



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

«Διερεύνηση της φασματοσκοπίας υπερύθρου εξασθενημένης ολικής ανάκλισης (ATR-FTIR) σε βιολογικά δείγματα για την διάκριση υγιών ατόμων και ασθενών με καρκίνο του προστάτη».



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΚΑΝΑΒΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΑΚΚΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

«Διερεύνηση της φασματοσκοπίας υπερύθρου εξασθενημένης ολικής ανάκλισης (ATR-FTIR) σε βιολογικά δείγματα για την διάκριση υγιών ατόμων και ασθενών με καρκίνο του προστάτη».



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΚΑΝΑΒΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΑΚΚΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ημερομηνία αίτησης του κ. Σακκά: 10/11/2022

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 1072/2.12.2022

Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ: Σακκάς Βασίλειος

.....

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 9/11/2022

Θέμα: «Διερεύνηση της φασματοσκοπίας υπερύθρου εξασθενημένης ολικής ανάκλησης (ATR-FTIR) σε βιολογικά δείγματα για την διάκριση υγιών ατόμων και ασθενών με καρκίνο του προστάτη»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:

1. Αναπληρωτής Καθηγητής Βασίλειος Σακκάς
2. Καθηγητής Αθανάσιος Βλεσσίδης
3. Αναπληρωτής Καθηγητής Δημήτριος Μπαλτογιάννης

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διατριβής στις

**Ο πρόεδρος του
Τμήματος Χημείας**

Πλακατούρας Ιωάννης

**Η γραμματέας του
Τμήματος Χημείας**

Τουτουτζόγλου Ξανθή

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία αποτελεί τη διπλωματική εργασία του μεταπτυχιακού προγράμματος «Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών-Αναλυτικής Χημείας» του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Το τελικό αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μελέτης είναι, σε μεγάλο βαθμό, αποτέλεσμα της προσωπικής μου συνεργασίας με μια ομάδα επιστημόνων που συντέλεσαν ο καθένας με διαφορετικό τρόπο στην διεξαγωγή της ερευνητικής εργασίας. Θα ήθελα λοιπόν να γίνει αναφορά σε καθέναν από αυτούς και να τους ευχαριστήσω για την συνεισφορά τους.

Αρχικά θα αναφέρω τον Αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Χημείας και επιβλέπων καθηγητή μου κ. Σακκά Βασίλειο. Η καθοδήγηση και η βοήθεια του ήταν ένας από τους βασικούς λόγους της πραγματοποίησης της συγκεκριμένης διατριβής και συνείσφερε σε όλα τα στάδια της εξέλιξης της ιδέας από την γέννηση μέχρι την ολοκλήρωση της. Θέλω επίσης να τον ευχαριστήσω για την ευκαιρία που μου έδωσε να είμαι μέλος του εργαστηρίου αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα.

Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Πανεπιστημιακής Ουρολογικής Κλινικής του ΠΓΝΙ και συγκεκριμένα τον Αναπληρωτή καθηγητή Ουρολογίας κ. Μπαλτογιάννη Δημήτριο καθώς και τον Ιατρό Χειρουργουρολόγο κ. Παλιούρα Αθανάσιο για την άκρως σημαντική συνεισφορά τους στην συλλογή των δειγμάτων των ασθενών και την άριστη συνεργασία. Για την σημαντική συνεισφορά του στην συλλογή των δειγμάτων θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τον Ιατρό ουρολόγο κ. Συλλάκο Αναστάσιο. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Βλεσσίδα Αθανάσιο για την συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της διατριβής του και την επιστημονική καθοδήγηση.

Έπειτα θα ήθελα να αναφέρω ξεχωριστά τους συνεργάτες μου στο εργαστήριο, τον υποψήφιο διδάκτορα Χρηματοπούλο Χριστόφορο, την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Λυπηρού Λουκία και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Βερτζάγια Αντωνία τόσο για την επιστημονική τους καθοδήγηση όσο και για την δημιουργία ενός άκρως θετικού κλίματος κατά την εργασία μου στο εργαστήριο του κ. Σακκά.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς αλλά και τον αδερφό μου για την συμπαράσταση και την βοήθεια τους κατά την διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Νοέμβριος 2022

Περίληψη

Στόχος της συγκεκριμένης μελέτης είναι η ανάπτυξη ενός αναλυτικού πρωτοκόλλου για την ανίχνευση διαφοροποιήσεων σε δύο ομάδες ατόμων μία εκ των οποίων θα έχει νοσήσει (ή θα νοσεί) από μία ασθένεια και η άλλη όχι. Επιπλέον η μελέτη αποσκοπεί στον να θέσει τα θεμέλια για την ανάπτυξη ενός απλού και χωρίς υψηλό κόστος, αναλυτικού πρωτοκόλλου για την διάγνωση της συγκεκριμένης ασθένειας.

Ως αντικείμενο της μελέτης επιλέχθηκε ο καρκίνος του προστάτη καθώς αποτελεί μία από τις πιο συχνές μορφές καρκίνου στον ανδρικό πληθυσμό και η έγκαιρη και έγκυρη διάγνωσή του αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για την βελτίωση του επιπέδου ζωής του συνόλου του ανδρικού πληθυσμού. Τα εργαλεία που επιλέχθηκαν για την επίτευξη του στόχου ήταν η τεχνική της Φασματοφωτομετρίας Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FTIR) σε συνδιασμό με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (ATR) και η ανάλυση των δεδομένων μέσω Μεταβολομικής Ανάλυσης που σχετίζεται άμεσα με τον ανθρώπινο οργανισμό καθώς μελετά τα προϊόντα του ανθρώπινου μεταβολισμού, τους μεταβολίτες.

Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στην ανάπτυξη μιας μεθόδου δειγματοληψίας που να συμφωνεί με τις απαιτήσεις του συνόλου της μελέτης. Για τον λόγο αυτό επιλέχθηκε μια μέθοδος η οποία είχε χαμηλό κόστος και ήταν όσο το δυνατόν λιγότερο επίπονη για τον ασθενή. Η υπόλοιπη διαδικασία αφορούσε την προκατεργασία του δείγματος, την ανάλυση του στο βασικό όργανο και την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Η προκατεργασία του δείγματος στοχεύει στην απομάκρυνση τυχών παρεμποδιστικών παραγόντων που περιέχονται στο δείγμα (π.χ. υγρασία), και στην μετατροπή του δείγματος στην κατάλληλη μορφή ώστε να είναι δυνατό να μετρηθεί με την τεχνική της ATR-FTIR. Η ανάλυση του δείγματος στο βασικό όργανο έγινε σε κατάλληλες συνθήκες και τα αποτελέσματα είχαν την μορφή φασμάτων υπερύθρου. Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων αρχικά χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SpectrGryph μέσω του οποίου έγινε η κανονικοποίηση των φασμάτων και η μετατροπή τους σε μορφή κατάλληλη για την μετέπειτα στατιστική τους επεξεργασία. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με το λογισμικό SIMCA και τα αποτελέσματα είχαν την μορφή διαγραμμάτων PCA, PLS-DA και OPLS-DA από όπου και εξάχθηκαν τα συμπεράσματα για τις διαφοροποιήσεις των δύο ομάδων δειγμάτων.

Περιεχόμενα

A. Θεωρητικό Μέρος	11
1. Καρκίνος του Προστάτη.....	11
1.1. Στοιχεία Ανατομίας και Φυσιολογίας του Προστάτη.....	11
1.1.1. Ανατομία και λειτουργία.....	11
1.1.2 Έλεγχος Ανάπτυξης του Προστάτη.....	12
1.2. Στοιχεία για τον καρκίνο του Προστάτη.....	13
1.2.1. Επιδημιολογία.....	13
1.2.2. Βαθμός Gleason.....	15
1.2.3. Προδιάθεση εμφάνισης Καρκίνου του Προστάτη.....	16
1.2.4. Διαγνωστική προσέγγιση του καρκίνου του Προστάτη.....	18
1.2.5 Θεραπεία του καρκίνου του προστάτη.....	24
2. Φασματοσκοπία IR.....	29
2.1 Περιοχές ενδιαφέροντος στην IR Φασματοσκοπία.....	29
2.2 Προέλευση απορροφήσεων στο υπέρυθρο φάσμα.....	30
2.2.1 Επιτρεπτές Μεταπτώσεις.....	30
2.2.2 Βαθμοί ελευθερίας και κανονικοί τρόποι δόνησης πολυατομικών μορίων.....	31
2.2.3. Υπέρτονες Ταινίες και Ταινίες Συνδυασμού.....	33
2.3. Απορροφήσεις χαρακτηριστικών ομάδων στο μέσο υπέρυθρο (MIR) φάσμα.....	34
2.4. Οργανολογία Τεχνικών Υπέρυθρης Ακτινοβολίας.....	35
2.4.1 Κλασσικά Φασματοφωτόμετρα IR Διασποράς.....	35
2.4.2 Φασματοφωτόμετρα Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR).....	37
2.4.3 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR).....	42
3. Μεταβολομική Ανάλυση.....	47
3.1 Εισαγωγή.....	47
3.2 Τεχνικές Ανάλυσης Βιολογικών Συστημάτων.....	47
3.3 Αρχές Μεταβολομικής Ανάλυσης.....	48
3.3.1 Ορισμοί Μεταβολομικής Ανάλυσης.....	48
3.3.2 Μεταβόλωμα.....	49
3.4 Στοχευμένη και μη Στοχευμένη Μεταβολομική Ανάλυση.....	51
3.5 Μεθοδολογία Μεταβολομικής Ανάλυσης.....	52

3.6 Βιοδείκτες	53
4. Χαρακτηριστικά Σιέλου ως Βιολογικό Δείγμα	55
4.1 Σύσταση Σιέλου.....	55
4.2 Φασματοσκοπικό Προφίλ Σιέλου	56
5. Σκοπός της Παρούσα Ερευνητικής Εργασίας	57
B. Πειραματικό Μέρος	58
6. Υλικά και Μέθοδοι.....	58
6.1 Συλλογή Δειγμάτων	58
6.2 Προετοιμασία Δειγμάτων	59
6.3 Ανάλυση με ATR-FTIR	61
6.3.1 Συνθήκες χρήσης του οργάνου.....	61
7. Στατιστική Επεξεργασία.....	62
7.1 Ταξινόμηση δειγμάτων.....	62
7.2. Επεξεργασία Φασμάτων.....	63
7.3. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων των φασμάτων	64
8. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	67
8.1. Ανάλυση των διαγραμμάτων της στατιστικής επεξεργασίας	67
8.2 Συμπεράσματα.....	69
8.3 Προοπτικές και εξέλιξη.....	70
9. Βιβλιογραφία	72

A. Θεωρητικό Μέρος

1. Καρκίνος του Προστάτη

1.1. Στοιχεία Ανατομίας και Φυσιολογίας του Προστάτη

1.1.1. Ανατομία και λειτουργία

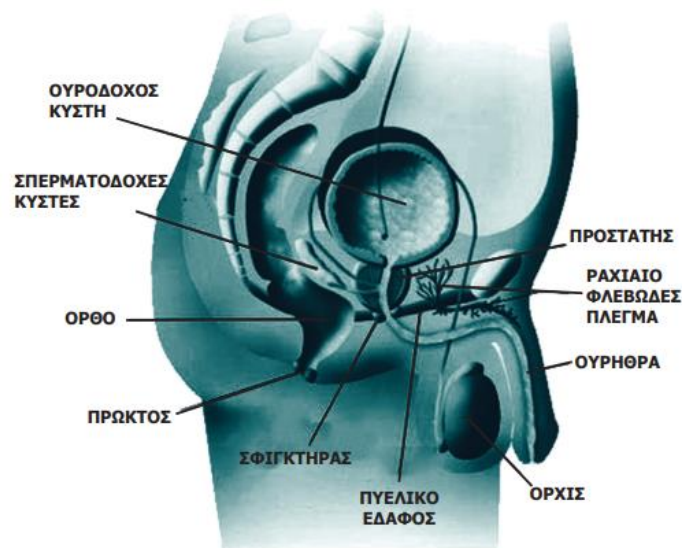
Ο προστάτης είναι ένα μικρό όργανο-αδένας που περιβάλλει την ουρήθρα. Αναπτύσσεται κατά την εφηβεία και συνεχίζει να μεγαλώνει καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του άνδρα. Στους νέους άνδρες έχει μέγεθος κάστανου και ζυγίζει περίπου 15-20 γραμμάρια. Σε περίπτωση υπερτροφίας του, μπορεί να φτάσει και τα 100-200 γραμμάρια.

Όσον αφορά τη θέση του σε σχέση με τα υπόλοιπα ανατομικά στοιχεία του άνδρα, βρίσκεται στην υποπεριτοναϊκή χώρα της ελάσσονος πυέλου, κάτω από την ουροδόχο κύστη, πάνω στο πυελικό έδαφος, μπροστά από το ορθό και πίσω από την ηβική σύμφυση, περιβάλλει την προστατική μοίρα της ουρήθρας και τους εκσπερματιστικούς πόρους. Για τη συγκράτηση και σταθεροποίηση του σε αυτή τη θέση συμμετέχουν οι ηβοπροστατικοί σύνδεσμοι, η ανώτερη περιτονία του ουρογεννητικού τριγώνου (που επενδύει τον προστάτη και το αρχικό μεμβρανικό τμήμα της ουρήθρας) και τα πρόσθια τμήματα του ανελκτήρα μυός (που πορεύονται πίσω από το ηβικό οστό και περικλείουν τις πλευρές του προστάτη). Πήρε το όνομα του από τη θέση όπου βρίσκεται (προϊσταται, βρίσκεται μπροστά και κάτω από την ουροδόχο κύστη) και όχι γιατί μας προστατεύει από κάτι. Είναι εύκολο για τον γιατρό να εξετάσει τον προστάτη, ψηλαφώντας τον με το δάχτυλο μέσα από το ορθό, αφού, όπως προαναφέρθηκε, βρίσκεται μπροστά από το κατώτερο τμήμα του παχέος εντέρου, το ορθό.[1]

Η κύρια λειτουργία του προστάτη είναι η παραγωγή ενός υγρού (γαλακτώδεις και αλκαλικές εκκρίσεις), το οποίο, αφενός μεταφέρει το σπέρμα κατά την εκσπερμάτιση και αφετέρου βοηθά στην ρευστοποίηση του σπερματικού υγρού έτσι ώστε η διείσδυση των σπερματοζωαρίων στην τραχηλική βλέννα να είναι ευκολότερη. Η προστατική έκκριση ρυθμίζεται κυρίως από τη δράση ανδρογόνων και από νευρικά ερεθίσματα, ενώ η παραγωγή του προστατικού υγρού αυξάνεται στη διάρκεια της συνουσίας. Κατά τη διάρκεια του οργασμού, το υγρό περιεχόμενο των σπερματοδόχων κύστεων μαζί με το έκκριμα από τον προστατικό αδένα εισέρχονται στην ουρήθρα, αναμιγνύονται μεταξύ τους και σχηματίζουν το σπερματικό υγρό. Το σπερματικό υγρό εξέρχεται από την ουρήθρα με ρυθμικές μυϊκές

συσπάσεις.[1]

Ο προστάτης λειτουργεί επίσης σαν ένα συνδετικό-κομβικό κουτί κατά την διάρκεια της εκσπερμάτισης. Επιτρέπει, δηλαδή, στα σωληνάρια που μεταφέρουν το σπέρμα από τους όρχεις (σπερματικός πόρος) και στα σωληνάκια που αποχετεύουν το σπερματικό υγρό από τις σπερματοδόχους κύστες (αποθηκευτικές δεξαμενές που παρέχουν τροφή στα σπερματοζωάρια και βρίσκονται πίσω από τον προστάτη) να συμβάλουν σε ένα κοινό σωληνάκι, που ονομάζεται εκσπερματικός πόρος, και να αδειάζουν από κοινού το σπερματικό υγρό στην ουρήθρα.[1]



Εικόνα 1.1: Ανατομία Προστάτη

1.1.2 Έλεγχος Ανάπτυξης του Προστάτη

Η ανάπτυξη των φυσιολογικών αλλά και των νεοπλασματικών κυττάρων του προστάτη εξαρτάται από τα επίπεδα των ανδρογόνων. Μεγαλύτερη αναλογία των κυκλοφορόντων, στον ορό, ανδρογόνων παράγεται από τους όρχεις με τη μορφή της τεστοστερόνης (την ανδρική γεννητική ορμόνη), ενώ μικρό ποσοστό (η ανδροστενεδιόνη και η δυεπιανδροστερόνη) παράγεται από τα επινεφρίδια. Η τεστοστερόνη εισέρχεται στον προστάτη και, με τη βοήθεια του ενζύμου 5α-ρεδουκτάση, μετατρέπεται σε διυδροτεστοστερόνη (dehydrotestosterone-DHT), η οποία είναι η δραστική μορφή της τεστοστερόνης και διεγείρει την ανάπτυξη του προστάτη αδένου.[1]

Έτσι, ο προστάτης προοδευτικά μεγαλώνει σε μέγεθος με την πάροδο της ηλικίας κάτω από την διεγερτική επίδραση της διυδροτεστοστερόνης. Η προοδευτική αυτή υπερπλασία του προστάτη προκαλεί συμπτώματα όπως ελάττωση της ροής των ούρων και αίσθημα ανεπαρκούς κένωσης της κύστης μια εντελώς φυσιολογική και καλοήθης (μη καρκινική) κατάσταση. Τα ανδρογόνα των επινεφριδίων μετατρέπονται περιφερικά επίσης σε DHT, φαίνεται όμως ότι ο ρόλος τους στην ανάπτυξη των προστατικών κυττάρων είναι περιορισμένος.[1]

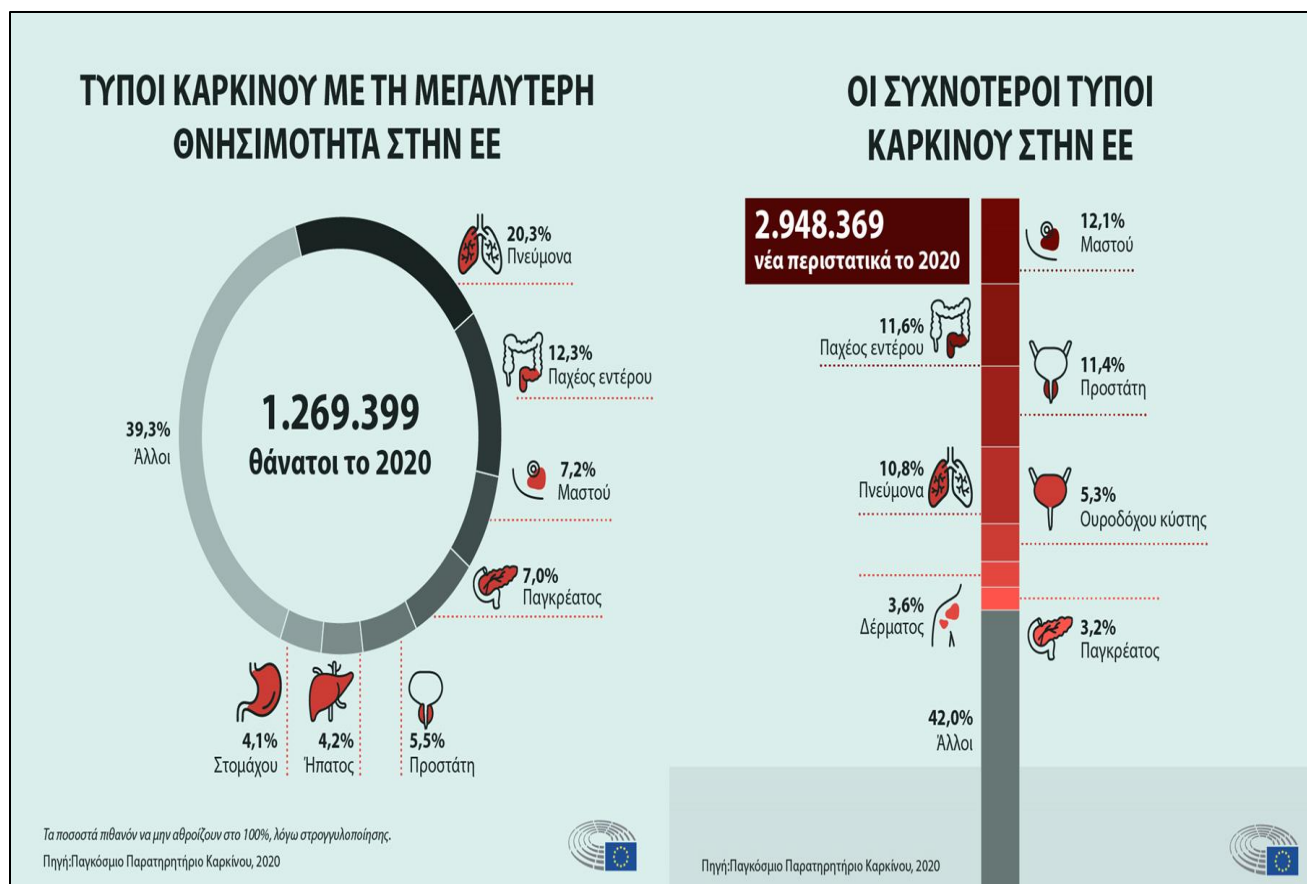
1.2. Στοιχεία για τον καρκίνο του Προστάτη

1.2.1. Επιδημιολογία

Ο καρκίνος του προστάτη, με βάση επιδημιολογικές μελέτες αποτελεί παγκόσμια την δεύτερη σε συχνότητα αιτία καρκίνου και την έκτη σε συχνότητα αιτία θανάτου από καρκίνο μεταξύ των ανδρών. Στην εικόνα 1.1 φαίνονται τα στατιστικά στοιχεία εμφάνισης του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου για το έτος 2020.[2]

Στις δυτικές βιομηχανικές περιοχές ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί το 17% του συνόλου των νεοανακαλυπτομένων νεοπλασματικών νόσων του άνδρα ετησίως. Σε συνάρτηση με τον προσδόκιμο χρόνο ζωής σήμερα, υπολογίζεται ότι κάθε 11ο άρρεν νεογέννητο θα αναπτύξει καρκίνο του προστάτη και κάθε 30ο θα πεθάνει από τον όγκο αυτό.[4]

Η συχνότητα και τα ποσοστά θνησιμότητας της ήδη κλινικά εμφανισθείσας νόσου διαφέρουν από φυλή σε φυλή, παρ' όλον ότι ο λανθάνων καρκίνος σε όλες τις ομάδες είναι το ίδιο συχνός. Εντύπωση προκαλεί η υψηλότερη συχνότητα της θνησιμότητας του καρκίνου του προστάτη στους μαύρους αμερικανούς σε σύγκριση προς τους λευκούς. Η νοσηρότητα του μαύρου αμερικανικού πληθυσμού είναι 6 φορές υψηλότερη από εκείνη του πληθυσμού στη Νιγηρία. Η θνησιμότητα από καρκίνωμα του προστάτη είναι χαμηλή στους Ινδιάνους και τους Νοτιοαμερικανούς. Παρ' όλο που δεν υπάρχει ικανοποιητική εξήγηση γι' αυτές τις διαφορές, φαίνεται ότι παίζουν κάποιο ρόλο οι περιβαλλοντικές επιδράσεις, η διατροφή και η σεξουαλική δραστηριότητα.[4]



Εικόνα 1.2: Στατιστικά στοιχεία για την επιδημιολογία του καρκίνου του προστάτη στην ΕΕ

Επιδημιολογικές μελέτες στις διάφορες χώρες έδειξαν ότι ο καρκίνος του προστάτη εμφανίζεται με συχνότητα στην Ιαπωνία: 4,3/100.000, στη Γερμανία: 46/100.000 και στις ΗΠΑ: 74/100.000. Στον ελληνικό χώρο δεν υπάρχουν ακριβή επιδημιολογικά στοιχεία για τον καρκίνο του προστάτη. Από τα ελάχιστα στοιχεία που διαθέτουμε προκύπτει ότι ο καρκίνος αυτός καταλαμβάνει την τρίτη θέση.[3]

Η σχέση μεταξύ προστατικού καρκινώματος και ηλικίας είναι στενή. Αυτό ισχύει στον ίδιο βαθμό τόσο για τον λανθάνοντα όσο και για τον κλινικό καρκίνο. Πριν από το 50ό έτος της ηλικίας ο καρκίνος αυτός είναι σπάνιος, αλλά μετά το 80ό έτος σχεδόν «γενικευμένος». Ο καρκίνος του προστάτη φαίνεται να είναι επιθετικότερος στους νεότερους άνδρες απ' ό,τι στους ηλικιωμένους παρ' όλον ότι αυτό δεν έχει αποδειχθεί στατιστικά. Σε προεπιλεγμένο υλικό επιβεβαιώνεται αυτή η άποψη: το ειδικό από τον όγκο ποσοστό θνησιμότητας εξαρτάται από την ηλικία κατά την έναρξη της θεραπείας.[5]

1.2.2. Βαθμός Gleason

Όλοι οι καρκίνοι του προστάτη δεν είναι βιολογικά ισοδύναμοι. Έτσι, μερικοί καρκίνοι εμφανίζουν μεγαλύτερο “βιολογικό δυναμικό” για τοπική ή απομακρυσμένη εξάπλωση σε σχέση με άλλους καρκίνους. Ο βαθμός της ιστολογικής διαφοροποίησης είναι μια σημαντική παράμετρος που συνδέεται άμεσα με την πιθανή κακοήγη συμπεριφορά ενός όγκου. Ο Gleason ταξινόμησε τους καρκίνους του προστάτη από 270 άνδρες που συμμετείχαν στις κλινικές δοκιμασίες των Veterans Administration Cooperative Urological Research Group’s (VACURG) των δεκαετιών των 1960 και 1970 και δημιούργησε ένα απλό βαθμονομικό σύστημα για την ταξινόμηση της ιστολογικής διαφοροποίησης. Αργότερα, ο Gleason ενσωμάτωσε στη μελέτη του 1032 περιπτώσεις που συμμετείχαν στις δοκιμασίες VACURG σε εθνικό επίπεδο παρέχοντας ένα νέο πιο εξελιγμένο βαθμολογικό σύστημα. Σ’ αυτό το σύστημα πρέπει κανείς να έχει υπόψιν του ότι οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με τη θεραπευτική τους προσέγγιση σε τέσσερα διαφορετικά θεραπευτικά πρωτόκολλα.[3]

Η βαθμολογία κατά Gleason υπολογίζεται με βάση τη μορφολογία και την αρχιτεκτονική διαμόρφωση των αδένων του προστάτη. Αρχικά διατυπώθηκε η κλίμακα του 5, στην οποία περιγράφεται ο βαθμός στον οποίον οι κακοήθεις αδενικοί μικροσχηματισμοί μοιάζουν στους φυσιολογικούς αδένες. Ο πρώτος βαθμός καθορίζεται από το κυρίαρχο (πρωτεύον) πρότυπο διαφοροποίησης και ο δεύτερος από το δεύτερο πιο συχνό πρότυπο: αυτοί οι βαθμοί έπειτα προστίθενται μαζί και δίνουν το άθροισμα κατά Gleason π.χ. 3 + 4 = 7. Το άθροισμα κατά Gleason τροποποιήθηκε το 2005, διότι ήταν δύσκολο να γίνει βιοψία με βελόνα καρκινωμάτων με βαθμό Gleason 1 και 2, έτσι πλέον στην πράξη τα αθροίσματα κυμαίνονται από 6 έως 10. Σ’ αυτήν την κλίμακα όσο χαμηλότερος είναι ο βαθμός τόσο εγγύτερα στη φυσιολογική ιστολογία του προστάτη βρίσκεται ο όγκος και τόσο μικρότερη πιθανότητα διασποράς εμφανίζει.[3]

Τα νεοπλάσματα με Gleason score 2-4 χαρακτηρίζονται ως νεοπλάσματα υψηλής διαφοροποίησης, εκείνα με score 5-7 ως νεοπλάσματα μέσης διαφοροποίησης και εκείνα με score 8-10 ως νεοπλάσματα χαμηλής διαφοροποίησης. Η τελευταία κλίμακα παρουσιάζει και μεγάλο προγνωστικό ενδιαφέρον καθώς τα νεοπλάσματα υψηλής, μέσης και χαμηλής διαφοροποίησης εμφανίζουν αντίστοιχα πιθανότητα εξέλιξης του καρκίνου σε 10 έτη, 25%, 50%, και 75%. Ο Gleason προσδιορίζοντας τους θανάτους ανά ασθενή και έτος με βάση τη κλίμακα 10 του Gleason score διαπίστωσε ότι οι ασθενείς με νεοπλάσματα χαμηλής διαφοροποίησης (Gleason:8-10) είναι πιο πιθανό να αποβιώσουν από καρκίνο του προστάτη σε σχέση με νεοπλάσματα υψηλής διαφοροποίησης.[3]

1.2.3. Προδιάθεση εμφάνισης Καρκίνου του Προστάτη

Με τα σημερινά δεδομένα η ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη είναι ένα φαινόμενο που συσχετίζεται με την ηλικία. Η φυλή, η κληρονομικότητα, η γεωγραφική κατανομή, άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες ή παθολογικές παθήσεις δεν φαίνεται, με βάση τα σημερινά στοιχεία, να επηρεάζουν με σαφή τρόπο την ανάπτυξη του.[2]

Ωστόσο, ορισμένοι από αυτούς τους παράγοντες συσχετίζονται με μία αυξημένη επίπτωση του βιολογικά επιθετικού ή κλινικά σημαντικού καρκίνου. Έχει αναγνωριστεί η πιθανότητα ύπαρξης μηχανισμών, μέσω των οποίων ο λανθάνων καρκίνος μεταπίπτει σε κλινικά εμφανή μορφή.

Τα αίτια που προκαλούν την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη παραμένουν σε γενικές γραμμές άγνωστα. Παρακάτω αναφέρονται ορισμένοι παράγοντες που κυρίως επηρεάζουν την πιθανότητα μετάπτωσης του καρκίνου σε κλινικά εμφανή μορφή και την ένταση της εμφάνισης του:

- **Κληρονομικοί ή γενετικοί παράγοντες:**

Παίζουν πιθανότατα ένα σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη. Έχει αποδειχθεί από εμπειριστατωμένες επιδημιολογικές μελέτες ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης προστατικού καρκίνου αυξάνει όταν υπάρχει θετικό οικογενειακό ιστορικό. Η παρουσία της νόσου σε δύο ή τρεις συγγενείς 1^{ου} βαθμού ή σε έναν 1^{ου} και έναν 2^{ου} βαθμού αυξάνει τον σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου κατά περίπου 5, 11 και 9 φορές αντίστοιχα. Από το σύνολο των προστατικών καρκίνων μόνο ένα ποσοστό μικρότερο του 10 % φαίνεται να είναι κληρονομικής αιτιολογίας (οικογενής καρκίνος του προστάτη).

- **Φυλετική προέλευση και γεωγραφική κατανομή:**

Ο επιπολασμός του κλινικά εμφανούς προστατικού καρκίνου διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες φυλετικές ομάδες μιας συγκεκριμένης περιοχής. Μελέτες που έγιναν στις Η.Π.Α. έδειξαν ότι η επίπτωση του καρκίνου του προστάτη στους γηγενείς αφροαμερικανούς είναι 6 φορές μεγαλύτερη απ' ό,τι σε αυτούς νιγηριανής καταγωγής. Σε ασιατικές φυλές, ενώ παρατηρείται ανάλογος επιπολασμός, εμφανίζονται διαφορές ανάλογα με τον τόπο διαμονής. Οι αφροαμερικανοί κάτοικοι των Η.Π.Α. εμφανίζουν την υψηλότερη επίπτωση καρκίνου του προστάτη σε ολόκληρο τον κόσμο, ενώ συγκριτικά εμφανίζουν καρκίνο σε μικρότερη ηλικία, σε πιο προχωρημένο στάδιο και με υψηλότερο βαθμό διαφοροποίησης. Αντίθετα οι Ινδιάνοι και οι

κάτοικοι ισπανικής καταγωγής παρουσιάζουν χαμηλότερο κίνδυνο θανάτου από καρκίνο του προστάτη:

- **Επιγενεείς παράγοντες:**

Πολλοί τέτοιοι παράγοντες έχουν συσχετιστεί αιτιολογικά με τον καρκίνο του προστάτη. Οι κυριότεροι είναι το επάγγελμα, η διατροφή, τα περιβαλλοντικά καρκινογόνα, οι σεξουαλικές συνήθειες και τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα. Μεταξύ των επαγγελματιών, αυξημένος κίνδυνος προσβολής από τη νόσο εμφανίζεται στους εργάτες που έρχονται σε επαφή με κάδμιο και άλλα βαρέα μέταλλα, ενώ πρόσφατα αναγνωρίστηκε ο αυξημένος κίνδυνος καρκίνου του προστάτη σε άνδρες που εκτίθενται σε διάφορα ραδιοϊσότοπα για επαγγελματικούς λόγους.

- **Διαιτητικές συνήθειες:**

Έχει θεωρηθεί από ορισμένους ερευνητές ότι συσχετίζονται με την αυξημένη επίπτωση καρκίνου του προστάτη, ενώ και η ανεπάρκεια της βιταμίνης D έχει επίσης προταθεί ως σημαντικός παράγοντας κινδύνου.

- **Ορμονικοί παράγοντες:**

Ορμόνες όπως η τεστοστερόνη, η διϋδροτεστοστερόνη, η προλακτίνη, η δραστηριότητα του ενζύμου 5α-ρεδουκτάση και η σφαιρίνη δέσμευσης των ορμονών του φύλου (sexual hormone binding globulin, SHBG) έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη προστατικού καρκίνου και ίσως αποτελούν αιτιολογικούς παράγοντες για την εμφάνιση του προστατικού καρκίνου.

- **Αιτιολογική σχέση καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη και ανάπτυξης καρκινώματος του προστάτη:**

Η σχέση αυτή δεν έχει αποδειχτεί. Η μετάπτωση της καλοήθους υπερπλασίας, που αναπτύσσεται στην κεντρική ζώνη, σε νεόπλασμα που αναπτύσσεται στην περιφερική ζώνη είναι απίθανη. Όμως και για τις δύο παθήσεις ενοχοποιείται η ίδια, άγνωστη ακόμη, νεύρο/ορμονική διέγερση.

- **Αλληλεπιδράσεις στρώματος-επιθηλίου:**

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ στρώματος-επιθηλίου οι οποίες διαμεσολαβούνται μέσω πολυπεπτιδικών αυξητικών παραγόντων φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αλλά και την εξέλιξη του προστατικού καρκίνου.

- **Παράγοντες που διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό:**

Ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας (transforming growth factor), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor), ο αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από τα αιμοπετάλια (platelet derived growth factor) καθώς και νεύρο-ενδοκρινικά πεπτιδία δρώντας με αυτοκρινή, παρακρινή και ενδοκρινή τρόπο διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την εξέλιξη της νόσου.[2]

1.2.4. Διαγνωστική προσέγγιση του καρκίνου του Προστάτη

1.2.4.1. Κλινική Εικόνα

Η διάγνωση του καρκίνου του προστάτη στα πρώιμα στάδια είναι δύσκολη. Τα συμπτώματα που εμφανίζουν οι άντρες με καρκίνο του προστάτη μπορούν να διακριθούν σε δύο κύριες κατηγορίες: η μία περιλαμβάνει τους ασθενείς με συμπτώματα απόφραξης του κατώτερου ουροποιητικού συστήματος (60-70%) και η άλλη τους ασθενείς με συμπτώματα από προχωρημένη νόσο (30-40%).

Η κλινική εικόνα του καρκίνου του προστάτη είναι ανάλογη με αυτή του καλοήθους αδενώματος του προστάτη. Δυσουρικά ενοχλήματα, μείωση της ροής των ούρων, αίσθημα ατελούς κένωσης της ουροδόχου κύστης είναι απότοκα απόφραξης της ουρήθρας από νεοπλασματικό ιστό. Ερεθιστικά συμπτώματα, όπως συχνουρία, νυκτουρία, επιτακτική ούρηση δείχνουν αστάθεια του εξωστήρα μύος της ουροδόχου κύστης ως επακόλουθο χρόνιας αύξησης της ενδοκυστεϊκής πίεσης.

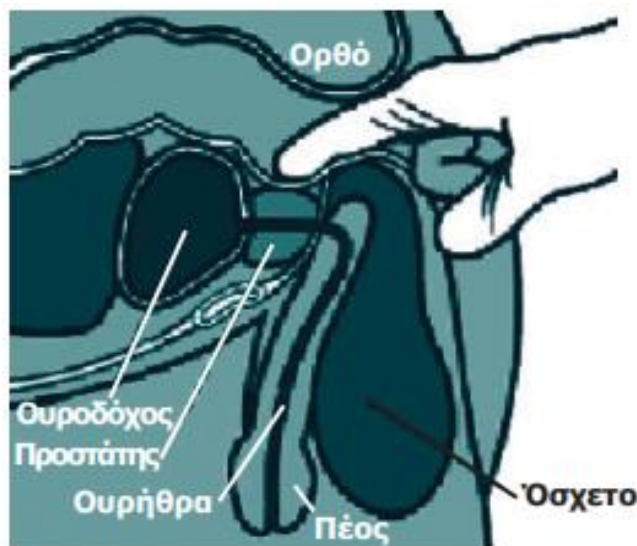
Συχνά όμως τα πρώτα συμπτώματα μπορεί να είναι από προχωρημένη νόσο, όπως νεφρική ανεπάρκεια, λόγω διήθησης των ουρητηρικών στομιών από τον πρωτοπαθή όγκο ή οστικά άλγη (π.χ. οσφυαλγία) από μεταστάσεις του όγκου.(5)

1.2.4.2. Διαγνωστικά Μέσα

1. Δακτυλική εξέταση

Η δακτυλική εξέταση από το ορθό παραμένει ακόμη και σήμερα αναντικατάστατη στη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη. Αποτελεί την απλούστερη και φθηνότερη εξεταστική μέθοδο, με τη βοήθεια της οποίας μπορούν να ανιχνευθούν περίπου το 70% των προστατικών καρκίνων της περιφερικής ζώνης.

Η δακτυλική εξέταση είναι αξιόπιστος τρόπος ανεύρεσης παθολογικών καταστάσεων του αδένα. Εάν υπάρχει, με βάση τη συμπτωματολογία, υποψία προστατικού νεοπλασματος, τότε θα πρέπει να γίνεται πριν από την ψηλάφηση του προστάτη λήψη αίματος για τον προσδιορισμό των καρκινικών δεικτών (κυρίως του PSA). Η ψηλάφηση του προστάτη από το ορθό (Εικ.5) καθιστά δυνατή με ακρίβεια την εκτίμηση του αδένα. Με την απλή αυτή εξέταση είναι δυνατό να ανακαλυφθεί περίπου το 70% των προστατικών καρκινωμάτων της περιφερικής ζώνης του προστάτη. Ο προστάτης διακρίνεται από σταθερότητα καθώς και από ελαφρά δυσκαμψία στην αφή. Η υφή του δηλαδή είναι έντονης πυκνότητας και ισχυρής ανθεκτικότητας σε εξωτερικές πιέσεις. Σκληρία του προστάτη, ανωμαλίες στην επιφάνεια και τη δομή του είναι ενδείξεις για περαιτέρω έλεγχο.[2]



Εικόνα 1.3: Δακτυλική εξέταση για την διάγνωση του καρκίνου του προστάτη

Καρκινώματα της μεταβατικής ζώνης δεν ανακαλύπτονται. Κατά τη δακτυλική εξέταση θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι εξής παράμετροι:

- το μέγεθος και η μορφή του προστάτη,
- τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας του προστάτη (βλεννογόνος του ορθού κινητός ή όχι),
- η οριοθέτηση του περιγράμματος του προστάτη,

- σκληρίες,
- μονήρης ή πολλαπλοί σκληροί όζοι.

2. Καρκινικοί Δείκτες

Μέχρι σήμερα δεν έχει ανακαλυφθεί ο ιδανικός καρκινικός προστατικός δείκτης ο οποίος θα είναι ειδικός της νόσου εμφανίζοντας ειδικότητα και ευαισθησία 100%, ενώ ταυτόχρονα θα προσδιορίζεται με μόνο μια μέτρηση και θα χαρακτηρίζει επακριβώς την έκταση της νόσου. Εντούτοις οι διαθέσιμοι σήμερα προστατικοί καρκινικοί δείκτες θεωρούνται από πολλούς ως οι σπουδαιότεροι στην Ουροογκολογία. Παρακάτω περιγράφονται οι σημαντικότεροι καρκινικοί δείκτες:

I. Προστατική Όξινη Φωσφατάση (PAP)

Τα επίπεδα της προστατικής όξινης φωσφατάσης στον ορό αποτελούν έναν από τους πιο παλιούς και κλασσικούς δείκτες για τη διάγνωση και παρακολούθηση του καρκίνου του προστάτη. Αναγνωρίστηκε ως καρκινικός δείκτης από τον Gutman το 1938 μετά την παρατήρηση των επιπέδων της στον ορό ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη. Από πολλούς ουρολόγους θεωρείται ξεπερασμένος ο προσδιορισμός της PAP στην περίπτωση που έχει ήδη προσδιοριστεί το PSA. Γενικά, ο προσδιορισμός της είναι χρήσιμος στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης ασθενών με οστικές μεταστάσεις στη θεραπεία. Η συνολική ευαισθησία της εξέτασης για όλα τα στάδια της νόσου είναι περίπου 50%. Σε μεταστατική νόσο οι τιμές της PAP μπορεί να είναι φυσιολογικές στο 20% των περιπτώσεων.

II. Προστατικό Ειδικό Αντιγόνο

Το PSA έχει για τον καρκίνο του προστάτη τη μεγαλύτερη κλινική σημασία. Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 34.000 daltons, η οποία παράγεται από τα προστατικά επιθηλιακά κύτταρα και αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα 240 αμινοξέων. Έχει ενζυμικές ιδιότητες, ανήκει δε στις πρωτεάσες της οικογένειας της καλλικρεΐνης και λειτουργικά σχρίζεται με την ρευστοποίηση του σπέρματος μέσω της ενζυματικής διάσπασης των πρωτεϊνών σεμινοζελίνης I-II και της φμπρονεκτίνης. Φυσιολογικά, το προστατικό ειδικό αντιγόνο εκκρίνεται εντός του αυλού των

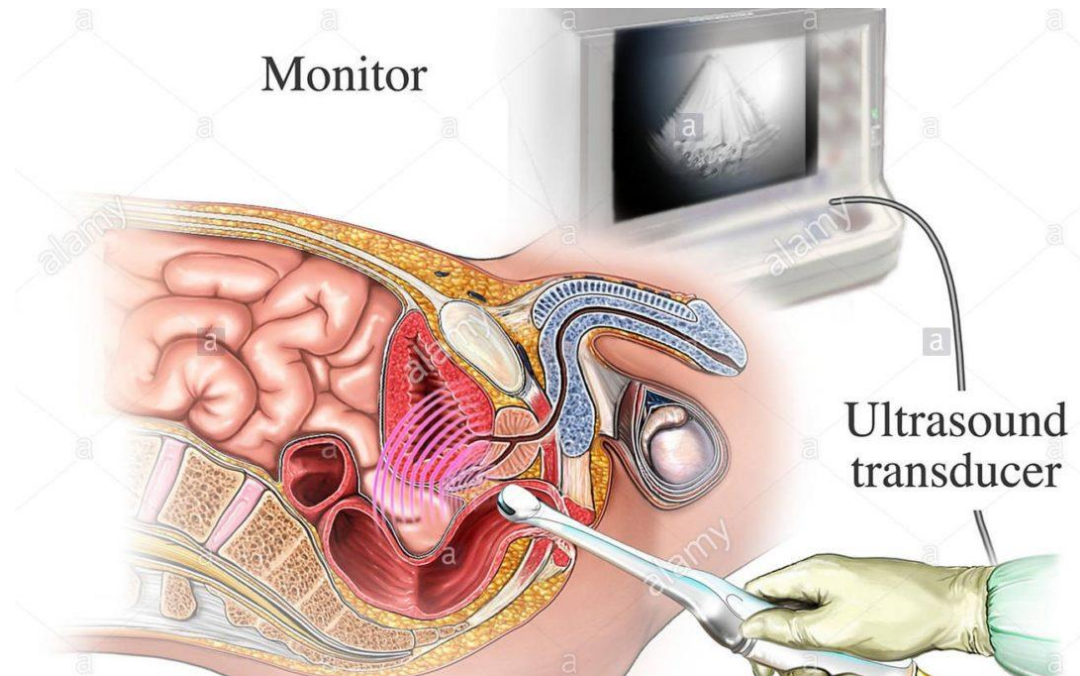
εκφορητικών προστατικών πόρων και έτσι παρουσιάζει υψηλές συγκεντρώσεις στο σπερματικό υγρό. Μικροποσότητες PSA φυσιολογικά διαφεύγουν προς τη συστηματική κυκλοφορία και ανιχνεύονται σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 4 ng/mL. Σημαντικό είναι πως ο δείκτης αυτός είναι ειδικό προς τον ιστό του προστάτη και όχι προς τον καρκίνο του προστάτη.

3. Διορθική Υπερηχογραφία

Με την χρήση του διορθικού υπερήχου είναι εφικτή η απεικόνιση της εσωτερικής δομής του προστάτη και των σπερματοδόχων κύστεων. Η κατάσταση υπερηχογραφικών κεφαλών υψηλής συχνότητας οδήγησε στην βελτίωση της εικόνας, γεγονός που επιτρέπει την ακριβή απεικόνιση των ανατομικών ζωνών του προστάτη και των τυπικών αλλοιώσεων του στις διάφορες παθήσεις ενώ ως διαγνωστική μέθοδος παρουσιάζει σημαντική έλλειψη ευαισθησίας και ειδικότητας.

Η διορθική υπερηχογραφία και η καθοδηγούμενη βιοψία έχουν αναδειχθεί σε χρήσιμα μέσα για την έγκαιρη διάγνωση και ακριβέστερη σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη, η οποία τα τελευταία χρόνια επιβεβαιώθηκε με την τροποποίηση του συστήματος TNM (tumor, nodes, metastases). Μάλιστα τα τελευταία χρόνια έχουν αποκτήσει ιδιαίτερη κλινική σημασία λόγω της καθιέρωσης του PSA ως εξέτασης ρουτίνας και της δυνατότητας συνδυασμού διαγνωστικής εξέτασης και βιοψίας στην ίδια συνεδρία.

Μέχρι το 1992 το στάδιο T2 διαχωριζόταν με το T1 με βάση την ύπαρξη ψηλαφητού όγκου στη δακτυλική εξέταση. Με την τροποποίηση του συστήματος TNM στο στάδιο T2 προστέθηκαν και όγκοι που δεν είναι ψηλαφητοί με την δακτυλική εξέταση αλλά απεικονίζονται με την διορθική υπερηχογραφία. Στο στάδιο T3 η διήθηση του αγγειοενωρδούς δεματίου και της κορυφής του προστάτη δύσκολα αναγνωρίζονται. Αντίθετα, η διήθηση των σπερματοδόχων κύστεων εύκολα αναγνωρίζεται. Στο στάδιο T4 η διήθηση του αυχένα της κύστεως επίσης δύσκολα αναγνωρίζεται λόγω της φυσιολογικής υποηχογένειας της περιοχής, σε αντίθεση με την διήθηση του ορθού που εύκολα αναγνωρίζεται λόγω της υπερηχογενούς εμφάνισης της περιτονίας του Denonvillier.[2]



Εικόνα 1.4: Σχηματική απεικόνιση διορθικής υπερηχογραφίας

Κάποιες από τις δυνατότητες που διαθέτει η διορθική υπερηχογραφία είναι οι εξής:

- Μπορεί να οπτικοποιήσει τα ευρήματα της δακτυλικής εξέτασης και/ή να αποκαλύψει το αίτιο αύξησης του PSA,
- Σε συνδυασμό με την καθοδηγούμενη βιοψία μπορεί να επιβεβαιώσει ή να αποκλείσει ύποπτη νεοπλασία,
- Η κατασκευή διορθικών κεφαλών υψηλής συχνότητας (7,5 MHz) έχει βελτιώσει την υπερηχογραφική εικόνα σε τέτοιο βαθμό, ώστε να μπορούν πλέον να αναγνωριστούν ακόμη και μικρά μη ψηλαφητά καρκινώματα διαμέτρου 5-7 mm και
- Ακόμη και σε προστάτες με φυσιολογική απεικόνιση έχει τη δυνατότητα, με τη συστηματική ή εξαπλή βιοψία να επιβεβαιώσει ή όχι την παρουσία καρκινώματος.

4. Απεικονιστικές Μέθοδοι για την Διάγνωση Καρκίνου του Προστάτη

Η αξονική τομογραφία (CT) και η μαγνητική τομογραφία (MRI) μπορούν να απεικονίσουν τον προστάτη και τον περιπροστατικό χώρο, είναι δύσκολο όμως να ξεχωρίσουν το φυσιολογικό προστατικό παρέγχυμα από την προστατική κάψα και να απεικονίσουν πάντοτε τις σπερματοδόχους κύστες.

Ενδείκνυται, ωστόσο, να γίνονται κυρίως για την απεικόνιση τυχόν διήθησης των επιχώριων λεμφαδένων. Η κύρια περιοχή διήθησης των λεμφαδένων βρίσκεται στο τρίγωνο που σχηματίζεται από τα έξω λαγόνια αγγεία (επί α εκτός), τα υπογάστρια αγγεία (επί τα εντός) και το πυελικό έδαφος (κάτω).

5. Λήψη Προστατικού Υλικού

A. Βιοψία προστάτη

Γίνεται με ειδική βελόνα βιοψίας είτε από το περίνεο με τοπική αναισθησία, είτε από το ορθό χωρίς αναισθησία. Ιδιαίτερα σήμερα η συστηματική βιοψία (εξαπλή λήψη ιστοτεμαχίων) γίνεται σε ασθενείς όπου το PSA του ορού είναι αυξημένο και όταν η δακτυλική εξέταση ή η διορθική υπερηχογραφία εγείρουν ισχυρές ενδείξεις ανάπτυξης καρκίνου.

B. Διορθική αναρρόφηση υλικού με βελόνη

Το βασικό της μεινέκτημα είναι ότι δεν παρέχει πληροφορίες για την ιστολογική διαφοροποίηση του όγκου. Η λήψη υλικού για κυτταρολογική εξέταση με αναρρόφηση μέσω λεπτής βελόνης (FNA) από ύποπτες προστατικές περιοχές γίνεται χωρίς αναισθησία και είναι ικανοποιητικά ανεκτή από τους ασθενείς.

C. Διουρηθρική εκτομή και βιοψία

Η ένδειξη της έχει κατά πολύ περιοριστεί και αφορά, ενδεχομένως, ασθενείς με μεγάλη προστατική μάζα, για τη λήψη ιστού από τη μεταβατική ζώνη, ύποπτους για όγκους σταδίου A.

D. Ανοικτή περινεϊκή βιοψία

Απαιτεί ραχιαία ή γενική αναισθησία και αποσκοπεί στην αποκάλυψη της οπίσθιας πλευράς του προστάτη με περινεϊκή τομή, όπως κατά την περινεϊκή προστατεκτομή. Χρησιμοποιείται και για

ταχεία βιοψία σε ασθενείς που είναι υποψήφιοι για ριζική προστατεκτομή. Η μέθοδος έχει υποκατασταθεί από τη συστηματική υπερηχογραφικά κατευθυνόμενη διορθική βιοψία, που αποδεδειγμένα πλεονεκτεί στην ανακάλυψη εκτεταμένων καρκινωμάτων του προστάτη.[2]

1.2.5 Θεραπεία του καρκίνου του προστάτη

1. **Όταν εντοπίζεται στον Προστάτη Αδένα:** Το εντοπισμένο καρκίνωμα του προστάτη μπορεί να αντιμετωπιστεί με ριζική οπισθο-ηβική προστατεκτομή (ΡΠ) ή ακτινοθεραπεία (Α/Θ). Στα πρώτα στάδια της νόσου, εξίσου σημαντικές είναι η ριζική προστατεκτομή (ΡΠ) και η ριζική εξωτερική ακτινοθεραπεία (Α/Θ) μόνη της ή σε συνδυασμό με ενδοϊστική ακτινοθεραπεία. Προστατεκτομή επιλέγεται για ασθενείς μικρότερους των 70 ετών με προσδόκιμο επιβίωσης 10-15 έτη, ενώ ριζική Α/Θ συνιστάται σε πιο προχωρημένη ηλικία με διάφορα προβλήματα υγείας ή σε όσους επιθυμούν να διατηρήσουν φυσιολογική τη σεξουαλική δραστηριότητά τους.

Η ριζική προστατεκτομή (ΡΠ) είναι μια τεχνικά δύσκολη και αιματηρή επέμβαση. Συχνά συνοδεύεται με μεγάλα ποσοστά μετεγχειρητικών επιπλοκών είτε άμεσα μετά την επέμβαση (π.χ. αιμορραγίες, λοιμώξεις), είτε μακροχρόνια (π.χ. ακράτεια ούρων, ανικανότητα σύσης). Σχεδόν σε όλους τους ασθενείς διατηρείται η ικανότητα συγκράτησης των ούρων, ενώ πολύ μικρό ποσοστό (1-4%) θα παρουσιάσει ακράτεια και ένα μεγάλο ποσοστό (70%) των ασθενών θα διατηρήσει τη σεξουαλική του ικανότητα.

Οι ασθενείς με ένδειξη για χειρουργική θεραπεία είναι σταδίου T1, T2 και επιλεγμένοι σταδίου T3 με προσδόκιμο επιβίωσης μεγαλύτερο από 10 χρόνια. Μετά από μια ΡΠ, εάν στη βιοψία ο καρκίνος δεν ξεπερνά την προστατική κάψα, τότε η πιθανότητα μετάστασης είναι εξαιρετικά μικρή (τοπική 2% και σε άλλο όργανο 1%). Αν όμως αποδειχθεί πως ο καρκίνος ξεπερνά την προστατική κάψα, έχει διηθήσει κοντινούς ιστούς ή όργανα ή τα χειρουργικά όρια δεν είναι «καθαρά» (δηλαδή δε φτάνουν σε υγιή ιστό) τότε η πιθανότητα της μεν τοπικής μετεγχειρητικής υποτροπής αυξάνει σε 10-25% και της δε απομακρυσμένης μετάστασης σε 20-25%. Στην επιλογή της μεθόδου πάντως θα ληφθούν υπόψιν η ηλικία, ο βαθμός διαφοροποίησης του καρκίνου και η τοπική εξάπλωση του. Όταν μετά από ριζική προστατεκτομή αποδειχθεί πως η νόσος έχει ξεπεράσει τα όρια του προστάτη και άρα ο κίνδυνος για μετάσταση είναι μεγαλύτερος, τότε συνήθως ακολουθεί μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία ή αντιανδρογονική θεραπεία.[7]

Η ακτινοθεραπεία έδειξε να μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης τοπικών υποτροπών από 15-30% (χωρίς ακτινοθεραπεία) σε 0-5% (με ακτινοθεραπεία). Δεν επέφερε όμως αλλαγή στην εμφάνιση των απομακρυσμένων μεταστάσεων (τα ποσοστά παρέμειναν στο 30-45%). Η ακτινοθεραπεία ελέγχει τοπικά τον καρκίνο και τα ποσοστά μετάστασης, ενώ η προοπτική επιβίωσης είναι συγκρίσιμη με εκείνη μετά από προστατεκτομή (εφόσον η νόσος είναι εντοπισμένη στον αδένα). Ασθενείς σταδίου T1β και T2 προς T3 έχουν ένδειξη για ριζική ακτινοθεραπεία πάντα, ανάλογα με την ηλικία και τη γενική τους κατάσταση.[6]

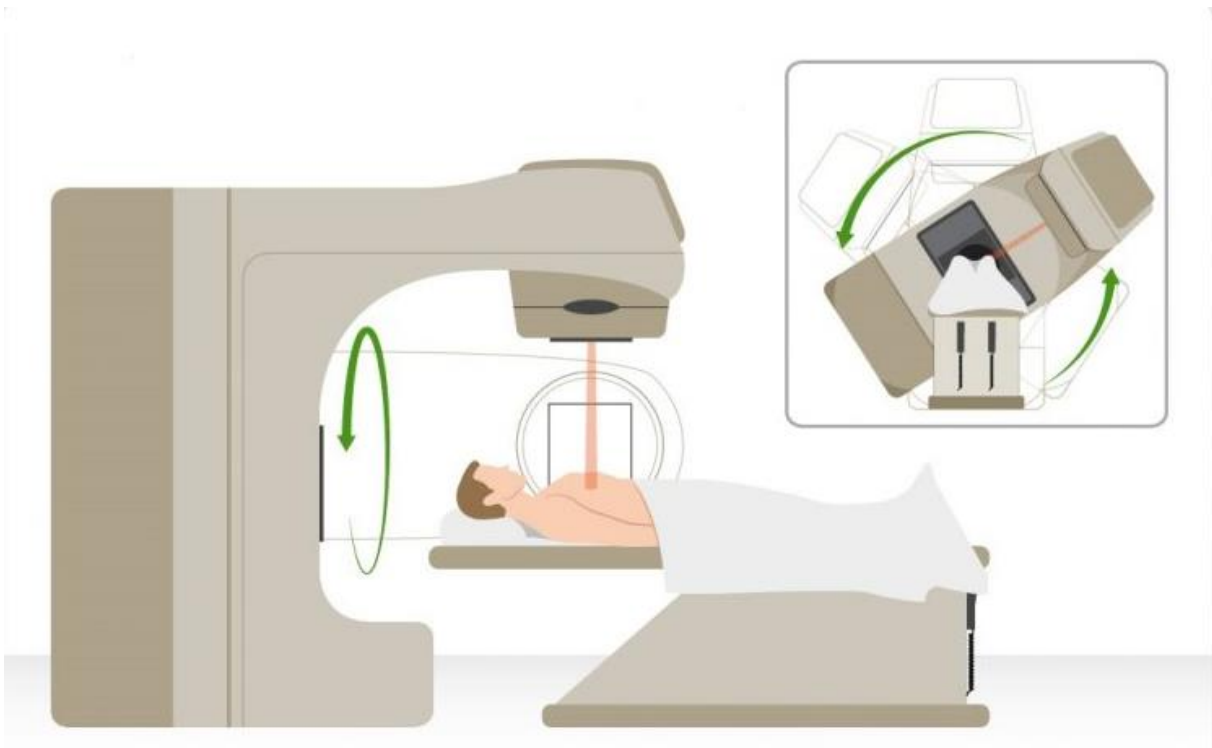
Η ριζική Α/Θ αποτελεί θεραπευτική αντιμετώπιση του εντοπισμένου ΚΠ για σταδιοποιημένους ασθενείς με αρνητικούς επιχώριους λεμφαδένες. Τα αποτελέσματα είναι εξίσου ικανοποιητικά με εκείνα της προστατεκτομής. Επιπλέον μελέτες οδήγησαν στην ελάττωση της δόσης ακτινοβολίας στους γύρω ιστούς, στην κύστη και στο ορθό, με στόχο τη μείωση της νοσηρότητας, ενώ σε εξέλιξη βρίσκονται νέες μέθοδοι θεραπευτικής αντιμετώπισης του εντοπισμένου ΚΠ με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (κρυοθεραπεία, laser, καθοδηγούμενη βραχυθεραπεία-digitally guided brachytherapy).

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές: η εξωτερική ακτινοθεραπεία και η εμφύτευση ραδιοϊσοτόπων από το περίνεο. Τα γενικά ποσοστά επιβίωσης είναι 65% στα 10 χρόνια για ασθενείς που ακολουθούν αυτή την θεραπευτική μέθοδο (είναι κατάλληλη για ασθενείς σε μεγάλη ηλικία). Χρησιμοποιείται γραμμικός επιταχυντής 6 MEV και η δόση ακτινοβολίας της πυέλου δεν πρέπει να ξεπερνά τα 40-55 Gy, διότι μπορεί να δημιουργήσει σημαντική βλάβη στο έντερο. Το βέλτιστο της δόσης συμβατικής ακτινοβολίας είναι συνολικά 70-75 Gy, αν και η υψηλότερη δόση σχετίζεται εκτός από καλύτερο τοπικό έλεγχο και με περισσότερες χρόνιες επιπλοκές. Σε τοπική υποτροπή της νόσου μετά από ΡΠ, η Α/Θ θεωρείται θεραπεία επιλογής και τα ποσοστά τοπικού ελέγχου αγγίζουν το 74%. Βιοψία του προστάτη κρίνεται απαραίτητη, όταν 18 μήνες μετά την Α/Θ το PSA παραμένει σε υψηλά επίπεδα, ενδεικτικό υποτροπής της νόσου.

Η ενδοϊστική βραχυθεραπεία του ΚΠ είναι η εμφύτευση ραδιενεργών ισοτόπων για υπολογισμένη χρονική περίοδο, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη κατανομή δόσης στον όγκο με ελάχιστη κατανομή στους υγιείς ιστούς. Η τρισδιάστατη (3D) ραδιοχειρουργική βραχυθεραπεία ή ενδοϊστική ραδιοχειρουργική εμφύτευση ραδιενεργών κόκκων παραορθικά, είναι μία νέα σύγχρονη μέθοδος, με στόχο την χορήγηση υψηλότερης δόσης ακτινοβολίας μέσα στον προστάτη αδένα, με αποτέλεσμα τη νέκρωση κάθε καρκινικού κυττάρου, ιδίως στο πρώιμο ενδοκαψικό στάδιο της νόσου (εντοπισμένος καρκίνος). Η χορηγούμενη δόση είναι σχεδόν διπλάσια της εξωτερικής ακτινοβολίας με πλήρη ασφάλεια των παρακειμένων οργάνων (κύστης,

ορθού, ουρήθρας). Σε τοπικά προχωρημένο καρκίνο του προστάτη, η συνδυαστική θεραπεία (εμφύτευση σε συνδυασμό με περιορισμένη εξωτερική ακτινοβολία) προσφέρει υψηλή πιθανότητα ριζικής αντιμετώπισης.[6]

Όπως και στη χειρουργική αντιμετώπιση έτσι και μετά την Α/Θ τα ποσοστά τοπικής υποτροπής και μετάστασης αλλάζουν ανάλογα με το στάδιο του καρκίνου και τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Στην πράξη, η συμπληρωματική ορμονοθεραπεία σε συνδυασμό με αντιανδρογόνα βελτιώνει τα ποσοστά επιβίωσης συγκριτικά με την ακτινοθεραπεία μόνο. Όσον αφορά στο PSA, η πτώση των τιμών που προκαλείται από τις δύο μεθόδους είναι διαφορετική.



Εικόνα 5: Μέθοδος ακτινοθεραπείας για την αντιμετώπιση καρκίνου του προστάτη

Σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ριζική προστατεκτομή η πτώση του PSA ακολουθεί το χρόνο ημίσειας ζωής (2-3 ημέρες), ενώ στη ριζική ακτινοθεραπεία η πτώση του καθυστερεί. Αυτό πιθανώς οφείλεται στον υπολειπόμενο φυσιολογικό προστατικό ιστό μετά το πέρας της ακτινοθεραπείας.[6]

2. Τοπικά προχωρημένος καρκίνος του προστάτη: Τόσο η ΡΠ όσο και η ριζική Α/Θ θεωρούνται θεραπευτικές πρακτικές επιλογής για ασθενείς με εντοπισμένη νόσο. Σε ασθενείς με τοπικά εκτεταμένο ΚΠ, η απόφαση του είδους θεραπείας θα στηριχθεί στο προσδόκιμο επιβίωσης και στις πιθανότητες εξέλιξης της νόσου κατά το διάστημα αυτό. Πιο ενδεδειγμένη θεραπεία θεωρείται η άμεση χορήγηση ανδρογονικού αποκλεισμού, διατηρώντας εφεδρικά την Α/Θ σαν ανακουφιστικό μέσον για την αντιμετώπιση του όγκου στην πύελο.

Ο ανδρογονικός αποκλεισμός αποτελεί σήμερα τη βάση στη θεραπεία ασθενών με προχωρημένο αδενοκαρκίνωμα του προστάτη και συμβάλλει στην επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου. Στην αγωγή αυτή υποβάλλονται ασθενείς με τοπικά προχωρημένη ή μεταστατική νόσο κατά το χρόνο της διάγνωσης, ασθενείς που υποτροπιάζουν μετά την αρχική θεραπεία και σε όσους αντενδεικνύεται η ριζική προστατεκτομή. Σε ασθενείς με προγνωστικά στοιχεία υψηλού κινδύνου, παράλληλα με τη ριζική θεραπεία, έγκαιρη έναρξη της ορμονικής θεραπείας βελτιώνει την επιβίωση.[2]

Η βιοχημική υποτροπή αποτελεί πλέον την πιο συνηθισμένη εκδήλωση του προχωρημένου αδενοκαρκινώματος του προστάτη. Η πλειοψηφία αυτών των ασθενών έχει ήδη υποβληθεί σε ανδρογονικό αποκλεισμό σε προηγούμενο στάδιο της νόσου και έτσι κινδυνεύουν να εμφανίσουν ορμονοαντοχή πολύ πριν την ακτινολογική πιστοποίηση της υποτροπής. Ο ανδρογονικός αποκλεισμός λοιπόν, είναι συχνή επιλογή σε ασθενείς όπου απέτυχε η αρχική θεραπεία και η βιοχημική υποτροπή είναι το μόνο σημείο της νόσου. Επιπλέον, αποτελεί αποτελεσματική παρηγορική θεραπεία και σε ασθενείς με μεταστατική νόσο και βελτιώνει σημαντικά την επιβίωση όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με ακτινοβολία σε ασθενείς υψηλού κινδύνου που έχουν τοπική ή μεταστατική νόσο. Η πρώιμη έναρξη της θεραπείας στοχεύει στο να καθυστερήσει ή να προλάβει την πρόοδο της νόσου και των επιπλοκών της. Σε πρόσφατες μελέτες παρατηρήθηκαν λιγότερες επιπλοκές, όπως: σκελετικές μεταστάσεις, συμπίεση του νωτιαίου μυελού και αποφρακτική ουροπάθεια, σε ασθενείς που έλαβαν έγκαιρα ανδρογονικό αποκλεισμό.[2]

Σε απάντηση στη θεραπεία, το PSA μειώνεται, η αλκαλική φωσφατάση περιοδικά αυξάνει και στη συνέχεια αποκαθίσταται στα φυσιολογικά επίπεδα. Παρόλα αυτά, τα περισσότερα νεοπλάσματα αναπτύσσουν ορμονοαντοχή, οπότε μπορεί να εφαρμοσθεί χημειοθεραπεία (με κατά το μάλλον απαισιόδοξα, ως τώρα, αποτελέσματα).

Εν κατακλείδει, διαπιστώνουμε ότι οι γενικά αποδεκτές θεραπευτικές απόψεις ανά στάδιο της νόσου διακρίνονται σε: α) απλή παρακολούθηση, β) εξωτερική Α/Θ, γ)

βραχυθεραπεία, δ) ριζική προστατεκτομή και ε) ορμονοθεραπεία (adjuvant). Τα αποτελέσματα της ριζικής αντιμετώπισης στον ΚΠ είναι καλύτερα για μικρούς όγκους και σχετικά καλώς διαφοροποιημένους, ενώ αντίθετα όσο μεγαλύτερη η μάζα του όγκου τόσο αυξάνεται η πιθανότητα διήθησης των σπερματοδόχων κύστεων ή των λεμφαδένων και οι ασθενείς έχουν μεγάλη πιθανότητα ανάπτυξης μεταστάσεων εντός πενταετίας (>80%).

- 3. Καρκίνος με μεταστάσεις:** Ασθενείς σταδίου T3 και T4 δεν έχουν ένδειξη για προστατεκτομή. Εάν υπάρχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις η καλύτερη θεραπεία είναι η αντιανδρογονική, αφού είναι αναπόφευκτη η λεμφική διασπορά της νόσου για τους περισσότερους ασθενείς. Το 70%-80% των ασθενών με διάσπαρτη νόσο αντιδρά καλά στην αντιανδρογονική θεραπεία, εφόσον ο καρκίνος είναι ορμονοεξαρτώμενος.
- 4. Πρόγνωση:** Ίαση που φθάνει έως και 10 έτη, προσεγγίζει περίπου το 65% και παρατηρείται σε περιπτώσεις εντοπισμένου καρκινώματος του προστάτη που αντιμετωπίζεται είτε με ριζική προστατεκτομή είτε με ακτινοθεραπεία. Περιπτώσεις που δεν επιδέχονται ριζική χειρουργική αντιμετώπιση ή ακτινοθεραπεία, μπορεί να ανταποκρίνονται για αρκετά χρόνια στην ορμονοθεραπεία, σε πλέον ηλικιωμένα άτομα και εφόσον το καρκίνωμα εμφανίζει ικανή διαφοροποίηση. Η παρουσία μεταστάσεων κατά το χρόνο της διάγνωσης είναι φανερό ότι επιβαρύνει την πρόγνωση, αλλά η θεραπεία μπορεί να παρέχει σημαντική μακροπρόθεσμη ανακούφιση.[2]

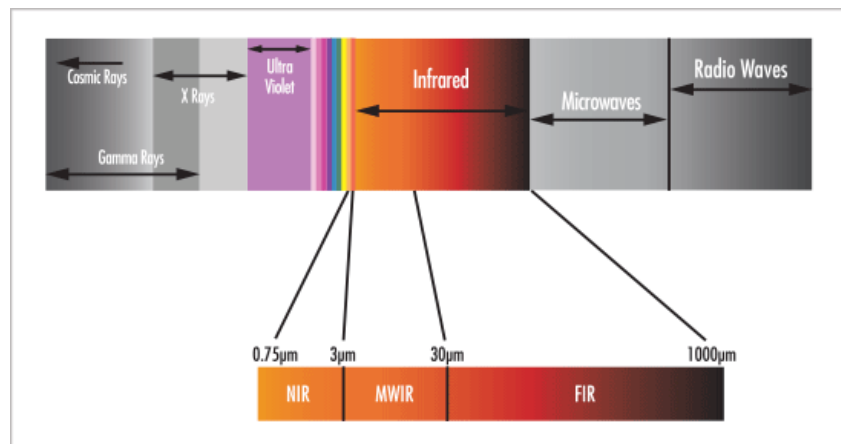
2. Φασματοσκοπία IR

2.1 Περιοχές ενδιαφέροντος στην IR Φασματοσκοπία

Η υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος εκτείνεται από το τέλος του ορατού φάσματος έως την περιοχή των μικροκυμάτων, δηλαδή μεταξύ 0,7 μm έως 300 μm , και διακρίνεται σε τρεις περιοχές:

- i. Το εγγύς υπέρυθρο (NIR) φάσμα που κυμαίνεται μεταξύ 0,8 μm έως 2,5 μm και αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς 14.000-4.000 cm^{-1} .
- ii. Το μέσο υπέρυθρο (MIR) φάσμα που κυμαίνεται μεταξύ 2,5 μm έως 25 μm και αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς 4.000-400 cm^{-1} .
- iii. Το άπω υπέρυθρο (FIR) φάσμα που κυμαίνεται μεταξύ 25 μm έως 300 μm και αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς 400-10 cm^{-1} .

Η πρώτη περιοχή (NIR) επιτρέπει τη μελέτη των υπερτονικών (overtones) και των αρμονικών δονήσεων ή δονήσεων συνδυασμού (harmonic or combination vibrations). Στο μέσο υπέρυθρο φάσμα (MWIR) παρατηρούνται οι βασικές μεταβολές στη δόνηση των μορίων λόγω απορρόφησης ακτινοβολίας, ενώ η άπω υπέρυθη περιοχή (FIR) παρέχει πληροφορίες για τις μοριακές περιστροφές και τις δονήσεις βαρέων ατόμων και κρυσταλλικού πλέγματος (δονήσεις υποκαταστάτη-μετάλλου).[8]



Εικόνα 2.1: Περιοχές ενδιαφέροντος στην IR φασματοσκοπία.

2.2 Προέλευση απορροφήσεων στο υπέρυθρο φάσμα

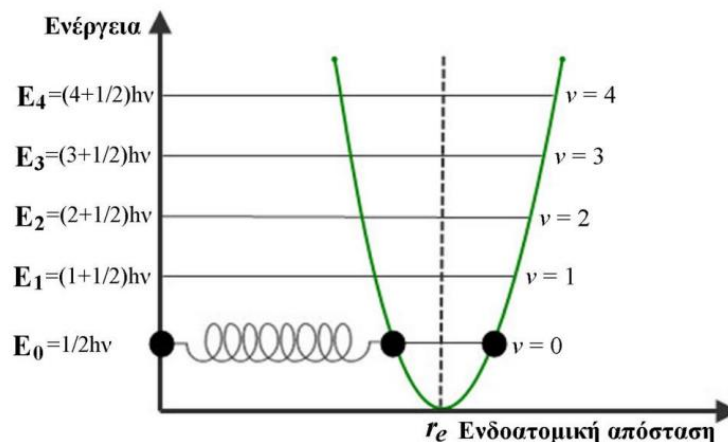
2.2.1 Επιτρεπτές Μεταπτώσεις

Η μέθοδος της υπέρυθρης φασματοσκοπίας βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Η προέλευση των απορροφήσεων στο IR φάσμα είναι αποτέλεσμα της αλληλοεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με το ηλεκτρικό δίπολο ενός μορίου. Προκειμένου να είναι μία δονητική μετάπτωση ενεργή στην απορρόφηση ή εκπομπή υπέρυθρης ακτινοβολίας, θα πρέπει να ικανοποιούνται οι εξής δύο κανόνες επιλογής (selection rules):

1. Μόνο δονήσεις για τις οποίες ισχύει $d\mu/dx \neq 0$ είναι ενεργές στο IR φάσμα, όπου ο λόγος $d\mu/dx$ εκφράζει τη μεταβολή της διπολικής ροπής του μορίου ως προς τη μεταβολή της απόστασης του διπόλου.
2. Για ένα μόριο που προσεγγίζει το μοντέλο του απλού αρμονικού ταλαντωτή (simple harmonic oscillator) επιτρεπτές είναι μόνο οι μεταπτώσεις εκείνες που συμβαίνουν μεταξύ γειτονικών δονητικών ενεργειακών καταστάσεων και για τις οποίες ισχύει $\Delta v = \pm 1$, όπου v είναι ακέραιος θετικός αριθμός ($v = 0, 1, 2, 3 \dots$) και καλείται δονητικός κβαντικός αριθμός (vibrational quantum number).

Με βάση λοιπόν τον πρώτο κανόνα επιλογής, ενεργά υπέρυθρες ενώσεις (IR-active) είναι μόνο αυτές στις οποίες οι δονήσεις και οι περιστροφές των ατόμων τους έχουν μια διαρκή μεταβολή της διπολικής ροπής, όπως τα μόρια που αποτελούνται από δυο ετεροάτομα (π.χ. στα μόρια CO, HCl, NO) ή στα μόρια των οποίων αλλάζει η διπολική ροπή κατά τη διάρκεια της περιστροφικής και δονητικής διαδικασίας.

Σύμφωνα με τον δεύτερο κανόνα επιλογής, μόνο μεταπτώσεις μεταξύ διαδοχικών ενεργειακών επιπέδων ($E_0 \rightarrow E_1 \rightarrow E_2$) είναι επιτρεπτές, όπου η ενεργειακή διαφορά μεταξύ τους είναι ίση με την ενέργεια του απορροφώμενου φωτονίου, $\Delta E_v = E_v - E_{v+1} = h\nu$. Ως εκ τούτου, σε απλό αρμονικό ταλαντωτή όπου οι ενεργειακές στάθμες βρίσκονται σε ισαπέχοντα διαστήματα όλες οι μεταπτώσεις που υπακούουν στον παραπάνω κανόνα συμβαίνουν στον ίδιο έναν κυματαριθμό ω . Κάτι τέτοιο θα δημιουργούσε μεγάλη σύγχυση στα IR φάσματα, ωστόσο η συμπεριφορά των μορίων στην πραγματικότητα παρουσιάζει αποκλίσεις από την αρμονικότητα. [8]



Εικόνα 2.2: Ενεργειακά επιτρεπτά επίπεδα και μεταπτώσεις σε διατομικά μόρια που εκτελούν απλή αρμονική ταλάντωση.

2.2.2 Βαθμοί ελευθερίας και κανονικοί τρόποι δόνησης πολυατομικών μορίων

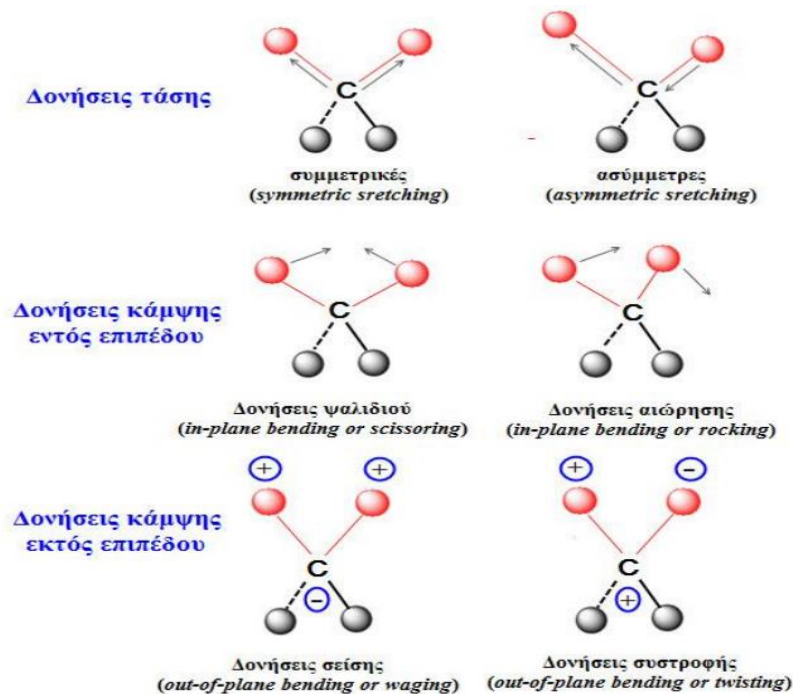
Ένα διατομικό μόριο έχει 3 ανεξάρτητους βαθμούς ελευθερίας (degrees of freedom) κινήσεων στον χώρο, οι οποίοι αντιστοιχούν στις τρεις συνταγμένες x , y , z που απαιτούνται προκειμένου να προσδιοριστεί η θέση του μορίου στον χώρο σε ένα καρτεσιανό σύστημα αξόνων. Εάν ένα μόριο αποτελείται από N άτομα, τότε θα υπάρχουν συνολικά $3N$ βαθμοί ελευθερίας κινήσεων στον χώρο για όλα τα άτομα του μορίου. Αφαιρώντας τους μεταφορικούς (translational) και τους περιστροφικούς (rotational) βαθμούς ελευθερίας που περιγράφουν τη μετατόπιση του κέντρου βάρους και την περιστροφή του μορίου γύρω από τους τρεις καρτεσιανούς άξονες αντίστοιχα, τότε τελικά προκύπτουν $3N-6$ δονητικοί (vibrational) βαθμοί ελευθερίας που περιγράφουν τις ταλαντώσεις (δονήσεις) ενός μη γραμμικού μορίου. Στην περίπτωση γραμμικών μορίων αρκούν δύο βαθμοί ελευθερίας για την περιγραφή της περιστροφής, λόγω του ότι η περιστροφή γύρω από τον άξονα του δεσμού δεν μεταβάλλει την ενέργεια του μορίου, και επομένως οι δονητικοί βαθμοί ελευθερίας περιορίζονται στους $3N-5$. Οι βασικοί αυτοί τρόποι δόνησης του μορίου ($3N-6$ ή $3N-5$) ονομάζονται κανονικοί τρόποι δόνησης (normal vibration modes), δεδομένου ότι οποιαδήποτε δόνηση του μορίου μπορεί να περιγραφεί ως γραμμικός συνδυασμός των κανονικών τρόπων δόνησης.[8]

Με βάση λοιπόν τα παραπάνω, ένα γραμμικό διατομικό μόριο ($N=2$), όπως για παράδειγμα το HCl έχει βαθμούς ελευθερίας $(3 \times 2) - 5 = 1$, δηλαδή παρουσιάζει μόνο μία θεμελιώδη δόνηση κατά μήκος του άξονα H - Cl ή κατά μήκος του χημικού δεσμού του μορίου που απορροφά στην υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Για ένα μη γραμμικό τριατομικό μόριο, όπως το νερό H₂O οι βαθμοί ελευθερίας είναι $(3 \times 3) - 6 = 3$, δηλαδή το μόριο παρουσιάζει τρία είδη δονήσεων που είναι ενεργά υπέρυθρες λόγω του ότι μεταβάλλουν τη διπολική ροπή μορίου, και οι οποίες περιλαμβάνουν δύο δονήσεις τάσης κατά μήκος των συμμετρικών (ν_s) και ασύμμετρων (ν_{as}) χημικών δεσμών O - H, και μία δόνηση κάμψης (δ) της μεταβολής της γωνίας H - O - H που σχηματίζουν οι δύο δεσμοί. Συνήθως στα μόρια συναντώνται οι ακόλουθοι βασικοί τύποι δονήσεων οι οποίοι παρουσιάζονται επίσης στην Εικόνα 2.3.

A. Δονήσεις τάσης (stretching vibrations) οι οποίες παράγονται όταν δύο συνδεδεμένα άτομα πάλλονται συνεχώς μεταξύ τους, μεταβάλλοντας τη μεταξύ τους απόσταση κατά μήκος του άξονα του δεσμού. Οι δονήσεις αυτές μπορεί να είναι είτε μεμονωμένες, όπως συμβαίνει στον δεσμό O – H είτε συζευγμένες, όπως για παράδειγμα η ομάδα του μεθυλενίου. Οι συζευγμένες δονήσεις διακρίνονται σε συμμετρικές (symmetric stretching) και ασύμμετρες (asymmetric stretching).

B. Δονήσεις κάμψης (bending vibrations) οι οποίες χαρακτηρίζονται από μία συνεχή μεταβολή της γωνίας μεταξύ δύο δεσμών και διακρίνονται στους εξής τέσσερις τύπους:

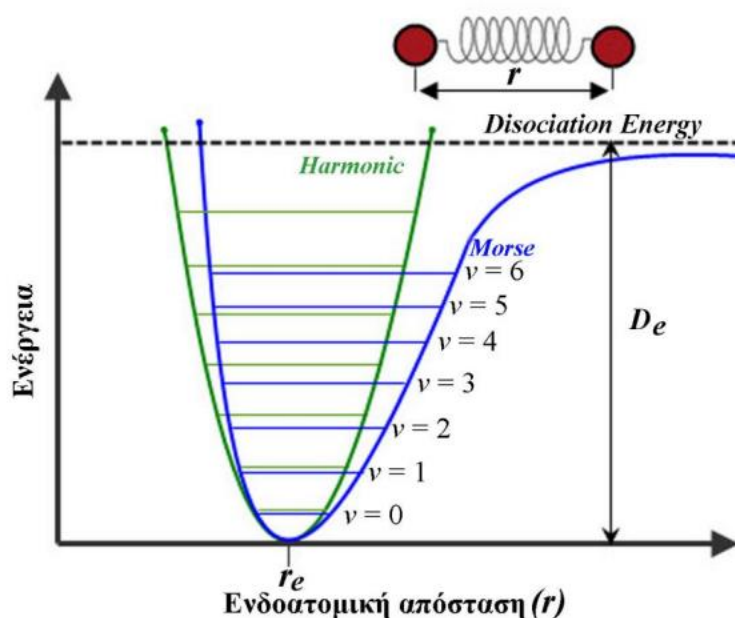
- Δονήσεις ψαλιδιού ή παραμόρφωσης (scissoring or deformation vibrations) οι οποίες παράγονται όταν δύο άτομα που είναι συνδεδεμένα με ένα κεντρικό άτομο κινούνται εμπρός πίσω εντός του επιπέδου ισορροπίας (in-plane) και προς τη μεταξύ τους διεύθυνση.
- Δονήσεις αιώρησης (rocking vibrations) οι οποίες συμβαίνουν όταν μία μη γραμμική δομική μονάδα τριών ατόμων δονείται εμπρός και πίσω εντός του επιπέδου ισορροπίας (in-plane) που σχηματίζεται από τα άτομα και τους δύο δεσμούς.
- Δονήσεις σείσης (wagging vibrations) οι οποίες παράγονται όταν μία μη γραμμική δομική μονάδα τριών ατόμων δονείται εκτός του επιπέδου ισορροπίας (out-of-plane) που σχηματίζεται από τα άτομα και τους δύο δεσμούς.
- Δονήσεις συστροφής (twisting vibrations) οι οποίες λαμβάνουν χώρα όταν μία δομική μονάδα τριών ατόμων συστρέφεται γύρω από τον δεσμό σύνδεσης με το υπόλοιπο τμήμα του μορίου εκτός του επιπέδου ισορροπίας (out-of-plane).[9]



Εικόνα 2.3: Βασικοί τύποι δονήσεων σε πολυατομικά Μόρια

2.2.3. Υπέρτονες Ταινίες και Ταινίες Συνδυασμού

Όπως είδαμε παραπάνω η ταλάντωση του χημικού δεσμού ενός διατομικού μορίου μπορεί να θεωρηθεί μόνο κατά προσέγγιση απλή αρμονική. Στα πραγματικά μόρια οι δονήσεις τους δεν είναι πάντα μόνο αρμονικές αλλά είναι και μη αρμονικές λόγω της ανελαστικότητας των δομών τους. Στον μη αρμονικό ταλαντωτή (anharmonic oscillator) η ενέργεια δεν αντιστοιχεί σε μία απλή συμμετρική παραβολική καμπύλη, αλλά αναπαρίσταται από μία καμπύλη, όπου τα ενεργειακά επίπεδα συγκλίνουν καθώς αυξάνεται ο δονητικός κβαντικός αριθμός, και υπάρχει μία ενέργεια πάνω από την οποία ο δεσμός διασπάται (dissociation energy).[10]



Εικόνα 2.4: Διάγραμμα επιτρεπόμενων ενεργειακών επιπέδων και μεταπτώσεων για μη αρμονικό ταλαντωτή.

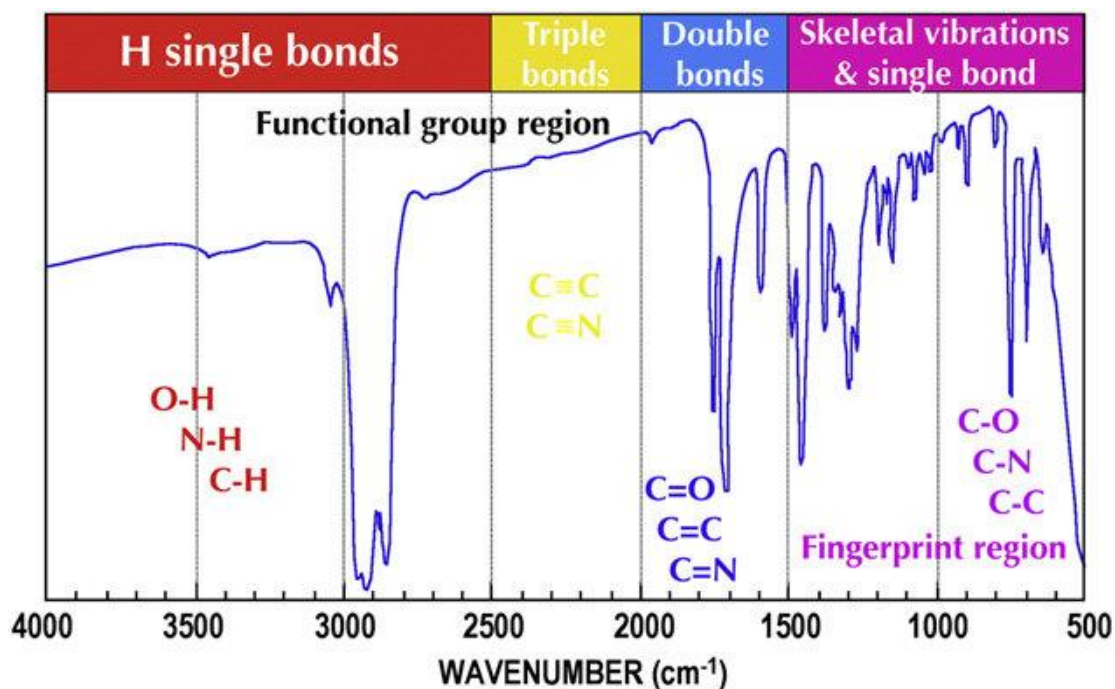
Αν περιοριστούμε στις μεταπτώσεις εκείνες που συμβαίνουν από την κατώτερη ενεργειακή στάθμη προς τις ανώτερες, τότε οι φασματικές ταινίες απορρόφησης που παρατηρούνται στα IR φάσματα για τα ενεργειακά άλματα $v = 0 \rightarrow v = 2$ και $v = 0 \rightarrow v = 3$ ονομάζονται πρώτη και δεύτερη υπερτονική (first & second overtones) αντίστοιχα.[10]

Οι ταινίες συνδυασμού παρατηρούνται όταν δύο (ή περισσότερες) θεμελιώδεις απορροφήσεις είναι δυνατό να συμβούν ταυτόχρονα. Ένας λόγος για τον οποίο μπορεί να προκύψει μία ταινία συνδυασμού είναι εάν μία θεμελιώδης δόνηση δεν μπορεί να συμβεί λόγω συμμετρίας. Το παραπάνω σχετίζεται με την ηλεκτρονική και δονητική σύζευξη (vibronic coupling) που συμβαίνει στις ηλεκτρονικές μεταπτώσεις, κατά τις οποίες η διέγερση μίας θεμελιώδους κατάστασης μπορεί να καταστεί επιτρεπτή ως διπλά διεγερμένη κατάσταση (doubly excited state). Οι ταινίες συνδυασμού στο IR φάσμα θα έχουν συχνότητα ίση με το άθροισμα των συχνοτήτων των θεμελιωδών απορροφήσεων), ωστόσο είναι δυνατό να παρατηρηθούν και ταινίες διαφοράς (difference bands) των οποίων η συχνότητα

θα προκύπτει από τη διαφορά μεταξύ των θεμελιωδών συχνοτήτων. Ομοίως με τις υπερτονικές, οι ταινίες συνδυασμού παρουσιάζουν σε γενικές γραμμές πολύ χαμηλότερη ένταση σε σύγκριση με τις θεμελιώδεις απορροφήσεις.[8]

2.3. Απορροφήσεις χαρακτηριστικών ομάδων στο μέσο υπέρυθρο (MIR) φάσμα

Το φάσμα απορρόφησης υπέρυθρου αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα κάθε μορίου και χρησιμεύει κυρίως στην ποιοτική ανάλυση και για την απόδοση της μοριακής δομής μιας ένωσης, παρέχοντας πληροφορίες για τη φύση των ατόμων που βρίσκονται στο μόριο, καθώς και τη διάταξή τους στον χώρο. Τα απλά μόρια (όπως πχ. CO₂) παρουσιάζουν φάσματα υπέρυθρου τα οποία είναι σχετικά εύκολο να ερμηνευτούν, όμως, όπως είναι φυσικό, η αύξηση του αριθμού των ατόμων σε ένα μόριο μπορεί να προκαλέσει μεγάλο αριθμό απορροφήσεων, καθιστώντας τα φάσματα IR αρκετά πολύπλοκα. Ωστόσο, παρά την πολυπλοκότητα των φασμάτων, η ερμηνεία τους μπορεί να απλοποιηθεί λαμβάνοντας πάντα υπόψη συγκεκριμένες ταινίες τις οποίες αναμένεται να απορροφούν οι χαρακτηριστικές ομάδες που απαρτίζουν το μόριο της ένωσης και οι οποίες δεν διαφέρουν σε θέση σημαντικά από ένωση σε ένωση. Ως εκ τούτου, το μέσο υπέρυθρο φάσμα (MIR) υποδιαιρείται, για λόγους ευκολίας, σε επιμέρους περιοχές ανάλογα με τις χαρακτηριστικές ομάδες του μορίου.[8]



Εικόνα 2.5: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών ομάδων οργανικών ενώσεων στο φάσμα IR.

Οι απορροφήσεις των δονήσεων σκελετού (skeletal vibrations) οργανικών ενώσεων εμφανίζονται στη χαμηλότερη περιοχή του μέσου υπέρυθρου φάσματος μεταξύ 1.500-400 cm⁻¹ και

επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από όλη τη δομή του μορίου. Οι ταινίες απορρόφησης που παρατηρούνται σε αυτή τη φασματική περιοχή είναι συνήθως αποτέλεσμα των δονήσεων τάσης των ομάδων C-C, C-O και C-N, καθώς και μίας μεγάλης ποικιλίας δονήσεων κάμψης (παραμόρφωσης, συστροφής κλπ.), που καθιστούν την ερμηνεία των φασμάτων αρκετά πολύπλοκη. Αυτή η περιοχή του φάσματος είναι μοναδική για κάθε ένωση και χαρακτηρίζει το μόριο σαν σύνολο, και γι' αυτόν ακριβώς τον λόγο ονομάζεται περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος (fingerprint region).[8]

Οι δονήσεις των χαρακτηριστικών ή δραστικών ομάδων (characteristic or functional group vibrations) ενός μορίου συνήθως εμφανίζονται στην ίδια περιοχή του φάσματος με μικρές μετατοπίσεις μεταξύ $4.000-1.400\text{ cm}^{-1}$. Οι θεμελιώδεις απορροφήσεις που απαντώνται στη φασματική περιοχή μεταξύ $4.000-3.200\text{ cm}^{-1}$ οφείλονται κυρίως στις δονήσεις τάσης των ομάδων O-H, N-H, ενώ οι ταινίες απορρόφησης C-H των αλειφατικών ομάδων εμφανίζονται συνήθως στην περιοχή που κυμαίνεται μεταξύ $3.000-2.800\text{ cm}^{-1}$. Αν ο δεσμός C-H είναι παρακείμενος σε έναν διπλό δεσμό ή σε αρωματικό δακτύλιο, τότε οι C-H απορροφήσεις παρατηρούνται σε κυματαριθμούς μεγαλύτερους των 3.000 cm^{-1} .

Οι συνηθέστερες απορροφήσεις που απαντώνται στην περιοχή του φάσματος μεταξύ $2.400-2.000\text{ cm}^{-1}$ οφείλονται στις δονήσεις των τριπλών δεσμών μεταξύ ατόμων άνθρακα ($C \equiv C$), οι οποίες παράγουν συνήθως μία ασθενή ταινία απορρόφησης μεταξύ των κυματαριθμών 2.260 cm^{-1} και 2.100 cm^{-1} , και στις δονήσεις των νιτριλομάδων $C \equiv N$, οι οποίες παράγουν μία μέτριας έντασης ταινία απορρόφησης μεταξύ των κυματαριθμών 2.260 cm^{-1} και 2.210 cm^{-1} .

Στη φασματική περιοχή μεταξύ $1.800-1.500\text{ cm}^{-1}$ παρατηρούνται ταινίες απορρόφησης που οφείλονται κατά κύριο λόγο στις δονήσεις τάσης των ομάδων C=C και C=O. Οι δονήσεις των καρβονυλομάδων παρουσιάζουν μία ισχυρή απορρόφηση στην περιοχή αυτή του φάσματος, που ανάλογα με τον τύπο του δεσμού C=O και τη δομή του υπόλοιπου μορίου μπορεί να συμβεί μεταξύ $1.830-1.650\text{ cm}^{-1}$. Οι δονήσεις τάσης των ομάδων C=C παράγουν πολύ πιο ασθενείς ταινίες περίπου στα 1.650 cm^{-1} , οι οποίες ωστόσο δεν παρατηρούνται συχνά για λόγους συμμετρίας και διπολικής ροπής. Άλλες απορροφήσεις που απαντώνται στην περιοχή αυτή είναι αποτέλεσμα των δονήσεων τάσης C=N, που παράγουν συνήθως ισχυρές ταινίες. [10]

2.4. Οργανολογία Τεχνικών Υπέρυθρης Ακτινοβολίας

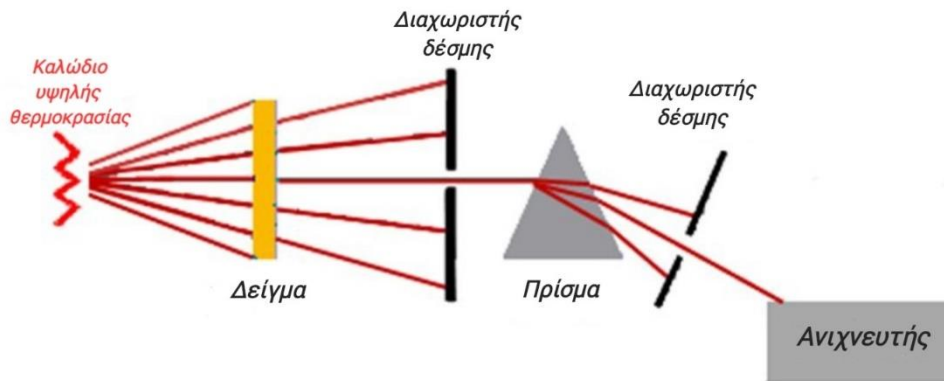
Στις παρακάτω ενότητες αναφέρονται τα τμήματα και η οργανολογία του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται σήμερα για την ανάλυση δειγμάτων με τεχνικές υπέρυθρης ακτινοβολίας. Αρχικά γίνεται συνοπτική αναφορά στην οργανολογία των κλασικών φασματοφωτόμετρων διασποράς ώστε να συγκριθεί στην συνέχεια με τα φασματοφωτόμετρα υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR).

2.4.1 Κλασικά Φασματοφωτόμετρα IR Διασποράς

Τα φασματοφωτόμετρα διασποράς IR αποτελούν τα πρώτα όργανα που αναπτύχθηκαν στα μέσα περίπου του 1940 και χρησιμοποιήθηκαν ευρέως για τη λήψη υπέρυθρων φασμάτων. Μία τυπική διάταξη ενός κλασικού φασματοφωτομετρικού συστήματος IR αποτελείται από τα εξής βασικά τμήματα:

1. Μία πηγή που εκπέμπει ακτινοβολία σε όλη την υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και η οποία μπορεί να είναι μία λάμπα με νήμα Ni-Cr (Nicrome) ή Nerst (μείγμα ZrO και άλλων οξειδίων σπάνιων γαιών) ή λυχνία Globar που κατασκευάζεται από καρβίδιο του πυριτίου και έχει πολύ μεγαλύτερη ένταση.
2. Έναν μονοχρωμάτορα, του οποίου το στοιχείο διασποράς (dispersive element) είναι συνήθως ένα πρίσμα ή φράγμα περίθλασης.
3. Έναν ανιχνευτή υπέρυθρου, ο οποίος είναι συνήθως θερμικός ανιχνευτής (π.χ. θερμοζεύγος) ή φωτοαγωγίμος.
4. Ένα οπτικό σύστημα κάτοπτρων.

Κλασικό IR Φασματοφωτόμετρο



Εικόνα 2.6: Σχηματική απεικόνιση τμημάτων ενός κλασικού φασματοφωτόμετρου διασποράς IR.

Η αρχή λειτουργίας ενός κλασικού φασματοφωτόμετρου απορρόφησης IR διπλής δέσμης μπορεί να περιγραφεί συνοπτικά ως εξής: Η υπέρυθη ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή διαχωρίζεται αφού υποστεί ανάκλαση από ένα σύστημα επίπεδων κάτοπτρων σε δύο δέσμες όπου η μία διέρχεται μέσω του συστήματος αναφοράς (τυφλό) και η άλλη διέρχεται από το δείγμα. Οι δύο δέσμες ανακλώνται από ένα σύστημα περιστρεφόμενων κάτοπτρων το οποίο εναλλάσσεται προκαλώντας την περιοδική διέλευση της δέσμης μέσω του δείγματος και της δέσμης αναφοράς, για να προσπέσει τελικά στον μονοχρωμάτορα. Καθώς οι δέσμες εναλλάσσονται, το κάτοπτρο περιστρέφεται αργά και διαφορετικές συχνότητες υπέρυθρης ακτινοβολίας καταλήγουν στον ανιχνευτή, ο οποίος μετατρέπει την ενέργεια της IR ακτινοβολίας σε ηλεκτρικό σήμα καταγράφοντας το φάσμα. [8]

2.4.2 Φασματοφωτόμετρα Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)

Την πραγματική επανάσταση στην υπέρυθη φασματοσκοπία έφερε η ανάπτυξη των φασματοφωτόμετρων υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier, τα οποία και αντικατέστησαν τα κοινά φασματοφωτόμετρα διασποράς που περιγράφηκαν παραπάνω. Η χρήση των οργάνων αυτών αναπτύχθηκε βαθμιαία, και τις τελευταίες δεκαετίες έχει επεκταθεί σημαντικότερα σε πολύ μεγαλύτερο πλήθος εφαρμογών λόγω της υψηλής ευαισθησίας και ταχύτητας που παρουσιάζουν. Οι πληροφορίες που παρέχουν οι δύο τύποι οργάνων είναι ίδιες, ωστόσο το βασικό πλεονέκτημα της FTIR φασματοσκοπίας έγκειται στη χρήση συμβολόμετρου αντί μονοχρωμάτορα, το οποίο επιτρέπει να κατευθύνονται στον ανιχνευτή όλες οι συχνότητες ταυτόχρονα και όχι διαδοχικά, μόνο μία τη φορά, υπερνικώντας κατ' αυτόν τον τρόπο τις αδυναμίες και τους περιορισμούς των συμβατικών φασματοφωτόμετρων διασποράς.

2.4.2.1 Οργανολογία Φασματοφωτόμετρου Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)

Ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο FTIR με συμβολόμετρο Michelson (Michelson interferometer) αποτελείται από τα εξής τρία βασικά μέρη:

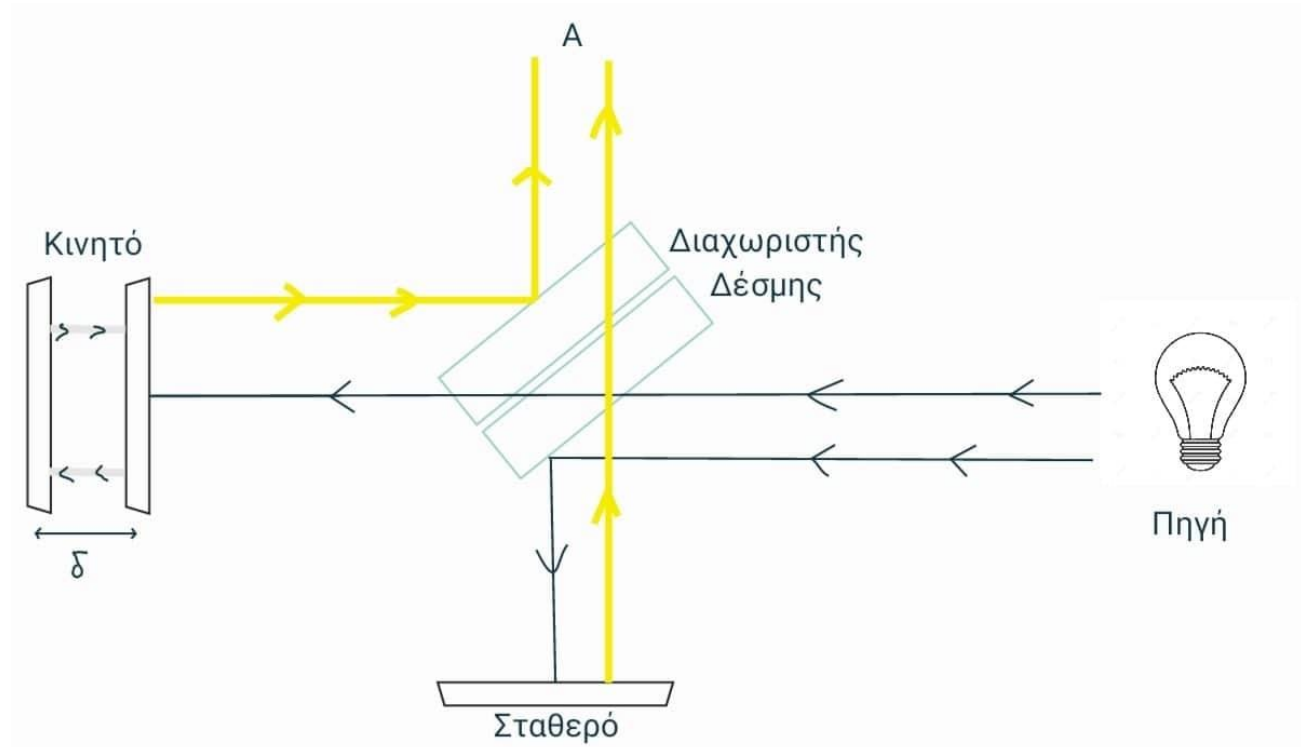
- Η πηγή της υπέρυθρης ακτινοβολίας
- Το συμβολόμετρο
- Ο ανιχνευτής υπέρυθρου

Η πηγή laser χρησιμοποιείται για τη δημιουργία εσωτερικής αναφοράς, τη μέτρηση των κυματαριθμών και τη ρύθμιση της διάρκειας των παλμών. Οι πηγές που χρησιμοποιούν τα φασματοφωτόμετρα FTIR στο μέσο υπέρυθρο φάσμα είναι του ίδιου τύπου με αυτές των συμβατικών φασματοφωτόμετρων IR (λυχνίες Globar ή Nerst) που περιγράφηκαν παραπάνω. Στην περίπτωση που εξετάζεται η άπω υπέρυθη περιοχή (FIR), τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί λάμπα υδραργύρου υψηλής πίεσης, ενώ για κοντινό υπέρυθρο (NIR) φάσμα χρησιμοποιούνται συνήθως λάμπες βολφραμίου-αλογόνου.

Το συμβολόμετρο αποτελεί την καρδιά του φασματοφωτόμετρου FTIR, του οποίου η χρήση, όπως προαναφέρθηκε, παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της χρήσης ενός μονοχρωμάτορα στην καταγραφή του IR φάσματος. Ένα από τα πιο διαδεδομένα και ευρέως χρησιμοποιούμενα συμβολόμετρα είναι το συμβολόμετρο Michelson, που αποτελείται από δύο κάτοπτρα εκ των οποίων το ένα παραμένει σταθερό (fixed mirror), ενώ το άλλο είτε κινείται με σταθερή ταχύτητα είτε σταματά περιοδικά και για μικρά χρονικά διαστήματα (moving mirror). Τα επίπεδα των δύο κάτοπτρων είναι κάθετα μεταξύ τους, ενώ ανάμεσα στο σταθερό και στο κινούμενο κάτοπτρο υπάρχει ένας διαχωριστής δέσμης 50/50 (beam splitter). Ο διαχωριστής δέσμης είναι ένα ημιδιαφανές κάτοπτρο το οποίο αποτελείται από υλικό που δεν απορροφά στην υπέρυθη περιοχή, με ανακλαστικότητα και διαπερατότητα 50% αντίστοιχα. Η επιλογή του υλικού για τον διαχωριστή δέσμης γίνεται με βάση την περιοχή του φάσματος που εξετάζεται. Οι διαχωριστές δέσμης που χρησιμοποιούνται στη NIR και FIR περιοχή αποτελούνται συνήθως από υποστρώματα βρομιούχου καλίου ή ιωδιούχου καισίου επικαλυμμένων με υλικά όπως γερμάνιο ή οξειδίο του σιδήρου, ενώ η χρήση λεπτών οργανικών φιλμ

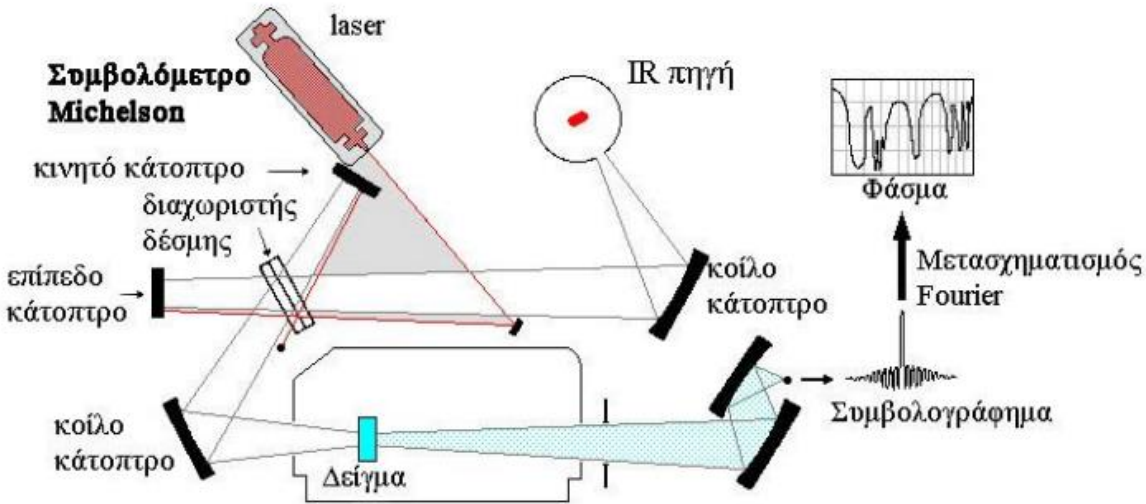
(όπως πολυαιθυλενίου) συναντάται στο άπω υπέρυθρο φάσμα.[8]

Η σχηματική απεικόνιση ενός συμβολόμετρου Michelson φαίνεται στην εικόνα 2.6 όπου παρουσιάζονται τα δύο κάτοπτρα (κινητό και σταθερό) η πηγή και ο διαχωριστής δέσμης. Η ακτινοβολία μαύρου χρώματος είναι αυτή που εξέρχεται από την πηγή με κατεύθυνση τα δύο κάτοπτρα και στην συνέχεια τα κάτοπτρα ανακλούν μέρος της ακτινοβολίας αυτής όπως φαίνεται και στο σχήμα με την δέσμη κίτρινου χρώματος. Η απόσταση που διανύει το κινητό κάτοπτρο μεταξύ των δύο άκρων της κίνησης του συμβολίζεται με δ . Όπως θα δούμε με την χρήση της απόστασης δ και την χρήση μαθηματικών εξισώσεων προκύπτει η αριθμητική ακολουθία μέσω της οποίας εν τέλει προκύπτει η αναλυτική πληροφορία.



Εικόνα 2.7: Σχηματική απεικόνιση του συμβολόμετρου Michelson. Όπου δ : απόσταση που διανύει το κινητό κάτοπτρο μεταξύ των δύο άκρων της κίνησης του, A: αναλυτής.

Στην εικόνα 2.8 παρουσιάζεται μια σχηματική απεικόνιση ενός Φασματοφωτόμετρου Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) όπου φαίνονται όλες οι οργανολογίες που περιγράφονται στις παραπάνω παραγράφους.



Εικόνα 2.8 Σχηματική αναπαράσταση φασματοφωτόμερου FTIR με συμβολόμετρο Michelson.

2.4.2.2 Αρχή Μετασχηματισμού Fourier

Ο πρώτος που ανακάλυψε πως το φάσμα και το συμβολογράφημα σχετίζονται μεταξύ τους μέσω του μετασχηματισμού Fourier ήταν ο Lord Rayleigh ο οποίος έκανε την συγκεκριμένη ανακάλυψη το 1892. Ωστόσο, ο πρώτος ερευνητής που μετέτρεψε επιτυχώς ένα συμβολογράφημα στο φάσμα του ήταν ο Fellgett που το κατάφερε έπειτα από παραπάνω από μισό αιώνα. Ο ταχύς (fast) μετασχηματισμός Fourier στον οποίο βασίζεται το σύγχρονο φασματοφωτόμετρο FTIR ανακαλύφθηκε από τους Cooley και Turkey το 1965. Εφαρμόζεται σε πολλές αναλυτικές μεθόδους όπως η φασματοσκοπία υπερύθρου (IR), φασματοσκοπία πυρηνικού συντονισμού (NMR) και φασματοσκοπία μάζας (MS) λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων που προσφέρει.

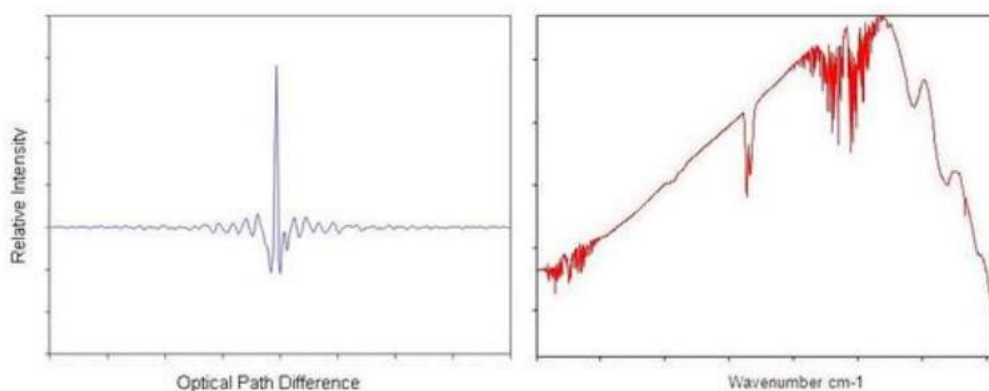
Ο μετασχηματισμός Fourier ονομάζεται έτσι από τον μαθηματικό Jean Baptiste Joseph Fourier και αποτελεί έναν μαθηματικό τύπο για την μετατροπή μιας εξίσωσης σε μια άλλη. Η παρακάτω εξίσωση αποτελεί μια κοινή μορφή του μετασχηματισμού Fourier:

$$F(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-i\omega t} dt \quad (2.1)$$

Μία άλλη ημιτονοειδής μορφή της παραπάνω εξίσωσης που όπως θα δούμε και παρακάτω χρησιμοποιείται από το συμβολόμετρο Michelson είναι η παρακάτω:

$$f(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} F(\nu) \cos(2\pi\nu t) d\nu \quad (2.2)$$

Μέσω της χρήσης των παραπάνω μαθηματικών σχέσεων ένα συμβολόμετρο είναι ικανό να μετατρέψει ένα συμβλογράφημα στην μορφή του φάσματος που απαιτείται για την εξαγωγή της αναλυτικής πληροφορίας μέσω των FTIR φασματοφωτόμετρων.(8). Ο μετασχηματισμός αυτός φαίνεται στην εικόνα 2.8.



Εικόνα 2.8 Μετασχηματισμός συμβολογραφήματος σε φάσμα.

2.4.2.3 Αρχή Λειτουργίας Φασματοφωτόμετρου Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)

Αρχικά αναφέρεται ο τρόπος λειτουργίας του συμβολόμετρου Michelson που αποτελεί το βασικό σημείο αναφοράς του γενικού συστήματος. Η υπέρυθη ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή κατευθύνεται στον διαχωριστή δέσμης όπου διαχωρίζεται σε δύο δέσμες, εκ των οποίων η μία προσπίπτει στο σταθερό κάτοπτρο ενώ η άλλη στο κινητό και στη συνέχεια, αφού αντανακλαστούν, επιστρέφουν στον διαχωριστή δέσμης όπου συμβάλλουν. Μετά τη συμβολή ένα τμήμα της ακτινοβολίας οδηγείται στον θάλαμο του δείγματος, ενώ το υπόλοιπο τμήμα επιστρέφει στην πηγή ακτινοβολίας. Το αποτέλεσμα είναι ότι περίπου το μισό κάθε δέσμης καταλήγει στον ανιχνευτή, παρόλο που διέσχισαν διαφορετικές διαδρομές. Η διαφορά (δ) των οπτικών διαδρομών, όπως προαναφέρθηκε, είναι ίση με την απόσταση μεταξύ των δύο άκρων της κίνησης του κινητού κατόπτρου και ονομάζεται Optical Path Difference (OPD).[11]

Όταν το κινούμενο κάτοπτρο κινείται βηματικά και η διαφορά των δύο οπτικών διαδρομών (δ) είναι μηδέν ή ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της ακτινοβολίας, $\delta = n\lambda$ όπου $n = 0,1,2,3 \dots$, τότε παρατηρείται ενισχυτική ή θετική συμβολή (constructive interference), και το σήμα που φτάνει στον ανιχνευτή λαμβάνει τη μέγιστη τιμή του. Αν όμως η διαφορά των δύο οπτικών διαδρομών είναι $\delta = (n + 1/2)\lambda$ όπου $n = 0,1,2,3 \dots$, τότε παρατηρείται αρνητική συμβολή (destructive interference), δηλαδή απόσβεση, και η ακτινοβολία επιστρέφει στην πηγή. Στην περίπτωση που το κινούμενο κάτοπτρο κινείται με σταθερή ταχύτητα, τότε το σήμα στον ανιχνευτή μεταβάλλεται ημιτονοειδώς. Στην περίπτωση αυτή, όταν η πηγή εκπέμπει ένα συνεχές φάσμα συχνοτήτων ν , τότε η ένταση του σήματος ως συνάρτηση της καθυστέρησης $I'(\delta)$ δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$I'(\delta) = 2 \int_0^{\infty} I(\nu)(1 + \cos 2\pi\nu\delta)d\nu = 2 \int_0^{\infty} I(\nu)d\nu + 2 \int_0^{\infty} \cos(2\pi\nu\delta)d\nu \quad (2.3)$$

Από την σχέση (2.1) φαίνεται ότι η ένταση $I'(\delta)$ αποτελείται από έναν σταθερό παράγοντα και έναν μεταβλητό $2 \int_0^{\infty} \cos(2\pi\nu\delta)d\nu$, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την εμφάνιση του συμβολογραφήματος (interferogram). Το συμβολογράφημα αποτελεί ένα φάσμα στον χώρο του χρόνου (time domain spectrum) που καταγράφει τις μεταβολές της απόκρισης του ανιχνευτή (ένταση) συναρτήσει του χρόνου κατά την κατοπτρική σάρωση, και παρέχει πληροφορίες για όλη την υπέρυθρη φασματική περιοχή στην οποία αποκρίνεται ο ανιχνευτής. Το συμβολογράφημα υπόκειται σε μαθηματική επεξεργασία με τη χρήση του μετασχηματισμού Fourier, όπου τελικά μετατρέπεται στο ληφθέν φάσμα IR, το οποίο αναπαριστά την ένταση συναρτήσει της συχνότητας (frequency domain spectrum).

Οι δύο πιο διαδεδομένοι τύποι ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στη φασματοσκοπία FTIR είναι οι ανιχνευτές DTGS (deuterated triglycine sulfate) που αποτελούνται από δευτεριωμένη θειική τριγλυκίνη και οι ανιχνευτές MCT που κατασκευάζονται από τελλουρίδιο καδμίου υδραργύρου (mercury cadmium telluride). Ο χρόνος απόκρισης των περισσότερων ανιχνευτών που χρησιμοποιούν τα κλασικά φασματοφωτόμετρα IR (όπως π.χ. τα θερμοζεύγη) είναι πολύ αργός για τους γρήγορους χρόνους σάρωσης των συμβολόμετρων. Ο ανιχνευτής DTGS είναι ένας πυροηλεκτρικός ανιχνευτής που λειτουργεί σε θερμοκρασία δωματίου και προσφέρει υψηλούς χρόνους απόκρισης λόγω του ότι παρέχει τη μέτρηση θερμοκρασιακών μεταβολών και όχι θερμοκρασιακών τιμών. Ο ανιχνευτής MCT, ο οποίος ανήκει στην κατηγορία των φωτονικών ανιχνευτών και εξαρτάται από την κβαντική φύση της ακτινοβολίας, λειτουργεί σε θερμοκρασία υγρού αζώτου (77 K) και σε γενικές γραμμές παρουσιάζει γρηγορότερη απόκριση και μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τον ανιχνευτή DTGS.[8]

Τα φασματοφωτόμετρα FTIR παρουσιάζουν σαφή πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές φασματοσκοπίας IR κυρίως ως προς την υψηλή ευαισθησία και ταχύτητα που παρουσιάζουν, καθώς και τον βελτιωμένο λόγο σήματος προς θόρυβο (SNR) ανά μονάδα χρόνου (Fellget advantage). Αυτή η υπεροχή τους οφείλεται στα βασικά χαρακτηριστικά κατασκευής και λειτουργίας τους που επιτρέπουν τη λήψη ενός πλήρους φάσματος κατά τη διάρκεια μίας μόνο κατοπτρικής σάρωσης, ενώ ο ανιχνευτής μπορεί να παρατηρεί όλες τις συχνότητες ταυτόχρονα. Η υψηλής ταχύτητας σάρωση που εμφανίζουν επιτρέπει την καταγραφή πολλαπλών φασμάτων σε πολύ μικρό χρόνο (1 min ή και λιγότερο), και ως εκ τούτου η ευαισθησία μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά αυξάνοντας τον λόγο σήματος προς θόρυβο μέσω πολλών επαναλαμβανόμενων σαρώσεων. Επιπλέον, στα όργανα αυτά χρησιμοποιείται συνήθως κυκλικό οπτικό άνοιγμα που επιτρέπει να περνά μέσα από το δείγμα ένα μεγάλο εμβαδόν δέσμης, το οποίο είναι περίπου 75 έως 100 φορές μεγαλύτερο από το πλάτος σχισμής ενός πρίσματος ή φράγματος περίθλασης που χρησιμοποιούν τα κλασικά φασματοφωτόμετρα διασποράς, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του σήματος και τη βελτίωση του λόγου SNR (Jacquinot advantage). Επίσης, η ακτίνα laser HeNe, σε συντονισμό με την προσπίπτουσα στο συμβολόμετρο Michelson υπέρυθρη ακτινοβολία, παρέχει τη δυνατότητα ακριβούς καταγραφής της μετατόπισης του κινούμενου κάτοπτρου, ενώ παράλληλα καθορίζει τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων φασμάτων. Τέλος, η χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή στην FTIR φασματοσκοπία προσφέρει τη δυνατότητα ταχείας λήψης πολλαπλών φασμάτων αλλά και επεξεργασίας των δεδομένων με μία μεγάλη ποικιλία διαθέσιμων τεχνικών επεξεργασίας, με αποτέλεσμα την καταγραφή φασμάτων πολύ υψηλής ποιότητας.[10]

2.4.3 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR)

2.4.3.1 Οργανολογία ATR

Οι τεχνικές ανάκλασης IR στην υπέρυθρη φασματοσκοπία χρησιμοποιούνται για την ανάλυση υλικών και δειγμάτων τα οποία είναι δύσκολο να μελετηθούν με τις συμβατικές φασματοσκοπικές μεθόδους διαπερατότητας. Μία από τις σημαντικότερες τεχνικές ανάκλασης που έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιείται ευρέως από τα φασματοφωτόμετρα FTIR κυρίως για επιφανειακές αναλύσεις είναι η τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (attenuated total reflectance, ATR), η οποία είναι κατάλληλη για τη μελέτη δειγμάτων μεγάλου πάχους ή υψηλά απορροφητικών και αδιαφανών στερεών ή υγρών υλικών που περιλαμβάνουν λεπτά φιλμ και επικαλύψεις, κονιοποιημένα υλικά (σκόνες), νήματα, πάστες, κόλλες, λεπτά υμένια πολυμερών και υδατικά διαλύματα.[12]

Στα ATR εξαρτήματα χρησιμοποιείται ως στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης (internal reflection element, IRE) ένας διαφανής κρύσταλλος στην υπέρυθρη ακτινοβολία με υψηλό δείκτη διάθλασης πάνω στον οποίο τοποθετείται το δείγμα. Η δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας που προσπίπτει στον κρύσταλλο (συνήθως υπό γωνία 45ο) υφίσταται πολλαπλές ολικές ανακλάσεις στον κρύσταλλο, με αποτέλεσμα να διέρχεται από το δείγμα πολλές φορές, από το οποίο και απορροφάται. Η εσωτερική ολική ανάκλαση της ακτινοβολίας στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο μέσων με διαφορετικούς δείκτες διάθλασης έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός φθίνοντος κύματος (evanescent wave), το οποίο διεισδύει κι εκτείνεται στο μέσο με τον χαμηλότερο δείκτη διάθλασης (δείγμα) και εξασθενεί (attenuates) στις περιοχές του υπέρυθρου ηλεκτρομαγνητικού φάσματος όπου το δείγμα απορροφά ενέργεια.[8]

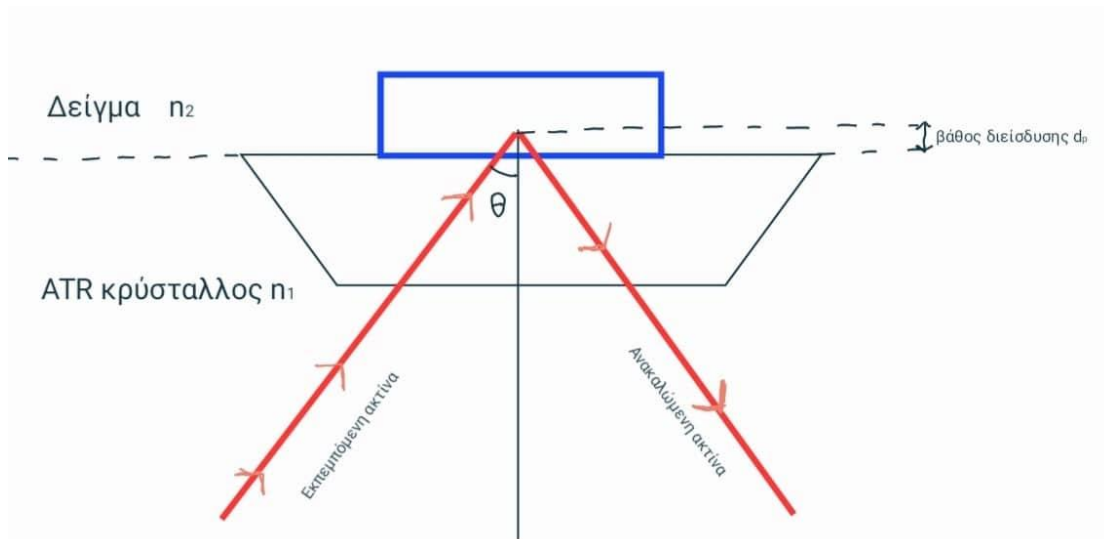


Εικόνα 2.10: Φασματοφωτόμετρο ATR-FTIR.

2.4.3.2 Αρχή Λειτουργίας ATR

Η λειτουργία της τεχνικής ATR βασίζεται στο φαινόμενο της ολικής εσωτερικής ανάκλασης (total internal reflection) το οποίο συμβαίνει όταν μία δέσμη ακτινοβολίας εισάγεται από ένα μέσο υψηλής πυκνότητας (με υψηλότερο δείκτη διάθλασης, n_1) σε ένα μέσο χαμηλότερης πυκνότητας (με χαμηλότερο δείκτη διάθλασης, n_2). Το κλάσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που ανακλάται αυξάνεται όσο μεγαλώνει η γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας. Όταν η γωνία πρόσπτωσης θ είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη γωνία θ_c , η οποία αποτελεί συνάρτηση των δεικτών διάθλασης των δύο μέσων (σχέση 2.4) τότε όλες οι προσπίπτουσες ακτινοβολίες ανακλώνται πλήρως στη διεπιφάνεια των δύο μέσων με αποτέλεσμα να συμβαίνει ολική εσωτερική ανάκλαση.

$$\theta_c = \sin^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (2.4)$$



Εικόνα 2.11: Αρχή λειτουργίας κρυστάλλου ATR.

Στα ATR εξαρτήματα χρησιμοποιείται ως στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης (internal reflection element, IRE) ένας διαφανής κρύσταλλος στην υπέρυθρη ακτινοβολία με υψηλό δείκτη διάθλασης πάνω στον οποίο τοποθετείται το δείγμα. Η δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας που προσπίπτει στον κρύσταλλο (συνήθως υπό γωνία 45ο) υφίσταται πολλαπλές ολικές ανακλάσεις στον κρύσταλλο, με αποτέλεσμα να διέρχεται από το δείγμα πολλές φορές, από το οποίο και απορροφάται. Η εσωτερική ολική ανάκλαση της ακτινοβολίας στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο μέσων με διαφορετικούς δείκτες διάθλασης έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός φθίνοντος κύματος (evanescent wave), το οποίο διεισδύει κι εκτείνεται στο μέσο με τον χαμηλότερο δείκτη διάθλασης (δείγμα) και εξασθενεί (attenuates) στις περιοχές του υπέρυθρου ηλεκτρομαγνητικού φάσματος όπου το δείγμα απορροφά ενέργεια. Η ένταση του κύματος

αυτού μειώνεται εκθετικά με την απόσταση από την επιφάνεια του κρυστάλλου σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$I_{ev} = I_0 \exp \left[-z/d_p \right] \quad (2.5)$$

όπου z είναι η απόσταση κάθετα στην οπτική διεπιφάνεια, I_0 η ένταση στο σημείο $z = 0$, και d_p το βάθος διείσδυσης, επιτρέποντας κατ' αυτόν τον τρόπο την ανάλυση δειγμάτων μεγάλου πάχους ή υψηλής απορροφητικότητας.[8]

Μία πολύ σημαντική παράμετρος είναι το βάθος διείσδυσης (depth of penetration) του φθίνοντος πεδίου ή αλλιώς της υπέρυθρης ακτινοβολίας στο δείγμα, που προσδιορίζεται ως η απόσταση από τη διεπιφάνεια κρυστάλλου-δείγματος στην οποία η ένταση του φθίνοντος κύματος πέφτει στο $1/e$ (προσεγγιστικά 37%) της αρχικής του τιμής στην επιφάνεια. Το βάθος διείσδυσης d_p αποτελεί συνάρτηση του μήκους κύματος λ , του δείκτη διάθλασης του κρυστάλλου n_1 , του δείκτη διάθλασης του δείγματος n_2 , και της γωνίας πρόσπτωσης της ακτινοβολίας ως προς την κάθετο στην επιφάνεια του κρυστάλλου θ , και υπολογίζεται από την παρακάτω σχέση:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2}} \quad (2.6)$$

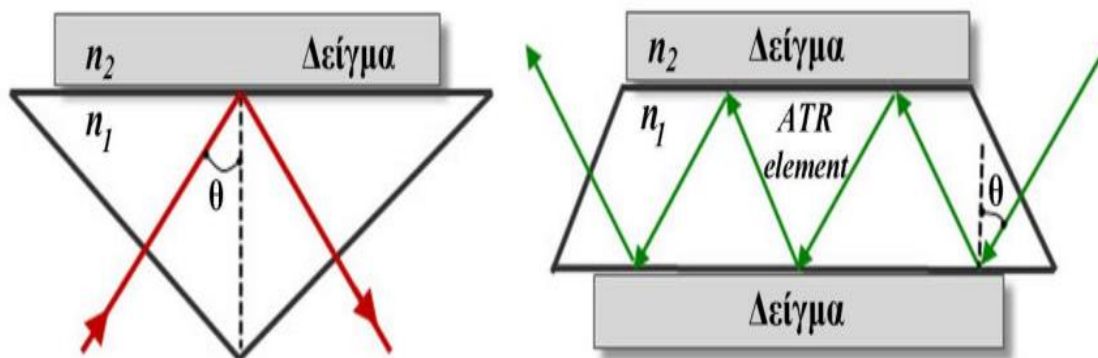
Το φθίνον κύμα που δημιουργείται από τη διεπιφάνεια μεταξύ του στοιχείου εσωτερικής ανάκλασης (κρύσταλλος) και του δείγματος. Έτσι λοιπόν ένα φάσμα μπορεί να προκύψει μέσω της μέτρησης της αλληλεπίδρασης του φθίνοντος κύματος με το δείγμα. Όταν ένα απορροφητικό υλικό τοποθετηθεί σε επαφή με τον ATR κρύσταλλο, το φθίνον κύμα θα απορροφηθεί από το δείγμα και η ένταση του θα εξασθενήσει (attenuates) στις περιοχές μήκους κύματος του IR φάσματος όπου το δείγμα απορροφά ενέργεια, με αποτέλεσμα η ανάκλαση να είναι χαμηλότερης έντασης (attenuated total reflection). Η μέτρηση και καταγραφή της προκύπτουσας αποσβένουσας ακτινοβολίας συναρτήσει του μήκους κύματος παράγει ένα IR φάσμα που παρουσιάζει ομοιότητα με ένα συμβατικό φάσμα απορρόφησης, ωστόσο διαφοροποιείται ως προς την ένταση των ταινιών απορρόφησης σε υψηλότερα μήκη κύματος. Αυτό οφείλεται στην εξάρτηση του βάθους διείσδυσης από το μήκος κύματος: σε υψηλότερα μήκη κύματος το φθίνον κύμα διεισδύει βαθύτερα στο δείγμα, με αποτέλεσμα οι αντίστοιχες ταινίες απορρόφησης να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ένταση σε σχέση με αυτές σε χαμηλότερα μήκη κύματος. Αυτό συνεπάγεται μεγαλύτερη απορρόφηση, που σημαίνει ότι, καθώς το μήκος κύματος αυξάνεται, παρατηρείται διεύρυνση ή και παραμόρφωση των ταινιών απορρόφησης. Επιπλέον, άλλες μικρές διαφορές που είναι δυνατό να εμφανίζουν τα φάσματα ATR-FTIR εν συγκρίσει με τα φάσματα διαπερατότητας μπορεί να οφείλονται σε επιδράσεις διασποράς, που προκαλούν μεταβολές του δείκτη διάθλασης ενός υλικού και του βάθους διείσδυσης μέσω μίας ζώνης απορρόφησης.[8]

Τα τυπικά βάθη διείσδυσης στην τεχνική ATR είναι της τάξης των μερικών μm (συνήθως μέχρι 10 μm) και ως εκ τούτου είναι προφανές ότι ένα φάσμα μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με την

επιφάνεια ενός δείγματος. Επιπλέον, ο βαθμός της φυσικής επαφής μεταξύ του στοιχείου εσωτερικής ανάκλασης (IRE) και του δείγματος επηρεάζει σε πολύ σημαντικό βαθμό την ευαισθησία, που σημαίνει ότι, προκειμένου να ληφθούν φάσματα υψηλής ποιότητας, θα πρέπει να υπάρχει πολύ καλή επαφή ανάμεσα στο δείγμα και στον κρύσταλλο.

Οι ATR κρύσταλλοι, όπως προαναφέρθηκε, κατασκευάζονται από υλικά που έχουν πολύ υψηλό δείκτη διάθλασης και χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Μερικά από τα πιο διαδεδομένα υλικά που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στους ATR κρυστάλλους είναι το διαμάντι, ο σεληνιούχος ψευδάργυρος (ZnSe), το γερμάνιο (Ge) και το ιωδιούχο θάλλιο / βρομιούχο θάλλιο (TlI₂/TlBr₂, κρύσταλλος KRS-5), του οποίου η χρήση όμως έχει περιοριστεί λόγω της τοξικότητάς του. Επίσης το μήκος του ATR κρυστάλλου καθορίζει την ευαισθησία της τεχνικής. Για μια δεδομένη γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας, η αύξηση του λόγου του μήκους προς το πάχος του κρυστάλλου παρέχει μεγαλύτερο αριθμό ανακλάσεων.[8]

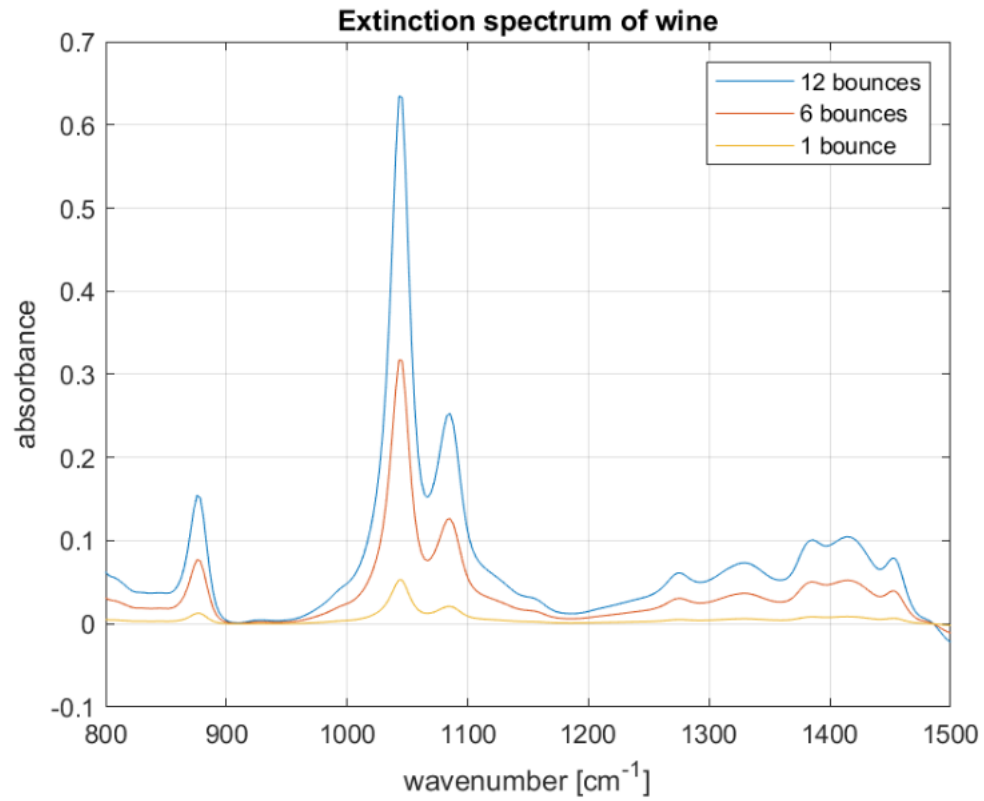
Όσον αφορά τις διατάξεις των ATR τεχνικών, υπάρχουν δύο διαθέσιμοι τύποι διατάξεων όπου στην πρώτη συμβαίνει μόνο μία εσωτερική ανάκλαση με τη χρήση πρίσματος (single Bounce-ATR), ενώ στη δεύτερη η IR ακτινοβολία υπόκειται σε πολλαπλές διαδοχικές εσωτερικές ανακλάσεις με τη χρήση ειδικών πρισμάτων (Multi Bounce-ATR). Πολλαπλές ανακλάσεις της IR ακτινοβολίας στο δείγμα έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου του σήματος προς τον θόρυβο (signal-to-noise ratio, SNR) και επομένως την αύξηση της έντασης των ταινιών του φάσματος ακόμα και για πολύ μικρές συγκεντρώσεις.



Εικόνα 2.12: Σχηματική αναπαράσταση της διαδρομής της δέσμης της ATR ανάλυσης σε μονή εσωτερική ανάκλαση (αριστερά) και πολλαπλές διαδοχικές εσωτερικές ανακλάσεις (δεξιά).

Η ATR-FTIR φασματοσκοπία αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μη καταστρεπτικές και πιο ευέλικτες μεθόδους, η οποία παρέχει φάσματα πολύ υψηλής ποιότητας για μία πολύ μεγάλη ποικιλία υλικών. Το βασικό πλεονέκτημα της ATR-FTIR μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι δεν απαιτεί οποιαδήποτε επεξεργασία του δείγματος ή ομογενοποίηση για τον σχηματισμό δισκίου του δείγματος με σκόνη KBr, παρά μόνο μία απειροελάχιστη ποσότητα δείγματος που τοποθετείται σε επαφή με τον κρύσταλλο ως έχει. Για την επίτευξη καλής επαφής, που όπως προαναφέρθηκε παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην

ακρίβεια των ληφθέντων φασμάτων, χρησιμοποιείται κατάλληλος εξοπλισμός που πιέζει το δείγμα πάνω στον κρύσταλλο.[11]



Εικόνα 2.13: Φάσμα απορρόφησης ATR δείγματος οίνου με διαφορετικό αριθμό διαδοχικών εσωτερικών ανακλάσεων.

3. Μεταβολομική Ανάλυση

3.1 Εισαγωγή

Κάθε χρόνο ο αριθμός των ασθενειών που προσβάλλουν τον άνθρωπο αυξάνεται δραματικά. Έτσι οι έρευνες έχουν στραφεί σε μεθόδους οι οποίες θα μπορούν να ανιχνεύσουν τέτοιες ασθένειες σε πολύ πρώιμο στάδιο. Για να επιτευχθεί αυτός ο σκοπός πρέπει να γίνει γνωστή η βιολογία του ανθρώπινου οργανισμού. Μία νέα προσέγγιση στη βιολογία, που ονομάζεται βιολογία συστημάτων, και εμφανίστηκε την τελευταία εικοσαετία, εξετάζει τη βιολογία του ανθρώπινου σώματος ως μια επιστήμη που παρέχει πολύτιμες πληροφορίες. Μελετά τα βιολογικά συστήματα στο σύνολό τους και αναγνωρίζει ότι η βιολογική διαμόρφωση στα ζωντανά συστήματα συλλαμβάνεται, διαβιβάζεται, διαμορφώνεται και ενσωματώνεται από βιολογικά δίκτυα που μεταδίδουν αυτές τις πληροφορίες σε μοριακές μηχανές για εκτέλεση.

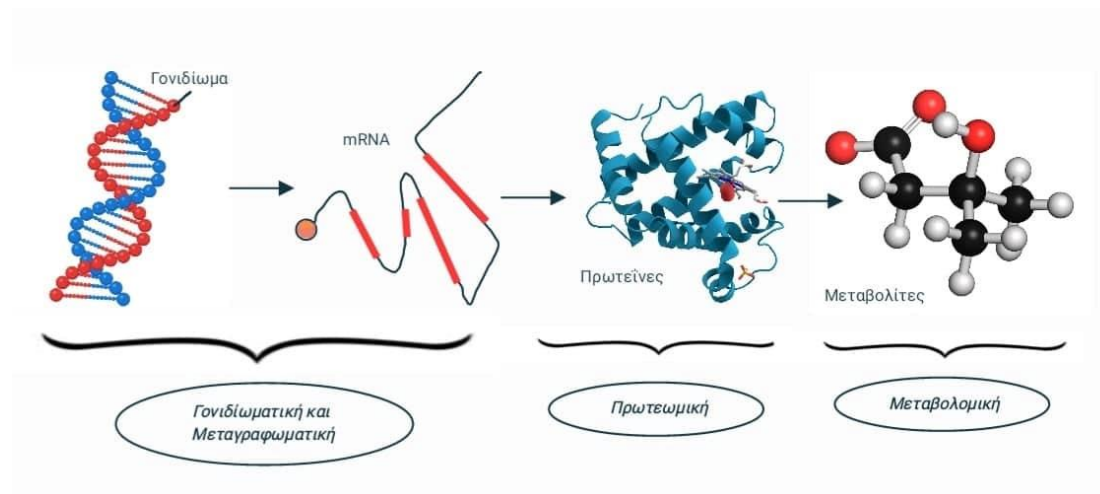
Η βιολογία των συστημάτων μας παρέχει μια κοινή γλώσσα τόσο για την περιγραφή όσο και για τη μοντελοποίηση της ολοκληρωμένης δράσης των ρυθμιστικών δικτύων σε πολλά επίπεδα βιολογικής οργάνωσης από το ενδοκυτταρικό μέσω των κυττάρων, των ιστών και των οργάνων μέχρι το σύνολο του οργανισμού. Η βιολογία συστημάτων σχετίζεται με την ανάλυση του γονιδιώματος, του πρωτεώματος, της μεταγραφής του RNA που εκφράζεται από τα γονίδια, και του μεταβολώματος. Με την ανάλυση αυτών των βιολογικών συστημάτων είναι δυνατόν να χαρτογραφηθεί το ολικό 'αποτύπωμα' ενός δείγματος, δηλαδή τα συστατικά από τα οποία αποτελείται. Η ανάλυση τους όμως δεν ήταν εφικτή για πολλά χρόνια. Η εισαγωγή όμως των φασματοσκοπικών τεχνικών έδωσαν λύση στο πρόβλημα και άνοιξαν νέους δρόμους στην ανάλυση των βιολογικών δειγμάτων.

3.2 Τεχνικές Ανάλυσης Βιολογικών Συστημάτων

Οι τεχνικές που αναλύουν τα βιολογικά συστήματα με τη χρήση της φασματοσκοπίας ονομάζονται ολιστικές τεχνικές και πλεονεκτούν ως προς το ότι δεν απαιτούνται αρχικά δεδομένα για την ανίχνευση ορισμένων συστατικών. Οι τεχνικές αυτές χωρίζονται σε ορισμένες υποκατηγορίες ανάλογα με το αντικείμενο μελέτης τους. Οι τεχνικές αυτές είναι οι εξής:

- **Γονιδιωματική** που μελετά όλες τις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων, συμπεριλαμβανομένων των δομικών γονιδίων, των ρυθμιστικών αλληλουχιών και του μη κωδικοποιημένων τμημάτων του DNA στα χρωμοσώματα που κωδικοποιείται από το γονιδίωμα ενός συγκεκριμένου κυττάρου ή οργανισμού σε συγκεκριμένο χρόνο ή υπό συγκεκριμένο σύνολο συνθηκών,
- **Μεταγραφωματική** η οποία μελετά του συνόλου των μεταγραφημάτων (mRNA) που παράγονται σε ένα κύτταρο ή είδος κυττάρων ή κάποιο οργανισμό,
- **Πρωτεωμική** που περιλαμβάνει την ταυτοποίηση πρωτεϊνών στο σώμα και τον προσδιορισμό του ρόλου τους στις φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές λειτουργίες. Το πολύπλοκο και οργανωμένο βιοχημικό δίκτυο στο οποίο μικρά μόρια, όπως μεταβολικά υποστρώματα και προϊόντα, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με άλλα βιολογικά μακρομόρια, αποτελεί το **μεταβόλωμα**.(17)

Έτσι, η μεταβολομική αναλαμβάνει τη θέση της ως η νέα επιστημονική ολιστική "omics" επιστήμη. Πλεονεκτεί σε σχέση με τις υπόλοιπες ολιστικές τεχνικές αφού συσχετίζει τις βιοχημικές αλλαγές με το φαινότυπο αλλά επιτρέπει και την άμεση παρατήρηση των αλλαγών που οφείλονται σε εξωγενείς παράγοντες.[17]



Εικόνα 3.1: Περιοχές μελέτης των τεχνικών ανάλυσης.

3.3 Αρχές Μεταβολομικής Ανάλυσης

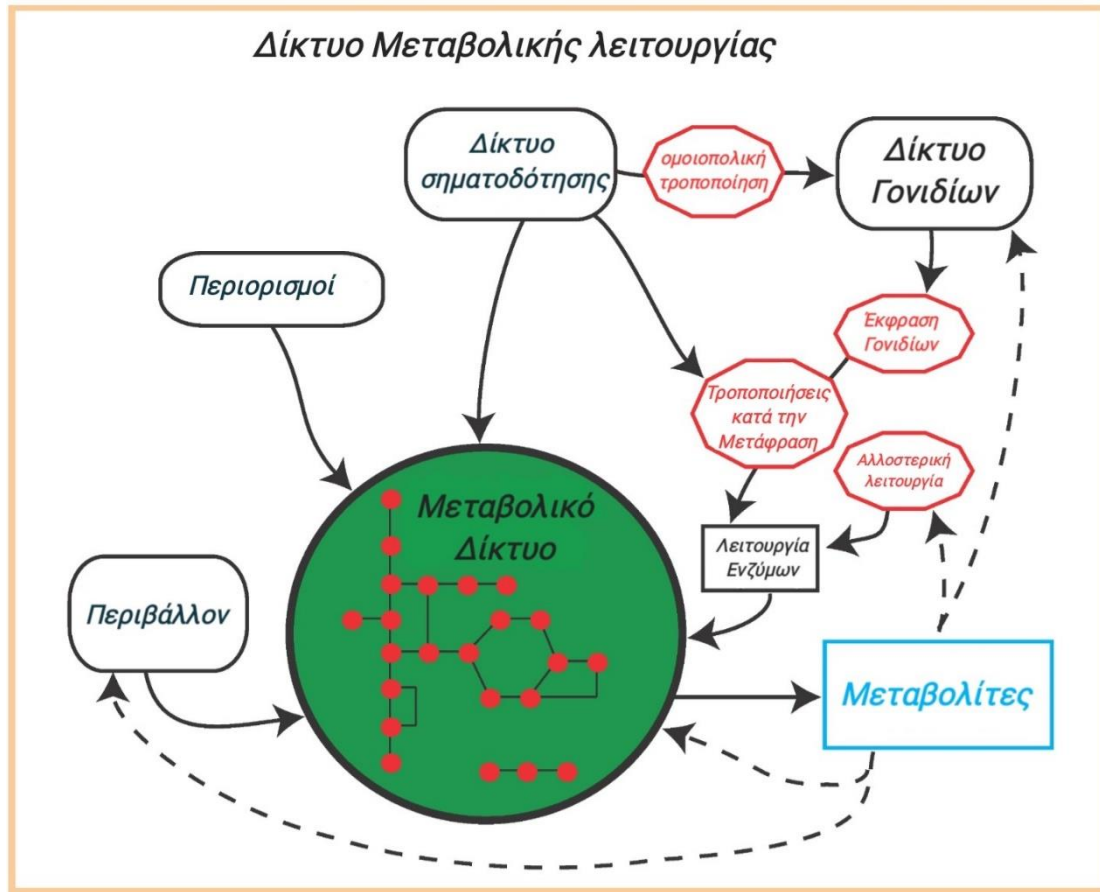
3.3.1 Ορισμοί Μεταβολομικής Ανάλυσης

Ως Μεταβολομική Ανάλυση ορίζεται η συνολική ποσοτική ανάλυση όλων των μεταβολιτών ενός οργανισμού ή ενός συγκεκριμένου βιολογικού δείγματος. Πιο συγκεκριμένα Η μεταβολομική είναι η μελέτη των μεταβολικών προφίλ σε βιολογικά δείγματα, ιστούς και απομονωμένα κύτταρα, αλλά ιδιαίτερα των ούρων, του σάλιου και του πλάσματος του αίματος. Το μεταβολικό προφίλ προκύπτει από την ανάλυση που επικεντρώνεται σε μια ομάδα μεταβολιτών, για παράδειγμα μια κατηγορία ενώσεων όπως είναι οι υδατάνθρακες, τα αμινοξέα ή κάποια που σχετίζονται με μια συγκεκριμένη βιοχημική οδό.

Οι μεταβολίτες θεωρούνται ότι "δρουν ως γλώσσα ομιλίας, εκπέμπουν σήματα από τη γενετική διάταξη και το περιβάλλον" και ως εκ τούτου θεωρείται ότι η μεταβολική μέθοδος παρέχει μια άμεση "λειτουργική ανάγνωση της φυσιολογικής κατάστασης" ενός οργανισμού. Ο αριθμός των διαφόρων μεταβολιτών στους ανθρώπους είναι άγνωστος, ωστόσο κυμαίνονται από 2.000 έως περίπου 20.000, σε σύγκριση με εκτιμώμενα 23.000 γονίδια και 60.000 πρωτεΐνες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη μεταβολομική είναι οι χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις που χρησιμεύουν ως υποστρώματα και προϊόντα σε διάφορες μεταβολικές πορείες. Αυτά τα μικρά μόρια, περιλαμβάνουν ενώσεις όπως τα λιπίδια, τα σάκχαρα και τα αμινοξέα, που δρουν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στις λειτουργίες του ιστού.[18]

Σε ένα κύτταρο, ανά πάσα στιγμή, διενεργούνται χιλιάδες διαδικασίες μετασχηματισμού

ενέργειας οι οποίες αναφέρονται ως μεταβολισμός. Τα μεταβολικά μόρια εμπλέκονται στο σύνολο των μεταβολικών διεργασιών συμπεριλαμβανομένου του αναβολισμού και του καταβολισμού, καθώς και σε όλες τις σχετικές κυτταρικές διεργασίες. Ο μεταβολισμός είναι δυναμικός, αντανακλώντας τις συνεχείς ροές μεταβολικών και σηματοδοτικών οδών.



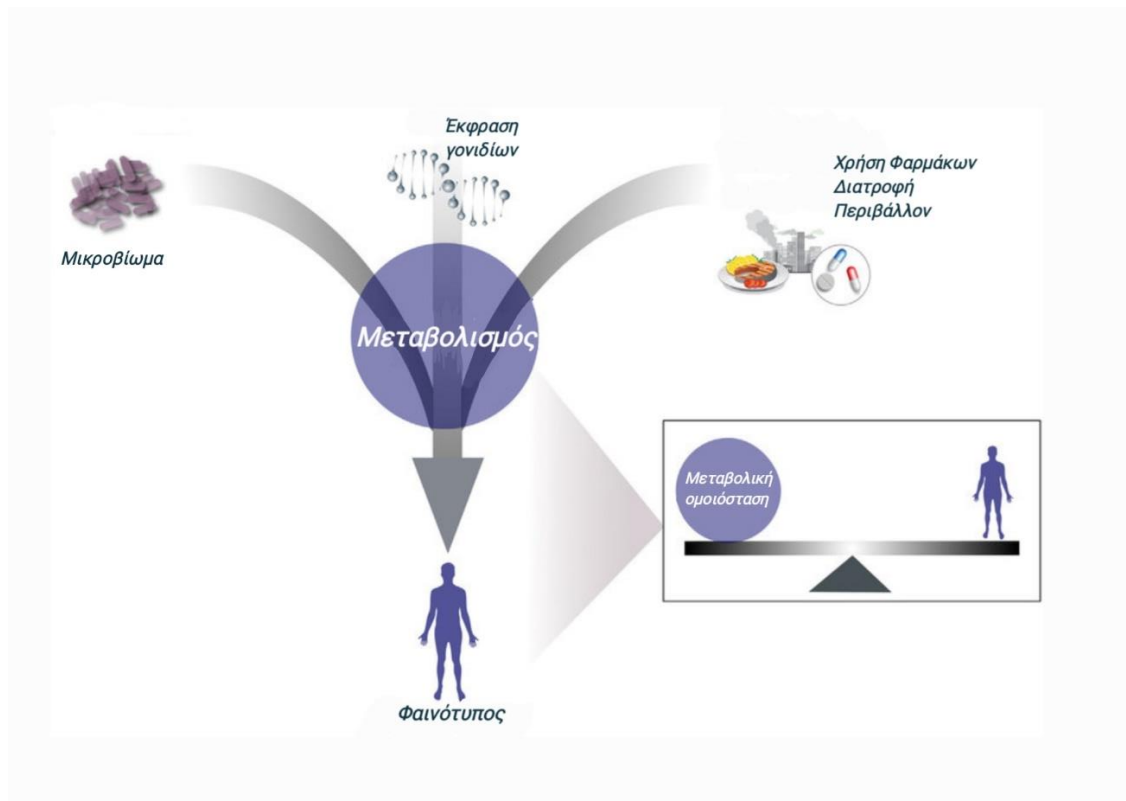
Εικόνα 3.2 Δίκτυο Μεταβολικών διεργασιών σε πολυκύτταρους οργανισμούς.

Η μεταβολική κατάσταση υπόκειται σε διάφορες επιδράσεις όπως περιβαλλοντική, χρονική, διατροφική, φυσιολογική, φάρμακα, ασθένειες, φύλο και ηλικία. Επομένως γενικός στόχος της μεταβολομικής είναι να προσδιοριστούν, να μετρηθούν και να ερμηνευθούν οι πολύπλοκες χρονικές συγκεντρώσεις, δραστηριότητες και ροές ενδογενών μεταβολιτών σε κύτταρα, ιστούς και σε βιολογικά δείγματα όπως αίμα, ούρα και σίελο. [19]

3.3.2 Μεταβόλωμα

Ως μεταβόλωμα ορίζεται ως η «ολική ποσοτική συλλογή ενώσεων μικρού μοριακού βάρους (μεταβολιτών) που υπάρχουν σε ένα κύτταρο ή οργανισμό, και συμμετέχουν σε μεταβολικές αντιδράσεις

που απαιτούνται για την ανάπτυξη, τη συντήρηση και τη φυσιολογική λειτουργία». Το μεταβόλωμα είναι ένα από τα συστατικά της βιολογίας των συστημάτων. Είναι ο πυρήνας σε σχέση με πολλές κυτταρικές αλλαγές και φαινότυπους. Συγκεκριμένα, ο μεταβολισμός ρυθμίζεται από έκφραση γονιδίου και μετα-μεταγραφικά και μετα-μεταφραστικά γεγονότα. Οι ποσότητες των μεταβολιτών μέσα στα κύτταρα ποικίλουν ως συνέπεια γενετικών ή φυσιολογικών αλλαγών και μπορούν να αντικατοπτρίζουν τον φαινότυπο. Τα γονίδια μπορούν να προδιαθέτουν σε ποια ασθένεια είναι δυνατόν να υπάρχει προδιάθεση, ωστόσο είναι μία ατελής εικόνα της υγείας. Οι εξωτερικοί παράγοντες όπως η διατροφή, η άσκηση, τα μικρόβια και γενικά ο συνολικός τρόπος ζωής μπορεί να επηρεάσει τα μεταβολικά δεδομένα του οργανισμού. Ο φαινότυπος δείχνει την κατάσταση του οργανισμού για δεδομένη χρονική περίοδο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη και την αντιμετώπιση ασθενειών.[17]



Εικόνα 3.3: Επιδραστικοί παράγοντες που σε συνδιασμό με τις μεταβολικές διεργασίες επηρεάζουν τον ανθρώπινο φαινότυπο.

Το σημείο εκκίνησης ενός μεταβολομικού πειράματος είναι να ποσοτικοποιήσει όλους τους μεταβολίτες σε ένα κυτταρικό σύστημα με σκοπό τη δημιουργία ενός μεταβολικού προφίλ). Επί του παρόντος, αυτό είναι αδύνατο, δεδομένης της έλλειψης απλών αυτοματοποιημένων αναλυτικών στρατηγικών που μπορούν να επηρεάσουν την κατάσταση αυτή με έναν αναπαραγωγίσιμο τρόπο. Οι κύριες προκλήσεις είναι η χημική πολυπλοκότητα και ετερογένεια των μεταβολιτών, το δυναμικό εύρος της τεχνικής μέτρησης, η απόδοση των μετρήσεων και τα πρωτόκολλα εξαγωγής. Στην ιδανική περίπτωση, η μεταβολομική δεν πρέπει να είναι συγκεκριμένη αλλά, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, στην καλύτερη περίπτωση μπορεί να θεωρηθεί ως μη στοχευμένη.[20]

3.4 Στοχευμένη και μη Στοχευμένη Μεταβολομική Ανάλυση

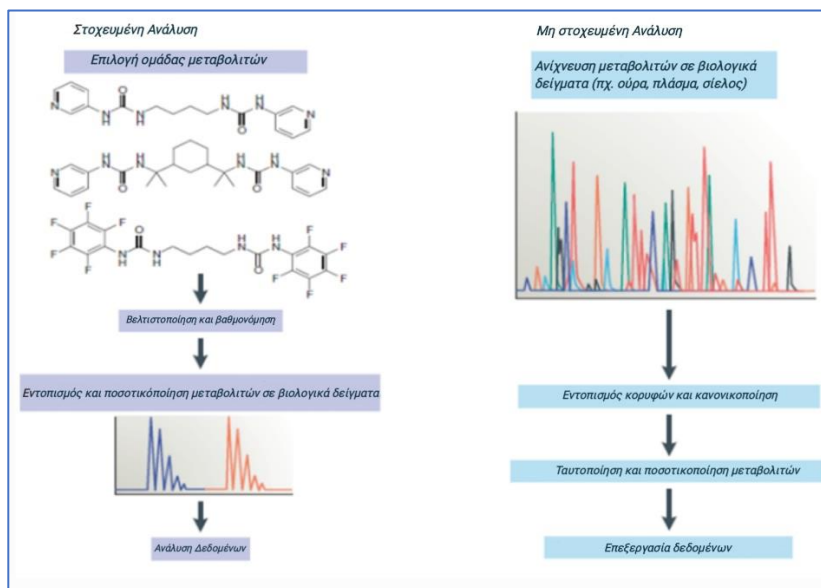
Υπάρχουν δύο κύριες στρατηγικές που μπορούν να πραγματοποιηθούν στη μεταβολομική: η στοχευμένη ανάλυση και η μελέτη του μεταβολικού προφίλ που πραγματοποιείται με μη στοχευμένη ανάλυση. Η στοχευμένη ανάλυση περιορίζεται στην ποσοτική ανάλυση μιας κατηγορίας ενώσεων και είναι πολύ χρήσιμη για τη μελέτη της πρωταρχικής επίδρασης των γενετικών αλλαγών. Η αναλυτική διαδικασία πρέπει να περιλαμβάνει ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των επιλεγμένων μεταβολιτών στο εξεταζόμενο δείγμα. Τα πλεονεκτήματα αυτής της προσέγγισης περιλαμβάνουν υψηλότερο βαθμό ευαισθησίας από μη στοχευμένες προσεγγίσεις, απόλυτη ποσοτικοποίηση και εύκολη ταυτοποίηση των ενώσεων.[20]

Αντιθέτως, ο σχηματισμός του μεταβολικού προφίλ πραγματοποιείται με ταχεία ανάλυση, συχνά μη ποσοτική, ενός μεγάλου αριθμού μεταβολιτών με σκοπό την ταυτοποίηση ενός συγκεκριμένου προφίλ του μεταβολίτη που χαρακτηρίζει ένα δείγμα. Κατηγοριοποιείται σε μεταβολικά δακτυλικά αποτύπωμα και μεταβολικό αποτύπωμα. Η αποτύπωση μεταβολικών δακτυλικών αποτυπωμάτων αποτελεί την ανίχνευση μεγάλου αριθμού ενδοκυτταρικών μεταβολιτών με επιλεγμένη αναλυτική τεχνική. Στην περίπτωση αυτή, δεν είναι απαραίτητο να προσδιορίζονται και να ποσοτικοποιούνται όλοι οι μεταβολίτες. Το μεταβολικό αποτύπωμα είναι τεχνικά παρόμοιο με το μεταβολικό δακτυλικό αποτύπωμα, αλλά επικεντρώνεται στη μέτρηση όλων των εξωκυτταρικών μεταβολιτών. Οι αναγνωρισμένες ενώσεις είναι είτε μεταβολίτες που εκκρίνονται από τα κύτταρα ή συστατικά που μετασχηματίζονται βιοχημικά από τον οργανισμό.[20]

Οι μη στοχευμένες τεχνικές μετράνε εκατοντάδες μεταβολίτες, με το πλεονέκτημα ότι ανιχνεύουν παλαιότερες απρόβλεπτες μεταβολικές διαταραχές που σχετίζονται με κάποια ασθένεια. Για τη σχεδίαση ενός πειράματος μεταβολομικής είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός του αριθμού των μεταβολιτών που πρέπει να μετρηθούν προκειμένου να πραγματοποιηθεί μια στοχευμένη ανάλυση ενώ σε περίπτωση που το πείραμα στοχεύει στην ανίχνευση όσο το δυνατόν περισσότερων μεταβολιτών αλλά και στη σύγκριση μεταξύ δειγμάτων τότε προτιμάται μία μη στοχευμένη προσέγγιση.

Τελικά, ο αριθμός και η χημική σύνθεση των μεταβολιτών που πρόκειται να μελετηθούν αποτελεί καθοριστικό χαρακτηριστικό οποιουδήποτε μεταβολομικού πειράματος και διαμορφώνει τον πειραματικό σχεδιασμό σε σχέση με την προετοιμασία του δείγματος και την επιλογή των οργάνων.

Συνοψίζοντας, το πεδίο εφαρμογής αυτών των δύο τύπων ανάλυσης είναι διαφορετικό και οι δύο έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Οι στοχευμένες προσεγγίσεις μεταβολισμού έχουν χαμηλό όριο ανίχνευσης και επιτρέπουν την απόλυτη ποσοτικοποίηση του δείγματος. Ωστόσο, οι στοχευμένες μέθοδοι δεν επιτρέπουν την ανακάλυψη άγνωστων ενώσεων. Οι μη προσανατολισμένες προσεγγίσεις μεταβολισμού παρέχουν μια συνολική εικόνα ενός δείγματος. Τα μειονεκτήματα των μη στοχευμένων μεθόδων περιλαμβάνουν τη σύνθετη πληροφορική που απαιτείται για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, τον ημι-ποσοτικό χαρακτήρα των μεθόδων και την ανάγκη επικύρωσης τυχόν προσδιορισμένων ενώσεων.[20]



Εικόνα 3.4: Στοχευμένη και μη στοχευμένη Μεταβολομική Ανάλυση.

3.5 Μεθοδολογία Μεταβολομικής Ανάλυσης

Η μεταβολομική εφαρμόζεται συχνά στις εκτιμήσεις των διαταραχών στα βιολογικά συστήματα, που προκαλούνται από ασθένειες ή θεραπείες σε σύγκριση με τα συστήματα αναφοράς. Στο πεδίο ιατρικών επιστημών οι μεταβολομικές μελέτες βρίσκουν εφαρμογή στον εντοπισμό βιοδεικτών ασθένειας (diagnostic markers), στην πρόβλεψη αποτελεσματικότητας φαρμάκων (pharmaco metabolomics), στην εύρεση βιοδεικτών πρόγνωσης ασθένειας (prognostic markers) και στη μελέτη τοξικότητας φαρμάκων (safety assessment). Παράλληλα μεταβολομικές μελέτες εφαρμόζονται και σε ταξινομικές μελέτες των επιστημών τροφίμων και περιβάλλοντος για την αξιολόγηση ποιότητας προέλευσης. Ανερχόμενο πεδίο έρευνας αποτελούν επίσης τα μικροβιακά metabolomics θεωρώντας τα θηλαστικά ξενιστές οργανισμούς στους οποίους μικροβιακές αλληλεπιδράσεις δύνανται να προκαλέσουν φαινόμενα τοξικότητας ή να επηρεάσουν την μεταβολική πορεία ενός φαρμάκου. Είναι συνεπώς, μια ανερχόμενη επιστήμη που συγκεντρώνει την αναλυτική τεχνολογία, την αξιολόγηση του μεταβολίτη και τον υπολογισμό του. Η ενσωμάτωση αυτού του εργαλείου δίνει την ευκαιρία να εξετάσουμε και να διαγνώσουμε πολλές ασθένειες όπως ο καρκίνος και να στοχεύσουμε στην πρόωρη διάγνωση πολλών ασθενειών.[22]

Για κάθε μεταβολομική μελέτη τίθεται μία βιολογική ερώτηση (**Εικόνα 3.5**) η οποία οφείλει να απαντηθεί με την ολοκλήρωση αυτής. Η μελέτη ξεκινά με την σχεδιασμό όπου επιλέγεται η μεθοδολογία ανάλυσης που θα χρησιμοποιηθεί, καθώς αυτή καθορίζει την ποσότητα δείγματος που θα πρέπει να συλλεχθεί, τα δοχεία (tubes) και τις συνθήκες αποθήκευσης. Η μεταφορά και οι συνθήκες αποθήκευσης είναι καθοριστικοί παράγοντες για την εξασφάλιση της επαναληψιμότητας και της επιτυχίας της αναλυτικής διαδικασίας. Αφού συλλέγεται το δείγμα, ακολουθεί προετοιμασία αυτού και ανάλυση. Έπειτα από το αναλυτικό στάδιο ακολουθεί η επεξεργασία φασμάτων, με σκοπό την εξαγωγή των μεταβολιτών, στατιστική επεξεργασία, ερμηνεία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.[21]



Εικόνα 3.5: Σειρά μεθοδολογίας για την εξαγωγή μιας μελέτης με μεταβολομική ανάλυση

3.6 Βιοδείκτες

Η έννοια του βιοδείκτη περιλαμβάνει κάθε μετρούμενη ποσότητα η οποία αντικατοπτρίζει αλληλεπίδραση μεταξύ βιολογικού συστήματος και περιβαλλοντικού παράγοντα. Ο παράγοντας αυτός μπορεί να είναι χημικός, φυσικός ή βιολογικός. Βιοδείκτες έκθεσης θεωρούνται τα προϊόντα αλληλεπίδρασης μεταξύ ξενοβιοτικού παράγοντα και οργανισμού. Οι βιοδείκτες επίδρασης συνδέονται με πιθανή διαταραχή υγείας ανάλογα με την ποσότητα στην οποία εντοπίζονται. Τέλος, οι βιοδείκτες ευαισθησίας είναι δείκτες ικανότητας οργανισμού να ανταποκριθεί σε έκθεση σε συγκεκριμένη ουσία. Για μελέτες εκτίμησης βιοδεικτών ως βιολογικά δείγματα χρησιμοποιούνται αίμα, ούρα, σίελος, νύχια, μαλλιά, κόπρανα, δόντια, αμνιακό υγρό, σπέρμα ή ιστοί.[19]

Η έγκαιρη και ασφαλής διάγνωση που βασίζεται σε επικυρωμένους βιοδείκτες και όχι σε μόνο σε κλινικές εξετάσεις μπορεί να βοηθήσει στην έγκαιρη αντιμετώπιση της ασθένειας. Επιπλέον η παρακολούθηση των συγκεντρώσεων μοριακών δεικτών κατά τη πορεία της ασθένειας μπορεί να βοηθήσει στη λήψη αποφάσεων σε κλινικό επίπεδο. Αυτή η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί στην εξατομικευμένη θεραπευτική, στην αναγνώριση της απόκρισης του ασθενούς στην αγωγή, πολύ νωρίτερα από εμφανείς αλλαγές στη φυσιολογία του. Η μέτρηση βιοδεικτών απόκρισης σε μία θεραπεία μπορεί να γίνει μέσα σε λίγες ώρες. Αντιθέτως, η αλλαγή στην κλινική εικόνα μπορεί να απαιτεί μέρες, κάτι που μπορεί να επιφέρει μεγάλο κόστος στην υγεία, ακόμη και στη ζωή του ασθενούς.

Σκοπός της μεταβολομικής μελέτης, κατ' επέκταση, είναι ο εντοπισμός συγκεκριμένων και σταθερών βιοδεικτών για μια συγκεκριμένη ασθένεια με χρήση βιοπληροφορικής. Καθώς οι περισσότερες παθήσεις εμφανίζουν πολυπαραγοντική αιτιότητα, η εύρεση ενός μόνο βιοδείκτη σχετιζόμενου με μία ασθένεια είναι δύσκολη. Μία ομάδα μεταβολιτών ή πρωτεϊνών τα οποία εντοπίστηκαν μέσω της προσέγγισης "omics" θεωρείται αποδεκτή ως βιοδείκτης. (An and Gao, 2015) Επιπροσθέτως, μελέτη βιοδεικτών συνδυαζόμενη με την τεχνολογία SNPs (single nucleotide polymorphisms), που ενέχει την γνώση των πιο κοινών γονιδιακών διαφοροποιήσεων, αποτελεί πολλά υποσχόμενα εργαλείο για την επιστήμη της εξατομικευμένης ιατρικής που αποτελεί έναν από τους πιο μεγαλεπίβλους στόχους των τεχνολογιών omics. Θεωρείται ότι με αυτόν τον τρόπο θα γίνει δυνατή η βελτιστοποίηση της θεραπείας και η απόκριση του ασθενούς στην εκάστοτε θεραπεία.[19]

Εκτός αυτού, η τεχνολογία αυτή έχει αποδείξει ένα σημαντικό πλεονέκτημα: μη ή ελάχιστα επεμβατική μέτρηση δυνητικά χρήσιμων βιοδεικτών από βιορευστά, όπως ούρα, πλάσμα ή ορός του αίματος, σπέρματικό υγρό, αμνιακό υγρό, αρθρικό υγρό, σάλιο, αλλά και άλλα πιο δύσκολα

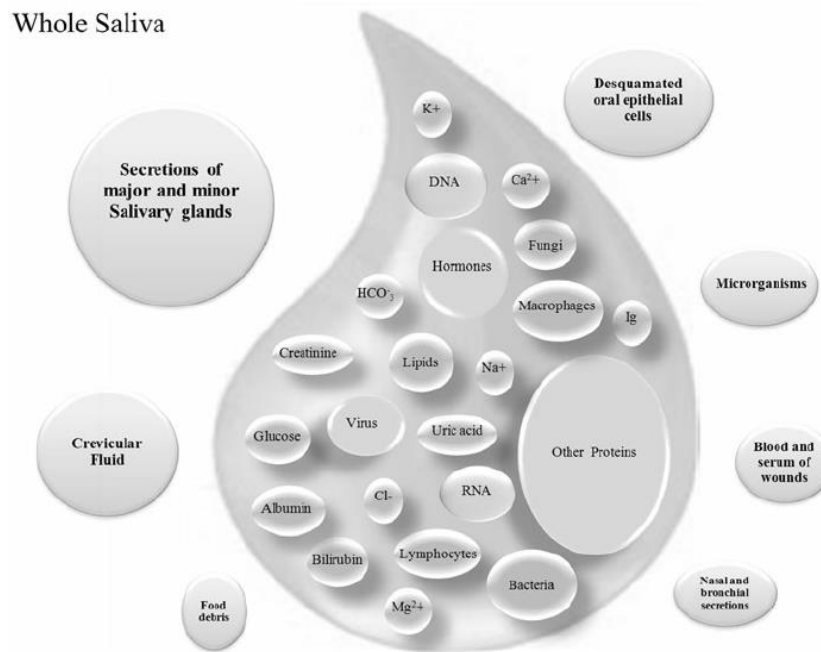
υποστρώματα όπως είναι ο αέρας. Ο αέρας περιλαμβάνει πολλές πτητικές ενώσεις. Σε βιολογικά δείγματα το δείγμα αέρα είναι δείγμα εκπνοής και περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs), οι οποίες μπορεί να είναι σημαντικοί μεταβολίτες για διάφορες μεταβολικές ενέργειες στο ανθρώπινο σώμα. Στην παρούσα μελέτη αναλύονται βιολογικά δείγματα σιέλου, τα χαρακτηριστικά της οποίας αναφέρονται στην επόμενη ενότητα.

4. Χαρακτηριστικά Σιέλου ως Βιολογικό Δείγμα

4.1 Σύσταση Σιέλου

Η σιέλος είναι ένα σύνθετο βιολογικό υγρό. Τα συστατικά της παράγονται κυρίως από κυψελιδικά κύτταρα και μεταφέρονται στην στοματική κοιλότητα, μέσω ενός συστήματος-αγωγού κυττάρων όπου το υγρό και τα ηλεκτρολυτικά συστατικά υφίστανται δευτερεύουσες τροποποιήσεις. Κανονικά η σιέλος είναι ένα άχρωμα διάλυμα με πυκνότητα από 1002 μέχρι 1012 mg/cm³ και pH σε τιμές που κυμαίνονται από 6 μέχρι περίπου 7,2. Το αυτόνομο νευρικό σύστημα (autonomic nervous system ANS) ρυθμίζει την παραγωγή και την σύσταση της σιέλου, έτσι ώστε οι εναλλαγές στην δραστηριότητα του συστήματος αυτού (ANS) να επηρεάζουν και το επίπεδο της παραγωγής του.[24]

Το βασικό συστατικό της σιέλου είναι το νερό ενώ τα υπόλοιπα συστατικά είναι κυρίως οργανικά (67%), ενώ έχει και ποσοστό ανόργανων συστατικών (33%). Μεταξύ των ανόργανων συστατικών της σιέλου, τα ωσμωτικά ενεργά κατιόντα () και ανιόντα () είναι ιδιαίτερης σημασίας. Τα ολικά επίπεδα πρωτεϊνών στην σιέλο είναι 8,0 με 3,0 gL⁻¹, εκ των οποίων το 90% παράγονται από τους σιελογόνους αδένες (γλυκοπρωτεΐνες, α-αμυλάση, λυσοζύμη κ.α.) και περίπου το 10% είναι μεταβολικά προϊόντα βακτηρίων από το αίμα ή κύτταρα της στοματικής κοιλότητας.



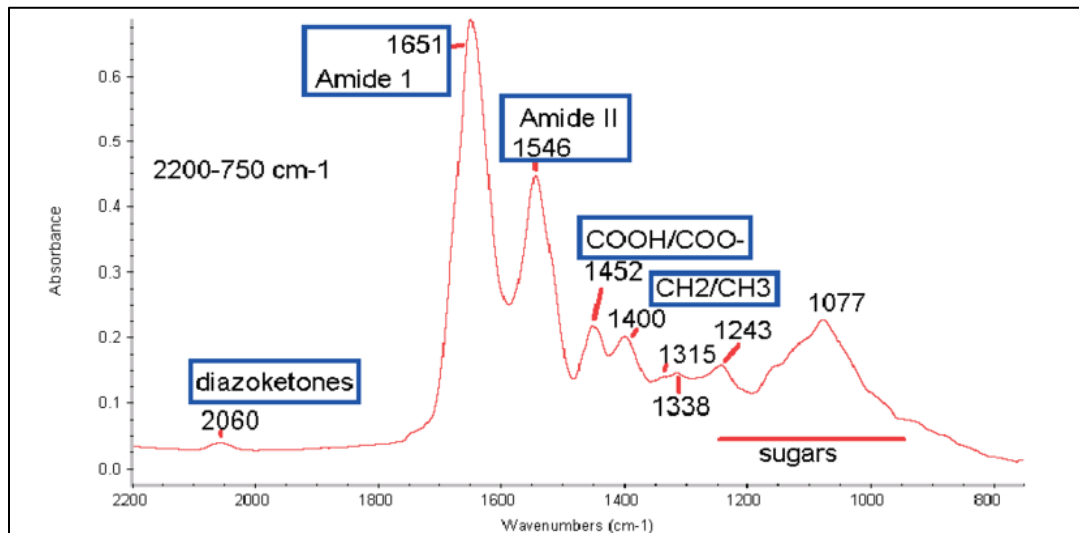
Εικόνα 4.1: Σχηματική απεικόνιση της σύστασης της σιέλου

Οι πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες της σιέλου μπορούν να ταξινομηθούν σε τουλάχιστον επτά υποκατηγορίες: βλεννίνες, πρωτεΐνες πλούσιες σε προλίνη (όξινες, βασικές και γλυκοζυλιωμένες), κυστατίνες, ιστατίνες και σταθερίνες, αμυλάσες, ανθρακικές ανυδράσες και περοξιδάσες της σιέλου.

Επιπλέον από τα πρωτεϊνικά συστατικά η σιέλος περιέχει και μία μεγάλη ποικιλία από χαμηλού μοριακού βάρους ουσίες όπως αμινοξέα και ορμόνες.[25]

4.2 Φασματοσκοπικό Προφίλ Σιέλου

Στην παραπάνω ενότητα αναφέρεται η περιεκτικότητα της σιέλου καθιστώντας κατανοητό πως πρόκειται για ένα βιολογικό υγρό με αρκετά σύνθετη σύσταση. Ωστόσο από ένα φάσμα μπορούν να εξαχθούν ορισμένα συμπεράσματα λόγω των χαρακτηριστικών κορυφών σε συγκεκριμένες περιοχές συχνοτήτων. Στην παρακάτω εικόνα (4.2) σημειώνονται ορισμένες από τις χαρακτηριστικές κορυφές ενός φάσματος σιέλου και αναγράφονται οι χαρακτηριστικές ομάδες στις οποίες οφείλονται.



Εικόνα 4.2: Φασματοσκοπικό προφίλ Σιέλου

Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω επικυρωμένα φασματικά δεδομένα καθίσταται δυνατό, όπως πραγματοποιήθηκε στην συγκεκριμένη έρευνα, να διαπιστωθούν τυχόν διαφοροποιήσεις σε φάσματα σιέλου δύο και περισσότερων ομάδων ατόμων με ορισμένες διαφορές (στην συγκεκριμένη περίπτωση υγιών ατόμων και ατόμων που πάσχουν από καρκίνο του προστάτη).

5. Σκοπός της Παρούσα Ερευνητικής Εργασίας

Όπως προαναφέρθηκε ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί μια από τις συχνότερες μορφές καρκίνου που εμφανίζεται στον ανδρικό πληθυσμό και συνεπώς αποτελεί μία σοβαρή απειλή για την υγεία στην σύγχρονη κοινωνία. Ωστόσο η θνησιμότητα της συγκεκριμένης νόσου μπορεί να κρατηθεί σε ελεγχόμενα επίπεδα λόγω των εξελιγμένων μεθόδων θεραπείας αλλά κυρίως λόγω των μεθόδων έγκαιρης διάγνωσης.

Στις πρώτες ενότητες της συγκεκριμένης εργασίας αναφέρονται οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα για την διαγνωστική προσέγγιση του καρκίνου του προστάτη. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν τεχνικές όπως η δακτυλική εξέταση η ανίχνευση και ανάλυση καρκινικών δεικτών, την λήψη προστατικού υλικού για την βιοψία και άλλες μεθόδους με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (π.χ. διορθική υπερηχογραφία). Όπως προαναφέρθηκε όλες οι μέθοδοι έχουν συγκεκριμένα πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα που αφορούν κυρίως την ευαισθησία της εκάστοτε μέθόδου αλλά και των διάφορων προϋποθέσεων που μπορεί να ισχύουν για την εφαρμογή τους.

Στόχος λοιπόν της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας είναι η διερεύνηση της φασματοσκοπίας υπέρυθρου εξασθενημένης ολικής ανάκλισης (ATR-FTIR) σε βιολογικά δείγματα για την διάκριση υγιών ατόμων και ασθενών με καρκίνο του προστάτη ανάπτυξη. Αυτό πραγματοποιείται με την ανάπτυξη ενός αναλυτικού πρωτοκόλλου που να επιτρέπει την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη με το ελάχιστο δυνατό κόστος, στο ελάχιστο δυνατό χρονικό διάστημα και με την ελάχιστη δυνατή επιβάρυνση του ασθενούς. Η διαγνωστική μέθοδος που θα προκύψει θα αποτελεί συνεπώς μια πλήρως ανώδυνη, χωρίς κόστος και απαίτησης χρόνου διαδικασία μέσω της οποίας ο εκάστοτε εν δυνάμει ασθενής θα μπορεί να αποκτήσει μία εικόνα για την κατάσταση του, αναφορικά με το συγκεκριμένο είδος καρκίνου, και εν συνεχεία να προχωράει στις επόμενες απαραίτητες διαδικασίες. Αυτό πραγματοποιείται με την μελέτη του μεταβολικού προφίλ των ασθενών με καρκίνο του προστάτη ώστε να ανιχνευθούν οι μεταβολίτες οι οποίοι μπορεί να χαρακτηριστούν ως βιοδείκτες και να συμβάλλουν στην πρόωρη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη.

Για την πραγματοποίηση της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα σιέλου που συλλέχθηκαν από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη μέσω μιας πρωτότυπης μεθόδου δειγματοληψίας και στην συνέχεια τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν μέσω της τεχνικής Φασματοφωτόμετρίας Υπέρυθρου με Μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR). Δείγματα συλλέχθηκαν επίσης από υγιή άτομα με αντίστοιχα χαρακτηριστικά (φύλο, ηλικία, συνήθειες) και μέσω της σύγκρισης των δεδομένων των δύο ομάδων προέκυψαν τα συμπεράσματα της μελέτης.

Β. Πειραματικό Μέρος

6. Υλικά και Μέθοδοι

6.1 Συλλογή Δειγμάτων

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης, όπως προαναφέρθηκε, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα σιέλου από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη καθώς και δείγματα από υγιή άτομα με χαρακτηριστικά ανάλογα των ασθενών. Η δειγματοληψία έγινε σε συνεργασία με την ουρολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (ΠΓΝΙ), και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε από τους δειγματολήπτες και τους συμμετέχοντες βασίστηκε στην υπάρχουσα βιβλιογραφία και σε επιστημονικά δεδομένα.[27]



Εικόνα 6.1: Περιορισμοί πριν την δειγματοληψία

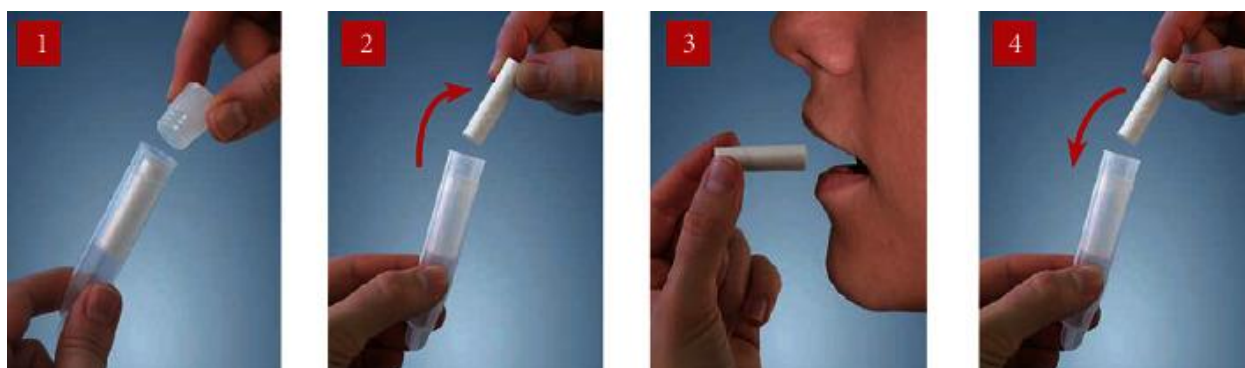
Συγκεκριμένα το πρωτόκολλο δειγματοληψίας περιλάμβανε τις εξής απαιτήσεις και περιορισμούς:

- **Το άτομο που θα δώσει το δείγμα σιέλου θα πρέπει:**
 - ✓ Να μην έχει φάει 8 ώρες πριν από την δειγματοληψία

- ✓ Να μην έχει καμία ενέργεια στοματικής υγιεινής (βούρτσισμα δοντιών, στοματικό διάλυμα) για τουλάχιστον 2 ώρες πριν την δειγματοληψία
- ✓ Να μην έχει καταναλώσει κάποιο ρόφημα (καφές, χυμός) 2 ώρες πριν την δειγματοληψία
- ✓ Να κάνει έκπλυση με νερό αμέσως πριν δώσει το δείγμα.

- **Ιδανικά 8:00 με 10:00 π.μ.**

Εφόσον διασφαλιστούν τα παραπάνω κριτήρια ακολουθεί η διαδικασία της παραλαβής του δείγματος από τους ασθενείς. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την εισαγωγή μέσα στην στοματική απορροφητικού υλικού το οποίο ο ασθενής κρατάει κάτω από την γλώσσα για περίπου ένα λεπτό. Το υλικό αυτό είναι απορροφητικά τούμπια με μακρόστενο μέγεθος (κυλινδρικό) από βαμβάκι. Εφόσον πραγματοποιηθεί η παραπάνω διαδικασία το απορροφητικό τούμπιο εισέρχεται άμεσα μέσα σε ειδικό σωλήνα φυγοκέντρωσης και η επεξεργασία του γίνεται εντός δύο ωρών από την παραλαβή του. Η ποσότητα σιέλου που συγκεντρώνεται στο υλικό για τον χρόνο που περιγράφεται παραπάνω είναι 10-15 mL.



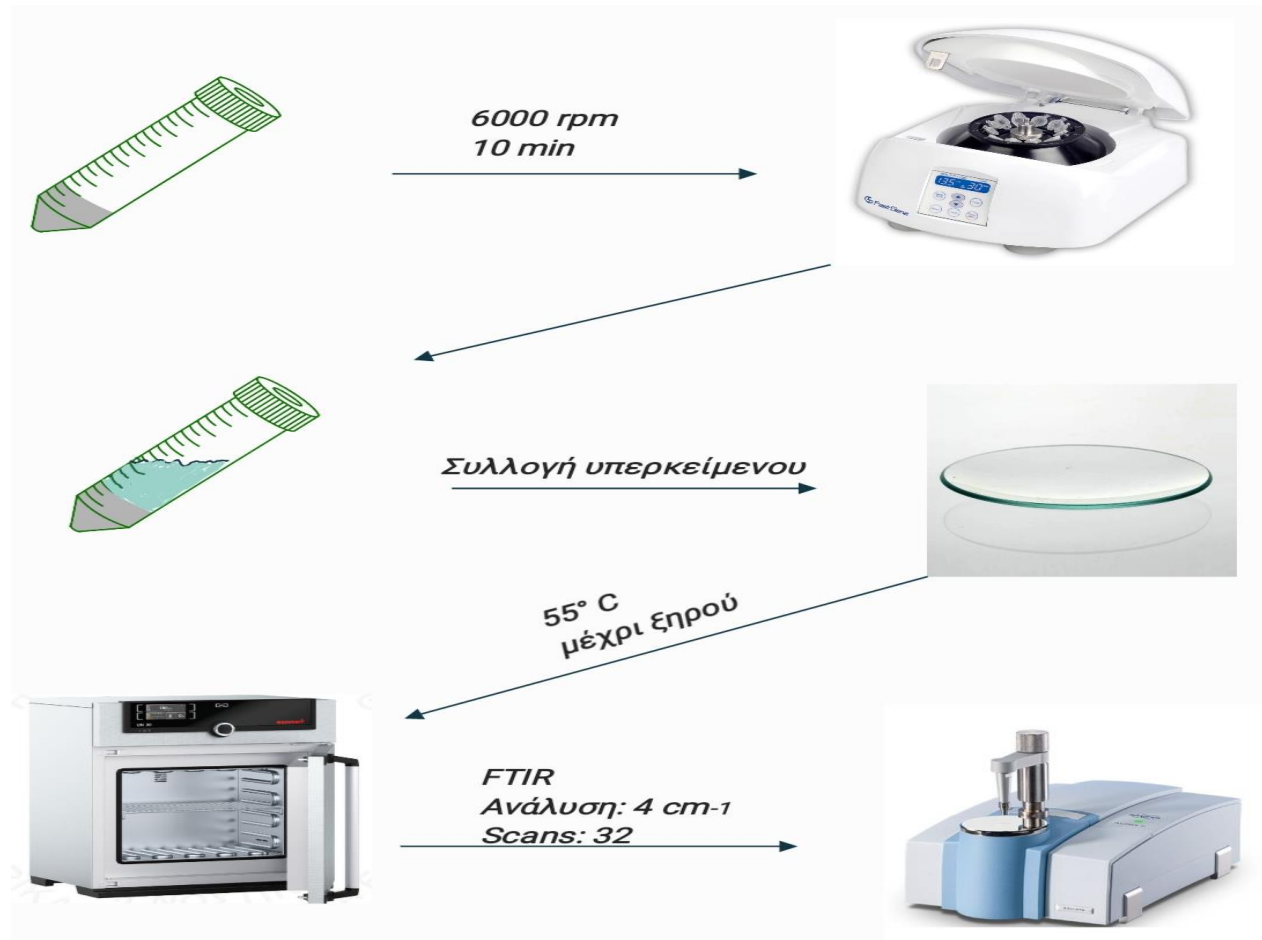
Εικόνα 6.2: Διαδικασία της δειγματοληψίας

6.2 Προετοιμασία Δειγμάτων

Το δείγμα σιέλου το οποίο παραλαμβάνεται πρέπει να υποστεί ορισμένες διαδικασίες επεξεργασίας ώστε να είναι κατάλληλο για περαιτέρω ανάλυση. Ορθή πρακτική αποτελεί οι διαδικασίες αυτές να πραγματοποιούνται εντός δύο ωρών από την λήψη του δείγματος. Οι διαδικασίες που ακολουθούνται πριν την μέτρηση του δείγματος στο ATR-FTIR είναι:

- Φυγοκέντρωση σε 6000 rpm για 10 min
- Συλλογή υπερκείμενου διαλύματος

- Τοποθέτηση του υπερκείμενου σε ύαλο ωρολογίου και έπειτα σε κλίβανο στους 55°C για την απομάκρυνση της υγρασίας (ξήρανση)
- Το στερεό υπόλειμμα συλλέγεται από την ύαλο και μεταφέρεται για μέτρηση στο FTIR



Εικόνα 6.3: Διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων

Οι παραπάνω διαδικασίες είναι απαραίτητες για την σωστή διεξαγωγή του αναλυτικού πρωτοκόλλου. Η φυγοκέντρηση είναι η πρώτη κατεργασία που υφίσταται το δείγμα. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για δύο βασικούς λόγους. Πρώτον το δείγμα σιέλου που έχει συγκεντρωθεί στο απορροφητικό υλικό, που εισήγαγε στο στόμα του ο ασθενής, πρέπει να διαχωριστεί κάτι το οποίο επιτυγχάνεται μέσω της συγκεκριμένης διαδικασίας. Στην συνέχεια ακολουθεί μια δεύτερη φυγοκέντρηση εφόσον έχει αφαιρεθεί το απορροφητικό υλικό (βαμβάκι). Η δεύτερη φυγοκέντρηση πραγματοποιείται ώστε τυχόν υπολείμματα τροφής που υπάρχουν στο δείγμα να αφαιρεθούν.

Μετά την φυγοκέντρηση και την συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος ακολουθεί ξήρανση του σε κλίβανο στους 55°C. Η ξήρανση αποσκοπεί επίσης σε δύο απαιτήσεις που υπάρχουν για το δείγμα. Αρχικά στον κρύσταλλο ATR, το δείγμα πρέπει να τοποθετηθεί για ανάλυση σε στερεή μορφή. Επιπλέον

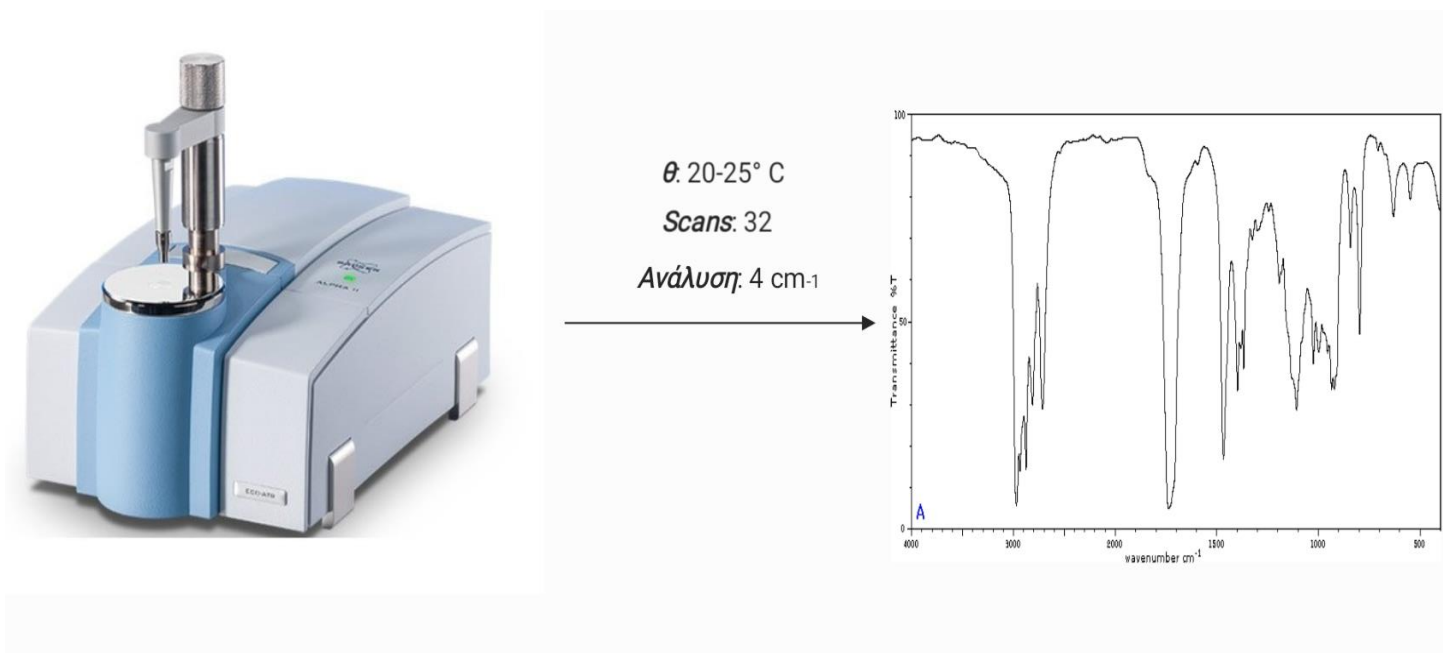
μέσω της διαδικασίας της ξήρανης αφαιρείται από το δείγμα η υγρασία, η οποία δρα παρεμποδιστικά κατά την ανάλυση του δείγματος και την λήψη των φασματικών του δεδομένων.

6.3 Ανάλυση με ATR-FTIR

6.3.1 Συνθήκες χρήσης του οργάνου

Οι συνθήκες με τις οποίες πραγματοποιήθηκε η λειτουργία του οργάνου (ATR-FTIR) προέκυψαν με βάση τις ανάγκες του πειράματος καθώς και τις συνθήκες που έχουν χρησιμοποιηθεί στην ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα παρακάτω αναγράφονται ενδεικτικές τιμές για τις διάφορες μεταβλητές που επηρεάζουν την διεξαγωγή του πειράματος:

- Περιοχή ανάλυσης: $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$
- Θερμοκρασία: $20\text{-}25^\circ\text{C}$ (θερμοκρασία δωματίου)
- Ποσότητα δείγματος: $\sim 0,5\text{ g}$ (αρκετή ώστε να καλυφθεί ο κρύσταλλος)
- Scans: 32
- Ανάλυση οργάνου: 4 cm^{-1}



Εικόνα 6.4: Συνθήκες λειτουργίας ATR-FTIR

7. Στατιστική Επεξεργασία

7.1 Ταξινόμηση δειγμάτων

Για την παρούσα ερευνητική εργασία, όπως προαναφέρθηκε, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από δύο κύριες διαφορετικές ομάδες ατόμων (άτομα με καρκίνο του προστάτη και υγιή άτομα προς την συγκεκριμένη νόσο. Ωστόσο υπάρχουν και επιπλέον παράγοντες οι οποίοι αξίζει να αναφερθούν και μπορεί να έχουν μικρό ή μεγάλο επιδραστικό ρόλο στην μορφή των φασμάτων κάθε δείγματος. Στον παρακάτω πίνακα γίνεται ταξινόμηση των δειγμάτων με βάση την κύρια ομαδοποίηση (ασθενείς-υγιείς) αλλά και δύο άλλων βασικών κατηγοριοποιήσεων, της ηλικίας και του καπνίσματος.

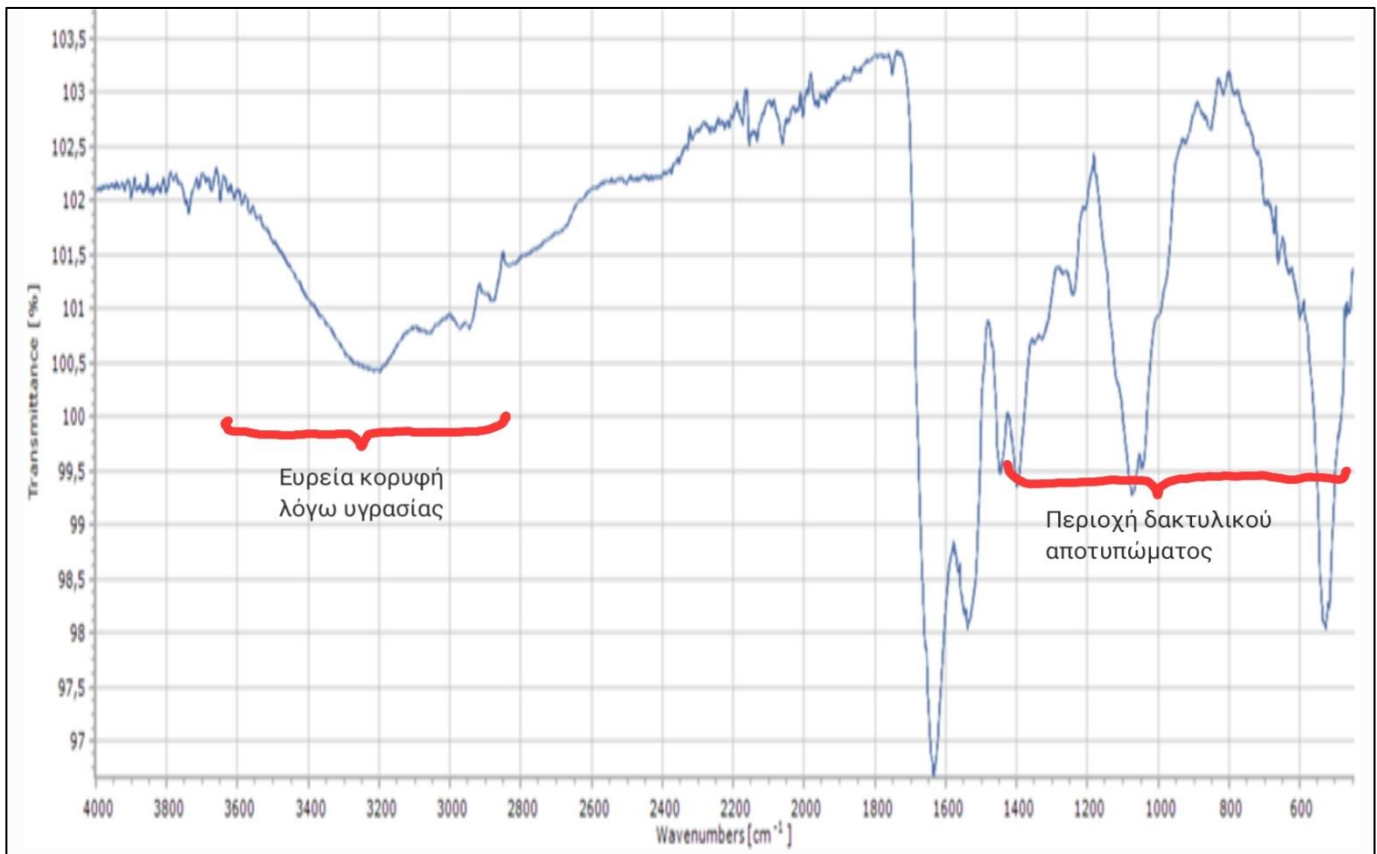
Πίνακας 7.1: Ταξινόμηση δειγμάτων της ερευνητικής εργασίας

Κωδ. Δείγματος	Καρκίνος του Προστάτη	Ηλικιακό group	Καπνιστής
P1	OXI	40-50	OXI
P2	OXI	40-50	OXI
P3	OXI	50-60	OXI
P4	OXI	50-60	OXI
P5	OXI	50-60	OXI
P6	OXI	50-60	NAI
P7	OXI	50-60	NAI
P8	OXI	50-60	OXI
P9	OXI	60-70	OXI
P10	OXI	60-70	OXI
P11	OXI	60-70	NAI
P12	OXI	60-70	NAI
P13	OXI	60-70	OXI
P14	OXI	70-80	NAI
P15	OXI	70-80	OXI
P16	NAI	50-60	OXI
P17	NAI	60-70	OXI
P18	NAI	60-70	OXI
P19	NAI	60-70	OXI
P20	NAI	60-70	OXI
P21	NAI	70-80	OXI
P22	NAI	70-80	OXI
P23	NAI	70-80	OXI
P24	NAI	70-80	OXI

7.2. Επεξεργασία Φασμάτων

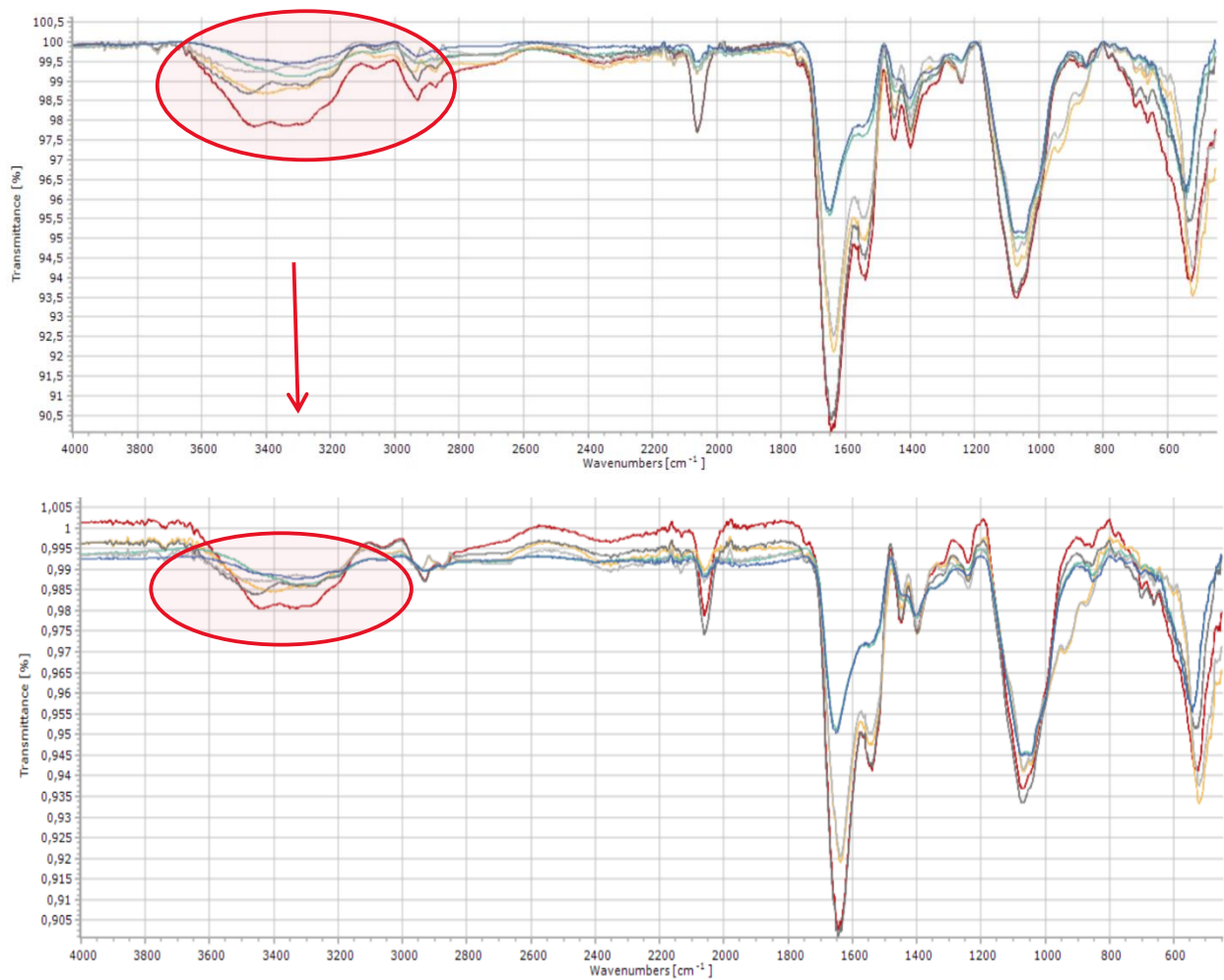
Τα Φάσματα τα οποία προκύπτουν από την ανάλυση στο ATR-FTIR περιέχουν την αναλυτική πληροφορία. Ανάλογα με τις διαφορετικές απορροφήσεις σε συγκεκριμένα μήκη κύματος μπορούν να προκύψουν διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα φάσματα των δειγμάτων με βάση τις οποίες γίνεται ο διαχωρισμός και η ταξινόμηση των ομάδων στην μεταβολομική ανάλυση.

Ωστόσο υπάρχουν περιοχές στα φάσματα οι οποίες μπορεί να δρουν παρεμποδιστικά για την εξαγωγή της πληροφορίας και των συμπερασμάτων. Οι περιοχές αυτές αφορούν κυρίως την περιοχή 3100-3600 όπου μπορεί να υπάρχουν ευρείες κορυφές απορρόφησης που οφείλονται στην παρουσία υγρασίας στο δείγμα.



Εικόνα 7.1: Φάσμα δείγματος χωρίς επεξεργασία όπου φαίνεται η περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος καθώς και η περιοχή 3000-3600 όπου εμφανίζεται ευρεία κορυφή λόγω της παρουσίας υγρασίας στο δείγμα

Για να πραγματοποιηθεί εγκυρότερη στατιστική επεξεργασία οι απορροφήσεις που οφείλονται στην παρουσία υγρασίας θα πρέπει να μην λαμβάνονται υπ' όψη από το πρόγραμμα στατιστική επεξεργασίας. Για αυτόν τον λόγο πραγματοποιείται μια διαδικασία κανονικοποίησης των φασμάτων όπως φαίνεται στην Εικόνα 7.2.



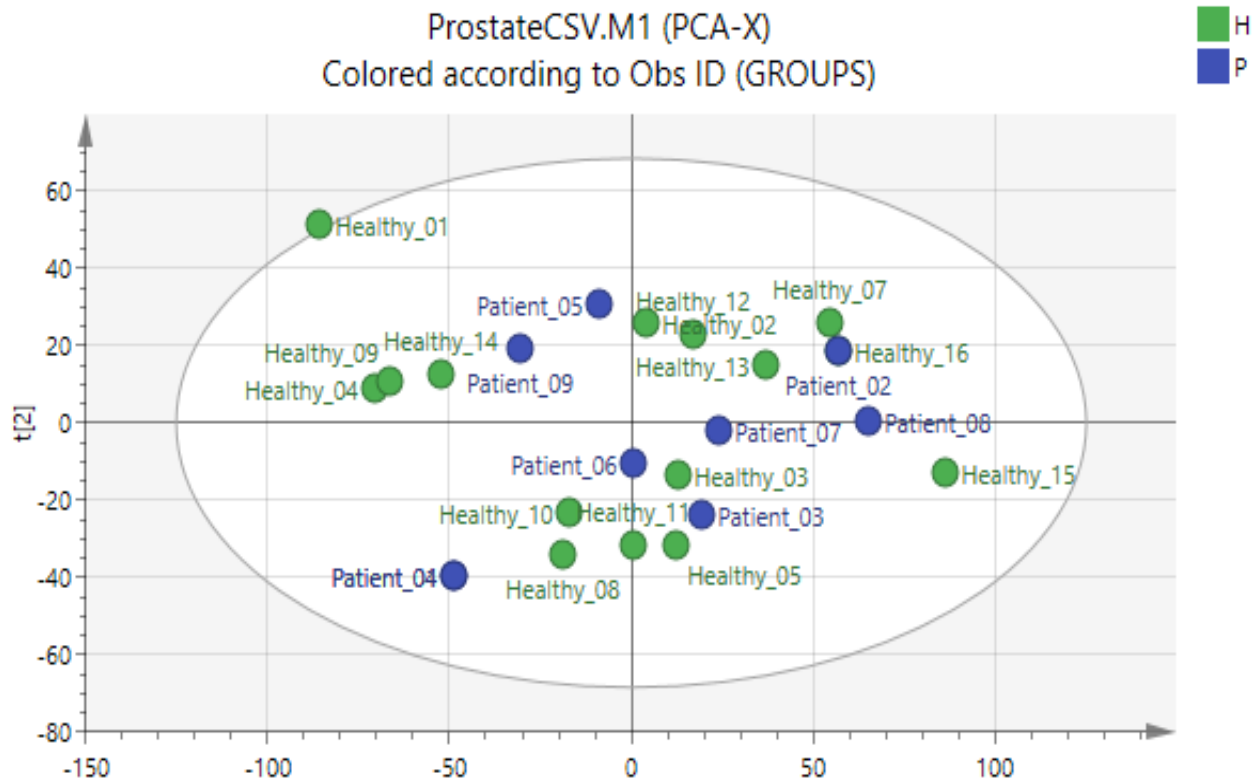
Εικόνα 7.2: Κανονικοποίηση των φασμάτων στην περιοχή όπου υπάρχουν παρεμποδίσεις λόγω της υγρασίας που περιέχει κάθε δείγμα

7.3. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων των φασμάτων

Τα φάσματα περιέχουν την αναλυτική πληροφορία μέσω της οποίας υπάρχει πιθανότητα να διαχωριστούν τα δείγματα των ασθενών και υγιών ατόμων. Τα πρωτογενή δεδομένα αφού λήφθηκαν από το πρόγραμμα επεξεργασίας των φασμάτων (SpectraGryph) ως raw data στην συνέχεια μέσω κατάλληλης επεξεργασίας μετατράπηκαν σε έναν πίνακα δεδομένων συμβατό με το πρόγραμμα στατιστικής επεξεργασίας (SIMCA και MetaboAnalyst).

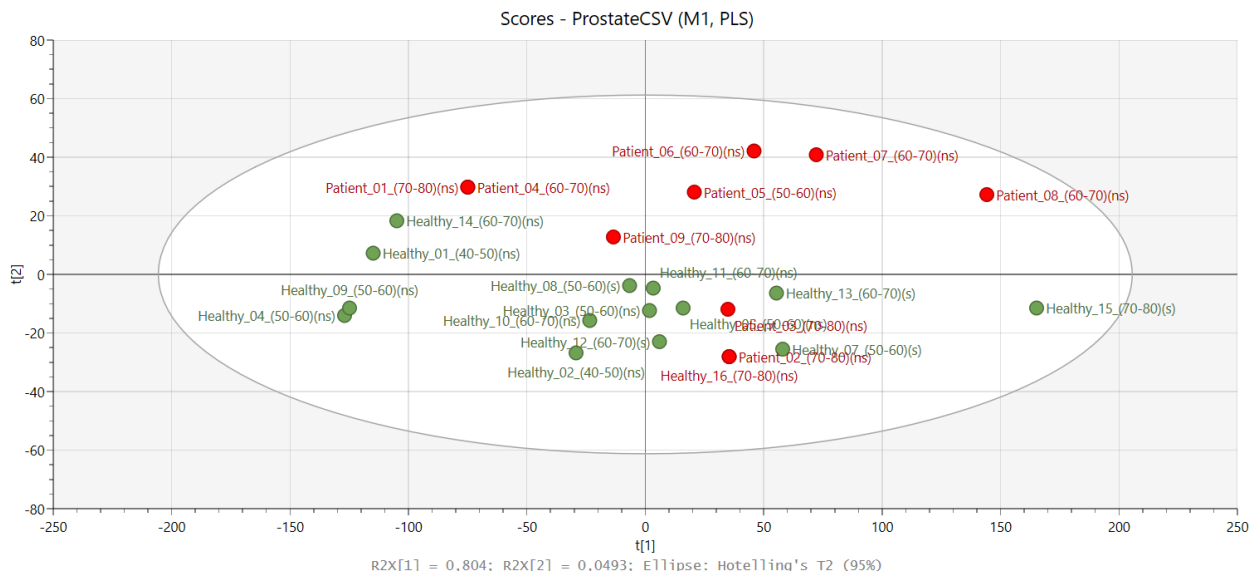
Το πρόγραμμα συλλέγει τα δεδομένα του πίνακα και μέσω της μεθοδολογίας της μεταβολομικής ανάλυσης, όπως έχει αναλυθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, μας δίνει σχηματικά την ταξινόμηση των δεδομένων ώστε να καταστεί δυνατός ο διαχωρισμός τους.

Σε πρώτο στάδιο εφαρμόστηκε η μέθοδος της PCA (Principal Component Analysis) που, όπως προαναφέρθηκε αποτελεί μια μη επιβλεπόμενη μέθοδο (τα δεδομένα διαχωρίζονται ανεξάρτητα με την ομαδοποίηση που έχει γίνει), και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην εικόνα 7.3.



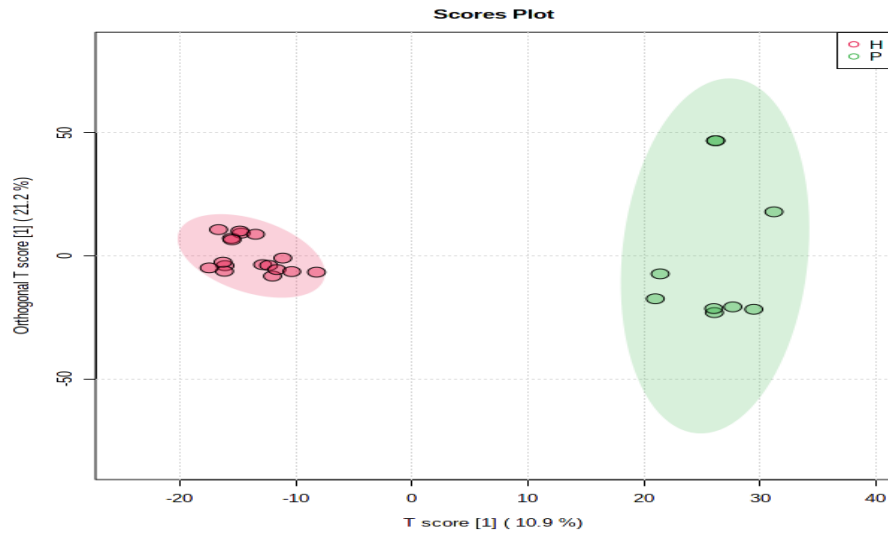
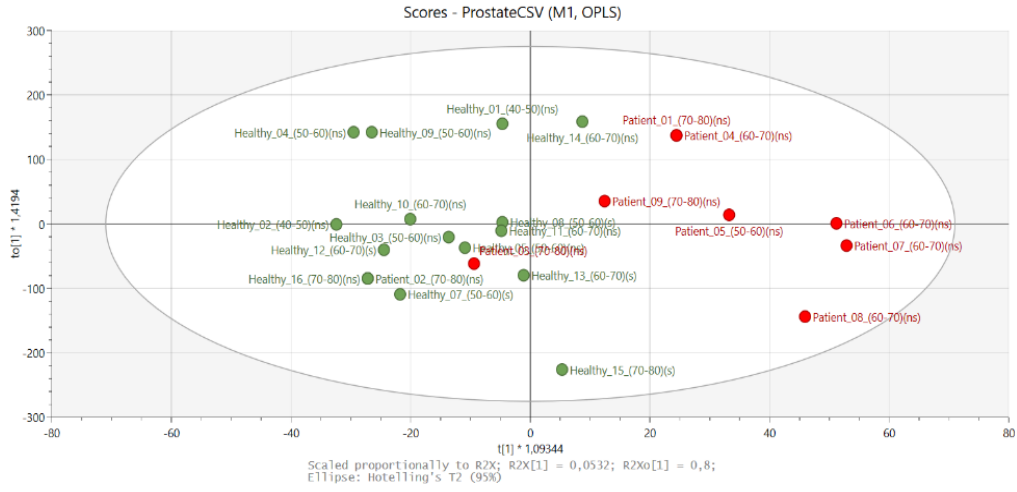
Εικόνα 7.3: Διάγραμμα PCA των δειγμάτων όπου τα δείγματα των υγιών ατόμων φαίνονται με πράσινο χρώμα και τα δείγματα των ασθενών με καρκίνο του προστάτη με μπλε χρώμα.

Έπειτα ακολούθησε η μέθοδος PLS-DA στην οποία ο διαχωρισμός μεταξύ των δειγμάτων των υγιών και των ασθενών ατόμων είναι περισσότερο διακριτός.



Εικόνα 7.4: Διάγραμμα PLS-DA όπου οι ασθενείς είναι χρωματισμένοι με πράσινο χρώμα και οι υγιείς με κόκκινο, ενώ είναι χρωματισμένες και οι περιοχές στις οποίες φαίνεται να υπάρχει διαχωρισμός μεταξύ των δύο ομάδων των δειγμάτων

Με την ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και η O-PLSDA (Ortho-PLS-DA) στην οποία ο διαχωρισμός των δύο ομάδων είναι περισσότερο εμφανής απ' ό τι στις δύο προηγούμενες μεθόδους.



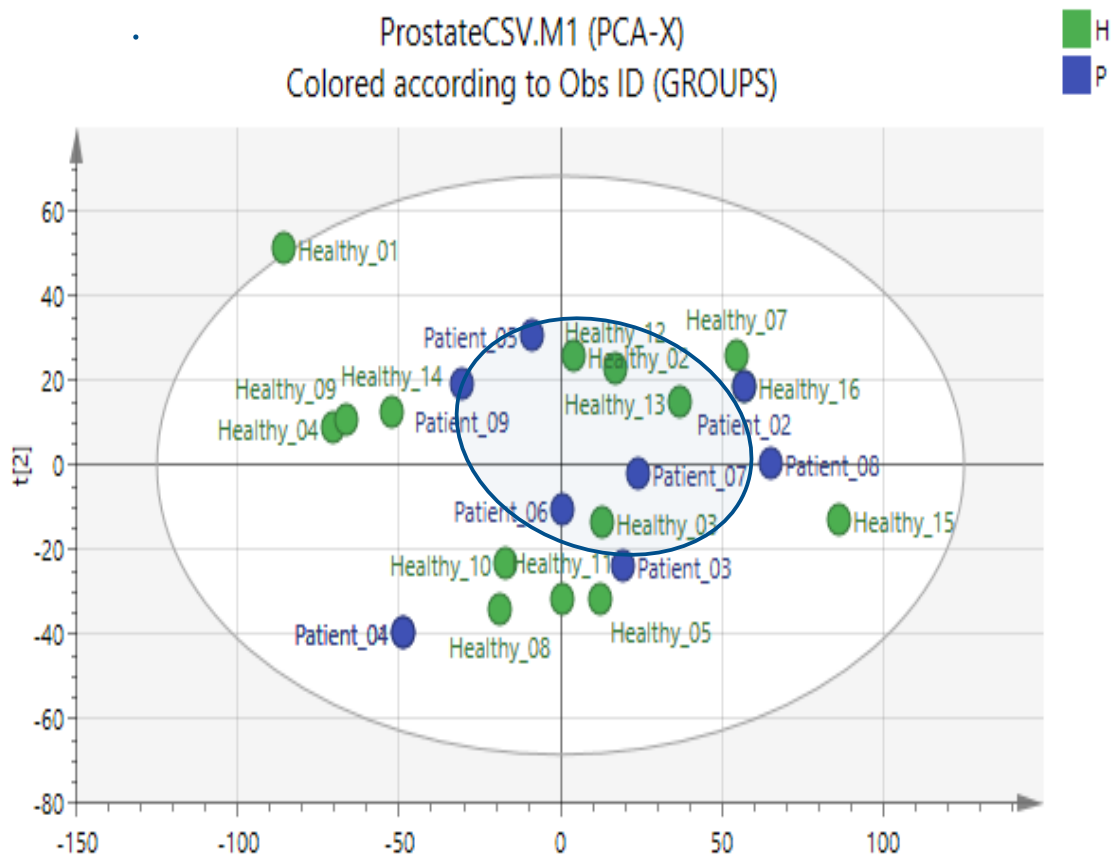
Εικόνα 7.5 Πάνω: Διάγραμμα OPLS-DA μέσω του λογισμικού SIMCA (με πρασινο χρώμα τα δείγματα των υγιών και με κόκκινο τα δείγματα των ατόμων με κακίνο του προστάτη. Κάτω: Διάγραμμα OPLS-DA μέσω του λογισμικού MetaboAnalyst, όπου με κόκκινο χρωματίζονται τα δείγματα των υγιών και με πράσινο χρώμα τα δείγματα των ασθενών.

Στο επόμενο κεφάλαιο αναλύονται τα δεδομένα των παραπάνω διαγραμμάτων και προκύπτουν τα συμπεράσματα καθώς και προτάσεις για την βελτίωση και την εξέλιξη της παρούσα μελέτης.

8. Αποτελέσματα και συζήτηση

8.1. Ανάλυση των διαγραμμάτων της στατιστικής επεξεργασίας

- PCA:



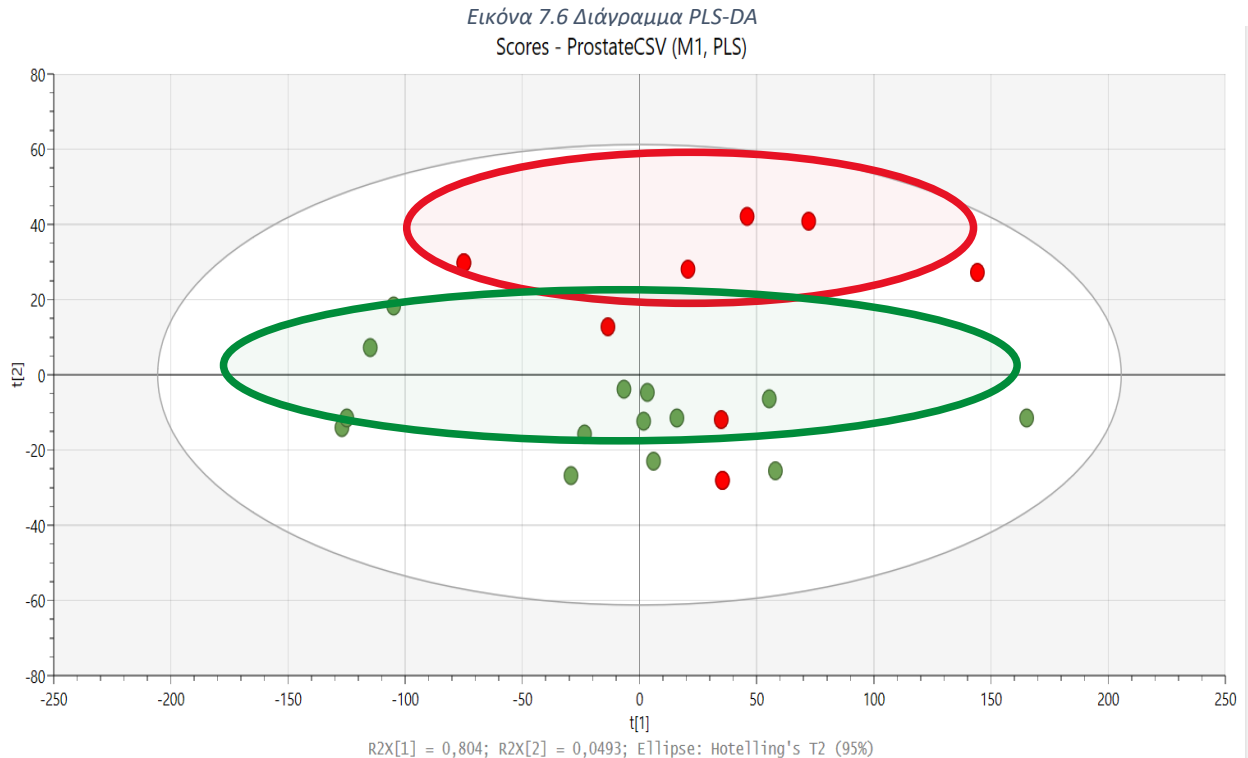
Εικόνα 7.6 Διάγραμμα PCA

Τα δείγματα στο διάγραμμα της PCA είναι κατανομημένα με τέτοιο τρόπο ώστε ο διαχωρισμός των δύο ομάδων να μην καθίσταται σαφής στον επιθυμητό βαθμό. Ωστόσο παρατηρείται συγκέντρωση των δειγμάτων των ασθενών στο κέντρο του διαγράμματος κάτι το οποίο όπως θα αναλυθεί στην συνέχεια πιθανώς να επιτρέπει τον καλύτερο διαχωρισμό τους μέσω των επόμενων επιβλεπόμενων μεθόδων.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον διαχωρισμό των δύο ομάδων δειγμάτων μέσω της PCA είναι πολυάριθμοι και πιθανώς οφείλονται στην πολυπλοκότητα της σιέλου ως βιολογικό δείγμα καθώς και στα διάφορα χαρακτηριστικά των ατόμων τα οποία συμμετείχαν στην έρευνα (κάπνισμα, διαφορετικές συνήθειες, διατροφή κλπ.).

Ωστόσο δεν παρατηρείται, επίσης, σημαντική συγκέντρωση των δειγμάτων των καπνιστών σε κάποια συγκεκριμένη περιοχή, γεγονός που υποδεικνύει πως τα δείγματα διαχωρίζονται με βάση χαρακτηριστικά της σιέλου τους που δεν έχουν σημαντική εξάρτηση από τους μεταβολίτες που προκύπτουν από έναν οργανισμό που καπνίζει συστηματικά.

- PLS-DA

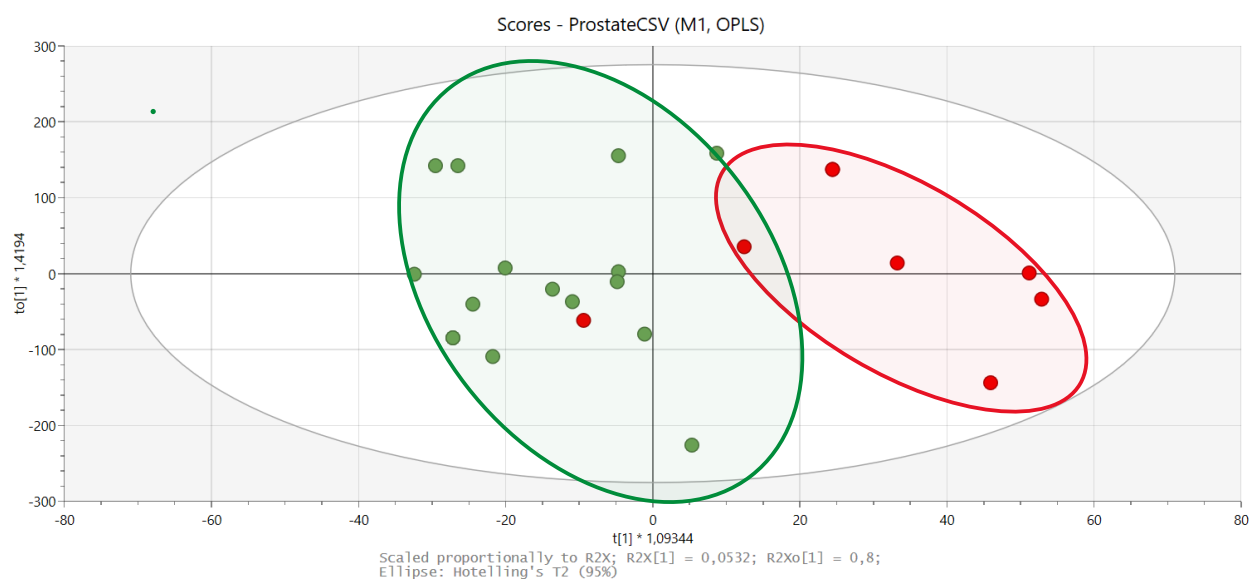


Στο διάγραμμα της PLS-DA η εικόνα είναι διαφορετική και ο διαχωρισμός μεταξύ των δύο ομάδων των δειγμάτων καθίσταται πλέον δυνατός. Όπως παρατηρείται στο διάγραμμα με εξαίρεση ενός δείγματος υγιούς ατόμου, όλα τα δείγματα της ομάδας των υγιών συγκεντρώνονται σε μια συγκεκριμένη περιοχή του διαγράμματος και μπορούν πλέον να διαχωριστούν από την ομάδα των ατόμων με καρκίνο του προστάτη.

Ο διαχωρισμός αυτός αποτελεί στην ουσία το ζητούμενο της συγκεκριμένης έρευνας και πιθανώς καθίσταται δυνατός μέσω της συγκεκριμένης επιβλεπόμενης μεθόδου καθώς τα δείγματα των δύο ομάδων διαφέρουν σε πολύ συγκεκριμένα σημεία (στο φάσμα απορρόφησης IR) και όπως είδαμε προηγουμένως δεν ήταν δυνατός ο διαχωρισμός μέσω της PCA.

- OPLS-DA

Ο διαχωρισμός καθίσταται ακόμη περισσότερο δυνατός όταν η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την στατιστική επεξεργασία είναι η OPLS-DA. Στο διάγραμμα που παρατίθεται παρακάτω φαίνονται με σαφή και διακριτά όρια οι δύο περιοχές στις οποίες κατανέμονται τα δείγματα των δύο ομάδων:



Με την μέθοδο OPLS-DA λοιπόν, ο διαχωρισμός των δύο ομάδων των δειγμάτων μπορεί να γίνει σε ικανοποιητικό βαθμό και οι ασθενείς με καρκίνο του προστάτη μπορούν συνεπώς να διαχωριστούν από αυτούς οι οποίοι είναι υγιείς.

8.2 Συμπεράσματα

Όπως προαναφέρθηκε η παρούσα ερευνητική εργασία έθεσε ως στόχο την ανάπτυξη ενός απλού σύγχρονου, καινοτόμου και οικονομικού αναλυτικού πρωτοκόλλου για την ανίχνευση του καρκίνου του προστάτη. Η μελέτη δεν έχει ως κύριο σκοπό να αντικαταστήσει τις ήδη υπάρχουσες αξιόπιστες τεχνικές αλλά να προσθέσει μια ακόμα μεθοδολογία με, μικρό κόστος και λιγότερες απαιτήσεις.

Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στην ανάπτυξη μιας απλής και ανώδυνης διαδικασίας δειγματοληψίας η οποία έχει χαμηλό κόστος και δεν απαιτεί ιδιαίτερη προετοιμασία για τον ασθενή. Με αυτόν τον τρόπο η ενδεχόμενη εξέταση δεν θα απαιτεί αφενός χρόνο και οποιουδήποτε είδους ταλαιπωρία από τον εν δυνάμει ασθενή και αφετέρου δεν θα κοστίζει ακριβά σε αναλώσιμα αλλά και χρόνο εργασίας.

Επιπλέον η αναλυτική διαδικασία θα έπρεπε να είναι εξίσου απλή και χωρίς ιδιαίτερο κόστος ώστε να συμπληρώνει με τον κατάλληλο τρόπο την απλή διαδικασία της δειγματοληψίας. Όπως προαναφέρθηκε η τεχνική ATR-FTIR αποτελεί μια από τις ιδανικές μεθόδους για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης και οι υπόλοιπες συμπληρωματικές τεχνικές επίσης συμφωνούν με τις

απαιτήσεις.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή της μεθόδου είχαν την μορφή φασμάτων υπέρυθρου και προφανώς δεν μπορούσε να γίνει ικανοποιητική και τεκμηριωμένη επεξεργασία τους σε αυτήν τους την μορφή (raw data). Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν εργαλεία στατιστικής ανάλυσης με διαφορετικό βαθμό επίβλεψης κάθε φορά (PCA, PLS-DA, OPLS-DA). Μέσω των συγκεκριμένων μεθόδων τα στοιχεία που προέκυψαν από την αρχική ανάλυση άλλαξαν μορφή και οπτικοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση είναι:

- Από το διάγραμμα της PCA δεν προκύπτει εμφανής διαχωρισμός αλλά τα δείγματα των ασθενών εμφανίζονται κυρίως στο κέντρο του διαγράμματος.
- Ο Διαχωρισμός μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τα αποτελέσματα των μετοβολομικών αναλύσεων καθώς τα δείγματα διασπείρονται με τρόπο που δείχνει να είναι ανεξάρτητος από το χαρακτηριστικό αυτό.
- Οι επιβλεπόμενες μέθοδοι (PLS-DA, OPLS-DA) επιτρέπουν τον καλύτερο διαχωρισμό των δύο ομάδων δειγμάτων, κάτι το οποίο αναμένεται λόγω της μεθοδολογίας των τεχνικών αυτών.
- Το διάγραμμα της PLS-DA πετυχαίνει σε κάποιο βαθμό τον διαχωρισμό των δύο ομάδων αφού τα δείγματα των ασθενών συγκεντρώνονται στο πάνω μέρος του διαγράμματος ενώ αυτά των ασθενών στο κάτω
- Με την OPLS-DA ο διαχωρισμός είναι σαφής και τα δείγματα των δύο ομάδων βρίσκονται σε διαφορετικές περιοχές του διαγράμματος.

8.3 Προοπτικές και εξέλιξη

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας όπως παρουσιάζονται στις παραπάνω ενότητες δείχνουν πως ο διαχωρισμός δειγμάτων υγιών ατόμων από δείγματα ατόμων με καρκίνο του προστάτη είναι εφικτός. Ωστόσο με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων το συμπέρασμα αυτό θα μπορούσε να ενισχυθεί και η στατιστική ανάλυση να παρέχει επιπλέον αποτελέσματα.

Η ανάπτυξη του συγκεκριμένου μοντέλου όπως προαναφέρθηκε είχε ως σκοπό την ανίχνευση ενδείξεων που σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη. Συγκεκριμένα μια προτεινόμενη μέθοδος είναι ο συνδυασμός του παρόντος πρωτοκόλλου με κάποια από τις πλέον αξιόπιστες τεχνικές για την εξακρίβωση της νόσου σε κάποιον εν δυνάμει ασθενή. Ουσιαστικά η συγκεκριμένη μεθοδολογία ενδείκνυται να εφαρμοστεί ώστε να εξακριβωθεί εάν υπάρχει λόγος ο εν δυνάμει ασθενής να προβεί σε εξετάσεις με μεγαλύτερο κόστος και απαιτήσεις εφόσον ο ίδιος έχει ενδείξεις που συνδέονται με τον καρκίνο του προστάτη που ανιχνεύθηκαν μέσω του αναλυτικού πρωτοκόλλου που αναπτύχθηκε από την παρούσα ερευνητική εργασία.

Τέλος, για την εξέλιξη της παρούσας έρευνας, ενισχύοντας επίσης το θεωρητικό της υπόβαθρο, η τεχνική της ATR-FTIR μπορεί να συνδυαστεί με περισσότερο ευαίσθητες τεχνικές όπως είναι η χρωματογραφία σε συνδυασμό με την φασματοσκοπία μάζας ώστε να ανιχνευτούν με ακρίβεια οι μεταβολίτες στους οποίους ευθύνονται οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται. Με τον τρόπο αυτό όχι μόνο θα επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης αλλά θα εξαχθούν

επιπλέον συμπεράσματα για την φύση της ίδιας της ασθένειας, θέτοντας έτσι τις βάσεις για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της.

9. Βιβλιογραφία

1. Moore K. L., «**Κλινική Ανατομία 2η Έκδοση**», Εκδόσεις BROKEN HILL PUBLISHES, 2012
2. Τουλουπίδης Σταύρος, «**Ουρολογία, Τόμος Α**», Εκδόσεις ΤΖΙΟΛΑ, 2005
3. ΜΑΡΙΑ Θ. ΣΙΑΜΠΑΝΟΠΟΥΛΟΥ, «**Η διερεύνηση των παραγόντων αύξησης και αγγειογένεσης σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη με ή χωρίς οστικές μεταστάσεις. Συσχέτιση με καρκινικούς δείκτες και απεικονιστικά ευρήματα.**», Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη 2014.
4. Nefzger, M D, L H Kuller, A M Lilienfeld, E L Diamond, G D Miller, P D Stolley, και S Tonascia. '**Three-Area Epidemiological Study of Geographic Differences in Stroke Mortality. I. Background and Methods.**' *Stroke* 8, τχ. 5 (Σεπτέμβριος 1977): 546–50. <https://doi.org/10.1161/01.STR.8.5.546>.
5. AMERICAN UROLOGICAL ASSOCIATION, Vol. 170, 530 –547, August 2003 THE JOURNAL OF UROLOGY® Printed in U.S.A. «**AUA Guideline on Management of Benign Prostatic Hyperplasia (2003). Chapter 1: Diagnosis and Treatment Recommendations**»
6. Zilli, Thomas, Vérane Achard, Alan Dal Pra, Nina Schmidt-Hegemann, Barbara Alicja Jereczek-Fossa, Andrea Lancia, Gianluca Ingrosso, κ.ά. '**Recommendations for Radiation Therapy in Oligometastatic Prostate Cancer: An ESTRO-ACROP Delphi Consensus**'. *Radiotherapy and Oncology* 176 (Νοέμβριος 2022): 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2022.10.005>.
7. Gasmi, Amin, Geir Bjørklund, Sadaf Noor, Yuliya Semenova, Alexandru Dosa, Joeri J. Pen, Alain Menzel, Salva Piscopo, Nicolas Wirth, και Daniel-Ovidiu Costea. '**Nutritional and Surgical Aspects in Prostate Disorders**'. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 12 Ιανουάριος 2022, 1–17. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2013158>.
8. T. Theophanides, **Introduction to Infrared Spectroscopy. Infrared Spectroscopy. Materials Science, Engineering and Technology.** T. Theophanides (Ed.), InTech, Available from:<http://www.intechopen.com/books/infrared-spectroscopy-materials-science-engineering-andtechnology>, pp. 1-10, 2002.
9. Α. Βαλαβανίδης. **Βασικές αρχές μοριακής φασματοσκοπίας και εφαρμογές στην οργανική χημεία.** Εκδόσεις Σύγχρονα Θέματα μη Άερδοσκοπική Εκδοτική Εταιρία, Αθήνα, 2008.
10. B. Stuart, **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications.** ATTS-Analytical Techniques in the Sciences Series. ISBN: 978-0-470-85428-0, 2004.
11. Kazarian, S.G., και K.L.A. Chan. '**Applications of ATR-FTIR Spectroscopic Imaging to Biomedical Samples**'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758, τχ. 7 (Ιούλιος 2006): 858–67. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.011>.
12. Sarroukh, Rabia, Erik Goormaghtigh, Jean-Marie Ruyschaert, και Vincent Raussens. '**ATR-FTIR: A "Rejuvenated" Tool to Investigate Amyloid Proteins**'. *Biochimica et*

- Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1828, τχ. 10 (Οκτώβριος 2013): 2328–38.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.012>.
13. Sánchez-Brito, Miguel, Francisco J. Luna-Rosas, Ricardo Mendoza-González, Mónica M. Mata-Miranda, Julio C. Martínez-Romo, και Gustavo J. Vázquez-Zapién. **'A Machine-Learning Strategy to Evaluate the Use of FTIR Spectra of Saliva for a Good Control of Type 2 Diabetes'**. Talanta 221 (Ιανουάριος 2021): 121650.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121650>.
 14. Rodrigues, Laís Morandini, Taciana Deprá Magrini Alva, Herculano da Silva Martinho, και Janete Dias Almeida. **'Analysis of Saliva Composition in Patients with Burning Mouth Syndrome (BMS) by FTIR Spectroscopy'**. Vibrational Spectroscopy 100 (Ιανουάριος 2019): 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2018.12.002>.
 15. Bel'skaya, Lyudmila V., Elena A. Sarf, Denis V. Solomatin, και Victor K. Kosenok. **'Analysis of the Lipid Profile of Saliva in Ovarian and Endometrial Cancer by IR Fourier Spectroscopy'**. Vibrational Spectroscopy 104 (Σεπτέμβριος 2019): 102944.
<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2019.102944>.
 16. Ferreira, Izabella C. C., Emília M. G. Aguiar, Alinne T. F. Silva, Leticia L. D. Santos, Léia Cardoso-Sousa, Thaise G. Araújo, Donizeti W. Santos, Luiz R. Goulart, Robinson Sabino-Silva, και Yara C. P. Maia. **'Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis'**. Journal of Oncology 2020 (10 Φεβρουάριος 2020): 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2020/4343590>.
 17. Bijlsma, Sabina, Ivana Bobeldijk, Elwin R. Verheij, Raymond Ramaker, Sunil Kochhar, Ian A. Macdonald, Ben van Ommen, και Age K. Smilde. **'Large-Scale Human Metabolomics Studies: A Strategy for Data (Pre-) Processing and Validation'**. Analytical Chemistry 78, τχ. 2 (1 Ιανουάριος 2006): 567–74.
<https://doi.org/10.1021/ac051495j>.
 18. Hollywood, Katherine, Daniel R. Brison, και Royston Goodacre. **'Metabolomics: Current Technologies and Future Trends'**. PROTEOMICS 6, τχ. 17 (Σεπτέμβριος 2006): 4716–23. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600106>.
 19. Álvarez-Sánchez, B., F. Priego-Capote, και M.D. Luque de Castro. **'Metabolomics Analysis I. Selection of Biological Samples and Practical Aspects Preceding Sample Preparation'**. TrAC Trends in Analytical Chemistry 29, τχ. 2 (Φεβρουάριος 2010): 111–19. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.12.003>.
 20. Bijlsma, Sabina, Ivana Bobeldijk, Elwin R. Verheij, Raymond Ramaker, Sunil Kochhar, Ian A. Macdonald, Ben van Ommen, και Age K. Smilde. **'Large-Scale Human Metabolomics Studies: A Strategy for Data (Pre-) Processing and Validation'**. Analytical Chemistry 78, τχ. 2 (1 Ιανουάριος 2006): 567–74.
<https://doi.org/10.1021/ac051495j>.
 21. Brown, Marie, Warwick B. Dunn, David I. Ellis, Royston Goodacre, Julia Handl, Joshua D. Knowles, Steve O'Hagan, Irena Spasić, και Douglas B. Kell. **'A Metabolome Pipeline: From Concept to Data to Knowledge'**. Metabolomics 1, τχ. 1 (Μάρτιος 2005): 39–51. <https://doi.org/10.1007/s11306-005-1106-4>.

22. Barnes, Stephen, H. Paul Benton, Krista Casazza, Sara J. Cooper, Xiangqin Cui, Xiuxia Du, Jeffrey Engler, κ.ά. **'Training in Metabolomics Research. II. Processing and Statistical Analysis of Metabolomics Data, Metabolite Identification, Pathway Analysis, Applications of Metabolomics and Its Future: Interpreting Data from a Metabolomics Experiment'**. *Journal of Mass Spectrometry* 51, τχ. 8 (Αύγουστος 2016): 535–48. <https://doi.org/10.1002/jms.3780>.
23. Abdi, Hervé, και Lynne J. Williams. **'Principal Component Analysis: Principal Component Analysis'**. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics* 2, τχ. 4 (Ιούλιος 2010): 433–59. <https://doi.org/10.1002/wics.101>.
24. Proctor, Gordon B. **'The Physiology of Salivary Secretion'**. *Periodontology* 2000 70, τχ. 1 (Φεβρουάριος 2016): 11–25. <https://doi.org/10.1111/prd.12116>.
25. Zhang, Aihua, Hui Sun, Ping Wang, Ying Han, και Xijun Wang. **'Recent and Potential Developments of Biofluid Analyses in Metabolomics'**. *Journal of Proteomics* 75, τχ. 4 (Φεβρουάριος 2012): 1079–88. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.10.027>.
26. Sala, Alexandra, David J. Anderson, Paul M. Brennan, Holly J. Butler, James M. Cameron, Michael D. Jenkinson, Christopher Rinaldi, Ashton G. Theakstone, και Matthew J. Baker. **'Biofluid Diagnostics by FTIR Spectroscopy: A Platform Technology for Cancer Detection'**. *Cancer Letters* 477 (Μάιος 2020): 122–30. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.02.020>.
27. Bel'skaya, Lyudmila V., Victor K. Kosenok, και Elena A. Sarf. **'Chronophysiological Features of the Normal Mineral Composition of Human Saliva'**. *Archives of Oral Biology* 82 (Οκτώβριος 2017): 286–92. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.06.024>.
28. Rodrigues, Laís Morandini, Taciana Deprá Magrini, Celina Faig Lima, Jaqueline Scholz, Herculano da Silva Martinho, και Janete Dias Almeida. **'Effect of Smoking Cessation in Saliva Compounds by FTIR Spectroscopy'**. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 174 (Μάρτιος 2017): 124–29. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.11.009>.