



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ
ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΓΝΑΘΟΠΡΟΣΩΠΙΚΗ**

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ
ΤΟΥ ΒΑΝΑΔΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ
ΣΑΡΚΩΜΑΤΩΝ»**

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΕΥΘ. ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ-ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΟΣ
ΣΤΟΜΑΤΙΚΟΣ & ΓΝΑΘΟΠΡΟΣΩΠΙΚΟΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ
ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΓΝΑΘΟΠΡΟΣΩΠΙΚΗ**

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ
ΤΟΥ ΒΑΝΑΔΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ
ΣΑΡΚΩΜΑΤΩΝ»**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΕΥΘ. ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ-ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΟΣ
ΣΤΟΜΑΤΙΚΟΣ & ΓΝΑΘΟΠΡΟΣΩΠΙΚΟΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202,
παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης του κ. Παπαναστασίου Γεωργίου: 20-9-2012

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 747^α/31-1-2013

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ράγκος Βασίλειος, Επίκουρος Καθηγητής Γναθοπροσωπικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Καστανιουδάκης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ωτορινολαρυγγολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Καλφακάκου Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 10-4-2013

«Επίδραση κυτταροτοξικών δράσεων συμπλόκων του βαναδίου στην ανάπτυξη κυτταρικών σειρών σαρκωμάτων»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 818^α/7-7-2017

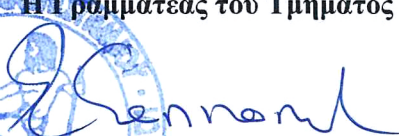
Ευαγγέλου Άγγελος	Ομότιμος Καθηγητής Φυσιολογίας, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Καλφακάκου Βασιλική	Καθηγήτρια Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Καρκαμπούνας Σπυρίδων	Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Καστανιουδάκης Ιωάννης	Αναπληρωτής Καθηγητής Ωτορινολαρυγγολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Μήτσης Μιχαήλ	Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Πέσχος Δημήτριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κυτταρική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Ράγκος Βασίλειος	Επίκουρος Καθηγητής Γναθοπροσωπικής, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 31-1-2018

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Στους Γονείς μου

Στη Γυναίκα μου και στα Παιδιά μου

Πρόλογος

Η ανακάλυψη νέων φαρμάκων κατά του καρκίνου απασχολεί τους επιστήμονες εδώ και πολλές δεκαετίες. Χιλιάδες πειράματα, παρατηρήσεις και μελέτες έχουν γίνει προκειμένου να σχεδιαστούν αντικαρκινικά φάρμακα για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Ορόσημο στην ιστορία της Ιατρικής αποτέλεσε η ανακάλυψη το 1968 της Σισπλατίνης, ενός συμπλόκου λευκόχρυσου, από τον Dr Barnett Rosenberg του Πανεπιστημίου του Μίτσιγκαν. Η σισπλατίνη έδωσε το έναυσμα για τη σύνθεση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων, χρησιμοποιώντας μέταλλα και υποκαταστάτες τα οποία θα εμφάνιζαν ισχυρή αντικαρκινική δράση αλλά και λιγότερες παρενέργειες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν διάφορα μέταλλα όπως ο χρυσός, το αντιμόνιο, ο άργυρος, ο κασσίτερος καθώς και πολλά άλλα. Ένα από τα πιο φιλικά μέταλλα για τον ανθρώπινο οργανισμό το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύνθεση αντικαρκινικών φαρμάκων και επιλέχτηκε για τη σύνθεση των συμπλόκων μετάλλων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, είναι το βανάδιο.

Η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε από το Εργαστήριο Γναθοπροσωπικής Παθολογίας που συνλειτουργεί με το Εργαστήριο Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και οποίο διαθέτει μακρόχρονη εμπειρία στη μελέτη συμπλόκων μετάλλων με αντικαρκινικές ιδιότητες.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή μου, κ. Βασίλειο Ναπ. Ράγκο για την καθοδήγησή του, την ουσιαστική του συμβολή και την αμέριστη βοήθειά του στην εκπόνηση της Διδακτορική μου Διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Άγγελο Ευαγγέλου για την πολύτιμη βοήθειά του και τις πολύτιμες συμβουλές του για την ολοκλήρωση της Διδακτορικής Διατριβής μου, σχετικά με ένα θέμα, το οποίο ήταν αποκλειστικά δική του σκέψη. Ακόμη, ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Σπυρίδωνα Καρκαμπούνα για την πολύτιμη βοήθειά του και την ουσιαστική κι πρακτική συνεισφορά του, ώστε να ολοκληρωθεί η Διδακτορική μου Διατριβή. Τέλος, ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς μου Επιτροπής, ήτοι την Καθηγήτρια κ. Καλφακάκου Βασιλική και τον Καθηγητή κ. Καστανιουδάκη Ιωάννη για την βοήθεια και τις συμβουλές τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου της Λευκωσίας κ. Αναστάσιο Κεραμιδά για τη σύνθεση των συμπλοκών

Βαναδίου, επίσης, ευχαριστώ τον κ. Γιάννη Σίμο, τον κ. Ευάγγελο Κονταργύρη και την κα Ίριδα Δήμα για τη βοήθειά τους στη συλλογή των αποτελεσμάτων.

Τελειώνοντας, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την συμπαράσταση και την υπομονή που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.1 Κακοήθη νεοπλάσματα (καρκίνος)	5
1.1.1 Ορισμός.....	5
1.1.2 Τύποι	5
1.1.3 Αιτίες.....	7
1.1.4 Παθολογία	13
1.1.5 Επιδημιολογία	15
1.2 Αντικαρκινική θεραπεία.....	20
1.2.1 Χειρουργική θεραπεία.....	20
1.2.2 Ακτινοβολία	22
1.2.3 Χημειοθεραπεία	26
1.2.4 Άλλες μορφές αντικαρκινικής θεραπείας.....	29
1.3 Σύμπλοκα λευκόχρυσου (σισπλατίνη)	31
1.3.1 Κλινική χρήση.....	31
1.3.2 Μηχανισμός δράσης.....	32
1.3.3 Δεύτερης και τρίτης γενιάς σύμπλοκα της πλατίνας	33
1.4 Σαρκώματα	34
1.4.1 Λειομυοσάρκωμα.....	36
1.4.2 Οστεοσάρκωμα	37
1.5 Σύμπλοκα βαναδίου στη χημειοθεραπεία του καρκίνου.....	38
1.5.1 Μεταβολισμός, κατανομή και βιοκινητική του βαναδίου	38
1.5.2 Τοξικότητα του βαναδίου.....	39
1.5.3 Κυτταρικοί μηχανισμοί δράσης των συμπλόκων βαναδίου	40
1.5.4 Αντιμεταστατικές ιδιότητες.....	40
1.5.5 Αντικαρκινικές δράσεις των συμπλόκων βαναδίου	42
2. ΣΚΟΠΟΣ	45
II. ΕΙΔΙΚΟΣ ΜΕΡΟΣ	47
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
3.1 Υλικά και αντιδραστήρια	47
3.2 Σύμπλοκα βαναδίου	48
3.3 Κυτταρικές σειρές.....	49
3.3.1 Λειομυοσαρκοματικά κύτταρα επίμυος Wistar (LMS)	49
3.3.2 Κύτταρα οστεοσαρκώματος ανθρώπου, επιθηλιακού τύπου (U2-OS).....	51
3.3.3 Φυσιολογικοί εμβρυϊκοί ινοβλάστες πνεύμονα ανθρώπου (MRC-5).....	52
3.4 Αποθήκευση και απόψυξη κυττάρων	52

3.5 Καλλιέργεια κυττάρων.....	53
3.6 Μέτρηση αριθμού κυττάρων.....	53
3.7 Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού	54
3.8 Ικανότητα σχηματισμού αποικιών	54
3.9 Κυτταρικός κύκλος – Απόπτωση κυττάρων	55
3.10 Στατιστική ανάλυση και δημιουργία γραφημάτων	55
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	57
4.1 Μελέτη της κυτταροτοξικότητας της σισπλατίνης και της μεθοτρεξάτης.....	57
4.1.1. Σε κύτταρα MRC5, LMS και U2-OS.....	57
4.2 Μελέτη της κυτταροτοξικότητας των συμπλόκων και των υποκαταστατών τους.....	60
4.2.1 Σε κύτταρα MRC-5.....	60
4.2.2. Σε κύτταρα LMS.....	65
4.2.3 Σε κύτταρα U2-OS.....	70
4.2.4 Συγκριτική δράση των συμπλόκων στις τρεις κυτταρικές σειρές.....	75
4.3 Σχηματισμός αποικιών (Colony Formation Efficiency).....	77
4.4 Κυτταρομετρία ροής – Μελέτη κυτταρικού κύκλου και απόπτωσης.....	79
4.4.1 Σύμπλοκο 1	79
4.4.2 Σύμπλοκο 2.....	81
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	85
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	91
7. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ.....	93
7.1 Ελληνική.....	93
7.2 Αγγλική.....	95
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	97

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κακοήθη νεοπλάσματα (καρκίνος)

1.1.1 Ορισμός

Τα κακοήθη νεοπλάσματα είναι μια ομάδα ασθενειών ο μηχανισμός της οποίας συνίσταται σε άτακτο, ανεξέλεγκτο και αδιάκοπο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ο άτακτος αυτός κυτταρικός πολλαπλασιασμός αντιτίθεται στην ελεγχόμενη, ισορροπημένη και τις περισσότερες φορές διαλείπουσα αναπαραγωγή που χαρακτηρίζει τους φυσιολογικούς ιστούς και λαμβάνει χώρα μόνο για να αντισταθμίσει τις έκτακτες κυτταρικές απώλειες από πληγές ή ατυχήματα και τις φυσικές απώλειες λόγω γήρανσης (1) .

Ο όρος «καρκίνος» καλύπτει ένα ευρύτατο φάσμα ασθενειών, που καταγράφεται ανάλογα με τα κύτταρα και τους ιστούς.

1.1.2 Τύποι

Τα κακοήθη νεοπλάσματα ταξινομούνται, ανάλογα με τον ιστό στον οποίο εμφανίζεται, στους ακόλουθους τύπους (2):

1. Καρκίνωμα: Είναι επιθηλιακής προέλευσης. Τα καρκινώματα μπορεί να εισβάλουν στους γειτονικούς ιστούς και στα γειτονικά όργανα και να κάνουν μετάσταση στους λεμφαδένες και σε άλλες περιοχές του σώματος. Οι πιο συνηθισμένες μορφές καρκίνου του τύπου αυτού είναι ο καρκίνος του μαστού, του προστάτη, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου. Τα καρκινώματα αποτελούν το 90% των περιστατικών καρκίνου.
2. Σάρκωμα: Κακοήθης νεοπλασία μεσεγχυματικής προέλευσης με καθορισμό συνοδό συνώνυμο τον επιμέρους ιστού προέλευσής τους (ινοσάρκωμα, οστεοσάρκωμα κ). Οι πιο συνηθισμένοι τύποι σαρκώματος είναι το λειομυοσάρκωμα, το λιποσάρκωμα και το οστεοσάρκωμα. Τα σαρκώματα αντιπροσωπεύουν το 2% των περιστατικών καρκίνου (61).

3. Λέμφωμα: Είναι μια μορφή καρκίνου του λεμφικού συστήματος, που διαπερνά όλο το σώμα, και επομένως είναι δυνατόν να συμβεί οπουδήποτε. Οι δύο κύριοι τύποι είναι το λέμφωμα μη- Hodgkin το οποίο ξεκινάει με την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων και το λέμφωμα Hodgkin στο οποίο τα κύτταρα των λεμφαδένων γίνονται καρκινικά.
4. Λευχαιμία: Καρκίνος των λευκών αιμοσφαιρίων και του μυελού των οστών-από τον οποίο σχηματίζονται τα κύτταρα του αίματος. Υπάρχουν διάφοροι τύποι λευχαιμίας οι συνηθέστεροι από τους οποίους είναι η λεμφοκυτταρική λευχαιμία και η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία.

Μπορεί να γίνει και περαιτέρω ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου, ανάλογα με τη λειτουργία και τη μορφολογία του ιστού. Ο όγκος που ξεκινάει από αδενικό ιστό ταξινομείται ως αδenoκαρκίνωμα. Αν ένας τύπος καρκίνου ταξινομηθεί ως θήλωμα (θηλώδες καρκίνωμα) σημαίνει ότι είναι ένας επιθηλιακός καρκίνος που επιδεικνύει προεξοχές σαν δάχτυλα όταν παρατηρείται στο μικροσκόπιο. Ένα νεόπλασμα που εμφανίζεται σε πρώιμα κύτταρα (βλαστοκύτταρα) ορίζεται ως βλάστωμα. Κάποια παραδείγματα είναι το νευροβλάστωμα, για τους όγκους του νευρικού ιστού και το ρετινοβλάστωμα, για τους όγκους των οφθαλμών. Κάποιες ονομασίες για ορισμένους τύπους καρκίνου δίνονται από το όνομα του επιστήμονα που ανέφερε πρώτος το συγκεκριμένο τύπο καρκίνου στην ιατρική ορολογία. Κάποια παραδείγματα που μπορούν να αναφερθούν είναι το λέμφωμα Hodgkin (που προαναφέρθηκε), ο όγκος του Wilm (Wilm's tumour) που αναφέρεται σε ένα καρκίνο παιδικής ηλικίας (νεφροβλάστωμα) και το σάρκωμα Kaposi (Kaposi' sarcoma), που εμφανίζεται σε ασθενείς που έχουν προσβληθεί από τον HIV (ανθρώπινο ιό ανοσοανεπάρκειας) (3). Επίσης τα είδη λευχαιμίας μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω ανάλογα με το είδος των καρκινικών κυττάρων (B και T λεμφοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα) (4). Στους καρκίνους του κεντρικού νευρικού συστήματος περιλαμβάνονται όγκοι που αναπτύσσονται στα αστροκύτταρα (υποστηρικτικά κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος), στα επενδυματικά κύτταρα (επενδύουν τις κοιλότητες του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού) και στα κύτταρα που αποτελούν τις μήνιγγες (5).

1.1.3 Αιτίες

Τα γονίδια, αποτελούν κωδικοποιημένα μηνύματα που βρίσκονται εντός του κυττάρου και περιέχουν συγκεκριμένες γενετικές πληροφορίες για τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Μια μετάλλαξη σε γονιδιακό επίπεδο όπως είναι μια βλάβη ή μια απώλεια γονιδίων, είναι δυνατόν να αλλάξει τον τρόπο συμπεριφοράς του κυττάρου. Όταν συμβεί ένας ικανός αριθμός γενετικών μεταλλάξεων στο κύτταρο τότε αυτό μπορεί να μετατραπεί σε καρκινικό. Οι παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε ένα κύτταρο και μεταβάλουν τη συμπεριφορά του ονομάζονται καρκινογόνοι. Τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί 140 περίπου γονίδια τα οποία κληρονομούνται και τα οποία αν μεταλλαχθούν προκαλούν καρκινογένεση. Επομένως ορισμένα άτομα γεννιούνται με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης κάποιου συγκεκριμένου τύπου καρκίνου ο οποίος κληρονομείται γενετικά, φαινόμενο που χαρακτηρίζεται ως γενετική προδιάθεση. Η γενετική προδιάθεση, δεν σημαίνει ότι τα άτομα που την έχουν θα αναπτύξουν οπωσδήποτε καρκίνο, αλλά η εκδήλωση της νόσου είναι πιο πιθανή (6).

Οι χημικές ουσίες που προκαλούν κακοήγη νεοπλάσματα ονομάζονται καρκινογόνοι παράγοντες (ή καρκινογόνα). Ωστόσο και ορισμένοι φυσικοί παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο ή να δράσουν σε συνεργασία με κάποιον χημικό παράγοντα, αυξάνοντας την επικινδυνότητά του. Οι πιο γνωστοί παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν καρκινογένεση είναι :

1. Καπνός. Ο καπνός του τσιγάρου περιλαμβάνει τουλάχιστον 80 διαφορετικά καρκινογόνα. Όταν ο καπνός εισπνέεται, οι χημικοί αυτοί παράγοντες εισέρχονται στους πνεύμονες, περνούν στη κυκλοφορία του αίματος και μεταφέρονται σε όλο το σώμα. Ευθύνεται για το ένα πέμπτο των νέων περιστατικών καρκίνου (περίπου 60.000 το χρόνο) και προκαλεί πάνω από το ένα τέταρτο (28%) των θανάτων από καρκίνο στο Ηνωμένο Βασίλειο (7). Παγκόσμια, ένας στους πέντε θανάτους από καρκίνο (22%) προκαλούνται από το κάπνισμα (8). Σύμφωνα με μια πρόσφατη εκτίμηση, περίπου το 85% των περιπτώσεων καρκίνου των πνευμόνων στους άνδρες και το 80% στις γυναίκες στο Ηνωμένο Βασίλειο προκαλούνται από το κάπνισμα (9). Το κάπνισμα έχει βρεθεί ότι σχετίζεται και με άλλους 15 τύπους καρκίνου, όπως με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, τη μυελογενή λευχαιμία, τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, τον καρκίνο

του ορθού, τον καρκίνο των νεφρών, τον καρκίνο του λάρυγγα, τον καρκίνο του ήπατος, τον καρκίνο της στοματικής κοιλότητας (συμπεριλαμβανομένων των χειλέων και της γλώσσας), τα νεοπλάσματα ρινός και παραρρινίων κόλπων, του καρκίνο του οισοφάγου, του καρκίνο των ωοθηκών, τον καρκίνο του φάρυγγα και τον καρκίνο του στομάχου (10).

2. Αλκοόλ. Τα άτομα που καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες αλκοολούχων ποτών έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου και ιδιαίτερα σε συνδυασμό με το κάπνισμα. Οι τύποι κακοήθων νεοπλασιών που σχετίζονται με την υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ είναι μεταξύ άλλων οι καρκίνοι της στοματικής κοιλότητας, του λάρυγγα, του φάρυγγα, του ήπατος και του οισοφάγου (11).
3. Υπεριώδης ακτινοβολία. Προέρχεται από το ηλιακό φως, από λάμπες ηλιακού φωτός ή από συσκευές τεχνητού μαυρίσματος (solarium) και προκαλεί πρόωρο γήρας του δέρματος και βλάβες στο DNA. Οι βλάβες αυτές μπορεί να οδηγήσουν στην εκδήλωση μελανώματος και άλλων μορφών καρκίνου του δέρματος (12, 13).
4. Ιοί και βακτήρια. Μολυσματικοί παράγοντες όπως είναι οι ιοί και τα βακτήρια μπορεί να συμβάλουν στην ανάπτυξη διάφορων τύπων καρκίνου. Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (human papilloma virus ή HPV) που μεταδίδεται με τη σεξουαλική επαφή, είναι η βασική αιτία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και του πρωκτού (14). Ιογενείς λοιμώξεις όπως είναι η ηπατίτιδα Β και η ηπατίτιδα C είναι σημαντικές αιτίες εκδήλωσης του καρκίνου του ήπατος. Παράγοντες κινδύνου για τις ηπατίτιδες Β και C είναι η επαγγελματική έκθεση σε προϊόντα αίματος, η χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών και πολλαπλοί ερωτικοί σύντροφοι. Πλέον, είναι διαθέσιμο το εμβόλιο της ηπατίτιδας Β αλλά μέχρι σήμερα δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο για την ηπατίτιδα C (15). Σχεδόν όλοι οι ενήλικες προσβάλλονται από τον ιό Epstein-Barr (Epstein-Barr virus ή EBV), ο οποίος σχετίζεται με ορισμένους τύπους λεμφώματος. Ο ιός αυτός προκαλεί λοιμώδη μονοπυρήνωση (16). Άλλος ένας τύπος ιού που ονομάζεται ερπητοϊός (ερπητοϊός 8 - HHV-8) σχετίζεται με το σάρκωμα του Kaposi (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ή KSHV) (17). Τέλος, η λοίμωξη από το

ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*), είναι αρκετά διαδεδομένη και αποτελεί την κύρια αιτία των περιστατικών έλκους στο στομάχο και χρόνιας γαστρίτιδας. Το βακτήριο σε κάποιες περιπτώσεις ενδέχεται να συμβάλλει στην ανάπτυξη του καρκίνου του στομάχου (18).

5. Ιονίζουσα ακτινοβολία. Η ιονίζουσα ακτινοβολία είναι αόρατη και λόγω των υψηλών συχνοτήτων της, μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA ή στα γονίδια του ανθρώπινου σώματος (19). Το ραδόνιο, που είναι ένα ραδιενεργό αέριο, παράγεται από τη διάσπαση του ραδίου (το οποίο ανήκει στην οικογένεια του ουρανίου 238) και απελευθερώνει φυσιολογικά χαμηλά επίπεδα ιονίζουσας ακτινοβολίας. Η επίδραση του ραδονίου στην ανθρώπινη υγεία παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε εργαζομένους στα ορυχεία ουρανίου, μεγάλο ποσοστό των οποίων παρουσίασε καρκίνο των πνευμόνων. Το ραδόνιο που υπάρχει φυσιολογικά στη φύση μπορεί να διαρρεύσει μέσα στα σπίτια από το έδαφος του περιβάλλοντος μέσω ρηγμάτων και άλλων ανοιγμάτων στα θεμέλια, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου του πνεύμονα στους κατοίκους των σπιτιών αυτών (20, 21). Άλλη μια πηγή ιονίζουσας ακτινοβολίας είναι οι ραδιενεργές ουσίες που απελευθερώνονται από ατομικές βόμβες ή από ατομικά όπλα που στο σύνολο τους είναι γνωστές και ως ραδιενεργή σκόνη (“fallout”). Η ρίψη των ατομικών βομβών στην Ιαπωνία είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του κινδύνου εκδήλωσης λευχαιμίας και καρκίνου του μαστού, του θυρεοειδούς, των πνευμόνων, του στομάχου και άλλων οργάνων στους κατοίκους που επιβίωσαν (22). Πολλά άτομα εκτίθενται στην ιονίζουσα ακτινοβολία κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων ιατρικών διαγνωστικών εξετάσεων. Ορισμένοι ασθενείς που υποβάλλονται σε ακτινοβολία για τη θεραπεία του καρκίνου ή άλλων παθολογικών καταστάσεων έχουν αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι τα παιδιά τα οποία υποβάλλονται σε ακτινοβολία για τη θεραπεία της ακμής, της δερματοφυΐας και άλλων καλοηθών καταστάσεων βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου του θυρεοειδούς, του μαστού, του δέρματος και άλλων όγκων κεφαλής και τραχήλου (23). Οι ακτίνες X που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση ή την απεικόνιση μιας νόσου είναι επίσης μια μορφή ιονίζουσας

ακτινοβολίας. Η δόση της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση ή την απεικόνιση μιας νόσου είναι πολύ μικρότερη από τη δόση που λαμβάνεται για τη θεραπεία μιας νόσου. Οι περισσότερες μελέτες που σχετίζονται με τις μακροπρόθεσμες επιδράσεις έκθεσης στην ακτινοβολία που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση ή την απεικόνιση του καρκίνου ή άλλων νόσων δεν δείχνουν ότι υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εκδήλωσης καρκίνου (24).

6. Παρασιτοκτόνα. Στις Ηνωμένες Πολιτείες κάποια παρασιτοκτόνα έχουν απαγορευτεί ή έχει περιοριστεί η χρήση τους. Σε αυτά περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων: το οξείδιο του αιθυλενίου (ethylene oxide), η αμινοτριαζόλη ή αμιτρόλη (amitrole), το διχλωροδιφαινυλτριχλωροαιθάνιο (dichlorodiphenyltrichloroethane ή DDT), η διμεθυλδραζίνη (dimethylhydrazine), το εξαχλωροβενζόλιο (hexachlorobenzene), το λινδάνιο (lindane), το «mirex» και το νιτροφένιο (nitrofen) (25). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα άτομα που εκτίθενται σε μεγάλες ποσότητες παρασιτοκτόνων, όπως είναι οι αγρότες και οι βιομηχανικοί εργάτες, έχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του αίματος και του λεμφικού συστήματος, των χειλέων, του στομάχου, του πνεύμονα, του εγκεφάλου, του προστάτη και του παχέος εντέρου (26-28).
7. Φάρμακα. Ορισμένα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του καρκίνου (πχ η κυκλοφωσφαμίδη, η χλωραμβουκίλη και η μελφαλάνη) μπορεί να αυξήσουν τα περιστατικά δευτερογενούς καρκινογένεσης, όπως είναι η λευχαιμία (29). Σε ασθενείς που έχουν υποστεί μεταμόσχευση οργάνου και λαμβάνουν ανοσοκατασταλτικά όπως κυκλοσπορίνη και αζαθειοπρίνη, έχει βρεθεί ότι έχουν αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου και ειδικά λεμφώματος (30, 31). Τα οιστρογόνα που χορηγούνται για τη θεραπεία συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης και άλλων γυναικολογικών παθολογικών καταστάσεων αυξάνουν το κίνδυνο καρκίνου του ενδομητρίου (32) και καρκίνου του μαστού (33). Αυξημένος κίνδυνος εκδήλωσης καρκίνου του μαστού, καρδιοπάθειας, εμφράγματος και θρόμβωσης αίματος σχετίζεται με τη χρήση οιστρογόνων σε συνδυασμό με «progestin» - μια συνθετική μορφή της προγεστερόνης (34). Η χρήση του «tamoxifen», μιας συνθετικής πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται για την

αποτροπή της επανεμφάνισης του καρκίνου του μαστού, σχετίζεται επίσης με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του ενδομητρίου όπως και εκδήλωσης εμφράγματος (35, 36).

8. Ίνες, λεπτά σωματίδια και σκόνη. Η έκθεση σε διάφορες ίνες, σε λεπτά σωματίδια και σε σκόνη που συμβαίνει σε βιομηχανικές τοποθεσίες σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου. Η έκθεση αυτή μπορεί επίσης να γίνει και σε μη-βιομηχανικές τοποθεσίες. Οι ίνες αμιάντου και όλες οι εμπορικές μορφές αμιάντου είναι καρκινογόνες. Έχουν καταγραφεί περιστατικά μεσοθηλιώματος, μιας σπάνιας μορφή καρκίνου του στρώματος των κυττάρων που επικαλύπτει τους πνεύμονες και τη κοιλιακή κοιλότητα, σε επαγγελματικούς χώρους στους οποίους γίνεται έκθεση σε αμίαντο (37). Η σκόνη χαλαζία σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου του πνεύμονα στους ανθρώπους και εντοπίζεται σε επαγγελματικές και βιομηχανικές τοποθεσίες όπως είναι τα ανθρακωρυχεία, οι μύλοι, τα λατομεία και οι χώροι επεξεργασίας γρανίτη και καθαρισμού με αμμοβολή (38). Η σκόνη του ξύλου σχετίζεται με κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου των ρινικών κοιλοτήτων και των ρινικών κόλπων και είναι ένα γνωστό καρκινογόνο που επηρεάζει τους εργαζόμενους οι οποίοι συμμετέχουν σε διεργασίες λείανσης και κατασκευής επίπλων και δεν λαμβάνουν τα απαραίτητα μέτρα προστασίας (39).
9. Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες. Μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει αυξημένη συχνότητα εκδήλωσης καρκίνου του πνεύμονα, του δέρματος και του ουροποιητικού συστήματος σε ανθρώπους που είναι εκτεθειμένοι σε μείγματα πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων. Προέρχονται από τη καύση χημικών ενώσεων που περιέχουν άνθρακα, ξύλων και καυσίμων για τη θέρμανση των σπιτιών. Επίσης περιέχονται στα καυσαέρια των αυτοκινήτων (βενζινοκίνητων και πετρελαιοκίνητων) και στο καπνό του τσιγάρου και του πούρου. Ορισμένες τροφές περιέχουν μικρές ποσότητες πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων όπως το καπνιστό κρέας και ψάρι, τα φαγητά που ψήνονται σε μπάρμπεκιου, ο καβουρδισμένος καφές και τα λουκάνικα (40-42).

10. Μέταλλα. Οι χημικές ενώσεις αρσενικού σχετίζονται με πολλές μορφές καρκίνου (του δέρματος, του πνεύμονα, της ουροδόχου κύστης, των νεφρών και του ήπατος), ιδιαίτερα όταν λαμβάνονται σε μεγάλες ποσότητες μέσω του πόσιμου νερού (43). Επιπλέον, η εισπνοή αρσενικού σε επαγγελματικούς χώρους (όπως οι χώροι εξόρυξης χαλκού) έχει σχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου του πνεύμονα (44). Είναι γνωστό ότι οι χημικές ενώσεις βηρυλλίου προκαλούν καρκίνο του πνεύμονα σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε άτομα που εργάζονται σε εγκαταστάσεις παραγωγής βηρυλλίου (45). Καρκίνο του πνεύμονα προκαλούν επίσης το κάδμιο, οι χημικές ενώσεις καδμίου (46) καθώς και οι χημικές ενώσεις χρωμίου (47).
11. Τοξίνες από μύκητες. Οι αφλατοξίνες παράγονται από μύκητες που αναπτύσσονται σε τροφές, όπως τα σιτηρά και τα φιστίκια, και οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο. Άλλες πηγές έκθεσης είναι το κρέας, τα αυγά και το γάλα από ζώα που έχουν καταναλώσει τροφή που έχει μολυνθεί από αφλατοξίνες. Η έκθεση σε υψηλά επίπεδα αφλατοξινών αυξάνει το κίνδυνο του καρκίνου του ήπατος (48).

Το κατεσταλμένο ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί επίσης να αυξήσει το κίνδυνο εκδήλωσης κάποιων μορφών καρκίνου. Τα άτομα που έχουν υποστεί μεταμόσχευση οργάνων, λαμβάνουν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα που αποδυναμώνουν το ανοσοποιητικό τους σύστημα προκειμένου να αποφευχθεί η απόρριψη των οργάνων αυτών. Επίσης, κατεσταλμένο ανοσοποιητικό σύστημα έχουν οι ασθενείς που πάσχουν από AIDS ή από άλλες παθολογικές καταστάσεις με τις οποίες μειώνεται η ανοσία τους στις νόσους (49).

Επιπλέον, το σωματικό βάρος, η διατροφή και η φυσική άσκηση επηρεάζουν την πιθανότητα εκδήλωσης καρκινογένεσης. Εκτιμάται ότι η διατήρηση του φυσιολογικού σωματικού βάρους, η υγιεινή διατροφή και η τακτική φυσική σωματική άσκηση μπορούν να αποτρέψουν ένα στους τρεις θανάτους από καρκίνο. Πολλά άτομα καταναλώνουν κόκκινο κρέας και επεξεργασμένο κρέας, χωρίς τη κατανάλωση φρέσκων φρούτων και λαχανικών, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου (50). Τα υπέρβαρα και τα παχύσαρκα άτομα παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου του εντέρου και του παγκρέατος, πιθανόν λόγω της αύξησης των επιπέδων της ινσουλίνης. Η παχυσαρκία

μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο για καρκίνο του οισοφάγου, των νεφρών, της χοληδόχου κύστης, του μαστού και του ενδομητρίου στις γυναίκες (51).

1.1.4 Παθολογία

Οι όγκοι διακρίνονται σε καλοήθεις ή κακοήθεις.

Οι καλοήθεις όγκοι δεν είναι καρκινικοί και σπάνια είναι απειλητικοί για τη ζωή. Αναπτύσσονται με αργό ρυθμό, παρουσιάζουν καλή διαφοροποίηση, δε μεθίστανται σε άλλα σημεία του σώματος και συνήθως αποτελούνται από κύτταρα που είναι σχεδόν παρόμοια με τα υγιή κύτταρα του ιστού στον οποίο εκδηλώνονται. Οι καλοήθεις όγκοι μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα μόνο όταν αναπτυχθούν υπερβολικά με αποτέλεσμα να ασκούν πίεση σε άλλα όργανα.

Οι κακοήθεις όγκοι αναπτύσσονται ταχύτερα από ότι οι καλοήθεις όγκοι, δεν παρουσιάζουν καλή διαφοροποίηση και έχουν την ικανότητα να διηθούνται και να καταστρέφουν τους γειτονικούς ιστούς. Τα κύτταρα των κακοήθων όγκων μπορούν να αποσπώνται από τον κύριο όγκο (πρωτογενής όγκος), να εξαπλώνονται σε άλλα σημεία του σώματος (εγκέφαλος, πνεύμονας, ήπαρ κ.α.) μέσω της λέμφου ή του αίματος και να σχηματίζουν δευτερογενείς όγκους, φαινόμενο που ονομάζεται μετάσταση. Οι δευτερογενείς όγκοι που αναπτύσσονται σε άλλες ανατομικές περιοχές ονομάζονται μεταστατικοί καρκίνοι.

Η μετάσταση μπορεί να γίνει με εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων σε γειτονικούς ιστούς (τοπικές μεταστάσεις), ενώ μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή της λέμφου είναι δυνατόν να μεταφερθούν καρκινικά κύτταρα σε άλλα σημεία του σώματος και να δημιουργήσουν δευτερογενείς μεταστάσεις. Τα περισσότερα είδη καρκίνου περιλαμβάνουν διάφορους τύπους κυττάρων με ποικίλα βιολογικά χαρακτηριστικά. Τα κύτταρα αυτά είναι δυνατόν να διαφέρουν σε ότι αφορά την ανάπτυξή τους, τον καρυότυπο, τη παραγωγή χρωστικών ουσιών, τους υποδοχείς καθώς, την ανοσογενετική και το βαθμό ευαισθησίας στα κυτταροτοξικά φάρμακα (52, 53).

Η ανάπτυξη του πρωτογενούς όγκου εξαρτάται από τη δημιουργία νέων τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων με τα οποία συντηρείται ο όγκος. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται αγγειογένεση. Η αγγειογένεση ξεκινάει από χημικά σήματα που προέρχονται από τον αναπτυσσόμενο όγκο (4, 52).

Η διάγνωση του καρκίνου πραγματοποιείται με διάφορες μεθόδους. Οι μέθοδοι αυτοί, μεταξύ άλλων, είναι η λήψη δείγματος από τον όγκο για βιοψία με χειρουργική επέμβαση ή με παρακέντηση με βελόνα καθώς και άλλες εργαστηριακές εξετάσεις. Η διάγνωση πραγματοποιείται από παθολογοανατόμο ιατρό ο οποίος και αποφασίζει εάν ο ιστός είναι νεοπλασματικός, εάν είναι καλοήθης ή κακοήθης καθώς και σχετικά με τον ιστολογικό τύπο των κυττάρων. Επίσης, η βιοψία βοηθάει στη πρόγνωση της νόσου με τον καθορισμό του μεγέθους της βλάβης, των ορίων εκτομής της βλάβης, τον αριθμό των λεμφαδένων που έχουν αφαιρεθεί και τις τυχούσες μεταστατικές διηθήσεις αυτών (54, 55). Στη διάγνωση χρησιμοποιούνται και μοριακές τεχνικές όπως τεχνικές ανοσοϊστοχημείας, τεχνικές για τον υπολογισμό του ολικού περιεχόμενου DNA και κάποιες άλλες που ανήκουν στο πεδίο της διαγνωστικής μοριακής γενετικής (54-56).

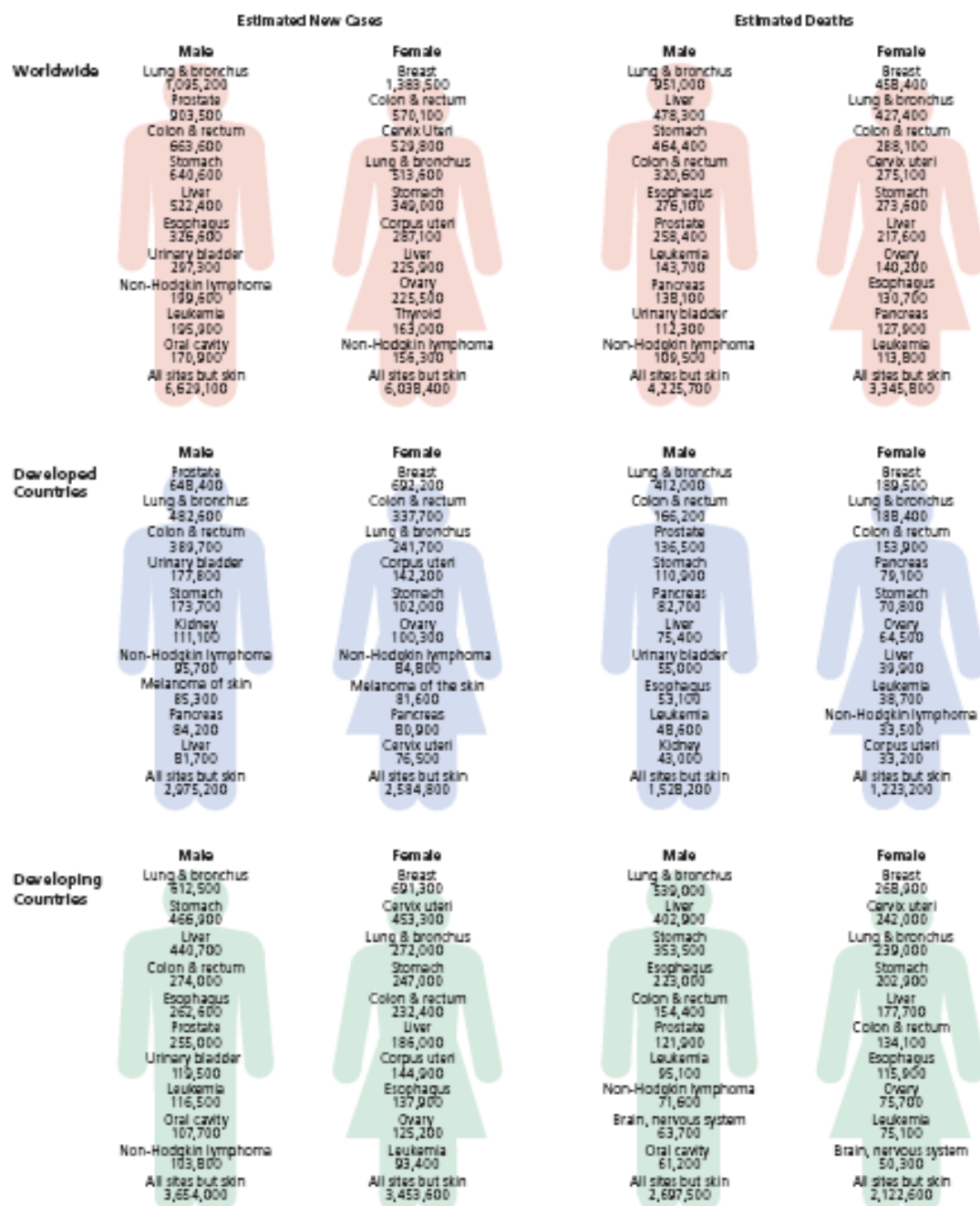
Αφού πραγματοποιηθεί η διάγνωση ακολουθεί η σταδιοποίηση του καρκίνου. Η σταδιοποίηση είναι μια απόπειρα αποτύπωσης στη δεδομένη στιγμή της έκτασης του καρκίνου μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Είναι ουσιαστικής σημασίας στην καθημερινή άσκηση της κλινικής ογκολογίας επειδή η ανατομική έκταση της νόσου είναι ο κυριότερος προγνωστικός παράγοντας όσον αφορά την επιβίωση στα περισσότερα είδη νεοπλασιών (τα περισσότερα συστήματα σταδιοποίησης είχαν και εξακολουθούν να έχουν σημείο αναφοράς τον παράγοντα αυτόν). Ένα κλινικά χρήσιμο σύστημα ταξινόμησης των νεοπλασματικών νόσων πρέπει να περιλαμβάνει εκείνα τα χαρακτηριστικά των όγκων που καθορίζουν τη συμπεριφορά τους. Το σύστημα TNM βασίζεται στην παραδοχή ότι νεοπλάσματα κοινής ανατομικής και ιστολογικής προέλευσης παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά συμπεριφοράς και εξέλιξης. Στο σύστημα TNM το γράμμα «T» αναφέρεται στις διαστάσεις της πρωτοπαθούς εστίας. Το γράμμα «N» αναφέρεται στον αριθμό και στην εντόπιση επιχώριων λεμφαδένων που βρίσκονται θετικοί. Το γράμμα «M» αναφέρεται στην ύπαρξη μεταστάσεων σε άλλα όργανα (απομακρυσμένες μεταστάσεις). Το σύστημα TNM έχει αναπτυχθεί από κοινού από την «International Agency for Research on Cancer» και από την «American Joint Committee on Cancer» (57). Εκτός από τα γενικά συστήματα, όπως είναι το «σύστημα TNM», εξειδικευμένα συστήματα έχουν αναπτυχθεί για συγκεκριμένους όγκους όπως το «Dukes System» για τη βαθμονόμηση του καρκίνου του παχέος εντέρου και του ορθού (58) και το “Columbia system” για το καρκίνο του μαστού (59).

1.1.5 Επιδημιολογία

Διάφοροι προδιαθεσικοί παράγοντες μπορεί να προκαλέσουν τη διαταραχή των φυσιολογικών γονιδίων και τη μετατροπή τους σε καρκινικά γονίδια. Η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου αυξάνει όταν συνυπάρχουν περισσότεροι από ένας προδιαθεσικοί παράγοντες. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση των ασθενών με καρκίνο που οφείλεται κυρίως στην αύξηση του μέσου όρου ζωής και στην επιβάρυνση του περιβάλλοντος. Παγκοσμίως, ένας στους οχτώ θανάτους προκαλείται εξ' αιτίας του καρκίνου. Ο καρκίνος μάλιστα προκαλεί περισσότερους θανάτους από ότι από κοινού το AIDS, η φυματίωση και η ελονοσία. Είναι η κύρια αιτία θανάτου στις αναπτυγμένες χώρες και η δεύτερη αιτία θανάτου στις αναπτυσσόμενες χώρες, μετά την καρδιακή νόσο. Σύμφωνα με εκτιμήσεις από την «International Agency for Research on Cancer (IARC)» το 2008 εκδηλώθηκαν παγκοσμίως 12.7 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου, από τις οποίες τα 5.6 εκατομμύρια σε οικονομικά ανεπτυγμένες χώρες και τα 7.1 εκατομμύρια σε οικονομικά αναπτυσσόμενες χώρες (**Σχήμα 1**). Έως και το 2030, νέα περιστατικά καρκίνου αναμένεται να εκδηλωθούν σε 21.4 εκατομμύρια άτομα. Επίσης αναμένεται να σημειωθούν 13.2 εκατομμύρια θάνατοι από καρκίνο, απλά λόγω της αύξησης της ηλικίας του πληθυσμού και λόγω της μείωσης της θνησιμότητας στη παιδική ηλικία καθώς και λόγω της μείωσης των θανάτων από μολυσματικές ασθένειες στις αναπτυσσόμενες χώρες (60).

Υπολογίζεται ότι περισσότερο από το 50% των θανάτων λόγω καρκίνου παγκοσμίως είναι εν δυνάμει αποτρέψιμο. Οι περιπτώσεις καρκίνου που σχετίζονται με το κάπνισμα, με την υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, και με την παχυσαρκία μπορούν να προληφθούν μέσω της εκπαίδευσης και μιας κοινωνικής πολιτικής που να ενθαρρύνει τα άτομα να υιοθετούν ένα υγιή τρόπο ζωής. Κάποιες περιπτώσεις καρκίνου που σχετίζονται με μολυσματικές ασθένειες όπως η ηπατίτιδα Β, ο ανθρώπινος ιός ανοσοανεπάρκειας (HIV) και ο ιός ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) μπορεί να αποτραπούν με τον εμβολιασμό, τη χορήγηση αντιβιοτικών, τη σωστή υγιεινή και την εκπαίδευση. Άλλα είδη καρκίνου όπως αυτοί του παχέος εντέρου και του ορθού καθώς και του τραχήλου της μήτρας μπορούν να αποτραπούν με την ανίχνευση και την αφαίρεση των προκαρκινικών αλλοιώσεων. Η έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου είναι σημαντική γιατί αυξάνεται η πιθανότητα για επιτυχή θεραπεία. Τα είδη καρκίνου που μπορεί να ανιχνευτούν έγκαιρα

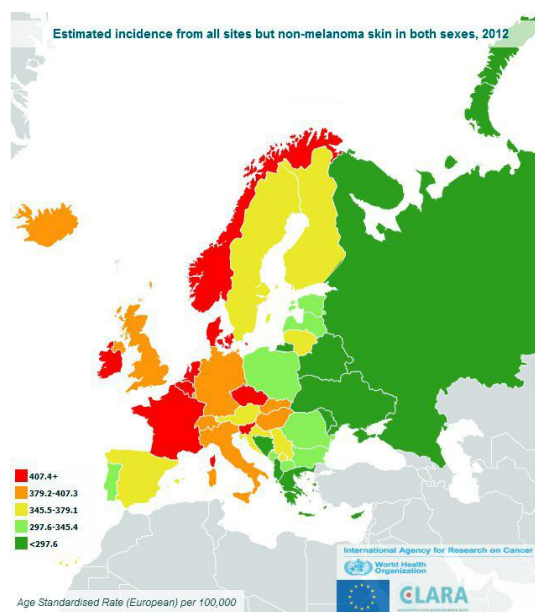
περιλαμβάνουν τον καρκίνο του μαστού, του τραχήλου της μήτρας, του παχέος εντέρου, του προστάτη, της στοματικής κοιλότητας και του δέρματος.



Source: Globocan 2008.

Σχήμα 1 Εκτιμώμενα νέα περιστατικά εκδήλωσης καρκίνου και εκτιμώμενοι θάνατοι από καρκίνο παγκοσμίως σύμφωνα με το επίπεδο της οικονομικής ανάπτυξης (60)

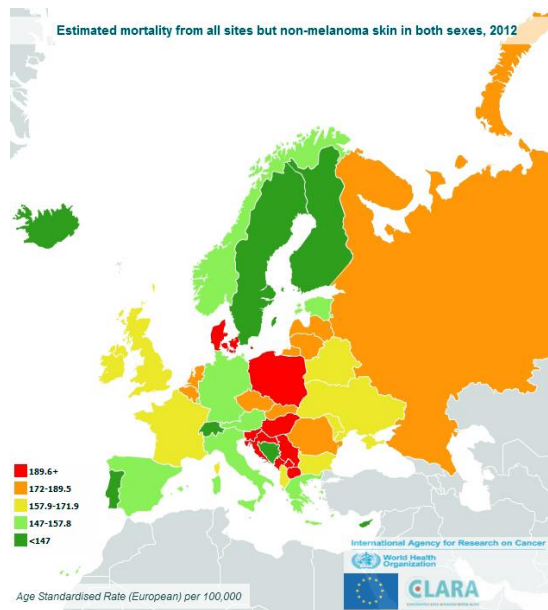
Στην Ευρώπη η επίπτωση του καρκίνου διαφέρει σημαντικά από χώρα σε χώρα. Τα μεγαλύτερα ποσοστά επίπτωσης παρουσιάζουν χώρες όπως η Δανία, η Ιρλανδία, η Νορβηγία, η Γαλλία, το Βέλγιο, η Τσεχία, η Ουγγαρία και η Σλοβενία ενώ η χώρα μας εμφανίζει από τα χαμηλότερα ποσοστά επίπτωσης και μάλιστα βρίσκεται στην 39^η θέση ανάμεσα στη 40 χώρες (235 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους) (Σχήμα 2).



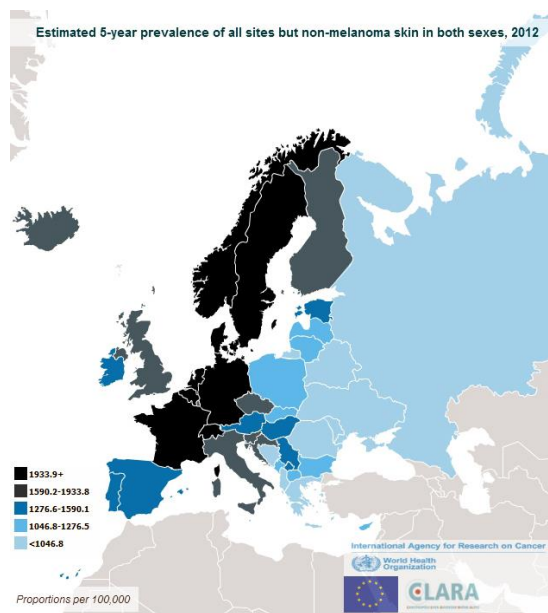
Σχήμα 2 Εκτιμώμενη επίπτωση του καρκίνου στην Ευρώπη το 2012 (International Agency for Research on Cancer)

Όσον αφορά τη θνησιμότητα στην Ευρώπη τους υψηλότερους δείκτες παρουσιάζουν η Ουγγαρία και η Σερβία με 222 και 213 θανάτους ανά 100.000 κατοίκους, αντίστοιχα, ενώ τους χαμηλότερους η Φιλανδία και η Ισλανδία με 132 και 139 θανάτους ανά 100.000 κατοίκους αντίστοιχα. Στη χώρα μας οι θάνατοι ανέρχονται σε 151 θάνατοι ανά 100.000 κατοίκους (Σχήμα 3).

Σε ότι αφορά τον επιπολασμό (αριθμός ασθενών με καρκίνο σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή) το Βέλγιο, η Νορβηγία και η Δανία βρίσκονται στις τρεις πρώτες θέσεις ενώ η χώρα μας βρίσκεται στην 33^η θέση (Σχήμα 4). Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι στην Ελλάδα ο επιπολασμός του καρκίνου είναι 284 ασθενείς ανά 100.000 κατοίκους ενώ στο Βέλγιο είναι σχεδόν διπλάσιος (551 ασθενείς ανά 100.000 κατοίκους).



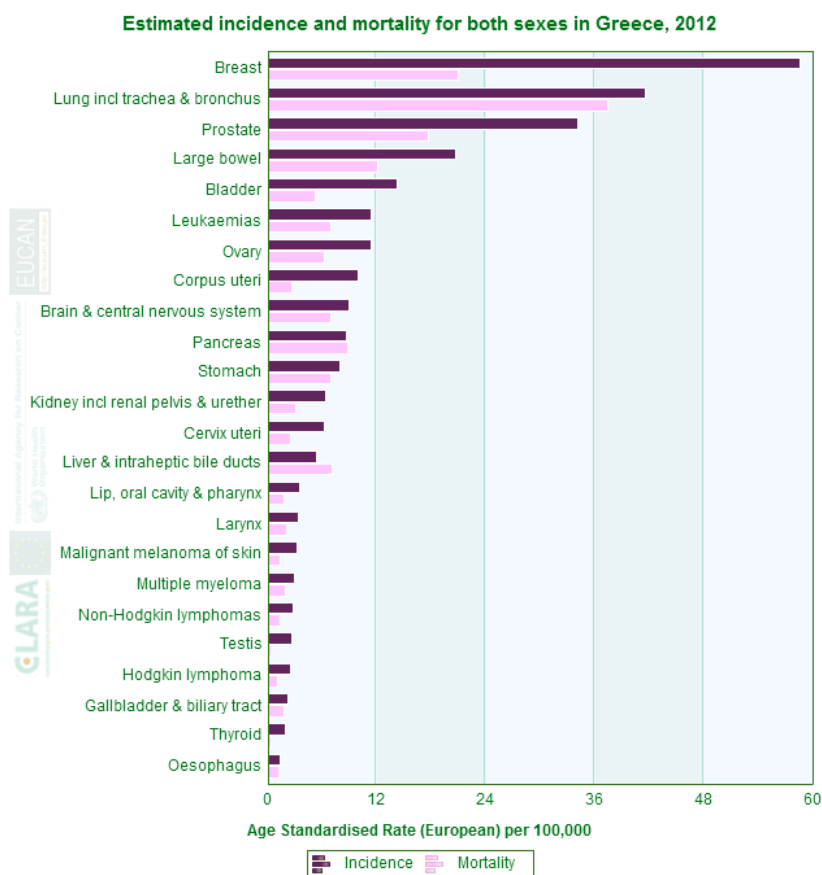
Σχήμα 3 Εκτιμώμενη θνησιμότητα του καρκίνου στην Ευρώπη το 2012 (International Agency for Research on Cancer)



Σχήμα 4 Πενταετής επιπολασμός των διαφόρων τύπων καρκίνων στην Ευρώπη (International Agency for Research on Cancer)

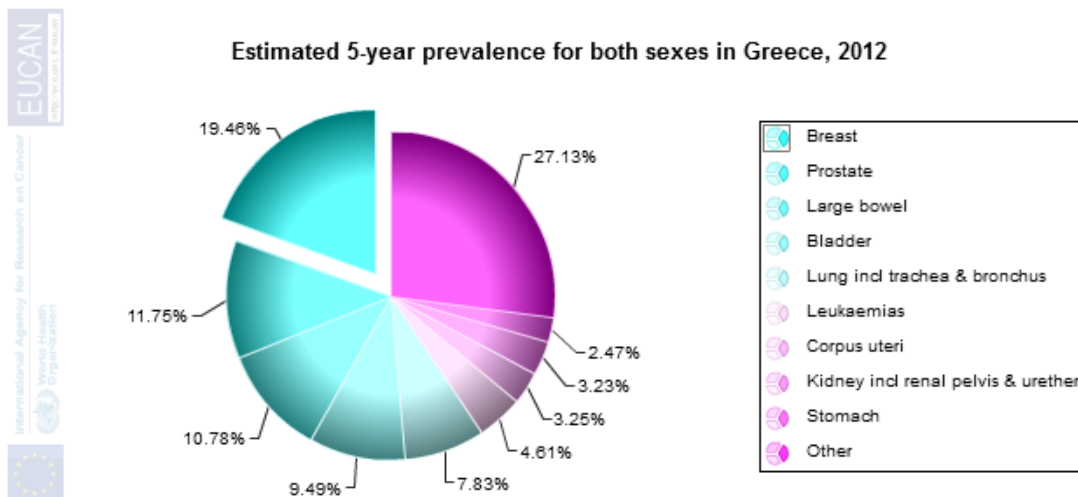
Στο Σχήμα 5 παρουσιάζονται οι 24 πιο συχνοί τύποι καρκίνων σε επίπτωση και θνησιμότητα στους Έλληνες και στις Ελληνίδες. Ο καρκίνος των πνευμόνων και των

βρόγχων είναι ο πιο κοινός θανατηφόρος καρκίνος. Στις γυναίκες στη πρώτη θέση με το μεγαλύτερο αριθμό θανάτων βρίσκεται ο καρκίνος του μαστού ενώ στους άνδρες ο καρκίνος του προστάτη.



Σχήμα 5 Επίπτωση και θνησιμότητα των διαφόρων τύπων καρκίνων στους Έλληνες και στις Ελληνίδες (International Agency for Research on Cancer)

Οι δύο αυτοί τύποι καρκίνου (ο καρκίνος του μαστού για τις γυναίκες και ο καρκίνος του προστάτη για τους άνδρες) εμφανίζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά επιπολασμού (Σχήμα 6).



Σχήμα 6 Επίπτωση και θνησιμότητα των διαφόρων τύπων καρκίνων στους Έλληνες και στις Ελληνίδες ανάλογα με τη θέση εντόπισης (International Agency for Research on Cancer)

1.2 Αντικαρκινική θεραπεία

Στις μεθόδους θεραπείας κατά των κακοήθων νεοπλασιών κυρίως περιλαμβάνονται: η χειρουργική επέμβαση, η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία. Άλλες μορφές αντικαρκινικής θεραπείας είναι: η στοχευμένη θεραπεία, οι παράγοντες διαφοροποίησης, η ορμονοθεραπεία και η ανοσοθεραπεία.

1.2.1 Χειρουργική θεραπεία

Η χειρουργική επέμβαση έχει πρωτεύοντα ρόλο στην αντιμετώπιση του καρκίνου (61). Το είδος της χειρουργικής επέμβασης μπορεί να είναι κάθε φορά διαφορετικό και ποικίλει ανάλογα το στάδιο της νόσου, την εντόπιση της βλάβης, την ηλικία του ασθενή και τα συνοδά συμπτώματα που εκδηλώνονται σε έναν ασθενή με καρκίνο. Οι τύποι των χειρουργικών επεμβάσεων σε ότι αφορά την αντιμετώπιση του καρκίνου είναι (62-64):

1. Προφυλακτική ή προληπτική χειρουργική επέμβαση. Πραγματοποιείται προκειμένου να αφαιρεθεί τμήμα ιστού από το σώμα το οποίο μπορεί δυνητικά να μετατραπεί σε καρκινικό όγκο. Για παράδειγμα, οι προκαρκινικοί πολύποδες μπορεί να αφαιρεθούν από το παχύ έντερο κατά τη διάρκεια μια κολonosκόπησης. Ορισμένες φορές ή προληπτική χειρουργική επέμβαση

χρησιμοποιείται για την αφαίρεση ενός ολόκληρου οργάνου όταν ένας ασθενής πάσχει από μια κληρονομική κατάσταση που ενέχει πολύ μεγάλο κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου σε κάποια στιγμή στη ζωή του. Για παράδειγμα, κάποιες γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού έχουν μια κληρονομική μετάλλαξη σε ένα ογκογονίδιο όπως είναι το *BRCA1*. Επειδή αυτές οι γυναίκες βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, μπορούν να προβούν σε μια ενδεχόμενη προφυλακτική μαστεκτομή (62-64).

2. Διαγνωστική χειρουργική επέμβαση - βιοψία. Χρησιμοποιείται προκειμένου να διαγνωστεί ο καρκίνος. Στις περισσότερες περιπτώσεις η αφαίρεση ενός τμήματος παθολογικού ιστού και στη συνέχεια η ιστολογική του εξέταση, είναι ο μοναδικός τρόπος για να επιτευχθεί η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου. Σε όγκους μη προσπελάσιμους, η διάγνωση γίνεται είτε με λήψη του ιστού με βελόνα (fine needle aspiration, FNA) είτε με κυτταρολογική εξέταση της βλάβης. (62-64).
3. Χειρουργική επέμβαση σταδιοποίησης του καρκίνου. Η χειρουργική επέμβαση πραγματοποιείται προκειμένου να γίνει σταδιοποίηση του καρκίνου με σκοπό τον καθορισμό της πρόγνωσης και την επιλογή επιπλέον θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Στη σταδιοποίηση συνεπικουρούν τα ευρήματα της φυσικής εξέτασης, τα αποτελέσματα των εργαστηριακών εξετάσεων καθώς και τα αποτελέσματα των απεικονιστικών εξετάσεων (62-64).
4. Θεραπευτική χειρουργική επέμβαση. Πραγματοποιείται συνήθως όταν υπάρχει η δυνατότητα αφαίρεσης του καρκινικού όγκου. Στη περίπτωση αυτή, η χειρουργική αυτή επέμβαση μπορεί να αποτελεί τη κύρια θεραπεία. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε από μόνη της, είτε σε συνδυασμό με άλλα είδη θεραπείας όπως είναι η χημειοθεραπεία ή η ακτινοθεραπεία, που γίνονται πριν ή μετά τη χειρουργική επέμβαση. Ορισμένες φορές η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια μιας χειρουργικής επέμβασης και ονομάζεται διεγχειρητική ακτινοθεραπεία (61-64).
5. Χειρουργική επέμβαση ογκομείωσης. Χρησιμοποιείται για την αφαίρεση ενός τμήματος του καρκινικού όγκου. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για προχωρημένο καρκίνο των ωοθηκών και ορισμένων μορφών λεμφωμάτων. Στις περιπτώσεις αυτές, ο χειρουργός προσπαθεί να αφαιρέσει όσο το δυνατόν μεγαλύτερο

τμήμα του καρκινικού όγκου και αυτό που παραμένει να θεραπεύεται με ακτινοθεραπεία, με χημειοθεραπεία ή με άλλα είδη θεραπείας (62-64).

6. Παρηγορητική χειρουργική επέμβαση. Στη περίπτωση αυτή ο όγκος είναι μη χειρουργήσιμος και η επέμβαση αποβλέπει στον έλεγχο των συμπτωμάτων παρά στη θεραπεία. Χρησιμοποιείται ανακουφιστικά για τον ασθενή με την αντιμετώπιση των επιπλοκών του καρκίνου οι οποίες προκαλούν δυσφορία και αναπηρία. Για παράδειγμα, ορισμένα είδη καρκίνου στη κοιλιακή χώρα μπορεί να αναπτυχθούν σε τέτοιο βαθμό ώστε να αποφράσσεται το έντερο. Σε αυτή τη περίπτωση θα πρέπει να γίνει μια χειρουργική επέμβαση για την απομάκρυνση της αιτίας της απόφραξης. Η παρηγορητική χειρουργική επέμβαση μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη αντιμετώπιση του πόνου. Η χειρουργική αυτή επέμβαση μπορεί να βοηθήσει τους ασθενείς να νιώθουν καλύτερα, αλλά δεν πραγματοποιείται για τη θεραπεία του ίδιου του καρκίνου (62-64).
7. Επανορθωτική ή αναπλαστική χειρουργική επέμβαση. Χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση ιστικών ελλειμμάτων ύστερα από μια κύρια χειρουργική επέμβαση για τον καρκίνο. Επίσης, χρησιμοποιείται για την αποκατάσταση της λειτουργίας ενός οργάνου ή ενός τμήματος του σώματος. Παραδείγματα επανορθωτικής χειρουργικής επέμβασης είναι η αποκατάσταση μαστού μετά από μαστεκτομή, ή η χρήση ελεύθερων αγγειούμενων μοσχευμάτων για την αποκατάσταση ελλειμμάτων στη γναθοπροσωπική χώρα (61-64).

1.2.2 Ακτινοβολία

Κατά τη διαδικασία της ακτινοθεραπείας χρησιμοποιούνται σωματίδια ή κύματα υψηλής ενέργειας, όπως είναι οι ακτίνες X, οι ακτίνες γάμμα και δέσμη ηλεκτρονίων ή πρωτονίων, προκειμένου να καταστραφούν ή να υποστούν βλάβη τα καρκινικά κύτταρα. Η ακτινοθεραπεία μπορεί να συνδυαστεί και με άλλες θεραπείες, όπως είναι η χειρουργική επέμβαση ή η χημειοθεραπεία. Ορισμένα φάρμακα (τα οποία ονομάζονται ραδιοευαισθητοποιητές) καθιστούν τα καρκινικά κύτταρα πιο ευαίσθητα στη ακτινοθεραπεία. Υπάρχουν διαφορετικοί τρόποι χορήγησης της ακτινοθεραπείας. Ορισμένες φορές κάποιος ασθενής μπορεί να λάβει περισσότερους από ένα τύπο ακτινοθεραπείας για τον ίδιο είδος καρκίνου (65-67).

Η ακτινοθεραπεία λειτουργεί προκαλώντας θραύσεις στο DNA των κυττάρων. Οι θραύσεις αυτές αποτρέπουν την ανάπτυξη και τη διαίρεση των καρκινικών κυττάρων και συχνά προκαλούν το θάνατο τους. Από την ακτινοβολία είναι δυνατόν να επηρεαστούν και τα φυσιολογικά κύτταρα που είναι γειτονικά των καρκινικών κυττάρων, τα περισσότερα από οποία αναρρώνουν και επανέρχονται στις λειτουργίες τους με κανονικό τρόπο. Η ακτινοθεραπεία είναι μια τοπική θεραπεία, σε αντίθεση με τη χημειοθεραπεία στην οποία εκτίθεται όλο το σώμα σε φάρμακα που καταπολεμούν τον καρκίνο. Ο στόχος της ακτινοθεραπείας είναι η πρόκληση βλάβης στα καρκινικά κύτταρα, με όσο το δυνατόν μικρότερη βλάβη στα γειτονικά υγιή κύτταρα. Σε ορισμένες διαδικασίες ακτινοθεραπείας χρησιμοποιούνται ραδιενεργές ουσίες οι οποίες χορηγούνται ενδοφλεβίως ή από το στόμα. Στην περίπτωση αυτή, η ακτινοβολία ταξιδεύει σε όλο το σώμα με τη κυκλοφορία του αίματος (65-67).

Ορισμένοι τύποι καρκίνου παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ακτινοβολία από ότι άλλοι τύποι ή εντοπίζονται σε περιοχές του σώματος στις οποίες η θεραπεία είναι πιο εύκολη με ακτινοθεραπεία χωρίς την πρόκληση σημαντικών παρενεργειών. Υπάρχουν κάποια ανώτατα όρια στη λήψη ακτινοβολίας στη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου. Οι ακτινοθεραπευτές ιατροί γνωρίζουν την ποσότητα της ακτινοβολίας η οποία μπορεί να χορηγηθεί σε υγιή σημεία του σώματος με ασφάλεια και χωρίς την πρόκληση βλάβης στα φυσιολογικά κύτταρα. Σε περίπτωση που έχει χορηγηθεί ακτινοβολία σε ένα μέρος του σώματος μια φορά, μπορεί να μην είναι δυνατόν να χορηγηθεί ακτινοβολία στο ίδιο αυτό μέρος για δεύτερη φορά. Εξαρτάται από τη ποσότητα της ακτινοβολίας που έχει ήδη χορηγηθεί την πρώτη φορά. Σε περίπτωση που κάποιο σημείο του σώματος έχει ήδη δεχτεί τη μέγιστη δυνατή δόση που απαιτείται για όλη τη διάρκεια της ζωής, τότε είναι δυνατόν να χορηγηθεί ακτινοβολία σε άλλο σημείο του σώματος εάν η απόσταση μεταξύ των δύο αυτών σημείων είναι αρκετά μεγάλη (65-67).

Η ακτινοθεραπευτική αγωγή χορηγείται με τρεις τρόπους: α) την εξωτερική ακτινοθεραπεία, β) την εσωτερική ακτινοθεραπεία και γ) την συστηματική ακτινοθεραπεία. Κατά την εξωτερική ακτινοθεραπεία χρησιμοποιείται ένας γραμμικός επιταχυντής ο οποίος κατευθύνει ακτίνες υψηλής ενέργειας εξωτερικά του σώματος και εντός του καρκινικού όγκου. Οι περισσότεροι καρκινοπαθείς λαμβάνουν εξωτερική ακτινοθεραπεία για πολλές εβδομάδες κατά τις καθορισμένες επισκέψεις στα εξωτερικά ιατρεία των νοσοκομείων. Στις περισσότερες περιπτώσεις η ολική δόση της ακτινοβολίας

που χρειάζεται για να φονευθεί ένας καρκινικός όγκος δεν χορηγείται μια φορά, γιατί μπορεί να προκληθεί μεγαλύτερη βλάβη σε γειτονικούς υγιείς ιστούς και επίσης να προκληθούν περισσότερες παρενέργειες. Συνεπώς, η ολική αυτή δόση της εξωτερικής ακτινοβολίας συνήθως διαιρείται σε μικρότερες δόσεις. Μπορεί να χρησιμοποιούνται και διαφορετικά προγράμματα ακτινοθεραπείας. Για παράδειγμα η ακτινοθεραπεία σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να διαρκέσει μόνο λίγες εβδομάδες, ή και λιγότερο, όταν χρησιμοποιείται για την ανακούφιση συμπτωμάτων, γιατί η ολική δόση της ακτινοβολίας είναι μικρότερη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η ακτινοθεραπεία μπορεί να χορηγείται τμηματικά 2 ή περισσότερες φορές κάθε μέρα (split course therapy), όπου για χρονικό διάστημα αρκετών εβδομάδων δεν χορηγείται ακτινοθεραπεία ανάμεσα στις μέρες τις θεραπείας, προκειμένου να μπορέσει το σώμα να αναρρώσει ενώ ο καρκινικός όγκος συρρικνώνεται. Κατά την εσωτερική ακτινοθεραπεία, που ονομάζεται και βραχυθεραπεία, χρησιμοποιείται μια ραδιενεργός πηγή, που είναι συνήθως σφραγισμένη σε ένα μικρό εμφύτευμα το οποίο τοποθετείται εντός του σώματος και πολύ κοντά στο καρκινικό όγκο ή και εντός του καρκινικού όγκου, έτσι ώστε να προκαλείται βλάβη σε όσο το δυνατό λιγότερα υγιή κύτταρα. Με την εσωτερική ακτινοθεραπεία επιτρέπεται η ακτινοβολήση υψηλότερης δόσης ακτινοβολίας σε μικρότερη περιοχή, από ότι συμβαίνει με την εξωτερική ακτινοθεραπεία. Οι κύριοι τύποι βραχυθεραπείας είναι η ενδοκοιλοτική και η ενδιάμεση βραχυθεραπεία. Και οι δύο αυτές μέθοδοι χρησιμοποιούν ραδιενεργά εμφυτεύματα όπως είναι τα σφαιρίδια, οι σπόροι, οι ταινίες, οι βελόνες, οι κάψουλες, τα μπαλόνια και οι σωλήνες. Κατά τη ενδοκοιλοτική βραχυθεραπεία η ραδιενεργός πηγή τοποθετείται σε μια κοιλότητα του σώματος όπως είναι το ορθό ή η μήτρα. Κατά την ενδιάμεση βραχυθεραπεία, τα εμφυτεύματα τοποθετούνται εντός του καρκινικού όγκου ή πλησίον του όγκου αλλά όχι σε κοιλότητα του σώματος. Κατά τη συστηματική ακτινοθεραπεία χρησιμοποιούνται ραδιενεργά φάρμακα, η ραδιοφάρμακα, για τη θεραπεία συγκεκριμένων τύπων καρκίνου. Τα φάρμακα αυτά δίνονται από το στόμα ή χορηγούνται ενδοφλεβίως και συγκεντρώνονται στο σημείο όπου υπάρχει ο καρκινικός όγκος, εκπέμπουν την ακτινοβολία τους και σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα. Τα ραδιοφάρμακα που αποτελούν πηγές ραδιενέργειας είναι σε υγρή μορφή και δημιουργούνται από ραδιενεργές ουσίες, οι οποίες ορισμένες φορές είναι συνδεδεμένες με ένα ειδικό αντίσωμα που ονομάζεται μονόκλωνο αντίσωμα το οποίο προσκολλάται σε καρκινικά κύτταρα. Για τη θεραπεία του καρκίνου του θυρεοειδούς, των οστών και του προστάτη χρησιμοποιούνται ραδιενεργό ιώδιο, στρόντιο και ράδιο (65-67). Οι κοινές παρενέργειες

της ακτινοθεραπείας είναι η κόπωση, ορισμένα προβλήματα στο δέρμα, η τριχόπτωση και η αναιμία. Ο ασθενής με αίσθημα κόπωσης νιώθει φυσική, διανοητική και συναισθηματική κούραση. Νιώθει δηλαδή ότι έχει λιγότερη ενέργεια να κάνει κάποιες δραστηριότητες τις οποίες κάνει ή επιθυμεί να κάνει υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η παρενέργεια αυτή είναι πολύ συχνή και η αντιμετώπιση της αποτελεί πολύ σημαντικό μέρος της θεραπείας. Σε ότι αφορά τα προβλήματα που εκδηλώνονται στο δέρμα, παρατηρείται ότι η περιοχή του δέρματος στην οποία χορηγείται η ακτινοθεραπεία έχει ερυθρό χρώμα, είναι ερεθισμένη, έχει υποστεί εξοίδηση ή φαίνεται σαν να έχει υποστεί έγκαυμα από τον ήλιο. Μετά από λίγες εβδομάδες ακτινοθεραπείας το δέρμα μπορεί να είναι ξηρό, με αίσθηση κνησμού και να ξεφλουδίζει. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται δερματίτιδα από χρήση ακτίνων. Με την ακτινοθεραπεία παρατηρείται απώλεια μαλλιών μόνο στη περιοχή που υφίσταται η θεραπεία. Για παράδειγμα, αν η ακτινοθεραπεία χορηγείται στη περιοχή της κεφαλής μπορεί να παρατηρηθεί απώλεια ορισμένης ποσότητας μαλλιών ή απώλεια όλων των μαλλιών συμπεριλαμβανομένων και των βλεφάρων και των φρυδιών. Στα περισσότερα άτομα μετά τη λήξη της ακτινοθεραπείας τα μαλλιά αναπτύσσονται και πάλι στο τριχωτό της κεφαλής τους. Σημαντικά προβλήματα δημιουργούνται ως επιπλοκή της ακτινοθεραπείας όταν αυτή εφαρμόζεται στην περιοχή του προσώπου και του τραχήλου. Στο βλεννογόνο της στοματικής κοιλότητας, εκδηλώνονται σταδιακά επώδυνες εξελκώσεις από της επίδραση της ακτινοβολίας και της ξηροστομίας που δημιουργείται λόγω βλάβης των σιελογόνων αδένων. Σε ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε ακτινοθεραπεία στην κεφαλή και στο τράχηλο θα πρέπει μα προηγείται οδοντιατρικός έλεγχος και να επιδιώκεται αυστηρή στοματική υγιεινή. Κατά τη διάρκεια των θεραπειών οι όποιες επιπλοκές αντιμετωπίζονται με φαρμακευτικά σκευάσματα, συγκεκριμένες οδηγίες και στενή παρακολούθηση από ειδικό Στοματικό και Γναθοπροσωπικό Χειρουργό. Σπάνια, η ακτινοθεραπεία μπορεί να μειώσει τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Σε περίπτωση που οι εξετάσεις αίματος του ασθενή δείξουν μείωση λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων, πιθανόν να καθυστερήσει η θεραπεία προκειμένου να επιστρέψουν οι τιμές των έμμορφων αυτών συστατικών του αίματος στις κανονικές τους τιμές. Η εκδήλωση της συγκεκριμένης παρενέργειας είναι περισσότερο πιθανή σε περίπτωση που στον καρκινοπαθή χορηγείται ταυτόχρονα και χημειοθεραπεία (65-67).

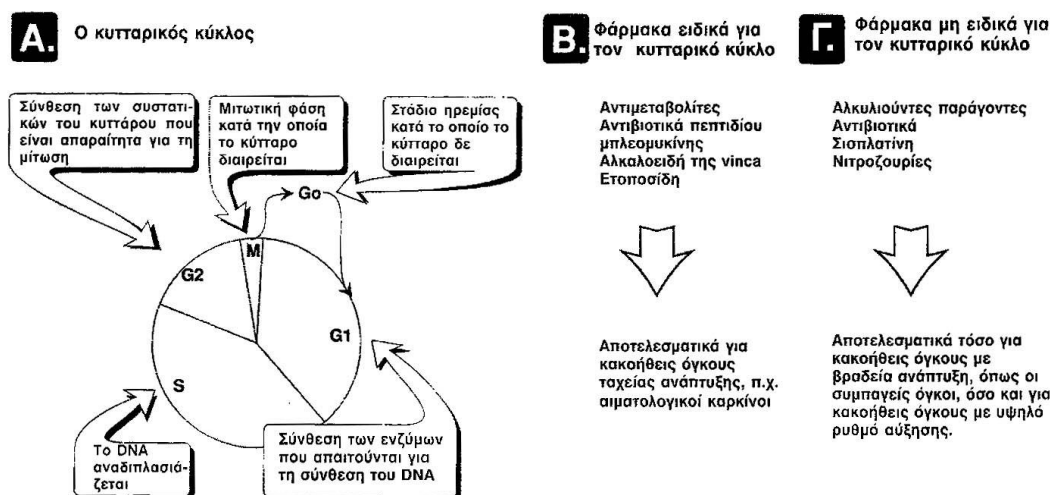
1.2.3 Χημειοθεραπεία

Σήμερα χρησιμοποιούνται περισσότερα από 100 χημειοθεραπευτικοί παράγοντες είτε από μόνοι τους είτε σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα ή χρησιμοποιείται και άλλου είδους αντικαρκινική θεραπεία. Τα φάρμακα αυτά ποικίλουν κατά πολύ σε ότι αφορά την χημική τους σύσταση, τον τρόπο που λαμβάνονται, τη χρησιμότητά τους στη θεραπεία ειδικών μορφών καρκίνου και τις παρενέργειές τους (68, 69)

Πολλά χημειοθεραπευτικά φάρμακα δρουν μόνο σε κύτταρα τα οποία αναπαράγονται ενεργά, και όχι σε κύτταρα που βρίσκονται στη φάση ηρεμίας του κυτταρικού κύκλου (G0 phase). Ορισμένα φάρμακα επιτίθενται ιδιαιτέρως σε κύτταρα που βρίσκονται σε συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου. Για παράδειγμα είτε επιτίθενται στα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση M (M phase), όπου σε αυτή τη φάση το κύτταρο διαιρείται σε 2 νέα, είτε στη φάση S (S phase) όπου τα χρωμοσώματα που περιλαμβάνουν το γενετικό κώδικα υπό τη μορφή του DNA αντιγράφονται έτσι ώστε και τα δύο νέα κύτταρα που θα προκύψουν να έχουν αντίστοιχο γενετικό υλικό. Η κατανόηση του τρόπου δράσης των φαρμάκων αυτών βοηθάει του ογκολόγους στο να προβλέπουν ποια φάρμακα λειτουργούν συνδυαστικά με σκοπό το καλύτερο αποτέλεσμα. Οι ιατροί επίσης, μπορούν να προγραμματίσουν πόσο συχνά θα γίνεται η χορήγηση του κάθε φαρμάκου με βάση τη χρονική διάρκεια των φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Σε ότι αφορά τον τρόπο δράσης των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων δεν είναι δυνατή η διάκριση ανάμεσα στα αναπαραγόμενα κύτταρα ενός υγιούς ιστού και στα καρκινικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη πρόκληση βλάβης και στα καρκινικά και στα φυσιολογικά κύτταρα (παρενέργειες φαρμάκου). Κάθε φορά που πραγματοποιείται χημειοθεραπεία, καταβάλλεται μια προσπάθεια να βρεθεί μια ισορροπία μεταξύ της καταστροφής των καρκινικών κυττάρων -προκειμένου να θεραπευτεί ή να ελεγχθεί η νόσος- και της προστασίας των φυσιολογικών κυττάρων, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι ανεπιθύμητες παρενέργειες (68, 69).

Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα εντάσσονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο δράσης, τη χημική τους δομή και την αλληλεπίδρασή τους με άλλα φάρμακα (Σχήμα 7). Ορισμένα φάρμακα δρουν με περισσότερους από ένα τρόπους και μπορεί να ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες. Η κατανόηση σχετικά με τον τρόπο λειτουργίας των φαρμάκων αυτών από τους ογκολόγους ιατρούς, είναι σημαντική σε ότι αφορά τη πρόβλεψη των παρενεργειών τους. Σε περίπτωση που χρησιμοποιούνται περισσότερα από

ένα φάρμακο, η κατανόηση του τρόπου λειτουργίας τους, βοηθάει στον ακριβή προγραμματισμό σχετικά με τη χρονική στιγμή που θα πρέπει να χορηγηθεί κάθε φάρμακο.



Σχήμα 7 Ενέργειες των χημειοθεραπευτικών ουσιών στον κύκλο ανάπτυξης των κυττάρων των θηλαστικών

Οι ομάδες των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων είναι (68, 69) :

1. Αλκυλιωτικοί παράγοντες: Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες προκαλούν άμεσα βλάβη στο DNA των κυττάρων έτσι ώστε να μην αναπαράγονται. Τα φάρμακα αυτά λειτουργούν σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία πολλών και διαφορετικών τύπων καρκίνου στους οποίους περιλαμβάνεται η λευχαιμία, το λέμφωμα, η νόσος του Hodgkin, το πολλαπλό μυέλωμα και το σάρκωμα όπως και ο καρκίνος του πνεύμονα, του μαστού και των ωοθηκών. Επειδή τα φάρμακα αυτά προκαλούν βλάβη στο DNA, είναι δυνατόν να προκαλέσουν μακροχρόνιες βλάβες στο μυελό των οστών. Σε σπάνιες περιπτώσεις, η παρενέργεια αυτή είναι δυνατόν να προκαλέσει οξεία λευχαιμία. Ο κίνδυνος πρόκλησης της λευχαιμίας αυξάνεται όσο αυξάνεται η δόση του φαρμάκου.
2. Αντιμεταβολίτες: Οι αντιμεταβολίτες παρεμβαίνουν στο DNA και στο RNA αντικαθιστώντας τα δομικά συστατικά των νουκλεϊκών αυτών οξέων. Οι παράγοντες αυτοί προκαλούν βλάβη στα κύτταρα κατά την φάση S του κυτταρικού κύκλου στην οποία αντιγράφονται τα χρωμοσώματα του κυττάρου.

Συνήθως χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των λευχαιμιών, του καρκίνου του μαστού, των ωοθηκών και του εντέρου καθώς και για τη θεραπεία άλλων ειδών καρκίνου. Στους αντιμεταβολίτες περιλαμβάνονται η 5-φθοριοουρακίλη, η 6-μερκαπτοπουρίνη, η καπεσιταβίνη, η κυταραβίνη, η φλοξουριδίνη, η φλουδαραβίνη, η γεμισιταβίνη, η υδροξουρία, η μεθοτρεξάτη και η πεμετρεξίδη (68, 69).

3. Αντιβιοτικά: Τα αντικαρκινικά αντιβιοτικά δεν έχουν το ίδιο τρόπο δράσης με τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των λοιμώξεων. Μεταβάλλουν το DNA των καρκινικών κυττάρων έτσι ώστε να μην πολλαπλασιάζονται. Αντικαρκινικά αντιβιοτικά είναι οι ανθρακυκλίνες οι οποίες παρεμβαίνουν στα ένζυμα αντιγραφής του DNA. Τα φάρμακα αυτά λειτουργούν σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Χρησιμοποιούνται ευρέως για διάφορα είδη καρκίνου. Στις ανθρακυκλίνες περιλαμβάνονται: η δαουνουροβικίνη, η δοξουροβικίνη, η επιρουβικίνη και η ιδαρουβικίνη. Τα φάρμακα αυτά είναι δυνατόν να προκαλέσουν μόνιμη βλάβη στη καρδιά εάν χορηγηθούν σε υψηλές δόσεις, για αυτό και υπάρχουν ανώτατα όρια στη δόση χορήγησης. Άλλα αντικαρκινικά αντιβιοτικά που δεν ανήκουν στις ανθρακυκλίνες είναι: η ακτινομυκίνη –D, η βλεομυκίνη, η μιτομυκίνη-C και η μιτοξαντρόνη η οποία δρα σαν αναστολέας τοποϊσομεράσης II (68, 69).
4. Αναστολείς της τοποϊσομεράσης: Οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης παρεμβαίνουν σε συγκεκριμένα ένζυμα που ονομάζονται τοποϊσομεράσες. Οι τοποϊσομεράσες βοηθούν στο διαχωρισμό των ελίκων του DNA οι οποίες αντιγράφονται κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία κάποιων συγκεκριμένων μορφών λευχαιμίας καθώς και του καρκίνου των πνευμόνων, των ωοθηκών και του γαστρεντερικού σωλήνα. Οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης ταξινομούνται σύμφωνα με τον τύπο του ενζύμου στο οποίο παρεμβαίνουν. Αναστολείς της τοποϊσομεράσης I είναι η τοποτεκάνη και η ιρινοτεκάνη. Αναστολείς της τοποϊσομεράσης II είναι η ετοποσίδη, η τενιποσίδη και η μιτοξαντρόνη η οποία δρα σαν αντικαρκινικό αντιβιοτικό. Οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης II είναι δυνατόν να αυξήσουν τον κίνδυνο εκδήλωσης οξείας μυελογενούς λευχαιμίας μέσα σε 2 με 3 μέρες από τη χορήγηση των φαρμάκων αυτών (68, 69).

5. Αναστολείς της μιτωτικής επεξεργασίας: Οι αναστολείς της μιτωτικής επεξεργασίας συνήθως είναι φυτικά αλκαλοειδή και άλλες χημικές ενώσεις που προέρχονται από φυσικά προϊόντα. Δρουν αναστέλλοντας τη μίτωση στη φάση Μ του κυτταρικού κύκλου αλλά είναι δυνατόν να προκαλέσουν βλάβη στα κύτταρα σε όλες τις φάσεις διακόπτοντας τη λειτουργία των ένζυμων που συνθέτουν πρωτεΐνες, οι οποίες είναι απαραίτητες για την αναπαραγωγή των κυττάρων. Στους αναστολείς της μιτωτικής επεξεργασίας περιλαμβάνονται: 1) οι ταξάνες που είναι η πακλιταξέλη και η ντοσεταξέλη 2) οι εποθιλόνες όπως είναι η ιξαβεπιλόνη 3) τα αλκαλοειδή της Vinca όπως είναι η βινβλαστίνη, η βινκριστίνη και η βινορελβίνη και 4) η εστραμουστίνη. Οι αναστολείς της μιτωτικής επεξεργασίας χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία πολλών διαφορετικών τύπων καρκίνου όπως είναι ο καρκίνος του μαστού, των πνευμόνων, τα μυελώματα, τα λεμφώματα και οι λευχαιμίες. Τα φάρμακα αυτά μπορεί να προκαλέσουν βλάβες στο νευρικό σύστημα για αυτό και υπάρχουν αυστηροί περιορισμοί στη δοσολογία με την οποία χορηγούνται. (42, 68, 69).
6. Κορτικοστεροειδή: Τα κορτικοστεροειδή είναι φυσικές ορμόνες και φάρμακα που λειτουργούν με τρόπο παρόμοιο με τις ορμόνες (hormone-like drugs). Όταν χρησιμοποιούνται ως θεραπεία για το καρκίνο, θεωρούνται χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Παραδείγματα κορτικοστεροειδών είναι η πρεδνιζόνη, η μεθυλπρεδνιζολόνη και η δεξαμεθαζόνη. Τα στεροειδή χρησιμοποιούνται για την αποτροπή της ναυτίας και του έμετου, που είναι συμπτώματα που προκαλούνται από τη χημειοθεραπεία. Επίσης, χρησιμοποιούνται πριν τη χημειοθεραπεία για την αποτροπή σοβαρών αλλεργικών αντιδράσεων (68, 69).

1.2.4 Άλλες μορφές αντικαρκινικής θεραπείας

Σκοπός είναι να αναπτυχθούν θεραπείες περισσότερο εκλεκτικές και ορθολογικές με στόχο τη μείωση της τοξικότητας των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων στα υγιή κύτταρα. Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα εκμεταλλεύονται το γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα διαιρούνται ταχέως, ενώ τα φάρμακα και οι θεραπείες που δεν χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία στοχεύουν σε άλλες ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων οι οποίες τα διαφοροποιούν τα καρκινικά κύτταρα από τα φυσιολογικά κύτταρα.

Τα φάρμακα και κάποιες βιολογικές ή μοριακές θεραπείες που δεν χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία έχουν λιγότερες παρενέργειες από ότι έχουν τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, γιατί στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα και όχι τα φυσιολογικά κύτταρα. Ορισμένα από αυτά τα φάρμακα και ορισμένες από αυτές τις θεραπείες χρησιμοποιούνται παράλληλα με τη χημειοθεραπεία (69).

Στις αντικαρκινικές αυτές θεραπείες ανήκουν οι στοχευμένες θεραπείες. Τα νέα αυτά φάρμακα επιτίθενται πιο εξειδικευμένα στα καρκινικά κύτταρα από ότι συμβαίνει με τα παραδοσιακά χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Τα περισσότερα από αυτά τα φάρμακα επιτίθενται σε κύτταρα με μεταλλαγμένες μορφές συγκεκριμένων γονιδίων ή σε κύτταρα τα οποία εκφράζουν υπερβολικά μεγάλο αριθμό από αντίγραφα ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν μέρος της κυρίας θεραπείας ή μετά τη κύρια θεραπεία για να μειωθεί ο κίνδυνος υποτροπής. Παραδείγματα φαρμάκων στοχευμένης θεραπείας είναι η ιματινίμπη, η σουνιτινίμπη και η βορτεζομίμπη (70)

Άλλα αντικαρκινικά φάρμακα που δεν θεωρούνται χημειοθεραπευτικά είναι οι παράγοντες διαφοροποίησης. Τα φάρμακα αυτά δρουν στα καρκινικά κύτταρα και ενεργοποιούν ενδογενείς μηχανισμούς διαφοροποίησης με σκοπό να επανέλθουν τα κύτταρα στη φυσιολογική διαδικασία ωρίμανσης και να αποβάλλουν τον καρκινικό φαινότυπο. Παραδείγματα τέτοιων φαρμάκων είναι τα ρετινοειδή, η τρετινοΐνη, το βηξαροτένιο και το τριοξειδίο του αρσενικού (71).

Μια άλλη αντικαρκινική θεραπεία είναι η ορμονοθεραπεία. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται είναι ορμόνες του φύλου ή φάρμακα που λειτουργούν με τρόπο παρόμοιο με τις ορμόνες, τα οποία μεταβάλλουν τη δράση ή τη παραγωγή των ορμονών των ανδρών ή των γυναικών. Χρησιμοποιούνται για να επιβραδύνουν την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού, του προστάτη και του ενδομητρίου, οι οποίοι αναπτύσσονται κανονικά σε απόκριση προς τις φυσιολογικές ορμόνες του σώματος. Οι ορμόνες αυτές για τη θεραπεία του καρκίνου δεν λειτουργούν με τον ίδιο τρόπο όπως συμβαίνει με τα κανονικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Δρουν είτε καθιστώντας τα καρκινικά κύτταρα ανάκατα στο να χρησιμοποιούν την ορμόνη που χρειάζονται για να αναπτυχθούν, είτε παρεμποδίζοντας τη σύνθεση μιας ορμόνης από τον οργανισμό. Παραδείγματα φαρμάκων ορμονοθεραπείας είναι: 1) τα αντι-οιστρογόνα που είναι η φουλβεστράντη, η ταμοξιφαίνη και η τορεμιφένη, 2) οι αναστολείς της αρωματάσης που είναι η αναστροζόλη, η εξεμεστάνη και η λετροζόλη, 3) οι προγεστίνες που είναι η οξική μεγεστρόλη, 4) τα

οιστρογόνα και 5) τα αντι-ανδρογόνα που είναι η βικαλουταμίδη, η φλουταμίδη και η νιλουταμίδη (72).

Μια ακόμα αντικαρκινική θεραπεία είναι η ανοσοθεραπεία, με την οποία χορηγούνται φάρμακα σε καρκινοπαθείς προκειμένου να ενισχυθεί το ανοσοποιητικό τους σύστημα έτσι ώστε να αναγνωρίζει και να επιτίθεται στα καρκινικά κύτταρα. Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι ανοσοθεραπείας. Η ενεργός ανοσοθεραπεία διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα του ίδιου του οργανισμού προκειμένου να καταπολεμηθεί η νόσος. Η παθητική ανοσοθεραπεία δεν βασίζεται στον οργανισμό για την επίθεση ενάντια στη νόσο. Δημιουργούνται κάποιες πρωτεΐνες του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως είναι τα αντισώματα, έξω από το σώμα και χορηγούνται για την καταπολέμηση του καρκίνου. Παραδείγματα ενεργού ανοσοθεραπείας είναι: 1) η θεραπεία μονοκλωνικών αντισωμάτων όπου χορηγούνται η ριτουξιμάβη και η αλεμτουζουμάμπη, 2) η μη-ειδική ανοσοθεραπεία και τα ενισχυτικά που είναι ουσίες ή κύτταρα που διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα, όπως είναι η ιντερλευκίνη-2 και η ιντερφερόνη-α 3) η χορήγηση ανοσορρυθμιστικών φαρμάκων όπως είναι η θαλιδομίδη και η λεναλιδομίδη. Τα εμβόλια για τον καρκίνο είναι ένας τύπος ενεργού ανοσοθεραπείας (73).

1.3 Σύμπλοκα λευκόχρυσου (σισπλατίνη)

Η ανακάλυψη της σισπλατίνης το 1960 αποτέλεσε το έναυσμα μίας καινούργιας εποχής στη θεραπεία του καρκίνου. Η σύνθεσή της έγινε για πρώτη φορά το 1845 και το 1893 ο Alfred Werner κατέληξε στη δομή της. Το 1960 ο Rosenberg και οι συνάδελφοι του ανακάλυψαν ότι η ηλεκτρόλυση ενός ηλεκτροδίου πλατίνας έδωσε ως αποτέλεσμα την παραγωγή σισπλατίνης. Αργότερα, η ίδια ομάδα δοκίμασε με επιτυχία τη δράση μερικών συμπλόκων πλατίνας σε σαρκώματα αρουραίων.

1.3.1 Κλινική χρήση

Το 1971, η σισπλατίνη εφαρμόστηκε για πρώτη φορά σε ασθενείς με καρκίνο. Έγινε διαθέσιμη για κλινική χρήση το 1978, ως Platinol® (Bristol-Myers Squibb). Η σισπλατίνη έδειξε ισχυρή αντικαρκινική δράση ευρέος φάσματος και επομένως αναπτύχθηκε ευρεία έρευνα στον τομέα του σχεδιασμού των φαρμάκων για να βρεθούν νέα είδη μετάλλων, που δεν περιέχουν πλατίνα, με ισχυρότερη αντικαρκινική δράση και λιγότερες παρενέργειες.

Όμως η αποτελεσματικότητα της σισπλατίνης συχνά συνοδεύεται από τοξικές παρενέργειες και αντίσταση στην θεραπεία του καρκίνου, γεγονός που οδηγεί σε δευτερογενείς κακοήθειες.

Η σισπλατίνη είναι ένα από τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα σύμπλοκα και δρα σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων κακοηθειών. Οι ενώσεις της πλατίνης χρησιμοποιούνται στην θεραπεία του καρκίνου των όρχεων, της ουροδόχου κύστης, του οισοφάγου, του μαστού, του μικροκυτταρικού και μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, του τραχήλου της μήτρας, του στομάχου και του προστάτη, στα λεμφώματα Hodgkin και μη Hodgkin, στα σαρκώματα, στο πολλαπλό μυέλωμα, το μελάνωμα και το μεσοθηλίωμα.

Παρά την αποτελεσματική δράση των ενώσεων σισπλατίνης, οι ασθενείς, που λαμβάνουν αυτές τις ενώσεις, εμφανίζουν παρενέργειες, οπότε αυτό περιορίζει και την δόση χορήγησης. Οι παρενέργειες της σισπλατίνης περιλαμβάνουν την ανεπαρκή παραγωγή κυττάρων του αίματος και αιμοπεταλίων στο μυελό των οστών (μυелоκαταστολή), τη μειωμένη απάντηση στις λοιμώξεις (ανοσοκαταστολή), τη ναυτία και τον έμετο. Οι πιο συνηθισμένες παρενέργειες περιλαμβάνουν τη νεφροτοξικότητα, τη νευροτοξικότητα και την απώλεια ακοής .

1.3.2 Μηχανισμός δράσης

Η σισπλατίνη μπορεί να δεσμευθεί σε όλες τις βάσεις του DNA, αλλά έχει προτίμηση στις N-7 θέσεις της αδενίνης και της γουανίνης εξαιτίας της υψηλής νουκλεϊνικής συγγένειας των N-7 θέσεων των πουρινικών βάσεων (74, 75) Ένας πιθανός στόχος της σισπλατίνης είναι τα τελομερή, τα οποία είναι περιοχές πλούσιες σε γουανίνη που βρίσκονται στα άκρα των χρωμοσωμάτων (76). Ουσιαστικά οι πλούσιες περιοχές σε γουανίνη αποτελούνται από επαναλήψεις της αλληλουχίας 5'-TTAGGG-3' και προστατεύουν τα χρωμοσώματα από την υδρόλυση. Τα τελομερή, στα περισσότερα κύτταρα σταδιακά βραχύνονται με την πάροδο της ηλικίας, γίνονται μη λειτουργικά και προκαλείται κυτταρικός θάνατος μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης. Όμως, έχει διαπιστωθεί ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα παρακάμπτουν την βράχυνση των τελομερών μέσω της ενεργοποίησης των τελομερασών και της εναλλακτικής επιμήκυνσης των τελομερών. Από αυτήν την οπτική γωνία η στόχευση των τελομερών και των τελομερασών αποτελεί μια θεραπευτική προσέγγιση (77). Η δυνατότητα παρεμπόδισης της σύνθεσης DNA εμφανίζεται σε πολύ πιο χαμηλές δόσεις από αυτές που χρειάζονται για να παρεμποδιστεί η σύνθεση πρωτεϊνών ή RNA

(78). *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο μόριο της σισπλατίνης και του DNA μπορεί να συμβάλλει στην παραγωγή ριζών ανιόντος του υπεροξειδίου του οξυγόνου προκαλώντας επιπρόσθετη τοξικότητα στα νεοπλασματικά κύτταρα (79).

Ο τρόπος δράσης της σισπλατίνης και η επιτυχία της ως αντικαρκινικό φάρμακο σε καμία περίπτωση δεν εμποδίζει την έρευνα ταυτοποίησης των δράσεων συμπλόκων άλλων μετάλλων. Αντίθετα, χρησιμεύει ως πρωτόκολλο για το σχεδιασμό των κατάλληλων πειραμάτων. Η συχνή εμφάνιση αντίστασης των νεοπλασματικών κυττάρων στη σισπλατίνη είναι ένας μεγάλος περιορισμός στην κλινική χρήση του φαρμάκου αυτού (80, 81).

1.3.3 Δεύτερης και τρίτης γενιάς σύμπλοκα της πλατίνας

Οι περιορισμοί στη χρήση της σισπλατίνης έδωσαν το έναυσμα για την έρευνα νέων, λιγότερο τοξικών συμπλόκων με πλατίνα. Τα δεύτερης και τρίτης γενιάς σύμπλοκα της πλατίνας, στα οποία συγκαταλέγεται η καρβοπλατίνη και η οξαλιπλατίνη, συντέθηκαν για να αυξήσουν την αντικαρκινική δράση και να μειώσουν την τοξικότητα της σισπλατίνης (82). Η καρβοπλατίνη είναι μια αποτελεσματική θεραπεία για νεοπλάσματα μήτρας και ωοθηκών, καθώς και εγκεφάλου (83) ενώ η οξαλιπλατίνη είναι κλινικά εγκεκριμένη για τη θεραπεία νεοπλασιών του παχέος εντέρου που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στη δράση της σισπλατίνης (84).

Η έρευνα για άλλα αντικαρκινικά φάρμακα τα οποία θα είχαν ως βάση τα μέταλλα είχε ξεκινήσει με τον σχεδιασμό συμπλόκων που δομικά ήταν ίδια με την σισπλατίνη, με βάση δηλαδή τη θεωρία ότι η όμοια δομή οδηγεί σε παρόμοια δράση (85). Παρόλα αυτά, η δράση των συμπλόκων αυτών δεν εξαρτάται μόνο από την παρουσία του μετάλλου αυτού καθαυτού, αλλά και από τον αριθμό και τον τύπο των υποκαταστατών του και τη συνδυαστική γεωμετρία του συμπλόκου. Άλλες ιδιότητες που παίζουν επίσης καθοριστικό ρόλο στη βιολογική δραστηριότητα των συμπλόκων μετάλλων είναι η κινητική αστάθεια, η οξειδοαναγωγική τους δράση και το ηλεκτρικό τους φορτίο. Αυτές οι ιδιαίτερες ιδιότητες ώθησαν τις έρευνες για την ανακάλυψη συμπλόκων μετάλλων με αντικαρκινική δράση που έχουν ποικίλους μηχανισμούς δράσης (86).

1.4 Σαρκώματα

Τα σαρκώματα είναι μια ομάδα κακοήθων νεοπλασμάτων με μεσεγχυματογενή προέλευση. Διακρίνονται σε σαρκώματα εκ μαλακών μορίων και σε σαρκώματα των οστών. Περίπου το 80% αναπτύσσονται στα μαλακά μόρια και 20% στα οστά. Η κατανόηση της παθογένειας τους είναι αρκετά δύσκολη λόγω των πολλαπλών ιστολογικών χαρακτηριστικών, των διαφορετικών ανατομικών σημείων που εντοπίζονται και της διαφορετικής βιολογικής τους συμπεριφοράς. Χαρακτηριστικό τους είναι ότι μεθύστανται αιματογενώς.

Σύμφωνα με το Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) τα σαρκώματα εκ μαλακών μορίων κατατάσσονται ιστολογικά ως εξής (87):

Όγκοι λιπώδους ιστού

Αποδιαφοροποιημένο λιποσάρκωμα (*Dedifferentiated liposarcoma*)

Μυξοειδές λιποσάρκωμα (*Myxoid liposarcoma*)

Πλειομορφικό λιποσάρκωμα (*Pleomorphic liposarcoma*)

Ινοϊστιοκυτταρικοί όγκοι

Πλειομορφικό κακοήθες ινώδες ιστοκύτωμα (*Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma, MFH*) / αδιαφοροποίητο πλειομορφικό σάρκωμα (*undifferentiated pleomorphic sarcoma*)

MFH γιγαντοκυττάρων / αδιαφοροποίητο πλειομορφικό σάρκωμα από γιγαντοκύτταρα

Φλεγμονώδης MFH (*Inflammatory MFH*) / αδιαφοροποίητο πλειομορφικό σάρκωμα με εμφανή φλεγμονή (*undifferentiated pleomorphic sarcoma with prominent inflammation*)

Όγκοι σκελετικών μυών

Ραβδομυοσάρκωμα (*Rhabdomyosarcoma*)

Όγκοι εκ λείων μυϊκών μυών

Λειομυοσάρκωμα (*Leiomyosarcoma*)

Περιαγγειακοί όγκοι

Γλομαγγείωμα (*Malignant glomus tumor*)

Όγκοι αγγείων και λεμφαγγείων

Αγγειοσάρκωμα (*Angiosarcoma*)

Επιθηλοειδές αιμαγγειοενδοθηλίωμα (*Epithelioid hemangioendothelioma*)

Ινοβλαστικοί & μυοϊνοβλαστικοί όγκοι

Ινοσάρκωμα (*Adult fibrosarcoma*)

Μυξοϊνοσάρκωμα (*Myxofibrosarcoma*)

Χαμηλού βαθμού ινομυξοσάρκωμα (*Low-grade fibromyxoid sarcoma*)

Επιθηλοειδές ινοσάρκωμα σκληρό (*Sclerosing epithelioid fibrosarcoma*)

Όγκοι κρανιακών και περιφερικών νεύρων

Κακοήθης όγκος εξ'ελύτρου περιφερικών νεύρων, νευροινোসάρκωμα (*Malignant peripheral nerve sheath tumor or MPNST, neurofibrosarcoma*)

MPNST με ραβδομυοσάρκωμα (*Malignant Triton tumor -MPNST with rhabdomyosarcoma*)

Όγκος κοκκιωδών κυττάρων (*Malignant granular cell tumor*)

Γαστρεντερικοί όγκοι αυτόνομων νεύρων (*Gastrointestinal autonomic nerve tumor - plexosarcoma*)

Αρχέγονος νευροεξωδερμικός όγκος του ΚΝΣ (*neuroblastoma, and peripheral neuroectodermal tumor, PNET*)

Εξωσκελετικοί

Μεσεγχυματικό χονδροσάρκωμα (*Mesenchymal chondrosarcoma*)

Εξωσκελετικό οστεοσάρκωμα (*Extraskelatal osteosarcoma*)

Όγκοι αγνώστου ιστογένεσης

Συνοβιακό σάρκωμα (*Synovial sarcoma*)

Επιθηλιοειδές σάρκωμα (*Epithelioid sarcoma*)

Διαυγοκυτταρικό σάρκωμα μαλακών ιστών (*Clear cell sarcoma of the soft tissue*)

Χαρακτηριστικό των σαρκωμάτων εκ μαλακών μορίων είναι ότι δεν προέρχονται από ώριμα και διαφοροποιημένα κύτταρα του ιστού αυτού. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων που οδηγεί στη διαφοροποίηση των ανώριμων μεσεγχυματικών κυττάρων προς συγκεκριμένο τύπο μεσεγχυματικών κυττάρων (δεδομένου του γεγονότος ότι τα διπλοειδή κύτταρα περιέχουν τη γενετική πληροφορία) (87).

Τα νεοπλάσματα αυτά είναι σχετικώς σπάνια στη στοματική κοιλότητα και ενώ συμπεριφέρονται γενικά όπως τα ενδοστοματικά καρκινώματα από πλευράς κλινικής πορείας και πρόγνωσης ως προς την επιβίωση, η αντιμετώπισή τους δεν είναι παρόμοια διότι και πιο ακτινοάντοχοι όγκοι είναι (εκτός από τα δικτυολεμφοσαρκώματα) και οι χειρουργική τους πιο ήπια αφού σχεδόν ουδέποτε δίνουν επιχώριες λεμφαδενικές μεταστάσεις.

Άλλες διαφορές από τα καρκινώματα αποτελούν το ότι τα σαρκώματα παρουσιάζονται σε σχετικώς μικρότερης ηλικίας άτομα και εκδηλώνουν μεγάλες διακυμάνσεις στην κακοήθειά τους.

Θεραπευτικά εφαρμόζεται ριζική (ακρωτηριαστική συχνά) αγωγή (γναθεκτομή) αλλά σε σπάνιες περιπτώσεις επεκτείνεται η επέμβαση στον τράχηλο για ριζική εκσκαφή. Γενικά αποσκοπείται η εξασφάλιση από την πιθανή υποτροπή. Η απόμακρη μετάσταση που βέβαια είναι αιματογενής δεν ελέγχεται και η μόνη πιθανή πρόληψη είναι η κατά το δυνατό πρόωπη (έγκαιρη) χειρουργική αφαίρεση της πρωτοπαθούς βλάβης σε υγιή βάση.

Σε απόλυτα ακτινευαίσθητους όγκους, όπως το λεμφοσάρκωμα ή το δικτυοσάρκωμα, η ακτινοθεραπεία είναι μέθοδος εκλογής θεραπείας, ενώ σε σχετικά ευαίσθητους (σάρκωμα του Ewing) αυτή συνδυάζεται με τη χειρουργική. Η διάκριση των διαφόρων μεσεγχυματογενών κακοήθων όγκων γίνεται ανάλογα με τον ιστό προέλευσής τους.

Στη μεγαλύτερη πλειοψηφία οι όγκοι εκ μαλακών μορίων είναι καλοήθεις (η αναλογία καλοηθών προς κακοηθών είναι 100:1) (88). Ο καθορισμός όχι μόνο του ιστολογικού τύπου αλλά και του υπότυπου αποτελεί έναν σημαντικό προγνωστικό και πολλές φορές προβλεπτικό παράγοντα της ανταπόκρισης στην εφαρμοζόμενη θεραπεία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το λιποσάρκωμα στο οποίο οι 5 διαφορετικοί υπότυποι του έχουν διαφορετική βιολογική συμπεριφορά και κατ' επέκταση πρόγνωση.

Στη συνέχεια θα αναφέρουμε τους δύο ιστολογικούς τύπους σαρκωμάτων που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα διατριβή.

1.4.1 Λειομυοσάρκωμα

Το λειομυοσάρκωμα είναι ένας κακοήθης όγκος αποτελούμενος από κύτταρα, φέροντα διακριτά χαρακτηριστικά λείων μυϊκών κυττάρων. Οι αιτίες που οδηγούν στην εμφάνιση λειομυοσαρκωμάτων είναι άγνωστες. Εμφανίζονται συνήθως σε ηλικίες μεγαλύτερες των 50 ετών.

Οι άνθρωποι με λειομυοσάρκωμα συνήθως δεν παρουσιάζουν κανένα σύμπτωμα. Τα περισσότερα λειομυοσαρκώματα διαγιγνώσκονται αφού το άτομο εκδηλώσει κάποια συμπτώματα όπως οίδημα, τυμπανισμό ή κοιλιακό πόνο, πόνο σε οποιοδήποτε σημείου του σώματος και αιμορραγία από τον κόλπο σε εμμηνόπαυση ή αλλαγή της περιόδου σε γυναίκες που δε βρίσκονται σε εμμηνόπαυση. Οποιοδήποτε άτομο παρατηρήσει αυτά τα συμπτώματα θα πρέπει να επικοινωνήσει με τον προσωπικό του ιατρό χωρίς βεβαία να σημαίνει ότι αυτά αποτελούν και ένδειξη καρκίνου καθώς μπορεί να προκληθούν από πολλές άλλες αιτίες.

Η διάγνωση γίνεται με :

1. Υστεροσκόπηση
2. Υπέρηχους
3. Αξονική τομογραφία
4. Μαγνητική τομογραφία

5. Βιοψία

Το λειομυοσάρκωμα αντιμετωπίζεται:

1. Με χειρουργική εκτομή
2. Με ακτινοθεραπεία.
3. Με χημειοθεραπεία. Χρησιμοποιείται συνήθως για τη θεραπεία λειομυοσαρκώματος που έχει υποτροπιάσει ή έχει δώσει μεταστάσεις. Ορισμένες φορές χρησιμοποιείται και μετά τη χειρουργική επέμβαση ώστε να μειωθούν οι πιθανότητες υποτροπής.

1.4.2 Οστεοσάρκωμα

Το οστεοσάρκωμα είναι μια κακοήθης νεοπλασία στην οποία τα νεοπλασματικά κύτταρα παράγουν οστικό ιστό. Είναι ο πιο συχνός πρωτοπαθής τύπος σαρκώματος των οστών. Η νεοπλασία είναι πρωτοπαθής όταν το εν τω βάθει οστό είναι φυσιολογικό και δευτεροπαθής όταν έχει τροποποιηθεί από διάφορες καταστάσεις όπως ακτινοβολία και συνύπαρξη νόσου Paget, ή από άλλες διαταραχές. Παρουσιάζει μια διτροπική κατανομή: εμφανίζεται κυρίως στις ηλικίες των 10-16 ετών και σε μικρότερο ποσοστό σε ενήλικες (30% των περιπτώσεων σε άτομα άνω των 40 ετών) (89). Επιπλέον το οστεοσάρκωμα είναι το πιο κοινό σάρκωμα που προκαλείται από την ακτινοβολία. Είναι άγνωστης αιτιολογίας, αν και έχει παρατηρηθεί ότι η αυξημένη συχνότητα πρωτοπαθούς οστεοσαρκώματος σχετίζεται με αρκετά γενετικά σύνδρομα όπως το Li-Fraumeni, το κληρονομικό ρετινοβλάστωμα και το σύνδρομο Rothmund Thomson.

Το πρωτοπαθές οστεοσάρκωμα μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιοδήποτε οστό, αν και στη συντριπτική τους πλειοψηφία τα οστεοσαρκώματα προέρχονται από μεγάλα οστά των άκρων, και συγκεκριμένα από το μηριαίο οστό (30%), από την κνήμη (15%) και από το βραχιόνιο οστό (15%). Τα οστά αυτά έχουν τις περισσότερες αυξητικές πλάκες. Στα μακρά οστά, ο καρκίνος εντοπίζεται κυρίως (90%) στη μετάφυση και εμφανίζεται ως μια ευμεγέθους ψηλαφητή μάζα ενώ ο πόνος είναι προοδευτικός (90).

Το διαγνωστικό χαρακτηριστικό του οστεοσαρκώματος είναι η ανίχνευση οστεώδους μάζας που παράγεται από τα κακοήθη κύτταρα. Ωστόσο, ο πιο συνηθισμένος τύπος οστεοσαρκώματος, το συμβατικό οστεοσάρκωμα, έχει ένα ευρύ φάσμα ιστολογικών εικόνων και κατηγοριοποιείται σε υπότυπους ανάλογα με τον επικρατέστερο τύπο

στρώματος (οστεοβλαστικό, χονδροβλαστικό, ινοβλαστικό, πλούσιο σε γιγαντοκύτταρα κτλ) αν και αυτή η κατηγοριοποίηση δεν έχει προγνωστική αξία (89).

1.5 Σύμπλοκα βαναδίου στη χημειοθεραπεία του καρκίνου

Το βανάδιο είναι ένα ιχνοστοιχείο το οποίο είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική λειτουργία ενός μεγάλου αριθμού οργανισμών. Ο ρόλος του ως μικροθρεπτικό συστατικό στην ανθρώπινη διατροφή δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί.

Το βανάδιο εισέρχεται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της αναπνοής, της λήψης τροφής και του δέρματος και αποθηκεύεται σε συγκεκριμένα όργανα όπως το ήπαρ, οι νεφροί και τα οστά (71, 91, 92).

Μετά την ανακάλυψη της αντικαρκινικής δράσης της σισπλατίνης η έρευνα σχετικά με τις αντικαρκινικές ιδιότητες συμπλόκων μετάλλων, συμπεριλαμβανομένου και του βαναδίου, προσέλκυσε το ερευνητικό ενδιαφέρον. Πρωτοπόροι στην ερεύνα του βαναδίου ήταν οι English et al. και Thompson et al., οι οποίοι έθεσαν τα θεμέλια της έρευνας του βαναδίου ως πιθανό χημειοθεραπευτικό παράγοντα (93)

1.5.1 Μεταβολισμός, κατανομή και βιοκινητική του βαναδίου

Το βαναδικό (V) με την είσοδο του στον οργανισμό ανάγεται σε βαναδύλιο (IV) από τη γλουταθειόνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων ή από το ασκορβικό οξύ καθώς και από άλλους αναγωγικούς παράγοντες του πλάσματος. Στη συνέχεια μεταφέρεται μέσω της αλβουμίνης και της τρανσφερίνης (94).

Στα κύτταρα το βανάδιο (V) εισέρχεται μέσω του μηχανισμού μεταφοράς ανιόντων (95, 96), ανάγεται σε βαναδύλιο (V) από την ενδοκυττάρια γλουταθειόνη (94) και προσδένεται σε πρωτεΐνες. Η αναγωγή του βαναδίου ρυθμίζεται από κυτταρικούς μηχανισμούς οξειδοαναγωγής οι οποίοι ελέγχουν το ισοζύγιο μεταξύ των διαφόρων καταστάσεων οξειδώσεως του βαναδίου (91, 97). Κατανέμεται κυρίως στο πυρήνα και σε διαλυτά υπερκείμενα κλάσματα (91, 97, 98) ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι προσδένεται και σε συγκεκριμένους άμινο-, καρβόξυ- και φώσφο- υποκαταστάτες (99, 100). Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι το βανάδιο συσσωρεύεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα καρκινικά κύτταρα και στους καρκινικούς ιστούς από ότι στα φυσιολογικά κύτταρα και ιστούς (101, 102), ιδιαίτερα σε περιοχές που είναι πλούσιες σε νουκλεϊκά οξέα (103).

Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι το βανάδιο συσσωρεύεται κυρίως στους νεφρούς, στη σπλήνα, στα οστά, στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό στους πνεύμονες και στους όρχεις με τη μορφή βαναδυλίου (IV) (71, 104). Το βανάδιο αποβάλλεται ταχύτατα από τους νεφρούς με βιολογικό χρόνο ημίσειας ζωής περίπου 20-40 ώρες στα ούρα (105).

1.5.2 Τοξικότητα του βαναδίου

Οι τοξικές δράσεις των συμπλόκων βαναδίου σχετίζονται με το είδος του οργανισμού, τη δοσολογία, την οδό και τη διάρκεια χορήγησης καθώς και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των συμπλόκων. Τα άλατα βαναδίου συνήθως προκαλούν γαστρεντερικές διαταραχές, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μελετών σε ανθρώπους που έπασχαν είτε από ΣΔ είτε από καρδιαγγειακή νόσο και τα λάμβαναν για σύντομα χρονικά διαστήματα (ως 1 μήνα) (106-108). Η λήψη για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα προκάλεσε ανορεξία, απώλεια βάρους και κοιλιακό άλγος σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο (109).

Στα πειραματόζωα οι πιο συχνές τοξικές δράσεις των συμπλόκων βαναδίου είναι οι λειτουργικές διαταραχές και οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στο ήπαρ και τους νεφρούς (110). Τοξικές δράσεις έχουν καταγραφεί επίσης και στις αναπαραγωγικές και αναπτυξιακές λειτουργίες επίμυων και ποντικών όπως και μειωμένος ρυθμός συλλήψεων και εμβρυϊκής ανάπτυξης (110). Υπάρχουν όμως και μελέτες σε υγιείς και διαβητικούς επίμυες που δεν αναφέρουν επιβλαβείς δράσεις των συμπλόκων βαναδίου σε αιματολογικές παραμέτρους ή στη λειτουργία του ήπατος και των νεφρών (111-113). Ακόμα και η μακροχρόνια λήψη (4 με 6 μήνες) 0.5 mg/κιλό ΣΒ βαναδίου (III και V) δεν προκαλεί τοξικότητα σε καρκινοπαθείς επίμυες (114, 115).

Στα συμπτώματα οξείας τοξικότητας που έχουν αναφερθεί από μελέτες σε πειραματόζωα περιλαμβάνεται η αδυναμία, η απώλεια της όρεξης, η αφυδάτωση, η σημαντική απώλεια βάρους, η ρινική αιμορραγία, η αιμορραγία των πνευμόνων, η νέκρωση του λεμφικού ιστού, η σωληναριακή νέκρωση και ο θάνατος. Οι επιπτώσεις αυτές είναι τόσο χρόνο-εξαρτώμενες όσο και δοσο-εξαρτώμενες μετά από υποδόρια ή ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση των συμπλόκων βαναδίων (116). Το βανάδιο V(V) είναι πιο τοξικό από το V(IV) (117). Επίσης τα οξειδία του βαναδίου έχει αναφερθεί ότι προκαλούν μεγαλύτερες βλάβες στα διάφορα όργανα (ήπαρ, σπλήνα, καρδιά και μυελό των οστών) από ότι τα άλατα βαναδίου (118). Τέλος, η εμφάνιση βραχυπρόθεσμων και

μακροπρόθεσμων παρενεργειών από τα σύμπλοκα βαναδίου εξαρτάται από το ρυθμό απορρόφησης του βαναδίου από τους ιστούς και από τα όργανα του οργανισμού (92).

Συμπερασματικά, τα σύμπλοκα βαναδίου δεν εμφανίζουν ισχυρές τοξικές δράσεις όταν προσλαμβάνονται από το στόμα και όταν ο χρόνος χορήγησης αλλά και η καθημερινή δόση δεν οδηγούν σε συσσώρευση του βαναδίου στα διάφορα όργανα.

1.5.3 Κυτταρικοί μηχανισμοί δράσης των συμπλόκων βαναδίου

Η δράση διάφορων συμπλόκων βαναδίου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό έχει μελετηθεί σε ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών σειρών. Τα αποτελέσματα δείχνουν στη πλειονότητά τους ότι τα σύμπλοκα αναστέλλουν το πολλαπλασιασμό των κυττάρων αν και σε ορισμένες περιπτώσεις τον αυξάνουν. Σημαντικό ρόλο φαίνεται πως διαδραματίζει η συγκέντρωση του συμπλόκου καθώς υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις ($<10^{-10}\text{M}$) τα άλατα βαναδίου διεγείρουν το πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων ενώ σε υψηλές τον αναστέλλουν ($>10^{-10}\text{M}$) (119)

Όσον αφορά τους μηχανισμούς δράσης τους αυτοί περιλαμβάνουν την αναστολή του κυτταρικού κύκλου (120-122), την αλληλεπίδραση με το DNA (123, 124) τη σχάση του μορίου του DNA (118, 125-130) κυρίως μέσω της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (125, 126, 129, 130) και κυρίως της ρίζας του υδροξυλίου ($\text{OH}^\bullet$) (125)

Η ικανότητα ρύθμισης της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών (όπως της AP-1, MEK-1, ERK-1, JNK-1, PI-3K και του NF-kB) από τα σύμπλοκα βαναδίου έχει αποδειχτεί από ένα μεγάλο αριθμό μελετών (18, 120, 131-133). Οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και την βλάβη του DNA. Η ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών ρυθμίζεται μέσω της φωσφορυλίωσης των τυροσινών και εξαρτάται από τη δραστηριότητα των κυτοσολικών φωσφατασών της τυροσίνης και των φωσφοκινασών που ρυθμίζουν τη φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση κομβικών πρωτεϊνών στη μεταγωγή του σήματος.

1.5.4 Αντιμεταστατικές ιδιότητες

Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για τις αντιμεταστατικές ιδιότητες των συμπλόκων βαναδίου:

1. Η φωσφορυλίωση της τυροσίνης η οποία επάγεται από τα σύμπλοκα βαναδίου μπορεί να επηρεάσει το «δυναμικό μετάστασης» των καρκινικών κυττάρων, ρυθμίζοντας τη προσκόλληση στο υπόστρωμα του κυττάρου (134) ή την σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους καθώς και τη διαμόρφωση του κυτταρικού σκελετού ακτίνης (135, 136). Οι πρωτεΐνες προσκόλλησης συμμετέχουν στη μετάσταση και στη διήθηση του καρκίνου σε άλλους ιστούς (137).

Μια ένωση η οποία αναστέλλει την επαγωγή των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών προσκόλλησης ICAM-1, V-CAM-1 και ELAM-1 είναι το σύμπλοκο του βαναδικού με υπεροξειδίου του υδρογόνου (perovanadate). Δρα πιθανόν μέσω της αδρανοποίησης των φωσφατασών της πρωτεΐνης τυροσίνης (PTPs) και της επικείμενης αναστολής του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF) (138). Η παρατεταμένη επώαση κυττάρων τα οποία εκφράζουν μεταλλαγμένα παράγωγα της E-καντχερίνης οδηγεί σε σταδιακή απώλεια της ικανότητας προσκόλλησης των κυττάρων μεταξύ τους και αλλαγές στο κυτταροσκελετό της ακτίνης λόγω της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης που υπάρχει στα μόρια προσκόλλησης του κυττάρου (136)

2. Η αναστολή της αιματογενούς διασποράς του καρκίνου μέσω της ενεργοποίησης της επαγόμενης από τον όγκο ενδογενούς ινόλυσης και της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (137, 139) . Ενώσεις όπως το βαναδικό αναστέλλουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων δρώντας ως αναστολείς της φωσφατάσης και ως διεγέρτες του υποδοχέα της ουροκινάσης για την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου (140) και ως αναστολείς της επαγόμενης από το κολλαγόνο συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (141). Το ορθοβαναδικό δρα είτε αναστέλλοντας την εξαρτώμενη από την ιντεγκρίνη αποφωσφορυλίωση της τυροσίνης P38 και P40 και την πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο ινωδογόνο (142) (142) είτε επάγοντας την αναστολή της δραστηριότητας της φωσφατάσης και αναστέλλοντας την ικανότητα των αιμοπεταλίων να προσκολληθούν μεταξύ τους (143).

Η καθημερινή εκ του στόματος λήψη ενός συμπλόκου βαναδίου-κυστεΐνης [vanadium(III)-cysteine], σε χαμηλές δόσεις βαναδίου (0.5 mg/kg ΣΒ) σε καρκινοπαθείς επίμυες Wistar (λειομυοσάρκωμα) αναστέλλει σημαντικά την εμφάνιση μεταστάσεων στους πνεύμονες (ως και 80%) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα που έλαβε θειικό βανάδιο (IV), σε αντίστοιχη χαμηλή δόση βαναδίου (144) .

1.5.5 Αντικαρκινικές δράσεις των συμπλοκών βαναδίου

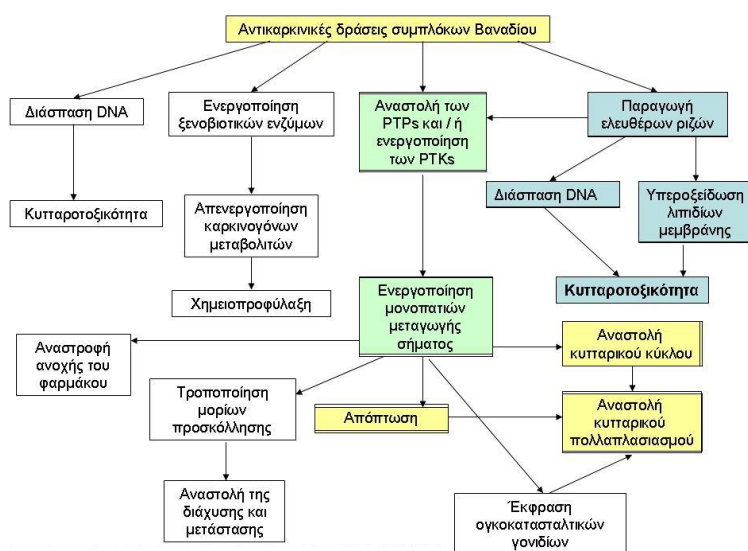
Οι αντικαρκινικές δράσεις των συμπλοκών βαναδίου έχουν μελετηθεί ευρέως σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων καθώς και σε πειραματικά καρκινικά μοντέλα πειραματόζωων.

Πρώτος ο Thompson et al. παρατήρησε ότι η χορήγηση θεικού βαναδυλίου IV (25 μM) σε θηλυκούς επίμυες Sprague-Dewley με καρκίνο του μαστού (που προκλήθηκε με τη χρήση MNU-1, 1-methyl-1-nitrosurea) οδηγεί σε μείωση τόσο της συχνότητας εμφάνισης καρκίνου, όσο και στον αριθμό καρκίνων που εμφανίστηκαν, καθώς και σε παράταση του μέσου χρόνου ζωής χωρίς καρκίνο (93). Άλλα πειράματα στο ίδιο τύπο επίμυων αλλά με τη χρήση DMBA (7,12-dimethyl-benz(α)-anthracene) για τη πρόκληση καρκίνου του μαστού, έδειξαν ότι ο εμπλουτισμός του πόσιμου νερού των πειραματόζωων με μονοβαναδικό αμμώνιο (0.5 μM) και η κατανάλωση του από αυτά κατά βούληση, οδηγεί σε σημαντική μείωση της συχνότητας εμφάνισης, του συνολικού αριθμού και του μεγέθους των ψηλαφητών όγκων καθώς και σε αύξηση του μέσου χρόνου της λανθάνουσας περιόδου εμφάνισης του καρκίνου. Οι δράσεις αυτές του βαναδίου ελεγχόταν από τη τροποποίηση του αντιοξειδωτικού δυναμικού του ήπατος των πειραματόζωων, καθώς και τη διαφοροποίηση της Φάσης I και Φάσης II των ενζύμων μεταβολισμού των φαρμάκων (145). Περαιτέρω έρευνες του μεταβαναδικού αμμωνίου σε επίμυες Sprague-Dawley έδειξαν ότι η χημειοπροστατευτική δράση του οφείλεται στην αναστολή των αλλοιώσεων που προκαλούνται στο ήπαρ και στη ανάπτυξη οξειδίων κατά τα αρχικά στάδια του μετασχηματισμού των νεοπλασμάτων (145, 146). Η δράση του βαναδίου αποδόθηκε στην ρύθμιση της δραστηριότητας της γ -GT (γ -γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάση) και στη βελτίωση του αιματολογικού προφίλ (αύξηση του αιματοκρίτη, της αιμοσφαιρίνης και του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων). Φαίνεται ότι το βανάδιο δρα στα αρχικά στάδια της ηπατοκαρκινογένεσης και όχι στην εξέλιξή της. Τέλος, στο ίδιο μοντέλο καρκίνου έχει δείχτεί ότι το βανάδιο ρυθμίζει την αύξηση των ενζύμων της Φάσης II η οποία οδηγεί στη μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης καρκινογόνων ουσιών (147).

Η αντικαρκινική δράση του βαναδικού αμμωνίου έχει μελετηθεί και σε αρσενικά αλμπίνο ποντίκια με ασκίτη από λέμφωμα Dalton και στα οποία η χορήγησή του σε χαμηλές δόσεις παράτεινε το χρόνο επιβίωσής τους, αυξάνοντας τη συγκέντρωση των ηπατικών ενζύμων (glutathione-S-transferase και UDP-glucuronyl transferase) καθώς και

του κυτοχρώματος P450 (148). Σε μια άλλη μελέτη σε αλμπίνο ποντίκια με ασκίτη από λέμφωμα Dalton η χορήγηση μεταβαναδικού αμμωνίου (0.05 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}/\text{ποντίκι}/\text{ημέρα}$) οδήγησε σε σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων καθώς και σε αύξηση της ερυθροποιητίνης, η οποία βελτίωσε το αιματολογικό προφίλ των καρκινοπαθών ποντικών (149). Ωστόσο, σε υψηλότερες δόσεις (0.01-0.1 $\mu\text{g}/\text{ποντίκι}/\text{ημέρα}$) το μεταβαναδικό αμμώνιο μειώνει το χρόνο επιβίωσης των καρκινοπαθών ποντικών και τον αριθμό των καρκινικών κυττάρων (150). Η παραγωγή ελευθέρων ριζών φαίνεται να είναι ένας ακόμα τρόπος με τον οποίο ασκούν αντικαρκινική δράση τα σύμπλοκα βαναδίου. Σύμφωνα με την μελέτη των Cruz et al., η υποδόρια χορήγηση ορθοβαναδικού (500 $\mu\text{g}/\text{ποντίκι}/\text{ημέρα}$ για 9 ημέρες) οδηγεί σε σημαντική μείωση της ανάπτυξης όγκων σε ποντίκια με λεμφοσάρκωμα (151). Τα βαναδοκένια έχουν αποδειχτεί ότι είναι ισχυρές αντικαρκινογόνες ενώσεις λόγω της ικανότητας παρέμβασης του βαναδίου στις βάσεις του DNA και την αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων (103, 124). Η χορήγηση ενός συμπλόκου βαναδίου-κυστεΐνης [vanadium(III)-cysteine], σε χαμηλές δόσεις βαναδίου (0.5 mg/kg ΣΒ) σε καρκινοπαθείς επίμυες Wistar με λειομυοσάρκωμα παράτεινε το χρόνο ζωής και μείωσε το ρυθμό ανάπτυξης των όγκων των πειραματόζωων (115). Τέλος, υπάρχουν και ερευνητές που έχουν αναφέρει ότι η λήψη βαναδικού (V) μέσω της τροφής ή του νερού δεν έχει κανένα όφελος σε ποντίκια με καρκίνο του παχέος εντέρου (151).

Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί της αντικαρκινικής δράσης των συμπλόκων βαναδίου παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.



Σχήμα 8 Προτεινόμενοι μηχανισμοί της αντικαρκινικής δράσης των συμπλόκων βαναδίου (152)

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης δύο συμπλόκων βαναδίου με διαφορετικούς υποκαταστάτες. Η μελέτη της σχέσης μεταξύ της δομής και της δραστηριότητας των ενώσεων αυτών έγινε με σκοπό να διευκρινιστούν οι παράγοντες που πιθανά συμβάλλουν στη βιολογική τους δράση, ώστε τελικά να παρασκευαστούν νέα αντικαρκινικά φάρμακα με βάση το βανάδιο με όσο το δυνατόν μικρότερη τοξικότητα και ανεπιθύμητες ενέργειες αλλά και με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και αποτελεσματικότητα.

II. ΕΙΔΙΚΟΣ ΜΕΡΟΣ

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

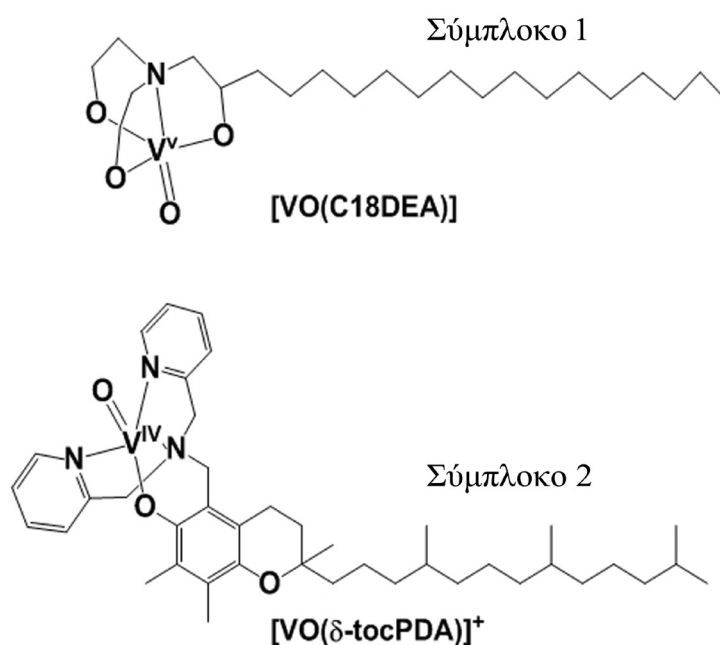
3.1 Υλικά και αντιδραστήρια

1. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with low glucose (1g/L), sterile, Gibco[®] by Life technologies[™], 31885-023
2. Fetal Bovine Serum (FBS), sterile, Biochrom AG, S0115
3. L-Glutamine 200mM (100X), Sterile, Gibco[®] by Life technologies[™], 25030-024
4. Penicillin-Streptomycin (10000Units/ml Penicilin, 10000μg/ml streptomycin), sterile, Gibco[®] by Life technologies[™], 15140-122
5. Trypsin/EDTA Solution (0.05%/0.02% w/v) in PBS w/o Ca²⁺, w/o Mg²⁺, sterile, Biochrom AG, L2143
6. Phosphate Buffered Saline (PBS), Sigma-Aldrich[®]
7. Ethanol absolute, Sigma-Aldrich[®], 24194
8. MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, approx. 97.5% TLC), M5655, Sigma-Aldrich[®]
9. Dimethylsulfoxid, 60153, Riedel-de Haen
10. Propidium Iodide solution, P4864, Sigma
11. Τρυβλία καλλιέργειας κυττάρων και ιστών Petri (100x20mm και 60x15mm), Cellstar[®], greiner bio-one, 664 160 και 628 160
12. Σιφώνια Pasteur (Pasteur pipettes) γυάλινα-225mm, ISOLAB *Laborgeräte GmbH*, 084.01.002
13. Σιφώνια (Pipettes) των 25, 10 και 5ml, Costar[®], Corning Incorporated, 4250, 4101, 4051
14. Πλαστικοί σωλήνες falcon (15 ή 50ml), Cellstar[®] Tubes, sterile, 118 271 και 227 261
15. Σωλήνες Eppendorf, Ρύγχη πιπετών διαφόρων μεγεθών
16. Πιπέττες μηχανικές άντλησης και έγχυσης (0.5-2, 2-20, 20-200, 100-1000μl), Orange Scientific
17. Ηλεκτρονική Αντλία για σιφώνια, pipetus[®]-akku, Hirschmann Laborgeräte

18. Εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νηματικής ροής, (cell/tissue culture hood) Faster BHA 48, Italy
19. Επωαστής (επωαστικός κλίβανος), Galaxy B, RS Biotech CO2 Incubator, CMB Scientific, USA
20. Οπτικό ανεστραμμένο μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσεως) Olympus CK2 με λάμπα αλογόνου (6V, 20W)
21. Υδατόλουτρο, memmert GmbH + Co.KG, Schwabach FRG, Germany
22. Αυτόκαυστο, Prestige Medical Autoclave 2100 Series, camlab

3.2 Σύμπλοκα βαναδίου

Τα σύμπλοκα βαναδίου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή συντέθηκαν από το εργαστήριο του Επίκουρου Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου της Λευκωσίας, κ. Αναστάσιο Κεραμιδά. Η δομή των συμπλόκων παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.



Σχήμα 9 Δομή των δύο συμπλόκων βαναδίου τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

3.3 Κυτταρικές σειρές

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν:

1. Λειομυοσαρκωματικά κύτταρα επίμυος Wistar (LMS)
2. Κύτταρα οστεοσαρκώματος ανθρώπου, επιθηλιακού τύπου (U2-OS)
3. Φυσιολογικοί εμβρυϊκοί ινοβλάστες πνεύμονα ανθρώπου (MRC-5).

3.3.1 Λειομυοσαρκωματικά κύτταρα επίμυος Wistar (LMS)

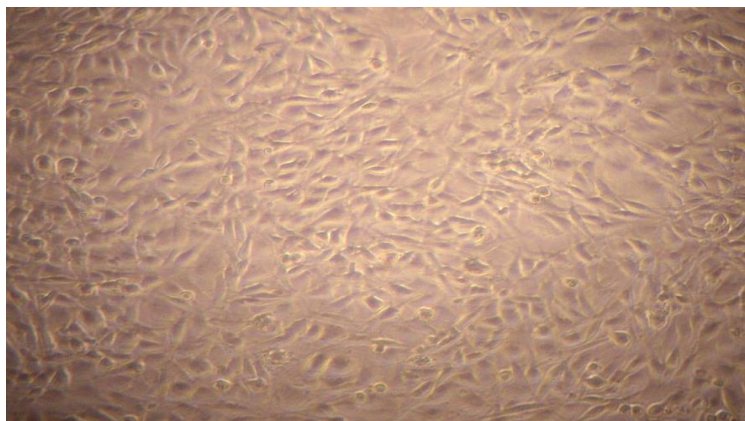
Τα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα του επίμυος Wistar που χρησιμοποιήθηκαν παρήχθησαν ως εξής: Από μία ομάδα συγγενών πειραματόζωων η οποία ανήκει στην 7η γενεά ομομικτικής αναπαραγωγής ελήφθησαν 3 αρσενικά και 3 θηλυκά ζώα στα οποία χορηγήθηκε κατόπιν αναισθητοποίησης ποσότητα βενζοπυρενίου (B[a]P) (115, 153). Μετά την παρέλευση 110-135 ημερών όλα τα ζώα ανέπτυξαν όγκους, οι οποίοι στην πλειοψηφία τους χαρακτηρίστηκαν ιστολογικά ως λειομυοσαρκώματα. Οι βιοψίες σε όλα τα ζώα έγιναν κατόπιν αναισθητοποίησης με διαιθυλικό αιθέρα και τα κακοήγη κύτταρα ελήφθησαν με βιοπτική βελόνα. Από τους όγκους των ζώων που είχαν χαρακτηριστεί ως λειομυοσαρκώματα ελήφθησαν (κάτω από άσηπτες συνθήκες και κατόπιν αναισθητοποίησης με κεταμίνη – μιδαζολάμη) τεμάχια μεγέθους 0.5 cm^2 τα οποία ετέθησαν αμέσως σε ψυχρό διάλυμα Ringer.

Κατόπιν τα ιστοτεμάχια κατατμήθηκαν περαιτέρω ώστε να προκύψουν τεμαχίδια μεγέθους περί το 1 mm^2 τα οποία ελήφθησαν άσηπτα από το Ringer και ετέθησαν σε 20 ml διαλύματος θρυψίνης 0.25%. Η επώαση των τεμαχίων γινόταν υπό ήπια ανάδευση και ανά 15 min λαμβανόταν το υπερκείμενο το οποίο τοποθετούνταν σε άσηπτους πλαστικούς σωλήνες (falcon) για περαιτέρω επεξεργασία (φυγοκέντρωση – τέλος 1ου κύκλου θρυψινισμού). Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκε 1 ml Fetal Bovine Serum (FBS) για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης και ακολούθησε φυγοκέντρωση. Το ίδιο χρονικό διάστημα, πριν από την έναρξη του 2ου κύκλου θρυψινισμού, προκειμένου τα τεμαχίδια του όγκου να παραμείνουν βιώσιμα, προστέθηκαν 10 ml DMEM ώστε η δράση της θρυψίνης να ανασταλεί. Ταυτοχρόνως οι προηγούμενοι δοκιμαστικοί σωλήνες που περιείχαν το εναιώρημα των καρκινικών κυττάρων του όγκου που αποκολλήθηκαν με θρυψίνη φυγοκεντρούνταν στις 1200 rpm για 5 min ώστε τα αιωρούμενα καρκινικά κύτταρα να καταπέσουν στον πυθμένα. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης απορρίπτονταν το υπερκείμενο, προσθέτονταν 10 ml PBS, επαναιωρούταν τα κύτταρα με ήπιες

αναρροφητικές κινήσεις της πιπέττας και ακολουθούσε φυγοκέντρωση τους στις ίδιες συνθήκες. Απορριπτόταν ξανά το υπερκείμενο, προσθέτονταν 10 ml DMEM με 10% FBS και κατόπιν πραγματοποιούνταν σπορά του νέου εναιωρήματος ώστε 1 ml αυτού να τίθεται σε τρυβλίο Petri με 9 ml DMEM με 10% FBS (τελικός όγκος καλλιέργειας 10 ml). Τα κύτταρα επωάζονταν σε επωαστή (37°C, 95% O₂, 5% CO₂) και ελέγχονταν οπτικά μία φορά την ημέρα (Εικόνα 1). Όταν δημιουργούσαν πλήρες ταπήτιο γινόταν έκπλυση με 10 ml PBS, αποκόλληση των κυττάρων με 1 ml διαλύματος θρυψίνης και επανασπορά σε καινούργια τρυβλία.

Ο έλεγχος της φύσης των κυττάρων αυτών έγινε με δύο τρόπους:

- Με τυπικό μικροσκοπικό έλεγχο
- Με βιολογική δοκιμασία



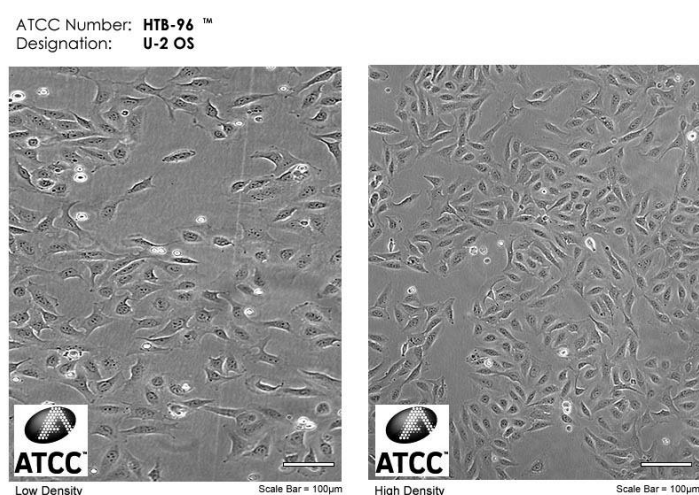
Εικόνα 1 Κύτταρα LMS

Η βιολογική δοκιμασία της νεοπλασματικής φύσης των κυττάρων αυτών γινόταν ως εξής: Από πρόσφατες κυτταροκαλλιέργειες των οποίων τα κύτταρα ήταν σε μεγάλο ποσοστό βιώσιμα γινόταν λήψη μεγάλων αριθμών κυττάρων τα οποία ενοφθαλμιζονταν σε επίμυες Wistar που ανήκαν στην ομομικτική σειρά ζώων από τους οποίους είχε γίνει η λήψη του αρχικού όγκου. Πριν τον ενοφθαλμισμό κάθε ένα από τα ζώα – λήπτες αναισθητοποιούνταν με κεταμίνη – μιδαζολάμη και υποβαλλόταν σε χειρουργική τομή κατά πρώτο σκοπό. Το μήκος της τομής ήταν περίπου 2 cm. Οι υποδόριοι ιστοί παρεκτοπίζονταν μέσω απώθησης με λαβίδα και κατόπιν η μυϊκή στοιβάδα που αποκαλύπτονταν τραυματιζόταν με ήπιους νυγμούς ώστε να προκαλείται μια μικρή τοπική αιμορραγία. Γινόταν εναπόθεση των καρκινικών κυττάρων ($4-8 \times 10^6$ κύτταρα/ml διαλύματος Hank) στη μικρή πληγή που είχε δημιουργηθεί. Μετά τον ενοφθαλμισμό των

κυττάρων γινόταν σφικτή συρραφή της τομής. Τόσο η διάνοιξη της τομής, όσο και η σύγκλισή της γινόταν υπό άσηπτες συνθήκες. Ο επιτυχής ενοφθαλμισμός των καρκινικών κυττάρων οδηγούσε σε ταχεία ανάπτυξη όγκου στην περιοχή (10-20 ημέρες). Από τους αναπτυχθέντες όγκους γινόταν, κατόπιν αναισθητοποίησης, λήψη δείγματος με βιοπτική βελόνα και ιστοπαθολογικός έλεγχος των κυττάρων. Σε όλες τις περιπτώσεις το αποτέλεσμα της βιοψίας ήταν θετικό για λειομυοσάρκωμα. Επίσης, τα επιτυχώς ενοφθαλμισμένα ζώα με καρκινικά κύτταρα ανέπτυξαν όλα τα χαρακτηριστικά της νεοπλασματικής νόσου τόσο σε τοπικό όσο και σε συστηματικό επίπεδο (τοπική αύξηση όγκου, νεο-αγγειογέννεση, διήθηση παρακείμενων ιστών, αιματογενή διασπορά, διήθηση λεμφαδένων, απομακρυσμένη μετάσταση, απίσχναση, αναιμία, θάνατος). Οι όγκοι κατά τη στιγμή του θανάτου είχαν μέγεθος που προσέγγιζε από 38-45 % της συνολικής μάζας του σώματος.

3.3.2 Κύτταρα οστεοσαρκώματος ανθρώπου, επιθηλιακού τύπου (U2-OS)

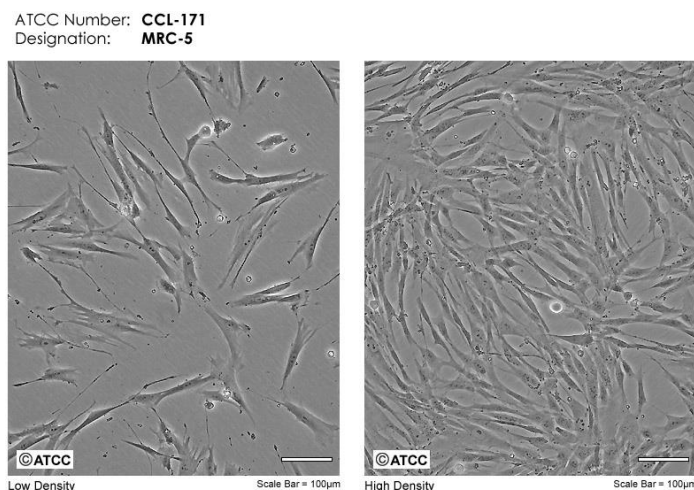
Η κυτταρική σειρά U2-OS, αρχικά γνωστή ως κυτταρική σειρά 2T, προέρχεται από τον οστικό ιστό κοριτσιού ηλικίας 15 ετών που έπασχε από οστεοσάρκωμα. Καθιερώθηκε ως κυτταρική σειρά το 1964, με τα αρχικά κύτταρα να προέρχονται από μετρίως διαφοροποιημένο σάρκωμα του οστού της κνήμης (Εικόνα 2).



Εικόνα 2 Κύτταρα U2-OS

3.3.3 Φυσιολογικοί εμβρυϊκοί ινοβλάστες πνεύμονα ανθρώπου (MRC-5).

Η κυτταρική σειρά MRC-5 αναπτύχθηκε το 1966 από τον ιστό του πνεύμονα ενός εμβρύου 14 εβδομάδων, του οποίου η κύηση της 27 ετών και σωματικά υγιούς μητέρας του διακόπηκε για ψυχιατρικούς λόγους. Έχουν μορφολογία φυσιολογικών ινοβλαστών (Εικόνα 3).



Εικόνα 3 Κύτταρα MRC-5

3.4 Αποθήκευση και απόψυξη κυττάρων

Η διατήρηση των κυττάρων εκτός επωαστή και εκτός κυτταροκαλλιέργειας για μεγάλο χρονικό διάστημα είναι εφικτή με την φύλαξή τους είτε σε ψυγείο βαθιάς κατάψυξης (-80°C για περίπου 6μήνες με 1 χρόνο) είτε σε υγρό άζωτο (-192°C για αρκετά χρόνια).

Σε ένα τρυβλίο Petri (10mm) 70-80% πληρότητας ταπητίου αναρροφείται το θρεπτικό υλικό, πραγματοποιείται πλύση με 2x5ml PBS και προσθήκη 1 ml θρυψίνης. Το τρυβλίο τοποθετείται στον επωαστή για 2-5min. Τα αποκολλημένα κύτταρα επαναιωρούνται σε 9ml PBS, μεταφέρονται σε πλαστικούς αποστειρωμένους σωλήνες Falcon (15 ml) και φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 3500rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1 ή 2ml διαλύματος συντήρησης, το οποίο αποτελείται από 90% FBS και 10% DMSO v/v. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε ειδικές αμπούλες (cryogenic vials) του 1 ml και αποθηκεύτηκε αμέσως είτε στους -86°C είτε στο υγρό άζωτο.

Για το ξεπάγωμα των κυττάρων, η αμπούλα με τα κύτταρα αφήνεται εντός της εστίας της κυτταροκαλλιέργειας ώστε να ξεπαγώσει σταδιακά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα κύτταρα (μαζί με το διάλυμα συντήρησης) μεταφέρονται σε ένα τρυβλίο μαζί με 8 ή 9 ml θρεπτικού υλικού (ανάλογα με αμπούλα) το οποίο αναδεύεται προσεκτικά και τοποθετείται εντός του επωαστικού κλιβάνου. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιείται απόρριψη του θρεπτικού υλικού και προσθήκη νέου.

3.5 Καλλιέργεια κυττάρων

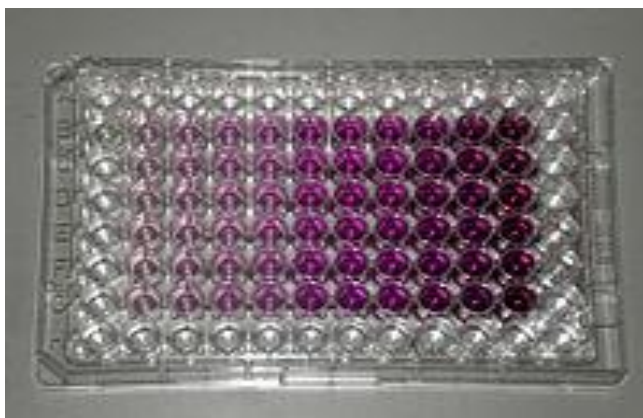
Τα κύτταρα LMS και U2-OS καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM), Low glucose (1gr/l), με την προσθήκη 10% εμβρυϊκού βοδινού ορού (Fetal Bovine Serum), 1% πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης και 0.5% L-γλουταμίνης, ενώ για κύτταρα MRC5 προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και 1% L-γλουταμίνη. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂.

3.6 Μέτρηση αριθμού κυττάρων

Ο προσδιορισμός του αριθμού ή της συγκέντρωσης των κυττάρων σε ένα κυτταρικό εναιώρημα πραγματοποιείται με το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο με αναρρόφηση και γίνεται πλύση των κυττάρων με 2x5ml PBS. Προστίθεται 1ml θρυψίνης και το τρυβλίο τοποθετείται στον επωαστή για 2-5min. Στη συνέχεια πραγματοποιείται οπτικός και μικροσκοπικός έλεγχος για να επιβεβαιωθεί η αποκόλληση κυττάρων από τον πυθμένα του τρυβλίου. Έπειτα γίνεται προσθήκη 9ml θρεπτικού υλικού (τελικός όγκος μαζί με την θρυψίνη 10ml) και ήπια ανάδευση για την καλύτερη ομοιογένεια του δείγματος (να μην υπάρχουν συσσωματώματα κυττάρων). Με μια ηλεκτρονική αντλία σιφωνίου το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετείται σε ένα σωλήνα Falcon 15ml. Πραγματοποιείται λήψη 10-11μl από το κυτταρικό εναιώρημα και τοποθετείται προσεκτικά στην πλάκα Neubauer. Η πλάκα Neubauer τοποθετείται στο οπτικό μικροσκόπιο (σκοτεινού πεδίου) όπου με κατάλληλη μεγέθυνση γίνεται μέτρηση των κυττάρων.

3.7 Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Πραγματοποιείται σπορά 5000 κυττάρων σε ένα πολυτρυβλίο 96 φρεατίων. Μετά από επώαση 24 ωρών σε επωαστικό θάλαμο σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂ πραγματοποιείται η προσθήκη της ουσίας (χημειοθεραπευτικός παράγοντας, σύμπλοκο, υποκαταστάτης) στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Τα κύτταρα επωάζονται για άλλες 48 ώρες. Ακολουθεί η προσθήκη 50μl MTT (3mg/ml) και νέα επώαση για 3 ώρες. Με προσοχή αφαιρείται το υπερκείμενο διάλυμα και η διάλυση των κρυστάλλων που σχηματιστήκαν στο ταπήτιο του πολυτρυβλίου γίνεται με την προσθήκη 200μl DMSO και ήπια ανάδευση με τη χρήση πολυπιπέττας. Η απορρόφηση σε κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου και για κάθε συγκέντρωση ουσίας πραγματοποιείται στα 540nm (η απορρόφηση υποβάθρου-background absorbance μετρήθηκε στα 690 nm) με τη χρήση ενός φασματοφωτόμετρου (Multiskan Spectrum, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4 Κύτταρα σε πολυτρυβλίο 96 θέσεων μετά από 3 ώρες επώαση με το MTT

3.8 Ικανότητα σχηματισμού αποικιών

Πραγματοποιήθηκε σπορά LMS κυττάρων σε πολυτρυβλία 24x. Μετά από 24h επώασης των πολυτρυβλίων προστέθηκαν οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, τα σύμπλοκα και οι υποκαταστάτες σε διάφορες συγκεντρώσεις. Έπειτα από 48 ώρες επώασης μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο neubauer όπως αναφέρεται παραπάνω. Υπολογίστηκε ο συνολικός αριθμός των κυττάρων σε κάθε φρεάτιο και ο κατάλληλος όγκος κυτταρικού εναιωρήματος που αντιστοιχούν 5.000 κύτταρα. Στην περίπτωση που δεν υπάρχουν 5.000 κύτταρα τότε λαμβάνεται ο συνολικός όγκος. Ο όγκος αυτός στη συνέχεια προστέθηκε σε τρυβλία 90 mm που περιείχαν 10 ml DMEM. Τα τρυβλία

επώαστηκαν για 3 ημέρες και πραγματοποιήθηκε αλλαγή θρεπτικού υλικού. Μετά από 4 ημέρες επιπλέον επώασης, αναρροφήθηκε το DMEM, έγινε πλύση με 10 ml PBS και προστέθηκαν 10 ml μείγματος μεθανόλης / οξικού οξέος σε αναλογία 3:1. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε καταψύκτη στους -20 °C για 10 λεπτά. Έπειτα αφαιρέθηκαν τα 10 ml του μείγματος και τα τρυβλία αφέθηκαν με ανοιχτό καπάκι μέσα σε απαγωγό χώρο για να στεγνώσουν. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 ml χρωστικής Giemsa, αραιωμένη με νερό 1:10, και αφέθηκε για 20 λεπτά για να βαφτούν οι αποικίες. Μετά το πέρας του εικοσάλεπτου τα τρυβλία πλύθηκαν αρκετά καλά με νερό βρύσης για να απομακρυνθεί η χρωστική (οι αποικίες είναι μονιμοποιημένες και δεν μπορούν να αποκολληθούν με το πλύσιμο) και αφέθηκαν να στεγνώσουν πολύ καλά. Οι εμφανείς βαμμένες αποικίες καταμετρήθηκαν και υπολογίστηκε σε ποσοστό επί τοις εκατό ο αριθμός των αποικιών πειράματος σε σχέση με τις αποικίες ελέγχου.

3.9 Κυτταρικός κύκλος – Απόπτωση κυττάρων

Για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου και του προσδιορισμού της απόπτωσης πραγματοποιήθηκε σπορά 60.000 LMS κυττάρων σε πολυτρυβλία 6 φρεατίων. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες και έπειτα πραγματοποιήθηκε η προσθήκη των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, των συμπλόκων βαναδίου και των υποκαταστατών σε διάφορες συγκεντρώσεις. Μετά από επώαση για 48 ώρες αναρροφήθηκε το υπερκείμενο, έγινε πλύση με 3ml PBS και προστέθηκαν 0.3 ml θρυψίνης σε κάθε φρεάτιο. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 5 λεπτά στους 37°C έως ότου αποκολληθούν τα κύτταρα. Προστέθηκαν 3ml PBS και τα κύτταρα αναδεύτηκαν ήπια με την χρήση πιπέτας. Αφού αποκολλήθηκαν πλήρως συλλέχθηκαν σε falcon και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3.500 rpm. Το υπερκείμενο απορρίφτηκε και τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρήθηκαν σε 50 ng/ml ιωδιούχο προπίδιο, σύμφωνα με τους (154). Η ανάλυση της κατανομής κυτταρικού κύκλου πραγματοποιήθηκε σε κυτταρόμετρο ροής (BD FACSCalibur) και τα δεδομένα αναλύθηκαν με το λογισμικό CellQuest V.3.1.

3.10 Στατιστική ανάλυση και δημιουργία γραφημάτων

Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ σταθερή απόκλιση. Για το προσδιορισμό στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των μέσων χρησιμοποιήθηκε το

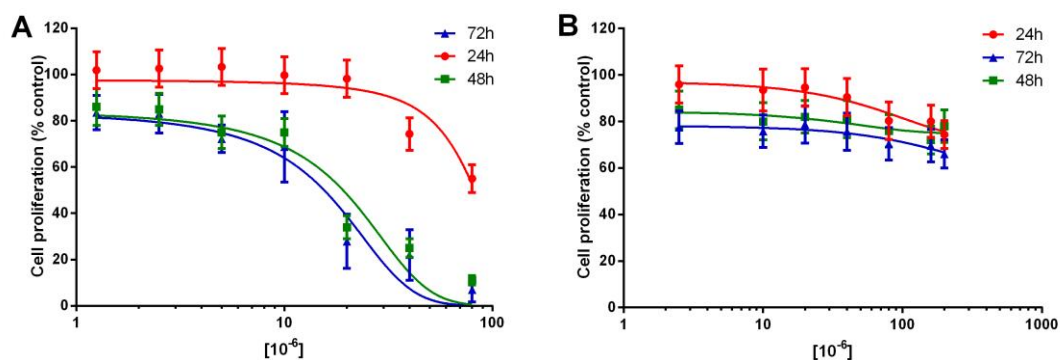
Student's t-test. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS 16.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, USA). Η ανάλυση των δεδομένων και ο υπολογισμός της IC₅₀ κυτταροτοξικότητας των χημειοθεραπευτικών παραγόντων, των συμπλόκων και των υποκαταστατών τους έγινε με το μοντέλο Μη Γραμμικής Παλινδρόμησης: Dose-Response-Inhibition: log(inhibitor) vs normalized response – Variable slope.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Μελέτη της κυτταροτοξικότητας της σισπλατίνης και της μεθοτρεξάτης

4.1.1. Σε κύτταρα MRC5, LMS και U2-OS

Η δράση της σισπλατίνης στους φυσιολογικούς ινοβλάστες είναι εμφανής μετά τις πρώτες 48 ώρες επώασης και παραμένει σχεδόν αμετάβλητη και στις 72 ώρες. Αντιθέτως η μεθοτρεξάτη δεν εμφανίζει κυτταροτοξική δοσο- ή χρόνο-εξαρτώμενη δράση (Γράφημα 1).

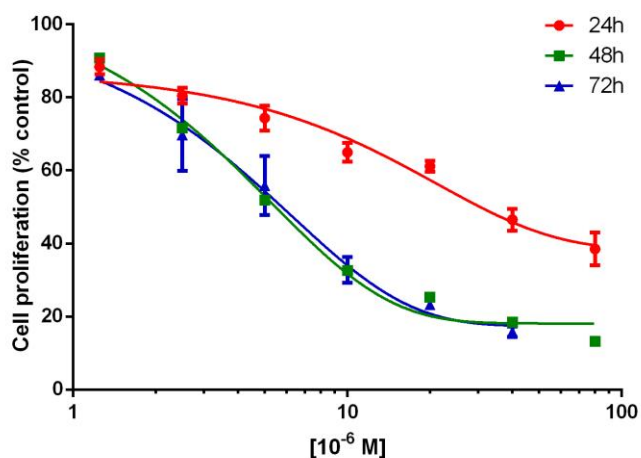


Γράφημα 1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MRC5 κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις σισπλατίνης (A) και μεθοτρεξάτης (B). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.

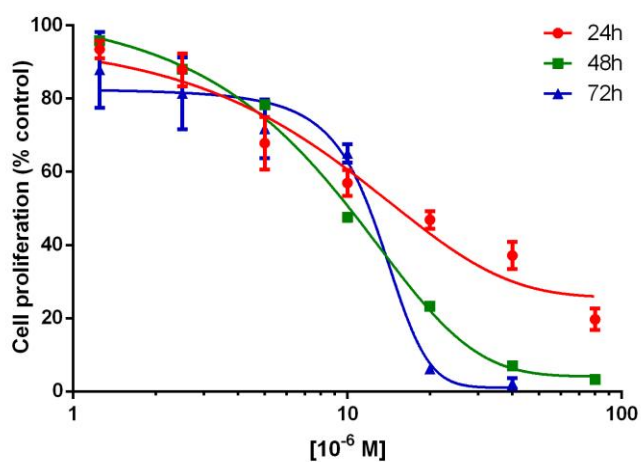
Η σισπλατίνη εμφάνισε δοσο-εξαρτώμενη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των LMS κυττάρων, ο οποίος σημείωσε έντονη πτώση μετά τις 24 ώρες. Η δράση της σισπλατίνης μεγιστοποιείται μετά από 48 ώρες, καθώς δεν καταγράφηκε περαιτέρω αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων μετά από 72 ώρες επώασης (Γράφημα 2). Η τιμή IC₅₀ με τη μέθοδο MTT ήταν 48.4±8.5 μM για τις 24 ώρες, 8.1±2.2 μM για τις 48 ώρες και 8.0±1.9 μM για τις 72 ώρες (Συγκεντρωτικός Πίνακας 1 στο τέλος του Κεφαλαίου).

Τα κύτταρα U2-OS ενώ στις 24 πρώτες ώρες επώασης εμφάνισαν μεγαλύτερη ευαισθησία στη σισπλατίνη από ότι τα LMS κύτταρα (IC₅₀ U2-OS κυττάρων 27.5±6.6 μM ενώ των LMS κυττάρων 48.4±8.5 μM) ωστόσο στη συνέχεια εμφάνισαν ανθεκτικότητα. Συγκεκριμένα, η IC₅₀ ήταν 11.5±1.2 μM στις 48 ώρες (8.1±2.2 μM για τα LMS κύτταρα)

και $11.0 \pm 1.1 \mu\text{M}$ στις 72 ώρες ($8.0 \pm 1.9 \mu\text{M}$ για τα LMS κύτταρα) (Συγκεντρωτικός Πίνακας 1 στο τέλος του Κεφαλαίου). Όπως και στα LMS κύτταρα η δράση της μεγιστοποιήθηκε μετά από 48 ώρες (Γράφημα 3).



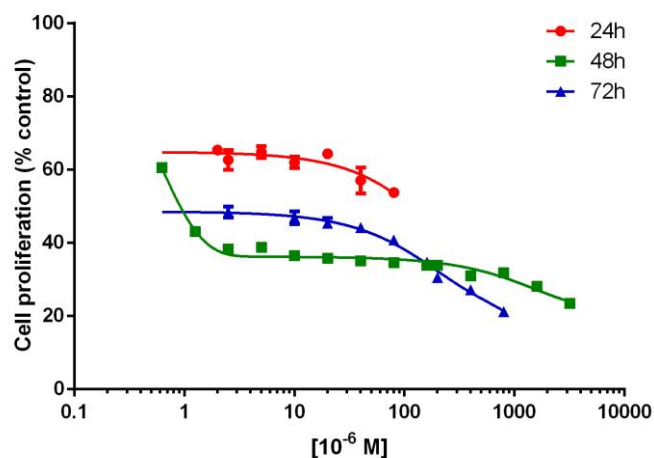
Γράφημα 2. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των LMS κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις σισπλατίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.



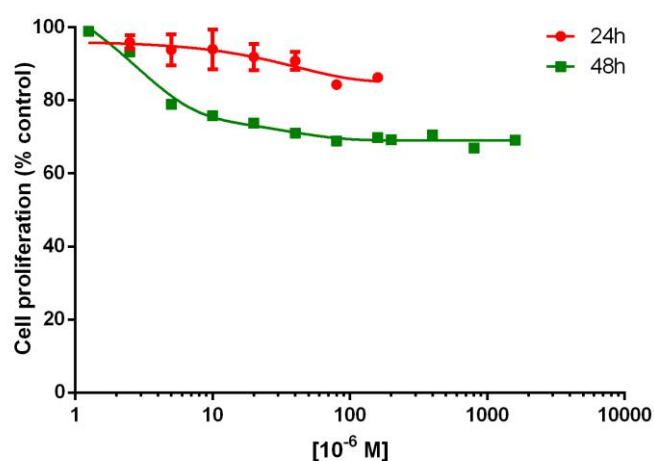
Γράφημα 3. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των U2-OS κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις σισπλατίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.

Τόσο τα LMS κύτταρα όσο και τα U2-OS παρουσίασαν ισχυρή ανθεκτικότητα στη δράση της μεθοτρεξάτης (Γραφήματα 4 και 5). Όπως φαίνεται στο Γράφημα 4 τα κύτταρα LMS

πολλαπλασιάζονται σε ποσοστό άνω του 30% σε συγκεντρώσεις μεθοτρεξάτης του 1 mM μετά από επώαση για 48 ώρες ενώ στα κύτταρα U2-OS το ποσοστό αυτό φτάνει σχεδόν το 70% (Γράφημα 5).



Γράφημα 4. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των LMS κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις μεθοτρεξάτης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.

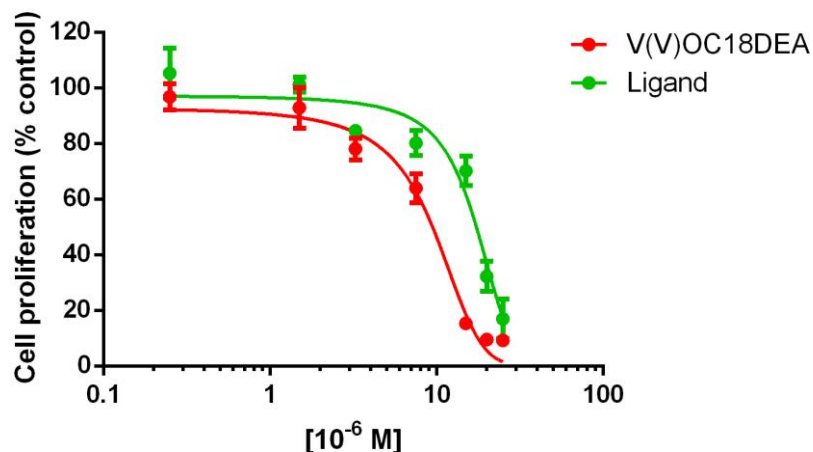


Γράφημα 5. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των U2-OS κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις μεθοτρεξάτης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.

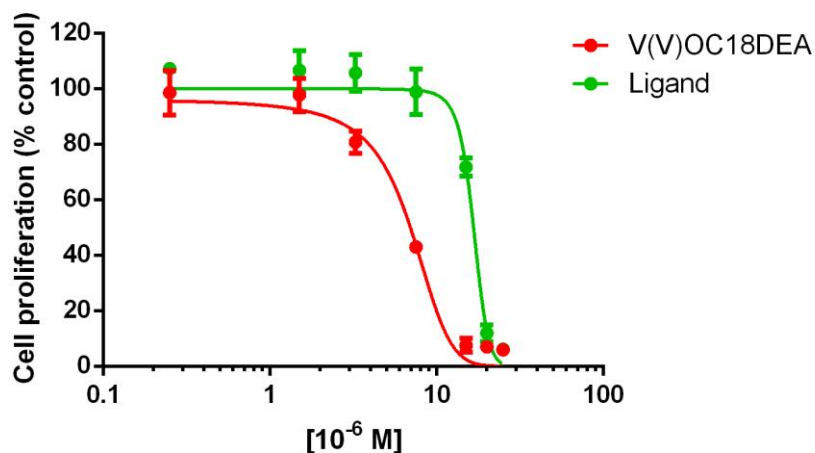
4.2 Μελέτη της κυτταροτοξικότητας των συμπλόκων και των υποκαταστατών τους

4.2.1 Σε κύτταρα MRC-5

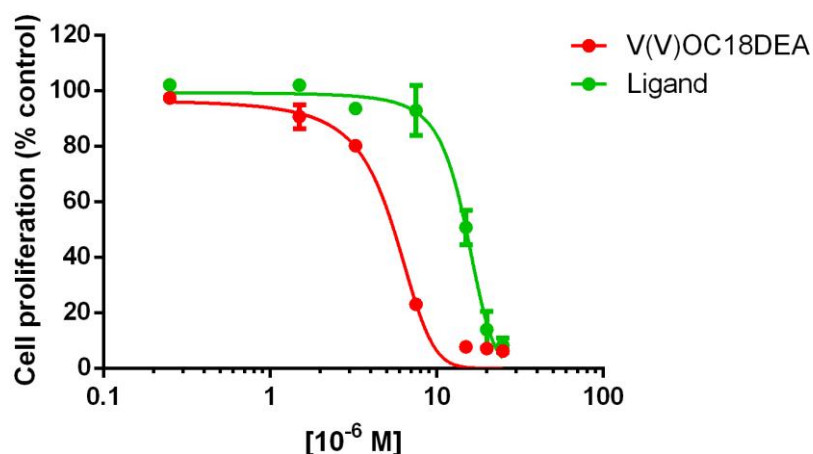
Από τα Γραφήματα 6, 7 και 8 παρατηρούμε ότι τόσο το Σύμπλοκο 1 όσο και ο υποκαταστάτης του ασκούν δόσο-εξαρτωμένη στα κύτταρα MRC-5. Το Σύμπλοκο 1 εμφανίζει πιο ισχυρή κυτταροτοξικότητα από ότι ο υποκαταστάτης.



Γράφημα 6. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MRC-5 κυττάρων μετά από επώαση για 24 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.

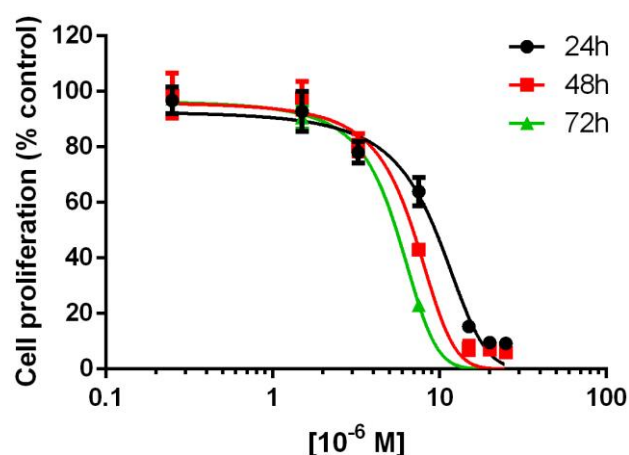


Γράφημα 7. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MRC-5 κυττάρων μετά από επώαση για 48 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.

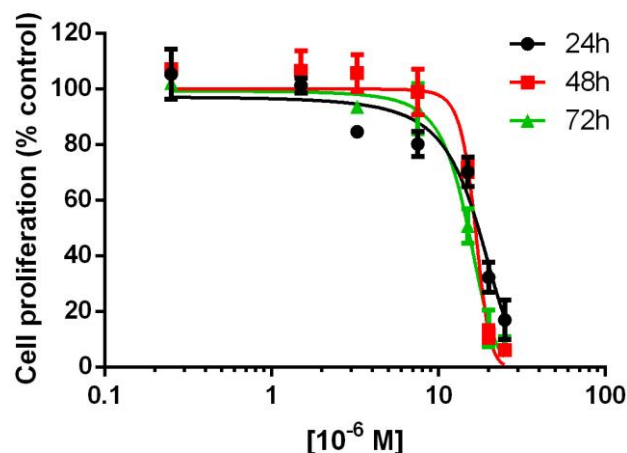


Γράφημα 8. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MRC-5 κυττάρων μετά από επώαση για 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.

Με τη πάροδο του χρόνου η κυτταροτοξικότητα του συμπλόκου αυξάνεται ενώ του υποκαταστάτη παραμένει σταθερή (Γραφήματα 9 και 10). Έτσι, στις 24 ώρες η τιμή IC_{50} του συμπλόκου είναι 9.5 ± 0.7 μ M, στις 48 ώρες 6.9 ± 0.4 μ M και στις 72 ώρες 5.5 ± 0.4 μ M ενώ για τον υποκαταστάτη 17.3 ± 1.1 μ M, 16.6 ± 0.4 μ M και 15.0 ± 0.4 μ M, αντίστοιχα (Συγκεντρωτικός Πίνακας 1 στο τέλος του Κεφαλαίου).

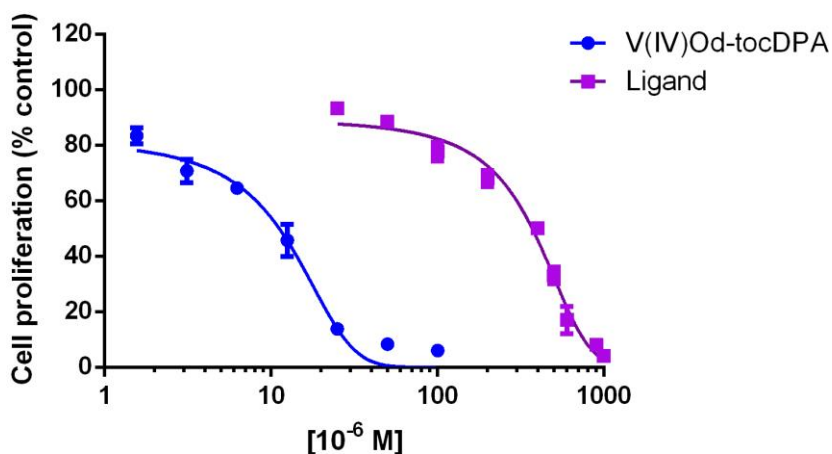


Γράφημα 9. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MRC-5 κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.

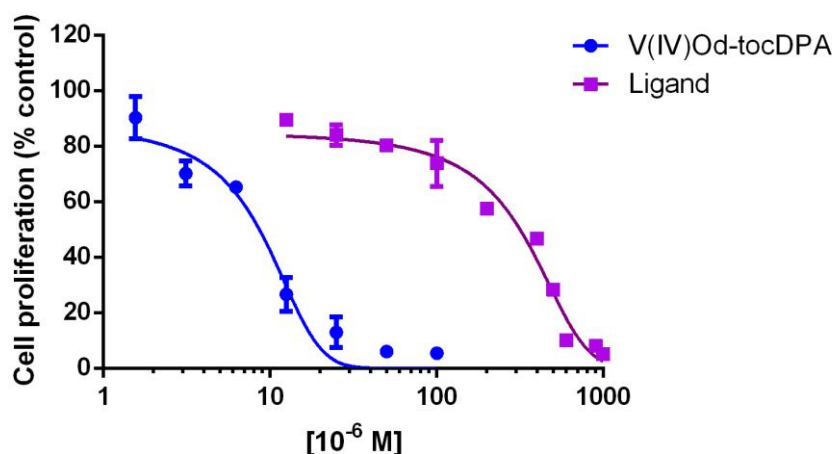


Γράφημα 10. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MRC-5 κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του υποκαταστάτη του Συμπλόκου 1. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.

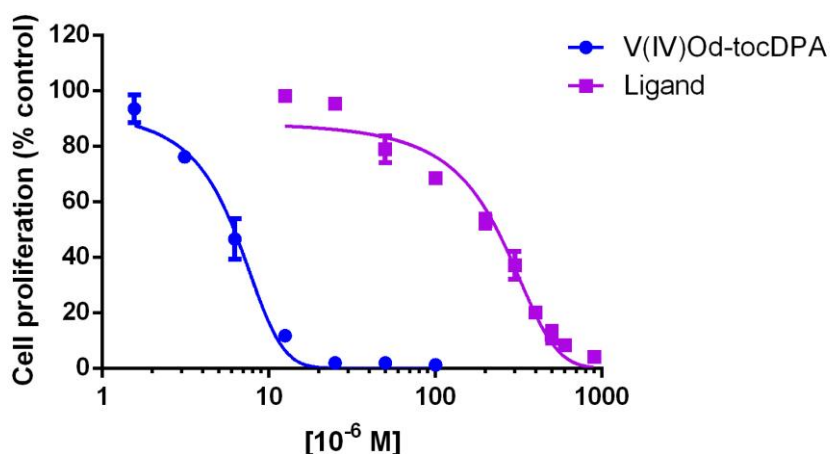
Το Σύμπλοκο 2 εμφάνισε ισχυρή δοσο-εξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση σε αντίθεση με τον υποκαταστάτη, του οποίου η δράση ήταν σημαντικά ασθενέστερη. Όπως φαίνεται από τα Γραφήματα 11, 12 και 13, η επώαση των MRC-5 κυττάρων με 25 μ M του συμπλόκου οδηγεί σε πλήρη σχεδόν αναστολή του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού (>90% στις 24, 48 και 72 ώρες), ενώ αντιθέτως τα κύτταρα επιβιώνουν σχεδόν σε ποσοστό 100% όταν επωάζονται στην ίδια συγκέντρωση με τον υποκαταστάτη.



Γράφημα 11. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MRC-5 κυττάρων μετά από επώαση για 24 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 2 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.

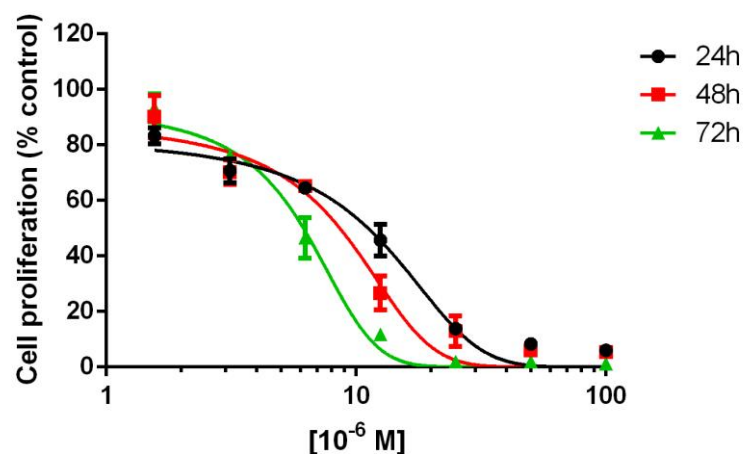


Γράφημα 12. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MRC-5 κυττάρων μετά από επώαση για 48 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 2 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.



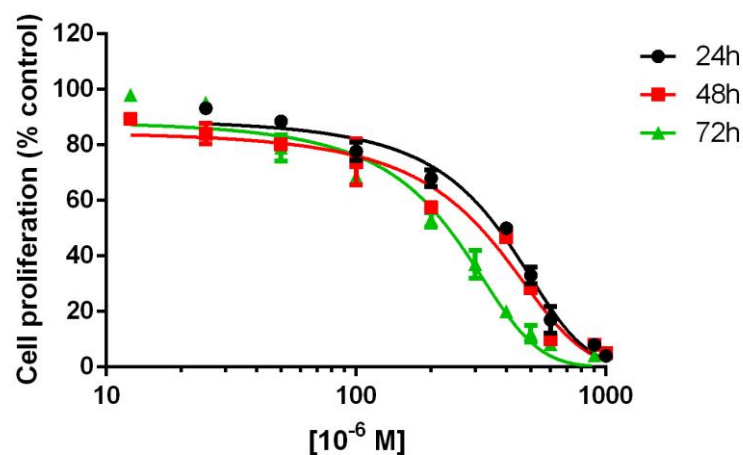
Γράφημα 13. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MRC-5 κυττάρων μετά από επώαση για 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 2 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.

Όπως και το Σύμπλοκο 1 έτσι και το Σύμπλοκο 2 παρουσίασε χρόνο-εξαρτώμενη δράση. Η δράση του συμπλόκου σχεδόν διπλασιάζεται μετά την πάροδο 48 ωρών και συγκεκριμένα από τη μέτρηση κυτταροτοξικότητας 24ώρου ως την μέτρηση στις 72 ώρες (Γράφημα 14).



Γράφημα 14. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MRC-5 κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 2. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.

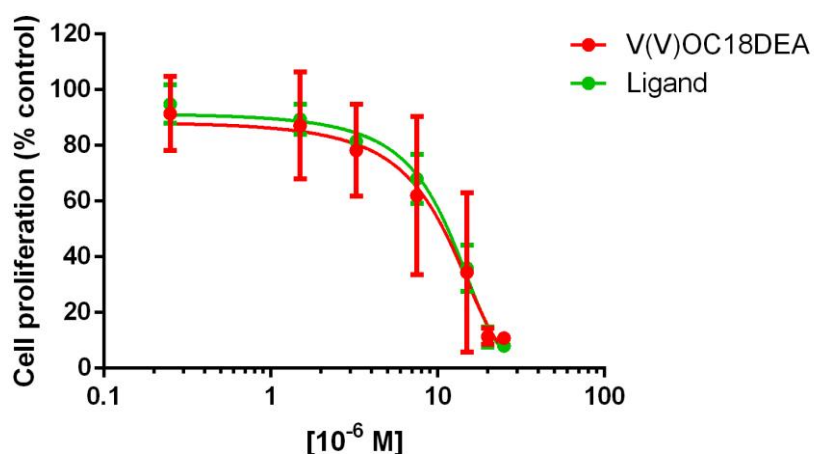
Η μεταβολή της IC_{50} ήταν η εξής: 11.2 ± 1.0 μ M (24 ώρες), 8.6 ± 1.0 μ M (48 ώρες) και 6.2 ± 0.5 μ M (Συγκεντρωτικός Πίνακας 1 στο τέλος του Κεφαλαίου). Όπως φαίνεται στο Γράφημα 15, η δράση του υποκαταστάτη δεν επηρεάζεται σημαντικά με τη πάροδο του χρόνου και επομένως είναι κυρίως δοσο-εξαρτώμενη και σε μικρότερο βαθμό χρόνο-εξαρτώμενη.



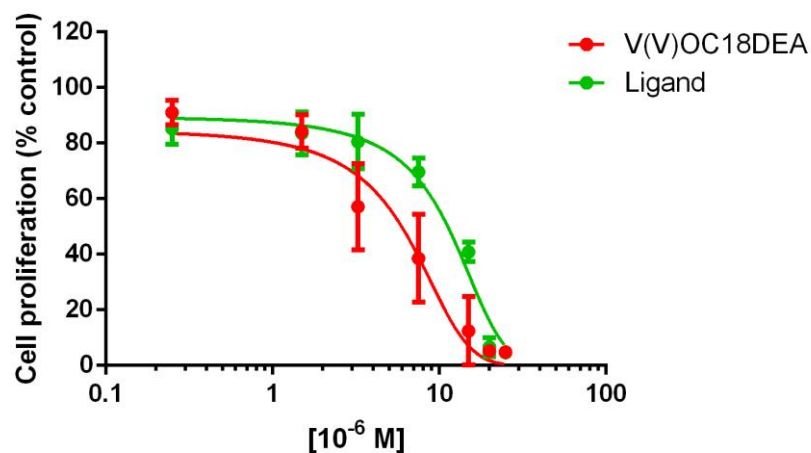
Γράφημα 15. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MRC-5 κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του υποκαταστάτη του Συμπλόκου 2. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.

4.2.2. Σε κύτταρα LMS

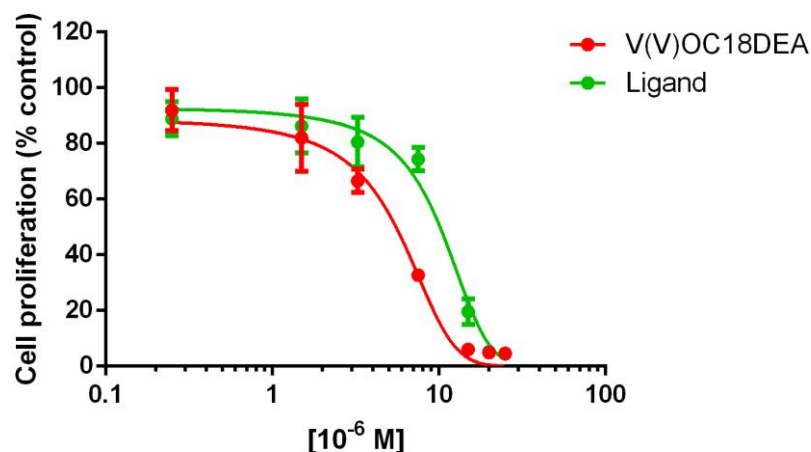
Ισχυρή δόσο-εξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση εμφανίζει το Σύμπλοκο 1 στα κύτταρα LMS, η οποία είναι εμφανής στις πρώτες 24 ώρες σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 1.5 μM . Αντίστοιχη δράση ωστόσο παρουσιάζει και ο υποκαταστάτης του συμπλόκου (Γράφημα 16). Ωστόσο, με τη πάροδο του χρόνου η δραστικότητα του συμπλόκου αυξάνει ενώ του υποκαταστάτη παραμένει σταθερή (Γράφημα 17 και 18).



Γράφημα 16. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των LMS κυττάρων μετά από επώαση για 24 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.

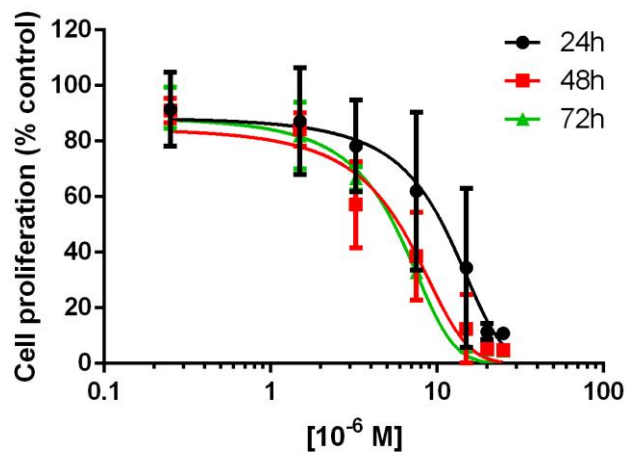


Γράφημα 17. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των LMS κυττάρων μετά από επώαση για 48 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.



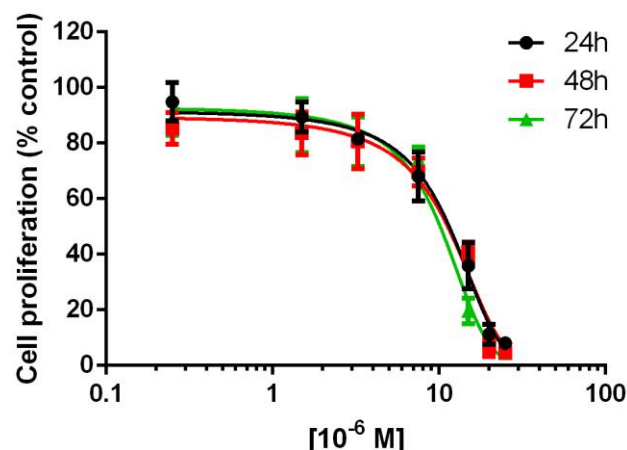
Γράφημα 18. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των LMS κυττάρων μετά από επώαση για 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.

Στο Γράφημα 19 παρουσιάζεται η μεταβολή της δράσης του συμπλόκου με τη πάροδο του χρόνου. Η τιμή IC_{50} για τις 24 ώρες είναι 10.8 ± 0.5 μ M, για τις 48 ώρες 6.0 ± 0.7 μ M ενώ για τις 72 ώρες 5.5 ± 0.3 μ M (Συγκεντρωτικός Πίνακας 1 στο τέλος του Κεφαλαίου).



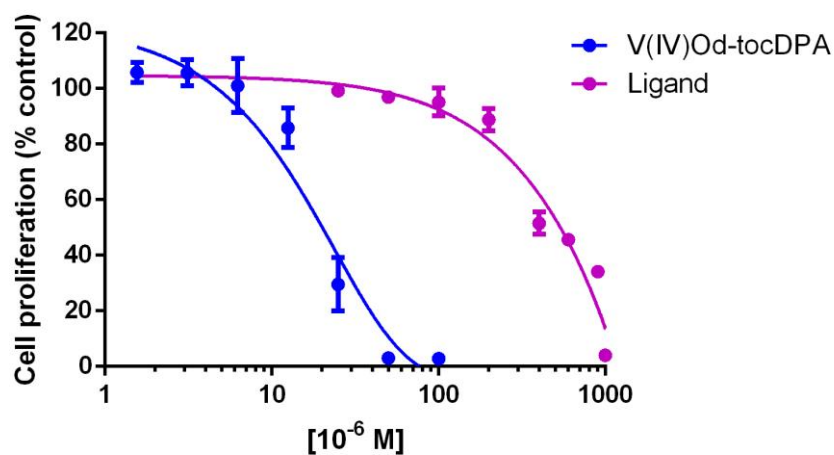
Γράφημα 19. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των LMS κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.

Στο Γράφημα 20 φαίνεται χαρακτηριστικά η σταθερή κυτταροτοξική δράση του υποκαταστάτη, η οποία δεν επηρεάζεται με την πάροδο του χρόνου. Έτσι, η τιμή IC₅₀ παραμένει σχεδόν αμετάβλητη για τις 24, 48 και 72 ώρες (11.5±0.4, 11.2±0.8 και 10.1±0.6 μM, αντίστοιχα) (Συγκεντρωτικός Πίνακας 1 στο τέλος του Κεφαλαίου).

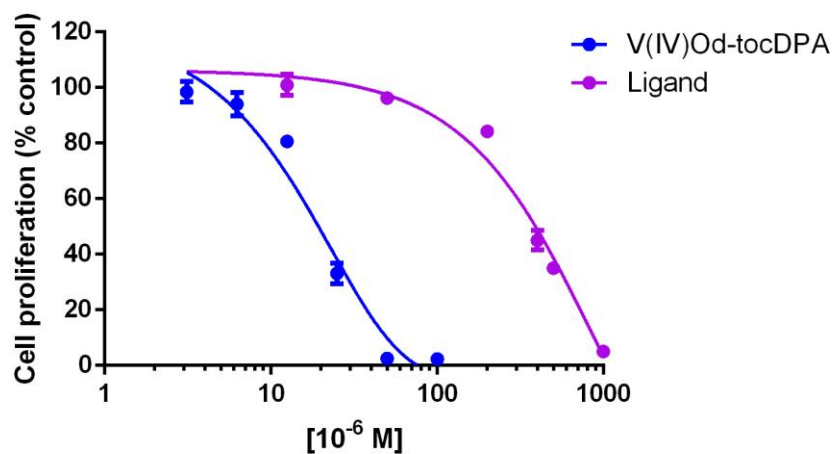


Γράφημα 20. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των LMS κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του υποκαταστάτη του Συμπλόκου 1. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.

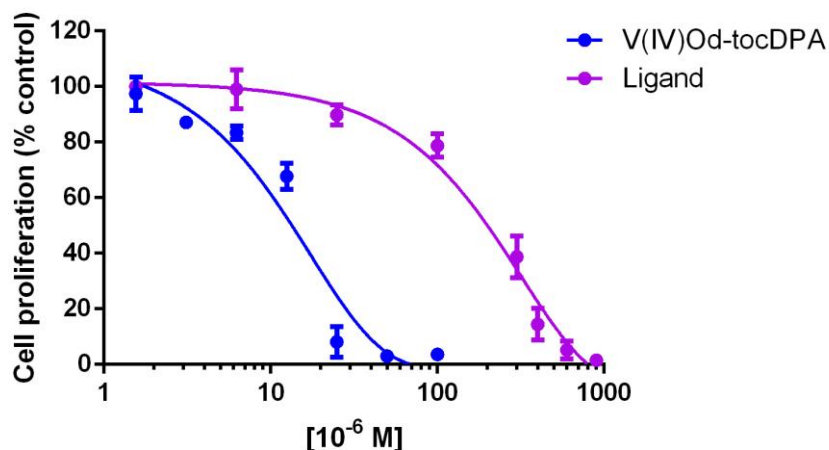
Όπως και στα κύτταρα MRC-5, έτσι και στα κύτταρα LMS η δράση του Συμπλόκου 2 είναι πολύ πιο ισχυρή από τη δράση του υποκαταστάτη του. Η δράση του είναι δοσο-εξαρτώμενη (Γραφήματα 21, 22 και 23) αλλά και χρονο-εξαρτώμενη, αν και απαιτείται η πάροδος τουλάχιστον 48 ωρών επώασης για να αυξήσει την κυτταροτοξική του δράση (Γραφήματα 24 και 25). Ο υποκαταστάτης εμφανίζει δράση σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι μετά από 24 ώρες επώασης με 100 μM του υποκαταστάτη η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων LMS είναι σχεδόν 100% ενώ μετά από 48 και 72 ώρες είναι περίπου 75%. Πλήρης θάνατος των κυττάρων επέρχεται σε συγκεντρώσεις >600 μM μετά από 72 ώρες επώασης.



Γράφημα 21. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των LMS κυττάρων μετά από επώαση για 24 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 2 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.

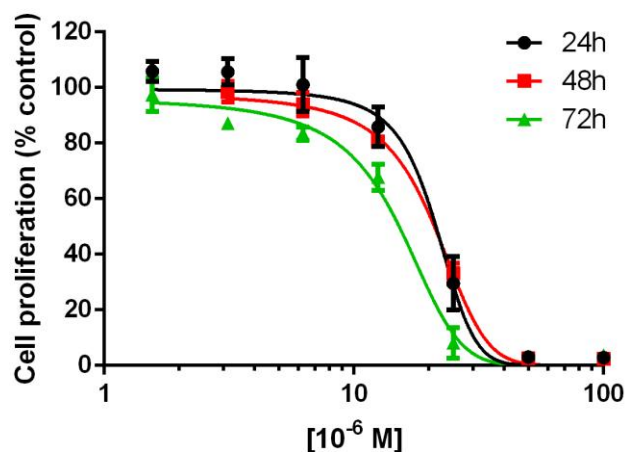


Γράφημα 22. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των LMS κυττάρων μετά από επώαση για 48 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 2 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.



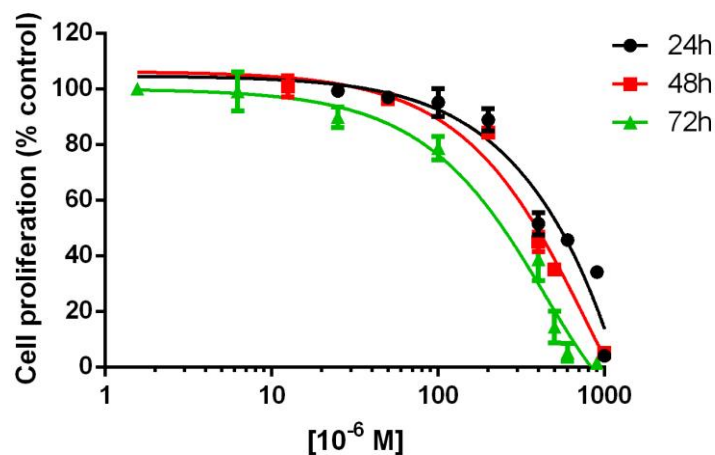
Γράφημα 23. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των LMS κυττάρων μετά από επώαση για 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 2 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.

Με τη πάροδο του χρόνου η κυτταροτοξική δράση του συμπλόκου αυξάνεται (Γράφημα 24) και συνεπώς μειώνεται η τιμή της IC_{50} , η οποία υπολογίστηκε στα 21.3 ± 1.0 , 21.0 ± 0.4 και 15.2 ± 0.8 μ M στις 24, 48 και 72 ώρες, αντίστοιχα.



Γράφημα 24. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των LMS κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 2. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.

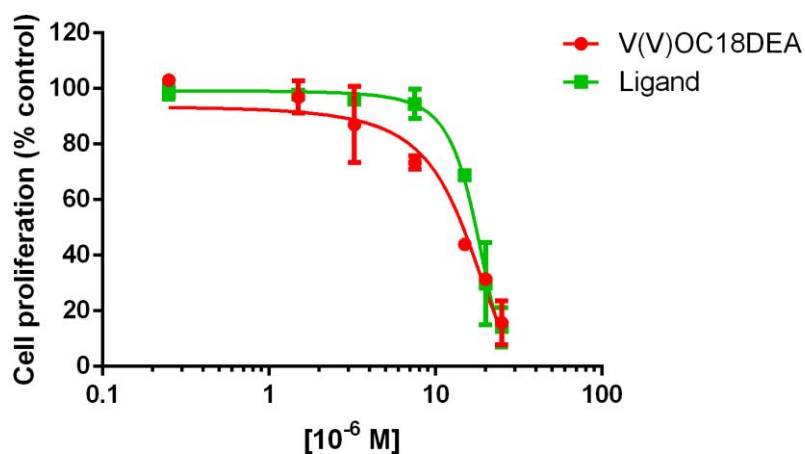
Η δράση του υποκαταστάτη του Συμπλόκου 2 είναι χρονο-εξαρτώμενη, ενώ απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις για να προκληθεί πλήρης θάνατος των κυττάρων (Γράφημα 25).



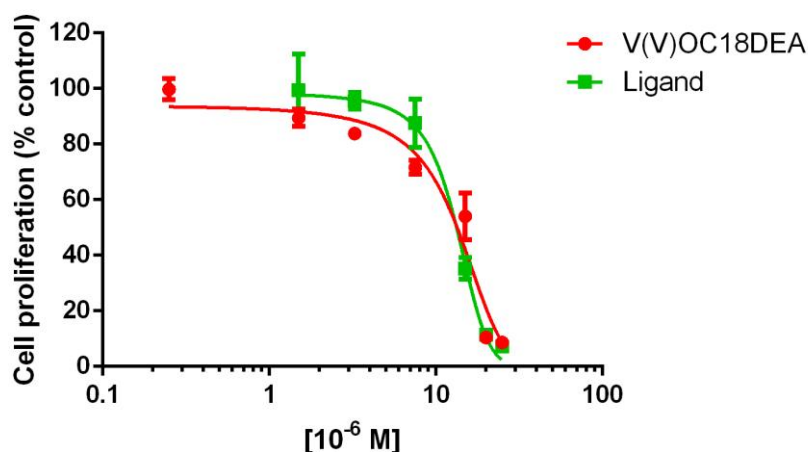
Γράφημα 25. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των LMS κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του υποκαταστάτη του Συμπλόκου 2. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.

4.2.3 Σε κύτταρα U2-OS

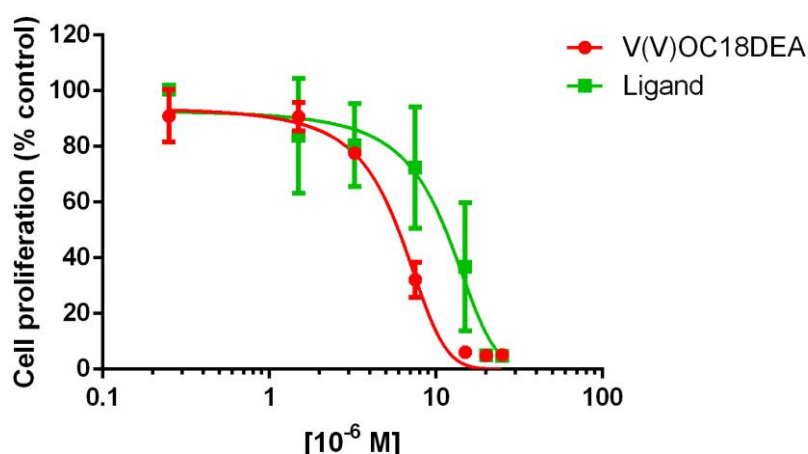
Η κυτταροτοξική δράση του Συμπλόκου 1 είναι δοσο-εξαρτώμενη και ισχυρότερη, ήδη από τις πρώτες 24 ώρες, από τη δράση του υποκαταστάτη (Γράφημα 26, 27 και 28).



Γράφημα 26. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των U2-OS κυττάρων μετά από επώαση για 24 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.

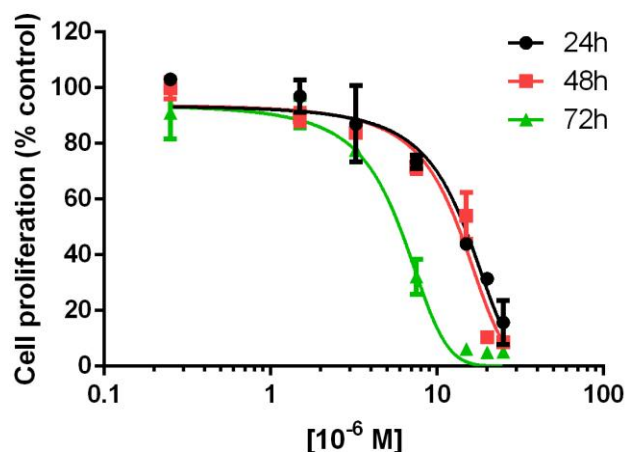


Γράφημα 27. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των U2-OS κυττάρων μετά από επώαση για 48 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.

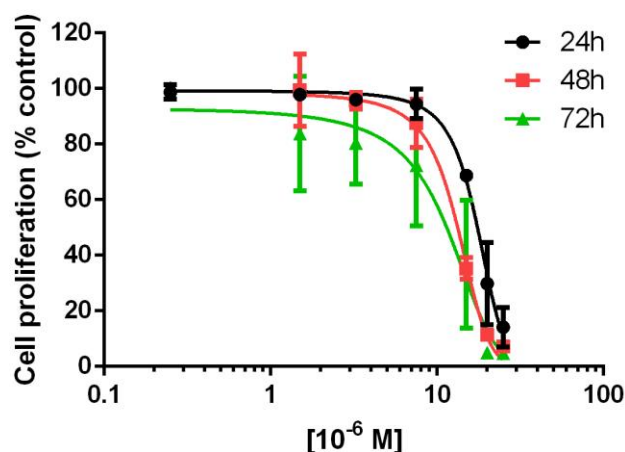


Γράφημα 28. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των U2-OS κυττάρων μετά από επώαση για 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.

Η IC_{50} του συμπλόκου παραμένει σχεδόν σταθερή τις πρώτες 48 ώρες επώασης (14.6 και 13.4 μ M στις 24 και 48 ώρες, αντίστοιχα) και μειώνεται σημαντικά στις 72 ώρες, γεγονός που δείχνει ότι όσο αυξάνεται ο χρόνος επώασης των κυττάρων με το σύμπλοκο τόσο υψηλότερη η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Γράφημα 29). Ο υποκαταστάτης με τη πάροδο του χρόνου αυξάνει την κυτταροτοξικότητα του αλλά σε μικρότερο βαθμό από ότι το σύμπλοκο (Γράφημα 30).



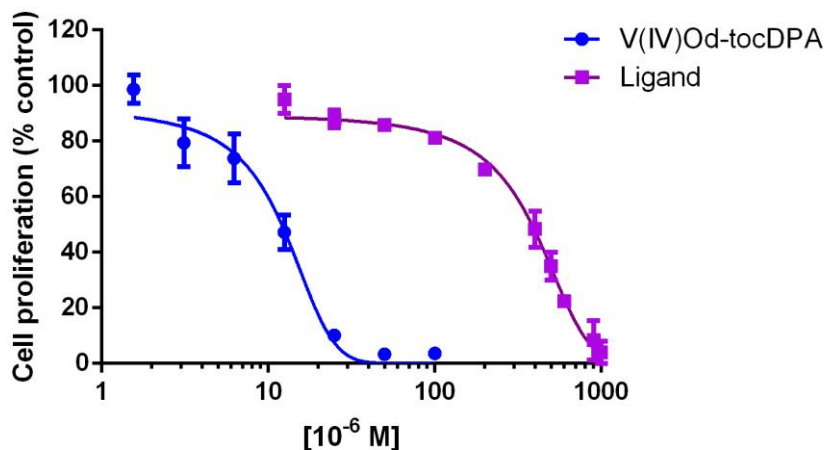
Γράφημα 29. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των U2-OS κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.



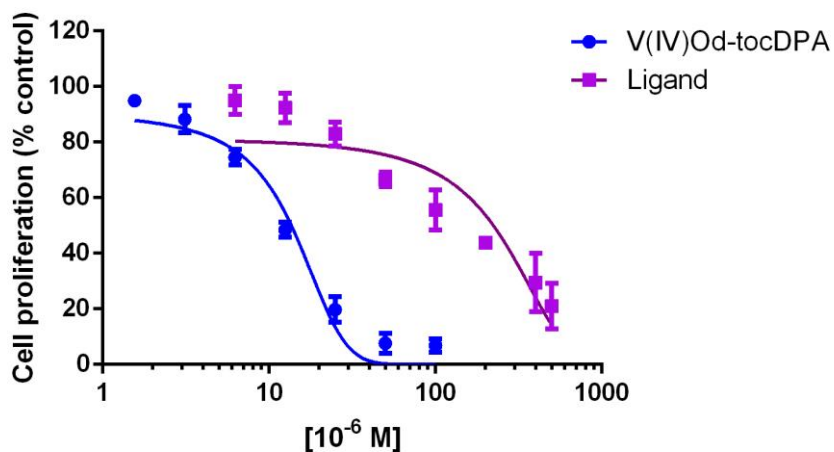
Γράφημα 30. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των U2-OS κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του υποκαταστάτη του Συμπλόκου 1. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.

Όπως και στις άλλες δύο κυτταρικές σειρές, η δράση του Συμπλόκου 2 είναι και στα κύτταρα U2-OS πολύ πιο ισχυρή από ότι του υποκαταστάτη. Στο Γράφημα 31 φαίνεται ότι η επώαση των κυττάρων με 25 μ M του συμπλόκου οδηγεί μετά από 24 ώρες σε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού του 90% των κυττάρων όταν σε αντίστοιχη

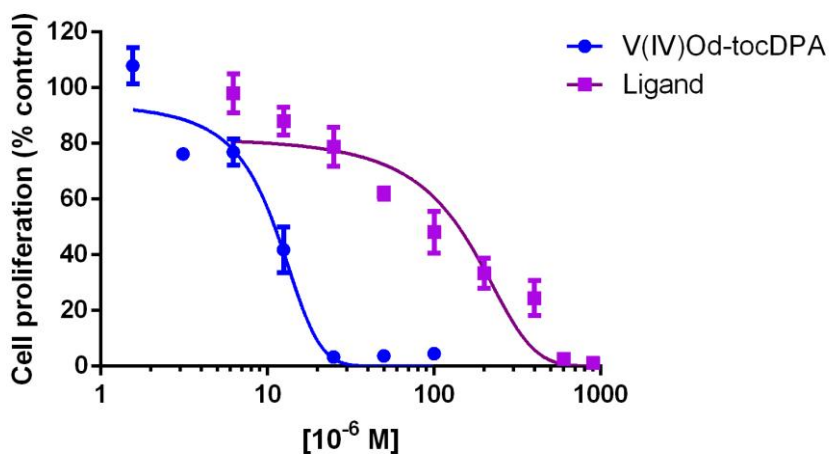
συγκέντρωση ο υποκαταστάτης τον αναστέλλει κατά 10% περίπου. Ανάλογη εικόνα παρουσιάζεται στις 48 και 72 ώρες (Γράφημα 32 και 33).



Γράφημα 31. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των U2-OS κυττάρων μετά από επώαση για 24 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 2 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.

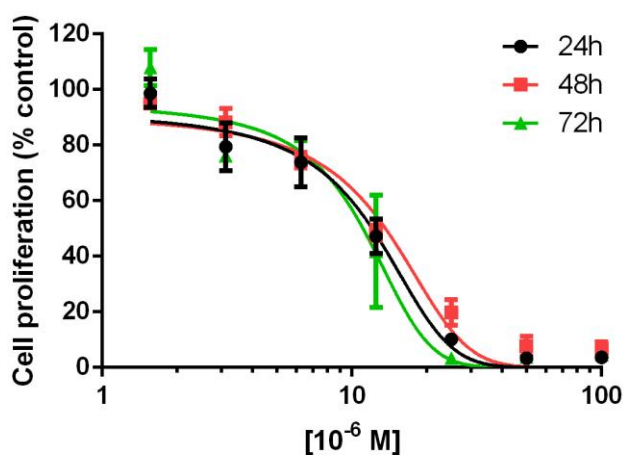


Γράφημα 32. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των U2-OS κυττάρων μετά από επώαση για 48 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 2 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.



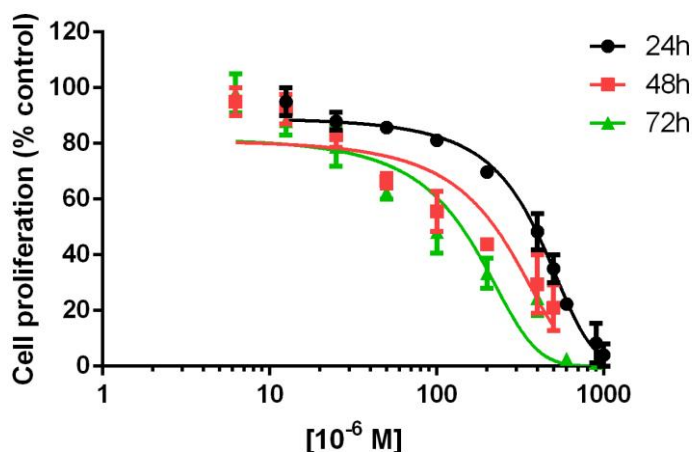
Γράφημα 33. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των U2-OS κυττάρων μετά από επώαση για 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 2 και του υποκαταστάτη του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.

Στο Γράφημα 34 παρουσιάζεται η κυτταροτοξική δράση του συμπλόκου με τη πάροδο του χρόνου.



Γράφημα 34. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των U2-OS κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 2. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.

Η δράση του υποκαταστάτη του Συμπλόκου 2 είναι ήπια και απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις και επαρκής χρόνος επώασης για να προκληθεί πλήρης θάνατος των κυττάρων.



Γράφημα 35. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των U2-OS κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του υποκαταστάτη του Συμπλόκου 2. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.

4.2.4 Συγκριτική δράση των συμπλόκων στις τρεις κυτταρικές σειρές

Στο Πίνακα 1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι τιμές IC_{50} των υπό εξέταση συμπλόκων καθώς και τις σισπλατίνης και της μεθοτρεξάτης στις τρεις κυτταρικές σειρές για τα τρία χρονικά διαστήματα που ελέγχθηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός.

Πίνακας 1. IC_{50} (inhibitory concentration)

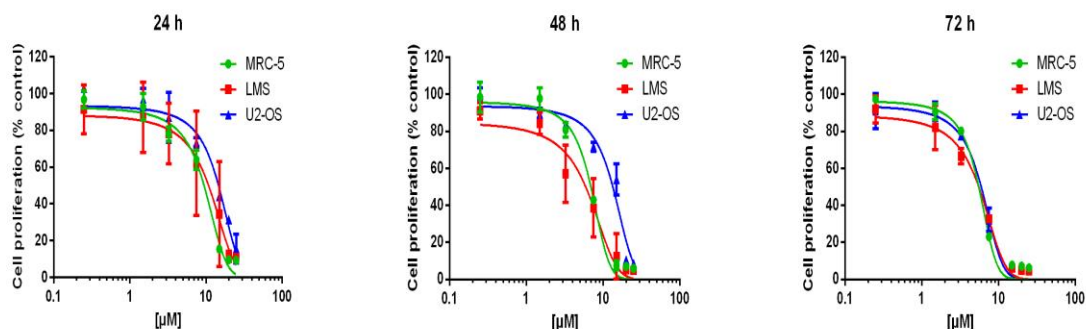
	MRC-5			LMS			U2-OS		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Cisplatin	>80	19.2±3.1	15.6±2.3	48.4±8.5	8.1±2.2	8.0±1.9	27.5±6.6	11.5±1.2	11.0±1.1
Methotrexate	MΔ	MΔ	MΔ	MΔ	MΔ	MΔ	MΔ	MΔ	MΔ
Σύμπλοκο1	9.5±0.7	6.9±0.4	5.5±0.4	10.8±0.5	6.0±0.7	5.5±0.3	14.6±0.9	13.4±1.1	6.0±0.3
Υποκαταστάτης	17.3±1.1	16.6±0.4	15.0±0.4	11.5±0.4	11.2±0.8	10.1±0.6	17.5±0.3	13.3±0.3	11.4±0.9
Σύμπλοκο 2	11.2±1.0	8.6±1.0	6.2±0.3	21.3±1.0	21.0±0.4	15.2±0.8	12.1±1.0	13.6±1.3	11.1±1.2
Υποκαταστάτης	370±16	316±20	234±16	566±59	380±42	191±19	383±11	223±39	141±28

MΔ, Μη διαθέσιμο

Η κυτταροτοξική δράση των 2 συμπλόκων στις 3 κυτταρικές σειρές μετά από 24, 48 και 72 ώρες παρουσιάζεται στο Πίνακα 2 και στο Γράφημα 36. Τα κύτταρα U2-OS εμφανίζουν μεγαλύτερη αντίσταση στο Σύμπλοκο 1, σε σχέση με τις άλλες δύο κυτταρικές σειρές, τουλάχιστον για τις πρώτες 48 ώρες. Η IC_{50} του Συμπλόκου 1 για τα MRC-5 και LMS κύτταρα σταθεροποιείται περίπου στα 5.5-7 μM μετά από 48 ώρες επώασης, ενώ για τα U2-OS κύτταρα υποδιπλασιάζεται σε χρονικό διάστημα 24 ωρών (επώαση 48 ώρες σε 72 ώρες). Ωστόσο, μετά από 72 ώρες επώασης με το Σύμπλοκο 1 και για τις 3 κυτταρικές σειρές, η IC_{50} κυμαίνεται στην τιμή των 5.5-6.0 μM .

Πίνακας 2. Σύγκριση της κυτταροτοξικής δράσης των συμπλόκων στις τρεις κυτταρικές σειρές με τη πάροδο του χρόνου επώασης.

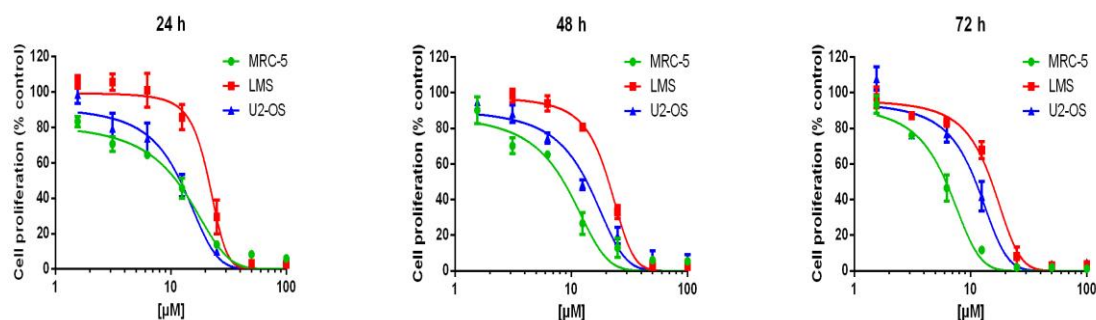
	24 h			48 h			72 h		
	MRC-5	LMS	U2-OS	MRC-5	LMS	U2-OS	MRC-5	LMS	U2-OS
Σύμπλοκο 1	9.5±0.7	10.8±0.5	14.6±0.9	6.9±0.4	6.0±0.7	13.4±1.1	5.5±0.4	5.5±0.3	6.0±0.3
Σύμπλοκο 2	11.2±1.0	21.3±1.0	12.1±1.0	8.6±1.0	21.0±0.4	13.6±1.3	6.2±0.3	15.2±0.8	11.1±1.2



Γράφημα 36. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MRC-5, LMS και U2-OS κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι±τυπική απόκλιση.

Τα κύτταρα U2-OS δεν επηρεάζονται χρονικά από τη κυτταροτοξική δράση του Συμπλόκου 2 καθώς η IC_{50} παραμένει σταθερή στα 11-13.5 μM . Πιο ανθεκτικά, ωστόσο, εμφανίζονται τα κύτταρα LMS καθώς η IC_{50} παραμένει σταθερή για τις πρώτες 48 ώρες στα 21 μM ενώ μετά από 72 ώρες υπολογίστηκε στα 15 μM . Πιο ευαίσθητα ήταν τα

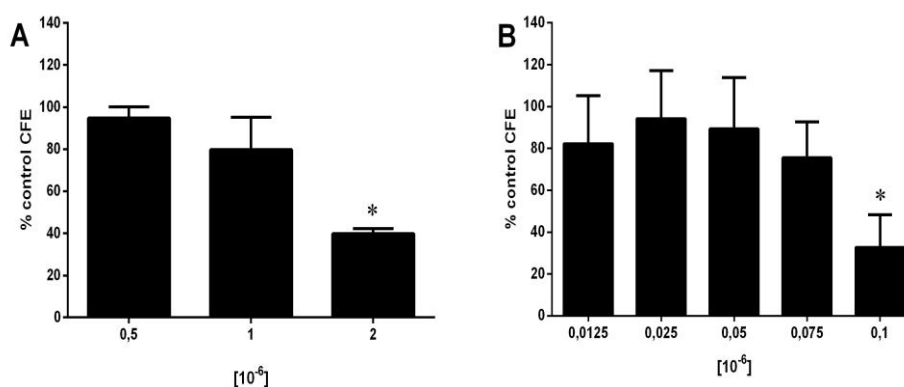
κύτταρα MRC-5, στα οποία με τη πάροδο του χρόνου η κυτταροτοξική δράση του συμπλόκου αυξάνει σταδιακά ως τα 6 μM μετά τη πάροδο 72 ωρών επώασης (Πίνακας 2 και Γράφημα 37).



Γράφημα 37. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MRC-5, LMS και U2-OS κυττάρων μετά από επώαση για 24, 48 και 72 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 2. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.

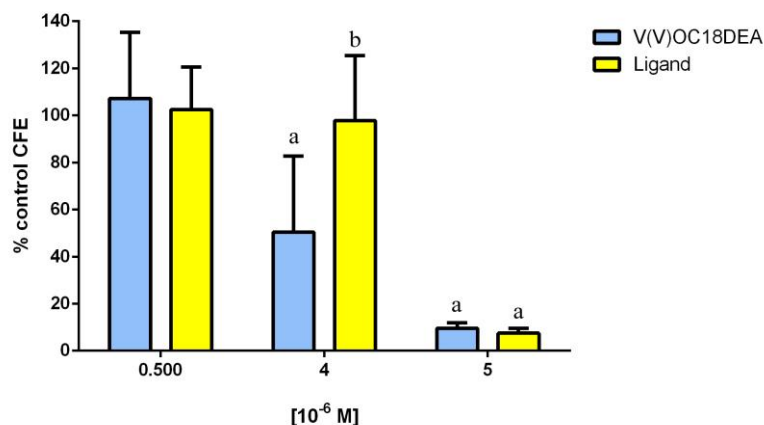
4.3 Σχηματισμός αποικιών (Colony Formation Efficiency)

Τόσο η σισπλατίνη όσο και η μεθοτρεξάτη εμφάνισαν δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της ικανότητας σχηματισμού αποικιών στα κύτταρα LMS (Γράφημα 38).



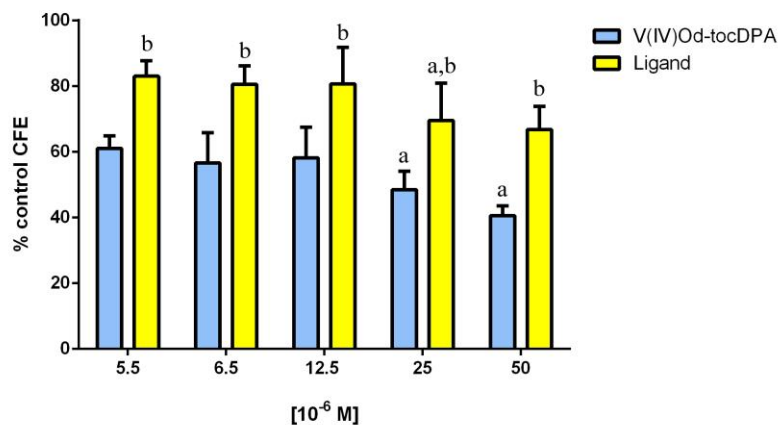
Γράφημα 38. Ικανότητα ανάπτυξης αποικιών των LMS κυττάρων (% του control) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σισπλατίνης (A) και μεθοτρεξάτης (B). *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την αμέσως προηγούμενη μικρότερη συγκέντρωση, $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τ.α.

Όσον αφορά την αναστολή της ικανότητας σχηματισμού αποικιών στα κύτταρα LMS, το Σύμπλοκο 1 παρουσίασε σημαντική δραστηριότητα. Η αναστολή ήταν δοσο-εξαρτώμενη ενώ στη συγκέντρωση των 5 μM το σύμπλοκο ανέστειλε κατά περίπου 90% το σχηματισμό αποικιών. Ο υποκαταστάτης του συμπλόκου δεν εμφανίζει ανασταλτική δράση (Γράφημα 39).



Γράφημα 39. Ικανότητα ανάπτυξης αποικιών των LMS κυττάρων (% του control) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1 και του υποκαταστάτη του. ^a Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την αμέσως προηγούμενη μικρότερη συγκέντρωση, $p < 0.05$. ^b Στατιστικά σημαντική μεταξύ του συμπλόκου και του υποκαταστάτη στην ίδια συγκέντρωση, $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τ.α.

Το Σύμπλοκο 2 παρουσίασε ήπια αναστολή της ικανότητας σχηματισμού αποικιών η οποία δεν ήταν δοσοεξαρτώμενη και κυμάνθηκε από 60% στη συγκέντρωση των 5.5 μM ως 45% στη συγκέντρωση των 25 μM . Παρόμοια δραστηριότητα αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις επέδειξε και ο υποκαταστάτης του συμπλόκου. Η αναστολή της ικανότητας σχηματισμού αποικιών κυμάνθηκε από 80% στη συγκέντρωση των 6.5 μM ως 65% στη συγκέντρωση των 50 μM (Γράφημα 40).



Γράφημα 40. Ικανότητα ανάπτυξης αποικιών των LMS κυττάρων (% του control) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 2 και του υποκαταστάτη του. ^a Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την αμέσως προηγούμενη μικρότερη συγκέντρωση, $p < 0.05$. ^b Στατιστικά σημαντική μεταξύ του συμπλόκου και του υποκαταστάτη στην ίδια συγκέντρωση, $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τ.α.

4.4 Κυτταρομετρία ροής – Μελέτη κυτταρικού κύκλου και απόπτωσης

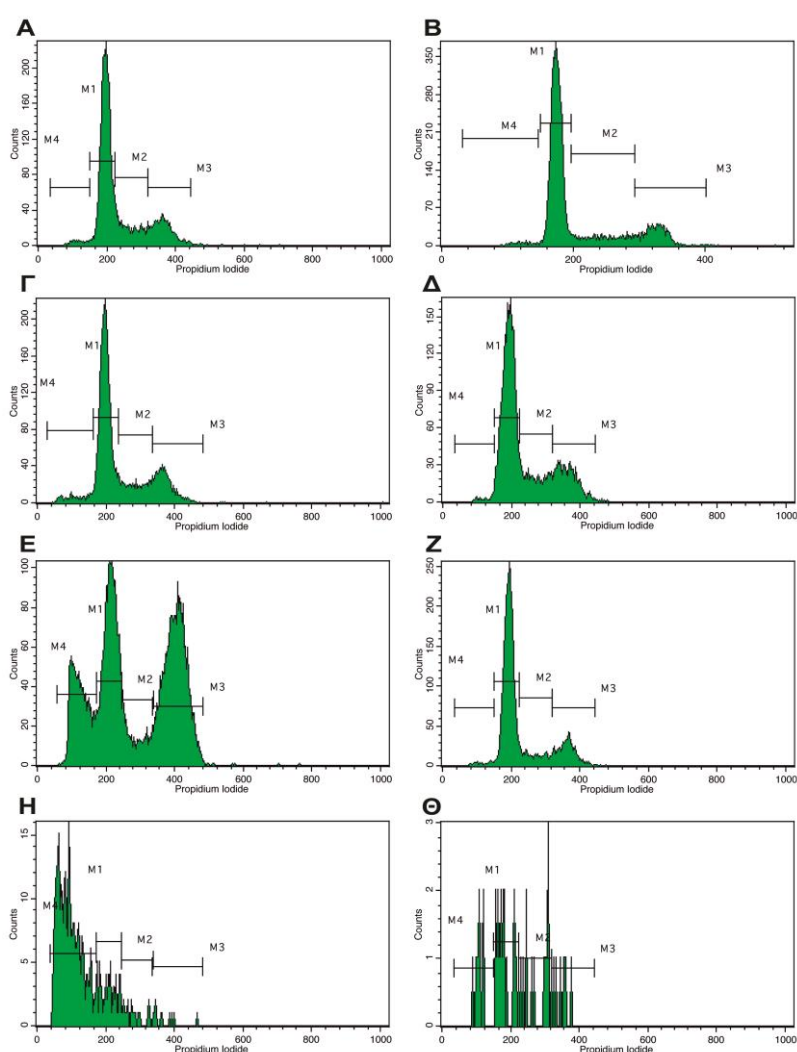
4.4.1 Σύμπλοκο 1

Σύμφωνα με τα Πίνακα 3, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1 ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκονται στη Φάση G0/G1 μειώνεται σημαντικά, όπως επίσης και των κυττάρων που βρίσκονται στη Φάση S.

Πίνακας 3. Ποσοστό (%) των LMS κυττάρων σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου μετά από επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1 και του υποκαταστάτη του για 48 ώρες.

		G0/G1	S	G2/M	SubG1
Control		66.7 $\pm$ 0.9	15.0 $\pm$ 0.9	17.0 $\pm$ 1.2	1.5 $\pm$ 0.5
Σύμπλοκο 1	0.5 μM	65.0 $\pm$ 0.6	15.3 $\pm$ 0.1	17.0 $\pm$ 0.15	3.2 $\pm$ 0.9
	4 μM	33.0 $\pm$ 4.3	8.3 $\pm$ 1.0	41.9 $\pm$ 5.4	17.6 $\pm$ 1.6
	20 μM	15.3 $\pm$ 1.9	3.8 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 1.9	79.7 $\pm$ 2.5
Υποκαταστάτης	0.5 μM	64.0 $\pm$ 1.2	17.0 $\pm$ 0.8	18.7 $\pm$ 1.1	0.9 $\pm$ 0.2
	4 μM	73.2 $\pm$ 2.4	10.1 $\pm$ 0.9	15.9 $\pm$ 1.2	1.2 $\pm$ 0.3
	20 μM	42.6 $\pm$ 1.5	26.2 $\pm$ 1.6	13.1 $\pm$ 0.9	19.7 $\pm$ 0.8

Αντιθέτως αυξάνει σημαντικά ο αριθμός των κυττάρων στη Φάση G2/M και στη subG1 ενώ στη μεγαλύτερη συγκέντρωση το σύνολο σχεδόν των κυττάρων βρίσκεται στη Φάση subG1, δηλαδή έχει ξεκινήσει η διαδικασία του θανάτου μέσω απόπτωσης. Το σύμπλοκο δρα κατά τη διάρκεια της κυτταρικής ανάπτυξης (Φάση G2) και της μίτωσης (Φάση M). Αντιθέτως ο υποκαταστάτης του δρα στη Φάση S (σύνθεση του DNA) αυξάνοντας τον αριθμό των κυττάρων αλλά και στη Φάση subG1 αυξάνοντας τον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων. Χαρακτηριστικά διαγράμματα από το κυτταρόμετρο ροής παρουσιάζονται στο Γράφημα 41.



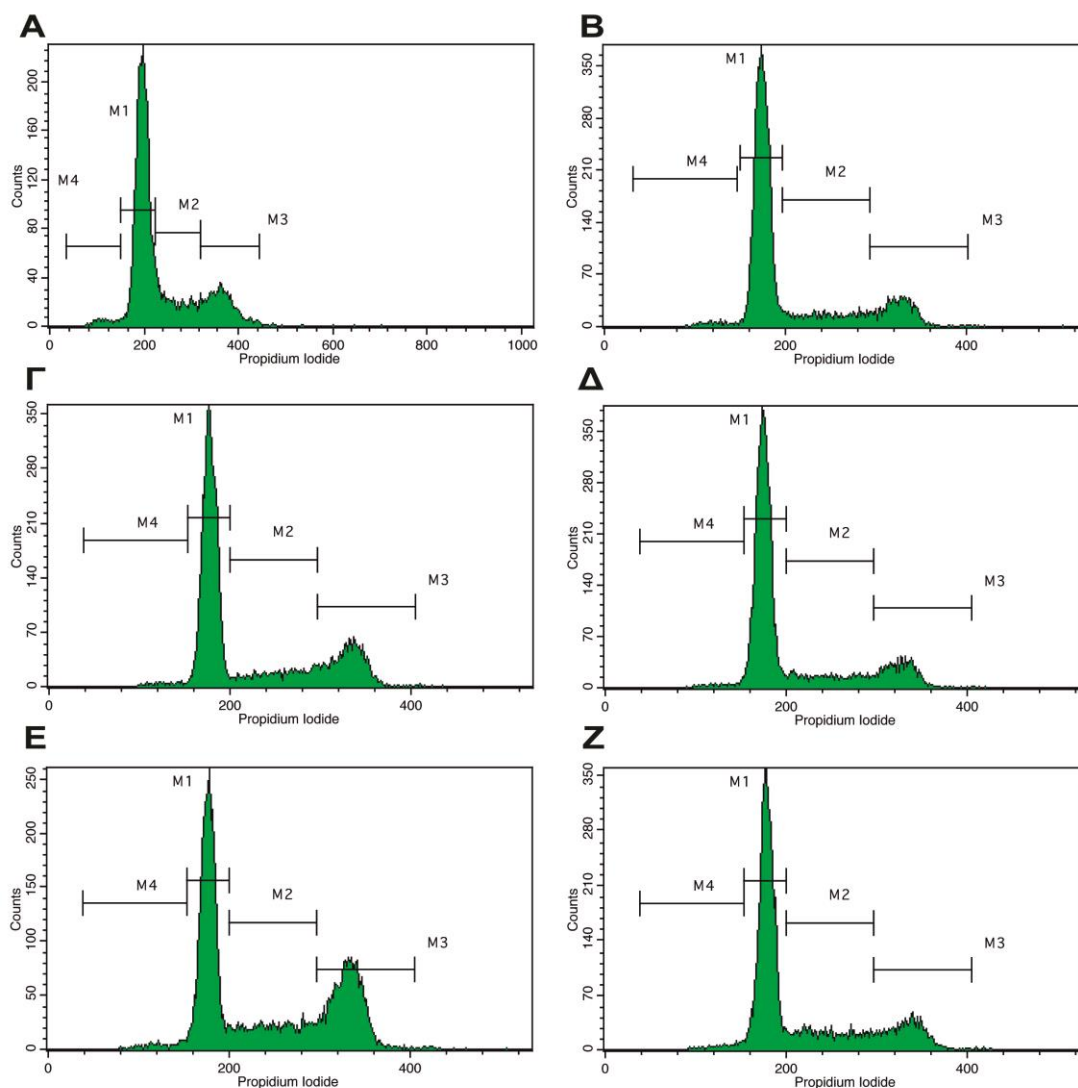
Γράφημα 41. Χαρακτηριστικά διαγράμματα ανάλυσης του κυτταρικού κύκλου των LMS κυττάρων μετά από επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1 (A, Γ, E και H) και του υποκαταστάτη του (B, Δ, Z και Θ) για 48 ώρες (A και B, control; Γ και Δ, 0.5μM; E και Z, 4 μM; H και Θ, 20 μM).

4.4.2 Σύμπλοκο 2

Όπως και το Σύμπλοκο 1 έτσι και το Σύμπλοκο 2 προκαλεί αύξηση του αριθμού των κυττάρων (cell cycle arrest) στη Φάση G2/M χωρίς όμως παράλληλα να αυξάνει τον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων (subG1) ή να προκαλεί σημαντική μεταβολή του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται στη Φάση S – μια μικρή αλλά σημαντική αύξηση περίπου 4% παρατηρείται στη μέγιστη συγκέντρωση των 25 μM . Ο υποκαταστάτης του συμπλόκου δρα αυξάνοντας τον αριθμό των κυττάρων στη Φάση S και G2/M, ωστόσο η αύξηση του αριθμού των κυττάρων είναι μικρότερη σε σχέση με το σύμπλοκο (Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά διαγράμματα από το κυτταρόμετρο ροής παρουσιάζονται στο Γράφημα 42.

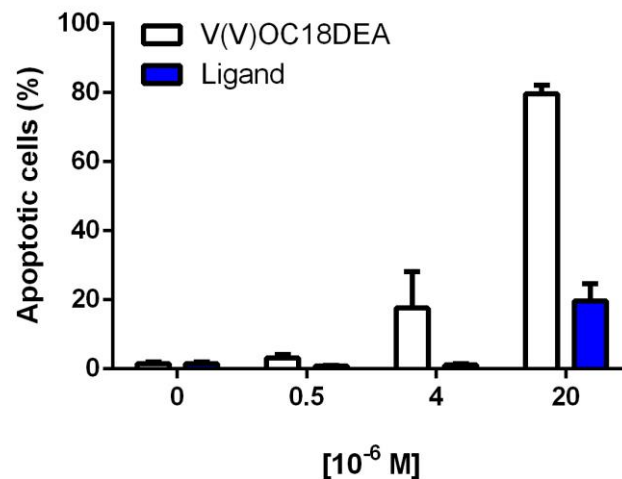
Πίνακας 4. Ποσοστό (%) των LMS κυττάρων σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου μετά από επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 2 και του υποκαταστάτη του για 48 ώρες.

		G0/G1	S	G2/M	SubG1
Control		68.1 $\pm$ 1.8	14.3 $\pm$ 0.5	16.3 $\pm$ 1.7	1.5 $\pm$ 0.5
Σύμπλοκο 2	3.1 μM	67.1 $\pm$ 2.0	14.1 $\pm$ 0.7	17.5 $\pm$ 1.1	1.7 $\pm$ 0.2
	6.2 μM	63.4 $\pm$ 1.6	14.0 $\pm$ 0.3	21.8 $\pm$ 1.4	1.1 $\pm$ 0.1
	12.5 μM	60.4 $\pm$ 1.1	13.8 $\pm$ 0.2	25.3 $\pm$ 1.0	0.8 $\pm$ 0.3
	25 μM	47.1 $\pm$ 1.0	18.4 $\pm$ 0.4	32.9 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 0.8
Υποκαταστάτης	3.1 μM	70.4 $\pm$ 1.2	14.4 $\pm$ 0.3	13.0 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.3
	6.2 μM	71.4 $\pm$ 1.5	13.4 $\pm$ 0.3	14.0 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.5
	12.5 μM	71.6 $\pm$ 1.4	13.5 $\pm$ 0.2	13.7 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 0.4
	25 μM	63.7 $\pm$ 1.0	18.3 $\pm$ 0.3	16.6 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.3



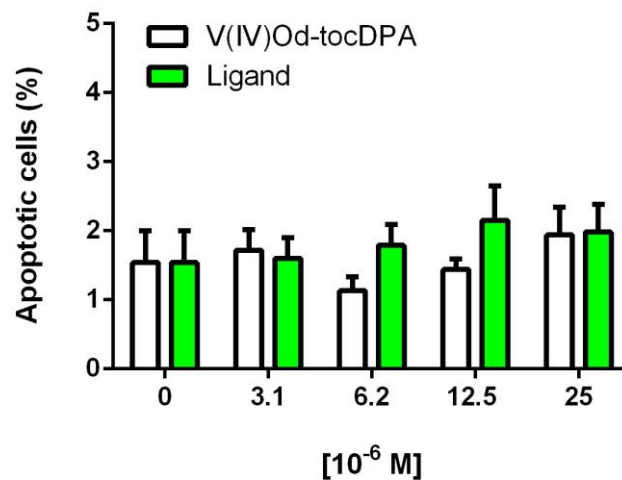
Γράφημα 42. Χαρακτηριστικά διαγράμματα ανάλυσης του κυτταρικού κύκλου των LMS κυττάρων μετά από επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 2 (A, Γ, και E) και του υποκαταστάτη του (B, Δ και Z) για 48 ώρες (A και B, control; Γ και Δ, 6.25 μM; E και Z, 25 μM).

Στο Γράφημα 43 της κυτταρομετρίας ροής είναι εμφανές ότι η δράση του Συμπλόκου 1 αυξάνει την αποπτωτική λειτουργία των LMS κυττάρων. Από την άλλη πλευρά ο υποκαταστάτης του συμπλόκου εμφανίζει ισχυρή αποπτωτική δράση στη μεγαλύτερη συγκέντρωση επώασης (20 μM). Αναλυτικά, η επώαση των κυττάρων LMS σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου (0.5, 4 και 20 μM) αυξάνει τον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων, έτσι ώστε στη μέγιστη συγκέντρωση των 20 μM το 80% των κυττάρων είναι αποπτωτικά (οδηγούνται δηλαδή σε θάνατο). Αντιθέτως, μόλις των 18% είναι αποπτωτικά όταν επωάστηκαν με 20 μM του υποκαταστάτη.



Γράφημα 43. Ποσοστό των LMS κυττάρων στη φάση SubG1 (απόπτωση) μετά από επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 1 και του υποκαταστάτη του για 48 ώρες.

Τόσο το Σύμπλοκο 2 όσο και ο υποκαταστάτης του δεν επάγουν την απόπτωση στα κύτταρα LMS (ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων 1 ως 3%) και επομένως η κυτταροτοξική δράση του συμπλόκου οφείλεται σε διαφορετικό μηχανισμό, ο οποίος πρέπει να διερευνηθεί (Γράφημα 44).



Γράφημα 44. Ποσοστό των LMS κυττάρων στη φάση SubG1 (απόπτωση) μετά από επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του Συμπλόκου 2 και του υποκαταστάτη του για 48 ώρες.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένας αποτελεσματικός αντικαρκινικός παράγοντας θα πρέπει να πληρεί ορισμένα κριτήρια όπως:

1. να αναστέλλει το πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων
2. να ασκεί κυτταροτοξικές και/ή κυτταροστατικές δράσεις προκαλώντας είτε νεκρωτικό είτε αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων
3. να μειώνει ή να αναστέλλει τη δυνατότητα μετάστασης των καρκινικών κυττάρων
4. να μην προκαλεί ανοχή στα κύτταρα, δηλαδή τα κύτταρα να μην αναπτύσσουν μηχανισμούς αντίστασης στον χημειοθεραπευτικό παράγοντα

Τα σύμπλοκα βαναδίου της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχουν σχεδιαστεί ώστε να παράγουν από το οξυγόνο ανιόντα του σουπεροξειδίου και να αντιδρούν με λιπίδια σχηματίζοντας ρίζες υπεροξειδίου και αλκοξειδίου. Τα μόρια αυτά είναι λιπόφιλα επομένως εισέρχονται εύκολα εντός των κυττάρων. Μια σημαντική διαφορά στη δομή τους είναι ότι έχουν άτομα βαναδίου με διαφορετικό αριθμό οξείδωσης.

Επειδή τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται με μεγάλη ταχύτητα ένας πιθανός στόχος των χημειοθεραπευτικών ενώσεων είναι τα μιτοχόνδρια. Ωστόσο, και τα δύο σύμπλοκα φαίνεται να είναι εξαιρετικά δραστικά προκαλώντας μεγάλες βλάβες στα κύτταρα χωρίς να δρουν σε συγκεκριμένους στόχους εντός των κυττάρων (DNA, μιτοχόνδρια κτλ).

Οι αντικαρκινικές δράσεις καθώς και οι μηχανισμοί δράσης διαφόρων συμπλόκων βαναδίου έχουν διερευνηθεί σε αρκετά είδη καρκινικών κυττάρων και ασκούν κυρίως αντιπολλαπλασιαστική δράση και –σε ορισμένες περιπτώσεις- πολλαπλασιαστική δράση.

Τα σύμπλοκα peroxovanadium αναστέλλουν το πολλαπλασιασμό των κυτταρικών σειρών νευροβλαστώματος (NB41) και γλοιώματος (C6) (121) αλλά αντιθέτως αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών ποντικού C3H10T1 (155). Έχει επίσης αναφερθεί ότι τα άλατα βαναδίου σε χαμηλές συγκεντρώσεις ($<10^{-10}$ M) διεγείρουν τον *in vitro* σχηματισμό αποικιών καρκινικών όγκων ενώ σε υψηλές ($>10^{-10}$ M) τον αναστέλλουν (156).

Ο κύριος μηχανισμός δράσης των συμπλόκων βαναδίου σε φυσιολογικές και κακοήθεις σειρές κυττάρων φαίνεται να ασκείται μέσω της αναστολής του κυτταρικού κύκλου. Σύμφωνα με αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής τα σύμπλοκα του peroxovanadate μπλοκάρουν τη μετάβαση στη G₂-M φάση του κυτταρικού κύκλου

καρκινικών κυττάρων (νευροβλάστωμα και γλοίωμα) οδηγώντας σε σημαντική αναστολή του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους (121). Η αναστολή που προκαλείται από τα σύμπλοκα βαναδίου φαίνεται ότι ρυθμίζεται από την αναστολή των τυροσινικών φωσφατασών (protein tyrosine phosphatases, PTPS), οι οποίες με τη σειρά τους αποφωσφορυλιώνουν υπομονάδες του συμπλέγματος της κυκλίνης-β. Η φωσφορυλίωση της υπομονάδας p34^{cdc2} του συμπλέγματος της κυκλίνης-β p34^{cdc2} είναι απαραίτητη για την εξέλιξη της μίτωσης (120). Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου μπορεί επίσης να προκαλείται από τα σύμπλοκα βαναδίου μέσω της ενεργοποίησης των MAPKs κινασών (mitogen activated protein kinases, MAPKs). Το θειικό βανάδιο V^{IV} ενεργοποιεί την MAPK p38 και επάγει την μεταγραφή του NF-κB (nuclear transcription factor κB), ο οποίος είναι ένας παράγοντας που συμμετέχει τόσο στη διαδικασία του κυτταρικού κύκλου όσο και στη διαδικασία της απόπτωσης (157). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας το Σύμπλοκο 1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αναστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο στη Φάση G₂/M και προκαλώντας απόπτωση σε αντίθεση με το Σύμπλοκο 2, το οποίο ενώ αναστέλλει το κυτταρικό κύκλο στη Φάση G₂/M, δεν προκαλεί απόπτωση.

Τα σύμπλοκα βαναδίου ασκούν επίσης αντιπολλαπλασιαστική και κυτταροτοξική δράση παρεμβαίνοντας στο μόριο του DNA των κυττάρων. Τα σύμπλοκα βαναδοκενίων αντιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες των νουκλεοτιδίων του DNA και σχηματίζουν ένα εξωτερικό ασταθή σφαιρικό σύμπλοκο. Αυτός ο τρόπος δράσης διαφέρει από τον τρόπο με τον οποίο παρεμβάλλεται το μόριο της σισπλατίνης στο DNA, η οποία σχηματίζει παράγωγα DNA τα οποία είναι εν δυνάμει μεταλλαξιογόνα (124, 158, 159). Τα σύμπλοκα βαναδίου προκαλούν επίσης και σχάση του DNA (118, 125, 127-130). Φαίνεται ότι τα σύμπλοκα βαναδίου V(IV) και V(V) δε δρουν απευθείας στο DNA των κυττάρων αλλά κυρίως παράγοντας δραστικές μορφές οξυγόνου, όπως ρίζες υδροξυλίου (OH[•]) (125). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με τη συνεπάωση DNA σολομού με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και σύμπλοκα βαναδίου έδειξαν ότι προκαλείται σχάση στην αλυσίδα του DNA με τη συμμετοχή των αντιδράσεων Fenton (129, 130). Ορισμένα σύμπλοκα και ενώσεις βαναδίου δρουν απευθείας στο DNA των κυττάρων όπως το βαναδύλιο (IV) το οποίο προκαλεί απευθείας οξειδωτική βλάβη στο μόριο του DNA ηπατικών κυττάρων (κύτταρα Chang) καθώς και αναστολή του κυτταρικού κύκλου (128) και το πεντοξείδιο του βαναδίου (V₂O₅), το οποίο προκαλεί σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA λευκών αιμοσφαιρίων και λεμφοκυττάρων (128), καθώς και σε κύτταρα των όρχεων (118).

Η ικανότητα ρύθμισης της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών (όπως της AP-1, MEK-1, ERK-1, JNK-1, PI-3K και του NF-kB) από τα σύμπλοκα βαναδίου έχει αποδειχτεί από ένα μεγάλο αριθμό μελετών, (160-162). Οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και με την βλάβη του DNA. Η ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών ρυθμίζεται μέσω της φωσφορυλίωσης των τυροσινών και εξαρτάται από τη δραστηριότητα των κυτοσολικών φωσφατάσων της τυροσίνης και των φωσφοκινάσων, που ρυθμίζουν τη φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση κομβικών πρωτεϊνών στη μεταγωγή του σήματος.

Η απενεργοποίηση των φωσφατάσων και/ή ενεργοποίηση των φωσφοκινάσων οδηγεί στη συσσώρευση φωσφορυλιωμένων καταλοίπων τυροσίνης στα κύτταρα, τη παραγωγή δευτερογενών διαβιβαστών, την ενεργοποίηση των κινάσων και την ενεργοποίηση παραγόντων όπως του NF-kB. Ο NF-kB ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων ρυθμίζουν ανοσολογικές λειτουργίες καθώς επίσης και τη λειτουργία του κυτταρικού κύκλου που οδηγεί είτε στην προστασία του κυττάρου από τον αποπτωτικό θάνατο είτε σε απόπτωση και θάνατο του κυττάρου (163, 164). Επομένως η αντικαρκινική δράση των συμπλόκων βαναδίου, σε συνάρτηση πάντα με την φωσφορυλίωση των τυροσινών και την ενεργοποίηση του NF-kB, εξαρτάται από το αν θα ενεργοποιηθούν γονίδια που οδηγούν στο θάνατο του κυττάρου ή στην έναρξη της απόπτωσης (165). Το αν θα ενεργοποιηθεί το αποπτωτικό μονοπάτι εξαρτάται από το είδος και τη συγκέντρωση του συμπλόκου βαναδίου ή και από το συνδυασμό και των δύο. Έτσι στα λεμφοκύτταρα, στα οποία τα σύμπλοκα βαναδίου επάγουν την μετατόπιση του NF-kB, το σύμπλοκο δις(μαλτολάτο)οξοβανάδιο (IV), επάγει την απόπτωση στα B λεμφοκύτταρα (166). Στα κύτταρα MC3T3E1 (κύτταρα δίκην οστεοβλάστου -osteoblast-like cells) τα σύμπλοκα βαναδίου που χρησιμοποιήθηκαν - βαναδικό (V), βαναδύλιο (VI), δις(μαλτολάτο)οξοβανάδιο (IV) και δις(μαλτολάτο)διοξοβανάδιο (V) [BMV] - και τα οποία φωσφορυλιώνουν τα κατάλοιπα τυροσίνης, επάγουν το κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλλά τον αναστέλλουν στις υψηλές, μεταβάλλοντας τη μορφολογία των κυττάρων (167). Το βαναδικό ανέστειλε την απόπτωση σε λευχαιμικά κύτταρα M07e, τα οποία καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες απουσία αυξητικών παραγόντων (168). Φαίνεται ότι, η ισορροπία μεταξύ των κινάσων και φωσφατάσων της τυροσίνης καθορίζει αν το κύτταρο θα επιβιώσει ή θα οδηγηθεί σε απόπτωση.

Οι φωσφατάσες της φωσφοτυροσίνης (Phosphotyrosine phosphatases, PTPs) είναι σημαντικά μόρια, τα οποία ρυθμίζουν τη μεταγωγή σήματος της απόπτωσης. Είναι όμως

και στόχοι του οξειδωτικού στρες (169, 170). Το βανάδιο προκαλεί ενδοκυτταρική απενεργοποίηση των PTPs (170-172), η οποία εξαρτάται κυρίως στο βαθμό οξειδώσεως του βαναδίου. Το σύμπλοκο pervanadate αναστέλλει τη δράση των φωσφατασών τυροσίνης της μεμβράνης σε επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη, ενισχύοντας τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης (173) ενώ το βαναδικό σύμπλοκο σε ηπατικά κύτταρα επίμυος (158). Επίσης και το ορθοβαναδικό σύμπλοκο σε συγκεντρώσεις από 1-10 μM αναστέλλει τις PTPs στα κύτταρα BALB/3T3 (174).

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που δείχνουν ότι τα ανόργανα άλατα βαναδίου ενεργοποιούν τις MAPKs, συμπεριλαμβανομένου τις ERK (extracellular signal –regulated protein kinase), JNK/SARK (c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase) και των πρωτεϊνών της οικογένειας της p38 (157, 160, 162, 175-177). Μέσω των πρωτεϊνών αυτών τα εξωκυττάρια ερεθίσματα εκφράζονται εντός των κυττάρων ως κυτταρικές αποκρίσεις. Τόσο το σηματοδοτικό μονοπάτι των ERKs όσο και της JNK/SARK συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του παράγοντα NF-kB μέσω της φωσφορυλίωσης του αναστολέα του I κ B (178).

Εκτός από τα ανόργανα άλατα βαναδίου, και τα σύμπλοκα βαναδίου ενεργοποιούν τον NF-kB τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα καρκινικά κύτταρα μέσω της οδού σηματοδότησης των MAPKs, οδηγώντας τα κύτταρα σε αποπτωτικό θάνατο (177, 179, 180). Το βανάδιο (IV) επάγει τη διάσπαση του I κ B και τη μετατόπιση του NF-kB σε επιθηλιακά κύτταρα της αεροφόρου οδού (175) ενώ το bis-peroxovanadium(bpV) ενεργοποιεί τον NF-kB στα T λεμφοκύτταρα (181). Τέλος, οι Jaspers et al. έδειξαν σε επιθηλιακά κύτταρα της αεροφόρου οδού (BEAS-2B) ότι το θεικό βαναδύλιο ενεργοποιεί την πρωτεΐνη p38 και ότι η ενεργοποίησή της εξαρτάται από επαγόμενο από το (IV) βανάδιο οξειδωτικό στρες (157)

Η παραγωγή ελεύθερων ριζών από τα σύμπλοκα βαναδίου είναι επίσης ένας ακόμα τρόπος με τον οποίο ενεργοποιούνται τα σηματοδοτικά μονοπάτια της απόπτωσης. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου που παράγονται από τα σύμπλοκα βαναδίου μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στα μιτοχόνδρια των κυττάρων και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C, το οποίο ενεργοποιεί τις κασπάσες-3 και -8 οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν την PARP (poly(ADP-ribose)-polymerase) και οδηγούν το κύτταρο στην απόπτωση (182-184) .

Η εκ του στόματος χορήγηση ενός συμπλόκου βαναδίου [Vanadium(III)-L-cysteine] (1 mg/kg κιλό ΣΒ) σε ποντίκια μειώνει αποτελεσματικά την έκφραση

προφλεγμονωδών παραγόντων, όπως του NF-kB, της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) και της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) (185). Τα σύμπλοκα βαναδίου ενεργοποιούν στους νεφρούς το αντιοξειδωτικό σύστημα που ρυθμίζεται από τον παράγοντα Nrf-2 επάγοντας τη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως της οξυγενάσης της αίμης (HO-1) (185, 186) και της φλαβοπρωτεΐνης NAD(P)H:κινόνη οξειδοαναγωγάσης 1 (186) καθώς και άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, Catlase, GPx) (185, 186). Πρόσφατες έρευνες έχουν χρησιμοποιήσει ως υποκαταστάτες για τη σύνθεση των συμπλόκων διάφορα φλαβονοειδή, όπως τη χρυσίνη και τη σιλιμπινίνη. Το σύμπλοκο βαναδίου oxidovanadium (IV) - χρυσίνης προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη Φάση G₂/M σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (HT-29) ενώ το σύμπλοκο βαναδίου oxidovanadium (IV) - σιλιμπινίνης αναστέλλει την ενεργοποίηση του NF-kB αυξάνοντας την απόπτωση των κυττάρων και τη δραστηριότητα της τοποϊσομεράσης IB (187). Το ίδιο σύμπλοκο (βαναδίου oxidovanadium (IV) - σιλιμπινίνης) προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου Φάση G₂/M σε ανθρώπινα κύτταρα οστεοσαρκώματος (MG-63) και ενεργοποιεί την κασπάση 3 και το μονοπάτι της απόπτωσης (188). Οι Naso et al., χρησιμοποίησαν ως υποκαταστάτη για τη σύνθεση του συμπλόκου βαναδίου, τη φλαβονόλη μορίνη. Το σύμπλοκο (oxovanadium(IV) complex, VOMor) ενεργοποιεί τις κασπάσες 3/7 στα καρκινικά κύτταρα του μαστού SKBR3 και επάγει την απόπτωση (189).

Η δομή του συμπλόκου έχει άμεση σχέση με τη βιολογική δράση του συμπλόκου. Η μελέτη των Leon et al., έδειξε ότι το σύμπλοκο VO(oxodiacetate)phen ασκεί ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση από τα σύμπλοκα VO(oxodiacetate) και VO(oxodiacetate)bipy, παράγοντας περισσότερες Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ΔΜΟ), προκαλώντας βλάβη στο DNA των οστεοσαρκωματικών κυττάρων (MG-63) και επάγοντας την απόπτωση τους (190).

Συνοπτικά, τα σύμπλοκα βαναδίου ενεργοποιούν σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα, διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια κυρίως απενεργοποιώντας της PTPs και/ή ενεργοποιώντας τις κινάσες της τυροσίνης (PTKs, protein tyrosine kinases). Η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών οδών καταλήγει στην μετατόπιση του NF-kB καθώς και στην μεταγραφή αποπτωτικών ή αντιαποπτωτικών γονιδίων. Η απόπτωση των κυττάρων μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί και μέσω των κασπασών που ενεργοποιούνται από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια λόγω της αυξημένης παραγωγής ΔΜΟ.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής τα δύο σύμπλοκα βαναδίου που εξετάστηκαν παρουσίασαν διαφορετικές δράσεις στις κυτταρικές σειρές.

1. Το Σύμπλοκο 1 :

- i. Εμφάνισε ισχυρή κυτταροτοξική δράση, ισχυρότερη της σισπλατίνης. Ισχυρή δράση παρουσίασε και ο υποκαταστάτης του συμπλόκου.
- ii. Δεν εμφανίζει εκλεκτικότητα. Δρα τόσο στα καρκινικά όσο και στα φυσιολογικά κύτταρα.
- iii. Αναστέλλει την ικανότητα των κυττάρων να αναπτύσσουν αποικίες.
- iv. Μειώνει τον αριθμό των κυττάρων στη Φάση G1 και στη Φάση S και αυξάνει τον αριθμό τους στη Φάση G2/M. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις επάγει την απόπτωση των κυττάρων.

2. Το Σύμπλοκο 2

- i. Ισχυρή κυτταροτοξική δράση (ασθενέστερη του Συμπλόκου 1). Αντίστοιχη δράση με της σισπλατίνης έναντι των U2-OS κυττάρων αλλά ασθενέστερη έναντι των LMS κυττάρων. Η δράση του υποκαταστάτη ήταν σημαντικά πιο ασθενής από ότι του συμπλόκου.
- ii. Δεν εμφανίζει εκλεκτικότητα. Δρα τόσο στα καρκινικά όσο και στα φυσιολογικά κύτταρα.
- iii. Δεν αναστέλλει την ικανότητα των κυττάρων να αναπτύσσουν αποικίες.
- iv. Μειώνει τον αριθμό των κυττάρων στη Φάση G1 και αυξάνει τον αριθμό τους στη Φάση G2/M και στη Φάση S. Δεν επάγει την απόπτωση των κυττάρων.

7. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

7.1 Ελληνική

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν οι αντικαρκινικές ιδιότητες δύο συμπλόκων βαναδίου και συγκεκριμένα του V(V)OC18DEA (Σύμπλοκο 1) και του V(IV)Od-tocDPA (Σύμπλοκο 2). Πραγματοποιήθηκαν *in vitro* πειράματα: α) σε κύτταρα λειομυοσαρκώματος επίμυος Wistar (leiomyosarcoma cells, LMS), β) σε κύτταρα οστεοσαρκώματος ανθρώπου, επιθηλιακού τύπου (U2-OS) και γ) σε φυσιολογικούς εμβρυϊκούς ινοβλάστες πνεύμονα ανθρώπου (MRC-5). Εκτιμήθηκε η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις των συμπλόκων με τη χρήση χρωστικής MTT, η ικανότητα των LMS κυττάρων να αναπτύσσουν αποικίες μετά από έκθεση στα σύμπλοκα βαναδίου ενώ μελετήθηκε και ο μηχανισμός κυτταρικού θανάτου των LMS κυττάρων που προκαλούν τα σύμπλοκα με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής (προσδιορισμός απόπτωσης/νέκρωσης και ανάλυση κυτταρικού κύκλου). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το Σύμπλοκο 1 έχει ισχυρή κυτταροτοξική δράση χωρίς να εμφανίζει εκλεκτικότητα, δρώντας τόσο στα καρκινικά όσο και στα φυσιολογικά κύτταρα ενώ αναστέλλει την ικανότητα των κυττάρων LMS να αναπτύσσουν αποικίες. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις επάγει την απόπτωση των κυττάρων μειώνοντας τον αριθμό των κυττάρων στη Φάση G1 και στη Φάση S και αυξάνοντας τον στη Φάση G2/M. Το Σύμπλοκο 2 παρουσιάζει και αυτό ισχυρή κυτταροτοξική δράση – ασθενέστερη ωστόσο του Συμπλόκου 1- χωρίς εκλεκτικότητα ενώ δεν αναστέλλει την ανάπτυξη αποικιών των LMS κυττάρων. Το Σύμπλοκο 2 μείωσε τον αριθμό των κυττάρων στη Φάση G1 και τον αύξησε στη Φάση G2/M και στη Φάση S. Δεν επάγει ωστόσο την απόπτωση των κυττάρων. Συμπερασματικά, τα σύμπλοκα βαναδίου V(V)OC18DEA και V(IV)Od-tocDPA διαθέτουν ισχυρή κυτταροτοξική δράση *in vitro* ωστόσο απαιτούνται περαιτέρω μελέτες ώστε να αυξηθεί η εκλεκτικότητα δράσης των συμπλόκων σε καρκινικά κύτταρα αλλά και να εξακριβωθεί ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους.

7.2 Αγγλική

In this dissertation we studied the antitumor properties of two novel vanadium complexes and particularly the V(V)OC18DEA (Complex 1) and V(IV)Od-tocDPA (Complex 2). The following cell lines were used: a) leiomyosarcoma Wistar rat cells (LMS), b) human osteosarcoma cells (U2-OS) and c) normal human foetal lung fibroblasts (MRC-5). The ability of cells to proliferate after incubation with increasing concentrations of the vanadium complexes was measured using the MTT assay. Experiments were also performed to study LMS cells colony formation efficiency following exposure to vanadium complexes and the mechanism of cell death using flow cytometry (apoptosis/necrosis and cell cycle analysis). The results showed that the Complex 1 has potent cytotoxic activity without displaying selectivity (acting both in cancer and normal cells) while inhibiting the ability of the LMS cells to form colonies. At higher concentrations the complex induced cell apoptosis and cell cycle arrest by reducing the number of cells in G1 and S phase and increasing them in G2/M phase. The Complex 2 had weaker cytotoxic activity than the Complex 1 and failed to inhibit the formation of LMS cell colonies. The Complex 1 caused cell cycle arrest in G2/M and S phase without induction of cell apoptosis. In conclusion, vanadium complexes (V)OC18DEA and V(IV)Od-tocDPA possess potent cytotoxic activity but further experiments are required to increase their selectivity to kill cancer cells and to determine the precise mechanism of action.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Franks L. What is cancer? In: Franks LM, Teich NM, eds. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer* 3ed 1997. 1-20 p.
2. Wills R. *The spread of tumors in the human body*. 2 ed. London: Butterworth & Co. Ltd; 1952.
3. Copper G. *Elements of Human Cancer*. Boston: Jones & Bartlett Publishers; 1992.
4. Folkman J. Tumor angiogenesis. In: Bast RC, Kufe DW, Pollack RE, et al. 5th ed. London: BC Decker; 2000.
5. Kleihues P BP, Scheithauer BW, in collaboration with LH Sobin and pathologists in 14 countries. *Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System*. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1993.
6. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-58.
7. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 2006;118(12):3030-44.
8. Eriksen M MJ, Ross H. *The Tobacco Atlas Edition F*, editor. Atlanta, USA: American Cancer Society; 2012.
9. Parkin DM. 2. Tobacco-attributable cancer burden in the UK in 2010. *Br J Cancer*. 2011;105 Suppl 2:S6-S13.
10. Secretan B. SK, Baan R., Grosse Y., El Ghissassi F., Bouvard V., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Freeman C., Galichet L., Coglian V. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol*. 2009(10(11)).
11. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis. *Alcohol Res Health*. 2001;25(4):263-70.
12. Boniol M, Autier P, Boyle P, Gandini S. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2012;345:e4757.
13. Wehner MR, Shive ML, Chren MM, Han J, Qureshi AA, Linos E. Indoor tanning and non-melanoma skin cancer: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2012;345:e5909.
14. Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol*. 2002;3(1):11-6.
15. Bartosch B. Hepatitis B and C viruses and hepatocellular carcinoma. *Viruses*. 2010;2(8):1504-9.
16. Vockerodt M, Yap LF, Shannon-Lowe C, Curley H, Wei W, Vrzalikova K, et al. The Epstein-Barr virus and the pathogenesis of lymphoma. *J Pathol*. 2015;235(2):312-22.
17. Dow DE, Cunningham CK, Buchanan AM. A Review of Human Herpesvirus 8, the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus, in the Pediatric Population. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2014;3(1):66-76.
18. Pandey R, Misra V, Misra SP, Dwivedi M, Kumar A, Tiwari BK. Helicobacter pylori and gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010;11(3):583-8.
19. Borrego-Soto G, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A. Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. *Genet Mol Biol*. 2015;38(4):420-32.
20. Pavia M, Bianco A, Pileggi C, Angelillo IF. Meta-analysis of residential exposure to radon gas and lung cancer. *Bull World Health Organ*. 2003;81(10):732-8.

21. Yoon JY, Lee JD, Joo SW, Kang DR. Indoor radon exposure and lung cancer: a review of ecological studies. *Ann Occup Environ Med.* 2016;28:15.
22. Simon S. Nuclear Weapons Tests and Cancer Risks Exposures 50 years ago still have health implications today that will continue into the future. *American Scientist.* 2006;48-57
23. Kleinerman RA. Cancer risks following diagnostic and therapeutic radiation exposure in children. *Pediatr Radiol.* 2006;36 Suppl 2:121-5.
24. Hall EJ, Brenner DJ. Cancer risks from diagnostic radiology. *Br J Radiol.* 2008;81(965):362-78.
25. Brown E, Ingianni E. Pesticide Education and Assessment Programs, Pesticide Information Leaflet, <http://pesticide.umd.edu>, Orig.Last rev. June 2013. 1999(33):1-13.
26. Blair A, Zahm SH, Pearce NE, Heineman EF, Fraumeni JF, Jr. Clues to cancer etiology from studies of farmers. *Scand J Work Environ Health.* 1992;18(4):209-15.
27. Settimi L, Masina A, Andrion A, Axelson O. Prostate cancer and exposure to pesticides in agricultural settings. *Int J Cancer.* 2003;104(4):458-61.
28. Lafiura KM, Bielawski DM, Posecion NC, Jr., Ostrea EM, Jr., Matherly LH, Taub JW, et al. Association between prenatal pesticide exposures and the generation of leukemia-associated T(8;21). *Pediatr Blood Cancer.* 2007;49(5):624-8.
29. Kaldor JM, Day NE, Pettersson F, Clarke EA, Pedersen D, Mehnert W, et al. Leukemia following chemotherapy for ovarian cancer. *N Engl J Med.* 1990;322(1):1-6.
30. Farrell RJ, Ang Y, Kileen P, O'Briain DS, Kelleher D, Keeling PW, et al. Increased incidence of non-Hodgkin's lymphoma in inflammatory bowel disease patients on immunosuppressive therapy but overall risk is low. *Gut.* 2000;47(4):514-9.
31. Bewtra M, Lewis JD. Update on the risk of lymphoma following immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease. *Expert Rev Clin Immunol.* 2010;6(4):621-31.
32. Weiderpass E, Adami HO, Baron JA, Magnusson C, Bergstrom R, Lindgren A, et al. Risk of endometrial cancer following estrogen replacement with and without progestins. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(13):1131-7.
33. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med.* 2006;354(3):270-82.
34. Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, et al. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA.* 2003;289(24):3243-53.
35. Bernstein L, Deapen D, Cerhan JR, Schwartz SM, Liff J, McGann-Maloney E, et al. Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(19):1654-62.
36. Hu R, Hilakivi-Clarke L, Clarke R. Molecular mechanisms of tamoxifen-associated endometrial cancer (Review). *Oncol Lett.* 2015;9(4):1495-501.
37. Mott FE. Mesothelioma: a review. *Ochsner J.* 2012;12(1):70-9.
38. Rice FL, Park R, Stayner L, Smith R, Gilbert S, Checkoway H. Crystalline silica exposure and lung cancer mortality in diatomaceous earth industry workers: a quantitative risk assessment. *Occupational and Environmental Medicine.* 2001;58(1):38-45.
39. Siew SS, Kauppinen T, Kyyronen P, Heikkila P, Pukkala E. Occupational exposure to wood dust and formaldehyde and risk of nasal, nasopharyngeal, and lung cancer among Finnish men. *Cancer Manag Res.* 2012;4:223-32.

40. Abdel-Shafy HI, Mansour MSM. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*. 2016;25(1):107-23.
41. Rengarajan T, Rajendran P, Nandakumar N, Lokeshkumar B, Rajendran P, Nishigaki I. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015;5(3):182-9.
42. Armstrong B, Hutchinson E, Unwin J, Fletcher T. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environ Health Perspect*. 2004;112(9):970-8.
43. Rossman TG. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2003;533(1–2):37-65.
44. Martin R, Dowling K, Pearce D, Sillitoe J, Florentine S. Health Effects Associated with Inhalation of Airborne Arsenic Arising from Mining Operations. *Geosciences*. 2014;4(3):128.
45. Sanderson WT, Ward EM, Steenland K, Petersen MR. Lung cancer case-control study of beryllium workers. *Am J Ind Med*. 2001;39(2):133-44.
46. Nemery B. Metal toxicity and the respiratory tract. *Eur Respir J*. 1990;3(2):202-19.
47. Holmes AL, Wise SS, Wise JP, Sr. Carcinogenicity of hexavalent chromium. *Indian J Med Res*. 2008;128(4):353-72.
48. Kew MC. Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Liver Dis*. 2013;22(3):305-10.
49. Whiteside TL. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol*. 2006;16(1):3-15.
50. Key TJ, Schatzkin A, Willett WC, Allen NE, Spencer EA, Travis RC. Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutr*. 2004;7(1A):187-200.
51. Key J, Spencer A, Reeves K. Symposium 1: Overnutrition: consequences and solutions Obesity and cancer risk. 2010(69):86-90
52. Tannock F, Bristow R, Harrington L. *The Basic Science of Oncology*. Fifth edition ed: The McGraw-Hill Companies 2013.
53. Varnus H, Weinberg A. *Genes and the Biology of Cancer*. New York: WH Freeman & Co; 1993.
54. Sklar L, Costa J. Principles of cancer management. In: De Vita VT, Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 5 ed. Philadelphia: JB Lippincot Co; 1997.
55. Lemoine R, Stamp H. The molecular pathology of cancer. 3 ed. In: Franks LM TM, editor: New York Oxford University Press; 1997.
56. Chatterjee SK, Zetter BR. Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. *Future Oncol*. 2005;1(1):37-50.
57. Sobin LH, Fleming ID. TNM classification of malignant tumors, fifth edition (1997). *Cancer*. 1997;80(9):1803-4.
58. Dukes CE. Discussion on major surgery in carcinoma of the rectum with or without colostomy, excluding the anal canal and including the rectosigmoid: general results of surgical treatment. *Proc R Soc Med*. 1957;50(12):1031-5.
59. Miller EB. 5-year review of carcinoma of the breast: analysis according to Columbia Classification. *Annals of Surgery*. 1966;163(4):629-33.

60. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
61. Μάρτης Χ.Σ. ΣτοματοΓναθοπροσωπική Χειρουργική. Τόμας Α'. Αθήνα 1990.
62. Pollock E, Morton L. Principles of surgical oncology. 6 ed. In: Kufe DW PR, Weichselbaum RR, Bast RC, Gansler TS, Holland JF, Frei E III, editor. Hamilton, Ontario: BC Decker; 2003.
63. Niederhuber E. Surgical Interventions in Cancer. . 4 ed. In: Abeloff MD AJ, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG, editor. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2008.
64. Lee J, Ito Y, Phillips H. Minimally Invasive Surgery for Cancer. In: Silberman H, Silberman AW, eds. Principles and Practice of Surgical Oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
65. Mundt J, Roeske C, Chung D. Weichselbaum RR. Radiation oncology. In: Kufe DW, Bast RC, Hait WN, et al., 7 ed. Hamilton, Ontario: BC: Decker Inc; 2006.
66. Halperin C, Perez A, Brady W. Principles and Practice of Radiation Oncology. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
67. Chao C, Perez A, Brady W. Radiation Oncology Management Decisions. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
68. Gullatt M, Gaddis J. Chemotherapy. 8 ed: American Cancer Society 2004.
69. Freter E, Perry MSTIAM, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG, eds. Abeloff's Clinical Oncology. Hall EJ, Brenner DJ. Cancer risks from diagnostic radiology *Br J Radiol*. . 4 ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2008.
70. Gerber J, Reiter A, Steinbauer R, Jakob S, Kuhn CD, Cramer P, et al. Site specific phosphorylation of yeast RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(3):793-802.
71. Hansen TV, Aaseth J, Alexander J. The effect of chelating agents on vanadium distribution in the rat body and on uptake by human erythrocytes. *Archives of Toxicology*. 1982;50(3):195-202.
72. Fairchild A, Tirumani SH, Rosenthal MH, Howard SA, Krajewski KM, Nishino M, et al. Hormonal therapy in oncology: a primer for the radiologist. *AJR Am J Roentgenol*. 2015;204(6):W620-30.
73. Meiliana A, Dewi M, Wijaya A-. Cancer Immunotherapy: A Review. *Indones Biomed J*. 2016;1(8):1-20.
74. Reed E. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treatment Reviews*. 1998;24(5):331-44.
75. Eckhardt S. Recent progress in the development of anticancer agents. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2002;2(3):419-39.
76. Abrams RA, Cardinale RM, Enger C, Haulk TL, Hurwitz H, Osterman F, et al. Influence of prognostic groupings and treatment results in the management of unresectable hepatoma: experience with Cisplatin-based chemoradiotherapy in 76 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1997;39(5):1077-85.
77. Sedletska Y, Giraud-Panis MJ, Malinge JM. Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2005;5(3):251-65.
78. Harder HC, Rosenberg B. Inhibitory effects of anti-tumor platinum compounds on DNA, RNA and protein syntheses in mammalian cells in vitro. *Int J Cancer*. 1970;6(2):207-16.
79. Masuda H. [Large intestinal carcinoma associated with cancers of the other organs, double cancer of the large intestine and stomach]. *Nihon Rinsho*. 1994;Suppl 6:303-6.

80. Galanski M, Slaby S, Jakupec MA, Keppler BK. Synthesis, characterization, and in vitro antitumor activity of osteotropic diam(m)ineplatinum(II) complexes bearing a N,N-bis(phosphonomethyl)glycine ligand. *J Med Chem*. 2003;46(23):4946-51.
81. Galanski M, Slaby S, Jakupec MA, Keppler BK. Synthesis and in vitro antitumor potency of (cyclohexane-1,2-diamine)platinum(II) complexes with aminotris(methylenephosphonic acid) as bone-seeking ligand. *Bioinorg Chem Appl*. 2005;179-90.
82. Alama A, Tasso B, Novelli F, Sparatore F. Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotins as antitumor agents. *Drug Discov Today*. 2009;14(9-10):500-8.
83. Harrap KR. Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative. *Cancer Treat Rev*. 1985;12 Suppl A:21-33.
84. de Gramont A, Figier A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18(16):2938-47.
85. Calamai P, Carotti S, Guerri A, Mazzei T, Messori L, Mini E, et al. Cytotoxic effects of gold(III) complexes on established human tumor cell lines sensitive and resistant to cisplatin. *Anticancer Drug Des*. 1998;13(1):67-80.
86. Schmitt MW, Prindle MJ, Loeb LA. Implications of genetic heterogeneity in cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1267:110-6.
87. Ghadah Al Saanna MD, Judith Bovée MD P, Jason Hornick MD PaALM, PhD. A Review of the WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. 2002.
88. DeVita VT LT, Rosenberg SA. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 8th edition ed. Philadelphia 2011.
89. Rosenberg AE. WHO Classification of Soft Tissue and Bone, fourth edition: summary and commentary. *Curr Opin Oncol*. 2013;25(5):571-3.
90. Alfranca A, Martinez-Cruzado L, Tornin J, Abarrategi A, Amaral T, de Alava E, et al. Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(16):3097-113.
91. Bracken WM, Sharma RP, Elsner YY. Vanadium accumulation and subcellular distribution in relation to vanadate induced cytotoxicity in vitro. *Cell Biol Toxicol*. 1985;1(4):259-68.
92. Cortizo AM, Bruzzone L, Molinuevo S, Etcheverry SB. A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines. *Toxicology*. 2000;147(2):89-99.
93. Thompson HJ, Chasteen ND, Meeker LD. Dietary vanadyl(IV) sulfate inhibits chemically-induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1984;5(6):849-51.
94. Sabbioni E, Pozzi G, Devos S, Pintar A, Casella L, Fischbach M. The intensity of vanadium(V)-induced cytotoxicity and morphological transformation in BALB/3T3 cells is dependent on glutathione-mediated bioreduction to vanadium(IV). *Carcinogenesis*. 1993;14(12):2565-8.
95. Cantley LC, Jr., Cantley LG, Josephson L. A characterization of vanadate interactions with the (Na,K)-ATPase. Mechanistic and regulatory implications. *J Biol Chem*. 1978;253(20):7361-8.
96. Heinz A, Robinson KA, Grantham JJ. The transport and accumulation of oxyvanadium compounds in human erythrocytes in vitro. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 100(4):593-612.

97. Sakurai H, Shimomura S, Fukuzawa K, Ishizu K. Detection of oxovanadium (IV) and characterization of its ligand environment in subcellular fractions of the liver of rats treated with pentavalent vanadium(V). *Biochem Biophys Res Commun*. 1980;96(1):293-8.
98. Sharma RP, Oberg SG, Parker RD. Vanadium retention in rat tissues following acute exposures to different dose levels. *J Toxicol Environ Health*. 1980;6(1):45-54.
99. Nechay BR, Nanninga LB, Nechay PS. Vanadyl (IV) and vanadate (V) binding to selected endogenous phosphate, carboxyl, and amino ligands; calculations of cellular vanadium species distribution. *Arch Biochem Biophys*. 1986;251(1):128-38.
100. Tasiopoulos AJ, Troganis AN, Deligiannakis Y, Evangelou A, Kabanos TA, Woollins JD, et al. Synthetic analogs for oxovanadium(IV/V)-glutathione interaction: an NMR, EPR, synthetic and structural study of oxovanadium(IV/V) compounds with sulfhydryl-containing pseudopeptides and dipeptides. *J Inorg Biochem*. 2000;79(1-4):159-66.
101. Rizk SL, Sky-Peck HH. Comparison between concentrations of trace elements in normal and neoplastic human breast tissue. *Cancer Res*. 1984;44(11):5390-4.
102. Iwai K, Ido T, Iwata R, Kawamura M, Kimura S. Localizing efficiency of [48V]vanadyl-pheophorbide in tumor as a new tumor imaging agent. *Int J Rad Appl Instrum B*. 1989;16(8):783-9.
103. Harding MM, Mokdsi G. Antitumour metallocenes: structure-activity studies and interactions with biomolecules. *Curr Med Chem*. 2000;7(12):1289-303.
104. Domingo JL, Gomez M, Sanchez DJ, Llobet JM, Keen CL. Toxicology of vanadium compounds in diabetic rats: the action of chelating agents on vanadium accumulation. *Mol Cell Biochem*. 1995;153(1-2):233-40.
105. Barceloux DG. Vanadium. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1999;37(2):265-78.
106. Cohen N, Halberstam M, Shlimovich P, Chang CJ, Shamoon H, Rossetti L. Oral vanadyl sulfate improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1995;95(6):2501-9.
107. Goldfine AB, Simonson DC, Folli F, Patti ME, Kahn CR. Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetes mellitus in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(11):3311-20.
108. Boden G, Chen X, Ruiz J, van Rossum GD, Turco S. Effects of vanadyl sulfate on carbohydrate and lipid metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 1996;45(9):1130-5.
109. Somerville J, Davies B. Effect of vanadium on serum cholesterol. *American Heart Journal*. 1962;64(1):54-6.
110. Domingo JL. Vanadium: A review of the reproductive and developmental toxicity. *Reproductive Toxicology*. 1996;10(3):175-82.
111. Dai S, Thompson KH, Vera E, McNeill JH. Toxicity studies on one-year treatment of non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats with vanadyl sulphate. *Pharmacol Toxicol*. 1994;75(5):265-73.
112. Dai S, Vera E, McNeill JH. Lack of haematological effect of oral vanadium treatment in rats. *Pharmacol Toxicol*. 1995;76(4):263-8.
113. Liasko R KS, Kabanos Th, et al. Antitumor effects of a vanadium complex with cysteine on malignant cell lines and tumor-bearing Wistar rats. *Metal Ions Biol Med*. 2000(6):577-9.
114. Evangelou A, Karkabounas S, Kalpouzou G, Malamas M, Liasko R, Stefanou D, et al. Comparison of the therapeutic effects of two vanadium complexes administered at low dose on benzo[a]pyrene-induced malignant tumors in rats. *Cancer Lett*. 1997;119(2):221-5.

115. Liasko R, Kabanos TA, Karkabounas S, Malamas M, Tasiopoulos AJ, Stefanou D, et al. Beneficial effects of a vanadium complex with cysteine, administered at low doses on benzo(alpha)pyrene-induced leiomyosarcomas in Wistar rats. *Anticancer Res.* 1998;18(5A):3609-13.
116. al-Bayati MA, Giri SN, Raabe OG, Rosenblatt LS, Shifrine M. Time and dose-response study of the effects of vanadate on rats: morphological and biochemical changes in organs. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 1989;9(5-6):435-55.
117. Domingo JL. Vanadium and diabetes. What about vanadium toxicity? *Mol Cell Biochem.* 2000;203(1-2):185-7.
118. Altamirano-Lozano M, Valverde M, Alvarez-Barrera L, Molina B, Rojas E. Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V(2)O(5)) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratog Carcinog Mutagen.* 1999;19(4):243-55.
119. Hanauske U, Hanauske A-R, Marshall MH, Muggia VA, Von Hoff DD. Biphasic Effect of Vanadium Salts on In Vitro Tumor Colony Growth. *The International Journal of Cell Cloning.* 1987;5(2):170-8.
120. Morinville A, Maysinger D, Shaver A. From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 1998;19(11):452-60.
121. Faure R, Vincent M, Dufour M, Shaver A, Posner BI. Arrest at the G2/M transition of the cell cycle by protein-tyrosine phosphatase inhibition: studies on a neuronal and a glial cell line. *J Cell Biochem.* 1995;59(3):389-401.
122. Jaspers I SJ, Erzurum S, Reed W. Vanadium-induced kB dependent transcription depends upon peroxide-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Cell Mol.* 2000;23:95-102.
123. Kuo LY, Liu AH, Marks TJ. Metallocene interactions with DNA and DNA-processing enzymes. *Met Ions Biol Syst.* 1996;33:53-85.
124. Kopf-Maier P. Complexes of metals other than platinum as antitumour agents. *Eur J Clin Pharmacol.* 1994;47(1):1-16.
125. Sakurai H. Vanadium distribution in rats and DNA cleavage by vanadyl complex: implication for vanadium toxicity and biological effects. *Environ Health Perspect.* 1994;102 Suppl 3:35-6.
126. Sakurai H, Tamura H, Okatani K. Mechanism for a new antitumor vanadium complex: hydroxyl radical-dependent DNA cleavage by 1,10-phenanthroline-vanadyl complex in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;206(1):133-7.
127. Sit KH, Paramanantham R, Bay BH, Chan HL, Wong KP, Thong P, et al. Sequestration of mitotic (M-phase) chromosomes in autophagosomes: mitotic programmed cell death in human Chang liver cells induced by an OH* burst from vanadyl(4). *Anat Rec.* 1996;245(1):1-8.
128. Rojas E, Valverde M, Herrera LA, Altamirano-Lozano M, Ostrosky-Wegman P. Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutat Res.* 1996;359(2):77-84.
129. Lloyd DR, Phillips DH, Carmichael PL. Generation of putative intrastrand cross-links and strand breaks in DNA by transition metal ion-mediated oxygen radical attack. *Chem Res Toxicol.* 1997;10(4):393-400.
130. Lloyd DR, Carmichael PL, Phillips DH. Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by fenton reactions. *Chem Res Toxicol.* 1998;11(5):420-7.

131. Huang C, Chen N, Ma WY, Dong Z. Vanadium induces AP-1- and NFkappaB-dependent transcription activity. *Int J Oncol.* 1998;13(4):711-5.
132. Ding M, Li JJ, Leonard SS, Ye JP, Shi X, Colburn NH, et al. Vanadate-induced activation of activator protein-1: role of reactive oxygen species. *Carcinogenesis.* 1999;20(4):663-8.
133. Chen D, Milacic V, Frezza M, Dou QP. Metal Complexes, their Cellular Targets and Potential for Cancer Therapy. *Current Pharmaceutical Design.* 2009;15(7):777-91.
134. Takenaga K. Suppression of metastatic potential of high-metastatic Lewis lung carcinoma cells by vanadate, an inhibitor of tyrosine phosphatase, through inhibiting cell-substrate adhesion. *Invasion Metastasis.* 1996;16(2):97-106.
135. Matsuyoshi N, Hamaguchi M, Taniguchi S, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M. Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J Cell Biol.* 1992;118(3):703-14.
136. Lubber B, Candidus S, Handschuh G, Mentele E, Hutzler P, Feller S, et al. Tumor-derived mutated E-cadherin influences beta-catenin localization and increases susceptibility to actin cytoskeletal changes induced by pervanadate. *Cell Adhes Commun.* 2000;7(5):391-408.
137. Kang YJ, Zhou ZX, Wang GW, Buridi A, Klein JB. Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 2000;275(18):13690-8.
138. Dhawan S, Singh S, Aggarwal BB. Induction of endothelial cell surface adhesion molecules by tumor necrosis factor is blocked by protein tyrosine phosphatase inhibitors: role of the nuclear transcription factor NF-kappa B. *Eur J Immunol.* 1997;27(9):2172-9.
139. Biggerstaff JP, Seth N, Amirkhosravi A, Amaya M, Fogarty S, Meyer TV, et al. Soluble fibrin augments platelet/tumor cell adherence in vitro and in vivo, and enhances experimental metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 1999;17(8):723-30.
140. Aguirre Ghiso JA, Farias EF, Alonso DF, Bal de Kier Joffe E. Secretion of urokinase and metalloproteinase-9 induced by staurosporine is dependent on a tyrosine kinase pathway in mammary tumor cells. *Int J Cancer.* 1998;76(3):362-7.
141. Chiang TM. Okadaic acid and vanadate inhibit collagen-induced platelet aggregation; the functional relation of phosphatases on platelet aggregation. *Thromb Res.* 1992;67(4):345-54.
142. Lubber K, Siess W. Integrin-dependent protein dephosphorylation on tyrosine induced by activation of the thrombin receptor in human platelets. *Cell Signal.* 1994;6(3):279-84.
143. Famiglietti J, Sun J, DeLisser HM, Albelda SM. Tyrosine residue in exon 14 of the cytoplasmic domain of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) regulates ligand binding specificity. *J Cell Biol.* 1997;138(6):1425-35.
144. Papaioannou A, Manos M, Karkabounas S, Liasko R, Evangelou AM, Correia I, et al. Solid state and solution studies of a vanadium(III)-l-cysteine compound and demonstration of its antimetastatic, antioxidant and inhibition of neutral endopeptidase activities. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2004;98(6):959-68.
145. Bishayee A, Oinam S, Basu M, Chatterjee M. Vanadium chemoprevention of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary carcinogenesis: probable involvement of representative hepatic phase I and II xenobiotic metabolizing enzymes. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2000;63(2):133-45.
146. Bishayee A, Karmakar R, Mandal A, Kundu SN, Chatterjee M. Vanadium-mediated chemoprotection against chemical hepatocarcinogenesis in rats: haematological and histological characteristics. *Eur J Cancer Prev.* 1997;6(1):58-70.

147. Chakraborty A, Selvaraj S. Differential modulation of xenobiotic metabolizing enzymes by vanadium during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in Sprague-Dawley rats. *Neoplasma*. 2000;47(2):81-9.
148. Sardar S, Ghosh R, Mondal A, Chatterjee M. Protective role of vanadium in the survival of hosts during the growth of a transplantable murine lymphoma and its profound effects on the rates and patterns of biotransformation. *Neoplasma*. 1993;40(1):27-30.
149. Chakraborty A, Chatterjee M. Enhanced erythropoietin and suppression of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) activity in murine lymphoma following administration of vanadium. *Neoplasma*. 1994;41(5):291-6.
150. Chakraborty A, Ghosh R, Roy K, Ghosh S, Chowdhury P, Chatterjee M. Vanadium: A Modifier of Drug-Metabolizing Enzyme Patterns and Its Critical Role in Cellular Proliferation in Transplantable Murine Lymphoma. *Oncology*. 1995;52(4):310-4.
151. Cruz TF, Morgan A, Min W. In vitro and in vivo antineoplastic effects of orthovanadate. *Mol Cell Biochem*. 1995;153(1-2):161-6.
152. Evangelou AM. Vanadium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;42(3):249-65.
153. Stefanou DG, Nonni AV, Kalpouzos G, Evangelou A, Agnantis NJ. Immunophenotype, ras oncogenes and p53 onco-suppressor gene in benzo(a)pyrene induced malignant soft tissue tumours in Wistar rats. *In Vivo*. 1998;12(5):511-21.
154. Vartholomatos G, Alexiou GA, Batistatou A, Lykoudis E, Voulgaris S, Kyritsis AP. Rapid cell cycle analysis for intraoperative diagnosis of brain tumors. *Brain Tumor Pathol*. 2015;32(2):151-2.
155. Krady M-M, Freyermuth S, Rogue P, Malviya AN. Pervanadate elicits proliferation and mediates activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in the nucleus 1. *FEBS Letters*. 1997;412(3):420-4.
156. Hanauske U, Hanauske AR, Marshall MH, Muggia VA, Von Hoff DD. Biphasic effect of vanadium salts on in vitro tumor colony growth. *Int J Cell Cloning*. 1987;5(2):170-8.
157. Jaspers I, Samet JM, Erzurum S, Reed W. Vanadium-induced kappaB-dependent transcription depends upon peroxide-induced activation of the p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;23(1):95-102.
158. Djordjevic C, Wilkins PL, Sinn E, Butcher RJ. Peroxo aminopolycarboxylato vanadate(V) of an unusually low toxicity: synthesis and structure of the very stable $K_2[VO(O_2)(C_6H_6NO_6)] \cdot 2H_2O$. *Inorganica Chimica Acta*. 1995;230(1):241-4.
159. Aubrecht J, Narla RK, Ghosh P, Stanek J, Uckun FM. Molecular genotoxicity profiles of apoptosis-inducing vanadocene complexes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999;154(3):228-35.
160. Pandey SK, Theberge JF, Bernier M, Srivastava AK. Phosphatidylinositol 3-kinase requirement in activation of the ras/C-raf-1/MEK/ERK and p70(s6k) signaling cascade by the insulinomimetic agent vanadyl sulfate. *Biochemistry*. 1999;38(44):14667-75.
161. Ding M, Li J-J, Leonard SS, Ye J-P, Shi X, Colburn NH, et al. Vanadate-induced activation of activator protein-1: role of reactive oxygen species. *Carcinogenesis*. 1999;20(4):663-8.
162. Huang C, Zhang Z, Ding M, Li J, Ye J, Leonard SS, et al. Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *J Biol Chem*. 2000;275(42):32516-22.
163. Mercurio F, Manning AM. Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11(2):226-32.

164. Bours V, Bentires-Alj M, Hellin A-C, Viatour P, Robe P, Delhalle S, et al. Nuclear factor- κ B, cancer, and apoptosis. *Biochemical Pharmacology*. 2000;60(8):1085-9.
165. Manning FC, Patierno SR. Apoptosis: inhibitor or instigator of carcinogenesis? *Cancer Invest*. 1996;14(5):455-65.
166. Schieven GL, Wahl AF, Myrdal S, Grosmaire L, Ledbetter JA. Lineage-specific induction of B cell apoptosis and altered signal transduction by the phosphotyrosine phosphatase inhibitor bis(maltolato)oxovanadium(IV). *J Biol Chem*. 1995;270(35):20824-31.
167. Sálice VC, Cortizo AM, Dumm CLG, Etcheverry SB, Etcheverry SB. Tyrosine phosphorylation and morphological transformation induced by four vanadium compounds on MC3T3E1 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1999;198(1):119-28.
168. Bergamaschi G, Rosti V, Danova M, Ponchio L, Lucotti C, Cazzola M. Inhibitors of tyrosine phosphorylation induce apoptosis in human leukemic cell lines. *Leukemia*. 1993;7(12):2012-8.
169. Lau KH, Baylink DJ. Phosphotyrosyl protein phosphatases: potential regulators of cell proliferation and differentiation. *Crit Rev Oncog*. 1993;4(4):451-71.
170. Krejsa CM, Nadler SG, Esselstyn JM, Kavanagh TJ, Ledbetter JA, Schieven GL. Role of oxidative stress in the action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. Redox independent activation of NF- κ B. *J Biol Chem*. 1997;272(17):11541-9.
171. Gresser MJ, Tracey AS. Vanadates as Phosphate Analogs in Biochemistry. In: Chasteen ND, editor. *Vanadium in Biological Systems: Physiology and Biochemistry*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1990. p. 63-79.
172. Gordon JA. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol*. 1991;201:477-82.
173. Boissonneault M, Chapdelaine A, Chevalier S. The enhancement by pervanadate of tyrosine phosphorylation on prostatic proteins occurs through the inhibition of membrane-associated tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem*. 1995;153(1-2):139-44.
174. Sakai A. Orthovanadate, an inhibitor of protein tyrosine phosphatases, acts more potently as a promoter than as an initiator in the BALB/3T3 cell transformation. *Carcinogenesis*. 1997;18(7):1395-9.
175. Jaspers I, Samet JM, Reed W. Arsenite exposure of cultured airway epithelial cells activates κ B-dependent interleukin-8 gene expression in the absence of nuclear factor- κ B nuclear translocation. *J Biol Chem*. 1999;274(43):31025-33.
176. English LH, Macara IG, Cantley LC. Vanadium stimulates the (Na⁺,K⁺) pump in friend erythroleukemia cells and blocks erythropoiesis. *J Cell Biol*. 1983;97(4):1299-302.
177. Samet JM, Graves LM, Quay J, Dailey LA, Devlin RB, Ghio AJ, et al. Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1998;275(3):L551-L8.
178. Jaspers I, Flescher E, Chen LC. Respiratory epithelial cells display polarity in their release of the chemokine IL-8 after exposure to ozone. *Inflamm Res*. 1997;46 Suppl 2:S173-4.
179. Pandey SK, Chiasson JL, Srivastava AK. Vanadium salts stimulate mitogen-activated protein (MAP) kinases and ribosomal S6 kinases. *Mol Cell Biochem*. 1995;153(1-2):69-78.
180. Zhao Z, Tan Z, Diltz CD, You M, Fischer EH. Activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway by pervanadate, a potent inhibitor of tyrosine phosphatases. *J Biol Chem*. 1996;271(36):22251-5.

181. Ouellet M, Barbeau B, Tremblay MJ. p56(lck), ZAP-70, SLP-76, and calcium-regulated effectors are involved in NF-kappaB activation by bisperoxovanadium phosphotyrosyl phosphatase inhibitors in human T cells. *J Biol Chem.* 1999;274(49):35029-36.
182. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998;281(5381):1309-12.
183. Burkle A. Poly(ADP-ribosyl)ation, genomic instability, and longevity. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;908:126-32.
184. Strianese M, Basile A, Mazzone A, Morello S, Turco MC, Pellicchia C. Therapeutic potential of a pyridoxal-based vanadium(IV) complex showing selective cytotoxicity for cancer versus healthy cells. *J Cell Physiol.* 2013;228(11):2202-9.
185. Basu A, Singha Roy S, Bhattacharjee A, Bhuniya A, Baral R, Biswas J, et al. Vanadium(III)-L-cysteine protects cisplatin-induced nephropathy through activation of Nrf2/HO-1 pathway. *Free Radic Res.* 2016;50(1):39-55.
186. Basu A, Bhattacharjee A, Hajra S, Samanta A, Bhattacharya S. Ameliorative effect of an oxovanadium (IV) complex against oxidative stress and nephrotoxicity induced by cisplatin. *Redox Rep.* 2016:1-11.
187. Leon IE, Cadavid-Vargas JF, Tiscornia I, Porro V, Castelli S, Katkar P, et al. Oxidovanadium(IV) complexes with chrysin and silibinin: anticancer activity and mechanisms of action in a human colon adenocarcinoma model. *J Biol Inorg Chem.* 2015;20(7):1175-91.
188. Leon IE, Porro V, Di Virgilio AL, Naso LG, Williams PA, Bollati-Fogolin M, et al. Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of an oxidovanadium(IV) complex with the flavonoid silibinin against osteosarcoma cells. *J Biol Inorg Chem.* 2014;19(1):59-74.
189. Naso LG, Lezama L, Rojo T, Etcheverry SB, Valcarcel M, Roura M, et al. Biological evaluation of morin and its new oxovanadium(IV) complex as antioxidant and specific anti-cancer agents. *Chem Biol Interact.* 2013;206(2):289-301.
190. Leon IE, Butenko N, Di Virgilio AL, Muglia CI, Baran EJ, Cavaco I, et al. Vanadium and cancer treatment: antitumoral mechanisms of three oxidovanadium(IV) complexes on a human osteosarcoma cell line. *J Inorg Biochem.* 2014;134:106-17.

Ιστοσελίδες

International Agency for Research on Cancer. <http://eco.iarc.fr/eucan/>