού	85
4.2.4	4 Μεθοδολογίες χαρακτηρισμού των συμπλόκων εγκλεισμού	86
4.2.4.1 με χρήση	Μεθοδολογία προσδιορισμού μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμι της τεχνικής δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)	коύ 86

4.2.4.2 SiCl₂Pc με Spectroso	Μεθοδολογία μελέτης της δομής των συμπλόκων εγκλεισμού της φθαλοκυανίνης ε τις κυκλοδεξτρίνες μέσω της υπέρυθρης φασματοσκοπίας (Fourier Transform Infrare copy, FT-IR Spectroscopy).	ed . 87
4.3 εγκλεισμένης	Μεθοδολογία μελέτης των φωτοφυσικών ιδιοτήτων της ελεύθερης αλλά και της στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης SiCl2Pc	. 87
4.4 εγκλεισμένης	Μεθοδολογίες μελέτης των φωτοχημικών ιδιοτήτων της ελεύθερης αλλά και της στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc	. 88
4.4.	 Μεθοδολογία μελέτης φωτολεύκανσης μορίων (Photobleaching). 	88
4.4.	2 Μεθοδολογία μελέτης παραγωγής ελευθέρων ριζών (ROS)	88
ΚΕΦΑΛ	ΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	.89
5.1 SiCl ₂ Pc, με τις	Χαρακτηρισμός των συμπλόκων εγκλεισμού της δίχλωρο-φθαλοκυανίνης πυριτίου, ; κυκλοδεξτρίνες	. 89
5.1. κυκλοδεξτρ	1 Απόδοση διεργασίας κατά τη διαδικασία εγκλεισμού της φθαλοκυανίνης στις ίνες89	
5.1.	2 Απόδοση εγκλεισμού φθαλοκυανίνης στις κυκλοδεξτρίνες	.90
5.1. μεταφοράς	3 Υπολογισμός μεγέθους, κατανομής μεγέθους και ζ-δυναμικού των νανοσυστημάτα με χρήση της τεχνικής δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS).	ov .92
5.1. φασματοσκ	4 Μελέτη της δομής των συμπλόκων εγκλεισμού με χρήση της Υπέρυθρης οπίας (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR Spectroscopy).	.93
5.2	Φωτοφυσικές μελέτες	00
5.2.	1 Φάσματα απορρόφησης ελεύθερης και εγκλεισμένης σε κυκλοδεξτρίνες SiCl ₂ Pc. 1	00
5.2. διάφορους δ	2 Φάσματα απορρόφησης ελεύθερης και εγκλεισμένης σε κυκλοδεξτρίνες SiCl2Pc σ διαλύτες	ε 01
5.2.	3 Φάσματα φθορισμού ελεύθερης και εγκλεισμένης σε κυκλοδεξτρίνες SiCl ₂ Pc1	05
5.3	Φωτοχημικές μελέτες1	06
5.3.	1 Μελέτες φωτολεύκανσης (Photobleaching)	06
5.3.	2 Μελέτη παραγωγής ελευθέρων ριζών (Reactive Oxygen Species (ROS))	10
5.4 βιωσιμότητα τ	Μελέτη επίδρασης της δίχλωρο-φθαλοκυανίνης-πυριτίου και των συμπλόκων αυτής α ων κυττάρων απουσία φωτός	5τη 13
5.5	Μελέτη επίδρασης φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων	14
5.6 κυκλοδεξτρίνε	Μελέτη φωτοδυναμικής δράσης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις ες SiCl2Pc στη βιωσιμότητα των κυττάρων1	16
5.7	Μελέτη επαγόμενου ενδοκυττάριου οξειδωτικού stress από τη φωτοδυναμική θεραπε 122	ία
ANAKE	ΦΑΛΑΙΩΣΗ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ1	29
ПАРАР	THMA1	136
ΒΙΒΛΙΟ	ФРАФІА1	44

ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. Στάδια Φωτοδυναμικής Θεραπείας ¹⁵	27
Εικόνα 1.2: Φωτοφυσικός μηχανισμός Φωτοδυναμικής θεραπείας ¹⁵	28
Εικόνα 1.3: Α) Βάθος διείσδυσης ακτινοβολίας χρώματος μπλε, πράσινο και κόκκινο. Β) Πιθανές αλληλεπιδράσεις φωτός – ιστού: ανάκλαση, απορρόφηση, σκέδαση ¹⁹ .	20
	29
Εικόνα 1.4: Οπτικό παράθυρο βιολογικών ιστών ²⁴	30
Εικόνα 1.5: Διάγραμμα Jablonski ²⁴	31
Εικόνα 1.6: Πηγές φωτός στην Φωτοδυναμική θεραπεία ³⁵	33
Εικόνα 2.1:Χημική δομή Photofrin ¹⁵	37
Εικόνα 2.2: Φάσματα απορρόφησης και φθορισμού της Photofrin ⁵³	37
Εικόνα 2.3: Χημικές δομές φωτοευαισθητοποιητών 2 ^{ης} γενιάς ¹⁵	38
Εικόνα 2.4: Δομή φθαλοκυανίνης	39
Εικόνα 2.5: Μόριο SiCl ₂ Pc ⁵⁸	40
Εικόνα 2.6: Πρώιμες αντιδράσεις σύνθεσης της SiCl ₂ Pc ⁵⁸	40
Εικόνα 2.7: Αντιδράσεις σύνθεσης SiCl ₂ Pc από τις πρόδρομες ουσίες φθαλιμίδιο και φθαλονιτρίλιο ⁵⁸	41
Εικόνα 2.8: Συμμετρικές και μη συμμετρικές SiPcs που συντέθηκαν από την πρόδρομη SiCl2Pc και την SiPc(OH)2 ⁵⁸	42
Εικόνα 2.9: Σχεδιασμός φωτοευαισθητοποιητών τρίτης γενιάς: α) σύζευξη PS με τμήμα στόχευσης β) εγκλεισμός ενός PS σε νανοσυστήματα μεταφοράς ⁶²	43
Εικόνα 2.10: Λιπόσωμα ⁶⁴	44
Εικόνα 2.11: Είδη πολυμερικών νανοσωματιδίων ⁶⁵	44
Εικόνα 2.12: Νανοσωματίδια άνθρακα: α) νανοσωλήνες, β) φουλερένια, γ) νανοΐνες, δ) γραφένιο και ε) carbon black ⁷¹	45
Εικόνα 2.13: Διαφορετικές μορφές νανοσωματιδίων διοξειδίου του πυριτίου με βάση α) τη μορφολογία, β) το σχήμα και γ) τη μορφολογία των πόρων ⁷³	46
Εικόνα 2.14: Οι θέσεις των υδροξυλίων στο μόριο της β-κυκλοδεξτρίνης ⁷⁵	47
Εικόνα 2.15: Δομή α, β και γ-κυκλοδεξτρίνης ⁷⁸	48
Εικόνα 2.16: Αλληλεπίδραση μορίου ξενιστή και φιλοξενούμενου μορίου ⁸²	50

Εικόνα 2.17: Σύμπλοκο εγκλεισμού του PS Cora στην γ-κυκλοδεξτρίνη ⁹⁶	53
Εικόνα 2.18: Μόριο κυκλοδεξτρίνης το οποίο έχει συζευχθεί με την ZnPc. Επιπλέον στην κοιλότητά της έχει εγκλειστεί φάρμακο που χρησιμοποιείται στην	
χημειοθεραπεία97	53
Εικόνα 2.19: Σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών τα οποία έχουν ενσωματωθεί στην επιφάνεια νανοσωματιδίων χρυσού ⁹⁸	54
Εικόνα 3.1: Απορρόφηση διαλύματος συγκέντρωσης c	56
Εικόνα 3.2: Η διάταξη απορρόφησης Lambda 35, Perkin Elmer ¹¹¹	57
Εικόνα 3.3: Το οπτικό διάγραμμα του οργάνου και η πορεία της φωτεινής δέσμης	58
Εικόνα 3.4: Η διάταξη φθορισμού LS 45, Perkin Elmer ¹¹³	59
Εικόνα 3.5: Οπτικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου φθορισμού	59
Εικόνα 3.6: Ανάστροφο μικροσκόπιο ¹¹⁵	61
Εικόνα 3.7: Καμπύλη βαθμονόμησης του διοδικού laser GCSLS -10 -1500m	62
Εικόνα 3.8: Γραφική παράσταση τάσης-μήκους κύματος του διοδικού laser GCSLS -10 -1500m.	63
Εικόνα 3.9: Διάταξη μελέτης παραγωγής ελευθέρων ριζών	64
Εικόνα 3.10: Διάταξη μελέτης της φωτοδυναμικής δράσης των φωτοευαισθητοποιητών	65
Εικόνα 3.11: Olympus BX-50 ²⁵	66
Εικόνα 3.12: Θαλαμίσκος μικροσκοπικής παρατήρησης ζωντανών κυττάρων ²⁵	67
Εικόνα 3.13: Κατανομή ενέργειας ανά στιβάδα δόνησης α) ενός αρμονικού ταλαντωτή και β) ενός μην αρμονικού ταλαντωτή, όπου r_0 η απόσταση των κέντρων δύο ατόμων, ενός μορίου σε κατάσταση ισορροπίας, r_1 και r_2 το ελάχιστο και μέγιστο μήκος του δεσμού των δύο ατόμων κατά τη δόνησής τους, E_D =ενέργεια διάστασης ¹¹⁰	69
Εικόνα 3.14: α) Συμμετρική δόνηση τάσης, β) Ασύμμετρη δόνηση τάσης ¹¹⁰	69
Εικόνα 3.15: α) Ομοεπίπεδη δόνηση κάμψης, β) Δόνηση κάμψης εκτός επιπέδου ¹¹⁰ .	70
Εικόνα 3.16:+: Δόνηση σείσης πάνω από το επίπεδο ισορροπίας, -: Δόνηση σείσης κάτω από το επίπεδο ισορροπίας ¹¹⁰	70
Εικόνα 3.17: Δόνηση αιώρησης ¹¹⁰	71
Εικόνα 3.18: +: δόνηση συστροφής πάνω από το επίπεδο ισορροπίας, -: δόνηση συστροφής κάτω από το επίπεδο ισορροπίας ¹¹⁰	71
Εικόνα 3.19: Δόνηση ψαλιδιού	72

Εικόνα 3.21: α) Φασματοφωτόμετρο FT-IR Alpha II Compact με κρύσταλλο διαμαντιού ATR και β) το άκρο του βραχίονα πίεσης ¹¹⁶	74
Εικόνα 3.22: Υδροδυναμική διάμετρος ¹¹⁷	75
Εικόνα 3.22: Διάταξη DLS ¹¹⁷	76
Εικόνα 4.1: α) πλάκα μέτρησης κυττάρων Neubauer (αιματοκυτταρόμετρο Neubauer), β) πλέγμα μέτρησης πλακιδίου γ) παράδειγμα μετρήσιμων και μη μετρήσιμων κυττάρων	79
Εικόνα 4.2: (α) το μη φθορίζον μόριο H ₂ DCFDA (β) ο ιχνηθέτης φθορισμού CM-H ₂ DCFDA και (γ) το φάσμα απορρόφησης και εκπομπής φθορισμού του ιχνηθέτη φθορισμού CM-H ₂ DCFDA (πηγή: ThermoFisher Scientific Company)	83
Εικόνα 4.3: Φάσματα φθορισμού των κυκλοδεξτρινών σε DMF (λexc = 360 nm)	86
Εικόνα 5.1: Απόδοση διεργασίας για την SiCl2Pc και τις διάφορες κυκλοδεξτρίνες	90
Εικόνα 5.2: Απόδοση εγκλεισμού για την SiCl2Pc και τις διάφορες κυκλοδεξτρίνες	91
Εικόνα 5.3: Φάσμα FT-IR της φθαλοκυανίνης SiCl ₂ Pc	93
Εικόνα 5.4: Φάσμα FT-IR της β-κυκλοδεξτρίνης	94
Εικόνα 5.5: Φάσμα FT-IR της ΗΡ-β-κυκλοδεξτρίνης	95
Εικόνα 5.6: Φάσμα FT-IR της γ-κυκλοδεξτρίνης	95
Εικόνα 5.7: Φάσμα FT-IR της Με-β-κυκλοδεξτρίνης	96
Εικόνα 5.8: Φάσμα FT-IR του συμπλόκου SiCl2Pc-β-CD	97
Εικόνα 5.9: Φάσμα FT-IR του συμπλόκου SiCl ₂ Pc-HP-β-CD	97
Εικόνα 5.10: Φάσμα FT-IR του συμπλόκου SiCl ₂ Pc-Me-β-CD	98
Εικόνα 5.11: Φάσμα FT-IR του συμπλόκου SiCl ₂ Pc-γ-CD	98
Εικόνα 5.12: Φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες SiCl ₂ Pc στο DMF (10 μM).	100
Εικόνα 5.13: Φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης SiCl2Pc (10 μM) σε διάφορους διαλύτες	102
Εικόνα 5.14: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου SiCl2Pc-β-CD (10 μM) σε διάφορους διαλύτες	102
Εικόνα 5.15: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου SiCl2Pc-HP-β-CD (10 μM) σε διάφορους διαλύτες	103
Εικόνα 5.16: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου SiCl ₂ Pc-Me-β-CD (10 μM) σε διάφορους διαλύτες	103

Εικόνα 5.17: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου SiCl2Pc-γ-CD (10 μM) σε διάφορους διαλύτες
Εικόνα 5.18: Φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης και εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης (10 μΜ) σε PBS104
Εικόνα 5.19: Φάσματα φθορισμού της ελεύθερης SiCl ₂ Pc (1 μM) και των συμπλόκων SiCl ₂ Pc-β-CD (1 μM), SiCl ₂ Pc-HP-β-CD (0,1 μM), SiCl ₂ Pc-Me-β-CD (0,1 μM) και SiCl ₂ Pc-γ-CD (0,5μM) σε DMF για διέγερση στα 360 nm
Εικόνα 5.20: Φάσματα φθορισμού της ελεύθερης SiCl ₂ Pc συγκέντρωσης 1 μM με ισχύ ακτινοβόλησης 10 mW/cm ² 106
Εικόνα 5.21: Φάσματα φθορισμού της SiCl ₂ Pc-β-CD συγκέντρωσης 0,5 μΜ με ισχύ ακτινοβόλησης 10 mW/cm ² 107
Εικόνα 5.22: Φάσματα έντασης φθορισμού της SiCl ₂ Pc-HP-β-CD συγκέντρωσης 0,1 μΜ με ισχύ ακτινοβόλησης 10 mW/cm ² 107
Εικόνα 5.23: Φάσματα έντασης φθορισμού της SiCl ₂ Pc-Me-β-CD συγκέντρωσης 0,01 μΜ με ισχύ ακτινοβόλησης 10 mW/cm ² 108
Εικόνα 5.24: Φάσματα έντασης φθορισμού της SiCl ₂ Pc-γ-CD συγκέντρωσης 0,5 μΜ με ισχύ ακτινοβόλησης 10 mW/cm ² 108
Εικόνα 5.25: Μέγιστη ένταση φθορισμού ως συνάρτηση του χρόνου ακτινοβόλησης για τους πέντε φωτοευαισθητοποιητές και ισχύ ακτινοβόλησης 10 mW/cm ²
Εικόνα 5.26: Φάσματα φθορισμού του ιχνηθέτη φθορισμού CM-H2DCFDA κατά τη διάρκεια ακτινοβόλησης του διαλύματος της ελεύθερης SiCl2Pc (1 μM) σε PBS
Εικόνα 5.27: Φάσματα φθορισμού του ιχνηθέτη φθορισμού CM-H2DCFDA κατά τη διάρκεια ακτινοβόλησης του διαλύματος της SiCl2Pc-β-CD (1 μM) σε PBS
Εικόνα 5.28: Φάσματα φθορισμού του ιχνηθέτη φθορισμού CM-H2DCFDA κατά τη διάρκεια ακτινοβόλησης του διαλύματος της SiCl2Pc-HP-β-CD (1 μM) σε PBS111
Εικόνα 5.29: Φάσματα φθορισμού του ιχνηθέτη φθορισμού CM-H2DCFDA κατά τη διάρκεια ακτινοβόλησης του διαλύματος της SiCl2Pc-Me-β-CD (1 μM) σε PBS112
Εικόνα 5.30: Φάσματα φθορισμού του ιχνηθέτη φθορισμού CM-H2DCFDA κατά τη διάρκεια ακτινοβόλησης του διαλύματος της ελεύθερης SiCl2Pc-γ-CD (1 μM) σε PBS 112
Εικόνα 5.31: Ρυθμός παραγωγής ROS των φωτοευαισθητοποιητών στο PBS σε τελική συγκέντρωση 1 μΜ και ισχύ ακτινοβόλησης 10 mW/cm ²
Εικόνα 5.32: Διάγραμμα επίδρασης των πέντε φωτοευαισθητοποιητών στην βιωσιμότητα των κυττάρων απουσία φωτός. * p < 0,05 vs κύτταρα ομάδας ελέγχου
Εικόνα 5.33: Διάγραμμα ισχύος ακτινοβόλησης - βιωσιμότητας κυττάρων για διάρκεια ακτινοβόλησης 1 λεπτό

Εικόνα 5.34: Διάγραμμα ισχύος ακτινοβόλησης - βιωσιμότητας κυττάρων για διάρκεια ακτινοβόλησης 2 λεπτά	116
Εικόνα 5.35: Διάγραμμα ισχύος ακτινοβόλησης - βιωσιμότητας κυττάρων για διάρκεια ακτινοβόλησης 3 λεπτά	116
Εικόνα 5.36: Φωτοδυναμικό αποτέλεσμα της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες SiCl ₂ Pc για ισχύ ακτινοβόλησης 9 mW/cm ² . * p < 0.05 vs SiCl ₂ Pc, ** p < 0.005 vs SiCl ₂ Pc; *** p < 0.0001 vs SiCl ₂ Pc	117
Εικόνα 5.37: Φωτοδυναμικό αποτέλεσμα της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες SiCl_2Pc για ισχύ ακτινοβόλησης 12 mW/cm ² . * $p < 0.05$ vs SiCl_2Pc, ** $p < 0.0001$ vs SiCl_2Pc.	118
Εικόνα 5.38: Φωτοδυναμικό αποτέλεσμα της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες SiCl_2Pc για ισχύ ακτινοβόλησης 15 mW/cm ² . * $p < 0.05$ vs SiCl_2Pc, ** $p < 0.0001$ vs SiCl_2Pc.	119
Εικόνα 5.39: Φωτοδυναμικό αποτέλεσμα της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες SiCl ₂ Pc για ισχύ ακτινοβόλησης 18 mW/cm ² . * $p < 0.05$ vs SiCl ₂ Pc, ** $p < 0.0001$ vs SiCl ₂ Pc.	120
Εικόνα 5.40: Διάγραμμα βιωσιμότητας-δόσεων ισχύος ακτινοβόλησης μετά από 1 λεπτό ακτινοβόλησης για τους πέντε φωτοευαισθητοποιητές	121
Εικόνα 5.41: Διάγραμμα βιωσιμότητας-δόσεων ισχύος ακτινοβόλησης μετά από 3 λεπτά ακτινοβόλησης για τους πέντε φωτοευαισθητοποιητές	122
Εικόνα 5.42: Ελεύθερες ρίζες στα Α431 κύτταρα απουσία οποιουδήποτε ερεθίσματος (κύτταρα ομάδας ελέγχου).	124
Εικόνα 5.43: Ελεύθερες ρίζες στα A431 κύτταρα (α) αμέσως μετά από τη φωτοδυναμική θεραπεία και (β) 24 h μετά τη θεραπεία με 0.75 μM SiCl ₂ Pc-β-CD και ακτινοβόληση με λέιζερ στα 660 nm, 12 mW/cm ² για 3 λεπτά	126
Εικόνα 5.44: Ελεύθερες ρίζες στα A431 κύτταρα (α) αμέσως μετά από τη φωτοδυναμική θεραπεία και (β) 24 h μετά τη θεραπεία με 0.75 μM SiCl ₂ Pc-β-CD και ακτινοβόληση με λέιζερ στα 660 nm, 18 mW/cm ² για 3 λεπτά	127
Εικόνα 5.45: Διάγραμμα παραγωγής ελευθέρων ριζών στα A431 κύτταρα 0 ώρες μετά από φωτοδυναμική με 0.75 μM SiCl ₂ PC-β-CD (επώαση 4h) και ακτινοβόληση με διοδικό laser στα 660 nm για 3 λεπτά σε σχέση με τις ελεύθερες ρίζες της ομάδας ελέγχου	128
Εικόνα 5.46: Διάγραμμα παραγωγής ελευθέρων ριζών στα A431 κύτταρα 24 ώρες μετά από φωτοδυναμική με 0.75 μM SiCl ₂ PC-β-CD (επώαση 4h) και ακτινοβόληση με διοδικό laser στα 660 nm για 3 λεπτά σε σχέση με τις ελεύθερες ρίζες της ομάδας ελέγγου	128
5/w ₁ /200	120

ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

	Πίνακας 2.1: Χαρακτηριστικά των φυσικών κυκλοδεξτρινών	.48
	Πίνακας 2.2: Χαρακτηριστικά τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών	.49
	Πίνακας 3.1: Χαρακτηριστικά λειτουργίας διοδικού laser GCSLS -10 -1500m	. 62
	Πίνακας 3.2: Χαρακτηριστικά οπτικής ίνας	. 63
	Πίνακας 3.3: Χαρακτηριστικά λειτουργίας ενεργομέτρου	. 64
	Πίνακας 3.4: Στοιχεία κύβων του μικροσκοπίου φθορισμού Olympus BX-50	. 67
διάφορε	Πίνακας 4.1: Συνολικές δόσεις ενέργειας ακτινοβόλησης (mJ/cm2) για τις ες δόσεις ισχύος και τους χρόνους ακτινοβόλησης	. 81
κάθε οι	Πίνακας 4.2: Μαθηματικές σχέσεις έντασης φθορισμού-συγκέντρωσης για την υσία	. 86
εγκλεισ	Πίνακας 5.1: Απόδοση διεργασίας για τα τέσσερα διαφορετικά σύμπλοκα σμού των κυκλοδεξτρινών με την φθαλοκυανίνη SiCl2Pc	. 89
εγκλεισ	Πίνακας 5.2: Μετρήσεις DLS για τα τέσσερα διαφορετικά σύμπλοκα 5μού των κυκλοδεξτρινών με την φθαλοκυανίνη SiCl2Pc	.92
φθαλοκ	Πίνακας 5.3: Κυματαριθμοί χαρακτηριστικών κορυφών της ελεύθερης ευανίνης, των κυκλοδεξτρινών και των συμπλόκων εγκλεισμού	. 99

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

1.1 Ιστορική αναδρομή

Το φως έχει μακρά παράδοση στην ιατρική, όχι μόνο ως διαγνωστικό αλλά και ως θεραπευτικό εργαλείο. Οι θεραπευτικές του ιδιότητες έχουν ανακαλυφθεί από την αρχαιότητα. Οι και αργαίοι ινδικοί αιγυπτιακοί πολιτισμοί, συνδυάζοντας βότανα και ηλιακή ακτινοβολία.^{1,2}κατάφεραν να θεραπεύσουν δερματικές ασθένειες όπως η λεύκη και η ψωρίαση, ενώ οι αρχαίοι Έλληνες ήταν οι πρώτοι που εισήγαγαν τον όρο ηλιοθεραπεία. Μόλις όμως τον περασμένο αιώνα η γρήση του φωτός για τη θεραπεία ασθενειών έκανε την επανεμφάνισή της. Η ιδέα του κυτταρικού θανάτου μέσω της αλληλεπίδρασης του φωτός και ενός χημικού παράγοντα εισήγαγε μια νέα θεραπεία που ονομάστηκε Φωτοδυναμική Θεραπεία (Photodynamic Therapy, $PDT)^{2,3}$.

Αρχές του 1900 οι επιστήμονες παρατήρησαν την επίδραση του φωτός και των χρωστικών στους βιολογικούς ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, οι Friedrich Meyer-Betz and Hermann von Tappeiner στην Γερμανία, εργαζόμενοι ο ένας ανεξάρτητα από τον άλλο, παρατήρησαν ότι η χρωμοφόρα ουσία ακριδίνη όταν ενεργοποιηθεί από φως μπορεί να καταστρέψει μικροοργανισμούς. Έτσι επινοήθηκε ο όρος «Φωτοδυναμική Θεραπεία». Όμως τελικά για αρκετά χρόνια η θεραπεία αυτή παρέμεινε στο περιθώριο^{2,3}.

Από το 1960 και μετά και ειδικά την δεκαετία 1970-1980 η Φωτοδυναμική θεραπεία επανήλθε στο προσκήνιο αναδεικνύοντας την σπουδαιότητα της αιματοπορφυρίνης ως μέσο διάγνωσης του καρκίνου χάρη στις ερευνητικές προσπάθειες του Dr. Thomas Dougherty και της ομάδας του. Περαιτέρω έρευνες και κλινικές μελέτες κατέδειξαν την αποτελεσματικότητα της PDT για διάφορες ιατρικές εφαρμογές. Την δεκαετία του 1990, η Photofrin, ένα παράγωγο της αιματοπορφυρίνης, έγινε ο πρώτος φωτοευαισθητοποιητής που εγκρίθηκε από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για κλινική χρήση στην φωτοδυναμική θεραπεία³.

Σήμερα η Φωτοδυναμική θεραπεία έχει προσελκύσει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας ως μια αποτελεσματική, εξαιρετικά επιλεκτική και ελάχιστα επεμβατική μέθοδο για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου⁴⁻⁶, του εκφυλισμού της ωχράς κηλίδας⁷⁻⁹, ορισμένων μη κακοήθων δερματικών παθήσεων όπως η ακμή¹⁰ και η ψωρίαση¹¹ και την ενίσχυση της επούλωσης πληγών¹².

1.2 Αρχή της Φωτοδυναμικής θεραπείας

Η αρχή της φωτοδυναμικής θεραπείας βασίζεται στη συνδυασμένη δράση τριών παραγόντων: του φωτός, ενός χημικού μορίου που ονομάζεται φωτοευαισθητοποιητής και του οξυγόνου. Κανένας από αυτούς τους παράγοντες αν δράσουν ανεξάρτητα δεν είναι τοξικός για τα κύτταρα. Αντίθετα, η συνδυασμένη δράση τους μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο. Ο φωτοευαισθητοποιητής (PS) είναι ένα εξωγενές χρωμοφόρο μόριο με την ικανότητα να κατακρατείται επιλεκτικά από τους πάσχοντες ιστούς.

Τα στάδια της Φωτοδυναμικής θεραπείας παρουσιάζονται στην εικόνα 1.1. Αρχικά πραγματοποιείται η χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή στον ασθενή είτε συστηματικά είτε με τοπική επάλειψη. Έπειτα από το πέρας του χρονικού διαστήματος που απαιτείται ώστε να κατακρατηθεί η ουσία από τους πάσχοντες ιστούς, αυτοί ακτινοβολούνται με ακτινοβολία φωτός κατάλληλων φασματικών χαρακτηριστικών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του

φωτοευαισθητοποιητή και την έναρξη των φωτοχημικών αντιδράσεων τύπου Ι και ΙΙ τα προϊόντα των οποίων οδηγούν στην νέκρωση των μη υγιών κυττάρων^{13–15}.



Εικόνα 1.1. Στάδια Φωτοδυναμικής Θεραπείας¹⁵

1.3 Μηχανισμός φωτοδυναμικής δράσης

Όπως είναι ήδη γνωστό, η απορρόφηση των φωτονίων από τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή έχει σαν αποτέλεσμα την διέγερσή του στην πρώτη διεγερμένη στάθμης. Εν συνεχεία, είτε θα αποδιεγερθεί επιστρέφοντας στην βασική στάθμη, είτε μέσω εσωτερικής μετάπτωσης θα μεταβεί στην διεγερμένη τριπλή στάθμη. Η τριπλή διεγερμένη στάθμη χαρακτηρίζεται από μεγάλη διάρκεια ζωής (~μs) και είναι εξαιρετικής σημασίας για την φωτοδυναμική θεραπεία καθώς ο φωτοευαισθητοποιητής όσο παραμένει στη στάθμη αυτή μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα μόρια του βιολογικού μέσου καθώς και με το οξυγόνο.

Στην περίπτωση που το διεγερμένο μόριο του φωτοευαισθητοποιητή αντιδράσει με τα μόρια του υποστρώματος (π.χ. μια κυτταρική μεμβράνη), μπορεί να δώσει ή να πάρει ένα ηλεκτρόνιο και έτσι να εμπλακεί σε έναν μηχανισμό παραγωγής ελευθέρων ριζών. Ο μηχανισμός αυτός περιγράφει τις αντιδράσεις τύπου Ι (εικόνα 1.2). Τα πιο δραστικά είδη ελευθέρων ριζών που σχηματίζονται αποτελούν δραστικές μορφές οξυγόνου και είναι το ανιόν του υπεροξειδίου (O^{2^-}), το υδροξύλιο (OH^-) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).

Αντίθετα, αν μεταφέρει την ενέργειά του στο μοριακό οξυγόνο που υπάρχει στην πάσχουσα περιοχή, τότε δημιουργείται το μονήρες οξυγόνο που αποτελεί μια διεγερμένη κατάσταση του μοριακού οξυγόνου. Η αντίδραση αυτή είναι γνωστή ως αντίδραση τύπου ΙΙ (εικόνα 1.2). Το μονήρες οξυγόνο αντιδρά στη συνέχεια με το βιολογικό υπόστρωμα προκαλώντας οξειδωτική βλάβη και κυτταρικό θάνατο λόγω της έντονης δραστικότητάς του. Ο χρόνος ημιζωής του μονήρους οξυγόνου είναι πολύ μικρός (10-320nm) οπότε η δράση του περιορίζεται σε μια πολύ μικρή περιοχή και συγκεκριμένα στην περιοχή που βρίσκεται ο φωτοευαισθητοποιητής.

Και οι δύο τύποι αντιδράσεων παράγουν οξειδωτικά είδη τα οποία καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα, βλάπτουν το μικροαγγειακό σύστημα του όγκου και προκαλούν τοπική φλεγμονώδη αντίδραση^{13,15–17}.



Εικόνα 1.2: Φωτοφυσικός μηχανισμός Φωτοδυναμικής θεραπείας¹⁵

Λόγω του γεγονότος ότι οι φωτοευαισθητοποιητές έχουν μεγάλη σημασία για την αποτελεσματικότητα της PDT, έχουν καταβληθεί εκτεταμένες προσπάθειες για την ανάπτυξη του ιδανικού.

1.4 Αλληλεπιδράσεις φωτός – ιστού

Το ανθρώπινο δέρμα αποτελείται από τρεις κύριες στιβάδες: την επιδερμίδα, τη δερμίδα και τα υποδόρια στρώματα¹⁸⁻¹⁹. Πρόκειται για ένα ανομοιογενές μέσο εξαιτίας της δομής του. Το φως, ανάλογα με το μήκος κύματος που έχει όταν προσπίπτει σε αυτό, μπορεί είτε να διέλθει μέσα από τον ιστό, είτε να υποστεί ανάκλαση (εικόνα 1.3). Αν το φως διέλθει από τον ιστό, τότε

μπορούν να παρατηρηθούν τα φαινόμενα της απορρόφησης και της σκέδασης, ανάλογα με το μήκος κύματος του φωτός και τις οπτικές ιδιότητες του ιστού.

Εξαιτίας των διαφορετικών μορίων και δομών του ιστού, η ακτινοβολία σκεδάζεται, με αποτέλεσμα να χάνεται η αρχική κατευθυντικότητα και εστίαση της αρχικής δέσμης του φωτός. Από την άλλη, η απορρόφηση του φωτός προκαλεί την θέρμανση του καθώς και διάφορες φωτοχημικές αντιδράσεις και εξαρτάται από το είδος και τη σύσταση του βιολογικού ιστού²⁰⁻²⁴.



Εικόνα 1.3: Α) Βάθος διείσδυσης ακτινοβολίας χρώματος μπλε, πράσινο και κόκκινο. Β) Πιθανές αλληλεπιδράσεις φωτός – ιστού: ανάκλαση, απορρόφηση, σκέδαση¹⁹.

Στην φωτοδυναμική θεραπεία, σημαντικό ρόλο για την αποτελεσματικότητα της έχει το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας στον ιστό. Ως βάθος διείσδυσης ορίζεται το πάχος εκείνο του ιστού στο οποίο η ένταση του φωτός ελαττώνεται στο 1/e (37%), της αρχικής προσπίπτουσας τιμής.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 1.4, η περιοχή μεταξύ 600- 1300 nm χαρακτηρίζεται ως οπτικό παράθυρο βιολογικών ιστών, αφού τόσο η απορρόφηση των βασικότερων χρωμοφόρων του οργανισμού, όσο και το φαινόμενο της σκέδασης, ελαχιστοποιούνται. Έτσι, το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας στον ιστό μεγιστοποιείται. Χαρακτηριστικά, φως μήκους κύματος 630 nm διεισδύει 1-3 mm στον ιστό. Για τον λόγο αυτό στην φωτοδυναμική θεραπεία χρησιμοποιούνται πηγές φωτός οι οποίες εκπέμπουν στο κόκκινο²⁰⁻²⁴.



Εικόνα 1.4: Οπτικό παράθυρο βιολογικών ιστών²⁴

1.5 Αλληλεπιδράσεις φωτός με τα χρωμοφόρα μόρια

Κάθε μόριο αποτελείται από μια σειρά ενεργειακών σταθμών, κάθε μια από τις οποίες αποτελείται από δονητικά επίπεδα. Τα μόρια μπορούν να μεταβούν από μία χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη E_1 σε μία υψηλότερη E_2 μέσω της απορρόφησης φωτεινής ακτινοβολίας, η οποία είναι ίση με τη διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο σταθμών $\Delta E = E_2 - E_1$.

Η πολλαπλότητα Μ μιας ενεργειακής στάθμης περιγράφει την τροχιακή στροφορμή και σχετίζεται με το συνολικό spin S της στάθμης αυτής. Για μόρια με πολλά ηλεκτρόνια, τα οποία βρίσκονται σε ζεύγη (έχουν αντιπαράλληλα spin), το συνολικό spin είναι 0 και η πολλαπλότητα της στάθμης 1. Μια τέτοια κατάσταση καλείται μονήρης (singlet). Εάν, όμως, τα spin δύο ηλεκτρονίων είναι παράλληλα, το συνολικό spin είναι 1 και η πολλαπλότητα 3. Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται ως τριπλή (triplet). Στη θεμελιώδη κατάσταση, τα μόρια είναι στη μονήρη κατάσταση S₀ έχοντας τη μικρότερη δυνατή ενέργεια. Αντίθετα, η τριπλή κατάσταση είναι πιο ασταθής και τα ηλεκτρόνια μεταβαίνουν σε αυτή όταν αυτά διεγείρονται. Εξαίρεση αποτελεί το οξυγόνο, το οποίο στη βασική του κατάσταση βρίσκεται στην τριπλή στάθμη.

Όταν ένα μόριο απορροφά φως, τα ηλεκτρόνια του μπορούν να μεταπηδήσουν από τη βασική στη διεγερμένη στάθμη. Η διέγερση από ορατό φως συνήθως προκαλεί μετάβαση στην πρώτη διεγερμένη στάθμη (S1), ενώ η υπεριώδης ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει διέγερση στη δεύτερη ενεργειακή στάθμη. Καθώς το μόριο παραμένει στη διεγερμένη κατάσταση, η μέσω κρούσεων, η πλεονάζουσα ενέργεια σε σχέση με την ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της στάθμης αυτής, μεταφέρεται σταδιακά σε άλλα μόρια. Αυτή η διαδικασία λέγεται ταλαντωτική χαλάρωση (vibrational relaxation). Το διάγραμμα Jablonski (εικόνα 1.5) περιγράφει τους πιθανούς μηχανισμούς επιστροφής του μορίου στην βασική ενεργειακή στάθμη.



Εικόνα 1.5: Διάγραμμα Jablonski²⁴

Ο φθορισμός παρατηρείται όταν το μόριο επιστρέφει στην βασική ενεργειακή στάθμη από το χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης στάθμης. Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού εξαρτάται από το μήκος κύματος της διεγείρουσας ακτινοβολίας. Η ενέργεια που εκπέμπεται, είναι μεγαλύτερου μήκους κύματος σε σχέση με την απορροφηθείσα. Η διαφορά ανάμεσα στο μήκος κύματος που αντιστοιχεί στη μέγιστη εκπομπή και σε αυτό που αντιστοιχεί στη μέγιστη απορρόφηση αυτή ονομάζεται μετατόπιση Stokes.

Χαρακτηριστική είναι η μετάβαση από την πρώτη διεγερμένη στάθμη S_1 σε ένα δονητικό επίπεδο της τριπλής κατάσταση T_1 . Η μετάβαση αυτή ονομάζεται εσωτερική μετάπτωση και δεν εκπέμπεται ακτινοβολία αφού το μόριο αποδιεγείρεται δονητικά. Ο φωσφορισμός παρατηρείται όταν τα μόρια αποδιεγείρονται στην βασική κατάσταση από το χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της τριπλής διεγερμένης κατάστασης^{24,25,26,27}.

1.6 Μηχανισμοί επαγόμενης από την φωτοδυναμική θεραπεία νέκρωσης καρκινικών όγκων

Η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να προκαλέσει τόσο απόπτωση όσο και νέκρωση στα κύτταρα-στόχους. Δεν υπάρχει ένας καθολικός μηχανισμός απόκρισης των κυττάρων στις φωτοδυναμικές θεραπείες. Παράγοντες που επηρεάζουν τον τύπο κυτταρικού θανάτου μπορούν να ταξινομηθούν είτε ως εξωτερικοί (π.χ. συνθήκες επώασης, συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή και εντοπισμός ανάλογα με τις χημικές του ιδιότητες, καθώς και η εφαρμοζόμενη δόση της ακτινοβολίας) είτε ως εσωτερικοί (π.χ. τύπος κυττάρου, χαρακτηριστικά ιστού που επηρεάζουν την πρόσληψη του φωτοευαισθητοποιητή, μεταβολική κατάσταση, φάση κυτταρικού κύκλου)²⁹⁻³¹.

Συνήθως η νέκρωση παρατηρείται όταν η δόση ακτινοβόλησης είναι υψηλή ή όταν προκαλείται άμεση βλάβη στην κυτταρική μεμβράνης από τον φωτοευαισθητοποιητή. Επίσης, η PDT μπορεί να ενεργοποιήσει μηχανισμούς που οδηγούν στην ενεργοποίηση κασπασών και συνεπώς να επάγει κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης. Επειδή τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στον ενεργό κυτταρικό θάνατο, οι φωτοευαισθητοποιητές που εντοπίζονται ή επηρεάζουν τα μιτοχόνδρια είναι ισχυροί επαγωγείς της απόπτωσης. Ωστόσο, οι λεπτομερείς μηχανισμοί με τους οποίους ο σχηματισμός ROS που προκαλείται από την PDT πυροδοτεί τον κυτταρικό θάνατο δεν έχουν πλήρως εξακριβωθεί³².

Τέλος, λόγω της παραγωγής των ελευθέρων ριζών και του μονήρους οξυγόνου που παράγονται κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας, ενεργοποιείται και ο μηχανισμός της αυτοφαγοκυττάρωσης. Μέσω του μηχανισμού αυτού, υπολείμματα οργανιδίων όπως μιτοχόνδρια, πρωτεΐνες κ.α. απομακρύνονται από τα κύτταρα με σκοπό την προστασία αυτών. Όμως, αν η κυτταρική βλάβη είναι εκτεταμένη τα κύτταρα δεν μπορούν να επιβιώσουν³³⁻³⁴.

1.7 Πηγές φωτός στη Φωτοδυναμική θεραπεία

Το φως αποτελεί έναν ακόμη κρίσιμο παράγοντα στη φωτοδυναμική θεραπεία. Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι πηγών φωτός που χρησιμοποιούνται στη PDT, όπως λέιζερ, LED και λάμπες πυράκτωσης (εικόνα 1.6). Κάθε μία από αυτές έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα³⁵⁻³⁷.

Τα συστήματα λέιζερ προσφέρουν μεγάλη δόση ισχύος κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης και μονοχρωματική ακτινοβολία φωτός. Η πάσχουσα περιοχή μπορεί να ακτινοβοληθεί με υψηλή δόση ενέργειας με ελάχιστες θερμικές απώλειες. Ωστόσο, τα συστήματα λέιζερ έχουν συνήθως μεγάλο κόστος, ενώ για κάθε φωτοευαισθητοποιητή απαιτείται διαφορετικό λέιζερ (αφού το μέγιστο απορρόφησης είναι διαφορετικό). Ακόμα, απαιτούν πρόσθετο οπτικό εξοπλισμό για να καθοδηγήσουν την φωτεινή ακτινοβολία στην πάσχουσα περιοχή. Στην φωτοδυναμική θεραπεία χρησιμοποιούνται λέιζερ με συνεχή και παλμική λειτουργία³⁸. Οι δίοδοι εκπομπής φωτός (LED) είναι ημιαγωγοί όπου το φως παράγεται από την επανασύνδεση ηλεκτρονίων-οπών μεταξύ ημιαγωγού τύπου P (με υψηλή συγκέντρωση οπών) και ημιαγωγού τύπου N (με υψηλή συγκέντρωση ηλεκτρονίων). Τα LED θεωρούνται οικονομική εναλλακτική λύση των λέιζερ, καθώς είναι λιγότερο επικίνδυνα, μικρά και ευέλικτα. Επιπλέον, διατίθενται σε εύκαμπτες διατάξεις. Παρ' όλα αυτά, τα LED προσφέρουν χαμηλή ισχύ κατά τη διάρκεια ακτινοβόλησης εξαιτίας του μεγάλου φασματικού εύρους της φωτεινής δέσμης³⁹.

Οι λάμπες πυρακτώσεως είναι οικονομικές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραπάνω από έναν φωτοευαισθητοποιητή λόγω του φασματικού εύρους της ακτινοβολίας τους. Τύποι λαμπτήρων που χρησιμοποιούνται στη PDT περιλαμβάνουν τους λαμπτήρες φθορισμού, πυράκτωσης, μεταλλικών αλογονιδίων και Xenon. Για την απομόνωση του κατάλληλου μήκους κύματος που ενεργοποιεί τον φωτοευαισθητοποιητή, χρειάζονται ειδικά φίλτρα⁴⁰.

Συμπερασματικά, η επιλογή της κατάλληλης πηγής φωτός πρέπει να βασίζεται στις οπτικές ιδιότητες του ιστού, το φάσμα απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή, αλλά και το βάθος του καρκινικού όγκου.



Εικόνα 1.6: Πηγές φωτός στην Φωτοδυναμική θεραπεία³⁵

1.8 Περιορισμοί και προκλήσεις στη Φωτοδυναμική θεραπεία

Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι η στοχευμένη δράση της, καθώς ο φωτοευαισθητοποιητής ενεργοποιείται μόνο όταν εκτεθεί σε φως συγκεκριμένου μήκους κύματος, περιορίζοντας τις επιδράσεις στους υγιείς ιστούς. Η επιλεκτικότητα της φωτοευαίσθητης ουσίας ως προς τα καρκινικά κύτταρα, μειώνει σημαντικά τις παρενέργειες της θεραπείας. Επιπλέον, η PDT έχει λιγότερες παρενέργειες, διατηρώντας την ποιότητα ζωής των ασθενών, ενώ μπορεί να εφαρμοστεί σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες για ενισχυμένα αποτελέσματα. Πρόκειται για θεραπεία η οποία είναι ελάχιστα επεμβατική, δεν απαιτεί μεγάλης διάρκειας νοσηλεία και ο χρόνος ανάρρωσης του ασθενούς μετά από κάθε συνεδρία είναι μικρός. Τέλος, μπορεί να επαναληφθεί όσες φορές χρειάζεται μέχρι την τελική ίαση του ασθενούς⁴¹⁻⁴³.

Η φωτοδυναμική θεραπεία περιορίζεται στην αντιμετώπιση επιφανειακών ή κοντά στην επιφάνεια όγκων, όπως οι καρκίνοι του δέρματος, λόγω της περιορισμένης διείσδυσης του φωτός, που συνήθως φτάνει μόνο λίγα χιλιοστά βαθιά μέσα στον δερματικό ιστό. Αυτό καθιστά την PDT λιγότερο αποτελεσματική για βαθύτερους όγκους. Σημαντικές προσπάθειες έχουν γίνει ώστε να αναπτυχθούν οπτικά συστήματα laser με κατάλληλες οπτικές ίνες τα οποία θα μεταφέρουν με όσο το δυνατόν λιγότερες απώλειες την φωτεινή ακτινοβολία στην πάσχουσα περιοχή⁴⁴.

Επίσης, η αποτελεσματικότητα της PDT εξαρτάται από τη στοχευμένη συσσώρευση και κατακράτηση των φωτοευαισθητοποιητών στον όγκο, κάτι που δεν επιτυγχάνεται πάντα με ακρίβεια με αποτέλεσμα να εμφανίζεται φωτοευαισθησία μετά το πέρας της θεραπείας. Ένα άλλο ζήτημα είναι η παρουσία οξυγόνου για την παραγωγή των ελευθέρων ριζών που προκαλούν κυτταρικό θάνατο. Συνήθως, οι καρκινικοί όγκοι έχουν χαμηλά επίπεδα οξυγόνου (υποξία), γεγονός που περιορίζει την παραγωγή ROS και μειώνει την αποτελεσματικότητα της PDT. Η δημιουργία νανοσωματιδίων μεταφοράς τόσο για την επιλεκτική κατακράτηση των φωτοευαισθητοποιητών από τους πάσχοντες ιστούς αλλά και για τη μεταφορά οξυγόνου με σκοπό την μείωση της υποξίας, μπορεί να να αποτελέσει λύση στις προκλήσεις αυτές⁴⁵⁻⁴⁶.

Τέλος, περιοριστικό παράγοντα θα μπορούσε να αποτελέσει το κόστος δημιουργίας εξειδικευμένων κέντρων θεραπείας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΕΣ

2.1 Τα βασικά χαρακτηριστικά των φωτοευαισθητοποιητών

Οι φωτοευαισθητοποιητές είναι φυσικές ή συνθετικές ενώσεις ικανές να απορροφούν φως συγκεκριμένων φασματικών χαρακτηριστικών και να ενεργοποιούν τις κυτταροτοξικές αντιδράσεις τύπου Ι και ΙΙ οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν κυτταρική βλάβη και θάνατο. Για να χαρακτηριστεί ένα χρωμοφόρο μόριο ως φωτοευαισθητοποιητής, θα πρέπει να πληρούνται κάποια βασικά χαρακτηριστικά τα οποία είναι⁴⁷⁻⁵²:

1) Φάσμα απορρόφησης: Οι φωτοευαισθητοποιητές πρέπει να έχουν υψηλή απορρόφηση φωτός μεταξύ 600 nm – 900 nm, στο λεγόμενο οπτικό παράθυρο. Στην συγκεκριμένη φασματική περιοχή, η απορρόφηση της ακτινοβολίας από τους ιστούς είναι ελάχιστη οπότε επιτυγχάνεται το μέγιστο βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας στους ιστούς. Έτσι, μη επιφανειακοί καρκινικοί όγκοι μπορούν να αντιμετωπιστούν. Επίσης, θα πρέπει να μην απορροφούν ισχυρά στην UV περιοχή του οπτικού φάσματος. Αν η απορρόφηση στην UV περιοχή είναι υψηλή, τότε ο ασθενής αν εκτεθεί στην ηλιακή ακτινοβολία μετά το πέρας της θεραπείας, κινδυνεύει να πάθει εγκαύματα στο δέρμα και τα μάτια.

i) Ικανοποιητική παραγωγή μονήρους οξυγόνου: Κατά την ενεργοποίησή τους από φως συγκεκριμένων φασματικών χαρακτηριστικών, οι φωτοευαισθητοποιητές θα πρέπει να είναι σε θέση να μεταφέρουν την απορροφηθείσα ενέργεια στο μοριακό οξυγόνο που υπάρχει στην πάσχουσα περιοχή, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), και ιδίως του μονήρους οξυγόνου. Το μονήρες οξυγόνο είναι ιδιαιτέρως δραστικό και μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα κύτταρα, οδηγώντας στην καταστροφή τους.

ii) Επιλεκτική συσσώρευση και κατακράτηση από τους πάσχοντες ιστούς: Οι φωτοευαισθητοποιητές πρέπει να συσσωρεύονται και να κατακρατούνται κατά προτίμηση από τα καρκινικά κύτταρα και τους πάσχοντες ιστούς.

iii) Φωτοσταθερότητα: Οι φωτοευαισθητοποιητές πρέπει να είναι χημικά σταθερά μόρια ώστε η έκθεσή τους στο φως να μην καταστρέφει τη δομή τους και την ικανότητά τους να εκπέμπουν φθορισμό. Η μη χημική τους σταθερότητα συνεπάγεται μείωση της φωτοδυναμική τους δράσης.

iv) Χαμηλή τοξικότητα απουσία φωτός: Οι φωτοευαισθητοποιητές δεν θα πρέπει να επηρεάζουν την βιωσιμότητα των κυττάρων απουσία φωτός (dark toxicity). Ιδανικά, πρέπει να έχουν χαμηλή τοξικότητα απουσία φωτός, εξασφαλίζοντας ελάχιστες παρενέργειες ή βλάβες στους υγιείς ιστούς.

v) Διαλυτότητα στο νερό: Πολλοί φωτοευαισθητοποιητές χορηγούνται ενδοφλεβίως, επομένως θα πρέπει να είναι υδατοδιαλυτοί για να διευκολύνεται η μεταφορά τους στο σώμα και η κατανομή τους στους πάσχοντες ιστούς. Η υδατοδιαλυτότητα βοηθά επίσης στην αποβολή του φωτοευαισθητοποιητή από το σώμα μετά τη θεραπεία. vi) Γρήγορη αποδέσμευση από τους υγιείς ιστούς: Μετά τη θεραπεία, οι φωτοευαισθητοποιητές είναι επιθυμητό να αποβάλλονται γρήγορα από το σώμα ώστε να μειώνεται η παραμένουσα φωτοευαισθησία και να ελαχιστοποιούνται οι πιθανές παρενέργειες.

2.2 Γενιές φωτοευαισθητοποιητών

Η ανάπτυξη και η ταξινόμηση των φωτοευαισθητοποιητών σε κατηγορίες ποικίλλει ανάλογα με τη βιβλιογραφία. Μια κοινά αναγνωρισμένη ταξινόμηση περιλαμβάνει τρεις γενιές φωτοευαισθητοποιητών στη φωτοδυναμική θεραπεία.

2.2.1 1η γενιά φωτοευαισθητοποιητών

Η 1^η γενιά των φωτοευαισθητοποιητών αποτελείται από την αιματοπορφυρίνη και τα παράγωγά της. Αναπτύχθηκαν την δεκαετία του 1970 και στις αρχές του 1980. Ο πιο γνωστός φωτοευαισθητοποιητής της γενιάς αυτής είναι ο Porfimer Sodium, ο οποίος κυκλοφορεί υπό την εμπορική ονομασία "Photofrin" (εικόνα 2.1) και προέρχεται από την αιματοπορφυρίνη, ένα πολύπλοκο μείγμα πορφυρινών που εξάγεται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια των βοοειδών. Αποτελεί τον πρώτο φωτοευαισθητοποιητή που έλαβε έγκριση για κλινική χρήση στην PDT από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) τη δεκαετία του 1990.

Οι φωτοευαισθητοποιητές 1^{ης} γενιάς, αν και αποτελεσματικοί, παρουσιάζουν κάποιους περιορισμούς κατά την εφαρμογή τους στην φωτοδυναμική θεραπεία. Ως μείγματα διαφορετικών ενώσεων πορφυρίνης, χαρακτηρίζονται από χαμηλή χημική καθαρότητα και δυσκολίες κατά τη σύνθεσή τους. Λόγω της μη χημικής τους καθαρότητας, εμφανίζουν ευρύ φάσμα απορρόφησης το οποίο περιορίζει την χρήση τους. Επίσης, οι ουσίες αυτές παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στην UV περιοχή (360 nm – 400 nm) με αποτέλεσμα το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας στον καρκινικό όγκο να είναι περιορισμένο. Ενδεικτικά στην εικόνα 2.2 δίνονται τα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού της Photofrin. Συνδυαστικά, με την μακρά παραμονή τους στον οργανισμό εξαιτίας της χαμηλή τους επιλεκτικότητας, παρατηρείται αυξημένη παραμένουσα φωτοευαισθησία.

Τα μειονεκτήματα της πρώτης γενιάς φωτοευαισθητοποιητών οδήγησαν στην ανάγκη αναζήτησης νέων ουσιών και την ανάπτυξη της δεύτερης γενιάς φωτοευαισθητοποιητών^{48,51,52}.


Εικόνα 2.1:Χημική δομή Photofrin¹⁵



Εικόνα 2.2: Φάσματα απορρόφησης και φθορισμού της Photofrin⁵³

2.2.2 2^η γενιά φωτοευαισθητοποιητών

Οι φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς είναι συνθετικές ενώσεις που δημιουργήθηκαν από τους ερευνητές ώστε να αντιμετωπιστούν τα μειονεκτήματα της 1^{ης} γενιάς. Τη γενιά αυτή αποτελούν ουσίες οι οποίες περιλαμβάνουν ή προέρχονται από τις πορφυρίνες, τις βακτηριοχλωρίνες, τις φθαλοκυανίνες, τις χλωρίνες, τις βενζοπορφυρίνες, την κουρκουμίνη και τα παράγωγά της, τα παράγωγα του μπλε του μεθυλενίου και άλλες (εικόνα 2.3). Πρόκειται για απλές ενώσεις με υψηλή χημική καθαρότητα. Επίσης, παρουσιάζουν υψηλή απορρόφηση στο ορατό και εγγύς υπέρυθρο του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και ως εκ τούτου όγκοι οι οποίοι είναι μη επιφανειακοί μπορούν να αντιμετωπιστούν. Ακόμα, εμφανίζουν υψηλότερη επιλεκτικότητα ως προς τα καρκινικά κύτταρα και γρηγορότερη αποδέσμευση από τους υγιείς ιστούς, με αποτέλεσμα η παραμένουσα φωτοευαισθησία να μειώνεται. Έχουν μειωμένη τοξικότητα απουσία φωτός και ενισχυμένη φωτοδυναμική δράση αφού χαρακτηρίζονται από υψηλή κβαντική απόδοση σε μονήρες οξυγόνο. Κάποιοι χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι της 2^{ης} γενιάς των φωτοευαισθητοποιητών που έχουν πάρει έγκριση από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για θεραπεία είναι οι Aminolevulinic acid (ALA) και methyl aminolevulinate (MAL) και η Vertoporfin ή με την εμπορική ονομασία Visudyne^{48-50,54}.



Εικόνα 2.3: Χημικές δομές φωτοευαισθητοποιητών 2^{ης} γενιάς¹⁵

Το κύριο μειονέκτημα της δεύτερης γενιάς φωτοευαισθητοποιητών είναι η χαμηλή τους διαλυτότητα στο νερό, που είναι σημαντικά περιοριστικός παράγοντας στην ενδοφλέβια χορήγηση τους.

2.2.2.1 Φθαλοκυανίνες

Οι φθαλοκυανίνες (Pcs) αποτελούν μια σημαντική ομάδα φωτοευαισθητοποιητών. Πρόκειται για μεγάλες, αρωματικές, οργανικές ενώσεις που αποτελούνται από τέσσερις μονάδες ισοϊνδόλης που ενώνονται με άτομα αζώτου (εικόνα 2.4). Λόγω των ιδιοτήτων τους, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε διάφορους τομείς της επιστήμης και της τεχνολογίας. Η ισχυρή απορρόφησή τους στην κόκκινη περιοχή του ορατού φάσματος (~700 nm), όπου η διείσδυση του ορατού φωτός στους ιστούς είναι μέγιστη, και η ασθενής απορρόφησή τους στην περιοχή των 400 nm έως 600 nm που εξασφαλίζει τη μείωση της φωτοευαισθησίας του δέρματος μετά την PDT, τις έχουν καταστήσει τους πλέον υποσχόμενους φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς. Επιπλέον, η ενσωμάτωση ενός μεταλλικού ιόντος στο μόριο τους και η χημική τροποποίησή τους, μπορεί να ενισχύσει τις φωτοφυσικές και φωτοχημικές τους ιδιότητες. Τα σύμπλοκα των φθαλοκυανινών με παραμαγνητικά μέταλλα δίνουν ενώσεις με μικρούς χρόνους ζωής της κατάστασης triplet (της τάξης των ns), ενώ με διαμαγνητικά μέταλλα όπως τα Zn^{2+} , Al^{3+} και Ga^{3+} δίνουν ουσίες με υψηλή κβαντική απόδοση και μεγάλους χρόνους ζωής⁵⁵⁻⁵⁷.



Εικόνα 2.4: Δομή φθαλοκυανίνης

Ωστόσο, λόγω της αρωματικής δομής τους, οι Pcs έχουν μεγάλη τάση συσσωμάτωσης σε υδατικά διαλύματα. Το φαινόμενο της συσσωμάτωσής τους οφείλεται στις ελκτικές αλληλεπιδράσεις π-π stacking μεταξύ των π δεσμών των αρωματικών δακτυλίων των μορίων τους. Ως αποτέλεσμα, η κακή διαλυτότητά τους σε βιολογικά υδατικά μέσα αναστέλλει την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου μειώνοντας τη φωτοδυναμική τους δράση⁵⁹⁻⁶¹.

Οι φθαλοκυανίνες πυριτίου αποτελούν ένα σημαντικό μέρος των φθαλοκυανίνων που εφαρμόζονται στην φωτοδυναμική θεραπεία⁵⁸. Αυτό γιατί η παρουσία πυριτίου στο μόριό τους εξασφαλίζει τη χημική σταθερότητα του μορίου (ισχυροί δεσμού Si-N) και την αυξημένη παραγωγή ROS ενισχύοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της PDT. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες φθαλοκυανίνες, οι SiPcs διαθέτουν δύο πρόσθετους αξονικούς δεσμούς, στους οποίους μπορούν να συνδεθούν διάφορα άτομα ή ομάδες ατόμων μειώνοντας έτσι τη συσσωμάτωση τους σε υδατικά διαλύματα. Επιπλέον η χημική αυτή τροποποίηση αφήνει περιθώρια διαμόρφωσης των οπτικών, χημικών και ηλεκτρονικών ιδιοτήτων των φθαλοκυανίνων πυριτίου. Στην βιβλιογραφία, αναφέρονται πολλοί τρόποι χημικής τροποποίησης των μορίων του τόσο με συμμετρικούς όσο και μη συμμετρικούς υποκατάστατες⁵⁸.

Η πρώτη φθαλοκυανίνη πυριτίου που συντέθηκε ήταν η δίχλωρο-φθαλοκυανίνη πυριτίου SiCl₂Pc, το μόριο της παρουσιάζεται στην εικόνα 2.5.



Εικόνα 2.5: Μόριο SiCl₂Pc⁵⁸

Η σύνθεσή της αρχικά πραγματοποιήθηκε με κυκλοτετραμερισμό παραγώγων φθαλονιτριλίου παρουσία μιας πρόδρομης ουσίας με βάση το πυρίτιο, το τετραχλωριούχο πυρίτιο (SiCl4) (εικόνα 2.6). Κατά τη διάρκεια αυτής της αντίδρασης, τέσσερα μόρια φθαλονιτριλίου σχηματίζουν μια μακροκυκλική δομή φθαλοκυανίνης γύρω από το άτομο πυριτίου στον πυρήνα. Τα δύο άτομα χλωρίου παραμένουν συνδεδεμένα με το κεντρικό άτομο πυριτίου, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της SiCl2Pc. Η αντίδραση πραγματοποιείται συνήθως σε υψηλές θερμοκρασίες, συχνά σε διαλύτη όπως η κινολίνη, για να εξασφαλιστεί ο επιτυχής σχηματισμός του συστήματος δακτυλίου φθαλοκυανίνης. Μετά τη σύνθεση, τυχόν προσμίξεις από το μόριο της SiCl2Pc απομακρύνονται με τη βοήθεια τεχνικών όπως η χρωματογραφία στήλης ή η ανακρυστάλλωση.

Εικόνα 2.6: Πρώιμες αντιδράσεις σύνθεσης της SiCl₂Pc⁵⁸

Ένας εναλλακτικός τρόπος σύνθεσης της SiCl₂Pc πρόδρομες ουσίες φθαλιμίδιο και φθαλονιτρίλιο παρουσιάζεται στην εικόνα 2.7.

Εικόνα 2.7: Αντιδράσεις σύνθεσης SiCl₂Pc από τις πρόδρομες ουσίες φθαλιμίδιο και φθαλονιτρίλιο⁵⁸

Από την SiCl₂Pc συντέθηκε η χημική ένωση SiPc(OH)₂, η οποία χρησιμοποιείται και αυτή για τη δημιουργία φωτοευαίσθητων ουσιών. Στην εικόνα 2.8 παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες ενώσεις οι οποίες έχουν συντεθεί ύστερα από υποκατάσταση των αξονικών ατόμων χλωρίου ή των -OH των SiCl₂Pc και SiPc(OH)₂ από αλκοόλες, φαινόλες, καρβοξυλικά οξέα κ.α. Τα νέα μόρια που προκύπτουν είναι συμμετρικά. Παράλληλα, στην βιβλιογραφία αναφέρονται και μεθοδολογίες για την σύνθεση μη συμμετρικών μοριακών ενώσεων αν και ο αριθμός τους είναι περιορισμένος (εικόνα 2.8). Τέλος, νέες ουσίες μπορούν να προκύψουν ύστερα από κατάλληλη υποκατάσταση ατόμων στους περιφερειακούς δακτυλίους των μορίων της φθαλοκυανίνης (βλ. περιοχές α, β του μορίου της φθαλοκυανίνης της εικόνας 2.5).

Εικόνα 2.8: Συμμετρικές και μη συμμετρικές SiPcs που συντέθηκαν από την πρόδρομη SiCl2Pc και την SiPc(OH)₂⁵⁸

2.2.3 3^η γενιά φωτοευαισθητοποιητών

Οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές είναι υδρόφοβα μόρια με αποτέλεσμα να δημιουργούν συσσωματώματα σε υδατικά διαλύματα. Εξαιτίας της συσσωμάτωσης των μορίων τους, επηρεάζονται τόσο οι φωτοφυσικές (μείωση κβαντικής απόδοσης μονήρους οξυγόνου), όσο και οι χημικές (μείωση της διαλυτότητάς τους) τους ιδιότητες, αλλά και οι βιολογικές, οι φαρμακολογικές και φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες. Για την αντιμετώπιση της έντονης υδροφοβικότητας των φωτοευαισθητοποιητών, οι ερευνητές πρότειναν και ανέπτυξαν νανοσυστήματα μεταφοράς για την πρόσδεση ή την ενσωμάτωση των ήδη υπαρχόντων φωτοευαίσθητων ουσιών (3^η γενιά φωτοευαισθητοποιητών) (εικόνα 2.9). Επιπλέον, σημαντικούς στόχους της ανάπτυξης της 3^{ης} γενιάς αποτέλεσαν η αύξηση της επιλεκτικότητας των ουσιών από τους καρκινικούς όγκους και η γρήγορη αποδέσμευσή τους από τους υγιείς ιστούς που οδηγεί σε μείωση της παραμένουσας φωτοευαισθησίας. Τα νανοσωματίδια μπορούν να βελτιώσουν τη σταθερότητα και την κυτταρική πρόσληψη των φωτοευαισθητοποιητών. Επίσης, μπορούν να επιτρέψουν την παθητική συσσώρευση στους ιστούς του όγκου μέσω του φαινομένου της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης (EPR). Ακόμα, προσπάθειες καταβάλλονται για την αύξηση της απορρόφησης των ουσιών εντός του θεραπευτικού παραθύρου και την υψηλότερη κβαντική απόδοση για την παραγωγή μονήρους οξυγόνου και ελεύθερων ριζών. Όλα αυτά συμβάλλουν στη μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητας της PDT.

Ιδανικά, ένα νανοσωματίδιο θα πρέπει να έχει μέγεθος περίπου 1-100 nm. Θα πρέπει να είναι βιοδιασπώμενο, με υψηλή χωρητικότητα, ελάχιστη ανοσογονικότητα και χωρίς τοξικότητα ή παρενέργειες. Ειδικά τα νανοσωματίδια που μεταφέρουν φωτοευαισθητοποιητές πρέπει να προστατεύουν τις φωτοφυσικές ιδιότητες του φορτίου και να εξασφαλίζουν την επιλεκτική συγκέντρωσή τους στους καρκινικούς όγκους. Ένα σημαντικό πρόβλημα στον σχεδιασμό αυτών των συστημάτων είναι η ταχεία απομάκρυνσή τους από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού, κάτι που μειώνει την αποδοτικότητά τους.

Σύμφωνα με τον σχεδιασμό της γενιάς αυτής, τα μόρια των φωτοευαισθητοποιητών είτε συζευγνύονται με κάποιο τμήμα στόχευσης όπως είναι τα αντισώματα, οι υδατάνθρακες, τα αμινοξέα και τα διάφορα πεπτίδια, είτε εγκλείονται σε διάφορα νανοσωματίδια όπως λιποσώματα, μικκύλια, κβαντικές τελείες, νανοσωλήνες άνθρακα, κυκλοδεξτρίνες κ.α^{47,48,51,62}.

Εικόνα 2.9: Σχεδιασμός φωτοευαισθητοποιητών τρίτης γενιάς: α) σύζευζη PS με τμήμα στόχευσης β) εγκλεισμός ενός PS σε νανοσυστήματα μεταφοράς⁶².

Τα νανοσωματίδια διερευνώνται ευρέως ως συστήματα μεταφοράς φωτοευαισθητοποιητών στη φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) για την ενίσχυση της θεραπευτικής τους αποτελεσματικότητας. Ακολουθούν ορισμένες βασικές κατηγορίες νανοσωματιδίων που χρησιμοποιούνται στην PDT:

Λιποσώματα: Τα λιποσώματα είναι σφαιρικά κυστίδια που αποτελούνται από διπλοστοιβάδες λιπιδίων (εικόνα 2.10). Μπορούν να μεταφέρουν υδρόφιλους και υδρόφοβους φωτοευαισθητοποιητές εντός του υδατικού τους πυρήνα ή των λιπιδικών διπλοστοιβάδων τους αντίστοιχα. Τα λιποσώματα προσφέρουν πλεονεκτήματα όπως η βιοσυμβατότητα, η σταθερότητα και η ικανότητα εγκλεισμού μιας ποικιλίας φωτοευαισθητοποιητών. Μπορούν να λειτουργήσουν με συνδέσμους στόχευσης για βελτιωμένη κυτταρική πρόσληψη και εξειδίκευση^{63,64}.

Εικόνα 2.10: Λιπόσωμα⁶⁴

Νανοσωματίδια από πολυμερή: Τα πολυμερή νανοσωματίδια κατασκευάζονται από βιοδιασπώμενα ή βιοσυμβατά πολυμερή, όπως π.χ. το πολυ(γαλακτικό-κο-γλυκολικό οξύ) (PLGA), η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) ή η χιτοζάνη (εικόνα 2.11). Μπορούν να μεταφέρουν φωτοευαισθητοποιητές εντός της πολυμερικής μήτρας ή στην επιφάνειά τους. Τα πολυμερικά νανοσωματίδια παρέχουν ελεγχόμενη απελευθέρωση των φωτοευαισθητοποιητών, τους προστατεύουν από την αποικοδόμηση και προσφέρουν ρυθμιζόμενες ιδιότητες όπως το μέγεθος, το επιφανειακό φορτίο και η σταθερότητα⁶⁵⁻⁶⁶.

Εικόνα 2.11: Είδη πολυμερικών νανοσωματιδίων⁶⁵

Νανοσωματίδια με βάση τα μέταλλα: Τα πιο εκτεταμένα μελετημένα νανοσωματίδια με βάση τα μέταλλα είναι τα νανοσωματίδια χρυσού. Παράλληλα διερευνώνται και άλλα μεταλλικά νανοσωματίδια όπως αυτά του αργύρου, του χαλκού και της πλατίνας. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως φωτοευαισθητοποιητές. Κάποια από τα βασικά πλεονεκτήματά τους αποτελούν το μικρός τους μέγεθος, η υψηλή χημική σταθερότητα, η εύκολη τροποποίηση της επιφάνειάς τους και οι φωτοθερμικές τους ιδιότητες⁶⁷⁻⁶⁹.

Νανοσωματίδια με βάση τον άνθρακα: Τα νανοσωματίδια άνθρακα, όπως οι κουκκίδες άνθρακα, το οξείδιο του γραφενίου και οι νανοσωλήνες άνθρακα, έχουν κερδίσει την προσοχή στη φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων και των πιθανών εφαρμογών τους (εικόνα 2.12). Χαρακτηρίζονται από υψηλή σταθερότητα και ρυθμιζόμενες οπτικές ιδιότητες. Στην επιφάνειά τους μπορούν να συζευχτούν διάφορα βιομόρια με στόχο την στοχευμένη χορήγηση και την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της PDT. Η μεγάλη επιφάνεια και οι μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητές τους επιτρέπουν την αποτελεσματική φόρτωση φωτοευαισθητοποιητών, οδηγώντας σε βελτιωμένη φωτοδυναμική δραστηριότητα και θεραπευτικά αποτελέσματα⁷⁰⁻⁷².

Εικόνα 2.12: Νανοσωματίδια άνθρακα: α) νανοσωλήνες, β) φουλερένια, γ) νανοΐνες, δ) γραφένιο και ε) carbon black⁷¹

Νανοσωματίδια πυριτίου: Τα νανοσωματίδια πυριτίου (silica nanoparticles, εικόνα 2.13) αποτελούν μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα κατηγορία νανοσωματιδίων λόγω των μοναδικών τους ιδιοτήτων και της ευρείας χρήσης τους στη βιοϊατρική και τη φαρμακευτική. Το διοξείδιο του πυριτίου, από το οποίο αποτελούνται, είναι χημικά σταθερό και βιοσυμβατό, γεγονός που τα

καθιστά ασφαλή για χρήση στον οργανισμό. Επιπλέον, διαθέτουν πορώδη δομή, επιτρέποντας την αποθήκευση και ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων, κάτι που είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τη στοχευμένη θεραπεία. Παρά τις πολλές τους δυνατότητες, η ανάπτυξη των νανοσωματιδίων πυριτίου αντιμετωπίζει ορισμένες προκλήσεις, κυρίως όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της στοχευμένης μεταφοράς τους και τη μακροχρόνια ασφάλεια της χρήσης τους στον οργανισμό⁷³.

Εικόνα 2.13: Διαφορετικές μορφές νανοσωματιδίων διοζειδίου του πυριτίου με βάση α) τη μορφολογία, β) το σχήμα και γ) τη μορφολογία των πόρων⁷³

2.2.3.1 Κυκλοδεξτρίνες

α) Δομή

Οι κυκλοδεξτρίνες (CDs) είναι φυσικοί κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από d-μονάδες γλυκοπυρανόζης συνδεδεμένες με δεσμούς α-(1,4). Το σχήμα τους είναι μοναδικό και τοροειδές. Η εξωτερική επιφάνειά τους είναι υδρόφιλη λόγω της ύπαρξης ομάδων υδροξυλίου (- OH) και η εσωτερική κοιλότητα υδρόφοβη (εικόνα 2.14). Στην στενότερη πλευρά του κώνου βρίσκονται οι πρωτοταγείς ομάδες υδροξυλίων ενώ στην πλευρά με την μεγαλύτερη διάμετρο οι δευτεροταγείς ομάδες υδροξυλίων (Primary and Secondary Face). Οι κυκλοδεξτρίνες έχουν τραβήξει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας καθώς μπορούν να φιλοξενήσουν στην κοιλότητά τους υδρόφοβα μόρια⁷⁴.

Εικόνα 2.14: Οι θέσεις των υδροζυλίων στο μόριο της β-κυκλοδεζτρίνης⁷⁵

Μπορούν να βρεθούν σε τρεις φυσικές μορφές, την α-CD, την β-CD και την γ-CD οι οποίες αποτελούνται αντίστοιχα από 6, 7 και 8 μονάδες d-γλυκοπυρανόζη (εικόνα 2.15). Παρά τις πολλές εφαρμογές των φυσικών κυκλοδεξτρινών, η διαλυτότητά τους συχνά δεν είναι επαρκής, γεγονός που περιορίζει τη χρήση τους. Ειδικά η β-CD εμφανίζει σημαντικά μικρότερη διαλυτότητα σε σχέση με τις άλλες δύο, παρά την παρουσία παραπάνω ομάδων υδροξυλίου. Αυτό οφείλεται στη χωρική διάταξη του μορίου της, η οποία ευνοεί τη δημιουργία ισχυρών ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στις δευτερογενείς ομάδες -OH. Παρόλα αυτά η β-CD εμφανίζεται περισσότερο στην βιομηχανία διότι έχει το ιδανικό μέγεθος κοιλότητας, το οποίο ευνοεί τον εγκλεισμό ενώσεων, σχηματίζει αποδοτικά σύμπλοκα φορέα φιλοξενούμενου, είναι εμπορικά διαθέσιμή και έχει σχετικά χαμηλό κόστος⁷⁶⁻⁷⁷.

	α-CD	β-CD	γ-CD
Μονάδες d-	6	7	8
γλυκοπυρανόζης			
Μοριακό βάρος	972.8	1135	1297
(g/mol)			
Διαλυτότητα στο	130	18.5	249
νερό (mg/ml) στους			
25 °C			
Διάμετρος d (nm)	0.47-0.53	0.6-0.65	0.75-0.83

Πίνακας 2.1: Χαρακτηριστικά των φυσικών κυκλοδεξτρινών77

Εικόνα 2.15: Δομή α, β και γ-κυκλοδεζτρίνης⁷⁸

Για την αύξηση της υδατοδιαλυτότητάς τους, τροποποιούνται χημικά μέσω αιθεροποίησης ή εστεροποίησης, ή με την εισαγωγή νέων ομάδων στις υδροξυλομάδες στις θέσεις 2-, 3-, 6-. Ανάλογα με την προστιθέμενη ομάδα, αποκτούν υδρόφιλες ή υδρόφοβες ιδιότητες, βελτιώνοντας έτσι τις φυσικοχημικές και βιοφαρμακευτικές ιδιότητες της ένωσης, καθώς και την ικανότητα εγκλεισμού μιας φιλοξενούμενης ουσίας στην υδρόφοβη κοιλότητά τους.

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες είναι οι υδροξυπροπυλβ-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD), η οποία προκύπτει από αντίδραση με μεθυλοξιράνιο, η μεθυλιωμένη-β-κυκλοδεξτρίνη (Me-β-CD), που παρασκευάζεται με ιωδομεθάνιο, και η σουλφοβουτυλεθερ-β-κυκλοδεξτρίνη (SBE-β-CD), η οποία παράγεται με κατεργασία 4-butane sultone⁷⁹.

Η διαλυτότητα των κυκλοδεξτρίνων βελτιώνεται μέσω της διάσπασης των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλομάδων στις θέσεις 2- και 3. Επιπλέον, βελτιώνεται η διαλυτότητα των συμπλόκων εγκλεισμού, καθιστώντας τις τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες περισσότερο κατάλληλες ως νανοσωματίδια μεταφοράς. Οι υποκατεστημένες ομάδες επιτρέπουν τη δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών με άλλα μόρια-στόχους, παρέχοντας μεγαλύτερη επιλεκτικότητα⁸⁰.

	HP-β-CD	RM-β-CD
Μοριακό βάρος (g/mol)	1400	1135
Διαλυτότητα στο νερό (mg/ml) στους 25 °C	>600	>600
Διάμετρος d (nm)	0.6	-

π' $\Delta \Delta$	X 7	,	,	104 17	/0
HIVAKAC 7.7.	X 000K7001	$\sigma \tau i \kappa a \tau n n \pi n$	π ammevav	KNK&0082701VMV	-
111VURUS 2.2 .	Δάρακτηρι	\mathbf{v}	ποιημένων	κυκλουσωιρινων	
2					

β) Σύμπλοκα εγκλεισμού

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να φιλοξενήσουν στην κοιλότητά τους άλλες χημικές ενώσεις δημιουργώντας έτσι σύμπλοκα εγκλεισμού (εικόνα 2.16). Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να αυξηθεί η υδατοδιαλυτότητα πολλών υδρόφοβων μορίων. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, κατά τη δημιουργία των συμπλόκων εγκλεισμού, οι δεσμοί τόσο στο μόριο του «οικοδεσπότη», δηλαδή της κυκλοδεξτρίνης, όσο και στο μόριο του «ξενιστή» δεν καταστρέφονται. Ουσιαστικά, τα δύο μόρια βρίσκονται σε μια δυναμική ισορροπία λόγω της μεγαλύτερης συγγένειας των υδρόφοβων μορίων με την μη πολική κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών. Συνήθως το σύμπλοκο εγκλεισμού που απαντάται περισσότερο στις ερευνητικές εργασίες είναι το 1:1 κυκλοδεξτρίνη : φιλοξενούμενο μόριο όπου συνήθως μόνο ένα μόριο της υδρόφοβης ένωσης φιλοξενείται στην κοιλότητα ενός μορίου κυκλοδεξτρίνης. Ωστόσο έχουν μελετηθεί και σύμπλοκα εγκλεισμού αναλογίας 2:1 ή ακόμα και σύμπλοκα όπου ουσίες φιλοξενούνται και στην υδρόφιλη επιφάνεια του μορίου της κυκλοδεξτρίνης^{79,81}.

Η ικανότητα των κυκλοδεξτρινών να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού εξαρτάται από δύο βασικούς παράγοντες. Πρώτον, η στερεοχημεία του συστήματος πρέπει να είναι κατάλληλη

για τον σχηματισμό τους, κάτι που σημαίνει ότι το μέγεθος της κυκλοδεξτρίνης σε σχέση με το μέγεθος του μορίου που θέλει να εγκλείσει, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λειτουργικών ομάδων, παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία. Οι κυκλοδεξτρίνες διαφέρουν ως προς την εσωτερική διάμετρο και τον όγκο της κοιλότητάς τους, καθώς αυξάνεται ο αριθμός των μονάδων D-γλυκοπυρανόζης που περιέχουν.

Εικόνα 2.16: Αλληλεπίδραση μορίου ξενιστή και φιλοξενούμενου μορίου⁸²

Ωστόσο, το ύψος της κοιλότητας παραμένει σταθερό. Με βάση αυτές τις διαστάσεις, οι ακυκλοδεξτρίνες είναι κατάλληλες για μικρά μόρια ή αλειφατικές αλυσίδες, οι β-κυκλοδεξτρίνες για αρωματικές και ετεροκυκλικές ενώσεις, και οι γ-κυκλοδεξτρίνες για μεγαλύτερα μόρια, όπως τα στεροειδή. Επίσης, οι θερμοδυναμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων του συστήματος (δηλαδή της κυκλοδεξτρίνης, του φιλοξενούμενου μορίου και του διαλύτη) επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του σχηματισμού του συμπλόκου. Υπάρχουν τέσσερις βασικές ενεργειακές αλληλεπιδράσεις που ευνοούν το σχηματισμό των συμπλόκων εγκλεισμού:

- Η απομάκρυνση των πολικών μορίων νερού από τη μη πολική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης.
- Ο αυξημένος αριθμός δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται όταν το νερό απομακρύνεται από την κοιλότητα και διαχέεται στο υπόλοιπο διάλυμα.
- Η μείωση των απωστικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στο υδρόφοβο μόριο και το υδατικό περιβάλλον.
- Η ενίσχυση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων του φιλοξενούμενου μορίου καθώς αυτό εισέρχεται στη μη πολική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης.

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης κυκλοδεξτρίνης για τον σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού είναι: α) βελτίωση διαλυτότητας: Οι κυκλοδεξτρίνες αυξάνουν την υδατοδιαλυτότητα των υδρόφοβων χημικών ενώσεων, β) αύξηση βιοδιαθεσιμότητας: ενισχύουν τη βιοδιαθεσιμότητα φαρμάκων που απορροφώνται δύσκολα λόγω χαμηλής διαλυτότητας, βοηθώντας στη διάλυσή τους, γ)βελτίωση σταθερότητας: προστατεύουν τις ενώσεις από οξυγόνο, νερό, ακτινοβολία και

θερμότητα, αυξάνοντας τη χημική και φυσική τους σταθερότητα, δ) μείωση ερεθισμού: μειώνουν τον ερεθισμό που προκαλούν ορισμένα φάρμακα στο στομάχι ή στο δέρμα, ελέγχοντας τη συγκέντρωσή τους, ε) καλύτερη συμβατότητα: απομονώνουν ασύμβατες ουσίες από τα υπόλοιπα συστατικά ενός φαρμάκου, προλαμβάνοντας ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις, στ) κάλυψη δυσάρεστων οσμών/γεύσεων: κρύβουν ανεπιθύμητες οσμές και γεύσεις, βελτιώνοντας την εμπειρία του ασθενή και ζ) καλύτερος χειρισμός υλικών: μετατρέπουν δύσκολα διαχειρίσιμες υγρές ουσίες σε σκόνες, διευκολύνοντας τη χρήση τους σε στερεές μορφές⁸³⁻⁸⁵.

Για την δημιουργία των συμπλόκων εγκλεισμού προτείνονται διάφορες μέθοδοι. Αυτές που συναντώνται συχνότερα στην βιβλιογραφία είναι οι: α) συγκαταβύθιση (Co-precipitation), β) υγρή λειοτρίβιση με τον σχηματισμό πάστας (kneading), γ) συμπλοκοποίηση σε μορφή πολτού (slurry complexation), δ) εκβολή (extrusion), ε) ξηρή ανάμειξη (dry mixing), στ) ξήρανση με ψεκασμό (spray drying) και ζ) λυοφιλοποίηση (freeze drying). Για υδρόφοβα μόρια όπως οι φθαλοκυανίνες, η προτιμώμενη μέθοδος είναι το kneading, λόγω της αργής διάλυσης του μορίου κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του συμπλόκου. Επιπλέον, χάρη στην απλότητά της και την υψηλή της αποτελεσματικότητα, η μέθοδος αυτή είναι μια γρήγορη, οικονομική και ευρέως χρησιμοποιούμενη διαδικασία στη φαρμακευτική βιομηχανία⁸³.

γ) Η χρήση των κυκλοδεξτρινών στην φωτοδυναμική θεραπεία

Η χρησιμότητα των κυκλοδεξτρινών στην φωτοδυναμική θεραπεία κρίνεται ιδιαιτέρως σημαντική. Αυτό γιατί, ο εγκλεισμός των υδρόφοβων φωτοευαισθητοποιητών στην κοιλότητά τους, οδηγεί στην ενίσχυση της διαλυτότητας των υδρόφοβων μορίων και άρα στην βελτίωση της φωτοδυναμικής τους δράσης. Επίσης, οι κυκλοδεξτρίνες είναι βιοσυμβατές με τον ανθρώπινο οργανισμό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα μόρια των φωτοευαισθητοποιητών που βρίσκονται εγκλεισμένα στην κοιλότητά τους να έχουν περισσότερη διάρκεια ζωής μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι, όχι μόνο προστατεύονται από πιθανές αλλοιώσεις της δομής τους, αλλά καταφέρνουν και φτάνουν τα καρκινικά κύτταρα-στόχους⁸⁶.

Παρακάτω αναφέρονται ενδεικτικά κάποιες ερευνητικές εργασίες από το 2000 και μετά, στις οποίες οι κυκλοδεξτρίνες έχουν χρησιμοποιηθεί ως νανοσωματίδια για τη μεταφορά φωτοευαίσθητων ουσιών.

Το 2003, οι Kolàrovà et al⁸⁷. μελέτησαν την ενδοκυτταρική φωτοτοξικότητα της μεσοτετρακισ(4-σουλφονοτοφαινυλ)πορφυρίνης (TPPS₄) και του μεταλλοσυγκροτήματός της με ψευδάργυρο (ZnTPPS4) όταν εγκλείστηκαν στην υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD). Βρήκαν ότι η ένταξη του ZnTPPS₄ στην HP-β-CD αύξησε την αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας ενάντια στο μελάνωμα. Αυτή η μελέτη ανέδειξε το δυναμικό των κυκλοδεξτρινών στη βελτίωση της PDT μέσω της αύξησης της διαλυτότητας και της τροποποίησης της συμπεριφοράς του φωτοευαισθητοποιητή σε βιολογικά συστήματα.

Η ίδια ομάδα, σε μελέτη του 2005, εστιάζει στις φωτοτοξικές ιδιότητες in vitro της τετραφαινοϋλπορφυρίνης ψευδαργύρου (ZnTPPS₄) εγκλεισμένη στην υδροξυπροπυλο-βκυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD). Αυτή η μελέτη εξέτασε συγκεκριμένα τις επιδράσεις του συγκροτήματος ενσωμάτωσης HP-β-CD-ZnTPPS₄ σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μελανώματος G361. Στη μελέτη αυτή, οι συγγραφείς παρατήρησαν ότι το σύμπλοκο εγκλεισμού παρουσίασε καλή ενδοκυτταρική πρόσληψη, και η διείσδυση του φωτοευαισθητοποιητή μέσω της κυτταρικής μεμβράνης εξαρτιόταν από τη συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή και τον χρόνο επώασης. Η υψηλότερη πρόσληψη επιτεύχθηκε για συγκέντρωση 3 μM και 48 ώρες επώασης. Οι συγγραφείς βρήκαν επίσης ότι η φωτοτοξικότητα του συμπλόκου εγκλεισμού ήταν σημαντικά υψηλότερη όταν ακτινοβολούνταν με φως σε σύγκριση με την ελεύθερη ZnTPPS₄.

Το 2007 οι Lo et al⁸⁸. μελέτησαν τη χρήση της επτακισ(2,3,6-τρι-Ο-μεθυλ)-βκυκλοδεξτρίνης, η οποία συνδέθηκε με την φθαλοκυανίνη (TMe-β-CD-SiIVPc), και την αλληλεπίδρασή της με την TPPS4. Τα ευρήματά τους έδειξαν ότι αυτά τα σύμπλοκα εγκλεισμού ενίσχυσαν τη διαλυτότητα των φωτοευαισθητοποιητών στο νερό. Δοκιμές in vitro σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (HT29) έδειξαν βελτιωμένη αποτελεσματικότητα PDT όταν χρησιμοποιήθηκαν τα σύμπλοκα εγκλεισμού σε σχέση με τους ελεύθερους φωτοευαισθητοποιητές.

Οι Silva et al⁸⁹. το 2011 μελέτησαν τα σύμπλοκα εγκλεισμού β-CD και HP-β-CD με την χλωρο-αλουμινο φθαλοκυανίνη (ClAlPc). Η μελέτη έδειξε ότι αυτά σύμπλοκα ενίσχυσαν τις φωτοφυσικές ιδιότητες της φθαλοκυανίνης και την απόδοση κβαντικής παραγωγής ROS, ενώ αύξησαν τη διαλυτότητα και τη σταθερότητά της σε υδάτινα περιβάλλοντα. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν ότι το συγκρότημα ClAlPc/HP-β-CD είναι ο καλύτερος υποψήφιος για εφαρμογές PDT σε σχέση με την ελεύθερη ClAlPc.

Σε μια σειρά ερευνών από το 2014 έως το 2016, οι Lu et al⁹⁰⁻⁹¹, μελέτησαν την ZnPc εγκλεισμένη στην HP-β-CD. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κυκλοδεξτρίνη βελτίωσε σημαντικά την αποτελεσματικότητα της PDT αυξάνοντας τη διαλυτότητα, μειώνοντας τη συσσώρευση και ενισχύοντας τη παραγωγή ROS της φθαλοκυανίνης. Επίσης, αυξήθηκε η ενδοκυττάρια συγκέντρωσης της ZnPc στα κύτταρα. Η συγκριτική μελέτη των συμπλόκων εγκλεισμού της ZnPc με τις α-CD, β-CD και γ-CD κατέδειξε το σύμπλοκο της β-CD πιο αποτελεσματικό.

Οι Paul et al⁹². το 2015 μελέτησαν τον εγκλσιμό της χλωρίνης e6 (Ce6) στην HP-β-CD. Το συγκρότημα βελτίωσε τη διαλυτότητα της Ce6, μείωσε τη συσσωμάτωσή του και αύξησε την κυτταροτοξικότητα του. Δοκιμές in vitro σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα της στοματικής κοιλότητας (OSC) έδειξαν ότι η Ce6-HP-β-CD, παρά τη μείωση της κυτταρικής πρόσληψης σε υψηλότερες συγκεντρώσεις της HP-β-CD, παρουσίασε σημαντικές βελτιώσεις στην αποτελεσματικότητα της PDT.

Το 2017, οι Yankovsky et al⁹³. μελέτησαν τη χρήση της μεθυλ-β-CD (Me-β-CD) και HPβ-CD για τη μεταφορά της mTHPC, ενός ισχυρού φωτοευαισθητοποιητή, σε in vitro και in vivo συνθήκες. Η μελέτη έδειξε ότι ο εγκλεισμός της mTHPC στις χημικά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες της β-CD, αποτρέπει τη συσσωμάτωση της στο αίμα και διευκολύνει τη διάχυση της σε βιολογικούς ιστούς. Έτσι ενισχύθηκε πολύ και η φωτοδυναμική της δράση.

Σε επόμενη μελέτη⁹⁴ το 2018, η ίδια ομάδα μελέτησε την φωτοδυναμική δράση της mTHPC εγκλεσμένης στις Me-β-CD και HP-β-CD ενάντια σε όγκους HT29. Βρήκαν ότι τα σύμπλοκα εγκλεισμού αύξησαν σημαντικά τη συσσώρευση της mTHPC στους όγκους σε σύγκριση με την ελεύθερη mTHPC. Επιπλέον, παρουσίασαν βελτιωμένη φωτοτοξικότητα, ενώ η mTHPc εγκλεισμένη στη Me-β-CD, διείσδυσε πιο βαθιά στους όγκους, ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα της PDT.

Αρκετές ερευνητικές εργασίες μελετούν τον εγκλεισμό και άλλων φωτοευαίσθητων ουσιών που δεν ανήκουν στις φθαλοκυανίνες. Το 2005, οι Bruzell et al⁹⁵. σύγκριναν την την φωτοδυναμική δράση της κουρκουμίνης εγκλεισμένης σε μικύλλια, λιποσώματα και την HP-β-CD (εικόνα 2.17). Και τα τρία είδη νανοσωματιδιών ενίσχυσαν την φωτοδυναμική δράση της κουρκουμίνης. Η ομάδα των Zhang et al⁹⁶ έγκλεισαν τον φωτοευαισθητοπιητή Cora στην γ-CD για να αυξήσουν την υδατοδιαλυτότητά του. Πράγματι, από τις φωτοδυναμικές μελέτες, επιβεβαιώθηκε η αύξηση της υδατοδιαλυτότητας του φωτοευαισθητοποιητή καθώς κι η ενισχυμένη του φωτοδυναμική δράση.

Εικόνα 2.17: Σύμπλοκο εγκλεισμού του PS Cora στην γ-κυκλοδεξτρίνη⁹⁶

Ακόμα, σε πολλές ερευνητικές εργασίες αναφέρεται η σύνδεση των φωτοευαισθητοποιητών με την εξωτερική επιφάνεια των κυκλοδεξτρινών δημιουργώντας συζεύξεις ή αλλιώς conjugates (εικόνα 2.18). Η δημιουργία της σύνδεσης κυκλοδεξτρίνηςφωτοευαισθητοποιητή πραγματοποιείται με χημικούς τρόπους και χρησιμοποιείται για φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι δεν είναι υδρόφοβοι. Επίσης, μπορούν να συνδεθούν και φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην χημειοθεραπεία με στόχο την καλύτερη στόχευσή τους⁹⁷.

Εικόνα 2.18: Μόριο κυκλοδεζτρίνης το οποίο έχει συζευχθεί με την ZnPc. Επιπλέον στην κοιλότητά της έχει εγκλειστεί φάρμακο που χρησιμοποιείται στην χημειοθεραπεία⁹⁷

Τέλος, ερευνητικές ομάδες, έχουν ενσωματώσει σύμπλοκα φωτοευαισθητοποιητώνκυκλοδεξτρινών σε νανοσωματίδια χρυσού, φουλερένια, λιποσώματα⁹⁸⁻¹⁰⁰ κ.α. (εικόνα 2.19).

Εικόνα 2.19: Σύμπλοκα κυκλοδεζτρινών τα οποία έχουν ενσωματωθεί στην επιφάνεια νανοσωματιδίων χρυσού⁹⁸

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι κυκλοδεξτρίνες δεν εισέρχονται στα κύτταρα καθώς είναι σχετικά μεγάλες δομές. Τα σχηματιζόμενα σύμπλοκά τους, αποδεσμεύουν τα μόρια του εγκλεισμένου φαρμάκου στον εξωκυτταρικό χώρο (λόγω αλλαγής pH κ.α.), όπου στη συνέχεια τα κύτταρα μπορούν να τα προσλάβουν μέσω διάφορων μηχανισμών, όπως η ενδοκυττάρωση. Η βκυκλοδεξτρίνη μαζί με την χημικά τροποποιημένη HP-β-CD μπορούν να επηρεάσουν τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης απομακρύνοντας χοληστερόλη και άλλες λιπαρές ουσίες. Αυτό μπορεί να διευκολύνει τη διείσδυση ορισμένων μορίων στα κύτταρα¹⁰¹.

2.3 Στόχος της παρούσας διατριβής

Έπειτα από ανασκόπηση της βιβλιογραφίας¹⁰²⁻¹⁰⁸ και λαμβάνοντας υπόψη τα σχετικά ευρήματα, σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι α) η διερεύνηση της φωτοδυναμικής δράσης της δίχλωρο-φθαλοκυανίνης-πυριτίου, SiCl₂Pc και β) η δημιουργία και μελέτη συστημάτων μεταφοράς με βάση τις κυκλοδεξτρίνες για την ενίσχυση τόσο της διαλυτότητάς της όσο και του φωτοδυναμικού της αποτελέσματος. Παρόλο που η συγκεκριμένη φθαλοκυανίνη έχει χρησιμοποιηθεί ως πρόδρομη ένωση για την δημιουργία άλλων φωτοευαισθητοποιητών, εξ' όσων γνωρίζουμε δεν έχει μελετηθεί ποτέ η φωτοδυναμική της δράση.

Για τον σχηματισμό των συμπλόκων εγκλεισμού της φθαλοκυανίνης με τις κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιείται η μέθοδος σχηματισμού πάστας (kneading). Έναν ακόμα στόχο της διατριβής αποτελεί ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων εγκλεισμού. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) όπου προσδιορίστηκαν το μέγεθος, ο δείκτης πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό των συμπλόκων. Η φασματοσκοπία φθορισμού επιλέχθηκε για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλεισμού και ο δομικός χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων μελετήθηκε με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας υπερύθρου.

Επιπλέον, μελετήθηκαν οι φωτοφυσικές και φωτοχημικές ιδιότητες της ελεύθερης αλλά και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης μέσω της φασματομετρίας ορατού υπεριώδους (UV-Vis) και της φασματομετρίας φθορισμού. Τέλος, μελετήθηκε και αξιολογήθηκε η in vitro φωτοδυναμική δράση τόσο της ελεύθερης φθαλοκυανίνης, αλλά και της εγκλεισμένης μορφής της ενάντια στην καρκινική σειρά κυττάρων A431. Η συγκεκριμένη καρκινική σειρά επιλέχθηκε αφού τα κύτταρα A431 χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση της πρωτεΐνης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), η οποία εμφανίζεται σε ένα ευρύ φάσμα καρκίνων. Μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη EGFR μπορεί να κατασταλεί με τη φωτοδυναμική θεραπεία. Επίσης, διαθέτουν το δυσλειτουργικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο P53, ένα γονίδιο κοινό σε πολλούς τύπους καρκίνου. Κατά συνέπεια, τα κύτταρα A431 θα μπορούσαν να θεωρηθούν ένα γενικό σύστημα δοκιμής για διάφορους τύπους καρκίνου κατά τη διάρκεια των μελετών PDT¹⁰⁵.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

3.1 Φασματοσκοπία απορρόφησης

3.1.1 Απορρόφηση φωτός - Νόμος Lambert - Beer

Η απορρόφηση, στο πλαίσιο της φασματοσκοπίας, αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία μια δέσμη ακτινοβολίας έντασης I_0 κατευθύνεται σε ένα δείγμα και μετριέται η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας I^{110} . Όταν η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διέρχεται από το δείγμα, ορισμένα φωτόνια απορροφούνται από τα μόριά του, με αποτέλεσμα η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας να ελαττώνεται (εικόνα 3.1).

Εικόνα 3.1: Απορρόφηση διαλύματος συγκέντρωσης c

Για τον υπολογισμό της απορρόφησης χρησιμοποιείται ο νόμος Lambert – Beer, ο οποίος περιγράφει την σχέση μεταξύ της εξερχόμενης από το δείγμα έντασης της ακτινοβολίας και της συγκέντρωσης του δείγματος.

		$I=I_0*10^{-\epsilon bc}$	(εξίσωση 3.1)
A=log	I ₀ /I=log 1/T=ɛbc,	Nόμος Lambert – Beer	(εξίσωση 3.2)
όπου	A= η απορρόφηση $I_0=$ η ένταση της προ I= η ένταση της εξερ T= I/I ₀ η διαπερατότ c= η συγκέντρωση τ	οσπίπτουσας ακτινοβολίας οχόμενης ακτινοβολίας ητα ου δείγματος (mol/l)	

b= πάχος της κυψελίδας (cm) ε= συντελεστής μοριακής απορρόφησης (l/mol*cm)

3.1.2 Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης

Για τη μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων τόσο της ελεύθερης όσο και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc, χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης Lambda 35, UV/VIS Spectrometer, Perkin Elmer¹¹¹ (εικόνα 3.2). Στην εικόνα 3.3 δίνεται το οπτικό διάγραμμα του οργάνου και η πορεία της φωτεινής δέσμης.

Εικόνα 3.2: Η διάταζη απορρόφησης Lambda 35, Perkin Elmer¹¹¹

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.3, το όργανο έχει δύο φωτεινές πηγές. Για την εκπομπή στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος (200 - 400 nm), χρησιμοποιείται μία λυχνία δευτερίου και για την εκπομπή στην ορατή και κοντινή υπέρυθρη περιοχή (350 - 900 nm) μία λυχνία αλογόνου. Σύμφωνα με το διάγραμμα, το κάτοπτρο M1 ανασηκώνεται προκειμένου να επιτρέψει τη διέλευση του φωτός το οποίο προέρχεται από την λυχνία δευτερίου. Όταν το φως προέρχεται από τη λυχνία άλογόνου, το κάτοπτρο M1 το ανακλά και έτσι αυτό οδηγείται στο κάτοπτρο M2. Στη συνέχεια, ανακλάται από το κάτοπτρο M2 και οδηγείται σε έναν τροχό φίλτρων. Εκεί, το κατάλληλο φίλτρο, ανάλογα με το μήκος κύματος του φωτός, παρεμβάλλεται στην πορεία της δέσμης και την φιλτράρει πριν αυτή εισέλθει στον μονοχρωμάτορα. Μετά την είσοδό της στον μονοχρωμάτορα, η δέσμη φωτός του εξεταζόμενου μήκους κύματος περνά από τη σχισμή εξόδου 2 και προσπίπτει στο κάτοπτρο M3 που την οδηγήσει στο διαχωριστή δέσμης. Από εκεί, το 50% της ακτινοβολίας της δέσμης ανακλάται και οδηγείται στο κάτοπτρο M5, ενώ το υπόλοιπο 50% περνά στο κάτοπτρο M4. Η δέσμη από το κάτοπτρο M5 οδηγείται στο δείγμα αναφοράς, ενώ η δέσμη από το κάτοπτρο M5 οδηγείται στο δείγμα αναφοράς, ενώ η δέσμη από το κάτοπτρο M5 οδηγείται στο δείγμα αναφοράς.

Ο έλεγχος του φασματοφωτόμετρου πραγματοποιείται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή και του λογισμικού πακέτου UV WinLab¹¹². Το λογισμικό αυτό προσφέρει τη δυνατότητα ρύθμισης κάποιων παραμέτρων όπως:

 η επιλογή μηκών κύματος μεταξύ των οποίων λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης της εκάστοτε ουσίας, η ταχύτητα σάρωσης και το πλάτος της σχισμής του μονοχρωμάτορα.

- ii) η ικανότητα μηδενισμού του σήματος που προκύπτει από τον διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένη η ουσία και το θόρυβο του φασματοφωτόμετρου μέσω της επιλογής «Autozero». Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, τα φάσματα που λαμβάνονται, να δίνουν μόνο την απορρόφηση που οφείλεται στη συγκέντρωση της εκάστοτε ουσίας στο υπό μέτρηση διάλυμα.
- iii) η επεξεργασία των καμπυλών των φασμάτων που λαμβάνονται.
- iv) ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ουσιών που περιέχονται στα υπό μέτρηση διαλύματα μέσω καμπυλών απορρόφησης των διαλυμάτων αναφοράς.

Εικόνα 3.3: Το οπτικό διάγραμμα του οργάνου και η πορεία της φωτεινής δέσμης.

3.2 Φασματοσκοπία φθορισμού

Για την συλλογή των φασμάτων φθορισμού της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc, αλλά και για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλεισμού της φθαλοκυανίνης στις κυκλοδεξτρίνες, χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία φθορισμού και η διάταξη φθορισμού LS 45 Luminescence Spectrometer, Perkin Elmer (εικόνα 3.4).

Εικόνα 3.4: Η διάταζη φθορισμού LS 45, Perkin Elmer¹¹³

Το συγκεκριμένο φασματοφωτόμετρο μπορεί να ανιχνεύσει φθορισμό, φωσφορισμό, χημειοφωταύγεια και βιοφωταύγεια των υπό μελέτη δειγμάτων είτε σε όλο το εύρος των μηκών κύματος του οργάνου (ή σε μέρος αυτής της περιοχής) είτε σε επιλεγμένα μήκη κύματος.

Εικόνα 3.5: Οπτικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου φθορισμού

Όπως προκύπτει από την εικόνα 3.5, η διάταξη φθορισμού αποτελείται από δύο μονοχρωμάτορες (διέγερσης και εκπομπής), κάτοπτρα και δύο φωτοπολλαπλασιαστές. Τα σήματα από τους ανιχνευτές μπορούν να παρατηρηθούν στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Ως πηγή φωτός διέγερσης χρησιμοποιείται είναι μια λυχνία ξένου, η οποία παράγει παλμούς μικρής χρονικής διάρκειας και μεγάλης έντασης.

Η ακτινοβολία διέγερσης εστιάζεται με τη βοήθεια κατόπτρων και εισέρχεται στον μονοχρωμάτορα διέγερσης. Στη συνέχεια το μονοχρωματικό φως που εξέρχεται από την σχισμή εξόδου, προσπίπτει με χρήση κατόπτρων υπό γωνία 45° στο δείγμα. Παράλληλα, μέσω ενός διαχωριστή δέσμης, ένα μέρος από τη μονοχρωματική δέσμη διέγερσης προσπίπτει στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς. Για τη διόρθωση της απόκρισης του φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς. Για τη διόρθωση της απόκρισης του φωτοπολλαπλασιαστή όργανο και διατηρεί σχεδόν σταθερή τη κβαντική απόδοση για απορρόφηση σε μήκη κύματος από 230 έως 630 nm και εκπομπή στα 650 nm.

Ο φθορισμός εκπέμπεται από το δείγμα σε γωνία 90° ως προς τη δέσμη διέγερσης και εστιάζεται από κάτοπτρα στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής. Η εξερχόμενη δέσμη από τον μονοχρωμάτορα συλλέγεται και αναλύεται τελικά από τον φωτοπολλαπλασιαστή δείγματος.

Ο έλεγχος του φασματοφωτόμετρου φθορισμού πραγματοποιείται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή με την χρήση του λογισμικού πακέτου FL WinLab¹¹⁴ το οποίο δίνει τη δυνατότητα ρύθμισης κάποιων παραμέτρων που επηρεάζουν τόσο τη μέθοδο φασματομετρίας όσο και το φασματοφωτόμετρο. Ενδεικτικά, μέσω του FL WinLab επιλέγονται τα μήκη κύματος και η ταχύτητα σάρωσης του δείγματος, το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης για το εκάστοτε δείγμα ενώ παρέχεται και η δυνατότητα επεξεργασίας των φασμάτων που προκύπτουν από τις μετρήσεις.

3.3 Οπτική μικροσκοπία

Το οπτικό μικροσκόπιο, που συχνά αναφέρεται ως "οπτικό μικροσκόπιο φωτός", είναι ένας τύπος μικροσκοπίου που χρησιμοποιεί ορατό φως και ένα σύστημα φακών για τη μεγέθυνση εικόνων μικρών δειγμάτων. Το πιο απλό μικροσκόπιο είναι ο απλός μεγεθυντικός φακός, ο οποίος προσφέρει μικρή μεγέθυνση. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται το σύνθετο μικροσκόπιο το οποίο απαρτίζεται από τέσσερα βασικά μέρη: α) μια πηγή φωτός, β) έναν συγκεντρωτικό φακό, γ) έναν προσφθάλμιο φακό, και δ) έναν αντικειμενικό φακό. Η συνολική μεγέθυνση που επιτυγχάνεται με ένα σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο είναι το γινόμενο των μεγεθύνσεων του προσοφθάλμιου και του αντικειμενικού φακού και φτάνει μέχρι και 2000χ.

Το υπό μελέτη δείγμα τοποθετείται πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα και κοντά στον αντικειμενικό φακό ο οποίος δημιουργεί το πραγματικό του είδωλο. Στη συνέχεια, το είδωλο αυτό μεγεθύνεται από τον προσοφθάλμιο φακό ο οποίος δημιουργεί το φανταστικό είδωλο του δείγματος. Εστιάζοντας κατάλληλα, επιτυγχάνεται η ευκρινής παρατήρηση του δείγματος.

Διακριτική ικανότητα d ενός σύνθετου μικροσκοπίου, ονομάζεται η ικανότητα του οπτικού συστήματος να διακρίνει δυο πολύ γειτονικά σημεία του δείγματος ως χωριστά και δίνεται από την εξίσωση 3.3:

d= 0.61λ/nsinα (εξίσωση 3.3)

όπου λ είναι το μήκος κύματος του φωτός της πηγής, n ο δείκτης διάθλασης του μέσου μεταξύ του αντικειμένου και του φακού και α το μισό της γωνίας του φωτεινού κώνου που δέχεται ο φακός. Το γινόμενο nsina ονομάζεται αριθμητικό άνοιγμα του φακού ΝΑ και εξαρτάται από την κατασκευή του φακού. Σημειώνεται ότι η διακριτική ικανότητα ενός σύνθετου μικροσκοπίου δεν μπορεί να ξεπεράσει τα 0.2 μm.

Για την οπτική παρατήρηση των κυττάρων, δεν χρησιμοποιείται το κοινό μικροσκόπιο καθώς οι διαθλάσεις του φωτός από το θρεπτικό μέσο δεν επιτρέπουν την εστίαση. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται το ανάστροφο μικροσκόπιο (εικόνα 3.6). Για την παρατήρηση των κυττάρων στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκε το ανάστροφο μικροσκόπιο φωτισμού διέλευσης Unitron MiC-1317 με πηγή φωτισμού λάμπα αλογόνου, το οποίο είναι εξοπλισμένο με μεγεθυντικούς φακούς 10x, 20x και 40x.

Εικόνα 3.6: Ανάστροφο μικροσκόπιο¹¹⁵

3.4 Συστήματα laser στην φωτοδυναμική θεραπεία

Η επιλογή της κατάλληλης πηγής φωτός στην φωτοδυναμική θεραπεία εξαρτάται από δύο βασικούς παράγοντες: α) το φάσμα απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή και β) το βάθος διείσδυσης του φωτός στους ιστούς. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε το διοδικό laser GCSLS -10 -1500m στο οποίο ενσωματώθηκε οπτική ίνα με διαχύτη κυκλικής συμμετρίας στο άκρο της. Το μήκος κύματος του εκπεμπόμενου φωτός είναι 660 nm. Στον πίνακα 3.1 παρατίθενται τα χαρακτηριστικά του.

invariagent. Aufartifictura Astrophilageneous as a cost of the second				
Χαρακτηριστικά	Τμή			
Μήκος κύματος	660 nm			
Τρόπος Λειτουργίας	Συνεχές			
Εύρος ρεύματος λειτουργίας	0-164 A			
Θερμοκρασία λειτουργίας	10-30 <i>C</i> °			
περιβάλλοντος				
Θερμοκρασία λειτουργίας LD	20 <i>C</i> °			
Θερμοκρασία συναγερμού LD	22 <i>C</i> °			

Πίνακας 3.1: Χαρακτηριστικά λειτουργίας διοδικού laser GCSLS -10 -1500m

Η εικόνα 3.7 δίνει τις καμπύλες βαθμονόμησης του laser, μια όταν στο άκρο της οπτικής ίνας είναι τοποθετημένος ο διαχύτης και μία χωρίς τον διαχύτη. Όπως προκύπτει, το laser εκπέμπει φως μετά τα 0.7 Α ενώ η μέγιστη ισχύς εκπομπής είναι 1600 mW. Στην εικόνα 3.8 δίνεται η γραφική παράσταση της τάσης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που εκπέμπεται. Το μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής του laser είναι στα 660±5 nm.

Εικόνα 3.7: Καμπύλη βαθμονόμησης του διοδικού laser GCSLS -10 -1500m.

Εικόνα 3.8: Γραφική παράσταση τάσης-μήκους κύματος του διοδικού laser GCSLS -10 -1500m.

Ο πίνακας 3.2 παρουσιάζει τα βασικά χαρακτηριστικά της οπτικής ίνας που συνδέεται στο laser. Λόγω της ίνας, η ισχύς της ακτινοβολίας στην έξοδό της μειώνεται. Για αυτό τον λόγο, η ισχύς εξόδου ρυθμίζεται με τη βοήθεια ενός ενεργόμετρου τα χαρακτηριστικά του οποίου δίνονται στον πίνακα 3.3

Χαρακτηριστικά	Τμή
Υλικό	Quartz
Διάμετρος	600 μm
Αριθμητικό άνοιγμα	0.37
Οπτικός προσαρμογέας	SMA 905

Πίνακας 3.2: Χαρακτηριστικά οπτικής ίνας

Χαρακτηριστικά	Τμή
Μήκος κύματος	$0.19-20\ \mu m$
Διάμετρος	16 mm
Κλίμακες ισχύος	10W/5W/0.5W
Όριο ισχύος/cm ²	30kW/cm ²
Επίπεδο θορύβου	1 mW
Ακρίβεια	$\pm 3\%$
Χρόνος απόκρισης	0.8s
Κλίμακες ενέργειας	2J/200mJ

Πίνακας 3.3: Χαρακτηριστικά λειτουργίας ενεργομέτρου

3.4.1 Πειραματική διάταξη laser για την μελέτη παραγωγής ελευθέρων ριζών της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc.

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη παραγωγής ελευθέρων ριζών της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc παρουσιάζεται στην εικόνα 3.9.

Εικόνα 3.9: Διάταξη μελέτης παραγωγής ελευθέρων ριζών.

Τη διάταξη απαρτίζουν το διοδικό laser GCSLS -10 -1500m με ενσωματωμένη την οπτική ίνα και ένα σύστημα ελέγχου της ισχύος εξόδου. Τα υπό μελέτη διαλύματα περιέχονται σε κυβέττα, η οποία βρίσκεται σε σταθερή απόσταση από το άκρο της οπτικής ίνας. Χάρη στον διαχύτη που περιέχεται στην οπτική ίνα, η κατανομή της ακτινοβολίας στα διαλύματα είναι ομοιογενής. Τέλος, για να αποφευχθούν οι καθιζήσεις των παραγόμενων φωτοπροϊόντων, η κυβέττα είναι τοποθετημένη σε μαγνητικό αναδευτήρα ο οποίος ενεργοποιεί τον μαγνήτη που περιέχεται στα υπό ακτινοβόληση διαλύματα.

3.4.2 Πειραματική διάταξη laser για την μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc.

Για την μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης των φωτοευαισθητοποιητών χρησιμοποιείται το ίδιο laser μαζί με το σύστημα μέτρησης της ισχύος εξόδου που χρησιμοποιείται και στην μελέτη παραγωγής ελευθέρων ριζών των φωτοευαισθητοποιητών. Η διάταξη παρουσιάζεται στην εικόνα 3.10. Ανάλογα με το πρωτόκολλο που εκτελείται, το αποτύπωμα του laser ρυθμίζεται ώστε να περιέχει τόσο τριβλία όσο και τα wells των plates, ενώ και εδώ η κατανομή της ακτινοβολίας είναι ομοιογενής.

Εικόνα 3.10: Διάταξη μελέτης της φωτοδυναμικής δράσης των φωτοευαισθητοποιητών

3.5 Μικροσκοπία φθορισμού

Η μικροσκοπία φθορισμού είναι μια ευαίσθητη, αξιόπιστη και ακριβής τεχνική απεικόνισης που χρησιμοποιείται από τους επιστήμονες για την παρατήρηση όχι μόνο των δομικών και μορφολογικών συστατικών των υπό μελέτη δειγμάτων, αλλά και των δυναμικών διεργασιών που παρατηρούνται σε ζωντανά κύτταρα. Βασίζεται στην ικανότητα εκπομπής φθορισμού των ενδογενών αυτοφθορίζοντων μορίων των κυττάρων αλλά και των εξωγενών χρωμοφόρων μορίων-ιχνηθετών. Τα χρωμοφόρα μόρια έχουν την ικανότητα να φθορίζουν όταν διεγερθούν με φως κατάλληλου μήκους κύματος, ενώ τα μόρια ιχνηθέτες εκπέμπουν φθορισμό μόνο όταν ενωθούν με την κατάλληλη χημική ουσία-στόχο. Χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα διαφορετικά χρωμοφόρα μόρια και ιχνηθέτες, μπορούν να μελετηθούν διαφορετικές δομές των κυττάρων την ίδια στιγμή.

Αφού το υπό μελέτη δείγμα φωτιστεί με φως κατάλληλων φασματικών χαρακτηριστικών, στον προσοφθάλμιο φακό ή τον αισθητήρα της κάμερας, είναι σημαντικό να φτάσει μόνο το σήμα του εκπεμπόμενου φθορισμού και όχι το φως της διέγερσης. Η εικόνα φθορισμού που προκύπτει, απαρτίζεται από τις φθορίζουσες περιοχές του δείγματος σε ένα σκοτεινό ή ιδανικά μαύρο υπόβαθρο. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται καλύτερη αντίθεση (contrast). Καθώς ο εκπεμπόμενος από το δείγμα φθορισμός είναι αρκετές τάξεις μεγέθους ασθενέστερος από το φως διέγερσης, για να υπάρξει η μέγιστη αντίθεση στις εικόνες φθορισμού, θα πρέπει το μικροσκόπιο φθορισμού να εξασφαλίζει μόνο τη διέλευση του φωτός φθορισμού από το δείγμα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται οπτικά φίλτρα στενού εύρους από τα οποία διέρχεται μόνο ένα μικρό ποσοστό φωτός. Έτσι λαμβάνονται εικόνες με σκοτεινό υπόβαθρο και άρα καλή αντίθεση. Συνολικά, ένα σωστά κατασκευασμένο μικροσκόπιο φθορισμού απαρτίζεται από το σύστημα φωτισμού και την πηγή διέγερσης, οπτικά για την διέγερση του δείγματος αλλά και την συλλογή του εκπεμπόμενου φθορισμού (φίλτρα διέγερσης και εκπομπής, διχρωϊκά κάτοπτρα) και ανιχνευτή του φωτός φθορισμού. Οι τρόποι φωτισμού του υπό εξέταση δείγματος που χρησιμοποιούνται στην μικροσκοπία φθορισμού είναι τρεις: α) φωτισμός διέλευσης πλήρους πεδίου (transmitted light illumination full aperture), φωτισμός διέλευσης σκοτεινού πεδίου (darkfield illumination) και γ) προσπίπτων φωτισμός (incident illumination).

Στις πειραματικές μελέτες της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο φθορισμού Olympus BX-50 με προσπίπτοντα φωτισμό. Στην εικόνα 3.11 παρουσιάζονται το διάγραμμα του μικροσκοπίου και οι οπτικοί δρόμοι.

*Εικόνα 3.11: Olympus BX-50*²⁵

Η πηγή φωτός που χρησιμοποιείται για τη διέγερση των δειγμάτων είναι λυχνία υδραργύρου 100 W και κατάλληλα οπτικά φίλτρα. Ο πίνακας 3.4 παρουσιάζει τα φίλτρα που διαθέτει το μικροσκόπιο. Αυτά είναι ενσωματωμένα σε κύβους ώστε να μπορούν να απεικονίζονται διάφορα χρωμοφόρα. Ο αντικειμενικός φακός που χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή των εικόνων φθορισμού είναι ένας 40x UPlanFl (NA=0.75), με διορθώσεις για σφαιρικές και χρωματικές εκτροπές, ενώ μέσω μιας κατάλληλα προσαρμοσμένης CCD κάμερας (KP-C571, Hitachi) συλλέγονται οι εικόνες.

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

	Πίνακας 3.4: Στοιγεία κα	δβων του μικ	ροσκοπίου φθορ	οισμού Olym	pus BX-50 ²⁵
--	--------------------------	--------------	----------------	-------------	-------------------------

3.5.1 Θαλαμίσκος μικροσκοπικής παρατήρησης ζωντανών κυττάρων

Για τα πειράματα μελέτης του επαγόμενου από τη φωτοδυναμική θεραπεία οξειδωτικού stress είναι αναγκαία η παρατήρηση και καταγραφή της απόκρισης ζωντανών κυττάρων σε διάφορα ερεθίσματα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο θαλαμίσκος της εικόνας 3.12, ο οποίος είχε αναπτυχθεί στα πλαίσια παλαιότερων διδακτορικών διατριβών²⁵. Ο θαλαμίσκος αποτελεί ένα πλήρως κλειστό σύστημα στον οποίο τοποθετείται το υπό μελέτη δείγμα μαζί με θρεπτικό μέσο ή ρυθμιστικό διάλυμα για να διατηρούνται τα κύτταρα ζωντανά.

Εικόνα 3.12: Θαλαμίσκος μικροσκοπικής παρατήρησης ζωντανών κυττάρων²⁵

3.6 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση οργανικών, πολυμερών και σε ορισμένες περιπτώσεις ανόργανων υλικών. Η μέθοδος ανάλυσης FT-IR βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρου φωτός από τα μόρια της υπό μελέτη ένωσης με αποτέλεσμα την διέγερση αυτών σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής¹¹⁰. Τα φάσματα απορρόφησης υπερύθρου των μορίων αποτελούν το δακτυλικό τους αποτύπωμα δίνοντας πληροφορίες για την φύση των ατόμων που βρίσκονται στο μόριο και την διάταξή τους στο χώρο. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως τα μόρια τα οποία μπορούν να διεγερθούν με την υπέρυθρη ακτινοβολία είναι όσα έχουν εμφανίζουν διπολική ροπή.

Στην φασματομετρία υπερύθρου μετριέται το ποσοστό της απορροφούμενης υπέρυθρης ακτινοβολίας από την υπό μελέτη χημική ένωση. Η ακτινοβολία αυτή οδηγεί σε δονήσεις των ατόμων. Για την καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού των διαφόρων δονήσεων, οι δεσμοί μεταξύ των ατόμων των μορίων αναπαρίστανται με ελατήρια.

Για τα διατομικά μόρια, η συχνότητα ν των δονήσεων των ατόμων δίνεται από τον νόμο του Hooke (εξίσωση 3.4),

ν=
$$\frac{1}{2\pi}\sqrt{\kappa/\mu}$$
 (εξίσωση 3.4)

όπου κ=σταθερά του ελατηρίου και μ=ανηγμένη μάζα, δηλαδή ο αρμονικός μέσος όρος των μαζών m1 και m2 των ατόμων.

Αφού το μόριο απορροφήσει την υπέρυθρη ακτινοβολία, διεγείρεται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης οι οποίες είναι κβαντισμένες (εικόνα 3.13). Η ενέργεια της κάθε στάθμης δόνησης καθορίζεται από την εξίσωση Schrödinger που ισχύει για τον αρμονικό ταλαντωτή (εξίσωση 3.5).

$$E_{vibr} = (v+1/2) hv$$
 (εξίσωση 3.5)

όπου $v = 0, 1, 2, 3, \dots$ ο κβαντινκός αριθμός δόνησης.

Εικόνα 3.13: Κατανομή ενέργειας ανά στιβάδα δόνησης α) ενός αρμονικού ταλαντωτή και β) ενός μην αρμονικού ταλαντωτή, όπου r₀ η απόσταση των κέντρων δύο ατόμων, ενός μορίου σε κατάσταση ισορροπίας, r₁ και r₂ το ελάχιστο και μέγιστο μήκος του δεσμού των δύο ατόμων κατά τη δόνησής τους, E_D=ενέργεια διάστασης¹¹⁰.

Στον αρμονικό ταλαντωτή, οι στιβάδες δόνησης ισαπέχουν ενεργειακά μεταξύ τους (εικόνα 3.13α). Η πραγματική κατάσταση δόνησης των μορίων όμως περιγράφεται από τον μη αρμονικό ταλαντωτή. Στην περίπτωση αυτή, η απόσταση μεταξύ των στιβάδων μειώνεται καθώς ο κβαντικός αριθμός δόνησης υ αυξάνεται. Αντίστοιχα η ενέργεια αυξάνεται πλησιάζοντας την ενέργεια διάστασης Ε_D (απαιτούμενη ενέργεια για να σπάσει ο δεσμός).

Τα πολυατομικά μόρια δονούνται με διάφορους τρόπους. Για την καλύτερη κατανόηση αυτών, παρατίθενται οι τρόποι δόνησης της μεθυλενικής ομάδας:

 Οι δονήσεις τάσης (stretching vibrations): δύο συνδεδεμένα άτομα δονούνται συνεχώς και ταυτόχρονα. Η μεταξύ τους απόσταση μεταβάλλεται, όμως δεν αλλάζει ο άξονας ή οι γωνίες του δεσμού τους.

Εικόνα 3.14: α) Συμμετρική δόνηση τάσης, β) Ασύμμετρη δόνηση τάσης¹¹⁰.

 Οι δονήσεις κάμψης (bending vibrations): Μοιάζουν με τις δονήσεις τάσης με τη διαφορά ότι η γωνία μεταξύ δύο δεσμών συνεχώς μεταβάλλεται.

Εικόνα 3.15: α) Ομοεπίπεδη δόνηση κάμψης, β) Δόνηση κάμψης εκτός επιπέδου¹¹⁰.

 Οι δονήσεις σείσης (wagging vibrations): δονήσεις μεταξύ τριών μη γραμμικών μορίων τα οποία πάλλονται εντός του επιπέδου ισορροπίας που σχηματίζεται από αυτά και τους δύο δεσμούς τους.

Εικόνα 3.16:+: Δόνηση σείσης πάνω από το επίπεδο ισορροπίας, -: Δόνηση σείσης κάτω από το επίπεδο ισορροπίας¹¹⁰.

 Οι δονήσεις αιώρησης (rocking vibrations): δονήσεις οι οποίες παράγονται όταν τρία μη γραμμικά συνδεδεμένα άτομα πάλλονται εκτός του επιπέδου ισορροπίας τους.

Εικόνα 3.17: Δόνηση αιώρησης¹¹⁰.

Οι δονήσεις συστροφής (twisting vibrations): δονήσεις που δημιουργούνται όταν μια ομάδα ατόμων περιστρέφεται γύρω από το δεσμό που την ενώνει με το υπόλοιπο μέρος του μορίου.

Εικόνα 3.18: +: δόνηση συστροφής πάνω από το επίπεδο ισορροπίας, -: δόνηση συστροφής κάτω από το επίπεδο ισορροπίας¹¹⁰.

 Οι δονήσεις ψαλιδιού ή παραμόρφωσης (scissoring ή deformations vibrations): δονήσεις που δημιουργούνται όταν δύο μη συνδεόμενα άτομα κινούνται μπρος και πίσω προς τη μεταξύ τους διεύθυνση.

Εικόνα 3.19: Δόνηση ψαλιδιού.

Τα πρώτα φασματοφωτόμετρα IR μετασχηματισμού Fourier εμφανίστηκαν το 1970. Στην εικόνα 3.20 παρουσιάζονται τα μέρη από τα οποία αυτά αποτελούνται. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.20, τα φασματοσκόπια FT-IR περιέχουν ένα συμβολόμετρο Michelson, το οποίο τοποθετείται μεταξύ της πηγής και του δείγματος. Η δέσμη φωτός που εκπέμπεται από την πηγή, προσπίπτει σε έναν διαχωριστή δέσμης, όπου το ένα μέρος αυτής ανακλάται σε ένα σταθερό κάτοπτρο και το άλλο μέρος σε ένα κινητό κάτοπτρο. Η δέσμη που προσπίπτει στο κινητό κάτοπτρο, ανακλάται από αυτό πίσω στον διαχωριστή δέσμης όπου και ενώνεται ξανά με την αρχική μισή δέσμη στο εσωτερικό του ανιχνευτή. Οι δύο δέσμες φωτός που συμβάλλουν, παρουσιάζουν διαφορά φάσης λόγω της διαφοράς οπτικού δρόμου που διανύουν. Η δέσμη IR φωτός που προκύπτει, χαρακτηρίζεται από μια κατανομή διαφόρων συχνοτήτων και εν συνεχεία κατευθύνεται στο υπό μελέτη δείγμα όπου και απορροφάται. Τα συμβολογράμματα που προκύπτουν, μετατρέπονται στα αντίστοιχα φάσματα με τη βοήθεια του μαθηματικού μετασχηματισμού Fourier.


Εικόνα 3.20: Σχηματική αναπαράσταση του συμβολόμετρου σε φασματόμετρο FTIR (πηγή https://www.edinst.com/blog/what-is-ftir-spectroscopy/)

Για την συλλογή των φασμάτων FT-IR της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc, χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο FT-IR Alpha II Compact με κρύσταλλο διαμαντιού ATR (Attenuated Total internal Reflectance) της εταιρείας Bruker (εικόνα 3.21). Στο συγκεκριμένο φασματοφωτόμετρο μπορούν να συλλεχθούν φάσματα τόσο από στερεά όσο και από υγρά δείγματα. Ο έλεγχος του οργάνου πραγματοποιείται μέσω του λογισμικού Opus 7.8.



(α) (β) Εικόνα 3.2120: α) Φασματοφωτόμετρο FT-IR Alpha II Compact με κρύσταλλο διαμαντιού ΑΤR και β) το άκρο του βραχίονα πίεσης¹¹⁶.

3.6.1 Μέθοδος Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων εγκλεισμού της φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc με τις κυκλοδεξτρίνες ως προς το μέγεθός τους, τον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS). Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Zetasizer Nano ZS της εταιρείας Malvern¹¹⁷.

Η δυναμική σκέδαση του φωτός είναι μια μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μετρήσεις της κατανομής του μεγέθους σωματιδίων, ιδίως στην περιοχή μεταξύ 2-500 nm και βασίζεται στην αλληλεπίδραση του φωτός με τα υπό μέτρηση σωματίδια. Πιο συγκεκριμένα, μελετάται η κίνηση Brown των σωματιδίων, η οποία συσχετίζεται με το μέγεθός τους. Η κίνηση Brown είναι η κίνηση των σωματιδίων που οφείλεται στην τυχαία σύγκρουση αυτών με τα μόρια του υγρού το οποίο περιέχονται. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της κίνησης Brown για το DLS είναι ότι τα μικρά σωματίδια κινούνται πιο γρήγορα σε σχέση με τα μεγαλύτερα που κινούνται πιο αργά. Η ταχύτητα των σωματιδίων στο υγρό εξαρτάται από: i) το μέγεθος του εκάστοτε σωματιδίου, ii) το ιξώδες του υγρού και iii) την θερμοκρασία. Η θερμοκρασία πρέπει να είναι γνωστή και να παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Υψηλότερη θερμοκρασία οδηγεί σε πιο γρήγορη κίνηση Brown, ενώ τυχόν μεταβολές αυτής επηρεάζουν και το ιξώδες του υγρού.

Η ταχύτητα των σωματιδίων της κίνησης Brown καθορίζεται από τον μεταφορικό συντελεστή διάχυσης D, ο οποίος περιγράφει την δυσκολία κίνησης ενός σωματιδίου μέσα σε ένα υγρό διάλυμα και είναι αντιστρόφως ανάλογος του μεγέθους του σωματιδίου. Η σχέση μεταξύ του μεγέθους του σωματιδίου και της ταχύτητάς του λόγω της κίνησης Brown δίνεται από την εξίσωση Stokes-Einstein (εξίσωση 3.7):

$$d_{H} = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$
 (εξίσωση 3.7)
όπου d_{H} = υδροδυναμική διάμετρος του σωματιδίου
k= σταθερά Boltzmann
T=απόλυτη θερμοκρασία
η=ιξώδες
D= μεταφορικός συντελεστής διάχυσης

Ως υδροδυναμική διάμετρο d_H ορίζουμε την διάμετρο μιας σφαίρας που διαχέεται με την ίδια ταχύτητα με το υπό μέτρηση σωματίδιο ή μόριο (εικόνα 3.22).



Εικόνα 3.212: Υδροδυναμική διάμετρος¹¹⁷

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η τεχνική DLS βασίζεται στην αλληλεπίδραση του φωτός με τα υπό μέτρηση σωματίδια. Όταν το φως σκεδάζεται από τα κινούμενα σωματίδια, λόγω του φαινομένου Doppler, υφίσταται μια μετατόπιση προς χαμηλότερη ή υψηλότερη συχνότητα ανάλογα εάν το σωματίδιο κινείται από ή προς την πηγή. Καθώς τα σωματίδια κινούνται, η ενισχυτική και καταστροφική συμβολή των φωτεινών κυμάτων προκαλούν αυξομειώσεις στην ένταση του φωτός που ανιχνεύεται από την οπτική διάταξη. Το σύστημα Zetasizer Nano μετρά το ρυθμό της διακύμανσης της έντασης του ανιχνευόμενου φωτός και στη συνέχεια το χρησιμοποιεί για να υπολογίσει το μέγεθος των σωματιδίων.

Η ακόλουθη εικόνα 3.23 παρουσιάζει μια τυπική διάταξη DLS. Αυτή αποτελείται από την οπτική μονάδα Zetasizer Nano (1), τις κυβέττες που τοποθετούνται τα δείγματα προς μέτρηση (2) καθώς και τη θέση αυτών στην οπτική μονάδα (3), τη μονάδα MPT-2 Titrator που χρησιμοποιείται για την μέτρηση & ρύθμιση του pH (4) και τέλος τον υπολογιστή μέσω του οποίου εκτελείται το λογισμικό Zetasizer (5). Το λογισμικό ελέγχει την οπτική μονάδα καθώς και την επεξεργασία και παρουσίαση των μετρούμενων δεδομένων για να δώσει είτε το μέγεθος είτε το ζ-δυναμικό του δείγματος που μετρήθηκε.



Εικόνα 3.22: Διάταζη DLS¹¹⁷.

Η διάταξη που παρουσιάζεται στην εικόνα 3.24, απεικονίζει εκ νέου μια τυπική μονάδα DLS μαζί με την πηγή φωτός-laser (1) που φωτίζει το δείγμα (2) καθώς και τον ανιχνευτή (3), ο οποίος χρησιμοποιείται για την μέτρηση της έντασης του σκεδαζόμενου, από το δείγμα, φωτός. Ανάλογα το μοντέλο Zetasizer Nano, ο ανιχνευτής τοποθετείται σε διαφορετική θέση, οπότε το φως ακολουθεί διαφορετικές διαδρομές. Οι μετρήσεις της διατριβής πραγματοποιήθηκαν σε μοντέλο Zetasizer Nano το οποίο περιγράφεται από την οπτική διαδρομή Α. Για την προστασία του ανιχνευτή από μεγάλης έντασης φωτός, η διάταξη περιλαμβάνει έναν οπτικό εξασθενητή (4).



Εικόνα 3.24: Διάταξη DLS που συμπεριλαμβάνει πηγή laser και ανιχνευτή φωτός¹¹⁷.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ

4.1 Πρωτόκολλα και μεθοδολογίες μοντέλου καρκίνου του δέρματος

4.1.1 Ανάπτυξη μοντέλου κυττάρου καρκίνου του δέρματος για μελέτες φωτοδυναμικής δράσης.

Για την ανάπτυξη του μοντέλου καρκίνου του δέρματος σε κυτταρικό επίπεδο, επιλέχθηκαν κύτταρα της καρκινικής σειράς επιδερμικού καρκινώματος A431 (American Type Tissue Collection, USA). Η κυτταρική αυτή σειρά χρησιμοποιείται ευρέως για την κατανόηση των μηχανισμών της καρκινογένεσης και της κυτταρικής αναπτυξιακής βιολογίας. Πρόκειται για κύτταρα τα οποία απομονώθηκαν από την επιδερμίδα 85χρονης ασθενούς και είναι γνωστά για τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor, EGFR), βασικού παράγοντα που σχετίζεται με την παθογένεια διαφόρων τύπων καρκίνου. Η μελέτη αυτών των κυττάρων παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στην ανάπτυξη των καρκινογόνων κυττάρων.

Τα A431 κύτταρα διατηρούνται κατεψυγμένα σε υγρό άζωτο σε ειδικά φιαλίδια κρυοδιατήρησης μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

4.1.2 Μεθοδολογία απόψυξης κυτταρικής σειράς A431.

Για την καλλιέργεια των καρκινικών κυττάρων Α431 χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοοειδών (FBS), 1% αντιβιοτικό-αντιμιτωτικό, 0,5% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και 0,07% γενταμικίνη. Το φιαλίδιο με τα κατεψυγμένα κύτταρα τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως το οποίο περιέχει απεσταγμένο νερό σε θερμοκρασία 37 °C. Στη συνέχεια, αφήνεται στον κλίβανο επώασης για περίπου 5 λεπτά μέχρις ότου ξεπαγώσει. Αφού ξεπαγώσει το περιεγόμενο της αμπούλας, αυτό προστίθεται σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρησης μαζί με 7 ml πλήρες θρεπτικό μέσο. Για την αποφυγή απώλειας κυττάρων, το φιαλίδιο κρυοδιατήρησης ξεπλένεται δύο φορές με 1 ml πλήρες θρεπτικό μέσο, το οποίο έπειτα προστίθεται στον πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρησης. Στη συνέχεια, το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 1200 rpm για 7 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και γίνεται πολύ καλό pipetting με 2 ml πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε να σπάσουν τα συσσωματώματα των κυττάρων που προέκυψαν από τη φυγοκέντρηση και να προκύψουν μεμονωμένα κύτταρα. Έπειτα, τα κύτταρα τοποθετούνται σε φλάσκα Corning των 75 cm² η οποία περιέχει 13 ml εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου. Πριν την τοποθέτηση της φλάσκας στον κλίβανο, αυτή παρατηρείται στο οπτικό μικροσκόπιο. Ακολουθεί η επώαση των κυττάρων για 48 ώρες στον κλίβανο ώστε να προσκολληθούν στην φλάσκα και να πολλαπλασιαστούν.

4.1.3 Μεθοδολογία ανακαλλιέργειας κυτταρικής σειράς A431.

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται όταν η πληρότητα σε κύτταρα της φλάσκας υπερβαίνει το 70%. Αρχικά, το υπάρχον υγρό της φλάσκας απορρίπτεται με προσοχή ώστε να μην αποκολληθούν κύτταρα και η φλάσκα ξεπλένεται με PBS δύο φορές (4 ml ανά

έκπλυση). Στη συνέχεια προστίθενται 7 ml θρυψίνης (Trypsin – EDTA 0,05%), η οποία προκαλεί την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας. Η φλάσκα τοποθετείται εντός του κλίβανου για 10 λεπτά ώστε να δράσει η θρυψίνη. Στη συνέχεια η αποκόλληση των κυττάρων επιβεβαιώνεται με οπτική παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Η αναστολή της δράσης της θρυψίνης πραγματοποιείται με την προσθήκη 8 ml πλήρους θρεπτικού μέσου στη φλάσκα και το περιεχόμενό της μεταφέρεται σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρησης. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 1200 rpm για 7 λεπτά, το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθενται 10 ml πλήρους θρεπτικού μέσου στον σωλήνα. Πριν το μοίρασμα των κυττάρων σε φλάσκες των 75 cm² που περιέχουν 15 ml εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο, πραγματοποιείται καλό pipetting ώστε να σπάσουν τυχόν συσσωματώματα κυττάρων. Οι φλάσκες ελέγχονται στο οπτικό μικροσκόπιο και τοποθετούνται για επώαση στον κλίβανο για 48 ώρες.

4.1.4 Μεθοδολογία κατάψυξης κυτταρικής σειράς A431.

Η φύλαξη και διατήρηση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα πραγματοποιείται με την αποθήκευσή τους σε υγρό άζωτο. Για την κατάψυξη των κυττάρων ακολουθείται η διαδικασία ανακαλλιέργειάς τους που περιγράφηκε παραπάνω με την διαφορά ότι το πλήρες θρεπτικό μέσο που παρασκευάζεται για να αποθηκευτούν τα κύτταρα, είναι εμπλουτισμένο με 20% FBS. Το περιεχόμενο σε κύτταρα μιας φλάσκας 75 cm² χωρίζεται σε 4 φιαλίδια κρυοδιατήρησης σε κάθε ένα από τα οποία προστίθεται 1,5 ml κυττάρων σε εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο. Τέλος, προστίθεται 10% DMSO σε κάθε φιαλίδιο ώστε να επιτευχθεί σταδιακή ψύξη των κυττάρων και να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό τους. Η διαδικασία κατάψυξης των κυττάρων πραγματοποιείται σταδιακά, πρώτα σε υπερκαταψύκτη και θερμοκρασία -80 °C και μετά το πέρας 24 ωρών τοποθετούνται στο υγρό άζωτο (-196 °C) όπου μπορούν να διατηρηθούν για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα.

4.1.5 Μεθοδολογία προσδιορισμού του αριθμού των κυττάρων.

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιείται με χρήση του αιματοκυτταρόμετρου (πλακίδιου) Neubauer (εικόνα 4.1α). Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο επιφάνειες με τη μορφή τετράγωνων πλεγμάτων. Κάθε πλέγμα (εικόνα 4.1β) αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm. Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2,5 μm, και χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του εάν τα κύτταρα θα θεωρηθούν ότι βρίσκονται μέσα ή έξω από πλέγμα. Από τα 9 κύρια τετράγωνα, μόνο τα 4 που βρίσκονται στις γωνίες του τετράγωνου πλέγματος χρησιμοποιούνται για την μέτρηση των κυττάρων (εικόνα 4.1γ).

Για να μετρηθεί ο αριθμός των κυττάρων, ακολουθείται η διαδικασία της ανακαλλιέργειας και αυτά συλλέγονται σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρησης. Το διάλυμα που προκύπτει είναι συνήθως πολύ πυκνό οπότε πραγματοποιείται αραίωση 1:10 (10 μl διαλύματος κυττάρων σε 90 μl πλήρες θρεπτικό μέσο). Από αυτό το διάλυμα, 9 μl εισάγονται στην καλυπτρίδα του πλακιδίου μέτρησης Neubauer. Το πλακίδιο τοποθετείται στο μικροσκόπιο και μετριέται ο αριθμός των κυττάρων σε στη συνέχεια τον μέσο όρο τους. Για να βρεθεί ο

συνολικός αριθμός των κυττάρων, χρειάζεται να γνωρίζουμε την συγκέντρωση τους. Ο συνολικός όγκος των τεσσάρων τετραγώνων είναι: 0,1 mm x 1 mm x 1 mm = 0,1 mm³ = 10^{-4} cm³ = 10^{-4} ml. Επομένως αν είναι N ο μέσος αριθμός κυττάρων που μετρήθηκε, αυτός πολλαπλασιάζεται με τον συνολικό όγκο (x 10^4) και έτσι βρίσκεται ο αριθμός κυττάρων ανά ml (κύτταρα/ml). Στην μέτρηση δεν υπολογίζονται τα κύτταρα που βρίσκονται πάνω στις γραμμές, πάνω και δεξιά ή κάτω και αριστερά καθώς και τα συσσωματώματα των κυττάρων που τυχόν υπάρχουν.



Εικόνα 4.1: **α**) πλάκα μέτρησης κυττάρων Neubauer (αιματοκυτταρόμετρο Neubauer), **β**) πλέγμα μέτρησης πλακιδίου **γ**) παράδειγμα μετρήσιμων και μη μετρήσιμων κυττάρων

4.1.6 Πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας – βιοχημικός έλεγχος MTT.

Για τη μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων χρησιμοποιείται ευρέως ο βιοχημικός έλεγχος βιωσιμότητας MTT (33-(4,5-διμεθυλοδιαζόλη-2)-2,5- διφαινυλοτετραζολικού βρωμιδίου bromide, Sigma). Το αντιδραστήριο MTT χρωματίζει μόνο τα υγιή κύτταρα ή κύτταρα τα οποία βρίσκονται στα πρώτα στάδια της απόπτωσης, καθώς, οι μιτοχονδριακές τους δεϋδρογενάσες αντιδρούν με το MTT σχηματίζοντας μωβ κρυστάλλους φορμαζάνης. Η ένταση του μωβ χρώματος των κρυστάλλων φανερώνει το βαθμό της κυτταροτοξικότητας που προκαλεί ο εκάστοτε παράγοντας-ερέθισμα που μελετάται. Η βιωσιμότητα των κυττάρων εκτιμάται 24 ώρες μετά από την πρόκληση ερεθίσματος σε αυτά και η διαδικασία πραγματοποιείται σε plates 96 θέσεων (wells). Το διάλυμα MTT παρασκευάζεται διαλύοντας 5 mg σκόνης MTT σε 1 ml PBS. Στη συνέχεια, αφού αφαιρεθεί το υπάρχον θρεπτικό μέσο, σε κάθε well προστίθενται 15 μl από το διάλυμα του MTT μαζί με 100 μl πλήρους θρεπτικού μέσου (τελική συγκέντρωση MTT σε κάθε well: 0,65 mg/ml). Τα κύτταρα επωάζονται με το MTT στον κλίβανο για 3 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης, είναι ορατοί οι σχηματισμένοι κρύσταλλοι φορμαζάνης. Ακολουθεί η αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος και σε κάθε well προστίθενται 200 μl DMSO για την διαλυστοποίηση των σχηματισμένων κρυστάλλων φορμαζάνης. Τέλος, καταγράφεται η απορρόφηση στα 570 nm (κορυφή του φάσματος απορρόφησης της φορμαζάνης) με τη χρήση ενός Epoch 2 Micro-plate Reader (Bio Tek Instruments). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % κυτταρική βιωσιμότητα = (μέση οπτική πυκνότητα (OD) επεξεργασμένων κυττάρων/μέση OD μη επεξεργασμένων κυττάρων) ×100.

4.1.7 Μεθοδολογία μελέτης της επίδρασης του φωτός διέγερσης στην βιωσιμότητα των κυττάρων.

Πριν την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας, είναι απαραίτητο να μελετηθεί η επίδραση του φωτός διέγερσης στην βιωσιμότητα των κυττάρων χωρίς την παρουσία του φωτοευαισθητοποιητή. Σκοπός είναι ο προσδιορισμός της κατάλληλης δόσης ενέργειας του φωτός διέγερσης που δεν οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Η εκάστοτε δόση ισχύος ακτινοβόλησης προκύπτει διαιρώντας την τιμή της ισχύος της ακτινοβολίας διέγερσης στην έξοδο του διαχύτη που βρίσκεται στο άκρο της οπτικής ίνας η οποία μεταφέρει το φως, με το εμβαδό της επιφάνειας του σένσορα που βρίσκεται στο επίπεδο των κυττάρων.

Στα πλαίσια της μελέτης αυτής επιλέχθηκαν τέσσερις διαφορετικές δόσεις ισχύος οι οποίες αντιστοιχούν στα 9 mW/cm², 12 mW/cm², 15 mW/cm² και 18 mW/cm², ενώ η διάρκεια ακτινοβόλησης ήταν 1, 2 και 3 λεπτά. Η συνολική δόση ενέργειας προκύπτει από το γινόμενο της δόσης ισχύος επί την χρονική διάρκεια της ακτινοβόλησης (πίνακας 4.1).

Αρχικά, προετοιμάζεται πλάκα (plate) 96 πηγαδιών με 7500 κύτταρα ανά πηγάδι, το οποίο και αφήνεται στον κλίβανο για 24 ώρες. Σε κάθε συνθήκη ακτινοβόλησης αντιστοιχούν 3 πηγάδια για λόγους επαναληψιμότητας, ενώ 3 πηγάδια τα οποία δεν ακτινοβολούνται, αποτελούν την ομάδα κυττάρων ελέγχου (control). Μετά το πέρας των 24 ωρών, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και προστίθενται 40 μl PBS σε κάθε πηγάδι για την ακτινοβόληση. Εν συνεχεία, ακολουθεί η ακτινοβόληση των κυττάρων. Μετά το τέλος της ακτινοβόλησης, αφαιρείται το PBS και προστίθενται 100 μl πλήρες θρεπτικό μέσο σε κάθε πηγάδι. Έπειτα, τα κύτταρα αφήνονται στον κλίβανο για 24 ώρες όπου και ακολουθεί η διαδικασία του ελέγχου της βιωσιμότητας των κυττάρων.

Δόση ισχύος ακτινοβόλησης (mW/cm ²) Διάρκεια ακτινοβόλησης (sec)	9	12	15	18
60	540	720	900	1080
120	1080	1440	1800	2160
180	1620	2160	2700	3240

Πίνακας 4.1: Συνολικές δόσεις ενέργειας ακτινοβόλησης (mJ/cm2) για τις διάφορες δόσεις ισχύος και τους χρόνους ακτινοβόλησης.

4.1.8 Μεθοδολογία μελέτης της επίδρασης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες SiCl₂Pc στην βιωσιμότητα των κυττάρων απουσία φωτός διέγερσης.

Πριν την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας, είναι αναγκαία η μελέτη τοξικότητας της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc απουσία φωτός στην βιωσιμότητα των κυττάρων (dark toxicity). Σκοπός είναι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των φωτοευαισθητοποιητών που δεν επάγει κυτταρικό θάνατο απουσία του φωτός διέγερσης. Για το λόγο αυτό τα κύτταρα επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις της ελεύθερης και εγκλεισμένης SiCl₂Pc στις κυκλοδεξτρίνες για 24 ώρες και μετρήθηκε η βιωσιμότητά τους με το βιοχημικό έλεγχο μέτρησης βιωσιμότητας MTT.

Για την επιλογή των συγκεντρώσεων των φωτοευαισθητοποιητών με τις οποίες θα επωαστούν τα κύτταρα, είναι απαραίτητο να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι αυτές διαλύονται σε DMF, το οποίο εμφανίζει τοξικότητα στα κύτταρα. Για το λόγο αυτό, η συγκέντρωση του DMF στα τελικά διαλύματα των φωτοευαισθητοποιητών με τα οποία θα επωαστούν τα κύτταρα πρέπει να είναι 0,1%. Τελικά, οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν για την επώαση των κυττάρων με τους φωτοευαισθητοποιητές είναι 0,1 μM, 0,25 μM, 0,5 μM, 0,75 μM και 1 μM.

Οι μελέτες της επίδρασης των φωτοευαισθητοποιητών στην βιωσιμότητα των κυττάρων πραγματοποιούνται σε πλάκα (plate) 96 πηγαδιών με 7500 κύτταρα ανά πηγάδι, το οποίο και αφήνεται στον κλίβανο για 24 ώρες. Σε κάθε υπό μελέτη συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιητή αντιστοιχούν 3 πηγάδια για λόγους επαναληψιμότητας, ενώ 3 πηγάδια τα οποία δεν επωάζονται με κάποια φωτοευαίσθητη ουσία, αποτελούν την ομάδα κυττάρων ελέγχου (control). Μετά το πέρας των 24 ωρών αφαιρείται το πλήρες θρεπτικό μέσο και προστίθεται νέο, το οποίο περιέχει τις φωτοευαίσθητες ουσίες στις προαναφερθείσες τελικές συγκεντρώσεις. 24 ώρες μετά, το πλήρες θρεπτικό μέσο και προστίθεται. Εν συνεχεία, προστίθεται φρέσκο πλήρες θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα αφήνονται να επωαστούν για άλλες 24 ώρες. Τέλος, ακολουθεί η διαδικασία ελέγχου βιωσιμότητας των κυττάρων.

4.1.9 Μεθοδολογία μελέτης φωτοδυναμικής δράσης στο μοντέλο κυττάρου καρκίνου του δέρματος.

Οι μελέτες της φωτοδυναμικής δράσης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες SiCl₂Pc στα κύτταρα A431 πραγματοποιούνται σε πλάκα (plate) 96 πηγαδιών με 7500 κύτταρα ανά πηγάδι, το οποίο και αφήνεται στον κλίβανο για 24 ώρες. Έπειτα, τα κύτταρα επωάζονται με τον κάθε φωτοευαισθητοποιητή σε τελική συγκέντρωση 0,75 μM για 4 ώρες. Στη συνέχεια, το εμπλουτισμένο με τις φωτοευαίσθητες ουσίες θρεπτικό μέσο απομακρύνεται και προστίθενται 40 μl PBS ανά πηγάδι για την ακτινοβόληση των κυττάρων. Η ακτινοβόληση πραγματοποιείται για τις τέσσερις δόσεις ισχύος των 9 mW/cm², 12 mW/cm², 15 mW/cm² και 18 mW/cm² για 1, 2 και 3 λεπτά. Μετά το πέρας της ακτινοβόλησης προστίθεται φρέσκο πλήρες θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα αφήνονται στον κλίβανο για 24 ώρες. Τέλος, μετράται η κυτταρική βιωσιμότητα με τη διαδικασία MTT. Σε κάθε συνθήκη φωτοδυναμικής θεραπείας, για λόγους επαναληψιμότητας, αντιστοιχούν 3 πηγάδια, ενώ 3 πηγάδια τα οποία δεν υφίστανται κανένα ερέθισμα, αποτελούν την ομάδα κυττάρων ελέγχου (control).

4.1.10 Μεθοδολογία και πρωτόκολλο μελέτης του επαγόμενου από την φωτοδυναμική θεραπεία ενδοκυττάριου οξειδωτικού στρες μέσω μικροσκοπίας φθορισμού.

4.1.10.1 Ιχνηθέτης φθορισμού

Για την μελέτη του επαγόμενου από τη φωτοδυναμική θεραπεία ενδοκυττάριου οξειδωτικού στρες, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του φθορισμού και ο ιχνηθέτης οξειδωτικού στρες 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester, CM-H2DCFDA, γνωστή και ως φλουορεσκεΐνη, η οποία είναι ένα παράγωγο χλωρομεθυλίου της ουσίας H2DCFDA. Η CM-H2DCFDA έχει τη δυνατότητα να εισέρχεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου και αφού ανιχνεύσει ελεύθερες ρίζες, αντιδρά με αυτές. Η H2DCFDA δεν είναι φθορίζουσα ουσία. Ενδοκυττάρια όμως, με τη βοήθεια των εστερασών, μετατρέπεται στην CM-H2DCFDA η οποία φθορίζει έντονα και έτσι μπορεί να ανιχνευτεί. Για τη διέγερση του ιχνηθέτη φθορισμού χρησιμοποιείται ο κύβος U-MNB του μικροσκοπίου φθορισμού, το μήκος κύματος διέγερσης είναι 488 nm, ενώ η εκπομπή φθορισμού σημειώνεται στα 520 nm.



Εικόνα 4.2: (α) το μη φθορίζον μόριο H₂DCFDA (β) ο ιχνηθέτης φθορισμού CM-H₂DCFDA και (γ) το φάσμα απορρόφησης και εκπομπής φθορισμού του ιχνηθέτη φθορισμού CM-H₂DCFDA (πηγή: ThermoFisher Scientific Company).

4.1.10.2 Πρωτόκολλο επώασης κυττάρων με τον ιχνηθέτη φθορισμού 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester, CM-H₂DCFDA.

Για την μελέτη του επαγόμενου από την φωτοδυναμική θεραπεία οξειδωτικού στρες, 75 × 10³ κύτταρα τοποθετούνται σε τρυβλία καλλιέργειας Petri και επωάζονται στον κλίβανο για 24 h. Στη συνέχεια, ακολουθεί η επώαση των κυττάρων με τον εκάστοτε φωτοευαισθητοποιητή (0, 75 μΜ) για 4 ώρες. Έπειτα, πραγματοποιείται η φωτοδυναμική θεραπεία όπως περιγράφεται παραπάνω για δόσεις ισχύος ακτινοβόλησης 12 mW/cm² και 18 mW/cm² και χρόνο ακτινοβόλησης 3 λεπτά.

Ο ιχνηθέτης φθορισμού 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester, CM-H₂DCFDA είναι σε μορφή σκόνης και διατηρείται στην κατάψυξη (-20 °C). Αρχικά παρασκευάζεται μητρικό διάλυμα συγκέντρωσης 1,08 mM, διαλύοντας 50 μg CM-H₂DCFDA σε 80 μl DMSO. Τα κύτταρα επωάζονται με τον ιχνηθέτη φθορισμού σε τελική συγκέντρωση 5 μM σε θρεπτικό μέσο χωρίς FBS, στο σκοτάδι, 10 λεπτά στον κλίβανο και 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συνεχεία, ακολουθούν 2 εκπλύσεις των κυττάρων με PBS και η καλυπτρίδα τοποθετείται στον ειδικό θαλαμίσκο για την παρατήρησή τους. Στον θαλαμίσκο προστίθεται PBS ώστε να παραμείνουν τα κύτταρα ζωντανά για όσο χρονικό διάστημα διαρκεί η παρατήρηση. Η ομάδα κυττάρων ελέγχου (control) αποτελείται από τρυβλία καλλιέργειας με μη ακτινοβολημένα κύτταρα. Η ενδοκυττάρια παραγωγή ROS των A431 κυττάρων ως αποτέλεσμα της PDT εξετάζεται 0 και 24 ώρες μετά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας.

4.1.10.3 Μεθοδολογία ποσοτικοποίησης εκπεμπόμενου από το δείγμα φθορισμού μέσω επεξεργασίας εικόνων φθορισμού από το μικροσκόπιο φθορισμού.

Η CM-H₂DCFDA φθορίζει όταν οξειδώνεται από τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται στο εσωτερικό των κυττάρων. Συνεπώς, η ένταση του φθορισμού που εκπέμπεται είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας των ελευθέρων ριζών και των δραστικών οξυγονούχων ειδών στο εσωτερικό τους. Η φωτεινότητα των εικόνων φθορισμού συνάδει με το ενδοκυττάριο οξειδωτικό στρες και μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με τη βοήθεια λογισμικού επεξεργασίας εικόνας.

Για τη λήψη εικόνων φθορισμού ανάλυσης 688 x 514 pixels με χρόνο ολοκλήρωσης 3 s, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό AnalySIS getIT (Olympus Soft Imaging Solutions, GmbH). Στη συνέχεια, οι εικόνες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Image J. Κάθε έγχρωμη RGB εικόνα μετατρεπόταν σε 8-bit μονόχρωμη στις αποχρώσεις του γκρι. Για την σωστή ποσοτικοποίηση της έντασης του φθορισμού, ήταν απαραίτητο να αφαιρεθεί ο φθορισμός του υποβάθρου αφού τα κύτταρα βρίσκονταν σε υγρό περιβάλλον το οποίο περιείχε μικρές ποσότητες του ιχνηθέτη φθορισμού. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν πέντε περιοχές ενδιαφέροντος (Region of Interest, ROI) ίδιας επιφάνειας στο υπόβαθρο κάθε εικόνας για να υπολογιστεί η μέση τιμή φωτεινότητας και να αφαιρεθεί από την φωτεινότητα της συνολικής εικόνας. Αντίστοιχα, επιλέχθηκαν ROI περιοχές σε κάθε κύτταρο, όπου υπολογίστηκε η μέση τιμή της φωτεινότητας των περιοχών αυτών. Η αξιολόγηση του παραγόμενου από κάθε συνθήκη οξειδωτικού στρες αξιολογήθηκε συγκρίνοντας το παραγόμενο οξειδωτικό στρες σε κύτταρα τα οποία δεν είχαν υποστεί κανένα ερέθισμα.

4.2 Μεθοδολογίες δημιουργίας και χαρακτηρισμού συμπλόκων εγκλεισμού

4.2.1 Μεθοδολογία δημιουργίας συμπλόκων εγκλεισμού με την μέθοδο της υγρής λειοτρίβισης με τον σχηματισμό πάστας (kneading).

Τα σύμπλοκα εγκλεισμού της φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc με τις κυκλοδεξτρίνες (β-CD, γ-CD, HP-β-CD και Me-β-CD) παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της υγρής λειοτρίβισης με τον σχηματισμό πάστας (kneading). Πιο συγκεκριμένα, ζυγίζονται ποσότητες φθαλοκυανίνης και της εκάστοτε κυκλοδεξτρίνης σε γραμμομοριακή αναλογία 1:1. Εν συνεχεία, η δίχλωροφθαλοκυανίνη πυριτίου και η αντίστοιχη κυκλοδεξτρίνη αναμειγνύονται σε γουδί για τουλάχιστον 45 λεπτά. Προκειμένου να ληφθεί ομοιογενής πάστα, προστίθεται διάλυμα αιθανόλης:νερού σε αναλογία 2:3. Τα τελικά μείγματα συλλέγονται, κατόπιν ξηραίνονται σε αντλία υψηλού κενού σε θερμοκρασία δωματίου και αποθηκεύονται στο ψυγείο μέχρι την χρήση τους ¹⁰⁸.

4.2.2 Απόδοση διεργασίας

Η απόδοση διεργασίας είναι απαραίτητη για την αξιολόγηση της καταλληλόλητας της επιλεγμένης μεθόδου για τον σχηματισμό των συμπλόκων εγκλεισμού. Για τον υπολογισμό της χρειάζεται να γνωρίζουμε την τελική μάζα του συμπλόκου εγκλεισμού και τις ποσότητες των ουσιών προς εγκλεισμό. Η απόδοση διεργασίας υπολογίζεται με τη βοήθεια της εξίσωσης (4.1):

$$Aπόδοση διεργασίας = \frac{τελική μάζα συμπλόκου εγκλεισμού (mg)}{μάζα φορέα + μάζα ένωσης προς εγκλεισμό (mg)} *100\%$$
(Εξίσωση 4.1)

4.2.3 Απόδοση εγκλεισμού

Η απόδοση εγκλεισμού αποτελεί μέτρο της αποτελεσματικότητας της μεθόδου παρασκευής των συμπλόκων εγκλεισμού και περιγράφει την ποσότητα της φθαλοκυανίνης που εγκλείστηκε στις κυκλοδεξτρίνες. Για τον υπολογισμό της χρησιμοποιείται η εξίσωση (4.2):

 $Aπόδοση εγκλεισμού = \frac{μάζα εγκλεισμένης φθαλοκυανίνης (mg)}{μάζα ένωσης προς εγκλεισμό+μάζαφορέα (mg)}*100\%$ (Εξίσωση 4.2)

Για τον προσδιορισμό της απόδοσης εγκλεισμού γίνεται χρήση της φασματοσκοπίας φθορισμού. Πιο συγκεκριμένα, 5mg από κάθε ξηρό σύμπλοκο εγκλεισμού της φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc με την εκάστοτε κυκλοδεξτρίνη προστίθενται σε 5 mL N, N-Dimethylformamide (DMF) και το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, το εκάστοτε διάλυμα φιλτράρεται για να αφαιρεθούν τυχόν υπολείμματα κυκλοδεξτρινών. Από τα φιλτραρισμένα διαλύματα, λαμβάνονται 25 μL και έπειτα από κατάλληλες αραιώσεις μετράται ο φθορισμός τους στην περιοχή 380-700 nm (λexc=360nm).

Για να προσδιοριστεί η ποσότητα της φθαλοκυανίνης που έχει εγκλειστεί στις κυκλοδεξτρίνες, χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη αναφοράς μέσω της οποίας συσχετίζεται η ένταση φθορισμού του υπό μέτρηση διαλύματος με την συγκέντρωσης της φθαλοκυανίνης που περιέχεται σε αυτό. Η καμπύλη αναφοράς δημιουργείται μετρώντας την ένταση φθορισμού διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης φθαλοκυανίνης σε διαλύτη DMF. Υπολογίζοντας έτσι τη συγκέντρωση της ουσίας που εγκλείστηκε, υπολογίζεται η μάζα της.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι κυκλοδεξτρίνες υπό διέγερση στα 360 nm, εκπέμπουν ισχυρό φθορισμό στα 420 nm και 670 nm (Εικόνα 4.3). Συνεπώς, η ένταση φθορισμού των παραπάνω διαλυμάτων σε οποιοδήποτε μήκος κύματος είναι το άθροισμα του φθορισμού της εκάστοτε κυκλοδεξτρίνης και της φθαλοκυανίνης. Επομένως, για τον ορθό προσδιορισμό της απόδοσης εγκλεισμού, κρίνεται αναγκαία η δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς και για τις κυκλοδεξτρίνες.



Εικόνα 4.3: Φάσματα φθορισμού των κυκλοδεζτρινών σε DMF (λexc = 360 nm).

Η ένταση φθορισμού (Y) της κάθε ουσίας συναρτήσει της συγκέντρωσής της (X) στον διαλύτη DMF περιγράφεται από τις μαθηματικές σχέσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2: Μαθηματικές σχέσεις έντασης φθορισμού-συγκέντρωσης για την κάθε ουσία

		670 nm		
SiCl ₂ Pc	β-CD	ΗΡ-β-CD	Me-β-CD	γ-CD
Y =3E+08 X -0,7372,	Y =3E+06 X +80,039,	Y =5E+06 X -201,79,	Y =4E+06 X +113.29,	Y =3E+06 X +166.18,
$R^2 = 0,9986$	$R^2 = 1$	$R^2 = 1$	$R^2 = 1$	$R^2 = 1$
		700 nm		
SiCl ₂ Pc	β-CD	ΗΡ-β-CD	Me-β-CD	γ-CD
Y =8E+07 X -1,2053,	Y =251787 X +9,6845,	Y =492525 X -21,101,	Y =448139 X +11.135,	Y =264722 X +19.357,
$R^2 = 1$	$R^2 = 1$	$R^2 = 1$	$R^2 = 1$	$R^2 = 1$

4.2.4 Μεθοδολογίες χαρακτηρισμού των συμπλόκων εγκλεισμού

4.2.4.1 Μεθοδολογία προσδιορισμού μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικού με χρήση της τεχνικής δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS).

Η μέθοδος δυναμικής σκέδασης φωτός χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μεγέθους, του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και του ζ-δυναμικού των συμπλόκων εγκλεισμού της φθαλοκυανίνης με τις κυκλοδεξτρίνες. Για την παρασκευή των υπό μέτρηση δειγμάτων, ζυγίζεται

1mg από το εκάστοτε σύμπλοκο, το οποίο στη συνέχεια διασπείρεται σε 20ml υπερκάθαρο νερό. Ακολούθως, τα δείγματα αναδεύονται σε vortex για τουλάχιστον 2 λεπτά πριν από κάθε μέτρηση και με τη χρήση σύριγγας, τοποθετούνται σε κυψελίδα τύπου U (DTS1070) η οποία εισάγεται στο όργανο. Με χρήση λογισμικού καταγράφονται οι μετρήσεις του μεγέθους, του δείκτη πολυδιασποράς και του ζ-δυναμικού. Για κάθε δείγμα, οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25 ± 1 °C και pH=7,4.

4.2.4.2 Μεθοδολογία μελέτης της δομής των συμπλόκων εγκλεισμού της φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc με τις κυκλοδεξτρίνες μέσω της υπέρυθρης φασματοσκοπίας (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR Spectroscopy).

Η φασματοσκοπία φθορισμού FT-IR είναι απαραίτητη για την επιβεβαίωση του σχηματισμού των συμπλόκων εγκλεισμού. Χρησιμοποιείται για τον δομικό χαρακτηρισμό τους και περιγράφει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μορίου ξενιστή (κυκλοδεξτρίνες) και του φιλοξενούμενου μορίου (φθαλοκυανίνη). Για την λήψη του φάσματος της κάθε ουσίας, με την βοήθεια πίεσης από μηχανική πρέσα, συμπιέζουμε την ουσία πριν οδηγηθεί στο όργανο ανάλυσης. Η ανάλυση πραγματοποιείται με τη χρήση φασματογράφου FT-IR ALPHA II (Bruker) και οι μετρήσεις (16 σαρώσεις ανά φάσμα) πραγματοποιούνται στην περιοχή σάρωσης 4000-400 cm⁻¹.

4.3 Μεθοδολογία μελέτης των φωτοφυσικών ιδιοτήτων της ελεύθερης αλλά και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc.

Τα φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες SiCl₂Pc πάρθηκαν με το φασματόμετρο UV/VIS Perkin Elmer Lambda 35 στην περιοχή 300-800 nm με ταχύτητα σάρωσης 480 nm/min. Η απορρόφηση κάθε μορίου μελετάται σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες, δύο οργανικούς (DMF και αιθανόλη) και έναν πολικό (PBS) σε τελική συγκέντρωση 10 μM.

Για τις μελέτες φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο φθορισμού LS45 Luminescence Spectrometer της Perkin Elmer. Οι ουσίες διαλύονται σε DMF σε τελική συγκέντρωση 1 μM για την ελεύθερη SiCl₂Pc και την SiCl₂Pc-β-CD, 0,1 μM για τις SiCl₂Pc-HPβ-CD και SiCl₂Pc-Me-β-CD και 0,5 μM για την SiCl₂Pc-γ-CD. Όλα τα υπό μέτρηση διαλύματα διεγείρονται με ακτινοβολία μήκος κύματος 360nm. Τα υπό μέτρηση διαλύματα παρασκευάζονται ακριβώς πριν την κάθε μέτρηση. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου. 4.4 Μεθοδολογίες μελέτης των φωτοχημικών ιδιοτήτων της ελεύθερης αλλά και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc.

4.4.1 Μεθοδολογία μελέτης φωτολεύκανσης μορίων (Photobleaching).

Η φωτοσταθερότητα των μορίων της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες SiCl₂Pc μελετάται με την βοήθεια της φασματοσκοπίας φθορισμού. Οι ουσίες διαλύονται σε DMF και ακτινοβολούνται με λέιζερ 660 nm και ισχύ ακτινοβόλησης 10 mW/cm² για 30 λεπτά. Τα φάσματα φθορισμού λαμβάνονται κάθε ένα λεπτό μέχρι τα 10 λεπτά και κάθε 5 λεπτά μεταξύ 10-30 λεπτών. Προκειμένου να αξιολογηθεί η φωτοσταθερότητα των μορίων, καταγράφεται το μέγιστο φθορισμού των ουσιών στα 670nm. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου. Καθ' όλη τη διάρκεια της ακτινοβόλησης όλα τα δείγματα αναδεύονται με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα.

4.4.2 Μεθοδολογία μελέτης παραγωγής ελευθέρων ριζών (ROS).

Οι μελέτες παραγωγής ελεύθερων ριζών βασίζονται στη μέθοδο του φθορισμού και στον ιχνηθέτη οξειδωτικού στρες CM-H₂DCFDA. Καθώς η φλουορεσκαΐνη CM-H₂DCFDA δεν χρησιμοποιείται σε κύτταρα, είναι αναγκαία η υδρόλυσή της με NaOH ώστε να μετατραπεί στην φθορίζουσα μορφή της. Αρχικά παρασκευάζεται μητρικό διάλυμα της φλουορεσκαΐνης CM-H₂DCFDA συγκέντρωσης 0.87 μ M (50 μ g CM-H₂DCFDA διαλύονται σε 1 mL DMSO) το οποίο και αποθηκεύεται στην κατάψυξη αμέσως μετά την παρασκευή του. Το επόμενο βήμα αφορά στην υδρόλυση της ουσίας από το NaOH. Για το σκοπό αυτό, 15 μ l από το διάλυμα της CM-H₂DCFDA σε DMSO και 5 μ ; από το διάλυμα υδρόλυσης (NaOH – H₂O) διαλύονται σε 40 μ L EtOH. Για να πραγματοποιηθεί η υδρόλυση του εστέρα, το διάλυμα αφήνεται σε σκοτεινό μέρος για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθεί η παρασκευή των υπό ακτινοβόληση διαλυμάτων που περιέχουν CM-H2DCFDA (5 μM) και τον κάθε φωτοευαισθητοποιητή διαλυμένα σε PBS και τελική συγκέντρωση 1 μM, τα οποία ακτινοβολούνται για 30 λεπτά με ισχύ 10 mW/cm². Το φάσμα φθορισμού της φλουορεσκεΐνης λαμβάνεται κάθε 1 λεπτό για 10 λεπτά και κάθε 5 λεπτά για τα υπόλοιπα 20 λεπτά. Προκειμένου να αξιολογηθεί η παραγωγή ROS, καταγράφεται το μέγιστο φθορισμού της στα 520 nm. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου. Όλα τα δείγματα αναδεύονται με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων εγκλεισμού της δίχλωρο-φθαλοκυανίνης πυριτίου, SiCl₂Pc, με τις κυκλοδεξτρίνες

5.1.1 Απόδοση διεργασίας κατά τη διαδικασία εγκλεισμού της φθαλοκυανίνης στις κυκλοδεξτρίνες

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές διαφορετικές μέθοδοι για την δημιουργία συμπλόκων εγκλεισμού, π.χ. η συγκαταβύθιση (co-precipitation), ξηρή ανάμειξη (dry mixing), λυοφιλοποίηση (freeze drying), η υγρή λειοτρίβιση με τον σχηματισμό πάστας (kneading) κ.α. Η κατάλληλη τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί στη διαδικασία καθορίζεται από τις ιδιότητες του μορίου που πρόκειται να εγκλειστεί στο εκάστοτε νανοσωματίδιο . Για υδρόφοβα μόρια όπως είναι οι φθαλοκυανίνες, η προτιμότερη μέθοδος είναι το kneading¹¹⁷⁻¹¹⁸. Πρόκειται για μια απλή, γρήγορη, οικονομική, φιλική προς το περιβάλλον και αποτελεσματική τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακευτική βιομηχανία¹¹⁹⁻¹²¹. Ο υπολογισμός τόσο της απόδοσης της διεργασίας όσο και της απόδοσης εγκλεισμού χρησιμοποιούνται για να χαρακτηρίσουν επιτυχημένη ή όχι την επιλεγμένη μέθοδο δημιουργίας των εκάστοτε νανοσωματιδίων.

Η απόδοση διεργασίας ορίζεται ως ο λόγος της μάζας του ξηρού συμπλόκου προς την μάζα του συμπλόκου πριν την ξήρανση. Στον Πίνακα 5.1 και στο διάγραμμα της εικόνας 5.1 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα που αφορούν στην απόδοση διεργασίας για τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα των κυκλοδεξτρινών β-CD, HP-β-CD, Me-β-CD και γ-CD με την φθαλοκυανίνη SiCl₂Pc. Όπως προκύπτει, το σύμπλοκο της φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc με την τροποποιημένη υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD) παρουσιάζει την υψηλότερη απόδοση διεργασίας, 75%. Αντίθετα, τα υπόλοιπα τρία σύμπλοκα έχουν μικρότερη απόδοση η οποία είναι σχεδόν ίδια για όλα. Οι διαφορές που παρατηρούνται στην μάζα των συμπλόκων πριν και μετά την ξήρανσή τους, και άρα επηρεάζουν την απόδοση της διεργασίας, οφείλεται στο γεγονός ότι η ομοιογενής πάστα που δημιουργήθηκε κατά την διεργασία, παρουσίαζε ισχυρή προσκόλληση στο γουδί, γεγονός που καθιστούσε δύσκολη την αποκόλλησή της.

Σύμπλοκα	Γραμμομοριακή αναλογία SiCl ₂ Pc:CD (mol)	m _{SiCl2Pc} (mg)	m _{CD} (mg)	m συμπλόκου πριν την ξήρανση (mg)	m ξηρού συμπλόκου (mg)	%Απόδοση διεργασίας
SiCl ₂ Pc-β- CD	1:1	20	37.1	57.1	35.3	62%
SiCl ₂ Pc- HP-β-CD	1:1	20	38.6	58.6	43.9	75%
SiCl ₂ Pc- Me-β-CD	1:1	20	42.8	62.8	39.4	63%
SiCl ₂ Pc-γ- CD	1:1	20	42.4	62.4	38.9	62%

Πίνακας 5.1:	Απόδοση διεργασίας για τα τέσσερα διαφορετικά σύμπλοκα εγκλεισμού
	των κυκλοδεξτρινών με την φθαλοκυανίνη SiCl2Pc.



Εικόνα 5.1: Απόδοση διεργασίας για την SiCl₂Pc και τις διάφορες κυκλοδεξτρίνες

5.1.2 Απόδοση εγκλεισμού φθαλοκυανίνης στις κυκλοδεξτρίνες

Στον Πίνακα 5.2 καθώς και στο διάγραμμα της εικόνας 5.2 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα που αφορούν στην απόδοση εγκλεισμού για τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα των κυκλοδεξτρινών β-CD, HP-β-CD, Me-β-CD και γ-CD με την φθαλοκυανίνη SiCl₂Pc. Ως απόδοση εγκλεισμού ορίζεται ο λόγος της ποσότητας της φθαλοκυανίνης που εγκλείστηκε στα νανοσωματίδια προς τη συνολική μάζα της φθαλοκυανίνης και της εκάστοτε κυκλοδεξτρίνης που χρησιμοποιήθηκαν για τον εγκλεισμό. Όπως προκύπτει, το σύμπλοκο της φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc με την γ-κυκλοδεξτρίνη (γ-CD) παρουσιάζει την υψηλότερη απόδοση drug loading 51%. Τα υπόλοιπα 3 σύμπλοκα εμφανίζουν σημαντικά μικρότερη απόδοση.

Πίνακας 5.2: Drug loading efficiency για τα τέσσερα διαφορετικά σύμπλοκα εγκλεισμού των κυκλοδεξτρινών με την φθαλοκυανίνη SiCl₂Pc.

Σύμπλοκα	Γραμμομοριακή αναλογία SiCl ₂ Pc:CD (mol)	m _{SiCl2Pc} που εγκλείστηκε (mg)	m ξηρού συμπλόκου (mg)	%Απόδοση εγκλεισμού
SiCl₂Pc-β- CD	1:1	9.6	35.3	27%
SiCl ₂ Pc-HP- β-CD	1:1	16.6	43.9	38%

SiCl ₂ Pc-Me-	1:1	9	39.4	23%
β-CD				
SiCl ₂ Pc-γ-	1:1	20	38.9	51%
CD				



Εικόνα 5.2: Απόδοση εγκλεισμού για την SiCl₂Pc και τις διάφορες κυκλοδεξτρίνες

Η επίτευξη υψηλής απόδοσης εγκλεισμού είναι κρίσιμη για τη μεγιστοποίηση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων των νανοσωματιδίων κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία. Ωστόσο, σε πολλά συστήματα νανοσωματιδίων, η απόδοση εγκλεισμού μπορεί να είναι αρκετά χαμηλή, ειδικά για υδρόφοβα φάρμακα ή σύνθετα μόρια όπως οι φθαλοκυανίνες (Pcs). Όπως είναι γνωστό, οι φθαλοκυανίνες είναι ιδιαιτέρως υδρόφοβα μόρια με μεγάλο μοριακό μέγεθος. Αυτό έχει σαν αποτέλεσματικά την μειωμένη ικανότητά τους να εγκλειστούν αποτελεσματικά σε κάποιο νανοσωματίδιο. Το γεγονός ότι η απόδοση εγκλεισμού αυξήθηκε σημαντικά με τον εγκλεισμό της φθαλοκυανίνης στην γ-κυκλοδεξτρίνη, δείχνει ότι το μέγεθος της κοιλότητας της εκάστοτε κυκλοδεξτρίνης έχει σημαντική επίδραση στην απόδοση. Ως γνωστόν, η γ-κυκλοδεξτρίνη έχει μεγαλύτερο μέγεθος κοιλότητας ¹ σε σχέση με τις υπόλοιπες κυκλοδεξτρίνες, οπότε το μόριο της φθαλοκυανίνης φαίνεται να εφαρμόζει καλύτερα μέσα σε αυτή. Κατά συνέπεια, το είδος του φορέα εγκλεισμού είναι κρίσιμης σημασίας για την απόδοση εγκλεισμού. Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη τους παραπάνω περιορισμούς, η επιλογή της τεχνικής kneading μπορεί να χαρακτηριστεί επιτυχημένη.

5.1.3 Υπολογισμός μεγέθους, κατανομής μεγέθους και ζ-δυναμικού των νανοσυστημάτων μεταφοράς με χρήση της τεχνικής δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS).

Στον πίνακα 5.3 παρουσιάζονται οι μετρήσεις και οι τυπικές αποκλίσεις για το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και το ζ-δυναμικό των συμπλόκων με χρήση της μεθόδου της δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS). Αναλυτικά οι μετρήσεις βρίσκονται στο παράρτημα του κειμένου. Όπως φαίνεται από τον πίνακα, τα σύμπλοκα που σχηματίζονται, παρουσιάζουν μικρές διαφορές στην τιμή της υδροδυναμικής διαμέτρου.

Σύμπλοκο	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	ζ-Δυναμικό (mV)		
SiCl ₂ Pc-β-CD	262.1±4.67	0.389 ± 0.049	-15.4±0.6		
SiCl ₂ Pc-HP-β-CD	291.8±7.84	0.463 ± 0.051	-18.9±0.3		
SiCl ₂ Pc-Me-β-CD	287.5 ± 5.92	0.353 ± 0.011	-13.4±0.6		
SiCl ₂ Pc-γ-CD	258.3±12.5	0.346 ± 0.006	-22.4 ± 0.4		

Πίνακας 5.2: Μετρήσεις DLS για τα τέσσερα διαφορετικά σύμπλοκα εγκλεισμού των κυκλοδεξτρινών με την φθαλοκυανίνη SiCl₂Pc.

Το εύρος τιμών της υδροδυναμικής διαμέτρου έχει ως αποτέλεσμα υψηλό δείκτη πολυδιασποράς (PDI), ο οποίος λαμβάνει τιμές μεταξύ 0.353 και 0.463. Το μεγαλύτερο δείκτη πολυδιασποράς εμφανίζει το σύμπλοκο της φθαλοκυανίνης με την HP-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD SiCl₂Pc). Ο δείκτης πολυδιασποράς PDI αποτελεί μέτρο της ομοιομορφίας των μεγεθών των νανοσωματιδίων μεταφοράς και παίρνει τιμές μεταξύ 0 και 1. Τιμές κοντά στο 0 υποδηλώνουν συστήματα με πλήρη ομοιομορφία, ενώ τιμές κοντά στο 1 συστήματα υψηλής ετερογένειας. Στην παρούσα εργασία, οι τιμές του δείκτη πολυδιασποράς υποδεικνύουν μέτρια ομοιογένεια στην κατανομή μεγέθους των συστημάτων εγκλεισμού. Αυτό οφείλεται στην τάση των κυκλοδεξτρινών να σχηματίζουν συσσωματώματα σε υδατικά διαλύματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος λόγω έλλειψης ικανοποιητικού φορτίου στην επιφάνειά τους. Η τάση συσσωμάτωσης των κυκλοδεξτρινών εξαρτάται από το είδος της κυκλοδεξτρίνης που χρησιμοποιείται στον εκάστοτε εγκλεισμο^{122,123}. Ωστόσο, σύμφωνα με την τρέχουσα βιβλιογραφία, είναι πιθανός ο σχηματισμός συμπλόκων μη εγκλεισμού της φθαλοκυανίνης με την εξωτερική επιφάνεια των κυκλοδεξτρινών επηρεάζοντας έτσι την τιμή του δείκτη πολυδιασποράς^{124,125}.

Όπως είναι γνωστό, το μέγεθος και ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) των νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων (NPs) καθορίζουν τη φυσικοχημική τους σταθερότητα, την βιοκατανομή και την τοξικότητά τους και επηρεάζουν την απελευθέρωση των φαρμάκων. Γενικά, δεν υπάρχει ιδανικό μέγεθος, αλλά όσο μικρότερα είναι τα νανοσωματίδια, τόσο καλύτερη είναι η αλληλεπίδρασή τους με τα βιολογικά υποστρώματα⁹. Επιπλέον, το μέγεθος των νανοσωματιδίων καθορίζεται από τον φορέα εγκλεισμού και την ουσία που εγκλείεται καθώς και από την διεργασία που επιλέχθηκε για τη δημιουργία τους¹²⁶.

Όσον αφορά στην τιμή του ζ-δυναμικού, παρατηρείται μια διακύμανση της απόλυτης τιμής του, από 13.4 για το σύμπλοκο SiCl₂Pc-Me-β-CD έως 22.4 για το σύμπλοκο SiCl₂Pc-γ-CD. Το ζ-

δυναμικό αποτελεί δείκτη της σταθερότητας των νανοσυστημάτων μεταφοράς και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του επιφανειακού φορτίου τους σε ορισμένες συνθήκες. Όσο μεγαλύτερες είναι οι απόλυτες τιμές του ζ-δυναμικού, τόσο μεγαλύτερες είναι οι απωθητικές δυνάμεις ανάμεσα στα νανοσωματίδια οπότε η τάση τους για συσσωμάτωση μειώνεται. Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, τιμές ζ-δυναμικού κοντά στα ±30 mV υποδηλώνουν σύμπλοκα εγκλεισμού με αυξημένη σταθερότητα¹²⁷. Στην παρούσα εργασία οι απόλυτες τιμές του ζδυναμικού υποδηλώνουν νανοσυστήματα μεταφοράς με μέτρια σταθερότητα σε υδάτινα περιβάλλοντα². Όπως προκύπτει από τις μετρήσεις, πιο σταθερό είναι το σύμπλοκο της φθαλοκυανίνης με την γ-CD. Επίσης, η σταθερότητα του εκάστοτε συμπλόκου εξαρτάται από την κυκλοδεξτρίνη που χρησιμοποιείται. Τέλος, το αρνητικό πρόσημο των τιμών του ζ-δυναμικού δείχνει ότι η ευθυγράμμιση των μορίων των κυκλοδεξτρινών είναι τέτοια που οι μη υποκατάστατες ομάδες -OH είναι προσανατολισμένες προς το υδάτινο περιβάλλον καθιστώντας έτσι την επιφάνεια της κυκλοδεξτρίνης δυνητικά υδρόφιλη^{122,127}.

5.1.4 Μελέτη της δομής των συμπλόκων εγκλεισμού με χρήση της Υπέρυθρης φασματοσκοπίας (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR Spectroscopy).

Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων της κυκλοδεξτρίνης (μόριο ξενιστήςhost molecule) και της φθαλοκυανίνης (φιλοξενούμενο μόριο-guest molecule), αλλά και της δομής των συμπλόκων εγκλεισμού πραγματοποιούνται μέσω της φασματοσκοπίας FT-IR. Τα φάσματα των καθαρών ουσιών (κυκλοδεξτρίνες και φθαλοκυανίνη) αλλά και των συμπλόκων τους, παρουσιάζονται στις εικόνες 5.3-5.11, ενώ στον Πίνακα 5.3 συνοψίζονται οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές των ενώσεων.



Εικόνα 5.3: Φάσμα FT-IR της φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc.

Στο φάσμα FT-IR της ελεύθερης SiCl₂Pc (εικόνα 5.3), οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα 1516 cm⁻¹, 1467 cm⁻¹, 1331 cm⁻¹, 1063 cm⁻¹, 821 cm⁻¹ και 720 cm⁻¹. Συγκεκριμένα, η κορυφή στα 1516 cm⁻¹ αποδίδεται στις δονήσεις τάσεως του αρωματικού δακτυλίου, ενώ η κορυφή στα 1467 cm⁻¹ αποδίδεται στην δόνηση τάσεως C-C της ισοϊνδόλης. Οι δύο κορυφές στα 1331 cm⁻¹ και 1063 cm⁻¹ οφείλονται στην δόνηση τάσης C-C της ισοϊνδόλης και την δόνηση τάσης C-N της δομής του πυρρόλιου αντίστοιχα. Τέλος, η κορυφή στα 821 cm⁻¹ αποδίδεται σε δονήσεις παραμόρφωσης C-H¹²⁸⁻¹³¹.

Τα φάσματα FT-IR των καθαρών κυκλοδεξτρινών παρουσιάζονται στις εικόνες 5.3-5.7. Οι χαρακτηριστικές κορυφές που εμφανίζονται στα 3290 cm⁻¹ για την β-CD, στα 3346 cm⁻¹ για την HP-β-CD, στα 3408 cm⁻¹ για την Me-β-CD και στα 3284 cm⁻¹ για την γ-κυκλοδεξτρίνη αποδίδονται στην δόνηση τάσης της ομάδας -OH. Οι κορυφές στα 2930 cm⁻¹ (β-CD), 2934 cm⁻¹ (HP-β-CD), 2934 cm⁻¹ (Me-β-CD) και 2928 cm⁻¹ (γ-CD) αποδίδονται στην δόνηση τάσης C-H. Επιπλέον, η ασύμμετρη δόνηση τάσης C-H του CH₂ παρατηρείται στα 1654 cm⁻¹ για την γ-CD. Επιπλέον, η δόνηση κάμψης O-H εμφανίζεται στα 1412 cm⁻¹ για την β-CD, στα 1420 cm⁻¹ για την HP-β-CD, στα 1434 cm⁻¹ για την Me-β-CD και στα 1428 cm⁻¹ για την γ-CD. Τέλος, οι κορυφές στα 1022 cm⁻¹ (β-CD), 1023 cm⁻¹ (HP-β-CD), 1033 cm⁻¹ (Me-β-CD) και 1027 cm⁻¹ (γ-CD) αποδίδονται στη δόνηση τάσης της C-O των δευτεροταγών αλκοολών που υπάρχουν στα μόρια των κυκλοδεξτρινών^{118,122,132}.



Εικόνα 5.4: Φάσμα FT-IR της β-κυκλοδεξτρίνης.



Εικόνα 5.5: Φάσμα FT-IR της ΗΡ-β-κυκλοδεξτρίνης.



Εικόνα 5.6: Φάσμα FT-IR της γ-κυκλοδεξτρίνης.



Εικόνα 5.7: Φάσμα FT-IR της Με-β-κυκλοδεξτρίνης.

Στις εικόνες 5.8-5.11 παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR των συμπλόκων εγκλεισμού της SiCl₂Pc με τις διάφορες κυκλοδεξτρίνες. Όπως παρατηρείται, τα φάσματα των συμπλόκων εμφανίζουν ομοιότητες με αυτά των καθαρών κυκλοδεξτρινών, ενώ σημειώνονται μετατοπίσεις των κυματαριθμών των γαρακτηριστικών κορυφών των καθαρών κυκλοδεξτρινών, ένδειξη αλληλεπίδρασης της φθαλοκυανίνης με την εκάστοτε κυκλοδεξτρίνη. Η μεγαλύτερη μετατόπιση παρατηρείται για τη κορυφή που αντιστοιχεί στην δόνηση τάσης της ομάδας Ο-Η και για τα τέσσερα σύμπλοκα εγκλεισμού (για το σύμπλοκο SiCl₂Pc- β -CD: από τα 3290 cm⁻¹ στα 3265 cm⁻¹ ¹, για το σύμπλοκο SiCl₂Pc-HP-β-CD: από τα 3346cm⁻¹ στα 3325 cm⁻¹, για το σύμπλοκο SiCl₂Pcβ-CD: από τα 3408 cm⁻¹ στα 3391 cm⁻¹ και για το σύμπλοκο SiCl₂Pc-γ-CD: από τα 3284 cm⁻¹ στα 3263 cm⁻¹). Ομοίως, παρατηρείται μεγάλη μετατόπιση της κορυφής που αποδίδεται στη δόνηση C-C της δομής της ισοϊνδόλης (από τα 1467 cm⁻¹ στα 1428 cm⁻¹ για τα σύμπλοκα της φθαλοκυανίνης με τις β-CD, HP-β-CD και γ-CD και στα 1430 cm⁻¹ για το σύμπλοκο με την Meβ-CD). Επιπλέον, σημειώνονται μικρές μετατοπίσεις των χαρακτηριστικών κορυφών του μορίου της φθαλοκυανίνης που αποδίδονται στη δόνηση τάσης C-C της δομής του πυρρόλιου (από τα 1331 cm⁻¹ στα 1335 cm⁻¹ για όλα τα σύμπλοκα εγκλεισμού), στη δόνησης τάσης της Si-N (από τα 821 cm^{-1} στα 829 cm^{-1} και για τα τέσσερα σύμπλοκα) και στις δονήσεις παραμόρφωσης C-H (από τα 720 cm⁻¹ στα 728 cm⁻¹ για όλα τα σύμπλοκα). Τέλος, παρατηρείται η απουσία της χαρακτηριστικής κορυφής της δόνησης τάσης της C-N της δομής πυρρόλιου της καθαρής φθαλοκυανίνης και στα τέσσερα σύμπλοκα εγκλεισμού. Οι τελευταίες παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι μόνο ένα μέρος της φθαλοκυανίνης εντοπίζεται στο εσωτερικό της κοιλότητας της εκάστοτε κυκλοδεξτρίνης. Η παρούσα παρατήρηση επιβεβαιώνεται και από άλλες ερευνητικές μελέτες^{117,118,120,133}



Εικόνα 5.8: Φάσμα FT-IR του συμπλόκου SiCl2Pc-β-CD.



Εικόνα 5.9: Φάσμα FT-IR του συμπλόκου SiCl₂Pc-HP-β-CD.



Εικόνα 5.10: Φάσμα FT-IR του συμπλόκου SiCl₂Pc-Me-β-CD.



Εικόνα 5.11: Φάσμα FT-IR του συμπλόκου SiCl₂Pc-γ-CD.

	Κυματαριθμοί χαρακτηριστικών κορυφών (cm-1)										
	O-H Stretching	C-H Stretchin g	C-H Antisym metric stretching of CH ₂	C=C-C stretchi ng (aroma tic)	C-C stretching vibration (isoindole)	O-H Bendin g	C-C Stretchi ng (pyrrole)	C-N Stretchi ng (pyrrole)	C-O Stretching (secondary alcohols)	Si-N stretching vibration	C-H Out of plane deformati on
SiCl ₂ Pc	-	-	-	1516	1467		1331	1063	-	821	720
β-CD	3290	2930	1654	-	-	1412	-	-	1022	-	-
SiCl ₂ Pc-β-CD	3265	2932	1650	1518	1428	1428	1335	-	1020	829	728
HP-β-CD	3346	2934	1654	-	-	1420	-	-	1023	-	-
SiCl ₂ Pc-HP-β- CD	3325	2932	1646	1518	1428	1428	1335	-	1026	829	728
Me-β-CD	3408	2934	1658	-	-	1434	-	-	1033		
SiCl ₂ Pc-Me-β- CD	3391	2930	1617	1516	1430	1435	1335	-	1041	829	728
γ-CD	3284	2928	1660	-	-	1428	-	-	1027	-	-
SiCl ₂ Pc-γ-CD	3263	2934	1648	1516	1428	1434	1335	-	1022	829	728

Πίνακας 5.3: Κυματαριθμοί χαρακτηριστικών κορυφών της ελεύθερης φθαλοκυανίνης, των κυκλοδεξτρινών και των συμπλόκων εγκλεισμού.

5.2 Φωτοφυσικές μελέτες

5.2.1 Φάσματα απορρόφησης ελεύθερης και εγκλεισμένης σε κυκλοδεξτρίνες SiCl₂Pc

Τα φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις τέσσερις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης παρουσιάζονται στην εικόνα 5.12. Όπως φαίνεται από το σχήμα, στο DMF, η ελεύθερη SiCl₂Pc παρουσιάζει τρεις κορυφές απορρόφησης στα 360 nm (B band), 680 nm και 720 nm (Q band). Η Q band οφείλεται στις ηλεκτρονιακές μεταβάσεις από την θεμελιώδη στην πρώτη διεγερμένη στάθμη και χαρακτηρίζεται από απορρόφηση μεγαλύτερης έντασης. Συνήθως, στο φάσμα απορρόφησης των μεταλλο-φθαλοκυανινών παρατηρείται μια ενιαία στενή κορυφή απορρόφησης. Η παρουσία δύο κορυφών στην περιοχή της Q band στα 680 nm και 720 nm αντίστοιχα, υποδηλώνει συσσωμάτωση της δίχλωρο φθαλοκυανίνης πυριτίου στο DMF λόγω της περιορισμένης διαλυτότητάς της. Η κορυφή απορρόφησης της B band ή Soret στα 360 nm έχει χαμηλότερη ένταση και αποδίδεται στη μετάβαση των ηλεκτρονίων από τη θεμελιώδη στη διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση¹³³⁻¹³⁷.



Εικόνα 5.12: Φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεζτρίνες SiCl₂Pc στο DMF (10 μM).

Ο εγκλεισμός της φθαλοκυανίνης στις κυκλοδεξτρίνες είχε ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση των μέγιστων κορυφών απορρόφησης της Q band σε μικρότερα μήκη κύματος. Για το σύμπλοκο εγκλεισμού της SiCl₂Pc με την β-CD, οι δύο κορυφές της Q band εμφανίζονται στα 675 nm και 705 nm, ενώ για το σύμπλοκο SiCl₂Pc-HP-β-CD τα μέγιστα παρατηρούνται στα 670 nm και 700 nm. Αντίστοιχα, για το σύμπλοκο SiCl₂Pc-Me-β-CD οι κορυφές απορρόφησης σημειώνονται στα 669 nm και 698 nm, ενώ για το σύμπλοκο με τη γ-κυκλοδεξτρίνη στα 672 nm και 699 nm. Επιπλέον, στα σύμπλοκα της φθαλοκυανίνης με τις HP-β-CD και Me-β-CD παρατηρείται αντιστροφή των εντάσεων των κορυφών της Q band. Συνολικά, ο εγκλεισμός της SiCl₂Pc στις κυκλοδεξτρίνες αύξησε σημαντικά την ένταση της απορρόφησής της. Το γεγονός ότι τα φάσματα της εγκλεισμένης φθαλοκυανίνης στις HP-β-κυκλοδεξτρίνη και Me-β-κυκλοδεξτρίνη είναι πιο καθορισμένα, υποδεικνύει μείωση των συσσωματωμένων μορίων της φθαλοκυανίνης στο DMF και κατά συνέπεια αύξηση της διαλυτότητάς της. Αντίστοιχη παρατήρηση αναφέρεται και σε άλλες μελέτες^{136,138-140}.

5.2.2 Φάσματα απορρόφησης ελεύθερης και εγκλεισμένης σε κυκλοδεξτρίνες SiCl₂Pc σε διάφορους διαλύτες

Στις εικόνες 5.13-5.17 απεικονίζονται τα φάσματα απορρόφησης των πέντε ουσιών σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες, στο DMF, στην EtOH και στο PBS. Οι διαλύτες επηρεάζουν σημαντικά τις φωτοφυσικές ιδιότητες των ενώσεων λόγω του διαφορετικού pH και της πολικότητάς τους. Όπως φαίνεται, το φάσμα απορρόφησης κάθε ένωσης διαφέρει ανάλογα με τον διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένη^{141,142}. Σε διαλύτες όπως το DMF και την EtOH, είναι ορατές οι χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης. Όσον αφορά την ένταση της απορρόφησης, στην EtOH είναι πάντα χαμηλότερη από εκείνη στο DMF για όλες τις ουσίες. Επίσης, ο εγκλεισμός της SiCl₂Pc στις κυκλοδεξτρίνες αύξησε την ένταση της απορρόφησης που παρατηρείται στα 705 nm στο φάσμα της ελεύθερης SiCl₂Pc, εμφανίζεται ελαφρώς μετατοπισμένη σε χαμηλότερα μήκη κύματος για το σύμπλοκα εγκλεισμού της με τις β-CD και γ-CD ενώ, εξαφανίζεται εντελώς στο φάσμα των συμπλόκων εγκλεισμού SiCl₂Pc-HP-β-CD και SiCl₂Pc-Me-β-CD.

Στην περίπτωση υδατικού διαλύτη όπως το PBS, τόσο στο φάσμα της ελεύθερης SiCl₂Pc όσο και στα φάσματα των συμπλόκων εγκλεισμού της παρατηρείται σημαντική μείωση της απορρόφησης ενώ οι χαρακτηριστικές κορυφές της εμφανίζονται αρκετά διευρυμένες (εικόνα 5.18). Η συμπεριφορά αυτή αποδίδεται στο φαινόμενο της συσσωμάτωσης των φθαλοκυανίνων σε υδατικά διαλύματα λόγω της υδροφοβικότητάς τους. Πιο συγκεκριμένα, η μη εγκλεισμένη φθαλοκυανίνη εμφανίζει δύο πολύ μικρές κορυφές απορρόφησης στα 382 nm και 746 nm. Στα φάσματα απορρόφησης των συμπλόκων εγκλεισμού της SiCl₂Pc με τις β-CD και γ-CD παρατηρούνται τρεις κορυφές απορρόφησης. Για το σύμπλοκο με την β-CD τα μέγιστα απορρόφησης εμφανίζονται στα 381 nm, 685 nm και 742 nm, ενώ για την γ-CD στα 384 nm, 682 nm και 739 nm. Τέλος, στα φάσματα των συμπλόκων με τις χημικά τροποποιημένες HP-β-CD και Me-β-CD είναι ευκρινείς τέσσερις κορυφές. Για την SiCl₂Pc-HP-β-CD οι κορυφές αυτές παρατηρούνται στα 388 nm, 624 nm, 679 nm και 741 nm, ενώ για την SiCl₂Pc-Me-β-CD στα 388 nm, 624 nm, 675 nm και 739 nm. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο εγκλεισμός της φθαλοκυανίνης στις κυκλοδεξτρίνες έχει οδηγήσει σε αύξηση της έντασης της απορρόφησής της στο PBS για όλα τα σύμπλοκα (εικόνα 5.18). Η μεγαλύτερη αύξηση της απορρόφησης παρατηρείται στο φάσμα του συμπλόκου εγκλεισμού της SiCl₂Pc με την Me-β-CD. Παρά την τάση των κυκλοδεξτρινών να συσσωματώνονται σε υδατικά διαλύματα 144, τόσο η αύξηση της έντασης της απορρόφησης όσο και η παρουσία πιο ευκρινών κορυφών (ειδικά για την SiCl₂Pc-Me-β-CD) υποδηλώνει μείωση των συσσωματωμάτων της φθαλοκυανίνης στο PBS και άρα βελτίωση της διαλυτότητάς της. Συνολικά, η βιοδιαθεσιμότητα του φωτοευαισθητοποιητή έχει βελτιωθεί.



Εικόνα 5.13: Φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης SiCl₂Pc (10 μM) σε διάφορους διαλύτες.



Εικόνα 5.14: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου SiCl₂Pc-β-CD (10 μM) σε διάφορους διαλύτες.



Εικόνα 5.15: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου SiCl₂Pc-HP-β-CD (10 μM) σε διάφορους διαλύτες.



Εικόνα 5.16: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου SiCl₂Pc-Me-β-CD (10 μM) σε διάφορους διαλύτες.

 $SiCl_2Pc-\gamma-CD$



Εικόνα 5.17: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου SiCl₂Pc-γ-CD (10 μM) σε διάφορους διαλύτες.



Εικόνα 5.18: Φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης και εγκλεισμένης στις κυκλοδεζτρίνες φθαλοκυανίνης (10 μΜ) σε PBS.

5.2.3 Φάσματα φθορισμού ελεύθερης και εγκλεισμένης σε κυκλοδεξτρίνες SiCl₂Pc

Για να μελετηθεί περαιτέρω η φωτοφυσική συμπεριφορά της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc, ελήφθησαν τα φάσματα φθορισμού κάθε μιας από τις παραπάνω μορφές (εικόνα 5.19). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το DMF.

Από τη φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού, είναι γνωστό ότι το άνοιγμα τόσο του μονοχρωμάτορα διέγερσης όσο και του μονοχρωμάτορα φθορισμού είναι 10 nm. Αυτό συνεπάγεται ότι είναι αδύνατον να διαχωριστούν μήκη κύματος διέγερσης που συμπίπτουν με την κορυφή φθορισμού. Καθώς η ελεύθερη SiCl₂Pc παρουσιάζει τρεις κορυφές απορρόφησης στα 360 nm, 680 nm και 720 nm, ως μήκος κύματος διέγερσης επιλέχθησαν τα 360 nm.

Επομένως, με διέγερση στα 360 nm, το μέγιστο φθορισμού παρατηρείται στα 670 nm και για τις πέντε ενώσεις διατηρώντας τη χαρακτηριστική μορφή του. Για την SiCl₂Pc-β-CD παρατηρείται μείωση της έντασης λόγω του εγκλεισμού της, ενώ για τα υπόλοιπα τρία σύμπλοκα ο εγκλεισμός της οδηγεί σε αυξημένη εκπομπή φθορισμού οπότε κρίθηκε απαραίτητο να μειωθεί η συγκέντρωση των υπό μέτρηση διαλυμάτων. Ως εκ τούτου, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η φθαλοκυανίνη αλληλεπιδρά με διαφορετικό τρόπο με την κάθε κυκλοδεξτρίνη^{136,138,143,144}. Αντίστοιχες αναφορές υπάρχουν και στην βιβλιογραφία σύμφωνα με την οποία, η αύξηση της έντασης του φθορισμού που παρατηρείται στα σύμπλοκα της φθαλοκυανίνης με τις χημικά τροποποιημένες HP-β-CD και Me-β-CD, μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία ισχυρών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων της φθαλοκυανίνης με τα μόρια των κυκλοδεξτρινών, καθιστώντας την κοιλότητα τους ένα καλύτερο και πιο προστατευτικό περιβάλλον για την φθαλοκυανίνη, εμποδίζοντας την συσσωμάτωσή της στα υδατικά διαλύματα^{145,146}. Αξίζει να σημειωθεί ότι και οι πέντε ενώσεις έδειξαν έντονη εκπομπή φθορισμού και ως εκ τούτου μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο στη φωτοδυναμική διάγνωση όσο και στη θεραπεία.



Εικόνα 5.19: Φάσματα φθορισμού της ελεύθερης SiCl₂Pc (1 μM) και των συμπλόκων SiCl₂Pc-β-CD (1 μM), SiCl₂Pc-HP-β-CD (0,1 μM), SiCl₂Pc-Me-β-CD (0,1 μM) και SiCl₂Pc-γ-CD (0,5μM) σε DMF για διέγερση στα 360 nm.

5.3 Φωτοχημικές μελέτες

5.3.1 Μελέτες φωτολεύκανσης (Photobleaching)

Η φωτολεύκανση (photobleaching) παρατηρείται σε αρκετά χρωμοφόρα μόρια κατά τη διάρκεια ακτινοβόλησης τους με φως. Το φως μπορεί να αλλάξει τη δομή του μορίου, καταστρέφοντάς το με αποτέλεσμα την μόνιμη απώλεια της ικανότητάς του να εκπέμπει φθορισμό. Ως αποτέλεσμα, μπορούν να παρατηρηθούν αλλαγές στη μορφή του φάσματος φθορισμού καθώς και μείωση της έντασης φθορισμού. Για τις φθαλοκυανίνες, η φωτοκαταστροφή τους οφείλεται στην καταστροφή των δακτυλίων C-N που αποτελούν το μόριό τους.

Για τη μελέτη φωτολεύκανσης των μορίων της ελεύθερης αλλά και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνης, οι ουσίες διαλύθηκαν σε DMF και ακτινοβολήθηκαν με λέιζερ ισχύος 10 mW/cm² στα 660 nm. Ο μέγιστος χρόνος ακτινοβόλησης ήταν 30 λεπτά. Οι συγκεντρώσεις των υπό ακτινοβόληση διαλυμάτων των συμπλόκων εγκλεισμού ήταν μικρότερες από τη συγκέντρωση του διαλύματος της ελεύθερης φθαλοκυανίνης, αφού οι κυκλοδεξτρίνες εκπέμπουν έντονο φθορισμό. Τα συλλεχθέντα φάσματα φθορισμού των υπό ακτινοβόληση διαλυμάτων 5.20-5.24.



Εικόνα 5.20: Φάσματα φθορισμού της ελεύθερης SiCl₂Pc συγκέντρωσης 1 μΜ με ισχύ ακτινοβόλησης 10 mW/cm².



Εικόνα 5.21: Φάσματα φθορισμού της SiCl₂Pc-β-CD συγκέντρωσης 0,5 μM με ισχύ ακτινοβόλησης 10 mW/cm².



Εικόνα 5.22: Φάσματα έντασης φθορισμού της SiCl₂Pc-HP-β-CD συγκέντρωσης 0,1 μΜ με ισχύ ακτινοβόλησης 10 mW/cm².



Εικόνα 5.23: Φάσματα έντασης φθορισμού της SiCl₂Pc-Me-β-CD συγκέντρωσης 0,01 μM με ισχύ ακτινοβόλησης 10 mW/cm².



Εικόνα 5.24: Φάσματα έντασης φθορισμού της SiCl₂Pc-γ-CD συγκέντρωσης 0,5 μΜ με ισχύ ακτινοβόλησης 10 mW/cm².

Όπως προκύπτει από τα ανωτέρω σχήματα, όλα τα φάσματα φθορισμού που συλλέχθηκαν και για τις πέντε φωτοευαίσθητες ουσίες, δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή στη μορφή ή στο
μέγιστο της εκπομπής φθορισμού κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης. Αυτό συνεπάγεται την χημική σταθερότητα και των πέντε φωτοευαισθητοποιητών, αφού στην περίπτωση φωτοχημικής καταστροφής των δομών των χρωμοφόρων μορίων, θα έπρεπε να παρατηρηθούν νέες κορυφές στα φάσματα, οι οποίες θα υποδήλωναν την δημιουργία νέων μορίων.

Επιπλέον, όλες οι ενώσεις παρουσίασαν έντονη αύξηση της έντασης του φθορισμού τους ειδικά κατά τα πρώτα λεπτά της ακτινοβόλησης. Στο διάγραμμα στην εικόνα 5.25 καταγράφηκε η κανονικοποιημένη ένταση του φθορισμού στα 670 nm σε σχέση με την ένταση φθορισμού πριν την ακτινοβόληση για τον συνολικό χρόνο ακτινοβόλησης. Εντονότερη ήταν η αύξηση της έντασης του φθορισμού στα σύμπλοκα της φθαλοκυανίνης με τις κυκλοδεξτρίνες σε σχέση με την ελεύθερη μορφή της. Μάλιστα, για τα σύμπλοκα της SiCl₂Pc με τις β-CD και γ-CD η αύξηση της φθορισμού ήταν τόσο έντονη που οδήγησε σε κορεσμό του ανιχνευτή του φασματοφωτόμετρου στο έβδομο και πέμπτο λεπτό της ακτινοβόλησης αντίστοιχα. Η αύξηση της έντασης φθορισμού μπορεί να αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες. Αρχικά, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η ακτινοβολία laser μπορεί να διασπάσει τα συσσωματώματα των μορίων της φθαλοκυανίνης στα διάλυμα^{136,147,148}. Επιπροσθέτως, όλο και περισσότερη ποσότητα φθαλοκυανίνης στο διάλυμα^{136,147,148}. Επιπροσθέτως, όλο και περισσότερη ποσότητα φθαλοκυανίνης του φθορισμού και σύμφωνα με την ισορροπία των μονομερών και διμερών μορίων της φθαλοκυανίνης στο διάλυμα^{136,147,148}.



Εικόνα 5.25: Μέγιστη ένταση φθορισμού ως συνάρτηση του χρόνου ακτινοβόλησης για τους πέντε φωτοευαισθητοποιητές και ισχύ ακτινοβόλησης 10 mW/cm².

5.3.2 Μελέτη παραγωγής ελευθέρων ριζών (Reactive Oxygen Species (ROS))

Η επαρκής παραγωγή ελεύθερων ριζών είναι ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένας φωτοευαισθητοποιητής ώστε να επιτευχθεί αξιόλογο φωτοδυναμικό αποτέλεσμα. Για το σκοπό αυτό η ελεύθερη αλλά και η εγκλεισμένη στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνη διαλύθηκαν σε PBS σε τελική συγκέντρωση 1μM και ακτινοβολήθηκαν με λέιζερ ισχύος 10 mW/cm² στα 660 nm για συνολικά 30 λεπτά. Για την αξιολόγηση της παραγωγής ROS και των πέντε φωτοευαισθητοποιητών καταγράφηκε η αύξηση της έντασης φθορισμού του ιχνηθέτη φθορισμού CM-H₂DCFDA. Η αύξηση της έντασης του φθορισμού αποτελεί ένδειξη της ποσότητας των ελεύθερων ριζών που παράγονται στο διάλυμα. Τα φάσματα φθορισμού της CM-H₂DCFDA που συλλέχθηκαν για τις πέντε ουσίες δίνονται στις εικόνες 5.26-5.30. Το σχήμα της εικόνας 5.31 παρουσιάζει την μέγιστη ένταση φθορισμού του ιχνηθέτη CM-H₂DCFDA στα 520 nm σε σχέση με την αρχική ένταση φθορισμού πριν την ακτινοβόληση. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η κλίση της κάθε καμπύλης του σχήματος 5.31 δείχνει την κινητική παραγωγής των ROS.



Εικόνα 5.26: Φάσματα φθορισμού του ιχνηθέτη φθορισμού CM-H₂DCFDA κατά τη διάρκεια ακτινοβόλησης του διαλύματος της ελεύθερης SiCl₂Pc (1 μM) σε PBS.



Εικόνα 5.27: Φάσματα φθορισμού του ιχνηθέτη φθορισμού CM-H₂DCFDA κατά τη διάρκεια ακτινοβόλησης του διαλύματος της SiCl₂Pc-β-CD (1 μM) σε PBS.



Εικόνα 5.28: Φάσματα φθορισμού του ιχνηθέτη φθορισμού CM-H₂DCFDA κατά τη διάρκεια ακτινοβόλησης του διαλύματος της SiCl₂Pc-HP-β-CD (1 μM) σε PBS.



Εικόνα 5.29: Φάσματα φθορισμού του ιχνηθέτη φθορισμού CM-H₂DCFDA κατά τη διάρκεια ακτινοβόλησης του διαλύματος της SiCl₂Pc-Me-β-CD (1 μM) σε PBS.



Εικόνα 5.30: Φάσματα φθορισμού του ιχνηθέτη φθορισμού CM-H₂DCFDA κατά τη διάρκεια ακτινοβόλησης του διαλύματος της ελεύθερης SiCl₂Pc-γ-CD (1 μM) σε PBS.



Εικόνα 5.31: Ρυθμός παραγωγής ROS των φωτοευαισθητοποιητών στο PBS σε τελική συγκέντρωση 1 μΜ και ισχύ ακτινοβόλησης 10 mW/cm².

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 5.31, όλες οι ενώσεις παράγουν επιθυμητή και σημαντική ποσότητα ελευθέρων ριζών (ROS). Η μεγαλύτερη ποσότητα των ελεύθερων ριζών παράγεται από τη φθαλοκυανίνη η οποία είναι εγκλεισμένη στην χημικά τροποποιημένη Me-β-κυκλοδεξτρίνη. Επιπλέον, η μεγάλη κλίση της καμπύλης συνεπάγεται ότι ένα μεγάλο ποσοστό των ελεύθερων ριζών παράγεται γρήγορα μέσα στα πρώτα 10 λεπτά της ακτινοβόλησης. Επίσης, η παραγωγή των ROS είναι τόσο έντονη που οδήγησε σε κορεσμό του ανιχνευτή του φασματοφωτομέτρου στο 25° λεπτό της ακτινοβόλησης. Μεγάλη είναι και η παραγωγή ROS από το σύμπλοκο SiCl₂Pc-γ-CD. Ακολουθεί το σύμπλοκο της φθαλοκυανίνης με την β-CD, ενώ το σύμπλοκο της SiCl₂Pc με την HP-β-CD παράγει παρόμοια ποσότητα ROS με την μη εγκλεισμένη φθαλοκυανίνη. Συμπερασματικά, όλες οι ουσίες βρέθηκαν ικανές να παράγουν ROS. Η αυξημένη ικανότητα των συμπλόκων της φθαλοκυανίνης με τις κυκλοδεξτρίνες να παράγουν ελεύθερες ρίζες αποδίδεται στην μείωση της υδροφοβικότητας της φθαλοκυανίνης¹¹⁸.

5.4 Μελέτη επίδρασης της δίχλωρο-φθαλοκυανίνης-πυριτίου και των συμπλόκων αυτής στη βιωσιμότητα των κυττάρων απουσία φωτός

Προκειμένου να μελετηθούν οι φωτοδυναμικές ιδιότητες των πέντε ουσιών, κρίθηκε αναγκαίο να εξασφαλιστεί ότι αυτές, σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, δεν είναι τοξικές για τα κύτταρα. Δηλαδή, η επώαση των κυττάρων με τους φωτοευαισθητοποιητές δεν επάγει κυτταρικό θάνατο απουσία του φωτός διέγερσης. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών που εξετάστηκαν είναι 0,1 μM, 0,25 μM, 0,5 μM, 0,75 μM και 1 μM και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 5.32. Από το διάγραμμα παρατηρείται ότι η ελεύθερη φθαλοκυανίνη δεν εμφάνισε τοξικότητα για καμία από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Αντίθετα, η βιωσιμότητα των κυττάρων τα οποία επωάστηκαν με τα τέσσερα σύμπλοκα για 1μΜ μειώθηκε σε 87% για την SiCl₂Pc-β-CD, 85% για την SiCl₂Pc-HP-β-CD, 83% για την SiCl₂Pc-Me-β-CD και 84% για την SiCl₂Pc-γ-CD. Κατά συνέπεια, τα πειράματα φωτοδυναμικής θεραπείας διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας τη συγκέντρωση των 0,75 μΜ για όλες τις ενώσεις.

Παρόμοια επίδραση των κυκλοδεξτρινών στην τοξικότητα των A431 κυττάρων παρατηρήθηκε επίσης για τη φθαλοκυανίνη μαγνησίου¹¹⁸. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, δεν είναι τόσο εύκολο να κατανοήσουμε τις επιπτώσεις των κυκλοδεξτρινών στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Συνήθως, η αλληλεπίδρασή τους με τα κύτταρα προκαλεί αλλαγές στη δομή της κυτταρικής μεμβράνης και τη διαπερατότητά της. Έτσι, σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, η τοξικότητα τους εξαρτάται και από το είδος της κυτταρικής σειράς με το οποίο επωάζονται¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Σε παλαιότερες μελέτες, έχει καταγραφεί ότι μεταξύ των φυσικών κυκλοδεξτρινών, η β-CD εμφανίζει τη μεγαλύτερη τοξικότητα. Παρόμοια συμπεράσματα αναφέρονται και για την τροποποιημένη υδροξυ-προπυλο-β-CD (HP-β-CD). Από την άλλη πλευρά, άλλες ερευνητικές ομάδες στις μελέτες τους δεν αναφέρουν κυτταρικό θάνατο εξαιτίας της παρουσίας των κυκλοδεξτρινών.



Εικόνα 5.32: Διάγραμμα επίδρασης των πέντε φωτοευαισθητοποιητών στην βιωσιμότητα των κυττάρων απουσία φωτός. * p < 0,05 vs κύτταρα ομάδας ελέγχου.

5.5 Μελέτη επίδρασης φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Ο προσδιορισμός της δόσης της ενέργειας, που ελλείψει φωτοευαισθητοποιητή, δεν οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο είναι αναγκαίος. Ως εκ τούτου, τα κύτταρα A431 ακτινοβόλησαν με ισχύ έντασης 9 mW cm⁻², 12 mW cm⁻², 15 mW cm⁻² και 18 mW cm⁻². Ο χρόνος ακτινοβολίας ήταν 1,

2 και 3 λεπτά. Τα αντίστοιχα διαγράμματα κυτταρικής βιωσιμότητας-ισχύος ακτινοβόλησης παρουσιάζονται στα σχήματα 5.33-5..35. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, καμία από τις παραπάνω δόσεις ισχύος δεν προκάλεσαν μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων που να είναι στατιστικά σημαντική. Ως εκ τούτου, για την μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης της ελεύθερης φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc αλλά και των συμπλόκων εγκλεισμού της στις κυκλοδεξτρίνες, επιλέχθηκαν όλες οι παραπάνω δόσεις ενέργειας.





Εικόνα 5.33: Διάγραμμα ισχύος ακτινοβόλησης - βιωσιμότητας κυττάρων για διάρκεια ακτινοβόλησης 1 λεπτό



Εικόνα 5.34: Διάγραμμα ισχύος ακτινοβόλησης - βιωσιμότητας κυττάρων για διάρκεια ακτινοβόλησης 2 λεπτά



Εικόνα 5.35: Διάγραμμα ισχύος ακτινοβόλησης - βιωσιμότητας κυττάρων για διάρκεια ακτινοβόλησης 3 λεπτά

5.6 Μελέτη φωτοδυναμικής δράσης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες SiCl2Pc στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Τα κύτταρα A431 επωάστηκαν με τον κάθε φωτοευαισθητοποιητή σε τελική συγκέντρωση 0,75 μM για 4 ώρες. Στη συνέχεια ακτινοβολήθηκαν με ακτινοβολία λέιζερ ισχύος 9 mW cm⁻², 12mW cm⁻², 15mW cm⁻² και 18mW cm⁻². Οι εικόνες 5.36-5.39 παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας για τον κάθε φωτοευαισθητοποιητή 24 ώρες μετά την PDT για όλες τις δόσεις ισχύος και τους χρόνους ακτινοβόλησης. Και οι πέντε φωτοευαισθητοποιητές που εξετάστηκαν, παρουσίασαν σημαντικό φωτοδυναμικό αποτέλεσμα.



Εικόνα 5.36: Φωτοδυναμικό αποτέλεσμα της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεζτρίνες SiCl₂Pc για ισχύ ακτινοβόλησης 9 mW/cm². * p < 0.05 vs SiCl₂Pc, ** p < 0.0001 vs SiCl₂Pc.

Σύμφωνα με την εικόνα 5.36, έπειτα από ακτινοβόληση 1 λεπτού με laser ισγύος 9 mW/cm² (μικρότερη δόση ενέργειας, 540 mJ/cm²), η εγκλεισμένη φθαλοκυανίνη στην βκυκλοδεξτρίνη γαρακτηρίστηκε από την καλύτερη φωτοδυναμική δράση, αφού το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων μειώθηκε στο 53%. Σημαντική κυτταροτοξική δράση παρουσίασε και το σύμπλοκο της SiCl₂Pc με την γημικά τροποποιημένη HP-β-CD (ποσοστό βιωσιμότητας 79%). Παρόμοια φωτοδυναμική δράση είχαν η φθαλοκυανίνη στην ελεύθερη μορφή της αλλά και εγκλεισμένη στην γ-CD (84% και 88% κυτταρική βιωσιμότητα αντίστοιχα). Αντίθετα, το σύμπλοκο της SiCl₂Pc στην τροποποιημένη Me-β-CD δεν παρουσίασε καμία κυτταροτοξικότητα (ποσοστό βιωσιμότητας 100%). Η αύξηση της δόσης ενέργειας στα 1080 mJ/cm² (δόση ισχύος 9 mW/cm² με διάρκεια ακτινοβόλησης 2 λεπτά), δεν οδήγησε σε κάποια αξιοσημείωτη διαφορά στο ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων για όλους του φωτοευαισθητοποιητές. Τέλος, με την δόση ενέργειας των 1620 mJ/cm² (δόση ισχύος 9 mW/cm² με διάρκεια ακτινοβόλησης 3 λεπτά), η SiCl₂Pc-β-CD εμφάνισε ακόμα εντονότερη φωτοδυναμική δράση (ποσοστό βιωσιμότητας 46%), ενώ αυξήθηκε και η φωτοδυναμική δράση της SiCl₂Pc-Me-β-CD. Το φωτοδυναμικό αποτέλεσμα των υπόλοιπων φωτοευαισθητοποιητών ήταν παρόμοιο με αυτό που σημειώθηκε κατά την ακτινοβόληση με τη δόση ενέργειας των 1080 mJ/cm².

Τα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας για τους πέντε φωτοευαισθητοποιητές με δόσεις ενέργειας 720 mJ/cm², 1440 mJ/cm² και 2160 mJ/cm² (ισχύς ακτινοβόλησης 12 mW/cm² για 1, 2 και 3 λεπτά αντίστοιχα), παρουσιάζονται στην εικόνα 5.37. Σύμφωνα με το σχήμα, παρατηρείται ότι η αύξηση της δόσης ισχύος ακτινοβόλησης, άρα και των δόσεων ενέργειας, δεν βελτίωσε το κυτταροτοξικό αποτέλεσμα της φωτοδυναμικής δράσης των φωτοευαισθητοποιητών SiCl₂Pc, SiCl₂Pc-γ-CD και SiCl₂Pc-Me-β-CD, αφού τα επίπεδα κυτταρικής βιωσιμότητας είναι παρόμοια με αυτά που απεικονίζονται στην εικόνα 5.34. Αντίθετα, οι εγκλεισμένες μορφές της SiCl₂Pc στις κυκλοδεξτρίνες β-CD και HP-β-CD, εμφάνισαν και πάλι έντονη φωτοδυναμική δράση. Ειδικά η SiCl₂Pc-β-CD κατάφερε να μειώσει την βιωσιμότητα των κυττάρων στο 39%. Βελτιωμένη ήταν και η δράση του φωτοευαισθητοποιητή SiCl₂Pc-HP-β-CD.



Εικόνα 5.37: Φωτοδυναμικό αποτέλεσμα της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεζτρίνες SiCl₂Pc για ισχύ ακτινοβόλησης 12 mW/cm². * p < 0.05 vs SiCl₂Pc, ** p < 0.0001 vs SiCl₂Pc.

Η εικόνα 5.38 απεικονίζει την φωτοδυναμική δράση των φωτοευαισθητοποιητών για δόση ισχύος ακτινοβόλησης 15 mW/cm² και χρόνο ακτινοβόλησης 1, 2 και 3 λεπτά (δόσεις ενέργειας 900 mJ/cm², 1800 mJ/cm² και 2700 mJ/cm² αντίστοιχα). Όπως προκύπτει από το σχήμα, η αύξηση της ισχύος ακτινοβόλησης βελτίωσε σε σημαντικό βαθμό τη φωτοδυναμική δράση των φωτοευαισθητοποιητών SiCl₂Pc-γ-CD και SiCl₂Pc-Me-β-CD. Επίσης, καλύτερη δράση παρουσίασε και η ελεύθερη SiCl₂Pc με την υψηλότερη δόση ενέργειας των 2700 mJ/cm² να οδηγεί σε ποσοστό κυτταροτοξικότητας 33% (ποσοστό βιωσιμότητας 67%). Βελτιωμένη ήταν και η κυτταροτοξική δράση της SiCl₂Pc-HP-β-CD ειδικά όταν τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με την μεγαλύτερη δόση ενέργειας (ποσοστό βιωσιμότητας 57%). Τέλος, ενώ στο πρώτο λεπτό της ακτινοβόλησης η SiCl₂Pc-β-CD οδήγησε στο μικρότερο ποσοστό βιωσιμότητας (61%), παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της δόσης ενέργειας (2° λεπτό) αύξησε τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τελικά, σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σημειώθηκε για τη μεγαλύτερη δόση ενέργειας (52%). Συμπερασματικά, συγκρίνοντας τα ποσοστά βιωσιμότητας που σημειώθηκαν το 3° λεπτό της ακτινοβόλησης και σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση, οι τρεις φωτοευαισθητοποιητές SiCl2Pc-β-CD, SiCl2Pc-γ-CD και SiCl2Pc-Me-β-CD εμφάνισαν παρόμοια φωτοδυναμική δράση.



Εικόνα 5.38: Φωτοδυναμικό αποτέλεσμα της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες SiCl₂Pc για ισχύ ακτινοβόλησης 15 mW/cm². * p < 0.05 vs SiCl₂Pc, ** p < 0.005 vs SiCl₂Pc; *** p < 0.0001 vs SiCl₂Pc.

Όταν τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με δόση ισχύος 18 mW/cm² για ένα λεπτό (Εικόνα 5.39), το σύμπλοκα της φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc με την κυκλοδεξτρίνη β-CD εμφάνισε παρόμοια κυτταροτοξικότητα με την ελεύθερη μορφή της φθαλοκυανίνης. Αντίθετα, τα σύμπλοκά της με τις HP-β-CD και Me-β-CD είγαν ακόμα καλύτερη δράση μειώνοντας το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων περίπου στο 70%. Αντίθετα, η SiCl₂Pc-γ-CD σημείωσε την χειρότερη φωτοδυναμική δράση αφού ο επαγόμενος κυτταρικός θάνατος ήταν μόλις 13%. Με την αύξηση του γρόνου ακτινοβόλησης (από τα 1080 mJ/cm² στα 2160 mJ/cm²), το φωτοδυναμικό αποτέλεσμα της μη εγκλεισμένης φθαλοκυανίνης δεν βελτιώθηκε. Παρόμοια συμπεριφορά είχαν οι SiCl₂Pc-β-CD και SiCl₂Pc-Me-β-CD. Αν και εμφάνισαν καλύτερη φωτοδυναμική δράση σε σχέση με την ελεύθερη φθαλοκυανίνη, τα ποσοστά βιωσιμότητας των κυττάρων δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά, οπότε η φωτοδυναμική τους δράση δεν μπορεί να χαρακτηριστεί βελτιωμένη. Απεναντίας, ενισχυμένη ήταν η δράση της SiCl₂Pc-HP-β-CD, αφού ο κυτταρικός θάνατος αυξήθηκε κατά 13% σε σγέση με το 1° λεπτό της ακτινοβόλησης. Ιδιαίτερα βελτιωμένη ήταν η δράση του φωτοευαισθητοποιητής SiCl₂Pc-γ-CD οδηγώντας σε ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας 56%. Οι δύο αυτοί φωτοευαισθητοποιητές είχαν παρόμοια φωτοδυναμική δράση. Τέλος, κατά την ακτινοβόληση με τα 3240 mJ/cm² (ακτινοβόληση για 3 λεπτά), η φωτοδυναμική δράση της ελεύθερης φθαλοκυανίνης, αν και σε μικρό βαθμό, ενισχύθηκε. Η δράση της SiCl₂Pc-β-CD παρέμεινε αμετάβλητη, ενώ μειώθηκε ελάχιστα η δράση της SiCl₂Pc-HP-β-CD. Όπως προκύπτει από τα ποσοστά βιωσιμότητας, και οι τρεις αυτοί φωτοευαισθητοποιητές είγαν παρόμοιο κυτταροτοξικό αποτέλεσμα. Η φωτοδυναμική δράση

των συμπλόκων SiCl₂Pc-γ-CD και SiCl₂Pc-Me-β-CD ήταν παρόμοια, μειώνοντας σημαντικά ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων.



Εικόνα 5.39: Φωτοδυναμικό αποτέλεσμα της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεζτρίνες SiCl₂Pc για ισχύ ακτινοβόλησης 18 mW/cm². * p < 0.05 vs SiCl₂Pc, ** p < 0.0001 vs SiCl₂Pc.

Το βελτιωμένο φωτοδυναμικό αποτέλεσμα των συμπλόκων της φθαλοκυανίνης με τις κυκλοδεξτρίνες οφείλεται στην αύξηση της διαλυτότητας της φθαλοκυανίνης στο υδατικό περιβάλλον εξαιτίας του εγκλεισμού της στις κυκλοδεξτρίνες 118,152-154. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μειώνονται τα συσσωματώματα των μορίων της φθαλοκυανίνης, τα οποία μειώνουν την φωτοδυναμική της δράση. Έτσι η ουσία απορροφάται σε μεγαλύτερο βαθμό από τα κύτταρα αυξάνοντας έτσι το κυτταροτοξικό της αποτέλεσμα. Επιπλέον, ο εγκλεισμός της SiCl₂Pc στις κυκλοδεξτρίνες β-CD και HP-β-CD οδήγησε σε σημαντικό φωτοδυναμικό αποτέλεσμα ακόμα και στις γαμηλότερες δόσεις ενέργειας. Αξίζει να σημειωθεί ότι το σύμπλοκο της φθαλοκυανίνης με την β-κυκλοδεξτρίνη στις μικρότερες δόσεις ενέργειας οδήγησε σε μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά 50% (LD50), αλλά επίσης μπορεί να γαρακτηριστεί και ως ο πιο ελπιδοφόρος φωτοευαισθητοποιητής αφού μείωσε τη βιωσιμότητα των κυττάρων στο 39% για μόλις 3 λεπτά ακτινοβόλησης με ισχύ 12 mW/cm². Το σύμπλοκο της φθαλοκυανίνης με την HP-β-CD παρουσίασε χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα στις μικρότερες δόσεις ενέργειας, η οποία είναι σύμφωνη με τις μελέτες παραγωγής ROS. Αντίθετα, τα σύμπλοκα της φθαλοκυανίνης με τις Meβ-CD και γ-CD, για τις μικρότερες δόσεις ισχύος δεν είχαν κάποιο σημαντικό κυτταροτοξικό αποτέλεσμα. Όμως, στην ακτινοβόληση με τις υψηλότερες δόσεις ισχύος, πιο αποδοτικός φωτοευαισθητοποιητής αναδείχθηκε η SiCl₂Pc-γ-CD.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρείται ότι το φωτοδυναμικό αποτέλεσμα της ελεύθερης SiCl₂Pc είναι δοσο-εξαρτώμενο, δηλαδή με την αύξηση της δόσης ενέργειας, ο κυτταρικός θάνατος αυξάνεται. Την ίδια συμπεριφορά έχουν και τα σύμπλοκα της φθαλοκυανίνης με τις κυκλοδεξτρίνες γ-CD και Me-β-CD. Αντίθετα, τα σύμπλοκα της φθαλοκυανίνης με τις β-

CD και HP-β-CD κυκλοδεξτρίνες με την αύξηση της ισχύος ακτινοβόλησης εμφανίζουν μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων (inverse dose dependent photodynamic effect) (Εικόνες 5.40-5.42). Παρόμοια συμπεράσματα έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία όμως ο βιολογικός μηχανισμός που εξηγεί αυτό το φαινόμενο είναι ελλιπώς κατανοητός ¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. Πιθανόν, ενδοκυτταρικοί μηχανισμοί τείνουν να μπλοκάρουν την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών μετασχηματίζοντάς τες σε μη δραστικές ουσίες με αποτέλεσμα η φωτοδυναμική δράση του φωτοευαισθητοποιητή να μειώνεται ¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι ο άνω περιγραφόμενος μηχανισμός θα μπορούσε να περιορίσει την παρατεταμένη φωτοευαισθησία που παρατηρείται έπειτα από κάθε θεραπεία ¹⁶⁰.



Εικόνα 5.40: Διάγραμμα βιωσιμότητας-δόσεων ισχύος ακτινοβόλησης μετά από 1 λεπτό ακτινοβόλησης για τους πέντε φωτοευαισθητοποιητές.



Σχήμα 5.38: Διάγραμμα βιωσιμότητας-δόσεων ισχύος ακτινοβόλησης μετά από 2 λεπτά ακτινοβολίας για όλους τους φωτοευαισθητοποιητές.



Εικόνα 5.41: Διάγραμμα βιωσιμότητας-δόσεων ισχύος ακτινοβόλησης μετά από 3 λεπτά ακτινοβόλησης για τους πέντε φωτοευαισθητοποιητές.

5.7 Μελέτη επαγόμενου ενδοκυττάριου οξειδωτικού stress από τη φωτοδυναμική θεραπεία

Η SiCl₂Pc εγκλεισμένη στην β-κυκλοδεξτρίνη παρουσίασε την πιο έντονη αντιστροφή δόσης ενέργειας-ποσοστού βιωσιμότητας. Προκειμένου να μελετηθεί το επαγόμενο ενδοκυττάριο οξειδωτικό stress καταγράφηκε η παραγωγή ελευθέρων ριζών 0 h και 24 h μετά την φωτοδυναμική θεραπεία. Η εικόνα 5.42 παρουσιάζει τα κύτταρα ομάδας ελέγχου με προσπίπτοντα φωτισμό καθώς και τα επίπεδα ελευθέρων ριζών που παρατηρούνται σε αυτά χωρίς να έχουν υποστεί την φωτοδυναμική θεραπεία. Στις εικόνες 5.43 και 5.44 παρουσιάζεται η καταγραφή της παραγωγής ελευθέρων ριζών για 0 h και 24 h μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία με 0,75 μM SiCl₂Pc-β-CD (επώαση 4 h) και ακτινοβόληση με λέιζερ στα 660 nm, με ισχύ 12 mW/cm² και 18 mW/cm² για 3 min, ενώ τα σχήματα 5.45 και 5.46 η αντίστοιχη ένταση του φθορισμού μετά την ποσοτικοποίησή της.

Αρχικά, οι εικόνες προσπίπτοντος φωτισμού (brightfield) παρουσιάζουν την επίδραση της φωτοδυναμικής θεραπείας στη μορφολογία των κυττάρων A431, η οποία εξαρτάται από την δόση ενέργειας που χρησιμοποιείται κάθε φορά. Όταν τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με τη μεγαλύτερη δόση ισχύος των 18 mW/cm², η μορφολογία τους δεν επηρεάστηκε σοβαρά αμέσως μετά ή 24 ώρες μετά την PDT. Ωστόσο, αμέσως μετά την PDT με την χαμηλότερη ισχύ των 12 mW/cm², υπέστησαν σοβαρές βλάβες. Τα κύτταρα ανασηκώθηκαν από την καλυπτρίδα και η μορφολογία τους άλλαξε. Πιο συγκεκριμένα, έχασαν το φυσικό σφαιρικό τους σχήμα, συρρικνώθηκαν και σε πολλά από αυτά η κυτταρική τους μεμβράνη καταστράφηκε. Όσα από αυτά επέζησαν, 24 ώρες μετά την PDT ξεκίνησαν να σχηματίζουν νέες αποικίες.





Εικόνα 5.42: Ελεύθερες ρίζες στα Α431 κύτταρα απουσία οποιουδήποτε ερεθίσματος (κύτταρα ομάδας ελέγχου).

Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS παρουσιάζονται στις εικόνες φθορισμού. Από τις εικόνες είναι αντιληπτή η διακύμανση που παρατηρείται στην ένταση φθορισμού η οποία είναι ανάλογη του αριθμού των ελευθέρων ριζών που παράγονται στο εσωτερικό του κυττάρου μετά την φωτοδυναμική θεραπεία. Η διαφορά στα επίπεδα παραγωγής ROS 0 h και 24 h μετά την εφαρμογή της θεραπείας είναι σαφώς αισθητή. Για τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου η ένταση του φθορισμού μετρήθηκε 12 α.μ., ενώ για την ισχύ ακτινοβόλησης των 12 mW/cm² 73 α.μ, και για τα 18 mW/cm² 25 α.μ. Και για τις δύο δόσεις ενέργειας καταγράφονται υψηλότερα επίπεδα ROS από ότι στα μη ακτινοβοληθέντα κύτταρα. Όμως, η ισχύς των 12 mW/cm² οδήγησε σε μεγαλύτερη παραγωγή ελευθέρων ριζών η οποία επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τέλος, 24 h μετά την PDT, και για τις δύο δόσεις ισχύος, δεν παρατηρείται παρατεταμένο οξειδωτικό stress αφού τα επίπεδα των ROS είναι σχεδόν ίδια με αυτά των κυττάρων ελέγχου.





Εικόνα 5.43: Ελεύθερες ρίζες στα Α431 κύτταρα (α) αμέσως μετά από τη φωτοδυναμική θεραπεία και (β) 24 h μετά τη θεραπεία με 0.75 μM SiCl₂Pc-β-CD και ακτινοβόληση με λέιζερ στα 660 nm, 12 mW/cm² για 3 λεπτά.





(β)

Εικόνα 5.44: Ελεύθερες ρίζες στα Α431 κύτταρα (α) αμέσως μετά από τη φωτοδυναμική θεραπεία και (β) 24 h μετά τη θεραπεία με 0.75 μM SiCl₂Pc-β-CD και ακτινοβόληση με λέιζερ στα 660 nm, 18 mW/cm² για 3 λεπτά.



Εικόνα 5.45: Διάγραμμα παραγωγής ελευθέρων ριζών στα A431 κύτταρα 0 ώρες μετά από φωτοδυναμική με 0.75 μM SiCl₂PC-β-CD (επώαση 4h) και ακτινοβόληση με διοδικό laser στα 660 nm για 3 λεπτά σε σχέση με τις ελεύθερες ρίζες της ομάδας ελέγχου.



Εικόνα 5.46: Διάγραμμα παραγωγής ελευθέρων ριζών στα Α431 κύτταρα 24 ώρες μετά από φωτοδυναμική με 0.75 μM SiCl₂PC-β-CD (επώαση 4h) και ακτινοβόληση με διοδικό laser στα 660 nm για 3 λεπτά σε σχέση με τις ελεύθερες ρίζες της ομάδας ελέγχου.

ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ ΣΤΟΧΩΝ

Η φωτοδυναμική θεραπεία αποτελεί μια επιλεκτική, καινοτόμο και αποτελεσματική προσέγγιση για την αντιμετώπιση του καρκίνου αλλά και άλλων μη καρκινικών νόσων. Βασίζεται στη συνδυασμένη δράση τριών παραγόντων: του φωτός, ενός χημικού μορίου που ονομάζεται φωτοευαισθητοποιητής και του οξυγόνου. Κανένας από αυτούς τους παράγοντες αν δράσουν ανεξάρτητα δεν είναι τοξικός για τα κύτταρα. Αντίθετα, η συνδυασμένη δράση τους μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο. Ο φωτοευαισθητοποιητής είναι ένα εξωγενές χρωμοφόρο μόριο με την ικανότητα να κατακρατείται επιλεκτικά από τους πάσχοντες ιστούς. Τα οξειδωτικά παράγωγα που παράγονται κατά τη διάρκεια των φωτοχημικών αντιδράσεων τύπου Ι και ΙΙ είναι αυτά τα οποία ενεργοποιούν τους μηχανισμούς νέκρωσης των καρκινικών κυττάρων.

Σε σύγκριση με τις συμβατικές αντικαρκινικές θεραπείες, το σημαντικότερο πλεονέκτημα της φωτοδυναμικής θεραπείας αποτελεί η επιλεκτικότητά της, η οποία οφείλεται στους εξής λόγους: α) ο φωτοευαισθητοποιητής συγκεντρώνεται επιλεκτικά από τους πάσχοντες ιστούς και κύτταρα, β) το φως διέγερσης καθοδηγείται και εστιάζεται αποκλειστικά στις πάσχουσες περιοχές και γ) καθώς τα οξειδωτικά παράγωγα παρουσιάζουν πολύ μικρό χρόνο ζωής (~nsec) εκεί που δημιουργούνται εκεί και δρουν, δεν μπορούν να καταστρέψουν υγιείς ιστούς σε άλλα μέρη του σώματος.

Παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματα της μεθόδου, η ευρύτερη εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας έναντι των γνωστών αντικαρκινικών θεραπειών είναι περιορισμένη. Βασικό μειονέκτημα, το οποίο αποτελεί εμπόδιο μιας ευρύτερης αποδοχής της προσέγγισης αυτής από την ιατρική κοινότητα, είναι η αδυναμία εφαρμογής της μεθόδου σε όγκους, οι οποίοι βρίσκονται σε εσωτερικά όργανα. Η μεταφορά του φωτός διέγερσης στον καρκινικό όγκο καθώς και ο καθορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή και της δόσης ενέργειάς του ώστε να επιτευχθεί η καταστροφή του καρκινικού όγκου, αποτελούν σημαντικές προκλήσεις για την επιτυχή εφαρμογή της μεθόδου. Χάρη στην εξέλιξη της τεχνολογίας, οπτικές ίνες τοποθετημένες στο εσωτερικό καθετήρων, μπορούν και μεταφέρουν το φως διέγερσης στον καρκινικό όγκο, δημιουργώντας έτσι την Ενδοϊστική Φωτοδυναμική Θεραπεία.

Το σημαντικότερο τροχοπέδη στην αποτελεσματικότητα και αποδοχή της θεραπείας, αποτελεί η παραμένουσα φωτοευαισθησία. Παρά την επιλεκτική απορρόφηση του φωτοευαισθητοποιητή από τους πάσχοντες ιστούς, μικρό μέρος αυτού συγκεντρώνεται και σε υγιείς. Το φυσικό φως μπορεί να διεγείρει τα υπάρχοντα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών αντιδράσεων και την καταστροφή υγιών ιστών στο δέρμα και τα μάτια. Ως εκ τούτου, πρόκληση αποτελεί η άρση της παραμένουσας φωτοευαισθησίας και ταυτόχρονα η βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής δράσης των φωτοευαίσθητων ουσιών. Η συνεισφορά της Νανοτεχνολογίας στην κατεύθυνση αυτή είναι πολύτιμη.

Η δημιουργία νανοσωματιδίων μεταφοράς φαρμάκων αποτελεί σημαντική εξέλιξη τόσο για τον τομέα της φωτοδυναμικής θεραπείας όσο και για την ιατρική συνολικά. Η πλειονότητα των φωτοευαίσθητων ουσιών που χρησιμοποιούνται στην φωτοδυναμική θεραπεία είναι υδρόφοβες με περιορισμένη διαλυτότητα σε υδατικά μέσα. Τα συσσωματώματα των μορίων που δημιουργούνται, αλλοιώνουν τα φωτοφυσικά και φωτοχημικά χαρακτηριστικά των φωτοευαισθητοποιητών και επηρεάζουν την βιοδιαθεσιμότητά τους στους βιολογικούς οργανισμούς περιορίζοντας έτσι την φωτοδυναμική τους δράση. Ο εγκλεισμός τους σε νανοσωματίδια μεταφοράς μπορεί να αυξήσει την διαλυτότητά τους στα υδατικά διαλύματα βελτιώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητά τους.

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μια άνθηση στα είδη των νανοσωματιδιακών συστημάτων μεταφοράς φωτοευαισθητοποιητών. Νανοσωματίδια με βάση τον άνθρακα, όπως οι κβαντικές τελείες, οι νανοσωλήνες άνθρακα, τα φουλερένια κ.α., λιποσώματα, μικκύλια, νανοσωματίδια χρυσού, πολυμερών ή κεραμικών αποτελούν ένα μικρό μέρος από τα διαφορετικά είδη νανοσωματιδίων που έχουν αναπτυχθεί. Ανάμεσα σε αυτά, οι κυκλοδεξτρίνες, φυσικοί κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες, όπου η χρησιμότητά τους κρίνεται ιδιαιτέρως σημαντική στην φωτοδυναμική θεραπεία. Αυτό γιατί, ο εγκλεισμός των υδρόφοβων φωτοευαισθητοποιητών στην κοιλότητά τους, οδηγεί στην ενίσχυση της διαλυτότητας των υδρόφοβων μορίων και άρα στην βελτίωση της φωτοδυναμικής τους δράσης. Επίσης, οι κυκλοδεξτρίνες είναι βιοσυμβατές με τον ανθρώπινο οργανισμό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα μόρια των φωτοευαισθητοποιητών που βρίσκονται εγκλεισμένα στην κοιλότητά τους να έχουν περισσότερη διάρκεια ζωής μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι, όχι μόνο προστατεύονται από πιθανές αλλοιώσεις της δομής τους, αλλά καταφέρνουν και φτάνουν τα καρκινικά κύτταρα-στόχους.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, τέθηκαν επιμέρους στόχοι, οι οποίοι αφορούσαν α) στην δημιουργία νανοσωματιδίων μεταφοράς από φυσικές και χημικά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες για τον φωτοευαισθητοποιητή 2^{ης} γενιάς SiCl₂Pc, και β) στη συγκριτική μελέτη των φωτοφυσικών & φωτοχημικών χαρακτηριστικών της εγκλεισμένης με την ελεύθερη φθαλοκυανίνη SiCl₂Pc. Στόχος είναι να διερευνηθεί αν η ενθυλάκωση της φθαλοκυανίνης στις κυκλοδεξτρίνες α) επηρεάζει τα φωτοφυσικά και φωτοχημικά της SiCl₂Pc, β) μειώνει ή ακόμα καλύτερα αποτρέπει τη συσσωμάτωση των μορίων της, γ) αυξάνει την υδατοδιαλυτότητά της και δ) ενισχύει την φωτοδυναμική της δράση σε κύτταρα της καρκινικής σειράς A431 του δέρματος. Στην τρέχουσα βιβλιογραφία, δεν απαντάται μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης του φωτοευαισθητοποιητή SiCl₂Pc σε κάποιο είδος καρκινικής σειράς κυττάρων. Επίσης, ο συγκεκριμένος φωτοευαισθητοποιητής δεν έχει εγκλειστεί σε νανοσωματίδια κυκλοδεξτρινών.

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1) Δημιουργία νανοσωματιδίων εγκλεισμού φθαλοκυανίνης και χαρακτηρισμός αυτών

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται πολλές διαφορετικές μέθοδοι για την δημιουργία συμπλόκων εγκλεισμού. Στην παρούσα διατριβή, η τεχνική που επιλέχθηκε για τη δημιουργία των νανοσωματιδίων είναι το kneading, καθώς είναι η προτιμότερη μέθοδος εγκλεισμού υδρόφοβων μορίων όπως οι φθαλοκυανίνες. Η επίτευξη υψηλής απόδοσης εγκλεισμού των ουσιών στα εκάστοτε νανοσωματίδια είναι κρίσιμη για τη μεγιστοποίηση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων των νανοσωματιδίων κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία και εξαρτάται από τα μόρια προς εγκλεισμό. Οι φθαλοκυανίνες, λόγω της έντονης υδροφοβικότητας και του μεγάλου μοριακού μεγέθους, χαρακτηρίζονται από μειωμένη ικανότητα να εγκλειστούν αποτελεσματικά σε κάποιο νανοσωματίδιο. Παρά τις προαναφερθείσες προκλήσεις, ο εγκλεισμός της SiCl₂Pc στις κυκλοδεξτρίνες κατέστη εφικτή. Η απόδοση εγκλεισμού αυξήθηκε σημαντικά όταν η φθαλοκυανίνη εγκλείστηκε στην γ-κυκλοδεξτρίνη, καθιστώντας σαφές ότι το μέγεθος της κοιλότητας της εκάστοτε κυκλοδεξτρίνης έχει σημαντική επίδραση στην απόδοση εγκλεισμού. Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη τους παραπάνω περιορισμούς, η επιλογή της τεχνικής kneading μπορεί να χαρακτηριστεί επιτυχημένη.

Όσον αφορά στον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων μεταφοράς, το μέγεθος, ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και το ζ-δυναμικό τους μετρήθηκε με χρήση της μεθόδου της δυναμικής σκέδασης φωτός DLS. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα σύμπλοκα παρουσίασαν μικρές διαφορές στην τιμή της υδροδυναμικής διαμέτρου ενώ η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς ήταν υψηλή υποδεικνύοντας μέτρια ομοιογένεια στην κατανομή μεγέθους των συστημάτων εγκλεισμού. Η υψηλή τιμή του δείκτη πολυδιασποράς οφείλεται στην τάση των κυκλοδεξτρινών να σχηματίζουν συσσωματώματα σε υδατικά διαλύματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος εξαιτίας της έλλειψης ικανοποιητικού φορτίου στην επιφάνειά τους. Επιπλέον, σύμπλοκα μη εγκλεισμού της φθαλοκυανίνης με την εξωτερική επιφάνεια των κυκλοδεξτρινών επηρεάζουν την τιμή του δείκτη πολυδιασποράς απόδείχθηκε το σύμπλοκο της φθαλοκυανίνης με την γ-CD. Το αρνητικό πρόσημο των τιμών του ζ-δυναμικού δείχυει ότι η ευθυγράμμιση των μορίων των κυκλοδεξτρινών είναι τέτοια που οι μη υποκατάστατες ομάδες -ΟΗ είναι προσανατολισμένες προς το υδάτινο περιβάλλον καθιστώντας

Ολοκληρώνοντας το χαρακτηρισμού των νανοσωματιδίων, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων της κυκλοδεξτρίνης (μόριο ξενιστής-host molecule) και της φθαλοκυανίνης (φιλοξενούμενο μόριο-guest molecule), αλλά και της δομής των συμπλόκων εγκλεισμού μελετήθηκαν μέσω της φασματοσκοπίας FT-IR. Τα φάσματα των συμπλόκων εμφάνισαν ομοιότητες με αυτά των καθαρών κυκλοδεξτρινών, ενώ σημειώθηκαν μετατοπίσεις των κυματαριθμών των χαρακτηριστικών κορυφών των καθαρών κυκλοδεξτρινών, ένδειξη αλληλεπίδρασης της φθαλοκυανίνης με την εκάστοτε κυκλοδεξτρίνη. Η απουσία της χαρακτηριστικής κορυφής της δόνησης τάσης της C-N της δομής πυρρόλιου της καθαρής φθαλοκυανίνης στην κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών, ενώ μόνο ένα μέρος της φθαλοκυανίνης φάνηκε να εντοπίζεται στο εσωτερικό της κοιλότητας της εκάστοτε κυκλοδεξτρίνης.

2) Εγκλεισμός της φωτοευαίσθητης ουσίας SiCl₂Pc στις κυκλοδεξτρίνες

2.1) Φωτοφυσικές μελέτες

Από τις φωτοφυσικές μελέτες απορρόφησης κατέστη φανερό πως η ελεύθερη SiCl₂Pc είναι μια ουσία δυσδιάλυτη με αυξημένη τάση για συσσωμάτωση ακόμα και σε οργανικούς διαλύτες. Το φάσμα απορρόφησής της επηρεάζεται ισχυρά από το διαλύτη στον οποίο διαλύεται. Ειδικά στον υδατικής φύσεως διαλύτη PBS, το μέγιστο απορρόφησης παρουσίασε σημαντική μείωση σε σχέση με το μέγιστο απορρόφησης στους οργανικούς διαλύτες DMSO και αιθανόλη. Η μείωση αυτή στο μέγιστο απορρόφησης είναι αποτέλεσμα της συσσωμάτωσης των μορίων της SiCl₂Pc σε υδατικά μέσα εξαιτίας της υδροφοβικότητάς της.

Όσον αφορά στα φάσματα απορρόφησης της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνης φθαλοκυανίνης, παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης του μέγιστου απορρόφησης. Επίσης, στους οργανικούς διαλύτες τα φάσματα απορρόφησης ήταν πιο καθορισμένα, ειδικά όταν η φθαλοκυανίνη εγκλίστηκε στις χημικά τροποποιημένες HP-β-CD και Me-β-CD. Στα φάσματα αυτά εμφανίζεται ξεκάθαρα η κορυφή απορρόφησης στην Q band περιοχή. Συγκρίνοντας τα φάσματα απορρόφησης. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν πως ο

εγκλεισμός της φθαλοκυανίνης στις κυκλοδεξτρίνες μείωσε την συσσωμάτωση των μορίων της SiCl₂Pc.

Σχετικά με τον φθορισμό της SiCl₂Pc, από τα αντίστοιχα φάσματα εξάγεται το συμπέρασμα ότι η φθαλοκυανίνη αλληλεπιδρά με διαφορετικό τρόπο με την κάθε κυκλοδεξτρίνη. Για την SiCl₂Pc-β-CD παρατηρήθηκε μείωση της έντασης λόγω του εγκλεισμού της, ενώ για τα υπόλοιπα τρία σύμπλοκα ο εγκλεισμός της οδήγησε σε αυξημένη εκπομπή φθορισμού. Η αυξημένη ένταση φθορισμού υποδηλώνει ότι η κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών αποτελεί ένα καλύτερο και πιο προστατευτικό περιβάλλον για την φθαλοκυανίνη, εμποδίζοντας την συσσωμάτωσή της στα διάφορα. Αξίζει να σημειωθεί ότι και οι πέντε ενώσεις έδειξαν έντονη εκπομπή φθορισμού και ως εκ τούτου μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο στη φωτοδυναμική διάγνωση όσο και στη θεραπεία.

Συνολικά, στην παρούσα εργασία αποδείχθηκε ότι ο εγκλεισμός της SiCl₂Pc στις φυσικές και χημικά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες μείωσε τον βαθμό συσσωμάτωσης σε όλους τους διαλύτες, ενώ δεν επηρέασε τα φωτοφυσικά της χαρακτηριστικά. Συνεπώς τα μόρια που φωτοευαισθητοποιητή παραμένουν σε μονομερή μορφή χωρίς να επηρεάζεται η κβαντική απόδοση και η φωτοδυναμική ικανότητα της SiCl₂Pc.

2.2) Φωτοχημικές μελέτες

Οι φωτοχημικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να διερευνηθεί αν η δομή της φθαλοκυανίνης τόσο στην ελεύθερη όσο και στην εγκλεισμένη μορφή της μεταβάλλεται παρουσία φωτός. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως φωτολεύκανση και έχει ως αποτέλεσμα το μόριο να χάνει την ικανότητα φθορισμού. Για τις φθαλοκυανίνες, η φωτοκαταστροφή τους οφείλεται στην καταστροφή των δακτυλίων C-N που αποτελούν το μόριό τους. Από τα ερευνητικά αποτελέσματα της παρούσας διατριβής προέκυψε πως και οι πέντε φωτοευαισθητοποιητές είναι χημικά σταθερά μόρια. Σε περίπτωση φωτοχημικής καταστροφής των δομών τους, θα έπρεπε να παρατηρηθούν είτε νέες κορυφές στα φάσματα φθορισμού οι οποίες θα υποδήλωναν την δημιουργία νέων μορίων, είτε την μείωση της έντασης στο μέγιστο φθορισμού. Αντίθετα, όλες οι ενώσεις παρουσίασαν έντονη αύξηση της έντασης του φθορισμού τους ειδικά κατά τα πρώτα λεπτά της ακτινοβόλησης. Η αύξηση αυτή μπορεί να αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες. Αρχικά, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η ακτινοβολία laser μπορεί να διασπάσει τα συσσωματώματα των μορίων της φθαλοκυανίνης στα διαλύματα. Αυτός ο μηγανισμός έχει περιγραφεί και από άλλους ερευνητές, όπου σύμφωνα με αυτούς, η ακτινοβολία λέιζερ μπορεί να αλλάξει την ισορροπία των μονομερών και διμερών μορίων της φθαλοκυανίνης στο διάλυμα. Επιπροσθέτως, όλο και περισσότερη ποσότητα φθαλοκυανίνης απελευθερώνεται από τις κυκλοδεξτρίνες κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης, οδηγώντας έτσι σε αύξηση της έντασης του φθορισμού.

Εν συνεχεία, διερευνήθηκε η επαρκής παραγωγή ελεύθερων ριζών της SiCl₂Pc στην ελεύθερη και εγκλεισμένη της μορφή. Η ικανοποιητική παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένας φωτοευαισθητοποιητής ώστε να επιτευχθεί αξιόλογο φωτοδυναμικό αποτέλεσμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι πέντε ενώσεις παράγουν επιθυμητή και σημαντική ποσότητα ελευθέρων ριζών (ROS). Η μεγαλύτερη ποσότητα των ελεύθερων ριζών παρήχθη από την SiCl₂Pc-Me-β-CD, ενώ μεγάλη ποσότητα ROS έδωσε και η SiCl₂Pc-γ-CD. Εν κατακλείδι, η αυξημένη ικανότητα των συμπλόκων της υδροφοβικότητας της φθαλοκυανίνης.

3) Φωτοδυναμική δράση

Από τις μελέτες φωτοδυναμικής δράσης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης στις κυκλοδεξτρίνες φθαλοκυανίνη, για μια συγκέντρωση (0.75 μM) και διέγερση με τέσσερις διαφορετικές δόσεις ισχύος (9, 12, 15 και 18 mW/cm²), προέκυψε ότι οι εγκλεισμένες μορφές της SiCl₂Pc έχουν ισχυρότερη φωτοδυναμική δράση σε σχέση με την ελεύθερη φθαλοκυανίνη.

Η ενθυλάκωση του φωτοευαισθητοποιητή στις κυκλοδεξτρίνες αύξησε την διαλυτότητά της στο υδατικό περιβάλλον με αποτέλεσμα την μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα στις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Η μείωση των συσσωματωμάτων αύξησε την ενδοκυττάρια συγκέντρωση και ενίσχυσε την φωτοδυναμική της δράση. Επιπλέον, ο εγκλεισμός της SiCl₂Pc στις κυκλοδεξτρίνες β-CD και HP-β-CD οδήγησε σε σημαντική κυτταροτοξικότητα ακόμα και στις χαμηλότερες δόσεις ενέργειας. Αξίζει να σημειωθεί ότι το σύμπλοκο της φθαλοκυανίνης με την β-κυκλοδεξτρίνη στις μικρότερες δόσεις ενέργειας μείωσε τη βιωσιμότητας των κυττάρων κατά 50% (LD50), αλλά επίσης μπορεί να χαρακτηριστεί και ως ο πιο ελπιδοφόρος φωτοευαισθητοποιητής αφού μείωσε τη βιωσιμότητα των κυττάρων στο 39% για μόλις 3 λεπτά ακτινοβόλησης με ισχύ 12 mW/cm². Το σύμπλοκο της φθαλοκυανίνης με την ΗΡ-β-CD παρουσίασε χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα στις μικρότερες δόσεις ενέργειας, α στις μικρότερες δόσεις ενέργειας. Ατίθετα, τα σύμπλοκα της φθαλοκυανίνης με τις Με-β-CD και γ-CD, για τις μικρότερες δόσεις ισχύος δεν είχαν κάποιο σημαντικό κυτταροτοξικό αποτέλεσμα. Όμως, στην ακτινοβόληση με τις υψηλότερες δόσεις ισχύος, πιο αποδοτικός φωτοευαισθητοποιητής αναδείχθηκε η SiCl₂Pc-γ-CD.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρείται ότι το φωτοδυναμικό αποτέλεσμα της ελεύθερης SiCl₂Pc ήταν δοσο-εξαρτώμενο, δηλαδή με την αύξηση της δόσης ενέργειας, ο κυτταρικός θάνατος αυξάνεται. Την ίδια συμπεριφορά είχαν και τα σύμπλοκα της φθαλοκυανίνης με τις κυκλοδεξτρίνες γ-CD και Me-β-CD. Αντίθετα, τα σύμπλοκα της φθαλοκυανίνης με τις β-CD και HP-β-CD κυκλοδεξτρίνες με την αύξηση της ισχύος ακτινοβόλησης εμφάνισαν μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων (inverse dose dependent photodynamic effect). Παρόμοια συμπεράσματα έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία όμως ο βιολογικός μηχανισμός που εξηγεί αυτό το φαινόμενο είναι ελλιπώς κατανοητός. Πιθανόν, ενδοκυτταρικοί μηχανισμοί τείνουν να μπλοκάρουν την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών μετασχηματίζοντάς τες σε μη δραστικές ουσίες με αποτέλεσμα η φωτοδυναμική δράση του φωτοευαισθητοποιητή να μειώνεται. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι ο άνω περιγραφόμενος μηχανισμός θα μπορούσε να περιορίσει την παρατεταμένη φωτοευαισθησία που παρατηρείται έπειτα από κάθε θεραπεία. Το inverse dose dependent photodynamic effect που εμφάνισαν οι δύο φωτοευαισθητοποιητές SiCl₂Pc-β-CD και SiCl₂Pc-HP-β-CD, επιβεβαιώθηκε και από την μελέτη του επαγόμενου ενδοκυττάριου οξειδωτικού stress 0 και 24 ώρες από τη φωτοδυναμική θεραπεία.

Τελικά διαπιστώνουμε ότι:

- i. Η SiCl₂Pc αν και είναι ιδιαιτέρως υδρόφοβο μόριο με μεγάλη τάση προς συσσωμάτωσης, χαρακτηρίζεται από σχετικά καλή φωτοδυναμική δράση ενάντια στον καρκίνο του δέρματος και συγκεκριμένα στα A431 κύτταρα.
- Ο εγκλεισμός της στις φυσικές και χημικά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες, β-CD, γ-CD, HP-β-CD και Me-β-CD, βελτιώνει την υδατοδιαλυτότητά της μειώνοντας σημαντικά την τάση προς συσσωμάτωση. Ο εγκλεισμός της δεν προκαλεί αλλοίωση των φωτοφυσικών

χαρακτηριστικών της ενώ αντίθετα ενισχύει την παραγωγή ελευθέρων ριζών, βελτιώνοντας έτσι το φωτοδυναμικό της αποτέλεσμα.

- Τα σύμπλοκα εγκλεισμού της φθαλοκυανίνης με την SiCl₂Pc, εμφανίζουν ισχυρότερη φωτοδυναμική δράση από την ελεύθερη φθαλοκυανίνη.
- iv. To inverse dose dependent photodynamic effect που εμφάνισαν οι δύο φωτοευαισθητοποιητές SiCl₂Pc-β-CD και SiCl₂Pc-HP-β-CD θα μπορούσε να περιορίσει την παρατεταμένη φωτοευαισθησία που παρατηρείται έπειτα από κάθε θεραπεία και αποτελεί το βασικό μειονέκτημα της φωτοδυναμικής θεραπείας.
- Και οι πέντε φωτοευαισθητοποιητές εκπέμπουν επαρκή φθορισμό στην ορατή περιοχή του φάσματος. Η ιδιότητά τους αυτή τους καθιστά χρήσιμους και για φωτοδυναμική διάγνωση.

KAINOTOMIA KAI ПРООПТІКН

Η SiCl₂Pc, αν και λόγω της χημικής δομής μπορεί να έχει σημαντικά φωτοδυναμικά αποτελέσματα, εμφανίζει έντονη υδροφοβικότητα, με αποτέλεσμα η φωτοδυναμική της δράση να έχει μείνει ανεξερεύνητη όλα αυτά τα χρόνια. Η μη αξιολόγησή της ως φωτοευαισθητοποιητή αποτελεί σημαντικό έλλειμα στην βιβλιογραφία για την φωτοδυναμική δράση των φθαλοκυανίνων πυριτίου. Καθώς η SiCl₂Pc χρησιμοποιείται και ως πρόδρομη ουσία για τη δημιουργία φωτοευαισθητοποιητών, η παρούσα διατριβή με τα αποτελέσματα της συμβάλλει σημαντικά στην γνώση της φωτοδυναμικής δράσης των φθαλοκυανινών πυριτίου.

Η βελτίωση της φωτοδυναμικής της δράσης αποτέλεσε τον κύριο στόχο της παρούσας διατριβής. Για την επίτευξη του σκοπού αυτό επιλέχθηκε καινοτόμος μεθοδολογία όπως ο εγκλεισμός της σε νανοσωματίδια μεταφοράς και συγκεκριμένα στις κυκλοδεξτρίνες. Οι κυκλοδεξτρίνες, κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες γνωστοί για την ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με υδρόφοβα μόρια, επιλέχθηκαν για την ικανότητά τους να βελτιώνουν τη διαλυτότητα και να ενισχύουν τη βιοδιαθεσιμότητα του φωτοευαισθητοποιητή. Αυτή είναι η πρώτη φορά που κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται για την ενθυλάκωση της SiCl₂Pc, σηματοδοτώντας μια πρωτοποριακή στρατηγική για τη βελτίωση της απόδοσής της στην PDT. Ο επιτυχής εγκλεισμός της SiCl₂Pc οδήγησε στην υπέρβαση εμποδίου της υδροφοβικότητας που ιστορικά εμπόδιζε τη μελέτη και την εφαρμογή της SiCl₂Pc στη φωτοδυναμική θεραπεία.

Η παρούσα ερευνητική μελέτη αυτή συμβάλλει στην ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών για τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας και της αποτελεσματικότητας των υδρόφοβων φωτοευαισθητοποιητών, επεκτείνοντας τη χρήση των φθαλοκυανινών στη φωτοδυναμική θεραπεία. Ξεπερνώντας τις προκλήσεις διαλυτότητας και συσσωμάτωσης της SiCl₂Pc μέσω του εγκλεισμού της στις κυκλοδεξτρίνες, στόχος ήταν η δημιουργία μιας νέας κατηγορίας αποτελεσματικών φωτοευαισθητοποιητών με τόσο στην Φωτοδυναμική θεραπεία όσο και στην φωτοδυναμική διάγνωση.

Επιπλέον, δεν έχουν προηγηθεί μελέτες που να διερευνούν τις επιδράσεις της SiCl₂Pc στην καρκινική σειρά A431. Τα κύτταρα A431 είναι ιδιαίτερα σημαντικά στην έρευνα για τον καρκίνο λόγω της υπερέκφρασης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), μιας πρωτεΐνης που διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο σε πολλά είδη καρκίνου. Η υπερέκφραση του EGFR συνδέεται συχνά με αυξημένη ανάπτυξη του όγκου, διεισδυτικότητα και αντίσταση στη θεραπεία.

Συνεπώς, τα κύτταρα A431 χρησιμεύουν ως ένα εξαιρετικό μοντέλο για τη δοκιμή της αποτελεσματικότητας της φωτοδυναμικής θεραπείας σε ένα ευρύ φάσμα τύπων καρκίνου και την αξιολόγηση της φωτοδυναμικής δράσης της SiCl₂Pc.

Τα ερευνητικά αποτελέσματα θα μπορούσαν να ανοίξουν το δρόμο για την περαιτέρω διερεύνηση της φωτοδυναμικής δράσης παρόμοιων παραγώγων της φθαλοκυανίνης πυριτίου. Ακόμα οι κυκλοδεξτρίνες ως νανοσωματίδια μεταφοράς, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και για άλλα υδρόφοβα μόρια που δεν έχουν ακόμη μελετηθεί ως φωτοευαισθητοποιητές λόγω παρόμοιων προκλήσεων διαλυτότητας.

Επιπλέον, σημαντικό βήμα-στόχο θα μπορούσε να αποτελέσει η μελέτη της επιλεκτικότητας της SiCl₂Pc στα υγιή κύτταρα καθώς και ο υπολογισμός του χρόνου αποδέσμευσής της αυτά. Στη συνέχεια αναγκαίο είναι να ακολουθήσουν μελέτες in vivo καθώς κρίνεται απαραίτητη η εύρεση και βελτιστοποίηση των κατάλληλων παραμέτρων της μεθόδου (δόση φωτοευαισθητοποιητή, χρόνος επώασης, χρόνος και δόση ακτινοβόλησης) ώστε να προκύψουν τα μέγιστα δυνατά αποτελέσματα στους ζωντανούς οργανισμούς. Τέλος, έμφαση πρέπει να δωθεί στην μελέτη της παραμένουσας φωτοευαισθησίας στα ζώα καθώς αυτή αποτελεί το κυριότερο μειονέκτημα της μεθόδου.

ПАРАРТНМА

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται οι μετρήσεις DLS για τα τέσσερα σύμπλοκα εγκλεισμού της φθαλοκυανίνης SiCl₂Pc με τις κυκλοδεξτρίνες.



SiCl2Pc-β-CD (μέγεθος υδροδυναμικής διαμέτρου & PDI)





SiCl₂Pc-β-CD (ζ-δυναμικό)









SiCl2Pc-HP-β-CD (μέγεθος υδροδυναμικής διαμέτρου & PDI)







SiCl₂Pc-HP-β-CD (ζ-δυναμικό)







SiCl2Pc-Me-β-CD (μέγεθος υδροδυναμικής διαμέτρου & PDI)















SiCl2Pc-γ-CD (μέγεθος υδροδυναμικής διαμέτρου & PDI)













ΒΙΒΛΙΟΦΡΑΦΙΑ

- 1. A. Grzybowski, J. Sak, and J. Pawlikowski, "A brief report on the history of phototherapy," *Clin. Dermatol*, vol. 34, no. 5, pp. 532-537, 2016. doi: 10.1016/j.clindermatol.2016.05.002.
- 2. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, and M. Reed, "The history of photodetection and photodynamic therapy," vol. 74, 2001.
- 3. A. Liebert and H. Kiat, "The history of light therapy in hospital physiotherapy and medicine with emphasis on Australia: Evolution into novel areas of practice," *Physiother. Theory Pract.*, vol. 37, no. 3, pp. 389-400, 2021. doi: 10.1080/09593985.2021.1887060.
- 4. M. D. Yaqoob, L. Xu, C. Li, M. M. L. Leong, and D. D. Xu, "Targeting mitochondria for cancer photodynamic therapy," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 38, p. 102830, 2022. doi: 10.1016/J.PDPDT.2022.102830.
- 5. M. A. F. Pinto, C. B. R. Ferreira, B. E. S. de Lima, et al., "Effects of 5-ALA mediated photodynamic therapy in oral cancer stem cells," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 235, p. 112552, 2022. doi: 10.1016/J.JPHOTOBIOL.2022.112552.
- 6. F. Adnane, E. El-Zayat, and H. M. Fahmy, "The combinational application of photodynamic therapy and nanotechnology in skin cancer treatment: A review," *Tissue Cell*, vol. 77, p. 101856, 2022. doi: 10.1016/J.TICE.2022.101856.
- K. Hatz, U. Schneider, B. Henrich, B. Braun, S. Sacu, and C. Prünte, "Comparing ranibizumab monotherapy and combination with single photodynamic therapy in wet AMD: Retreatment and morphologic results," *Eur. J. Ophthalmol.*, vol. 27, no. 4, pp. 470-475, 2017. doi: 10.5301/ejo.5000886.
- 8. Y. Gao, T. Yu, Y. Zhang, and G. Dang, "Anti-VEGF monotherapy versus photodynamic therapy and anti-VEGF combination treatment for neovascular age-related macular degeneration: A meta-analysis," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 59, no. 10, pp. 4307-4317, 2018. doi: 10.1167/iovs.17-23747.
- 9. M. Yoshida, A. Oishi, M. Miyake, et al., "Rescue photodynamic therapy for age-related macular degeneration refractory to anti-vascular endothelial growth factor monotherapy," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 38, p. 102745, 2022. doi: 10.1016/J.PDPDT.2022.102745.
- 10. K. Wojewoda, M. Gillstedt, J. Tovi, et al., "Optimizing treatment of acne with photodynamic therapy (PDT) to achieve long-term remission and reduce side effects. A
prospective randomized controlled trial," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 223, 2021. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112299.

- 11. Y. Wang, S. Fu, Y. Lu, et al., "Chitosan/hyaluronan nanogels co-delivering methotrexate and 5-aminolevulinic acid: A combined chemo-photodynamic therapy for psoriasis," *Carbohydr. Polym.*, vol. 277, 2022. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118819.
- M. H. Lin, J. Y. Y. Lee, S. C. Pan, and T. W. Wong, "Enhancing wound healing in recalcitrant leg ulcers with aminolevulinic acid-mediated antimicrobial photodynamic therapy," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 33, 2021. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.102149.
- 13. P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, *et al.*, "Photodynamic therapy of cancer: An update," *CA Cancer J. Clin.*, vol. 61, no. 4, pp. 250-281, 2011. doi: 10.3322/caac.20114.
- A. F. Dos Santos, D. R. Q. De Almeida, L. F. Terra, M. S. Baptista, and L. Labriola, "Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review," *J. Cancer Metastasis Treat.*, 2019. doi: 10.20517/2394-4722.2018.83.
- G. Gunaydin, M. E. Gedik, and S. Ayan, "Photodynamic therapy for the treatment and diagnosis of cancer–A review of the current clinical status," *Front. Chem.*, vol. 9, 2021. doi: 10.3389/fchem.2021.686303.
- 16. R. Bonnett, Chemical Aspects of Photodynamic Therapy, 1st ed., *CRC Press*, 2021. doi: 10.1201/9781482296952.
- 17. G. Gunaydin, M. E. Gedik, and S. Ayan, "Photodynamic therapy—Current limitations and novel approaches," *Front. Chem.*, vol. 9, 2021. doi: 10.3389/fchem.2021.691697.
- Ł. Szymański, M. Ciepielak, A. Cios, M. Palusińska, W. Stankiewicz, and S. Lewicki, "Effects of 445 nm, 520 nm, and 638 nm laser irradiation on the dermal cells," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 21, p. 11605, Oct. 2021. doi: 10.3390/ijms222111605.
- 19. K. Alhallak, D. Omran, S. Tomi, and A. Abdulhafid, "Skin, light and their interactions, an in-depth review for modern light-based skin therapies," *J. Clin. Dermatol. Ther.*, vol. 7, p. 081, 2021.
- 20. H. Kolárová, D. Ditrichová, and J. Wagner, "Penetration of the laser light into the skin in vitro," *Lasers Surg. Med.*, vol. 24, pp. 231-235, 1999.
- 21. J. N. Pozner, J. L. Cohen, J. Burns, B. E. DiBernardo, L. S. Bass, *et al.*, "State of laser resurfacing 2021: A roundtable discussion," *Dermatol. Rev.*, vol. 2, pp. 34-46, 2020.

- A. Cios, M. Ciepielak, Ł. Szymański, A. Lewicka, S. Cierniak, W. Stankiewicz, M. Mendrycka, and S. Lewicki, "Effect of different wavelengths of laser irradiation on the skin cells," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, p. 2437, 2021.
- 23. S. Kaneko, "Safety guidelines for diagnostic and therapeutic laser applications in the neurosurgical field," *Laser Ther.*, vol. 21, p. 129, 2012.
- 24. Α. Πετρή, "Διερεύνηση μηχανισμών συνδυαστικής δράσης φωτός, φωτοευαίσθητων ουσιών & αντιοξειδωτικών σε μοντέλα νεοπλασιών με ανάπτυξη οπτικών μεθόδων," Διδακτορική διατριβή, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2013.
- 25. K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berr, and T. Kiesslich, "Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects," *Lasers Med. Sci.*, vol. 24, pp. 259–268, 2009.
- 26. P. N. Prasad, Introduction to Biophotonics, Wiley, Hoboken, 2003.
- 27. W. M. Sharman, C. M. Allen, and J. E. van Lier, "Role of activated oxygen species in photodynamic therapy," *Methods Enzymol.*, vol. 319, pp. 376-400, 2000.
- W. M. Sharman, C. M. Allen, and J. E. van Lier, "Role of activated oxygen species in photodynamic therapy," *Methods Enzymol.*, vol. 319, pp. 376-400, 2000. doi: 10.1016/s0076-6879(00)19037-8.
- 29. K. Plaetzer, T. Kiesslich, T. Verwanger, and B. Krammer, "The modes of cell death induced by PDT: An overview," *Med. Laser Appl.*, vol. 18, pp. 7–19, 2003.
- 30. I. J. MacDonald and T. J. Dougherty, "Basic principles of photodynamic therapy," J. *Porphyrins Phthalocyanines*, vol. 5, pp. 105–129, 2001.
- 31. K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, and T. Kiesslich, "Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects," *Lasers Med. Sci.*, vol. 24, pp. 259–268, 2009.
- 32. A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, "Mechanisms in photodynamic therapy: Part one photosensitizers, photochemistry and cellular localization," *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, vol. 1, pp. 279–293, 2004.
- 33. M. Ochsner, "Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 39, no. 1, pp. 1-18, 1997.

- 34. E. Buytaert, M. Dewaele, and P. Agostinis, "Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1776, no. 1, pp. 86-107, 2007.
- 35. Y. Allamyradov, J. ben Yosef, B. Annamuradov, M. Ateyeh, C. Street, H. Whipple, and A. O. Er, "Photodynamic therapy review: Past, present, future, opportunities and challenges," *Photochem.*, vol. 4, pp. 434–461, 2024. doi: 10.3390/photochem4040027.
- S. Kylychbekov, Y. Allamyradov, Z. Khuzhakulov, I. Majidov, S. Banga, J. Ben Yosef, L. Duta, and A. O. Er, "Bioactivity and mechanical properties of hydroxyapatite on Ti6Al4V and Si(100) surfaces by pulsed laser deposition," *Coatings*, vol. 13, p. 1681, 2023.
- Z. Khuzhakulov, S. Kylychbekov, Y. Allamyradov, I. Majidov, J. Ben Yosef, A. Y. Er, C. Kitchens, S. Banga, S. Badarudeen, and A. O. Er, "Formation of picosecond laserinduced periodic surface structures on steel for knee arthroplasty prosthetics," *Front. Met. Alloy*, vol. 1, p. 1090104, 2023.
- 38. I. Ilhom, K. Kholikov, P. Li, C. Ottman, D. Sanford, and Z. Thomas, "Scalable patterning using laser-induced shock waves," *Opt. Eng.*, vol. 57, p. 1, 2018.
- 39. M. M. Kim and A. Darafsheh, "Light sources and dosimetry techniques for photodynamic therapy," *Photochem. Photobiol.*, vol. 96, pp. 280–294, 2020.
- 40. J. F. Algorri, J. M. López-Higuera, L. Rodríguez-Cobo, and A. Cobo, "Advanced light source technologies for photodynamic therapy of skin cancer lesions," *Pharmaceutics*, vol. 15, p. 2075, 2023.
- 41. A. Barbora, O. Bohar, A. A. Sivan, E. Magory, A. Nause, and R. Minnes, "Higher pulse frequency of near-infrared laser irradiation increases penetration depth for novel biomedical applications," *PLoS ONE*, vol. 16, p. e0245350, 2021.
- 42. J. Gao, Z. Chen, X. Li, M. Yang, J. Lv, H. Li, and Z. Yuan, "Chemiluminescence in combination with organic photosensitizers: Beyond the light penetration depth limit of photodynamic therapy," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, p. 12556, 2022.
- 43. N. S. Aboelella, C. Brandle, T. Kim, Z.-C. Ding, and G. Zhou, "Oxidative stress in the tumor microenvironment and its relevance to cancer immunotherapy," *Cancers*, vol. 13, p. 986, 2021.
- 44. W. Udomsak, M. Kucinska, J. Pospieszna, H. Dams-Kozlowska, W. Chatuphonprasert, and M. Murias, "Antioxidant enzymes in cancer cells: Their role in photodynamic therapy resistance and potential as targets for improved treatment outcomes," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 25, p. 3164, 2024.

- 45. E. C. Aniogo, B. P. George, and H. Abrahamse, "Molecular effectors of photodynamic therapy-mediated resistance to cancer cells," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, p. 13182, 2021.
- 46. J. P. Tardivo, A. Del Giglio, C. S. De Oliveira, D. S. Gabrielli, H. C. Junqueira, D. B. Tada, D. Severino, R. F. Turchiello, and M. S. Baptista, "Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications," *Photodiagn. Photodyn. Ther*, vol. 2, pp. 175–191, 2005.
- X. Zhao, J. Liu, J. Fan, H. Chao, and X. Peng, "Recent progress in photosensitizers for overcoming the challenges of photodynamic therapy: From molecular design to application," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 50, no. 6, pp. 4185–4219, 2021. doi: 10.1039/d0cs00173b.
- 48. M. Lan, S. Zhao, W. Liu, C. S. Lee, W. Zhang, and P. Wang, "Photosensitizers for photodynamic therapy," *Adv. Healthcare Mater.*, vol. 8, no. 13, 2019. doi: 10.1002/adhm.201900132.
- 49. X. Li, J. F. Lovell, J. Yoon, and X. Chen, "Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 17, no. 11, pp. 657–674, 2020. doi: 10.1038/s41571-020-0410-2.
- 50. R. Baskaran, J. Lee, and S. G. Yang, "Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications," *Biomater. Res.*, vol. 22, 2018. doi: 10.1186/s40824-018-0140-z.
- 51. I. S. Mfouo-Tynga, L. D. Dias, N. M. Inada, and C. Kurachi, "Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review," *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, vol. 34, 2021. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.102091.
- B. Dhaini, P. Arnoux, J. Daouk, F. Lux, O. Tillement, A. Hagège, T. Hamieh, G. Shafirstein, and C. Frochot, "Energy transfer between AGuIX nanoparticles and Photofrin under light or X-ray excitation for PDT applications," *Pharmaceuticals*, vol. 17, p. 1033, 2024. doi: 10.3390/ph17081033.
- 53. J. Kou, D. Dou, and L. Yang, "Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications," *Oncotarget*, vol. 8, no. 46, pp. 81591–81603, Aug. 2017. doi: 10.18632/oncotarget.20189.
- 54. P. C. Lo, M. S. Rodríguez-Morgade, R. K. Pandey, D. K. P. Ng, T. Torres, and F. Dumoulin, "The unique features and promises of phthalocyanines as advanced photosensitizers for photodynamic therapy of cancer," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 49, no. 4, pp. 1041–1056, 2020. doi: 10.1039/c9cs00129h.

- 55. A. M. Oluwajembola, W. D. Cleanclay, A. F. Onyia, B. N. Chikere, S. Zakar, E. Ndifreke, and O. C. De Campos, "Photosensitizers in photodynamic therapy: An advancement in cancer treatment," *Reactions Chem. Eng.*, vol. 10, p. 101715, Aug. 2024, doi: 10.1016/j.rechem.2024.101715.
- 56. L. M. Santos, R. M. Barros, D. P. da Silva Lima, A. M. A. Nunes, M. R. Sato, R. Faccio, B. P. G. de Lima Damasceno, and J. A. Oshiro-Junior, "Prospective application of phthalocyanines in the photodynamic therapy against microorganisms and tumor cells: A mini-review," *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, vol. 32, p. 102032, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.102032.
- P.-C. Lo, M. S. Rodriguez-Morgade, R. Pandey, D. Ng, T. Torres, and F. Dumoulin, "The unique features and promises of phthalocyanines as advanced photosensitisers for photodynamic therapy of cancer," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 49, pp. 4748-4767, 2020, doi: 10.1039/C9CS00129H.
- 58. K. Mitra and M. C. T. Hartman, "Silicon phthalocyanines: synthesis and resurgent applications," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 19, pp. 1168-1190, 2021, doi: 10.1039/D00B02299C.
- 59. C. M. Allen, W. M. Sharman, and J. E. Van Lier, "Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer," *Photochem. Photobiol.*, vol. 70, no. 1, pp. 1-19, 1999.
- C. G. Claessens, U. Hahn, and T. Torres, "Phthalocyanines: From outstanding electronic properties to emerging applications," *Chem. Rec.*, vol. 8, no. 2, pp. 75-97, 2008, doi: 10.1002/tcr.20139.
- 61. E. Halevas, M. Arvanitidou, B. Mavroidi, et al., "A novel curcumin gallium complex as photosensitizer in photodynamic therapy: Synthesis, structural and physicochemical characterization, photophysical properties and in vitro studies against breast cancer cells," *J. Mol. Struct.*, vol. 1240, p. 130485, 2021, doi: 10.1016/j.molstruc.2021.130485.
- 62. A. Verger, N. Brandhonneur, Y. Molard, et al., "From molecules to nanovectors: Current state of the art and applications of photosensitizers in photodynamic therapy," *Int. J. Pharm.*, vol. 604, p. 120763, 2021, doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120763.
- 63. J. Rak, M. Kabesova, J. Benes, P. Pouckova, and D. Vetvicka, "Advances in liposomeencapsulated phthalocyanines for photodynamic therapy," *Life*, vol. 13, no. 2, p. 305, 2023, doi: 10.3390/life13020305.
- 64. H. Nsairat, D. Khater, U. Sayed, F. Odeh, A. Al Bawab, and W. Alshaer, "Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications," *Heliyon*, vol. 8, no. 5, p. e09394, 2022, doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e09394.

- 65. W. Borzęcka, A. Domiński, and M. Kowalczuk, "Recent progress in phthalocyaninepolymeric nanoparticle delivery systems for cancer photodynamic therapy," *Nanomaterials*, vol. 11, no. 9, p. 2426, 2021, doi: 10.3390/nano11092426.
- M. A. Beach, U. Nayanathara, Y. Gao, C. Zhang, Y. Xiong, Y. Wang, and G. K. Such, "Chemical Reviews," *Chem. Rev.*, vol. 124, no. 9, pp. 5505-5616, 2024, doi: 10.1021/acs.chemrev.3c00705.
- L. Shang, X. Zhou, J. Zhang, Y. Shi, and L. Zhong, "Metal nanoparticles for photodynamic therapy: A potential treatment for breast cancer," *Molecules*, vol. 26, no. 21, p. 6532, 2021, doi: 10.3390/molecules26216532.
- 68. S. Mariano, E. Carata, L. Calcagnile, and E. Panzarini, "Recent advances in photodynamic therapy: Metal-based nanoparticles as tools to improve cancer therapy," *Pharmaceutics*, vol. 16, p. 932, 2024, doi: 10.3390/pharmaceutics16070932.
- 69. G. B. P. George, A. Chota, P. Sarbadhikary, and H. Abrahamse, "Fundamentals and applications of metal nanoparticle-enhanced singlet oxygen generation for improved cancer photodynamic therapy," *Front. Chem.*, vol. 10, p. 964674, 2022, doi: 10.3389/fchem.2022.964674.
- A. Karagianni, N. G. Tsierkezos, M. Prato, M. Terrones, and K. V. Kordatos, "Application of carbon-based quantum dots in photodynamic therapy," *Carbon*, vol. 203, pp. 273-310, 2023, doi: 10.1016/J.CARBON.2022.11.026.
- A. F. Burlec, A. Corciova, M. Boev, D. Batir-Marin, C. Mircea, O. Cioanca, G. Danila, M. Danila, A. F. Bucur, and M. Hancianu, "Current overview of metal nanoparticles' synthesis, characterization, and biomedical applications, with a focus on silver and gold nanoparticles," *Pharmaceuticals*, vol. 16, p. 1410, 2023, doi: 10.3390/ph16101410.
- 72. V. Chandrakala, V. Aruna, and G. Angajala, "Review on metal nanoparticles as nanocarriers: current challenges and perspectives in drug delivery systems," *Emergent Mater.*, vol. 5, pp. 1593–1615, 2022, doi: 10.1007/s42247-021-00335-x.
- 73. V. Selvarajan, S. Obuobi, and P. L. Ee, "Silica nanoparticles—A versatile tool for the treatment of bacterial infections," *Front. Chem.*, vol. 8, p. 602, 2020, doi: 10.3389/fchem.2020.00602.
- 74. A. Cid-Samamed, J. Rakmai, J. C. Mejuto, J. Simal-Gandara, and G. Astray, "Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications," *Food Chem.*, vol. 384, p. 132467, 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132467.
- 75. A. Srivastava and J. Hunter, "Reversal of neuromuscular block," *Br. J. Anaesth.*, vol. 103, pp. 115-129, 2009, doi: 10.1093/bja/aep093.

- 76. G. Crini, "Review: A history of cyclodextrins," *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 21, pp. 10940-10975, Nov. 2014, doi: 10.1021/cr500081p.
- P. Jansook, N. Ogawa, and T. Loftsson, "Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications," *Int. J. Pharm.*, vol. 535, no. 1-2, pp. 272-284, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.11.018.
- 78. C. J. Bruns, "Exploring and exploiting the symmetry-breaking effect of cyclodextrins in mechanomolecules," *Symmetry*, vol. 11, no. 10, p. 1249, 2019, doi: 10.3390/sym11101249.
- P. Saokham, C. Muankaew, P. Jansook, and T. Loftsson, "Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes," *Molecules*, vol. 23, no. 5, p. 1161, May 2018, doi: 10.3390/molecules23051161.
- 80. M. E. Davis and M. E. Brewster, "Cyclodextrin-based pharmaceutics: past, present and future," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 3, no. 12, pp. 1023-1035, Dec. 2004, doi: 10.1038/nrd1576.
- B. Tian, D. Xiao, T. Hei, R. Ping, S. Hua, and J. Liu, "The application and prospects of cyclodextrin inclusion complexes and polymers in the food industry: a review," *Polym. Int.*, vol. 69, pp. 597-603, 2020.
- T. Loftsson and M. E. Brewster, "Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency," *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, no. 9, pp. 3019-3032, Sep. 2012, doi: 10.1002/jps.23077.
- M. Kotronia, E. Kavetsou, S. Loupassaki, S. Kikionis, S. Vouyiouka, and A. Detsi, "Encapsulation of oregano (Origanum onites L.) essential oil in β-cyclodextrin (β-CD): Synthesis and characterization of the inclusion complexes," *Bioengineering*, vol. 4, no. 3, p. 74, 2017, doi: 10.3390/bioengineering4030074.
- T. Loftsson and M. E. Brewster, "Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency," *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, no. 9, pp. 3019-3032, Sep. 2012, doi: 10.1002/jps.23077.
- 85. J. U. Lee, S. S. Lee, S. Lee, and H. T. Oh, "Noncovalent complexes of cyclodextrin with small organic molecules: Applications and insights into host–guest interactions in the gas phase and condensed phase," *Molecules*, vol. 25, no. 18, p. 4048, 2020, doi: 10.3390/molecules25184048.
- B. Gidwani and A. Vyas, "A comprehensive review on cyclodextrin-based carriers for delivery of chemotherapeutic cytotoxic anticancer drugs," *Biomed. Res. Int.*, vol. 2015, p. 198268, 2015, doi: 10.1155/2015/198268.

- A. Ben Mihoub, L. Larue, A. Moussaron, Z. Youssef, L. Colombeau, F. Baros, C. Frochot, R. Vanderesse, S. Acherar. "Use of Cyclodextrins in Anticancer Photodynamic Therapy Treatment," *Molecules*. vol 2; 2018, doi: 10.3390/molecules23081936.
- H. Kolarova, J. Macecek, P. Nevrelova, M. Huf, M. Tomecka, R. Bajgar, J. Mosinger, and M. Strnad, "Photodynamic therapy with zinc-tetra(p-sulfophenyl) porphyrin bound to cyclodextrin induces single strand breaks of cellular DNA in G361 melanoma cells," *Toxicol. In Vitro*, vol. 19, pp. 971–974, 2005.

89. X. B. Leng, C. F. Choi, P. C. Lo, and D. K. P. Ng, "Assembling a mixed phthalocyanine-porphyrin array in aqueous media through host-guest interactions," *Org. Lett.*, vol. 9, pp. 231–234, 2007.

- A. R. A. Silva, A. R. Simioni, and A. C. Tedesco, "Photophysical and complexation studies of chloro-aluminum phthalocyanine with β-cyclodextrin and hydroxypropyl-βcyclodextrin," J. Nanosci. Nanotechnol., vol. 11, pp. 4046–4055, 2011.
- 91. S. Lu, Y. J. Ma, H. Y. Xuan, A. Wang, B. Zhao, X. D. Li, J. H. Zhou, Y. Lin, L. Zhou, and S. H. Wei, "A novel assembling complex of hydrophobic phthalocyanine-cyclodextrin: Preparation, characterization, molecular modeling, and in vitro activity," *RSC Adv.*, vol. 4, pp. 59759–59763, 2014.
- S. Lu, A. Wang, Y. J. Ma, H. Y. Xuan, B. Zhao, X. D. Li, J. H. Zhou, L. Zhou, and S. H. Wei, "Cyclodextrin type dependent host-guest interaction mode with phthalocyanine and their influence on photodynamic activity to cancer," *Carbohydr. Polym.*, vol. 148, pp. 236–242, 2016.
- 93. S. Paul, P. W. S. Heng, and L. W. Chan, "pH-dependent complexation of hydroxypropyl-β-cyclodextrin with chlorin e6: Effect on solubility and aggregation in relation to photodynamic efficacy," J. Pharm. Pharmacol., vol. 68, pp. 439–449, 2015.
- 94. I. Yankovsky, E. Bastien, I. Yakavets, I. Khludeyev, H. P. Lassalle, S. Gräfe, L. Bezdetnaya, and V. Zorin, "Inclusion complexation with β-cyclodextrin derivatives alters photodynamic activity and biodistribution of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 91, pp. 172–182, 2016.
- 95. I. Yakavets, I. Yankovsky, M. Millard, L. Lamy, H. P. Lassalle, A. Wiehe, V. Zorin, and L. Bezdetnaya, "The alteration of temoporfin distribution in multicellular tumor spheroids by β-cyclodextrins," *Int. J. Pharm.*, vol. 529, pp. 568–575, 2017.
- 96. E. M. Bruzell, E. Morisbak, and H. H. Tonnesen, "Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 4, pp. 523–530, 2005.

- 97. L. M. Zhang, X. P. Dong, D. Lu, S. H. Liu, D. Ding, D. L. Kong, A. P. Fan, Z. Wang, and Y. J. Zhao, "Controlled ROS production by corannulene: The vehicle makes a difference," *Biomater. Sci.*, vol. 5, pp. 1236–1240, 2017.
- Z. Kejik, T. Briza, J. Kralova, P. Pouckova, A. Kral, P. Martasek, and V. Kral, "Coordination conjugates of therapeutic proteins with drug carriers: A new approach for versatile advanced drug delivery," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 21, pp. 5514–5520, 2011.
- 99. M. Trapani, A. Romeo, T. Parisi, M. T. Sciortino, S. Patane, V. Villari, and A. Mazzaglia, "Supramolecular hybrid assemblies based on gold nanoparticles, amphiphilic cyclodextrin and porphyrins with combined phototherapeutic action," *RSC Adv.*, vol. 3, pp. 5607-5614, 2013.
- Y. Q. Xu, L. Wang, X. Y. Zhu, and C. Q. Wang, "Hierarchical self-assembly of protoporphyrin IX-bridged Janus particles into photoresponsive vesicles," *RSC Adv.*, vol. 6, pp. 31053-31058, 2016.
- 101. S. Bosi, T. Da Ros, G. Spalluto, and M. Prato, "Fullerene derivatives: An attractive tool for biological applications," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 38, pp. 913-923, 2003.
- 102. L. Leclercq, "Interactions between cyclodextrins and cellular components: Towards greener medical applications?," *Beilstein J. Org. Chem.*, vol. 12, pp. 2644-2662, Dec. 7, 2016, doi: 10.3762/bjoc.12.261.
- 103. S. S. Lucky, K. C. Soo, and Y. Zhang, "Nanoparticles in photodynamic therapy," *Chem. Rev.*, vol. 115, no. 4, pp. 1990-2042, 2015, doi: 10.1021/cr5004198.
- 104. W. Zhang, J. Li, W. Zhang, et al., "Novel phthalocyanine and PEG-methacrylates based temperature-responsive polymers for targeted photodynamic therapy," *Polym. Chem.*, vol. 4, no. 3, pp. 782-788, 2013, doi: 10.1039/c2py20668d.
- 105. J. Liu, J. Li, Z. Zhang, et al., "Encapsulation of hydrophobic phthalocyanine with poly(N-isopropylacrylamide)/lipid composite microspheres for thermo-responsive release and photodynamic therapy," *Materials*, vol. 7, no. 5, pp. 3481-3493, 2014, doi: 10.3390/ma7053481.
- 106. L.M. Dias, F. Sharifi, M.J. de Keijzer, et al., "Attritional evaluation of lipophilic and hydrophilic metallated phthalocyanines for oncological photodynamic therapy," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 216, 2021, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112146.
- 107. V.C. Mello, V.H.S. Araújo, K.L.R. de Paiva, et al., "Development of new natural lipid-based nanoparticles loaded with aluminum-phthalocyanine for photodynamic therapy against melanoma," *Nanomaterials*, vol. 12, no. 20, 2022, doi: 10.3390/nano12203547.
- 108. E. Kavetsou, C. Tsoukalas-Koulas, A. Katopodi, A. Kalospyros, E. Alexandratou, and A. Detsi, "Inclusion complexes of magnesium phthalocyanine with cyclodextrins as

potential photosensitizing agents," *Bioengineering*, vol. 10, no. 2, 2023, doi: 10.3390/bioengineering10020244.

- 109. S. B. Carneiro, F. Í. C. Duarte, L. Heimfarth, et al., "Cyclodextrin-drug inclusion complexes: In vivo and in vitro approaches," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 3, p. 642, 2019, doi: 10.3390/ijms20030642.
- 110. Μ. Όξενκιουν-Πετροπούλου, Φυσικές μέθοδοι ανάλυσης: φασματομετρικές μέθοδοι, Συμμετρία, 2012.
- 111. Perkin-Elmer, *Lambda 35 UV/VIS Spectrometer User's Guide*, PerkinElmer Inc., 2003.
- 112. Perkin-Elmer, Lambda 35 UV/VIS Spectrometer UV Winlab Software User's Guide
- 113. Perkin-Elmer, LS 45 Luminescence Spectrometer User's Guide
- 114. Perkin-Elmer, FL Winlab Software User's Guide
- 115. Σχολή ΗΜΜΥ, ΕΜΠ, Εργαστηριακός Οδηγός Μαθήματος «Εισαγωγή στη Βιοφωτονική και Κυτταρική Μηχανική»
- 116. Τμήμα Χημείας MIT, Introductory Training for Bruker Alpha II FTIR, Bruker
- 117. Malvern, Zetasizer Nano Series User Manual. Malvern Instruments Ltd., 2013.
- 118. B. Cheirsilp and J. Rakmai, "Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications," *Biology, Engineering and Medicine*, vol. 2, no. 1, 2017, Art. no. 1000108, doi: 10.15761/bem.1000108.
- 119. E. Kavetsou, C. Tsoukalas-Koulas, A. Katopodi, et al., "Inclusion complexes of magnesium phthalocyanine with cyclodextrins as potential photosensitizing agents," *Bioengineering*, vol. 10, no. 2, 2023, Art. no. 244, doi: 10.3390/bioengineering10020244.
- 120. A. Cid-Samamed, J. Rakmai, J. C. Mejuto, et al., "Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications," *Food Chemistry*, vol. 384, 2022, Art. no. 132467, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132467.
- 121. J. Zhou, J. Jia, J. He, et al., "Cyclodextrin Inclusion Complexes and Their Application in Food Safety Analysis: Recent Developments and Future Prospects," *Foods*, vol. 11, no. 23, 2022, Art. no. 33871, doi: 10.3390/foods11233871.
- 122. W. F. da Silva Júnior, J. G. de Oliveira Pinheiro, C. Moreira, et al., "Alternative Technologies to Improve Solubility and Stability of Poorly Water-Soluble Drugs," in *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*, 2017, pp. 281–305, doi: 10.1016/B978-0-323-52725-5.00015-0.

- 123. T. A. Reis, A. E. Jaculi, R. Ramos, et al., "Combination of cyclodextrin complexation and iontophoresis as a promising strategy for the cutaneous delivery of aluminum-chloride phthalocyanine in photodynamic therapy," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 105056, 2019, doi: 10.1016/j.ejps.2019.105056.
- 124. M. Messner, S. Kurkov, P. Jansook, et al., "Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles," *Int. J. Pharm.*, vol. 387, no. 1-2, pp. 199–208, 2010, doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.11.035.
- 125. P. Saokham, C. Muankaew, P. Jansook, and T. Loftsson, "Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes," *Molecules*, vol. 23, p. 1161, 2018, doi: 10.3390/molecules23051161.
- 126. M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, et al., "Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems," *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 2, p. 57, 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10020057.
- 127. A. R. A. Silva, A. R. Simioni, and A. C. Tedesco, "Photophysical and complexation studies of chloro-aluminum phthalocyanine with beta-cyclodextrin and hydroxypropylbeta-cyclodextrin," *J. Nanoscience Nanotechnology*, vol. 11, no. 5, pp. 4046–4055, 2011, doi: 10.1166/jnn.2011.3823.
- 128. M. M. El-Nahass, K. F. Abd-El-Rahman, A. A. Al-Ghamdi, et al., "Optical properties of thermally evaporated tin-phthalocyanine dichloride thin films, SnPcCl₂," *Physica B: Condens. Matter*, vol. 344, no. 1–4, pp. 398–406, 2004, doi: 10.1016/j.physb.2003.10.019.
- 129. C. A. Lopez, A. H. de Vries, and S. J. Marrink, "Molecular Mechanism of Cyclodextrin Mediated Cholesterol Extraction," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 7, no. 3, p. e1002020, 2011, doi: 10.1371/journal.pcbi.1002020.
- 130. C. I. Nkanga and R. W. M. Krause, "Encapsulation of Isoniazid-conjugated Phthalocyanine-In-Cyclodextrin-In-Liposomes Using Heating Method," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, 2019, Art. no. 47991, doi: 10.1038/s41598-019-47991-y.
- 131. C. C. Jayme, I. R. Calori, and A. C. Tedesco, "Spectroscopic analysis of aluminum chloride phthalocyanine in binary water/ethanol systems for the design of a new drug delivery system for photodynamic therapy cancer treatment," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 153, pp. 178–183, 2016, doi: 10.1016/j.saa.2015.08.027.
- S. Dridi, J. E. Khiari, G. Magna, et al., "Synthesis and Characterization of New-Type Soluble β-Substituted Zinc Phthalocyanine Derivative of Clofoctol," *Molecules*, vol. 28, no. 10, p. 4102, 2023, doi: 10.3390/molecules28104102.

- 133. P. Tau, A. O. Ogunsipe, S. Maree, et al., "Influence of cyclodextrins on the fluorescence, photostability and singlet oxygen quantum yields of zinc phthalocyanine and naphthalocyanine complexes," *J. Porphyrins Phthalocyanines*, vol. 7, pp. 439-446, 2003, doi: 10.1142/S1088424603000562.
- 134. R. Bayrak, H. T. Akçay, M. Pişkin, et al., "Azine-bridged binuclear metallophthalocyanines functioning photophysical and photochemical-responsive," *Dyes and Pigments*, vol. 95, no. 2, pp. 330-337, 2012, doi: 10.1016/j.dyepig.2012.05.010.
- 135. J. Veprek-Siska, E. Schwertnerova, D. M. Wagnerova, et al., "The aggregation and reaction with oxygen of the tetrasodium salt of cobalt phthalocyanine-4,4',4",4"'-tetrasulphonic acid," *Aust. J. Chem.*, vol. 26, no. 2, pp. 319-323, 1971, doi: 10.1071/CH9730319.
- 136. Z. Feng, T. Tang, T. Wu, et al., "Perfecting and extending the near-infrared imaging window," *Light: Sci. Appl.*, vol. 10, no. 1, 2021, doi: 10.1038/s41377-021-00628-0.
- 137. F. Ghani, J. Kristen, and H. Riegler, "Solubility properties of unsubstituted metal phthalocyanines in different types of solvents," *J. Chem. Eng. Data*, vol. 57, no. 2, pp. 439–449, 2012, doi: 10.1021/je2010215.
- 138. K. Boonyarattanakalin, H. Viernstein, P. Wolschann, et al., "Influence of ethanol as a co-solvent in cyclodextrin inclusion complexation: A molecular dynamics study," *Scientia Pharmaceutica*, vol. 83, no. 2, pp. 387–399, 2015, doi: 10.3797/scipharm.1412-08.
- 139. C. Coisne, S. Tilloy, E. Monflier, et al., "Cyclodextrins as emerging therapeutic tools in the treatment of cholesterol-associated vascular and neurodegenerative diseases," *Molecules*, vol. 21, no. 12, p. 1748, 2016, doi: 10.3390/molecules21121748.
- 140. J. Mosinger, V. Kliment, J. Sejbal, et al., "Host-guest complexes of anionic porphyrin sensitizers with cyclodextrins," *J. Porphyrins Phthalocyanines*, vol. 6, pp. 514–526, 2002, doi: 10.1142/S1088424602000646.
- 141. A. Bautista-Sanchez, A. Kasselouri, M. C. Desroches, et al., "Photophysical properties of glucoconjugated chlorins and porphyrins and their associations with cyclodextrins," *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, vol. 81, no. 3, pp. 154–162, 2005, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2005.05.013.
- X. Guo, W. An, S. Shuang, et al., "Study on spectroscopic characterization of mesotetrakis (4-hydroxyphenyl) porphyrin (THPP) in β-cyclodextrin and its derivatives," *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, vol. 173, no. 3, pp. 258–263, 2005, doi: 10.1016/j.jphotochem.2005.04.004.

- 143. G. Zhang, S. Shuang, C. Dong, et al., "Investigation on DNA assembly to neutral red-cyclodextrin complex by molecular spectroscopy," *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, vol. 74, no. 2–3, pp. 127–134, 2004, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2004.03.006.
- 144. S. Bhattacharjee, "DLS and zeta potential What they are and what they are not?" *J. Control. Release*, vol. 235, pp. 337–351, 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- 145. J. Krawinkel, U. Richter, M. L. Torres-Mapa, et al., "Optical and electron microscopy study of laser-based intracellular molecule delivery using peptide-conjugated photodispersible gold nanoparticle agglomerates," *J. Nanobiotechnology*, vol. 14, no. 1, 2016, doi: 10.1186/s12951-015-0155-8.
- Y. Dong, L. Zhou, Z. Shen, et al., "Iodinated cyanine dye-based nanosystem for synergistic phototherapy and hypoxia-activated bioreductive therapy," *Drug Deliv.*, vol. 29, no. 1, pp. 238–253, 2022, doi: 10.1080/10717544.2021.2023701.
- 147. Á. Rusznyák, M. Palicskó, M. Malanga, et al., "Cellular effects of cyclodextrins: Studies on HeLa cells," *Molecules*, vol. 27, no. 5, 2022, doi: 10.3390/molecules27051589.
- 148. J. F. B. Barata, A. Zamarrón, M. G. P. M. S. Neves, et al., "Photodynamic effects induced by meso-tris(pentafluorophenyl)corrole and its cyclodextrin conjugates on cytoskeletal components of HeLa cells," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 92, pp. 135–144, 2015, doi: 10.1016/j.ejmech.2014.12.025.
- 149. F. Derique Leroy-Lechat, D. Wouessidjewe, A. Andreux, et al., "Evaluation of the cytotoxicity of cyclodextrins and hydroxypropylated derivatives," *J. Pharmaceutics*, vol. 101, no. 1-2, pp. 97–103, 1994, doi: 10.1016/0378-5173(94)90080-9.
- 150. S. Lu, Y. J. Ma, H. Y. Xuan, et al., "A novel assembling complex of hydrophobic phthalocyanine-cyclodextrin: Preparation, characterization, molecular modeling, and in vitro activity," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 104, pp. 59759–59763, 2014, doi: 10.1039/c4ra12654h.
- 151. S. Lu, A. Wang, Y. J. Ma, et al., "Cyclodextrin type dependent host-guest interaction mode with phthalocyanine and their influence on photodynamic activity to cancer," *Carbohydr. Polym.*, vol. 148, pp. 236–242, 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.04.062.
- 152. L. M. O. Lourenço, P. M. R. Pereira, E. Maciel, et al., "Amphiphilic phthalocyanine-cyclodextrin conjugates for cancer photodynamic therapy," *Chem. Commun.*, vol. 50, no. 61, pp. 8363–8366, 2014, doi: 10.1039/c4cc02226b.
- 153. K. T. Kazantzis, K. Koutsonikoli, B. Mavroidi, et al., "Curcumin derivatives as photosensitizers in photodynamic therapy: Photophysical properties and in vitro studies with prostate cancer cells," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 19, no. 2, pp. 193–206, 2020, doi: 10.1039/c9pp00375d.

- 154. G. Gunaydin, M. E. Gedik, and S. Ayan, "Photodynamic therapy—current limitations and novel approaches," *Front. Chem.*, vol. 9, 2021, doi: 10.3389/fchem.2021.691697.
- 155. J. A. Rodrigues, R. Amorim, M. Silva, et al., "Photodynamic therapy at low-light fluence rate: In vitro assays on colon cancer cells," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, vol. 25, no. 1, 2019, doi: 10.1109/JSTQE.2018.2889426.
- 156. M. Tanaka, M. Kinoshita, Y. Yoshihara, et al., "Photodynamic therapy using intraarticular photofrin for murine MRSA arthritis: Biphasic light dose response for neutrophilmediated antibacterial effect," *Lasers Surg. Med.*, vol. 43, no. 3, pp. 221-229, 2011, doi: 10.1002/lsm.21037.
- 157. R. Penjweini, H. G. Loew, M. Eisenbauer, et al., "Modifying excitation light dose of novel photosensitizer PVP-Hypericin for photodynamic diagnosis and therapy," *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, vol. 120, pp. 120–129, 2013, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2012.12.013.
- 158. M. Moustakas, "Plant photochemistry, reactive oxygen species, and photoprotection," Photochem., vol. 2, 2021, no. 1, pp. 5 - 8,doi: 10.3390/photochem2010002.
- 159. Z. Hussain, H. E. Thu, M. Amjad, et al., "Exploring recent developments to improve antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial efficacy of curcumin: A review of new trends and future perspectives," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 77, pp. 1316-1326, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.226.
- 160. P. C. Lo, M. S. Rodríguez-Morgade, R. K. Pandey, et al., "The unique features and promises of phthalocyanines as advanced photosensitizers for photodynamic therapy of cancer," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 49, no. 4, pp. 1041-1056, 2020, doi: 10.1039/c9cs00129h.
- 161. M. T. Jarvi, M. S. Patterson, and B. C. Wilson, "Insights into photodynamic therapy dosimetry: simultaneous singlet oxygen luminescence and photosensitizer photobleaching measurements," *Biophys. J.*, vol. 102, no. 3, pp. 661-671, 2012, doi: 10.1016/j.bpj.2011.12.043.
- 162. H. Barr, P. B. Boulos, A. J. Macrobert, et al., "Comparison of lasers for photodynamic therapy with a phthalocyanine photosensitizer," *Lasers Med. Sci.*, vol. 4, pp. 7–12, 1989, doi: 10.1007/BF02032503.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Έγκριτες Δημοσιεύσεις σε Επιστημονικά Περιοδικά:

Georgiopoulou E., Kavetsou E., Alexandratou E., Detsi A., Politopoulos K., «Cyclodextrins as nanocarriers of hydrophobic silicon phthalocyanine dichloride for the enhancement of photodynamic therapy effect». (Accepted 25th November 2024), Journal of Biomedical Applications

Δημοσιεύσεις σε Πρακτικά Συνεδρίων με Κριτές:

Georgiopoulou E., Kavetsou E., Alexandratou E., Detsi A., Politopoulos K. «Comparative characterization of SiCl₂Pc and its cyclodextrin complexes as photosensitizers in photodynamic therapy» Translational Biophotonics: Diagnostics and Therapeutics III Vol. 12627, 1262718, 2023 SPIE \cdot 0277-786X \cdot doi: 10.1117/12.2670864.

Ανακοινώσεις σε Έγκριτα Διεθνή Συνέδρια:

- 1. Georgiopoulou E., Kavetsou E., Alexandratou E., Detsi A., Politopoulos K. «Comparative characterization of SiCl₂Pc and its cyclodextrin complexes as photosensitizers in photodynamic therapy», European Conferences on Biomedical Optics (ECBO): Translational Biophotonics: Diagnostics and Therapeutics, SPIE» Munich, Germany, 2023
- Georgiopoulou E., Kavetsou E., Alexandratou E., Detsi A., Politopoulos K. «Conjugation of Silicon phthalocyanine dichloride with β-cyclodextrin: a promising photosensitizer formulation», 10 th International Conference on Oxidative stress in Skin Medicine and Biology», Andros, Greece, 2022