Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών
Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη Συνδυαστικής Δράσης Φωτοδυναμικής Θεραπείας και Αντιοξειδωτικών σε Καρκίνο του Δέρματος με Χρήση Φωτοφυσικών Μεθόδων

ΜΑΡΙΑΣ ΚΥΡΙΑΖΗ
Διπλωματούχου Χημικού Μηχανικού Ε.Μ.Π.

Επιβλέπουσα: **Διδώ Γιόβα**
Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2007

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών
Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη Συνδυαστικής Δράσης Φωτοδυναμικής Θεραπείας και Αντιοξειδωτικών σε Καρκίνο του Δέρματος με Χρήση Φωτοφυσικών Μεθόδων

ΜΑΡΙΑΣ ΚΥΡΙΑΖΗ

Διπλωματούχου Χημικού Μηχανικού Ε.Μ.Π.

Επιβλέπουσα: **Δρ. Διδώ Γιόβα**

Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2007

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί υποέργο του προγράμματος: «Ηράκλειτος: Υποτροφίες έρευνας με προτεραιότητα στην βασική έρευνα»

Το Πρόγραμμα «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ» συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινοτικό Ταμείο (75%) και από Εθνικούς Πόρους (25%).

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών του ΕΜΠ, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κ. Διδώ Γιόβα. Ένα σημαντικό κομμάτι του πειραματικού μέρους αυτής της εργασίας, το οποίο αφορούσε in vivo και in vitro πειράματα, εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του ΕΚΠΑ. Με αφορμή την ολοκλήρωση αυτής της ερευνητικής εργασίας, αισθάνομαι ότι είναι απαραίτητο να ευχαριστήσω όλους αυτούς, χωρίς τη συμβολή των οποίων η ολοκλήρωση αυτής της διατριβής δε θα ήταν δυνατή.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής κ. Διδώ Γιόβα για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή ενθάρρυνση και εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αυτά τα χρόνια. Αισθάνομαι ιδιαίτερα ευγνώμων, όχι μόνο για τις γνώσεις που απέκτησα στα πεδία της φωτοδυναμικής θεραπείας και διάγνωσης μέσω της διδασκαλίας και των συζητήσεων που είχα μαζί της αλλά και για την επίμονη προσπάθειά της να έρθω σε επαφή και να συνεργαστώ με κορυφαίους Έλληνες και ξένους επιστήμονες που εργάζονται στο συγκεκριμένο ερευνητικό πεδίο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή ΕΜΠ κ. Δημήτριο Διονύσιο Κουτσούρη, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις βασικές γνώσεις Βιοϊατρικής που απέκτησα μέσω των μεταπτυχιακών μαθημάτων του αλλά και για την υποστήριξη καθόλη τη διάρκεια της διατριβής.

Θερμά ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή της Φαρμακευτικής Σχολής του ΕΚΠΑ κ. Μιχαήλ Ράλλη, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την επιμονή του αρχικά να ξεκινήσω τη διατριβή αυτή αλλά και την προσπάθειά του να με γνωρίσει και να με βοηθήσει να ενταχθώ στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του ΕΚΠΑ. Όλα αυτά τα χρόνια στάθηκε δίπλα μου με τις συμβουλές και υποδείξεις του στο δύσκολο πειραματικό βιολογικό μέρος αυτής της εργασίας.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον Καθηγητή της Φαρμακευτικής Σχολής κ. Γεώργιο Παπαϊωάννου και Διευθυντή του Εργαστηρίου Φαρμακευτικής Τεχνολογίας για την τόσο εγκάρδια υποδοχή μου στο εργαστήριο αλλά και την επί επτά χρόνια παραχώρηση εργαστηριακού εξοπλισμού, αναλωσίμων και χώρων απαραίτητων για την εκπόνηση των in vivo και in vitro πειραμάτων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θεωρώ ότι οφείλω στον Καθηγητή της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του ΕΜΠ κ. Κωνσταντίνο Δέρβο και στην Καθηγήτρια της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ κ. Παναγιώτα Βασιλείου με τους οποίους είχα την τύχη να έρθω σε επαφή μέσω των μεταπτυχιακών μαθημάτων αλλά και της διαδικασίας ενδιάμεσης κρίσης της διδακτορικής διατριβής. Οι συμβουλές και υποδείξεις τους ήταν πολύ σημαντικές για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη θα ήθελα επίσης να εκφράσω στο Λέκτορα της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του ΕΜΠ κ. Κωνσταντίνο Πολιτόπουλο, για τη συνεχή βοήθεια του στο σχεδιασμό και ανάπτυξη διατάξεων αλλά και τη συνεισφορά του στην επίλυση οποιουδήποτε τεχνολογικού προβλήματος προέκυψε κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον κ. Σπύρο Λουκά, Ερευνητή του Δημόκριτου ο οποίος με τις συμβουλές του βοήθησε σημαντικά, τόσο στον ορισμό των πρωτοκόλλων φωτοδυναμικής θεραπείας και διάγνωσης, όσο και στην ανάπτυξη του συστήματος οπτικής απεικόνισης ιστών.

Πολύτιμη ήταν όμως και η βοήθεια των νεότερων μελών των δύο προαναφερθέντων εργαστηρίων. Για το λόγο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διδάκτορα ΕΜΠ κ. Ελένη Αλεξανδράτου. Χωρίς τις συμβουλές της θα ήμουν σίγουρα λιγότερο μεθοδική και υπομονετική με όποιες επιπτώσεις συνεπάγεται αυτό σε μία διατριβή που περιλαμβάνει τόσο χρονοβόρα πειραματική εργασία. Θα ήθελα ακόμη να την ευχαριστήσω όπως και τον Υποψήφιο Διδάκτορα κ. Δημήτρη Γκόρπα γιατί με τις ιδέες τους αλλά και την ουσιαστική βοήθεια κατάφερα να ξεπεράσω πολλά από τα πρακτικά, και όχι μόνο, προβλήματα που παρουσιάζονταν κατά τη

διάρκεια των πειραμάτων. Σημαντική ήταν επίσης και η βοήθεια της νέας συναδέλφου κ. Ασπασίας Πετρή στα τελευταία πειραματικά στάδια αυτής της εργασίας και για αυτό και την ευχαριστώ θερμά. Και οι τρεις τους συνέβαλαν στη δημιουργία ενός άριστου κλίματος, γεγονός που διευκόλυνε πάρα πολύ την εκπόνηση αυτής της διατριβής.

Εξίσου σημαντική ήταν και η βοήθεια των Υποψηφίων Διδακτόρων του Εργαστηρίου Φαρμακευτικής Τεχνολογίας. Για αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τις Υποψηφίους Διδάκτορες κ. Παναγούλα Παύλου, κ. Φωτεινή Δανιά, την Διδάκτορα κ. Σοφία Χατζηαντωνίου και τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες κ. Ασημίνα Περάκη και κ. Νινώ Μπαζελίτζε. Εκτός από την πολύτιμη βοήθειά τους στα βιολογικά πειράματα αυτής της εργασίας εξίσου σημαντικό ήταν το ευχάριστο και εγκάρδιο κλίμα που δημιουργούσαν στο εργαστήριο.

Εκπόνηση όμως διδακτορικής διατριβής, για εμένα τουλάχιστον, δε συνεπάγεται μόνο εμβάθυνση στο συγκεκριμένο επιστημονικό πεδίο και παραγωγή νέας γνώσης. Ήταν μία πορεία κατά τη διάρκεια της οποίας είχα την ευλογία να γνωρίσω, να δουλέψω και να ταξιδέψω με πραγματικά αξιόλογους συναδέλφους. Όλοι, εκτός από πολύτιμοι συνάδελφοι και καθηγητές, στάθηκαν δίπλα μου και πραγματικοί φίλοι βοηθώντας όχι μόνο να ξεπεράσω προβλήματα σχετικά με τη διδακτορική διατριβή αλλά και πολύ πιο σημαντικά προβλήματα όπως προβλήματα υγείας, τόσο δικά μου όσο και μελών της οικογένειάς μου, καθώς και την όλη ψυχολογική επιβάρυνση που αυτά συνεπάγονταν. Για το λόγο αυτό θερμά ευχαριστώ τη Διδώ, τον Κώστα, την Ελένη, το Δημήτρη, την Ασπασία, τη Γιούλα, τη Φωτεινή, τη Μίνα και το Μιχάλη.

Δε θα μπορούσα να μην πω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου αλλά και στα αδέρφια μου (τα οποία ελάχιστα διαφέρουν από δεύτερους γονείς για εμένα) για την αγάπη τους και την κάθε είδους υποστήριξη που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον σύντροφό μου Δημήτριο Κορρέ γιατί χωρίς την επιμονή του δε θα είχα ξεκινήσει ούτε ολοκληρώσει αυτή τη διατριβή, για τις ώρες που πέρασε προσπαθώντας να με βοηθήσει κατά την εκπόνησή της, αλλά και γιατί ξεχωριστή αξία προσδίδεται στα όνειρά σου το να βιώνεις την πραγματοποίηση τους με κάποιον που πιστεύει τόσο σε εσένα.

Περιεχόμενα

Πρόλογος **i**

Περιεχόμενα **v**

Κατάλογος Πινάκων **xi**

Κατάλογος Σχημάτων **xiii**

Κατάλογος Εικόνων **xix**

Περίληψη **xxi**

Abstract **xxv**

Κεφάλαιο 1 Φωτοδυναμική θεραπεία **1**

1.1. Εισαγωγή 1

1.2. Μηχανισμοί φωτοδυναμικής θεραπείας 3

1.2.1. Φαινόμενα που ακολουθούν την απορρόφηση φωτός από χρωμοφόρα μόρια 3

1.2.2. Βασικές φωτοφυσικές παράμετροι φωτοευαισθητοποιητών 7

1.2.3. Φωτοχημικές αντιδράσεις 9

1.3. Φωτοευαισθητοποιητές 11

1.3.1. Βασικά χαρακτηριστικά φωτοευαισθητοποιητών 11

1.3.2. Ομάδες φωτοευαισθητοποιητών 12

1.3.2.1 Ομάδα πορφυρινών 14

1.3.2.2. Ομάδα χλωρινών 17

1.3.2.3 Ομάδα χρωστικών 18

1.3.3. Βιολογικές διεργασίες που προηγούνται της απορρόφησης του μορίου του φωτοευαισθητοποιητή από τα κύτταρα 19

1.3.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την ενδοκυττάρια κατανομή των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή 20
1.3.5. Μηχανισμοί νέκρωσης των καρκινικών ιστών 21
1.3.5.1 Απόπτωση ή νέκρωση των καρκινικών κυττάρων 21
1.3.5.2 Βλάβες στο αγγειακό δίκτυο των καρκινικών ιστών 24
1.3.5.3 Ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος 25
1.4. Βιβλιογραφία 25

Κεφάλαιο 2 Διαγνωστικά συστήματα φασματοσκοπίας φθορισμού 29
2.1. Εισαγωγή 29
2.2. Το φαινόμενο του φθορισμού 30
2.2.1. Ιστορικά στοιχεία 30
2.2.2. Φάσματα διέγερσης και εκπομπής 31
2.2.3. Διάρκεια ζωής φθορισμού 32
2.2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την ένταση φθορισμού 33
2.3. Διαγνωστικές μέθοδοι φασματοσκοπίας φθορισμού 33
2.3.1. Ενδογενή φθορίζοντα μόρια 34
2.3.2. Εξωγενή φθορίζοντα μόρια 36
2.3.3. Περιορισμοί των διαγνωστικών μεθόδων φθορισμού 37
2.3.4. Σημειακά συστήματα καταγραφής φθορισμού 38
2.3.5. Επεξεργασία σήματος σημειακών συστημάτων καταγραφής φθορισμού 41

Κεφάλαιο 3 Συστήματα lasers στη φωτοδυναμική θεραπεία 45
3.1. Εισαγωγή 45
3.2. Lasers 46
3.2.1. Ιστορικά στοιχεία 46
3.2.2. Αρχή λειτουργίας των lasers 47
3.2.3. Συστήματα lasers που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία 51
3.2.3.1. Lasers ιόντων αργού 51
3.2.3.2. Lasers χρωστικών αντλούμενα από lasers αργού 52
3.2.3.3. Lasers ατμών μετάλλων 53
3.2.3.4. Lasers στερεάς κατάστασης Nd:YAG 53
3.2.3.5. Lasers χρωστικών αντλούμενα από laser ατμών 54
3.2.3.6. Διοδικά lasers 54
3.3. Πηγές μη σύμφωνου ορατού φωτός 58

3.4. Διατάξεις μεταφοράς φωτεινής ακτινοβολίας στη φωτοδυναμική θεραπεία 60
3.4.1. Διατάξεις για επίπεδη επιφανειακή ακτινοβόληση 60
3.4.2. Διατάξεις για επίπεδη κυλινδρική ακτινοβόληση 61
3.4.3. Διατάξεις για ενδοϊστική ακτινοβόληση 62
3.5. Βιβλιογραφία 62

Κεφάλαιο 4 Φωτοδιάγνωση και φωτοδυναμική θεραπεία μη μελανωματικών δερματικών καρκινικών όγκων 63
4.1. Εισαγωγή 63
4.2. Η δομή του δέρματος 64
4.2.1. Επιδερμικά κύτταρα 64
4.2.2. Η δομή της επιδερμίδας 65
4.2.3. Χόριο ή κυρίως δέρμα 66
4.2.4. Αγγεία και νεύρα του δέρματος 67
4.3. Καρκίνος του δέρματος 67
4.3.1. Ακτινική κεράτωση 69
4.3.2. Βασικοκυτταρικός καρκίνος 69
4.3.3. Ακανθοκυτταρικός καρκίνος 71
4.3.4. Ασθένεια Bowen's 71
4.4. Διάγνωση μη μελανωματικών καρκίνων του δέρματος με φασματοσκοπία φθορισμού 72
4.4.1. Ενδογενή χρωμοφόρα του δέρματος 73
4.4.2. Φωτοδυναμική διάγνωση 73
4.4.3. Βάθος διείσδυσης ακτινοβολίας διέγερσης 75
4.4.4. Ανάλυση και επεξεργασία φασμάτων φθορισμού 76
4.4.4.1 Ανάλυση φασμάτων αυτοφθορισμού 76
4.4.4.2 Ανάλυση φασμάτων φθορισμού φωτοευαισθητοποιητών 78
4.4.4.3 Επεξεργασία φασμάτων 78
4.5. Φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνου του δέρματος 81
4.5.1. Τοπική φωτοδυναμική θεραπεία 82
4.5.2. Τοπική φωτοδυναμική θεραπεία με ALA και παράγωγά του 82
4.5.3. Τοπική φωτοδυναμική θεραπεία με 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ) -2,3 διυδροπορφυρίνη 83
4.5.4. Τοπική φωτοδυναμική θεραπεία με μεταλλοφθαλοκυανίνες 84
4.6. Βιβλιογραφία 86

Κεφάλαιο 5 Αντιοξειδωτική και προ-οξειδωτική δράση πολυφαινολικών ενώσεων 89
5.1. Ελεύθερες Ρίζες 89
5.1.1. Ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών 90
5.1.2. Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών 92
5.2. Οξειδωτικό στρες και καρκινογένεση 92
5.2.1. Συμμετοχή ελευθέρων ριζών στα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης 92
5.2.2. Το μόριο του δεσοξυριβοζο-νουκλεϊνικού οξέος (DNA) 94
5.2.3. Καρκινογόνες βλάβες στο DNA από ελεύθερες ρίζες 95
5.3. Αντιοξειδωτικές ενώσεις και καρκίνος 96
5.3.1. Φλαβονοειδή 96
5.3.2. Δομή φλαβονοειδών 97
5.3.3. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί φλαβονοειδών 98
5.3.4. Προ-οξειδωτικοί μηχανισμοί φλαβονοειδών 100
5.4. Επίδραση αντιοξειδωτικών ενώσεων στη θεραπεία καρκίνου 102
5.4.1. Οξειδοαναγωγική κατάσταση υγιών και καρκινικών κυττάρων 102
5.4.2. Επίδραση αντιοξειδωτικών ενώσεων στη θεραπεία καρκίνου 103
5.4.2.1. Φωτοδυναμική θεραπεία και αντιοξειδωτικά σε αντιοξειδωτικές δόσεις 103
5.4.2.2. Φωτοδυναμική θεραπεία και αντιοξειδωτικά σε αντιοξειδωτικές δόσεις 104
5.5. Βιβλιογραφία 105

Κεφάλαιο 6 Ανάπτυξη μεθόδων και συστημάτων 107
6.1. Εισαγωγή 107
6.2. Φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού 111
6.2.1. Περιγραφή 111
6.2.2. Διαχείρηση σήματος 114
6.3. Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης 114
6.3.1. Περιγραφή 114
6.3.2. Λογισμικό επεξεργασίας σήματος 116
6.4. Λογισμικό επεξεργασίας σήματος 117
6.5. Περιγραφή συστημάτων laser για φωτοδυναμική θεραπεία 120
6.6. In vivo μοντέλα μελέτης μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος 124
6.6.1. Μοντέλα μυών για τη μελέτη δερματικού καρκίνου 124
6.6.2. Επαγωγή όγκων με UV ακτινοβολία σε μύες τύπου SKH-HR1 και SKH-HR2 126

6.6.3. Επαγωγή όγκων με UV ακτινοβολία και διμεθυλ-βενζ-ανθρακένιο σε μύες τύπου SKH-HR1 και SKH-HR2 127
6.7. Ανάπτυξη διαγνωστικής μεθόδου μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων 128
6.8. Μέθοδος μελέτης φωτολεύκανσης φωτοευαισθητοποιητών 130
6.9. Φαρμακοκινητικές μελέτες φωτοευαισθητοποιητών 131
6.9.1. Ανάπτυξη μεθόδου ex vivo φαρμακοκινητικής μελέτης φωτοευαισθητοποιητών 132
6.9.2. Ανάπτυξη μεθόδου μελέτης βάθους διείσδυσης φωτοευαισθητοποιητή σε ιστούς 133
6.10. Ανάπτυξη πρωτοκόλλου φωτοδυναμικής θεραπείας μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος 134
6.11. In vivo μελέτη προστατευτικής δράσης εκχυλίσματος φλοιού του πεύκου Maritima από καρκινογόνους παράγοντες μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος 136
6.11.1. Αντιοξειδωτική δράση εκχυλίσματος φλοιού του πεύκου Maritima 136
6.11.2. Μεθοδολογία μελέτης 136
6.12. Βιβλιογραφία 139

Κεφάλαιο 7 Αποτελέσματα και συμπεράσματα 143
7.1. Αποτελέσματα διαγνωστικής μεθόδου αυτοφθορισμού μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων 143
7.1.1. Φάσματα διέγερσης και εκπομπής υγιούς δέρματος και μη μελανωματικών καρκινωμάτων 143
7.1.2. Εξαγωγή λόγων εντάσεων αυτοφθορισμού 150
7.1.3. Στατιστική επεξεργασία λόγων εντάσεων αυτοφθορισμού 152
7.1.3.1. Έλεγχος ισότητας διακυμάνσεων 153
7.1.3.2. Έλεγχος μέσων τιμών 154
7.1.3.3. Εύρεση τιμών κατωφλίωσης 155
7.1.3.4. Ακρίβεια ταξινόμησης των δειγμάτων βάσει των λόγων εντάσεων αυτοφθορισμού 156
7.1.4. Συμπεράσματα 158
7.2. Αποτελέσματα φωτοφυσικών μελετών φωτοευαισθητοποιητών 159
7.2.1. Φάσματα απορρόφησης φωτοευαισθητοποιητών 159
7.2.2. Συμπεράσματα που προκύπτουν από τα φάσματα απορρόφησης των φωτοευαισθητοποιητών 162
7.2.3. Φάσματα φθορισμού φωτοευαισθητοποιητών 163

7.2.4. Συμπεράσματα που προκύπτουν από τα φάσματα φθορισμού των φωτοευαισθητοποιητών 166
7.2.5. Φωτολεύκανση φωτοευαισθητοποιητών 166
7.2.6. Συμπεράσματα που προκύπτουν από τη μελέτη φωτολεύκανσης των φωτοευαισθητοποιητών 173
7.3. Αποτελέσματα ex vivo φαρμακοκινητικών μελετών φωτοευαισθητοποιητών 173
7.3.1. Φαρμακοκινητικές μελέτες χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης 173
7.3.2. Βάθος διείσδυσης AlClPc σε δερματικούς ιστούς 175
7.3.3. Φαρμακοκινητικές μελέτες 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ) -2,3 διυδροπορφυρίνης 177
7.3.4. Συμπεράσματα 177
7.4. Αποτελέσματα φωτοδυναμικής θεραπείας μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων 178
7.4.1. Φωτοδυναμική θεραπεία με χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη 178
7.4.2. Φωτοδυναμική θεραπεία με 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ) -2,3 διυδροπορφυρίνη 186
7.4.3. Συμπεράσματα 188
7.5. Αντιοξειδωτική δράση εκχυλίσματος φλοιού πεύκου 189
7.5.1. In vivo αποτελέσματα προστατευτικής δράσης εκχυλίσματος φλοιού πεύκου από καρκινογόνους παράγοντες 189
7.5.2. Συμπεράσματα 199
7.6. Συνεργειακή δράση φωτοδυναμικής θεραπείας-εκχυλίσματος 199
7.6.1. Αποτελέσματα 199
7.6.2. Συμπεράσματα 200

Κεφάλαιο 8 Συζήτηση Αποτελεσμάτων 203
8.1. Διαγνωστική μέθοδος αυτοφθορισμού μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων 203
8.2. Τοπική φωτοδυναμική θεραπεία μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων 206
8.3. Πρόληψη μη μελανωματικού δερματικού καρκίνου με χρήση αντιοξειδωτικών 212
8.4. Συνεργειακή δράση φωτοδυναμικής θεραπείας και μίγματος αντιοξειδωτικών 214
8.5. Προοπτικές 216
8.6. Βιβλιογραφία 217

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1:	*Γεγονότα σταθμοί στην ιστορία και εξέλιξη της φωτοδυναμικής θεραπεία*	2
Πίνακας 1.2:	*Ομάδες φωτοευαισθητοποιητών*	13
Πίνακας 2.1:	*Ενδογενή φθορίζοντα μόρια*	35
Πίνακας 3.1:	*Ιδιότητες των lasers που χρησιμοποιήθηκαν και χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία*	59
Πίνακας 4.1:	*Ενδογενή χρωμοφόρα*	74
Πίνακας 6.1:	*Τεχνικά χαρακτηριστικά της ψυχόμενης CCD κάμερας*	*119*
Πίνακας 6.2:	*Τεχνικά χαρακτηριστικά συστήματος φωτισμού*	*119*
Πίνακας 6.3:	*Χαρακτηριστικά διοδικού laser στα 661 nm*	*122*
Πίνακας 6.4:	*Χαρακτηριστικά διοδικού laser στα 670 nm*	*123*
Πίνακας 6.5:	*Χαρακτηριστικά ενεργόμετρου*	*125*
Πίνακας 6.6:	*Βασικά χαρακτηριστικά οπτικής ίνας*	*125*
Πίνακας 6.7:	*Χαρακτηριστικά διοδικού laser 652 nm*	*125*
Πίνακας 6.8:	*Περιεκτικότητα μετάλλων στην Πυκνογενόλη*	*138*
Πίνακας 6.9:	*Ομάδες ζώων in vivo μελέτη προστατευτικής δράσης εκχυλίσματος φλοιού πεύκου από καρκινογόνους παράγοντες*	*140*
Πίνακας 7.1:	*Παράμετροι F-test για τους λόγους εντάσεων*	154
Πίνακας 7.2:	*Υπολογισμός της παραμέτρου t για κάθε λόγο εντάσεων βάσει των τιμών κοινής διασποράς*	154
Πίνακας 7.3:	*Υπολογισμός των συντελεστών α0 και α1 καθώς και της διαχωριστικής τιμής x για κάθε λόγο εντάσεων*	155
Πίνακας 7.4:	*Παράμετροι αξιολόγησης των διαγνωστικών λόγων*	158
Πίνακας 7.5:	*Χαρακτηριστικά μεγέθη του όγκου πριν τη φωτοδυναμική θεραπεία*	180
Πίνακας 7.6:	*Χαρακτηριστικά μεγέθη της πληγής 4 ημέρες μετά τη φωτοδυναμική Θεραπεία*	180

Πίνακας 7.7: *Ομάδες ζώων και θεραπευτικές παράμετροι* 181
Πίνακας 7.8: *Πλήρης ίαση κατά τη διάρκεια της θεραπείας* 181
Πίνακας 7.9: *Μέση τιμή και τυπική απόκλιση αύξησης του όγκου, t για Bonferoni t-test για κάθε πειραματική ομάδα* 182
Πίνακας 7.10: *Ομάδες ζώων και θεραπευτικές παράμετροι* 186
Πίνακας 7.11: *Πλήρης ίαση κατά τη διάρκεια της θεραπείας* 186
Πίνακας 7.12: *Πλήρης ίαση κατά τη διάρκεια της θεραπείας* 200

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1.1:	*Στάδια φωτοδυναμικής θεραπείας*	1
Σχήμα 1.2:	*Διάγραμμα Jablonski*	4
Σχήμα 1.3:	*Κατανομή των ηλεκτρονίων του φωτοευαισθητοποιητή κατά τη διάρκεια παραμονής του σε διεγερμένες καταστάσεις*	6
Σχήμα 1.4:	*Οπτικό παράθυρο δερματικών ιστών*	8
Σχήμα 1.5:	*Αντιδράσεις που ακολουθούν τη διέγερση του μορίου του φωτοευαισθητοποιητή*	9
Σχήμα 1.6:	*(α) Δομή πορφυρινών, (β) Photofrin*	14
Σχήμα 1.7:	*Παραγωγή PpIX από ALA*	16
Σχήμα 1.8:	*Δομή m-THPC*	17
Σχήμα 1.9:	*Δομή (α) Φθαλοκυανίνης, (β) Σουλφωνομένης Φθαλοκυανίνης (γ) Μεταλλοφθαλοκυανίνης*	18
Σχήμα 1.10:	*Μηχανισμοί νέκρωσης καρκινικών ιστών*	22
Σχήμα 2.1:	*Παρατήρηση Stokes*	31
Σχήμα 2.2:	*Κατοπτρικά φάσματα διέγερσης – εκπομπής, Stokes' shift*	32
Σχήμα 2.3:	*Σχηματικό διάγραμμα ενός σημειακού συστήματος καταγραφής φθορισμού*	39
Σχήμα 3.1:	*Σχηματικό διάγραμμα αυθόρμητης εκπομπής ακτινοβολίας κατά τη μετάπτωση από μία υψηλότερη σε μία χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη*	47
Σχήμα 3.2:	*Σχηματικό διάγραμμα εξαναγκασμένης εκπομπής ακτινοβολίας μετά την απορρόφηση ενός φωτονίου ενέργειας ίσης με την ενεργειακή των δύο σταθμών.*	48
Σχήμα 3.3:	*Σχηματικό διάγραμμα μετάβασης σε ανώτερη ενεργειακά στάθμη μετά από απορρόφηση ενός φωτονίου*	48
Σχήμα 3.4:	*Ενεργειακό διάγραμμα laser τριών ενεργειακών επιπέδων*	49
Σχήμα 3.5:	*Ενεργειακό διάγραμμα laser τεσσάρων ενεργειακών επιπέδων*	50

Σχήμα 3.6: *Σχηματικό διάγραμμα ενεργειακών ζωνών των ηλεκτρονίων μονωτών, αγωγών και ημιαγωγών.* 56
Σχήμα 3.7: *Αρχή λειτουργίας ενός laser ημιαγωγού επαφής p-n με (α) μηδενική πόλωση και (β) ορθή πόλωση* 57
Σχήμα 4.1: *Δομή του δέρματος* 63
Σχήμα 4.2: *Διαφοροποίηση κερατινοκυττάρων* 66
Σχήμα 4.3: *Βάθος διείσδυσης φωτεινής ακτινοβολίας στο δέρμα* 76
Σχήμα 4.4: *Φάσμα εκπομπής φθορισμού και βασικά εξαγόμενα ποσοτικά χαρακτηριστικά* 79
Σχήμα 4.5: *Διάγραμμα σκέδασης ιστολογικών κατηγοριών* 80
Σχήμα 5.1: *Αντιδράσεις μετατροπής μοριακού οξυγόνου σε ενεργά οξυγονούχα είδη* 92
Σχήμα 5.2: *Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών στην πολυσταδιακή καρκινογένεση* 93
Σχήμα 5.3: *Οι δύο πουρίνες που παίρνουν μέρος στο σχηματισμό του DNA θυμίνη (Τ) και κυτοσίνη (C)* 94
Σχήμα 5.4: *Οι δύο πυριμιδίνες που παίρνουν μέρος στο σχηματισμό του DNA αδενίνη (Α) και γουανίνη (G)* 95
Σχήμα 5.5: *Γενική δομή φλαβονεοειδών* 97
Σχήμα 5.6: *Δομή κατηγοριών φλαβονεοειδών* 98
Σχήμα 5.7: *Αντιδράσεις σταθεροποίησης ελευθέρων ριζών από φλαβονοειδή* 99
Σχήμα 5.8: *Πιθανές θέσεις πρόσδεσης μεταλλικών ιόντων στο μόριο φλαβονοειδούς* 100
Σχήμα 5.9: *Προ-οξειδωτικές αντιδράσεις φλαβονοειδών με φαινολική δομή στο δακτύλιο Β* 101
Σχήμα 5.10: *Προ-οξειδωτικές αντιδράσεις φλαβονοειδών με κατεχολική δομή στο δακτύλιο Β* 102
Σχήμα 6.1: *Οπτικό διάγραμμα διέγερσης και συλλογής φθορισμού* *113*
Σχήμα 6.2: *Ενεργειακή φασματική κατανομή πηγής ξένου* *114*
Σχήμα 6.3: *Οπτικό διάγραμμα φασματοφωτομετρικής διάταξης απορρόφησης* *117*
Σχήμα 6.4: *Διάγραμμα βαθμονόμησης του διοδικού laser 661 nm (15°C)* *123*
Σχήμα 6.5: *Διάγραμμα βαθμονόμησης του διοδικού laser 670 nm* *124*
Σχήμα 6.6: *Δομή μονομερούς* *137*
Σχήμα 6.7: *Δομή διμερούς* *138*
Σχήμα 6.8: *Δομή ολιγομερούς* *138*
Σχήμα 7.1: *Φάσμα διέγερσης υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος με λ_{em} 350 nm* *144*
Σχήμα 7.2: *Φάσματα εκπομπής υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος με λ_{exc} 298 nm* *144*
Σχήμα 7.3: *Φάσμα διέγερσης υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος με λ_{em} 395 nm* *145*
Σχήμα 7.4: *Φάσμα εκπομπής υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος με λ_{exc} 335 nm* *146*
Σχήμα 7.5: *Φάσματα διέγερσης υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος με λem 445 nm* *147*
Σχήμα 7.6: *Φάσματα εκπομπής υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος με λexc 365 nm* *147*
Σχήμα 7.7: *Φάσματα διέγερσης υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος*

	με λem 490 nm	*148*
Σχήμα 7.8:	*Φάσματα διέγερσης υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος με λem 610 nm*	*149*
Σχήμα 7.9:	*Φάσματα εκπομπής υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος με λexc 410 nm*	*149*
Σχήμα 7.10:	*Συνοπτικό διάγραμμα κατανομής της μέσης τιμής των λόγων έντασης φθορισμού για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες*	*151*
Σχήμα 7.11:	*Συνοπτικό διάγραμμα κατανομής της μέσης τιμής των λόγων έντασης φθορισμού για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες*	*152*
Σχήμα 7.12:	*Διάγραμμα σκέδασης λόγου εντάσεων F1 για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες*	*156*
Σχήμα 7.13:	*Διάγραμμα σκέδασης λόγου εντάσεων F10 για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες*	*156*
Σχήμα 7.14:	*Διάγραμμα σκέδασης λόγου εντάσεων F13 για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες*	*157*
Σχήμα 7.15:	*Διάγραμμα σκέδασης λόγου εντάσεων F17 για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες*	*157*
Σχήμα 7.16:	*Διάγραμμα σκέδασης λόγου εντάσεων F18 για τις δύο ιστολογικές Κατηγορίες*	*158*
Σχήμα 7.17:	*Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων AlClPc σε DMSO*	*161*
Σχήμα 7.18:	*Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων m-THPC σε DMSO*	*161*
Σχήμα 7.19:	*Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων m-THPC και AlClPc συγκέντρωσης 10^{-7} M σε DMSO*	*162*
Σχήμα 7.20:	*Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων AlClPc συγκέντρωσης 5×10^{-6} M σε DMSO, EtOH και H_2O*	*162*
Σχήμα 7.21:	*Φάσματα έντασης φθορισμού AlClPc σε DMSO με διέγερση στα 611 nm*	*164*
Σχήμα 7.22:	*Φάσματα έντασης φθορισμού m-THPC σε DMSO με διέγερση στα 420 nm*	*165*
Σχήμα 7.23:	*Διάγραμμα συγκέντρωσης-φθορισμού της AlClPc στα 680 nm με διέγερση στα 420 nm*	*165*
Σχήμα 7.24:	*Διάγραμμα συγκέντρωσης-φθορισμού της m-THPC στα 652 nm με διέγερση στα 420 nm*	*166*
Σχήμα 7.25:	*Διάγραμμα απορρόφησης-δόσης ενέργειας διαλύματος AlClPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6} M. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 661 nm (25 mW/cm^2)*	*167*
Σχήμα 7.26:	*Διάγραμμα φθορισμού-δόσης ενέργειας AlClPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6}M. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 661 nm (25 mW/cm^2)*	*167*
Σχήμα 7.27:	*Διάγραμμα απορρόφησης-δόσης ενέργειας διαλύματος AlClPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6} M. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 670 nm (50 mW/cm^2)*	*168*
Σχήμα 7.28:	*Διάγραμμα φθορισμού-δόσης ενέργειας διαλύματος AlClPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6} M. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 670 nm (50 mW/cm^2)*	*168*
Σχήμα 7.29:	*Διάγραμμα απορρόφησης-δόσης ενέργειας διαλύματος AlClPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6} M. Ακτινοβόληση με διοδικό*	

laser 670 nm (75 mW/cm^2) *169*

Σχήμα 7.30: *Διάγραμμα φθορισμού-δόσης ενέργειας διαλύματος AlClPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6} Μ. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 670 nm (75 mW/cm^2)* *169*

Σχήμα 7.31: *Διάγραμμα απορρόφησης-δόσης ενέργειας διαλύματος AlClPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6} Μ. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 670 nm (100 mW/cm^2)* *170*

Σχήμα 7.32: *Διάγραμμα φθορισμού-δόσης ενέργειας διαλύματος AlClPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6} Μ. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 670 nm (100 mW/cm^2)* *170*

Σχήμα 7.33: *Διάγραμμα απορρόφησης (420 nm)-δόσης ενέργειας διαλύματος m-THPC σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6}Μ. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 652 nm (50 mW/cm^2)* *171*

Σχήμα 7.34: *Διάγραμμα απορρόφησης (652 nm)-δόσης ενέργειας διαλύματος m-THPC σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6}Μ. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 652 nm (50 mW/cm^2)* *172*

Σχήμα 7.35: *Διάγραμμα φθορισμού-δόσης ενέργειας διαλύματος m-THPC σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6}Μ. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 652 nm (50 mW/cm^2)* *172*

Σχήμα 7.36: *Συγκέντρωση AlClPc σε καρκινικούς και υγιείς ιστούς σε σχέση με το χρόνο μετά την επάλειψη* *174*

Σχήμα 7.37: *Λόγος συγκέντρωσης AlClPc σε καρκινικούς/υγιείς ιστούς σε σχέση με το χρόνο* *183*

Σχήμα 7.38: *Αύξηση του όγκου των όχι πλήρως θεραπευμένων καρκινωμάτων μετά το τέλος της θεραπείας* *183*

Σχήμα 7.39: *Εμφάνιση πρώτων θηλωμάτων σε αρσενικούς μύες SKH-HR1 και SKH-HR2, που υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία και διμεθυλβενζανθρακένιο* *192*

Σχήμα 7.40: *Εμφάνιση πρώτων θηλωμάτων σε θηλυκούς μύες SKH-HR1 και SKH-HR2, που υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία και διμεθυλβενζανθρακένιο* *192*

Σχήμα 7.41: *Εμφάνιση πρώτων θηλωμάτων σε αρσενικούς μύες SKH-HR1 και SKH-HR2, που υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία* *193*

Σχήμα 7.42: *Εμφάνιση πρώτων θηλωμάτων σε θηλυκούς μύες SKH-HR1 και SKH-HR2, που υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία* *194*

Σχήμα 7.43: *Ποσοστό των μυών που υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με διμεθυλβενζανθρακένιο και υπεριώδη ακτινοβολία και εμφάνισαν καρκινώματα* *195*

Σχήμα 7.44: *Ποσοστό των μυών που υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία και εμφάνισαν καρκινώματα* *195*

Σχήμα 7.45: *Μέσος αριθμός όγκων ανά μυ. Όλοι οι μύες έχουν υποβληθεί σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με διμεθυλβενζανθρακένιο και*

υπεριώδη ακτινοβολία *196*

Σχήμα 7.46: *Μέσος αριθμός όγκων ανά μυ. Όλοι οι μύες έχουν υποβληθεί σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία* *196*

Σχήμα 7.47: *Ο μέσος χρόνος ζωής μυών που έχουν υποβληθεί σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με διμεθυλβενζανθρακένιο και υπεριώδη ακτινοβολία* *197*

Σχήμα 7.48: *Ο μέσος χρόνος ζωής μυών που έχουν υποβληθεί σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία* *198*

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 4.1:	*Οζώδες και ελκωτικό βασικοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής*	71
Εικόνα 4.2:	*Ακανθοκυτταρικά καρκινώματα κεφαλής*	72
Εικόνα 6.1:	*Απεικονιστική διάταξη, σύστημα ακτινοβόλησης και διοδικό laser 661 nm*	120
Εικόνα 6.2:	*Διοδικά lasers 670 και 652 nm*	125
Εικόνα 6.3:	*Θηλυκός SKH-HR1 μυς 4 μήνες μετά τη λήξη του πρωτοκόλλου επαγωγής καρκίνου με UV ακτινοβολία*	128
Εικόνα 6.4:	*Αρσενικός SKH-HR1 μυς ένα μήνα μετά τη λήξη του πρωτοκόλλου επαγωγής καρκίνου με συνδυασμό UV ακτινοβολίας και εφαρμογής DMBA*	129
Εικόνα 7.1:	*Τυπική σειρά εικόνων υγιούς δέρματος οι οποίες έχουν ληφθεί με συνεστιακό μικροσκόπιο 1 h μετά την επάλειψη με AlClPc: (α) 0, (β) 20, (γ) 40 και (δ) 60 μm από την επιφάνεια του δέρματος*	175
Εικόνα 7.2:	*Εικόνα κάθετης τομής μη μελανωματικού δερματικού καρκινώματος η οποία έχει ληφθεί 1 h μετά την επάλειψη με AlClPc.*	*176*
Εικόνα 7.3:	*Εικόνες όγκου πριν τη φωτοδυναμική θεραπεία*	*179*
Εικόνα 7.4:	*Εικόνες όγκου 4 ημέρες μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία*	*179*
Εικόνα 7.5:	*Εικόνες όγκου 7 ημέρες μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία*	*179*
Εικόνα 7.6:	*Χρονική εξέλιξη πλήρως θεραπευμένου δερματικού ακανθοκυτταρικού καρκινώματος με χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη*	*184*
Εικόνα 7.7:	*Χρονική εξέλιξη δερματικού ακανθοκυτταρικού καρκινώματος το οποίο δε δέχθηκε καμία θεραπεία ή φροντίδα*	*185*
Εικόνα 7.8:	*Χρονική εξέλιξη πλήρως θεραπευμένων δερματικών ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων με m-THPC*	*187*
Εικόνα 7.9:	*Μύες ίδιας ηλικίας οι οποίοι υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία*	*190*
Εικόνα 7.10:	*Μύες ίδιας ηλικίας οι οποίοι υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία και διμεθυλβενζανθρακένιο*	*191*

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η ανάπτυξη συστήματος τοπικής φωτοδυναμικής θεραπείας με φθαλοκυανίνες μη μελανωματικών δερματικών καρκινικών όγκων και η περαιτέρω βελτίωση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων του συστήματος αυτού μέσω παράλληλης χορήγησης αντιοξειδωτικών. Το αντικειμένου της διατριβής αναπτύσσεται σε τέσσερεις τομείς.

Αρχικά, επιδιώχθηκε να αναπτυχθούν in vivo μοντέλα μη μελανωματικού καρκίνου αλλά και υγιούς δέρματος, τα οποία φαινοτυπικά θα παρουσίαζαν σημαντικές ομοιότητες με το ανθρώπινο δέρμα. Σε τέτοια μοντέλα μπορούν να μελετηθούν προληπτικές, διαγνωστικές, θεραπευτικές μέθοδοι καθώς και οι μηχανισμοί δράσης τους και τα αποτελέσματα να αξιοποιηθούν σε κλινικό επίπεδο (στάδια κλινικών μελετών). Στα πλαίσια αυτών των μελετών επελέγησαν μοντέλα άτριχων μυών με και χωρίς μελανίνη και αναπτύχθηκαν δύο μεθοδολογίες επαγωγής μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος (με UV ακτινοβολία και με συνδυαστική δράση UV ακτινοβολίας και καρκινογενούς χημικής ένωσης).

Εν συνεχεία, αναπτύχθηκε μη επεμβατική οπτική διαγνωστική μέθοδος, η οποία βασίζεται σε φασματοσκοπική διάταξη φθορισμού. Η μέθοδος αυτή συνεισφέρει στην έγκαιρη διάγνωση μη μελανωματικού δερματικού καρκίνου αλλά και ελαχιστοποιεί τους κινδύνους που συνεπάγεται η λήψη επαναλαμβανομένων βιοψιών για υποτροπή του καρκινώματος (η βιοψία μέχρι σήμερα θεωρείται η μέθοδος με τα πιο αξιόπιστα αποτελέσματα). Ταυτόχρονα αναπτύχθηκαν διαγνωστικοί αλγόριθμοι για την κατηγοριοποίηση μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων και υγιών δερματικών ιστών με ποσοστά επιτυχίας μεγαλύτερα από αυτά της βιοψίας και σε πραγματικό χρόνο.

Ένας άλλος στόχος της παρούσας έρευνας ήταν η ανάπτυξη θεραπευτικού συστήματος τοπικής φωτοδυναμικής θεραπείας (φωτοευαισθητοποιητής-ακτινοβολητική διάταξη-πρωτόκολλο) με εξειδικευμένα χαρακτηριστικά. Για το λόγο αυτό επελέγη ένας φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς, η χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη και μελετήθηκαν οι φωτοφυσικές ιδιότητές της και συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης η οποία έχει ήδη εγκριθεί και θεωρείται από τους πλέον ενδεδειγμένους φωτοευαισθητοποιητές. Ακολούθως, παρασκευάστηκε ειδικό σκεύασμα φωτοευαισθητοποιητή κατάλληλο για τοπική χορήγηση και μελετήθηκε φαρμακοκινητικά. Για τις μελέτες αυτές αναπτύχθηκαν μεθοδολογίες αλλά και διατάξεις κατάλληλες για την εξαγωγή των φασματοφωτομετρικών χαρακτηριστικών ιστών και διαλυμάτων.

Παράλληλα, σχεδιάστηκαν και αναπτύχθηκαν σύστημα ακτινοβόλησης και διάταξη οπτικής ψηφιακής απεικόνισης δερματικών όγκων. Το σύστημα ακτινοβόλησης αποτελείται από ένα διοδικό laser νέας γενιάς, υψηλής ισχύος 1W και μήκους κύματος 670 nm το οποίο συνδέεται με συστήματα μεταφοράς και διάχυσης της οπτικής ακτινοβολίας. Μέσω της διάταξης οπτικής απεικόνισης ιστών καθίσταται δυνατή η απεικόνιση των όγκων αλλά και η καταγραφή βασικών γεωμετρικών χαρακτηριστικών των όγκων κρίσιμων για την παρακολούθηση της εξέλιξης της θεραπείας. Η διάταξη οπτικής απεικόνισης δερματικών όγκων αποτελείται από μία CCD κάμερα, στερεοτακτικές διατάξεις και κατάλληλο λογισμικό λήψης και επεξεργασίας των εικόνων.

Ακόμη, μελετήθηκε η δράση φυσικού πολυφαινολικού εκχυλίσματος (πλούσιου σε αντιοξειδωτικές ιδιότητες). Διαπιστώθηκε ότι όταν το μίγμα αυτό χορηγηθεί σε μικρές συγκεντρώσεις, σε in vivo μοντέλα μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος, παρουσιάζει αντιοξειδωτική, αντιγηραντική και αντικαρκινική δράση. Η δράση αυτή αντιστρέφεται όταν χορηγηθεί τοπικά σε υψηλές δόσεις (προ-οξειδωτική). Λόγω αυτών των αποτελεσμάτων εξετάστηκε η πιθανότητα συνεργειακής δράσης του μίγματος αντιοξειδωτικών (σε προ-οξειδωτικές δόσεις) με τη φωτοδυναμική θεραπεία. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις αντίστοιχες μελέτες ενισχύουν τη θεωρία συνεργειακής δράσης αντιοξειδωτικών σε προ-οξειδωτικές δόσεις και θεραπειών που δρουν μέσω μηχανισμών ελευθέρων ριζών.

Τα αποτελέσματα όλων των προαναφερθέντων μελετών επεξεργάστηκαν θεωρητικά, στατιστικά και συγκρίθηκαν με αποτελέσματα παρόμοιων ερευνών τα οποία παρουσιάζονται στη διεθνή βιβλιογραφία. Βάσει των συμπερασμάτων που εξάγονται από αυτή τη θεωρητική μελέτη προκύπτει ότι η διατριβή αυτή

συνεισφέρει σημαντικά στη βελτιστοποίηση της τοπικής φωτοδυναμικής θεραπείας μη μελανωματικού καρκίνου, στην έγκαιρη και ασφαλή διάγνωση του αλλά και στην παραγωγή νέας γνώσης και κατανόησης μηχανισμών προ-οξειδωτικής / αντιοξειδωτικής δράσης μιας από τις σημαντικότερες ομάδες αντιοξειδωτικών, των πολυφαινολών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι πρωτότυπα διεθνώς και μπορούν εκτός από τη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων της φωτοδυναμικής θεραπείας να συνεισφέρουν και στη βελτιστοποίηση των κλασικών θεραπειών του καρκίνου που δρουν μέσω μηχανισμών ελευθέρων ριζών.

Abstract

The aim of the present thesis is the development of a topical non melanoma skin carcinomas photodynamic therapy system, and the further improvement of its results with parallel administration of antioxidants. The thesis consists of four sections.

Firstly, non melanoma skin carcinomas and healthy skin animal models, which present high phenotypic similarity with human skin, were developed. In such models, preventive, diagnostic and therapeutic methodologies and their mechanisms can be studied. In addition, their results can be exploited to clinical level (clinical studies). Thus, two models of hairless mice with and without melanin were chosen and two methodologies of non melanoma skin cancer initiation (with UV radiation and combination of UV radiation with carcinogenic chemical substance) were developed.

Then, a non invasive diagnostic method, which is based on fluorescence spectroscopy, was developed. This method contributes to the early diagnosis of non melanoma skin cancer and minimizes the danger of tumor injuring due to repeated biopsies (biopsy is considered the cold standard). In parallel, diagnostic algorithms for the categorization of healthy skin and non melanoma skin carcinomas, with higher accuracy than biopsy and in real time, were developed.

Another task of this research is the development of a system for topical photodynamic therapy (photosensitizer-irradiation-protocol) with specific characteristics. For this reason, a second generation photosensitizer, chloro-aluminum phthalocyanine, was chosen. Its photophysical properties were studied and compared with those of 5,10,15,20-tetra (3-hydroxyphenyl) -2,3,

dihydropoprhyrin which is already used in clinical practice and is considered one of the most efficient photosensitizers. A special formulation of photosensitizer for topical application was synthesized and its pharmacokinetics were studied. For these studies appropriate methodologies and devices, for the extraction of tissues and solutions spectroscopic characteristics, were developed.

Furthermore, an irradiation system for photodynamic therapy and a system for digital imaging of skin tumors were designed and developed. The irradiation system is consisted of a new generation diode laser of high power (1 W) emitting at 670 nm and a system for the delivery and diffusion of radiation. By using digital imaging system the basic geometrical characteristics of tumors can be recorded for the follow up during the therapy. This system consists of a CCD camera, stereotactic devices and appropriate software for image acquisition and processing.

Moreover, the activity of a physical polyphenolic extract (rich in antioxidant properties) was studied. From these studies it was found that this antioxidant mixture presents antioxidant, antiageing and anticancer action when administrated at low doses. This action is inverted when it was administrated at higher doses (pro-oxidant). Thus, the possible synergetic action of antioxidants (at pro-oxidant doses) with photodynamic therapy was investigated. The results obtained from these studies support the theory of synergestic action of antioxidants (in pro-oxidant doses) with the cancer therapies which are based on free radicals mechanisms.

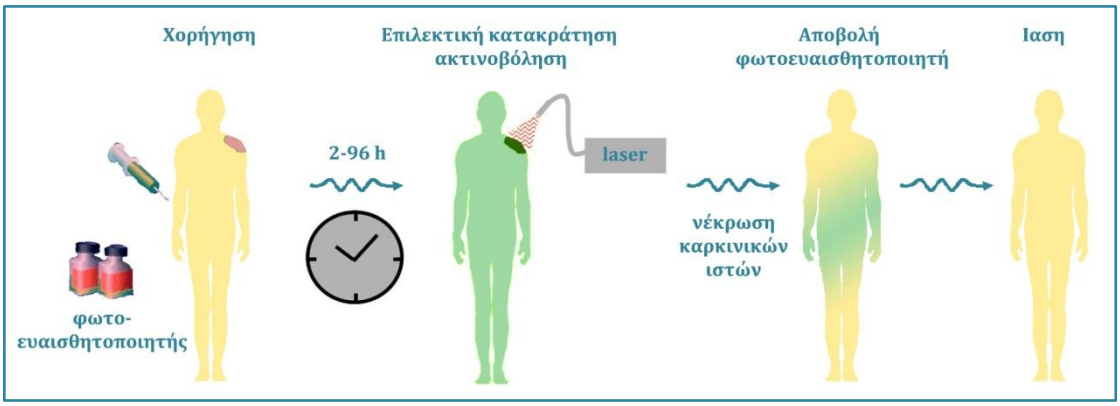
The results were processed theoretically, statistically and compared with the results of relevant studies as these are presented in the international literature. This thesis contributes significantly to the improvement of topical photodynamic therapy of non melanoma skin cancer, to the safe and on time diagnosis of non melanoma skin carcinomas and to the production of new knowledge and understanding of pro-oxidant and antioxidant mechanisms of action of a very important antioxidant substances group, polyphenolics. The results of the thesis can also contribute to the improvement of traditional cancer therapies which act through free radical mechanisms.

Κεφάλαιο 1

Φωτοδυναμική Θεραπεία

1.1. Εισαγωγή

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μία μη επεμβατική, σχετικά σύγχρονη μέθοδος, πολλά υποσχόμενη για τη θεραπεία κυρίως καρκινικών όγκων. Η θεραπεία αυτή βασίζεται στην επίδραση τριών παραγόντων: φωτός, μιας φωτοευαίσθητης ουσίας και οξυγόνου. Τριών παραγόντων που από μόνοι τους και στις δόσεις στις οποίες χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία δεν μπορούν να προκαλέσουν καμία βλάβη σε καρκινικά ή υγιή κύτταρα, η συνδυασμένη όμως δράση τους επιφέρει τη νέκρωσή των καρκινικών ιστών [1-3].



Σχήμα 1.1: *Στάδια φωτοδυναμικής θεραπείας*

Η φωτοδυναμική θεραπεία θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μία διαδικασία πέντε σταδίων. Αρχικά η φωτοευαίσθητη ουσία - ένα εξωγενές χρωμοφόρο - χορηγείται

Πίνακας 1.1: *Γεγονότα σταθμοί στην ιστορία και εξέλιξη της φωτοδυναμικής θεραπείας*[4-8]

Αίγυπτος	Συνδυασμός βοτάνων και ηλιακής ακτινοβολίας για τη θεραπεία δερματικών παθήσεων
Ινδιάνοι	Συνδυασμός ψωραλενίων (φυτικής προέλευσης) και ηλιακής ακτινοβολίας για τη θεραπεία λεύκης.
Oscar Raab (Μόναχο 1900)	Νέκρωση πρωτοζώων τα οποία προκαλούσαν ελονοσία με συνδυασμό ακριδίνης και φωτός.
Von Tappeiner-Jesionek (1903)	Πρώτη εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας σε άνθρωπο για τη θεραπεία δερματικού καρκίνου. Ιοσίνη-φως.
Hausman (1908)	Καταγραφή φωτοδυναμικών ιδιοτήτων αιματοπορφυρίνης σε ζώα και ερυθροκύτταρα.
Meyer Betz (Γερμανία 1913)	Χορήγηση αιματοπορφυρίνης και καταγραφή της φωτοευαισθησίας που παρουσιάστηκε μετά από έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία.
Lipson, Winkelman, Schwartz (1957)	Δημοσίευση εργασιών που αφορούσαν τον επιλεκτικό εντοπισμό της αιματοπορφυρίνης σε καρκινικούς και γενικά πάσχοντες ιστούς.
Ομάδα του Roswell Park Cancer Institute (1970-1980)	Θεραπεία δερματικών καρκίνων και καρκίνων του στήθους, με χρήση παραγώγου αιματοπορφυρίνης και λαμπτήρα τόξου ξένου εφοδιασμένο με κατάλληλα φίλτρα ώστε να εκπέμπεται κόκκινο φως.
1981	Μεταβίβαση των δικαιωμάτων της ευρεσιτεχνίας του «καθαρού» παραγώγου αιματοπορφυρίνης από το Roswell Park Cancer Institute στην Oncology Research and Development. Ευρεία κυκλοφορία αυτού του σκευάσματος με την εμπορική ονομασία Photofrin.
1985	Μεταβίβαση των δικαιωμάτων από την Oncology Research and Development στην Johnson & Johnson. Έναρξη διαδικασιών απόκτησης έγκρισης για χρήση στην ιατρική πρακτική.
1993	Έγκριση πρωτοκόλλων φωτοδυναμικής θεραπείας καρκίνου της ουροδόχου κύστης από το Υπουργείο Υγείας του Καναδά.
1995	Έγκριση από τον FDA πρωτοκόλλων για χρήση της Photofrin σε καρκίνο του οισοφάγου.
1995	Έγκριση από τον FDA πρωτοκόλλων θεραπείας Ακτινικής Κεράτωσης με 5-ALA
Levy, van den Bergh, Birngruber, Gragoudas, Hassan, Miller, Schmidt-Erfurth (1999)	Έγκριση από τον FDA πρωτοκόλλων φωτοδυναμικής θεραπείας με Verteporfin, Visudyne® για τη θεραπεία εκφύλισης της ωχράς κηλίδας
2001	Έγκριση πρωτοκόλλων χρήσης Foscan για θεραπεία Ακανθοκυτταρτικού καρκίνου Κεφαλής Τραχήλου από την Ευρωπαϊκή Ένωση, τη Νορβηγία και την Ιρλανδία.
6/2001-4/2003	Έγκριση από 17 Ευρωπαϊκές χώρες της χρήσης πρωτοκόλλων μεθυλεστέρα του αμινολεβουλινικού οξέος (MAL cream) σε Βασικοκυτταρικό καρκίνο του δέρματος και Ακτινική Κεράτωση

στον ασθενή. Η χορήγηση είναι συνήθως συστηματική αν και σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να είναι τοπική (επάλειψη ή μικροέγχυση στον όγκο). Μετά την πάροδο κατάλληλου χρονικού διαστήματος ο φωτοευαισθητοποιητής κατακρατείται επιλεκτικά από τους καρκινικούς ιστούς. Εν συνεχεία οι πάσχοντες ιστοί ακτινοβολούνται με οπτική ακτινοβολία κατάλληλων φασματικών χαρακτηριστικών. Με αυτόν τον τρόπο προκαλείται ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή η οποία και σημαίνει την έναρξη μιας σειράς φωτοχημικών αντιδράσεων, τα προϊόντα των οποίων προκαλούν σημαντικές βλάβες σε συστατικά, λειτουργίες και δομές των μη υγιών κυττάρων, αλλά και καταστροφή του τοπικού αγγειακού συστήματος οδηγώντας σε νέκρωση τους καρκινικούς ιστούς[2] (Σχήμα 1.1).

1.2. Μηχανισμοί Φωτοδυναμικής Θεραπείας

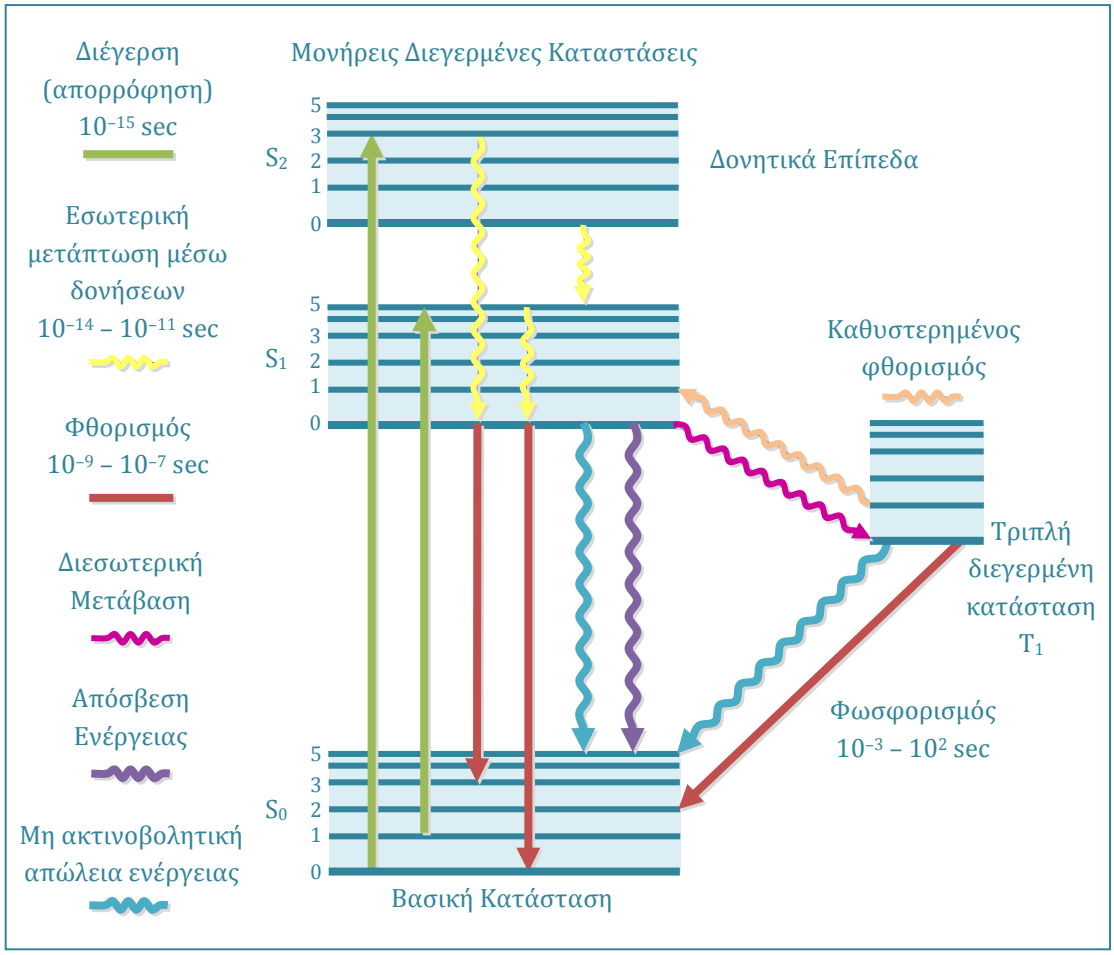
1.2.1. Φαινόμενα που ακολουθούν την απορρόφηση φωτός από χρωμοφόρα μόρια

Χρωμοφόρα ονομάζονται τα μόρια τα οποία απορροφούν κάποια μήκη κύματος του ορατού φωτός, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα να τα θεωρούμε έγχρωμα συστατικά. Πολλές φορές όμως ο ορισμός αυτός επεκτείνεται για την UV και IR ακτινοβολία.

Κάθε μόριο κατέχει μία σειρά ενεργειακών σταθμών και μπορεί να μεταβεί από μία χαμηλότερη σε μία υψηλότερη στάθμη με την απορρόφηση κβάντου φωτεινής ακτινοβολίας, ίσης ενέργειας με τη διαφορά των δύο ενεργειακών επιπέδων. Σε κάθε ηλεκτρονιακή στάθμη αντιστοιχεί επίσης ένα πλήθος δονητικών επιπέδων. Η πολλαπλότητα Μ μιας στάθμης, που εκφράζει την τροχιακή στροφορμή, σχετίζεται με το συνολικό spin της στάθμης S μέσω της σχέσης $M = 2 \cdot S + 1$. Έτσι στην περίπτωση ενός πολυατομικού μορίου του οποίου τα ηλεκτρόνια βρίσκονται σε ζεύγη με αντιπαράλληλα spin το συνολικό spin είναι 0 και η πολλαπλότητά του είναι ίση με 1. Αυτή η κατάσταση ονομάζεται μονήρης (singlet). Όταν το spin ενός ηλεκτρονίου αντιστραφεί, τότε στην κατάσταση αυτή υπάρχουν δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με παράλληλα spin και ολικό spin 1 άρα η πολλαπλότητα της στάθμης είναι 3. Αυτή η ηλεκτρονιακή στάθμη καλείται τριπλή (triplet).

Στη σταθερή τους κατάσταση τα περισσότερα μόρια βρίσκονται στη μονήρη κατάσταση (singlet state) S_0. Η βασική αυτή στάθμη χαρακτηρίζεται από τη μικρότερη δυνατή ενέργεια που μπορεί να έχει το μόριο. Αυτό επιτυγχάνεται όταν όλα τα ηλεκτρόνια είναι συζευγμένα και έχουν αντιπαράλληλα spins. Δεν υπάρχει

δηλαδή ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Η τριπλή κατάσταση είναι για τα περισσότερα μόρια μία ασταθής κατάσταση στην οποία μεταβαίνουν όταν διεγερθούν και η οποία χαρακτηρίζεται από δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια τα οποία έχουν παράλληλα spins. Το οξυγόνο αποτελεί εξαίρεση των παραπάνω, όντας μία από τις σπάνιες ενώσεις οι οποίες στη βασική τους κατάσταση βρίσκονται στην τριπλή στάθμη, ενώ όταν διεγερθούν μεταβαίνουν στην πολύ σημαντική για τη φωτοδυναμική θεραπεία μονήρη κατάσταση.



Σχήμα 1.2: *Διάγραμμα Jablonski*

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα Jablonski (Σχήμα 1.2), μετά την απορρόφηση ενός φωτονίου από το μόριο του χρωμοφόρου (διαδικασία που ολοκληρώνεται σε χρόνο της τάξεως των 10^{-15} sec), ακολουθεί μετάβασή του στην πρώτη ή δεύτερη μονήρη διεγερμένη κατάσταση ανάλογα με το εάν το φωτόνιο ανήκε στην περιοχή της ορατής ή της υπεριώδους ακτινοβολίας. Η διαδικασία αυτή είναι πολύ εξειδικευμένη και ακτινοβολία συγκεκριμένης ενέργειας απορροφάται από

συγκεκριμένες χημικές δομές. Κατά τη διάρκεια παραμονής του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, η πλεονάζουσα ενέργεια σε σχέση με την ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της στάθμης διοχετεύεται μέσω δονήσεων ή συγκρούσεων με άλλα μόρια. Με τη διαδικασία αυτή το μόριο καταλαμβάνει το χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της διεγερμένης μονήρους στάθμης. Ο χρόνος ζωής αυτής της στάθμης είναι πολύ μικρός, της τάξεως του 1 μs. Το μόριο μπορεί να επιστρέψει στη βασική του στάθμη ακολουθώντας κάποιον από τους παρακάτω μηχανισμούς:

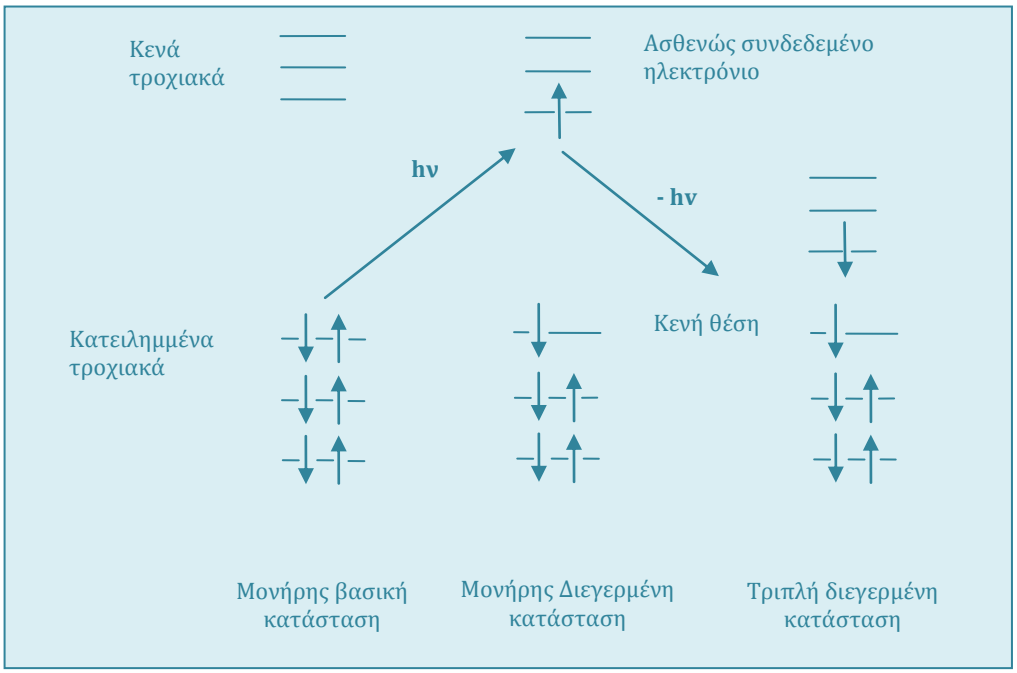
- Εσωτερική μετάπτωση: το μόριο μπορεί από την διεγερμένη κατάσταση, να μεταπηδήσει σε ένα κοντινό δονητικό επίπεδο της βασικής ενεργειακής κατάστασης. Η ενέργεια χάνεται χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας μέσω δονητικής αποδιέγερσης.

- Εκπομπή φθορισμού: το διεγερμένο μόριο που βρίσκεται σε κάποιο δονητικό επίπεδο της μονήρους στάθμης μπορεί να μεταβεί σε ένα δονητικό επίπεδο της βασικής μονήρους κατάστασης, με εκπομπή ενός φωτονίου. Η ενέργεια του φωτονίου και άρα το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, καθορίζεται από την ενεργειακή διαφορά μεταξύ της διεγερμένης και του δονητικού επιπέδου της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η διάρκεια ζωής του φθορισμού είναι της τάξης των nsec. Κατόπιν, μέσω απόσβεσης και χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας, το μόριο επιστρέφει στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της βασικής κατάστασης. Εξαιτίας της απώλειας ενέργειας κατά την παραμονή του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, η εκπεμπόμενη ενέργεια (φθορισμός) είναι μεγαλύτερου μήκους κύματος σε σχέση με την απορροφηθείσα ενέργεια. Το φάσμα φθορισμού (η κατανομή της έντασης της ακτινοβολίας φθορισμού για κάθε μήκος κύματος), εκφράζει τις διαφορετικές πιθανές μεταβάσεις από την μονήρη διεγερμένη κατάσταση στα διάφορα δονητικά επίπεδα της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η σχετική πιθανότητα να συμβεί κάποια από τις πιθανές διαδρομές διαφέρει από μόριο σε μόριο και εξαρτάται, όχι μόνο από τη δομή του, αλλά και από το τοπικό του περιβάλλον.

- Εσωτερική μετατροπή $S^* \rightarrow T^*$: το διεγερμένο μόριο μπορεί να μεταβεί από τη μονήρη διεγερμένη (S^*) στην πρώτη τριπλή διεγερμένη στάθμη (T^*). Η μετάβαση από τη βασική S_0 στην τριπλή διεγερμένη είναι απαγορευμένη (πολύ απίθανη). Σε αντιδιαστολή, η μετάπτωση από τη μονήρη στην τριπλή διεγερμένη στάθμη είναι περισσότερο πιθανή, αφού η ενέργεια του

χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της T^* είναι μικρότερη αυτής της S^*. Η άμεση επιστροφή στην βασική κατάσταση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας είτε με εκπομπή ακτινοβολίας, οπότε και έχουμε το φαινόμενο του φωσφορισμού. Εφόσον η πιθανότητα αντίστροφης μετάβασης από τη διεγερμένη τριπλή στη διεγερμένη μονήρη στάθμη είναι μικρή, η διεγερμένη τριπλή στάθμη είναι συνήθως μεγάλης διάρκειας ζωής (της τάξεως των msec). Επίσης η σχετικά μεγάλη παραμονή των μορίων σε αυτή την κατάσταση τα καθιστά πιο επιρρεπή σε διαδικασίες αποδιέγερσης χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας. Στο Σχήμα 1.3 φαίνεται η κατανομή των ηλεκτρονίων του φωτοευαισθητοποιητή κατά τη διάρκεια αυτού του φαινομένου.

- Καθυστερημένος φθορισμός: Το διεγερμένο μόριο το οποίο βρίσκεται στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση T^* μπορεί εκτός από άμεσα να επιστρέψει και έμμεσα στη βασική μονήρη κατάσταση S_0 μέσω της S_1. Η μετάβαση από την τριπλή διεγερμένη στη μονήρη διεγερμένη προϋποθέτει απορρόφηση ενέργειας από το περιβάλλον. Από την μονήρη διεγερμένη το μόριο θα μεταβεί στη βασική μονήρη εκπέμποντας φωτεινή ενέργεια ίση με τη ενεργειακή διαφορά των δύο σταθμών.



Σχήμα 1.3: *Κατανομή των ηλεκτρονίων του φωτοευαισθητοποιητή κατά τη διάρκεια παραμονής του σε διεγερμένες καταστάσεις*[11]

- Μεταφορά ενέργειας μέσω κρούσεων: αν το διεγερμένο μόριο συγκρουστεί με άλλο μόριο που βρίσκεται σε χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο, τότε η ενέργεια μπορεί να μεταφερθεί σε αυτό το μόριο χωρίς εκπομπή ακτονοβολίας. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως απόσβεση φθορισμού.
- Μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού: η ενέργεια αυτή μπορεί να μεταφερθεί σε άλλο μόριο χωρίς επαφή μέσω μιας σύζευξης διπόλου-διπόλου ανάμεσα στα μόρια. Αν και αυτή η σύζευξη μειώνεται ανάλογα με την έκτη δύναμη της απόστασης ανάμεσα στα μόρια, στα βιολογικά συστήματα μπορεί να επιτευχθεί ικανοποιητική μεταφορά ενέργειας για αποστάσεις μέχρι και 5 mm. Το μόριο που δέχεται την ενέργεια, πρέπει να έχει και μια κατάλληλη ενεργειακή δομή. Το φαινόμενο αυτό είναι μια παραλλαγή της απόσβεσης φθορισμού[9,10].

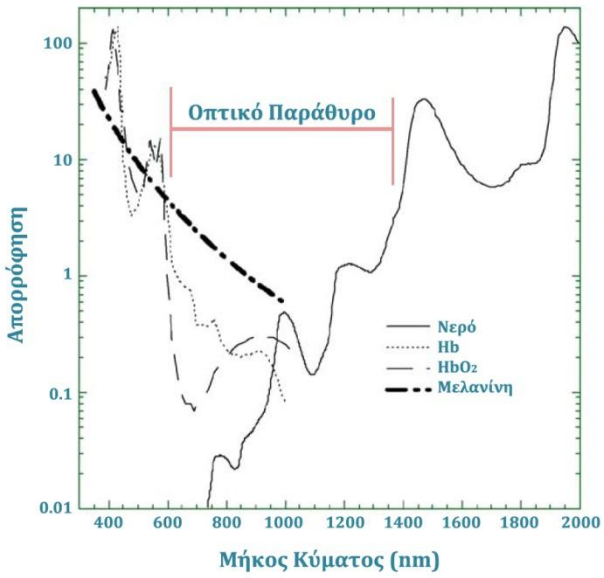
1.2.2. Βασικές φωτοφυσικές παράμετροι φωτοευαισθητοποιητών

Ο φωτοευαισθητοποιητής στη φωτοδυναμική θεραπεία έχει το ρόλο του μέσου που θα μεταφέρει την ενέργεια της φωτεινής ακτινοβολίας στο οξυγόνο ή τα κυτταρικά συστατικά, προκειμένου να αρχίσουν οι πορείες φωτοτοξικών αντιδράσεων[12]. Οι βασικές φωτοφυσικές παράμετροι που καθορίζουν αυτήν την φωτοευαισθητοποιό ικανότητα του φωτοευαισθητοποιητή είναι:

- Ο συντελεστής απόδοσης τριπλής διεγερμένης κατάστασης Φ_t ο οποίος ορίζεται ως ο αριθμός των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή τα οποία βρίσκονται στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση προς τα φωτόνια τα οποία απορροφήθηκαν από τον φωτοευαισθητοποιητή.
- Ο μεγάλος χρόνος παραμονής στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση τ_t. Η παράμετρος αυτή επηρεάζει σημαντικά τη φωτοδυναμική θεραπεία αφού όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος παραμονής στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση τόσο μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα να αλληλεπιδράσει το διεγερμένο μόριο του φωτοευαισθητοποιητή με το οξυγόνο ή μόρια του περιβάλλοντός.
- Ο συντελεστής απόδοσης μονήρους οξυγόνου Φ_Δ, ο οποίος ορίζεται ως το παραγόμενο μονήρες οξυγόνο προς τον αριθμό των φωτονίων που απορρόφησε ο φωτοευαισθητοποιητής.
- Η παράμετρος S_Δ η οποία ορίζεται από την εξίσωση $S_\Delta = \Phi_\Delta / \Phi_t$ και εκφράζει το μέρος της ενέργειας το οποίο είχαν τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή

στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση και καταναλώθηκε στην παραγωγή μονήρους οξυγόνου.

- Η ΔE_t που ορίζεται ως η διαφορά ενέργειας μεταξύ της βασικής μονήρους κατάστασης S_0 και της τριπλής διεγερμένης κατάστασης T_1 του μορίου του φωτοευαισθητοποιητή. Η διαφορά ενέργειας ΔE_t πρέπει να είναι μεγαλύτερη από τη διαφορά ενέργειας ΔE_Δ μεταξύ της μονήρους διεγερμένης κατάστασης του οξυγόνου $^1O_2$ και της βασικής τριπλής $^3O_2$, η οποία είναι ίση με 94 $KJmol^{-1}$.
- Ο συντελεστής απόδοσης φθορισμού Φ_{fl} ο οποίος ορίζεται ως ο αριθμός των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή τα οποία πέρασαν από την πρώτη μονήρη διεγερμένη κατάσταση στη βασική εκπέμποντας φθορισμό προς τον αριθμό των φωτονίων που απορροφήθηκαν από τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή Καθώς ο φωτοευαισθητοποιητής συγκεντρώνεται επιλεκτικά στους καρκινικούς ιστούς, εάν είναι φθορίζον μόριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη διάγνωση του καρκίνου. Δεν πρέπει όμως να έχει πολύ μεγάλο συντελεστή απόδοσης φθορισμού Φ_{fl} γιατί το φαινόμενο του φθορισμού είναι ανταγωνιστικό της μετάβασης στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση και άρα ανταγωνιστικό της φωτοδυναμικής ικανότητας του φωτοευαισθητοποιητή[13].
- Μεγάλο μοριακό συντελεστή απορρόφησης στην περιοχή του κόκκινου. Απορρόφηση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος 600-800 nm συνεπάγεται μεγαλύτερο βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας στον ιστό (Σχήμα 1.4) και κατά συνέπεια αποτελεσματικότερη και όχι μόνο επιφανειακή νέκρωση των όγκων[6,13-15].



Σχήμα 1.4: *Οπτικό παράθυρο δερματικών ιστών*

Επίσης, ο συντελεστής απορρόφησης δεν πρέπει να είναι εξαιρετικά μεγάλος γιατί και πάλι το φως δεν μπορεί να διεισδύσει σε μεγάλο βάθος, λόγω της απορρόφησής του από τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή που βρίσκονται στα ανώτερα στρώματα καρκινικών ιστών[13]. Ο φωτοευαισθητοποιητής πρέπει να απορροφά στην περιοχή 600-800 nm γιατί σε μεγαλύτερα μήκη κύματος η ενέργεια της ακτινοβολίας δεν είναι αρκετή ώστε να διεγείρει κατάλληλα τα μόριά του[1,14].

- Μικρό συντελεστή απορρόφησης στην περιοχή λ < 600 nm. Η ισχύς της ηλιακής ακτινοβολίας για λ < 600 nm είναι αρκετά υψηλή και σε συνδυασμό με υψηλή συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιητή σε επιφανειακούς ιστούς (δέρμα, μάτια) συνεπάγεται γενικευμένη φωτοευαισθησία[1].

1.2.3. Φωτοχημικές αντιδράσεις

Φωτοευαισθητοποίηση ονομάζεται η αλληλουχία των φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών που συμβαίνουν όταν το μόριο του φωτοευαισθητοποιητή

Διέγερση Φωτοευαισθητοποιητή

$$\text{Φωτοευαισθητοποιητής} \xrightarrow{hv} {}^{1}\text{Φωτοευαισθητοποιητής}^{*}$$

$${}^{1}\text{Φωτοευαισθητοποιητής}^{*} \xrightarrow{-E} {}^{3}\text{Φωτοευαισθητοποιητής}^{*}$$

Αντιδράσεις τύπου I

$${}^{3}\text{Φωτοευαισθητοποιητής}^{*} + {}^{3}\text{Φωτοευαισθητοποιητής}^{*} \rightarrow \text{Φωτοευαισθητοποιητής}^{*+} + \text{Φωτοευαισθητοποιητής}^{*-}$$

$${}^{3}\text{Φωτοευαισθητοποιητής}^{*} + \text{Υπόστρωμα} \rightarrow \text{Υπόστρωμα}^{+} + \text{Υπόστρωμα}^{-}$$

$$\text{Φωτοευαισθητοποιητής}^{*-} + O_2 \rightarrow \text{Φωτοευαισθητοποιητής} + O_2^{-}$$

$$\text{Υπόστρωμα}^{*+} + O_2 \rightarrow \text{Οξειδωτικές Αντιδράσεις}$$

$$\text{Υπόστρωμα} + O_2^{-} \rightarrow \text{Οξειδωτικές Αντιδράσεις}$$

Αντιδράσεις τύπου II

$${}^{3}\text{Φωτοευαισθητοποιητής}^{*} + {}^{3}O_2 \rightarrow \text{Φωτοευαισθητοποιητής} + {}^{1}O_2$$

$${}^{1}O_2 + \text{Υπόστρωμα} \rightarrow \text{Οξειδωτικές Αντιδράσεις}$$

Σχήμα 1.5: *Αντιδράσεις που ακολουθούν τη διέγερση του μορίου του φωτοευαισθητοποιητή*[18]

απορροφήσει φωτεινή ενέργεια, και τη μεταφέρει στα μόρια του περιβάλλοντός του που δεν έχουν τη δυνατότητα να απορροφήσουν την ενέργεια αυτή.

Αναλυτικότερα, το διεγερμένο μόριο του φωτοευαισθητοποιητή που βρίσκεται στην τριπλή διεγερμένη στάθμη μπορεί να αντιδράσει με το υπόστρωμα και να δεχθεί ή να δώσει ένα ηλεκτρόνιο ή άτομο υδρογόνου, ή να μεταφέρει την ενέργειά του σε μοριακό οξυγόνο. Στην πρώτη περίπτωση θα «εμπλακεί» σε ένα μηχανισμό παραγωγής ελευθέρων ριζών (αντιδράσεις τύπου Ι), ενώ στη δεύτερη σε ένα μηχανισμό παραγωγής μονήρους οξυγόνου (αντιδράσεις τύπου ΙΙ)[15] (Σχήμα 1.5). Το μονήρες οξυγόνο μπορεί να παράγει ένα μεγάλο πλήθος υδρο-υπεροξειδικών παραγώγων[11]. Αυτά τα είδη είναι ικανά να δημιουργήσουν νέες πορείες οξειδωτικών αντιδράσεων. Ενδιαφέρον επίσης είναι ότι και οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από τον πρώτο μηχανισμό μπορούν να οδηγήσουν σε παρόμοιες πορείες αντιδράσεων αλληλεπιδρώντας με το υπόστρωμα. Έτσι, αφού και οι δύο μηχανισμοί παράγουν παρόμοια προϊόντα, είναι δύσκολο να διευκρινιστεί αν η προκαλούμενη τοξικότητα οφείλεται στον ένα ή τον άλλο μηχανισμό και σε ποιο βαθμό[11,16].

Όποια πορεία αντιδράσεων και αν προκαλέσει ο φωτοευαισθητοποιητής, θα ξαναγυρίσει στη βασική του μονήρη στάθμη από όπου μπορεί να απορροφήσει και πάλι φωτόνια προκειμένου να ακολουθήσει ένα νέο κύκλο διέγερσης οξυγόνου ή παραγωγής ελευθέρων ριζών, δρώντας ουσιαστικά ως καταλύτης[2]. Όταν όμως κατά τη διάρκεια αυτών των αντιδράσεων η δομή του μορίου αλλάξει (και κατά συνέπεια και τα φασματικά του χαρακτηριστικά), χάνει και την ικανότητά του να παράγει αυτές τις κυτταροτοξικές ενώσεις. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται φωτολεύκανση (photobleaching)[17].

Τόσο από τις αντιδράσεις τύπου Ι όσο και από τις αντιδράσεις τύπου ΙΙ προκύπτουν εξαιρετικά δραστικά προϊόντα με πολύ μικρό χρόνο ζωής (< 0.04 μs) και πολύ μικρή ακτίνα διάχυσης (< 0.02 μm)[5]. Ως εκ τούτου, η καταστροφή που προκαλείται από αυτά τα είδη είναι τοπική και πιο συγκεκριμένα καταστρέφονται-οξειδώνονται κυτταρικοί στόχοι που βρίσκονται πολύ κοντά στη θέση στην οποία βρίσκονταν το μόριο του φωτοευαισθητοποιητή πριν από την ενεργοποίησή του.

Η εισαγόμενη από τη φωτοδυναμική θεραπεία κυτταροτοξικότητα φαίνεται να οφείλεται κύρια στις αντιδράσεις τύπου ΙΙ γιατί όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα σχετικών ερευνών:

- Έχει παρατηρηθεί μείωση της τοξικότητας της φωτοδυναμικής θεραπείας όταν στο σύστημα εισαχθούν κάποιοι ειδικοί αναστολείς του μονήρους οξυγόνου

όπως τα παράγωγα του 1,3 διφαινυλισοβενζοφουρανίου, και

- Αν κύτταρα ή ιστοί υποστούν φωτοδυναμική θεραπεία κάτω όμως από χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, παρατηρείται πολύ σημαντική μείωση της κυτταροτοξικότητάς της.

Το ποσοστό με το οποίο θα συμμετέχουν οι αντιδράσεις τύπου I ή II στο τελικό κυτταροτοξικό αποτέλεσμα εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως:

- Το είδος του φωτοευαισθητοποιητή,
- Το είδος του ιστού ή των κυττάρων,
- Το pH (όσο λιγότερο ουδέτερο είναι το pH τόσο περισσότερο ευνοούνται οι αντιδράσεις τύπου I),
- Τη συγκέντρωση οξυγόνου (όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση του οξυγόνου τόσο περισσότερο ευνοούνται οι αντιδράσεις τύπου I)[11].

1.3. Φωτοευαισθητοποιητές

1.3.1. Βασικά χαρακτηριστικά φωτοευαισθητοποιητών

Εκτός όμως από τις βασικές φωτοφυσικές παραμέτρους ένα μόριο πρέπει να παρουσιάζει και κάποια επιπλέον χαρακτηριστικά προκειμένου να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί ως φωτοευαισθητοποιητής. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορούν να διακριθούν στις παρακάτω κατηγορίες:

Φαρμακολογικά χαρακτηριστικά

- *Ικανοποιητική και επιλεκτική συγκέντρωση σε καρκινικούς όγκους σε σχέση με τους υγιείς.* Το χαρακτηριστικό αυτό είναι κρίσιμο, καθώς το σημαντικότερο πλεονέκτημα της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι να προκαλέσει ικανοποιητική νέκρωση των όγκων με τις ελάχιστες δυνατές βλάβες στους παρακείμενους ιστούς[12,14].
- *Γρήγορη αποδέσμευση από τους υγιείς ιστούς.* Η γρήγορη αποδέσμευση από τους υγιείς ιστούς συνεπάγεται αύξηση της επιλεκτικότητας αλλά και μείωση της φωτοευαισθησίας[12, 14].
- *Έλλειψη τοξικότητας απουσία φωτός (dark toxicity).* Ο φωτοευαισθητοποιητής δεν πρέπει να είναι τοξικός χωρίς την προηγούμενη ενεργοποίηση του από φως κατάλληλου μήκους κύματος[1,12-14].

Φωτοθεραπευτικά χαρακτηριστικά.

- *Χαμηλή παραμένουσα φωτοευαισθησία.* Το βασικότερο μειονέκτημα της φωτοδυναμικής θεραπείας στην παρούσα της μορφή είναι η παραμένουσα φωτοευαισθησία που εμφανίζει ο ασθενής σε περιοχές που μπορεί να εκτεθούν στην ηλιακή ακτινοβολία, όπως το δέρμα και τα μάτια. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να διαρκέσει αρκετές εβδομάδες, μειώνοντας την ποιότητα ζωής του ασθενή. Για το λόγο αυτό, ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να απορροφάται ελάχιστα από τους υγιείς ιστούς καθώς και να απομακρύνεται γρήγορα από αυτούς[1,12].

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

- *Χημική καθαρότητα.* Ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να είναι μία καθαρή χημική ουσία. Επίσης, πρέπει να είναι ένα μόριο του οποίου η σύνθεση είναι σχετικά απλή και φθηνή, ώστε να είναι εφικτή η ευρείας κλίμακας παραγωγή του.
- *Μικρή τάση για σχηματισμό συσσωματωμάτων σε υδάτινο περιβάλλον.* Οι φωτοευαισθητοποιητές που είναι υδατοδιαλυτοί είναι πιο εύκολο να χορηγηθούν στην κλινική πράξη. Επιπλέον, θα πρέπει να είναι δυνατή η είσοδος τους στο εσωτερικό των κύτταρων διαμέσου των λιπιδίων της μεμβράνης. Επομένως, ιδανικά θα πρέπει να είναι και υδρόφοβες ουσίες. Για να συνδυαστούν τα δύο αυτά χαρακτηριστικά, η διαλυτότητα στο νερό και η υδροφοβικότητα, θα πρέπει η ουσία να είναι αμφίφιλη. Εκτός όμως από τον τρόπο χορήγησης ο σχηματισμός συσσωματωμάτων επηρεάζει και πιο συγκεκριμένα μειώνει τόσο το συντελεστή απόδοσης τριπλής διεγερμένης κατάστασης Φ_t όσο και το συντελεστή απόδοσης φθορισμού Φ_{fl}[13].

1.3.2. Ομάδες φωτοευαισθητοποιητών

Οι φωτοευαισθητοποιητές που χρησιμοποιούνται σήμερα μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες, τις πορφυρίνες, τις χλωροφύλλες και τις χρωστικές (Πίνακας 1.2). Η οικογένεια των πορφυρινών αποτελείται από τα παράγωγα της αιματοπορφυρίνης. Σήμερα, στο εμπόριο κυκλοφορούν μίγματα που αποτελούνται από διάφορες αναλογίες μονομερών, διμερών και ολιγομερών της αιματοπορφυρίνης. Μάλιστα, παρόλο που όλα αυτά τα προϊόντα διαφέρουν

σημαντικά ως προς τη σύστασή τους, η οποία εξαρτάται από το βαθμό καθαρισμού τους, κλινικά οι διαφορές τους δεν είναι ουσιαστικές.

Στη δεύτερη οικογένεια ανήκουν ενώσεις οι οποίες παράγονται από τις χλωροφύλλες. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται χλωρίνες και έχουν πολύ σημαντική φωτοευαισθητοποιό ικανότητα. Σημαντική επίσης είναι και η φωτοευαισθητοποιός ικανότητα των πουρινών, ενώσεων που αποτελούν προϊόντα αποδόμησης των χλωροφυλλών.

Τέλος, κύριοι εκπρόσωποι της οικογένειας των χρωστικών θεωρούνται οι φθαλοκυανίνες και οι ναφθαλοκυανίνες, ενώσεις που διεγείρονται σε αρκετά μεγάλα μήκη κύματος και με μεγάλο συντελεστή απόδοσης μονήρους οξυγόνου[12].

Οι φωτοευαισθητοποιητές, εκτός από τις χημικές ομάδες στις οποίες ανήκουν συνηθίζεται να διακρίνονται και σε τρεις γενιές. Στην πρώτη γενιά κατατάσσονται οι φωτοευαισθητοποιητές που αναπτύχθηκαν τη δεκαετία του 1970 και στις αρχές της δεκαετίας του 1980, δηλαδή οι πορφυρίνες. Μιλώντας κάποιος για φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς συνήθως αναφέρεται στα παράγωγα των πορφυρινών και γενικά τις ενώσεις που αναπτύχθηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1980. Στην τρίτη γενιά, ανήκουν τόσο οι φωτοευαισθητοποιητές όσο και τα προϊόντα ενσωμάτωσης των φωτοευαισθητοποιητών σε λιποσώματα ή μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία αναπτύχθηκαν τα τελευταία χρόνια προκείμενου να αυξηθεί η επιλεκτικότητα και η αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας[12,19].

Πίνακας 1.2. *Ομάδες φωτοευαισθητοποιητών*

Ομάδα Πορφυρινών	
Παράγωγα αιματοπορφυρίνης	δ-αμινολεβουλινικό οξύ
Παράγωγα βενζοπορφυρινών	Τεξαφυρίνες
Ομάδα χλωροφυλλών	
Χλωρίνες	Βακτηριοχλωρίνες
Πουρπουρίνες	
Ομάδα Χρωστικών	
Φθαλοκυανίνες	Ναφθαλοκυανίνες

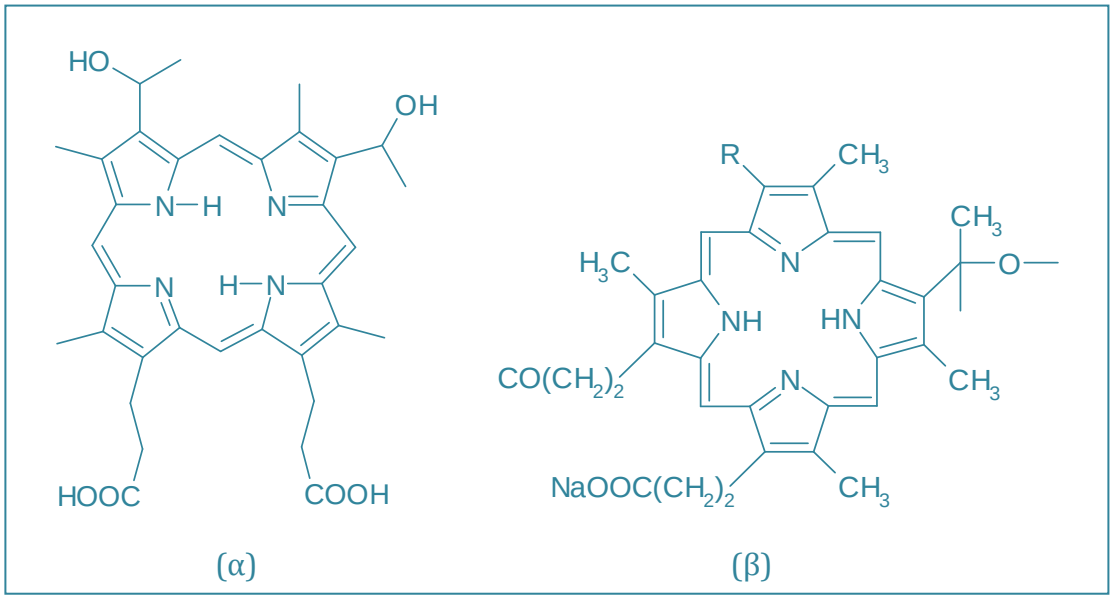
Ο διαχωρισμός των φωτοευαισθητοποιητών σε γενιές χρησιμοποιείται πολλές φορές και ως τρόπος αξιολόγησής τους. Ένας μεγάλος αριθμός κλινικών ιατρών, όμως, δε φαίνεται να ενστερνίζεται αυτήν την άποψη. Έτσι, ενώ οι

φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς εμφανίζουν βελτιωμένες ιδιότητες ως προς αυτούς της πρώτης γενιάς, όπως υψηλότερους συντελεστές απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος και μεγαλύτερους συντελεστές απόδοσης μονήρους οξυγόνου, δεν εφαρμόζονται ακόμη στην κλινική πρακτική. Ένας ακόμη παράγοντας που εμποδίζει την ευρεία χρήση των νέων φωτοευαισθητοποιητών στην κλινική πρακτική είναι η έλλειψη συγκριτικών κλινικών ερευνών για τους φωτοευαισθητοποιητές πρώτης και δεύτερης γενιάς[12].

1.3.2.1. Ομάδα πορφυρινών

Photofrin

Ο πρώτος φωτοευαισθητοποιητής που δοκιμάστηκε κλινικά ήταν η Photofrin®. Η Photofrin® (Axcan Pharma, Montreal, Canada) είναι ένα μίγμα 60 περίπου μονομερών, διμερών και ολιγομερών της αιματοπορφυρίνης[14] (Σχήμα 1.6).



Σχήμα 1.6: *(α) Δομή πορφυρινών, (β) Photofrin®*

Το φάσμα απορρόφησης της Photofrin® παρουσιάζει 6 κορυφές απορρόφησης με την ισχυρότερη απορρόφηση στα 400 nm και την ασθενέστερη στα 630 nm. Αν και στα 630 nm η απορρόφηση είναι μικρή (ε = 1170 $M^{-1}cm^{-1}$ [14]), αυτό είναι το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται τόσο πειραματικά όσο και κλινικά, αφού σε αυτό το μήκος η διεισδυτικότητα της ακτινοβολίας στον ιστό είναι η υψηλότερη. Το φως των 630 nm μπορεί να διεισδύσει σε βάθος περίπου 5 mm στον ιστό, ανάλογα και με τη συγκέντρωση της φωτοευαισθητοποιού ουσίας σε αυτόν[5].

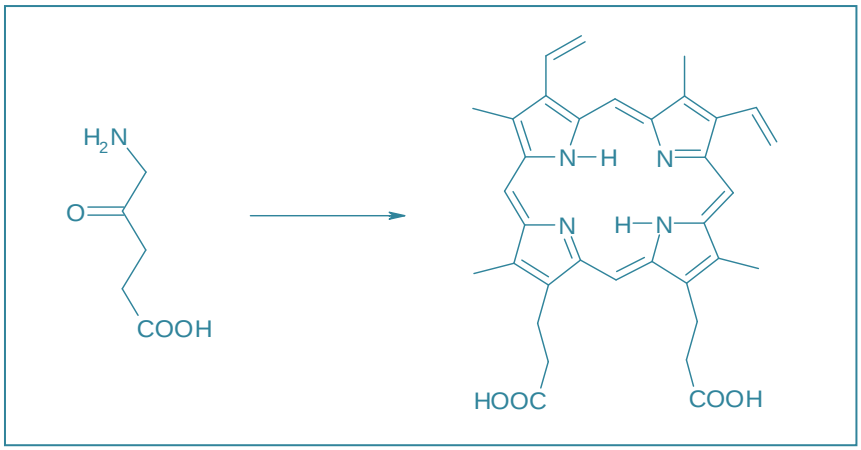
Γενικά η Photofrin® χορηγείται ενδοφλέβια και η συνήθης δόση είναι 2 mg/kg σωματικού βάρους. Οι καρκινικοί ιστοί ακτινοβολούνται 48 h περίπου μετά τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή ενώ οι δόσεις ενέργειας κυμαίνονται από 150-300 J/cm^2. Αυτό το πρωτόκολλο θεραπείας έχει πάρει έγκριση για θεραπεία καρκινικών και προκαρκινικών όγκων δέρματος, πνευμόνων, εγκεφάλου, οισοφάγου, κεφαλής-τραχήλου, ουροδόχου κύστης και στήθους[12].

Το σημαντικότερο μειονέκτημα αυτού του φωτοευαισθητοποιητή είναι η παρατεταμένη φωτοευαισθησία, απόρροια του συνδυασμού υψηλών συντελεστών απορρόφησης σε μήκη κύματος < 600 nm (όπου παρουσιάζει μέγιστο έντασης η ηλιακή ακτινιβολία) και της κατακράτησής του από τους υγιείς ιστούς 4-6 εβδομάδες μετά τη χορήγηση[14,20]. Μείωση πάντως της χορηγούμενης δόσης Photofrin® σε 0.8 mg/kg σωματικού βάρους σε περιπτώσεις καρκίνου των πνευμόνων και 1.2 mg/kg σωματικού βάρους σε περιπτώσεις καρκίνου του δέρματος και της κεφαλής-τραχήλου είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της φωτοευαισθησίας χωρίς όμως υποβάθμιση των αποτελεσμάτων της θεραπείας[12].

5-Αμινολεβουλινικό οξύ (ALA)

Το 5-αμινολεβουλινικό οξύ (ALA) είναι ένα φυσικό αμινοξύ, πρόδρομη ένωση της πρωτοπορφυρίνης IX (Pp IX) (Σχήμα 1.7) στην πορεία σχηματισμού της αίμης[14,20]. Υψηλή συγκέντρωση ALA συνεπάγεται συσσώρευση της PpIX[13]. Η PpIX είναι όπως και οι περισσότερες πορφυρίνες μία φωτοευαίσθητη ένωση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φωτοευαισθητοποιητής. Σε σχέση μάλιστα με τη Photofrin® έχει πενταπλάσιο συντελεστή απορρόφησης (ε ≈ 5000 M^{-1}cm^{-1} [14]).

Το ALA (Levulan, Dusa Pharma, Torondo, Canada) χορηγείται τοπικά με τη μορφή κρέμας περιεκτικότητας 20 % στην περίπτωση καρκινικών και προκαρκινικών δερματικών βλαβών. Οι πάσχοντες ιστοί ακτινοβολούνται 3-6 h μετά την επάλειψη, με φως 630-635 nm και συνολική δόση ενέργειας 150 J/cm^2 [12,20]. Τα ποσοστά ίασης για επιφανειακές βλάβες (περίπου 0.2 cm) αγγίζουν το 90 %, ενώ άριστα είναι και τα κοσμετολογικά αποτελέσματα[5]. Τοπικά, το ALA χρησιμοποιείται σε καρκίνους της στοματικής κοιλότητας. Για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης χρησιμοποιείται ενδοφλέφια σε περιεκτικότητα 17 % ενώ σε μορφή πόσιμου διαλύματος χρησιμοποιείται με μεγάλη στον καρκίνο του οισοφάγου[12].



Σχήμα 1.7: *Παραγωγή PpIX από ALA*

Τελευταία, προκειμένου να βελτιωθεί η επιλεκτικότητά και η αποτελεσματικότητά του, η έρευνα έχει στραφεί σε υδροφοβικότερα παράγωγα όπως ο μεθυλεστέρας (Metvix, Photocure ASA, Oslo, Norway) και ο βενζυλεστέρας του (Benzix, Photocure ASA, Oslo, Norway). Το σημαντικότερο πλεονέκτημα αυτού του φωτοευαισθητοποιητή είναι η πολύ χαμηλή παραμένουσα φωτοευαισθησία όταν χορηγείται τοπικά, ενώ το σημαντικότερο μειονέκτημα είναι ότι μπορεί να θεραπεύσει μόνο επιφανειακούς όγκους[20].

Παράγωγο βενζοπορφυρίνης-Verteporfin

Η Verteporfin είναι ένα παράγωγο της βενζοπορφυρίνης. Έχει ένα πολύ υψηλό συντελεστή απορρόφησης στα 690 nm, ε = 35 000 $M^{-1}cm^{-1}$ [14]. Κλινικά χορηγείται εγκλεισμένη σε λιποσώματα. Η συγκεκριμένη μορφή με την οποία χορηγείται, της επιτρέπει να συσσωρεύεται και να απομακρύνεται πολύ γρήγορα από καρκινικούς και υγιείς ιστούς, μειώνοντας έτσι σημαντικά την παραμένουσα φωτοευαισθησία. Η Verteporfin έχει εγκριθεί και χρησιμοποιείται ευρέως στη φωτοδυναμική θεραπεία ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας. Για τη συγκεκριμένη ασθένεια χορηγείται ενδοφλέβια σε δόση των 6 mg/kg σωματικού βάρους. Η ακτινοβόληση με διοδικό laser (690 nm) ξεκινά 15-30 min μετά τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή, ενώ η συνολική δόση της χορηγούμενης ενέργειας είναι 100 J/cm^2 [12].

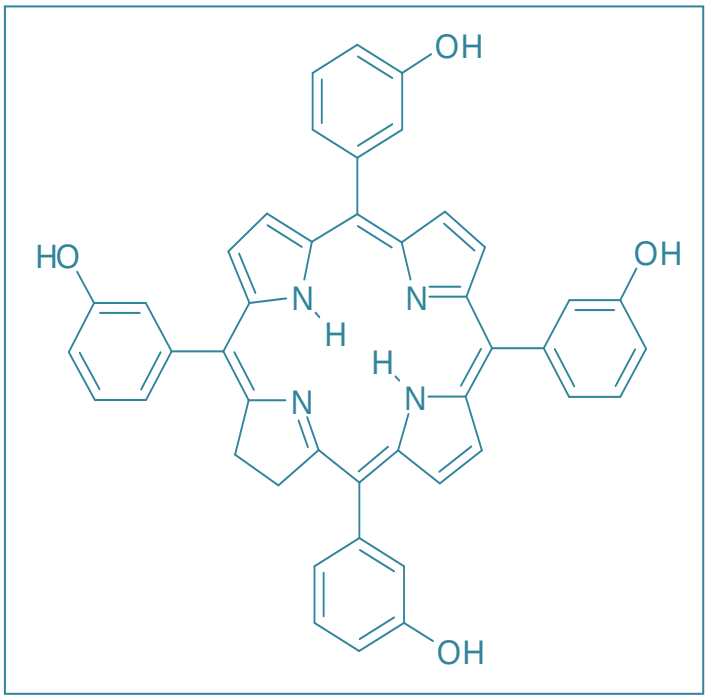
Πρόσφατα, ολοκληρώθηκαν και οι φάσεις I και II κλινικών ερευνών εφαρμογής της φωτοδυναμικής θεραπείας με Verteporfin σε ασθενείς που έφεραν πολλαπλούς, μη μελανωματικούς καρκίνους στο δέρμα τους. Στους συγκεκριμένους ασθενείς, η Verteporfin χορηγήθηκε ενδοφλέβια σε δόση 14 mg/kg σωματικού

βάρους. Οι όγκοι ακτινοβολήθηκαν 1-3 h αργότερα με κόκκινο φως (688 ± 10 nm) και οι συνολικές δόσεις ενέργειας ήταν 60, 120 και 180 J/cm^2. Τα ποσοστά επιτυχίας κυμάνθηκαν από 69-93 % για δόσεις από 60-180 J/cm^2 αντίστοιχα[21]. Έτσι, αν και ακόμη χρησιμοποιείται μόνο για τη θεραπεία εκφύλισης της ωχράς κηλίδας, φαίνεται να είναι ένας αρκετά καλός φωτοευαισθητοποιητής[12].

1.3.2.2. Ομάδα χλωρινών

m-THPC

Η 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη (m-THPC) (Σχήμα 1.8) φαίνεται μέχρι στιγμής να είναι ο φωτοευαισθητοποιητής με τις καλύτερες ιδιότητες από την ομάδα των χλωρινών. Η m-THPC παρουσιάζει δύο κορυφές στο φάσμα απορρόφησης, μία κύρια στα 415 nm και μία δευτερεύουσα στα 652 nm[22]. Ο συντελεστής απορρόφησής της είναι ε = 30 000 M^{-1}cm^{-1} [14].



Σχήμα 1.8: *Δομή m-THPC*

Η m-THPC έχει ήδη περάσει με επιτυχία τις κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία καρκινικών όγκων κεφαλής-τραχήλου και έτσι χρησιμοποιείται κλινικά επισήμως από το 2003[13]. Για τη θεραπεία καρκίνων κεφαλής-τραχήλου χορηγείται στη δόση των 0.15 mg/kg σωματικού βάρους ενδοφλέβια. Οι όγκοι ακτινοβολούνται 4 ημέρες μετά τη χορήγηση με διοδικό laser 652 nm και συνολική δόση μόλις 20 J/cm^2. Το ίδιο πρωτόκολλο χρησιμοποιείται, ερευνητικά όμως, για θεραπεία καρκίνων του

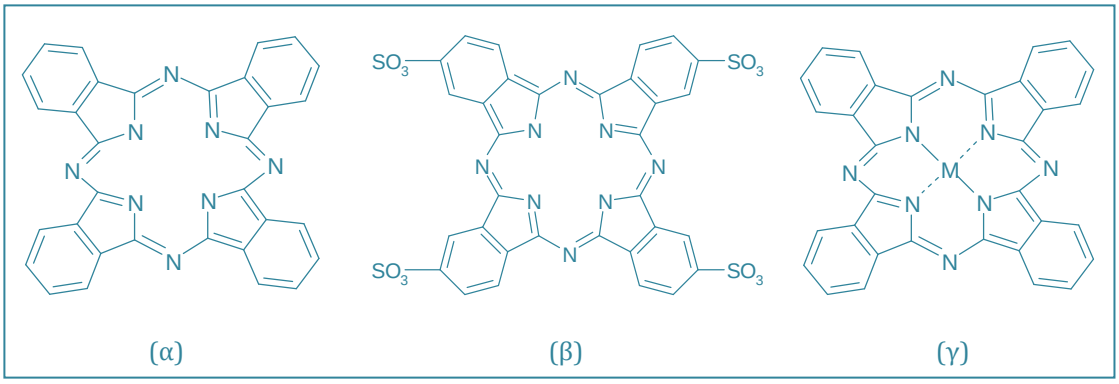
δέρματος, του οισοφάγου και των πνευμόνων. Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της θεραπείας με m-THPC είναι η υψηλή παραμένουσα φωτοευαισθησία για 2 εβδομάδες περίπου και ο οξύς πόνος κατά τη διάρκεια της θεραπείας [12].

1.3.2.3. Ομάδα χρωστικών

Φθαλοκυανίνες

Οι φθαλοκυανίνες προτάθηκαν για πρώτη φορά ως φωτοευαισθητοποιητές από τους Ben-Hur και Rosenthal το 1985, μόλις την τελευταία όμως δεκαετία άρχισαν να μελετώνται εντατικά[20]. Τα μόρια αυτά (Σχήμα 1.9) απορροφούν πιο ισχυρά από όλους τους γνωστούς φωτοευαισθητοποιητές στην κόκκινη περιοχή του φάσματος (~ 680 nm, $\varepsilon > 10^5$ M^{-1} cm^{-1}), ενώ όταν έχουν στον πυρήνα τους συνδεδεμένο ένα άτομο ψευδαργύρου, αλουμινίου, ή πυριτίου παρουσιάζουν και πολύ υψηλούς συντελεστές απόδοσης μονήρους οξυγόνου (~0,9)[14, 23].

Όπως φαίνεται και από τη δομή τους, είναι μόρια πρακτικά αδιάλυτα στο νερό. Για το λόγο αυτό, από τα πρώτα στάδια της μελέτης τους από διάφορες ερευνητικές ομάδες καταβλήθηκαν προσπάθειες προκειμένου να ενσωματωθούν στο μόριο χημικές ομάδες που θα αύξαναν την υδατοδιαλυτότητά τους αλλά δε θα επηρέαζαν τις προαναφερθείσες ιδιότητες[24]. Έτσι προέκυψαν οι σουλφωνομένες φθαλοκυανίνες.



Σχήμα 1.9: *Δομή (α) Φθαλοκυανίνης, (β) Σουλφωνομένης Φθαλοκυανίνης (γ) Μεταλλοφθαλοκυανίνης*

Από τις σουλφωνομένες φθαλοκυανίνες, η φθαλοκυανίνη αλουμινίου έχει πάρει έγκριση για κλινική χρήση στη Ρωσία για θεραπεία καρκίνων των πνευμόνων και του δέρματος. Μάλιστα, στη μορφή με την οποία κυκλοφορεί εμπορικά (Photosense®) μπορεί να χορηγηθεί τοπικά (ως σπρέι), με απευθείας ένεση-

μικροέγχυση στην περιοχή του όγκου ή ενδοφλέβια. Η παραμένουσα φωτοευαισθησία περιορίζεται σε μερικές μέρες μετά τη θεραπεία, ενώ τα κλινικά αποτελέσματα αυτής της συγκεκριμένης φθαλοκυανίνης είναι άριστα. Παράλληλα, η φθαλοκυανίνη αυτή μελετάται κλινικά και για καρκίνους κεφαλής-τραχήλου[12]. Εκτός από τη σουλφωνομένη φθαλοκυανίνη αλουμινίου αυτή τη στιγμή στην πρώτη φάση κλινικών ερευνών βρίσκεται η σουλφωνομένη φθαλοκυανίνη πυριτίου (Silicon Phthalocyanine 4) για θεραπεία καρκίνου του δέρματος, κεφαλής-τραχήλου, στήθους[25, 26].

Παρατηρήθηκε όμως, πως όσο αυξάνονται οι σουλφωνικές ομάδες μειώνεται η απορρόφησή τους από τα κύτταρα και η αποδοτικότητά τους[14]. Για το λόγο αυτό έχουν ξεκινήσει προσπάθειες εγκλεισμού των μορίων σε λιποσώματα ή άλλα μέσα-διαλύτες, τα οποία θα βοηθήσουν στη μεταφορά των μορίων στους κυτταρικούς στόχους χωρίς να είναι απαραίτητη η προσθήκη επιπλέον ομάδων.

1.3.3. Βιολογικές διεργασίες που προηγούνται της απορρόφησης του μορίου του φωτοευαισθητοποιητή από τα κύτταρα

Από τη στιγμή που ο φωτοευαισθητοποιητής θα εισέλθει στη ροή του αίματος μέχρι τη στιγμή που θα αποβληθεί από τον οργανισμό, λαμβάνουν χώρα οι παρακάτω βιολογικές διεργασίες. Καταρχάς, αμέσως μετά την είσοδο του διαλύματος του φωτοευαισθητοποιητή στην αιματική ροή ακολουθεί αποσύνδεση των μορίων του από το μέσο-διαλύτη με το οποίο μεταφέρονται και ένωσή τους με διάφορες πρωτεΐνες του ορού του αίματος. Μέσα στο αίμα, εκτός από τις πρωτεΐνες κυκλοφορούν και κύτταρα (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια), τα οποία επίσης μπορούν να παίξουν το ρόλο του μέσου με το οποίο θα μεταφερθούν τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή. Στη συνέχεια τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή πρέπει να αποκολληθούν από αυτά τα μέσα και να προσκολληθούν στα τοιχώματα των αγγείων.

Τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή πρέπει να διασχίσουν τα τοιχώματα των αγγείων προκειμένου να διαχυθούν στο παρέγχυμα του οργάνου ή του όγκου. Εάν το αγγειακό δίκτυο στο οποίο βρέθηκαν είναι κάποιου ενεργού μεταβολικά οργάνου, π.χ. ήπατος, τότε υπάρχει πιθανότητα και να μεταβολιστούν, αν και αυτό είναι σχετικά απίθανο για τους ευρέως χρησιμοποιούμενους φωτοευαισθητοποιητές με τετραπυρολική δομή. Μετά την πάροδο κάποιου χρονικού διαστήματος, ο φωτοευαισθητοποιητής θα απομακρυνθεί από το όργανο μέσω του λεμφικού συστήματος, θα περάσει και πάλι στην κυκλοφορία μέσω του

θωρακικού αγωγού για να αποβληθεί από το ήπαρ στη χολή και τελικά από τον οργανισμό μέσω της απέκκρισης[27].

Οι φαρμακοκινητικές μελέτες των φωτοευαισθητοποιητών σε ανθρώπους γίνονται με λήψη αίματος και άλλων δειγμάτων βιολογικού υλικού σε τακτά χρονικά διαστήματα. Οι πιο ακριβείς μέθοδοι ανάλυσης αυτών των βιολογικών δειγμάτων είναι η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) και η ραδιοσήμανση του μορίου του φωτοευαισθητοποιητή[27-29]. Ακόμη, επειδή οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές είναι και φθορίζοντα μόρια, η ανίχνευσή τους μπορεί να γίνει μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού αφού πρώτα έχουν περάσει κάποια στάδια εκχυλίσεων – φυγοκεντρήσεων[30,31]. Επίσης, η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή στο δέρμα και σε επιφανειακούς όγκους μελετάται τελευταίως μη επεμβατικά μέσω καταγραφής εικόνας ή/και σήματος φθορισμού[32,33].

1.3.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την ενδοκυττάρια κατανομή των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες επιτυχίας της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι η χημική δομή του φωτοευαισθητοποιητή. Η δομή του φωτοευαισθητοποιητή θα καθορίσει το πώς αυτό το μόριο θα αλληλεπιδράσει με το περιβάλλον του, τον τρόπο με τον οποίο θα μεταφερθεί στα κύτταρα και τέλος τις υποκυττάριες δομές στις οποίες τελικά θα εντοπιστεί πριν την ακτινοβόληση[34]. Τα πιο σημαντικά χαρκτηριστικά της δομής ενός φωτοευαισθητοποιητή είναι:

- το σθένος του, το οποίο μπορεί να κυμαίνεται από -4 έως +4,
- ο βαθμός λιποφιλικότητας, ο οποίος εκφράζεται από τον αρνητικό λογάριθμο του συντελεστή κατανομής της ένωσης στο σύστημα οκτανόλης / νερού, και
- ο βαθμός ασυμμετρίας του[1].

Το μέσο με το οποίο θα μεταφερθεί ο φωτοευαισθητοποιητής στους ιστούς εξαρτάται από το βαθμό λιποφιλικότητάς του καθώς και το βαθμό ασυμμετρίας του μορίου του. Έτσι:

- Οι σχετικά υδροφιλικοί φωτοευαισθητοποιητές, όπως οι σουλφωνομένες φθαλοκυανίνες και τετραπορφυρίνες, μεταφέρονται μέσω της αλβουμίνης.

- Οι φωτοευαισθητοποιητές με αμφιφιλικά και ασύμμετρα μόρια όπως οι χλωρίνες και η βενζοπορφυρίνη μεταφέρονται από την αλβουμίνη αλλά και από υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL).
- Για τους υδρόφοβους φωτοευαισθητοποιητές (μη σουλφωνομένες φθαλοκυανίνες, πουρπουρίνες) απαιτείται προηγουμένως ενσωμάτωσή τους σε κάποια μέσα μεταφοράς όπως λιποσώματα, επιφανειοδραστικές ενώσεις και διαλύτες (π.χ. Chremophor EL, Tween 80). Τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή που μεταφέρονται από αυτά τα μέσα φαίνεται να προσκολλώνται σε χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες και να μεταφέρονται μέσω αυτών στους ιστούς[27].

Ο τρόπος με τον οποίο τα κύτταρα θα απορροφήσουν το φωτοευαισθητοποιητή εξαρτάται από το φορτίο και τη λιποφιλικότητά του. Συνεπώς:

- Φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι είναι υδροφοβικοί και έχουν σθένος < -2, μπορούν εύκολα να διαχυθούν στην κυτταρική μεμβράνη και από αυτή στις ενδοκυττάριες. Για τους φωτοευαισθητοποιητές αυτούς παρουσιάζονται επίσης και οι μεγαλύτεροι βαθμοί απορρόφησης από τα κύτταρα ακόμη και όταν η συγκέντρωσή τους (σε in vitro συστήματα) είναι μικρότερη και από 1 μM.
- Φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι είναι λιγότερο υδροφοβικοί και έχουν σθένος > -2 διαπερνούν δύσκολα τις κυτταρικές μεμβράνες και για αυτό απορροφώνται μέσω ενδοκυττάρωσης.
- Το σθένος των φωτοευαισθητοποιητών επηρεάζει επίσης και την ενδοκυττάρια κατανομή των φωτοευαισθητοποιητών, με αποτέλεσμα οι κατιονικοί να εντοπίζονται κυρίως στα μιτοχόνδρια ενώ οι ανιονικοί στα λισοσώματα[1].

1.3.5. Μηχανισμοί νέκρωσης των καρκινικών ιστών

Η μείωση του όγκου των καρκινικών ιστών και η τελική εξάλειψή τους από το εκάστοτε όργανο μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία, θεωρείται ως το αποτέλεσμα τριών διαφορετικών μηχανισμών που φαίνεται να συνδέονται μεταξύ τους.

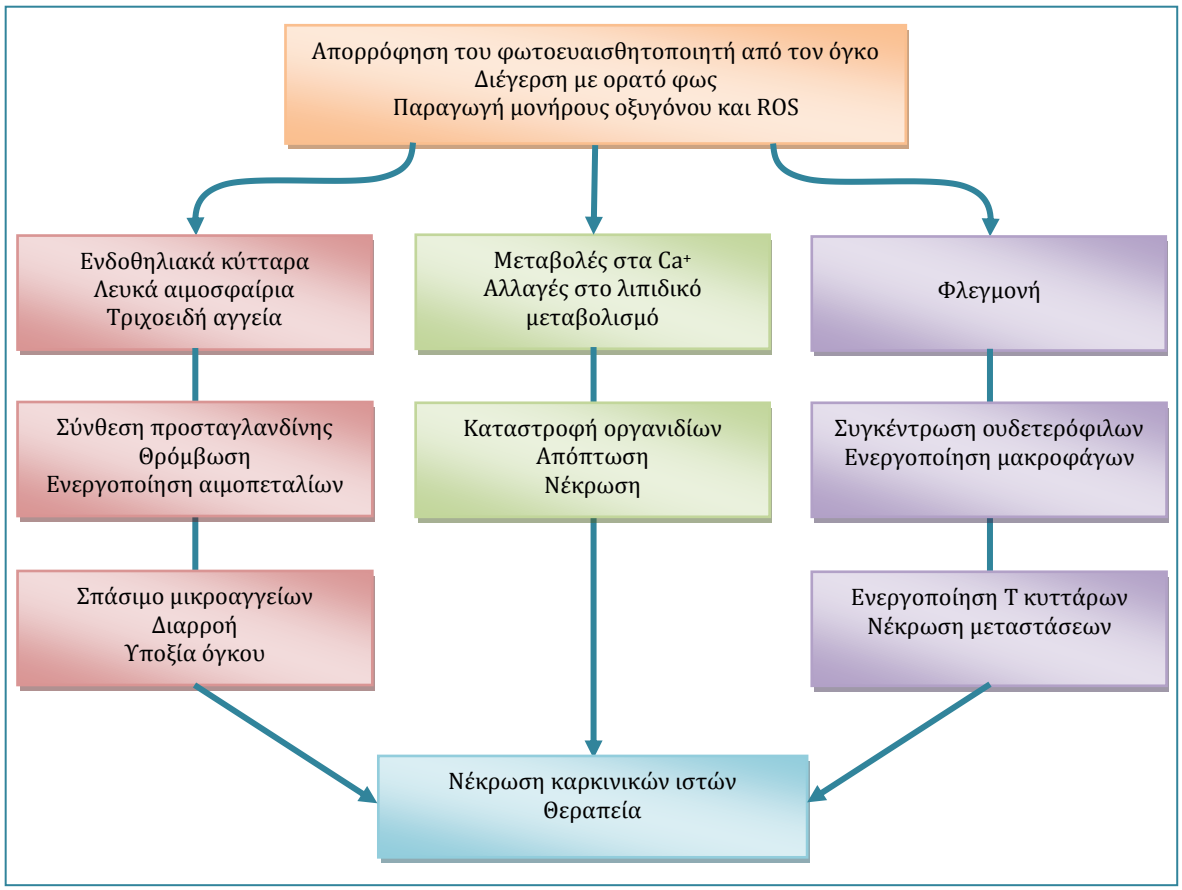
Οι μηχανισμοί αυτοί, οι οποίοι συνοπτικά φαίνονται στο Σχήμα 1.10, είναι:

1. Η απευθείας απόπτωση ή νέκρωση των καρκινικών κυττάρων,
2. Οι εκτεταμένες βλάβες στο αγγειακό δίκτυο των καρκινικών ιστών, και

3. Η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος[27].

1.3.5.1. Απόπτωση ή νέκρωση των καρκινικών κυττάρων

Οι απευθείας κυτταρικές βλάβες θεωρούνται σημαντικός παράγοντας της τελικής φωτοδυναμικής απόδοσης. Η απόπτωση ή νέκρωση των καρκινικών κυττάρων μπορεί να οφείλεται σε πολλές διαφορετικές πορείες βιοχημικών αντιδράσεων που ξεκινούν από διαφορετικά ενδοκυττάρια οργανίδια-δομές.



Σχήμα 1.10: *Μηχανισμοί νέκρωσης καρκινικών ιστών*

Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια είναι ένας από τους συνήθεις ενδοκυττάριους προορισμούς των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή. Τα μιτοχόνδρια φαίνεται να ενεργοποιούν τους μηχανισμούς απόπτωσης με δύο τρόπους. Πρώτον μέσω της πρωτεΐνης Bcl-2 και δεύτερον μέσω του κυτοχρώματος C.

Ένας από τους μηχανισμούς από τους οποίους ρυθμίζεται η κυτταρική απόπτωση είναι η αναλογία των πρωτεϊνών Bcl-2 (αντι-αποπτωτική)-Bax (προαππτωτική). Η

Bcl-2 βρίσκεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και είναι πολύ επιρρεπής στην οξείδωση από τα φωτοτοξικά προϊόντα της φωτοδυναμικής θεραπείας. Οξείδωση και άρα καταστροφή της Bcl-2 συνεπάγεται σημαντική μετατόπιση της ισορροπίας των δύο πρωτεϊνών (αύξηση της Bax) και ενεργοποίηση των μηχανισμών απόπτωσης[34].

Ένας άλλος μηχανισμός εισαγωγής απόπτωσης που οφείλεται σε μιτοχονδριακές βλάβες είναι η απελευθέρωση του κυτοχρώματος C. Έχει παρατηρηθεί ότι, δυσλειτουργίες στα μιτοχόνδρια οι οποίες οφείλονται είτε σε μεβρανικές είτε σε άλλες βλάβες που τελικά παρεμποδίζουν την παραγωγή ενέργειας, έχουν ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση κυτοχρώματος C από το εσωτερικό των μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα. Η αύξηση της συγκέντρωσης του κυτοχρώματος C συνεπάγεται ενεργοποίηση της *caspase 8* και *9* που με τη σειρά τους θα ενεργοποιήσουν την *caspase 3*, η οποία είναι και το ένζυμο που θα ενεργοποιήσει το μηχανισμό απόπτωσης. Έτσι, το γενετικό υλικό που βρίσκεται στον πυρήνα θα συμπυκνωθεί, οι μεμβράνες του κυττάρου και του πυρήνα θα σπάσουν σε πολύ μικρότερες και το κύτταρο θα διασπαστεί σε μικρά σωματίδια. Τα σωματίδια αυτά τελικά θα απορροφηθούν από τα φαγοκύτταρα με ενδοκυττάρωση[34,35].

Ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να εισάγει απόπτωση είναι η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου. Η αύξηση αυτή μπορεί να γίνει είτε γιατί η φωτοδυναμική θεραπεία ενεργοποιεί τις αντλίες ιόντων είτε λόγω βλαβών στα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο και απελευθέρωσης των ιόντων ασβεστίου που αυτά περιέχουν[36].

Κυτταροπλασματική Μεμβράνη

Ως ενδοκυττάριος στόχος οι κυτταροπλασματικές μεμβράνες προτιμώνται μόνο από τους υδροφοβικούς φωτοευαισθητοποιητές[37]. Συνήθως τα μόρια των φωτοευαισθητοποιητών εντοπίζονται στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες μόνο για ένα πολύ μικρό χρονικό διάστημα, μερικές ώρες μετά τη χορήγησή τους, το χρονικό διάστημα δηλαδή που προσπαθούν να τις διαπεράσουν προκειμένου να διαχυθούν στις υπόλοιπες κυτταρικές δομές[1]. Οι φωτοδυναμικές βλάβες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη πάντως μπορούν να πρατηρηθούν σχεδόν άμεσα, λίγα λεπτά μόνο μετά την ακτινοβόληση[3]. Με τον όρο βλάβες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ουσιαστικά αναφερόμαστε στις υπεροξειδώσεις των λιπιδίων αλλά και των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε αυτή για να μπορεί να επικοινωνήσει και να απορροφήσει μόρια του περιβάλλοντός της[34,37].

Μορφολογικά αυτές οι φωτοδυναμικές δράσεις εκδηλώνονται μέσω διόγκωσης της μεμβράνης, δημιουργίας και διάρρηξης κυστιδίων. Σε επίπεδο κυτταρικών μηχανισμών οι η εκδήλωση πραγματοποιείται μέσω απελευθέρωσης μεμβρανικών αλλά και γενικότερα ενδοκυττάριων ενζύμων, αλλαγές στις συγκεντρώσεις ιόντων Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} αλλά κυρίως μέσω ενεργοποίησης των ενζυμικών μηχανισμών των φωσφολιπασών A2 και C. Οι πορείες αντιδράσεων που ακολουθούν την ενεργοποίηση αυτών των δύο φωσφολιπασών παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση η οποία μπορεί να οδηγήσει τελικά το κύτταρο είτε σε διόρθωση των βλαβών είτε σε εισαγωγή απόπτωσης. Εκτεταμένες βλάβες-οξειδώσεις των λιπιδίων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης μπορεί να επιφέρουν και νέκρωση του κυττάρου, το γεγονός αυτό απαντάται όμως σπάνια[34].

Λυσοσώματα

Κάποια άλλη ενδοκυττάρια δομή, την οποία μπορεί να λύσει η φωτοδυναμική θεραπεία είναι τα λυσοσώματα. Αν και λύση των λισοσωμάτων δεν μπορεί να προκαλέσει άμεσα εισαγωγή μηχανισμών απόπτωσης ούτε είναι τόσο τοξική, οι έμμεσες βλάβες που μπορεί να προκαλέσει στο κύτταρο δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ασήμαντες. Όταν οι μεμβράνες των λισοσωμάτων σπάσουν λόγω οξείδωσης των συστατικών τους, το υλικό που υπήρχε μέσα σε αυτά διαχέεται στο κυτταρόπλασμα. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται πρώτον ανακατανομή των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή ενδοκυττάρια και άρα πρόκληση βλαβών σε άλλα ενδοκυττάρια συστατικά, και δεύτερον αναγωγή των συστατικών που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα λόγω της απελευθέρωσης των λισοσωματικών ενζύμων[34].

1.3.5.2. Βλάβες στο αγγειακό δίκτυο των καρκινικών ιστών

Μετά την ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή, σημαντικές βλάβες μπορούν να συμβούν και στο μικροαγγειακό δίκτυο του καρκινικού ιστού. Οι βλάβες αυτές συνίστανται κυρίως σε νέκρωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και της μεμβράνης του επιθηλιακού ιστού και μπορούν να προκαλέσουν θρομβώσεις, διάρρηξη των αγγείων και αιμορραγία. Πάντως, από διάφορες μέχρι στιγμής μελέτες έχει δειχθεί ότι οι φωτοευαισθητοποιητές διαφέρουν και ως προς την έκταση αλλά και ως προς τον τύπο βλαβών στο αγγειακό δίκτυο. Σε κάθε περίπτωση, όμως, βλάβες στο αγγειακό δίκτυο συνεπάγονται μείωση της τροφοδοσίας των κυττάρων και έναρξη της απόπτωσής τους[27,34].

1.3.5.3. Ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος

Όλες αυτές οι αλλαγές στις κυτταρικές δομές που περιγράφηκαν, ανάλογα με την έντασή τους μπορούν να προκαλέσουν νέκρωση, απόπτωση, ή απλώς φλεγμονή. Η φλεγμονή φαίνεται να ξεκινά κυρίως από τις οξειδώσεις των μεμβρανικών λιπιδίων. Η οξείδωση των μεμβρανικών λιπιδίων ενεργοποιεί τις φωσφολιπάσες, οι οποίες καλούνται να ανάγουν τα οξειδωμένα λιπίδια. Κατά τη διάρκεια όμως της επιδιόρθωσης αυτών των βλαβών, οι φωσφολιπάσες ενεργοποιούν παράγοντες φλεγμονής.

Η σηματοδότηση φλεγμονής προκαλεί συσσώρευση ουδετερόφιλων και μακροφάγων κυττάρων τα οποία αριθμητικά μπορεί και να υπερτερούν των καρκινικών κυττάρων. Ο ρόλος της δημιουργίας σημάτων φλεγμονής όμως δε σταματά εδώ. Η παρουσία φλεγμονής θα μεταφραστεί σε πεπτίδια αντιγόνων, τα οποία θα μεταφερθούν στις κυτταρικές μεμβράνες προκειμένου να επικοινωνήσουν με τα CD4 αντιγόνα των Τ λεμφοκυττάρων. Αυτά με τη σειρά τους θα ενεργοποιήσουν τα CD 8 λεμφοκύτταρα που δε θα δράσουν μόνο στην περιοχή όπου πραγματοποιήθηκε η φωτοδυναμική θεραπεία αλλά και πολύ μακρύτερα (όπου πιθανώς υπάρχουν μεταστάσεις, αναγνωρίζοντας τον ίδιο τύπο κυττάρων)[27,34].

1.4. Βιβλιογραφία

1. A. Castano, T. Deminova, M. Hamblin, “Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization”, Photodiagn Photodyn Ther, 1, 279-293, 2004.
2. S. Brown, E. Brown, and I. Walker, “The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment”, Lancet Oncol, 5, 497-505, 2004.
3. T. Dougherty, C. Gomer, B. Henderson, G. Jori D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, “Photodynamic Therapy”, J Natl Cancer Inst, 90, 889-905, 1998.
4. A. Kubler, “Photodynamic therapy”, Med Laser Applic, 20, 37-45, 2005.
5. C. Hopper, “Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer”, Lancet Oncol, 1, 212-219, 2000.
6. D. Kessel, “Photodynamic therapy: from the beginning”, Photodiagn Photodyn Ther, 1, 3-7, 2004.
7. R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, and M. Reed, “The history of photodetection and photodynamic therapy”, Photochem Photobiol, 74, 656-669, 2001.
8. Briefing document for FDA advisory committee meeting for photodynamic therapy with methyl aminolevulinate cream for treatment of basal cell carcinoma NDA 21-576, FDA, September 2003.

9. G. Guilbault, Practical fluorescence, Markel Dekker Inc., New York, 1990.

10. P. N. Prasad, Introduction to Biophotonics, John Wiley & Sons Inc, New Jersey, 2003.

11. M. Ochsner, "Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors", J Photochem Photobiol, 39, 1-18, 1997.

12. R. Allison, G. Downie, R. Cuenca, X. H. Hu, C. Childs, C. Sibata, "Photosensitizers in PDT", Photodiagn Photodyn Ther, 1, 27-42, 2004.

13. E. Nyman, P. Hynninen, "Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy", J Photochem Photobiol, 73, 1-28, 2004.

14. M. Detty, S. Gibson, and S. Wagner, "Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy", 47, 3897-3915, J Med Chem, 2004.

15. K. Berg, P. K. Selbo, A. Weyergang, A. Dietze, L. Prasmickaite, A. Bonsted, B. O. Engesaeter, E. Angell-Petersen, T. Warloe, N. Frandsen and A. Hogset, "Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications„, J Microsc, 218, 133-147, 2005.

16. U. Schmidt-Erfurt, T. Hasan, "Mechanisms of action of photodynamic therapy with Verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration", Surv Ophthalmol, 45, 196-214, 2000.

17. R. Bonnett and G. Martinez, "Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy", 57, 9513-9547, 2001.

18. W. Sharman, C. Allan, J. van Lier, "Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications", Drug Discov Today, 11, 507-517, 1999.

19. Y. Niamien Konan, R. Gurny, E. Allemann, "State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy", J Photochem Photobiol, 66, 89-106, 2002.

20. K. Kalka, H. Merk, and H. Mukhtar, "Photodynamic therapy in dermatology", J Am Acad Dermatol, 42, 389-413, 2000.

21. H. Lui, L. Hobbs, W. Lori, P. Lee, C. Elmets, N. Provost, A. Chan, H. Neydorff, S. Herma, Y. Xiang, H. jain, I. Hamzavi, d. McLean, R. Bissonnette, "Photodynamic therapy of multiple nonmelanoma skin cancers with verteporfin and red light-emitting diodes: two-year results evaluating tumor response and cosmetic outcomes", Arch Dermatol, 1, 26-32, 2004.

22. S. Sansouski, V. Zorin, I. Khludeyev, M. A. D'Hallewin, F. Guillemin, L. Bezdetnaya, "Investigation of Foscan® interactions with plasma proteins", Biochim Biophys Acta, 1725, 394-402, 2005.

23. L. Gao, X. Qian, L. Zhang, Y. Zhang, "Tetra-trifluoroethoxyl zinc phthalocyanine: potential photosensitizer for use in the photodynamic therapy of cancer", J Photochem Photobiol, 65, 35-38, 2001.

24. E. Richi-Junior, J. Maldonado Marchetti, "Zinc(II)phthalocyanine loaded PLGAnanoparticles for photodynamic therapy" Int J Pharm, 310, 187-195, 2006.

25. National Cancer Institute, Clinical trials, "Photodynamic therapy using silicon phthalocyanine 4 in treating patients with actinic keratosis, Bowen's disease, skin cancer, or stage I or II mycosis Fungoides", http://www.clinicaltrials.gov/ct/gui/show/NCT00103246.

26. National Cancer Institute, Clinical trials, “Photodynamic therapy in treating patients with skin cancer or solid tumors metastatic to the skin”, http://www.clinicaltrials.gov/ct/gui/show/NCT00023790.

27. A. Castano, T. Demidova, M. Hamblin, “Mechanisms in photodynamic therapy: Part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction”, Photodiagn Photodyn Ther, 2, 91-106, 2005.

28. Z. Huang, Q. Chen, D. Luck, J. Beckers, B. Wilson, N. Trncic, S. M. LaRue, D. Blanc and F. Hetzel, “Studies of vascular-acting photosensitizer, Pd-Bacteriopheophorbide (Tookad), in normal canine prostate and spontaneous canine prostate cancer”, Laser Surg Med, 17,390-397,2005.

29. P. Cramers, M. Ruevekamp, H. Oppelaar, O. Dalesio, P. Baas, and F. A. Stewart, “Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy”, Brit J Cancer, 88, 283-290, 2003.

30. K. Masumoto, I. Yamada, H. Tanaka, Y. Fujise, K. Hashimoto, “Tissue distribution of a new photosensitizer ATX-S10Na(II) and effect of a diode laser (670 nm) in photodynamic therapy”, Laser Med Sci, 18, 134-138, 2003.

31. G. A. Campbell, K. E. Bartels, C. Arnold, T. Healey, R. L. Cowell, M. D. Lucroy, A. M. Ronn, “Tissue levels, histologic changes and plasma pharmacokinetics of meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorine (mTHPC) in the cat”, Laser Med Sci, 17, 79-85, 2002.

32. E. Alexandratou, M. Kyriazi, D. Yova, S. Grafe, T. Trebst, A. Johansson, J. Svensson, K. Svanberg, N. Bendsoe, S. Anderson-Engels, “Distribution studies of m-THPC thermogel in a murine mon-melanoma skin cancer tumor model by fluorescence spectroscopic and imaging techniques”, Optical methods for tumor treatment and detection: Mechanisms and techniques in photodynamic therapy, SPIE, 6139, 91-100, 2006.

33. A. Johansson, J. Svensson, S. Anderson-Engels, N. Bendsoe, K. Svanberg, I. Bigio, E. Alexandratou, M. Kyriazi, D. Yova, S. Grafe, “mTHPC pharmacokinetics following topical administration”, Optical Diagnostics and Sensing VI, SPIE, 6094, 60-67, 2006.

34. S. Stylli, A. Kaye, “Photodynamic therapy of cerebral glioma-A review Part I-A biological basis”, J Clin Neurosci, 13, 615-625, 2006.

35. R. Almeida, B. Manadas, A. Carvalho, C. Duarte, “Intracellular signalling mechanisms in photodynamic therapy”, Biochim Biophys Acta, 1704, 59-86, 2004.

36. A. Castano, T. Demidova, M. Hamblin, “Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signalling, cell metabolism and modes of cell death”, Photodiagn Photodyn Ther, 2, 1-23, 2005.

37. A. Moor, “Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy”, J Photochem Photobiol, 57, 1-13, 2000.

Κεφάλαιο 2

Διαγνωστικά Συστήματα Φασματοσκοπίας Φθορισμού

2.1. Εισαγωγή

Η ιστοπαθολογική εξέταση θεωρείται από τους κλινικούς η κύρια μέθοδος διάγνωσης καθώς και η μέθοδος η οποία παρέχει τα πιο αξιόπιστα αποτελέσματα (gold standard). Παρόλα αυτά, σημαντικά μειονεκτήματα όπως η απαίτηση νάρκωσης και χειρουργείου για τη λήψη δειγμάτων ιστών από εσωτερικά όργανα, τα υψηλά ποσοστά υποτροπής σε ορισμένα είδη καρκίνου και το μεγάλο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη λήψη των δειγμάτων έως την έκδοση του αποτελέσματος, καθιστούν αναγκαία τη μερική τουλάχιστον αντικατάστασή της από νέες μεθόδους.

Η ανάπτυξη καινοτόμων μη επεμβατικών διαγνωστικών μεθόδων, οι οποίες βασίζονται στην επεξεργασία δεδομένων οπτικής φασματοσκοπίας, αποτελεί μέρος της παγκόσμιας μετωπικής έρευνας. Στην ευρεία κατηγορία αυτών των μεθόδων έχει αποδοθεί η ονομασία «οπτική βιοψία» αφού ένας από τους κύριους στόχους αυτών των μεθόδων είναι η αντικατάσταση της βιοψίας. Η ονομασία αυτή μοιάζει αντιφατική αφού ο όρος βιοψία σημαίνει χειρουργική αφαίρεση αντιπροσωπευτικού δείγματος ιστού προκειμένου αυτό να χαρακτηριστεί μέσω ιστοπαθολογικών τεχνικών, ενώ ο όρος οπτική αναιρεί οποιαδήποτε επέμβαση στους ιστούς.

Η αρχή αυτών των μεθόδων είναι η καταγραφή φασματικών χαρακτηριστικών και γενικότερα οπτικών ιδιοτήτων οι οποίες θα διακρίνουν τους υγιείς από τους

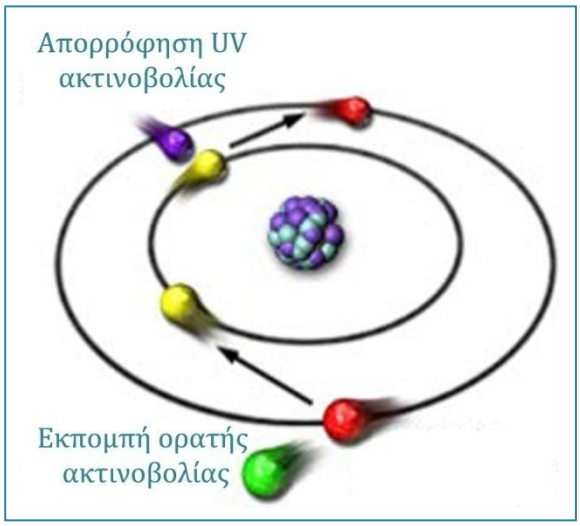
καρκινικούς ιστούς. Σημαντικοί στόχοι αυτών των μεθόδων είναι η άμεση λήψη και επεξεργασία των δεδομένων και η όσο το δυνατό μικρότερη επέμβαση στους ιστούς. Άμεση κοινοποίηση του αποτελέσματος στον ασθενή συνεπάγεται και εξάλειψη του ψυχολογικού φόρτου που αυτός υφίσταται από τη διεξαγωγή της εξέτασης έως την έκδοση των αποτελεσμάτων. Ο παράγοντας αυτός θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της ιστοπαθολογικής εξέτασης, για την έκδοση των αποτελεσμάτων της οποίας απαιτούνται αρκετές ημέρες. Επιπλέον, γρήγορη έκδοση του διαγνωστικού αποτελέσματος συνεπάγεται εξοικονόμηση πολύτιμου χρόνου για το θεραπευτικό πλέον αποτέλεσμα. Επίσης, η μείωση του βαθμού επεμβατικότητας ακολουθείται από μείωση της αναγκαιότητας χειρουργικού περιβάλλοντος και κατά συνέπεια σημαντική μείωση του χρόνου και του κόστους διάγνωσης[1].

2.2. Το φαινόμενο του φθορισμού

2.2.1. Ιστορικά στοιχεία

Το φαινόμενο του φθορισμού παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε υδάτινο διάλυμα κινίνης και τρυγικού οξέος το 1845 από τον John Frederick William Herschel[2]. Το πείραμα αυτό καταγράφηκε ως μία απλή παρατήρηση αφού το φαινόμενο του φθορισμού δεν μπορούσε να εξηγηθεί από την τότε υπάρχουσα επιστημονική γνώση. Το 1852 ο Stokes παρατήρησε για πρώτη φορά ότι το φάσμα εκπομπής είναι μετατοπισμένο προς μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με το φάσμα διέγερσης (Stokes' shift)[3] (Σχήμα 2.1). Παρόλα αυτά, σε αυτήν την ανακάλυψη δεν δόθηκε ιδιαίτερη σημασία μέχρι τις αρχές του 20^{ου} αιώνα όταν ο Stübel (1911) ανέφερε ότι οι ιστοί ζώων εκπέμπουν φως στην ορατή περιοχή του φάσματος το οποίο μπορεί κανείς να διακρίνει με γυμνό μάτι, όταν ακτινοβοληθούν με υπεριώδες φως. Έκτοτε το φαινόμενο του φθορισμού άρχισε να αξιοποιείται γενικά στην έρευνα αλλά και να συζητείται η συνεισφορά του στην ιατρική[4].

Τα τελευταία 25 χρόνια παρατηρείται μία συνεχώς αυξανόμενη αξιοποίηση του φαινομένου του φθορισμού στις βιολογικές επιστήμες. Πριν μερικά χρόνια μάλιστα, η φασματοσκοπία φθορισμού και ο χρονοδιαχωριζόμενος φθορισμός (time resolved fluorescence) αποτελούσαν δύο από τα κύρια εργαλεία-μεθόδους της βιοχημείας και της βιοφυσικής. Σήμερα πλέον ο φθορισμός χρησιμοποιείται και σε άλλους τομείς όπως στο περιβάλλον (μέτρηση δεικτών περιβαλλοντικής μόλυνσης) και στην ιατρική (διάγνωση, προσδιορισμός αλληλουχίας DNA, κυτταρολογία, απεικόνιση κυτταρικών λειτουργιών).



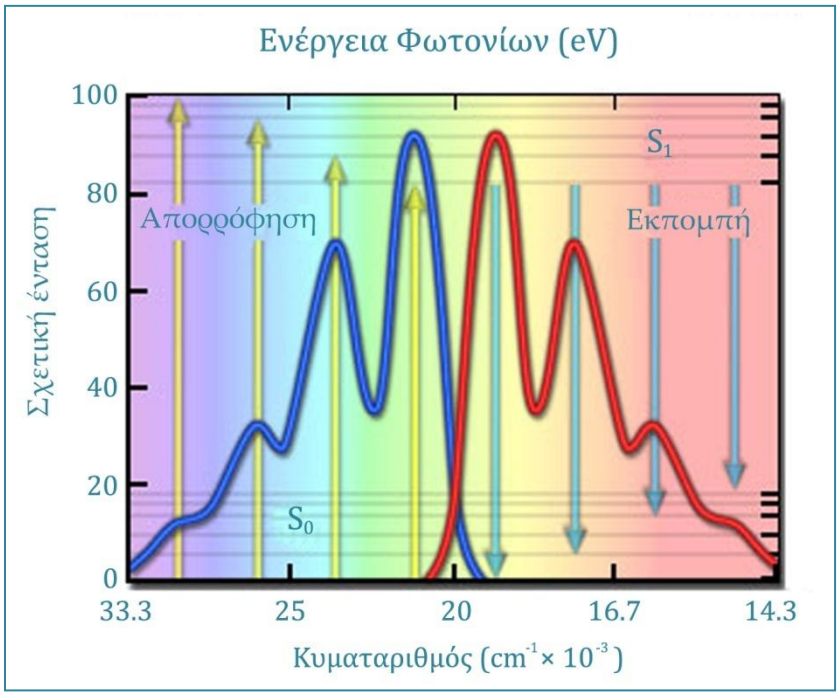
Σχήμα 2.1: *Παρατήρηση Stokes*

2.2.2. Φάσματα διέγερσης και εκπομπής

Όπως έχει ήδη περιγραφεί στο κεφάλαιο 1 το φαινόμενο του φθορισμού λαμβάνει χώρα όταν κάποιο οργανικό ή ανόργανο μόριο διεγερθεί απορροφώντας ενέργεια με μορφή φωτονίων και αποδιεγερθεί επανεκπέμποντας φωτόνια χαμηλότερης ενέργειας σε χρονικό διάστημα της τάξης των 10^{-9}-10^{-7} sec. Κάθε φθορίζον μόριο έχει δύο χαρακτηριστικά φάσματα, το φάσμα διέγερσης και το φάσμα εκπομπής.

Το φάσμα διέγερσης ενός φθορίζοντος μορίου εκφράζει τη σχετική απόδοση των διαφόρων μηκών κύματος να επάγουν φθορισμό. Αναλυτικότερα, το φάσμα διέγερσης είναι η γραφική παράσταση της έντασης του επαγόμενου φθορισμού (κάθετος άξονας) για διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης ως προς το μήκος κύματος διέγερσης (οριζόντιος άξονας). Το φάσμα διέγερσης ενός φθορίζοντος μορίου θα έπρεπε να συμπίπτει με το φάσμα απορρόφησής του όπως αυτό θα λαμβάνονταν από ένα φασματοφωτόμετρο. Κάτι τέτοιο όμως πολύ σπάνια συμβαίνει λόγω κατασκευαστικών διαφορών των οργάνων.

Το φάσμα εκπομπής εκφράζει την ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού στα διάφορα μήκη κύματος όταν το μόριο ακτινοβοληθεί από κάποιο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Το φάσμα εκπομπής ουσιαστικά είναι η φασματική ανάλυση του εκπεμπόμενου φθορισμού. Η κβαντική απόδοση (ο αριθμός των κβάντων που εκπέμπονται προς τα κβάντα που απορροφούνται) και το σχήμα του φάσματος εκπομπής είναι ανεξάρτητα των μηκών κύματος διέγερσης. Η ένταση όμως του φθορισμού εξαρτάται από το μήκος κύματος διέγερσης αφού όσο λιγότερη ενέργεια απορροφήσει τόσο λιγότερη και θα εκπέμψει.



Σχήμα 2.2: *Κατοπτρικά φάσματα διέγερσης – εκπομπής, Stokes' shift*

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.2. υπάρχουν κάποια μήκη κύματος στα οποία το φάσμα διέγερσης υπερκαλύπτει το φάσμα εκπομπής. Επίσης λόγω απώλειας ενέργειας κατά την παραμονή στη μονήρη διεγερμένη κατάσταση το φάσμα διέγερσης είναι μετατοπισμένο προς μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με το φάσμα διέγερσης (Stokes' shift = 10^7 $(1/\lambda_{ex} - 1/\lambda_{em})$. Τα φάσματα διέγερσης είναι κατοπτρικά των φασμάτων εκπομπής. Ύπαρξη ζωνών στο φάσμα εκπομπής που δεν έχουν κατοπτρικές στο φάσμα υποδεικνύουν σκέδαση ή ύπαρξη προσμίξεων[5].

2.2.3. Διάρκεια ζωής φθορισμού

Εκτός από τα φάσματα διέγερσης, εκπομπής και την κβαντική απόδοση φθορισμού ένα άλλο χαρακτηριστικό μέγεθος για κάθε φθορίζον μόριο είναι η διάρκεια ζωής φθορισμού. Η διάρκεια φθορισμού τ ορίζεται ως ο μέσος χρόνος παραμονής των φθοριζόντων μορίων στην πρώτη μονήρη διεγερμένη κατάσταση. Η πιθανότητα να βρεθεί ένα μόριο στη μονήρη διεγερμένη κατάσταση μετά από χρόνο t δίνεται από τη σχέση $e^{-t/\tau}$. Ο αριθμός των μορίων $[S_1]$ τα οποία παραμένουν μετά από χρόνο t στη μονήρη διεγερμένη κατάσταση όταν κατά τη διέγερση ο αριθμός των μορίων αυτών ήταν $[S_1]_0$ είναι $[S_1]=[S_1]_0$ $e^{-t/\tau}$. Επίσης η ένταση φθορισμού τη χρονική στιγμή t μετά τη διέγερση και όταν κατά τη διέγερση η ένταση ήταν I_0 είναι $I= I_0$ $e^{-t/\tau}$ [5].

2.2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την ένταση του φθορισμού

Ο τύπος ο οποίος δίνει την σχέση συγκέντρωσης φθορίζουσας ουσίας-έντασης φθορισμού είναι: $F=\phi I_0(1-e^{-\varepsilon bc})$ όπου ϕ είναι η κβαντική απόδοση, I_0 είναι η ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, ε είναι ο συντελεστής μοριακής εξασθένισης, b είναι το μήκος του οπτικού δρόμου και c είναι συγκέντρωση της φθορίζουσας ουσίας. Από την παραπάνω εξίσωση φαίνεται ότι η ένταση του φθορισμού επηρεάζεται από τέσσερις βασικούς παράγοντες

- Την κβαντική απόδοση ϕ. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της ϕ τόσο μεγαλύτερος θα είναι ο εκπεμπόμενος φθορισμός.
- Την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας I_0. Θεωρητικά, όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση ακτινοβόλησης τόσο μεγαλύτερος θα είναι ο φθορισμός. Στην πράξη, ακτινοβολία διέγερσης μεγάλης ισχύος μπορεί να προκαλέσει φωτολεύκανση του δείγματος και κατά συνέπεια μείωση της ισχύος του εκπεμπόμενου φθορισμού
- Το συντελεστή μοριακής απορρόφησης, ε. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εκπομπή φθορισμού είναι η διαδικασία της απορρόφησης. Έτσι όσο μεγαλύτερος είναι ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης τόσο μεγαλύτερη θα είναι η ένταση φθορισμού της ουσίας.
- Τη συγκέντρωση της φθορίζουσας ένωσης.

Για πολύ αραιά διαλύματα ($\varepsilon bc<0.05$) η προηγούμενη σχέση παίρνει τη μορφή $F=K\phi I_0\varepsilon bc$. Έτσι, η καμπύλη του φθορισμού συναρτήσει της συγκέντρωσης, θα είναι γραμμική στις χαμηλές συγκεντρώσεις και θα φθάνει σε ένα μέγιστο για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις η απορρόφηση του εκπεμπόμενου φθορισμού γίνεται τόσο έντονη, ώστε τελικά η ένταση να μειώνεται. Η γραμμικότητα της έντασης ως προς τη συγκέντρωση ισχύει για μια ευρεία περιοχή τιμών συγκέντρωσης. Γενικότερα η γραμμικότητα θα διατηρείται μέχρι η συγκέντρωση των φθοριζουσών ουσίων να είναι αρκετά μεγάλη, ώστε να απορροφούν σημαντικά ποσοστά της ακτινοβολίας διέγερσης και εκπομπής[5].

2.3. Διαγνωστικές μέθοδοι φασματοσκοπίας φθορισμού

Η μεταβολή του φθορισμού που οφείλεται σε φυσιολογικές, μορφολογικές ή βιολογικές αλλαγές των ιστών, αποτελεί την κοινή βάση αναφοράς όλων των φασματοσκοπικών διαγνωστικών μεθόδων φθορισμού. Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι φθορισμού μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την

προέλευση του μορίου του οποίου ο φθορισμός θα δώσει την διαγνωστική πληροφορία. Το μόριο αυτό μπορεί να είναι είτε ενδογενές (αυτοφθορισμός), είτε εξωγενές. Στην περίπτωση που το μόριο είναι ενδογενές η μεταβολή στο σήμα φθορισμού μπορεί να οφείλεται σε έναν ή περισσότερους από τους παρακάτω λόγους.

- Η συγκέντρωση του φθορίζοντος μορίου είναι διαφορετική μεταξύ των υγιών και πασχόντων ιστών (διαφορετική ένταση φθορισμού).
- Το μικροπεριβάλλον του φθορίζοντος μορίου στους δύο τύπους ιστών είναι διαφορετικό (διαφορετική ένταση φθορισμού).
- Το μόριο λόγο της συνεπαγόμενης της ασθένειας διαφορετικής βιοχημείας έχει υποστεί μεταβολές οι οποίες μπορεί να μεταφράζονται σε διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής ή/και σε διαφορετική ένταση φθορισμού.

Στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί ένα εξωγενές φθορίζον μόριο αυτό πρέπει να συγκεντρώνεται επιλεκτικά στον πάσχοντα ιστό. Σε αυτήν την περίπτωση η διαφοροποίηση των ιστών υφίσταται στη διαφορετική ένταση σημάτων φθορισμού[4]. Γενικά στη μέθοδο αυτή έχει αποδοθεί ο όρος φωτοδιάγνωση, ενώ στην περίπτωση που ο ιχνηθέτης φθορισμού είναι κάποιος φωτοευαισθητοποιητής η μέθοδος ονομάζεται φωτοδυναμική διάγνωση. Αν και η έρευνα γύρω από αυτούς τους ιχνηθέτες φθορισμού αποτελεί ένα από τα κύρια πεδία μετωπικής έρευνας σήμερα, τα περισσότερα διαγνωστικά συστήματα τα οποία έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιούν φωτοευαισθητοποιητές.

2.3.1. Ενδογενή φθορίζοντα μόρια

Τα κυριότερα ενδογενή φθορίζοντα μόρια παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1. Το μέγιστο μήκος κύματος διέγερσής τους κυμαίνεται μεταξύ των 250 και 450 nm, από την υπεριώδη έως και την ορατή δηλαδή περιοχή. Το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής αυτών των βιομορίων αντίθετα εκτείνεται σε μία πολύ μεγαλύτερη φασματικά περιοχή, από τα 280 έως τα 700 nm, από την υπεριώδη δηλαδή έως την κοντινή στην υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2.1 τα βιολογικά αυτά μόρια μπορούν να διακριθούν σε πέντε κατηγορίες ανάλογα με τη δομή τους ή τη λειτουργία τους στους ιστούς. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι δομικές μονάδες των πρωτεϊνών, τα αμινοξέα. Σε δερματικούς[7] και καρκίνους του γαστρεντερικού συστήματος[8] έχει

παρατηρηθεί ότι ο φθορισμός που οφείλεται σε αυτά τα μόρια και κυρίως στην τρυπτοφάνη αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με το φθορισμό των αντίστοιχων υγιών ιστών. Μέχρι στιγμής όμως δεν έχουν διευρευνηθεί οι μηχανισμοί στους οποίους μπορεί να αποδοθεί αυτή η αύξηση της συγκέντρωσης των αμινοξέων.

Πίνακας 2.1: *Ενδογενή φθορίζοντα μόρια*[6]

Ενδογενές φθορίζον μόριο	Μέγιστο Διέγερσης (nm)	Μέγιστο Εκπομπής (nm)
Αμινοξέα		
Τρυπτοφάνη	280	350
Τυροσίνη	275	300
Φαινυλαλανίνη	260	280
Δομικές πρωτεΐνες		
Κολλαγόνο	325, 360	400, 405
Ελαστίνη	290, 325	340, 400
Ένζυμα και Συνένζυμα		
FAD, φλαβίνες	450	535
NADH	290, 351	440, 460
NADPH	336	464
Λιπίδια		
Φωσφολιπίδια	436	540, 560
Λιποφουσκίνη	340-395	540, 430-460
Κηροειδής	340-395	430-460, 540
Πορφυρίνες	400-450	630, 690

Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα βιομόρια τα οποία αποτελούν τη δομική μήτρα των ιστών, οι δομικές πρωτεΐνες. Ο φθορισμός αυτών των πρωτεϊνών οφείλεται κυρίως στις διασυνδέσεις των αμινοξέων από τα οποία αποτελούνται. Ο σχηματισμός προκαρκινικών και καρκινικών μορφωμάτων συνοδεύεται συνήθως από σημαντική μείωση στις διασυνδέσεις των πρωτεϊνών αυτών και κατά συνέπεια και της έντασης φθορισμού που προέρχεται από αυτά[9,7]. Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται κυρίως στην αυξημένη συγκέντρωση μεταλλοπρωτεϊνασών ή/και άλλων ενζύμων τα οποία θεωρούνται υπεύθυνα για την αποδόμηση αυτών των πρωτεϊνών[7].

Τα ένζυμα και τα συνένζυμα, τα μόρια δηλαδή τα οποία σχετίζονται με τον κυτταρικό μεταβολισμό αποτελούν επίσης μία κατηγορία φθοριζόντων μορίων. Ο σχηματισμός προκαρκινικών και καρκινικών μορφωμάτων συνοδεύεται από έντονη μεταβολική δραστηριότητα και σημαντικές αλλαγές στην αναλογία αυτών των μιτοχονδριακών φθοριζουσών ενώσεων ως προς την οξειδωμένη τους μορφή στην οποία δε φθορίζουν[10].

Οι πορφυρίνες είναι πρόδρομα μόρια στην πορεία σχηματισμού της αίμης. Η συγκέντρωση των πορφυρινών αυξάνεται στους προκαρκινικούς και καρκινικούς ιστούς. Παράλληλα όμως αυξάνεται και η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης οπότε σε αρκετές περιπτώσεις δεν παρατηρείται τόσο σημαντική αύξηση στην ένταση του σήματος φθορισμού αφού η εκπεμπόμενη ακτινοβολία απορροφάται από την αιμοσφαιρίνη[9].

Τέλος παρόλο που κάποιες βιταμίνες και λιπίδια είναι φθορίζοντα μόρια μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν μελέτες που να έχουν δείξει ότι τα μόρια αυτά μπορούν να αξιοποιηθούν για διαγνωστικούς λόγους.

2.3.2. Εξωγενή φθορίζοντα μόρια

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα εξωγενή χρωμοφόρα μόρια τα οποία χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση καρκίνου με φθορισμό είναι φωτοευαισθητοποιητές, ενώσεις δηλαδή οι οποίες χρησιμοποιούνται και στη φωτοδυναμική θεραπεία. Οι κύριοι λόγοι της χρήσης φωτοευαισθητοποιητών στη διάγνωση φθορισμού με εξωγενή χρωμοφόρα είναι η επιλεκτικότητα των φωτοευαισθητοποιητών ως προς τα καρκινικά κύτταρα καθώς και το ότι οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές φθορίζουν[4].

Με τη χρήση εξωγενών χρωμοφόρων τα οποία κατακρατούνται επιλεκτικά από τους προκαρκινικούς ή καρκινικούς ιστούς επιτυγχάνεται πολύ σημαντική αύξηση της ισχύος του εκπεμπόμενου φθορισμού σε σχέση με την ισχύ του εκπεμπόμενου φθορισμού από ενδογενή χρωμοφόρα μόρια[11]. Για αυτό το λόγο, η διάκριση των καρκινικών ή προκαρκινικών και υγιών ιστών είναι πολύ πιο εύκολη, ενώ αποφεύγεται η πολύ μεγάλη ηλεκτρονική ενίσχυση του σήματος και τα τεχνικά προβλήματα που αυτή συνεπάγεται στην επεξεργασία του[12].

Η χρήση εξωγενών χρωμοφόρων ως διαγνωστικών ιχνηθετών όμως παρουσιάζει και σημαντικά μειονεκτήματα αφού οι ενώσεις αυτές μεταφέρουν στη διαγνωστική μέθοδο και όλες τις παρενέργειες τους. Έτσι, παρόλο που οι

φωτοευαισθητοποιητές, στις δόσεις τουλάχιστον που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία και διάγνωση, είναι μη τοξικές ενώσεις δεν ενδείκνυνται για επαναλαμβανόμενη εφαρμογή, όπως απαιτούν οι εξετάσεις ρουτίνας ενός ασθενή που ανήκει στις ομάδες υψηλού κινδύνου. Ακόμη οι ασθενείς, όπως και μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία, έτσι και μετά τη φωτοδυναμική διάγνωση θα πρέπει να προφυλάσσονται από την ηλιακή ακτινοβολία για το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την απέκκριση του φωτοευαισθητοποιητή από τους υγιείς ιστούς, γεγονός το οποίο υποβαθμίζει σημαντικά την ποιότητα ζωής τους[1,13].

Η ευαισθησία και η εξειδίκευση της φωτοδυναμικής διάγνωσης με αιματοπορφυρίνη και παράγωγά της ή με ALA ξεπερνά για αρκετούς τύπους καρκίνου όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου, γυναικολογικών καρκίνων, μη μελανωματικών καρκίνων του δέρματος, το 95%[14-16]. Πολύ σημαντική είναι επίσης η συνεισφορά της φωτοδυναμικής διάγνωσης και σε πολύ ευαίσθητα όργανα όπως ο εγκέφαλος, ή όργανα όπως η ουροδόχος κύστη, οι πνεύμονες και ο οισοφάγος στα οποία η ακτινοβόληση της πάσχουσας περιοχής πρέπει να είναι πολύ καλά οροθετημένη προκειμένου να αποφευχθούν παρενέργειες[17].

2.3.3. Περιορισμοί των διαγνωστικών μεθόδων φθορισμού

Η φασματοσκοπία φθορισμού μέσα σε «θολά» μέσα όπως είναι ο ιστός εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τη συγκέντρωση και τη διασπορά του φθορίζοντος μορίου στον ιστό και από το βιοχημικό/βιοφυσικό μικροπεριβάλλον. Οι επιθηλιακοί π.χ. ιστοί αποτελούνται από δύο κύρια στρώματα την επιθηλιακή μεμβράνη και τον υποβλενογόνο στα οποία η συγκέντρωση των ενδογενών φθοριζόντων μορίων διαφέρει σημαντικά. Σημαντικά όμως διαφέρει και η σύστασή τους ως προς άλλα βιομόρια τα οποία μπορεί να μη δίνουν φθορισμού αλλά μπορεί να απορροφήσουν ή να σκεδάσουν την ακτινοβολία διέγερσης ή εκπομπής μεταβάλλοντας σημαντικά τον εκπεμπόμενο φθορισμό[6].

Οι δύο αυτές παράμετροι που επηρεάζουν ή και σε ορισμένες περιπτώσεις δεν επιτρέπουν τη μέτρηση του εκπεμπόμενου φθορισμού, εξαρτώνται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Η απορρόφηση και η σκέδαση μπορούν να επηρεάσουν τόσο την ακτινοβολία διέγερσης όσο και την ακτινοβολία εκπομπής, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο στα φάσματα διέγερσης και εκπομπής κορυφές ή κοιλάδες οι οποίες δεν θα υπήρχαν εάν το φθορίζον μόριο βρίσκονταν διαλυμένο σε ένα μη θολό μέσο. Οι δύο αυτές παράμετροι επηρεάζουν επίσης και το βάθος στο οποίο θα φτάσει η ακτινοβολία διέγερσης αλλά και την ένταση του σήματος εκπομπής.

Η απορρόφηση είναι πολύ ισχυρή στην περιοχή του υπεριώδους και στην υπέρυθρη ενώ στην περιοχή του ορατού αυξάνεται με μείωση του μήκους κύματος. Αντίθετα, είναι σημαντικά μικρότερη στην κόκκινη περιοχή του ορατού και στο εγγύς υπέρυθρο. Η σκέδαση μειώνεται με μείωση του μήκους κύματος, με αποτέλεσμα ο συντελεστής σκέδασης να είναι πολύ μικρότερος της απορρόφησης στην υπεριώδη περιοχή, αλλά πολύ μεγαλύτερος της απορρόφησης στο εγγύς υπέρυθρο. Στην ορατή περιοχή του φάσματος και το μακράν υπέρυθρο οι συντελεστές έχουν περίπου ίσες τιμές[6,12].

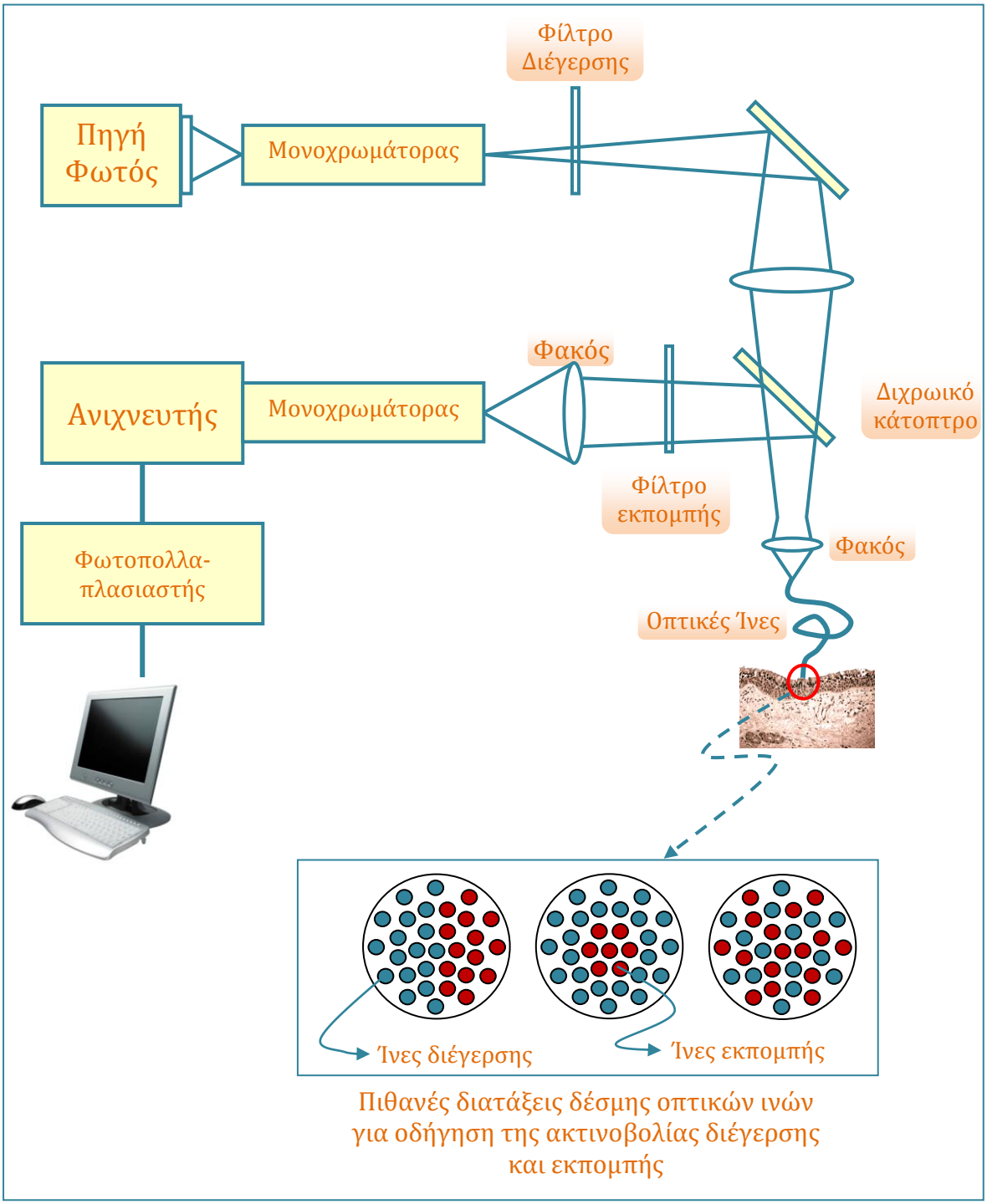
2.3.4. Σημειακά συστήματα καταγραφής φθορισμού

Τα σημειακά συστήματα καταγραφής φθορισμού (Fluorescence Point Monitoring Systems) μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο in vitro όσο και in vivo. Αν και αρκετές είναι οι διαφορές που παρουσιάζουν μεταξύ τους, ανάλογα με το αν προορίζονται για να καταγράψουν αυτοφθορισμό ή φθορισμό ενός ιχνηθέτη καθώς επίσης και για το εάν θα καταγράψουν εντάσεις σε κάποια συγκεκριμένα μήκη κύματος ή φάσματα εκπομπής, κατασκευαστικά αποτελούνται από τρία επιμέρους συστήματα. Το σύστημα ακτινοβολίας διέγερσης, το σύστημα ανίχνευσης του φθορισμού και το σύστημα οδήγησης της ακτινοβολίας διέγερσης και εκπομπής[6] (Σχήμα 2.3).

Η ακτινοβολία διέγερσης μπορεί να προέρχεται είτε από πηγές υπεριώδους και ορατού φωτός όπως είναι οι λάμπες τόξου (xenon, mercury), είτε από πηγές μονοχρωματικού φωτός lasers. Τα lasers μπορεί να είναι συνεχή όπως π.χ. ιόντων αργού (UV περιοχή), ηλίου-καδμίου (442 nm) ή παλμικά όπως π.χ. το laser αζώτου (337 nm). Τα lasers όντας σύμφωνες πηγές συνδέονται εύκολα με οπτικές ίνες οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά της ακτινοβολίας στο βιολογικό δείγμα. Επίσης επειδή είναι μονοχρωματικές πηγές δε χρειάζονται φίλτρα ή μονοχρωμάτορες για την απομάκρυνση των μη επιθυμητών μηκών κύματος. Τα παλμικά lasers (ns) επίσης, παρέχουν τη δυνατότητα καταγραφής του σήματος φθορισμού μεταξύ δύο διαδοχικών παλμών, όταν δηλαδή δεν εκπέμπεται φως από την πηγή. Η καταγραφή του εκπεμπόμενου φθορισμού, το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, υπερτερεί λόγω του ότι έτσι απορρίπτεται χωρίς επιπλέον οπτικά συστήματα ο θόρυβος που προέρχεται από την ανάκλαση και σκέδαση της ακτινοβολίας διέγερσης από το βιολογικό δείγμα.

Το μειονέκτημα των lasers είναι ότι όντας μονοχρωματικές πηγές μπορούν να διεγείρουν μόνο κάποιο φωτοευαισθητοποιητή ή κάποιο συγκεκριμένο ενδογενές

χρωμοφόρο τα οποία απορροφούν στο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Κατά συνέπεια εάν παράλληλα πρέπει να μελετηθούν και κάποια άλλα χρωμοφόρα ή φωτοευαισθητοποιητές απαιτείται ένα άλλο laser εν αντιθέσει με τις πηγές λευκού φωτός οι οποίες μπορούν να δώσουν πολλά μήκη κύματος αρκεί να συνδυαστούν με κατάλληλα φίλτρα.



Σχήμα 2.3: *Σχηματικό διάγραμμα ενός σημειακού συστήματος καταγραφής φθορισμού*

Στην περίπτωση που η ακτινοβολία διέγερσης προέρχεται από κάποιο laser θα οδηγηθεί απευθείας μέσω οπτικών ινών στο βιολογικό υλικό. Στην περίπτωση που η ακτινοβολία διέγερσης προέρχεται από κάποια πηγή λευκού φωτός, το φως θα περάσει καταρχήν από κάποιους φακούς προκειμένου να εστιαστεί. Εν συνεχεία προκειμένου να απομονωθούν το επιθυμητό μήκος κύματος ή η επιθυμητή περιοχή θα περάσει από μονοχρωμάτορα ή/και φίλτρα. Η ακτινοβολία διέγερσης πλέον θα οδηγηθεί μέσω φακών, κατόπτρων και ενός διχρωικού κατόπτρου στην οπτική ίνα[14].

Οι οπτικές ίνες οι οποίες μεταφέρουν την ακτινοβολίας διέγερσης και εκπομπής αποτελούνται από χαλαζία (και για την περιοχή 350-650 nm όπου και δουλεύουν αυτά τα συστήματα) έχουν συνήθως διάμετρο από 0.5-1 mm. Το ενδοσκόπιο το οποίο χρησιμοποιείται για τη μεταφορά της ακτινοβολίας από και προς το βιολογικό δείγμα περιέχει συνήθως μία δέσμη ινών. Σε αυτή τη δέσμη οι ίνες που μεταφέρουν την ακτινοβολία από και προς το δείγμα είναι διατεταγμένες συνήθως με τρεις τρόπους.

- Στο κέντρο υπάρχουν οι ίνες που μεταφέρουν την ακτινοβολία διέγερσης και περιφερειακά οι ίνες που λαμβάνουν την ακτινοβολία εκπομπής.
- Οι ίνες που μεταφέρουν την ακτινοβολία διέγερσης είναι αντιδιαμετρικά διατεταγμένες ως προς τις ίνες που λαμβάνουν την ακτινοβολία εκπομπής.
- Δίπλα από κάθε ίνα που μεταφέρει ακτινοβολία διέγερσης υπάρχει και μία ίνα συλλογής της ακτινοβολίας εκπομπής.

Η ακτινοβολία εκπομπής που θα συλλεχθεί θα οδηγηθεί πάλι μέσω ενός συστήματος φακών και κατόπτρων σε φίλτρα τα οποία θα αποκόψουν τη σκεδαζόμενη και ανακλώμενη ακτινοβολία διέγερσης. Ανάλογα με το είδος της πληροφορίας που απαιτείται από το σύστημα η ακτινοβολία εκπομπής θα οδηγηθεί στο αντίστοιχο σύστημα ανάλυσης και ενίσχυσης. Το σύστημα ανάλυσης μπορεί να είναι ένας μονοχρωμάτορας ενώ το τελικό σήμα μπορεί να ενισχυθεί μέσω φωτοπολλαπλασιαστή ή φωτοδιόδου.

Τα σημειακά συστήματα καταγραφής φθορισμού τα οποία χρησιμοποιούν πηγές λευκού φωτός και μονοχρωμάτορες τόσο για τη διέγερση όσο και για την ανάλυση εκπομπής, έχουν δηλαδή τη δομή των φασματοφωτομέτρων φθορισμού, μπορούν να δώσουν έναν πολύ σημαντικό όγκο πληροφορίας σχετικά με τη σύσταση των ιστών. Για αυτό και η ευαισθησία κει εξειδίκευση που παρουσιάζουν είναι πάρα πολύ υψηλές. Το σημαντικό μειονέκτημά τους όμως είναι ότι με αυτά τα συστήματα δε μπορεί να γίνει σάρωση ολόκληρων οργάνων ή μεγάλων περιοχών, αλλά μόνο

περιοχών οι οποίες μετά από απλή ενδοσκοπία (παρατήρηση με λευκό φως) κρίθηκαν ως πιθανώς προβληματικές[6].

2.3.5. Επεξεργασία σήματος σημειακών συστημάτων καταγραφής φθορισμού

Τα δεδομένα τα οποία προκύπτουν μετά την εξέταση των ιστών από ένα διαγνωστικό σύστημα φασματοσκοπίας φθορισμού εξαρτώνται καταρχήν από τον τύπο του συστήματος. Έτσι π.χ. ένα σύστημα με έναν απλό ανιχνευτή και κάποια φίλτρα μπορεί να μας δώσει πληροφορία μόνο για κάποιες συγκεκριμένες περιοχές του φάσματος εν αντιθέσει με ένα φασματοσκοπικό σύστημα το οποίο θα μας δώσει πληροφορία για μία ευρεία περιοχή μηκών κύματος.

Και στις δύο περιπτώσεις πάντως υπεισέρχονται διάφοροι παράγοντες οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν το σήμα και κατά συνέπεια την ορθότητα της εξαγόμενης πληροφορίας. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι μεταβολές στη γεωμετρία του ιστού, στην ένταση της ακτινοβολίας διέγερσης, στη συγκέντρωση μορίων που απορροφούν την ακτινοβολία διέγερσης ή εκπομπής κ.λ.π. Για αυτό το λόγο υπάρχουν διάφορες μέθοδοι επεξεργασίας των σημάτων φθορισμού προκειμένου να μειωθεί όσο το δυνατό περισσότερο η επίδραση αυτών των παραγόντων.

Προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο παράγοντας μεταβολής της ακτινοβολίας διέγερσης λαμβάνονται τρεις ή περισσότερες μετρήσεις. Από αυτές υπολογίζεται η μέση τιμή και αυτή είναι που λαμβάνεται υπόψην στη στατιστική επεξεργασία για την κατηγοριοποίηση των ιστών[18].

Για να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση των οπτικών ιδιοτήτων των ιστών, συνήθως υπολογίζεται η ένταση του φθορισμού όχι μόνο σε μία αλλά σε περισσότερες περιοχές του φάσματος. Πιο αναλυτικά χρησιμοποιείται ο λόγος της έντασης σε μία περιοχή του φάσματος όπου και εμφανίζεται το μέγιστο, και σε μία κοντινή περιοχή στην οποία η ένταση είναι χαμηλή (αλλά δε μεταβάλλονται κατά πολύ οι ιδιότητες των ιστών)[9]. Διαιρώντας αυτές τις δύο εντάσεις η επίδραση των παραγόντων απορρόφησης, σκέδασης και γεωμετρίας του ιστού συνήθως ελαχιστοποιούνται.

Μία άλλη μεθοδολογία προτείνει κανονικοποίηση των σημάτων φθορισμού υπόπτων για βλάβη ιστών βάσει των εντάσεων υγιών ιστών προκειμένου να διαφοροποιηθούν οι υγιείς από τους καρκινικούς ιστούς. Κανονικοποίηση σημάτων ή και φασμάτων μπορεί επίσης να γίνει και βάσει της μέσης τιμής έντασης μίας περιοχής στην οποία η ένταση είναι στα όρια του θορύβου του συστήματος[18]. Ένα τέτοιο είδος κανονικοποίησης απαλλάσσει ουσιαστικά τα δεδομένα από την

επίδραση του θορύβου. Κανονικοποίηση των σημάτων φθορισμού γίνεται προκειμένου να ενταχθούν ίδιου τύπου ιστοί αλλά με διαφορετικές γεωμετρίες, ή ίδιου τύπου ιστοί αλλά από διαφορετικούς ασθενείς στην ίδια ομάδα επεξεργασίας.

Αυτές οι μεθοδολογίες επεξεργασίας του σήματος χρησιμοποιούνται από συστήματα που καταγράφουν είτε φάσματα, είτε σήματα εντάσεων σε κάποιες συγκεκριμένες περιοχές μόνο. Επίσης, οι συγκεκριμένες μεθοδολογίες μπορούν να εφαρμοστούν τόσο από συστήματα αυτοφθορισμού όσο και από συστήματα τα οποία βασίζονται στην καταγραφή φθορισμού εξωγενούς χρωμοφόρου.

2.4. Βιβλιογραφία

1. I. Bigio and J. Mourant, “Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy”, Phys Med Biol, 42, 803-814, 1997.
2. J. F. W. Herschel, “On a case of superficial colour presented by a homogenous liquid internally colourless”, Philosophical Transaction of the Royal Society of London, 135, 143-145, 1845.
3. G. G. Stokes, “On the change of refrangibility of light”, Philosophical Transaction of the Royal Society of London, 142, 463-562, 1852.
4. S. Andersson-Engels, C. af Klinterberg, K. Svanberg and S. Svanberg, “In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics”, Phys Med Biol, 42, 815-824, 1997.
5. J.R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, Second Edition, Kluver Academic, 1999, New York.
6. N. Ramanujam, “Fluorescence spectroscopy of neoplasmatic and non-neoplasmatic tissues”, Neoplasia, 2, 89-117, 2000.
7. L. Brancaleon, A. J. Durkin, J. H. Tu, G. Manaker, J. D. Fallon, N. Kollias, “In vivo fluorescence spectroscopy of non melanoma skin cancer”, Photochem Photobiol, 73, 178-183, 2001.
8. B. H. Li, S. S. Xie, “Autofluorescence excitation-emission matrices for diagnosis of colonic cancer”, World J Gastroentero, 11, 3931-3934, 2005.
9. B. Mayinger, M. Jordan, T. Horbach, P. Horner, C. Gerlach, S. Mueller, W. Hohenberger, E. Hahn, “Evaluation of in vivo endoscopic autofluorescence spectroscopy in gastric cancer”, Gastrointest Endosc, 59, 191-198, 2004.
10. K. Sokolov, M. Follen, and R. Richards-Kortum, “Optical spectroscopy for detection of neoplasia” Curr Opin Chem Biol, 6, 651-658, 2002.
11. T. Wang, J. Van Dam, “Optical Biopsy: A new frontier in Endoscopic detection and diagnosis”, Clin Gastroentero and Hepatol, 2, 744-753, 2004.
12. J. Haringsma, G. N. J. Tytgat, “Fluorescence and autofluorescence”, Best Pract Res Cl Gastroentero, 13, 1-10, 1999.

13. R. R. Allison, R. Cuenca, G. H. Downie, M. E. Randall, V. S. Bagnato, C. H. Sibata, “PD/PDT for gynecological disease: A clinical review”, Photodiag Photodyn Ther, 2, 51-63, 2005.

14. R. Da Costa, “Spectroscopy and fluorescence in esophageal diseases”, Best Pract Res Cl Gastroentero, 20, 41-57, 2006.

15. H. Messmann, E. Endlicher, C.M. Gelbmann, J. Scholmerich, “Fluorescence endoscopy and photodynamic therapy”, Digest Liver Dis, 34, 754-761, 2002.

16. R. Hage, P. R. Galhanone, R. A. Zangaro, K. C. Rodrigues, M. T. T. Pacheco, A. A. Martin, M. M. Netto, F. A. Soares, I. W. da Cunha, “Using the laser-induced fluorescence spectroscopy in the differentiation between normal and neoplasmatic human breast tissue”, Lasers Med Sci, 18, 171-176, 2003.

17. M. Stringer, K. Moghissi, “Photodiagnosis and fluorescence imaging in clinical practice”, Photodiag Photodyn Ther, 1, 9-12, 2004.

18. E. Alexandratou, M. Kyriazi, D. Yova, S. Grafe, T. Trebst, A. Johansson, J. Svensson, K. Svanberg, N. Bendsoe, S. Anderson-Engels, “Distribution studies of m-THPC thermogel in a murine mon-melanoma skin cancer tumor model by fluorescence spectroscopic and imaging techniques”, Optical methods for tumor treatment and detection: Mechanisms and techniques in photodynamic therapy, SPIE, 6139, 91-100, 2006.

Κεφάλαιο 3

Συστήματα Lasers στη Φωτοδυναμική Θεραπεία

3.1. Εισαγωγή

Η επιλογή της κατάλληλης πηγής φωτεινής ακτινοβολίας στη φωτοδυναμική θεραπεία είναι τόσο σημαντική όσο και η επιλογή του φωτοευαισθητοποιητή και του τρόπου χορήγησής του. Η επιλογή αυτή καθορίζεται κυρίως από τρεις παράγοντες:

- το φάσμα απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή (κύριες κορυφές απορρόφησης),
- το βάθος στο οποίο απαιτείται να διεισδύσει το φως (βάθος / ύψος του όγκου),
- το σημείο στο οποίο βρίσκεται ο όγκος (και άρα τον τρόπο με τον οποίο μπορεί το φως να μεταφερθεί σε αυτόν)[1,2].

Το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας αυξάνεται ανάλογα με το μήκος κύματος (φωτεινή ακτινοβολία 630 nm μπορεί να διεισδύσει μέχρι 5mm, 700 nm μέχρι 1 cm, και 800 nm περίπου 2 cm)[1]. Άρα ανάλογα με το εκτιμώμενο βάθος του όγκου πρέπει να επιλεγεί και το κατάλληλο σύστημα πηγής-φωτοευαισθητοποιητή. Σε αυτόν τον παράγοντα πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη η συμφωνία ή ασυμφωνία της πηγής αφού το μη σύμφωνο φως παρουσιάζει μεγαλύτερο συντελεστή σκέδασης.

Οι πηγές φωτεινής ακτινοβολίας οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν και χρησιμοποιούνται στις εφαρμογές της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι κυρίως οι

λυχνίες και τα lasers. Αν και τα πρώτα χρόνια κλινικής εφαρμογής της φωτοδυναμικής θεραπείας οι πηγές που κυριαρχούσαν ήταν οι λυχνίες τελευταία η κατάσταση έχει πλήρως αναστραφεί. Τα lasers υπερτερούν πλέον κυρίως λόγω της δυνατότητας που παρέχουν να συνδέονται εύκολα με οπτικές ίνες οι οποίες επιτρέπουν τη μεταφορά της ακτινοβολίας μέσω ενδοσκοπίων και σε εσωτερικά όργανα. Με τα lasers είναι πολύ πιο εύκολος ο έλεγχος του εμβαδού της ακτινοβολούμενης περιοχής, της ροής ισχύος (mW/cm^2) αλλά και της συνολικής δόσης ενέργειας (J/cm^2), ενώ επίσης λόγω της μονοχρωματικότητας και της συμφωνίας του παρεχόμενου από τα lasers φωτός αυξάνεται η αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας[2].

3.2. Lasers

3.2.1. Ιστορικά στοιχεία

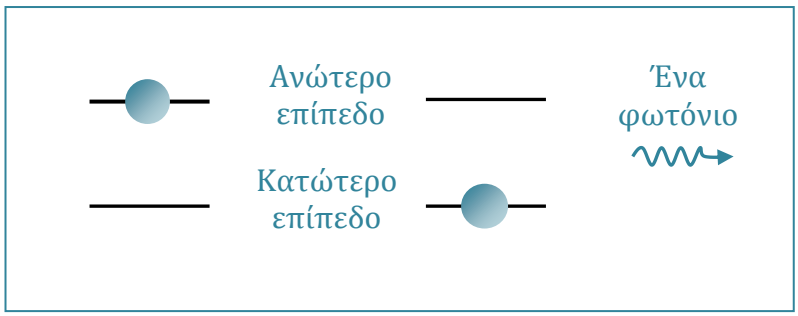
Τα lasers είναι διατάξεις σύμφωνης ενίσχυσης και παραγωγής ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων στην περιοχή του ορατού φάσματος ή κοντά σε αυτό. Ο όρος laser προέρχεται από τα αρχικά των αγγλικών λέξεων Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, οι οποίες σημαίνουν ενίσχυση φωτός μέσω εξαναγκασμένης εκπομπής ακτινοβολίας.

Ο Albert Einstein είναι αυτός ο οποίος θεωρείται ότι άνοιξε το δρόμο για την ανάπτυξη συστημάτων laser αφού ήταν ο πρώτος ο οποίος απέδειξε θεωρητικά ότι ένα άτομο ή μόριο μπορεί να αποδιεγερθεί μέσω δύο τύπων εκπομπής. Το φαινόμενο του laser, το οποίο βασίζεται στην εξαναγκασμένη εκπομπή ακτινοβολίας, περιγράφεται θεωρητικά για πρώτη φορά από τον Einstein το 1917. Παρόλα αυτά, στο φαινόμενο της εξαναγκασμένης εκπομπής δε δόθηκε ιδιαίτερη σημασία από τους φυσικούς μέχρι τον $2^{ο}$ Παγκόσμιο Πόλεμο οπότε άρχισαν να διερευνώνται οι συνθήκες κάτω από τις οποίες μπορεί να υπάρξει εξαναγκασμένη εκπομπή.

Η πρώτη δυνατότητα εφαρμογής αυτού του φαινομένου για την ενίσχυση μικροκυμάτων (maser, Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation) διατυπώθηκε θεωρητικά το 1951 από τον C. H. Thowens και επιβεβαιώθηκε πειραματικά το 1954. Το 1958 δημοσιεύθηκε το πρώτο επιστημονικό άρθρο σχετικά με τα lasers από τους A. L. Schalow και C. H. Thowens. Το 1960 ολοκληρώθηκε η κατασκευή του πρώτου laser στερεάς κατάστασης του laser ρουβινίου (694 nm) από τον H. Maiman. Ένα χρόνο αργότερα κατασκευάστηκε το πρώτο laser αερίων και τρία χρόνια αργότερα το πρώτο laser υγρών[3].

3.2.2. Αρχή λειτουργίας των lasers

Εάν ένα άτομο ή μόριο βρίσκεται σε μία κατάσταση υψηλότερη ενεργειακά από τη βασική μπορεί αυθόρμητα χωρίς κάποια εξωτερική διέγερση να επιστρέψει στη βασική του κατάσταση εκπέμποντας ένα φωτόνιο ενέργειας ίσης με την ενεργειακή διαφορά των δύο καταστάσεων $h\nu = E_2 - E_1$ όπου E_2 είναι η ενέργεια της διεγερμένης κατάστασης, E_1 είναι η ενέργεια της χαμηλότερης ενεργειακά κατάστασης, h η σταθερά του Planck και ν η συχνότητα (Σχήμα 3.1).

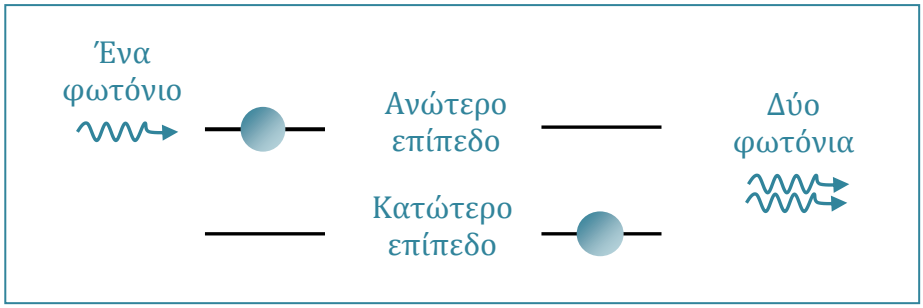


Σχήμα 3.1: *Σχηματικό διάγραμμα αυθόρμητης εκπομπής ακτινοβολίας κατά τη μετάπτωση από μία υψηλότερη σε μία χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη*

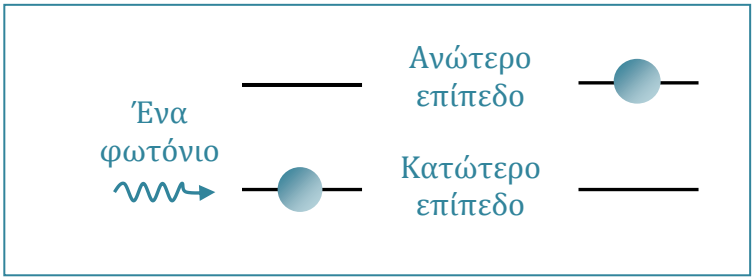
Όταν ένα άτομο ή μόριο βρίσκεται σε μία διεγερμένη κατάσταση και προσπέσει σε αυτό ένα φωτόνιο ενέργειας ίσης με την ενεργειακή διαφορά των δύο καταστάσεων τότε το άτομο ή μόριο θα αποδιεγερθεί εκπέμποντας δύο φωτόνια ενέργειας ίσης με την ενεργειακή διαφορά των δύο καταστάσεων (Σχήμα 3.2). Τα παραγόμενα φωτόνια έχουν την ίδια συχνότητα και μήκος κύματος με το προσπίπτον. Κατά κάποιον τρόπο δηλαδή, το διεγερμένο άτομο ή μόριο δρα ως ενισχυτής της προσπίπτουσας ακτινοβολίας[4].

Το κύριο πρόβλημα για να κατασκευαστεί μία διάταξη ενίσχυσης φωτός μέσω εξαναγκασμένης εκπομπής (laser), είναι ότι κάτω από κανονικές συνθήκες θερμοδυναμικής ισορροπίας τα μόρια ή άτομα τα οποία βρίσκονται σε κάποια διεγερμένη κατάσταση είναι ελάχιστα, αφού έχουν την τάση να παραμένουν σε χαμηλότερες ενεργειακά καταστάσεις. Επίσης, όταν ο αριθμός των διεγερμένων μορίων είναι πολύ μικρότερος σε σχέση με αυτά τα οποία βρίσκονται στη βασική κατάσταση, τα φωτόνια είναι πολύ πιο πιθανό να απορροφηθούν από τα μόρια της βασικής κατάστασης παρά να αλληλεπιδράσουν με αυτά τα οποία βρίσκονται στη διεγερμένη κατάσταση (Σχήμα 3.3). Άρα απαραίτητη προϋπόθεση για να υπάρξει

ενίσχυση φωτός μέσω εξαναγκασμένης εκπομπής ακτινοβολίας είναι να υπάρξει αναστροφή στον αριθμό των διεγερμένων μορίων σε σχέση με αυτά τα οποία βρίσκονται στη βασική κατάσταση[5].



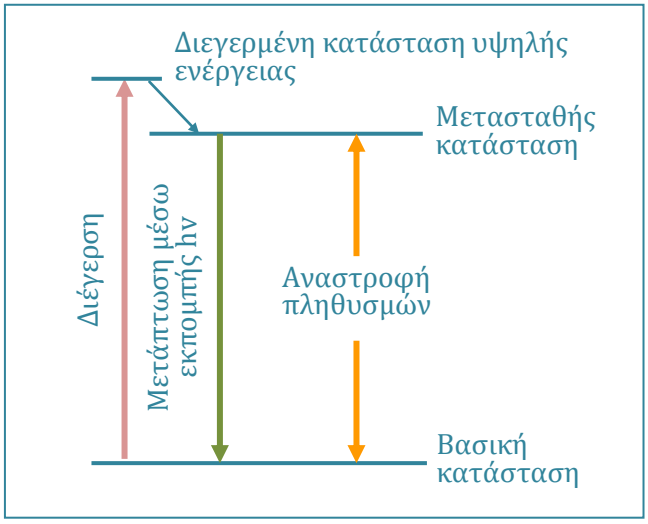
Σχήμα 3.2: *Σχηματικό διάγραμμα εξαναγκασμένης εκπομπής ακτινοβολίας μετά την απορρόφηση ενός φωτονίου ενέργειας ίσης με την ενεργειακή των δύο σταθμών*



Σχήμα 3.3: *Σχηματικό διάγραμμα μετάβασης σε ανώτερη ενεργειακά στάθμη μετά από απορρόφηση ενός φωτονίου*

Η διεργασία κατά την οποία επιτυγχάνεται αναστροφή πληθυσμού ονομάζεται αντλητική διεργασία. Ένας πολύ σημαντικός παράγοντας για την αναστροφή των πληθυσμών και κατά συνέπεια για την κατασκευή ενός laser είναι ο χρόνος παραμονής του μορίου ή ατόμου στη διεγερμένη κατάσταση. Όσο πιο μεγάλος είναι αυτός ο χρόνος τόσο πιο πιθανό είναι να αλληλεπιδράσει το διεγερμένο μόριο ή άτομο με κάποιο προσπίπτον φωτόνιο. Οι συνήθεις χρόνοι ζωής στη διεγερμένη κατάσταση είναι της τάξης των ns. Σε τόσο μικρούς χρόνους υπερισχύει το φαινόμενο της αυθόρμητης εκπομπής. Υπάρχουν όμως και κάποια υλικά οι δομικές μονάδες των οποίων εμφανίζουν αρκετά μεγαλύτερους χρόνους παραμονής στις διεγερμένες στάθμες (μετασταθείς στάθμες, metastable levels) της τάξης των ms ή μs. Χρόνο δηλαδή, αρκετό προκειμένου να διεγερθούν και πάλι οι δομικές μονάδες οι οποίες είχαν αποδιεγερθεί μέσω εξαναγκασμένης εκπομπής και έτσι να διατηρηθεί η αναστροφή πληθυσμού.

Εάν ένα υλικό διαθέτει δύο ενεργειακά επίπεδα και κάποια άτομα βρίσκονται στη διεγερμένη κατάσταση η πιθανότητα να απορροφήσουν και να εκπέμψουν ενέργεια είναι ίση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στην καλύτερη περίπτωση ο πληθυσμός που βρίσκεται στη διεγερμένη κατάσταση να γίνει ίσος με τον πληθυσμό που βρίσκεται στη βασική. Συνεπώς σε ένα τέτοιο υλικό δε θα μπορούσε ποτέ να παρατηρηθεί αναστροφή πληθυσμών και κατά συνέπεια δε θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ενεργό υλικό laser. Για να υπάρξει αναστροφή πληθυσμών λοιπόν, πρέπει να αναζητηθούν υλικά με τρία ή περισσότερα ενεργειακά επίπεδα.

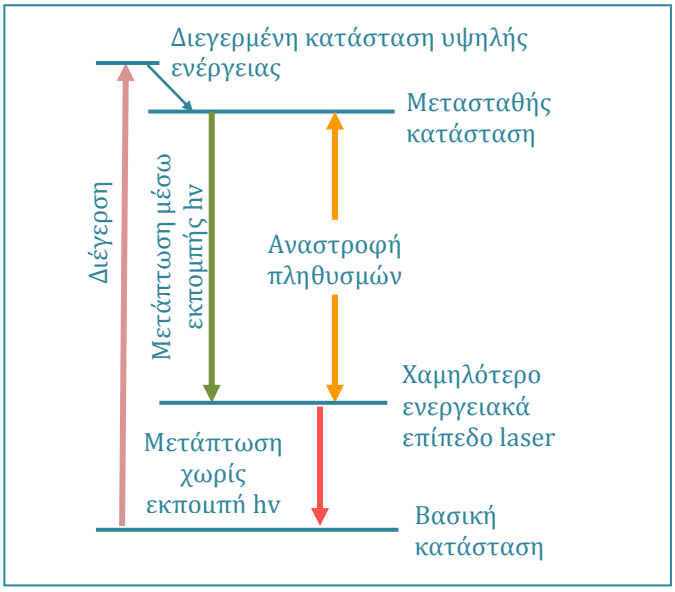


Σχήμα 3.4: *Ενεργειακό διάγραμμα laser τριών ενεργειακών επιπέδων*

Το πιο απλό διάγραμμα ενεργειακών καταστάσεων μεταξύ των οποίων μεταβαίνουν τα μόρια ή άτομα ενός υλικού κατά τη λειτουργία ενός laser φαίνονται στο Σχήμα 3.4. Σε ένα τέτοιο σύστημα η βασική κατάσταση είναι η χαμηλότερη ενεργειακά. Τα μόρια διεγείρονται και περνούν σε μία υψηλής ενέργειας διεγερμένη κατάσταση. Από αυτήν και μετά από απώλεια ενός μικρού μέρους της ενέργειάς τους περνούν στη μεταστάθή κατάσταση στην οποία παραμένουν μέχρι να αλληλεπιδράσουν με κάποιο φωτόνιο προκειμένου να μεταπέσουν στη βασική κατάσταση και να αρχίσουν έναν νέο κύκλο. Ο χρόνος παραμονής των ατόμων ή μορίων στη μεταστάθή κατάσταση είναι συνήθως 1000 φορές μεγαλύτερος από το χρόνο ζωής στην υψηλότερη ενεργειακά κατάσταση[6]. Επειδή η μετάπτωση από τη διεγερμένη κατάσταση υψηλής ενέργειας στη μεταστάθή είναι πολύ πιο γρήγορη διαδικασία σε σχέση με την απορρόφηση ενός φωτονίου, την εκπομπή δύο φωτονίων και τη μετάβαση στη βασική κατάσταση μπορεί να υπάρξει αντιστροφή πληθυσμών μεταξύ της μεταστάθούς κατάστασης και της βασικής.

Παρόλο που αυτό το σχήμα των τριών ενεργειακών επιπέδων λειτουργεί, εμφανίζει κάποια σημαντικά προβλήματα σε σχέση με τα σχήματα περισσοτέρων ενεργειακών επιπέδων. Το κυριότερο πρόβλημα είναι ότι προκειμένου τα άτομα ή μόρια του μέσου να διεγερθούν από τη βασική σε μία πολύ υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση απαιτούν προσφορά μεγάλων ποσών ενέργειας. Επίσης η αναστροφή πληθυσμών είναι δύσκολο σε αυτά τα συστήματα να διατηρηθεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Αυτός είναι και ο κύριος λόγος για τον οποίο η λειτουργία των περισσοτέρων συστημάτων τριών επιπέδων είναι παλμική και όχι συνεχής.

Στο Σχήμα 3.5 φαίνεται στο σχήμα τεσσάρων ενεργειακών επιπέδων λειτουργίας ενός laser. Η δομή είναι παρόμοια με αυτή των τριών ενεργειακών επιπέδων μόνο που αυτή τη φορά μεταξύ της μετασταθούς και της βασικής κατάστασης μεσολαβεί άλλη μία κατάσταση χαμηλής ενέργειας. Έτσι μόνο ένα πολύ μικρό κομμάτι του πληθυσμού βρίσκεται στη βασική κατάσταση και η ενέργεια που απαιτείται προκειμένου τα μόρια ή άτομα να ξεκινήσουν έναν νέο κύκλο διέγερσης αποδιέγερσης είναι πολύ μικρότερη[3].



Σχήμα 3.5: *Ενεργειακό διάγραμμα laser τεσσάρων ενεργειακών επιπέδων*

Αναστροφή πληθυσμού στα υπάρχοντα lasers επιτυγχάνεται με δύο τρόπους, οπτικά και ηλεκτρικά. Στην οπτική άντληση, φως από μία ισχυρή πηγή απορροφάται από το ενεργό υλικό και τα άτομα διεγείρονται στο ανώτερο επίπεδο άντλησης. Αυτή η μέθοδος είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για lasers στερεών και lasers υγρών (χρωστικών). Η ηλεκτρική άντληση επιτυγχάνεται μέσω μιας ισχυρής ηλεκτρικής εκκένωσης και είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για lasers αερίων και ημιαγωγών[7].

Το φως το οποίο παράγεται από το ενεργό μέσο πρέπει πριν «βγει» από αυτό να υποστεί μία διαδικασία ενίσχυσης. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται μέσω ενός αντηχείου, δύο κατόπτρων τα οποία έχουν τοποθετηθεί στα άκρα της οπτικής κοιλότητας. Το ένα ανακλά πλήρως (100%) ενώ το άλλο, που αποτελεί ουσιαστικά και την έξοδο του laser, ανακλά μερικώς (80-98%) τη φωτεινή ακτινοβολία. Για να υπάρξει ενίσχυση της φωτεινής ακτινοβολίας όμως πρέπει η ακτινοβολία που ανακλάται από τα κάτοπτρα να βρίσκεται στην ίδια φάση με την ακτινοβολία που παράγεται από το ενεργό μέσο. Αυτό συνεπάγεται ότι το μήκος της κοιλότητας πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να «χωρά» ακριβώς έναν ακέραιο αριθμό ημιμηκών κύματος. Το μήκος της κοιλότητας δηλαδή, πρέπει να δίνεται από την εξίσωση: $L= n\lambda/2$ όπου λ το μήκος κύματος του φωτός και n ένας ακέραιος αριθμός[4].

3.2.3. Συστήματα lasers που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία

Ιστορικά τα lasers ιόντων αργού και ατμών μετάλλων ήταν τα πρώτα lasers τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη φωτοδυναμική θεραπεία. Οι λόγοι για τους οποίους επικράτησαν τα πρώτα χρόνια της φωτοδυναμικής θεραπείας ήταν ότι τα lasers αυτά συνδύαζαν μερικά χαρακτηριστικά όπως υψηλή ισχύ εξόδου και τη δυνατότητα να συνδεθούν με lasers χρωστικών τα οποία έδιναν ακτινοβολία μήκους κύματος κατάλληλου για τη διέγερση των πορφυρινών, που ήταν και οι πρώτοι φωτοευαισθητοποιητές. Αργότερα για την άντληση των lasers χρωστικών από αρκετές ερευνητικές ομάδες χρησιμοποιήθηκαν και κάποια lasers στερεάς κατάστασης σε συνδυασμό με μη γραμμικούς κρυστάλλους διπλασιασμού συχνότητας. Σήμερα πρακτικά, τα μόνα lasers τα οποία χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία είναι τα διοδικά τα οποία εμφανίζουν πληθώρα πλεονεκτημάτων σε σχέση με τα υπόλοιπα lasers για τη συγκεκριμένη εφαρμογή [2].

3.2.3.1. Lasers ιόντων αργού

Τα lasers αργού ήταν από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα lasers στη φωτοδυναμική θεραπεία. Το αέριο αργό και πιο συγκεκριμένα τα ιόντα αργού που παράγονται μετά από σύγκρουση των ατόμων του αερίου με ηλεκτρόνια που παράγονται κατά τη διάρκεια ηλεκτρικής εκκένωσης, αποτελούν το ενεργό μέσο αυτών των lasers. Τα lasers αυτά έχουν γραμμές στην υπεριώδη αλλά και την ορατή περιοχή του φάσματος. Οι γραμμές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στη φωτοδυναμική θεραπεία είναι οι δύο γραμμές στην ορατή περιοχή στα 488 και 514 nm. Η συνολική ισχύς εξόδου τους μπορεί να φτάσει τα 20 W καθώς όμως η αποδοτικότητα του

laser είναι αρκετά χαμηλή, απαιτούν σχετικά μεγάλα ποσά ηλεκτρικής ενέργειας και ψύξη με νερό. Τα lasers αυτά είναι ογκώδη και πρακτικά ακίνητα. Τα πιο νέα συστήματα laser αργού τα οποία έχουν χαμηλότερη ισχύ εξόδου 10 W μπορούν να ψυχθούν με αέρα. Παρόλα αυτά, τα lasers αυτά έχουν αρκετά υψηλό κόστος λειτουργίας και συντήρησης. Ένα άλλο σημαντικό μειονέκτημα της χρήσης αυτού του laser στη φωτοδυναμική θεραπεία είναι το μικρό βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας σε αυτά τα μήκη κύματος που περιορίζει τη χρήση του μόνο σε επιφανειακούς καρκίνους.

Γενικά τα lasers αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως σε συνδυασμό με την m-THPC στη γραμμή των 514 nm και για επιφανειακούς καρκίνους δερματικούς και γυναικολογικούς καρκίνους. Επίσης, για να χρησιμοποιηθούν στη φωτοδυναμική θεραπεία πρέπει να μειωθεί κατά πολύ η ακτινοβόληση mW/cm^2, γεγονός που καθιστά απαραίτητη τη χρήση οπτικών διατάξεων οι οποίες αυξάνουν κατά πολύ τη διάμετρο της διατομής της δέσμης αλλά και εξασθενούν την ισχύ της δέσμης[2,5].

3.2.3.2. Lasers χρωστικών αντλούμενα από lasers αργού

Τα lasers χρωστικών μπορούν να λειτουργήσουν χρησιμοποιώντας για την άντλησή σου τους λάμπες ή κάποια άλλα lasers. Στη φωτοδυναμική θεραπεία χρησιμοποιήθηκαν και χρησιμοποιούνται ακόμη συστήματα τα οποία αντλούνται από κάποια άλλα lasers. Οι πιο συνηθισμένες χρωστικές που χρησιμοποιούνται για τη συγκεκριμένη εφαρμογή είναι αυτές που εκπέμπουν ακτινοβολία στην περιοχή μεταξύ 600 και 650 nm περιοχή στην οποία απορροφούν οι πορφυρίνες και το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας είναι ικανοποιητικό. Οι χρωστικές αυτές είναι η ροδαμίνη B, η ροδαμίνη 101 και η σουλφοροδαμίνη 640. Για την άντληση των lasers αυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οι δύο γραμμές του laser αργού στην περιοχή του ορατού.

Τα συστήματα αυτά δίνουν τελική ισχύ έως 1 W και είναι συνεχή. Τα κύρια μειονεκτήματα αυτών των συστημάτων είναι ότι είναι ογκώδη αλλά και απαιτούν υψηλού επιπέδου τεχνική υποστήριξη για την ευθυγράμμιση και τη συχνή συντήρησή τους. Το κύριο πλεονέκτημα αυτών των συστημάτων είναι ότι η διατομή της δέσμης έχει διάμετρο < 1mm και άρα μπορεί εύκολα να οδηγηθεί σε οπτική ίνα. Η διάμετρος της ίνας μπορεί να ποικίλει από 200-600 μm ανάλογα με το εμβαδόν της βλάβης που πρέπει να θεραπευθεί. Η ακτινοβολία που παράγεται από αυτά τα συστήματα ανήκει σε μία πολύ μικρή φασματική περιοχή των 5-10 nm. Η σύνδεση των συστημάτων αυτών με ενδοσκόπια επέτρεψε και τη χρήση αυτών των

συστημάτων σε φωτοδυναμική θεραπεία εσωτερικών οργάνων όπως οι πνεύμονες, ο οισοφάγος, ο φάρυγγας και ο λάρυγγας και η ουροδόχος κύστη[2,5,8].

3.2.3.3. Lasers ατμών μετάλλων

Το ενεργό μέσο αυτών των συστημάτων είναι μίγμα νέου (gas-Ne) και ατμών μετάλλου, το οποίο μπορεί να είναι χαλκός (copper) ή χρυσός (gold). Τα lasers αυτά λειτουργούν σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες (περίπου 1500 °C), και η διέγερση επιτυγχάνεται μέσω ηλεκτρικής εκκένωσης. Το μήκος κύματος εκπομπής εξαρτάται από το μέταλλο που χρησιμοποιείται. Το laser χαλκού έχει δύο γραμμές στην πράσινη περιοχή του φάσματος στα 511 και 578 nm, ενώ ο χρυσός έχει μία γραμμή στην κόκκινη περιοχή στα 628 nm και μια ασθενέστερη υπεριώδη περιοχή, στα 312 nm. Τα lasers ατμών μετάλλων είναι παλμικά lasers με διάρκεια παλμού 10-50 ns και με ρυθμούς επαναληψιμότητας παλμού περίπου 5-15 kHz. Η ισχύς εξόδου αυτών των συστημάτων κυμαίνεται από μερικά W έως μερικές δεκάδες W ενώ η διατομή της δέσμης έχει εμβαδόν 1-3 cm^2.

Ο όγκος που καταλαμβάνουν είναι σημαντικά μικρότερος σε σχέση με τον όγκο των lasers αργού, αλλά και πάλι δεν μπορούν να χαρακτηριστούν φορητά. Τα παλαιότερα lasers ατμών μετάλλων, μάλιστα, απαιτούσαν ειδική παροχή ρεύματος και ψύξη με νερό. Σήμερα, το σημαντικότερο πρόβλημα που παρουσιάζουν είναι ότι λόγω της υψηλής θερμοκρασίας στην οποία πρέπει να βρεθούν οι ατμοί, απαιτούν μεγάλα χρονικά για να «ζεσταθούν» και να «κρυώσουν», κάτι το οποίο τα καθιστά δύσχρηστα στην καθημερινή κλινική πρακτική. Ένα δεύτερο, επίσης σημαντικό μειονέκτημα, είναι ότι το laser χρυσού το οποίο θα μπορούσε να συνδυαστεί απευθείας με κάποιον φωτοευαισθητοποιητή χωρίς την ανάγκη κάποιου άλλου laser π.χ. χρωστικών, έχει πάρα πολύ υψηλό κόστος συντήρησης αφού οι ατμοί πρέπει να αναπληρώνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα[9].

3.2.3.4. Lasers στερεάς κατάστασης Nd:YAG

Τα Nd:YAG είναι lasers στερεάς κατάστασης. Ως ενεργό μέσο έχουν έναν συνθετικό κρύσταλλο, γρανάτη νιτρίου-αργίλου (YAG, Yttrium Aluminum Garnet), εμπλουτισμένο με προσμίξεις περίπου 1-2 % από τη σπάνια γαία νεοδύμιο (Nd). Η κύρια γραμμή αυτού του laser βρίσκεται στην περιοχή του κοντινού υπερύθρου στα 1064 nm. Ο κρύσταλλος Nd:YAG διεγείρεται (αντλείται) από λάμπες φλας (flash lamps). Η συνολική απόδοση του laser είναι αρκετά χαμηλή, περίπου 0.1-1.0%. Η

θερμότητα που δημιουργείται κατά τη λειτουργία είναι πολύ μεγάλη γεγονός το οποίο κάνει απαραίτητη τη χρήση συστήματος ψύξης νερού. Επίσης, για να επιτευχθεί ισχύς εξόδου ίση με 100 W, είναι απαραίτητη ηλεκτρική ισχύς εισόδου 7 - 10 kW, περίπου. Αυτού του είδους η τροφοδοσία απαιτεί ειδική γραμμή τροφοδοσίας, όπως 220 V, τρεις φάσεις και 40 A. Το σύστημα ψύξης νερού ή η ειδική γραμμή τροφοδοσίας δεν είναι απαραίτητες εάν η συνεχής έξοδος-εκπομπή του laser είναι χαμηλότερη από 50 W. Τα lasers Nd:YAG μπορούν να λειτουργήσουν είτε με συνεχή (CW) είτε με παλμικό τρόπο (pulsed), με διάρκεια παλμού που κυμαίνεται από ps έως ms.

Στη φωτοδυναμική θεραπεία τα lasers αυτά χρησιμοποιούνται μόνο με συνδυασμό μη γραμμικών κρυστάλλων οι οποίοι μπορούν να δώσουν διπλασιασμό ή τριπλασιασμό συχνότητας και κατά συνέπεια να δώσουν γραμμές στα 532 και 266 nm. Γενικά τα lasers αυτά ως αυτόνομα συστήματα έχουν χρησιμοποιηθεί ελάχιστα στη φωτοδυναμική θεραπεία εν αντιθέσει με άλλες εφαρμογές και γιατί σε αυτά τα μήκη κύματος το βάθος διείσδυσης είναι πολύ μικρό, αλλά και γιατί χρειάζεται πολύ μεγάλη εξασθένιση της ισχύος προκειμένου η ακτινοβόληση (mW/cm^2) να φτάσει την τάξη μεγέθους που χρησιμοποιείται στην κλινική φωτοδυναμική θεραπεία. Ευρύτερη ήταν η χρήση τους ως lasers από τα οποία αντλούνταν τα lasers χρωστικών[4,5,8,10].

3.2.3.5. Lasers χρωστικών αντλούμενα από laser ατμών

Τα lasers αυτά υπήρξαν για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα η πιο δημοφιλής λύση κυρίως μεταξύ των Ευρωπαίων ερευνητών. Σε αυτά τα συστήματα για την άντληση χρησιμοποιούνται τα lasers μετάλλων. Η τελική έξοδος αυτών των συστημάτων είναι μερικών εκατοντάδων mW. Τα συστήματα αυτά είναι παλμικά με διάρκεια 10-50 ns και συχνότητα επαναληψιμότητας παλμών της τάξεως των μερικών kHz.

Επειδή και η δέσμη των lasers μετάλλων έχει σχετικά μικρό εμβαδόν διατομής η ευθυγράμμιση των δύο lasers είναι πολύ σημαντική. Επίσης τα συστήματα αυτά μεταφέρουν όλα τα μειονεκτήματα των lasers μετάλλων[2,8].

3.2.3.6. Διοδικά lasers

Αμέσως μετά την εφεύρεση και την κατασκευή των πρώτων lasers διαπιστώθηκε η σημαντικότητά τους και το εύρος των πεδίων στα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν προσφέροντας πολύ σημαντική πρόοδο. Ένα από τα

σημαντικότερα μειονεκτήματα όμως των πρώτων lasers, το οποίο έχει ήδη αναφερθεί, ήταν ο πολύ μεγάλος όγκος τους (αδυναμία μεταφοράς) και κατά συνέπεια ο αποκλεισμός τους από κάποιες εφαρμογές. Μία από αυτές ήταν και οι τηλεπικοινωνίες. Η ανάπτυξη συστημάτων lasers τα οποία θα καταλάμβαναν πολύ μικρότερο όγκο ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις τηλεπικοινωνίες αποτέλεσε πεδίο μετωπικής έρευνας για πολλές επιστημονικές ομάδες τη δεκαετία του 60. Έτσι το 1962 σχεδόν ταυτόχρονα ανακοινώθηκε από ερευνητικά εργαστήρια εταιρειών των ΗΠΑ αλλά και του MIT (Τεχνολογικού Πανεπιστημίου της Μασαχουσέτης) η κατασκευή laser κρυσταλλοδιόδου.

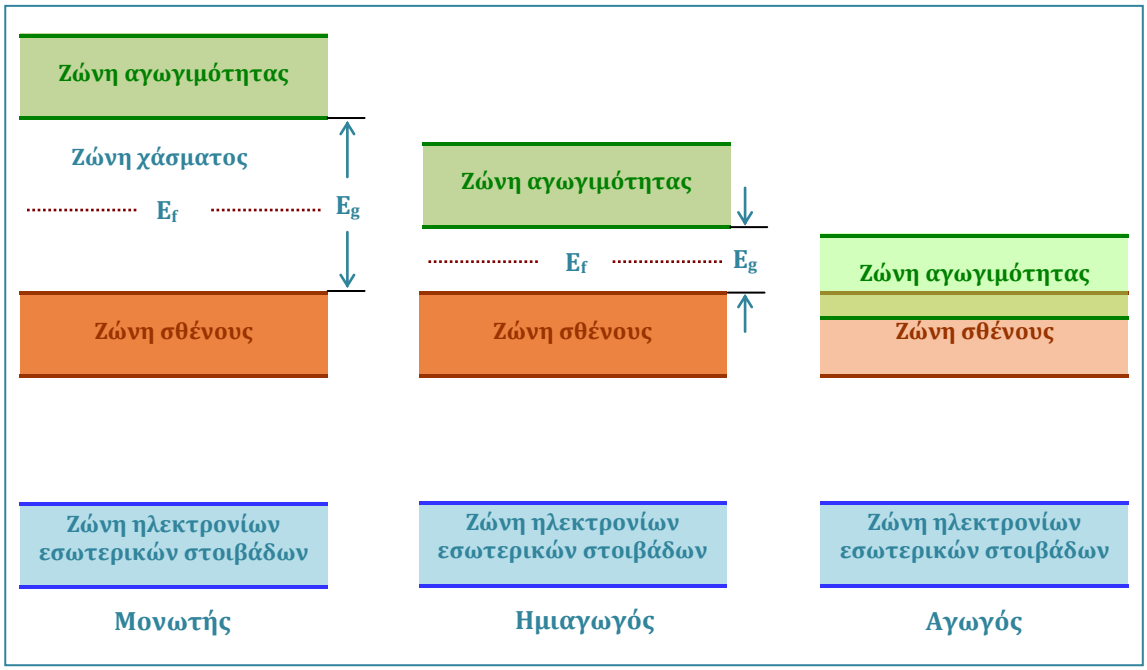
Τα πρώτα αυτά συστήματα αποτελούνταν από δίοδο της ημιαγώγιμης ένωσης αρσενιδίου του γαλλίου (GaAs). Τα συστήματα αυτά έγιναν δεκτά με ενθουσιασμό από την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα λόγω του πολύ μικρού μεγέθους του αλλά και της πολύ μικρής απαιτούμενης τάσης λειτουργίας (1.5 V). Το μόνο μειονέκτημα αυτών των πρώτων συστημάτων ήταν ότι απαιτούσαν υψηλή πυκνότητα ρεύματος για τη λειτουργίας τους σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε για να προστατευθούν από την υπερθέρμανση έπρεπε να λειτουργούν ως παλμικά ή κάτω από κρυογενικές συνθήκες. Η βελτίωση όμως της τεχνολογίας-σύστασης των διόδων (ετεροεπαφές και διπλές ετεροεπαφές) αργότερα κατέστησε δυνατή και τη συνεχή λειτουργία αυτών των συστημάτων.

Σήμερα η ζήτηση για αξιόπιστες, μικρού όγκου και υψηλής φωτεινότητας πηγές εξακολουθεί να αυξάνεται. Τα διοδικά lasers λόγω του μικρού όγκου και κόστους τους έχουν καταλάβει ένα πολύ σημαντικό μερίδιο της αγοράς φωτεινών πηγών. Το 2003 οι πωλήσεις των lasers αυτών αυξήθηκαν παγκοσμίως κατά 16% αγγίζοντας τα 3.1 δισεκατομμύρια ευρώ. Τα διοδικά lasers βρίσκουν πια εκτός από τις τηλεπικοινωνίες πολύ σημαντικές εφαρμογές σε τομείς υγείας, συστημάτων ασφαλείας και περιβάλλοντος.

Τα lasers ημιαγωγών εμφανίζουν πολλά κοινά αλλά και διαφορετικά χαρακτηριστικά σε σχέση με όλα τα προαναφερθέντα συστήματα. Το ενεργό μέσο σε αυτά τα συστήματα είναι ένας ημιαγώγιμος κρύσταλλος διαστάσεων ενός κόκκου άμμου. Η φωτεινή ακτινοβολία προέρχεται αυτή τη φορά από μεταβάσεις ηλεκτρονίων από στάθμες υψηλότερης σε στάθμες χαμηλότερης ενέργειας και όχι από μεταβάσεις ατόμων ή μορίων από διεγερμένες σε βασικές ή καταστάσεις χαμηλότερης ενέργειας.

Οι κρύσταλλοι ημιαγωγών, όπως και κάθε κρύσταλλος, αποτελούνται από άτομα διατεταγμένα στο χώρο με τέτοιο τρόπο ώστε να εμφανίζεται περιοδικότητα και

στους τρεις άξονες. Τα ηλεκτρόνια των ατόμων αυτών μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες. Τα ηλεκτρόνια των εσωτερικών και τα ηλεκτρόνια των εξωτερικών στοιβάδων. Οι ενεργειακές στάθμες αυτών των ηλεκτρονίων βρίσκονται πολύ κοντά με αποτέλεσμα να δημιουργούν συνεχείς σχεδόν ενεργειακές ζώνες. Τα ηλεκτρόνια των εσωτερικών στοιβάδων δε παίρνουν μέρος στο σχηματισμό δεσμών μεταξύ των ατόμων και καταλαμβάνουν τη χαμηλότερη ενεργειακά ζώνη (Σχήμα 3.6). Οι δεσμοί (συνοχή) μεταξύ των ατόμων του κρυστάλλου οφείλονται στα ηλεκτρόνια που βρίσκονται στις εξωτερικές στοιβάδες των ατόμων (ηλεκτρόνια σθένους). Τα ηλεκτρόνια αυτά έχουν ενέργειες οι οποίες αντιστοιχούν στη ζώνη σθένους. Στα ηλεκτρόνια αυτά όμως εάν προσφερθεί ενέργεια μπορούν να περάσουν σε κάποιες υψηλότερα ενεργειακά στάθμες, σε στάθμες που ανήκουν στη ζώνη αγωγιμότητας. Τα ηλεκτρόνια που ανήκουν σε αυτήν τη ζώνη παρουσιάζουν μεγαλύτερο βαθμό ελευθερίας και μπορούν να κινηθούν μέσα στον κρύσταλλο. Μεταξύ των ζωνών αγωγιμότητας και σθένους μεσολαβεί μία περιοχή ενεργειακών σταθμών οι οποίες είναι απαγορευμένες (ζώνη χάσματος). Η διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο ζωνών συμβολίζεται με E_g, ενώ η ενέργεια Fermi με E_f.

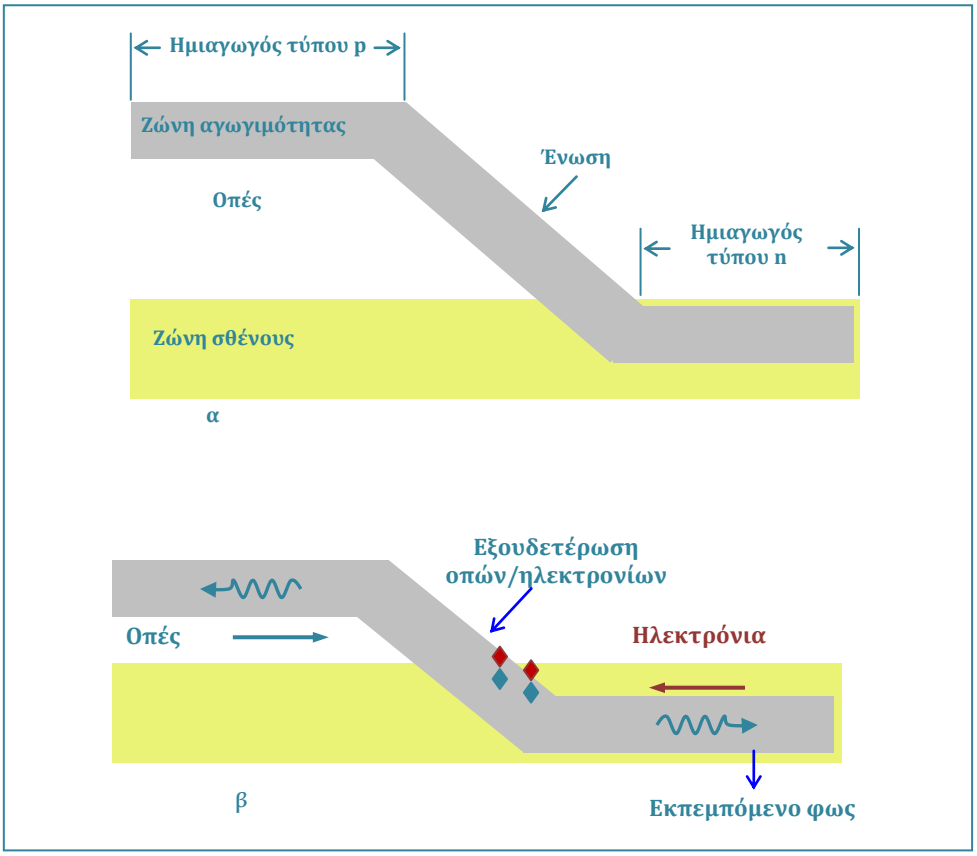


Σχήμα 3.6: *Σχηματικό διάγραμμα ενεργειακών ζωνών των ηλεκτρονίων μονωτών, αγωγών και ημιαγωγών*

Η αγωγιμότητα ενός υλικού εξαρτάται από το πόσο μεγάλη ή μικρή είναι η E_g. Για τους μονωτές η διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο ενεργειακών ζωνών είναι πάρα

πολύ μεγάλη. Για αυτό και η ροή ρεύματος σε αυτά τα υλικά υπό κανονικές συνθήκες είναι πρακτικά αδύνατη. Στους αγωγούς οι δύο ζώνες αλληλεπικαλύπτονται μερικώς. Η E_g είναι μηδενική σε αυτά τα υλικά. Κάποια από τα ηλεκτρόνια σθένους συμπεριφέρονται ως ελεύθερα ενώ κάποια άλλα χρειάζονται την προσφορά πολύ μικρών ποσών ενέργειας προκειμένου να συμπεριφερθούν έτσι. Οι ημιαγωγοί έχουν τιμές αγωγιμότητας μεταξύ αγωγών και μονωτών. Κάτω δηλαδή από ορισμένες συνθήκες (προσφορά ενέργειας) κάποια ηλεκτρόνια σθένους μπορούν να μεταπηδήσουν στη ζώνη αγωγιμότητας.

Υπό κανονικές συνθήκες σε έναν κρύσταλλο η ζώνη σθένους είναι κατειλημμένη ενώ η ζώνη αγωγιμότητας κενή. Εάν όμως ο κρύσταλλος περιέχει κάποιες προσμίξεις η κατάσταση αυτή μπορεί να διαφοροποιηθεί και να εμφανιστεί έλλειψη (αποδέκτες ηλεκτρονίων) ή περίσσεια (δότες ηλεκτρονίων). Εάν στον κρύσταλλο έχουν προστεθεί δότες ο ημιαγωγός χαρακτηρίζεται ως τύπου n. Εάν στον κρύσταλλο έχουν προστεθεί αποδέκτες τότε ο ημιαγωγός χαρακτηρίζεται ως τύπου p.



Σχήμα 3.7: *Αρχή λειτουργίας ενός laser ημιαγωγού επαφής p-n με (α) μηδενική πόλωση και (β) ορθή πόλωση*

Εάν τώρα οι επιφάνειες δύο ημιαγωγών εκ των οποίων ο ένας είναι τύπου n και ο άλλος τύπου p έρθουν σε επαφή δημιουργείται ένα φράγμα pn ή αλλιώς μία περιοχή απογύμνωσης. Πιο αναλυτικά όταν οι δύο αυτές περιοχές έρθουν σε επαφή λόγω του διαφορετικού φορτίου ηλεκτρόνια από τον n ημιαγωγό θα έρθουν προς τη διεπιφάνεια και θα εξουδετερώσουν οπές του p ημιαγωγού. Με αυτόν τον τρόπο όμως θα δημιουργηθούν πεδία στους ημιαγωγούς τα οποία δε θα επιτρέψουν την έλευση περισσότερων ηλεκτρονίων και τελικά θα παραμορφώσουν τα άκρα των ζωνών σθένους και αγωγιμότητας (Σχήμα 3.7).

Για να επιτευχθεί το φαινόμενο laser απαραίτητες είναι δύο προϋποθέσεις, να υπάρχει αντιστροφή πληθυσμών και ενίσχυση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας μέσα στο ενεργό μέσο. Η πρώτη από τις δύο προϋποθέσεις η αντιστροφή των πληθυσμών ικανοποιείται με μέσω εφαρμογής κατάλληλου πεδίου στη διεπιφάνεια. Η δεύτερη απαίτηση στα υπόλοιπα lasers επιτυγχάνεται μέσω των κατόπτρων του σωλήνα του ενεργού μέσου Στην περίπτωση των ημιαγωγών το ρόλο των κατόπτρων μπορεί να παίξουν ανακλαστικές επιστρώσεις στους ημιαγωγούς. Αν και στις περισσότερες περιπτώσεις αυτή η επίστρωση δεν είναι απαραίτητη λόγω του πολύ μεγάλου δείκτη διάθλασης των υλικών των ημιαγωγών (ανακλαστικότητα ~35%)[5,7].

Από την σύσταση του ημιαγωγού εξαρτάται και το μήκος κύματος εκπομπής του διοδικού laser. Τα lasers αρσενικούχου γαλλίου-αλουμινίου εκπέμπουν ανάλογα με την περιεκτικότητα σε γάλλιο και αλουμίνιο από τα 760 έως τα 900 nm, τα αρσενικούχου ινδίου-γαλλίου από τα 900 έως τα 1100 nm. Η απόδοση των διοδικών lasers είναι πολύ υψηλή και κυμαίνεται από 30-40%. Ένα διοδικό laser μπορεί να αποτελείται από μία μόνο δίοδο (single-emitter) η οποία έχει μέσες διαστάσεις 1 mm × 100 μm × 1 μm οπότε η έξοδός του θα είναι συνεχής και της τάξης του 1 W, από μία μονοδιάστατη συστοιχία 20 περίπου διόδων (1-D array, bar) οπότε η έξοδός του θα κυμαίνεται από 10 έως 25 W ή μία δισδιάστατη συστοιχία διόδων, τοποθετημένες σε διαστήματα από 0.3 έως 2 mm, συνολικού εμβαδού της τάξης του 1 cm^2 δίνοντας ισχύ της τάξης των 100 W.

3.3. Πηγές μη σύμφωνου ορατού φωτός

Μερικά από τα lasers τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ή χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία φαίνονται στον Πίνακα 3.1. Τα lasers όμως δεν είναι οι μόνες πηγές ακτινοβόλησης οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη φωτοδυναμική θεραπεία. Λυχνίες υψηλής ισχύος σε συνδυασμό με φίλτρα

μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν σε κλινικές εφαρμογές της φωτοδυναμικής θεραπείας. Γενικά ως προς τη συντήρησή τους οι λυχνίες είναι πιο εύκολες στο χειρισμό και πιο οικονομικές. Οι λυχνίες εκπέμπουν σε ένα μεγάλο εύρος μηκών κύματος οπότε συνήθως είναι απαραίτητος ο συνδυασμός ζωνοπερατά, υψηπερατά και βαθυπερατά φίλτρων.

Πίνακας 3.1: *Ιδιότητες των lasers που χρησιμοποιήθηκαν και χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία*

Σύστημα	Μήκος(οι) Κύματος	Εύρος Ζώνης	Ακτινοβόληση	Διάρκεια παλμού	Σύστημα μεταφοράς ακτινοβολίας
Laser αργού	488 και 514,5 nm	Μονο-χρωματική	0,5-1 W/cm^2	Συνεχής	Απευθείας ή μέσω οπτικής ίνας
Laser χρωστικών αντλούμενα από laser αργού	600-650 nm (εξαρτάται από τη χρωστική)	5-10 nm	10-200 mW/cm^2	Συνεχής	Απευθείας ή μέσω οπτικής ίνας
Laser ατμών μετάλλου	UV ή ορατή περιοχή (εξαρτάται από το μέταλλο)	Μονο-χρωματική	Έως 10 W/cm^2	10-50 ns παλμικό	Απευθείας ή μέσω οπτικής ίνας
Laser χρωστικών αντλούμενα από laser ατμών μετάλλου	600-650 nm (εξαρτάται από τη χρωστική)	5-10 nm	10-500 mW/cm^2	10-50 ns παλμικό	Απευθείας ή μέσω οπτικής ίνας
Στερεάς κατάστασης	Για Nd:YAG 1064, 532, 355, 266 nm	Μονο-χρωματική	Έως 10 W/cm^2	10ps-30ns παλμικό	Απευθείας ή μέσω οπτικής ίνας
Laser χρωστικών αντλούμενα από laser στερεάς κατάστασης	600-650 nm (εξαρτάται από τη χρωστική)	5-10 nm	10-500 mW/cm^2	10ps-30ns παλμικό	Απευθείας ή μέσω οπτικής ίνας
Lasers ημιαγωγών	600-800 nm	Μονο-χρωματική	Έως 700 mW/cm^2	Συνεχής	Οπτική ίνα

Τα ζωνοπερατά φίλτρα χρησιμοποιούνται για να αφήσουν να περάσει ακτινοβολία η οποία έχει εύρος μήκους κύματος 10 nm, τα υψηπερατά φίλτρα χρησιμοποιούνται για να κόψουν την υψηλής ισχύος UV ακτινοβολία ενώ τα βαθυπερατά φίλτρα χρησιμοποιούνται για να κόψουν την IR ακτινοβολία η οποία μπορεί να θερμάνει τους ιστούς και να καταστρέψει τα οπτικά του συστήματος. Λόγω του μεγάλου εύρους τους οι λυχνίες μπορούν να συνδυαστούν με διάφορα φίλτρα και κατά συνέπεια με πολλούς φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι απορροφούν σε διαφορετικές περιοχές.

Το σημαντικότερο μειονέκτημα των υψηλής ισχύος των πηγών μη σύμφωνου ορατού φωτός στη φωτοδυναμική θεραπεία είναι ότι αν συνδεθούν με οπτικές ίνες θα χαθεί το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειάς τους. Έτσι η χρήση τους έχει περιοριστεί μόνο σε θεραπεία δερματικών-επιφανειακών βλαβών. Αρκετά θετικό θεωρείται στη δερματολογία ότι το εμβαδόν της κηλίδας της δέσμης φωτός είναι αρκετά μεγάλο με αποτέλεσμα την ικανοποιητική και γρήγορη θεραπεία ακόμη και εκτεταμένων βλαβών[2,8].

3.4. Διατάξεις μεταφοράς φωτεινής ακτινοβολίας laser στη φωτοδυναμική θεραπεία

Η τοξικότητα, η επιλεκτικότητα και η επιτυχία της φωτοδυναμικής θεραπείας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποσότητα του φωτός που θα μεταφερθεί στους καρκινικούς και υγιείς ιστούς. Οι απαιτήσεις που πρέπει οπωσδήποτε να πληροί μία διάταξη μεταφοράς της φωτεινής ακτινοβολίας εκτός από την κατάλληλη ακτινοβόληση mW/cm^2 είναι η συμβατότητα και η σύνδεση αυτής της διάταξης με τις υπάρχουσες χειρουργικές διατάξεις π.χ. ενδοσκόπια, και η αντιστοίχηση με το σχήμα του όγκου.

3.4.1. Διατάξεις για επίπεδη επιφανειακή ακτινοβόληση

Στις περιπτώσεις των δερματικών καρκίνων καθώς και καρκίνων της κεφαλής καταλληλότερη θεωρείται η επίπεδη ακτινοβόληση. Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιούνται οπτικές ίνες στην άκρη των οποίων έχει προσαρμοστεί ένα σύστημα μικροφακών. Από αυτές τις διατάξεις προκύπτει μία κηλίδα κυκλικής μορφής. Η ισχύς σε αυτήν την κηλίδα είναι ομοιόμορφα κατανεμημένη εν αντιθέσει με την κατανομή της ισχύος που θα προέκυπτε εάν έλειπε το σύστημα μικροφακών.

Η διάμετρος αυτής της κηλίδας αυξάνεται με αύξηση της απόστασης μεταξύ του άκρου της ίνας και του ακτινοβολούμενου επιπέδου[8,9].

Πριν τη φωτοδυναμική θεραπεία με διατάξεις επίπεδης ακτινοβόλησης, εντοπίζονται τα όρια της καρκινικής περιοχής και μετράται η μέγιστη διάμετρός της. Η απόσταση του άκρου της ίνας υπολογίζεται έτσι ώστε η φωτεινή κυκλική κηλίδα που θα σχηματίσει να καλύπτει όλη την καρκινική περιοχή καθώς και έναν μικρό δακτύλιο φαινομενικά υγιών ιστών γύρω από αυτήν. Στη συνέχεια υπολογίζεται το εμβαδόν αυτής της περιοχής προκειμένου να υπολογιστεί αντίστοιχα και η επιθυμητή ισχύς εξόδου του laser (mW) βάσει της επιθυμητής ακτινοβόλησης (mW/cm^2)[10].

3.4.2. Διατάξεις για επιφανειακή κυλινδρική ακτινοβόληση

Κάποια όργανα όπως ο οισοφάγος ή οι πνεύμονες δε μπορούν να ακτινοβοληθούν με διατάξεις επίπεδης ακτινοβόλησης γιατί το σχήμα τους μοιάζει με το εσωτερικό κάποιου σωλήνα και οι βλάβες αναπτύσσονται εσωτερικά και περιμετρικά αυτών των σωλήνων. Άρα σε αυτές τις περιπτώσεις απαιτείται κυλινδρική συμμετρία. Οι πρώτες διατάξεις οι οποίες αναπτύχθηκαν για αυτό το σκοπό ήταν οι κυλινδρικοί διαχύτες, οι οποίοι είναι κυλινδρικές διατάξεις στο άκρο της ίνας οι οποίες διαχέουν τη φωτεινή ακτινοβολία ομοιόμορφα σε κυλινδρική συμμετρία. Οι διαχύτες βρίσκονται στο άκρο της ίνας έχουν διάμετρο λίγο μεγαλύτερη από τη διάμετρο της ίνας και μήκος από 1-10 cm. Ανάλογα με το μήκος της βλάβης επιλέγεται και ο κατάλληλος διαχύτης.

Για αυτή τη συμμετρία ακτινοβόλησης έχουν επίσης κατασκευαστεί και καθετήρες οι οποίοι καταλήγουν σε κυλινδρικά μπαλονάκια μέσα στα οποία καταλήγει η ίνα. Τα μπαλονάκια περιέχουν συνήθως κάποιο υλικό το οποίο διαχέει ομοιόμορφα το φως ενώ σε αυτά εισάγεται αέρας ώστε να μπορούν να σταθεροποιήσουν τα τοιχώματα του ακτινοβολούμενου βρόγχου ή οισοφάγου. Τα μπαλονάκια αυτά έχουν μαύρη επίστρωση στο άκρα τους ώστε να ακτινοβολούνται μόνο τα τοιχώματα των οργάνων. Ανάλογα με τη βλάβη μπορούν εκτός από τα άκρα του να επιστρωθεί και κάποιο μέρος από τα πλευρικά τοιχώματα έτσι ώστε η ακτινοβόληση να μη γίνεται σε 360° αλλά σε 180° ή 240°. Οι διατάξεις αυτές συνήθως εισάγονται στους βρόγχους ή τον οισοφάγο μέσω ενδοσκοπίων[9,8].

3.4.3. Διατάξεις για ενδοϊστική ακτινοβόληση

Εάν ο όγκος βρίσκεται κάτω από κάποιους υγιείς ιστούς ή έχει μεγάλο βάθος (> 1 cm) τότε καμία από τις παραπάνω διατάξεις δεν είναι κατάλληλη. Στην περίπτωση αυτή μετά το laser μεσολαβεί ένας διαχωριστής δέσμης. Η διάταξη αυτή διαχωρίζει τη δέσμη του laser σε 2-4 μέρη τα οποία οδηγούνται σε οπτικές ίνες. Αυτές τοποθετούνται μέσα σε χειρουργικές βελόνες οι οποίες έχουν εμφυτευτεί σε κατάλληλες αποστάσεις και βάθη μέσα στον όγκο. Θεωρητικά κάθε οπτική ίνα πιστεύεται ότι είναι αρκετή για να ακτινοβολήσει μία σφαίρα διαμέτρου 1 cm.

3.5. Βιβλιογραφία

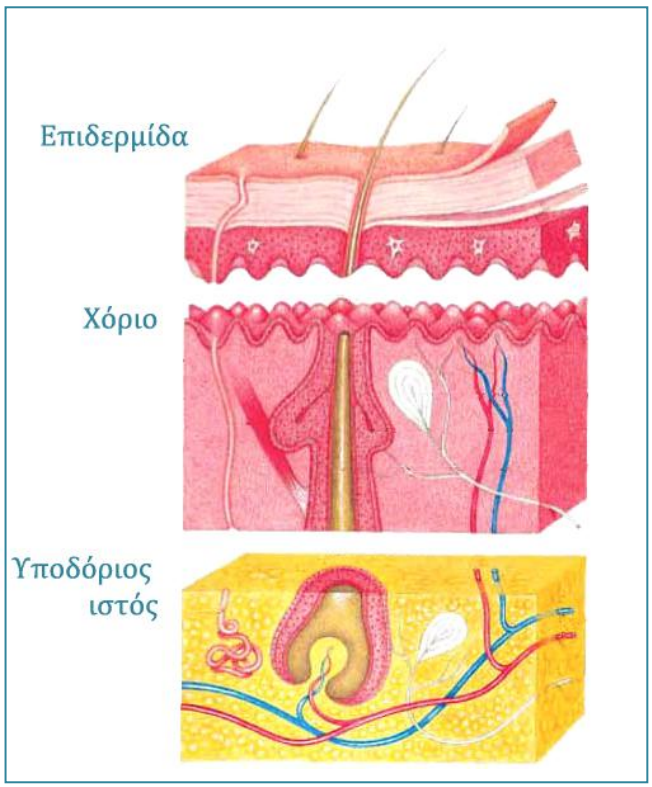
1. M. Alexiades-Armenakas, “Laser-mediated photodynamic therapy”, Clin Dermatol, 24, 16-25, 2006.
2. L. Brancaleon, and H. Moseley, “Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy”, Lasers Med Sci, 17, 173-186, 2002.
3. J. A. S. Carruth και A. L. McKenzie, Μετάφραση, Σύγχρονη Ενημέρωση, Επιμέλεια, Α. Α. Σεραφετινίδης, Μ. Ι. Μακροπούλου, Ιατρικά Lasers Επιστήμη και Κλινική Εφαρμογή, Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα, 1994.
4. P. N. Prasad, Introduction to Biophotonics, John Wiley & Sons Inc, New Jersey, 2003.
5. A. Katzir, Lasers and Optical Fibers in Medicine, Academic Press, San Diego, 1993.
6. J. Wilson, J. Hawkes, Optoelectronics an introduction, 3rd Edition, Prentice Hall, UK, 1998
7. O. Svelto, D. C. Hanna, Principles of Lasers, Plenum Press, New York, 1982.
8. T. Mang, “Lasers and light sources for PDT: Past, present and future”, Photodiag Photodyn Ther, 1, 43-48, 2004.
9. S. Tang, N. Marcon, “Photodynamic therapy in the esophagus”, Photodiag Photodyn Ther, 1, 65-74, 2004.
10. A. J. MacRobert, T. Theodossiou, “Photodynamic therapy of cancer”, Encyclopedia of Modern Optics, 2005, 53-62.

Κεφάλαιο 4

Φωτοδιάγνωση και Φωτοδυναμική Θεραπεία Μη Μελανωματικών Δερματικών Καρκινικών Όγκων

4.1. Εισαγωγή

Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος με μέση επιφάνεια περίπου 2 m^2, βάρος 4 kg ενώ το πάχος του στις περισσότερες περιοχές πλησιάζει τα 2 mm[1].



Σχήμα 4.1: *Δομή του δέρματος*

Το δέρμα αποτελείται από δύο στιβάδες, την εξωτερική επιθηλιακή στιβάδα η οποία ονομάζεται επιδερμίδα, και έχει πάχος που κυμαίνεται μεταξύ των 75 και των 150 μm εκτός από τις παλάμες και τα πέλματα των ποδιών σημεία στα οποία το πάχος της μπορεί να φτάσει και τα 600 μm, και την εσωτερική στιβάδα η οποία ονομάζεται χόριο ή κυρίως δέρμα λόγω του ότι αποτελεί και την κυρίως μάζα του. Κάτω από το χόριο βρίσκεται ένας χαλαρός συνδετικός ιστός ο οποίος περιέχει άφθονο λίπος και ονομάζεται υπόδερμα ή υποδόριος ιστός (Σχήμα 4.1). Το δέρμα διαθέτει επίσης και κάποια εξαρτήματα τα οποία είναι οι αδένες-σμηγματογόνοι και ιδρωτοποιοί-τα νύχια και οι τρίχες[2].

4.2. Η δομή του δέρματος

4.2.1. Επιδερμικά κύτταρα

Η επιδερμίδα αποτελείται από τέσσερα είδη κυττάρων:

- Τα επιθηλιακά (κερατινοκύτταρα)
- Τα μελανοκύτταρα
- Τα κύτταρα του Langerhans
- Τα κύτταρα του Merkel

Τα κερατινοκύτταρα είναι τα κύτταρα που κατακλύζουν την επιδερμίδα. Τα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας παρουσιάζουν τη μέγιστη μιτωτική δραστηριότητα. Το κυτταρόπλασμα των κερατινοκυττάρων περιέχει ριβοσωμάτια, μιτοχόνδρια και τονοϊνίδια, δηλαδή πολυπεπτίδια, που συμμετέχουν στην κατασκευή των δεσμοσωμάτων, τα οποία συνδέουν τα κύτταρα της επιδερμίδας μεταξύ τους.

Τα μελανοκύτταρα βρίσκονται μεταξύ και κάτω από τα κύτταρα της βασικής στιβάδας και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή μελανίνης. Η ποσοτική τους σχέση με τα κύτταρα της βασικής στιβάδας είναι 1/5. Τα μελανοκύτταρα είναι κύτταρα νευρογενούς προέλευσης και φέρουν δενδρίτες που διακλαδίζονται μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων. Οι δενδρίτες είναι γεμάτοι από μελανοσώματα, κοκκία τα οποία περιέχουν μελανίνη προερχόμενη από τη διαδικασία της μελανογένεσης. Ο αριθμός των μελανοκυττάρων είναι ο ίδιος σε όλες τις φυλές, οι οποίες όμως διαφέρουν ως προς τον αριθμό και το μέγεθος των μελανοσωμάτων. Τα μελανοσώματα που βρίσκονται στους δενδρίτες των μελανοκυττάρων, φαγοκυτταρώνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα και περιβάλλουν τον πυρήνα τους,

προστατεύοντάς τα έτσι από την υπεριώδη ακτινοβολία. Κάθε μελανοκύτταρο, όπως φαίνεται και από την αναλογία τους ως προς τα επιθηλιακά κύτταρα, τροφοδοτεί αρκετά επιθηλιακά κύτταρα με μελανοσώματα[2].

Τα κύτταρα του Langerhans είναι δενδριτικά κύτταρα που βρίσκονται πάνω από τη βασική στιβάδα και μετά την ενηλικίωση αποτελούν το 3-8% του επιδερμικού πληθυσμού κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά συμμετέχουν στην ανοσολογική λειτουργία και είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση και παρουσίαση των αλλεργιογόνων στα λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα του Langerhans προέρχονται από το μυελό των οστών και μεταναστεύουν στην επιδερμίδα μας κατά τη $12^{η}$-$14^{η}$ εβδομάδα της κύησης. Τα κύτταρα του Merkel, είναι υπεύθυνα για την αισθητική λειτουργία του δέρματος και είναι άφθονα σε περιοχές όπου δεν παρατηρείται τριχοφυΐα[1].

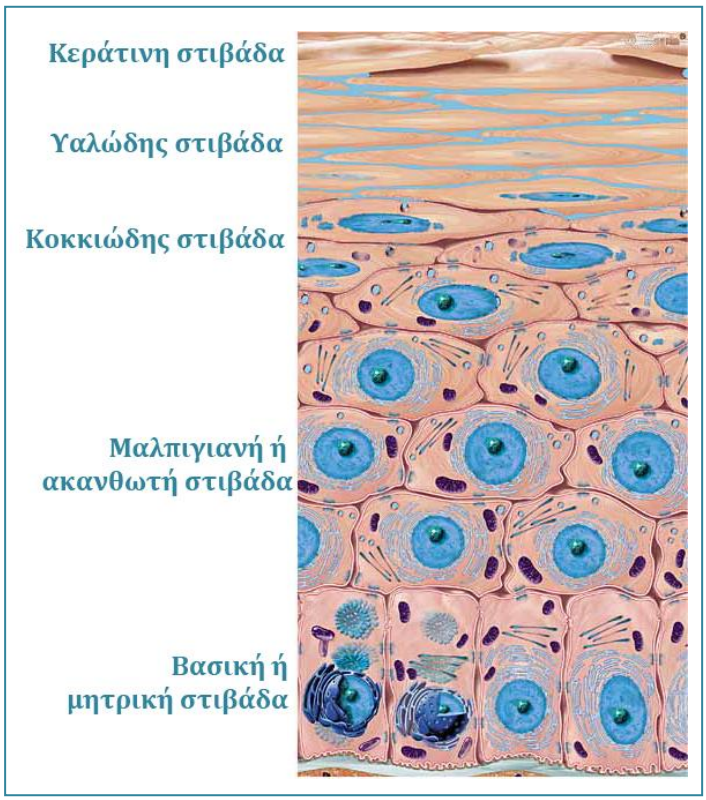
4.2.2. Η δομή της επιδερμίδας

Η επιδερμίδα αποτελείται από τέσσερις στιβάδες κερατινοκυττάρων, οι οποίες από την επιφάνεια του δέρματος προς το χόριο είναι οι εξής:

- Κεράτινη στιβάδα
- Κοκκιώδης στιβάδα
- Μαλπιγιανή ή ακανθωτή στιβάδα
- Βασική ή μητρική στιβάδα

Η βαθύτερη από τις στιβάδες της επιδερμίδας είναι η βασική στιβάδα η οποία αποτελείται από μία συστοιχία επιθηλιακών κυττάρων σχεδόν ορθογωνίου σχήματος, τα οποία διατάσσονται το ένα δίπλα στο άλλο και συνδέονται μεταξύ τους μέσω δεσμοσωμάτων. Τα κύτταρα της βασικής στιβάδας πολλαπλασιάζονται και ανεβαίνουν προς την επιφάνεια περνώντας από τα διάφορα στάδια διαφοροποίησης με σκοπό να σχηματίσουν τελικώς την κεράτινη στιβάδα. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται κερατινοποίηση και διαρκεί κατά μέσο όρο 28 ημέρες.

Πάνω από τη βασική στιβάδα βρίσκεται η Μαλπιγιανή ή ακανθωτή στιβάδα, η οποία πήρε το όνομά της από τα δεσμοσώματα τα οποία συνδέουν τα κύτταρα μεταξύ τους τα οποία μοιάζουν με άκανθες. Η στιβάδα αυτή αποτελείται εν αντιθέσει με τη βασική από πολλές συστοιχίες κυττάρων. Της στιβάδας αυτής έπεται η κοκκιώδης στιβάδα η οποία περιέχει κοκκία κερατοϋαλίνης, τα οποία αποτελούν την πρόδρομη ουσία της κερατίνης. Τα κύτταρα της στιβάδας αυτής περιέχουν επίσης και κάποια λιπίδια τα οποία αποβάλλονται στο μεσοκυττάριο διάστημα και συμβάλλουν στην κυτταρική συνοχή.



Σχήμα 4.2: *Διαφοροποίηση κερατινοκυττάρων*

Η κεράτινη, η εξωτερική στιβάδα της επιδερμίδας, αποτελείται από τα πλέον επίπεδα απύρηνα κύτταρα (πετάλια), με κεραμωτή αλληλουχία. Τα κύτταρα αυτής της στιβάδας συνενώνονται αρκετά σταθερά μεταξύ τους, δημιουργώντας ένα πολύ σημαντικό φραγμό προς το περιβάλλον προσδίδοντας με αυτόν τον τρόπο μία πολύ σημαντική ιδιότητα στο δέρμα, την αδιαπερατότητα.

Στις παλάμες και τα πέλματα, μεταξύ της κεράτινης και της κοκκιώδους στιβάδας, υπάρχει μία επιπλέον στιβάδα η διαυγής, η οποία ονομάστηκε έτσι λόγω του ότι δε βάφεται από τις κοινές χρωστικές που χρησιμοποιούνται για τη βαφή των άλλων στιβάδων[2].

4.2.3. Χόριο ή κυρίως δέρμα

Το χόριο τρέφει και υποστηρίζει την επιδερμίδα. Στο χόριο υπάρχουν αυτόχθονα και ετερόχθονα κύτταρα. Τα περισσότερα από τα αυτόχθονα κύτταρα είναι ινοβλάστες, οι οποίοι συνθέτουν τριών ειδών ίνες, τις ίνες κολλαγόνου, τις ελαστικές και τις δικτυωτές ίνες. Οι βασικοκυτταρικές ίνες είναι οι ίνες κολλαγόνου οι οποίες εξασφαλίζουν τη δομική υποστήριξη του δέρματος. Οι ίνες κολλαγόνου είναι παχύτερες και τραχύτερες στο βαθύτερο στρώμα του χορίου, δικτυωτό

στρώμα, σε σχέση με το επιφανειακό στρώμα, θηλώδες στρώμα, όπου οι ίνες κολλαγόνου είναι λεπτότερες και χαλαρότερες. Οι ελαστικές ίνες εξασφαλίζουν την ελαστικότητα του δέρματος. Τα ετερόχθονα κύτταρα διακρίνονται σε μαστοκύτταρα, μακροφάγα και λεμφοκύτταρα.

Το χόριο συνδέεται με την επιδερμίδα μέσω καταδύσεων της επιδερμίδας και αντίστοιχες αναδύσεις του χορίου οι οποίες ονομάζονται θηλές. Η βασική μεμβράνη, η μεμβράνη δηλαδή που χωρίζει το χόριο από την επιδερμίδα αποτελείται από δύο πέταλα διακριτά από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα πέταλα αυτά είναι το διαυγές πέταλο (Lamina Lucida) που έρχεται σε επαφή με τη βασική στιβάδα και το πυκνό πέταλο (Lamina Densa) το οποίο έρχεται σε επαφή με το χόριο. Το πυκνό πέταλο είναι πλούσιο σε ινίδια κολλαγόνου (achoring fibrils) τα οποία δένουν την επιδερμίδα με το χόριο. Η ένωση αυτή εξασφαλίζει μηχανική υποστήριξη της επιδερμίδας και λειτουργεί και ως ημιδιαπερατό φίλτρο το οποίο ρυθμίζει τη δίοδο των ουσιών από την επιδερμίδα στο χόριο και αντίστροφα[2].

4.2.4. Αγγεία και νεύρα του δέρματος

Τα αγγεία του δέρματος (αρτηρίες, φλέβες και τριχοειδή) δημιουργούν 2 κύρια οριζόντια πλέγματα, το εν τω βάθει αγγειακό πλέγμα, το οποίο βρίσκεται κοντά στο υποδόριο λίπος και τροφοδοτεί τους ιδρωτοποιούς αδένες και τους θυλάκους των τριχών και το αγγειακό πλέγμα το οποίο βρίσκεται στο ανώτερο χόριο (θηλώδες στρώμα) και εκπέμπει τις τριχοειδείς αγκύλες οι οποίες αιματώνουν τις ανώτερες στιβάδες του χορίου και την επιδερμίδα.

Στο χόριο υπάρχουν επίσης λεμφαγγεία, όπως επίσης και πλήθος αισθητικών νεύρων και νευρικών απολήξεων τα οποία εξασφαλίζουν την αίσθηση της αφής και τις πολλαπλές παραλλαγές της (πόνος, αίσθηση ψυχρού-θερμού, πίεσης κλπ)[1,2].

4.3. Καρκίνος του δέρματος

Ο καρκίνος του δέρματος άρχισε να απασχολεί συστηματικά την έρευνα τα τελευταία χρόνια. Μέχρι πριν 20 χρόνια περίπου, θεωρούνταν ότι ο καρκίνος του δέρματος δεν παρουσίαζε ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του ότι δεν απειλούσε άμεσα τη ζωή των ασθενών αλλά και λόγω της μικρής συχνότητας εμφάνισής του. Η κατάσταση αυτή όμως έχει αντιστραφεί πλήρως τα τελευταία χρόνια, λόγω κυρίως των μεγάλων ρυθμών αύξησης της συχνότητας εμφάνισής του (3-8% ετησίως με τους μεγαλύτερους ρυθμούς να εμφανίζονται στις περιοχές που βρίσκονται πιο

κοντά στον ισημερινό) με αποτέλεσμα ο καρκίνος του δέρματος να θεωρείται πλέον ένα από τα σημαντικότερα θέματα της δημόσιας υγείας[3].

Χαρακτηριστικό είναι ότι στις ΗΠΑ περισσότερο από το 30% των συνολικών περιστατικών καρκίνου αφορούν καρκίνο του δέρματος, γεγονός που συνεπάγεται ότι τα περιστατικά καρκίνου του δέρματος που αναφέρονται ετησίως αριθμητικά ξεπερνούν το 1.000.000, ενώ εκτιμάται ότι από το 1997 και μετά περισσότερα από 500 εκατομμύρια δολάρια δαπανώνται μόνο στις ΗΠΑ για τη θεραπεία αυτών των ασθενών. Εκτιμάται επίσης, ότι τα επόμενα 20 χρόνια θα εμφανίσει καρκίνο του δέρματος ένας στους τρεις Αμερικανούς που θα ζήσει ως την ηλικία των 65 χρόνων. Παρόμοια στατιστικά στοιχεία αναφέρονται από διάφορους ερευνητές τόσο για τους κατοίκους της Αυστραλίας όσο και για τους κατοίκους της Βόρειας Ευρώπης λόγω του φαινότυπου του δέρματός τους αλλά και τις αλλαγές στον τρόπο ζωής τους[4].

Οι τρεις σημαντικότεροι τύποι καρκίνου του δέρματος είναι το μελάνωμα και οι δύο τύποι επιθηλιακών καρκίνων του δέρματος ο βασικοκυτταρικός και ο ακανθοκυτταρικός. Τα επί τοις εκατό ποσοστά θνησιμότητας λόγω των μη-μελανωματικών καρκίνων του δέρματος παραμένουν ακόμη πολύ χαμηλά. Λόγω όμως της πολύ μεγάλης συχνότητας εμφάνισης αυτών των μορφών καρκίνου, ο αριθμός θανάτων ανά έτος είναι πολύ μεγάλος (2.800).

Κύριο αίτιο για την πρόκληση αυτών των μορφών καρκίνου θεωρείται η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) η οποία αποτελεί έναν ολοκληρωμένο καρκινογόνο παράγοντα που μπορεί να συμμετέχει και στις τρεις φάσεις της καρκινογένεσης, εισαγωγή, προώθηση, εξέλιξη. Το δέρμα αντιδρά στις βλάβες που μπορεί να προκαλέσει η προσπίπτουσα υπεριώδης ακτινοβολία με πάχυνση της κεράτινης στιβάδας και με παραγωγή μελανίνης. Με αυτόν τον τρόπο η ακτινοβολία απορροφάται είτε από τη μελανίνη είτε από τα κερατινοκύτταρα της κεράτινης στιβάδας τα οποία βρίσκονται στο τελικό στάδιο της διαφοροποίησης προλαμβάνοντας έτσι βλάβες κερατινοκυττάρων των χαμηλότερων στιβάδων[5]. Παρόλα αυτά οι μηχανισμοί αυτοί δεν μπορούν να προστατέψουν το δέρμα από την επαναλαμβανόμενη και υπερβολική έκθεση.

Εκτός από την UV ακτινοβολία και αρκετοί άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες θεωρείται ότι μπορούν να συνεισφέρουν και στις δύο φάσεις της καρκινογένεσης στο δέρμα. Έτσι, η επαναλαμβανόμενη έκθεση σε χημικά μέσα όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, σε πτητικές οργανικές ενώσεις όπως το βενζένιο, και σε βαριά μέταλλα όπως το αρσενικό, το κάδμιο και ο μόλυβδος,

θεωρείται ότι αποτελούν τους κύριους παράγοντες εισαγωγής και προώθησης του καρκίνου σε συγκεκριμένες πληθυσμιακές ομάδες όπως οι αγρότες και οι εργαζόμενοι σε βιομηχανίες πετροχημικών προϊόντων, εντομοκτόνων, διυλιστηρίων, υφαντουργίας και μεταλλουργίας[6]. Μία άλλη σημαντική επίσης αιτία δημιουργίας μη-μελανωματικών καρκίνων του δέρματος είναι και ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων HPV. Γενικότερα μάλιστα έχει παρατηρηθεί ότι οι ασθενείς που εκτίθενται σε κάποιον από τους παραπάνω παράγοντες εμφανίζουν μεγαλύτερο αριθμό και πιο επιθετικά καρκινώματα σε σχέση με αυτούς για τους οποίους κύριο αίτιο θεωρείται η υπεριώδης ακτινοβολία. Κάποιοι άλλοι παράγοντες οι οποίοι μπορούν να συνεισφέρουν στη δημιουργία μη-μελανωματικών καρκινωμάτων είναι γενετικοί παράγοντες, το κάπνισμα και η ανοσοκαταστολή που ακολουθεί τις μεταμοσχεύσεις οργάνων[3,5].

4.3.1. Ακτινική κεράτωση

Η ακτινική κεράτωση είναι η πιο συνηθισμένη προκαρκινική βλάβη του δέρματος. Εμφανίζεται κυρίως στα χέρια, το πρόσωπο, στο τριχωτό της κεφαλής στους άνδρες, και γενικά σε σημεία τα οποία εκτίθενται περισσότερο στην ηλιακή ακτινοβολία[3,7]. Παρόλο που η ακτινική κεράτωση δεν μπορεί να επιφέρει σημαντικές επιπτώσεις στη γενική υγεία του ασθενή μπορεί να μετατραπεί μετά από κάποια χρόνια σε ακανθοκυτταρικό καρκίνο ο οποίος είναι μεταστατικός[7,8]. Υπολογίζεται ότι το 5-20% των ακτινικών κερατώσεων μετατρέπονται σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα εάν δε θεραπευτούν μετά από 10-25 χρόνια. Αρκετές φορές μάλιστα επειδή η πολλαπλότητα αυτών των βλαβών σε μία ευρεία περιοχή της πλάτης ή των άκρων αυξάνει σημαντικά των κίνδυνο δημιουργίας καρκινωμάτων και καθιστά απαραίτητη την άμεση θεραπεία τους. Εξάλλου γενικά η θεραπεία αυτών των βλαβών είναι σχετικά εύκολη και ανώδυνη με αποτέλεσμα να προτιμάται η έγκαιρη θεραπεία τους προκειμένου να εξαλειφθεί ο κίνδυνος δημιουργίας ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων[3].

4.3.2. Βασικοκυτταρικός καρκίνος

Το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα είναι ο συνηθέστερος καρκίνος των λευκών. Η ονομασία δόθηκε σε αυτόν τον τύπο καρκίνου λόγω των κυττάρων από τα οποία ξεκινά, κύτταρα βασικής στιβάδας. Η συχνότητα εμφάνισής του μάλιστα είναι αρκετά υψηλότερη στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες αν και τα τελευταία χρόνια παρατηρείται πολύ σημαντική αύξηση και στα ποσοστά εμφάνισής του και

στις γυναίκες. Το καρκίνωμα αυτό είναι εξαιρετικά ασυνήθιστο στις μαύρες και μελαμψές φυλές. Επίσης, εμφανίζεται συχνότερα στις λευκές φυλές σε σχέση με τις κίτρινες. Συνήθως, εμφανίζεται μετά το 40° έτος ηλικίας και η συχνότητά του αυξάνεται με την ηλικία.

Τα βασικοκυτταρικά καρκινώματα είναι κυρίως τοπικά μόνο διηθητικά, επιθετικά και καταστροφικά με περιορισμένη ικανότητα μετάστασης. Η εξήγηση για το φαινόμενο αυτό βρίσκεται στην εξάρτηση της ανάπτυξης του όγκου από την μεσοκυττάρια ουσία του, η οποία κατά τη διήθηση των αγγείων από τα κύτταρα του όγκου, δε διασπείρεται μαζί με τα κακοήθη κύτταρα. Όταν λοιπόν, τα κύτταρα του όγκου εγκαθίστανται σε απομακρυσμένες περιοχές δεν πολλαπλασιάζονται και δεν αναπτύσσονται, εξαιτίας της απουσίας των αυξητικών παραγόντων που υπάρχουν στην μεσοκυττάρια ουσία του όγκου.

Τα βασικοκυτταρικά καρκινώματα εμφανίζονται συνήθως μόνο σε περιοχές της επιδερμίδας οι οποίες έχουν την ικανότητα ανάπτυξης τριχικών θυλάκων. Συνεπώς, τα βασικοκυτταρικά καρκινώματα σπανίως εμφανίζονται στο όριο δέρματος-βλεννογόνου, των χειλιών ή στο βλεννογόνο των γεννητικών οργάνων.

Σοβαρά προβλήματα μπορούν να ανακύψουν όταν βασικοκυτταρικά καρκινώματα αναπτυχθούν σε συγκεκριμένες περιοχές της κεφαλής όπως γύρω από τους οφθαλμούς, τις ρινοπαρειακές αύλακες, γύρω και έξω από τον ακουστικό πόρο ή την οπίσθια ωτιαία αύλακα. Στις θέσεις αυτές ο όγκος μπορεί να καταστεί βαθέως διηθητικός, να προκαλέσει εκτεταμένη καταστροφή οστών και μυών, ακόμη και να διηθήσει στη σκληρή μήνιγγα. Σε τέτοιες περιπτώσεις, ο θάνατος μπορεί να επέλθει από αιμορραγία λόγω διάβρωσης μεγάλων αγγείων ή από λοίμωξη (μηνιγγίτιδα).

Τα καρκινώματα μπορούν αρχικά να εμφανιστούν με τρεις τρόπους. Ως μία ρόδινη βλατίδα που μεγεθύνεται προοδευτικά, μία διάβρωση η οποία δεν εμφανίζει τάση επούλωσης είτε τέλος ως διόγκωση μαργαριτοειδούς χρώματος με επιφάνεια ομαλή και λεία. Ο οριστικός κλινικός τύπος που θα εμφανίσει τελικά το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα γίνεται σαφής μετά την πάροδο κάποιων ετών από την εμφάνισή του.

Κλινικά τα βασικοκυτταρικά καρκινώματα μπορούν να διακριθούν σε επτά τύπους:

- Το οζώδες και ελκωτικό καρκίνωμα που είναι και ο συνηθέστερος τύπος.
- Το μελαγχρωματικό καρκίνωμα.
- Το καρκίνωμα που εμφανίζεται ως εντοπισμένη σκληροδερμία.

Εικόνα 4.1: *Οζώδες και ελκωτικό βασικοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής*

- Το επιφανειακό η παζετοειδές καρκίνωμα.
- Το ινοεπιθηλίωμα του Pinkus.
- Το σύνδρομο των πολλαπλών καρκινωμάτων.
- Το γραμμοειδή βασικοκυτταρικό σπίλο και γενικευμένο θυλακικό βασικο-κυτταρικό σπίλο[1].

4.3.3. Ακανθοκυτταρικός καρκίνος

Ο δερματικός ακανθοκυτταρικός καρκίνος δημιουργείται από την κακοήθη ανάπτυξη των κερατινοκυττάρων της επιδερμίδας που είναι και ο κυρίαρχος πληθυσμός της. Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα αναπτύσσεται τόσο στο δέρμα όσο και στους βλεννογόνους που αποτελεί και το συνηθέστερο καρκίνο τους. Πολύ συνηθισμένη, επίσης, θέση εμφάνισής του αποτελεί και ο ημιβλεννογόνος του κάτω χείλους.

Κλινικά το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα εμφανίζεται με τη μορφή ελκωμένου ογκιδίου. Το ογκίδιο αυτό εξέχει από την επιφάνεια του δέρματος, εμφανίζει επιφάνεια ανώμαλη βλαστική και ερυθρή, είναι σκληρό, ανώδυνο ή ελαφρώς επώδυνο και αιμορραγεί εύκολα. Η βάση του όγκου εμφανίζεται σκληρή λόγω διήθησης. Η σκληρότητα αυτή συνήθως ξεπερνά και τα όρια του όγκου. Τα καρκινώματα αυτά αναπτύσσονται σχετικά γρήγορα ενώ η έλκωση μέσω της οποίας εκφράζονται είναι ακανόνιστη και περιέχει πυθμένα ρυπαρό που περιέχει εύκολα αιμορραγούσες θηλωματώδεις εκβλαστίσεις ή συνηθέστερα λευκά στίγματα. Μετά

από πίεση από την περιοχή αυτή εξέρχονται κοκκία ή νημάτια λευκοκίτρινου χρώματος.

Συχνά η έλκωση καλύπτεται από μία εφελκίδα κάτω από την οποία παρατηρείται ερυθρά και κοκκιωματώδης βάση. Άλλοτε το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα εμφανίζεται ως υπερυψωμένος εξωφυτικός, μυρμηγκιώδης όγκος χωρίς τάση να ελκωθεί[1].

Εικόνα 4.2: *Ακανθοκυτταρικά καρκινώματα κεφαλής*

4.3.4. Ασθένεια Bowen's

Η ασθένεια Bowen's (in situ ακανθοκυτταρικός καρκίνος) εμφανίζεται κυρίως στο κάτω μέρος των ποδιών ηλικιωμένων κυρίως ασθενών. Το 30% περίπου αυτών των βλαβών εάν δε θεραπευτούν μετατρέπονται σε επιθετικούς-διηθητικούς οι οποίοι δίνουν μεταστάσεις[3]. Εκτός όμως από τα άκρα σπανιότερα εμφανίζονται και σε άλλα σημεία του δέρματος[7].

4.4. Διάγνωση μη μελανωματικών καρκίνων του δέρματος με φασματοσκοπία φθορισμού

Ο καρκίνος του δέρματος, οι φλεγμονώδεις καθώς και οι μολυσματικές ασθένειες του δέρματος, είναι ασθένειες των οποίων η θεραπεία θα ευνοούνταν κατά πολύ από ένα γρήγορο, αντικειμενικό, μη επεμβατικό διαγνωστικό τεστ. Ενδιαφέρον θα ήταν επίσης, για την προληπτική δερματολογία, εάν αυτό το τεστ μπορούσε να μετρήσει κάποιους ενδεικτικούς δείκτες του ανοσοποιητικού συστήματος και της βιοχημικής κατάστασης του δέρματος.

Η σύγχρονη κλινική δερματολογική διάγνωση βασίζεται στην οπτική παρατήρηση υπό έντονο λευκό φως (συνήθως και με χρήση κάποιου συστήματος φακών),

καταγραφή του ιατρικού ιστορικού, βιοψία και εξέταση-καλλιέργεια βιολογικών δειγμάτων. Η εξέταση αυτή παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα όπως το ότι είναι ακριβή, χρονοβόρα και κυρίως επεμβατική. Επίσης μηδαμινή είναι η συνεισφορά της στη μέτρηση ενδεικτικών δεικτών της γενικότερης βιοχημικής κατάστασης του δέρματος[9].

Η φασματοσκοπία είναι μια εναλλακτική μέθοδος η οποία έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη μη επεμβατικών διαγνωστικών συστημάτων. Το δέρμα ήταν από τα πρώτα όργανα που εξετάστηκαν κάτω από αυτό το πρίσμα λόγω της εύκολης πρόσβασης των φασματοσκοπικών συστημάτων σε αυτό. Επιπλέον, το δέρμα χρησιμοποιήθηκε και ως μοντέλο για τη δοκιμή διαφόρων μεθόδων πριν τη μεταφορά τους σε πιο δύσκολα στην πρόσβαση όργανα[10].

4.4.1. Ενδογενή χρωμοφόρα του δέρματος

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι φθορισμού για τη διάγνωση μη μελανωματικών καρκίνων του δέρματος, όπως και γενικότερα οι φασματοσκοπικές μέθοδοι φθορισμού, μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την προέλευση του μορίου του οποίου ο φθορισμός θα δώσει τη διαγνωστική πληροφορία (αυτοφθορισμού-φθορισμού εξωγενών χρωμοφόρων).

Τα δύο πιο σημαντικά μόρια του δέρματος τα οποία απορροφούν στην υπεριώδη (280-400 nm) και στην ορατή περιοχή του φάσματος (400-700 nm) είναι η μελανίνη και η αιμοσφαιρίνη. Στο δέρμα υπάρχουν επίσης και αρκετά φθορίζοντα μόρια. Τα μόρια αυτά διεγείρονται μετά από απορρόφηση υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας εκπέμποντας ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος και εντάσεως 1000 φορές περίπου μικρότερης από την προσπίπτουσα. Τα φάσματα εκπομπής αυτών των μορίων είναι πολύ δύσκολο έως αδύνατο να διαχωριστούν γιατί αλληλεπικαλύπτονται. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ύπαρξη μορίων απορροφητών (πρωτεΐνες 280-330, αιμοσφαιρίνη μελανίνη 330-400) στο δέρμα κάνει το φαινόμενο του αυτοφθορισμού ακόμη πιο πολύπλοκο ειδικά στην περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας[11].

4.4.2. Φωτοδυναμική διάγνωση

Η διάγνωση φθορισμού με χρήση εξωγενών χρωμοφόρων είναι μία πολλά υποσχόμενη αλλά όχι ευρέως κλινικά χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία. Στη φωτοδυναμική διάγνωση ένας φωτοευαισθητοποιητής ή μία πρόδρομος ένωση

αυτού χορηγείται τοπικά ή συστηματικά και μετά την πάροδο κάποιου χρονικού διαστήματος κατακρατείται επιλεκτικά από τους καρκινικούς ιστούς. Εάν οι ιστοί αυτοί ακτινοβοληθούν με κατάλληλο φως (χαμηλής ισχύος και μήκους κύματος που αντιστοιχεί σε κάποια από τις κορυφές του φάσματος απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή) ο φωτοευαισθητοποιητής θα φθορίσει επιτρέποντας την ανίχνευση των καρκινικών ιστών[12,13].

Πίνακας 4.1. *Ενδογενή χρωμοφόρα του δέρματος*

Χρωμοφόρο	Κύρια περιοχή απορρόφησης	Φθορισμός	Κύριες Κορυφές (nm)
Οξυαιμοσφαιρίνη	UV-Ορατή	Όχι	412, 542, 577
Δεσόξυαιμοσφαιρίνη	UV-Ορατή	Όχι	430, 555, 760
Μελανίνη	UV-Ορατή	Όχι	Αύξηση με μείωση του μήκους κύματος
Νερό	IR-μακράν ορατή	Όχι	760, 900, 1250, 1400
Πορφυρίνες	Ορατή	Ναι	Διεγ. ~405, Εκπομ. ~600
Χολερυθρίνη	Ορατή	Όχι	460
NAD/NADH	UV	Ναι	Διεγ. ~350, Εκπομ. ~460
DNA/RNA	UV	Όχι	260
Τρυπτοφάνη	UV	Ναι	Διεγ. 295, Εκπομ. 340-350
Ουροκανικό οξύ	UV	Όχι	280
Σταυροδεσμοί κολλαγόνου	UV	Ναι	Διεγ. 335, 370 Εκπομ. 380, 460
Σταυροδεσμοί ελαστίνης	UV-Ορατή	Ναι	Διεγ. 420, 460 Εκπομ. 500, 540
Ξηρή κερατίνη	UV	Ναι	Διεγ. 370 Εκπομ. 460

Το σημαντικότερο μειονέκτημα της φωτοδυναμικής διάγνωσης των μη μελανωματικών καρκίνων του δέρματος είναι ότι οι περισσότεροι

φωτοευαισθητοποιητές με εξαίρεση το αμινολεβουλινικό οξύ χορηγούνται συστηματικά. Και αυτό γιατί τα μόρια τους είναι τόσο μεγάλα σε μέγεθος που δύσκολα μπορούν να διεισδύσουν και να περάσουν το φράγμα της επιδερμίδας. Η συστηματική χορήγηση τόσο λόγω της τοξικότητας που επιφέρει η επαναλαμβανόμενη χρήση τους όσο και λόγω της παραμένουσας φωτοευαισθησίας τους καθιστά ακατάλληλους για διαγνωστικά συστήματα[14].

Μέχρι στιγμής κανένας από τους φωτοευαισθητοποιητές, εκτός από το ALA, δεν έχει πάρει έγκριση για κλινική εφαρμογή στη διάγνωση μη μελανωματικών καρκίνων του δέρματος. Παρόλα αυτά, αρκετά ερευνητικά πρωτόκολλα φωτοδυναμικής διάγνωσης μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος έχουν εγκριθεί σε επίπεδο κλινικών ερευνών οι οποίες αυτή τη στιγμή βρίσκονται σε εξέλιξη[15]. Το αμινολεβουλινικό οξύ και τα διάφορα παράγωγά του είναι οι φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι μελετώνται από τις περισσότερες ερευνητικές ομάδες. Ο κυριότερος λόγος για αυτήν την προτίμηση των διαφόρων επιστημονικών ομάδων σε αυτήν την ένωση, είναι ότι μπορεί να χορηγηθεί τοπικά και να απορροφηθεί σε σημαντικό βαθμό από το δέρμα (λόγω του πολύ μικρού μεγέθους του μορίου του) αποφεύγοντας έτσι όλες τις παρενέργειες που δημιουργεί η συστηματική χορήγηση των φωτοευαισθητοποιητών[14,16,17].

Κάποιοι άλλοι φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι μελετώνται τοπικά είναι η 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη και οι φθαλοκυανίνες. Το σημαντικότερο μειονέκτημα αυτών των φωτοευαισθητοποιητών ως προς το αμινολεβουλινικό οξύ και τα παράγωγά του είναι το σημαντικά μεγαλύτερο μέγεθος των μορίων τους σε σχέση με το αμινολεβουλινικό (~3 φορές μεγαλύτερο μοριακό βάρος) γεγονός που δεν τους επιτρέπει να απορροφηθούν από το δέρμα τόσο εύκολα όσο το αμινολεβουλινικό οξύ. Προκειμένου να λυθεί όμως αυτό το πρόβλημα γίνονται προσπάθειες ώστε τα μόρια αυτά να εγκλειστούν σε λιποσώματα ή να διαλυθούν σε διαλύματα ενώσεων τα οποία βοηθούν σημαντικά τη διείσδυση και την απορρόφησή τους από τα διάφορα στρώματα του δέρματος[18].

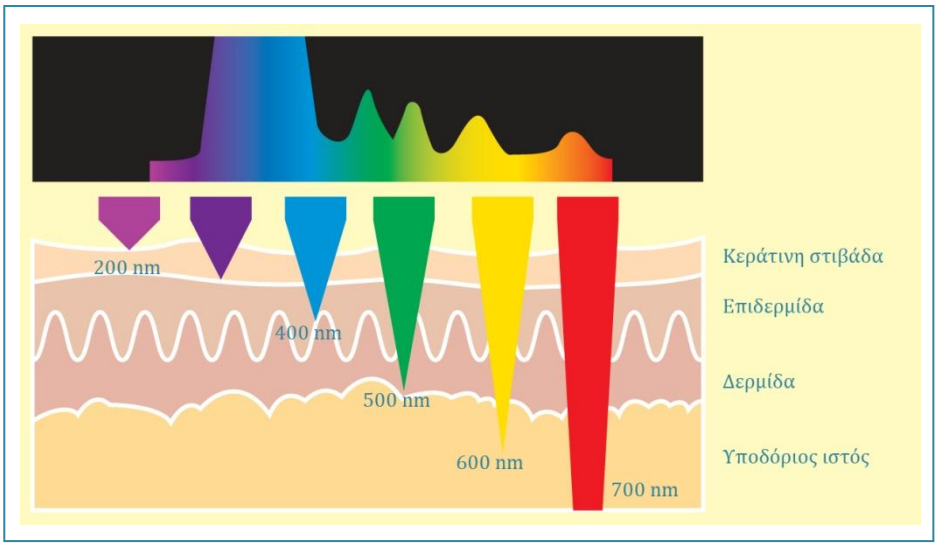
Ένας άλλος φωτοευαισθητοποιητής ο οποίος χορηγείται συστηματικά είναι η υπερικίνη η οποία μελετάται αυτή τη στιγμή, κυρίως λόγω της πολύ χαμηλής τοξικότητάς της, σε επίπεδο πειραματοζώων[19].

4.4.3. Βάθος διείσδυσης ακτινοβολίας διέγερσης

Μία άλλη σημαντική παράμετρος κατά την αλληλεπίδραση του φωτός με το

δέρμα και γενικότερα τους ιστούς είναι το βάθος διείσδυσης. Το βάθος στο οποίο μπορεί να διεισδύσει το φως στο δέρμα ουσιαστικά αντιστοιχεί και στο βάθος από το οποίο προέρχεται η διαγνωστική πληροφορία. Το βάθος διείσδυσης του φωτός περιορίζεται από την εξασθένηση της έντασής του λόγω απορρόφησης και σκέδασης.

Το βάθος διείσδυσης φωτός με μήκος κύματος που ανήκει στην κόκκινη περιοχή του ορατού είναι μερικά mm. Όσο το μήκος κύματος μειώνεται και πλησιάζει την μπλε περιοχή του ορατού, τα 400 nm δηλαδή, το βάθος διείσδυσης μειώνεται κατά μία τάξη μεγέθους. Περαιτέρω μείωση του μήκους κύματος συνεπάγεται μείωση του βάθους κατά δύο τάξεις μεγέθους. Πρακτικά αυτό σημαίνει πως το κόκκινο φως μπορεί να δώσει πληροφορία για όλες τις στιβάδες του δέρματος ενώ το υπεριώδες φως μπορεί να δώσει πληροφορία μόνο για την ανώτατη στιβάδα του δέρματος, την επιδερμίδα[11,20].



Σχήμα 4.3: *Βάθος διείσδυσης φωτεινής ακτινοβολίας στο δέρμα*

4.4.4. Ανάλυση και επεξεργασία φασμάτων φθορισμού

4.4.4.1. Ανάλυση φασμάτων αυτοφθορισμού

Η μεθοδολογία που ακολουθείται για την κατηγοριοποίηση των δερματικών ιστών μέσω φασματοσκοπίας είτε αυτοφθορισμού είτε φθορισμού εξωγενών χρωμοφόρων δε διαφέρει σημαντικά. Και στις δύο περιπτώσεις για τη λήψη των φασματικών χαρακτηριστικών χρησιμοποιούνται σημειακά συστήματα καταγραφής φθορισμού, τα οποία έχουν ήδη περιγραφεί στο κεφάλαιο 2.

Από τη στιγμή που θα ληφθούν τα φάσματα φθορισμού υπάρχουν διάφορες

μεθοδολογίες επεξεργασίας τους. Όλες όμως στηρίζονται στην κοινή αρχή ότι η ένταση φθορισμού εκτός από όλους τους άλλους παράγοντες, οι οποίοι εκτενώς έχουν εξεταστεί στο κεφάλαιο 2, εξαρτάται από τη συγκέντρωση του χρωμοφόρου στο εξεταζόμενο σημείο. Μέσω της έντασης φθορισμού δηλαδή, μελετάται η μεταβολή της συγκέντρωσης μορίων η οποία μπορεί να αποτελέσει δείκτη βιοχημικών αλλαγών στον ιστό ή ακόμη και δείκτη κατηγοριοποίησης της παθογένειάς του.

Η λήψη φασμάτων διέγερσης των μέχρι στιγμής μελετών αυτοφθορισμού σε δερματικούς ιστούς έχει δείξει ότι υπάρχουν τρία κύρια μήκη κύματος διέγερσης στην UV περιοχή 295, 335 και 370 nm τα οποία δίνουν ισχυρό σήμα φθορισμού και ένα το οποίο δίνει ασθενέστερο σήμα στην ορατή περιοχή 420 nm[11]. Επίσης έχει δειχθεί μετά από ex vivo μελέτες (απομόνωση της δερμίδας από την επιδερμίδα) τα χρωμοφόρα της επιδερμίδας διεγείρονται με μήκη κύματος τα οποία βρίσκονται στη ζώνη του UV μέχρι τα 315 nm. Με διέγερση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος η συνεισφορά της επιδερμίδας στη συνολική ένταση φθορισμού θεωρείται αμελητέα[21].

Η κορυφή στα 295 nm αποδίδεται στην επιδερμική τρυπτοφάνη η οποία παρουσίαζει κορυφή έντασης φθορισμού στα 340-350 nm[10,11,22]. Αύξηση της τρυπτοφάνης συνδέεται με αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων. Αύξηση του φθορισμού της τρυπτοφάνης σε σχέση με το φθορισμό της σε φυσιολογικό δέρμα έχει παρατηρηθεί σε δέρμα το οποίο έχει υποστεί γήρανση λόγω επαναλαμβανόμενης έκθεσης σε UV ακτινοβολία[11] αλλά και σε μη μελανωματικούς καρκίνους[10].

Οι κορυφές στα 335 και στα 370 nm αποδίδονται στους σταυροδεσμούς κολλαγόνου οι οποίοι λύονται από πεπσίνη και κολλαγενάση αντίστοιχα. Ο φθορισμός των σταυροδεσμών κολλαγόνου οι οποίοι λύονται από πεπσίνη έχει βρεθεί να σχετίζεται άμεσα με τη γήρανση. Αντίθετα δεν έχει παρατηρηθεί σημαντική μεταβολή του φθορισμού που αποδίδεται στους σταυροδεσμούς που λύονται από κολλαγενάση σε σχέση με τη γήρανση[22]. Στην περίπτωση όμως των μη μελανωματικών καρκίνων του δέρματος έχει παρατηρηθεί σημαντική μεταβολή στο φθορισμό η οποία αποδίδεται στη λύση των δεσμών από τις μεταλλοπρωτεϊνάσες των οποίων η συγκέντρωση αυξάνεται σημαντικά[10,18].

Στην ίδια περιοχή με τους σταυροδεσμούς του κολλαγόνου διεγείρεται και το NADH. Η ένταση φθορισμού του όμως υπερκαλύπτεται από αυτήν των σταυροδεσμών κολλαγόνου. Αυτό συμβαίνει γιατί τα κερατινοκύτταρα εν αντιθέσει

με άλλα κύτταρα π.χ. ηπατοκύτταρα (στα οποία η συγκέντρωση του NADH χρησιμοποιείται ως καρκινικός δείκτης) είναι πολύ φτωχά σε μιτοχονδριακό περιεχόμενο[11]. Θεωρείται επίσης ότι ο φθορισμός ο οποίος οφείλεται στο NADH δεν μεταβάλεται τόσο σημαντικά είτε λόγω γήρανσης είτε λόγω καρκινογένεσης ώστε να επηρεάζει σημαντικά το σήμα φθορισμού το οποίο προέρχεται από το κολλαγόνο.

Οι σταυροδεσμοί της ελαστίνης διεγείρονται στα 420 nm. Από in vitro μελέτες η κορυφή του φάσματος εκπομπής αναμένεται στα 500 nm. Όμως, το φάσμα των σταυροδεσμών της ελαστίνης επικαλύπτεται σε σημαντικό βαθμός από το φάσμα των σταυροδεσμών του κολλαγόνου και έτσι μόνο κάποια δευτερεύουσα κορυφή μπορεί να παρατηρηθεί στα in vivo πειράματα. Στις μέχρι τώρα μελέτες η συγκέντρωση των σταυροδεσμών της ελαστίνης φαίνεται να αυξάνεται με τη γήρανση και να μειώνεται σε μη μελανωματικά καρκινώματα παρόμοια με του κολλαγόνου λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης των μεταλλοπρωτεϊνασών[10,18,22].

4.4.4.2. Ανάλυση φασμάτων φθορισμού φωτοευαισθητοποιητών

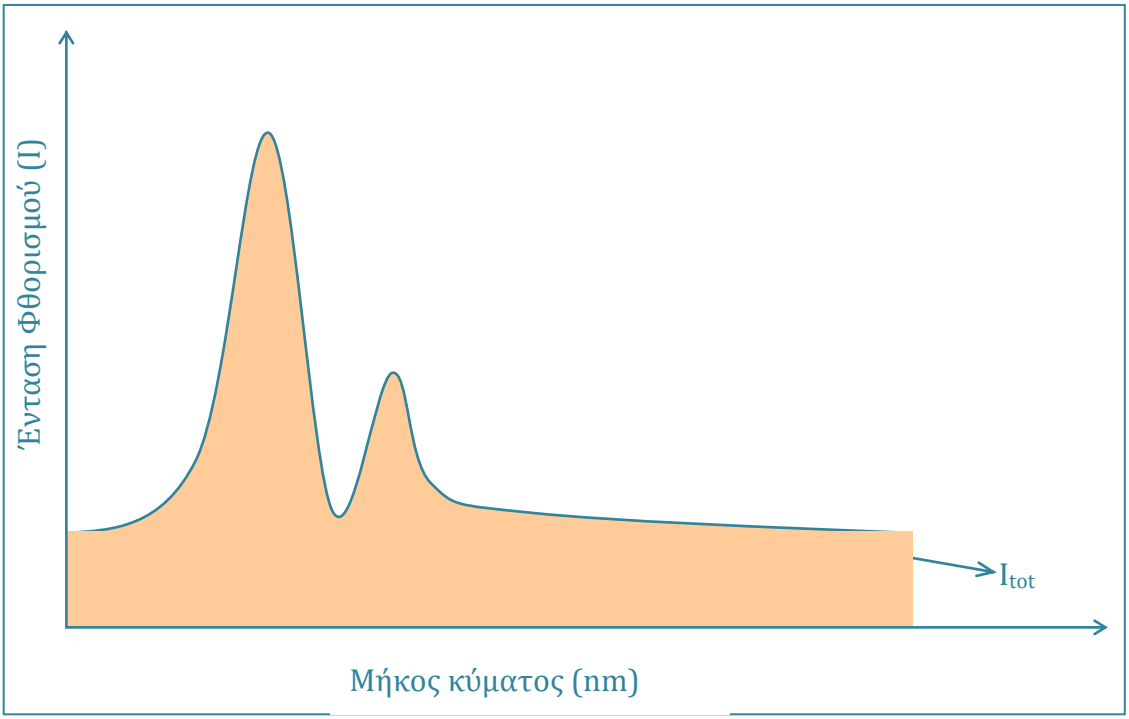
Στην περίπτωση των φωτοευαισθητοποιητών η ανάλυση των φασμάτων είναι πολύ πιο εύκολη. Το φάσμα το οποίο προκύπτει όταν ο φωτοευαισθητοποιητής απορροφηθεί από τον ιστό και διεγερθεί σε μία από τις κύριες κορυφές απορρόφησής του μοιάζει αρκετά με αυτό του φωτοευαισθητοποιητή σε κάποιον οργανικό διαλύτη. Η ένταση φθορισμού είναι πολύ πιο ισχυρή και οι κορυφές φθορισμού του φωτοευαισθητοποιητή είναι σχετικά εύκολα διακριτές. Παρόλα αυτά και αυτά τα φάσματα χρειάζονται κάποια επεξεργασία προκειμένου να υπολογιστεί η συνεισφορά του αυτοφθορισμού.

4.4.4.3. Επεξεργασία φασμάτων

Από την παραπάνω ποιοτική ανάλυση των φασμάτων φθορισμού προκύπτει ότι υπάρχουν κάποια βιολογικά μόρια τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατηγοριοποίηση των ιστών ως προς την παθογένεια ή τη βιοχημική τους κατάσταση. Όμως προκειμένου να εξαχθούν δείκτες οι οποίοι θα κατατάσσουν αντικειμενικά και με έναν αποδεκτό βαθμό επιτυχίας τους ιστούς σε κατηγορίες θα πρέπει να εξαχθούν κάποια ποσοτικά στοιχεία από φάσματα ιστών οι οποίοι έχουν εξεταστεί ιστοπαθολογικά και είναι γνωστό σε ποια κατηγορία ανήκουν.

Μετά την πρώτη παρατήρηση των φασμάτων και εύρεση των κορυφών εκπομπής

και διέγερσης στα φάσματα φθορισμού μπορούν να εξαχθούν δύο βασικά ποσοτικά χαρακτηριστικά. Η ένταση φθορισμού σε κάποια συγκεκριμένα μήκη κύματος (I_1) και η συνολική ένταση φθορισμού (I_{tot}) η οποία προκύπτει από ολοκλήρωση του φάσματος εκπομπής για μία συγκεκριμένη ζώνη μηκών κύματος (Σχήμα 4.4). Η ένταση φθορισμού συνήθως υπολογίζεται σε ένα από τα μήκη κύματος όπου τα φάσματα εμφανίζουν κορυφές.

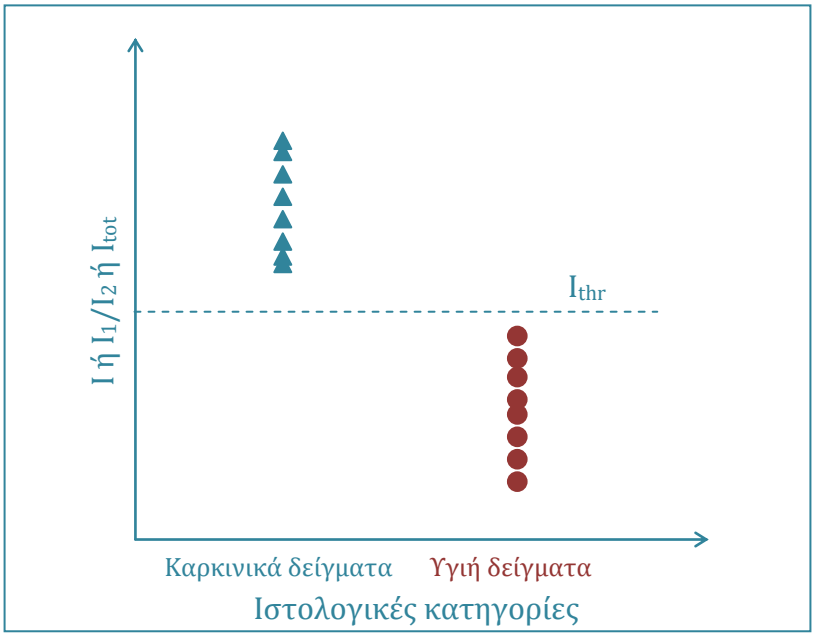


Σχήμα 4.4: *Φάσμα εκπομπής φθορισμού και βασικά εξαγόμενα ποσοτικά χαρακτηριστικά*

Αφού βρεθεί η μέση ένταση φθορισμού σε κάποια συγκεκριμένα μήκη κύματος για αρκετά δείγματα ιστών που ανήκουν σε δύο ή περισσότερες κατηγορίες μπορεί να υπολογιστεί μέσω στατιστικών αλγορίθμων και η τιμή όριο η οποία με μία δεδομένη ακρίβεια διαχωρίζει τα δείγματα σε κατηγορίες[23,24]. Το ίδιο μπορεί να συμβεί και όταν αντί για την ένταση φθορισμού σε κάποιο συγκεκριμένο μήκος κύματος έχει υπολογιστεί η συνολική ένταση φθορισμού σε μία ζώνη μηκών κύματος[10] (Σχήμα 4.5).

Σε αυτές τις τεχνικές μπορούν να γίνουν και κάποιες βελτιώσεις προκειμένου να απορριφθεί ο θόρυβος των οργάνων ή/και κάποια χαρακτηριστικά που επηρεάζουν τη μέτρηση όπως π.χ. ο τύπος δέρματος. Σε αυτήν την περίπτωση δεν υπολογίζεται μόνο η ένταση φθορισμού σε κάποια μήκη κύματος στα οποία ο φθορισμός

εμφανίζει μέγιστο αλλά και σε κάποιες περιοχές όπου το σήμα φθορισμού είναι χαμηλό και σχεδόν σταθερό για μία περιοχή μηκών κύματος (baseline) (I_2) και ως δείκτης λαμβάνεται ο λόγος των δύο εντάσεων (I_1/I_2). Επίσης μπορεί να γίνει και κανονικοποίηση όλου του φάσματος ως προς κάποια τιμή ένστασης[25].



Σχήμα 4.5: *Διάγραμμα σκέδασης ιστολογικών κατηγοριών*

Στην περίπτωση χρήσης κάποιου φωτοευαισθητοποιητή ακολουθείται η ίδια επεξεργασία με μία μικρή μόνο αλλαγή. Από το φάσμα φθορισμού αφαιρείται το φάσμα αυτοφθορισμού του ιστού το οποίο καταγράφηκε από το ίδιο σημείο πριν τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή[26]. Με κατάλληλη βαθμονόμηση του συστήματος μέσω καμπυλών αναφοράς μπορεί ακόμη το σύστημα να υπολογίζει και τη συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή στον ιστό.

Η επιτυχία τελικά της μεθόδου ως προς το να κατατάξει σωστά κάποιους ιστούς εκφράζεται μέσω των παρακάτω στατιστικών παραμέτρων[25].

- Ευαισθησία, η οποία ορίζεται ως το πηλίκο του πλήθους των πραγματικά θετικών δειγμάτων προς το συνολικό πλήθος των καρκινικών δειγμάτων
- Εξειδίκευση, η οποία ορίζεται ως το πηλίκο του πλήθους των πραγματικά αρνητικών δειγμάτων προς το συνολικό πλήθος των υγιών δειγμάτων
- Ακρίβεια ταξινόμησης, η οποία ορίζεται ως το πηλίκο του πλήθους των πραγματικά αρνητικών και θετικών δειγμάτων προς το συνολικό πλήθος των υγιών και καρκινικών δειγμάτων

Στην περίπτωση βέβαια που δε μελετάται κάποια μορφή καρκίνου αλλά κάποια άλλη ασθένεια στους παραπάνω λόγους μπαίνει ο αριθμός των μη υγιών δειγμάτων.

4.5. Φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνου του δέρματος

Οι κύριοι λόγοι για τους οποίους η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μία από τις προτιμώμενες θεραπείες δερματολογικών καρκίνων είναι η σχετικά γρήγορη καταστροφή του όγκου, η επιλεκτικότητα και τα άριστα κοσμητολογικά αποτελέσματα[7]. Ο πρώτος φωτοευαισθητοποιητής που χρησιμοποιήθηκε στη φωτοδυναμική θεραπεία δερματικού καρκίνου ήταν η Photofrin. Ο φωτοευαισθητοποιητής αυτός και πολύ άλλοι οι οποίοι εφαρμόστηκαν και μερικοί από αυτούς εφαρμόζονται ακόμη, όπως η 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη (Foscan), παρουσιάζουν ένα σημαντικό μειονέκτημα. Η μορφή στην οποία βρίσκονται απαγορεύει την τοπική τους χορήγηση. Αυτό συνεπάγεται ότι οι φωτοευαισθητοποιητές αυτοί πρέπει απαραιτήτως να χορηγηθούν συστηματικά (συνήθως ενδοφλέβια)[7,27].

Η συστηματική χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή «επιβαρύνει» τη φωτοδυναμική θεραπεία με πάρα πολλά μειονεκτήματα. Πρώτον, δεν αποφεύγεται η ηπατική διέλευση του φωτοευαισθητοποιητή, κάτι το οποίο δεν επιτρέπει τη συχνά επαναλαμβανόμενη χρήση του. Δεύτερον, αυξάνεται κατά πολύ ο χρόνος ο οποίος πρέπει να μεσολαβήσει μεταξύ της χορήγησης του φτοευαισθητοποιητή και της ακτινοβόλησης των καρκινικών ιστών με αποτέλεσμα την αύξηση του συνολικού χρόνου της θεραπείας και της ψυχολογικής φόρτισης του ασθενή. Τρίτον, οι φωτοευαισθητοποιητές απορροφώνται σε μεγάλα ποσοστά και από τα υγιή δερματικά κύτταρα γεγονός που σε συνδυασμό με τους μεγάλους χρόνους απομάκρυνσης αυτών των φωτοευαισθητοποιητών από τους ιστούς (>1 μήνα για τη Photofrin) συντελούν στο φαινόμενο της γενικευμένης φωτοευαισθησίας[8,28].

Αντίθετα, με τοπική χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή όλα αυτά τα μειονεκτήματα εξαλείφονται ενώ εφικτή είναι πλέον και η επανάληψη της θεραπείας εάν κάτι τέτοιο κριθεί απαραίτητο. Το σημαντικότερο μέχρι στιγμής πρόβλημα στην τοπική χορήγηση των φωτοευαισθητοποιητών είναι ότι όντας μεγάλα μόρια δύσκολα διαπερνούν τις ανώτερες κυτταρικές στιβάδες του δέρματος και δύσκολα διεισδύουν μέσα στον όγκο[27]. Όπως στη φωτοδυναμική διάγνωση έτσι και στη φωτοδυναμική θεραπεία οι μόνοι φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι μέχρι σήμερα έχουν εγκριθεί στις ΗΠΑ και στις Ευρωπαϊκές χώρες για τοπική

εφαρμογή είναι το αμινολεβουλινικό οξύ και παράγωγά του[7]. Τελευταία πάντως σημαντικές προσπάθειες καταβάλλονται για τη σύνθεση ειδικών λιπιδικών διαλυμάτων-σκευασμάτων τα οποία θα βοηθούσαν στη γρήγορη απορρόφηση της μετα-τετρα-υδροξυφαινυλοχλωρίνης από τους καρκινικούς δερματικούς ιστούς[16] ενώ παράλληλα μελετάται η διάλυση φθαλοκυανινών σε διαλύματα ενισχυτών διείσδυσης μεγάλων οργανικών μορίων στο δέρμα[29,30].

4.5.1. Τοπική φωτοδυναμική θεραπεία

Οι ασθενείς στους οποίους προτείνεται να ακολουθήσουν τοπική φωτοδυναμική θεραπεία είναι ασθενείς οι οποίοι φέρουν επιφανειακά βασικοκυτταρικά καρκινώματα, βλάβες ακτινικής κεράτωσης και Bowen's. Η τοπική φωτοδυναμική θεραπεία δεν έχει πάρει ακόμη έγκριση ούτε στην Ευρώπη ούτε στις ΗΠΑ για ακανθοκυτταρικά δερματικά καρκινώματα αν και πολλές μελέτες έχουν πάρει άδεια και βρίσκονται αυτόν τον καιρό σε εξέλιξη. Επίσης δεν ενδείκνυνται για θεραπεία οζωδών και μελαγχρωματικών βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων παρά μόνο στις περιπτώσεις που η χειρουργική αφαίρεση δεν είναι εφικτή[7].

4.5.2. Τοπική φωτοδυναμική θεραπεία με ALA και παράγωγά του

Η τοπική χορήγηση του αμινολεβουλινικού οξέος έχει εγκριθεί από τον FDA μόνο για θεραπεία βλαβών ακτινικής κεράτωσης κεφαλής. Ο μεθυλεστέρας του (Metvix®) έχει εγκριθεί στην Ευρώπη για θεραπεία ακτινικής κεράτωσης και βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων[31]. Παρόλα αυτά σε όλον τον κόσμο πάρα πολλά νοσοκομεία έχουν πάρει εγκρίσεις για κλινικές έρευνες της χρήσης αυτών των δύο φωτοευαισθητοποιητών σε όλες τις μορφές μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος. Οι περισσότερες μάλιστα από αυτές τις έρευνες είναι τόσο ευρείας κλίμακας ώστε σήμερα πάρα πολλές χιλιάδες ασθενών που έφεραν μη μελανωματικούς καρκίνους του δέρματος έχουν θεραπευτεί[3].

Γενικά θεωρείται ότι ο μεθυλεστέρας του αμινολεβουλινικού οξέος είναι πιο επιλεκτικός και απορροφάται πολύ πιο γρήγορα σε σχέση με το αμινολεβουλινικό οξύ[31]. Έτσι η μόνη διαφορά μεταξύ των πρωτοκόλλων αυτών των δύο φωτοευαισθητοποιητών είναι ουσιαστικά το μικρότερο διάστημα που απαιτείται για την απορρόφηση του μεθυλεστέρα του αμινολεβουλινικού οξέος. Ο χρόνος που αφήνεται να μεσολαβήσει μεταξύ ης επάλειψης και της ακτινοβόλησης του αμινολεβουλινικού οξέος κυμαίνεται από 6-16 h[31-33]. Αντίθετα, για τον μεθυλεστέρα του 3h θεωρούνται αρκετές[3].

Σημαντικές είναι επίσης και οι διαφορές από κλινική σε κλινική αλλά ακόμη και μέσα στην ίδια κλινική στις πηγές ακτινοβόλησης οι οποίες χρησιμοποιούνται. Στην Ευρώπη προτιμώνται κυρίως πηγές ακτινοβολίας στην περιοχή του κόκκινου[32-34,] αν και στη θεραπεία της ακτινικής κεράτωσης πολύ καλά είναι και τα αποτελέσματα που έχουν δώσει λάμπες από τις οποίες αφήνεται να περάσει μόνο η ακτινοβολία στην περιοχή του μπλε[7]. Στην περιοχή του κόκκινου χρησιμοποιούνται διοδικά laser που εκπέμπουν στα 630 nm, laser χρωστικών τα οποία αντλούνται από laser αργού στα 635 nm, και λάμπες με φίλτρα οι οποίες αφήνουν ακτινοβολία μήκους κύματος 560-740 nm ή ακόμη και LED στην περιοχή των 600-650 nm[31,32].

Η ακτινοβόληση στην περιοχή του κόκκινου κυμαίνεται από 65-120 mW/cm^2 ανάλογα με την πηγή, ενώ η συνολική δόση ενέργειας από 75-150 J/cm^2 [31,32]. Συνήθως 2 συνεδρίες είναι αρκετές για την πλήρη ίαση επιφανειακών καρκινωμάτων και μεταξύ τους μεσολαβεί διάστημα 2- 3 εβδομάδων[35].

Τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής στις μεγαλύτερες κλινικές δοκιμές που έχουν διεξαχθεί μέχρι τώρα διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο μη μελανωματικού καρκίνου. Έτσι για ακτινική κεράτωση και για την ασθένεια Bowen's κυμαίνονται από 90 έως 100%, για επιφανειακά βασικοκυτταρικά καρκινώματα από 80-100% για οζώδη βασικοκυτταρικά από 62-94%[3]. Για επιφανειακά ακανθοκυτταρικά καρκινώματα τα οποία θεραπεύτηκαν με τοπική φωτοδυναμική θεραπεία με αμινολεβουλινικό οξύ ή παράγωγά του τα ποσοστά επιτυχίας είναι σημαντικά χαμηλότερα 60-74% αλλά και οι έρευνες έχουν διεξαχθεί σε πολύ μικρότερο αριθμό ασθενών[32,35].

4.5.3. Τοπική φωτοδυναμική θεραπεία με 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη

Η ενδοφλέβια χορήγηση της μετα-τετρα-υδροξυφαινυλοχλωρίνης έχει εγκριθεί από το 2001 στις χώρες της ΕΕ, για φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνων κεφαλής και τραχήλου. Η χορηγούμενη δόση σε αυτό το πρωτόκολλο θεραπείας είναι 0.15 mg/kg. Ο χρόνος που μεσολαβεί από τη χορήγηση έως την ακτινοβόληση των όγκων είναι 96 h και η δόση ενέργειας είναι 20 J/cm^2 ακτινοβόληση 100 mW/cm^2. Σε αυτό το πρωτόκολλο χρησιμοποιείται διοδικό laser που εκπέμπει στα 652 nm και η μετα-τετρα-υδροξυφαινυλοχλωρίνη είναι διαλυμένη σε διάλυμα αιθανόλης-πολυαιθυλενογλυκόλης (40/60)[36]. Τα τελευταία χρόνια έγιναν και κάποιες έρευνες σε δερματικούς καρκίνους οι οποίες έδειξαν πως η μετα-τετρα-υδροξυφαινυλοχλωρίνη

μπορεί να είναι αποτελεσματική και σε μικρότερες δόσεις >0,1 mg/kg. Επίσης δόσεις ενέργειας >0,5 J/cm^2 μπορούν να δώσουν εξίσου καλά αποτελέσματα[37,38].

Η χορήγηση αυτή της μετα-τετρα-υδροξυφαινυλοχλωρίνης παρόλο που δίνει αρκετά καλά θεραπευτικά αποτελέσματα συνοδεύεται από γενικευμένη φωτοευαισθησία για αρκετές εβδομάδες με όλα τα προβλήματα που αυτή συνεπάγεται[36]. Για αυτό και τα τελευταία χρόνια οι φαρμακευτικές εταιρείες παραγωγής της μετα-τετρα-υδροξυφαινυλοχλωρίνης καταβάλουν προσπάθειες ώστε να δημιουργήσουν κάποιο σκεύασμα 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης κατάλληλο για τοπική χορήγηση.

Η μόνη κλινική έρευνα που έχει δημοσιευθεί μέχρι στιγμής είναι των Gupta et al. Σε αυτήν την έρευνα συμμετείχαν 29 ασθενείς με ασθένεια Bowen's και βασικοκυτταρικά καρκινώματα. Επάνω στις βλάβες έγινε επάλειψη ενός gel μετα-τετρα-υδροξυφαινυλοχλωρίνης (2%). Οι βλάβες καλύφθηκαν όπως έχει ήδη περιγραφεί για 24 h. Εν συνεχεία ακτινοβολήθηκαν με μία λάμπα στην οποία είχαν προσαρμοστεί κατάλληλα φίλτρα ώστε να εκπέμπει σε μία περιοχή 30 nm γύρω από τα 652 nm. Η ακτινοβόληση ήταν 60 mW/cm^2 ενώ δοκιμάστηκαν δόσεις ενέργειας 25-75 και 100-150 J/cm^2. Η θεραπεία αυτή έδωσε αρκετά καλά αποτελέσματα για επιφανειακούς όχι όμως για όγκους με μεγαλύτερο βάθος. Υποδεικνύοντας πως ένας από τους λόγους αποτυχίας της θεραπείας βαθύτερων όγκων είναι και η μικρή διείσδυση αυτού του μορίου στα βαθύτερα στρώματα του δέρματος. Γενικά τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής δεν έδειξαν ότι ο συγκεκριμένος φωτοευαισθητοποιητής στο συγκεκριμένο σκεύασμα δίνει καλύτερα αποτελέσματα από το αμινολεβουλινικό οξύ, όταν αυτό ή κάποιο παράγωγό του χορηγούνται τοπικά[39]. Για αυτό το λόγο η έρευνα προς αυτήν την κατεύθυνση συνεχίζεται.

4.5.4. Τοπική φωτοδυναμική θεραπεία με μεταλλοφθαλοκυανίνες

Οι φθαλοκυανίνες είναι φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς οι οποίοι παρουσιάζουν φωτοφυσικές ιδιότητες οι οποίες τις καθιστούν εξαιρετικά ενδιαφέρουσες ενώσεις. Μέχρι στιγμής οι περισσότερες έχουν μελετηθεί μόνο προκλινικά κυρίως σε κυτταρικές σειρές και λιγότερο σε πειραματόζωα. Η μόνη φθαλοκυανίνη η οποία βρίσκεται αυτή τη στιγμή επίσημα στη φάση των κλινικών δοκιμών είναι η τετρασουλφονωμένη φθαλοκυανινή πυριτίου[40,41].

Οι μεταλλοφθαλοκυανίνες, και κυρίως οι φθαλοκυανίνες αλουμινίου και ψευδαργύρου, θεωρούνται πολύ πιο αποτελεσματικές σε σχέση με τις υπόλοιπες κυρίως λόγω του μεγάλου χρόνου παραμονής τους στην τριπλή διεγερμένη

κατάσταση. Οι μεταλλοφθαλοκυανίνες έχουν δοκιμαστεί in vitro σε αρκετές σειρές καρκινικών δερματικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα από αυτές τις μελέτες τις κατατάσσουν στους πολύ αποτελεσματικούς φωτοευαισθητοποιητές για τη φωτοδυναμική θεραπεία δερματικών καρκίνων[42,43].

Αν και η συστηματική δράση τους όταν τα μόριά τους εγκλειστούν σε λιποσώματα έχει αρκετά μελετηθεί, η δράση τους όταν χορηγηθούν τοπικά έχει εξεταστεί ελάχιστα και μόνο σε δέρμα μυών. Συγκεκριμένα έχει μελετηθεί η δράση δύο φθαλοκυανινών ψευδαργύρου σε υγιές δέρμα πειραματοζώων. Και στις δύο περιπτώσεις οι φθαλοκυανίνες έχουν διαλυθεί σε διάλυμα ισοπροπανόλης, προπυλενογλυκόλης, αζόνης (2 mg/ml). 20 μl από αυτό το διάλυμα επαλείφθηκαν σε 1 cm^2 δέρματος για χρονικά διαστήματα από 1-2 h. Η φωτοδυναμική δράση των φθαλοκυανινών αυτών υπολογίστηκε βάσει της βλάβης (ερύθημα, έγκαυμα, νέκρωση) που προκάλεσαν στο δέρμα των ζώων. Αν και οι έρευνες αυτών των ενώσεων βρίσκονται ακόμη σε πολύ πρώιμα στάδια τα αποτελέσματά τους καθιστούν αυτές τις ενώσεις πολλά υποσχόμενους φωτοευαισθητοποιητές[29,30].

Στα πλαίσια κλινικών ερευνών μελετάται η τετρασουλφονωμένη φθαλοκυανίνη πυριτίου (Pc 4) σε διάλυμα αιθανόλης-προπυλενογλυκόλης. Αν και η έρευνα βρίσκεται ακόμη σε εξέλιξη κάποια πρώτα αποτελέσματα έδειξαν ότι μέσω αυτού του διαλύματος η φθαλοκυανίνη μπορεί να απορροφηθεί από τα ανώτερα τουλάχιστον στρώματα του δέρματος και να φτάσει ως τη βασική στοιβάδα 1 h μετά την επάλειψη. Ακτινοβόληση με διοδικό laser στα 675 nm, ακτινοβόληση 100 mW/cm^2 και συνολική δόση ενέργειας 50-100 J/cm^2 δερματικών καρκίνων στους οποίους έγινε επάλειψη με τη συγκεκριμένη φθαλοκυανίνη έδωσε σημαντικά ποσοστά νέκρωσης των καρκινικών ιστών[44].

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου φαίνεται να δρουν οι μεταλλοφθαλοκυανίνες είναι ο εξής. Αρχικά λόγω των βλαβών που προξενεί η φωτοδυναμική δράση των φθαλοκυανινών στις μιτοχονδριακές μεμβράνες μιτοχονδριακό κυτόχρωμα C διαλύεται στο κυτταρόπλασμα. Εκεί αντιδρά με διάφορα προ-ένζυμα και παράγοντες έναρξης απόπτωσης δημιουργώντας ένα σύμπλεγμα απόπτωσης. Το σύμπλεγμα αυτό δεν επιτρέπει την ενεργοποίηση διορθωτικών του DNA παραγόντων ενώ αντίθετα ενεργοποιεί ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για σπασίματα στην έλικα του DNA και κατά συνέπεια για την εισαγωγή απόπτωσης[44].

4.6. Βιβλιογραφία

1. Μαθήματα δερματολογίας αφροδισιολογίας, Α. Κατσάμπας, Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα 2001.
2. Physiology, biochemistry and molecular biology of the skin, L. A. Goldsmith, Oxford University Press, New York 1991.
3. L. Braathen, R. M. Szeimes, N. Basset-Seguin, R. Bissonnette, P. Foley, D. Pariser, R. Roelands, A. M. Wennberg and C. Morton, "Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: An international consensus", J Am Acad Dermatol, 56, 125-143, 2007.
4. American Cancer Society, Skin Cancer Facts, Copyright 2007.
5. A. Dlugosz, G. Merlino and H. Yuspa, "Progress in cutaneous cancer research", J Invest Dermatol Symp Proc, 7, 1, 2002.
6. B. Baudouin, M. Charveron, R. Tarroux and Y. Gall, "Environmental pollutants and skin cancer", Cell Biol Toxicol, 18, 341-348. 2002.
7. R. Allison, C. Sibata, G. Downie, R. Cuenca, "A clinical review of PDT for cutaneous malignacies", Photodiagn Photodyn Ther, 3, 214-226, 2006.
8. S. Brown, E. Brown, and I. Walker, "The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment", Lancet Oncol, 5, 497-508, 2004.
9. L. McIntosh, M. Jackson, H. Mantsch, J. Mansfield, N. Crowson, J. Toole, "Near-infrared spectroscopy for dermatological applications", Vibr Spectrosc, 28, 53-58, 2002.
10. L. Brancaleon, A. Durkin, J. Tu, G. Menaker, J. Fallon, and N. Kollias, "In vivo Fluorescence spectroscopy of non melanoma skin cancer", Photochem Photobiol, 73, 178-183, 2001.
11. N. Kollias, G. Zonios, G. Stamatas, "Fluorescence spectroscopy of skin", Vibr Spectrosc, 28, 17-23, 2002.
12. M. Stringer, K. Moghissi, "Photodiagnosis and fluorescence imaging in clinical practice", Photodiagn Photodyn Ther, 4, 9-12, 2004.
13. R. Allison, H. Mota, C. Sibata, "Clinical PD/PDT in North America: An historical review", Photodiagn Photodyn Ther, 1, 263-277, 2004.
14. W. Baumler, C. Abels and R. M. Szeimes, "Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy in dermatology", Med Laser Appl, 18, 47-56, 2003.
15. S. Kimel, G. Kostenich, A. Orenstein, "Photodynamic therapy: basic principles and applications to skin cancer", Encyclopedia of Cancer, 3, 443-451, 2002.
16. E. Alexandratou, M. Kyriazi, D. Yova, S. Grafe, T. Trebst, A. Johansson, J. Svensson, K. Svanberg, N. Bendsoe, S. Anderson-Engels, "Distribution studies of m-THPC thermogel in a murine mon-melanoma skin cancer tumor model by fluorescence spectroscopic and imaging techniques", Optical methods for tumor treatment and detection: Mechanisms and techniques in photodynamic therapy, SPIE, 6139, 91-100, 2006.

17. A. Johansson, J. Svensson, S. Anderson-Engels, N. Bendsoe, K. Svanberg, I. Bigio, E. Alexandratou, M. Kyriazi, D. Yova, S. Grafe, “mTHPC pharmacokinetics following topical administration”, Optical Diagnostics and Sensing VI, SPIE, 6094, 60-67, 2006.

18. E. Rounda, M. Kyriazi, M. Rallis, G. Papaioannou, A. Lima, and D. Yova, “In vivo fluorescence spectroscopy as a diagnostic method for nonmelanoma skin cancer”, 4th European Symposium in Biomedical Engineering, Patra, 2004.

19. A. Uzdensky, V. Iani, L. W. Ma, J. Moan, “On hypericin application in fluorescence diagnosis and cancer treatment: Pharmacokinetics and photosensitizing efficiency in nude mice bearing WiDr carcinoma”, Med Laser Appl, 21, 271-276,2006.

20. A. Anstey, “Photodynamic therapy”, Medicine, 32, 24-25, 2004.

21. N. Kollias and G. Stamatas, “Optical non-invasive approaches to diagnosis of skin diseases”, J Invest Dermatol, 7, 64-75, 2002.

22. R. Gillies, G. Zonios, R. Anderson, and N. Kollias, “Fluorescence excitation spectroscopy provides information about human skin in vivo”, J Invest Dermatol, 115, 704-707, 2000.

23. S. Andersson-Engels, G. Canti, R. Cubeddu, C. Eker, C. af Klinteberg, A. Pifferi, K. Svenberg, S. Svanberg, P. Taroni, G. Velentini and I. Wang, “Preliminary evaluation of two fluorescence imaging methods for the detection of basal cell carcinomas of the skin”, Laser Surg Med, 26, 76-82, 2000.

24. N. Kollias, R. Gillies, M. Moran, I. Kochevar, R. Anderson, “Endogenous skin fluorescence includes bands that may serve as quantitive markers of aging and photoaging”, J Invest Dermatol, 111, 776-780, 1998.

25. M. Panjehpour, C. Julius, M. Phan, T. Vo-Dihn, and S. Overholt, “Laser-induced fluorescence spectroscopy for in vivo diagnosis of non-melanoma skin cancers”, Laser Surg Med, 31, 367-373, 2002.

26. P. Parmeswaran, M. Yaseen, J. Yu, M. Wong, B. Anvari, “Autofluorescence characterization for the early diagnosis of neoplasmatic changes in DMBA/TPA induced mouse skin carcinogenesis”, Laser Surg Med, 37, 382-395, 2005.

27. N. A. Renhua, I. M. Stender, and H. C. Wulf, “Can autofluorescence demarcate basal cell carcinoma from normal skin? A comparison with protoporphyrin IX fluorescence”, Acta Derm Venereol, 81, 246-249, 2001.

28. W. Baumler, C. Abels, and R. M. Szeimies, „Fluoescence diagnosis and photodynamic therapy in dermatology“, Med Laser Appl, 18, 47-56, 2000.

29. A. Anstey, “Photodynamic therapy”, Medicine, 32, 24-25, 2004.

30. A. Fabris, M. Soncin, E. Mazzon, P. Calzavara-Pinton, L. Fantetti, G. Chiti, D. Dei, S. Tampucci, G. Roncucci, G. Jori, “A novel tetracationic phthalocyanine as a potential skin phototherapeutic agent”, Exp Dermatol, 14, 675-683, 2005.

31. K. Kassab, C. Fabris, M. P. Defilippis, D. Dei, L. Fantetti, G. Roncucci, E. Reddi, G. Jori, “Skin photosensitizing properties of Zn (II)-2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrakis –(4-oxy-N-

methylpiperidinyl)phthalocyanine topically administered to mice", J Photochem Photobiol, 55, 128-137, 2000.

32. S. Ibbotson, H. Moselley, L. Brancaleon, M. Padgett, M. O'Dwyer, J. Woods, A. Lesar, C. Goodman, J. Ferguson, "Photodynamic therapy in dermatology: Dundee clinicl and research experience", Photodiagn Photodyn Ther, 1, 211-223, 2004.
33. S. Ibboston, "How we treat a superficial basal cell carcinoma with topical photodynamic therapy in Dundee", Photodiagn Photodyn Ther, 3, 128-131, 2006.
34. N. Zeitouni, A. Oseroff, S. Shieh, "Photodynamic therapy for non melanoma skin cancers Current review and updates" Molec Immunol, 39, 113-1136, 2003.
35. A. Sieron, A. Kawczyk-Krupka, M. Adamek, W. Cebula, M. Szygula, W. Zieleznik, M. Gruk, B. Suwala-Jurczyk, "Photodynamic therapy (PDT) using topically applied δ-aminolevulinic acid (ALA) for the treatment of malignant skin tumors", Photodiagn Photodyn Ther, 1, 311-317, 2004.
36. R. Haddad, E. Nesher, J. Weiss, Y. Skornick, H. Kashtan, " Photodynamic therapy for Bowen's disease and squamous cell carcinoma of the skin", Photodiagn Photodyn Ther, 1, 225-230, 2004.
37. Foscan Product Monograph, biolitec pharma, April 2003.
38. A. Kubler, T. Haase, C. Staff, B. Kahle, M. Rheinwald, J. Muhling, "Photodynamic therapy of primary nonmelanomatous skin tumors of the head and neck", Laser Surg Med, 25, 60-68, 1999.
39. P. Baas, A. Saarnak, H. Oppelaar, H. Neering, and F. Stewart, "Photodynamic therapy with meta-tetrahydroxyphenylchlorin for a basal cell carcinoma: a phase I/II study", Br J Dermatol, 145, 75-78, 2001.
40. M. Gupta, M. Whitehurst, "Photodynamic therapy with meso-tetra-hydroxyphenyl chlorine in the topical treatment of Bowen's disease and basal cell carcinoma", Br J Dermatol, 141, 385-386, 1999.
41. National Cancer Institute, Clinical trials, "Photodynamic therapy using silicon phthalocyanine 4 in treating patients with actinic keratosis, Bowen's disease, skin cancer, or stage I or II mycosis Fungoides", http://www.clinical trials.gov/ct/gui/show/NCT00103246.
42. National Cancer Institute, Clinical trials, "Photodynamic therapy in treating patients with skin cancer or solid tumors metastatic to the skin", http://www.clinical trials.gov/ct/gui/show/NCT00023790.

Κεφάλαιο 5

Αντιοξειδωτική και Προ-οξειδωτική Δράση Πολυφαινολικών Ενώσεων

5.1. Ελεύθερες ρίζες

Ο όρος ελεύθερες ρίζες αποδίδεται σε μόρια, άτομα ή ομάδες ατόμων τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στα ατομικά ή μοριακά τροχιακά τους. Λόγω αυτής ακριβώς της ιδιότητάς τους, οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικά είδη με πολύ μικρό χρόνο ζωής και κατά συνέπεια πολύ μικρή ακτίνα διάχυσης μέσα στα κύτταρα. Στα βιολογικά συστήματα οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι αυτές οι οποίες παρουσιάζουν και το μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Μία άλλη επίσης σημαντική κατηγορία ελευθέρων ριζών είναι οι ελεύθερες ρίζες αζώτου.

Τόσο οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες συνήθως ονομάζονται δραστικά οξυγονούχα είδη (reactive oxygen species ROS), όσο και οι ελεύθερες ρίζες αζώτου, οι οποίες ονομάζονται δραστικά αζωτούχα είδη (reactive nitrogen species RNS), αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού. Τα δραστικά οξυγονούχα και αζωτούχα είδη έχουν διπλό ρόλο στα βιολογικά συστήματα, ευεργετικό-καταστροφικό. Ο ρόλος τους είναι ευεργετικός σε χαμηλές-μέσες συγκεντρώσεις στις οποίες οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από τους κυτταρικούς μηχανισμούς ως μέσο άμυνας σε μολύνσεις (noxia) αλλά και ως μέσο ενεργοποίησης κυτταρικών μηχανισμών σήμανσης (signaling).

Σε υψηλές συγκεντρώσεις όμως τα ενεργά αυτά είδη προκαλούν σημαντικές βλάβες σε βιολογικά μόρια εισάγοντας μια σειρά βιολογικών διεργασιών η οποία

καλείται οξειδωτικό στρες. Πιο συγκεκριμένα οξειδωτικό στρες έχουμε όταν σε κάποιο βιολογικό σύστημα συμβαίνει υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών παράλληλα με μειωμένη συγκέντρωση μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών ή / και παρεμπόδιση ενζυμικών μηχανισμών προστασίας του κυττάρου. Οξειδωτικό στρες δηλαδή σημαίνει διατάραξη της ισορροπίας οξειδωτικών-αντιοξειδωτικών αντιδράσεων σε ένα βιολογικό σύστημα.

Η περίσσεια ελευθέρων ριζών μπορεί να προκαλέσει οξείδωση σε πολύ σημαντικά βιολογικά μόρια όπως στο δεσόξυριβοζο-νουκλεϊνικό οξύ (DNA), στα λιπίδια και στις πρωτεΐνες, αποτρέποντάς τα από το να συμμετέχουν στις κυτταρικές αλυσίδες αντιδράσεων για τις οποίες προορίζονταν. Για αυτόν ακριβώς το λόγο το οξειδωτικό στρες συνδέεται με τη γήρανση αλλά και ένα μεγάλο αριθμό ασθενειών[1-3].

5.1.1. Ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες προέρχονται τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς πηγές. Τα μιτοχόνδρια θεωρούνται οι σημαντικότερες ενδοκυττάριες πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών. Το 90% του εισπνεόμενου οξυγόνου στους αερόβιους οργανισμούς προορίζεται να καταναλωθεί στη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Κατά τη μιτοχονδριακή αναγωγή του, το οξυγόνο θα δεχθεί από την κυτοχρωμική οξειδάση 4 ηλεκτρόνια προκειμένου να της επιτρέψει να ξαναμπεί στον κύκλο παραγωγής τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Το οξυγόνο μετά την τετρασθενή αναγωγή του θα δώσει ένα μόριο νερού.

$$O_2 + 4H^+ + e^- \rightarrow 2H_2O$$

Αυτή η τετραπλή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου είναι μία «ασφαλής» σχετικά διεργασία. Παρόλα αυτά, κάποια ηλεκτρόνια μπορεί να διαφύγουν από την αλυσίδα και να δεσμευθούν από το μοριακό οξυγόνο παράγοντας το υπεροξειδικό ανιόν $O_2^{\bullet -}$ (superoxide anion)[4].

Το υπεροξειδικό ανιόν θεωρείται πρωτεύον δραστικό οξυγονούχο είδος, το οποίο μπορεί να ακολουθήσει δύο διαφορετικούς τύπους αντιδράσεων (ενζυμικές και αντιδράσεις που καταλύονται από μεταλλικά στοιχεία) παράγοντας με αυτούς τους τρόπους δευτερογενή δραστικά οξυγονούχα είδη. Τα δεδομένα στη βιβλιογραφία για το κατά πόσο μπορεί το υπεροξειδικό ανιόν να οξειδώσει απευθείας βασικά κυτταρικά συστατικά και ενώσεις υψηλής βιολογικής σημασίας όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, σάκχαρα και νουκλεϊνικά οξέα είναι αντικρουόμενα[1].

Η παραγωγή δευτερευόντων δραστικών οξυγονούχων ειδών ξεκινά με την αναγωγή του υπεροξειδικού ανιόντος παρουσία διαφόρων ενζύμων τα οποία ονομάζονται υπεροξειδικές δισμουτάσες (superoxide dismoutases).

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

Μέσω της αντίδρασης αυτής το υπεροξειδικό ανιόν καταναλώνεται τόσο γρήγορα (η παρουσία δισμουτάσης επιταχύνει την αντίδραση κατά τέσσερις τάξεις μεγέθους) ώστε είναι δύσκολο ακόμη και να ανιχνευθεί. Υπό φυσιολογικές συνθήκες υπολογίζεται ότι το 2% του οξυγόνου που αναπνέουμε μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (hydrogen peroxide H_2O_2) που παράγεται δεν μπορεί να θεωρηθεί ρίζα αφού δε διαθέτει κάποιο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Ανήκει όμως στα δραστικά οξυγονούχα είδη γιατί από τη διάσπασή του παράγεται η υδροξυλική ρίζα (hydroxyl radical $HO^{\bullet}$)[3].

Η υδροξυλική ρίζα είναι η ουδέτερη μορφή του υδροξυλικού ανιόντος (OH^-). Η ρίζα αυτή είναι εξαιρετικά δραστική και μπορεί να αντιδράσει με όλα τα βιολογικά μόρια. Το γεγονός αυτό απεικονίζεται στον πολύ μικρό χρόνο ζωής (10^{-9} s) και την πολύ μικρή ακτίνα διάχυσης. Η υδροξυλική ρίζα παράγεται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μέσω της αντίδρασης Fenton.

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + {}^{\bullet}OH + OH^-$$

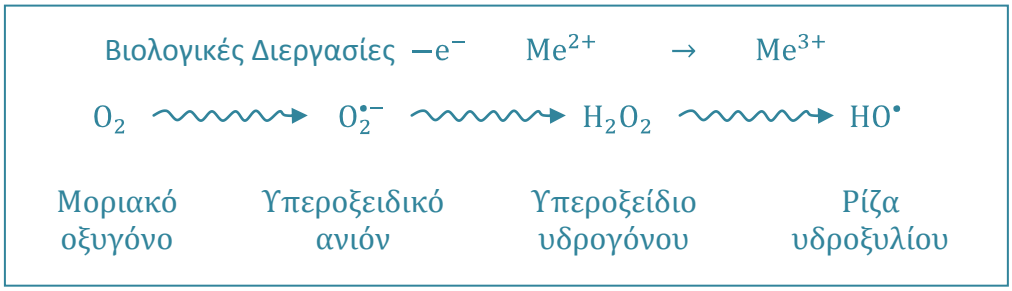
Η οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου εξαρτάται άμεσα κυρίως από τη συγκέντρωση δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου και λιγότερο από τη συγκέντρωση μονοσθενούς και δισθενούς χαλκού. Η αναλογία συγκεντρώσεων αυτών των ιόντων ρυθμίζεται πολύ αυστηρά από τους κυτταρικούς μηχανισμούς. Έχει παρατηρηθεί όμως, πως κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες, αυξημένης παραγωγής υπεροξειδικού ανιόντος, παρατηρείται απελευθέρωση ιόντων σιδήρου από σύμπλοκα μόρια τα οποία τα περιείχαν. Έτσι ευνοείται η αντίδραση Fenton. Εν συνεχεία, η αυξημένη συγκέντρωση ιόντων υπεροξειδίου όμως και τρισθενούς σιδήρου ευνοούν και την αντίδραση Haber-Weiss [1] (Σχήμα 5.1):

$$O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + {}^{\bullet}OH + OH^-$$

και κατά συνέπεια την περαιτέρω παραγωγή υδροξυλικής ρίζας και ανιόντος.

Άλλες πηγές δραστικών οξυγονούχων ειδών είναι τα ηωσινόφιλα, τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιούν την έκλυση ελευθέρων ριζών προκειμένου να

εξουδετερώσουν παρασιτικούς οργανισμούς. Μία άλλη πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών θεωρείται ο μεταβολισμός διαφορών ενδογενών και εξωγενών συστατικών μέσω του κυτοχρώματος P450. Στα διάφορα στάδια αυτού του μεταβολικού κύκλου απελευθερώνεται υπεροξείδιο του υδρογόνου αλλά και υπεροξειδικό ανιόν. Τα υπεροξυσώματα είναι επίσης κάποια άλλα οργανίδια στα οποία παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου[3].



Σχήμα 5.1: *Αντιδράσεις μετατροπής μοριακού οξυγόνου σε ενεργά οξυγονούχα είδη*

5.1.2. Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών

Εκτός όμως από τις φυσιολογικές ενδογενείς διεργασίες παραγωγής ελευθέρων ριζών, οι οποίες γίνονται περισσότερο επιβλαβείς με τη γήρανση του οργανισμού και τη μείωση των αντιοξειδωτικών, ενζυμικών και μη ενζυμικών μηχανισμών, υπάρχουν και διεργασίες παραγωγής ελευθέρων ριζών οι οποίες οφείλονται σε εξωγενείς παράγοντες. Πολλές ξενοβιοτικές ουσίες (αέρια, σωματιδιακή ρύπανση, συστατικά διατροφής, καπνός του τσιγάρου, τοξικές ουσίες, ακτινοβολία) παράγουν είτε άμεσα είτε έμμεσα, μετά από μεταβολική ενεργοποίηση, ελεύθερες ρίζες.

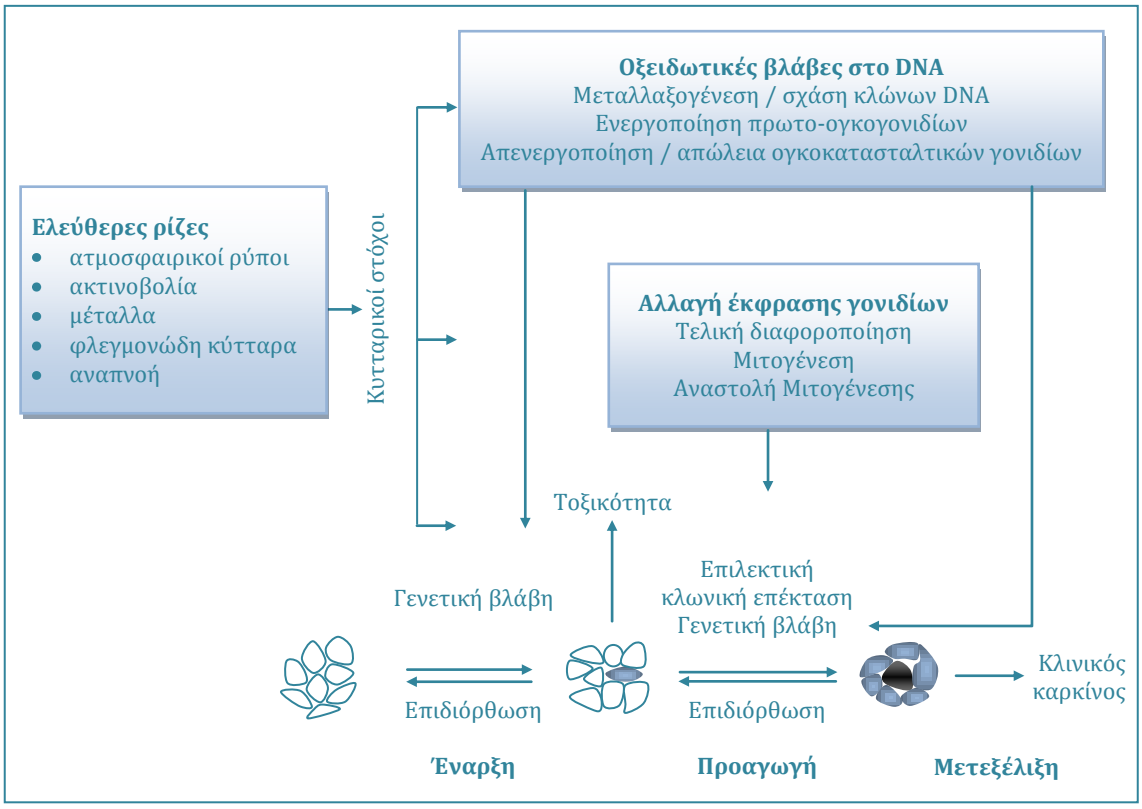
Οι ελεύθερες ρίζες και οι οξειδωτικές ενώσεις που παράγονται συμβάλουν σε οξειδώσεις, φλεγμονές, παθολογικές καταστάσεις και τελικά συνεισφέρουν στα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης. Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν προκαρκινογόνες ενώσεις προς ηλεκτρονιόφιλα μόρια τα οποία είναι ικανά προκαλέσουν βλάβες στο DNA[2].

5.2. Οξειδωτικό στρες και καρκινογένεση

5.2.1. Συμμετοχή ελευθέρων ριζών στα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης

Καρκίνος θεωρείται η ασθένεια η οποία προκαλείται από διατάραξη των διεργασιών σηματοδότησης του κυττάρου οι οποίες καθορίζουν τον κυτταρικό κύκλο και τα στάδια διαφοροποίησής του. Το σύνολο αυτών των διεργασιών

ελέγχεται από την αποκωδικοποίηση των σημάτων τα οποία καθορίζονται από τη δομή συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Άρα παρεμπόδιση της σύνθεσης αυτών των πρωτεϊνών θα συνεπάγονταν αδυναμία έκφρασης σημάτων, ενώ αλλαγές στη δομή τους θα συνεπάγονταν εξαγωγή λάθος σημάτων κατά την αποκωδικοποίηση[5].



Σχήμα 5.2: *Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών στην πολυσταδιακή καρκινογένεση*

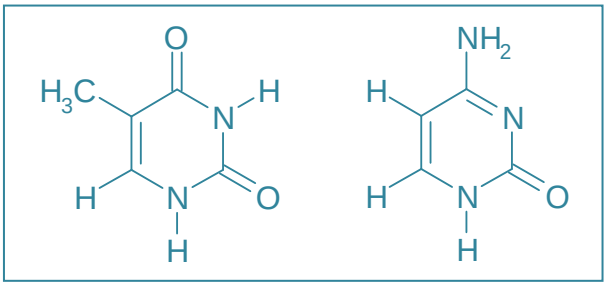
Η διεργασία για τη μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε κακόηθες καλείται καρκινογένεση. Η καρκινογένεση είναι μία σύνθετη, πολυπαραγοντική και πολυδιάστατη διεργασία με μεγάλη λανθάνουσα περίοδο[2]. Γενικά θεωρείται ότι αυτή η σύνθετη πορεία μπορεί να διακριθεί σε τρεις επιμέρους φάσεις (Σχήμα 5.2). Τη φάση της έναρξης (initiation), μία γρήγορη σχετικά διεργασία κατά την οποία δεν παρατηρούνται μορφολογικές αλλαγές στο κύτταρο, αλλά το μόριο του DNA έχει υποστεί αλλαγές, η ενεργοποίηση των οποίων δημιουργεί νεοπλασία. Τη φάση της προαγωγής (promotion) φάση κατά την οποία πολλαπλασιάζονται τα κύτταρα τα οποία φέρουν γενετικό υλικό με βλάβες. Τη φάση της μετεξέλιξης (progression), κατά την οποία τα κύτταρα αποκτούν επιπλέον γενετικές βλάβες, υφίστανται σημαντικές μορφολογικές αλλαγές και οι ρυθμοί πολλαπλασιασμού τους αυξάνονται τόσο ώστε να διεισδύουν στους γειτονικούς ιστούς ή να μεταναστεύουν σε πολύ μακρινούς. Η πρώτη και τα πρώτα στάδια της δεύτερης φάσης είναι

αντιστρεπτά ενώ αντίθετα τα τελευταία στάδια της καρκινογένεσης δεν είναι αντιστρεπτά[6].

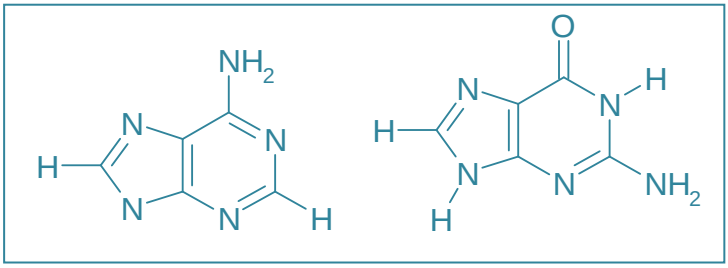
Οι ελεύθερες ρίζες θεωρείται ότι συνεισφέρουν στην πολυσταδιακή διαδικασία της καρκινογένεσης κυρίως μέσω των οξειδωτικών βλαβών που προκαλούν στο DNA. Μέχρι στιγμής, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν κυρίως στις δύο πρώτες φάσεις τις καρκινογένεσης, την έναρξη και την προαγωγή. Οι βλάβες αυτές προκαλούνται είτε από τα ενδογενή δραστικά οξυγονούχα είδη και μόρια, είτε από εξωγενείς καρκινογόνους παράγοντες που διεισδύουν στο εσωτερικό του κυττάρου και μετατρέπονται σε ενεργούς μεταβολίτες μέσω τω ελευθέρων ριζών. Οι βλάβες αυτές είναι αποτέλεσμα της οξειδωτικής, στο DNA, δράσης είτε ενδογενών δραστικών οξειδωτικών μορίων είτε εξωγενών καρκινογόνων παραγόντων οι οποίοι διείσδυσαν στο κύτταρο και μετατράπηκαν σε δραστικές ενώσεις μέσω των ελευθέρων ριζών. Η επίδραση των οξειδωτικών αυτών παραγόντων μπορεί να προκαλέσει διαφόρων ειδών βλάβες στο DNA όπως προσθήκες μορίων, σημειακές μεταλλάξεις, σχάση των κλώνων, σχάση των σταυροσυνδέσεων κλπ.

5.2.2. Το μόριο του δεσοξυριβοζο-νουκλεϊνικού οξέος (DNA)

Το DNA ή αλλιώς το μόριο το οποίο μεταφέρει το γενετικό υλικό κάθε είδους είναι ένα πολυμερές το οποίο αποτελείται από μονάδες δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Ένα δεοξυριβονουκλεοτίδιο αποτελείται από μία αζωτούχα βάση, ένα σάκχαρο και μία φωσφορική ομάδα. Το σάκχαρο στο δεοξυριβονουκλεοτίδιο είναι η δεοξυριβόζη. Η αζωτούχος βάση είναι ένα παράγωγο πουρίνης ή πυριμιδίνης. Οι πουρίνες που παίρνουν μέρος στο σχηματισμό του μορίου του DNA είναι η αδενίνη και η γουανίνη ενώ οι πυριμιδίνες είναι η θυμίνη και η κυτοσίνη (Σχήματα 5.3, 5.4). Σε ένα δεοξυριβονουκλεοτίδιο το άτομο του άνθρακα C-1 της δεοξυριβόζης δεσμεύεται με το N-1 μιας πυριμιδίνης ή το N-9 μιας πουρίνης.



Σχήμα 5.3: *Οι δύο πουρίνες που παίρνουν μέρος στο σχηματισμό του DNA θυμίνη (T) και κυτοσίνη (C)*



Σχήμα 5.4: *Οι δύο πυριμιδίνες που παίρνουν μέρος στο σχηματισμό του DNA αδενίνη (A) και γουανίνη (G)*

Η διαδικασία αναδιπλασιασμού του DNA είναι μία πολύ ακριβής και καλά προγραμματισμένη διαδικασία σε όλα τα είδη. Όσον αφορά τα κύτταρα ένας πολύ μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών παίζουν τον κρίσιμο ρόλο του ελέγχου αυτής της διαδικασίας. Τον κεντρικό ρόλο στην αντιγραφή του DNA παίζουν τα ένζυμα τα οποία ανήκουν στην ομάδα των DNA πολυμερασών οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία του νέου κλώνου. Η σύνθεση του νέου κλώνου γίνεται βάσει ενός υπάρχοντα κλώνου ο οποίος χρησιμοποιείται ως μήτρα ενώ η αντιγραφή θα ακολουθήσει τον κανόνα των βάσεων[7].

5.2.3. Καρκινογόνες βλάβες στο DNA από ελεύθερες ρίζες

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το υπεροξειδικό ανιόν και το υπεροξείδιο του υδρογόνου θα μπορούσαν να αντιδράσουν άμεσα με το DNA μόνο κάτω από ορισμένες συνθήκες π.χ. πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Αντίθετα άλλα δραστικά οξυγονούχα είδη όπως η υδροξυλική ρίζα και οι αζωτούχες ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν άμεσα με το DNA προκαλώντας αλλαγές στη δομή του. Οι βλάβες στο DNA από ελεύθερες ρίζες θα μπορούσαν να διακριθούν στις τρεις παρακάτω κατηγορίες:

- Πρόκληση δομικών αλλαγών στο DNA. Στη κατηγορία αυτή των βλαβών ανήκουν οι μεταλλάξεις στα ζεύγη βάσεων μεταθέσεις ελλείψεις, εισαγωγές και επέκταση της σειράς διαδοχής των νουκλεοβάσεων, νίτρωση, απαμίνωση. Τέτοια είδη βλαβών μπορούν να προκληθούν από τη ρίζα υδροξυλίου, το μονήρες οξυγόνο αλκόξυ και υπεροξυλοξυ-ρίζες, το όζον, το υπερόξυνιτρώδες ανιόν και τα οξείδια του αζώτου. Τα δραστικά οξυγονούχα είδη που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά έχουν ισχυρή οξειδωτική δράση μπορούν να προκαλέσουν σημειακές μεταλλάξεις και μαζικές αλλαγές στα χρωμοσώματα. Οι αλλαγές αυτές συμβάλουν στην αδρανοποίηση ή απώλεια του δευτέρου φυσικού τύπου αλληλομόρφου κατά τη διάρκεια της προαγωγής ή μετεξέλιξης

του κακοήθους κυττάρου, επιτρέποντας την έκφραση ενός μεταλλαγμένου φαινοτύπου.

- Επίδραση στους μηχανισμούς μεταγωγής σημάτων σε κυτταροπλασματικό και πυρηνικό επίπεδο. Όπως π.χ. η αναστολή των κυτταρικών μονάδων που κρατούν τον κυτταροπλασματικό μεταγραφικό παράγοντα NFkB εκτός πυρήνα.
- Διαμόρφωση των πρωτεϊνών και γονιδίων που ρυθμίζουν το οξειδωτικό στρες τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει επίσης και η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων[2].

5.3. Αντιοξειδωτικές ενώσεις και καρκίνος

Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία χρόνια έχει στραφεί και προς κάποια σχετικά μικρά αντιοξειδωτικά μόρια όπως αυτά του ασκορβικού οξέως της α-τοκοφερόλης και του β-καροτενίου τα οποία έχουν δείξει σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Τόσο in vitro όσο και in vivo μελέτες έχουν δείξει σημαντική προληπτική-προστατευτική δράση αυτών των μορίων ως προς τις βλάβες που μπορούν να προκαλέσουν ελεύθερες ρίζες και πιο συγκεκριμένα γήρανση, ασθένειες όπως ο διαβήτης αλλά και ο καρκίνος. Σε αυτή την κατηγορία ενώσεων ανήκουν και οι πολυφαινόλες.

5.3.1. Φλαβονοειδή

Φλαβονοειδή ονομάζονται οι πολυφαινολικές ενώσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για το χρώμα των φυτών και των καρπών. Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί περισσότερα από 4000 διαφορετικά φλαβονοειδή φυτικής προέλευσης. Φλαβονοειδή βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά, το τσάι, τον καφέ, την μπύρα και το κόκκινο κρασί. Ως εκ τούτου, εκτός από ευρύτατα διαδεδομένα στη φύση συνιστούν και ένα σημαντικό κομμάτι της διατροφής μας. Υπολογίζεται ότι μέσω της τροφής μας προσλαμβάνουμε καθημερινά 500-1000 mg φλαβονοειδών. Εάν όμως εκτός από την τροφή ληφθούν και κάποια φυτικά σκευάσματα, τα οποία χορηγούνται ως συμπληρώματα διατροφής, όπως εκχύλισμα ginko biloba ή εκχύλισμα σταφυλιού τότε η ημερήσια πρόσληψη φλαβονοειδών ανέρχεται σε μερικά γραμμάρια[8,9].

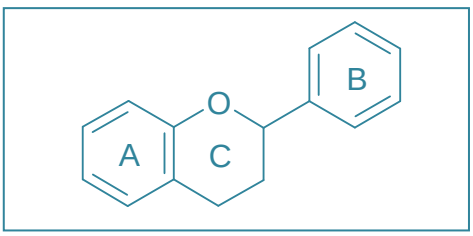
Έρευνες σε πειραματόζωα και στατιστικές μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει πως διατροφή πλούσια σε φλαβονοειδή βοηθά πολύ στην αποφυγή αγγειακών θρομβώσεων και ασθενειών του μυοκαρδίου. Επίσης τα φλαβονοειδή θεωρούνται

ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία προστατεύουν τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες και τις ασθένειες που συνδέονται με αυτό. Η δράση των φλαβονοειδών αποδίδεται κυρίως στους παρακάτω μηχανισμούς.

- Ανάγουν ακόμη και τις πιο δραστικές ελεύθερες ρίζες εξαιτίας του χαμηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού τους.
- Δεσμεύουν ιόντα ιχνοστοιχείων όπως του σιδήρου και του χαλκού τα οποία συμμετέχουν ως καταλύτες σε αντιδράσεις δημιουργίας των ελευθέρων ριζών.
- Εμποδίζουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών αναστέλλοντας τη λειτουργία ενζύμων που ευνοούν το σχηματισμό αυτό (όπως της οξειδάσης της ξανθίνης, της κινάσης C, της NADH οξειδάσης).
- Προστατεύουν ή αναγεννούν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα.
- Μπλοκάρουν ενζυμικούς μηχανισμούς (κυτόχρωμα P-450) οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για το μεταβολισμό καρκινογενών χημικών ενώσεων όπως πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την ένωση των μεταβολιτών αυτών των καρκινογενών ενώσεων με το μόριο του DNA[10].

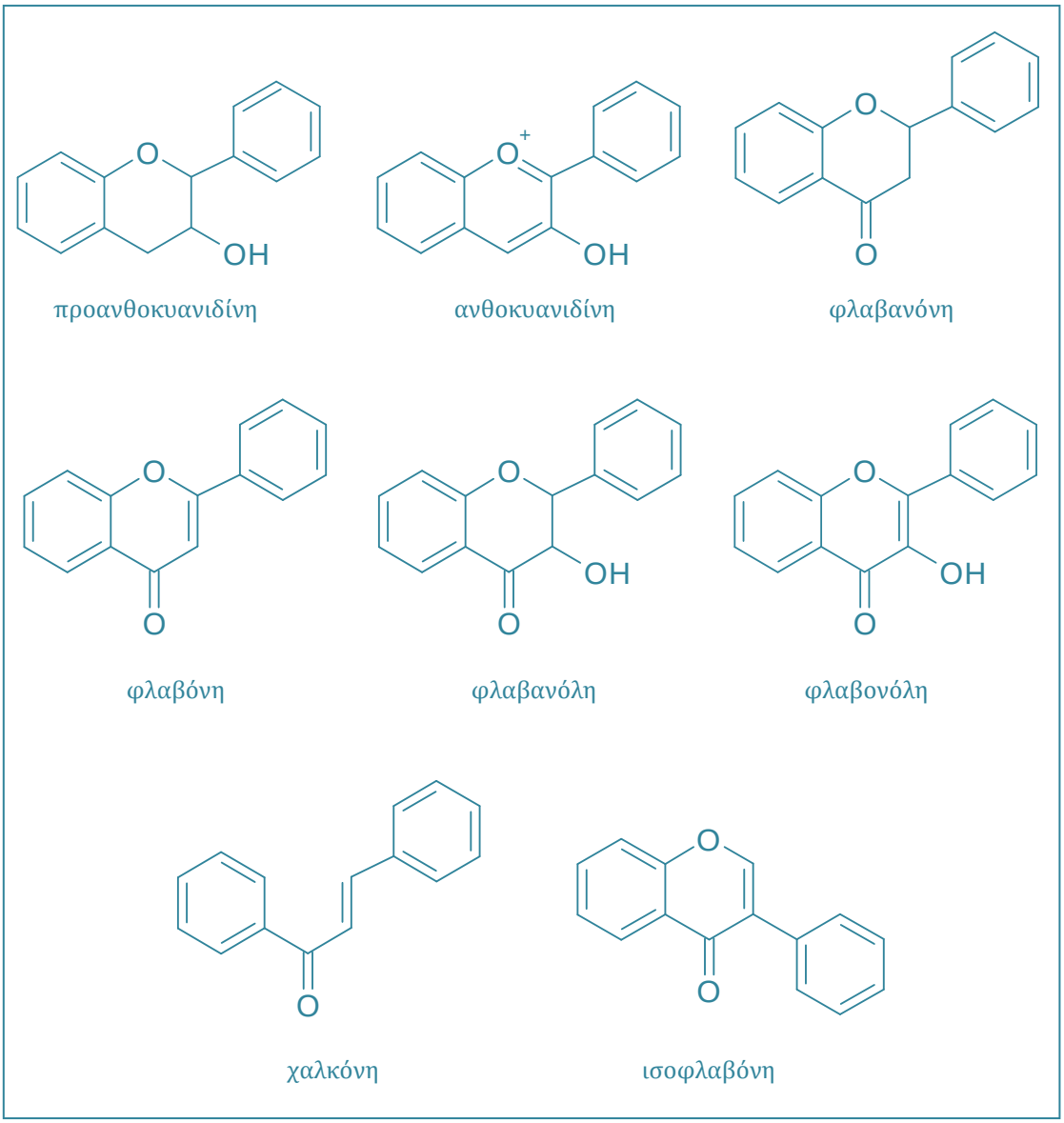
5.3.2. Δομή φλαβονοειδών

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες των ανώτερων φυτών είναι μία μεγάλη ομάδα χημικών ενώσεων τις οποίες χρησιμοποιεί το φυτό για την ανάπτυξή του, την αναπαραγωγή του, την άμυνα εναντίον οργανισμών που το προσβάλλουν και γενικότερα για την επιβίωσή του. Ανάμεσα στις ενώσεις αυτές συγκαταλέγεται και ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων οι οποίες περιέχουν έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους υποκατεστημένους με μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες, φαινολικές ενώσεις.



Σχήμα 5.5: *Γενική δομή φλαβονοειδών*

Οι φαινολικές ενώσεις που απαντώνται στα φυτά ανάλογα με τη δομή τους χωρίζονται στις απλές φαινόλες, στις πολυφαινόλες, τα φλαβονοειδή (Σχήμα 5.5) και τα φαινολικά τερπενοειδή. Τα φλαβονοειδή προέρχονται από υποκατάσταση του μορίου της φλαβόνης σε διάφορες θέσεις και έχουν τη δομή που φαίνεται στο Σχήμα 5.6. Η υποκατάσταση μπορεί να γίνει από ομάδες υδροξυλίου, μεθόξυ ομάδες, σακχαρικές ομάδες κ.α. Τα φλαβονοειδή διακρίνονται στις ανθοκυανιδίνες, τις φλαβόνες, τις φλαβανόνες, τις φλαβανόλες, τις φλαβονόλες και τις ισοφλαβόνες[11,12].



Σχήμα 5.6: *Δομή κατηγοριών φλαβονοειδών*

5.3.3. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί φλαβονοειδών

Οι φαινολικές επειδή είναι πλούσιες ηλεκτρονιακά ενώσεις συμμετέχουν πολύ συχνά σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Τα φλαβονοειδή όπως και οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά τερματίζοντας τις πορείες αντιδράσεων ελευθέρων ριζών (Σχήμα 5.7). Η ιδιότητά τους αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι μπορούν εύκολα να προσφέρουν ένα ηλεκτρόνιο σε μία ελεύθερη ρίζα σταθεροποιώντας την. Για να δρα μία ένωση ως αντιοξειδωτικό όμως δεν αρκεί μόνο να μπορεί να προφέρει ένα ηλεκτρόνιο γιατί έτσι μετατρέπεται αυτή σε ελεύθερη ρίζα. Πρέπει και η ίδια μετά τη μεταφορά του ηλεκτρονίου να παραμένει σταθερή. Στην περίπτωση των φαινολικών ενώσεων η φαινολική ρίζα που δημιουργείται σταθεροποιείται μέσω δομών συντονισμού. Οι γενικές αντιδράσεις σταθεροποίησης ελευθέρων ριζών φαίνονται στο παρακάτω σχήμα:

$$FLOH + R^{\bullet} \rightarrow FLO^{\bullet} + RH \qquad \text{(αντίδραση εξουδετέρωσης ελεύθερης ρίζας)}$$

$$FLO^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow FLO - R \qquad \text{(αντίδραση ελευθέρων ριζών)}$$

$$FLO^{\bullet} + FLO^{\bullet} \rightarrow FLO - OLF \qquad \text{(αντίδραση ελευθέρων ριζών)}$$

$$FLO^{\bullet}\ \text{(ημικινόνη)} \xrightarrow{-H^{\bullet}} FL = O\ \text{(κινόνη)}$$

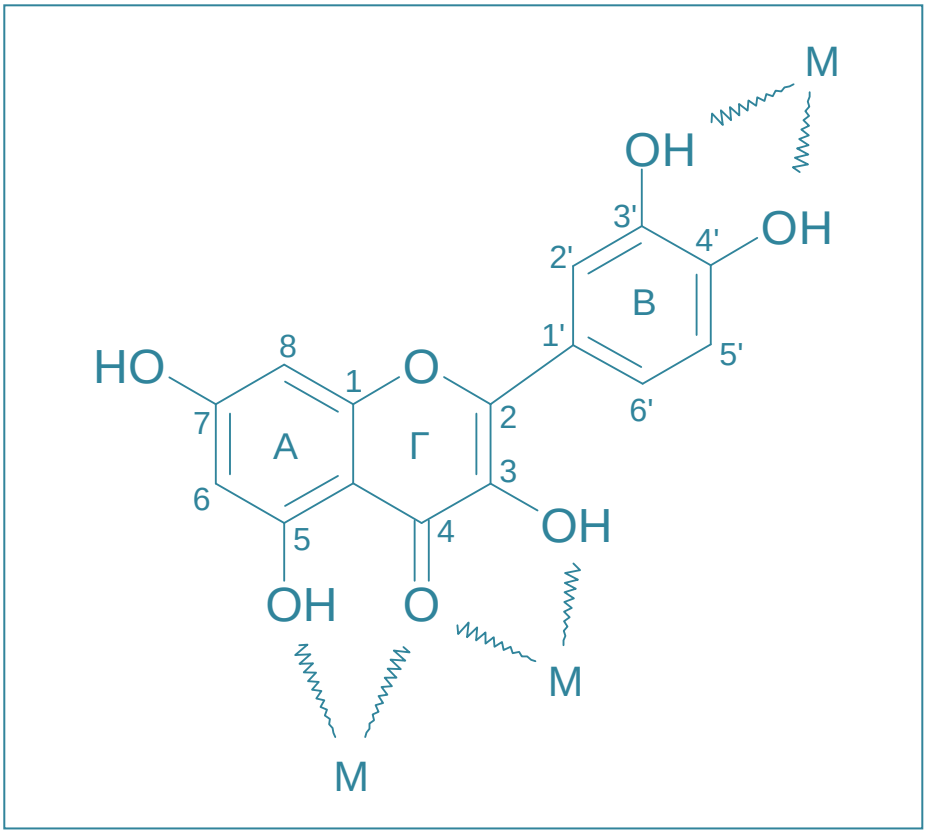
Σχήμα 5.7: *Αντιδράσεις σταθεροποίησης ελευθέρων ριζών από φλαβονοειδή*

Τα φλαβονοειδή μπορούν επίσης να σχηματίσουν σύμπλοκα μόρια με το δισθενή σίδηρο (Σχήμα 5.8). Δεσμεύοντας το σίδηρο με αυτόν τον τρόπο όμως δεν τον αφήνουν να συμμετέχει στις αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών τις οποίες καταλύει.

$$FLOH + Fe(II) \rightarrow Fe(II)FLOH$$

Σε in vitro πειράματα έχει δειχθεί ότι πολύ σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών παίζει το πλήθος των υδροξυλομάδων που υπάρχουν στο μόριο ως υποκαταστάτες, αλλά και η θέση αυτών. Γενικά τα φλαβονοειδή με μεγαλύτερο αριθμό υδροξυλομάδων παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Επίσης τα φλαβονοειδή που διαθέτουν υδροξυλομάδες στις θέσεις 3 και 4 του δακτυλίου Β είναι τα πιο ισχυρά φλαβονοειδή ως προς την αντιοξειδωτική

τους ικανότητα. Η παρουσία των υδροξυλομάδων σε αυτές τις δύο θέσεις βοηθούν μετά την προσφορά του ηλεκτρονίου στον απεντοπισμό της παραγόμενης ρίζας και κατά συνέπεια στη σταθερότητά της. Ο απεντοπισμός της ρίζας οφείλεται επίσης και σε μεγάλο βαθμό στην ύπαρξη της κετονομάδας στη θέση 4 του δακτυλίου Γ. Μέγιστη ικανότητα απενεργοποίησης ελευθέρων ριζών προσφέρεται στο μόριο όταν στις θέσεις 3, 5 και 7 των δακτυλίων Α και Γ υπάρχουν υδροξυλομάδες. Από αυτές τις τρεις ηλεκτρόνιο στην ελεύθερη ρίζα μπορούν να προσφέρουν μόνο η υδροξυλομάδες στη θέση 5 και 7. Οι ίδιες ομάδες εκτός από την υδροξυλομάδα στη θέση 7 του Α δακτυλίου παίζουν επίσης πολύ σημαντικό ρόλο και στην αντίδραση χηλικοποίησης του σιδήρου όπως φαίνεται στο σχήμα της επόμενης σελίδας[13-15].

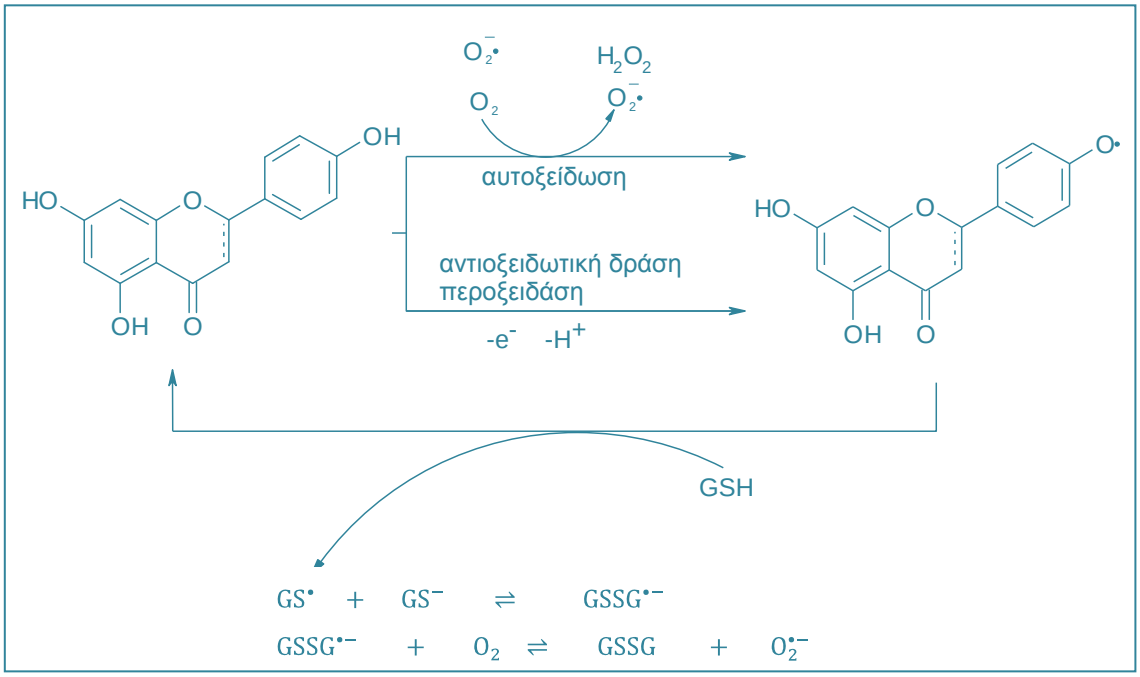


Σχήμα 5.8: *Πιθανές θέσεις πρόσδεσης μεταλλικών ιόντων στο μόριο φλαβονοειδούς*

5.3.4. Προ-οξειδωτικοί μηχανισμοί φλαβονοειδών

Για τα φλαβονοειδή όμως εκτός από αντιοξειδωτική έχει διαπιστωθεί και προ-οξειδωτική δράση υπό ορισμένες συνθήκες. Τα φλαβονοειδή τα οποία έχουν μία υδροξυλομάδα στο δακτύλιο Β (φαινολική δομή) έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να προκαλέσουν παραγωγή ελευθέρων ριζών και οξείδωση λιπιδίων ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, στις οποίες τα υπόλοιπα φλαβονοειδή δρουν ως

αντιοξειδωτικά[9,16]. Ο μηχανισμός που έχει προταθεί για την οξειδωτική δράση αυτών των φλαβονοειδών φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Αρχικά το φλαβονοειδές οξειδώνεται ενζυμικά παράγοντας μία ρίζα ημικινόνης. Το φλαβονοειδές αναγεννάται μέσω της οξείδωσης της γλουταθειόνης (GSH) η οποία όμως μετατρέπεται σε ρίζα. Ξεκινώντας μία πορεία αντιδράσεων η οποία καταλήγει σε σχηματισμό υπεροξειδικού ανιόντος (Σχήμα 5.9).

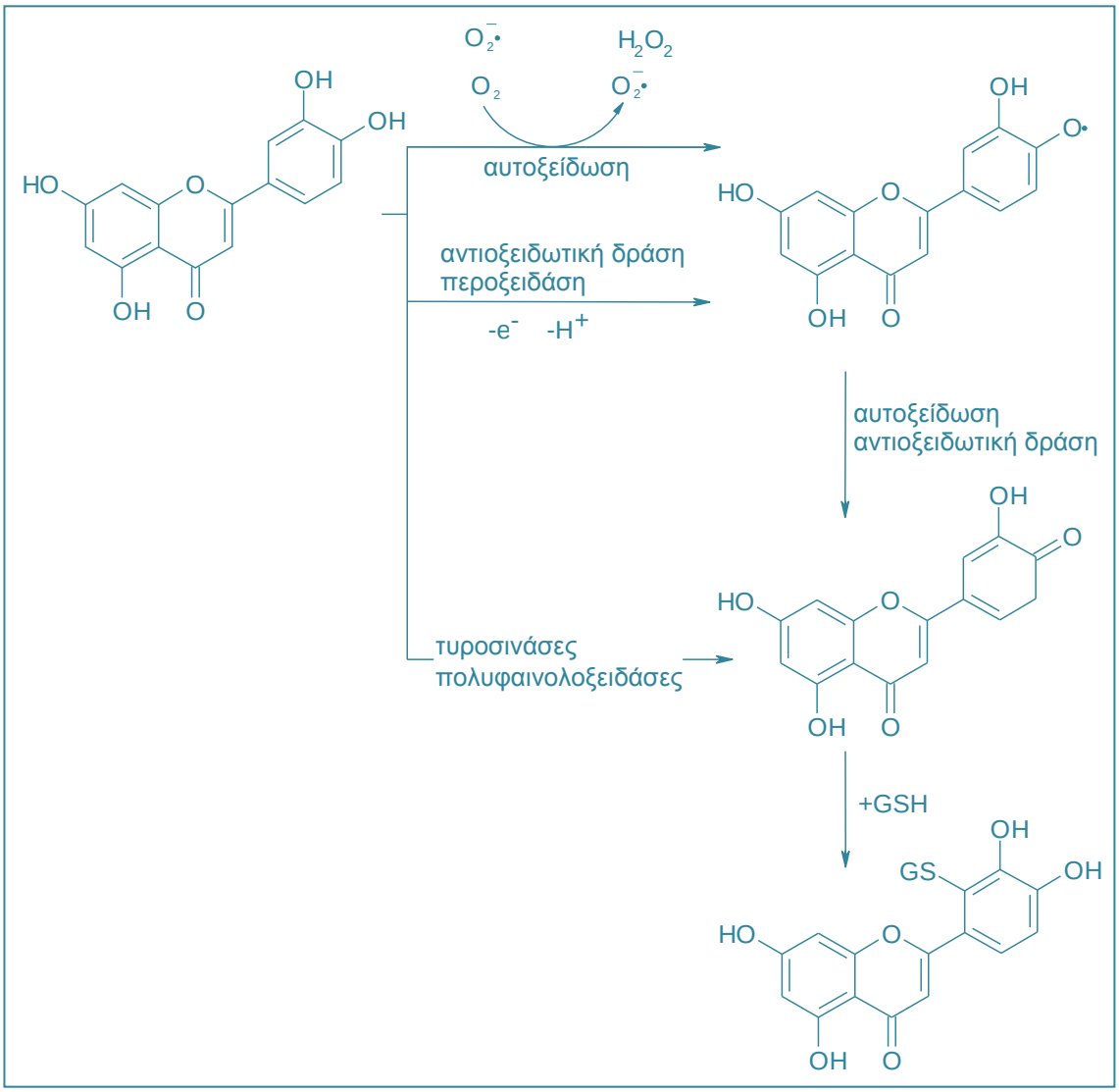


Σχήμα 5.9: *Προ-οξειδωτικές αντιδράσεις φλαβονοειδών με φαινολική δομή στο δακτύλιο Β*

Τα φλαβονοειδή τα οποία έχουν δύο υδροξυλομάδες στις θέσεις 3 και 4 του δακτυλίου Β (κατεχολική δομή) δεν οξειδώνουν τη γλουταθειόνη όταν οξειδωθούν σε ημικινόνες. Ακόμη και όταν χάσουν 2 ηλεκτρόνια και μετατραπούν σε κινόνες δεν παρουσιάζουν την τάση να οξειδώσουν τη γλουταθειόνη αλλά την προσλαμβάνουν ως υποκαταστάτη. Οι δομές αυτές των φλαβονοειδών ειδικά αυτών που είχαν κατεχολική δομή το δακτύλιο Β και οι μεταβολίτες τους έχουν δείξει σε πολλές έρευνες καρκινιγόνο δράση. Αναλυτικότερα μπορούν να εμπλακούν σε μηχανισμούς προσθήκης υδροξυλίων στα οιστρογόνα καταλυόμενες από το κυτόχρωμα P450, και ενεργοποίηση των πολυαρωματικών υδρογονανθράκων. Επίσης μπορούν να προκαλέσουν άμεσες βλάβες στο DNA[9,16] (Σχήμα 5.10).

In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι όταν φαινολικές ενώσεις βρεθούν σε περιβάλλον με υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων, τα οποία καταλύουν τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις τους (Cu, Fe), παράγουν ενεργά είδη οξυγόνου. Ο μηχανισμός ο οποίος

προτείνεται σε αυτήν την περίπτωση είναι οξείδωση της φαινολικής ένωσης από τα ιόντα Cu^{2+} σε ημικινόνη η οποία στη συνέχεια αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο δίνοντας υπεροξειδικό ανιόν. Το υπεροξειδικό ανιόν αντιδρά και αυτό με τις φαινολικές ενώσεις παράγοντας ημικινόνες και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσία ιόντων χαλκού ευνοεί την αντίδραση Fenton και κατά συνέπει το σχηματισμό υδροξυλικών ριζών. Ο παραπάνω μηχανισμός έχει προταθεί για φλαβονοειδή με κατεχολική δομή στο δακτύλιο Β. In vivo όμως αυτά τα μεταλλικά ιόντα είναι αδέσμευτα σπάνια, και σε πολύ μικρές ποσότητες. Έτσι ο μηχανισμός αυτός μπορεί να λάβει χώρα κάτω από πολύ συγκεκριμένες προϋποθέσεις[9,16].



Σχήμα 5.10: *Προ-οξειδωτικές αντιδράσεις φλαβονοειδών με κατεχολική δομή στο δακτύλιο Β*

5.4. Επίδραση αντιοξειδωτικών ενώσεων στη θεραπεία καρκίνου

5.4.1. Οξειδοαναγωγική κατάσταση υγιών και καρκινικών κυττάρων

Σήμερα θεωρείται ότι η οξειδοαναγωγική κατάσταση ισορροπίας των καρκινικών κυττάρων είναι διαφορετική από αυτή των αντίστοιχων υγιών. Γενικά, διαθέτουν σε σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικά ένζυμα, με εξαίρεση τα κύτταρα των αδενοκαρκινωμάτων, σε σχέση με τα υγιή κύτταρα από τα οποία προέρχονται. Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών όπως για παράδειγμα της βιταμίνης Ε είναι υψηλότερες[17] .

Σε διάφορες in vitro και in vivo μελέτες έχει αποδειχθεί ότι τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη Ε και οι φαινολικές ενώσεις έχουν δείξει αντιμιττωτική δράση ως προς τα καρκινικά κύτταρα σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Το αντίστοιχο φαινόμενο όμως δεν έχει παρατηρηθεί στα υγιή κύτταρα. Σε υγιή κύτταρα μάλιστα έχει παρατηρηθεί ότι η ενδοκυττάρια συγκέντρωση σε μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά δεν είναι τόσο ευαίσθητη σε αυξήσεις της εξωκυττάριας όσο αυτή των καρκινικών[17,18].

Η τοξικότητα των υψηλών δόσεων της βιταμίνης Ε στα καρκινικά κύτταρα οφείλεται πιθανώς στην ενεργοποίηση διεργασιών διαφοροποίησης η οποία εισάγεται με αναγωγή μεταγραφικών παραγόντων, παρεμπόδιση των μηχανισμών που συνδέονται με τους αυξητικούς παράγοντες και παρεμπόδιση των μηχανισμών μίτωσης. Η τοξικότητα της βιταμίνης C πιθανώς οφείλεται στην αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου (Fe^{+3}) σε δισθενή (Fe^{+2}) και την έναρξη πορείας οξειδωτικών αντιδράσεων τις οποίες καταλύει ο δισθενής σίδηρος. Η τοξικότητα των φαινολικών αντιοξειδωτικών αποδίδεται σε παρεμπόδιση των αντιδράσεων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια και σχηματισμό του ATP[17-19].

Μετά λοιπόν από αυτές τις παρατηρήσεις τίθεται το ερώτημα του κατά πόσο αυτές οι διαφορές στη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών μεταξύ υγιών και καρκινικών κυττάρων αλλά και η γενικότερη διαφορετική οξειδοαναγωγική ισορροπία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί προς όφελος μιας θεραπείας κατά του καρκίνου όπως η φωτοδυναμική θεραπεία.

5.4.2. Επίδραση αντιοξειδωτικών ενώσεων στη θεραπεία καρκίνου

5.4.2.1. Φωτοδυναμική θεραπεία και αντιοξειδωτικά σε αντιοξειδωτικές δόσεις

Σήμερα, σε πολλούς ασθενείς συστήνεται παράλληλα με την κύρια θεραπεία να ακολουθήσουν και κάποια πιο νέα σχετικά, συμβατική θεραπεία. Η πιο συνήθης από αυτές είναι η παράλληλη χορήγηση αντιοξειδωτικών. Αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη C, θεωρούνται ασφαλή και πιστεύεται γενικά ότι βοηθούν στην πρόληψη των παρενεργειών των συμβατικών θεραπειών του καρκίνου. Κι αυτό γιατί οι περισσότερες συμβατικές θεραπείες καρκίνου παράγουν ελεύθερες ρίζες οι οποίες όμως δεν επιδρούν μόνο στα καρκινικά αλλά και σε υγιή κύτταρα. Η παράλληλη χορήγηση αντιοξειδωτικών σε αυτήν την περίπτωση μπορεί να προστατεύσει τα υγιή κύτταρα από τις βλάβες που θα προκαλούνταν από τις ελεύθερες ρίζες και κατά συνέπεια να μειώσει σημαντικά τις παρενέργειες τις θεραπείας. Όπως ήδη αναφέρθηκε μάλιστα σε προηγούμενη παράγραφο η ενδοκυττάρια συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών στα καρκινικά κύτταρα είναι πολύ πιο ευαίσθητη ως προς την εξωκυττάρια σε σχέση με τα υγιή κύτταρα. Συνεπώς αναμένεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση σε μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά να είναι πολύ μεγαλύτερη από ότι στα αντίστοιχα υγιή. Κάτι τέτοιο όμως σημαίνει και δέσμευση των ελευθέρων ριζών στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων και κατά συνέπεια υποβάθμιση της θεραπείας.

Πράγματι σε in vitro μελέτη κατά την οποία χορηγήθηκε σε κύτταρα που προέρχονταν από σάρκωμα ασκορβικό οξύ πριν τη φωτοδυναμική θεραπεία, παρατηρήθηκε υποβάθμιση των αποτελεσμάτων της θεραπείας. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι το ασκορβικό οξύ μείωσε στατιστικά σημαντικά την οξείδωση των ενδοκυττάριων λιπιδίων και πρωτεϊνών και προστάτευσε κυτταρικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια[20].

5.4.2.2. Φωτοδυναμική θεραπεία και αντιοξειδωτικά σε αντιοξειδωτικές δόσεις

Η φωτοδυναμική θεραπεία βασίζεται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Αναμενόμενο θα ήταν η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού να ζημίωνε και όχι να βελτίωνε την αποδοτικότητα της φωτοδυναμικής αφού τα αντιοξειδωτικά μόρια θα δέσμευαν τις ελεύθερες ρίζες και έτσι θα προστάτευαν το καρκινικό κύτταρο. Αν η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού όμως ή το μικροπεριβάλλον του ήταν τέτοιο ώστε το αντιοξειδωτικό να αποκτούσε προ-οξειδωτική δράση τα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας θα βελτιώνονταν.

Πράγματι, υπάρχουν αρκετές μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν τη θεωρία ότι τα αντιοξειδωτικά βοηθούν την αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας[17-22]. Οι μηχανισμοί συνεργειακής δράσης φωτοδυναμικής θεραπείας και αντιοξειδωτικών που έχουν προταθεί είναι οι εξής:

1. Τα αντιοξειδωτικά σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις ανάγουν το μονήρες οξυγόνο σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το μονήρες οξυγόνο έχει πολύ μικρότερο χρόνο ζωής (≈ 100 ns) και ακτίνα διάχυσης σε σχέση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Αν το μονήρες οξυγόνο αναχθεί σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο διαχέεται πολύ πιο εύκολα μέσα στο κύτταρο, θα προκαλέσει πολύ πιο εκτεταμένες βλάβες. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου εκτός από τη διάσπασή του σε υδροξυλικές ρίζες μέσω των αντιδράσεων Fenton, μπορεί να αντιδράσει και με τη μυελοπεροξειδάση και να παράγει υποχλωρικό οξύ το οποίο είναι επίσης ισχυρό οξειδωτικό με αρκετά μεγάλη ακτίνα διάχυσης. Ο μηχανισμός αυτός εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης και γενικότερα το περιεχόμενο των κυττάρων σε αντιοξειδωτικά ένζυμα. Για αυτό το λόγο και ο μηχανισμός αυτός παρατηρείται σε καρκινικά κύτταρα στα οποία η συγκέντρωση των ενζυμικών αντιοξειδωτικών που θα μπορούσαν να εμποδίσουν αυτό το μηχανισμό είναι μικρή[22].
2. Τα αντιοξειδωτικά σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις παρεμποδίζουν εν μέρει το μηχανισμό αναπνοής. Σε αυτήν την περίπτωση η κατανάλωση οξυγόνου αλλά και η παραγωγή ενέργειας είναι μικρότερες από ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες. Έτσι ευνοείται ο σχηματισμός μονήρους οξυγόνου κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας αφού η κατανάλωση του μοριακού οξυγόνου στην αναπνευστική αλυσίδα είναι μικρή[18].
3. Το κύτταρο επίσης λόγω της ανεπαρκούς παραγωγής ενέργειας και της προ-οξειδωτικής δράσης των αντιοξειδωτικών είναι αρκετά καταπονημένο γεγονός το οποίο επίσης επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας[17,18].

5.5. Βιβλιογραφία

1. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. Cronin, M. Mazur, J. Telser, “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease”, Int J Biochem Cell Biol, 39, 44-84, 2007.
2. Α. Βαλαβανίδης, Ελεύθερες ρίζες και μηχανισμοί καρκινογένεσης, Εκδόσεις Βήτα, Αθήνα 2003.
3. M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, “Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer”, Chem Biol Interact, 160, 1-40, 2006.

4. A. Shukla, B. T. Mossman, “Oxidants and Antioxidants”, Encyclopedia of Respiratory Medicine, 2, 271-278, Elsevier, 2006.

5. F. R. de Gruijl, “Skin cancer and solar UV radiation”, Eur J Cancer, 35, 2003-2009, 1999.

6. A. Albino, E. Jorgensen, “Multistage carcinogenesis”, Encyclopedia of Cancer, 275-285, 2003.

7. L. Stryer, Βιοχημεία, Τόμος 1, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997.

8. G. Galati, P. O’ Brien, “Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties”, Free Radical Biol Med, 37, 287-303, 2004.

9. C. Skibola, M. Smith, “Potential health impacts of excessive flavonoid intake”, Free Radical Biol Med, 29, 375-383, 2000.

10. P. G. Pietta, “Flavonoids as antioxidants”, J Nat Prod, 63, 1035-1042, 2000.

11. A. Urquiaga, F. Leighton, “Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress”, Biol Res, 33, 54-64, 2000.

12. G. Duthie, P. Gardner, and J. Kyle, “Plant polyphenols: are they the new magic bullet?”, Proceedings of the Nutrition Society, 62, 599-603, 2003.

13. K. Heim, A. Tagliafero, D. Bobilya, “Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships”, J Nutrit Biochem, 13, 572-584, 2002.

14. G. Haenen, M. Arts, A. Bast, M. Coleman, “Structure and activity in assessing antioxidant activity in vitro and in vivo A critical appraisal illustrated with the flavonoids”, Environ Toxicol Phar, 21, 191-198, 2006.

15. M. Valko, C. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, “Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer”, Chem Biol Interact, 160, 1-40, 2006.

16. Riejens, M. Boersma, L. de Haan, B. Spenkelink, H. Awad, N. Cnubben, J. van Zanden, H. van der Woude, G. Alink, J. Koeman, “The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids”, Environ Toxicol Pharmacol, 11, 321-333, 2002.

17. V. Melnikova, L. Bezdetnaya, I. Belitchenco, A. Potapenco, J. L. Merlin, F. Guillemin, “Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorine-sensitized photodynamic damage of cultured tumor and normal cells in the presence of high concentrations of a-tocopherol”, Cancer Lett, 139, 89-95, 1999.

18. Shevchuk, V. Chekulayev, L. Chekulayeva, “Enhancement of the efficiency of photodynamic therapy of tumors by t-butyl-4-hydroxyanisole”, J Photchem Photobiol, 45, 136-143, 1998.

19. E. Kelley, F. Domann, G. Buettner, L. Oberley, P. Burns, “Increased efficacy of in vitro Photofrin® photosensitization of human oral squamous cell carcinoma by iron and ascorbate”, J Photochem Photobiol, 40, 273-277, 1997.

20. J. Frank, A. Flaccus, C. Schwarz, C. Lambert, H. Biesalki, “Ascorbic acid suppresses cell death in rat DS-sarcoma cancer cells induced by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy”, Free Rad Biol Med, 40, 827-836, 2006.

21. A. Matsuyama, H. Nakano, K. Harada, T. Yamazaki, T. Kanno, M. Wakui, K. Hanada, “Enhancement of photodynamic effect in normal rat keratinocytes by treatment with 1,25 dihydroxy vitamin D_3”, Photodermatol Photoimmunol Photomed, 19, 303-308, 2003.

22. G. Kramarenko, W. Wilke, D. Dayal, G. Buettner, F. Schafer, “Ascorbate enhances the toxicity of the photodynamic action of Verteporfin in HL-60 cells”, Free Rad Biol Med, 40, 1615-1627, 2006.

Κεφάλαιο 6

Ανάπτυξη Μεθόδων και Συστημάτων

6.1. Εισαγωγή

Η έγκαιρη διάγνωση και αντιμετώπιση του καρκίνου αποτελεί άμεση προτεραιότητα της επιστημονικής κοινότητας παγκοσμίως. Κι αυτό γιατί από το 1997 και έπειτα τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του δέρματος αυξάνονται συνεχώς. Τα νέα περιστατικά μη-μελανωματικού καρκίνου στις ΗΠΑ μόνο ξεπερνούν το 1 000 000 / χρόνο. Στην περίπτωση που η διάγνωση γίνει στα πρώτα στάδια, τα ποσοστά πλήρους ίασης και επιβίωσης για τα 5 χρόνια τα οποία ακολουθούν τη θεραπεία μπορεί να φτάσουν και το 98 % ενώ όταν η διάγνωση γίνει σε προχωρημένα ή πολύ προχωρημένα στάδια της καρκινογένεσης τα ποσοστά αυτά μειώνονται στο 64 και 16 % αντίστοιχα.

Οι έρευνες διεξάγονται παράλληλα σε πολλά μέτωπα. Έτσι, ταυτόχρονα με τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων από τα οποία θα προκύψουν τα κυριότερα αίτια πρόκλησης αυτού του τύπου καρκίνου, διεξάγονται in vitro και in vivo έρευνες προκειμένου να αποσαφηνιστεί η αλληλουχία των βιοχημικών διεργασιών που οδηγούν στην καρκινογένεση. Επίσης παράλληλα με τη βελτιστοποίηση των υπαρχουσών μεθόδων διάγνωσης, ταυτοποίησης και θεραπείας του δερματικού καρκίνου το ενδιαφέρον στρέφεται και προς νέες εναλλακτικές τεχνικές μέσω των οποίων παρακάμπτονται οι παρενέργειες και γενικότερα τα προβλήματα των υπαρχουσών.

Η παρούσα ερευνητική εργασία συνεισφέρει σε τέσσερεις διαφορετικούς τομείς. Αρχικά, επιδιώχθηκε να βρεθούν κάποια in vivo μοντέλα μη μελανωματικού

καρκίνου του δέρματος τα οποία φαινοτυπικά θα παρουσίαζαν σημαντικές ομοιότητες με αυτές των κυττάρων του ανθρώπινου δέρματος. Σε τέτοια μοντέλα μπορούν να μελετηθούν προληπτικές, διαγνωστικές, θεραπευτικές μέθοδοι και τα αποτελέσματα αυτών θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν / μεταφερθούν με κάποιο σημαντικό ποσοστό ασφάλειας σε κλινικό επίπεδο (στάδια κλινικών μελετών).

Δεύτερον λόγω της πολύ μεγάλης σημασίας της έγκαιρης διάγνωσης στα θεραπευτικά αποτελέσματα αλλά και του μεγάλου κινδύνου που συνεπάγεται η λήψη βιοψίας για υποτροπή του καρκινώματος (η βιοψία μέχρι σήμερα θεωρείται ως η μέθοδος με τα πιο αξιόπιστα αποτελέσματα) αναπτύχθηκε μία μη επεμβατική διαγνωστική μέθοδος. Στόχος ήταν μέσω διαγνωστικών αλγορίθμων να μπορούν να διακριθούν μη μελανωματικά δερματικά καρκινώματα από υγιείς δερματικούς ιστούς με ποσοστά επιτυχίας παρόμοια με αυτά της βιοψίας, μηδενικές παρενέργειες και σε πραγματικό χρόνο.

Εν συνεχεία προτάθηκε η βέλτιστη θεραπευτική μέθοδος. Η φωτοδυναμική θεραπεία προτιμάται γενικά στην περίπτωση των μη μελανωματικών δερματικών καρκίνων έναντι των άλλων θεραπειών γιατί δεν προκαλεί θέρμανση των ιστών και έτσι δεν επηρεάζει συνδετικούς ιστούς όπως το κολλαγόνο και η ελαστίνη. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την απουσία πληγών οδηγεί σε ταχεία πλήρη ανάπλαση της θεραπευμένης περιοχής. Το σημαντικότερο μειονέκτημα που παρουσιάζει η φωτοδυναμική θεραπεία είναι η φωτοευαισθησία που εμφανίζει ο ασθενής όταν η χορήγηση της φωτοευαισθητοποιού ουσίας γίνει συστηματικά. Το μειονέκτημα αυτό ειδικά στην περίπτωση του δερματικού καρκίνου (όπου η πρόσβαση στο όργανο είναι πολύ εύκολη) μπορεί να επιλυθεί μέσω της τοπικής χορήγησης της φωτοευαισθητοποιού ουσίας.

Μέχρι σήμερα όμως το πρόβλημα αυτό δεν έχει επιλυθεί. Ο μόνος φωτοευαισθητοποιητής ο οποίος χορηγείται τοπικά είναι το 5-αμινολεβουλινικό οξύ το οποίο όμως λόγω της μεγάλης υδροφιλικότητάς του μπορεί να διεισδύσει σε πολύ μικρά βάθη (< 1 mm) και για αυτό χρησιμοποιείται μόνο στη θεραπεία επιφανειακών δερματικών καρκίνων. Για αυτό το λόγο οι φωτοευαισθητοποιητές εξακολουθούν να χορηγούνται συστηματικά. Ο συγκεκριμένος τρόπος χορήγησης επιβάλλει στους ασθενείς να αποφεύγουν για αρκετές ημέρες να έρχονται σε επαφή με φως. Το γεγονός αυτό όμως αποτελεί επιπλέον ψυχολογική επιβάρυνση και γενικότερα υποβιβάζει την ποιότητα ζωής του ασθενούς.

Ένας άλλος στόχος λοιπόν της παρούσας έρευνας ήταν η ανάπτυξη κάποιου θεραπευτικού συστήματος (φωτοευαισθητοποιητής - ακτινοβολιτική διάταξη -

πρωτόκολλο) κατάλληλων χαρακτηριστικών το οποίο θα επέλυε τα παραπάνω προβλήματα διατηρώντας όμως στο ακέραιο τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η φωτοδυναμική θεραπεία. Για το λόγο αυτό επελέγη ένας φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς, η χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη. Πρόκειται για μία φωτοευαίσθητη ένωση η οποία όπως και οι υπόλοιπες μεταλλοφθαλοκυανίνες παρουσιάζει πολύ υψηλούς συντελεστές κβαντικής απόδοσης σε μονήρες οξυγόνο και κατά συνέπεια είναι ένας πολύ ισχυρός φωτοευαισθητοποιητής. Το πλεονέκτημά της έναντι των υπολοίπων μεταλλοφθαλοκυανινών είναι η ήπια υδατοδιαλυτότητα που προσδίδει στο μόριο της το άτομο του χλωρίου. Έτσι λόγω του ταυτόχρονα υδρόφιλου και λιπόφιλου χαρακτήρα της αλλά και του μικρού μοριακού μεγέθους της (ιδιότητες που συνεισφέρουν στην απορρόφηση και διάχυση ενός μορίου στα δερματικά κύτταρα) φαίνεται ιδανικό μόριο για τοπική επάλειψη. Για να επιβεβαιωθούν οι βελτιωμένες ιδιότητές του, ο φωτοευαισθητοποιητής συγκρίθηκε στα διάφορα στάδια της μελέτης με ένα φωτοευαισθητοποιητή ο οποίος έχει ήδη πάρει έγκριση για θεραπεία δερματικών καρκίνων.

Όσο σημαντικός όμως είναι ο φωτοευαισθητοποιητής στη φωτοδυναμική θεραπεία, τόσο σημαντικό είναι και το σύστημα ακτινοβόλησης. Στην συγκεκριμένη μελέτη επιδιώχθηκε να αναπτυχθεί ένα σύστημα ακτινοβόλησης ιστών το οποίο θα συνδέονταν ιδανικά με τον παραπάνω φωτοευαισθητοποιητή. Βασική προϋπόθεση που θα έπρεπε να πληροί ένα τέτοιο σύστημα ήταν να εκπέμπει στην περιοχή μήκους κύματος στην οποία ο φωτοευαισθητοποιητής παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης. Επίσης θα έπρεπε να συνδέεται με κατάλληλο σύστημα μεταφοράς της ακτινοβολίας και να διαθέτει ακριβή έλεγχο ισχύος και διαμέτρου της φωτεινής κηλίδας προκειμένου να μπορεί να είναι ευέλικτο και να προσαρμόζεται αξιόπιστα και γρήγορα σε καρκινώματα διαφορετικού μεγέθους που βρίσκονται σε διαφορετικά σημεία και απαιτούν διαφορετικά πρωτόκολλα θεραπείας. Ιδανικό θα ήταν επίσης στην ίδια διάταξη να μπορούσε να προσαρμοστεί και κάποιο σύστημα απεικόνισης του δέρματος το οποίο θα αξιολογούσε παράλληλα και τα αποτελέσματα της θεραπείας. Τελικά, για να είναι αποτελεσματικό αυτό το σύστημα (φωτοευαισθητοποιητή-ακτινοβολητικής διάταξης) θα έπρεπε να καθοριστούν οι βέλτιστες δόσεις φωτοευαισθητοποιητή, ισχύος, συνολικής δόσης ενέργειας.

Ένας επίσης πολύ σημαντικός τομέας των βιοϊατρικών επιστημών ερευνά την ευεργετική δράση των αντιοξειδωτικών φυτικής προέλευσης. Οι μέχρι σήμερα μελέτες έχουν δείξει ότι στα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης εμπλέκονται

μηχανισμοί ελευθέρων ριζών. Έτσι από πολλές ερευνητικές ομάδες και εργασίες υποστηρίζεται ότι αύξηση της ημερήσιας δόσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να καθυστερήσει τις βιοχημικές διεργασίες καρκινογένεσης. Παρόλα αυτά οι σχετικές μελέτες γύρω από το μη μελανωματικό καρκίνο του δέρματος είναι λίγες και τα αποτελέσματά τους αντικρουόμενα. Στρεφόμενη προς αυτήν την κατεύθυνση η παρούσα εργασία εξετάζει τη δράση ενός γνωστού από την αρχαιότητα αντιοξειδωτικού εκχυλίσματος πεύκου με γνωστή ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Το εκχύλισμα αυτό παρόλο που έχει εκτενώς μελετηθεί ως προς την αντιοξειδωτική του δράση δεν έχει μελετηθεί ως προς την προστατευτική-αντικαρκινική του δράση. Το εκχύλισμα αυτό προέρχεται από το φλοιό του πεύκου *Maritima* και το σημαντικότερο ίσως πλεονέκτημά του, μετά από την πλούσια σε φαινολικές αντιοξειδωτικές ουσίες σύστασή του, είναι η σταθερότητα ως προς τη σχετική συγκέντρωση των συστατικών του. Το πλεονέκτημά του αυτό αποδίδεται στις κλιματολογικές συνθήκες κάτω από τις οποίες ευδοκιμεί το συγκεκριμένο φυτό αλλά και την προστατευμένη πλέον περιοχή καλλιέργειάς του.

Για κάποιες γνωστές βιταμίνες όπως το ασκορβικό οξύ και η α-τοκοφερόλη έχει δειχθεί ότι κάτω από ορισμένες συνθήκες η δράση τους αντιστρέφεται και γίνεται από αντιοξειδωτική προ-οξειδωτική. Η αντιστροφή αυτή στη δράση τους παρατηρείται όταν βρίσκονται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ή παρουσία μεγάλης συγκέντρωσης μεταλλικών ιόντων. Μάλιστα κάποιες μελέτες προτείνουν τη χρήση αυτού του φαινομένου ως έναν επιπλέον μέσο νέκρωσης των καρκινικών κυττάρων κατά τη διάρκεια κάποιας αντικαρκινικής θεραπείας.

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μία θεραπεία η οποία δρα μέσω μηχανισμών παραγωγής ελευθέρων ριζών. Στις περισσότερες μελέτες στις οποίες έχει δοκιμαστεί παράλληλη χορήγηση αντιοξειδωτικών υποβαθμίστηκαν σημαντικά τα αποτελέσματα της θεραπείας λόγω δέσμευσης των ελευθέρων ριζών από τα αντιοξειδωτικά μόρια. Οι δόσεις όμως στις οποίες έχουν χορηγηθεί μέχρι στιγμής αυτά τα μόρια είναι μικρές, δόσεις στις οποίες έχει διαπιστωθεί ότι παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση. Σημαντικό είναι το κενό που υπάρχει αυτήν τη στιγμή σχετικά με το ποια θα είναι τα αποτελέσματα της θεραπείας εάν αυτά τα μόρια ή κάποια άλλα με παρόμοιες βιοχημικές ιδιότητες χορηγηθούν σε ασυνήθιστα υψηλές δόσεις στις οποίες η δράση τους αντιστρέφεται.

Προς αυτήν την κατεύθυνση οδηγήθηκε αυτή η μελέτη. Έτσι δοκιμάστηκε πριν τη φωτοδυναμική θεραπεία να χορηγηθεί μία υψηλή δόση μίγματος αντιοξειδωτικών τοπικά. Η δόση αυτή επελέγη μετά από in vitro μελέτες του εκχυλίσματος φλοιού πεύκου σε υγιή δερματικά κύτταρα. Για να διαπιστωθεί η συνεργειακή δράση του

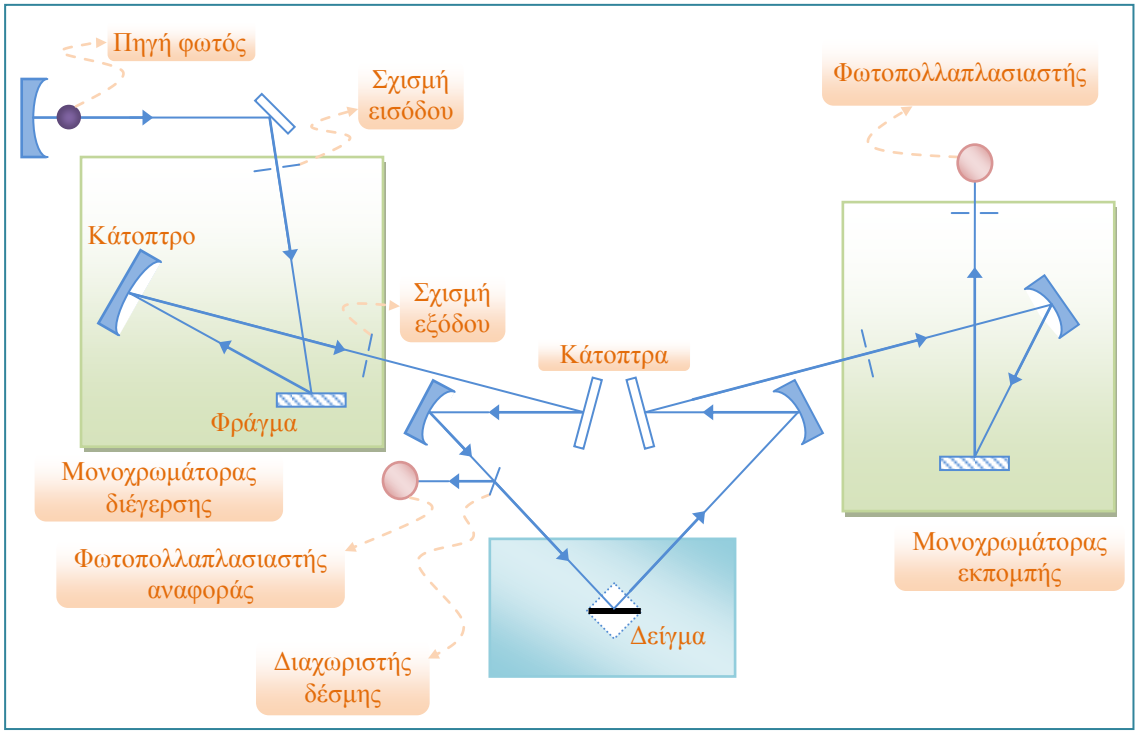
μίγματος αντιοξειδωτικών και της φωτοδυναμικής εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο φωτοδυναμικής θεραπείας το οποίο είχε ήδη μελετηθεί και ήταν γνωστή η αποτελεσματικότητά του.

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα συστήματα, οι διατάξεις και οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν προκειμένου να υλοποιηθούν οι παραπάνω στόχοι.

6.2. Φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού

6.2.1. Περιγραφή

Μία από τις απαραίτητες προϋποθέσεις για την υλοποίηση των στόχων που τέθηκαν ήταν η ανάπτυξη μιας διάταξης η οποία θα επέτρεπε φθορισμομετρικές μελέτες ιστών αλλά και διαλυμάτων φωτοευαισθητοποιητών. Για την καταγραφή φασμάτων φθορισμού από διαλύματα και ιστούς χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτομετρική διάταξη η οποία μπορεί να ανιχνεύσει φθορισμό, φωσφορισμό, χημειο- ή βιο-φωταύγεια (chemi- ή bio-luminescence).

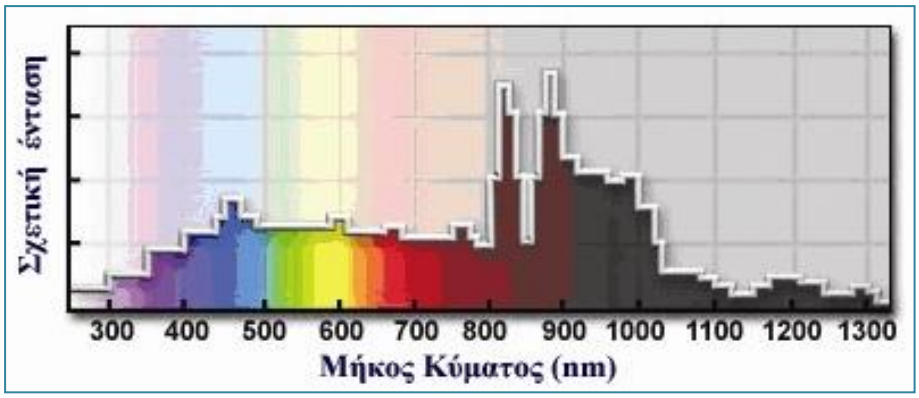


Σχήμα 6.1: *Οπτικό διάγραμμα διέγερσης και συλλογής φθορισμού*

Η μέτρηση σημάτων φθορισμού από τη συγκεκριμένη διάταξη μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε για συνεχή σάρωση σε όλο το εύρος των μηκών κύματος του οργάνου (ή σε μέρος αυτής της περιοχής) είτε σε επιλεγμένα μήκη κύματος. Το

οπτικό σύστημα της διάταξης (Σχήμα 6.1) αποτελείται από δύο μονοχρωμάτορες (διέγερσης και εκπομπής), μια σειρά από κάτοπτρα και δύο φωτοπολλαπλασιαστές (δείγματος και αναφοράς). Τα σήματα από τους δύο ανιχνευτές επεξεργάζονται από τα ηλεκτρονικά του οργάνου και μπορούν να παρατηρηθούν στην οθόνη ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Η πηγή φωτός διέγερσης είναι μια ειδική λυχνία αναλαμπής ξένου (Xenon flash tube), η οποία παράγει παλμούς μικρής χρονικής διάρκειας (μέση διάρκεια 8 μs) και μεγάλης έντασης. Η ενεργειακή φασματική κατανομή της, φαίνεται στο Σχήμα 6.2.



Σχήμα 6.2: *Ενεργειακή φασματική κατανομή πηγής ξένου.*

Η ακτινοβολία από τη λυχνία ξένου, με τη βοήθεια κατόπτρων εστιάζεται στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα διέγερσης, ο οποίος περιλαμβάνει φράγμα 1440 γραμμών / mm και σφαιρικό κάτοπτρο για τη σωστή κάλυψη του φράγματος από τη φωτεινή δέσμη. Από τη σχισμή εξόδου εξέρχεται το μονοχρωματικό φως, σε συγκεκριμένη στενή φασματική περιοχή, με κεντρικό μήκος κύματος που καθορίζεται από τη γωνιακή θέση σάρωσης του φράγματος περίθλασης, που ελέγχεται από βηματικό κινητήρα (stepping motor). Η μονοχρωματική δέσμη διέγερσης προσπίπτει με τη βοήθεια κατόπτρων στο δείγμα (υπάρχει κατάλληλος υποδοχέας για κυψελίδα 10 mm) υπό γωνία 45°. Παράλληλα, μέσω ενός διαχωριστή δέσμης (beam splitter), ένα μικρό μέρος από τη δέσμη διέγερσης εστιάζεται στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς. Για τη διόρθωση της απόκρισης του φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς, χρησιμοποιείται καμπύλη αναφοράς ροδαμίνης B, η οποία είναι αποθηκευμένη στο όργανο και διατηρεί σχεδόν σταθερή τη κβαντική απόδοση για απορρόφηση σε μήκη κύματος από 200 έως 600 nm και εκπομπή στα 630 nm.

Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το δείγμα, σε γωνία 90° ως προς τη δέσμη διέγερσης, εστιάζεται από κάτοπτρα στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα

εκπομπής, ο οποίος περιλαμβάνει οπτικό φράγμα περίθλασης 1200 γραμμών / mm και σφαιρικό κάτοπτρο. Η στενή φασματική περιοχή που εξέρχεται από τη σχισμή εξόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής - η κίνηση του φράγματος του οποίου επίσης ελέγχεται από βηματικό κινητήρα - αναλύεται τελικά από φωτοπολλαπλασιαστή.

Οι μονοχρωμάτορες είναι τύπου Monk-Gillieson και μπορούν να σαρώνουν είτε ανεξάρτητα είτε συνδυαστικά για εύρος πεδίου, το οποίο κυμαίνεται για μεν το μονοχρωμάτορα διέγερσης από 200 έως 800 nm, για δε το μονοχρωμάτορα εκπομπής από 200 έως 650 nm. Για εφαρμογές σε μήκη κύματος εκπομπής έως 900 nm, απαιτείται η αλλαγή σε φωτοπολλαπλασιαστή με διευρυμένη φασματική απόκριση (red sensitive photomultiplier). Επίσης υπάρχει η δυνατότητα σύγχρονης σάρωσης, με σταθερή διαφορά μήκους κύματος διέγερσης και εκπομπής. Η ταχύτητα σάρωσης του φράγματος περίθλασης, μπορεί να επιλεγεί από 10 έως 1500 nm / min, με βήμα του 1 nm. Επιλογή μικρότερης τιμής για την ταχύτητα σάρωσης επιτρέπει την επίτευξη καλύτερου λόγου σήματος προς θόρυβο, αλλά σε περιπτώσεις που το εξεταζόμενο δείγμα δεν είναι φωτοσταθερό, για να αποφευχθούν φαινόμενα φωτολεύκανσης (photobleaching) επιλέγεται μεγαλύτερη τιμή ταχύτητας σάρωσης.

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

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

6.2.2. Διαχείριση σήματος

Για κάθε κύκλο συλλογής των σημάτων φθορισμού πραγματοποιούνται τέσσερις ολοκληρώσεις: δύο για το σήμα από το φωτοπολλαπλασιαστή δείγματος και δύο

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

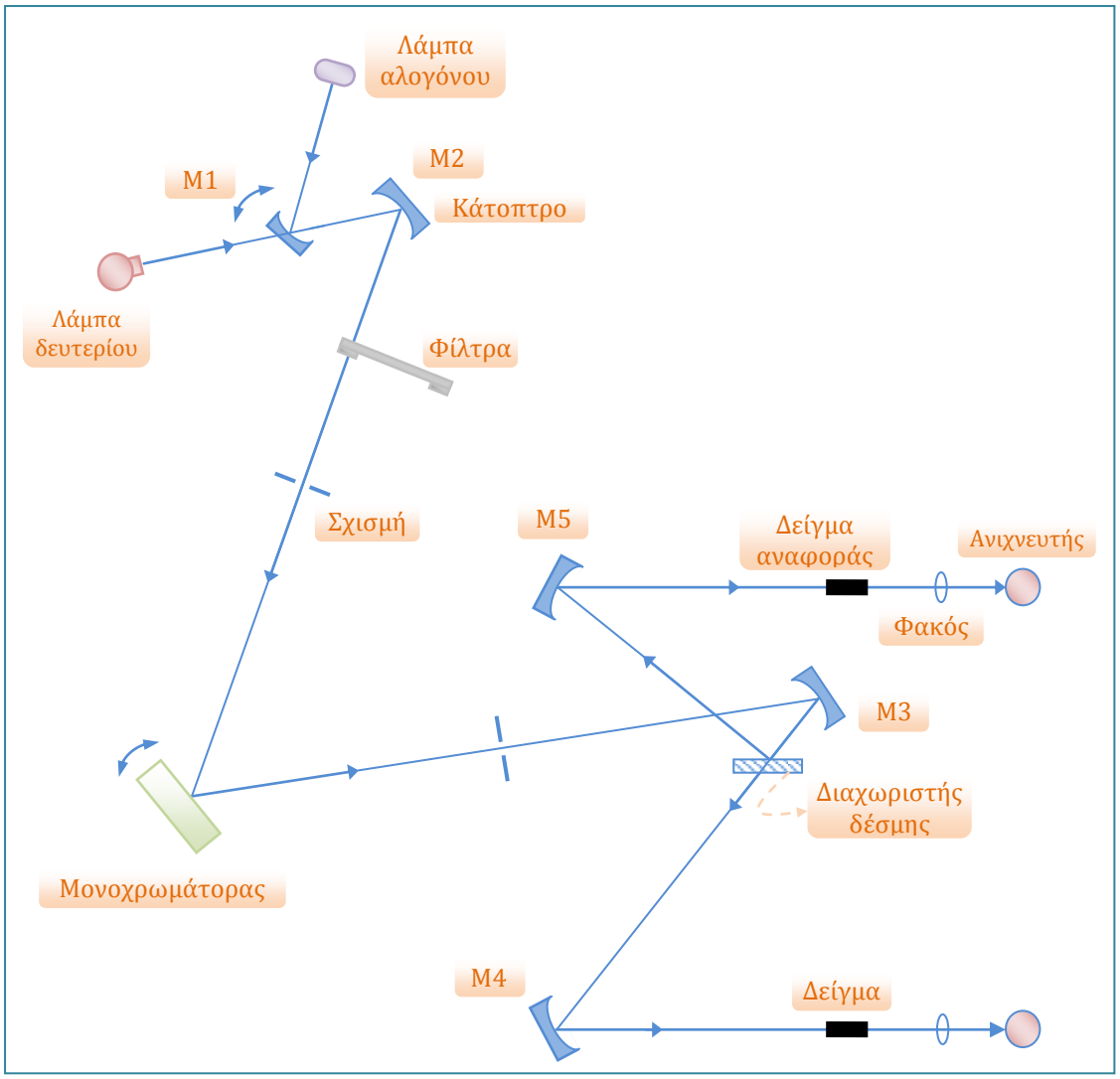
Έπειτα σχηματίζεται ο λόγος του σήματος από το φωτοπολλαπλασιαστή δείγματος ως προς το αντίστοιχο αναφοράς, για τη βελτίωση του λόγου σήματος προς θόρυβο και για τη διόρθωση λόγω διακυμάνσεων στην εκπομπή της πηγής φωτισμού. Στη συνέχεια πολλαπλασιάζεται το σήμα με την καμπύλη διόρθωσης της ροδαμίνης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

6.3. Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης

6.3.1. Περιγραφή

Για τη μελέτη των ιδιοτήτων των φωτοευαισθητοποιητών εξίσου σημαντική με την καταγραφή των σημάτων φθορισμού των διαλυμάτων τους είναι και η καταγραφή των φασμάτων απορρόφησης. Για τη λήψη και καταγραφή των φασμάτων απορρόφησης των διαλυμάτων των φωτοευαισθητοποιητών χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης.

Η πορεία της φωτεινής δέσμης και το οπτικό διάγραμμα του οργάνου φαίνονται στο Σχήμα 6.3. Το συγκεκριμένο όργανο διαθέτει δύο φωτεινές πηγές. Μία λυχνία δευτερίου, η οποία εκπέμπει στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος (200-400 nm), και μία λυχνία αλογόνου, η οποία εκπέμπει στην ορατή και κοντινή υπέρυθρη περιοχή (350-900 nm). Όπως φαίνεται και στο οπτικό διάγραμμα του οργάνου, το κάτοπτρο M1 ανασηκώνεται όταν η ακτινοβολία προέρχεται από τη λυχνία δευτερίου προκειμένου να επιτρέψει τη διέλευση φωτός. Όταν η ακτινοβολία προέρχεται από τη λυχνία αλογόνου, το κάτοπτρο M1 επανέρχεται στη θέση του προκειμένου το φως της πηγής να ανακλαστεί και να οδηγηθεί στο κάτοπτρο M2. Όταν γίνεται σάρωση μίας ευρείας περιοχής μηκών κύματος, τότε η μετακίνηση του κατόπτρου και η αλλαγή λυχνίας γίνεται αυτόματα (στα 326 nm).



Σχήμα 6.3: *Οπτικό διάγραμμα φασματοφωτομετρικής διάταξης απορρόφησης*

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

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

φωτοδίοδο. Με παρόμοιο τρόπο, η δέσμη από το κάτοπτρο M4 θα οδηγηθεί στο δείγμα και από εκεί, μέσω φακών, στη φωτοδίοδο.

6.3.2. Λογισμικό επεξεργασίας σήματος

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

Μία άλλη δυνατότητα που προσφέρει το λογισμικό αυτό είναι η ικανότητα μηδενισμού του σήματος που οφείλεται στο διαλύτη και το θόρυβο του φασματοφωτόμετρου, μέσω της επιλογής Autozero. Η επιλογή αυτή θέτει τις γραμμές αναφοράς είτε πρόκειται για μετρήσεις διέλευσης είτε για μετρήσεις απορρόφησης. Έτσι τα φάσματα ή αποτελέσματα που προκύπτουν αναφέρονται μόνο στην απορρόφηση που οφείλεται στη συγκέντρωση των ουσιών του δείγματος και όχι του μέσου στο οποίο έχουν διαλυθεί ή διασπαρθεί και το θόρυβο του φασματοφωτόμετρου.

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

6.4. Σχεδίαση και ανάπτυξη συστήματος ψηφιακής απεικόνισης ιστών

Πριν και μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου της φωτοδυναμικής θεραπείας, κρίθηκε απαραίτητη η λήψη και επεξεργασία εικόνων από την περιοχή του όγκου, προκειμένου αυτές να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της θεραπείας. Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε ένα σύστημα ψηφιακής απεικόνισης δερματικών ιστών. Το σύστημα αυτό σχεδιάστηκε έτσι ώστε να πληροί τις εξής προϋποθέσεις:

- Κατάλληλη σχεδίαση ώστε να μπορούν να ληφθούν εικόνες από το δέρμα μικρών ζωντανών πειραματόζωων (μυών).
- Διάρκεια λήψης και αποθήκευσης των εικόνων μικρότερη από 2-3 min προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί το στρες που προκαλεί η όλη διαδικασία στο πειραματόζωο.
- Παραγωγή εικόνων υψηλής ποιότητας αφού από την επεξεργασία τους εξαρτάται άμεσα η αξιολόγηση της θεραπείας.
- Φορητότητα.
- Δυνατότητα ενσωμάτωσής του στο σύστημα ακτινοβόλησης, ώστε το τελικό σύστημα απεικόνισης-ακτινοβόλησης να καταλαμβάνει μικρό όγκο για να μπορεί να μεταφερθεί και γενικά να διαχειριστεί με ευκολία.

Το σύστημα περιλαμβάνει μία ψυχόμενη CCD κάμερα και κάρτα PCI προκειμένου να επικοινωνεί και να μεταφέρει τις εικόνες σε έναν υπολογιστή. Η κάμερα διαθέτει υψηλής ποιότητας CCD, ψηφιοποιητή 12 bit και ηλεκτρονικά χαμηλού θορύβου, για την παραγωγή έγχρωμων ψηφιακών εικόνων 36 bit και ανάλυση μεγαλύτερη από 1k × 1k. Τα κύρια χαρακτηριστικά της κάμερας παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1.

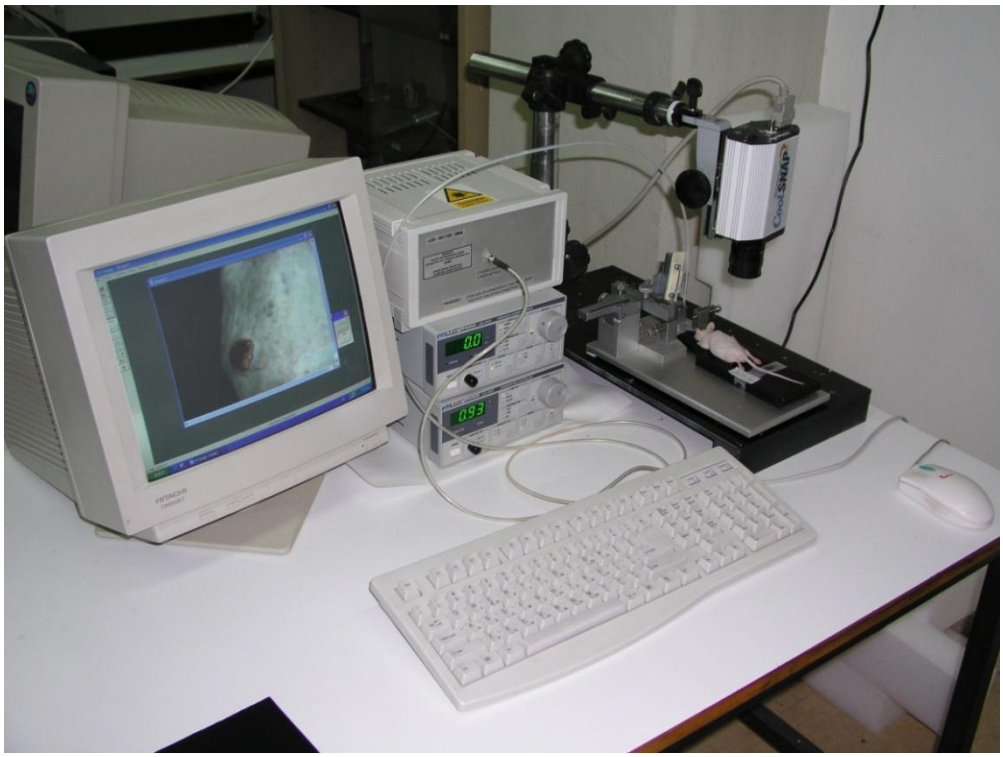
Πίνακας 6.1: *Τεχνικά χαρακτηριστικά της ψυχόμενης CCD κάμερας*

Χαρακτηριστικό	**Τιμή**
Ανάλυση	1392 × 1040
Μέγεθος pixel	4.65 μm × 4.65 μm
Ρυθμός ψηφιοποίησης	5 MHz
Ψύξη	Η CCD ψύχεται θερμοηλεκτρικά στους 5 °C κάτω από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος

Πίνακας 6.2: *Τεχνικά χαρακτηριστικά συστήματος φωτισμού*

Χαρακτηριστικά συστήματος φωτισμού 360º	
Συχνότητα	85 kHz
Ισχύς λαμπτήρα	13 W
Θερμοκρασία χρώματος	5100 K (deluxe light)
Χρόνος ζωής λαμπτήρα	7000 h
Θερμοκρασία λειτουργίας	0-40 °C
Εύρος ρυθμιζόμενης έντασης φωτός	10-100 %

Για τη λήψη εικόνων με τη συγκεκριμένη απεικονιστική διάταξη χρησιμοποιήθηκε διάχυτος ομοαξονικός φωτισμός. Το σύστημα φωτισμού που χρησιμοποιήθηκε παρέχει ομοιόμορφο και χωρίς σκιάσεις φωτισμό 360°, υψηλής συχνότητας (85 kHz) και ελεγχόμενης έντασης (10-100%). Το σύστημα φωτισμού περιλαμβάνει τροφοδοτικό, λαμπτήρα (σχήματος δακτυλίου) φθορισμού και βάση κατάλληλη για τη στερέωση του δακτυλίου σε φακούς μικροσκοπίου ή κάμερας. Τα τεχνικά χαρακτηριστικά του συστήματος αναφέρονται στον Πίνακα 6.2.



Εικόνα 6.1: *Απεικονιστική διάταξη, σύστημα ακτινοβόλησης και διοδικό laser 661 nm*

Κατά τη λήψη των εικόνων, για να εξαχθούν από αυτές τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του όγκου, τοποθετούνταν πάνω στο δέρμα και κοντά στον όγκο ένα αντικείμενο βαθμονόμησης. Το αντικείμενο αυτό ήταν μία πλαστική σφαίρα διαμέτρου 0.40 cm. Η σφαίρα αυτή είναι πολύ ελαφριά (≈ 0.5 g) και μπορεί να τοποθετηθεί εύκολα σε οποιοδήποτε σημείο του δέρματος χωρίς να ενοχλεί το πειραματόζωο. Το χρώμα της είναι μπλε ώστε να μπορεί πολύ εύκολα κατά τη διαδικασία τεμαχισμού να εξαχθεί από την εικόνα.

Για τη λήψη και επεξεργασία των εικόνων χρησιμοποιούνται εκτός από το λογισμικό που συνοδεύει την κάμερα τα προγράμματα Image Pro Plus 3.0 (Media Cybernetics), Adobe Photoshop 7.0. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε μετά τη λήψη της εικόνας είναι η εξής:

- Αυτόματη βελτίωση της αντίθεσης-φωτεινότητας της εικόνας (contrast-brightness)
- Μετατροπή της έγχρωμης σε γκρίζα (gray scale) εικόνα.
- Τεμαχισμός της εικόνας (εξαγωγή όγκου και του αντικειμένου βαθμονόμησης) με βάση τα χωρικά χαρακτηριστικά της.
- Εξαγωγή των γεωμετρικών χαρακτηριστικών του αντικειμένου βαθμονόμησης.
- Βαθμονόμηση με βάση αυτά τα χαρακτηριστικά.
- Εξαγωγή των γεωμετρικών χαρακτηριστικών του όγκου.

Τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του όγκου που εξάγονται από την παραπάνω διαδικασία είναι:

- Η διάμετρος
- Η περίμετρος
- Το εμβαδόν
- Το μήκος του κύριου άξονα
- Το μήκος του δευτερεύοντος άξονα

Κατά τη διάρκεια της λήψης εικόνων από το δέρμα των ζώων ήταν απαραίτητη λόγω της μεγάλης ευαισθησίας της κάμερας η στήριξή της και η διατήρηση μιας σταθερής θέσης ως προς τον όγκο. Για τη στερέωση του συστήματος ψηφιακής απεικόνισης σχεδιάστηκε και κατασκευάστηκε ειδική στερεοτακτική τράπεζα. Η τράπεζα αυτή παρέχει δυνατότητα μετακίνησης της ψηφιακής κάμερας σε τρεις διαστάσεις, ώστε να μπορεί να ρυθμίζεται το ύψος και η σχετική θέση της τελευταίας ως προς το ακίνητο σώμα του πειραματόζωου. Στην τράπεζα αυτή τοποθετείται άλλη μία στερεοτακτική διάταξη, η οποία προορίζεται για τη στήριξη και μετακίνηση της οπτικής ίνας που μεταφέρει την ακτινοβολία κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας (Εικόνα 6.1).

6.5. Περιγραφή συστημάτων laser για φωτοδυναμική θεραπεία

Η ζήτηση για αξιόπιστες, μικρού μεγέθους και υψηλής φωτεινότητας πηγές αυξάνεται συνεχώς. Τα διοδικά lasers σήμερα βρίσκουν πολύ σημαντικές εφαρμογές στις τηλεπικοινωνίες, στην υγεία, στα συστήματα ασφαλείας και στο περιβάλλον. Τα διοδικά lasers είναι μακράν τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα lasers στη φωτοδυναμική θεραπεία λόγω των προαναφερθεισών ιδιοτήτων τους. Το πολύ

χαμηλό κόστος αγοράς και συντήρησης των διοδικών lasers σε σχέση με τα υπόλοιπα lasers, καθώς και ο πολύ εύκολος χειρισμός τους, αποτελούν επίσης πολύ σημαντικούς παράγοντες για την αντικατάσταση, στη φωτοδυναμική θεραπεία, των συμβατικών ιατρικών lasers από διοδικά.

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

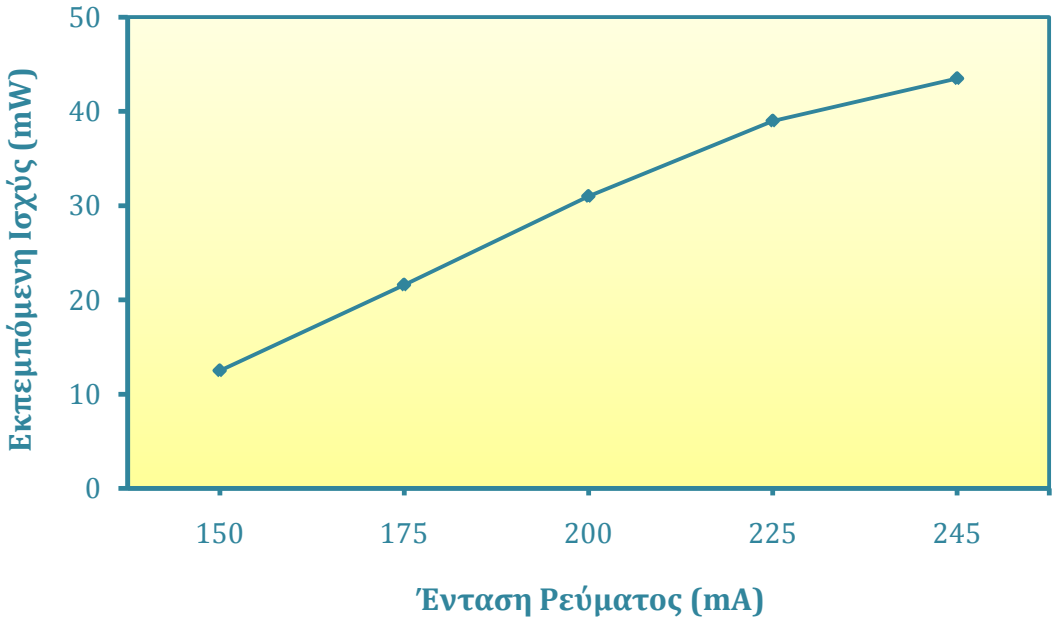
Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τρεις διατάξεις laser, δύο για τη φωτοδυναμική θεραπεία με χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη και μία για τη φωτοδυναμική θεραπεία με 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη (m-THPC). Το πρώτο σύστημα, διοδικό laser στα 661 nm, (Εικόνα 6.1), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τοπική φωτοδυναμική θεραπεία με χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη, αντικαταστάθηκε στην πορεία των πειραμάτων. Αν και τα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας με αυτό το σύστημα ακτινοβόλησης ήταν αρκετά ικανοποιητικά, κρίθηκε αναγκαία η αντικατάστασή του από κάποιο διοδικό laser νέας γενιάς, με υψηλότερη ισχύ εξόδου, προκειμένου να μπορεί να χρησιμοποιηθεί το ίδιο σύστημα τόσο σε σημειακές όσο και σε εκτεταμένες καρκινικές και προκαρκινικές βλάβες. Επίσης, το νέο διοδικό laser στα 670 nm (Εικόνα 6.2) έχει μήκος κύματος πιο κοντά στην περιοχή όπου οι μεταλλοφθαλοκυανίνες παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης. Συνεπώς αναμένονταν η φωτοδυναμική θεραπεία με αυτό να είναι πιο αποτελεσματική. Τα κύρια χαρακτηριστικά των lasers αυτών φαίνονται στους Πίνακες 6.3 και 6.4.

Πίνακας 6.3: *Χαρακτηριστικά διοδικού laser στα 661 nm*

Χαρακτηριστικό	**Τιμή**
Τύπος Laser	InGaP/InGaAlp-Δίοδος
Ισχύς εξόδου(W)	60mW
Μήκος Κύματος (λ) (nm)	661 ± 4 nm
Αριθμητικό Άνοιγμα	0.37
Συζευκτής Ίνας	SMA 905
Τρόπος Λειτουργίας	Συνεχές
Ψύξη	Με αέρα

Πίνακας 6.4: *Χαρακτηριστικά διοδικού laser στα 670 nm*

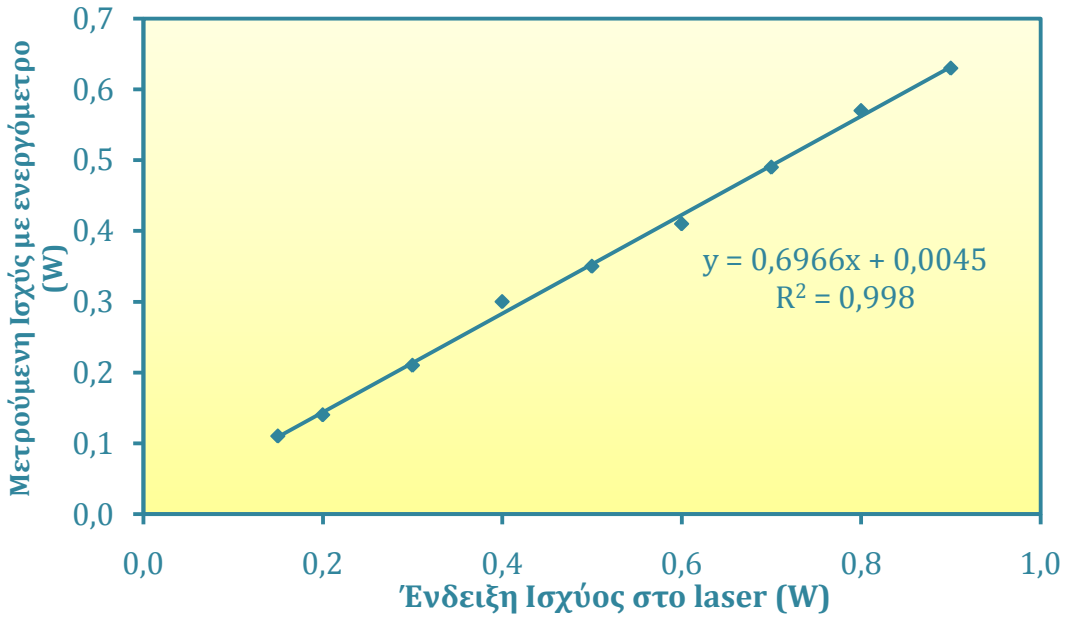
Χαρακτηριστικό	Τιμή
Τύπος Laser	GaAs-Δίοδος
Ισχύς εξόδου(W)	1W
Μήκος Κύματος (λ) (nm)	670 ± 3 nm
Αριθμητικό Άνοιγμα	0.37
Συζευκτής Ίνας	SMA 905
Τρόπος Λειτουργίας	Συνεχές
Ψύξη	Με αέρα



Σχήμα 6.4: *Διάγραμμα βαθμονόμησης του διοδικού laser LD-100 (15°C)*

Το διοδικό laser στα 661 nm δεν παρέχει δυνατότητα άμεσης ρύθμισης της ισχύος εξόδου. Η ισχύς εξόδου ρυθμιζόταν έμμεσα μέσω της εντάσεως του ρεύματος. Αντίθετα, το διοδικό laser στα 670 nm παρείχε τη δυνατότητα άμεσης ρύθμισης της εντάσεως εξόδου μέσω ειδικού λογισμικού. Λόγω όμως των πολλών ωρών λειτουργίας η ισχύς εξόδου είχε μειωθεί 30 % περίπου σε σχέση με την αρχική (με την οποία είχε γίνει και η βαθμονόμηση). Για το λόγο αυτό, και για τα δύο laser σχεδιάστηκαν δύο διαγράμματα βαθμονόμησης. Για το διοδικό laser στα 661 nm σχεδιάστηκε διάγραμμα εντάσεως ρεύματος-πραγματικής ισχύος εξόδου επειδή το λογισμικό του επέτρεπε ρύθμιση της ισχύος εξόδου μόνο μέσω της εντάσεως του ρεύματος (Σχήμα 6.4). Για το διοδικό laser στα 670 nm σχεδιάστηκε διάγραμμα

ισχύος αναγραφόμενης στην οθόνη του οργάνου - πραγματικής ισχύος εξόδου (Σχήμα 6.5). Η πραγματική ισχύς εξόδου μετρούνταν μέσω ενεργόμετρου. Τα βασικά τεχνικά χαρακτηριστικά του ενεργόμετρου φαίνονται στον Πίνακα 6.5.



Σχήμα 6.5: *Διάγραμμα βαθμονόμησης του διοδικού laser Ceralas PDT 670 nm*

Η ακτινοβολία από τα lasers μεταφέρονταν στους υπό θεραπεία ιστούς μέσω μιας οπτικής ίνας. Τα βασικά τεχνικά χαρακτηριστικά της ίνας φαίνονται στον Πίνακα 6.6. Επειδή κατά τη μεταφορά της ακτινοβολίας μέσω της ίνας υπάρχει μία σημαντική μείωση της ισχύος, η ισχύς μετρούνταν και μετά την έξοδό της από το διαχύτη της ίνας. Το άκρο της ίνας στηρίζονταν σε μία στερεοτακτική διάταξη που επέτρεπε την τρισδιάστατη κίνησή της έτσι ώστε να είναι κάθετη στον όγκο και η απόστασή της να είναι τόση ώστε η φωτεινή κηλίδα που δημιουργεί να έχει ακτίνα 0.5 cm μεγαλύτερη από την ακτίνα του όγκου.

Τα αποτελέσματα της τοπικής φωτοδυναμικής θεραπείας με χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα τοπικής φωτοδυναμικής θεραπείας ενός φωτοευαισθητοποιητή που έχει ήδη πάρει έγκριση από την Ευρώπη της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης. Αυτός όμως ο φωτοευαισθητοποιητής, παρουσιάζει όμως μέγιστο απορρόφησης σε διαφορετική περιοχή. Κατά συνέπεια απαιτούνταν ένα laser το οποίο εκπέμπει σε διαφορετική περιοχή. Για την τοπική φωτοδυναμική θεραπεία με αυτόν τον φωτοευαισθητοποιητή χρησιμοποιήθηκε διοδικό laser στα 652 nm (Εικόνα 6.2), τα βασικά χαρακτηριστικά του οποίου φαίνονται στον Πίνακα 6.7.

Πίνακας 6.5: *Χαρακτηριστικά ενεργόμετρου*

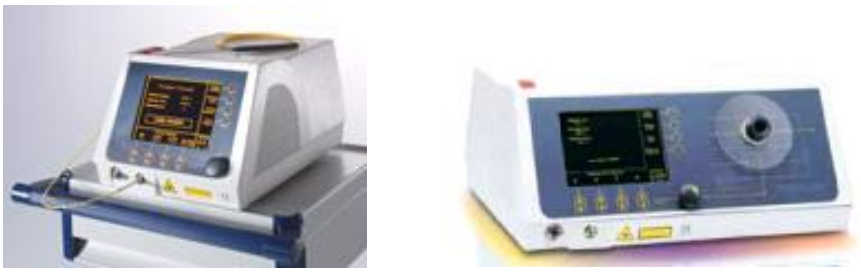
Χαρακτηριστικό	Τιμή
Μήκη κύματος	0.19-20 μm
Διάμετρος	16 mm
Κλίμακες Ισχύος	10W/5W/0.5W
Όριο ισχύος/cm^2	30KW/cm^2
Επίπεδο θορύβου	1 mW
Ακρίβεια	± 3%
Χρόνος απόκρισης	0.8s
Κλίμακες Ενέργειας	2J/200mJ

Πίνακας 6.6: *Βασικά χαρακτηριστικά οπτικής ίνας*

Χαρακτηριστικό	Τιμή
Υλικό	QUARTZ
Διάμετρος	600 μm
Αριθμητικό Άνοιγμα	0.37
Οπτικός Προσαρμογέας	SMA 905

Πίνακας 6.7: *Χαρακτηριστικά διοδικού laser 652 nm*

Χαρακτηριστικό	Τιμή	Χαρακτηριστικό	Τιμή
Τύπος Laser	GaAs-Δίοδος	Συζευκτής Ίνας	SMA 905
Ισχύς εξόδου (W)	2W	Τρόπος Λειτουργίας	Συνεχές
Μήκος Κύματος (λ) (nm)	652 ± 4 nm	Ψύξη	Με αέρα
Αριθμητικό Άνοιγμα	0.37	Βαθμονόμηση ισχύος	Σφαίρα ολοκλήρωσης



Εικόνα 6.2: *Διοδικά lasers 670 και 652 nm*

6.6. *In vivo μοντέλα μελέτης μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος*

6.6.1. *Μοντέλα μυών για τη μελέτη δερματικού καρκίνου*

Το ανθρώπινο δέρμα δεν μπορεί να αποτελέσει μοντέλο για τη μελέτη των αποτελεσμάτων της υπεριώδους ακτινοβολίας και άλλων καρκινογόνων παραγόντων όχι μόνο για ηθικούς και κοινωνιολογικούς λόγους αλλά και γιατί ο χρόνος που μεσολαβεί από την έκθεση μέχρι τη δημιουργία των πρώτων θηλωμάτων είναι πολύ μεγάλος. Έτσι, η ύπαρξη ενός ορθού πειραματικού μοντέλου αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη μελέτη των βιολογικών επιπτώσεων των καρκινογόνων παραγόντων στο δέρμα. Το ίδιο ισχύει και για οποιαδήποτε νέα διαγνωστική η θεραπευτική μέθοδο. Πριν μία μέθοδος περάσει στο επίπεδο των κλινικών δοκιμών απαραίτητο είναι να έχει προηγουμένως μελετηθεί προκλινικά προκειμένου να ελεγχθούν πιθανές παρενέργειες ή τοξικότητα.

Τα πρώτα μοντέλα ζώων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αρουραίοι και άτριχοι μύες. Οι κύριοι λόγοι για τους οποίους οι μύες έχουν επικρατήσει ως πειραματικά μοντέλα έναντι άλλων ζώων είναι η αξιοσημείωτη φαινοτυπική ομολογία που παρουσιάζει το δέρμα τους με αυτό του ανθρώπου και ο σύντομος χρόνος έκθεσης ο οποίος απαιτείται για τη δημιουργία δερματικών καρκινωμάτων. Σημαντικής βαρύτητας θεωρείται επίσης το γεγονός ότι οι μύες βρίσκονται χαμηλά στη βιολογική πυραμίδα και έτσι προτιμώνται για ηθικούς λόγους έναντι άλλων ζώων[1,2].

Στους μύες, τρεις είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν το κατά πόσο εύκολα και γρήγορα θα επαχθούν σε αυτά τα ζώα δερματικά καρκινώματα. Αυτοί είναι η ύπαρξη τριχώματος, μελανίνης και το πάχος της κεράτινης στοιβάδας. Έχει παρατηρηθεί ότι η μελανίνη παρέχει αρκετά μεγάλη προστασία στο δέρμα και έτσι προκειμένου να δημιουργηθούν παρόμοιοι όγκοι σε ζώα με μελανίνη απαιτούνται πολύ μεγαλύτερες δόσεις ακτινοβόλησης. Παρόμοια φαινόμενα έχουν παρατηρηθεί και σχετικά με το τρίχωμα των ζώων και μάλιστα η προστασία που αυτό παρέχει είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή της μελανίνης.

Επίσης μελέτες σε μύες με τρίχωμα έδειξαν ότι οι όγκοι οι οποίοι επάγονταν μετά από UV ακτινοβόληση ήταν κατά κύριο λόγο σαρκώματα εν αντιθέσει με τους όγκους που επάγονται στην ανθρώπινη επιδερμίδα μετά από μακροχρόνια επαναλαμβανόμενη έκθεση σε UV ακτινοβολία οι οποίοι είναι βασικοκυτταρικοί και ακανθοκυτταρικοί. Το τρίχωμα των ζώων ακόμη, καθιστούσε πολύ δύσκολη έως

αδύνατη την παρακολούθηση της εξέλιξης του όγκου και την ποσοτικοποίηση των μεταβολών του μεγέθους τους.

Για όλους τους παραπάνω λόγους λοιπόν, δύο μοντέλα άτριχων μυών τα οποία έχουν προκύψει από μεταλλάξεις θεωρούνται τα πιο αξιόπιστα για τις μελέτες επαγωγής καρκινικών όγκων και τη θεραπεία τους, τα SKH με ή χωρίς μελανίνη και τα Uscd[2].

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, για την αξιολόγηση τόσο θεραπευτικών όσο και διαγνωστικών μεθόδων, χρησιμοποιήθηκαν άτριχοι μύες χωρίς και με μελανίνη τύπου SKH-HR1 και SKH-HR2. Χρησιμοποιώντας αυτά τα δύο μοντέλα μυών είναι δυνατό να εξαχθούν συμπεράσματα για τους πολύ ευαίσθητους αλλά και για τους λιγότερο ευαίσθητους φωτότυπους δέρματος (αυτούς δηλαδή οι οποίοι παράγουν σημαντικές ποσότητες μελανίνης). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα πρόκλησης καρκίνου. Στο πρώτο η καρκινογένεση οφείλεται μόνο στην υπεριώδη ακτινοβολία. Με το πρωτόκολλο αυτό προσομοιώνονται οι συνθήκες και προσεγγίζεται ο κίνδυνος που διατρέχουν οι μεγαλύτερες πληθυσμιακές ομάδες. Στο δεύτερο πρωτόκολλο η καρκινογένεση οφείλεται στο συνδυασμό υπεριώδους ακτινοβολίας και ενός χημικού παράγοντα (διμεθυλ-βενζ-ανθρακένιο). Με το πρωτόκολλο αυτό προσομοιώνονται οι συνθήκες και προσεγγίζεται ο κίνδυνος που διατρέχουν οι ομάδες υψηλού κινδύνου. Στις ομάδες αυτές ανήκουν άτομα τα οποία λόγω της εργασίας εκτός από την υπεριώδη ακτινοβολία εκτίθενται και σε χημικούς καρκινογόνους παράγοντες. Τέτοιες χαρακτηριστικές ομάδες είναι οι αγρότες (φυτοφάρμακα), οι εργαζόμενοι στη βαριά βιομηχανία (διαλύτες, βαρέα μέταλλα, αρωματικοί υδρογονάνθρακες) κλπ[3].

6.6.2. Επαγωγή όγκων με UV ακτινοβολία σε μύες τύπου SKH-HR1 και SKH-HR2

Ιδιαίτερη μέριμνα λήφθηκε ώστε σε κάθε πείραμα να χρησιμοποιείται ο ελάχιστος δυνατός αλλά και ίσος αριθμός αρσενικών και θηλυκών μυών χωρίς μελανίνη (SKH-HR1) και με μελανίνη (SKH-HR2) των οποίων η ηλικία κυμαινόταν μεταξύ των 8 και 10 εβδομάδων. Όλοι οι μύες είχαν, για όλη τη διάρκεια της ζωής τους, πρόσβαση χωρίς περιορισμούς σε νερό και κατάλληλη ξηρή τροφή (σε μορφή pellets). Ο διάχυτος φωτισμός του χώρου στον οποίο ζούσαν τα ζώα είχε ρυθμιστεί σε δωδεκάωρους κύκλους φωτός-σκότους, ενώ η θερμοκρασία παρέμενε σταθερή στους 25 ^{o}C.

Για τις ακτινοβολήσεις χρησιμοποιήθηκε λυχνία ξένου 1000 W η οποία είναι τοποθετημένη σε κατάλληλη διάταξη στήριξης, ψύξης και τροφοδοσίας. Το φως

περνούσε μέσα από συγκεντρωτικό φακό, ο οποίος είναι κατάλληλα στερεωμένος στη διάταξη ώστε τελικά σε απόσταση 25 cm περίπου από το φακό να σχηματίζεται μία ομοιόμορφη κηλίδα διαμέτρου 5 cm. Η ακτινοβόληση (mW/cm^2) ελέγχονταν με τη βοήθεια του ειδικού ενεργομέτρου για τη συγκεκριμένη φασματική περιοχή το οποίο παρέχει ακρίβεια ± 3%.

Οι μύες ακτινοβολούνταν πέντε φορές την εβδομάδα με ακτινοβολία UVA και UVB ισχύος 8.5 mW/cm^2 και 8 mW/cm^2 αντίστοιχα. Την πρώτη εβδομάδα ο χρόνος ακτινοβόλησης αντιστοιχούσε σε μία μέση ερυθηματική δόση για τους μύες χωρίς μελανίνη και ήταν ίσος με 5 s/ημέρα. Οι ακτινοβολήσεις διήρκεσαν 16 εβδομάδες. Κάθε εβδομάδα, ο χρόνος ακτινοβόλησης αυξανόταν κατά 25 % έως την $9^η$ εβδομάδα, οπότε και σταθεροποιήθηκε στις 7 ερυθηματικές δόσεις (35 s). Οι μύες τοποθετούνταν κάτω από την πηγή φωτός με τέτοιο τρόπο ώστε να ακτινοβολείται μόνο η ράχη και τα άκρα τους αλλά όχι το κεφάλι τους.

Εικόνα 6.3: *Θηλυκός SKH-HR1 μυς 4 μήνες μετά τη λήξη του πρωτοκόλλου επαγωγής καρκίνου με UV ακτινοβολία*

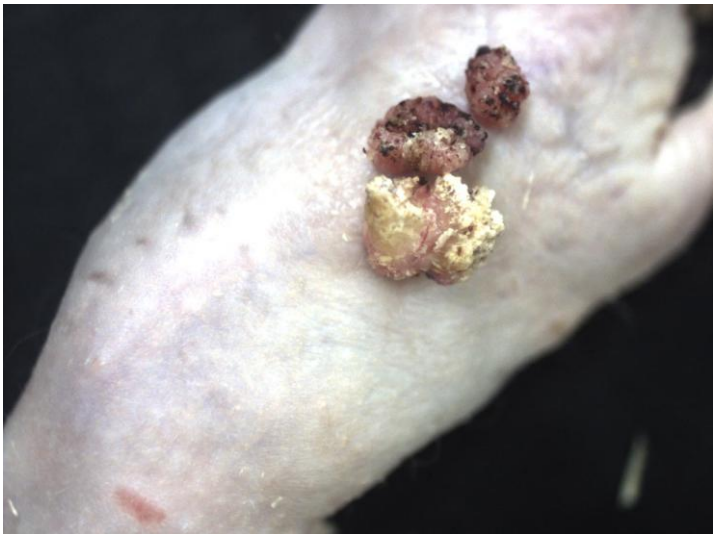
Μετά την $20^η$ εβδομάδα ένας σημαντικός αριθμός μυών εμφάνισε στη ράχη αλλά και σε άλλα σημεία του σώματος θηλώματα, των οποίων η κακοήθεια αυξάνονταν σταδιακά (Εικόνα 6.3). Τα ζώα θυσιάζονταν, για ηθικούς λόγους, όταν η διάμετρος του όγκου που έφεραν γινόταν μεγαλύτερη από 1 cm. Η ταυτοποίηση-αξιολόγηση αντιπροσωπευτικών όγκων και θηλωμάτων γινόταν από ειδικό ιστοπαθολόγο. Τα πειράματα έγιναν σύμφωνα με την οδηγία 2003/65/EC της Ευρωπαϊκής Ένωσης σχετικώς με τη μεταχείριση των πειραματόζωων και έχουν εγκριθεί από την αντίστοιχη Ελληνική Υπηρεσία.

6.6.3. *Επαγωγή όγκων με UV ακτινοβολία και διμεθυλ-βενζ-ανθρακένιο σε μύες τύπου SKH-HR1 και SKH-HR2*

Κατά τη διάρκεια αυτών των πειραμάτων επαγωγής καρκίνου, οι μύες ζούσαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες όπως και στην περίπτωση πρόκλησης καρκίνου με UV ακτινοβολία. Τα πειράματα έγιναν σύμφωνα με τους ίδιους κανονισμούς, ενώ τα ζώα επιλέχθηκαν πάλι ώστε όταν ξεκινούσαν τα πειράματα η ηλικία τους να κυμαίνεται μεταξύ των 8 και 10 εβδομάδων. Οι ομάδες αρσενικών-θηλυκών και ζώων χωρίς και με μελανίνη να αποτελούνται από ίσους αριθμούς ζώων.

Κάθε ζώο δέχθηκε επαλείψεις με 0.2 ml διαλύματος διμεθυλ-βενζ-ανθρακενίου (DMBA), συγκέντρωσης 5.2×10^{-4} M, στη ράχη του κάθε πέντε ημέρες έως ότου ο συνολικός αριθμός των επαλείψεων να φθάσει τις πέντε. Τρεις ημέρες μετά το τέλος των επαλείψεων άρχισαν οι ακτινοβολήσεις των μυών. Οι μύες ακτινοβολούνταν πέντε φορές την εβδομάδα με ακτινοβολία UVA και UVB ισχύος 8.5 mW/cm^2 και 8 mW/cm^2 αντίστοιχα. Την πρώτη εβδομάδα ο χρόνος ακτινοβόλησης ήταν 5 sec/ημέρα ενώ κάθε εβδομάδα ο χρόνος αυτός αυξανόταν κατά 25 %. Οι ακτινοβολήσεις διήρκεσαν 5 εβδομάδες.

Δύο εβδομάδες περίπου μετά την τελευταία ακτινοβόληση ένας σημαντικός αριθμός ζώων εμφάνισε όχι μόνο στη ράχη αλλά και σε πολλά άλλα σημεία του σώματος θηλώματα (Εικόνες 6.4, 6.5) των οποίων η κακοήθεια αυξανόταν με αρκετά γρήγορους ρυθμούς. Η αξιολόγηση-ταυτοποίηση αντιπροσωπευτικών όγκων και θηλωμάτων έγινε και σε αυτήν την περίπτωση από ειδικό ιστοπαθολόγο.



Εικόνα 6.4: *Αρσενικός SKH-HR1 μυς ένα μήνα μετά τη λήξη του πρωτοκόλλου επαγωγής καρκίνου με συνδυασμό UV ακτινοβολίας και εφαρμογής DMBA*

6.7. Ανάπτυξη διαγνωστικής μεθόδου μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων

Στα πλαίσια αυτής της ερευνητικής εργασίας επιδιώχθηκε να αναπτυχθεί μία διαγνωστική μέθοδος μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων η οποία θα βασίζεται στις διαφορετικές ιδιότητες που παρουσιάζουν αυτά τα καρκινώματα σε σχέση με τους υγιείς ιστούς, όπως αυτές προκύπτουν από τα φάσματα αυτοφθορισμού. Η διαγνωστική αυτή μέθοδος προτιμήθηκε έναντι των άλλων κυρίως λόγω των μηδενικών παρενεργειών και τη δυνατότητα πολύ συχνής επανάληψης που προσφέρει. Απαραίτητο, λοιπόν, ήταν να αναπτυχθεί μία διάταξη η οποία θα μπορούσε να καταγράψει, να αποθηκεύσει και να επεξεργαστεί φάσματα αυτοφθορισμού από υγιές δέρμα και μη μελανωματικά δερματικά καρκινώματα ζωντανών μυών.

Για τη μελέτη των φασματοφωτομετρικών χαρακτηριστικών μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων και εξαγωγή διαγνωστικών χαρακτηριστικών από αυτά προσαρμόστηκε και χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού η οποία περιγράφηκε στην παράγραφο 6.2.1.

Για τη μεταφορά της δέσμης διέγερσης αλλά και του σήματος φθορισμού αφαιρέθηκε από τη διάταξη ο ειδικός υποδοχέας κυβεττών και στη θέση του τοποθετήθηκε το ειδικό σύστημα οπτικών ινών. Πρόκειται για ένα σύστημα το οποίο επιτρέπει τη μελέτη φασματοφωτομετρικών χαρακτηριστικών δειγμάτων που δεν μπορούν να τοποθετηθούν σε κυβέττες.

Το σύστημα αυτό αποτελείται από μία δέσμη οπτικών ινών χαλαζία διαμέτρου 600 μm που είναι διατεταγμένες έτσι ώστε η ίνες που μεταφέρουν την ακτινοβολίας διέγερσης να βρίσκονται αντιδιαμετρικά με τις ίνες που μεταφέρουν την ακτινοβολία εκπομπής. Στο ένα άκρο τους οι οπτικές ίνες είναι στερεωμένες σε ειδική μεταλλική διάταξη η οποία στερεώνεται στο εσωτερικό της φασματοφωτομετρικής διάταξης ώστε η ακτινοβολία διέγερσης και εκπομπής όπως μεταφέρεται από τις ίνες να είναι πλήρως ευθυγραμμισμένες με τα αντίστοιχα κάτοπτρα της διάταξης. Στο άλλο άκρο τους οι οπτικές ίνες καταλήγουν σε ένα μεταλλικό δακτύλιο ύψους 2 cm και εσωτερικής διαμέτρου 7 mm και πάχους 1 mm. Το άκρο των ινών είναι τοποθετημένο 5 mm από το άκρο του δακτυλίου. Η εσωτερική επιφάνεια του δακτυλίου είναι μαύρη ώστε να αποφεύγονται οι ανακλάσεις. Ο δακτύλιος τοποθετείται κάθετα πάνω στο δέρμα ή το καρκίνωμα και ασκείται σε αυτόν η ελάχιστη δυνατή πίεση ώστε να μην εισέρχεται σε αυτόν (και κατά συνέπεια μεταφέρεται από τις ίνες εκπομπής) φως από τον περιβάλλοντα χώρο.

Για τη μελέτη των ιδιοτήτων φθορισμού των δύο διαφορετικών ιστολογικών κατηγοριών (μη μελανωματικά καρκινώματα-υγιές δέρμα) πραγματοποιήθηκε συλλογή φασμάτων εκπομπής με μήκη κύματος που κυμαίνονται από 280-460 nm με αύξηση του μήκους κύματος από φάσμα σε φάσμα ανά 10 nm. Το μήκος κύματος εκπομπής ήταν $\lambda_{exc} + 20$ έως 700 nm ή $\lambda_{exc} + 20$ έως $2\lambda_{exc} - 20$ εάν $2\lambda_{exc} < 700$ nm. Για κάθε μήκος κύματος όπου το φάσμα εκπομπής εμφάνιζε κορυφή καταγράφονταν και ένα φάσμα διέγερσης με μήκος κύματος εκπομπής το μήκος κύματος αυτής της κορυφής.

Συνολικά ελήφθησαν φάσματα φθορισμού από 8 μύες. Από κάθε μυ λαμβάνονταν φάσματα από μία υγιή περιοχή και από ένα καρκίνωμα. Οι διάμετρος των περιοχών ήταν > 0.7 cm. Από την κάθε περιοχή κάθε φάσμα λαμβάνονταν 3 φορές ενώ το τελικό φάσμα προέκυπτε από τη μέση τιμή της έντασης σε κάθε μήκος κύματος.

Τα φάσματα αυτά, αποθηκεύτηκαν, και υπέστησαν επεξεργασία, αρχικά μέσω του λογισμικού της φασματοφωτομετρικής διάταξης και στη συνέχεια μέσω στατιστικών μεθόδων προκειμένου να προκύψουν οι πιο ασφαλείς διαγνωστικές παράμετροι, με τις οποίες τα ταυτοποιημένα ιστοπαθολογικά δείγματα θα διακρίνονταν σε δύο ιστολογικές κατηγορίες. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε το ποσοστό ασφάλειας αυτών των διαγνωστικών παραμέτρων.

6.8. Μέθοδος μελέτης φωτολεύκανσης φωτοευαισθητοποιητών

Για να χρησιμοποιηθεί μία φωτοευαίσθητη ουσία στη φωτοδυναμική θεραπεία και διάγνωση πρέπει εκ των προτέρων να είναι γνωστό το αν και κατά πόσο υφίσταται το φαινόμενο της φωτολεύκανσης (photobleaching), μεταβάλλεται δηλαδή η δομή της όταν ακτινοβοληθεί. Τέτοιες μεταβολές συνεπάγονται και μεταβολές στη φωτοδυναμική της δράση. Οι συγκεκριμένες βλάβες συνήθως απεικονίζονται στα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού μιας ένωσης.

Πιο συγκεκριμένα, όταν σε μία φωτοευαίσθητη ουσία προσπίπτει φωτεινή ακτινοβολία, μπορούν να προκληθούν μεταβολές στη δομή της οι οποίες μπορούν να καταταγούν στις δύο παρακάτω κατηγορίες.

- Φωτοτροποποίηση (photomodification): Το μόριο της ουσίας υφίσταται κάποιες αλλαγές χωρίς όμως να χάσει τη βασική του δομή. Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρούνται σημαντικές μειώσεις στην ένταση των κορυφών στα

φάσματα απορρόφησης και φθορισμού χωρίς να δημιουργούνται κάποιες νέες καθαρές κορυφές.

- Φωτολεύκανση (true photobleaching): Σε αυτήν την περίπτωση οι χημικές αλλαγές είναι σημαντικές. Το μόριο της φωτοευαίσθητης ουσίας διασπάται στις δομικές του ομάδες με αποτέλεσμα εκτός από μείωση της έντασης στις κύριες κορυφές του φάσματος να παρατηρούνται και νέες κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν στα νέα μόρια που δημιουργήθηκαν[4].

Για το λόγο αυτό ακτινοβολήθηκαν κάποια αντιπροσωπευτικά διαλύματα των φωτοευαισθητοποιητών με δόσεις που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία και εν συνεχεία ελήφθησαν τα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού τους. Πιο αναλυτικά 5 mL διαλύματος φωτοευαισθητοποιητή τοποθετήθηκαν σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως των 10 mL. Το ποτήρι ζέσεως καλύπτονταν καθόλη τη διάρκεια της ακτινοβόλησης με μία πλαστική μεμβράνη προκειμένου να αποφευχθεί εξάτμιση του διαλύτη ή μόλυνση του διαλύματος από το εργαστηριακό περιβάλλον. Στη μεμβράνη αυτή ανοίχθηκε μία οπή διαμέτρου ίσης με τη διάμετρο του διαχύτη της οπτικής ίνας ώστε μέσω αυτής να περνά η ακτινοβολία του laser στο διάλυμα. Το ποτήρι ζέσεως και η πλαστική μεμβράνη καλύφθηκαν με αδιαφανή μεμβράνη ώστε να μην έρχεται το διάλυμα σε επαφή με το φως του εργαστηριακού περιβάλλοντος. Με αυτό τον τρόπο διασφαλίστηκε ότι η ακτινοβολία που προκάλεσε τη φωτολεύκανση της ουσίας ήταν μόνο η ακτινοβολία που προέρχονταν από το laser. Το διάλυμα αναδευόταν καθόλη τη διάρκεια της ακτινοβόλησης με μαγνητικό αναδευτήρα. Ο διαχύτης της οπτικής ίνας τοποθετούταν σε τέτοια απόσταση από το διάλυμα ώστε η κηλίδα της φωτεινής δέσμης να είχε εμβαδόν ίσο με αυτό της επιφάνειας του διαλύματος.

Μετά την ακτινοβόληση υπολογιζόταν η συνολική ενέργεια της φωτεινής ακτινοβολίας που είχε δεχθεί το δείγμα και λαμβάνονταν φάσματα απορρόφησης και φθορισμού. Ως χρόνοι επελέγησαν χρόνοι αντίστοιχοι με αυτούς που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία, δηλαδή 10 min – 1 h. Τα φάσματα αυτά ελεγχόταν ως προς την έντασή τους στις κύριες κορυφές απορρόφησης και φθορισμού, ως προς το πλάτος των κύριων κορυφών αλλά και την περίπτωση σε αυτά να έχει εμφανιστεί κάποια νέα κορυφή. Από την επεξεργασία αυτών των αποτελεσμάτων εξάγονταν το συμπέρασμα εάν η φωτοευαίσθητη ουσία είχε υποστεί κάποια διαφοροποίηση λόγω της ακτινοβόλησης. Επίσης εάν παρατηρούταν κάποια διαφοροποίηση, καταγράφονταν τα ποσά συνολικής ενέργειας ακτινοβολίας για τα οποία η διαφοροποίηση αυτή γίνονταν μετρήσιμη.

6.9. Φαρμακοκινητικές μελέτες φωτοευαισθητοποιητών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για την επιτυχία τόσο της φωτοδυναμικής θεραπείας όσο και της φωτοδυναμικής διάγνωσης είναι ο βέλτιστος χρόνος στον οποίο πρέπει να λάβει χώρα η ακτινοβόληση των ιστών μετά τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή. Στο χρονικό αυτό διάστημα, η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή στους καρκινικούς ιστούς πρέπει να είναι όσο το δυνατό μεγαλύτερη, ώστε στην περίπτωση της φωτοδυναμικής θεραπείας να επιτευχθεί ο μέγιστος δυνατός ρυθμός νέκρωσης των καρκινικών κυττάρων και κατά συνέπεια του ιστού, ενώ στην περίπτωση της φωτοδυναμικής διάγνωσης να ληφθεί το ισχυρότερο δυνατό σήμα. Επίσης, σε αυτό το χρονικό διάστημα επιθυμητό είναι η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή στους υγιείς ιστούς να είναι όσο το δυνατό μικρότερη ώστε στην περίπτωση της φωτοδυναμικής θεραπείας η βλάβη που θα προκληθεί σε αυτούς να είναι πολύ μικρή και στην περίπτωση της φωτοδυναμικής διάγνωσης να υπάρχει όσο το δυνατό μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ των σημάτων που προέρχονται από υγιείς και καρκινικούς ιστούς ώστε να εξάγεται πιο βέβαιο διαγνωστικό αποτέλεσμα.

6.9.1. Ανάπτυξη μεθόδου ex vivo φαρμακοκινητικής μελέτης φωτοευαισθητοποιητών

Για τις φαρμακοκινητικές μελέτες των φωτοευαισθητοποιητών, 12 άτριχοι μύες τύπου SKH-HR1 και SKH-HR2 που έφεραν μη μελανωματικά δερματικά καρκινώματα χωρίστηκαν τυχαία σε 4 ομάδες. Η $1^{η}$ ομάδα ζώων χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου, δηλαδή στα ζώα της ομάδας δε χορηγήθηκε φωτοευαισθητοποιητής. Στους μύες της $2^{ης}$, $3^{ης}$ και $4^{ης}$ ομάδας χορηγήθηκαν τοπικά (με επάλειψη) 40 μL/cm^2 διαλύματος φωτοευαισθητοποιητή σε μία περιοχή υγιούς δέρματος και καρκινώματος. Η χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη είχε διαλυθεί σε ένα διάλυμα DMSO/Tween 80/H_2O (50/30/80) 17mM, ενώ η 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη βρίσκονταν διαλυμένη σε μία ειδική θερμογέλη κατάλληλη για την τοπική της χορήγηση. Η συγκέντρωση της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης σε αυτή τη θερμογέλη ήταν 0.5 mg/mL γέλης. Η σύνθεση τόσο της γέλης όσο και του διαλύματος ήταν τέτοια ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη δυνατή διείσδυση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή στα καρκινικά κύτταρα.

Οι περιοχές στις οποίες έγινε η επάλειψη καλύφθηκαν με φύλλο αλουμινίου και επιδεσμικό υλικό. Τα ζώα κρατήθηκαν σε σκοτεινό περιβάλλον για χρονικά

διαστήματα από 1-6 h. Μετά τη λήξη αυτών των χρονικών διαστημάτων, θυσιάστηκαν προκειμένου να ληφθούν βιοψίες από τις περιοχές που είχε γίνει επάλειψη αλλά από μία περιοχή υγιούς δέρματος μακριά από τις περιοχές αυτές. Πριν τη λήψη βιοψιών οι προαναφερθείσες περιοχές είχαν σχολαστικά καθαριστεί με αιθανόλη και νερό προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα διαλύματος φωτοευαισθητοποιητή τα οποία δεν είχαν απορροφηθεί. Οι βιοψίες διατηρήθηκαν στους – 70 °C από τη συλλογή έως την επεξεργασία τους.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή στους ιστούς έγινε μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού εκχυλισμάτων των ιστών. Πιο συγκεκριμένα, 100 mg ιστού ομογενοποιήθηκαν με 5 mL DMSO σε αυτόματο ομογενοποιητή ιστών στις 24 000 rpm. Στη συνέχεια, το διάλυμα αυτό φυγοκεντρήθηκε στις 3000 rpm (800 g) για 20 min. Μετά τη λήξη της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο διάλυμα απομονώθηκε προκειμένου να γίνουν σε αυτό οι μετρήσεις φθορισμού.

Οι μετρήσεις φθορισμού έγιναν στη φασματοσκοπική διάταξη φθορισμού. Φάσματα εκπομπής καταγράφηκαν για μήκη κύματος από 630-750 nm και διέγερση στα 610 nm για τις φαρμακοκινητικές μελέτες της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης και για μήκη κύματος 450-750 nm και διέγερση στα 420 nm για τις φαρμακοκινητικές μελέτες της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδρο-πορφυρίνης. Για κάθε εκχύλισμα ιστών καταγράφηκαν τρία φάσματα. Η μέση τιμή αυτών χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή στους ιστούς. Η καμπύλη αναφοράς της έντασης φθορισμού κατασκευάστηκε από μέτρηση διαφόρων γνωστών συγκεντρώσεων χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης ή 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδρο-πορφυρίνης σε εκχύλισμα υγιούς δέρματος. Έπειτα, η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή στα εκχυλίσματα των ιστών υπολογίστηκε μέσω παρεμβολής των εντάσεων φθορισμού σε αυτήν την καμπύλη. Κάτω από αυτές τις πειραματικές συνθήκες η ελάχιστη συγκέντρωση η οποία μπορεί να υπολογιστεί (μετά από αυτή η αναλογία σήματος/θόρυβο είναι πολύ υψηλή) είναι 0.14 ng/mg ιστού.

6.9.2. Ανάπτυξη μεθόδου μελέτης βάθους διείσδυσης φωτοευαισθητοποιητή σε ιστούς

Ένας σημαντικός παράγοντας για την τοπική φωτοδυναμική θεραπεία εκτός από τη συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή στους ιστούς είναι το βάθος διείσδυσης σε αυτούς. Για τη μελέτη του βάθους διείσδυσης της φθαλοκυανίνης σε υγιές δέρμα

και καρκινώματα ελήφθησαν βιοψίες μία ώρα μετά την επάλειψη του μυ με διάλυμα χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης. Οι βιοψίες διατηρήθηκαν στους -70 °C μέχρι την εξέταση τους.

Από τις βιοψίες ελήφθησαν τομές με τη χρήση κρυομικροτόμου με θερμοκρασία θαλάμου -20 °C. Οι βιοψίες πριν τον τεμαχισμό τους εμβαπτίστηκαν σε ειδική γέλη κατάλληλη για τη σταθεροποίηση τομών, οι οποίες πρόκειται να εξεταστούν με μικροσκοπία φθορισμού. Επειδή στο υγιές δέρμα το βάθος διείσδυσης του φωτοευαισθητοποιητή αναμένονταν μικρό και για να επιτευχθεί μεγαλύτερη ακρίβεια στον υπολογισμό του βάθους διείσδυσης, ελήφθησαν οριζόντιες τομές ανά 20 μm. Αντιθέτως, επειδή το βάθος διείσδυσης στα καρκινώματα αναμένονταν πολύ μεγαλύτερο, λόγω έλλειψης του φραγμού της κεράτινης στοιβάδας, οι τομές των καρκινωμάτων ελήφθησαν κάθετα.

Για την απεικόνιση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser το οποίο συνδέονταν με ορθό μικροσκόπιο. Όλες οι εικόνες ελήφθησαν με φακό 10X, 0.30 NA. Με το μικροσκόπιο συνδεόταν ένα ψυχόμενο με αέρα laser ιόντων αργού-κρυπτού ισχύος (15 mW) το οποίο διέθετε γραμμές στα 488, 568 και 647 nm. Ο φθορισμός της φθαλοκυανίνης καταγράφηκε μετά από διέγερση στα 647 nm. Το σήμα φθορισμού ενισχύθηκε από τον φωτοπολλαπλασιαστή του συστήματος αφού πρώτα πέρασε μέσα από φίλτρο προκειμένου να αποκοπούν τα μικρότερα μήκη κύματος.

Η ισχύς του laser στη γραμμή των 647 nm ήταν 5 mW. Για να μην φωτοκαταστραφεί όμως το δείγμα και για να μην υπάρξει κορεσμός, χρησιμοποιήθηκε μόνο το 3% αυτής της ισχύος. Για τη λήψη των εικόνων χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος Kalman μέσω του οποίου η ένταση του φθορισμού σε κάθε σημείο της εικόνας προέκυπτε από τον υπολογισμό της μέσης τιμής της έντασης σε κάθε σημείο μετά από 5 διαδοχικές λήψεις. Συνολικά η λήψη κάθε εικόνας διαρκούσε λιγότερο από 1 s. Το μέγεθος των εικόνων είναι 512 × 512 pixels. Τόσο οι εικόνες από το υγιές δέρμα όσο και οι εικόνες από τους καρκινικούς ιστούς ελήφθησαν με τις ίδιες ρυθμίσεις ίριδας και φωτοπολλαπλασιαστή προκειμένου να μπορούν να συγκριθούν ως προς την ένταση.

6.10. Ανάπτυξη πρωτοκόλλου φωτοδυναμικής θεραπείας μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος

Το πρωτόκολλο φωτοδυναμικής θεραπείας που αναπτύχθηκε επιδιώχθηκε να είναι σε συμφωνία με τα πρωτόκολλα που εφαρμόζονται σήμερα στην κλινική

πρακτική ώστε να είναι εύκολα μεταβιβάσιμο σε αυτή. Το μόνο σημείο στο οποίο διαφέρει σε σχέση με τα πρωτόκολλα που εφαρμόζονται στην κλινική πρακτική είναι η ολική αντί για τοπική νάρκωση[5,6]. Η ολική νάρκωση όμως ήταν απαραίτητη προκειμένου να παραμείνει ακίνητο το ζώο κατά τη λήψη εικόνων και την ακτινοβόληση του καρκινώματος. Ιδιαίτερη μέριμνα ελήφθη ακόμη ώστε να χρησιμοποιηθεί και σε αυτή όπως και στις υπόλοιπες μελέτες ο ελάχιστος αριθμός πειραματοζώων.

Όλες οι μελέτες φωτοδυναμικής θεραπείας έγιναν σε ομάδες των 5 μυών (ο ελάχιστος δυνατός αριθμός πειραματοζώων). Πριν τη θεραπεία οι μύες ναρκώνονταν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση γ-υδροξυβουτυρολαγκτόνης (25-75) σε φυσιολογικό ορό (40 μL, 1.5 μL/g βάρους ζώου). Εν συνεχεία καθαριζόταν η περιοχή του όγκου από στοιβάδες νεκρών κυττάρων, αίμα, ή κρούστες που πιθανώς υπήρχαν με τη βοήθεια νερού, αποστειρωμένης γάζας και εάν θεωρούνταν απαραίτητο και με τη βοήθεια χειρουργικών εργαλείων. Αφού λαμβάνονταν οι απαραίτητες εικόνες από τον όγκο με το σύστημα ψηφιακής απεικόνισης ιστών για την ποσοτικοποίησή του γινόταν επάλειψη του όγκου με διάλυμα ή γέλη φωτοευαισθητοποιητή 40 μL/cm^2 και κάλυψη της περιοχής αυτής με αποστειρωμένη γάζα και επίδεσμο. Με αυτόν τον τρόπο, ο φωτοευαισθητοποιητής δεν έρχονταν σε επαφή με το διάχυτο φως του χώρου. Μετά από την πάροδο του κατάλληλου χρονικού διαστήματος, όπως αυτό προέκυψε από τις φαρμακοκινητικές μελέτες κάθε φωτοευασισθητοποιητή, απομακρυνόταν η γάζα και ακολουθούσε ακτινοβόληση του όγκου αφού πρώτα ρυθμίζονταν κατάλληλα η έξοδος της ίνας και η απόσταση του διαχύτη από το δέρμα ανάλογα με το εμβαδόν του όγκου. Η ισχύς του laser ελέγχονταν πριν και μετά την ακτινοβόληση μέσω ενεργόμετρου.

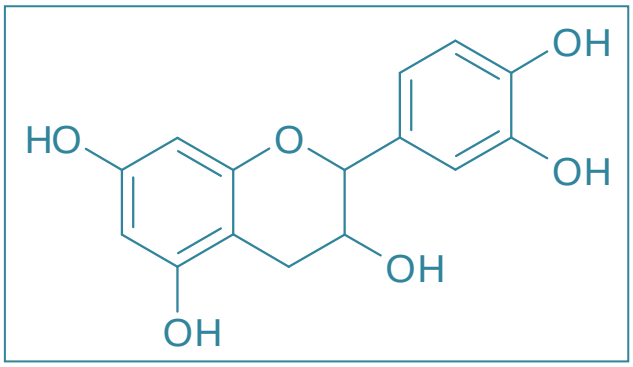
Μετά τη θεραπεία το ζώο επανερχόταν στο χώρο της αποικίας όπου και παρακολουθούνταν καθημερινά. Οι όγκοι των μυών δε δέχονταν καμία επιπλέον φροντίδα κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος. Στην περίπτωση που δεν υπήρχε σημαντική μείωση των γεωμετρικών χαρακτηριστικών του όγκου, το παραπάνω πρωτόκολλο επαναλαμβάνονταν άλλες δύο φορές, μία κάθε 7 ημέρες.

Εικόνες από την περιοχή του όγκου λαμβάνονταν 7 ημέρες μετά από κάθε εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας ή και πιο συχνά εάν η εξέλιξη του φαινόμενου καθιστούσε κάτι τέτοιο απαραίτητο. Οι τελευταίες εικόνες από την περιοχή του όγκου λαμβάνονταν 14 ημέρες μετά την τελευταία συνεδρία. Η κλινική εικόνα του ζώου εξακολουθούσε να καταγράφεται έως το φυσικό θάνατο του ζώου ή την ευθανασία του εάν κάτι τέτοιο επιβάλλονταν για ηθικούς λόγους.

6.11. *In vivo μελέτη προστατευτικής δράσης εκχυλίσματος φλοιού του πεύκου* Maritima *από καρκινογόνους παράγοντες*

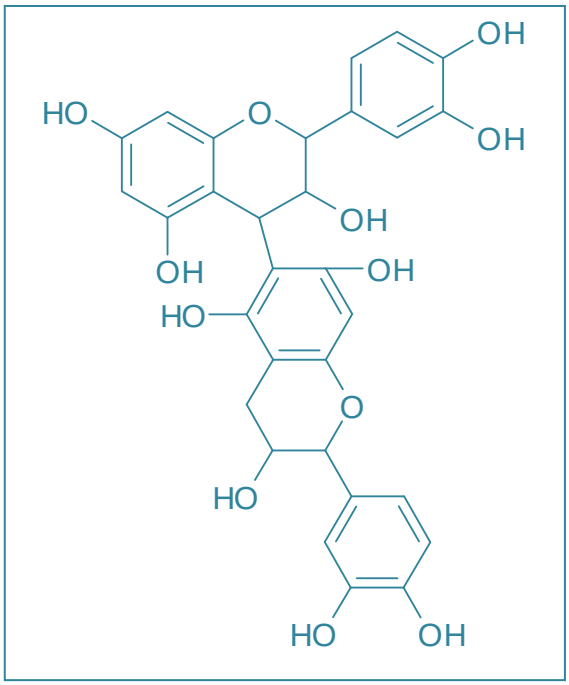
6.11.1. *Αντιοξειδωτική δράση εκχυλίσματος φλοιού του πεύκου* Maritima

Ένα πολυφαινολικό μίγμα γνωστό για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες είναι το εκχύλισμα από το φλοιό του πεύκου *Maritima*. Το εκχύλισμα αυτό σήμερα χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής αλλά και ως φυτικό φάρμακο για αρκετές ασθένειες όπως ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες όπως η αθηροσκλήρωση, ο διαβήτης και η ισχαιμία ασθένειες που οφείλονται σε χρόνια φλεγμονή και ασθένειες που σχετίζονται με τη διαδικασία της γήρανσης[7]. Επίσης το εκχύλισμα δεν εμφανίζει τερατογενή ή μεταλλαξιόγονο δράση και γενικά θεωρείται μη τοξικό[8]. Παρεμφερή εκχυλίσματα αυτού χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα ακόμη στη θεραπεία φλεγμονωδών ασθενειών, στη θεραπεία των συμπτωμάτων σκορβούτου και στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών του δέρματος.

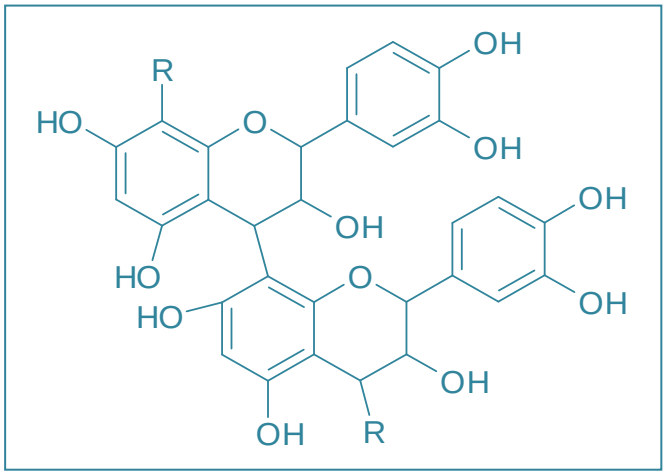


Σχήμα 6.6: *Δομή μονομερούς*

Παρόλο που η ακριβής σύσταση του μίγματος αυτού δεν έχει ακόμη πλήρως αποσαφηνιστεί, τα κύρια συστατικά του είναι φαινολικά συστατικά τα οποία μπορούν να διακριθούν σε μονομερή (Σχήμα 6.6) (κατεχίνη, επικατεχίνη και ταξιφολίνη) και συμπυκνωμένα φλαβονοειδή (Σχήματα 6.7, 6.8) τα οποία διακρίνονται σε δύο κατηγορίες προκυανιδίνες, προκανθοκυανιδίνες (γιατί όταν βρεθούν σε υψηλή θερμοκρασία και όξινο περιβάλλον αποδεσμεύουν ανθοκυανίνες). Αυτά τα συμπυκνωμένα φλαβονοειδή αποτελούνται από μονάδες από μία έως επτά ομάδες κατεχίνης και επικατεχίνης. Το εκχύλισμα αυτό περιέχει επίσης και κάποια φαινολικά οξέα όπως το καφεϊκό, το φερουλικό και το γ-υδροξυβενζοϊκό) ως συστατικά γλυκοζυλίωσης.



Σχήμα 6.7: *Δομή διμερούς*



Σχήμα 6.8: *Δομή ολιγομερούς*

Πίνακας 6.8: *Περιεκτικότητα μετάλλων στην Πυκνογενόλη*

Μέταλλο	μg/g (επί ξηρής βάσης)
Ca	900
K	500
Fe	65
Mn	4
Zn	4
Cu	<3
Se	<2

Στο εκχύλισμα αυτό εμφανίζονται επίσης και κάποια μέταλλα μετάπτωσης (Fe, Cu, Zn) σε συγκεντρώσεις της τάξεως των μg/g ενώ σχετικά υψηλή (σε σχέση με άλλα εκχυλίσματα φυτών γνωστά για την αντιοξειδωτική τους δράση) είναι και η συγκέντρωση ασβεστίου[9,10] (Πίνακας 6.8).

6.11.2. Μεθοδολογία μελέτης

Η αντιοξειδωτική-αντικαρκινική δράση του εκχυλίσματος φλοιού του πεύκου *Maritima* μελετήθηκε σε μύες στους οποίους τα καρκινώματα είχαν επαχθεί με δύο τρόπους, με υπεριώδη ακτινοβολία και συνδυασμό υπεριώδους ακτινοβολίας και διμεθυλ-βενζανθρακενίου. Για να μελετηθεί η προληπτική-αντικαρκινική δράση του αντιοξειδωτικού έναντι κάθε πρωτοκόλλου καρκινογένεσης, κάθε πρωτόκολλο καρκινογένεσης εφαρμόστηκε σε 40 μύες τύπου SKH-HR1 και SKH-HR2. Οι μύες αυτοί χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Κάθε ομάδα αποτελούνταν από 20 μύες, 5 αρσενικούς SKH-HR1, 5 θηλυκούς SKH-HR1, 5 αρσενικούς SKH-HR2 και 5 θηλυκούς SKH-HR2.

Στην πρώτη ομάδα τα ζώα κατανάλωναν αντί για νερό 10 mL διαλύματος αντιοξειδωτικού ημερησίως, συγκέντρωσης 0.02 % (0.2 g/mL). Η χορήγηση του αντιοξειδωτικού σε αυτή την ομάδα ξεκίνησε δύο εβδομάδες πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου επαγωγής καρκίνου και συνεχίστηκε μέχρι το θάνατο των ζώων. Στα ζώα της δεύτερης ομάδας εφαρμόστηκε το ίδιο πρωτόκολλο με τη διαφορά ότι τα ζώα αυτά κατανάλωναν την ίδια ποσότητα νερού βρύσης αντί για διάλυμα αντιοξειδωτικού. Οι ομάδες των ζώων περιγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 6.9. Διαλύματα φλοιού πεύκου παρασκευάζονταν δύο φορές την εβδομάδα προκειμένου το διάλυμα που κατανάλωναν τα ζώα να είναι φρέσκο και να διατηρεί τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες.

Οι μύες παρακολουθούνταν εβδομαδιαίως και καταγράφονταν η εμφάνιση θηλωμάτων, βασικοκυτταρικών και ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων ή οποιασδήποτε άλλης βλάβης εμφανίζονταν στο δέρμα τους. Εβδομαδιαία ήταν επίσης και η καταγραφή του βάρους των ζώων. Η παρακολούθηση της διαμέτρου των όγκων ή θηλωμάτων γίνονταν κάθε 15 ημέρες και μέσω του συστήματος οπτικής απεικόνισης το οποίο έχει περιγραφεί. Ένας μικρός επίσης αριθμός ζώων θυσιάστηκε προκειμένου αντιπροσωπευτικά δείγματα όγκων και θηλωμάτων να εξεταστούν από ιστοπαθολόγο. Η αποτελεσματικότητα του αντιοξειδωτικού αξιολογήθηκε με σύγκριση των δερματικών βλαβών που παρουσίασαν οι δύο ομάδες ζώων.

Πίνακας 6.9: *Ομάδες ζώων in vivo μελέτη προστατευτικής δράσης εκχυλίσματος φλοιού πεύκου από καρκινογόνους παράγοντες*

Α/Α	Τύπος ζώων	Φύλο	Καρκινογενείς Παράγοντες	Θεραπεία με εκχύλισμα αντιοξειδωτικού
1	SKH-HR1	♂	DMBA-UV	Όχι
2	SKH-HR1	♀	DMBA-UV	Όχι
3	SKH-HR1	♀	DMBA-UV	Ναι
4	SKH-HR1	♂	DMBA-UV	Ναι
5	SKH-HR2	♂	DMBA-UV	Όχι
6	SKH-HR2	♀	DMBA-UV	Όχι
7	SKH-HR2	♀	DMBA-UV	Ναι
8	SKH-HR2	♂	DMBA-UV	Ναι
9	SKH-HR1	♂	UV	Όχι
10	SKH-HR1	♀	UV	Όχι
11	SKH-HR1	♀	UV	Ναι
12	SKH-HR1	♂	UV	Ναι
13	SKH-HR2	♂	UV	Όχι
14	SKH-HR2	♀	UV	Όχι
15	SKH-HR2	♀	UV	Ναι
16	SKH-HR2	♂	UV	Ναι

6.12. Βιβλιογραφία

1. H. Soehnge, A. Ouhtit, and H. Ananthaswamy, “Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation”, Frontiers in Bioscience 2, 1997.
2. H. Maibach, N. Lowe, “Models in dermatology”, vol 2, Karger, Basel, 1985.
3. C. Baudouin, M. Charveron, R. Tarroux and Y. Gall, “Environmental pollutants and skin cancer”, Cell Biol Toxicol, 18 (2002) 341-348.
4. R. Bonnett and G. Martinez, “Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy”, Tetrahedron, 57, 9513-9547, 2001.
5. S. Ibbotson, H. Moselley, L. Brancaleon, M. Padgett, M. O’Dwyer, J. Woods, A. Lesar, C. Goodman, J. Ferguson, “Photodynamic therapy in dermatology: Dundee clinical and research experience”, Photodiagn Photodyn Ther, 1, 211-223, 2004.

6. S. Ibboston, “How we treat a superficial basal cell carcinoma with topical photodynamic therapy in Dundee”, Photodiagn Photodyn Ther, 3, 128-131, 2006

7. S. Sharma, N. Khan, S. Sultana, “Effect of Onosma echioides on DMBA/croton oil mediated carcinogenic response, hyperproliferation and oxidative damage in murine skin”, Life Sci, 75, 2391-2410, 2004.

8. H. T. Huynh, R. W. Teel, “Selective induction of apoptosis in human mammary cancer cells (MCF-7) by Pycnogenol”, Anticancer Res, 20, 2417-2420, 2000.

9. L. Packer, G. Rimbach, F. Virgili, “Antioxidant activity and biological properties of procyanidin-rich extract from pine (Pinus Maritima) bark, Pycnogenol”, Free Radic Biol Med, 27, 704-24, 1999.

10. F. Virgili, H. Kobuchi, L. Packer, “Procyanidines Extracted from Pinus Maritima: Scavengers of Free Radical Species and Modulators of Nitrogen Monoxide Metabolism in Activated Murine RAW 264.7 macrophages”, Free Radic Biol Med, 24, 1120-1129, 1998.

Κεφάλαιο 7

Αποτελέσματα και Συμπεράσματα

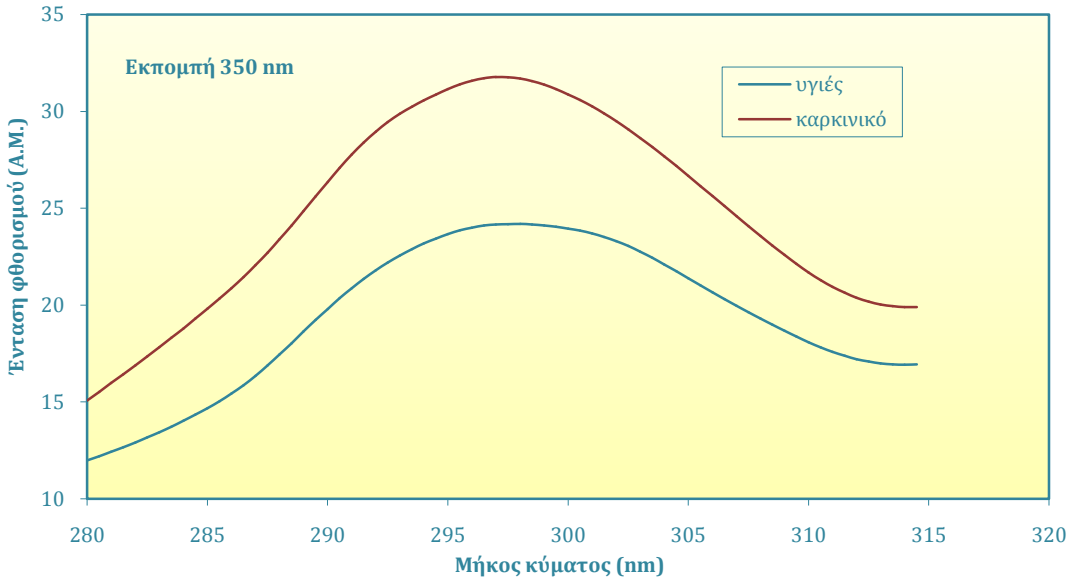
7.1. Αποτελέσματα διαγνωστικής μεθόδου αυτοφθορισμού μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων

7.1.1. Φάσματα διέγερσης και εκπομπής υγιούς δέρματος και μη μελανωματικών καρκινωμάτων

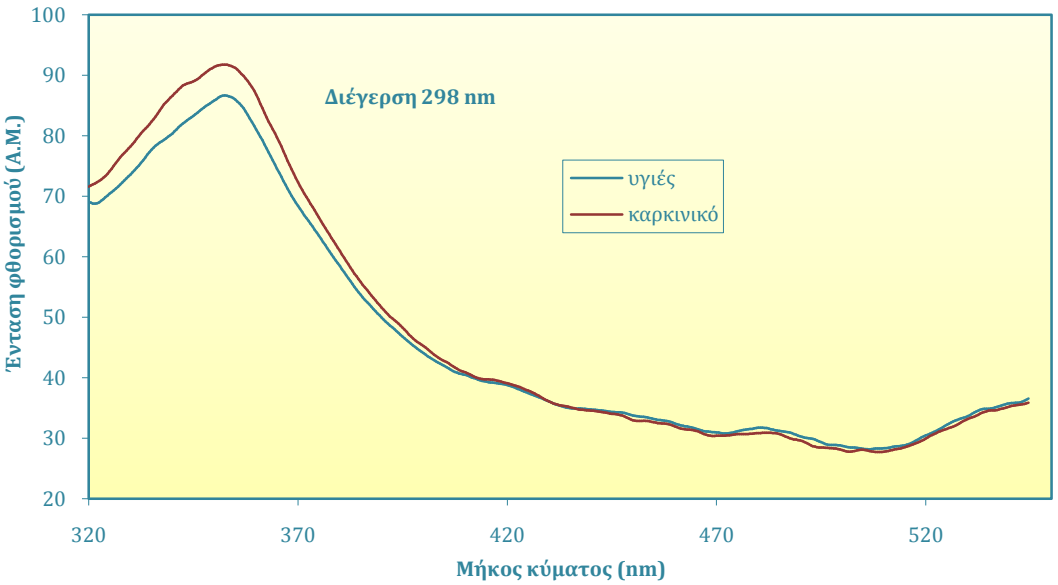
Από τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής τα οποία καταγράφηκαν παρουσιάζονται τα πλέον ενδιαφέροντα για την εξαγωγή διαγνωστικών παραμέτρων τα οποία εμφανίζουν σημαντικές διαφορές ως προς την ένταση και το μήκος κύματος των κορυφών τους όταν προέρχονται από διαφορετικές ιστολογικές κατηγορίες. Εν συνεχεία επιδιώχθηκε να αποδοθούν οι διαφορές αυτές στις βιοχημικές αλλαγές που επέρχονται κατά τις διεργασίες καρκινογένεσης.

Τα φάσματα εκπομπής που συλλέχθηκαν με διέγερση στα 290 και 300 nm παρουσίασαν μία κορυφή στα 350 nm. Για να βρεθεί το ακριβές μήκος κύματος διέγερσης το οποίο προκαλεί τη μέγιστη ένταση εκπομπής στα 350 nm συλλέχθηκαν φάσματα διέγερσης με λ_{exc} 280 - 315 nm και λ_{em} 350 nm. Από την επεξεργασία των φασμάτων διέγερσης προέκυψε ότι μέγιστη ένταση εκπομπής στα 350 nm παρατηρείται όταν το μήκος κύματος διέγερσης είναι 298 nm (Σχήμα 7.1). Τα φάσματα εκπομπής με λ_{exc} 298 nm και λ_{em} 320 - 540 nm φαίνονται στο Σχήμα 7.2. Αυτές οι κορυφές παρουσιάζονται σε όλα τα δείγματα είτε αυτά ανήκουν στην κατηγορία των υγιών είτε αυτά ανήκουν στην κατηγορία των καρκινικών. Βάσει των βιβλιογραφικών δεδομένων για το φθορισμό των συστατικών του δέρματος

(Πίνακας 2.1) το σήμα αυτό αποδίδεται σε ένα από τα αρωματικά αμινοξέα του δέρματος, την τρυπτοφάνη.



Σχήμα 7.1: *Φάσμα διέγερσης υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος με λ_{em} 350 nm*

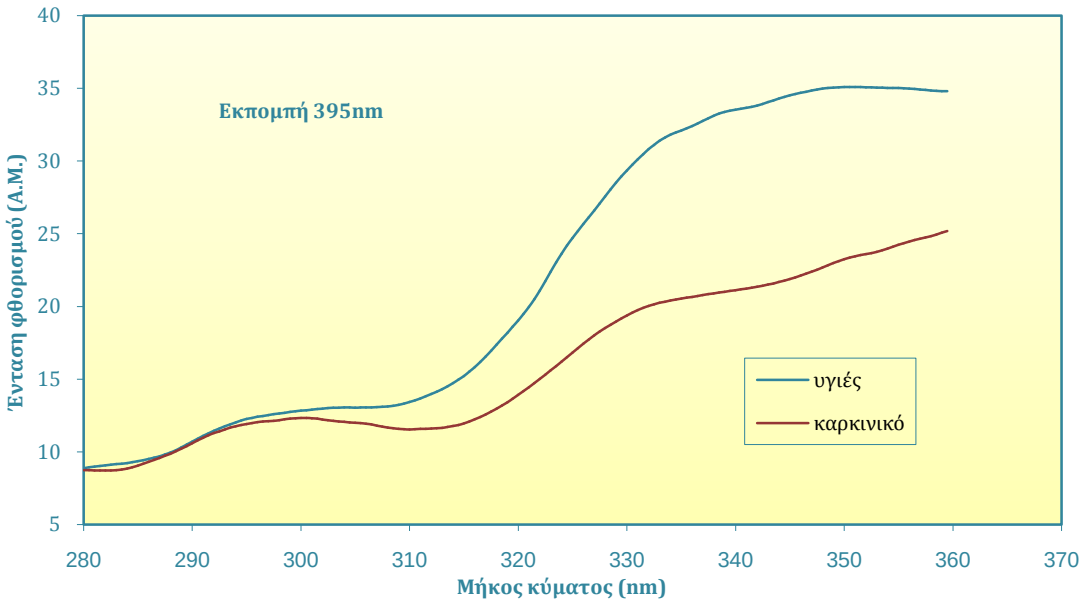


Σχήμα 7.2: *Φάσματα εκπομπής υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος με λ_{exc} 298 nm*

Σε όλα τα δείγματα, η ένταση φθορισμού των καρκινωμάτων είναι πιο ισχυρή από την ένταση φθορισμού των αντίστοιχων υγιών δειγμάτων. Υπολογίζοντας το λόγο

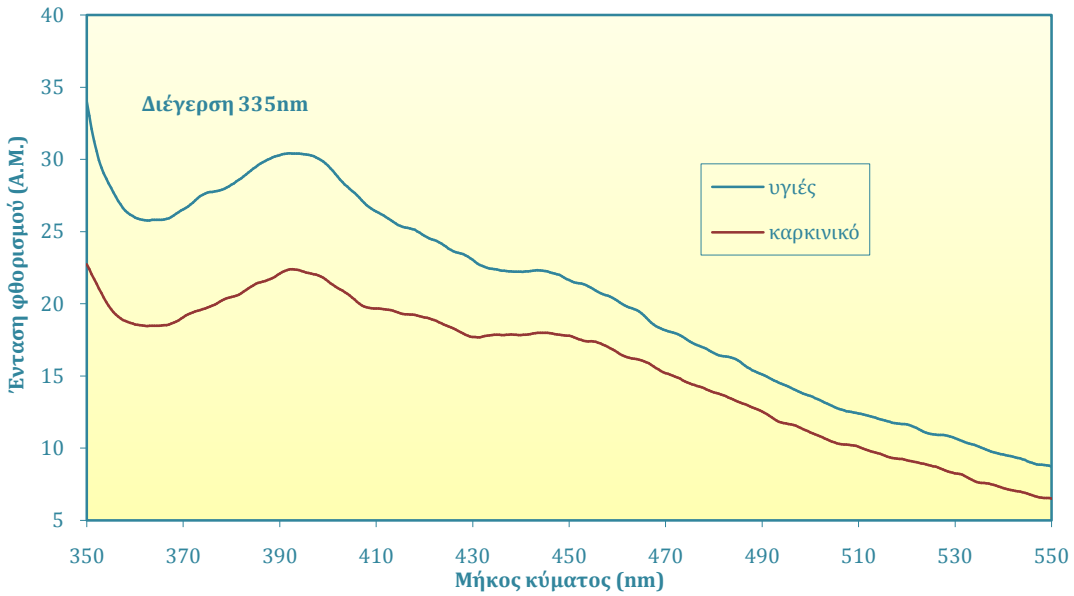
$\frac{I_{καρκινικό}-I_{υγιές}}{I_{καρκινικό}} \times 100\ \%$ από τα φάσματα εκπομπής για κάθε ζεύγος υγιούς-καρκινικού δείγματος προκύπτει ότι ο φθορισμός των καρκινικών δειγμάτων για διέγερση στο συγκεκριμένο μήκος κύματος είναι μεγαλύτερος κατά 13.79 ± 7.62 % (Μ.Τ. ± Τ.Α.). Η αύξηση αυτή αποδίδεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του συγκεκριμένου αμινοξέος στα καρκινικά δείγματα λόγω του μεγαλύτερου ρυθμού πολλαπλασιασμού που παρουσιάζουν τα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα υγιή.

Τα φάσματα εκπομπής που συλλέχθηκαν με λ_{exc} 330 nm παρουσίασαν μία κορυφή στα 395 nm. Για να βρεθεί το ακριβές μήκος κύματος διέγερσης το οποίο προκαλεί τη μέγιστη ένταση εκπομπής στα 395 nm συλλέχθηκαν φάσματα διέγερσης από τα 280 έως τα 360 nm με μήκος κύματος εκπομπής 395 nm. Από την επεξεργασία των φασμάτων διέγερσης προέκυψε ότι η μέγιστη ένταση εκπομπής στα 395 nm παρατηρείται όταν το μήκος κύματος διέγερσης είναι 335 nm (Σχήμα 7.3). Τα φάσματα εκπομπής με λ_{exc} = 335 nm και λ_{em} = 350 - 550 nm φαίνονται στο Σχήμα 7.4. Αυτές οι κορυφές παρουσιάζονται σε όλα τα δείγματα, είτε αυτά ανήκουν στην κατηγορία των υγιών είτε αυτά ανήκουν στην κατηγορία των καρκινικών. Βάσει των βιβλιογραφικών δεδομένων για το φθορισμό των συστατικών του δέρματος (Πίνακας 2.1), το σήμα αυτό μπορεί να αποδοθεί στους σταυροδεσμούς του κολλαγόνου που διασπώνται από το ένζυμο πεψίνη.



Σχήμα 7.3: *Φάσμα διέγερσης υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος με λ_{em} 395 nm*

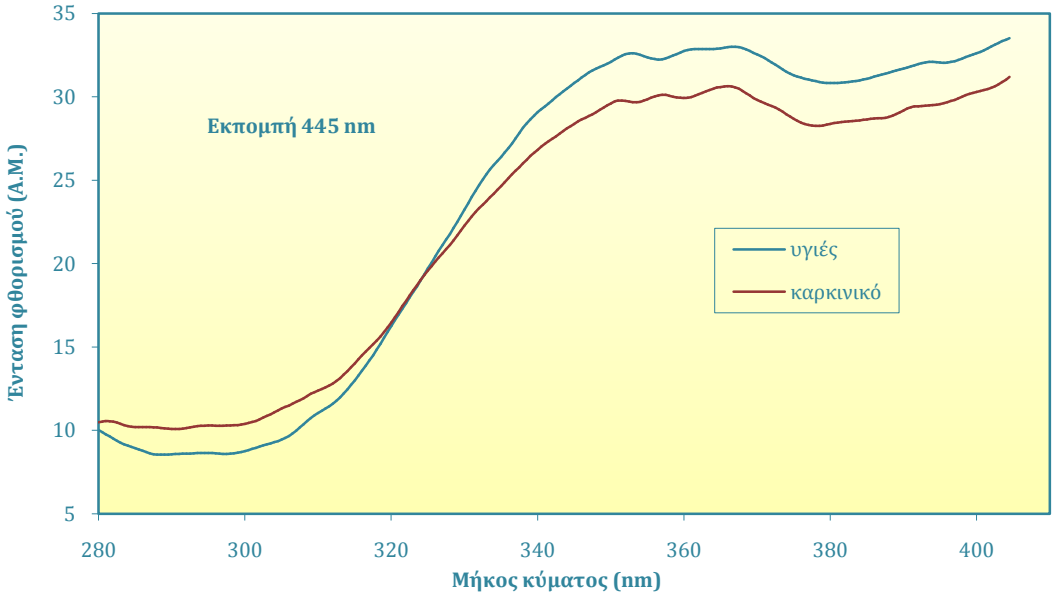
Σε όλα τα δείγματα η ένταση φθορισμού των υγιών δειγμάτων είναι πιο ισχυρή από την ένταση φθορισμού των αντίστοιχων καρκινικών δειγμάτων. Υπολογίζοντας το λόγο $\frac{I_{υγιές}-I_{καρκινικό}}{I_{υγιές}} \times 100\%$ από τα φάσματα εκπομπής για κάθε ζεύγος υγιούς-καρκινικού δείγματος προκύπτει ότι ο φθορισμός των υγιών δειγμάτων για διέγερση στο συγκεκριμένο μήκος κύματος είναι μεγαλύτερος κατά 22.82 ± 10.93 % (Μ.Τ. ± Τ.Α.). Η αύξηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι οι συνδετικοί ιστοί είναι πολύ πιο καλά δομημένοι στους υγιείς σε σχέση με τους καρκινικούς ιστούς και λόγω του ρυθμού σχηματισμού τους αλλά και λόγω των μεταλλοπρωτεϊνασών που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα στο περιβάλλον τους και οι οποίες αποδομούν αυτούς τους δεσμούς.



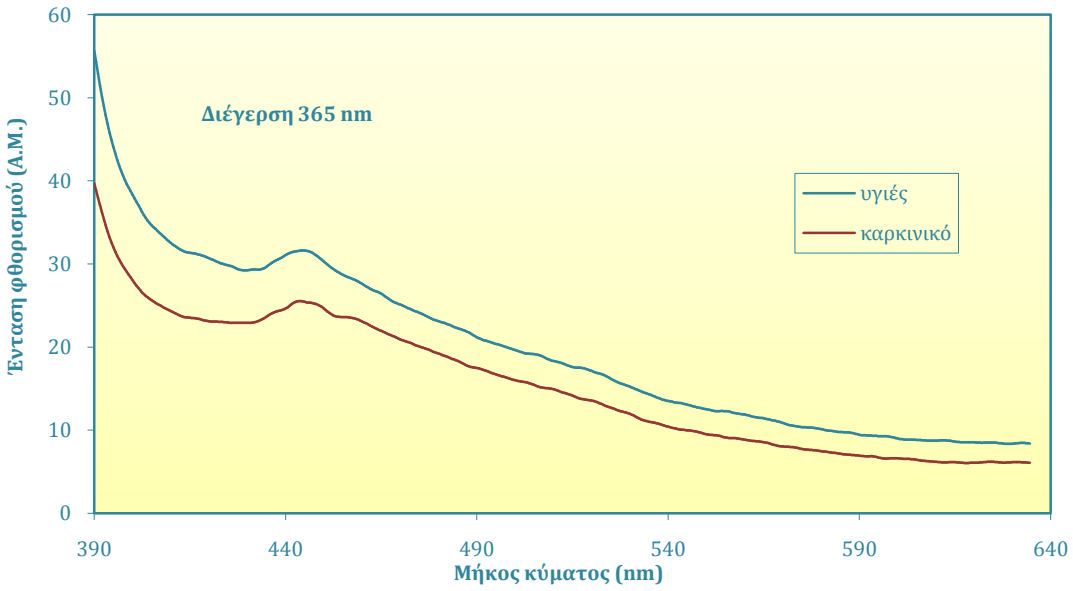
Σχήμα 7.4: *Φάσμα εκπομπής υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος με λ_{exc} 335 nm*

Τα φάσματα εκπομπής που συλλέχθηκαν με διέγερση στα 370 nm παρουσίασαν μία κορυφή στα 445 nm. Για να βρεθεί το ακριβές μήκος κύματος διέγερσης το οποίο προκαλεί τη μέγιστη ένταση εκπομπής στα 445 nm συλλέχθηκαν φάσματα διέγερσης με λ_{em} 445 nm και λ_{exc} 280 - 400 nm. Από την επεξεργασία των φασμάτων διέγερσης προέκυψε ότι μέγιστη ένταση εκπομπής στα 445 nm παρατηρείται όταν το μήκος κύματος διέγερσης είναι 365 nm (Σχήμα 7.5). Τα φάσματα εκπομπής με λ_{exc} 445 nm και λ_{em} 390 - 640 nm φαίνονται στο Σχήμα 7.6. Αυτές οι κορυφές παρουσιάζονται σε όλα τα δείγματα είτε αυτά ανήκουν στην κατηγορία των υγιών είτε αυτά ανήκουν στην κατηγορία των καρκινικών. Βάσει των βιβλιογραφικών δεδομένων για το φθορισμό των συστατικών του δέρματος (Πίνακας 2.1) το σήμα

αυτό μπορεί να αποδοθεί στους σταυροδεσμούς του κολλαγόνου που διασπώνται από το ένζυμο κολλαγενάση.



Σχήμα 7.5: *Φάσματα διέγερσης υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος με λ_{em} 445 nm*

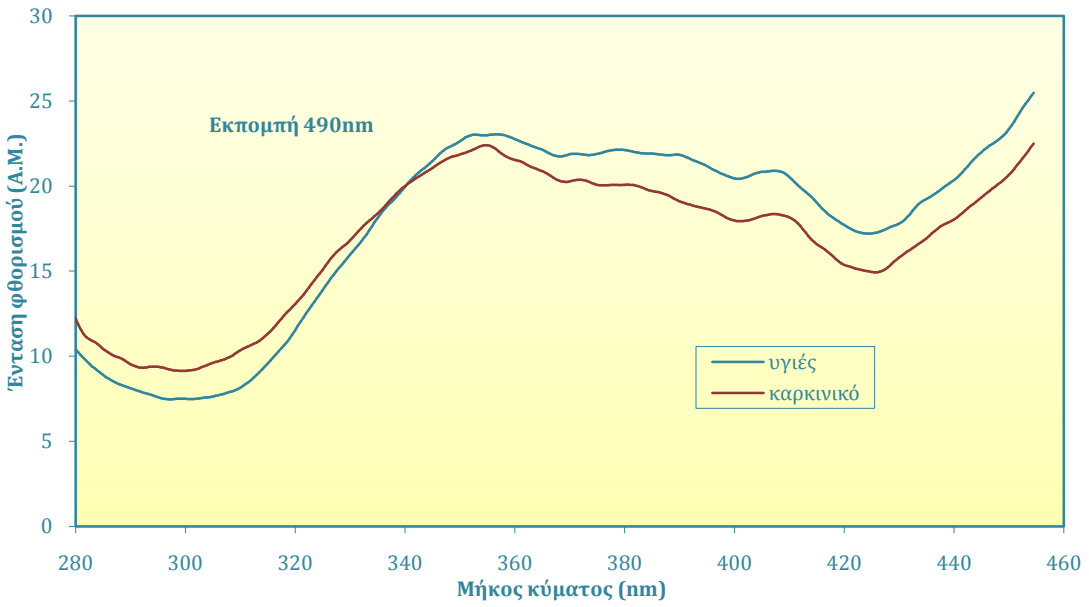


Σχήμα 7.6: *Φάσματα εκπομπής υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος με λ_{exc} 365 nm*

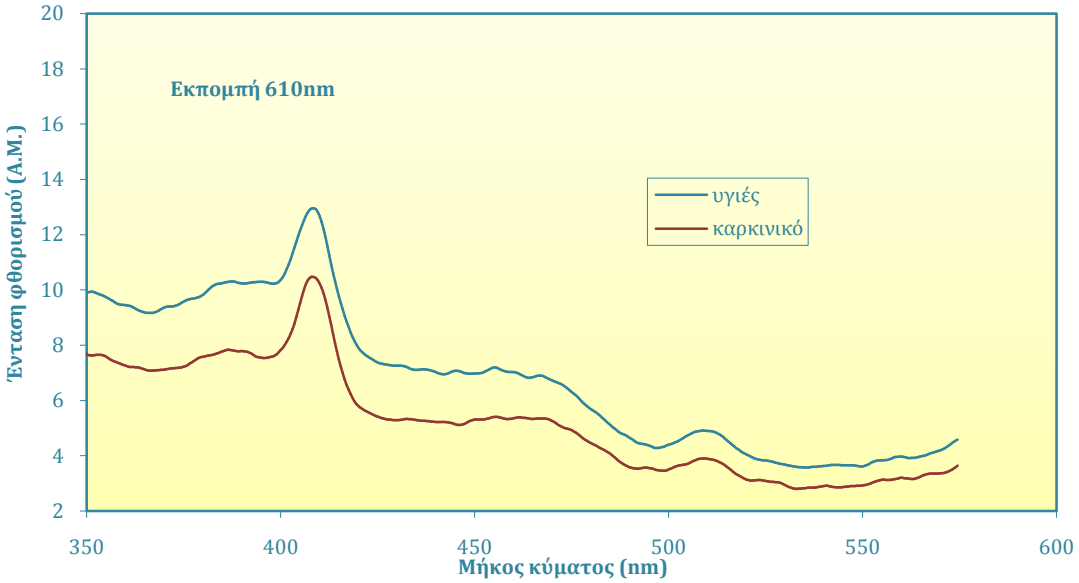
Σε όλα τα δείγματα η ένταση φθορισμού των υγιών δειγμάτων είναι πιο ισχυρή από την ένταση φθορισμού των αντίστοιχων καρκινικών δειγμάτων. Υπολογίζοντας

το λόγο $\frac{I_{υγιές} - I_{καρκινικό}}{I_{υγιές}} \times 100\%$ από τα φάσματα εκπομπής για κάθε ζεύγος υγιούς-καρκινικού δείγματος προκύπτει ότι ο φθορισμός των υγιών δειγμάτων για διέγερση στο συγκεκριμένο μήκος κύματος είναι μεγαλύτερος κατά 24.21 ± 11.64% (Μ.Τ. ± Τ.Α.). Η αύξηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στους ίδιους λόγους στους οποίους αποδόθηκε και η αυξημένη στους υγιείς σε σχέση με τους καρκινικούς ιστούς ένταση φθορισμού σταυροδεσμών κολλαγόνου που διασπώνται από το ένζυμο πεψίνη.

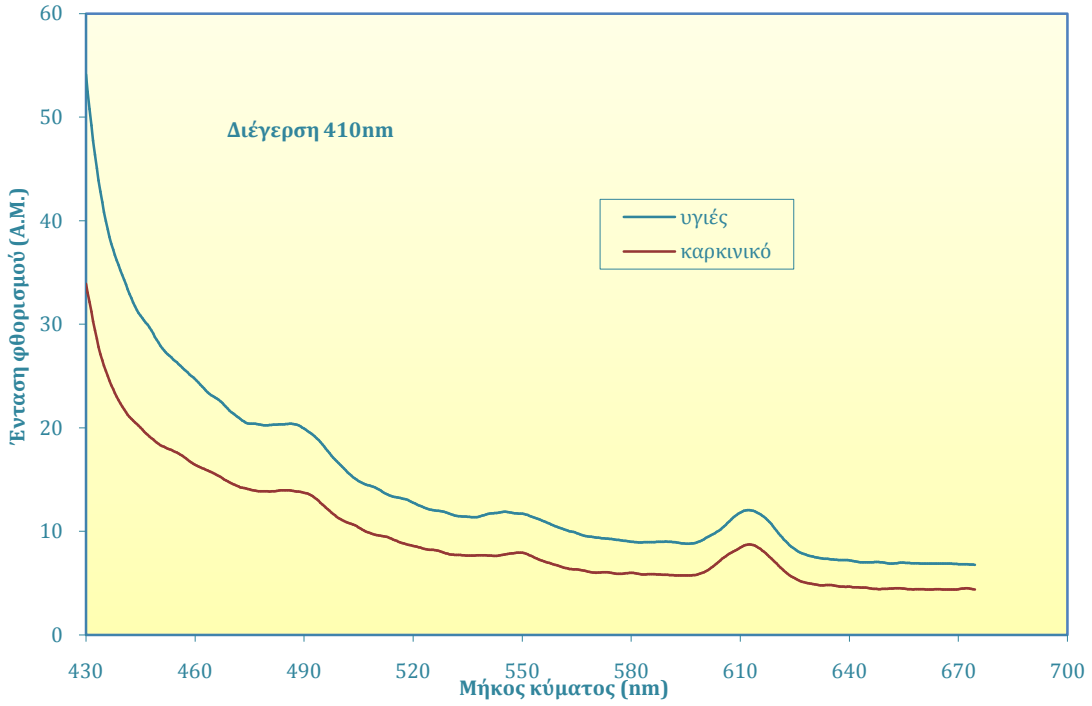
Τα φάσματα εκπομπής που συλλέχθηκαν με διέγερση στα 410 nm παρουσίασαν κορυφές στα 490 και 610 nm. Για να βρεθεί το ακριβές μήκος κύματος διέγερσης το οποίο προκαλεί τη μέγιστη ένταση εκπομπής στα 490 nm συλλέχθηκαν φάσματα διέγερσης με λ_{em} 490 nm και λ_{exc} 280 - 440 nm. Από την επεξεργασία των φασμάτων διέγερσης προέκυψε ότι μέγιστη ένταση εκπομπής στα 490 nm παρατηρείται όταν το μήκος κύματος διέγερσης είναι 410 nm (Σχήμα 7.7). Ομοίως για να βρεθεί το ακριβές μήκος κύματος διέγερσης το οποίο προκαλεί τη μέγιστη ένταση εκπομπής στα 610 nm συλλέχθηκαν φάσματα διέγερσης λ_{em} 610 nm και λ_{exc} 350 - 570 nm. Από την επεξεργασία των φασμάτων διέγερσης προέκυψε ότι μέγιστη ένταση εκπομπής στα 610 nm παρατηρείται όταν το μήκος κύματος διέγερσης είναι 410 nm (Σχήμα 7.8). Τα φάσματα εκπομπής με λ_{exc} 410 nm και λ_{em} 430 – 680 nm φαίνονται στο Σχήμα 7.9.



Σχήμα 7.7: *Φάσματα διέγερσης υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος με λ_{em} 490 nm*



Σχήμα 7.8: *Φάσματα διέγερσης υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος με λ_{em} 610 nm*



Σχήμα 7.9: *Φάσματα εκπομπής υγιούς δέρματος και μη μελανωματικού καρκινώματος με λ_{exc} 410 nm*

Αυτές οι κορυφές παρουσιάζονται σε όλα τα δείγματα είτε αυτά ανήκουν στην κατηγορία των υγιών είτε αυτά ανήκουν στην κατηγορία των καρκινικών. Βάσει των βιβλιογραφικών δεδομένων για το φθορισμό των συστατικών του δέρματος

(Πίνακας 2.1) το σήμα αυτό μπορεί να αποδοθεί στους σταυροδεσμούς της ελαστίνης και στο φθορισμό των πορφυρινών αντίστοιχα.

Σε όλα τα δείγματα η ένταση φθορισμού των υγιών δειγμάτων είναι πιο ισχυρή από την ένταση φθορισμού των αντίστοιχων καρκινικών δειγμάτων. Υπολογίζοντας το λόγο $\frac{I_{υγιές}-I_{καρκινικό}}{I_{υγιές}} \times 100\%$ από τα φάσματα εκπομπής για κάθε ζεύγος υγιούς-καρκινικού δείγματος προκύπτει ότι ο φθορισμός των υγιών δειγμάτων για διέγερση στο συγκεκριμένο μήκος κύματος είναι μεγαλύτερος κατά 27.18 ± 10.53% και 15.78 % ± 8.71 (Μ.Τ. ± Τ.Α.) αντίστοιχα για τα 490 και 610 nm.

7.1.2. Εξαγωγή λόγων εντάσεων αυτοφθορισμού

Η ένταση αυτοφθορισμού για μήκη κύματος μέσω των οποίων απεικονίζονται σημαντικές βιολογικές διαφορές μεταξύ υγιών και καρκινικών ιστών μπορεί από μόνη της να αποτελέσει μία διαγνωστική παράμετρο. Επειδή όμως οι τιμές της μπορούν να επηρεαστούν σε μεγάλο βαθμό από αυξομειώσεις της έντασης της ακτινοβολίας διέγερσης, τη γεωμετρία του ιστού αλλά και από άλλα χαρακτηριστικά της διάταξης ανίχνευσης φθορισμού προτιμάται να χρησιμοποιούνται λόγοι εντάσεων.

Από τα φάσματα εκπομπής και διέγερσης των δειγμάτων και των δύο ιστολογικών κατηγοριών εξετάζονται λόγοι έντασης φθορισμού

$$\frac{I(\lambda_{exc1}, \lambda_{em1})}{I(\lambda_{exc2}, \lambda_{em2})}$$

για διάφορους συνδυασμούς διακριτών μηκών κύματος διέγερσης και εκπομπής, σε σημεία όπου τα φάσματα εκπομπής παρουσιάζουν κορυφές. Οι λόγοι που εξετάστηκαν αρχικά είναι οι εξής:

$$F_1 = I_{(280,\,350)} \,/\, I_{(280,\,460)}$$

$$F_2 = I_{(298,\,335)} \,/\, I_{(298,\,485)}$$

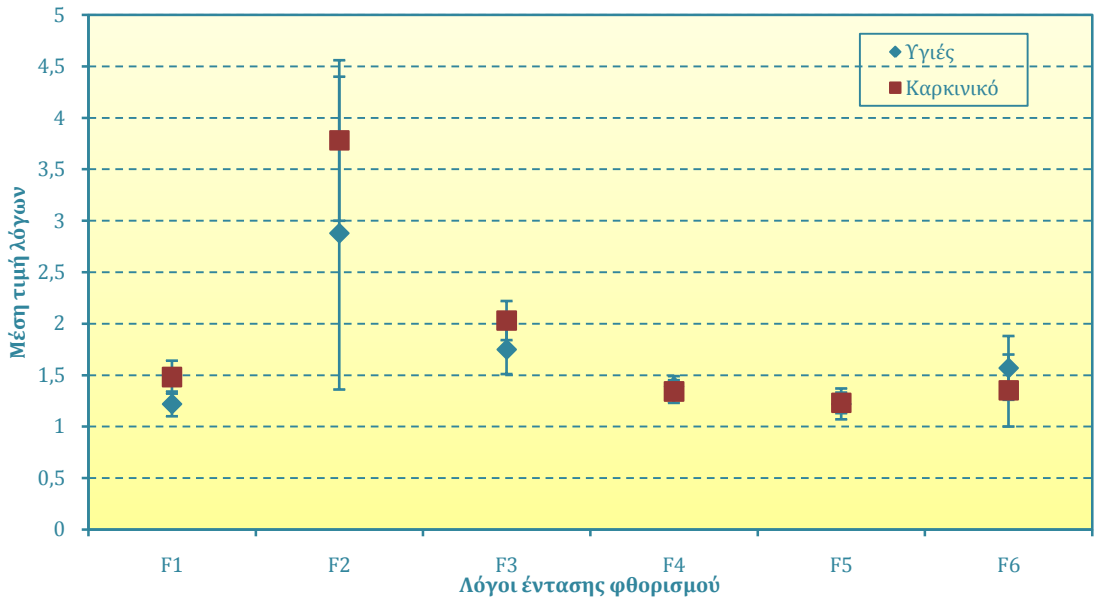
$$F_3 = I_{(310,\,350)} \,/\, I_{(310,\,460)}$$

$$F_4 = I_{(335,\,395)} \,/\, I_{(330,\,445)}$$

$$F_5 = I_{(350,\,420)} \,/\, I_{(350,\,450)}$$

$$F_6 = I_{(410,\,490)} \,/\, I_{(410,\,615)}$$

Η μέση τιμή του κάθε λόγου για κάθε ιστολογική κατηγορία φαίνεται στο Σχήμα 7.10.



Σχήμα 7.10: *Συνοπτικό διάγραμμα κατανομής της μέσης τιμής των λόγων έντασης φθορισμού για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες. Με τις μπάρες παρουσιάζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή του κάθε όρου*

Παρατηρώντας το Σχήμα 7.10 προκύπτει ότι μόνο οι τιμές του λόγου F_1 δεν αλληλεπικαλύπτονται για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες. Συνεπώς αυτός ο λόγος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστική παράμετρος. Κάποιοι άλλοι λόγοι οι οποίοι εξετάστηκαν είναι:

$$F_7 = I_{(350,\,420)} / I_{(298,\,350)}$$

$$F_8 = I_{(410,\,490)} / I_{(335,\,395)}$$

$$F_9 = I_{(410,\,490)} / I_{(298,\,350)}$$

$$F_{10} = I_{(410,\,490)} / I_{(310,\,350)}$$

$$F_{11} = I_{(410,\,490)} / I_{(350,\,420)}$$

$$F_{12} = I_{(310,\,350)} / I_{(298,\,350)}$$

$$F_{13} = I_{(335,\,395)} / I_{(310,\,350)}$$

$$F_{14} = I_{(350,\,420)} / I_{(335,\,395)}$$

$$F_{15} = I_{(350,\,420)} / I_{(298,\,350)}$$

$$F_{16} = I_{(335,\,395)} / I_{(280,\,350)}$$

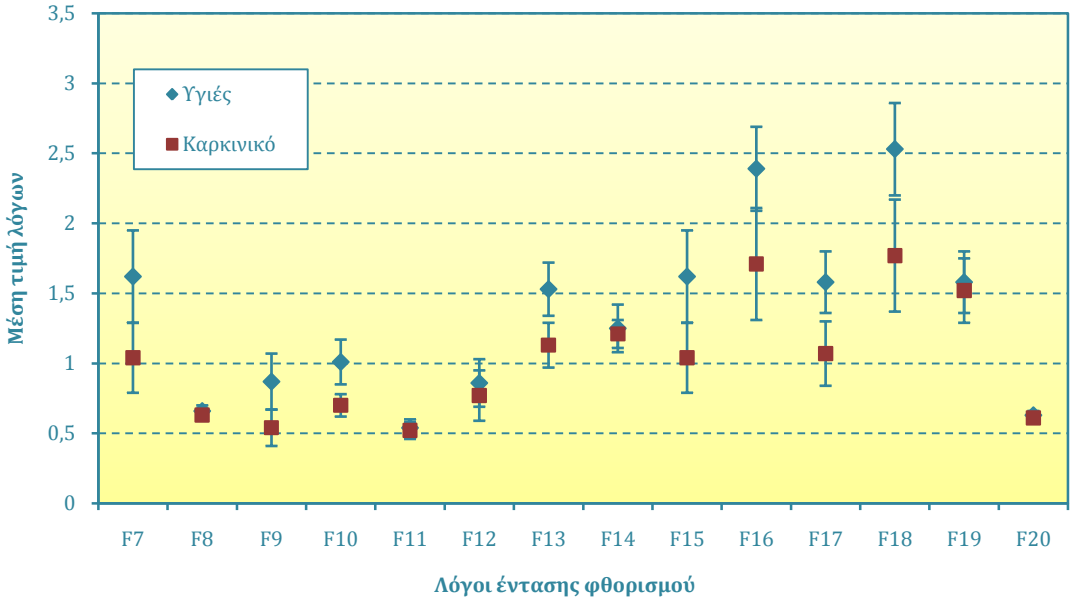
$$F_{17} = I_{(410,\,490)} / I_{(280,\,350)}$$

$$F_{18} = I_{(365,\,445)} / I_{(280,\,350)}$$

$$F_{19} = I_{(310,\,350)} / I_{(280,\,350)}$$

$$F_{20} = I_{(410,\,490)} / I_{(365,\,445)}$$

Η μέση τιμή του κάθε λόγου για κάθε ιστολογική κατηγορία φαίνεται στο Σχήμα 7.11.



Σχήμα 7.11: *Συνοπτικό διάγραμμα κατανομής της μέσης τιμής των λόγων έντασης φθορισμού για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες. Με τις μπάρες παρουσιάζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή του κάθε όρου*

Παρατηρώντας το Σχήμα 7.11 προκύπτει ότι μόνο οι τιμές του λόγου F_{10}, F_{13}, F_{17}, F_{18}, δεν αλληλεπικαλύπτονται για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες. Συνεπώς αυτοί οι λόγοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικές παράμετροι. Συμπερασματικά οι πιο αποτελεσματικοί λόγοι διαφοροποίησης των δύο πληθυσμών φαίνεται να είναι οι:

$$F_1 = I_{(280,\,350)} \,/\, I_{(280,\,460)}$$

$$F_{10} = I_{(410,\,490)} \,/\, I_{(310,\,350)}$$

$$F_{13} = I_{(335,\,395)} \,/\, I_{(310,\,350)}$$

$$F_{17} = I_{(410,\,490)} \,/\, I_{(280,\,350)}$$

$$F_{18} = I_{(365,\,445)} \,/\, I_{(280,\,350)}$$

7.1.3. Στατιστική επεξεργασία λόγων εντάσεων αυτοφθορισμού

Η στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων που αναφέρεται στη συνέχεια ως στόχο είχε τη διαπίστωση του κατά πόσο αυτοί οι λόγοι έντασης αυτοφθορισμού μπορούν ή όχι να συντελέσουν στο διαχωρισμό των δύο πληθυσμών, υγιών δηλαδή και

καρκινικών δειγμάτων. Για το λόγο αυτό αρχικά εφαρμόστηκαν οι κατάλληλοι στατιστικοί έλεγχοι κοινών ή όχι διασπορών των ιστολογικών κατηγοριών. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η ισότητα των μέσων τιμών κάθε ιστολογικής κατηγορίας. Τέλος για τους λόγους που εμφάνισαν ανισότητα μέσων τιμών, για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες, προσδιορίστηκε μία τιμή κατωφλίωσης η οποία επιτρέπει με κάποιο βαθμό βεβαιότητας το διαχωρισμό των πληθυσμών.

7.1.3.1. Έλεγχος ισότητας διακυμάνσεων

Θεωρώντας ότι οι λόγοι και για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες (πρόκειται για βιολογικές μετρήσεις) ακολουθούν κανονική κατανομή ελέγχθηκε η ισότητα των διακυμάνσεων των δύο ιστολογικών κατηγοριών για κάθε λόγο προκειμένου να αποφασιστεί το ποιο είναι το καταλληλότερο κριτήριο ελέγχου ισότητας των μέσων τιμών.

Η προς δοκιμή μηδενική υπόθεση είναι

$$H_0: \sigma_Y^2 = \sigma_K^2$$

η οποία ως εναλλακτική έχει την υπόθεση

$$H_1: \sigma_Y^2 \neq \sigma_K^2.$$

Για να ελεγχθεί η ισχύς της H_0 και H_1 υπολογίστηκε ο λόγος F ο οποίος δίνεται από τη σχέση

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

όπου s_1^2 η μεγαλύτερη σε τιμή διασπορά και s_2^2 η μικρότερη σε τιμή διασπορά.

Η τιμή του λόγου F συγκρίθηκε με την τιμή που προκύπτει από τον πίνακα τιμών για την κατανομή F για επίπεδο βεβαιότητας 95% ή $\alpha = 0.05$ και για $df = n-1$ ίσο με 7.

Από τους πίνακες της F κατανομής $F_{critical}$=4.99 για επίπεδο βεβαιότητας 95% ή α=0.05. Συνεπώς για κανέναν λόγο δε μπορεί να απορριφθεί η μηδενική υπόθεση. Δηλαδή τα υγιή και τα καρκινικά δείγματα για κάθε λόγο εμφανίζουν κοινή διασπορά. Η κοινή διασπορά για κάθε λόγο δίνεται στον Πίνακα 7.1 και υπολογίζεται από τη σχέση

$$s_p^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Πίνακας 7.1: Παράμετροι F-test για τους λόγους εντάσεων

Λόγοι Εντάσεων	$\sigma^2_{\text{υγιών}}$	$\sigma^2_{\text{καρκινικών}}$	$F = \frac{\sigma^2_{\text{υγιών}}}{\sigma^2_{\text{καρκινικών}}}$	Κοινή διασπορά σ^2_p
F_1	0.026	0.014	1.857	0.020
F_{10}	0.027	0.007	3.857	0.017
F_{13}	0.037	0.026	1.423	0.032
F_{17}	0.052	0.047	1.106	0.050
F_{18}	0.161	0.112	1.438	0.137

7.1.3.2. Έλεγχος μέσων τιμών

Ο έλεγχος της ισότητας των μέσων τιμών των δύο ιστολογικών κατηγοριών για κάθε λόγο εντάσεων έγινε μέσω του κριτηρίου Student. Για το λόγο αυτό υπολογίστηκε η παράμετρος t από τον τύπο

$$t = \frac{\mu_1 - \mu_2}{\sqrt{s_p^2\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

Η τιμή αυτής της παραμέτρου συγκρίνεται με την αντίστοιχη τιμή της κατανομής t όπως αυτή δίνεται από τους αντίστοιχους πίνακες. Αν η απόλυτη τιμή t που υπολογίστηκε είναι μεγαλύτερη από αυτή που δίνεται στον πίνακα της κατανομής τότε απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση. Απορρίπτεται δηλαδή η υπόθεση ότι οι δύο μέσοι όροι είναι ίσοι.

Πίνακας 7.2: *Υπολογισμός της παραμέτρου t για κάθε λόγο εντάσεων βάσει των τιμών κοινής διασποράς*

Λόγοι Εντάσεων	Παράμετρος t
F_1	48.65
F_{10}	63.82
F_{13}	44.22
F_{17}	36.48
F_{18}	19.44

Συγκρίνοντας την τιμή $t_{critical}$ = 4.14 για επίπεδο βεβαιότητας 99.9% από τους πίνακες της t-κατανομής με τις τιμές του Πίνακα 7.2 προκύπτει ότι για όλους τους λόγους εντάσεων $t_{critical} < t$. Συνεπώς η μηδενική υπόθεση ότι οι μέσες τιμές των δύο ιστολογικών κατηγοριών είναι ίσες απορρίπτεται για όλους τους λόγους εντάσεων με ποσοστό βεβαιότητας 99.9 % ή α = 0.001.

7.1.3.3. Εύρεση τιμών κατωφλίωσης

Οι τιμές κατωφλίωσης για κάθε λόγο έντασης θα υπολογιστούν με βάση τον παρακάτω λόγο πιθανοτήτων

$$L(x_0) = \frac{pr(x_0|D)}{pr(x_0|\overline{D})}$$

όπου $pr(x_0|D)$ είναι η συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας της παρατηρούμενης τιμής X στο σημείο x_0 υπό την κατάσταση D, ενώ $pr(x_0|\overline{D})$ είναι η συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας απουσία της D. Ειδικά για πληθυσμούς που ακολουθούν κανονική κατανομή με μέσους όρους μ_D και $\mu_{\overline{D}}$ και κοινή διασπορά s^2 η εξίσωση παίρνει την απλή εκθετική μορφή

$$L(x) = \exp(\alpha_0 + \alpha_1 x)$$

που οι συντελεστές α_0 και α_1 δίνονται από τις σχέσεις

$$a_0 = -\frac{1}{2}\frac{\mu_D^2 - \mu_{\overline{D}}^2}{s^2}$$

και

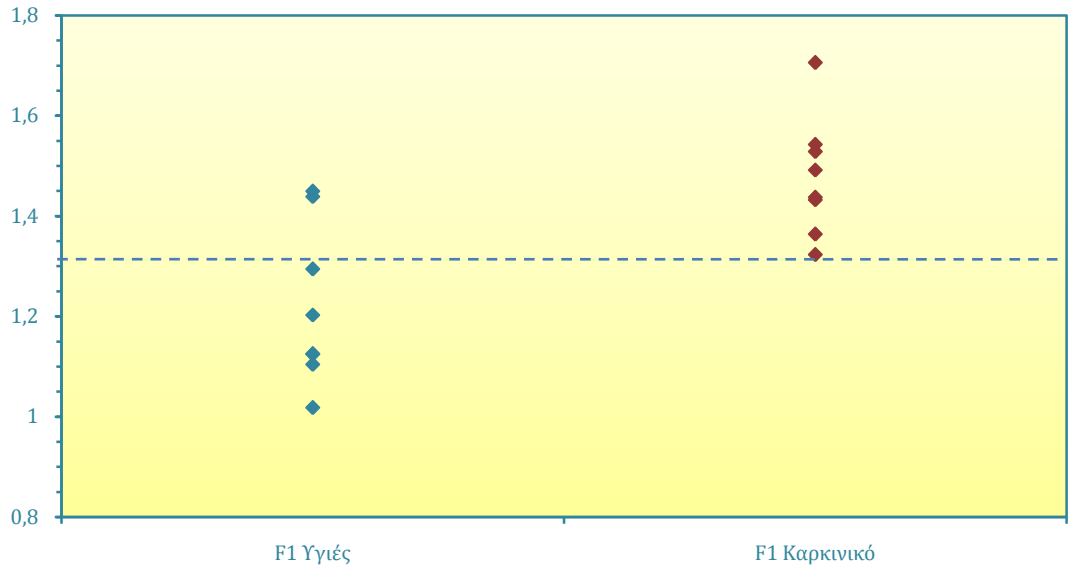
$$a_1 = \frac{\mu_D - \mu_{\overline{D}}}{s^2}$$

αντίστοιχα.

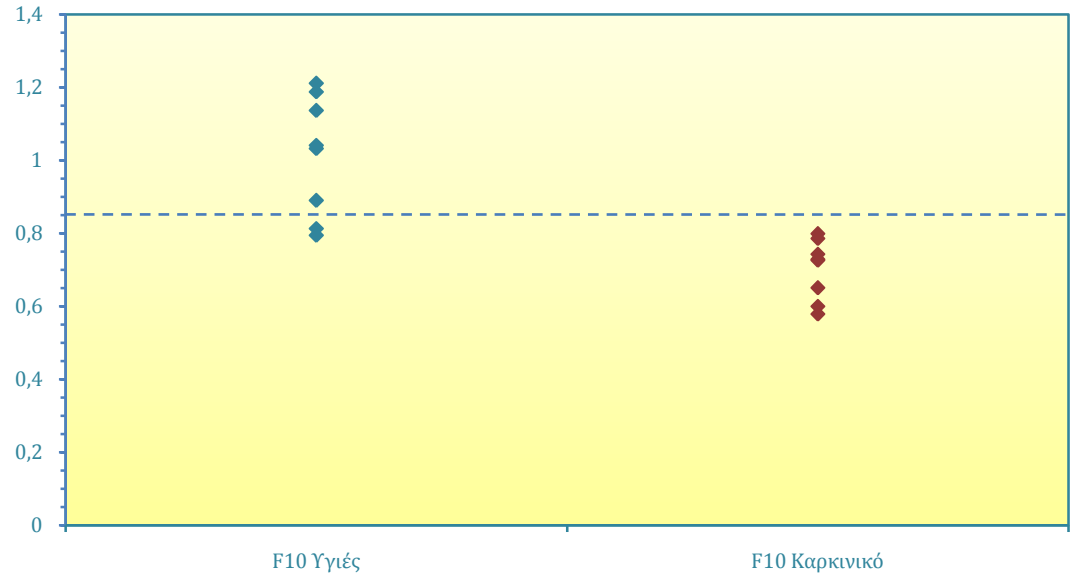
Πίνακας 7.3: *Υπολογισμός των συντελεστών α_0 και α_1 καθώς και της διαχωριστικής τιμής x για κάθε λόγο εντάσεων*

Λόγοι Εντάσεων	Συντελεστής α_0	Συντελεστής α_1	Διαχωριστική τιμή x
F_1	17.441	-12.930	1.349
F_{10}	-15.738	18.348	0.858
F_{13}	-16.758	12.655	1.326
F_{17}	-13.826	10.435	1.325
F_{18}	11.948	-5.556	2.151

Η κρίσιμη τιμή του x είναι η τιμή για την οποία ο λόγος των πιθανοτήτων θα γίνει ίσος με τη μονάδα. Είναι η τιμή δηλαδή για την οποία η $pr(x_0|D)$ είναι ίση με την $pr(x_0|\overline{D})$. Η τιμή αυτή του x διαχωρίζει δηλαδή τις δύο καταστάσεις D και $\overline{D}$. Η τιμή x για κάθε λόγο φαίνονται στον Πίνακα 7.3 και γραφικά στα παρακάτω διαγράμματα (Σχήματα 7.12-7.16).



Σχήμα 7.12: *Διάγραμμα σκέδασης λόγου εντάσεων F_1 για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες. Με τη διακεκομμένη γραμμή παρουσιάζεται η τιμή κατωφλίωσης*



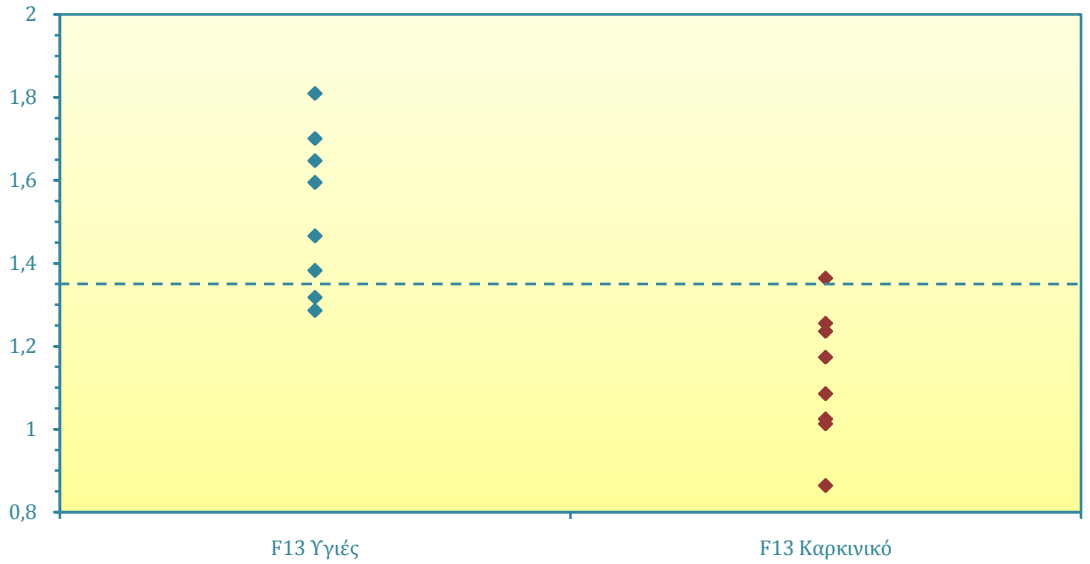
Σχήμα 7.13: *Διάγραμμα σκέδασης λόγου εντάσεων F_{10} για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες. Με τη διακεκομμένη γραμμή παρουσιάζεται η τιμή κατωφλίωσης*

7.1.3.4. Ακρίβεια ταξινόμησης των δειγμάτων βάσει των λόγων εντάσεων αυτοφθορισμού

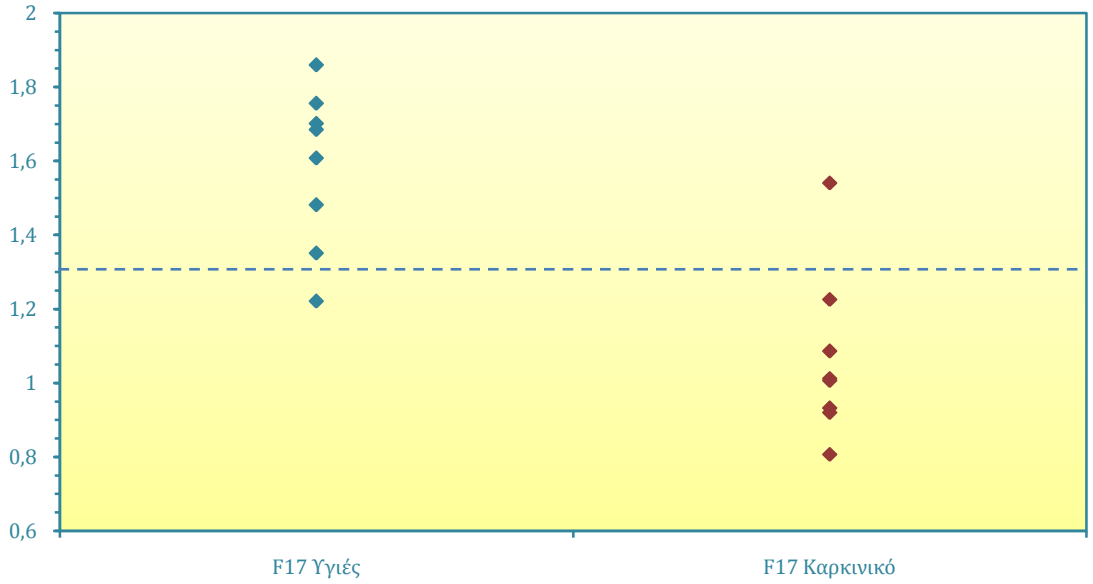
Για να αξιολογηθεί κάθε διαγνωστική μέθοδος υπολογίζονται οι παράμετροι ταξινόμησης βάσει των αποτελεσμάτων της μεθόδου σε ταυτοποιημένα δείγματα. Για το λόγο αυτό και προκειμένου να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης για κάθε λόγο εντάσεων υπολογίστηκαν οι εξής παράμετροι:

- Ευαισθησία (sensitivity) $= \frac{\text{πλήθος θετικών δειγμάτων}}{\text{πλήθος καρκινικών δειγμάτων}}$
- Εξειδίκευση (specificity) $= \frac{\text{πλήθος αρνητικών δειγμάτων}}{\text{πλήθος υγιών δειγμάτων}}$
- Ακρίβεια ταξινόμησης $= \frac{\text{πλήθος θετικών και αρνητικών δειγμάτων}}{\text{συνολικό πλήθος υγιών και καρκινικών δειγμάτων}}$

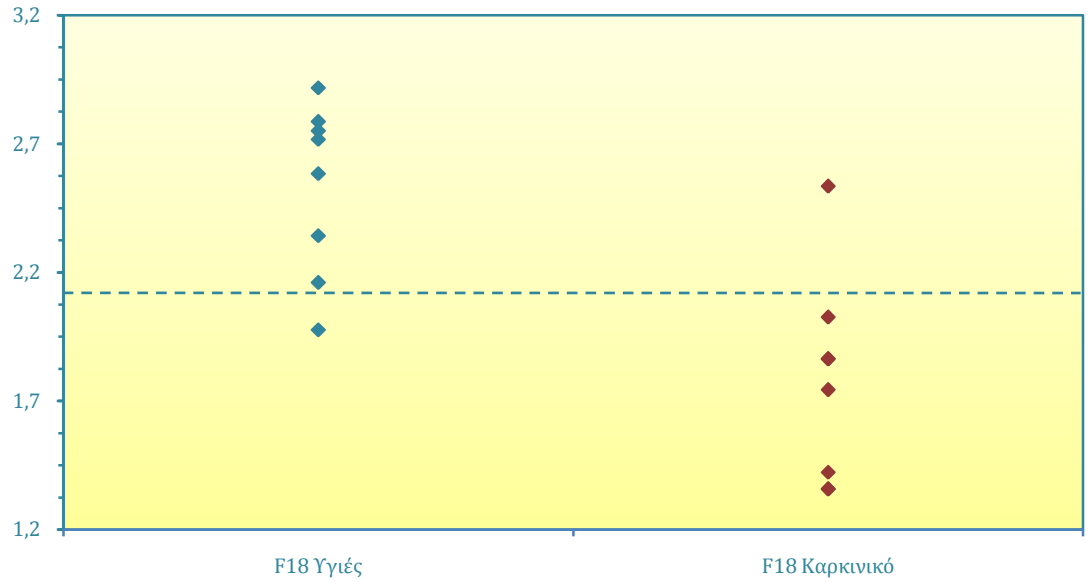
  (classification accuracy)



Σχήμα 7.14: *Διάγραμμα σκέδασης λόγου εντάσεων F_{13} για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες. Με τη διακεκομμένη γραμμή παρουσιάζεται η τιμή κατωφλίωσης*



Σχήμα 7.15: *Διάγραμμα σκέδασης λόγου εντάσεων F_{17} για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες. Με τη διακεκομμένη γραμμή παρουσιάζεται η τιμή κατωφλίωσης*



Σχήμα 7.16: *Διάγραμμα σκέδασης λόγου εντάσεων F_{18} για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες. Με τη διακεκομμένη γραμμή παρουσιάζεται η τιμή κατωφλίωσης*

Πίνακας 7.4: *Παράμετροι αξιολόγησης των διαγνωστικών λόγων*

Λόγοι ή συνδυασμός λόγων	Ευαισθησία	Εξειδίκευση	Ακρίβεια ταξινόμησης
F_1	(8/8) 100 %	(6/8) 75 %	(14/16) 87.5 %
F_{10}	(8/8) 100 %	(6/8) 75 %	(14/16) 87.5 %
F_{13}	(7/8) 87.5 %	(6/8) 75 %	(13/16) 81.3 %
F_{17}	(7/8) 87.5 %	(7/8) 87.5 %	(14/16) 87.5 %
F_{19}	(7/8) 87.5 %	(7/8) 87.5 %	(14/16) 87.5 %

7.1.4. Συμπεράσματα

Από τη λήψη φασμάτων αυτοφθορισμού από υγιείς και καρκινικούς δερματικούς ιστούς προκύπτει ότι οι δύο αυτές ιστολογικές κατηγορίες παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ως προς τη σύσταση. Αρωματικά αμινοξέα όπως η τρυπτοφάνη εμφανίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στους καρκινικούς ιστούς λόγω των υψηλών ρυθμών πολλαπλασιασμού που εμφανίζουν τα κύτταρα σε αυτούς. Αντίθετα πολύ λιγότεροι είναι οι σταυροδεσμοί κολλαγόνου και ελαστίνης κυρίως λόγω των μεταλλοπρωτεϊνασών που εκκρίνονται στο εξωκυττάριο υλικό από τα καρκινικά κύτταρα αλλά και του πολύ γρήγορου ρυθμού δόμησης του καρκινικού ιστού. Σημαντική φαίνεται να είναι επίσης και η διαφορά στη συγκέντρωση των πορφυρινών μεταξύ υγιών και καρκινικών ιστών.

Οι διαφορές αυτές αντικατοπτρίζονται στα φάσματα φθορισμού και πιο συγκεκριμένα στα μήκη κύματος όπου αυτές οι ενώσεις ή οι δεσμοί φθορίζουν. Για αυτό το λόγο ένας πρώτος διαχωρισμός μπορεί να γίνει βάσει της έντασης φθορισμού στα μήκη κύματος που αυτές οι ενώσεις ή δεσμοί παρουσιάζουν κορυφές. Επειδή όμως η ένταση φθορισμού μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες όπως αυξομειώσεις στην ένταση της ακτινοβολίας διέγερσης, πιο ασφαλές κρίθηκε να ληφθούν λόγοι εντάσεων, ώστε να εξαλειφθούν σφάλματα που μπορεί να οφείλονται στο φασματοφωτόμετρο ή στη γεωμετρία των ιστών.

Από τους διάφορους λόγους που μελετήθηκαν πέντε εμφανίστηκαν πιο αποτελεσματικοί στο διαχωρισμό των δύο ιστολογικών κατηγοριών. Η υψηλή ακρίβεια, ευαισθησία και εξειδίκευση των διαγνωστικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν από αυτούς τους λόγους καθιστούν αυτό το σύστημα διάγνωσης πολύ αποτελεσματικό. Σημαντικά πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι επίσης το ότι δεν είναι επεμβατική, δεν έχει καμία παρενέργεια και η εξαγωγή των αποτελεσμάτων της είναι πάρα πολύ γρήγορη. Λόγω αυτών των πλεονεκτημάτων απαλείφονται τα πολύ σημαντικά μειονεκτήματα της βιοψίας που είναι η υψηλή πιθανότητα υποτροπής και το πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη λήψη έως την εξέταση του δείγματος.

7.2. Αποτελέσματα φωτοφυσικών μελετών φωτοευαισθητοποιητών

7.2.1. Φάσματα απορρόφησης φωτοευαισθητοποιητών

Σε όλα τα στάδια μελετών των φωτοφυσικών αλλά και φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης (AlClPc) και προκειμένου να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα αντίστοιχες μελέτες με αυτές της φθαλοκυανίνης διεξάγονταν και με έναν άλλο φωτοευαισθητοποιητή δεύτερης γενιάς την 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη (m-THPC). Η χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη καθαρότητας 95% αγοράστηκε από την εταιρεία Sigma ενώ η 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη καθαρότητας 99% προσφέρθηκε από την εταιρεία Biolitec. Η χλωρίνη αυτή είναι ένας φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς ο οποίος θεωρείται πολύ πιο αποτελεσματικός σε σχέση με τα παράγωγα αιματοπορφυρίνης και ο οποίος έχει ήδη πάρει έγκριση σε πάρα πολλές χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης μεταξύ των οποίων και στην Ελλάδα για θεραπεία καρκίνων κεφαλής - τραχήλου.

Στο πρώτο στάδιο των φωτοφυσικών μελετών της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης καταγράφηκαν τα φάσματα απορρόφησης της φθαλοκυανίνης αλλά

και της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης σε οργανικούς διαλύτες όπως το δι-μεθυλ-σουλφοξείδιο και την αιθανόλη αλλά και ανόργανους όπως ο φυσιολογικός ορός.

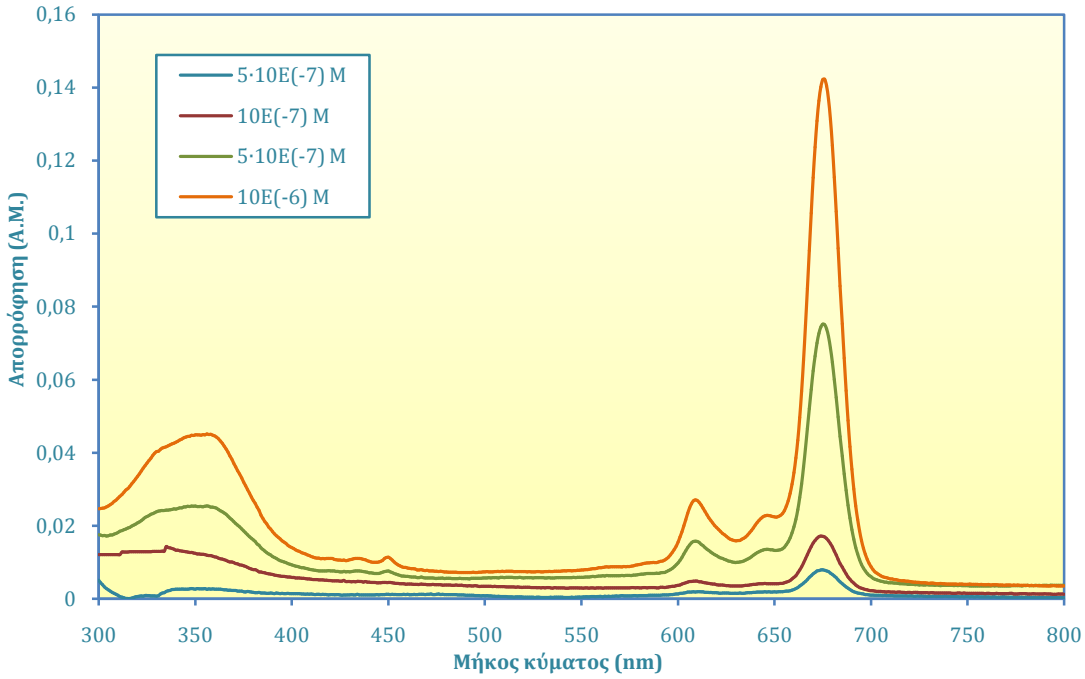
Για τη μελέτη της συμπεριφοράς της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης σε οργανικούς διαλύτες, παρασκευάστηκαν αρχικά φωτοευαισθητοποιητών σε δι-μεθυλ-σουλφοξείδιο (DMSO) συγκέντρωσης 10^{-3} M. Τα μητρικά αυτά διαλύματα φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία 4-8 ^{o}C και σε απόλυτο σκοτάδι. Με βάση αυτά τα διαλύματα και με συνεχείς αραιώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα φωτοευαισθητοποιητών σε δι-μεθυλ-σουλφοξείδιο και αιθανόλη (EtOH) συγκεντρώσεων 5×10^{-6} – 5×10^{-9} M. Και αυτά τα δείγματα ως τη μέτρηση των φασματικών τους ιδιοτήτων φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία 4-8 ^{o}C και σε απόλυτο σκοτάδι.

Τα δείγματα πριν ληφθούν οι μετρήσεις που αφορούσαν τα φασματικά τους χαρακτηριστικά αφέθηκαν για 3 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε σκοτεινό μέρος. Τα φάσματα απορρόφησης καταγράφηκαν με χρήση της φασματοφωτομετρικής διάταξης απορρόφησης. Προκειμένου να ληφθούν τα φάσματα απορρόφησης των διαλυμάτων φωτοευαισθητοποιητών τα διαλύματα μεταγγίζονταν σε πλαστικές κυβέττες απορρόφησης των 4,5 mL κατάλληλες για σάρωση στην ορατή και υπεριώδη περιοχή. Σε κάθε μέτρηση, γινόταν μηδενισμός του σήματος για την αποφυγή σφαλμάτων που οφείλονταν στην απορρόφηση του εκάστοτε διαλύτη αλλά και στο θόρυβο του οργάνου και στη συνέχεια λαμβάνονταν φάσματα που αφορούσαν τόσο στην υπεριώδη όσο και στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (300-800) nm. Η ταχύτητα σάρωσης σε όλα τα πειράματα παρέμεινε σταθερή στα 480 nm / min.

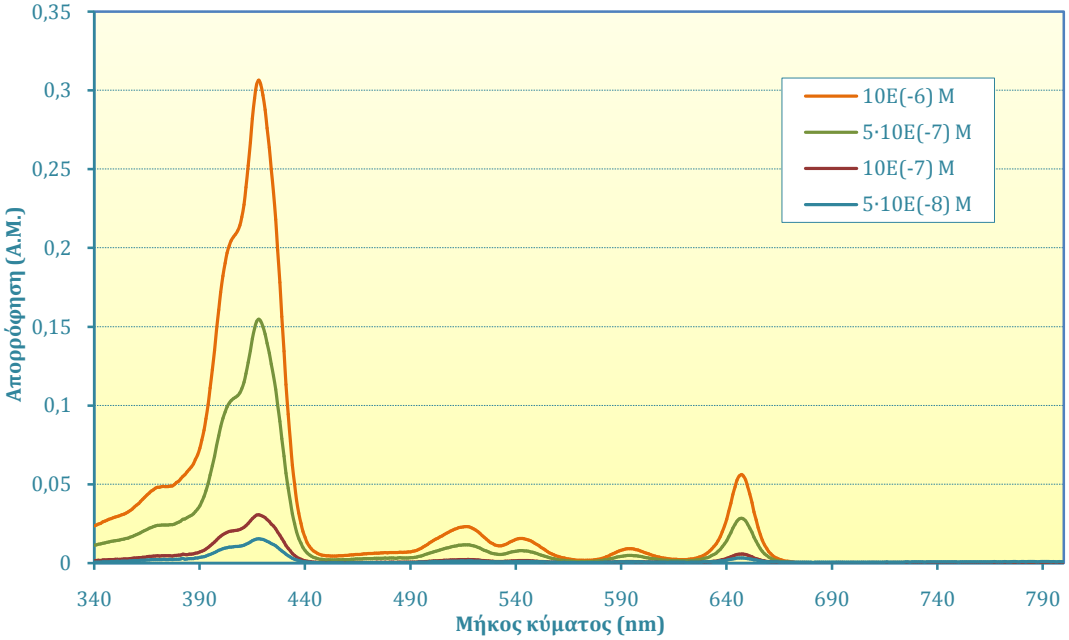
Η ακριβής διαδικασία περιλάμβανε τα παρακάτω στάδια:

- Τοποθέτηση στο φασματοφωτόμετρο ενός ζεύγους ομοίων κυβεττών οι οποίες περιείχαν τον εκάστοτε διαλύτη, προκειμένου να πραγματοποιηθεί καταγραφή του σήματος λόγω της απορρόφησης του διαλύτη αλλά και του θορύβου του οργάνου.
- Λήψη φάσματος με σάρωση από τα 300 έως τα 800 nm. Αυτόματη αποθήκευση του φάσματος αυτού ώστε να χρησιμοποιηθεί ως σήμα μηδενισμού.
- Αντικατάσταση μιας από τις κυβέττες που περιείχαν το διαλύτη με μία που περιείχε το προς εξέταση διάλυμα.
- Σάρωση μεταξύ των επιλεγμένων μηκών κύματος προκειμένου να προκύψει το φάσμα απορρόφησης του διαλύματος.

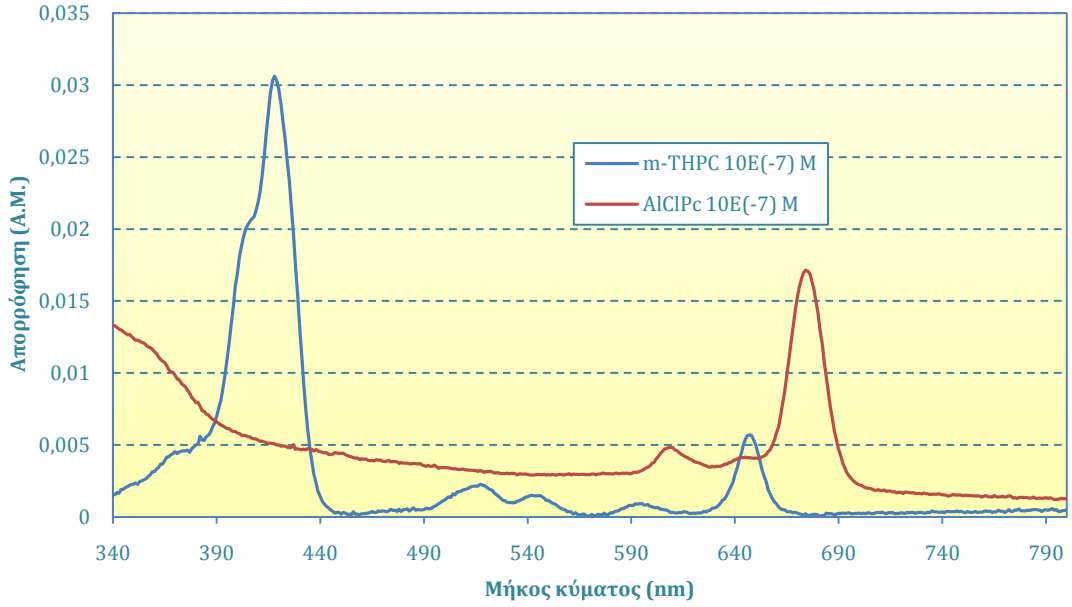
Η διαδικασία επαναλαμβάνονταν τρεις φορές για κάθε διάλυμα, ενώ τα τελικά φάσματα προέκυψαν από το μέσο όρο της απορρόφησης του διαλύματος σε κάθε μήκος κύματος.



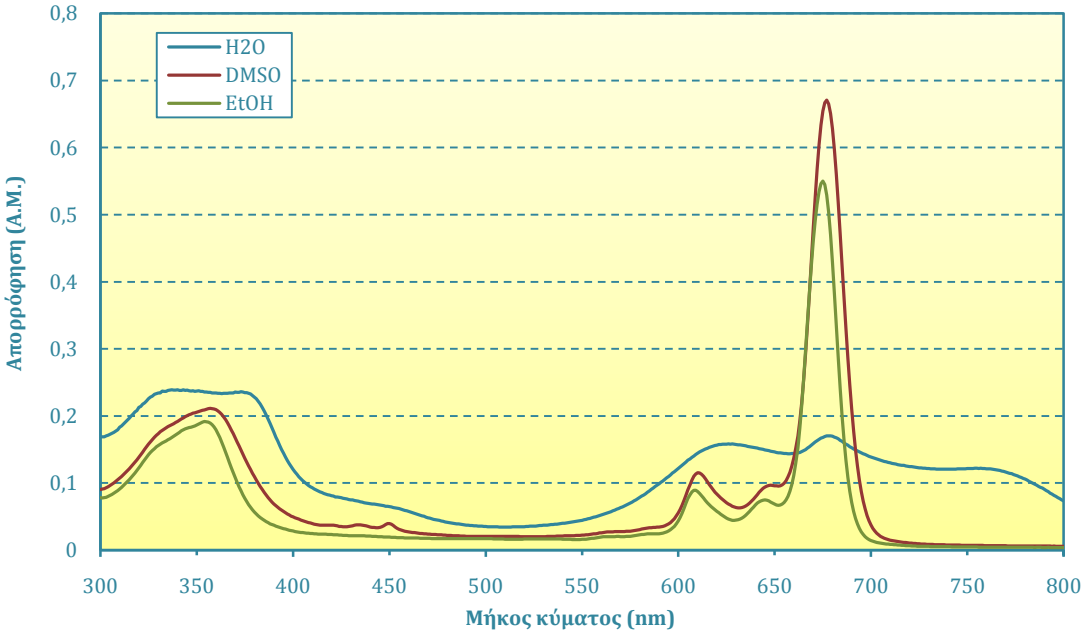
Σχήμα 7.17: *Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων AlClPc σε DMSO*



Σχήμα 7.18: *Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων m-THPC σε DMSO*



Σχήμα 7.19: *Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων m-THPC και AlClPc συγκέντρωσης 10^{-7} M σε DMSO*



Σχήμα 7.20: *Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων AlClPc συγκέντρωσης 5×10^{-6} M σε DMSO, EtOH και H_2O*

7.2.2. Συμπεράσματα που προκύπτουν από τα φάσματα απορρόφησης των φωτοευαισθητοποιητών

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 7.17 η χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη παρουσιάζει τρεις κορυφές απορρόφησης. Η πιο ψηλή εμφανίζεται στην περιοχή του ερυθρού

(Q-Band) στα 673 nm. Μία δευτερεύουσα κορυφή εμφανίζεται στα 611 nm ενώ επίσης η φθαλοκυανίνη αυτή απορροφά ισχυρά στην περιοχή του υπεριώδους (B-band) εμφανίζοντας μέγιστο στα 357 nm.

Μετά από παρατήρηση του διαγράμματος στο Σχήμα 7.20, προκύπτει ότι το φάσμα απορρόφησης της φθαλοκυανίνης μεταβάλλεται σημαντικά ανάλογα με το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται. Έτσι ενώ σε οργανικούς διαλύτες η κορυφή απορρόφησης στα 673 nm έχει πλάτος περίπου 40 nm στο νερό η κορυφή αυτή διευρύνεται και το πλάτος της φτάνει τα 200 nm περίπου. Η διεύρυνση αυτή οφείλεται στο ότι παρόλο που η AlClPc είναι μία σχετικά υδατοδιαλυτή ουσία, όταν βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε υδατικά διαλύματα εμφανίζει το φαινόμενο της συσσωμάτωσης (aggregation). Η συσσωμάτωση είναι ένα μη επιθυμητό φαινόμενο το οποίο εκτός από μείωση της απορρόφησης συνεπάγεται και μείωση της αποδοτικότητας της φωτοευαίσθητης ουσίας. Ωστόσο πρέπει να παρατηρηθεί ότι η ένταση του φαινομένου της συσσωμάτωσης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή στο διάλυμα. Έτσι η ένταση του φαινομένου συσσωμάτωσης μειώνεται πάρα πολύ για συγκεντρώσεις μικρότερες του 10^{-7} M, συγκεντρώσεις που είναι και οι συνήθεις συγκεντρώσεις στις οποίες βρίσκονται οι φωτοευαισθητοποιητές στα κύτταρα.

Παρατηρώντας το Σχήμα 7.18 προκύπτει ότι οι δύο κύριες κορυφές απορρόφησης της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης είναι στα 420 και 652 nm. Ακόμη παρατηρώντας το Σχήμα 7.19 συμπεραίνουμε πως η φθαλοκυανίνη απορροφά και σε μεγαλύτερα μήκη κύματος αλλά και πολύ πιο ισχυρά σε σχέση με την 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη (>300 %). Έτσι αναμένεται η χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη να εμφανίζει πολύ πιο ισχυρή φωτοδυναμική δράση σε σχέση με την 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη.

7.2.3. Φάσματα φθορισμού φωτοευαισθητοποιητών

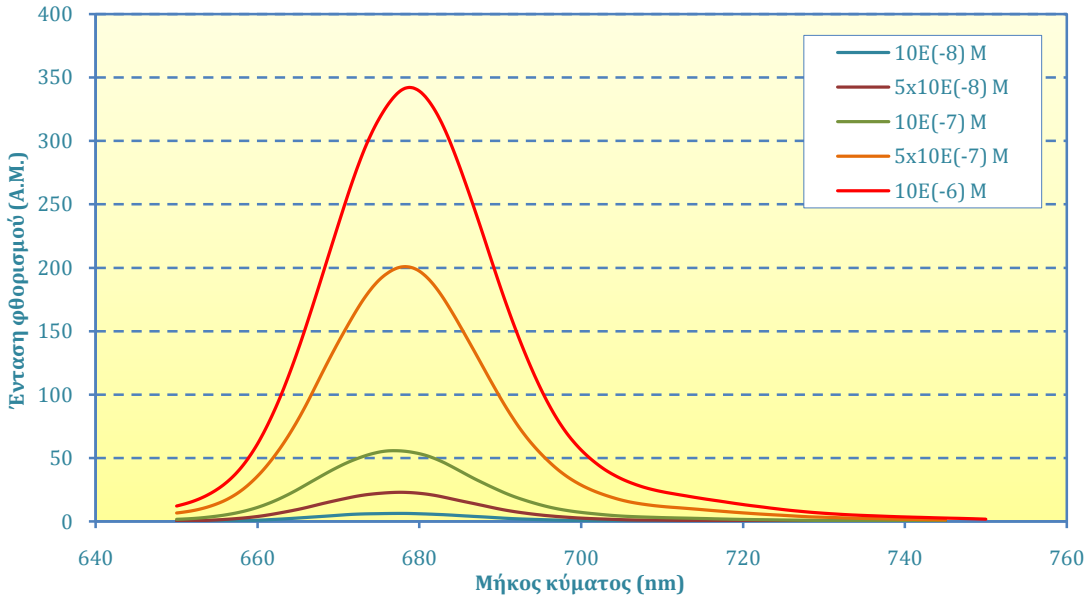
Προκειμένου να μελετηθεί η συμπεριφορά της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης σε οργανικούς διαλύτες, λήφθηκαν εκτός από τα φάσματα απορρόφησης και τα φάσματα φθορισμού των παραπάνω διαλυμάτων. Τα φάσματα φθορισμού καταγράφηκαν με χρήση της φασματοφωτομετρικής διάταξης φθορισμού. Προκειμένου να ληφθούν τα φάσματα φθορισμού των διαλυμάτων φθαλοκυανίνης τα διαλύματα μεταγγίζονταν σε πλαστικές κυβέττες φθορισμού των 4,5 mL κατάλληλες για σάρωση στην ορατή και υπεριώδη περιοχή. Τα φάσματα λήφθηκαν

αφού πρώτα είχε γίνει μηδενισμός του σήματος λόγω του φθορισμού του εκάστοτε διαλύτη αλλά και του θορύβου του οργάνου. Η ταχύτητα σάρωσης σε όλα τα πειράματα παρέμεινε σταθερή στα 480 nm/min.

Σχετικά με το ποιο μήκος κύματος θα έπρεπε να χρησιμοποιηθεί ως μήκος κύματος διέγερσης της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης (κορυφές απορρόφησης στα 357 nm, 611 nm και στα 673 nm) έγιναν διάφορες δοκιμές από τις οποίες προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

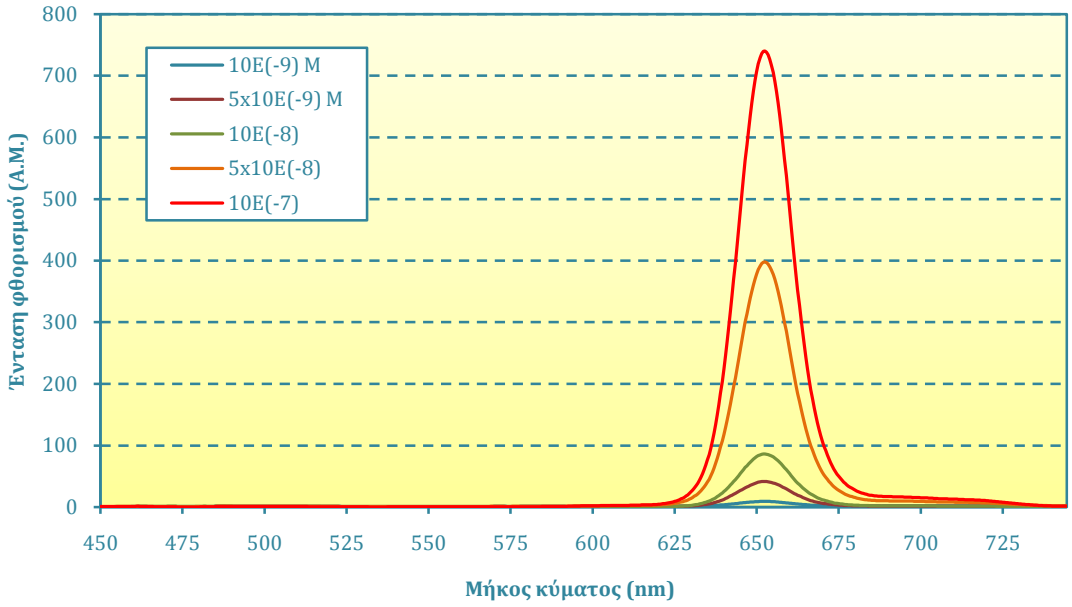
- Η κορυφή φθορισμού παρουσιάζεται στα 680 nm.
- Τα 675 nm δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήκος κύματος διέγερσης γιατί λόγω του ανοίγματος της σχισμής (10 nm) του μονοχρωμάτορα διέγερσης και του μονοχρωμάτορα εκπομπής της φασματοφωτομετρικής διάταξης φθορισμού ο θόρυβος που θα προέρχονταν από τη λάμπα θα δημιουργούσε κορεσμό στο φάσμα.
- Τα 357 nm επίσης δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήκος κύματος διέγερσης γιατί το διπλάσιο μήκος κύματος 714 nm (λόγω των οπτικών της διάταξης) θα επηρέαζε την κορυφή φθορισμού η οποία είναι αρκετά πλατιά.

Για τους παραπάνω λόγους ως μήκος κύματος διέγερσης χρησιμοποιήθηκαν τα 611 nm (Σχήμα 7.21).

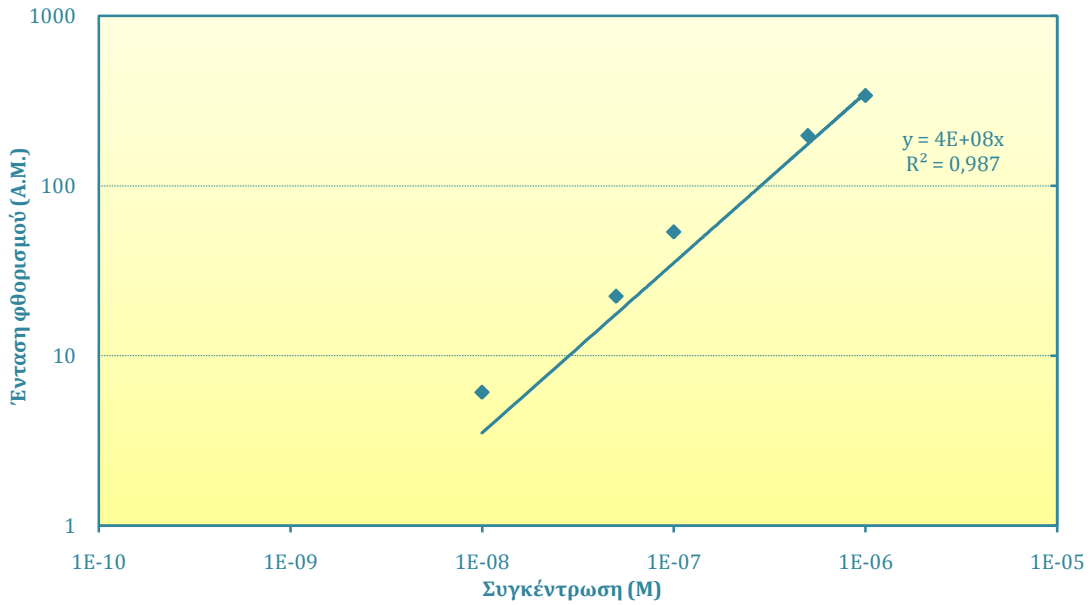


Σχήμα 7.21: *Φάσματα έντασης φθορισμού AlClPc σε DMSO με διέγερση στα 611 nm*

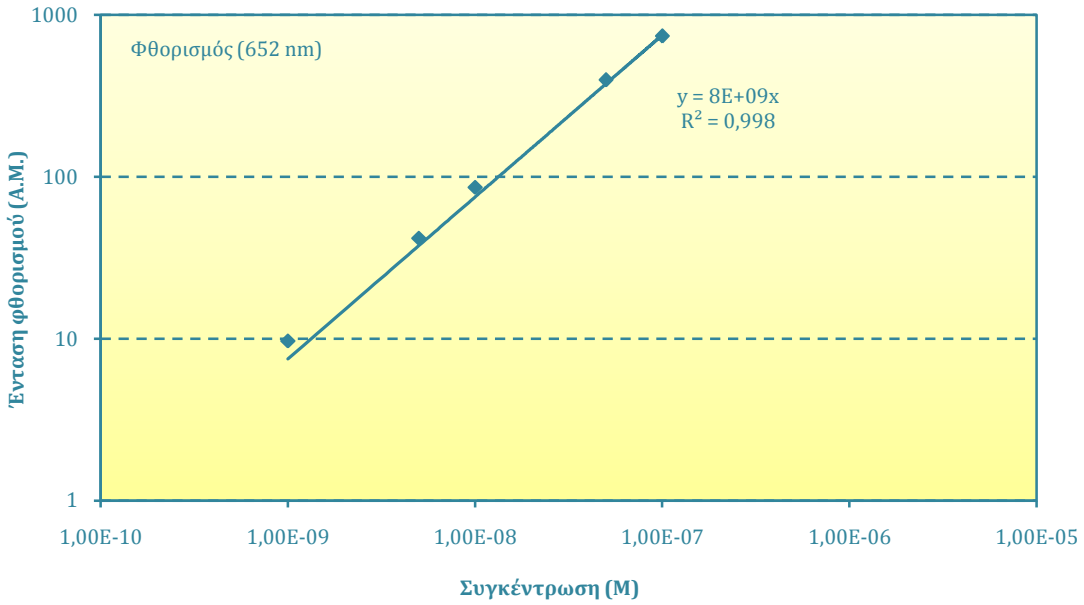
Αντίστοιχα, ως μήκος κύματος διέγερσης της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε τα 420 είτε τα 652 nm. Επειδή όμως η 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 654 nm και ο θόρυβος που θα προέρχονταν αν χρησιμοποιούνταν ως ακτινοβολία διέγερσης τα 652 nm θα ήταν πολύ μεγάλος ως μήκος κύματος διέγερσης χρησιμοποιήθηκαν τα 420 nm (Σχήμα 7.22).



Σχήμα 7.22: *Φάσματα έντασης φθορισμού m-THPC σε DMSO με διέγερση στα 420 nm*



Σχήμα 7.23: *Διάγραμμα συγκέντρωσης-φθορισμού της AlClPc στα 680 nm με διέγερση στα 420 nm*



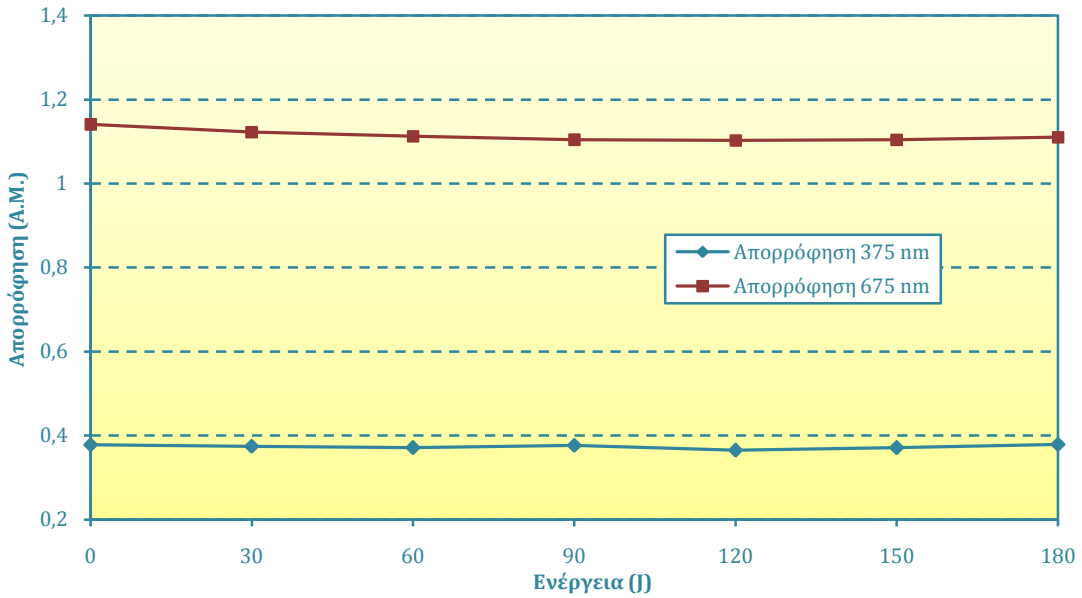
Σχήμα 7.24: *Διάγραμμα συγκέντρωσης-φθορισμού της m-THPC στα 652 nm με διέγερση στα 420 nm*

7.2.4. Συμπεράσματα που προκύπτουν από τα φάσματα φθορισμού των φωτοευαισθητοποιητών

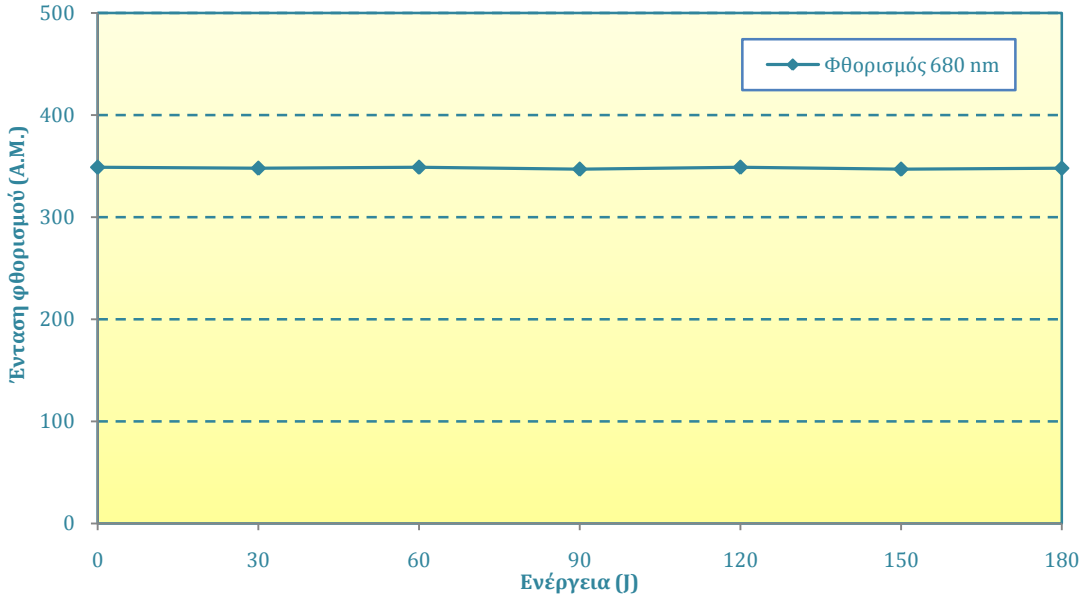
Από την ένταση φθορισμού τόσο των διαλυμάτων της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης όσο και των διαλυμάτων της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης προκύπτει ότι και οι δύο φωτοευαισθητοποιητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν όχι μόνο στη φωτοδυναμική θεραπεία αλλά και στη φωτοδυναμική διάγνωση αφού το σήμα φθορισμού τους είναι αρκετά υψηλό. Για Για το συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων το σήμα φθορισμού είναι γραμμικά ανάλογο της συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή στο διάλυμα (Σχήματα 7.23, 7.24). Κατά συνέπεια αντίστοιχα διαγράμματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καμπύλες αναφοράς στις ex vivo φαρμακοκινητικές μελέτες προκειμένου να προσδιορίσουν τη συγκέντρωση αγνώστων διαλυμάτων.

7.2.5. Φωτολεύκανση φωτοευαισθητοποιητών

Για τις μελέτες φωτολεύκανσης της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης, ένα διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-6} M ακτινοβολήθηκε για διάφορα χρονικά διαστήματα με το διοδικό laser 661 nm. Η ακτινοβόληση μετά το διαχύτη της ίνας (και για εμβαδό κηλίδας 1.6 cm^2) ήταν ≈25 mW/cm^2. Οι χρόνοι ακτινοβόλησης κυμαίνονταν από 10 min έως 1 h. Οι μεταβολές στις κύριες κορυφές απορρόφησης και φθορισμού της φθαλοκυανίνης φαίνονται στα Σχήματα 7.25 και 7.26.



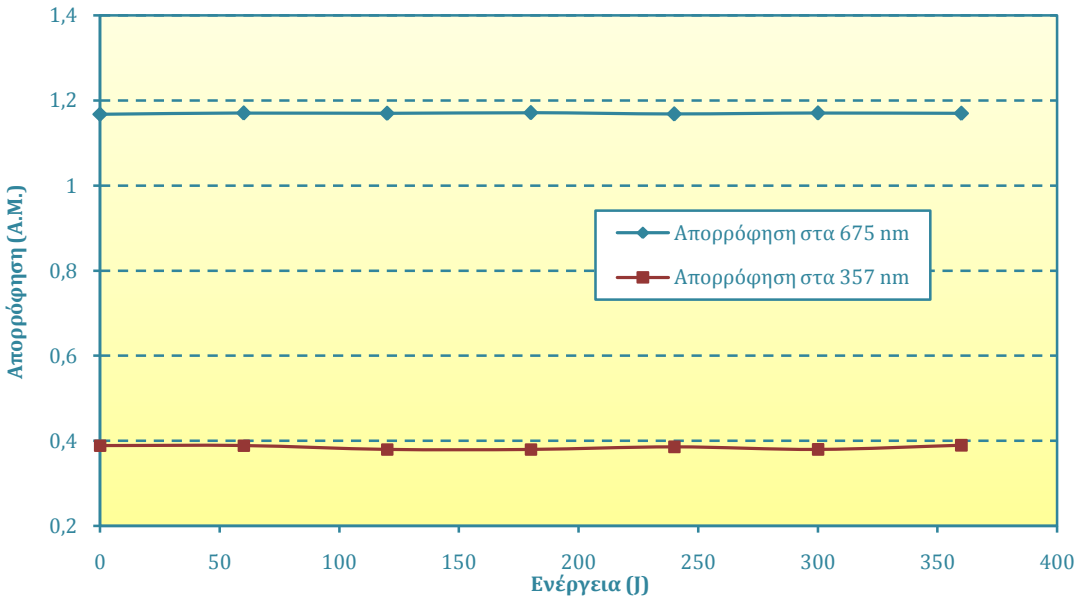
Σχήμα 7.25: *Διάγραμμα απορρόφησης-δόσης ενέργειας διαλύματος AlClPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6} Μ. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 661 nm (25 mW/cm²)*



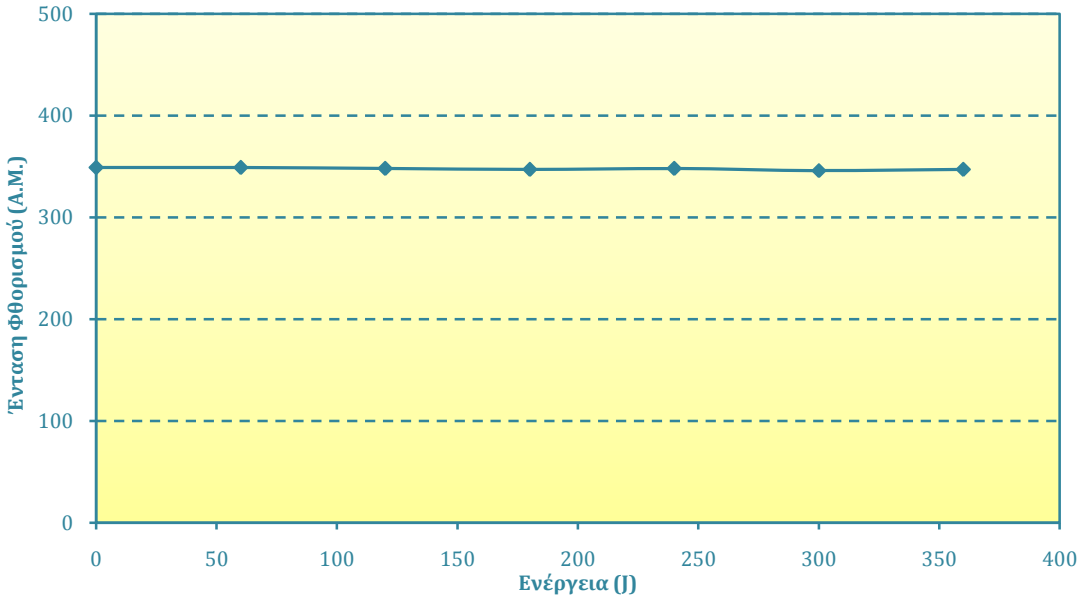
Σχήμα 7.26: *Διάγραμμα φθορισμού-δόσης ενέργειας AlClPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6}Μ. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 661 nm (25 mW/cm²)*

Στη συνέχεια των μελετών και αφού κρίθηκε απαραίτητη η αντικατάσταση του διοδικού laser 661 nm με διοδικό laser 670 nm οι αντίστοιχες μελέτες έγιναν και για το νέο laser αφού το μήκος κύματος του φωτός στο νέο laser ήταν διαφορετικό αλλά είχε και τη δυνατότητα πολύ μεγαλύτερης ισχύος εξόδου ≈ 1W. Η έξοδος του laser για τη διεξαγωγή αυτών των μελετών ρυθμίστηκε έτσι ώστε η ισχύς μετά το

διαχύτη να είναι 50, 75 και 100 mW/cm^2. Οι μεταβολές στις κύριες κορυφές απορρόφησης και φθορισμού της φθαλοκυανίνης φαίνονται στα Σχήματα 7.27-7.32.



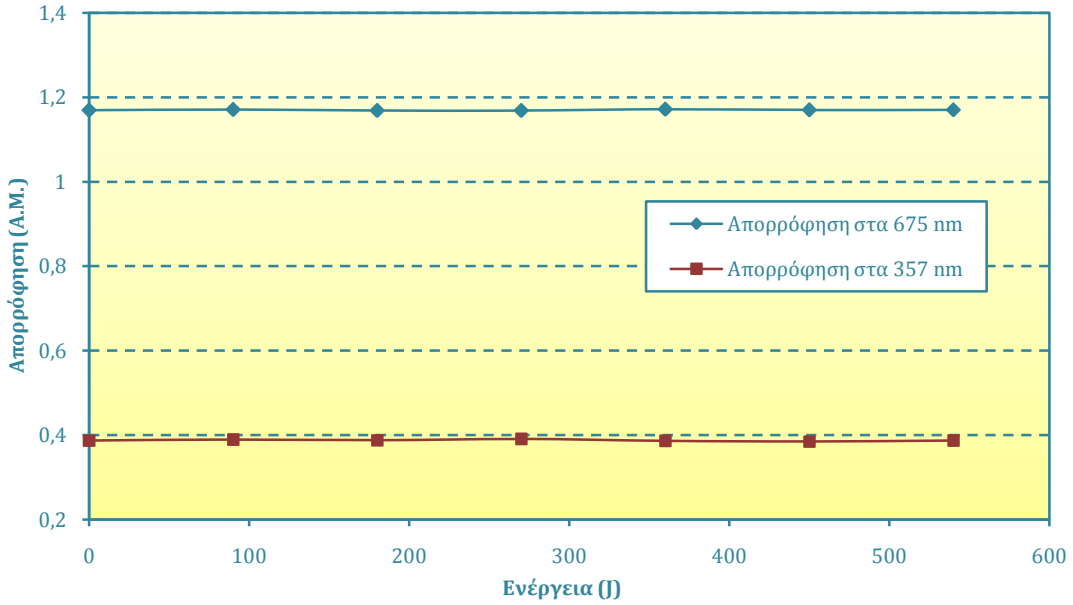
Σχήμα 7.27: *Διάγραμμα απορρόφησης-δόσης ενέργειας διαλύματος AlClPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6} Μ. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 670 nm (50 mW/cm²)*



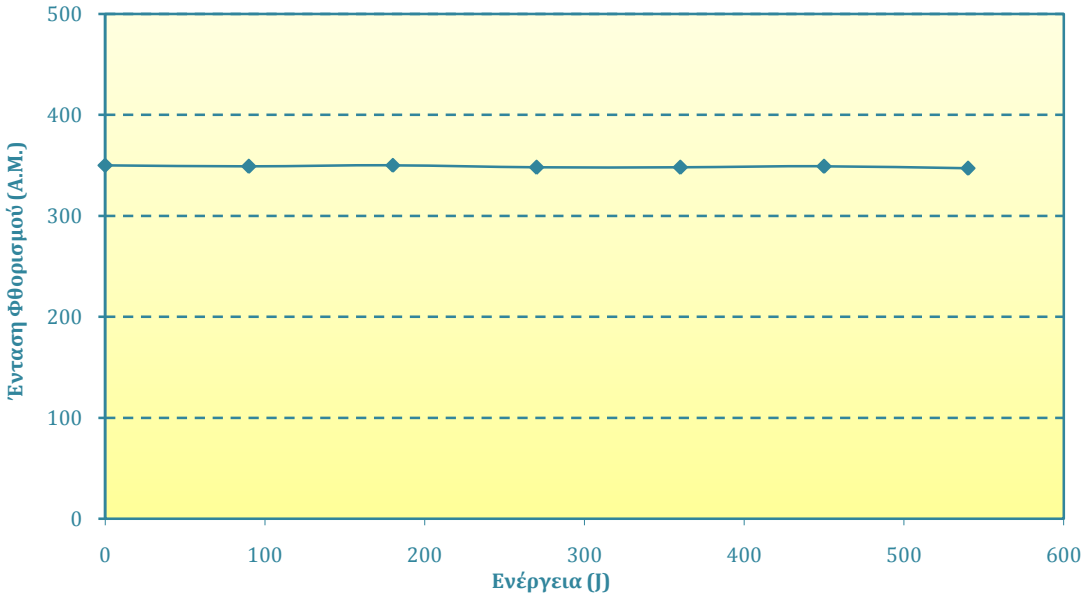
Σχήμα 7.28: *Διάγραμμα φθορισμού-δόσης ενέργειας διαλύματος AlClPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6} Μ. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 670 nm (50 mW/cm²)*

Κατά την παρατήρηση και επεξεργασία των φασμάτων των διαλυμάτων προέκυψε ότι:

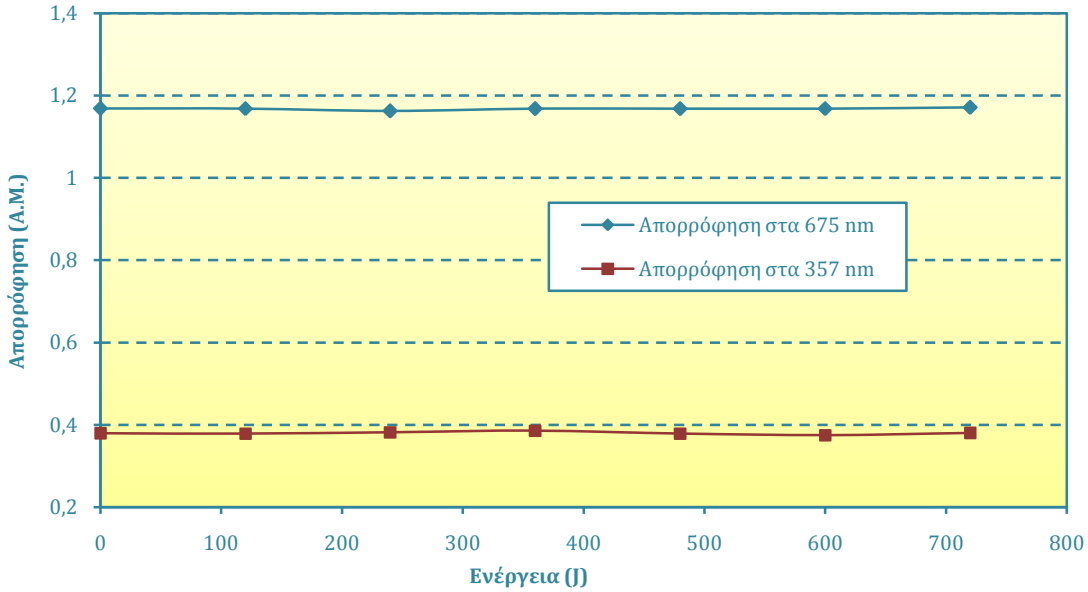
- Καμία σημαντική μεταβολή δεν παρουσιάστηκε στα σημεία όπου στα φάσματα παρουσιάζονταν μέγιστα απορρόφησης ή φθορισμού.
- Καμία σημαντική μεταβολή δεν παρουσιάστηκε στο πλάτος των κορυφών απορρόφησης και φθορισμού.



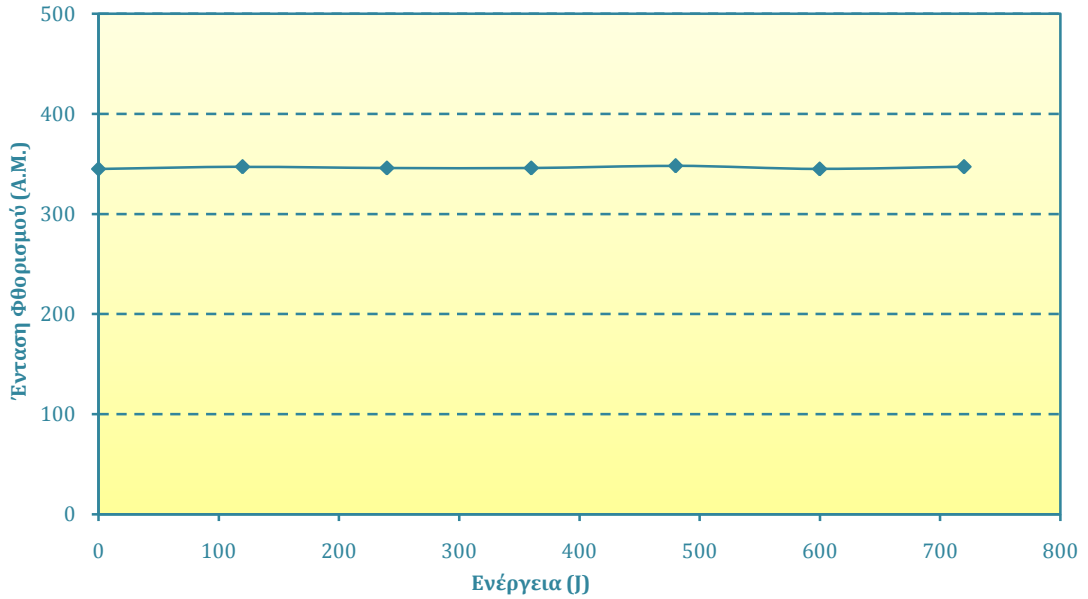
Σχήμα 7.29: *Διάγραμμα απορρόφησης-δόσης ενέργειας διαλύματος AlClPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6} Μ. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 670 nm (75 mW/cm²)*



Σχήμα 7.30: *Διάγραμμα φθορισμού-δόσης ενέργειας διαλύματος AlClPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6} Μ. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 670 nm (75 mW/cm²)*



Σχήμα 7.31: *Διάγραμμα απορρόφησης-δόσης ενέργειας διαλύματος AlClPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6} M. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 670 nm (100 mW/cm²)*

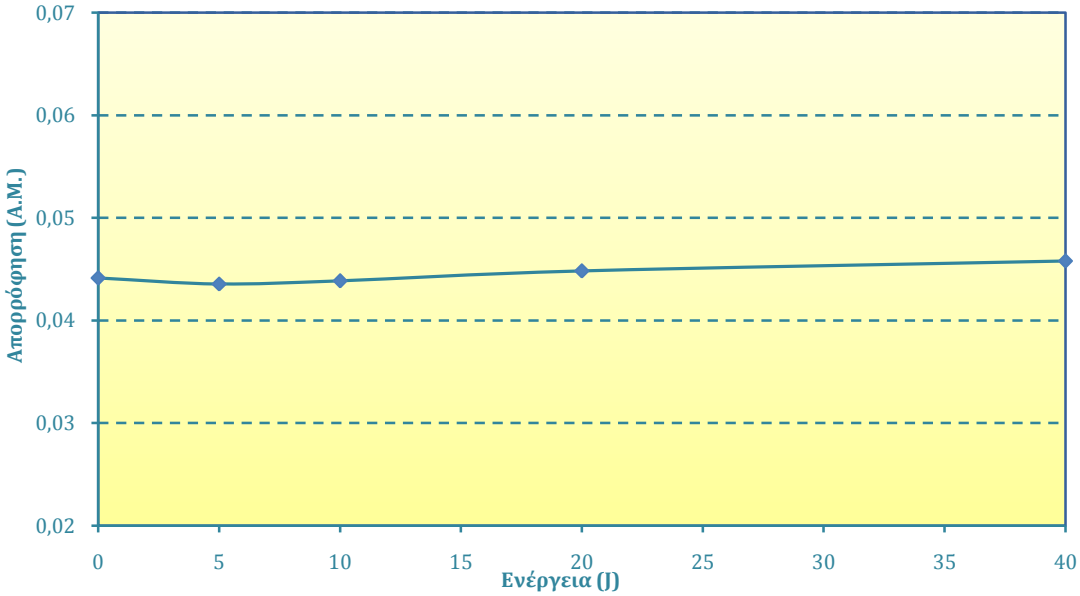


Σχήμα 7.32: *Διάγραμμα φθορισμού-δόσης ενέργειας διαλύματος AlClPc σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6} M. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 670 nm (100 mW/cm²)*

- Δεν εμφανίστηκε κάποια νέα κορυφή ούτε στο φάσμα απορρόφησης ούτε στο φάσμα φθορισμού, ακόμη και μετά από 1 h ακτινοβόλησης με 100 mW/cm^2. Επίσης όπως φαίνεται και στα διαγράμματα απορρόφησης στις κύριες κορυφές των φασμάτων (357 και 675 nm) σε σχέση με τη δόση ενέργειας η μεταβολή της απορρόφησης είναι στατιστικά μη σημαντική (μηδενική). Το ίδιο παρατηρείται

και στα διαγράμματα έντασης φθορισμού (στην κύρια κορυφή του φάσματος 680 nm).

Ομοίως για τις μελέτες της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-6} M. Το διάλυμα αυτό ακτινοβολήθηκε με το διοδικό laser 652 nm για χρονικά διαστήματα από 50 sec έως 25 min με ακτινοβόληση 50 mW/cm^2. Οι μεταβολές στις κύριες κορυφές απορρόφησης και φθορισμού της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης φαίνονται στα Σχήματα 7.33-7.35.

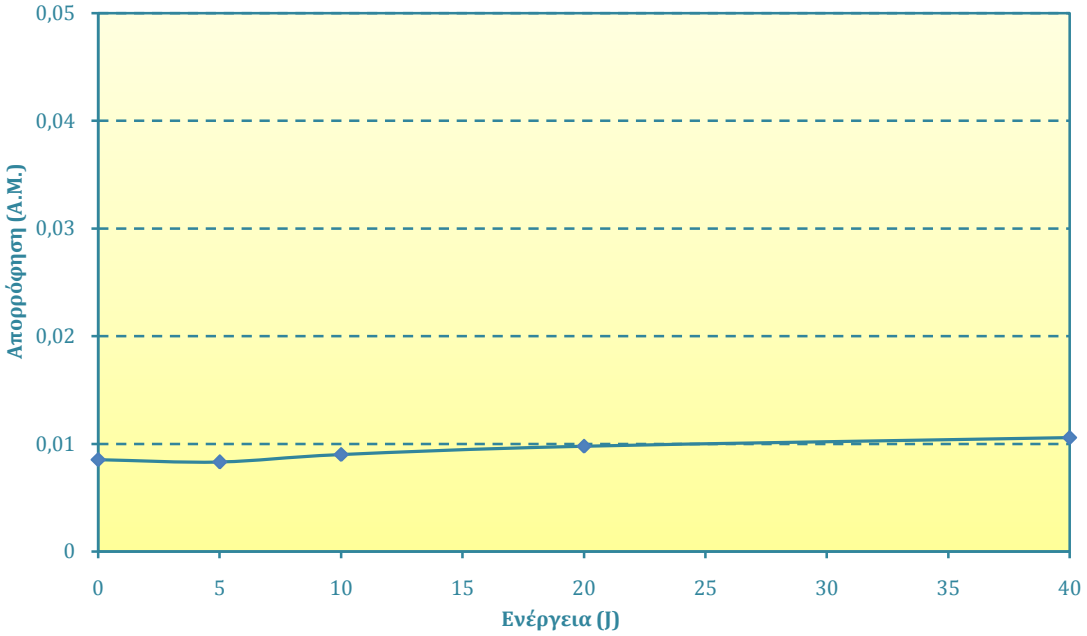


Σχήμα 7.33: *Διάγραμμα απορρόφησης (420 nm)-δόσης ενέργειας διαλύματος m-THPC σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6}M. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 652 nm (50 mW/cm^2)*

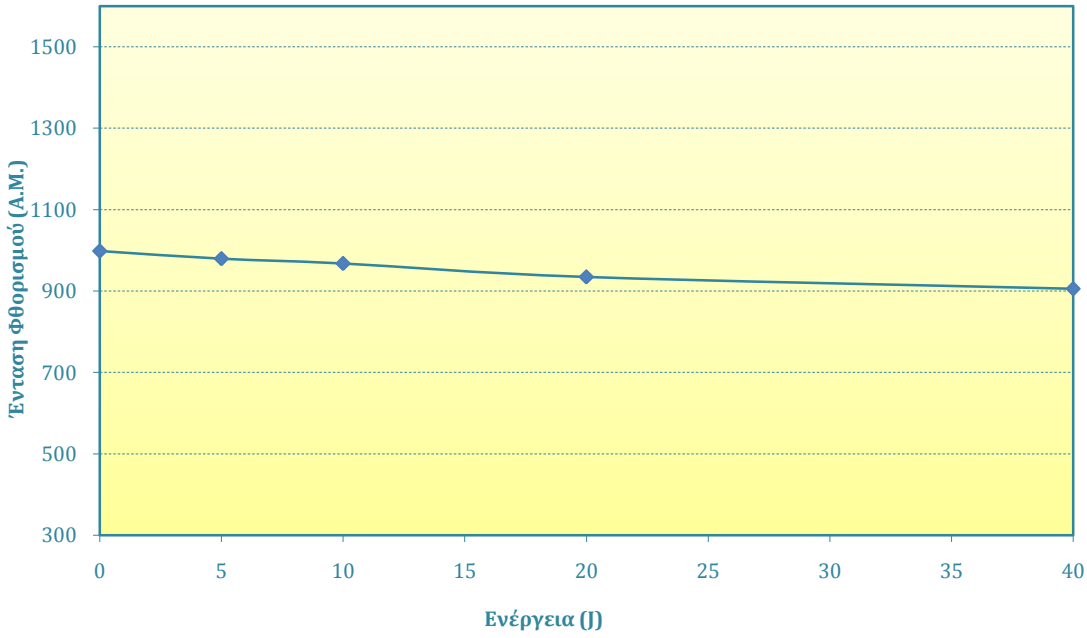
Κατά την παρατήρηση και επεξεργασία των φασμάτων των διαλυμάτων προέκυψε ότι:

- Σημαντικές μεταβολές παρουσιάστηκαν στα σημεία όπου στα φάσματα παρουσιάζονταν μέγιστα απορρόφησης. Συγκεκριμένα η ένταση της απορρόφησης στα 420 και 652 nm αυξάνονταν μετά την ακτινοβόληση.
- Σημαντικές μεταβολές παρουσιάστηκαν στα σημεία όπου στα φάσματα παρουσιάζονταν μέγιστο φθορισμού. Η ένταση φθορισμού μειώθηκε σημαντικά μετά την ακτινοβόληση.
- Δεν εμφανίστηκε σημαντική μεταβολή στο πλάτος των κορυφών απορρόφησης και φθορισμού.

- Δεν εμφανίστηκε κάποια νέα κορυφή ούτε στο φάσμα απορρόφησης ούτε στο φάσμα φθορισμού.



Σχήμα 7.34: *Διάγραμμα απορρόφησης (652 nm)-δόσης ενέργειας διαλύματος m-THPC σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6}M. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 652 nm (50 mW/cm²)*



Σχήμα 7.35: *Διάγραμμα φθορισμού-δόσης ενέργειας διαλύματος m-THPC σε DMSO συγκέντρωσης 10^{-6}M. Ακτινοβόληση με διοδικό laser 652 nm (50 mW/cm²)*

7.2.6. Συμπεράσματα που προκύπτουν από τη μελέτη φωτολεύκανσης των φωτοευαισθητοποιητών

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη είναι πολύ πιο σταθερό μόριο σε σχέση με την 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη. Πιο συγκεκριμένα η φθαλοκυανίνη δε φαίνεται να υφίσταται καμία μεταβολή στο μόριό της ακόμη και μετά από 1 h ακτινοβόλησης με 100 mW/cm^2. Αντίθετα η 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη φαίνεται να υφίσταται φωτοδιαμόρφωση (photomodification) ακόμη και μετά από ακτινοβόληση 100 s με 50 mW/cm^2. Οι αλλαγές αυτές στη δομή της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης δε φαίνεται να είναι σημαντικές (π.χ. διάσπαση της βασικής δομής) αφού δεν εμφανίζονται νέες κορυφές στο φάσμα απορρόφησης. Παρόλα αυτά από τη μείωση στην ένταση του φθορισμού, που παρατηρείται μετά την ακτινοβόληση (μείωση του σήματος έως και 28 %), φαίνεται πως οι μεταβολές αυτές είναι ικανές να επηρεάσουν σημαντικά τη φωτοδυναμική δράση του φωτοευαισθητοποιητή.

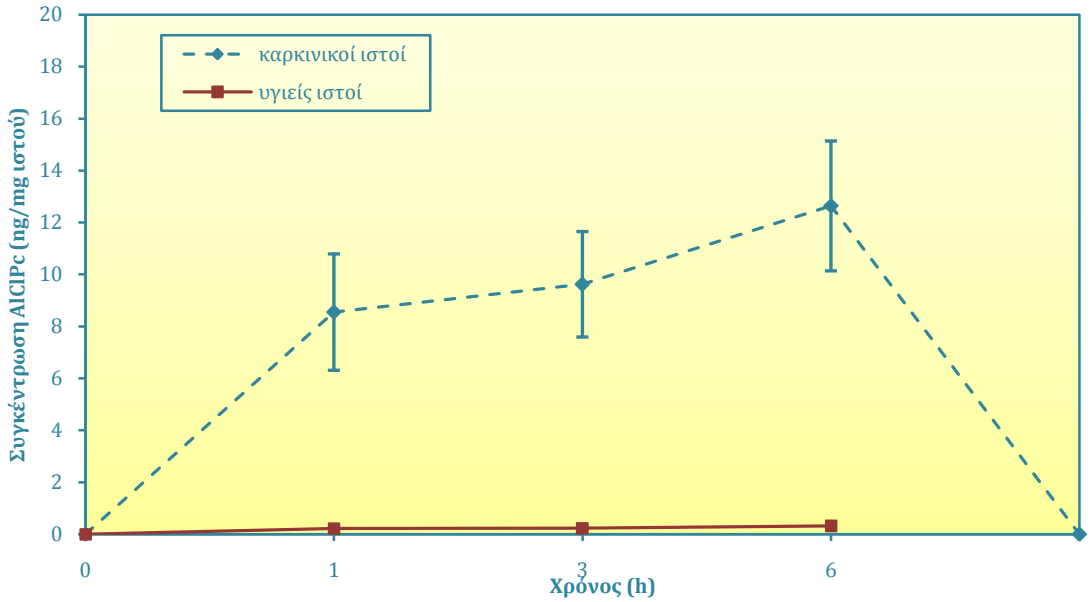
7.3. Αποτελέσματα ex vivo φαρμακοκινητικών μελετών φωτοευαισθητοποιητών

7.3.1. Φαρμακοκινητικές μελέτες χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης

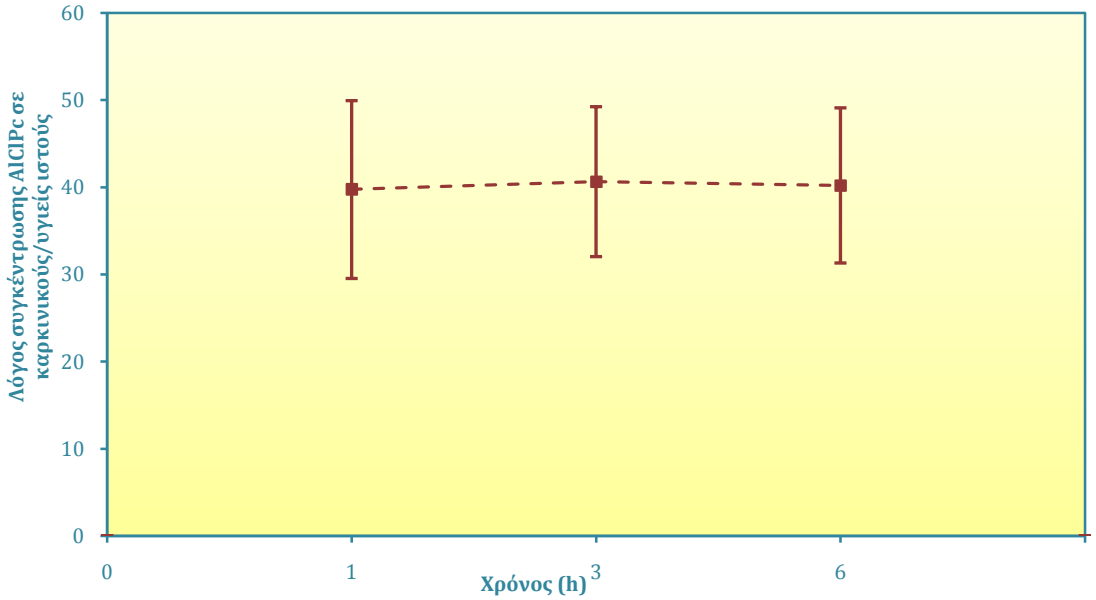
Οι φαρμακοκινητικές μελέτες της χλώρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης έγιναν βάσει του πρωτοκόλλου φαρμακοκινητικών μελετών που περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Στα φάσματα των δειγμάτων της 1^{ης} ομάδας, από ζώα δηλαδή στα οποία δεν είχε γίνει επάλειψη, δεν παρατηρήθηκε κάποια κορυφή γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει ότι δεν υπάρχει κάποιο βιολογικό μόριο το οποίο θα μπορούσε να δημιουργήσει προβλήματα στη μέτρηση. Από την επεξεργασία των ιστών των ζώων όλων των ομάδων δε βρέθηκαν ίχνη φωτοευαισθητοποιητή στα δείγματα υγιών περιοχών μακριά από αυτές που είχε γίνει η επάλειψη, ακόμη και 6 h μετά την επάλειψη. Αυτό συνεπάγεται ότι με αυτόν τον τρόπο χορήγησης της φθαλοκυανίνης επιλύεται ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας η γενικευμένη φωτοευαισθησία και τοξικότητα.

Στο διάγραμμα του Σχήματος 7.36 φαίνεται η συγκέντρωση της φθαλοκυανίνης σε υγιείς και καρκινικούς ιστούς στους οποίους είχε γίνει επάλειψη σε σχέση με το χρόνο. Η υψηλότερη μέση συγκέντρωση στον όγκο παρατηρήθηκε 6 h μετά την επάλειψη. Οι διαφορές της συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή στους καρκινικούς ιστούς όμως 1, 3, 6 h μετά την επάλειψη όμως δεν είναι στατιστικά

σημαντικές. Η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή στους υγιείς ιστούς είναι περίπου 40 φορές χαμηλότερη σε σχέση με αυτήν στους καρκινικούς ιστούς (Σχήμα 7.37). Η υψηλότερη συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή στους υγιείς ιστούς στους οποίους είχε γίνει επάλειψη παρατηρήθηκε στις 6 h 0.32 ng AlClPc / mg ιστού. Η συγκέντρωση αυτή ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικά από την αντίστοιχη συγκέντρωση 1 h μετά την επάλειψη 0.22 ng AlClPc / mg ιστού (α = 0.01).



Σχήμα 7.36: *Συγκέντρωση AlClPc σε καρκινικούς και υγιείς ιστούς σε σχέση με το χρόνο μετά την επάλειψη*

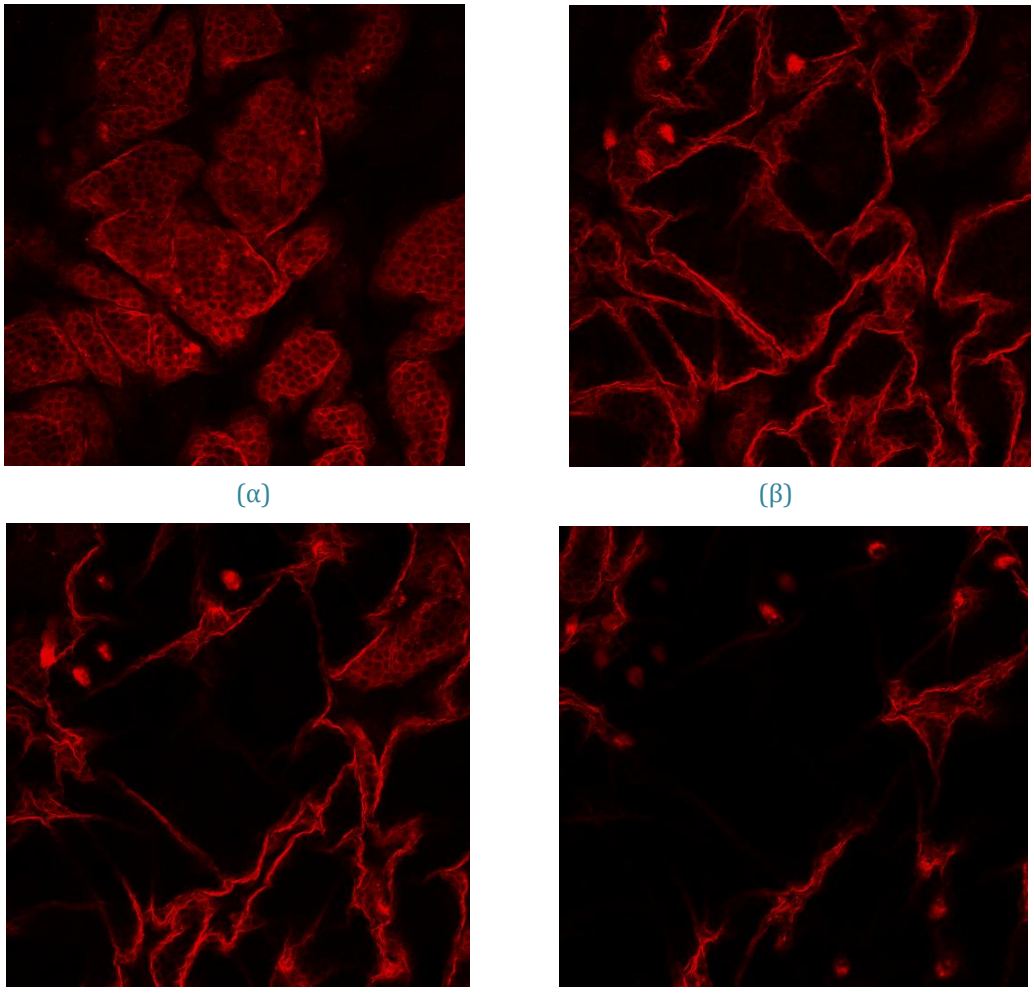


Σχήμα 7.37: *Λόγος συγκέντρωσης AlClPc σε καρκινικούς/υγιείς ιστούς σε σχέση με το χρόνο*

Στο διάγραμμα του Σχήματος 7.37 φαίνεται η αναλογία της συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή στους καρκινικούς ιστούς προς τη συγκέντρωση στους υγιείς ιστούς σε σχέση με το χρόνο που διήρκησε η επάλειψη. Η αναλογία αυτή δεν παρουσιάζει σημαντικές αλλαγές. Επομένως ως βέλτιστος χρόνος διάρκειας της επάλειψης επελέγη η 1h προκειμένου έτσι να μειωθεί και ο συνολικός χρόνος διάρκειας της θεραπείας.

7.3.2. Βάθος διείσδυσης AlClPc σε δερματικούς ιστούς

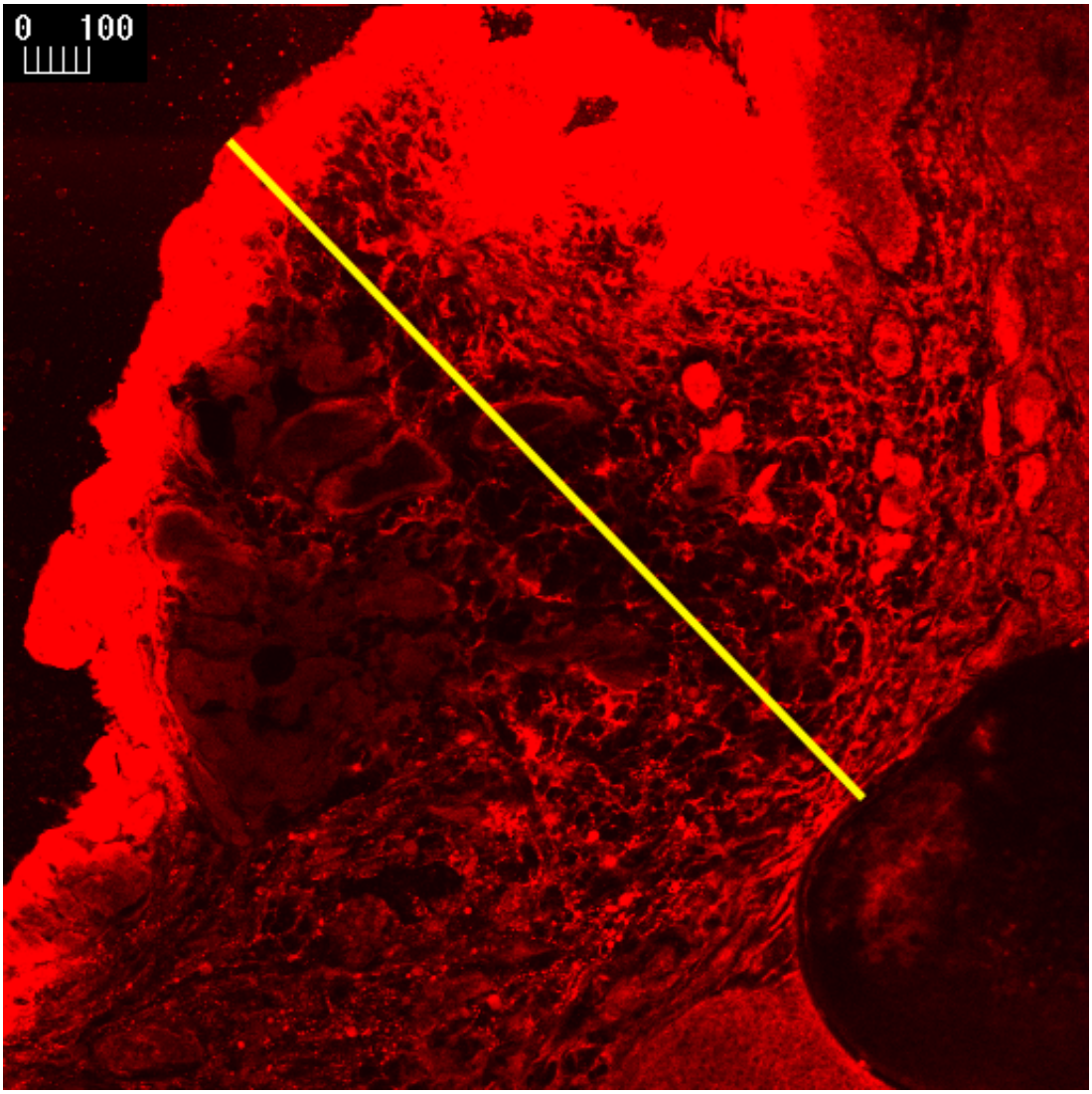
Η Εικόνα 7.1 δείχνει μία τυπική σειρά συνεστιακών εικόνων που έχουν προκύψει από τομές βιοψίας υγιούς δέρματος στο οποίο έχει γίνει επάλειψη διαλύματος χλώρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης για 1 h.



Εικόνα 7.1: *Τυπική σειρά εικόνων υγιούς δέρματος οι οποίες έχουν ληφθεί με συνεστιακό μικροσκόπιο 1 h μετά την επάλειψη με AlClPc: (α) 0, (β) 20, (γ) 40 και (δ) 60 μm από την επιφάνεια του δέρματος*

Οι εικόνες προκύπτουν από τομές 0, 20, 40, 60 μm από την επιφάνεια του δέρματος. Από παρατήρηση των εικόνων αυτών προκύπτει πως ο φθορισμός είναι ασθενής στην επιφάνεια του υγιούς δέρματος ενώ η έντασή του μειώνεται πηγαίνοντας προς τα βαθύτερα στρώματα της επιδερμίδας ενώ μηδενίζεται σχεδόν μετά τα 60 μm.

Στην Εικόνα 7.2 φαίνεται ο φθορισμός μιας κάθετης τομής καρκινώματος στο οποίο έγινε επάλειψη διαλύματος AlClPc για 1 h. Η ένταση του φθορισμού είναι πάρα πολύ ισχυρή στην επιφάνεια του καρκινώματος ενώ μειώνεται σταδιακά σε βαθύτερα στρώματα. Το μέσο βάθος διείσδυσης μετά από επεξεργασία τυπικών εικόνων κάθετων τομών υπολογίστηκε ότι είναι 1490 μm.



Εικόνα 7.2: *Εικόνα κάθετης τομής μη μελανωματικού δερματικού καρκινώματος η οποία έχει ληφθεί 1 h μετά την επάλειψη με AlClPc. Η κίτρινη γραμμή δείχνει το βάθος διείσδυσης. Η κλίμακα στο επάνω αριστερό μέρος της εικόνας αναφέρεται σε μm*

Από τη σύγκριση του βάθους διείσδυσης της AlClPc σε υγιείς και καρκινικούς δερματικούς ιστούς προκύπτει ότι το βάθος διείσδυσης στους καρκινικούς ιστούς είναι 25 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με τους υγιείς. Τα αποτελέσματα και οι εικόνες αυτές συμπίπτουν και δικαιολογούν την κατά 40 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση της AlClPc στους καρκινικούς σε σχέση με τους υγιείς ιστούς όπως αυτή προέκυψε από την ex vivo φασματοφωτομετρική μελέτη.

7.3.3. Φαρμακοκινητικές μελέτες 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης

Η συγκέντρωση της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης υπολογίστηκε για χρονικά διαστήματα 4 και 6 h μετά την επάλειψη γιατί 1 h μετά την επάλειψη η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή στον ιστό ήταν πάρα πολύ μικρή. Η συγκέντρωση της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδρο-πορφυρίνης στους όγκους ήταν (5.74 ± 3.28 ng / mg ιστού), 4 h μετά την επάλειψη και 7.56 ± 6,46 ng / mg ιστού (M.T. ± T.A.), 6 h μετά την επάλειψη. Δεν βρέθηκαν ίχνη φωτοευαισθητοποιητή ούτε στους υγιείς ιστούς στους οποίους έγινε επάλειψη ούτε σε υγιείς δερματικούς ιστούς μακριά από τα σημεία που έγινε η επάλειψη.

Βάσει αυτών των δεδομένων και επειδή η διαφορά της συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή στους ιστούς για τα δύο χρονικά διαστήματα δεν είναι σημαντική ως βέλτιστος χρόνος διάρκειας της επάλειψης επελέγησαν οι 4 h προκειμένου να μειωθεί και ο συνολικός χρόνος της θεραπείας.

7.3.4. Συμπεράσματα

Έχει ήδη αναφερθεί ότι, μία ουσία θα πρέπει να πληροί κάποια χαρακτηριστικά προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως φωτοευαισθητοποιητής όπως, να προσλαμ-βάνεται και να κατακρατείται επιλεκτικά από τα καρκινικά κύτταρα. Και οι δύο φωτοευαισθητοποιητές που μελετήθηκαν παρουσιάζουν αυτή την ιδιότητα. Και στους δύο ο λόγος συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή στους καρκινικούς / υγιείς ιστούς είναι μεγαλύτερος του 40. Η 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη φαίνεται μάλιστα να απορροφάται από τους υγιείς ιστούς σε μικρότερες συγκεντρώσεις από 0.14 ng/mg ιστού που είναι η ακρίβεια της μεθόδου.

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης έναντι της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης είναι ότι απορροφάται σημαντικά από τα καρκινικά κύτταρα μόλις 1 h μετά την επάλειψη μειώνοντας

σημαντικά το συνολικό χρόνο της θεραπείας. Επίσης επειδή οι φωτοευαισθητοποιητές έχουν περίπου ίσα μοριακά βάρη (MB_{AlClPc}=675, $MB_{m\text{-}THPC}$=680) η γραμμομοριακή συγκέντρωση της φθαλοκυανίνης στους καρκινικούς ιστούς είναι σχεδόν διπλάσια της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης.

7.4. Αποτελέσματα φωτοδυναμικής θεραπείας μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων

7.4.1. Φωτοδυναμική θεραπεία με χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη

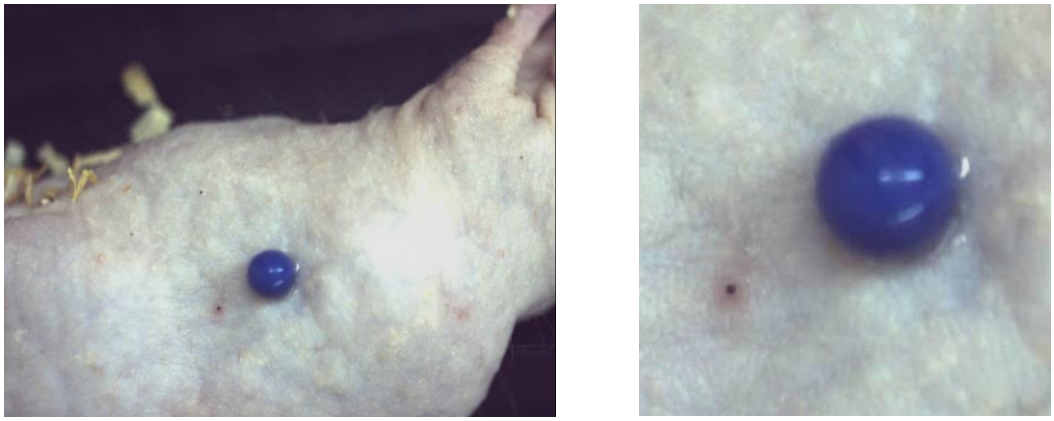
Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενες παραγράφους πολύ σημαντικά μεγέθη για τη φωτοδυναμική θεραπεία σχετικά με τη δοσιμετρία και κατά συνέπεια την επιτυχία της θεραπείας είναι η ακτινοβόληση (fluence rate mW/cm^2) και η συνολική δόση ενέργειας (total energy dose J/cm^2). Η ακτινοβόληση F.R. είναι ίση με την ισχύ της ακτινοβολίας μετά το διαχύτη της οπτικής ίνας δια του εμβαδού της ακτινοβολούμενης περιοχής (F.R.=P/E). Στο συγκεκριμένο σύστημα ακτινοβόλησης ο διαχύτης της οπτικής ίνας δίνει φωτεινή κηλίδα κυκλικής γεωμετρίας. Επομένως το εμβαδόν της ακτινοβολούμενης περιοχής θα είναι $E=\pi r^2$ όπου r η ακτίνα της ακτινοβολούμενης περιοχής ή αλλιώς η ακτίνα της φωτεινής κηλίδας.

Οι πρώτες μελέτες φωτοδυναμικής θεραπείας έγιναν με το διοδικό laser 661 nm. Στις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκαν μύες οι οποίοι έφεραν καρκινώματα με ακτίνα 4-5 mm. Από βιβλιογραφικά δεδομένα για άλλους φωτοευαισθητοποιητές η ακτινοβόληση που προτείνεται για μύες είναι >50mW/cm^2. Επομένως, επειδή η ισχύς της ακτινοβολίας μετά την έξοδο του διαχύτη είναι περίπου 30 mW και προκειμένου η ακτινοβόληση να είναι >50 mW/cm^2 επελέγησαν μύες με καρκινώματα διαμέτρου 4-5 mm και κατά συνέπεια εμβαδού οριζόντιας διατομής περίπου ίσου με 0.5 cm^2 ώστε η ακτινοβόληση να είναι περίπου 60 mW/cm^2.

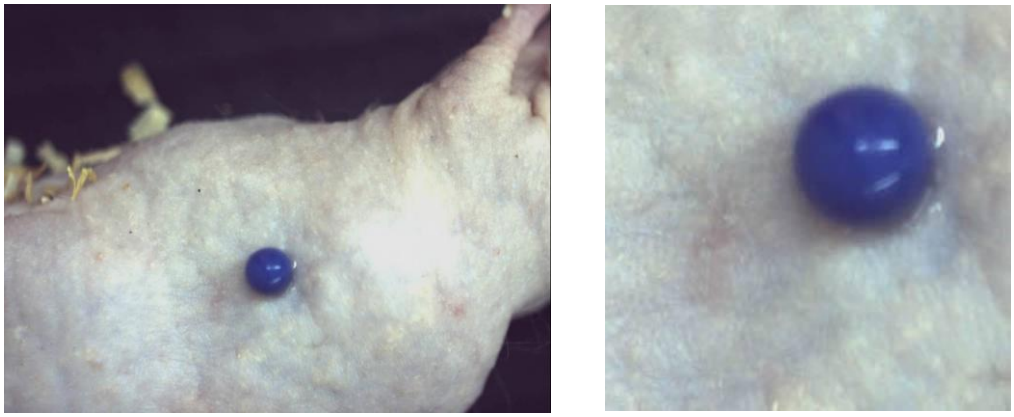
Από τους μύες στους οποίους εφαρμόστηκε το παραπάνω πρωτόκολλο σε ένα ποσοστό 60% ο όγκος είχε πλήρως απομακρυνθεί 3-7 ημέρες μετά τη θεραπεία. Στην περιοχή του όγκου για μία εβδομάδα περίπου υπήρχε μία πολύ μικρή πληγή η οποία εξαφανίζονταν μετά από 3-4 ημέρες (Εικόνες 7.3, 7.4, 7.5). Εκτός από τα ζώα τα οποία θυσιάστηκαν προκειμένου να εξεταστούν αντιπροσωπευτικά τμήματα του δέρματός τους από ιστοπαθολόγο τα υπόλοιπα παρακολουθούνταν για περισσότερο από 6 μήνες έως δηλαδή το φυσιολογικό τους θάνατο. Σε κανένα από τα θεραπευμένα ζώα δεν εμφανίστηκε όγκος στην περιοχή στην οποία εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο της φωτοδυναμικής, ούτε σε γειτονική περιοχή.

Σε κανένα από τα υπόλοιπα ζώα δεν παρατηρήθηκε εξάλειψη των όγκων με δεύτερη ή τρίτη εφαρμογή, ενώ η φωτοδυναμική θεραπεία δε φάνηκε να καθυστερεί καθόλου την εξέλιξη των όγκων προς καταστάσεις σοβαρότερης κακοήθειας. Η φωτοδυναμική θεραπεία δε φάνηκε να έχει καμία επίπτωση στη γενική υγεία των ζώων μετά ή και κατά τη διάρκεια της θεραπείας αν εξαιρεθεί μία μικρή απώλεια βάρους η οποία παρατηρείται για 2-3 ημέρες λόγω της νάρκωσης.

Εικόνα 7.3: *Εικόνες όγκου πριν τη φωτοδυναμική θεραπεία*



Εικόνα 7.4: *Εικόνες όγκου 4 ημέρες μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία*



Εικόνα 7.5: *Εικόνες όγκου 7 ημέρες μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία*

Πίνακας 7.5: *Χαρακτηριστικά μεγέθη του όγκου πριν τη φωτοδυναμική θεραπεία*

Μέγεθος	**Τιμή**
Διάμετρος	0.514 cm
Περίμετρος	1.287 cm
Εμβαδό	0.174 cm^2
Μήκος κυρίου άξονα	0.491 cm
Μήκος δευτερεύοντος άξονα	0.455 cm

Πίνακας 7.6: *Χαρακτηριστικά μεγέθη της πληγής 4 ημέρες μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία*

Μέγεθος	**Τιμή**
Διάμετρος	0.005 cm
Περίμετρος	0.03cm
Εμβαδό	0.001 cm^2
Μήκος κυρίου άξονα	0.029 cm
Μήκος δευτερεύοντος άξονα	0.029 cm

Η ανάγκη το σύστημα να μπορεί να θεραπεύσει καρκινώματα μεγαλύτερης διαμέτρου και παράλληλα η θεραπεία να επεκταθεί για λόγους ασφαλείας και σε μία μικρή περιοχή φαινομενικά υγιούς δέρματος γύρω από το καρκίνωμα, ακτίνας μεγαλύτερης από αυτή του καρκινώματος κατά 0.5 cm, κατέστησε απαραίτητη την αντικατάσταση του διοδικού laser 661 nm από ένα άλλο διοδικό laser μεγαλύτερης ισχύος εξόδου αλλά παρόμοιου μήκους κύματος. Για τους λόγους αυτούς οι μελέτες φωτοδυναμικής θεραπείας της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης συνεχίστηκαν με το διοδικό laser 670 nm ισχύος 1 W.

Προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες θεραπευτικές παράμετροι 43 συνολικά αρσενικοί και θηλυκοί μύες τύπου SKH-HR1 και SKH-HR2, οι οποίοι έφεραν ακανθοκυτταρικά καρκινώματα, χωρίστηκαν τυχαία σε 9 ομάδες, 7 πειραματικές και 2 ομάδες ελέγχου. Οι θεραπευτικές παράμετροι της κάθε ομάδας φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 7.7. Οι υπολογισμοί του όγκου των καρκινωμάτων έγιναν θεωρώντας ότι τα καρκινώματα προσεγγίζουν περισσότερο τη γεωμετρία κυλίνδρου (V=Eh).

Τα τελικά αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας φαίνονται στον Πίνακα 7.8. Ως προς την πλήρη ίαση όλοι οι συνδυασμοί θεραπευτικών παραμέτρων είχαν

τα ίδια αποτελέσματα εκτός από αυτούς των ομάδων 3 και 7. Κανένας από τους όγκους της ομάδας 3 δε θεραπεύτηκε πλήρως, ενώ 3 από τους 5 όγκους (60%) της ομάδας 7 θεραπεύτηκαν πλήρως. Σε όλες τις άλλες ομάδες μόνο το 20% των όγκων θεραπεύτηκαν πλήρως.

Πίνακας 7.7: *Ομάδες ζώων και θεραπευτικές παράμετροι*

Ομάδα No.	Τύπος ομάδας	Αριθμός μυών	Ακτινοβόληση (mW/cm²)	Συνολική δόση ενέργειας (J/cm²)	Χρόνος ακτινοβόλησης (min)
1	Καμία θεραπεία (ομάδα ελέγχου)	5	—	—	—
2	Μόνο διάλυμα (ομάδα ελέγχου)	3	—	—	—
3	Πειραματική ομάδα	5	100	75	12.5
4	Πειραματική ομάδα	5	100	150	25.0
5	Πειραματική ομάδα	5	100	250	42.0
6	Πειραματική ομάδα	5	75	100	22.5
7	Πειραματική ομάδα	5	75	150	45.0
8	Πειραματική ομάδα	5	50	100	33.5
9	Πειραματική ομάδα	5	50	150	50.0

Πίνακας 7.8: *Πλήρης ίαση κατά τη διάρκεια της θεραπείας*

Ομάδα No.	Τύπος ομάδας	Ακτινοβόληση (mW/cm²)	Συνολική δόση ενέργειας (J/cm²)	Πλήρης ίαση		
				7 ημέρες μετά την 1η συνεδρία	7 ημέρες μετά την 2η συνεδρία	7 ημέρες μετά την 3η συνεδρία
1	Καμία θεραπεία	—	—	0%	0%	0%
2	Μόνο διάλυμα	—	—	0%	0%	0%
3	Πειραματική ομάδα	100	75	0%	0%	0%
4	Πειραματική ομάδα	100	150	0%	0%	20%
5	Πειραματική ομάδα	100	250	0%	0%	20%
6	Πειραματική ομάδα	75	100	0%	20%	20%
7	Πειραματική ομάδα	75	150	60%	60%	60%
8	Πειραματική ομάδα	50	100	20%	20%	20%
9	Πειραματική ομάδα	50	150	20%	20%	20%

Όλες οι ομάδες οι οποίες δέχθηκαν ακτινοβόληση 100 mW/cm^2 εμφάνισαν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Αναλυτικότερα, το 60% των ζώων των ομάδων 3 και 4 και το 40% των ζώων της ομάδας 5 δεν επιβίωσαν μέχρι το τέλος της θεραπείας. Συνολικά μόνο 7 από τα 15 ζώα τα οποία δέχθηκαν ακτινοβόληση 100 mW/cm^2 επέζησαν μέχρι το τέλος της θεραπείας. Αντίθετα, στις υπόλοιπες θεραπευτικές ομάδες καθώς και στις ομάδες ελέγχου τα ποσοστά επιβίωσης ήταν 100% κατά τη διάρκεια της θεραπείας γεγονός το οποίο συνεπάγεται ότι η ακτινοβόληση των 100 mW/cm^2 είναι πολύ υψηλή, για το συγκεκριμένο μοντέλο ζώου τουλάχιστον.

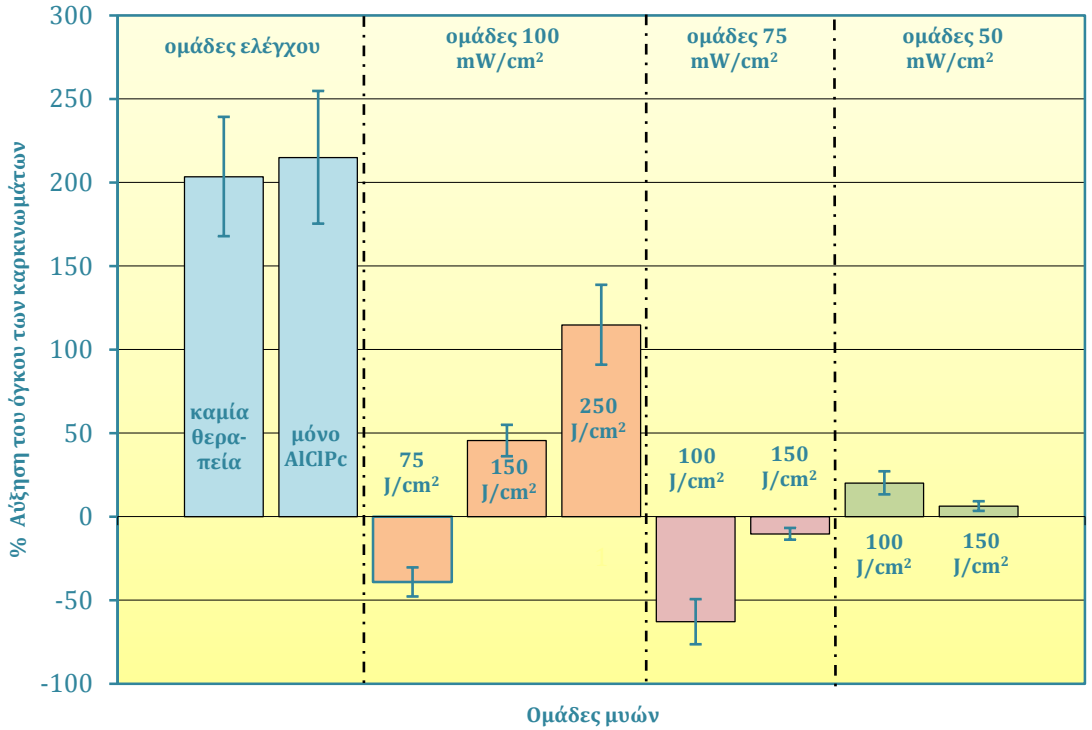
Η μέση αύξηση του όγκου των μη θεραπευμένων καρκινωμάτων 14 ημέρες μετά την 3^η συνεδρία φαίνεται στο διάγραμμα του Σχήματος 7.38. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα ο όγκος των μη θεραπευμένων καρκινωμάτων (ομάδα ελέγχου) αυξήθηκε κατά 203.5 % 5 εβδομάδες μετά την πρώτη καταγραφή. Η αντίστοιχη αύξηση για την ομάδα που δέχθηκε θεραπεία μόνο με το διάλυμα φθαλοκυανίνης ήταν 215 %.

Πίνακας 7.9: *Μέση τιμή και τυπική απόκλιση αύξησης του όγκου, t για Bonferoni t-test για κάθε πειραματική ομάδα*

Ομάδα	Μέση τιμή αύξησης όγκου	Τυπική απόκλιση	t
Ελέγχου	203.5	35.7	0.482
Μόνο διάλυμα	215.0	39.7	-14.763
100mW/cm^2-75J/cm^2	-39.1	8.7	-9.570
100mW/cm^2-150J/cm^2	45.5	9.4	-4.617
100mW/cm^2-250J/cm^2	114.8	23.9	-15.607
75mW/cm^2-100J/cm^2	-62.9	13.5	-13.327
75mW/cm^2-150J/cm^2	-10.3	3.5	-11.272
50mW/cm^2-100J/cm^2	20.2	6.9	-12.311
50mW/cm^2-150J/cm^2	6.3	2.9	0.482

Για τη στατιστική επεξεργασία της μέσης τιμής αύξησης του όγκου της κάθε ομάδας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ή κάποιες από τις ομάδες με παρόμοιες θεραπευτικές παραμέτρους χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test ή βελτιώσεις αυτού ανάλογα με τον αριθμό των συγκρινόμενων ομάδων. Για την εφαρμογή αυτών των κριτηρίων έγινε η παραδοχή ότι τα δείγματα ανήκουν σε κανονικούς

πληθυσμούς αφού προέρχονται από μη επεξεργασμένες βιολογικές μετρήσεις ή παρατηρήσεις. Αναλυτικά τα αποτελέσματα των κριτηρίων αυτών φαίνονται στον Πίνακα 7.9.



Σχήμα 7.38: *Αύξηση του όγκου των όχι πλήρως θεραπευμένων καρκινωμάτων μετά το τέλος της θεραπείας*

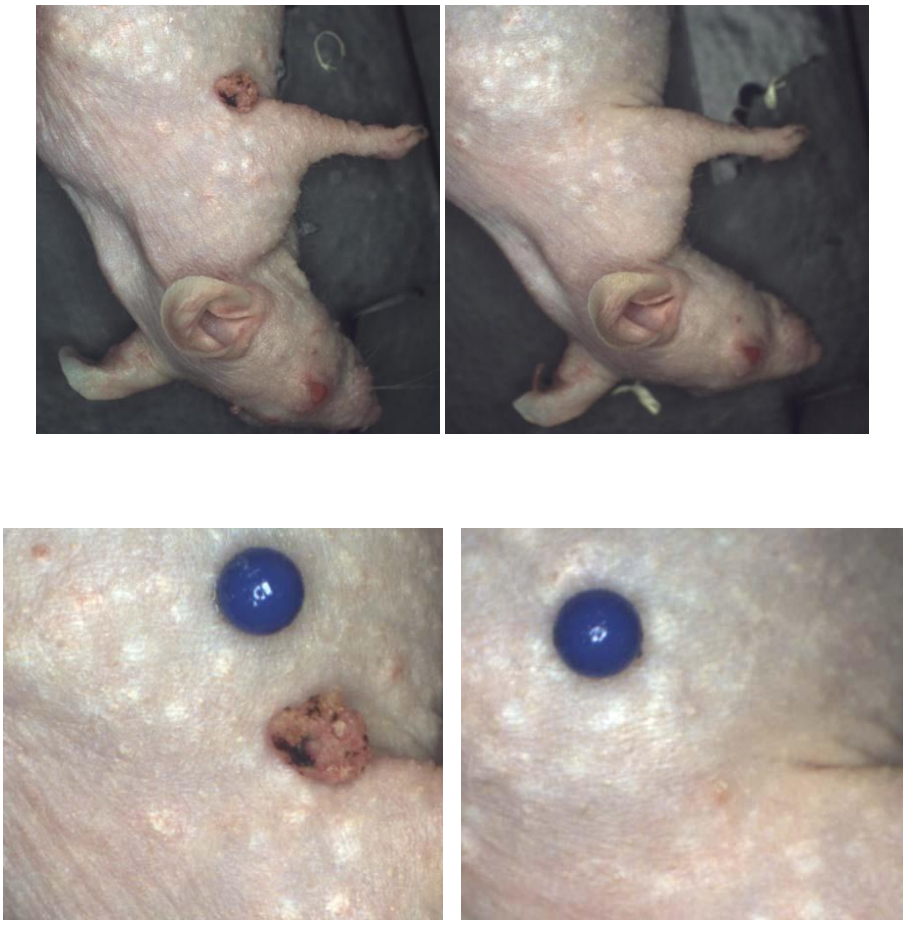
Η τιμή t υπολογίστηκε βάσει του τύπου $t = \frac{\overline{X_1} - \overline{X_2}}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$. Η τιμή $t_{critical}$ για ν=41 και α=0.001 όπως προκύπτει από τους πίνακες είναι 3.5. Άρα αφού για όλες τις ομάδες εκτός από την ομάδα στην οποία έγινε μόνο επάλειψη το |t| είναι μεγαλύτερο του $t_{critical}$ δεν μπορεί να γίνει αποδεκτή η μηδενική υπόθεση. Οι μέσες τιμές κάθε ομάδας δηλαδή διαφέρουν σημαντικά από τη μέση τιμή της ομάδας ελέγχου α=0.001.

Οι πειραματικές ομάδες οι οποίες δέχθηκαν ακτινοβόληση 100 mW/cm^2 εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους με α=0.05 (Student-Newman-Keuls test). Στην ομάδα η οποία δέχθηκε ακτινοβόληση 100 mW/cm^2 και συνολική ενέργεια 75 J/cm^2 παρουσιάστηκε αύξηση του όγκου των μη θεραπευμένων καρκινωμάτων κατά 39.1 %. Στην ομάδα η οποία θεραπεύτηκε με ακτινοβόληση 100 mW/cm^2 και συνολική ενέργεια 150 και 250 J/cm^2

παρουσιάστηκε αντίστοιχα αύξηση του όγκου των μη θεραπευμένων καρκινωμάτων κατά 45.5 και 114.8 %.

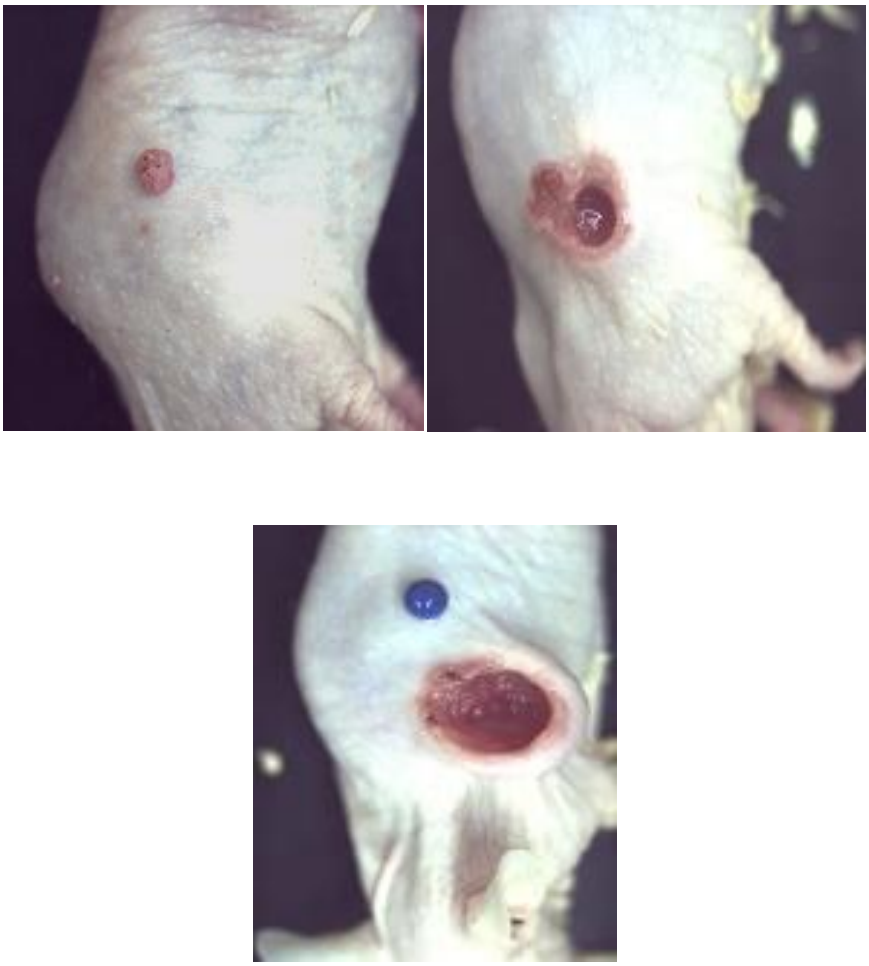
Οι ομάδες που θεραπεύτηκαν με 75 mW/cm^2 και συνολικές δόσεις ενέργειας 100 και 150 J/cm^2 παρουσίασαν αύξηση όγκου μη θεραπευμένων καρκινωμάτων 69.2 και 10.3% αντίστοιχα. Και αυτή η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική (p=0.001, Student's t test). Τα καρκινώματα των ομάδων που θεραπεύτηκαν με 50 mW/cm^2 παρουσίασαν αύξηση στον όγκο κατά 20.2 και 6.3% για δόσεις ενέργειας 100 και 150 J/cm^2. Η διαφορά στην αύξηση του όγκου μεταξύ αυτών των δύο ομάδων είναι στατιστικά σημαντική με p=0.005 (Student's t test).

Σε κανένα από τα ζώα στα οποία τα καρκινώματα είχαν θεραπευθεί πλήρως δεν παρουσιάστηκε επανεμφάνιση τους. Η θεραπεία φάνηκε να ήταν ανεκτή από την πλειοψηφία των ζώων εκτός από τα ζώα τα οποία δέχθηκαν ακτινοβόληση 100 mW/cm^2. Τα ζώα αυτά φαίνονταν να αισθάνονται κάποιον πόνο κατά τη διάρκεια της θεραπείας παρόλο που βρίσκονταν υπό την επήρεια του αναισθητικού.



Εικόνα 7.6: *Χρονική εξέλιξη πλήρως θεραπευμένου δερματικού ακανθοκυτταρικού καρκινώματος με χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη*

Μερικά από αυτά τα ζώα παρουσίασαν και κάποια όχι σοβαρά εγκαύματα στην ακτινοβολημένη περιοχή 2-3 ημέρες μετά τη θεραπεία. Τα εγκαύματα αυτά όμως επουλώθηκαν 7-10 ημέρες αργότερα χωρίς κάποια επιπλέον φροντίδα ή θεραπεία. Όλα όμως τα ζώα στα οποία τα καρκινώματα θεραπεύτηκαν πλήρως δεν παρουσίασαν καμία τέτοια βλάβη κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Χαρακτηριστικές εικόνες ενός πλήρως θεραπευμένου καρκινώματος φαίνονται στην Εικόνα 7.6. Στην Εικόνα 7.7 φαίνεται η χρονική εξέλιξη ενός δερματικού ακανθοκυτταρικού καρκινώματος το οποίο δεν δέχθηκε καμία θεραπεία ή φροντίδα. Όπως φαίνεται από την εικόνα αυτό το μοντέλο καρκίνου είναι πολύ επιθετικό.



Εικόνα 7.7: *Χρονική εξέλιξη δερματικού ακανθοκυτταρικού καρκινώματος το οποίο δε δέχθηκε καμία θεραπεία ή φροντίδα*

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι ο καλύτερος συνδυασμός θεραπευτικών παραμέτρων είναι διάρκεια επάλειψης 1 h, ακτινοβόληση 75 mW/cm^2 και συνολική δόση ενέργειας 150 J/cm^2.

7.4.2. Φωτοδυναμική θεραπεία με 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη

Για να βρεθούν οι βέλτιστες θεραπευτικές παράμετροι 28 συνολικά αρσενικοί και θηλυκοί μύες τύπου SKH-HR1 και SKH-HR2, οι οποίοι έφεραν ακανθοκυτταρικά καρκινώματα, χωρίστηκαν τυχαία σε 9 ομάδες, 7 πειραματικές και 2 ομάδες ελέγχου. Οι θεραπευτικές παράμετροι της κάθε ομάδας φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 7.10.

Πίνακας 7.10: *Ομάδες ζώων και θεραπευτικές παράμετροι*

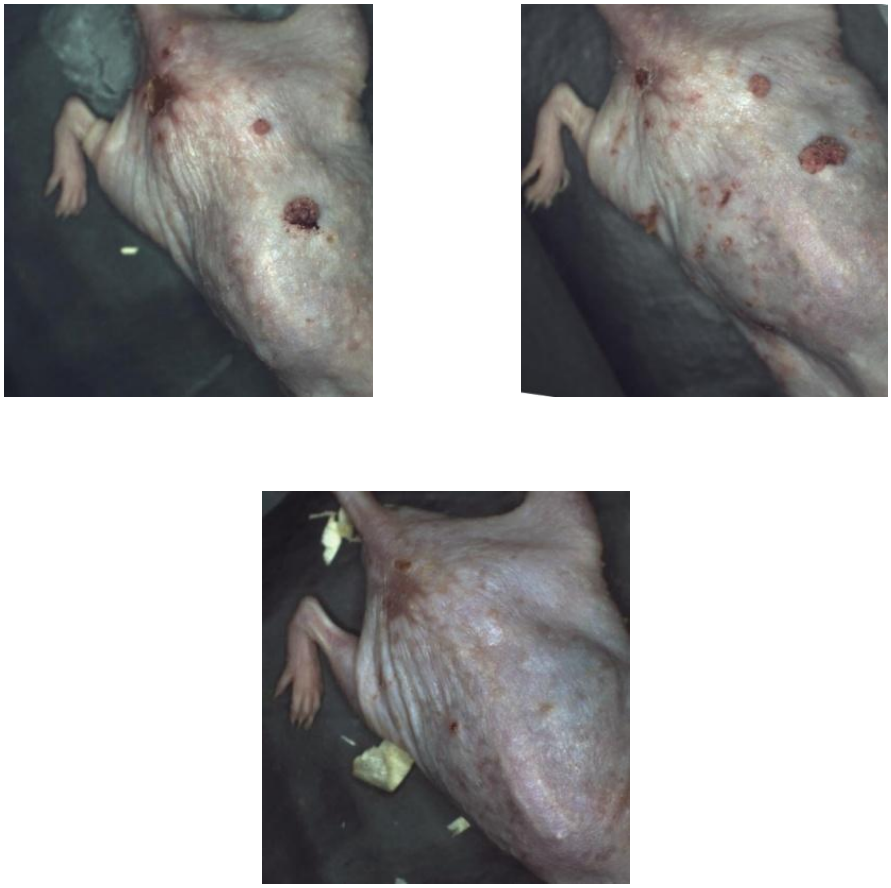
Ομάδα No.	Τύπος ομάδας	Αριθμός μυών	Ακτινοβόληση (mW/cm^2)	Συνολική δόση ενέργειας (J/cm^2)	Χρόνος ακτινοβόλησης (min)
1	Καμία θεραπεία (ομάδα ελέγχου)	5	–	–	–
2	Μόνο διάλυμα (ομάδα ελέγχου)	3	–	–	–
3	Πειραματική ομάδα	5	100	10	1.67
4	Πειραματική ομάδα	5	100	100	16.67
5	Πειραματική ομάδα	5	50	10	3.33
6	Πειραματική ομάδα	5	50	100	33,3

Πίνακας 7.11: *Πλήρης ίαση κατά τη διάρκεια της θεραπείας*

Ομάδα No.	Τύπος ομάδας	Ακτινοβόληση (mW/cm^2)	Συνολική δόση ενέργειας (J/cm^2)	Πλήρης ίαση 7 ημέρες μετά την 3η συνεδρία
1	Καμία θεραπεία (ομάδα ελέγχου)	–	–	0%
2	Μόνο διάλυμα (ομάδα ελέγχου)	–	–	0%
3	Πειραματική ομάδα	100	10	40%
4	Πειραματική ομάδα	100	100	60%
5	Πειραματική ομάδα	50	10	0%
6	Πειραματική ομάδα	50	100	20%

Τα τελικά αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας φαίνονται στον Πίνακα 7.11. Ως προς την πλήρη ίαση ο καλύτερος συνδυασμός θεραπευτικών παραμέτρων

φαίνεται να είναι ο συνδυασμός ακτινοβόλησης 100 mW/cm^2 και 100 J/cm^2, για τον οποίο το ποσοστό πλήρους ίασης είναι 60%. Για το συνδυασμό θεραπευτικών παραμέτρων 100 mW/cm^2 και 10 J/cm^2 το ποσοστό πλήρους ίασης ήταν 40%. Όμως και στους δύο συνδυασμούς παρουσιάστηκαν πολύ υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, 40%. Τα ποσοστά πλήρους ίασης για τους θεραπευτικούς συνδυασμούς 50 mW/cm^2, 100 J/cm^2 και 10 J/cm^2 αν και η θνησιμότητα ήταν μηδενική είναι πολύ μικρά 20 και 0% αντίστοιχα.



Εικόνα 7.8: *Χρονική εξέλιξη πλήρως θεραπευμένων δερματικών ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων με m-THPC*

Όλα τα καρκινώματα τα οποία δεν θεραπεύτηκαν πλήρως παρουσίασαν αύξηση κατά μέσο όρο στο μέγεθός τους κατά 110% δύο εβδομάδες μετά την τρίτη συνεδρία. Οι διαφορές στην αύξηση του όγκου των μη πλήρως θεραπευμένων καρκινωμάτων μεταξύ των διαφόρων ομάδων δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Τα μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας (το 80%) κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας εμφανίστηκαν 2-3 ημέρες μετά τη δεύτερη συνεδρία. Κανένας από τους θεραπευμένους όγκους δε θεραπεύτηκε μετά την πρώτη ή τη δεύτερη συνεδρία. Όλοι οι όγκοι δηλαδή θεραπεύτηκαν μετά την τρίτη συνεδρία. Ενδιαφέρον επίσης

παρουσιάζει το ότι ο όγκος μετά την πρώτη και τη δεύτερη συνεδρία των καρκινωμάτων που θεραπεύτηκαν πλήρως παρουσίασε αύξηση του μεγέθους τους.

7.4.3. Συμπεράσματα

Η τοπική φωτοδυναμική θεραπεία αν και θεωρείται μία από της πιο αποτελεσματικές μεθόδους για τη θεραπεία της ακτινικής κεράτωσης και των επιφανειακών βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων όπου τα ποσοστά επιτυχίας της ξεπερνούν το 90% δε θεωρείται κατάλληλη για ακανθοκυτταρικά και κυρίως ακανθοκυτταρικά καρκινώματα ύψους > 1 mm. Στη συγκεκριμένη μελέτη μελετήθηκε η τοπική δράση της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης και της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης σε ακανθοκυταρικά καρκινώματα τα οποία εμφάνιζαν ύψος από 2.5-8 mm.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής φαίνεται ότι οι κύριες συνιστώσες της δοσιμετρίας, ακτινοβόληση και συνολική δόση ενέργειας, παίζουν πάρα πολύ σημαντικό ρόλο στα αποτελέσματα της θεραπείας. Επίσης και για τους δύο φωτοευαισθητοποιητές φαίνεται πως υπάρχει μία τιμή ακτινοβόλησης (mW/cm^2) από την οποία και πάνω όχι μόνο η θεραπεία γίνεται αναποτελεσματική αλλά ακόμη και τοξική. Και για τους δύο φωτοευαισθητοποιητές η τιμή αυτή φαίνεται να είναι τα 100 mW/cm^2.

Για τη χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη η βέλτιστη ακτινοβόληση ανάμεσα σε αυτές που μελετήθηκαν είναι τα 75 mW/cm^2. Όταν ακανθοκυτταρικά δέχθηκαν αυτήν την ακτινοβόληση και συνολική δόση ενέργειας 150 J/cm^2 εμφάνισαν το μεγαλύτερο ποσοστό πλήρους ίασης, μηδενική επανεμφάνιση και σημαντική μείωση του όγκου των μη πλήρως θεραπευμένων καρκινωμάτων.

Στις μελέτες της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης δοκιμάστηκε η αποτελεσματικότητά της με συνδυασμούς θεραπευτικών παραμέτρων που χρησιμοποιούνται κατά τη συστηματική της χορήγηση. Το σημαντικότερο πρόβλημα είναι πως στην ακτινοβόληση στην οποία παρουσιάζεται το μεγαλύτερο ποσοστό πλήρους ίασης είναι και η ακτινοβόληση στην οποία παρουσιάζεται και ένα πάρα πολύ μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Το ποσοστό αυτό μάλιστα παραμένει σταθερό ακόμη και όταν η συνολική δόση ενέργειας μειωθεί στο 1/10.

Τα κοσμητολογικά αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας και με τους δύο φωτοευαισθητοποιητές όπως φαίνεται και από τις Εικόνες 7.3-7.6 και 7.8 είναι

άριστα. Ενώ επίσης καμία επιπλέον φροντίδα ή θεραπεία δε χρειάστηκε προκειμένου να αποκτήσει η επιδερμίδα των ζώων τη φυσιολογική της όψη στα σημεία στα οποία βρίσκονταν τα καρκινώματα.

Με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο τοπικής επιδερμικής χορήγησης του φωτοευαισθητοποιητή αποφεύχθηκε η ηπατική διέλευση του φωτοευαισθητοποιητή και η τοξικότητα που πιθανώς αυτή συνεπάγονταν. Ακόμη αποφεύχθηκε και η γενικευμένη φωτοευαισθησία που συνοδεύει τη συστηματική χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή, η οποία διαρκεί ακόμη και μήνες. Τα δύο παραπάνω πλεονεκτήματα σε συνδυασμό με την πολύ μικρή συνολική διάρκεια της θεραπείας θεωρούνται πολύ σημαντικά αφού βελτιώνουν κατά πολύ την ποιότητα ζωής του ασθενούς κατά τη διάρκεια της θεραπείας.

Η φθαλοκυανίνη βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων υπερτερεί της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης και ως προς τα ποσοστά ίασης σε μη τοξικά ποσά ακτινοβόλησης αλλά και ως προς τον αριθμό των συνεδριών που απαιτήθηκαν προκειμένου να θεραπευθούν πλήρως τα καρκινώματα. Από τις πειραματικές ομάδες που θεραπεύτηκαν με φθαλοκυανίνη όλα τα καρκινώματα θεραπεύτηκαν πλήρως αμέσως μετά την πρώτη συνεδρία με εξαίρεση αυτά που θεραπεύτηκαν με 100 mW/cm^2. Κανένα από τα πλήρως θεραπευμένα καρκινώματα με 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης δε θεραπεύτηκε πριν την τρίτη συνεδρία. Η φθαλοκυανίνη υπερτερεί της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης και ως προς την επιβράδυνση της αύξησης του όγκου των όχι πλήρως θεραπευμένων καρκινωμάτων.

7.5. Αντιοξειδωτική δράση μίγματος αντιοξειδωτικών

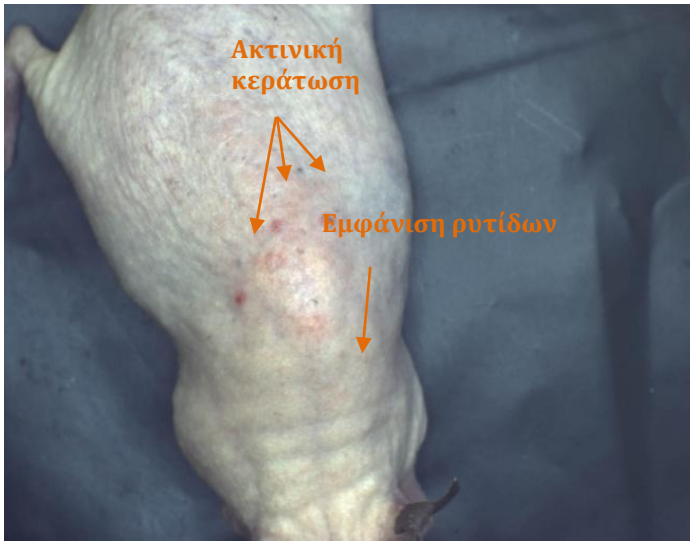
7.5.1. *In vivo αποτελέσματα προστατευτικής δράσης μίγματος αντιοξειδωτικών από καρκινογόνους παράγοντες*

Τα ζώα τα οποία κατανάλωναν υδατικό διάλυμα αντοξειδωτικού μίγματος σε σχέση με τα ζώα τα οποία κατανάλωναν νερό κατά τη διάρκεια των πρωτοκόλλων καρκινογένεσης αλλά και μετά από αυτό:

- Εμφάνισαν αργότερα σημάδια γήρανσης όπως εμφάνιση ρυτίδων.
- Εμφάνισαν αργότερα προκαρκινικές βλάβες όπως ακτινική κεράτωση (SKH-HR1) και blue nevi (SKH-HR2) (Εικόνες 7.9, 7.10).
- Παρουσίασαν μειωμένη παραγωγή μελανίνης (μύες τύπου SKH-HR2) (Εικόνα 7.10).

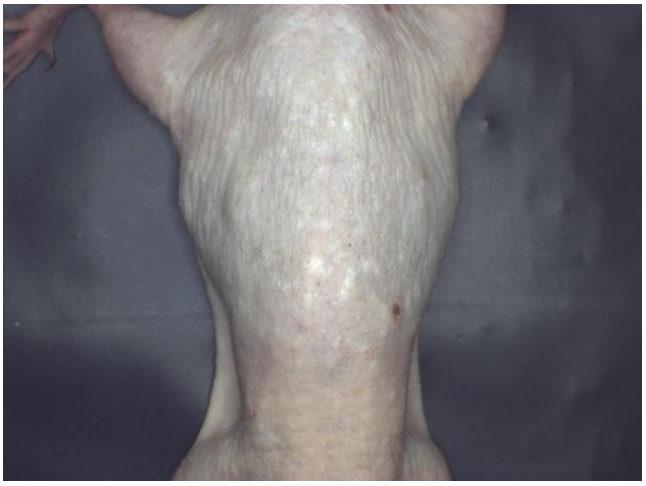
- Εμφάνισαν τα πρώτα θηλώματα αρκετές εβδομάδες αργότερα.
- Εμφάνισαν σε μικρότερο ποσοστό (επί του συνολικού αριθμού μυών) καρκινώματα.
- Εμφάνισαν μικρότερο αριθμό μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων.
- Εμφάνισαν μεγαλύτερο μέσο όρο ζωής.

(α)

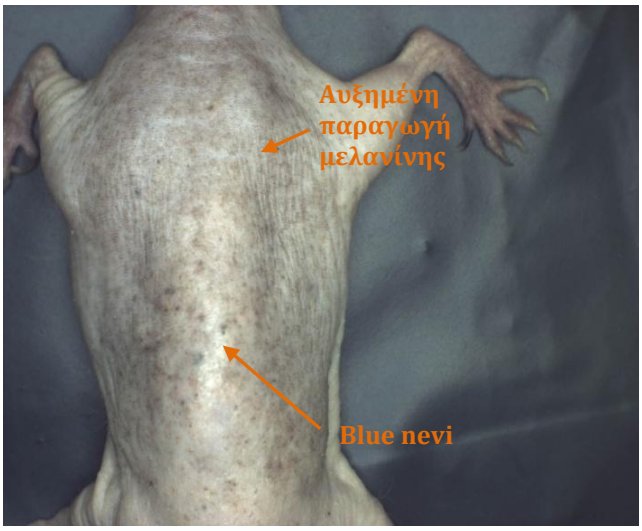


(β)

Εικόνα 7.9: *Μύες ίδιας ηλικίας οι οποίοι υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία. Στην (α) εικόνα εμφανίζεται μυς ο οποίος πριν και κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου καρκινογένεσης κατανάλωνε μίγμα αντιοξειδωτικών ενώ στη (β) μυς ο οποίος κατανάλωνε νερό. Οι εικόνες έχουν ληφθεί την δέκατη εβδομάδα ακτινοβόλησης*



(α)

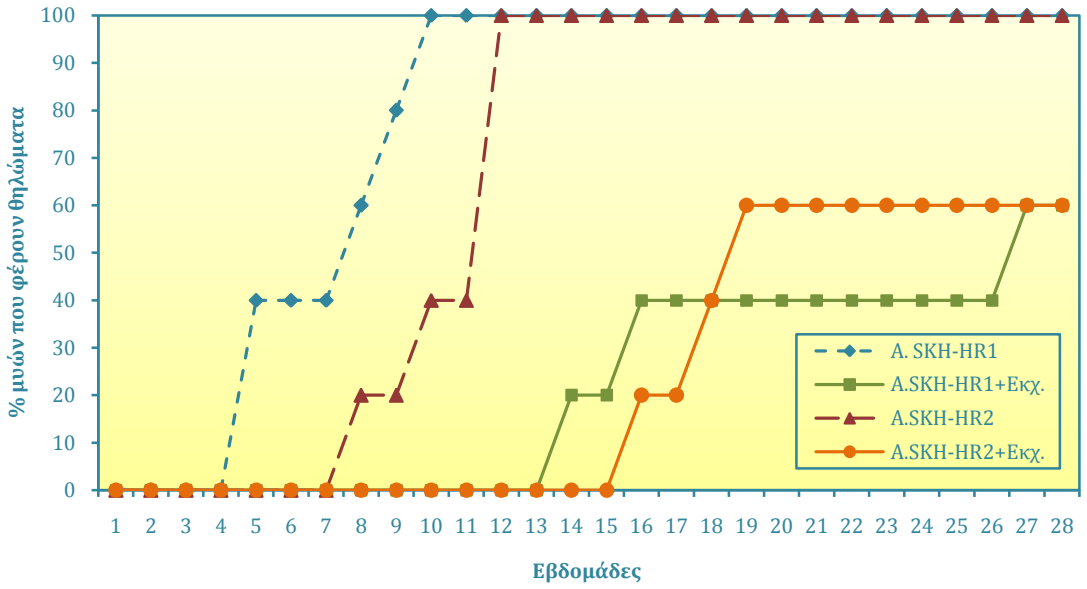


(β)

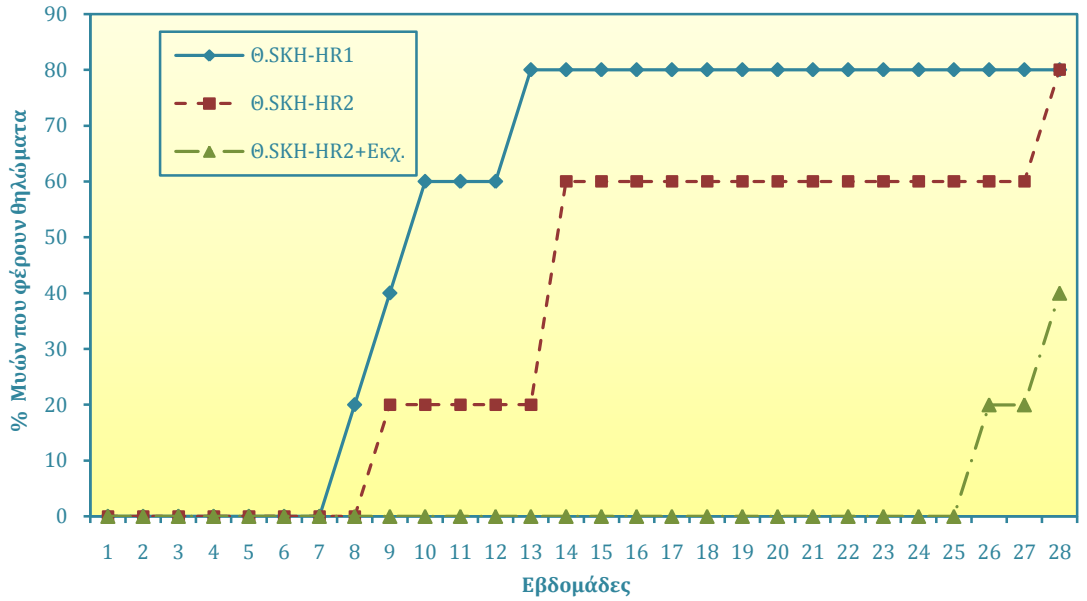
Εικόνα 7.10: *Μύες ίδιας ηλικίας οι οποίοι υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία και διμεθυλβενζανθρακένιο. Στην (α) εικόνα εμφανίζεται μυς ο οποίος πριν και κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου καρκινογένεσης κατανάλωνε μίγμα αντιοξειδωτικών ενώ στη (β) μυς ο οποίος κατανάλωνε νερό. Οι εικόνες έχουν ληφθεί αμέσως μετά τη λήξη του πρωτοκόλλου καρκινογένεσης*

Στα διαγράμματα των Σχημάτων 7.39 και 7.40 φαίνονται τα αποτελέσματα του εκχυλίσματος του φλοιού πεύκου ως προς την καθυστέρηση εμφάνισης των πρώτων θηλωμάτων στα ζώα στα οποία εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία και διμεθυλβενζανθρακένιο. Συγκεκριμένα στο διάγραμμα του Σχήματος 7.22 φαίνεται ότι η κατανάλωση αντιξειδωτικού εκχυλίσματος από τα ζώα καθυστέρησε την εμφάνιση των πρώτων θηλωμάτων 9 εβδομάδες για τα αρσενικά SKH-HR1 ζώα και 8 εβδομάδες για τα SKH-HR2. Η αντίστοιχη καθυστέρηση για θηλυκά ζώα ήταν 17 εβδομάδες για τα SKH-HR2

ενώ δεν εμφανίστηκαν θηλώματα στα θηλυκά SKH-HR1 τα οποία αντί για νερό κατανάλωναν διάλυμα εκχυλίσματος φλοιού πεύκου (Σχήμα 7.40).

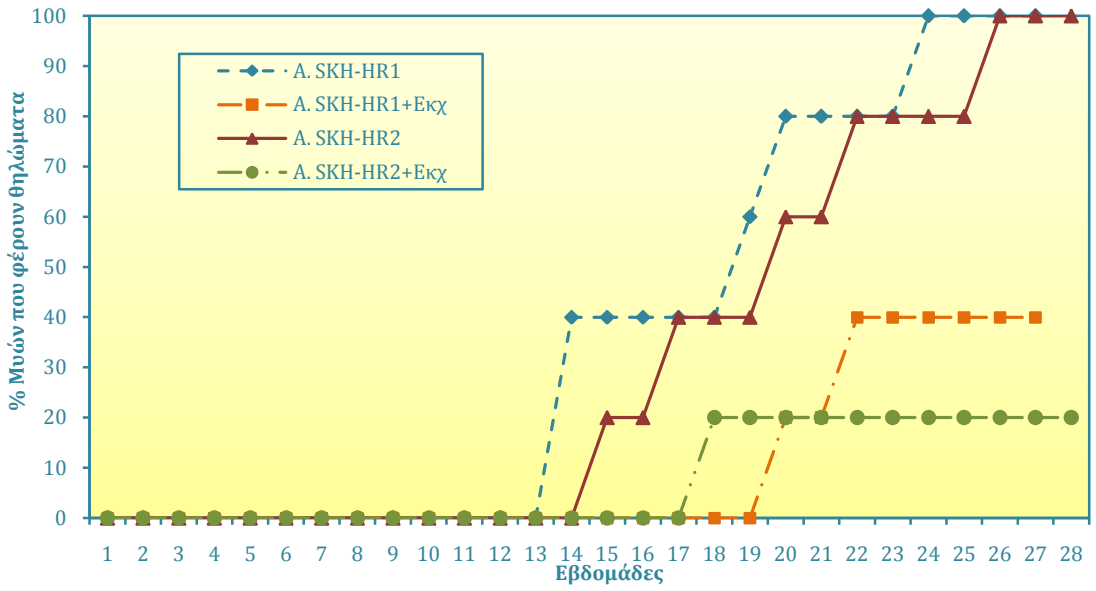


Σχήμα 7.39: *Εμφάνιση πρώτων θηλωμάτων σε αρσενικούς μύες SKH-HR1 και SKH-HR2, που υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία και διμεθυλβενζανθρακένιο. Με Α. σημειώνονται οι αρσενικοί μύες και με Εκχ. οι μύες που αντί για νερό κατανάλωναν υδατικό διάλυμα αντιοξειδωτικών*



Σχήμα 7.40: *Εμφάνιση πρώτων θηλωμάτων σε θηλυκούς μύες SKH-HR1 και SKH-HR2, που υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία και διμεθυλβενζανθρακένιο. Με Θ. σημειώνονται οι θηλυκοί μύες και με Εκχ. οι μύες που αντί για νερό κατανάλωναν υδατικό διάλυμα αντιοξειδωτικών*

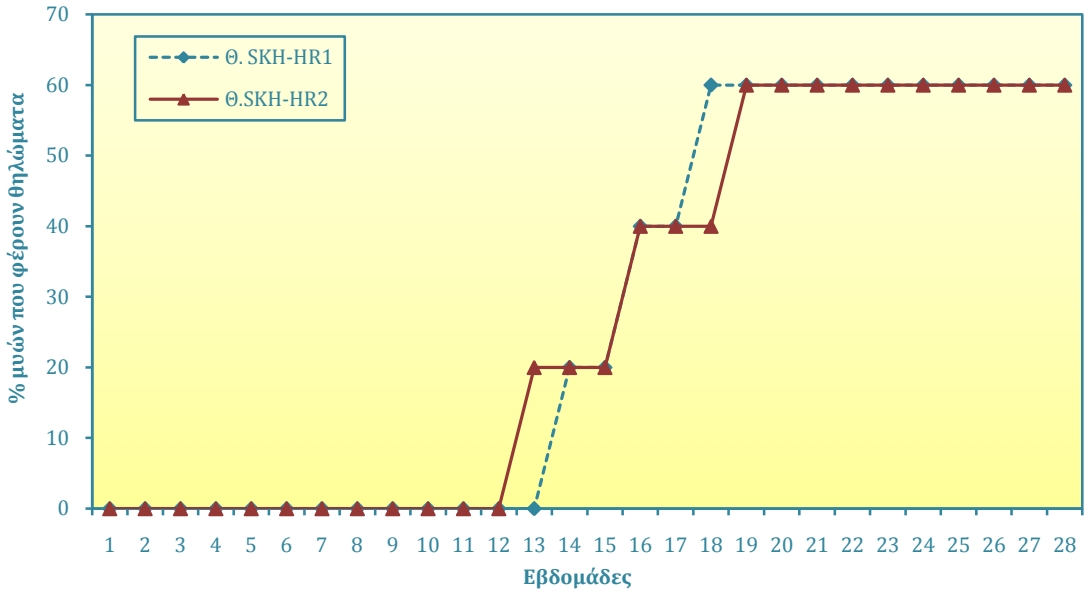
Τα αποτελέσματα του αντιοξειδωτικού εκχυλίσματος ως προς την καθυστέρηση εμφάνισης των πρώτων θηλωμάτων στα ζώα στα οποία εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία σχετικά με τα αρσενικά ζώα φαίνονται στο Σχήμα 7.41. Η καθυστέρηση εμφάνισης θηλωμάτων είναι 6 εβδομάδες για τα SKH-HR1 ζώα και 3 εβδομάδες για τα SKH-HR2. Αξιοσημείωτο είναι πως η χορήγηση διαλύματος εκχυλίσματος πεύκου απέτρεψε πλήρως την εμφάνιση θηλωμάτων και όγκων στους θηλυκούς μύες (Σχήμα 7.42).



Σχήμα 7.41: *Εμφάνιση πρώτων θηλωμάτων σε αρσενικούς μύες SKH-HR1 και SKH-HR2, που υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία. Με Α. σημειώνονται οι αρσενικοί μύες και με Εκχ. οι μύες που αντί για νερό κατανάλωναν υδατικό διάλυμα αντιοξειδωτικών*

Στο Σχήμα 7.43 φαίνονται τα τελικά ποσοστά των μυών που παρουσίασαν μη μελανωματικά δερματικά καρκινώματα αφού υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με διμέθυλβενζανθρακένιο και υπεριώδη ακτινοβολία. Ο όρος τελικό ποσοστό αναφέρεται στο ποσοστό των μυών οι οποίοι εμφάνισαν κάποιο μη μελανωματικό δερματικό καρκίνωμα μέχρι το τέλος της ζωής τους. Το τελικό ποσοστό των αρσενικών μυών και των δύο τύπων (SKH-HR1 και SKH-HR2) οι οποίοι έφεραν καρκινώματα ήταν 100%. Τα ποσοστά για τις αντίστοιχες ομάδες στις οποίες χορηγήθηκε εκχύλισμα αντιοξειδωτικών ήταν 60%. Δηλαδή το εκχύλισμα αντιοξειδωτικών μείωσε το ποσοστό των αρσενικών μυών που έφεραν όγκους κατά 40%. Παρόμοια, αν συγκρίνουμε το ποσοστό των θηλυκών μυών που εμφάνισαν

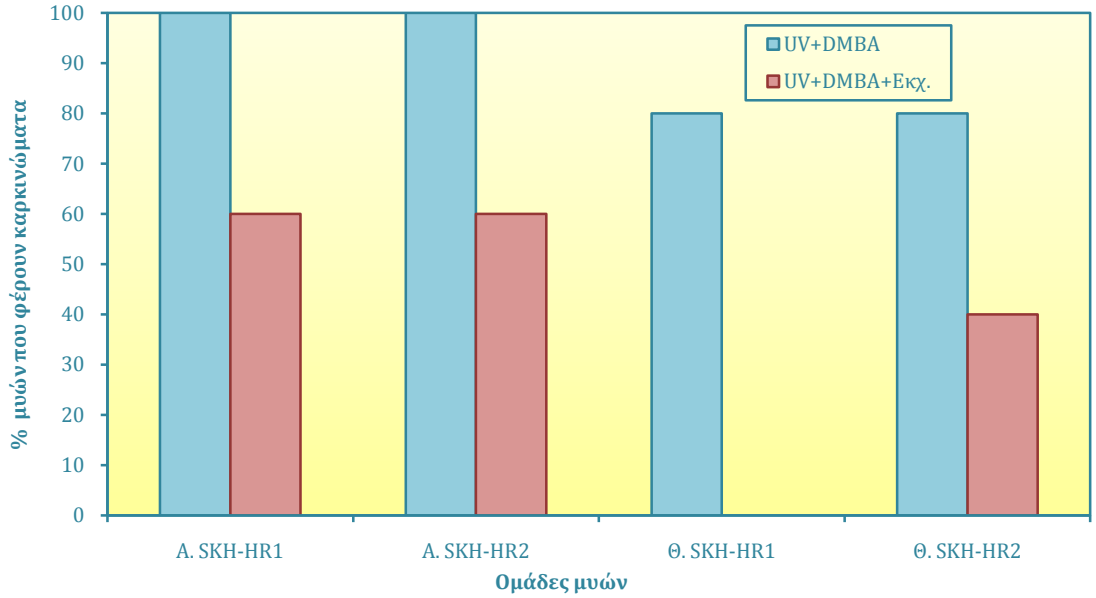
όγκους, στους οποίους δε χορηγήθηκε εκχύλισμα, 80% και για τους δύο τύπους (SKH-HR1 και SKH-HR2), με το ποσοστό των θηλυκών μυών στους οποίους χορηγήθηκε εκχύλισμα, 0% για τους SKH-HR1 και 40% για τους SKH-HR2, θα διαπιστώσουμε ότι η χορήγηση εκχυλίσματος μείωσε κατά 100% το ποσοστό των SKH-HR1 θηλυκών μυών που έφεραν όγκους και κατά 50% το ποσοστό των SKH-HR2.



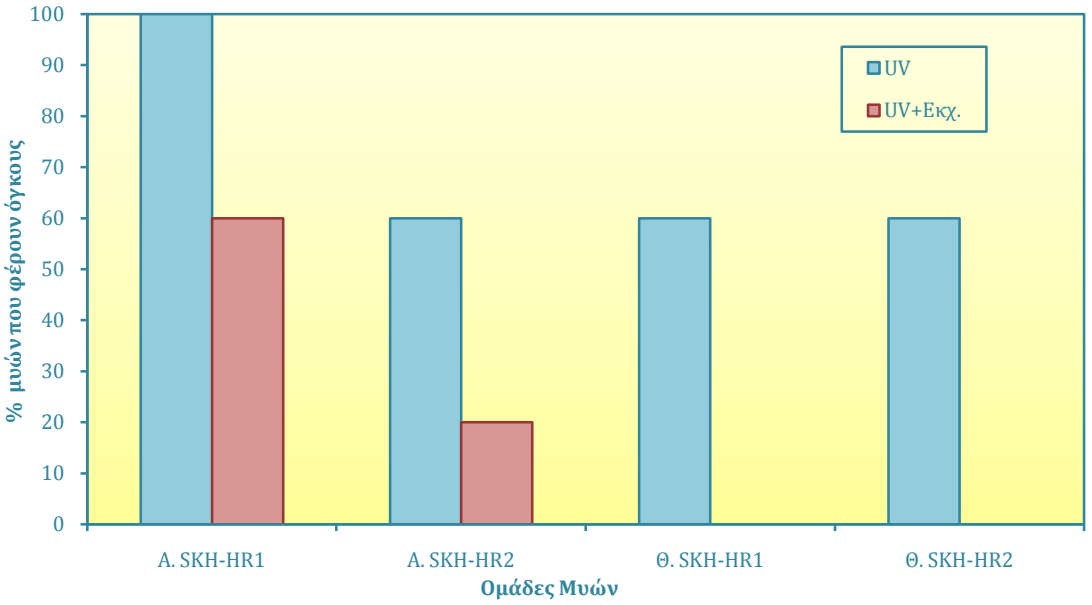
Σχήμα 7.42: *Εμφάνιση πρώτων θηλωμάτων σε θηλυκούς μύες SKH-HR1 και SKH-HR2, που υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία. Με Θ. σημειώνονται οι θηλυκοί μύες. Οι μύες που αντί για νερό κατανάλωναν υδατικό διάλυμα αντιοξειδωτικών δεν εμφάνισαν θηλώματα ή όγκους*

Στο Σχήμα 7.44 φαίνονται τα τελικά ποσοστά των μυών που παρουσίασαν μη μελανωματικά δερματικά καρκινώματα αφού υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία. Το τελικό ποσοστό των αρσενικών μυών τύπου SKH-HR1 που έφεραν καρκινώματα είναι 100% ενώ το ποσοστό των αρσενικών μυών τύπου SKH-HR2 ήταν 60%. Τα ποσοστά για τις αντίστοιχες ομάδες στις οποίες χορηγήθηκε εκχύλισμα φλοιού πεύκου *Maritima* ήταν 60% και 20%. Δηλαδή το εκχύλισμα φλοιού πεύκου *Maritima* μείωσε το ποσοστό των αρσενικών μυών που έφεραν όγκους κατά 40%. Παρόμοια, αν συγκρίνουμε το ποσοστό των θηλυκών μυών που εμφάνισαν όγκους, στους οποίους δε χορηγήθηκε εκχύλισμα, 60% και για τους δύο τύπους (SKH-HR1 και SKH-HR2), με το ποσοστό των θηλυκών μυών στους οποίους χορηγήθηκε εκχύλισμα, 0% θα διαπιστώσουμε ότι η χορήγηση

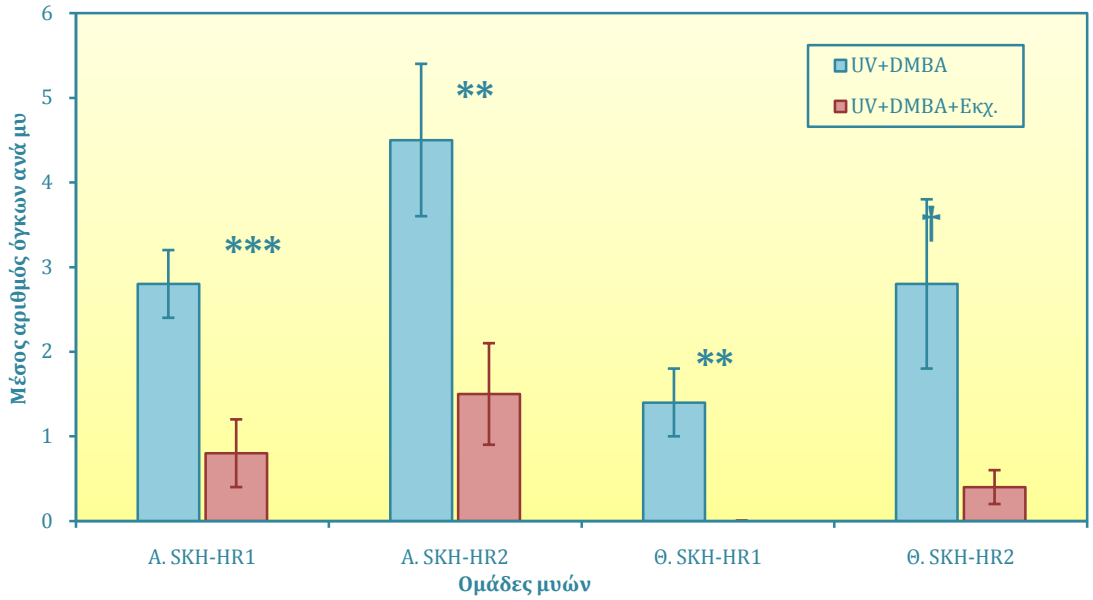
εκχυλίσματος μείωσε κατά 100% το ποσοστό των θηλυκών μυών που έφεραν όγκους.



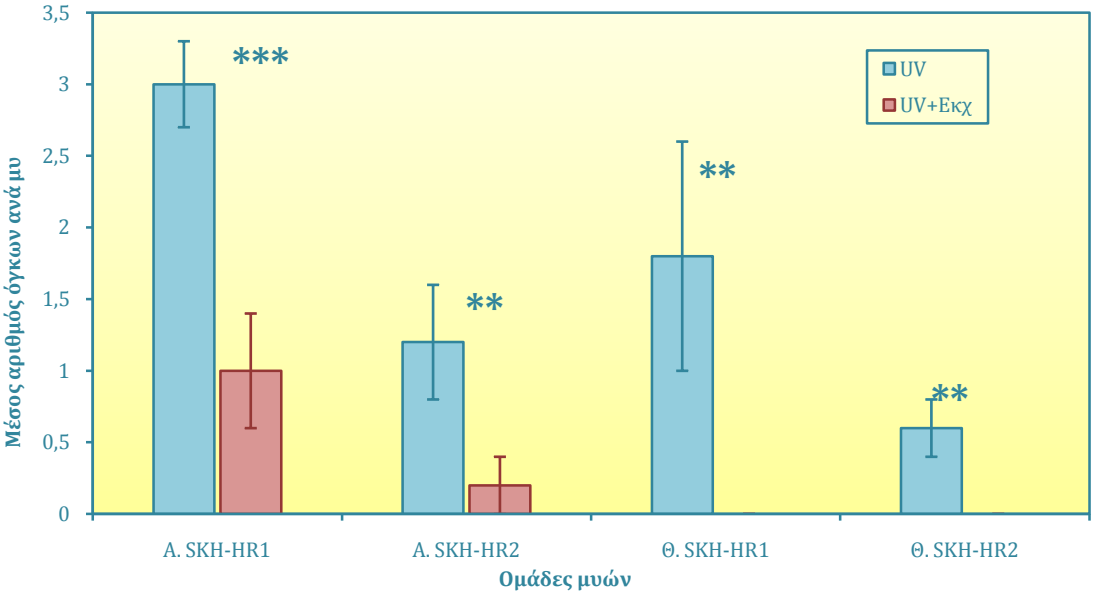
Σχήμα 7.43: *Ποσοστό των μυών που υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με διμεθυλβενζανθρακένιο και υπεριώδη ακτινοβολία και εμφάνισαν καρκινώματα. Με Α. σημειώνονται οι αρσενικοί μύες, με Θ. οι θηλυκοί και με Εκχ. οι μύες που αντί για νερό κατανάλωναν υδατικό διάλυμα αντιοξειδωτικών*



Σχήμα 7.44: *Ποσοστό των μυών που υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία και εμφάνισαν καρκινώματα. Με Α. σημειώνονται οι αρσενικοί μύες, με Θ. οι θηλυκοί και με Εκχ. οι μύες που αντί για νερό κατανάλωναν υδατικό διάλυμα αντιοξειδωτικών*



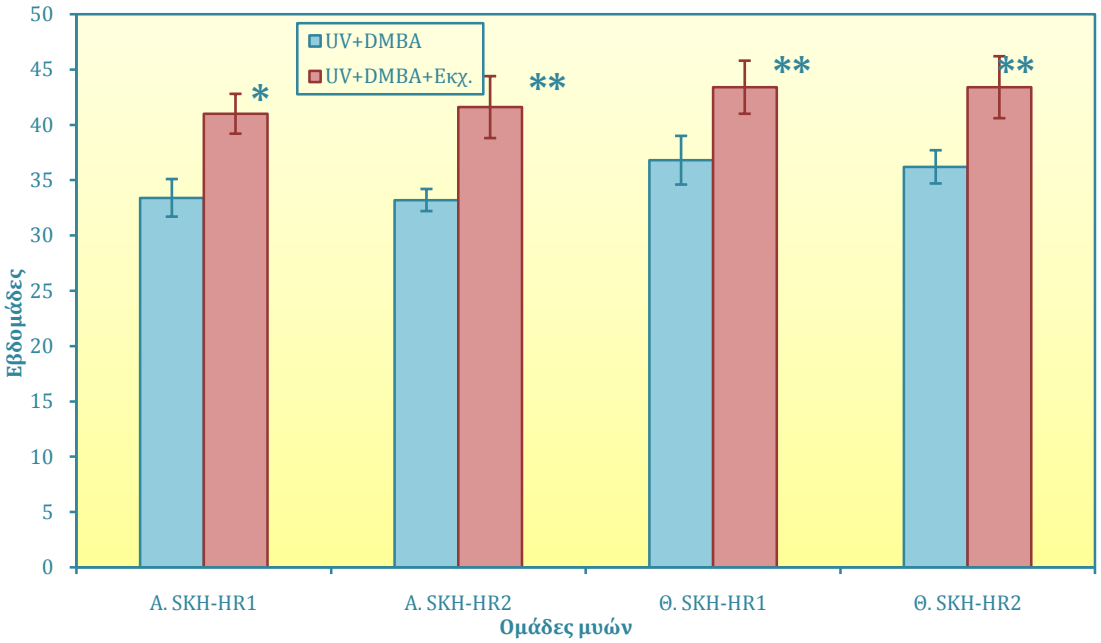
Σχήμα 7.45: *Μέσος αριθμός όγκων ανά μυ. Όλοι οι μύες έχουν υποβληθεί σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με διμεθυλβενζανθρακένιο και υπεριώδη ακτινοβολία. Με Α. σημειώνονται οι αρσενικοί μύες, με Θ. οι θηλυκοί και με Εκχ. οι μύες που αντί για νερό κατανάλωναν υδατικό διάλυμα αντιοξειδωτικών. Οι διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων ομάδων είναι στατιστικά σημαντικές με επίπεδα βεβαιότητας ***P<0,005, **P<0,05, †P<0,1 (T-τεστ)*



Σχήμα 7.46: *Μέσος αριθμός όγκων ανά μυ. Όλοι οι μύες έχουν υποβληθεί σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία. Με Α. σημειώνονται οι αρσενικοί μύες, με Θ. οι θηλυκοί και με Εκχ. οι μύες που αντί για νερό κατανάλωναν υδατικό διάλυμα αντιοξειδωτικών. Οι διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων ομάδων είναι στατιστικά σημαντικές με επίπεδα βεβαιότητας **P<0,05, *P<0,01 (T-τεστ)*

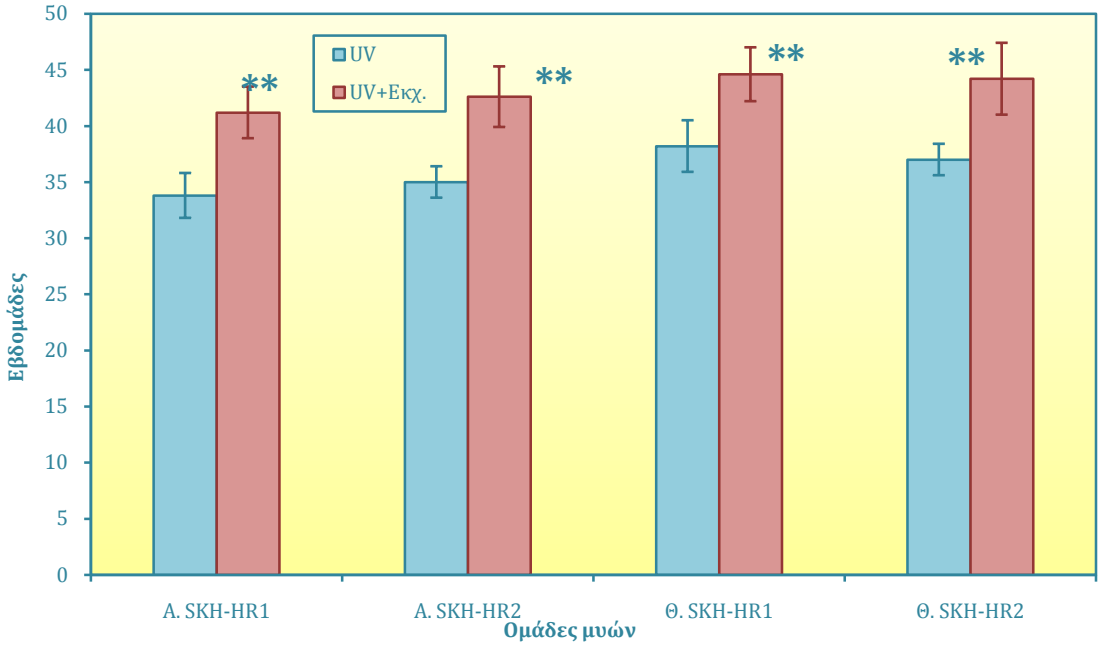
Στο Σχήμα 7.45 φαίνεται η μείωση της μέσης πολλαπλότητας μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων ανά μυ που επέφερε η κατανάλωση υδατικού διαλύματος αντιοξειδωτικών, σε μύες οι οποίοι υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με διμεθυλβενζανθρακένιο και υπεριώδη ακτινοβολία. Η μέση πολλαπλότητα δερματικών μη μελανωματικών καρκινωμάτων μεταβλήθηκε από 2.8 σε 0.8 (μείωση κατά 71.4%) για τους SKH-HR1 αρσενικούς μύες, από 4.5 σε 1.5 (μείωση κατά 66.7%) για τους SKH-HR2 αρσενικούς μύες, από 1.4 σε 0 (μείωση 100%) για τους SKH-HR1 θηλυκούς μύες και από 2.8 σε 0.4 (μείωση κατά 85.7%) για τους SKH-HR2 θηλυκούς μύες.

Οι αντίστοιχες μεταβολές για τους μύες που υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία φαίνονται στο Σχήμα 7.46. Η μέση πολλαπλότητα δερματικών μη μελανωματικών καρκινωμάτων μεταβλήθηκε από 3 σε 1 (μείωση κατά 66,7%) για τους SKH-HR1 αρσενικούς μύες, από 1.2 σε 0.2 (μείωση κατά 83.3%) για τους SKH-HR2 αρσενικούς μύες, από 1.8 σε 0 (μείωση 100%) για τους SKH-HR1 θηλυκούς μύες και από 0.6 σε 0 (μείωση κατά 100%) για τους SKH-HR2 θηλυκούς μύες.



Σχήμα 7.47: *Ο μέσος χρόνος ζωής μυών που έχουν υποβληθεί σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με διμεθυλβενζανθρακένιο και υπεριώδη ακτινοβολία. Με Α. σημειώνονται οι αρσενικοί μύες, με Θ. οι θηλυκοί και με Εκχ. οι μύες που αντί για νερό κατανάλωναν υδατικό αντιοξειδωτικών. Οι διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων ομάδων είναι στατιστικά σημαντικές με επίπεδα βεβαιότητας **P<0,05, *P<0,01 (Τ-τεστ)*

Η χορήγηση του υδατικού διαλύματος αντιοξειδωτικών παρέτεινε επίσης το μέσο χρόνο ζωής των μυών. Οι μεταβολές αυτές για τους μύες που υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με διμεθυλβανζανθρακένιο και υπεριώδη ακτινοβολία φαίνονται στο Σχήμα 7.47. Ο μέσος χρόνος ζωής των αρσενικών μυών SKH-HR1 που κατανάλωσαν υδατικό διάλυμα εκχυλίσματος αυξήθηκε κατά 7.6 εβδομάδες (23%), κατά 8.4 εβδομάδες για τους SKH-HR2 αρσενικούς μύες (25%), κατά 6.6 εβδομάδες για τους SKH-HR1 θηλυκούς μύες (18%) και κατά 7.2 εβδομάδες για τους SKH-HR2 θηλυκούς μύες (20%).



Σχήμα 7.48: *Ο μέσος χρόνος ζωής μυών που έχουν υποβληθεί σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία. Με Α. σημειώνονται οι αρσενικοί μύες, με Θ. οι θηλυκοί και με Εκχ. οι μύες που αντί για νερό κατανάλωναν υδατικό διάλυμα αντιοξειδωτικών. Οι διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων ομάδων είναι στατιστικά σημαντικές με επίπεδα βεβαιότητας **P<0,05, (Τ-τεστ)*

Οι αντίστοιχες μεταβολές για τους μύες που υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία φαίνονται στο Σχήμα 7.48. Ο μέσος χρόνος ζωής των αρσενικών μυών SKH-HR1 που κατανάλωσαν υδατικό διάλυμα εκχυλίσματος αυξήθηκε κατά 7.4 εβδομάδες (21.9%), κατά 7.6 εβδομάδες για τους SKH-HR2 αρσενικούς μύες (21.7%), κατά 6.4 εβδομάδες για τους SKH-HR1 θηλυκούς μύες (16.8%) και κατά 7.2 εβδομάδες για τους SKH-HR2 θηλυκούς μύες (19.5%).

7.5.2. Συμπεράσματα

Η χορήγηση εκχυλίσματος αντιοξειδωτικών, σε μύες στους οποίους εφαρμόστηκαν πρωτόκολλα καρκινογένεσης, καθυστέρησε και μείωσε σημαντικά χαρακτηριστικά σημάδια γήρανσης όπως ρυτίδες, χαλαρότητα δέρματος αλλά και προκαρκινικές βλάβες όπως βλάβες ακτινικής κεράτωσης και blue nevi.

Εκτός όμως από τους μηχανισμούς γήρανσης τα αποτελέσματα χορήγησης του εκχυλίσματος φαίνεται να παρεμποδίζουν σημαντικά τις διαδικασίες καρκινογένεσης. Πιο συγκεκριμένα η χορήγηση εκχυλίσματος καθυστέρησε σημαντικά την εμφάνιση των πρώτων θηλωμάτων ενώ μείωσε σημαντικά και το μέσο αριθμό όγκων ανά μυ. Επίσης σημαντική ήταν και η αύξηση των ποσοστών των μυών που δεν έφεραν όγκο ή θήλωμα και η αύξηση του μέσου χρόνου ζωής των μυών. Αξιοσημείωτο είναι ακόμη ότι μηδένισε την εμφάνιση όγκων σε θηλυκούς μύες που είχαν υποβληθεί σε πρωτόκολλο καρκινογένεσης με υπεριώδη ακτινοβολία.

7.6. Συνεργειακή δράση φωτοδυναμικής θεραπείας-εκχυλίσματος

7.6.1. Αποτελέσματα

Από μελέτες που διεξήχθησαν σε υγιή δερματικά κύτταρα από νεογέννητους μύες SKH-HR1 και SKH-HR2 προέκυψε ότι το εκχύλισμα αντιοξειδωτικών αποκτά τοξική/προ-οξειδωτική δράση για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10μg/ml. Έτσι κύτταρα τα οποία επωάστηκαν με συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 μg/ml παρουσίασαν πολύ μικρούς έως μηδενικούς μιττωτικούς ρυθμούς καθώς και μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας όταν ακτινοβολήθηκαν με 24 mJ/cm^2 UVB ακτινοβολίας εν αντιθέσει με κύτταρα τα οποία επωάστηκαν σε μέσο το οποίο δεν περιείχε εκχύλισμα ή περιείχε εκχύλισμα σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις μάλιστα το εκχύλισμα παρουσίασε σημαντική προστατευτική δράση.

Ως εκ τούτου ως προ-οξειδωτική συγκέντρωση επελέγησαν τα 100μg/ml (η μέγιστη διαλυτότητα του εκχυλίσματος στο νερό και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι 200 μg/ml). Για να μελετηθεί η συνεργειακή δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας με το εκχύλισμα επελέγησαν 5 μύες οι οποίοι έφεραν μη μελανωματικά δερματικά καρκινώματα. Στους μύες αυτούς έγινε ένεση με 10-20 μl διαλύματος (ανάλογα με τον όγκο του καρκινώματος) με διάλυμα εκχυλίσματος συγκέντρωσης 100 μg/ml πάνω στον όγκο πριν την επάλειψη του

φωτοευαισθητοποιητή. Εν συνεχεία εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο φωτοδυναμικής με τις θεραπευτικές παραμέτρους που παρουσίασαν τα βέλτιστα θεραπευτικά αποτελέσματα (75 mW/cm^2, 150J/cm^2). Επίσης, σε 3 μύες, οι οποίοι αποτέλεσαν και την ομάδα ελέγχου, έγινε νάρκωση και ένεση του εκχυλίσματος στον όγκο. Τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των όγκων και των 8 μυών καταγράφονταν πριν από κάθε θεραπεία και 14 ημέρες μετά την τελευταία. Τα αποτελέσματα της θεραπείας φαίνονται στον Πίνακα 7.12

Η μέση αύξηση του όγκου των καρκινωμάτων των μυών οι οποίοι δέχθηκαν θεραπεία μόνο με το εκχύλισμα ήταν 198.5 $\pm$ 23.2%. Η μέση αυτή τιμή αύξησης δε διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τη μέση τιμή αύξησης του όγκου των καρκινωμάτων των ζώων της ομάδας ελέγχου 203.0 $\pm$ 35.7% (μύες στους οποίους δεν έγινε καμία θεραπεία μόνο παρακολουθούνταν η αύξηση του μεγέθους των καρκινωμάτων). Το καρκίνωμα που δε θεραπεύτηκε παρουσίασε αύξηση στον όγκο 20% 14 ημέρες μετά την τρίτη θεραπεία. Στα υπόλοιπα ζώα τα οποία θεραπεύτηκαν πλήρως μετά την πρώτη συνεδρία δεν επαναλήφθηκε το πρωτόκολλο φωτοδυναμικής θεραπείας με παράλληλη χορήγηση φωτοευαισθητοποιητή. Τα κοσμητολογικά αποτελέσματα της θεραπείας ήταν άριστα ενώ δεν εμφανίστηκε κάποια άλλη βλάβη, θήλωμα ή όγκος στη θεραπευθείσα περιοχή μέχρι το φυσιολογικό θάνατο των μυών.

Πίνακας 7.12: *Πλήρης ίαση κατά τη διάρκεια της θεραπείας*

Ομάδα No.	Τύπος ομάδας	Ακτινοβόληση (mW/cm^2)	Συνολική δόση ενέργειας (J/cm^2)	Πλήρης ίαση		
				7 ημέρες μετά την 1η συνεδρία	7 ημέρες μετά την 2η συνεδρία	7 ημέρες μετά την 3η συνεδρία
1	Μόνο εκχύλισμα	—	—	0%	0%	0%
2	Εκχύλισμα και φωτοδυναμική θεραπεία	75	150	80%	80%	80%

7.6.2. Συμπεράσματα

Η ενδοϊστική χορήγηση διαλύματος εκχυλίσματος πολύ υψηλής συγκέντρωσης στην οποία το εκχύλισμα παρουσιάζει προ-οξειδωτική δράση δε φάνηκε να επηρεάζει την ανάπτυξη των καρκινωμάτων. Εν αντιθέσει όταν το διάλυμα του

εκχυλίσματος χορηγήθηκε με τον ίδιο τρόπο αμέσως πριν τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή τα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας βελτιώθηκαν σημαντικά. Το ποσοστό πλήρους ίασης αυξήθηκε από 60 σε 80% χωρίς να παρατηρηθεί καμία επίπτωση στη γενικότερη υγεία των μυών. Σημαντικό είναι επίσης ότι ενώ η παράλληλη χορήγηση του αντιοξειδωτικού αύξησε το ποσοστό πλήρους ίασης το ποσοστό επανεμφάνισης παρέμεινε μηδενικό καθώς επίσης και τα κοσμητολογικά αποτελέσματα άριστα. Το ποσοστό αυτό πλήρους ίασης είναι το υψηλότερο που έχει αναφερθεί για θεραπεία ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων ύψους έως 7 mm και μηδενικού ποσοστού επανεμφάνισης (διαμέτρου έως 1 cm). Πολύ σημαντικό είναι επίσης ότι όλα τα καρκινώματα που θεραπεύτηκαν πλήρως θεραπεύτηκαν με την πρώτη συνεδρία.

Κεφάλαιο 8

Συζήτηση Αποτελεσμάτων

8.1. Διαγνωστική μέθοδος αυτοφθορισμού μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων

Η λήψη βιοψίας και η μικροσκοπική εξέτασή της μετά από ιστοχημικές χρώσεις θεωρείται από τους κλινικούς η κύρια μέθοδος διάγνωσης καθώς και η μέθοδος η οποία παρέχει τα πιο αξιόπιστα αποτελέσματα (gold standard). Παρόλα αυτά, σημαντικά μειονεκτήματα όπως ο επαναλαμβανόμενος τραυματισμός του όγκου, η απαίτηση νάρκωσης και χειρουργείου για τη λήψη δειγμάτων ιστών από εσωτερικά όργανα, τα υψηλά ποσοστά υποτροπής σε ορισμένα είδη καρκίνου και το μεγάλο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη λήψη των δειγμάτων έως την έκδοση του αποτελέσματος, καθιστούν αναγκαία τη μερική τουλάχιστον αντικατάστασή της από νέες μεθόδους. Ένα επιπλέον μειονέκτημα της ιστοπαθολογικής εξέτασης βιοψιών είναι ότι τα αποτελέσματα τα οποία παρέχει είναι ποιοτικά και όχι ποσοτικά με αποτέλεσμα η τελική διάγνωση να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον ιστοπαθολόγο.

Την τελευταία δεκαετία η οπτική φασματοσκοπία αποτελεί τη βάση για μία υψηλού επιπέδου ερευνητική δραστηριότητα η οποία ως στόχο έχει την πρόταση νέων διαγνωστικών μεθόδων[1]. Ανάμεσα σε αυτές τις μεθόδους ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι διαγνωστικές μέθοδοι οι οποίες βασίζονται στη φασματοσκοπία φθορισμού. Κι αυτό γιατί μπορούν να απεικονίσουν σχετικά εύκολα, γρήγορα και κυρίως μη επεμβατικά βιοχημικές και μορφολογικές αλλαγές που μπορούν να συμβούν στους ιστούς[2].

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι αυτοφθορισμού παρουσιάζουν ένα επιπλέον πλεονέκτημα σε σχέση με τις υπόλοιπες φασματοσκοπικές μεθόδους φθορισμού. Οι βιοχημικές ή μορφολογικές αλλαγές που αντικατοπτρίζονται στις διαφορές της έντασης φθορισμού δεν οφείλονται σε εξωγενή αλλά ενδογενή χρωμοφόρα. Έτσι, αποφεύγονται οι κίνδυνοι που δημιουργούνται από τη χορήγηση εξωγενών χρωμοφόρων. Γιατί τα περισσότερα εξωγενή χρωμοφόρα θεωρούνται ασφαλή όταν χορηγούνται μία φορά αλλά δεν συνίσταται η χρήση τους για εξετάσεις ρουτίνας[3].

Στη βιβλιογραφία εμφανίζονται αρκετές αναφορές σύμφωνα με τις οποίες αυτή τη στιγμή η διάγνωση με φασματοσκοπία φθορισμού χρησιμοποιείται με μεγάλη επιτυχία στη διάγνωση νεοπλασιών στον οισοφάγο και στο γαστρεντερικό σύστημα[4-6]. Επίσης αρκετές είναι και οι αναφορές βάσει των αποτελεσμάτων των οποίων η φασματοσκοπία αυτοφθορισμού μπορεί να διαγνώσει βιοχημικές αλλαγές μεταξύ των υγιών και μη μελανωματικών καρκίνων και κατά συνέπεια θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως αρχή κάποιας διαγνωστικής μεθόδου.

Σύμφωνα με τους N. Kollias et al.[7] υπάρχουν κάποια ενδογενή χρωμοφόρα μόρια των οποίων η συγκέντρωση μεταβάλλεται στους μη μελανωματικούς καρκινικούς δερματικούς ιστούς σε σχέση με τους υγιείς. Αυτά είναι οι πορφυρίνες και η τρυπτοφάνη, ένα αρωματικό αμινοξύ. Σημαντικές μεταβολές υφίστανται βασικοί δεσμοί των συνδετικών μορίων όπως της ελαστίνης και του κολλαγόνου οι οποίοι επίσης επηρεάζουν το σήμα αυτοφθορισμού. Τα χρωμοφόρα αυτά διεγείρονται με ακτινοβολία της οποίας το μήκος κύματος ανήκει στα χαμηλότερα μήκη κύματος της ορατής και της υπεριώδους περιοχής.

Σε μία εργασία τους οι L. Branceleon et al.[8] παρουσιάζουν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον αυτοφθορισμό δειγμάτων υγιών και μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων τα οποία διεγέρθηκαν με ακτινοβολία 295 και 350 nm. Μετά από επεξεργασία των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε ότι τα καρκινικά δείγματα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ένταση φθορισμού σε σχέση με τα υγιή όταν διεγερθούν με ακτινοβολία μήκους κύματος 295 nm. Αντίθετα τα υγιή εμφανίζουν μεγαλύτερη ένταση αυτοφθορισμού όταν διεγερθούν με ακτινοβολία 350 nm. Σύμφωνα με τους ερευνητές οι διαφορές αυτές στην ένταση μπορούν να διαχωρίσουν τα αποτελέσματα με μία ακρίβεια που είναι ίση με 60 και 78 % αντίστοιχα για ακανθοκυτταρικά και βασοκυτταρικά καρκινώματα.

Οι R. Na et al.[9] παρατηρούν ότι η ένταση αυτοφθορισμού, που εισάγεται με ακτινοβολία διέγερσης στα 370 nm, είναι 53% υψηλότερη για στους υγιείς σε σχέση με βασικοκυτταρικά καρκινώματα. Οι M. Panjepour et al. χρησιμοποιούν ως μήκος

κύματος διέγερσης τα 410 nm και παρατηρούν ότι το σήμα αυτοφθορισμού των υγιών ιστών είναι πολύ υψηλότερο σε σχέση με τα καρκινικά καρκινώματα. Η κατηγοριοποίηση που προκύπτει μετά από κανονικοποίηση των φασμάτων αυτοφθορισμού αλλά και κατάταξη βάσει του τύπου δέρματος παρέχει διαχωρισμό υγιών από καρκινικά δείγματα με ακρίβεια περίπου 90%.

Παρόμοιες μελέτες έχουν παρουσιάσει οι W. D. Tian et al και οι L. Brancelon et al. [10,11] χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά τον αυτοφθορισμό ως ένα εργαλείο μέτρησης των μεταβολών που προκαλεί στην επιδερμίδα η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν τα φάσματα διέγερσης σε όλο το φάσμα του υπεριώδους και ορατού (ανά 10 nm). Για όσα από τα φάσματα υπήρχε ενδιαφέρον (διακριτές κορυφές) καταγράφηκαν και τα αντίστοιχα φάσματα εκπομπής προκειμένου να βρεθεί το βέλτιστο μήκος κύματος διέγερσης, στο οποίο το χρωμοφόρο του ιστού παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση και κατά συνέπεια εκπέμπει τη μέγιστη ένταση. Τα φάσματα αυτά αναλύθηκαν και επεξεργάστηκαν προκειμένου να αποδοθεί η κάθε κορυφή σε ένα συγκεκριμένο χρωμοφόρο.

Ως διαγνωστικές παράμετροι χρησιμοποιήθηκαν λόγοι έντασης και όχι η απόλυτη ένταση σε ένα σημείο του φάσματος. Με τον τρόπο αυτό μειώθηκε σημαντικά η πιθανότητα οι διαφορές στον αυτοφθορισμό μεταξύ υγιών και καρκινικών δειγμάτων να οφείλονται σε εξωτερικούς παράγοντες αλλά κυρίως στη βιοχημική σύσταση των ιστών. Από τους διάφορους λόγους που προτάθηκαν επελέγησαν αυτοί που θα προσέφεραν τον καλύτερο διαχωρισμό. Προκειμένου να βρεθούν ποιοι από αυτούς τους λόγους προσέφεραν καλύτερο διαχωρισμό κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα σκέδασης αυτών των λόγων για τις δύο ιστολογικές κατηγορίες.

Οι βέλτιστοι λόγοι αξιολογήθηκαν στατιστικά ώστε τελικά να προκύψει μία τιμή κατωφλίωσης για κάθε λόγο, βάσει της οποίας θα μπορεί να ταξινομηθεί ένα άγνωστο δείγμα ανάλογα με την τιμή του λόγου εντάσεων αυτοφθορισμού. Οι στατιστικές παράμετροι ευαισθησία, εξειδίκευση, ακρίβεια ταξινόμησης είναι μεγαλύτερες από 75% για όλους τους λόγους ενώ η ευαισθησία για δύο λόγους είναι ίση με 100%. Οι τιμές αυτές σημαίνουν ότι αυτή η διαγνωστική μέθοδος παρουσιάζει αρκετά υψηλά ποσοστά επιτυχίας στο διαχωρισμό των δύο ιστολογικών κατηγοριών. Τα αποτελέσματα μπορούν επίσης να βελτιωθούν σημαντικά αν εξεταστούν ταυτόχρονα περισσότεροι από έναν λόγο. Τα αντίστοιχα ποσοστά για τις διαγνωστικές μεθόδους αυτοφθορισμού μη μελανωματικών

δερματικών καρκινωμάτων που έχουν προταθεί μέχρι στιγμής είναι της τάξεως του 60-90%[8,9].

Η μέθοδος όμως εκτός από την ευαισθησία της παρουσιάζει και κάποια αλλά σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των υπαρχουσών μεθόδων διάγνωσης. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι το ότι η μέθοδος δεν είναι επεμβατική αφού η μόνη διαδικασία που απαιτείται είναι ένας ήπιος καθαρισμός του δέρματος με νερό και τοποθέτηση της probe πάνω στο δέρμα. Επίσης η τοξικότητά της είναι μηδενική. Για αυτό το λόγο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως μέθοδος ρουτίνας για την παρακολούθηση δερματικών καρκινωμάτων μετά τη θεραπεία ή καρκινωμάτων που θεωρείται απαραίτητο να εξετάζονται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Η εξέταση διαρκεί μόνο 3 min και δεν προκαλεί πόνο ή στρες. Η έκδοση των αποτελεσμάτων είναι άμεση αφού προκειμένου να εξαχθούν οι διάφοροι διαγνωστικοί λόγοι από τους αλγορίθμους δε χρειάζεται παρά ένας συμβατικός υπολογιστής και μερικά δευτερόλεπτα.

8.2. Τοπική φωτοδυναμική θεραπεία μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων

Οι παραδοσιακές θεραπευτικές τεχνικές του καρκίνου όπως η ακτινοθεραπεία, η χημειοθεραπεία και η χειρουργική αφαίρεση των καρκινικών ιστών είναι μη επιλεκτικές θεραπείες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα εκτός από τα καρκινικά κύτταρα και ιστούς, να προκαλούνται σοβαρές βλάβες και στους υγιείς ιστούς. Οι βλάβες αυτές συνεπάγονται σημαντικές παρενέργειες, έως και δυσλειτουργία των θεραπευμένων οργάνων και μπορούν να επιβάλουν ακόμη και διακοπή της θεραπείας. Για αυτό και η έρευνα για τη θεραπεία του καρκίνου έχει στραφεί σε νέες πιο επιλεκτικές μεθόδους[12].

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μία σύγχρονη, επιλεκτική, ελάχιστα επεμβατική τεχνική η οποία χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη θεραπεία καρκινικών όγκων. Η νέκρωση των καρκινικών όγκων κατά τη θεραπεία αυτή επιτυγχάνεται μέσω νέκρωσης των καρκινικών κυττάρων και βλαβών στο αγγειακό δίκτυο το οποίο τροφοδοτεί τον όγκο[13]. Τόσο η νέκρωση των καρκινικών κυττάρων όσο και οι βλάβες στο αγγειακό δίκτυο οφείλονται στο μονήρες οξυγόνο και τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται από τις φωτοχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της θεραπείας[14]. Σήμερα, η επιλεκτικότητά της αλλά και η δυνατότητα να συνδυαστεί χωρίς κανένα πρόβλημα με κλασσικές θεραπείες του καρκίνου όπως η χημειοθεραπεία, η χειρουργική αφαίρεση και η θεραπεία με ιοντίζουσα

ακτινοβολία, την έχουν καταστήσει μία από τις κύριες θεραπείες πολλών μορφών καρκίνου[15].

Η φωτοδυναμική θεραπεία χρησιμοποιείται ευρύτατα στη θεραπεία του δερματικού καρκίνου[16]. Ένα πλεονέκτημα που παρουσιάζει η φωτοδυναμική θεραπεία δερματικού καρκίνου είναι η πολύ εύκολη έκθεση του δέρματος στην ακτινοβολία σε σχέση με τα εσωτερικά όργανα[17]. Γενικά, η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μία φωτοχημική διεργασία κατά την οποία δεν παράγεται θερμότητα[15]. Επιπλέον, οι φωτοευαισθητοποιητές δεν απορροφούνται από τους συνδετικούς ιστούς. Τα δύο αυτά χαρακτηριστικά έχουν ως αποτέλεσμα ενώ καταστρέφονται οι καρκινικοί ιστοί οι γύρω υγιείς να μένουν άθικτοι. Αυτός είναι και ο κυριότερος λόγος για τον οποίο η φωτοδυναμική θεραπεία του δέρματος δίνει άριστα κοσμητολογικά αποτελέσματα. Κάποια άλλα σημαντικά πλεονεκτήματα για τη χρήση της στη δερματολογία είναι ο σχετικά μικρός χρόνος πλήρους ίασης, η ταυτόχρονη θεραπεία πολλαπλών όγκων αλλά και το ότι μπορεί να εφαρμοστεί ακόμη και σε εξαιρετικά επιβαρυμένους ασθενείς οι οποίοι δεν μπορούν να δεχθούν κάποια από τις κλασσικές θεραπείες[18].

Το δέρμα όμως εκτός από τη δυνατότητα εύκολης ακτινοβόλησης παρέχει και δυνατότητα τοπικής χορήγησης του φωτοευαισθητοποιητή. Το κύριο μειονέκτημα αυτού του τύπου χορήγησης είναι η γενικευμένη φωτοευαισθησία. Ο κίνδυνος αυτός αναγκάζει τους ασθενείς να παραμένουν σε εσωτερικούς χώρους με πολύ χαμηλό φωτισμό επηρεάζοντας έτσι σημαντικά την ποιότητα ζωής τους. Με την τοπική φωτοδυναμική θεραπεία η γενικευμένη φωτοευαισθησία μειώνεται στο ελάχιστο. Εκτός όμως από αυτό το πλεονέκτημα η τοπική χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή προσδίδει και κάποια άλλα πλεονεκτήματα στη θεραπεία. Ένα από αυτά είναι ότι αποφεύγεται η ηπατική διέλευση του φωτοευαισθητοποιητή και κατά συνέπεια η όποια τοξικότητα θα μπορούσε να συνεπάγεται η επαναλαμβανόμενη χρήση του. Επίσης, η συγκέντρωση στον όγκο που επιτυγχάνεται με αυτόν τον τρόπο χορήγησης είναι πολύ μεγαλύτερη[19,20].

Όμως ακόμη και σήμερα η χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή για τη θεραπεία δερματολογικών καρκίνων γίνεται συστηματικά. Ο μόνος φωτοευαισθητοποιητής που χορηγείται αυτήν τη στιγμή τοπικά είναι το 5-αμινολεβουλινικό οξύ[19]. Τα αποτελέσματα του φωτοευαισθητοποιητή αυτού είναι πολύ ενθαρρυντικά αλλά μόνο για πολύ επιφανειακούς όγκους[20,21]. Το κύριο πρόβλημα της τοπικής φωτοδυναμικής θεραπείας με 5-αμινολεβουλινικό οξύ όμως είναι ότι ο φωτοευαισθητοποιητής έχει πολύ μικρό βάθος διάχυσης μέσα στον ιστό < 1mm[22]. Συνεπώς οι όγκοι μπορούν να νεκρωθούν μόνο επιφανειακά. Προκειμένου να

επιλυθεί αυτό το πρόβλημα, να αυξηθεί δηλαδή το βάθος διάχυσης του φωτοευαισθητοποιητή στους ιστούς αυτή τη στιγμή εξετάζονται ενισχυτές διείσδυσης ουσιών στο δέρμα και λιποφιλικά παράγωγα του 5-αμινολεβουλινικού οξέος[23-25]. Μία άλλη προσέγγιση θα ήταν να προταθεί ένα νέο σύστημα τοπικής φωτοδυναμικής για δερματικούς καρκίνους, το οποίο θα περιλαμβάνει φωτοευαισθητοποιητή σε κατάλληλο σκεύασμα για τοπική χορήγηση, σύστημα ακτινοβόλησης και συνδυασμό αποτελεσματικών ως προς τη θεραπεία και ασφαλών ως προς τον ασθενή θεραπευτικών παραμέτρων.

Σε αυτήν τη διδακτορική διατριβή μελετήθηκε ένας φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς η χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη. Αφού ελέγχθηκαν πειραματικά οι ενδιαφέρουσες ως προς τη φωτοδυναμική της δράση ιδιότητες συγκρίθηκε με το 5-αμινολεβουλινικό οξύ και την 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη. Τα δεδομένα για τη χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη και την 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη προέκυψαν πειραματικά ενώ για το 5-αμινολεβουλινικό οξύ βιβλιογραφικά. Οι δύο αυτοί φωτοευαισθητοποιητές με τους οποίους συγκρίθηκε η χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη επελέγησαν γιατί και οι δύο έχουν πάρει έγκριση για φωτοδυναμική θεραπεία δερματικών καρκίνων και παρουσιάζουν πολύ καλά αποτελέσματα.

Αρχικά μελετήθηκαν οι φωτοφυσικές ιδιότητες της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών καταλήγουν στο ότι η χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 670 nm. Η πρωτοπορφυρίνη IX στην οποία μεταβολίζεται το 5-αμινολεβουλινικό οξύ παρουσιάζει μία κορυφή απορρόφησης στα 635 nm ενώ η 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη στα 652 nm. Η φθαλοκυανίνη στην κόκκινη περιοχή του ορατού φάσματος απορροφά ισχυρότερα και από την πρωτοπορφυρίνη IX[26] και από την 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη. Αυτό σημαίνει ότι η φθαλοκυανίνη κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία αναμένεται να είναι πιο αποδοτική και λόγω του υψηλότερου συντελεστή απορρόφησης αλλά και λόγω της απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος όπου το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας είναι μεγαλύτερο (βαθύτερη καταστροφή καρκινικού ιστού).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν φαρμακοκινητικές μελέτες μετά από τοπική χορήγηση χλωρο-αλομινο-φθαλοκυανίνης και 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνης. Για τις μελέτες αυτές αλλά και τις μελέτες φωτοδυναμικής θεραπείας που ακολούθησαν αναπτύχθηκαν κατάλληλα πειραματικά μοντέλα ζώων τα οποία έφεραν μη μελανωματικό καρκίνο του δέρματος. Τα μοντέλα αυτά

παρουσίαζαν μεγάλη φαινοτυπική ομοιότητα με τους ανθρώπινους μη μελανωματικούς καρκίνους του δέρματος ενώ ιδιαίτερη μέριμνα ελήφθη ώστε τα αίτια πρόκλησης των καρκινωμάτων αυτών να προσομοιάζουν τα κύρια αίτια στα οποία αποδίδεται η εμφάνιση μη μελανωματικών καρκινωμάτων στο ανθρώπινο δέρμα.

Η τοπική χορήγηση ενός φωτοευαισθητοποιητή δεν είναι ένα απλό ζήτημα, κυρίως λόγω της ύπαρξης της κεράτινης στοιβάδας η οποία αποτελεί έναν άριστο φραγμό για το δέρμα. Για το λόγο αυτό και οι δύο φωτοευαισθητοποιητές ήταν διαλυμένοι σε ειδικά σκευάσματα τα οποία ευνοούν την απορρόφηση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή από το δέρμα όταν αυτός χορηγηθεί τοπικά. Το μόριο της χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης διαλύθηκε σε ένα υδατικό διάλυμα το οποίο περιείχε δύο γνωστούς ενισχυτές διείσδυσης χημικών ενώσεων στο δέρμα. Οι ενισχυτές αυτοί είναι το διμεθυλ-σουλφοξείδιο και το Tween 80[27]. Η 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη ήταν εγκλεισμένη μέσα σε λιπίδια τα οποία είναι διεσπαρμένα σε θερμογέλη.

Τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν από τις φαρμακοκινητικές μελέτες αυτού του διαλύματος χλωρο-αλομινο φθαλοκυανίνης (0.7% κ.ο.) έδειξαν ότι ο φωτοευαισθητοποιητής απορροφάται ισχυρά από τους καρκινικούς ιστούς μόλις 1 h μετά τη χορήγηση (20 ng/mg ιστού). Η αντίστοιχη συγκέντρωση της πρωτοπορφυρίνης IX στην οποία μεταβολίζεται το 5-αμινολεβουλινικό οξύ όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία μετά από 18-24 h επάλειψης κρέμας 5-αμινολεβουλινικού οξέος πολύ μεγαλύτερης συγκέντρωσης (20-30% κ.ο.) 11.30±4.36[28]. Η συγκέντρωση της 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη (0.05 κ.ο.) προσδιρίστηκε μέσω των φαρμακοκινητικών μελετών 5.74 ± 3.28 ng / mg ιστού 4 h και 7.6 ± 6.46 ng / mg ιστού 6 h μετά την επάλειψη.

Οι μελέτες που έγιναν με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser (laser confocal microscopy) έδειξαν ότι στους υγιείς ιστούς ο φωτοευαισθητοποιητής φτάνει μόνο μέχρι 60 nm από την επιφάνεια του ιστού. Το αντίστοιχο βάθος διείσδυσης για τους καρκινικούς ιστούς είναι 1490 μm. Τα αποτελέσματα των μελετών με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser συμφωνούν και δικαιολογούν την κατά 40 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή στους καρκινικούς σε σχέση με τους υγιείς ιστούς.

Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών δείχνουν ότι το συγκεκριμένο διάλυμα φθαλοκυανίνης υπερτερεί έναντι του των έως σήμερα ευρέως αποδεκτών φωτοευαισθητοποιητών για τοπική φωτοδυναμική θεραπεία. Μάλιστα φαίνεται ο φωτοευαισθητοποιητής να διαχέεται σε μεγαλύτερο βάθος (50% βαθύτερα) στους

καρκινικούς ιστούς σε σχέση με το αμινολεβουλινικό οξύ. Η απορρόφηση του αυτή είναι πολύ πιο επιλεκτική και γίνεται πολύ πιο γρήγορα με αποτέλεσμα να μειώνεται ο συνολικός χρόνος της θεραπείας.

Μετά από αυτές τις παρατηρήσεις σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε κατάλληλο σύστημα απεικόνισης και ακτινοβόλησης μη μελανωματικών δερματικών όγκων. Το σύστημα απεικόνισης παρέχει τη δυνατότητα ποσοστικοποίησης του μεγέθους των όγκων πριν και μετά τη θεραπεία. Με αυτόν τον τρόπο αλλά και με ιστοπαθολογική εξέταση των δειγμάτων επιτυγχάνονταν ποσοτική αποτίμηση των αποτελεσμάτων της θεραπείας και καταγραφή ιστορικού για τον κάθε όγκο. Το σύστημα αυτό βασίζεται σε μία CCD κάμερα, κατάλληλο διάχυτο ομοαξονικό φωτισμό και στερεοτακτική τράπεζα. Πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα για το σύστημα αυτό είναι, η υψηλή ποιότητα εικόνων, ο πολύ μικρός χρόνος που απαιτείται για τη λήψη των εικόνων του όγκου (≈5 min), η εξαγωγή των γεωμετρικών χαρακτηριστικών των όγκων σε πραγματικό χρόνο, η φορητότητα και η μικρή υπολογιστική ισχύς που απαιτείται για τον έλεγχο του συστήματος και την επεξεργασία των εικόνων.

Παράλληλα με το σύστημα απεικόνισης σχεδιάστηκαν και τα συστήματα ακτινοβόλησης των όγκων. Τα συστήματα αυτά (ένα για τη χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη και ένα για την 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη) διέφεραν μόνο ως προς το διοδικό laser αφού κάθε φωτοευαισθητοποιητής παρουσίαζε διαφορετικό μέγιστο απορρόφησης και κατά συνέπεια έπρεπε να ακτινοβοληθεί με ακτινοβολία διαφορετικού μήκους κύματος. Και για τους δύο φωτοευαισθητοποιητές χρησιμοποιήθηκαν διοδικά lasers υψηλής ισχύος εξόδου (1 και 2 W). Η υψηλή ισχύς εξόδου αυτών των lasers νέας γενιάς είναι πολύ σημαντική για τη φωτοδυναμική θεραπεία γιατί παρέχει τη δυνατότητα ακτινοβόλησης ακόμη και αρκετά μεγάλων περιοχών (έως 10 cm^2) κάτι το οποίο ήταν αδύνατο με τα παλαιότερα διοδικά lasers στη συγκεκριμένη περιοχή μηκών κύματος των οποίων η ισχύς έφθανε ως τα 100 mW. Ένα άλλο επίσης πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό αυτών των lasers είναι η δυνατότητα ρύθμισης της ισχύος εξόδου (με ακρίβεια 1 mW) αλλά και του χρόνου ακτινοβόλησης (με ακρίβεια 0.1 s) με λογισμικό επικοινωνίας με το όργανο. Η δυνατότητα αυτή ελαχιστοποιεί την πιθανότητα σφάλματος για υπερβολική ή ανεπαρκή ακτινοβόληση και κατά συνέπεια υποβάθμιση των αποτελεσμάτων της θεραπείας.

Μετά την ανάπτυξη αυτών των απαραίτητων υποσυστημάτων για τη φωτοδυναμική θεραπεία δοκιμάστηκαν για τη χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη 7 διαφορετικοί συνδυασμοί ακτινοβόλησης-συνολικής δόσης ενέργειας. Από τα

αποτελέσματα της θεραπείας όπως αυτά απεικονίζονταν στα ποσοστά πλήρους ίασης των καρκινωμάτων, τις αλλαγές στον όγκο των μη πλήρως θεραπευμένων καρκινωμάτων, τα κοσμητολογικά αποτελέσματα και τα ποσοστά επανεμφάνισης προέκυψε ότι ο βέλτιστος συνδυασμός θεραπευτικών παραμέτρων είναι 75 mW/cm^2 και 150 J/cm^2.

Με επάλειψη διάρκειας μιας ώρας διαλύματος χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης στους συγκεκριμένους διαλύτες και ακτινοβόληση με διοδικό laser το οποίο εκπέμπει στα 670 nm, με 75 mW/cm^2 και συνολική δόση ενέργειας 150 J/cm^2 επιτεύχθηκε πλήρης ίαση ακανθοκυτταρικών δερματικών όγκων σε ποσοστό 60%. Τα αντίστοιχα ποσοστά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για τοπική φωτοδυναμική θεραπεία επιφανειακών ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων με 5-αμινολεβουλινικό οξύ[29] και αυτά που βρέθηκαν για τοπική θεραπεία με 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη είναι της τάξεως του 60% επίσης. Πρώτη φορά όμως αναφέρεται πλήρης ίαση όγκων με μηδενικό ποσοστό επανεμφάνισης αφού τα συνήθη ποσοστά επανεμφάνισης που αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι της τάξης του 10-35%[30,31]. Επίσης το ποσοστό θνησιμότητας κατά τη διάρκεια της τοπικής φωτοδυναμικής θεραπείας με αυτές τις θεραπευτικές παραμέτρους και το συγκεκριμένο διάλυμα χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνης είναι μηδενικό εν αντιθέσει με την φωτοδυναμική θεραπεία με 5,10,15,20-τετρα(3-υδροξυφαινυλ)-2,3 διυδροπορφυρίνη που παρουσίαζε το ίδιο ποσοστό πλήρους ίασης αλλά θνησιμότητα 40%. Επίσης πρώτη φορά αναφέρεται πλήρης ίαση ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων με ύψος έως και 7 mm αφού τα δεδομένα που υπάρχουν μέχρι στιγμής στη βιβλιογραφία αναφέρονται σε ίαση ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων έως και 2 mm.

Για το σύστημα αυτό όμως εκτός από την κλινική δοκιμή σε μη επιφανειακά ακανθοκυτταρικά καρκινώματα θα μπορούσε να προταθεί και η εφαρμογή του σε τύπους καρκίνου οι οποίοι θεραπεύονται κλασικά με τοπική φωτοδυναμική θεραπεία με 5-αμινολεβουλινικό οξύ όπως ο επιφανειακός βασικοκυτταρικός καρκίνος και η ακτινική κεράτωση αφού φαίνεται να υπερτερεί ως προς το συνολικό χρόνο θεραπείας (σημαντικά μικρότερος) και τα ποσοστά επανεμφάνισης. Το σύστημα τοπικής φωτοδυναμικής θεραπείας που προτείνεται στην παρούσα διδακτορική διατριβή φαίνεται κατάλληλο για τη θεραπεία ακόμη και μη επιφανειακών ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων τα οποία θεωρούνται από τα πιο δύσκολα αντιμετωπίσιμα καρκινώματα με φωτοδυναμική θεραπεία.

Το σύστημα τοπικής φωτοδυναμικής θεραπείας με χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη και διοδικό laser υψηλής ισχύος είναι διεθνώς πρωτότυπο αφού

πρώτη φορά αναφέρεται τοπική χορήγηση φθαλοκυανινών και ακτινοβόληση των ιστών με laser στα 670 nm όπου οι φθαλοκυανίνες παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης. Σημαντική καινοτομία θεωρείται επίσης η ανάπτυξη ενός ενιαίου πολύ μικρού σε όγκο και συνεπώς φορητού συστήματος παράλληλης καταγραφής των χαρακτηριστικών του όγκου και κατά συνέπεια των αποτελεσμάτων της θεραπείας το οποίο προσαρμόστηκε στο σύστημα ακτινοβόλησης.

8.3. Πρόληψη μη μελανωματικού δερματικού καρκίνου με χρήση αντιοξειδωτικών

Η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία θεωρείται η κύρια αιτία πρόκλησης όλων των τύπων δερματικού καρκίνου[32,33]. Σημαντική όμως συνεισφορά θεωρείται ότι παρουσιάζουν και άλλοι εξωγενείς καρκινογόνοι παράγοντες όπως συστατικά καυσαερίων (π.χ. πολυκυλικοί υδρογονάνθρακες), πτητικές οργανικές ενώσεις (βενζένιο) και βαρέα μέταλλα (αρσενικό, κάδμιο, μόλυβδος). Η υπεριώδης ακτινοβολία είναι ένας καρκινογόνος παράγοντας ο οποίος επηρεάζει όλες τις πληθυσμιακές ομάδες, εν αντιθέσει με τους χημικούς παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν μόνο κάποιες μικρές πληθυσμιακές ομάδες. Στις μικρές αυτές ομάδες ανήκουν συνήθως άτομα των οποίων το περιβάλλον εργασίας είναι επιβαρυμένο με αυτούς τους χημικούς γονοτοξικούς παράγοντες (π.χ. εργαζόμενοι σε πετροχημικές βιομηχανίες, υφαντουργία, μονάδες παραγωγής εντομοκτόνων, αγρότες)[33,34].

Η υπεριώδης ακτινοβολία και οι προαναφερθείσες χημικές ενώσεις μπορεί να εισάγουν βλάβες σε σημαντικά βιομόρια είτε μέσω άμεσων φωτοχημικών αντιδράσεων είτε μέσω μηχανισμών ελευθέρων ριζών. Τελευταία αρκετές είναι οι μελέτες οι οποίες συνδέουν το οξειδωτικό στρες με την καρκινογένεση[35]. Το δέρμα διαθέτει κάποιους μηχανισμούς προκειμένου να προστατευτεί από τις ελεύθερες ρίζες και γενικότερα τα προϊόντα αυτών των φωτοχημικών αντιδράσεων. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορεί να οφείλονται στη δράση ενζύμων όπως για παράδειγμα της υπεροξειδικής δισμουτάσης και της καταλάσης είτε σε μικρού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικά μόρια όπως η α-τοκοφερόλη και το ασκορβικό οξύ. Όταν η συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών όμως ξεπεράσει κάποιο όριο οι μηχανισμοί αυτοί δεν είναι ικανοί να αποτρέψουν τις οξειδωτικές βλάβες[36]. Για αυτό το λόγο αλλαγές μπορεί να παρατηρηθούν σε γονίδια τα οποία ελέγχουν τους μηχανισμούς ομοιόστασης και πολλαπλασιασμού οδηγώντας στο στάδιο έναρξης του καρκίνου.

Η προστασία από τις ελεύθερες ρίζες και τα προϊόντα των φωτοχημικών αντιδράσεων μέσω φυσικών αντιοξειδωτικών αποτελεί μία νέα σχετικά στρατηγική

πρόληψης του καρκίνου. Βάσει αυτής, επιβραδύνεται ή αναστέλλεται πλήρως η δράση των οξειδωτικών παραγόντων που οδηγούν στην καρκινογένεση μέσω λήψης συμπληρωμάτων διατροφής ή μέσω ενίσχυσης της διατροφής με φυσικά αντιοξειδωτικά προϊόντα. Τα προϊόντα αυτά πρέπει να μην είναι τοξικά, να μην εμφανίζουν μεταλλαξιγόνο δράση και να παρουσιάζουν ισχυρή τάση δέσμευσης ελευθέρων ριζών[37]. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν και τα φλαβονοειδή.

Το αντιοξειδωτικό μίγμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε είναι ένα πολύ πλούσιο σε πολυφαινολικές ενώσεις μίγμα το οποίο παρουσιάζει πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική δράση[38,39]. Το μίγμα αυτό έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα διατροφής προκειμένου να προστατεύσει ή και να θεραπεύσει ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες όπως η αθηροσκλήρωση και ο διαβήτης ή βλάβες που οφείλονται στη γήρανση.

Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν μελέτες σχετικές με την πρόληψη καρκίνου του δέρματος ή επιβράδυνσης των διεργασιών γήρανσης και καρκινογένεσης μέσω χορήγησης του συγκεκριμένου εκχυλίσματος. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η προληπτική ως προς την ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος δράση του μίγματος αυτού.

Η χορήγηση μίγματος αντιοξειδωτικών σε ζώα τα οποία εκτέθηκαν σε καρκινογόνους παράγοντες μείωσε τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου από 40% για τα αρσενικά ζώα έως 100% για τα θηλυκά. Επίσης καθυστέρησε σημαντικά την εμφάνιση των πρώτων θηλωμάτων στα ζώα (>3 εβδομάδες), μείωσε σημαντικά (>67%) το μέσο όρο καρκινωμάτων ανά ζώο, ενώ αύξησε κατά 20% περίπου τη μέση διάρκεια ζωής των ζώων. Επίσης, καθυστέρησε και μείωσε σημαντικά τη δημιουργία καλοηθών σπίλων. Ενδιαφέρον ακόμη παρουσιάζει το γεγονός ότι η χορήγηση του μίγματος αντιοξειδωτικών στη μορφή που χορηγήθηκε (μέσω του πόσιμου νερού των ζώων) και στη δόση που χορηγήθηκε (10 ml διαλύματος 0.2 g/l την ημέρα) δεν εμφάνισε καμία τοξικότητα ή παρενέργεια σε κανένα από τα ζώα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν τις μελέτες που προτείνουν ότι η καρκινογένεση είναι μία πολύπλοκη διαδικασία στην οποία εμπλέκονται μηχανισμοί ελευθέρων ριζών. Μάλιστα, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής συνηγορούν ως προς την άποψη ότι η μηχανισμοί αυτοί μπορούν να εμποδιστούν πλήρως ή μερικώς μέσω διατροφής πλούσιας σε φλαβονοειδή ή με παράλληλη χορήγηση κατάλληλων δόσεων φλαβονοειδών ως συμπλήρωμα διατροφής.

8.4. Συνεργειακή δράση φωτοδυναμικής θεραπείας και μίγματος αντιοξειδωτικών

Η φωτοδυναμική θεραπεία βασίζεται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Αναμενόμενο θα ήταν η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού να ζημίωνε και όχι να βελτίωνε την αποδοτικότητα της φωτοδυναμικής αφού τα αντιοξειδωτικά μόρια θα δέσμευαν τις ελεύθερες ρίζες και έτσι θα προστάτευαν το καρκινικό κύτταρο. Αν η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού όμως ή το μικροπεριβάλλον του ήταν τέτοιο ώστε το αντιοξειδωτικό να αποκτούσε προ-οξειδωτική δράση τα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας θα βελτιώνονταν.

Πράγματι, υπάρχουν κάποιες μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν τη θεωρία ότι τα αντιοξειδωτικά βοηθούν την αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας[40-45]. Οι μηχανισμοί συνεργειακής δράσης φωτοδυναμικής θεραπείας και αντιοξειδωτικών που έχουν προταθεί είναι οι εξής:

- Τα αντιοξειδωτικά σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις ανάγουν το μονήρες οξυγόνο σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το μονήρες οξυγόνο έχει πολύ μικρότερο χρόνο ζωής (~ 100 ns) και ακτίνα διάχυσης σε σχέση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Αν το μονήρες οξυγόνο αναχθεί σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο διαχέεται πολύ πιο εύκολα μέσα στο κύτταρο, θα προκαλέσει πολύ πιο εκτεταμένες βλάβες. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου εκτός από τη διάσπασή του σε υδροξυλικές ρίζες μέσω των αντιδράσεων Fenton, μπορεί να αντιδράσει και με τη μυελοπεροξειδάση και να παράγει υποχλωρικό οξύ το οποίο είναι επίσης ισχυρό οξειδωτικό με αρκετά μεγάλη ακτίνα διάχυσης. Ο μηχανισμός αυτός εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης και γενικότερα το περιεχόμενο των κυττάρων σε αντιοξειδωτικά ένζυμα. Για αυτό το λόγο και ο μηχανισμός αυτός παρατηρείται σε καρκινικά κύτταρα στα οποία η συγκέντρωση των ενζυμικών αντιοξειδωτικών που θα μπορούσαν να εμποδίσουν αυτό το μηχανισμό είναι μικρή[45].
- Τα αντιοξειδωτικά σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις παρεμποδίζουν εν μέρει το μηχανισμό αναπνοής. Σε αυτήν την περίπτωση η κατανάλωση οξυγόνου αλλά και η παραγωγή ενέργειας είναι μικρότερες από ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες. Έτσι ευνοείται ο σχηματισμός μονήρους οξυγόνου κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας αφού η κατανάλωση του μοριακού οξυγόνου στην αναπνευστική αλυσίδα είναι μικρή[41].
- Το κύτταρο επίσης λόγω της ανεπαρκούς παραγωγής ενέργειας και της προ-οξειδωτικής δράσης των αντιοξειδωτικών είναι αρκετά καταπονημένο γεγονός το οποίο επίσης επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας[40,41].

Μέχρι στιγμής όμως δεν έχει διεξαχθεί καμία in vivo μελέτη η οποία να υποστηρίζει τη θεωρία αυτή. Ο τελευταίος στόχος της διατριβής αυτής ήταν η in vivo μελέτη αλληλεπίδρασης φωτοδυναμικής θεραπείας και παράλληλης χορήγησης αντιοξειδωτικού σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η τοπική φωτοδυναμική θεραπεία με χλωρο-αλουμινο-φθαλοκυανίνη και προσδιορίστηκαν οι θεραπευτικές παράμετροι οι οποίες παρέχουν το βέλτιστο θεραπευτικό αποτέλεσμα. Επίσης σε in vitro μελέτες διαπιστώθηκε ότι το συγκεκριμένο μίγμα αντιοξειδωτικών σε υψηλές συγκεντρώσεις (>10 μg/ml) παρουσιάζει οξειδωτική δράση. Προκειμένου λοιπόν να μελετηθεί εάν το μίγμα αντιοξειδωτικών μπορεί να βελτιώσει τα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας, παράλληλα με τη φωτοδυναμική θεραπεία χορηγήθηκε ενδοϊστικά διάλυμα αντιοξειδωτικού πολύ υψηλής συγκέντρωσης (100 μg/ml).

Το ποσοστό πλήρους ίασης της φωτοδυναμικής θεραπείας βελτιώθηκε κατά 20% (θεραπεύτηκε δηλαδή το 80% των περιπτώσεων) όταν πριν την επάλειψη του φωτοευαισθητοποιητή χορηγήθηκε υψηλή δόση αντιοξειδωτικού εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα της θεραπείας δεν υποβαθμίστηκαν σε κανέναν από τους υπόλοιπους παράγοντες. Δηλαδή, δεν αυξήθηκε το ποσοστό επανεμφάνισης των όγκων, δεν αυξήθηκε το ποσοστό θνησιμότητας (παρέμειναν μηδενικά), ενώ επίσης τα κοσμητολογικά αποτελέσματα παρέμειναν άριστα.

Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν διεθνή πρωτοτυπία αφού παράλληλη χορήγηση αντιοξειδωτικού σε προ-οξειδωτικές δόσεις και φωτοδυναμικής θεραπείας in vivo δεν έχει μελετηθεί. Επίσης, δεν έχει μελετηθεί ούτε in vivo ούτε όμως και in vitro χορήγηση φλαβονοειδών παράλληλα με τη φωτοδυναμική θεραπεία. Μεγάλη σημασία πρέπει να δοθεί επίσης και στον τρόπο με τον οποίο έγινε τόσο η φωτοδυναμική θεραπεία όσο και η χορήγηση του αντιοξειδωτικού εκχυλίσματος. Η παράλληλη τοπική χορήγηση φωτοευαισθητοποιητή και αντιοξειδωτικού μεγιστοποιεί την επιλεκτικότητα και αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Επιπλέον, η εμβάθυνση στη συνεργειακή δράση της φωτοδυναμικής με αντιοξειδωτικά και η διατύπωση μοντέλου ρύθμισης παραγόμενων ελευθέρων ριζών, πιθανόν να συνεισφέρει στη βελτίωση και άλλων θεραπειών όπως η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία.

8.5. Προοπτικές

Κύριος σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάπτυξη ενός συστήματος τοπικής φωτοδυναμικής θεραπείας με φθαλοκυανίνες μη

μελανωματικών δερματικών καρκινικών όγκων και η περαιτέρω βελτίωση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων μέσω παράλληλης χορήγησης αντιοξειδωτικών. Στα πλαίσια αυτής της ερευνητικής εργασίας:

- Σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε σύστημα ακτινοβόλησης το οποίο βασίζεται σε διοδικό laser νέας γενιάς κατάλληλο για τη φωτοδυναμική θεραπείας δερματικών όγκων.
- Σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε σύστημα ποσοτικοποίησης των γεωμετρικών χαρακτηριστικών των δερματικών καρκινωμάτων πριν, μετά και κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας.
- Αναπτύχθηκε μη επεμβατική διαγνωστική μέθοδος μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων με αυτοφθορισμό.
- Μελετήθηκε η φωτοδυναμική δράση των φθαλοκυανινών και συγκρίθηκε με αυτή φωτοευαισθητοποιητών που χρησιμοποιούνται ήδη στην κλινική πρακτική.
- Μελετήθηκε η συνεισφορά μίγματος αντιοξειδωτικών στην πρόληψη του μη μελανωματικού δερματικού καρκίνου.
- Διατυπώθηκαν ερμηνείες για τη συνεργειακή δράση φωτοδυναμικής θεραπείας και αντιοξειδωτικών σε προ-οξειδωτικές συγκεντρώσεις.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής μπορούν να αξιοποιηθούν:

- *Στην κλινική φωτοδυναμική θεραπεία και διάγνωση με αυτοφθορισμό του μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος*. Τα συστήματα και τα πρωτόκολλα φωτοδυναμικής θεραπείας και διάγνωσης με αυτοφθορισμό που αναπτύχθηκαν στη συγκεκριμένη διατριβή μπορούν να περάσουν στα πρώτα στάδια κλινικών ερευνών με ελάχιστες προσαρμογές.
- *Στη φωτοδυναμική θεραπεία και διάγνωση και άλλων μορφών καρκίνου*. Τα συστήματα και τα πρωτόκολλα φωτοδυναμικής θεραπείας και διάγνωσης με αυτοφθορισμό μπορούν να αποτελέσουν μοντέλα για αντίστοιχα συστήματα διάγνωσης και θεραπείας άλλων μορφών καρκίνου.
- *Στην πρόληψη του μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος μέσω χορήγησης αντιοξειδωτικών*.
- *Στη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων και άλλων θεραπειών του καρκίνου που δρουν μέσω ελευθέρων ριζών.* Το μοντέλο αύξησης της παραγωγής των ελευθέρων ριζών με την παράλληλη χορήγηση αντιοξειδωτικού μίγματος σε υψηλές συγκεντρώσεις κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας μπορεί να αποτελέσει τη θεωρητική βάση για την βελτίωση των αποτελεσμάτων και άλλων θεραπειών όπως η ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία.

8.6. Βιβλιογραφία

1. I. Bigio and J. Mourant, “Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy”, Phys Med Biol, 42, 803-814, 1997.
2. N. Ramanujam, “Fluorescence spectroscopy of neoplasmatic and non-neoplasmatic tissues”, Neoplasia, 2, 89-117, 2000.
3. S. Andersson-Engels, C. af Klinterberg, K. Svanberg and S. Svanberg, “In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics”, Phys Med Biol, 42, 815-824, 1997.
4. B. Mayinger, M. Jordan, T. Horbach, P. Horner, C. Gerlach, S. Mueller, W. Hohenberger, E. Hahn, “Evaluation of in vivo endoscopic autofluorescence spectroscopy in gastric cancer”, Gastrointest Endosc, 59, 191-198, 2004.
5. A. Wang, J. Van Dam, “Optical Biopsy: A new frontier in Endoscopic detection and diagnosis”, Clin Gastroentero and Hepatol, 2, 744-753, 2004.
6. R. Da Costa, “Spectroscopy and fluorescence in esophageal diseases”, Best Pract Res Cl Gastroentero, 20, 41-57, 2006.
7. N. Kollias, G. Zonios, G. Stamatas, “Fluorescence spectroscopy of skin”, Vibrat Spectros, 28, 17-23, 2002.
8. L. Brancaleon, A. J. Durkin, J. H. Tu, G. Manaker, J. D. Fallon, N. Kollias, “In vivo fluorescence spectroscopy of non melanoma skin cancer, Photochem Photobiol, 73, 178-183, 2001.
9. R. Na, I. M. Stender and H. C. Wulf, “Can autofluorescence demarcate basal cell carcinoma from normal skin? A comparison with protoporphyrin IX fluorescence”, Acta Derm Venereol, 81, 246-249, 2001.
10. W. D. Tian, R. Gillies, L. Branceleon and N. Kollias, “Aging effects of ultraviolet A exposure may be quantified by fluorescence excitation spectroscopy in vivo”, J Invest Dermatol, 116, 840-845, 2001.
11. L. Branceleon, G. Lin and N. Kollias, “The in vivo fluorescence of tryptophan moieties in human skin increases with UV exposure and is a marker for epidermal proliferation”, J Invest Dermatol, 113, 977-982, 1999.
12. W. Sharman, C. Allen and J van Lier, “Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications”, Drug Discovery Today, 4, 507-517, 1999.
13. S. Kimel, G. Kostenich, A Orenstein, “Photodynamic therapy: basic principles and applications to skin cancer”, Encyclopedia of Cancer, 2nd Edition, Elsevier Science, 2002.
14. A. Castano, T. Demidova, M. Hamblin, «Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular, localization, Photoiagn Photodyn Ther, 1, 279-293, 2004.
15. A. Kubler, “Photodynamic therapy”, Med Laser Appl, 20, 37-45, 2005.
16. C. Hopper, “Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer”, Lancet Oncol, 1, 212-219, 2000.

17. K. Kalka, H. Merkand and H. Mukhtar, “Photodynamic therapy in dermatology”, J Am Acad Dermatol, 42, 389-413, 2002.

18. R. Allison, C. Sibata, G. Downie, R. Cuenca, “A clinical review of PDT for cutaneous malignancies”, Photodiagn Photodyn Ther, 3, 214-226, 1006.

19. S. Brown, E. Brown and I. Walker, “The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment”, Lancet Oncol, 5, 497-508, 2004.

20. R. Haddad, E. Nesher, J. Weiss, Y. Skornick, H. Kashtan, “Photodynamic therapy for Bowen’s disease and squamous cell carcinoma of the skin”, Photodiagn Photodyn Ther, 1, 225-230, 2004.

21. A. Williams, B. Barry, “Penetration enhancers”, Adv Drug Deliv Rev, 56, 603-618, 2004.

22. A. Leunig, M. Mehlmann, C. Betz, H. Stepp, S. Argobast, G. Grevers, R. Baumgartner, “Fluorescence staining of oral cancer using a topical application of 5-aminolevulinic acid: fluorescence microscopic studies”, J. Photochem Photobiol, 60, 44-49, 2001.

23. Q. Peng, A. M. Soler, T. Warloe, J. M. Nesland, K. E. Giercksky, “Selective distribution of porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate”, J Photochm Photobiol, 62, 140-145, 2001.

24. J. T. van den Akker, V. Iani, W. M. Star, H. J. Sterenborg, J. Moan, “Topical application of 5-aminolevulinic acid hexyl ester and 5-aminolevulinic acid to normal nude mouse skin: differences in protoporphyrin IX fluorescence kinetics and the role of the stratum corneum” Photochem Photobiol 72, 681–689, 2000.

25. A .Juzeniene, J. Moan, “The history of PDT in Norway. Part II. Recent advances in general PDT and ALA-PDT” Photodiagn Photodyn Ther 4, 80-87, 2007.

26. M. Detty, S. Gibson, and S. Wagner, “Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy”, 47, 3897-3915, J Med Chem, 2004.

27. A. Williams, B. Barry, “Penetration enhancers”, Advanc Drug Deliver Rev, 56, 603-618, 2004.

28. D. Bellnier, W. Greco, G. Loewen, H.Nava, A. Oseroff, T. Dougherty, “Clinical pharmacokinetics of the PDT photosensitizers Porfimer Sodium (Photofrin), 2-[1-Hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a (Photochlor) and 5-ALA-induced Protoporphyrin IX”, Lasers Surg Med 38,439-444, 2006.

29. A. Sieron, A. Kawczyk-Krupa, M. Adamek, W. Cebula, M. Szygula, W. Zieleznik, M. Gruk, B. Suwala-Jurczyk, “Photodynamic therapy (PDT) using topically applied δ-aminolevulinic acid (ALA) for the treatment of malignant skin tumors”, Photodiagn Photodyn Ther, 1, 311-317, 2004.

30. P. Babilas, S. Karrer, A. Sidoroff, M. Landthaler, R. M. Szeimies, “Photodynamic therapy in dermatology-an update”, Photoderm Photoimm Photomed, 21, 142-149, 2005.

31. R. Haddad, E. Nesher, J. Weiss, Y. Skornick, H. Kashtan, “Photodynamic therapy for Bowen’s disease and squamous cell carcinoma of the skin”, Photodiagn Photodyn Ther, 1, 225-230, 2004.

32. American Cancer Society, Skin Cancer Facts, Copyright 2007.

33. A. Dlugosz, G. Merlino and S. Yuspa, Progress in cutaneous cancer research, J. Invest. Dermatol. 7, 17-26, 2002.

34. C. Baudouin, M. Charveron, R. Tarroux and Y. Gall, «Environmental pollutants and skin cancer», Cell Biol Toxicol, 18, 341-348, 2002.

35. F. R. de Gruijl, "Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation", Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 15, 316-320, 2002.

36. S. F'guyer, F. Afaq, H. Mukhtar, "Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents", Phtodermatol Photoimmunol. Photomed 19, 56-72, 2003.

37. F. Afaq, H. Mukhtar, "Photochemoprevention by botanical antioxidants", Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 15, 297-306, 2002.

38. L. Pacjer, G. Rimbach and F. Virgili, "Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (Pinus Maritima) bark, Pycnogenol", Free Rad Biol Med 27, 704-724, 1999.

39. G. Blazso, M. Gabor and P. Rohdewald, "Antiinflammatory activities of procyanidin-containg extracts from Pinus pinaster Ait. after oral and cutaneous application", Pharmazie, 52, 380-382, 1997.

40. V. Melnikova, L. Bezdetnaya, I. Belitchenco, A. Potapenco, J. L. Merlin, F. Guillemin, " Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorine-sensitized photodynamic damage of cultured tumor and normal cells in the presence of high concentrations of a-tocopherol", Cancer Lett, 139, 89-95, 1999.

41. Shevchuk, V. Chekulayev, L. Chekulayeva, "Enhancement of the efficiency of photodynamic therapy of tumors by t-butyl-4-hydroxyanisole", J Photchem Photobiol, 45, 136-143, 1998.

42. E. Kelley, F. Domann, G. Buettner, L. Oberley, P. Burns, "Increased efficacy of in vitro Photofrin® photosensitization of human oral squamous cell carcinoma by iron and ascorbate", 40, 273-277, 1997.

43. J. Frank, A. Flaccus, C. Schwarz, C. Lambert, H. Biesalki, "Ascorbic acid suppresses cell death in rat DS-sarcoma cancer cells induced by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy", Free Rad Biol Med, 40, 827-836, 2006.

44. A. Matsuyama, H. Nakano, K. Harada, T. Yamazaki, T. Kanno, M. Wakui, K. Hanada, "Enhancement of photodynamic effect in normal rat keratinocytes by treatment with 1,25 dihydroxy vitamin D_3", Photodermatol Photoimmunol Photomed, 19, 303-308, 2003.

45. G. Kramarenko, W. Wilke, D. Dayal, G. Buettner, F. Schafer, "Ascorbate enhances the toxicity of the photodynamic action of Verteporfin in HL-60 cells", Free Rad Biol Med, 40, 1615-1627, 2006.