



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Χημικά Τροποποιημένα Παράγωγα Στεροειδών. Σχεδιασμός και Ανάπτυξη
Νέων Έξυπνων Μέταλλο-Φαρμάκων που Στοχεύουν Εκλεκτικά τα
Καρκινικά Κύτταρα του Μαστού.**

Μαρία-Ελένη Σταθοπούλου

Μοριακή Βιολόγος και Γενετίστρια, MSc "Ιατρική Χημεία"

Επιβλέπων Καθηγητής:

Σωτήριος Κ. Χατζηκακού, Καθηγητής Τμήματος Χημείας

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Χημικά Τροποποιημένα Παράγωγα Στεροειδών. Σχεδιασμός και Ανάπτυξη
Νέων Έξυπνων Μέταλλο-Φαρμάκων που Στοχεύουν Εκλεκτικά τα
Καρκινικά Κύτταρα του Μαστού.**

Μαρία-Ελένη Σταθοπούλου

Μοριακή Βιολόγος και Γενετίστρια, MSc "Ιατρική Χημεία"

Επιβλέπων Καθηγητής:

Σωτήριος Κ. Χατζηκακού, Καθηγητής Τμήματος Χημείας

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών
Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του
συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Συνέλευση: 948^A/ 12 - 05 - 2017

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Δρ. Σ. Κ. Χατζηκακού Καθηγητής Τμήμα Χημείας Π.Ι.

Μέλη:

Δρ. Ν. Κουρκουμέλης Επίκουρος Καθηγητής Τμήμα Ιατρικής Π.Ι.

Δρ. Κ. Φυλακτακίδου Καθηγήτρια Τμήμα Χημείας Α.Π.Θ.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 18 - 05 - 2017

Θέμα: «Χημικά Τροποποιημένα Παράγωγα Στεροειδών. Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Νέων Έξυπνων Μέταλλο-Φαρμάκων που Στοχεύουν Εκλεκτικά τα Καρκινικά Κύτταρα του Μαστού.»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Συνέλευση: 1017^A/ 27 - 05 - 2020

1. Δρ. Σ. Κ. Χατζηκακού Καθηγητής Τμήμα Χημείας Π.Ι.
2. Δρ. Ν. Κουρκουμέλης Επίκουρος Καθηγητής Τμήμα Ιατρικής Π.Ι.
3. Δρ. Κ. Φυλακτακίδου Καθηγήτρια Τμήμα Χημείας Α.Π.Θ.
4. Δρ. Σ. Περλεπές Καθηγητής Τμήμα Χημείας Παν. Πατρών
5. Δρ. Α. Κουτσολέλος Καθηγητής Τμήμα Χημείας Παν. Κρήτης
6. Δρ. Θ. Μαυρομούστακος Καθηγητής Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ
7. Δρ. Μ-Ε. Λέκκα Καθηγήτρια Τμήμα Χημείας Π.Ι.

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 17 - 06 - 2020

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Λουλούδη Μαρία, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος
Ξανθή Τουτουνζόγλου

Στους γονείς μου...

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	5
A. Εισαγωγή.....	7
Κεφάλαιο 1.....	7
1.1. Καρκίνος.....	7
1.2. Καρκίνος του μαστού.....	9
1.3. Θεραπείες που εφαρμόζονται στον καρκίνο του μαστού.....	16
1.4. Καρκινικές κυτταρικές σειρές.....	25
Κεφάλαιο 2.....	27
2.1. Χολικά οξέα.....	27
2.2. Χολικά οξέα και συζεύγματά τους με αντικαρκινικά φάρμακα.....	38
Κεφάλαιο 3.....	47
3.1. Κασσίτερος γενικά.....	47
3.2. Οργανοκασσιτερικές ενώσεις.....	49
3.3. Οργανοκασσιτερικές ενώσεις και καρκίνος.....	56
3.4. Οργανοκασσιτερικές ενώσεις και στεροειδή.....	70
B. Σκοπός.....	75
Γ. Πειραματικό μέρος.....	77
Κεφάλαιο 4.....	77
4.1. Χημικό πειραματικό μέρος.....	77
4.1.1. Σύνθεση της ένωσης Ph_3SnCA (1).....	77
4.1.2. Σύνθεση της ένωσης $n\text{-Bu}_3\text{SnCA}$ (2).....	78
4.1.3. Σύνθεση της ένωσης $\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{CA})_2$ (3).....	79
4.1.4. Σύνθεση της ένωσης $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{CA})_2$ (4).....	81
4.1.5. Σύνθεση της ένωσης $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{CA})_2$ (5).....	82
4.1.6. Σημείο τήξης.....	83
4.1.7. Διαλυτότητα.....	84
4.1.8. Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR.....	84
4.1.9. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR).....	84

4.1.10. Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).....	84
4.1.11. Ατομική απορρόφηση.	85
4.1.12. Φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (X-ray Fluorescence Spectroscopy, XRF).	85
4.1.13. Φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization Mass Spectrometry, ESI-MS).	85
4.1.14. Φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (High Resolution Mass Spectrometry, HR-MS).	85
4.1.15. Φασματοσκοπία Mössbauer.	86
4.2. Βιολογικό πειραματικό μέρος.....	86
4.2.1. Συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων.	86
4.2.2. Συνθήκες ανακαλλιέργειας των κυττάρων.....	86
4.2.3. Συνθήκες κρυοσυντήρησης των κυττάρων.	87
4.2.4. Μέθοδος εύρεσης κυτταροτοξικότητας μιας ουσίας <i>in vitro</i> με χρήση της Sulforhodamine B.....	88
4.2.5. Έλεγχος της <i>in vitro</i> γονοτοξικότητας μιας ουσίας με την μέθοδο των μικροκυρήνων (Micronucleus assay).	90
4.2.6. Έλεγχος της <i>in vivo</i> γονοτοξικότητας μια ουσίας χρησιμοποιώντας τον οργανισμό μοντέλο <i>Allium cepa</i> (<i>Allium cepa</i> test).	91
4.2.7. Έλεγχος της <i>in vivo</i> τοξικότητας μιας ουσίας χρησιμοποιώντας τον ζωντανό οργανισμό μοντέλο <i>Artemia salina</i>	93
4.3. Μοριακός μηχανισμός δράσης.	94
4.3.1. Αναστολή του ενζύμου της λιποξυγονάσης (lipoxygenase, LOX).	94
4.3.2. Καταλυτική δράση των ενώσεων στην υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος.	95
4.3.3. Αλληλεπίδραση των ενώσεων με το DNA: πείραμα με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).	96
4.3.4. Αλληλεπίδραση των ενώσεων με το DNA: πείραμα ιξωδομετρίας.	97
Δ. Αποτελέσματα.	99
Κεφάλαιο 5.....	99
Αποτελέσματα Χημικού μέρους.	99
Γενικό μέρος.....	99
Χαρακτηρισμός των συμπλόκων 1-5.....	100
5.1. Φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (X-ray fluorescence spectroscopy, XRF).....	100

5.2. Δονητική φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR).	101
5.3. Φασματοσκοπία ^{119}Sn Mössbauer.....	111
5.4. Ανάλυση περίθλασης ακτίνων X σε σκόνη (X-ray powder diffraction, XRPD).....	117
5.5. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR, ^1H , ^{13}C , ^{119}Sn).	121
5.6. Σταθερότητα σε διάλυμα με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (^1H -NMR).	153
5.7. Σταθερότητα σε διάλυμα με φασματοσκοπία υπεριώδους/ορατού (UV-Vis).....	159
5.8. Φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS).	162
5.9. Φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS).	165
5.10. Ατομική απορρόφηση.	171
Κεφάλαιο 6.....	173
Αποτελέσματα Βιολογικού μέρους.....	173
6.1. Αντιπολλαπλασιαστική δράση έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών.	173
6.2. Τοξικότητα <i>in vitro</i> σε φυσιολογικά κύτταρα MRC-5.....	175
6.3. Έλεγχος της <i>in vitro</i> γονοτοξικότητας με τη μέθοδο των μικροπυρήνων.....	177
6.4. Έλεγχος της <i>in vivo</i> γονοτοξικότητας στον ζωντανό οργανισμό <i>Allium cepa</i>	181
6.5. Έλεγχος της <i>in vivo</i> τοξικότητας στον ζωντανό οργανισμό <i>Artemia salina</i>	194
Κεφάλαιο 7.....	197
Αποτελέσματα Μοριακού μηχανισμού δράσης.	197
7.1. Αναστολή του ενζύμου της λιποξυγονάσης.	197
7.2. Καταλυτική δράση των συμπλόκων 1-5 στην υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος. .	200
7.3. Αλληλεπίδραση των συμπλόκων 1-5 με το DNA: έλεγχος με φασματοσκοπία UV-Vis.	206
7.4. Αλληλεπίδραση των συμπλόκων 1-5 με το DNA: έλεγχος με ιξωδομετρία.	212
Ε. Συμπεράσματα.	215
Κεφάλαιο 8.....	215
ΣΤ. Περίληψη.	225
Z. Abstract.	227
Η. Βιβλιογραφία.	229

Πρόλογος

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Σωτήρη Χατζηκακού, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και επιβλέποντα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, για την υπόδειξη, επίβλεψη και καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής. Η εμπιστοσύνη του, η βοήθεια και οι συμβουλές του ήταν κρίσιμες για την ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ θερμά το Ίδρυμα Ωνάση που στήριξε τη παρούσα διατριβή με παροχή υποτροφίας (G-ZN 059-1/2017-2018), και μου έδωσε τη δυνατότητα να επεκτείνω τις επιστημονικές μου γνώσεις καλύπτοντας μέρος των εξόδων μου.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Νικόλαο Κουρκουμέλη, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, και την κα Κωνσταντίνα Φυλακτακίδου, Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για τις συμβουλές τους κατά την διάρκεια της διατριβής. Τον κ. Κουρκουμέλη τον ευχαριστώ και για την λήψη των φασμάτων ανάλυσης περίθλασης ακτίνων X (XRPD).

Επιπλέον, ευχαριστώ τον κ. Θωμά Μαυρομούστακο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, μέλος της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τη λήψη και ερμηνεία των φασμάτων ^{13}C - και ^{119}Sn -NMR.

Ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής τους κα Μαρία-Ελένη Λέκκα, Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Σπυρίδωνα Περλεπέ, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών και κ. Αθανάσιο Κουτσολέλο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Επιπλέον να ευχαριστήσω τον κ. Γεώργιο Βαρβούνη Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη λήψη των φασμάτων μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού,

τον κ. Αθανάσιο Καρκαμπούνα, μέλος ΕΔΙΠ του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την λήψη των φασμάτων μάζας υψηλής ανάλυσης, την κα Χριστίνα Παπαχριστοδούλου μέλος ΕΔΙΠ του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη λήψη των φασμάτων φθορισμού ακτίνων Χ και τον κ. Αλέξιο Δούβαλη Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη λήψη των φασμάτων Mössbauer.

Ευχαριστώ θερμά την κα Χριστίνα Μπαντή, Μεταδιδάκτορα του Εργαστηρίου Βιολογικής Ανόργανης Χημείας και Διδάσκουσα Βιολογίας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την πολύτιμη βοήθεια κατά την πορεία και την επεξήγηση των εκάστοτε πειραμάτων.

Ευχαριστώ πολύ και τους συναδέλφους και μέλη του Εργαστηρίου Βιολογικής Ανόργανης Χημείας, τους Μαρία Χρυσούλη, Ιωάννη Κετικίδη, Βασίλη Μπαλά, Ανδρέα Ρώσσο, Αναστασία Μερετούδη, Μαριάνθη Καπετανά, Κωνσταντίνο Μοσχοβίτη, Παναγιώτη Ράπτη, Γλύκα Πορφυριάδου, Βασιλική Καρέτση, Γιώργο Λάτση, για το ευχάριστο κλίμα και τις συζητήσεις εντός και εκτός εργαστηρίου.

Κυρίως όμως να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου, Κωνσταντίνο και Αγνή, για την αμέριστη στήριξή τους, ψυχολογική και οικονομική, την υπομονή τους και την βοήθεια τους σε όλα τα θέματα όλα τα χρόνια της ζωής μου! Τα αδέρφια μου, Ραφαηλία και Αλέξανδρο, για τη στήριξή τους και τις συζητήσεις μας εφ' όλης της ύλης, καθώς και τον σύντροφό μου Παναγιώτη, που είναι εκεί και με στηρίζει πάντα.

A. Εισαγωγή.

Κεφάλαιο 1

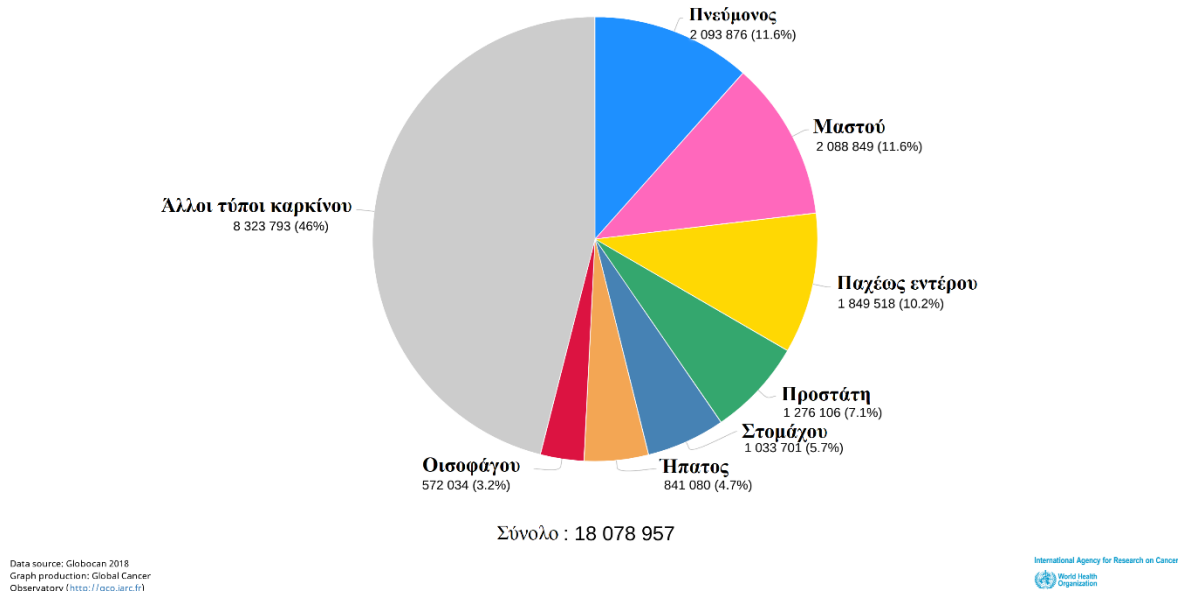
1.1. Καρκίνος.

Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό καθώς και την εξάπλωση μεταλλαγμένων κυττάρων και θεωρείται ως μια ομάδα ασθενειών [1-2]. Μπορεί να δημιουργηθεί από οποιονδήποτε τύπο κυττάρων και σε όλα τα όργανα, εξαρτώμενος από εύρος παραγόντων [3]. Εάν η εξάπλωση δεν είναι ελεγχόμενη, μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο [1]. Αν και οι αιτίες του καρκίνου δεν είναι πλήρως κατανοητές, είναι γνωστό ότι πολλοί παράγοντες αυξάνουν την εμφάνιση της νόσου, συμπεριλαμβανομένων πολλών τροποποιήσιμων, όπως το κάπνισμα και η περίσσεια βάρους [1], και άλλων που δεν τροποποιούνται, όπως οι κληρονομικές γενετικές μεταλλάξεις, οι οποίες μπορούν και αλλάζουν τους παράγοντες που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση οδηγώντας στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό ανώμαλων κυττάρων και άρα στον καρκίνο [1,4]. Αυτοί οι παράγοντες κινδύνου μπορούν να δράσουν ταυτόχρονα ή διαδοχικά για να ξεκινήσουν ή/και να προωθήσουν την ανάπτυξη του καρκίνου [1].

Είναι μια απειλητική για τη ζωή ασθένεια η οποία επηρεάζει τους ανθρώπους ανεξαρτήτου ηλικίας και είναι υπεύθυνη για την αύξηση της θνητότητας σε παγκόσμιο επίπεδο [2,4-7]. Είναι η δεύτερη αιτία θανάτου στον σύγχρονο κόσμο και αντιπροσωπεύει το 1/4 όλων των θανάτων [7-9]. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) και την έκθεση GLOBOCAN 2018, οι νέες περιπτώσεις καρκίνου παγκοσμίως για το 2018 ήταν 18.1 εκατομμύρια, ενώ οι καταγεγραμμένοι θάνατοι για το ίδιο έτος ανέρχονται στα 9.5 εκατομμύρια (Εικόνα 1.1.1) [4,10-13]. Οι περιπτώσεις στην Ευρώπη για το ίδιο έτος αντιστοιχούν στο 23.4%, ενώ στην Αμερική και την Ασία το ποσοστό είναι 21% και 48.4%,

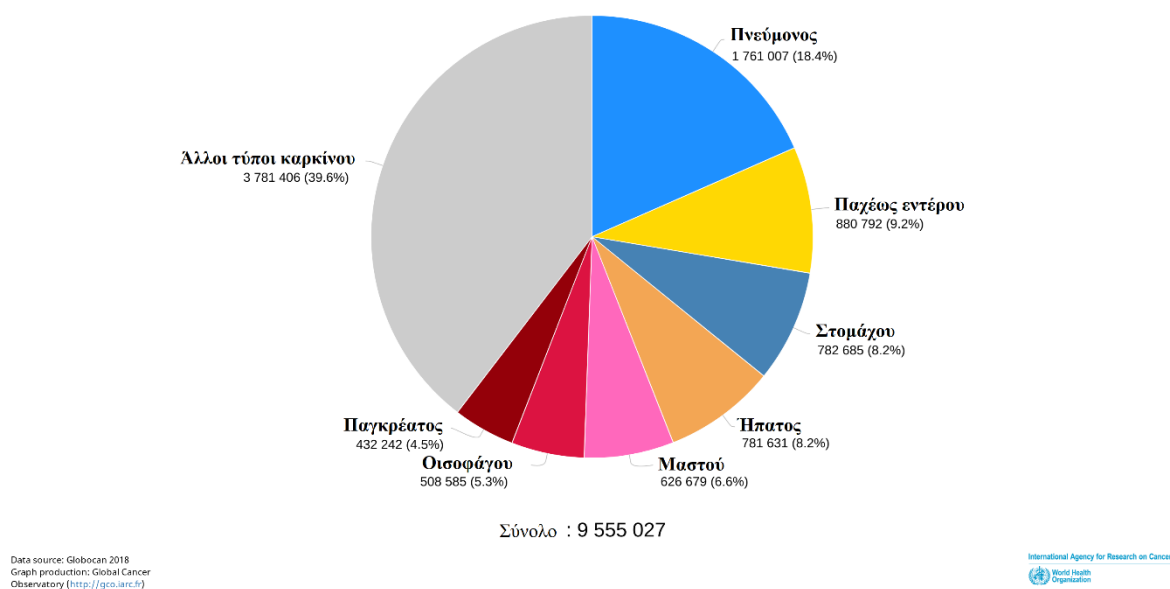
αντίστοιχα. Οι νέες περιπτώσεις μέχρι το 2040 αναμένεται να είναι 29.5 εκατομμύρια [13], ενώ μέχρι το 2030 αναμένεται να κοστίσει τη ζωή σε περίπου 13 εκατομμύρια ανθρώπους [4].

Εκτιμώμενος αριθμός νέων περιπτώσεων για το 2018, παγκοσμίως, όλοι οι καρκίνοι, και τα δύο φύλα, όλες οι ηλικίες



α.

Εκτιμώμενος αριθμός θανάτων για το 2018, παγκοσμίως, όλοι οι καρκίνοι, και τα δύο φύλα, όλες οι ηλικίες



β.

Εικόνα 1.1.1 Τα ποσοστά νέων περιπτώσεων (α) και θανάτου (β) από καρκίνο το 2018 [13].

Εξαιτίας της περιπλοκότητας της ασθένειας ένα μόνο φάρμακο δεν θα μπορούσε να οδηγήσει σε αποτελεσματική θεραπεία [14]. Έτσι οι στοχευμένες θεραπείες αποτελούν το επόμενο βήμα ως προς τα αντικαρκινικά φάρμακα καθώς τείνουν να κατανοηθούν περισσότερο οι μοριακές οδοί που οδηγούν στην ανάπτυξη και εξέλιξη των διαφόρων καρκίνων [11].

1.2. Καρκίνος του μαστού.

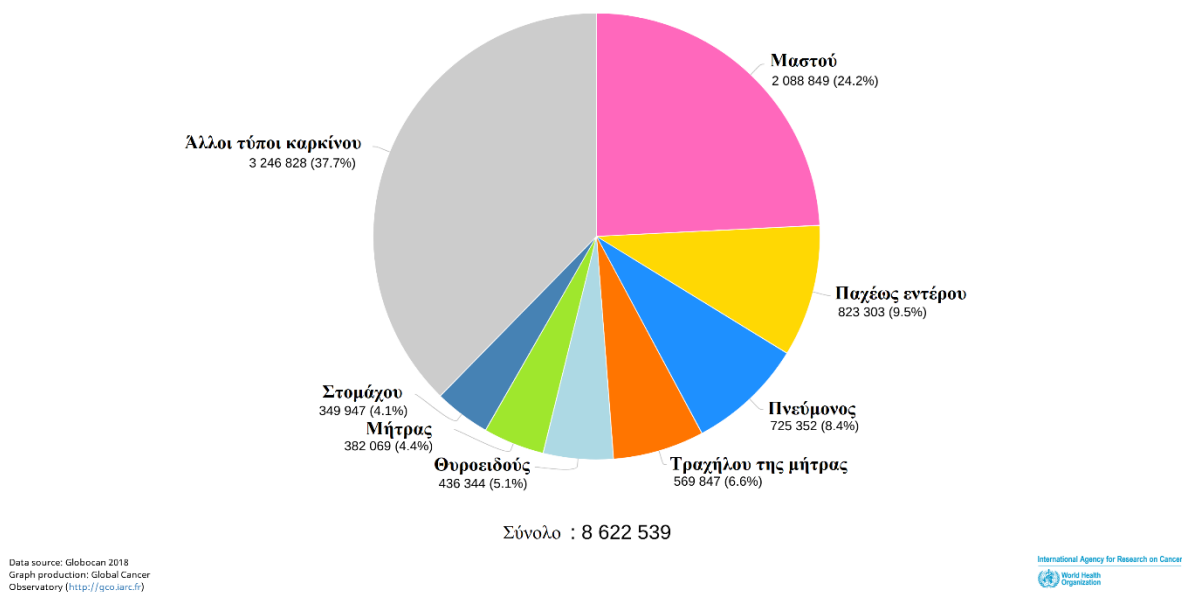
Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί σημαντική αιτία πρόωρου θανάτου μεταξύ των γυναικών στον δυτικό κόσμο, παρά τη μείωση του ποσοστού θνησιμότητας τα τελευταία χρόνια [15]. Αν και οι αιτίες του καρκίνου δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως, είναι γνωστό ότι η διαδικασία της καρκινογένεσης περιλαμβάνει διάφορα στάδια [15]. Το πρώτο βήμα της έναρξης περιλαμβάνει κάποιο είδος βλάβης στον γενετικό κώδικα που μεταφέρεται στο κύτταρο, στο DNA [15]. Περιλαμβάνει επίσης την προώθηση, μια διαδικασία που επιτρέπει σε αυτά τα κατεστραμμένα κύτταρα να αναπτυχθούν [15]. Κατά τη διάρκεια του επόμενου σταδίου της ανάπτυξης του όγκου, υπάρχει μια περίοδος περαιτέρω πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε μια ανιχνεύσιμη μάζα [15]. Στη συνέχεια, τα κύτταρα δεν είναι πλέον αντίγραφα μεταξύ τους, και αυτό ονομάζεται εξέλιξη όγκου [15]. Έπειτα, τα κύτταρα του όγκου μπορούν να εξαπλωθούν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή μέσω του λεμφικού συστήματος [15]. Τα κύτταρα του καρκινώματος του μαστού μεταφέρονται κυρίως μέσω του λεμφικού συστήματος [15]. Αυτά τα κύτταρα μεταναστεύουν στους λεμφαδένες κάτω από τον βραχίονα και είναι συχνά το πρώτο μέρος όπου ανιχνεύεται η μετάσταση [15].

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συχνός καρκίνος στις γυναίκες όλων των ηλικιών, αν και μπορεί να εμφανιστεί και στους άντρες, και ο δεύτερος πιο συχνός μεταξύ όλων των μορφών καρκίνου, ενώ χαρακτηρίζεται ως η κύρια αιτία θανάτου στις γυναίκες [12,14,16-31]. Πρόκειται για κακοήγη όγκο που αναπτύσσεται στον ιστό του μαστού, συμπεριλαμβανομένων

των αγωγών και των αδένων, οι οποίοι παρέχουν το γάλα στους αγωγούς [19]. Παρόλο που διαφορετικές θεραπείες μπορούν να θεραπεύσουν πρωτογενείς όγκους του μαστού, οι περισσότεροι θάνατοι που οφείλονται στον καρκίνο του μαστού (> 95%) συμβαίνουν λόγω μεταστάσεων [32].

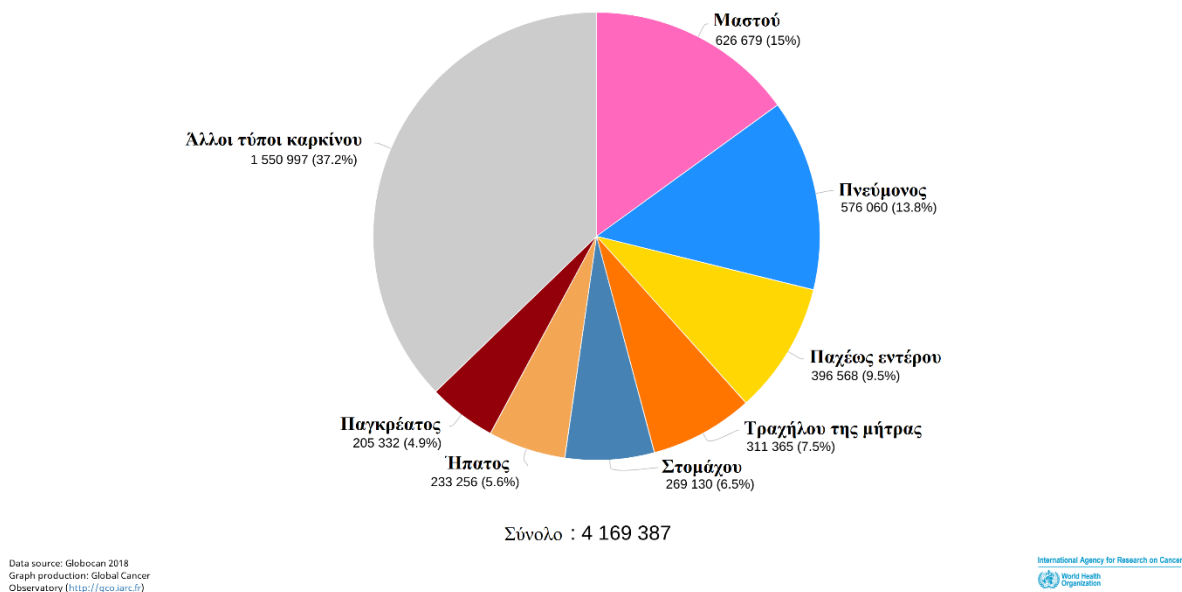
Σύμφωνα με τον ΠΟΥ το 2018 νόσησαν 2.1 εκατομμύρια γυναίκες ενώ οι θάνατοι ανήλθαν στις 626,679 χιλιάδες, και αποτελεί το 24.2% όλων των καρκίνων που εμφανίζονται στις γυναίκες (Εικόνα 1.2.1) για αυτό το έτος, καθώς καμία από αυτές τις περιπτώσεις δεν αφορούσε αρσενικό άτομο [13]. Τα ποσοστά επιβίωσης εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, αλλά ο κυριότερος είναι το στάδιο του καρκίνου [5]. Τα στάδια ξεκινούν από το μηδέν, το οποίο είναι μια προκαρκινική ή σημειωτική κατάσταση, έως το στάδιο 4, όπου η κατάσταση γίνεται μεταστατική [5]. Ο ρυθμός επιβίωσης για τα στάδια 0 και 1 είναι περίπου 90-100% [5,22], αλλά για το στάδιο 4 μόνο 22% [5]. Ο μεταστατικός καρκίνος του μαστού είναι συνήθως ανίατος και οι συμβατικές χημειοθεραπείες δείχνουν μόνο καταπραϋντική επίδραση και σε ένα πολύ μικρό κλάσμα ασθενών [24]. Όπως και στους περισσότερους καρκίνους η επιβίωση ορίζεται στα πέντε έτη [5]. Οι περιπτώσεις του καρκίνου του μαστού, σύμφωνα με τον ΠΟΥ, αναμένεται να ανέλθουν στις 6.9 εκατομμύρια μέχρι το 2023 (Εικόνα 1.2.2.) [13].

Εκτιμώμενος αριθμός νέων περιπτώσεων για το 2018, παγκοσμίως, όλοι οι καρκίνοι, γυναίκες, όλες οι ηλικίες



α.

Εκτιμώμενος αριθμός θανάτων για το 2018, παγκοσμίως, όλοι οι καρκίνοι, γυναίκες, όλες οι ηλικίες

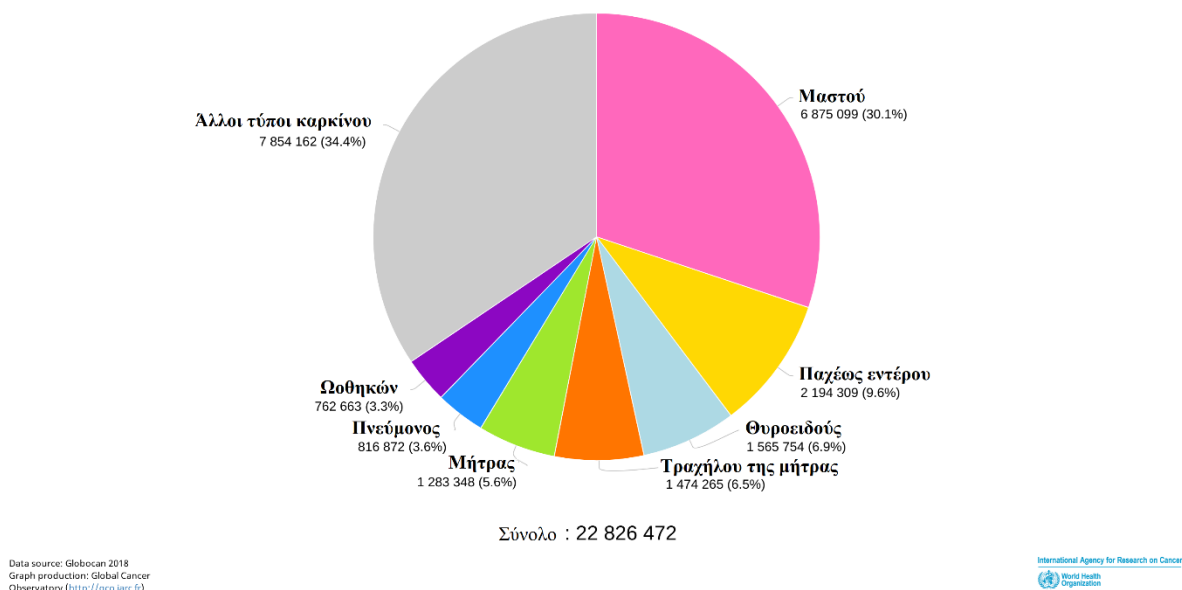


β.

Εικόνα 1.2.1. Τα ποσοστά νέων περιπτώσεων (α) και θανάτου (β) από καρκίνο το του μαστού το 2018 [13].

Η αποτυχία των θεραπειών του καρκίνου του μαστού μπορεί επίσης να οφείλεται σε διάφορους βιολογικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με την ετερογένεια αυτού του καρκίνου, χωρίζοντάς τον σε διάφορους υποτύπους [24].

Εκτιμώμενος αριθμός επιπολασμού (5-χρόνια) για το 2018, παγκοσμίως, όλοι οι καρκίνοι, γυναίκες, όλες οι ηλικίες



Εικόνα 1.2.2. Εκτιμώμενος αριθμός περιπτώσεων σε διάστημα 5-ετίας [13].

Γονιδιωματικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο καρκίνος του μαστού περιλαμβάνει διάφορους μοριακούς υποτύπους: 1) τον βασικό (basal), 2) τον εμπλουτισμένο με τον υποδοχέα-2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (human epidermal growth factor receptor, HER-2), και 3) των κοιλοτήτων (luminal= ο σχετικός με τη κοιλότητα μιας σωληνοειδούς ή άλλης κοίλης δομής) [25,32-34]. Η συμβατική ανοσολογική ιστοχημεία υποδηλώνει ότι οι luminal όγκοι του μαστού θα μπορούσαν να οριστούν, ευρέως, ως αυτοί με την έκφραση του υποδοχέα των οιστρογόνων (estrogen receptor, ER) (ER-θετικός) [32-33]. Ο luminal καρκίνος του μαστού είναι εξαιρετικά ετερογενής και περιλαμβάνει διαφορετικά

ιστολογικά χαρακτηριστικά, προφίλ έκφρασης γονιδίων και μοτίβα μεταλλάξεων, με πολυποίκιλες απαντήσεις στη συστηματική θεραπεία [23]. Χωρίζεται περαιτέρω σε υποτύπους luminal A και luminal B, μια ταξινόμηση που καθορίζεται από το επίπεδο έκφρασης των γονιδίων πολλαπλασιασμού, με τους καρκίνους τύπου luminal B να έχουν υψηλότερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού και χειρότερη πρόγνωση από τους καρκίνους τύπου luminal A [32-33]. Ο τύπου A εκφράζει τους υποδοχείς οιστρογόνων ή/και προγεστερόνης (progesterone receptor, PR) (~40%), αλλά όχι τους HER-2 υποδοχείς και έχει χαμηλά επίπεδα έκφρασης του δείκτη Ki67 [32,34]. Επιπλέον ο τύπου A εμφανίζεται σε ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας και έχει καλύτερη πρόγνωση σε σύγκριση με τους άλλους τύπους [35]. Ο τύπου B έχει μικρότερο ποσοστό έκφρασης (~20%) των υποδοχέων ER/PR, και είτε εκφράζει είτε όχι υποδοχείς HER-2, αλλά έχει αυξημένη έκφραση του δείκτη Ki67 [23,25,32,34] καθώς και υψηλότερη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό και ενεργοποίηση οδών σηματοδότησης από τον υποδοχέα αυξητικού παράγοντα [23]. Οι όγκοι του B τύπου είναι πιθανότερο να καταστούν ενδοκρινικά και χημειοθεραπευτικά ανθεκτικοί, να έχουν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης μεταστάσεων και χειρότερη συνολική επιβίωση από τους όγκους του A τύπου [23,25,35]. Ο υπότυπος HER-2 συσχετίζεται συχνά με μεταστάσεις στους αδένες [35] και δεν εκφράζει υποδοχείς ER/PR [32]. Ο βασικός υπότυπος εμφανίζεται συχνά σε νεότερους ασθενείς, συσχετίζεται συχνότερα με μετάσταση σε σπλαγχνικά όργανα και έχει κακή πρόγνωση [35].

Η πλειοψηφία των όγκων του μαστού είναι ορμονοεξαρτώμενοι/τριπλά θετικοί (triple positive breast cancer, TPBC) υπερεκφράζοντας τους υποδοχείς ορμονών (ER, PR, HER-2) [14,16,20-23,25,32,36-39] ενώ αυτοί που δεν εκφράζουν υποδοχείς ορμονών ονομάζονται τριπλά αρνητικοί (triple negative, TNBC) [25,32,39]. Έχει βρεθεί πως εκφράζουν τον υποδοχέα των οιστρογόνων σε μεγάλο ποσοστό (~75%) [15-16,20-21,32,34,36-38,40-43]. Ο ER είναι πυρηνικός υποδοχέας τύπου 1 και μετά την ενεργοποίησή του, γονιδιωματικά ή όχι, επάγει τη μεταγραφή γονιδίων αποκρινόμενος στα οιστρογόνα [32]. Υπάρχουν δύο υπότυποι ER

υποδοχέων, ο ERα και ο ERβ [32]. Στον υγιή ιστό του μαστού, υπάρχει υψηλή έκφραση του ERβ, ενώ στον καρκίνο του μαστού αυξάνεται η έκφραση του ERα [32]. Στη γονιδιωματική οδό, η οιστραδιόλη (estradiol, E2) δρα ως συνδέτης των ER [32].

Ένα σημαντικό ποσοστό των ER-θετικών (ER+) όγκων του μαστού (~90%) είναι επίσης θετικοί στον υποδοχέα ανδρογόνων (androgen receptor, AR) [32]. Οι ER είναι γνωστό ότι προάγουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού [16,20-21,32,34,38]. Οι ER+ όγκοι τείνουν να αναπτύσσονται πιο αργά, διαφοροποιούνται καλύτερα και συνδέονται με μια ελαφρώς καλύτερη συνολική πρόγνωση [15]. Έτσι η έκφραση ER έχει γίνει προγνωστικός παράγοντας, μαζί με την κατάσταση των λεμφαδένων, το μέγεθος του όγκου και τον ιστολογικό βαθμό [15]. Τα χαμηλά επίπεδα υποδοχέων οιστρογόνων στους όγκους του μαστού είναι ενδεικτικά μιας μικρής απόκρισης στην ενδοκρινική θεραπεία [15]. Πιο σημαντικό είναι πως η ανίχνευση των ER σε κύτταρα καρκινώματος του μαστού είναι ένας κύριος δείκτης πιθανής απόκρισης στην ενδοκρινική θεραπεία [15]. Παρόμοια με τον ER υποδοχέα, η κατάσταση του υποδοχέα της προγεστερόνης (PR) είναι ένας επιθυμητός παράγοντας πρόβλεψης της ανταπόκρισης του όγκου στη θεραπεία [15]. Σχεδόν το 50% όλων των ER+ όγκων αναφέρεται επίσης ότι είναι PR+ και περίπου το 75% αυτών ανταποκρίνονται θετικά στην ενδοκρινική θεραπεία [15]. Ως εκ τούτου, η γνώση της έκφρασης των ER και PR μπορεί να βοηθήσει στην ταυτοποίηση των ασθενών που μπορούν να ωφεληθούν από την ενδοκρινική θεραπεία [15]. Τα ποσοστά απόκρισης στην ενδοκρινική θεραπεία σε προχωρημένο στάδιο της ασθένειας, είναι 33% σε όγκους θετικούς για έναν υποδοχέα ορμονών και 50-70% σε ER+/PR+ όγκους [15].

Οι τριπλά αρνητικοί καρκίνοι του μαστού (TNBC) έχουν υψηλό μεταλλακτικό φορτίο σε σύγκριση με άλλους υπότυπους, καθώς επίσης υψηλό επίπεδο διείσδυσης λεμφοκυττάρων και υψηλά επίπεδα έκφρασης του συνδέτη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου-1

(programmed cell death ligand-1, PD-L1) [22]. Οι καρκίνοι του βασικού υπότυπου χαρακτηρίζονται ως τριπλά αρνητικοί (10-20%) [44].

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια σύνθετη ασθένεια και, σε αντίθεση με πολλές άλλες ασθένειες, μπορεί εύκολα να αναπτύξει ανθεκτικότητα στα φάρμακα [42]. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε ένα σύνολο γονιδιακών μεταλλάξεων που οδηγούν σε δυσλειτουργία της ισορροπίας μεταξύ σημάτων επιβίωσης και προαποπτωτικών [42]. Για παράδειγμα, οι ασθενείς με μεταλλάξεις γονιδίων BRCA1 ή/και BRCA2 παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού [42]. Η μετάλλαξη μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σηματοδότησης μπορεί επίσης να οδηγήσει σε ανθεκτικότητα στα φάρμακα [42]. Ανθεκτικότητα μπορεί επίσης να προκύψει μέσω ενεργοποίησης μεταφορέων φαρμάκων που εμποδίζουν τη συσσώρευσή τους εντός του κυττάρου [42]. Για παράδειγμα, τα φάρμακα των ανθρακυκλινών απομακρύνονται εύκολα από καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τη P-γλυκοπρωτεΐνη [42]. Επιπλέον, οι φαινότυποι του καρκίνου ποικίλουν μεταξύ διαφορετικών ανθρώπινων πληθυσμών και έτσι η ανταπόκριση σε ένα μόνο φάρμακο μπορεί να μην είναι εξίσου αποτελεσματική σε όλα τα άτομα [42].

Τα οιστρογόνα (οιστρόνη E1, οιστραδιόλη E2) σχετίζονται με την προώθηση της λειτουργίας μιας υπάρχουσας διαδικασίας καρκινογένεσης στο μαστό [26-28,45]. Έτσι, τα οιστρογόνα και οι μεταβολίτες τους μπορούν να προκαλέσουν άμεση ή έμμεση βλάβη στο DNA από ελεύθερες ρίζες, γενετική αστάθεια και κυτταρικές μεταλλάξεις [45]. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν πολλά διαφορετικά αποτελέσματα των οιστρογόνων στον μαστό που μειώνουν τον κίνδυνο καρκίνου [45]. Για παράδειγμα, σε γυναίκες που ήταν έγκυες πριν από την ηλικία των 20 ετών, αυτή η ορμόνη έχει προστατευτικό αποτέλεσμα [45]. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποίησης από τα οιστρογόνα ενός αριθμού ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως το p53 ή το BRCA1, υπεύθυνα για την επιδιόρθωση του DNA [45].

Η θεραπεία της ασθένειας αγγίζει ποσοστά του 70%, αρκεί ο καρκίνος να είναι στο αρχικό στάδιο, ωστόσο η επανεμφάνιση του καρκίνου του μαστού ως μετάσταση θεωρείται μη θεραπεύσιμη [30-31]. Επιπλέον η επιτυχής θεραπεία πολύ συχνά περιορίζεται εξαιτίας της ανθεκτικότητας που αναπτύσσουν οι όγκοι τόσο στη χημειοθεραπεία όσο και στην ενδοκρινική θεραπεία [28-29]. Επιπλέον είναι γνωστό πως ακόμα και άτομα με ER+ όγκους δεν ανταποκρίνονται στην ενδοκρινική θεραπεία [29,43]. Για τους τριπλά αρνητικούς όγκους του μαστού η χημειοθεραπεία είναι η μόνη που μπορεί να εφαρμοστεί, αν και πολύ συχνά ο καρκίνος επιστρέφει ως μετάσταση [43,44]. Έτσι είναι αναγκαία η ανάπτυξη νέων χημειοθεραπευτικών παραγόντων με αυξημένη αποτελεσματικότητα και μειωμένη συστηματική τοξικότητα [29].

1.3. Θεραπείες που εφαρμόζονται στον καρκίνο του μαστού.

Οι θεραπείες που εφαρμόζονται για τον καρκίνο του μαστού περιλαμβάνουν: 1) τη χειρουργική επέμβαση, 2) την ορμονική/ενδοκρινική θεραπεία, 3) τη χημειοθεραπεία, π.χ. με φάρμακα όπως docetaxel, capecitabine, gemcitabine, irinotecan, ixabepilone ή pemetrexed καθώς και χημικούς αναστολείς όπως τα imatinib ή sunitinib [46], 4) την ανοσοθεραπεία και 5) την ακτινοθεραπεία [5,32]. Αυτές μπορούν να εφαρμοστούν για την θεραπεία πρωτογενών όγκων,· ωστόσο οι περισσότεροι θάνατοι από καρκίνο του μαστού οφείλονται στη μετάσταση σε άλλο όργανο (πνεύμονας, εγκέφαλος και ήπαρ) [32]. Η μεγαλύτερη χρήση της διεπιστημονικής φροντίδας και η ανάπτυξη τριών τρόπων συστηματικής θεραπείας (χημειοθεραπεία, ενδοκρινική θεραπεία, στοχευμένη θεραπεία), μπορούν να θεραπεύσουν σχεδόν το 90% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού [22].

Άλλες θεραπείες που μπορούν να εφαρμοστούν είναι: 1) τα μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal antibodies, mAbs), τα οποία στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν

υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (π.χ. HER-2) ή ογκογονίδια (RAS), 2) τα μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν στο αγγειακό ενδοθήλιο για να αποτρέψουν την εξαρτώμενη από τον όγκο αγγειογένεση, 3) τα μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν τους ανασταλτικούς υποδοχείς στα T-κύτταρα και παρεμποδίζουν την ανοσολογική ρύθμιση, 4) τα γενετικά τροποποιημένα T-κύτταρα, για προσαρμοστική θεραπεία με T-κύτταρα, 5) τα αντικαρκινικά εμβόλια, για ειδική ενεργή ανοσοθεραπεία και 6) οι ογκολυτικοί ιοί (oncolytic viruses, OV), οι οποίοι δρουν εκλεκτικά στους όγκους οδηγώντας τα κύτταρα σε θάνατο [46].

Χειρουργική επέμβαση

Παραδείγματα καρκινικής θεραπείας από τον 19^ο αιώνα περιλαμβάνουν τη ριζική και υπερ-ριζική χειρουργική επέμβαση [46]. Συγκεκριμένα, η ριζική μαστεκτομή χρησιμοποιήθηκε για την θεραπεία του καρκίνου του μαστού για ~90 χρόνια, μεταξύ 1891 και 1981 [46]. Ωστόσο, το 1981 μια μελέτη απέρριψε τη ριζική χειρουργική επέμβαση για τη θεραπεία του καρκίνου [46]. Η χρήση της ριζικής χειρουργικής επέμβασης μειώθηκε αμέσως αφού επιβεβαιώθηκε ότι η συστηματική θεραπεία με ανοσοενισχυτικό (adjuvant), σε συνδυασμό με την τοπική χειρουργική επέμβαση παράγει παρόμοια αποτελέσματα [46].

Οι συστηματικές θεραπείες με ανοσοενισχυτικό περιλαμβάνουν την ακτινοβολία και την εφαρμογή κυτταροστατικών φαρμάκων και απαιτούνται για τη θεραπεία της διάδοσης του καρκίνου και της μετάστασης [46]. Ξεκίνησαν να χρησιμοποιούνται ως θεραπεία το 1970-1980 με πιλοτικές δοκιμές να ελέγχουν τον συνδυασμό χημειοθεραπείας και ταμοξιφένης (tamoxifen), μιας βασικής ενδοκρινικής θεραπείας [22]. Μετά τις αρχές της δεκαετίας του '80 τέθηκαν σε χρήση νέοι θεραπευτικοί παράγοντες (ταξάνες, ανθρακυκλίνες, αναστολείς αρωματάσης, trastuzumab) καθώς και η εκτεταμένη ενδοκρινική θεραπεία (5-10 έτη ταμοξιφένης ή/και αναστολέα αρωματάσης) [22]. Πράγματι, επί του παρόντος, οι γυναίκες με καρκίνο του μαστού σε πρώιμο στάδιο μπορούν να λάβουν συστηματική θεραπεία που υπερβαίνει

τα 10 χρόνια [22]. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία δεν στερείται αρνητικών συνεπειών, καθώς συνδέεται με υψηλότερο κίνδυνο τοξικότητας και αυξανόμενο οικονομικό κόστος [22].

Παράλληλα, η τοπική θεραπεία με χειρουργική επέμβαση ή/και ακτινοθεραπεία έχει υποβαθμιστεί (δηλαδή καθίσταται λιγότερο σύνθετη και μικρότερης διάρκειας), χωρίς αισθητή μείωση στην αποτελεσματικότητα και με θετική επίδραση στη μακροπρόθεσμη ποιότητα ζωής των ασθενών [22]. Έχει επίσης επιδιωχθεί η κλιμάκωση της ακτινοθεραπείας, με μικρότερης διάρκειας θεραπείες και μικρότερες ακτινοβολημένες περιοχές, καθιστώντας τις εφικτές προσεγγίσεις για τη θεραπεία πολλών ασθενών με μικρότερους όγκους [22].

Ακτινοθεραπεία

Η ακτινοθεραπεία αποτελεί βασικό συστατικό της θεραπείας του καρκίνου [47]. Χρησιμοποιείται συχνά ως θεραπευτική αγωγή για εντοπισμένο καρκίνο ή απομονωμένη μετάσταση και ως μετριαστική θεραπεία σε ασθενείς με εκτεταμένη νόσο [47-48]. Συνολικά περίπου το 50-60% των ασθενών με καρκίνο λαμβάνουν ακτινοθεραπεία [48]. Χρησιμοποιείται μόνη της ή σε συνδυασμό με συντηρητική χειρουργική επέμβαση ή χημειοθεραπεία και είναι μια πολύ αποτελεσματική θεραπεία για διάφορους καρκίνους [48].

Για τους ακτινοβολούμενους όγκους, οι ακτινογολόγοι μπορούν να χρησιμοποιήσουν είτε φωτόνια (ακτίνες X), που παράγονται σε επιταχυντές γραμμικού ηλεκτρονίου (linacs), είτε φορτισμένα σωματίδια, τα οποία περιλαμβάνουν πρωτόνια και βαρέα ιόντα (άνθρακα) [47]. Από τα περίπου δύο τρίτα των ασθενών με καρκίνο που λαμβάνουν ακτινοθεραπεία, το 80% λαμβάνει ακτίνες X και μόνο το 0,8% λαμβάνει ακτινοβολία από φορτισμένα με υψηλή ενέργεια σωματίδια, ποσοστό που αυξάνεται συνεχώς [47].

Οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού αρχικού σταδίου λαμβάνουν ως θεραπεία λεμφαδεκτομή σε συνδυασμό με ακτινοβόληση όλου του μαστού [49]. Γενικά, η θεραπευτική κλασματοποιημένη ακτινοθεραπεία για εντοπισμένους καρκίνους χορηγείται σε σχετικά μικρές

ημερήσιες δόσεις (1.5-2.2 Gy), με τη συνολική δόση να είναι 60-80 Gy, ανάλογα με τον τύπο του όγκου και την ευαισθησία στην ακτινοβολία των φυσιολογικών ιστών [48]. Μεγαλύτερες ημερήσιες δόσεις (3 Gy) έχουν χρησιμοποιηθεί σε βραχύτερα τμηματικά προγράμματα θεραπείας (3 εβδομάδες έναντι 6-7 εβδομάδων) στη θεραπεία ορισμένων καρκίνων [48]. Η ακτινοβολήση για τον καρκίνο του μαστού διαρκεί 6-7 εβδομάδες με δόσεις 45-50 Gy [49].

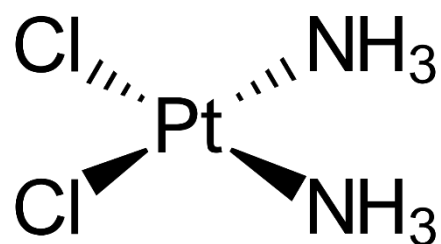
Χημειοθεραπεία

Τα καρκινικά κύτταρα του μαστού μπορούν να διαδοθούν από τον όγκο σε άλλους ιστούς, όπου παραμένουν μη ανιχνεύσιμα και σε μικρούς αριθμούς ονομάζονται μικρομεταστάσεις [22]. Κατά συνέπεια, οι ογκολόγοι έπρεπε να αξιοποιήσουν μεταξύ άλλων διάφορα δεδομένα, όπως το μέγεθος του όγκου, την κατάσταση των λεμφαδένων ή τους υποδοχείς ορμονών, προκειμένου να εκτιμήσουν τον κίνδυνο υποτροπής μετά από θεραπεία, με σκοπό να αποφασίσουν ποιοι ασθενείς θα πρέπει να λάβουν ανοσοενισχυτική θεραπεία [22].

Η χημειοθεραπεία αποτελεί τη βασική μέθοδο αντιμετώπισης του καρκίνου [4,46,50], η οποία αρχικά τροφοδοτήθηκε από την πρόωμη ανακάλυψη των βακτηριοστατικών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων συμπλόκων πολυπυριδυλίου του ρουθηνίου από τον Francis Dwyer το 1950 και αργότερα ενισχύθηκε από την ανακάλυψη της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης του συμπλόκου *cis*-διάμινο-διχλωρολευκοχρύσου (*cisplatin*) από τον Barnet Rosenberg το 1969 (Εικόνα 1.3.1) [4]. Από την έγκριση της *cisplatin*, το 1979 ως χημειοθεραπευτικό φάρμακο για την αντιμετώπιση στερεών κακοηθειών, αρκετά δευτερεύοντα ανάλογα λευκοχρύσου έχουν υποβληθεί σε διαγνωστικούς ελέγχους ως δυνητικοί αντικαρκινικοί παράγοντες, αλλά από αυτούς μόνο δύο, οι καρβοπλατίνη (*carboplatin*) και οξαλιπλατίνη (*oxaliplatin*), έχουν εισέλθει παγκοσμίως σε χημειοθεραπευτικά σχήματα [4].

Άλλες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν και οι *bleomycin* και *vinblastine* [46]. Ενδεχομένως, αυτά τα σύμπλοκα παρουσιάζουν ένα ευρύ αντικαρκινικό φάσμα και, σε

συνδυασμό με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, θα μπορούσαν να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί σε διάφορους καρκίνους [4]. Ανεξαρτήτως της κλινικής και εμπορικής επιτυχίας των φαρμάκων του λευκοχρύσου, τα μειονεκτήματα που συνδέονται με αυτά, ιδιαίτερα η συστηματική τοξικότητα και η ανθεκτικότητα στο φάρμακο, έχουν διεγείρει μια εκτεταμένη αναζήτηση για μη συμβατικές χημειοθεραπευτικές στρατηγικές [4].



Εικόνα 1.3.1. Η δομή του *cis*-διάμινο-διχλωρολευκοχρύσου (cisplatin).

Τα κυτταροστατικά φάρμακα στοχεύουν στον κυτταρικό κύκλο [46]. Μπορούν να ομαδοποιηθούν ανάλογα με τον τύπο τους, όπως παράγοντες αλκυλίωσης, αλκαλοειδή, αντιβιοτικά και αντιμεταβολίτες [46]. Αυτά τα φάρμακα αλληλεπιδρούν με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στοχεύοντας το DNA ή το RNA και τον μεταβολισμό τους [46]. Οι αντιμεταβολίτες στοχεύουν τα μεταβολικά ένζυμα πουρίνης ή πυριμιδίνης, ενώ τα αλκαλοειδή στοχεύουν τον κυτταροσκελετό (β τουμπουλίνη) και τη μίτωση [46]. Αρκετά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού είναι το paclitaxel ή docetaxel (φάρμακα που βασίζονται σε φυσικά προϊόντα) [51].

Η ταξόλη είναι ένα από τα πιο αποτελεσματικά φάρμακα που στοχεύουν τους μικροσωληνίσκους για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού και αντιπροσωπεύει σημαντικές βελτιώσεις στην επιβίωση του ασθενούς με καρκίνο του μαστού τις τελευταίες δύο δεκαετίες

[6]. Οι ανθρακυκλίνες είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές για τη θεραπεία ασθενών με καρκίνο του μαστού [22]. Η χρήση τους, ωστόσο ενέχει κίνδυνο καρδιακής τοξικότητας που μπορεί να είναι σοβαρή και μη αναστρέψιμη [22]. Άλλα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία είναι τα cyclophosphamide, gemcitabine, fluorouracil, adriamycin, και methotrexate [5].

Η χημειοθεραπεία για τον καρκίνο συνδέεται με προκλήσεις και επιπλοκές όπως: 1) την αδυναμία των φαρμάκων να διαπεράσουν τους βιολογικούς φραγμούς, 2) τη μικρή εξειδίκευση που οδηγεί στην εμφάνιση αρκετών παρενεργειών, 3) τη χαμηλή συσσώρευση των φαρμάκων μέσα στα καρκινικά κύτταρα, καθώς και 4) την ταχεία ανάπτυξη ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα [2,50].

Επιπροσθέτως συνδέεται με πολλές σοβαρές παρενέργειες, οι οποίες περιλαμβάνουν τόσο άμεση όσο και χρόνια τοξικότητα [46]. Άμεσα αποτελέσματα μπορούν να παρατηρηθούν στο δέρμα και στα μαλλιά, στο μυελό των οστών και το αίμα, στο γαστρεντερικό σωλήνα και τα νεφρά [46]. Όλα τα όργανα του σώματος μπορούν να επηρεαστούν, συμπεριλαμβανομένων των βασικών οργάνων, όπως η καρδιά, οι πνεύμονες και ο εγκέφαλος [46]. Η νευροτοξικότητα βαθμού 3 και 4 μπορεί να προκαλέσει υπνηλία, παραισθησία, παράλυση, αταξία, σπασμούς και κώμα [46]. Επιπλέον, οι χρόνιες επιδράσεις της χημειοθεραπείας περιλαμβάνουν την ανθεκτικότητα στα φάρμακα, την καρκινογένεση και τη στειρότητα [46]. Ωστόσο παρά τις σοβαρές παρενέργειες παραμένει η κύρια επιλογή θεραπείας για τον καρκίνο [46].

Έτσι η τοπική ασθένεια του καρκίνου του μαστού αντιμετωπίζεται κατά κύριο λόγο με χειρουργική επέμβαση, είτε με λεμφαδεκτομή είτε με μαστεκτομή, για την απομάκρυνση του μείζονος καρκινικού ιστού [31]. Η ακτινοβολία και η χημειοθεραπεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν πριν από τη χειρουργική επέμβαση (neoadjuvant ρύθμιση) για τη μείωση της μάζας του όγκου [31]. Η χειρουργική επέμβαση ακολουθείται συνήθως (adjuvant ρύθμιση) από

ακτινοθεραπεία για να θανατωθούν τυχόν εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα [31]. Ο καρκίνος του μαστού σε προχωρημένο στάδιο θεωρείται συστηματική ασθένεια και ως εκ τούτου χορηγείται συμπληρωματική συστηματική θεραπεία (ενδοκρινική θεραπεία, χημειοθεραπεία ή/και trastuzumab) επιπλέον της τοπικής θεραπείας [31]. Η χημειοθεραπεία με ανοσοενισχυτικό (adjuvant) χορηγείται συνήθως για 3 έως 6 μήνες μετά την ακτινοβολήση και αποτελείται από συνδυασμό φαρμάκων [31]. Τέτοιοι συνδυασμοί είναι αποτελεσματικότεροι από την θεραπεία με ένα φάρμακο καθώς κάθε συστατικό προσδίδει το δικό του όφελος μέσω ενός διαφορετικού μηχανισμού [31]. Οι περισσότερες χημειοθεραπευτικές προσεγγίσεις είναι επιρρεπείς σε σημαντικές συστηματικές παρενέργειες λόγω της υψηλής τοξικότητάς τους και της έλλειψης εξειδίκευσης στον καρκινικό ιστό [31]. Ως αποτέλεσμα, έχουν καταβληθεί σημαντικές προσπάθειες για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών με μεγαλύτερη ειδικότητα, αυξημένη θεραπευτική αποτελεσματικότητα ή/και βιοδιαθεσιμότητα [31].

Ενδοκρινική θεραπεία

Η ενδοκρινική θεραπεία είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη θεραπεία για τους ασθενείς με ER⁺ όγκους του μαστού [28,32,34,52]. Σ' αυτούς, οι παράγοντες που χρησιμοποιούνται είτε εμποδίζουν τη δέσμευση της E2 (ταμοξιφένη, tamoxifen) είτε σταματούν την παραγωγή της E2 (αναστολείς της αρωματάσης, aromatase inhibitors, AI) [25-28,32] ή μπορεί να αποδομούν τον υποδοχέα των οιστρογόνων [25] ή και να ανταγωνίζονται τα οιστρογόνα [28]. Μερικές φορές ακόμη και οι γυναίκες με όγκους στον μαστό που έχουν χαμηλή έκφραση υποδοχέα των ορμονών, επωφελούνται από την ταμοξιφένη [50,52]. Ωστόσο, ~30-50% των αρχικά ανταποκρινόμενων ασθενών αναπτύσσουν ανθεκτικότητα σε αυτές τις ενδοκρινικές θεραπείες, αλλά οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί αυτής της διαδικασίας δεν είναι ακόμη γνωστοί [32]. Η ενδοκρινική θεραπεία κατευθύνεται κατά των δράσεων των οιστρογόνων στο μαστό, που εμφανίζεται μετά την πρόσδεσή τους στον ERα υποδοχέα [52].

Η ταμοξιφένη ανήκει στα μη-στεροειδή παράγωγα τριφαινυλαιθυλενίου [50] και είναι ένας εκλεκτικός τροποποιητής του υποδοχέα των οιστρογόνων έχοντας αγωνιστική ή ανταγωνιστική δράση ανάλογα με το ποσό των υποδοχέων στο κύτταρο ή τον ιστό [21,25,50,52]. Προσδένεται σε διαφορετικό σημείο από την ορμόνη στον ERα υποδοχέα αλλάζοντας το σημείο πρόσδεσης της ορμόνης [50,52]. Ωστόσο υπάρχουν και μη κλασικοί μηχανισμοί δράσης που περιλαμβάνουν την αλληλεπίδραση της ταμοξιφένης με τις υδρόφοβες περιοχές των λιπιδίων της μεμβράνης, επηρεάζοντας τη ρευστότητά της, και την αναστολή ενζύμων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό από πιθανές αλληλεπιδράσεις με φωσφολιπίδια [50].

Οι αναστολείς της αρωματάσης δρουν καταστέλλοντας τα επίπεδα των ορμονών στις γυναίκες μέσω αναστολής του ενζύμου της αρωματάσης (CYP19A1), το ένζυμο που οφείλεται για τη σύνθεση των ορμονών από ανδρογόνα [52]. Οι αναστολείς αρωματάσης που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική εμπίπτουν σε δύο κατηγορίες: τους μη-αναστρέψιμους στεροειδείς αναστολείς, όπως το exemestane, και τους αναστρέψιμους μη-στεροειδείς αναστολείς, όπως το anastrozole και letrozole [27,52]. Η αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου της αρωματάσης θεωρείται ότι είναι μια επιλεκτική στρατηγική για τη μείωση της ποσότητας της παραγωγής οιστρογόνων χωρίς να επηρεάζεται η παραγωγή άλλων στεροειδών στη βιοσυνθετική οδό των οιστρογόνων [27].

Οι ασθενείς με ER+ καρκίνο του μαστού πρώιμου σταδίου είναι επιρρεπείς σε υποτροπές (που μπορεί να εμφανιστούν μέχρι και 15 χρόνια μετά τη διακοπή της θεραπείας) [22]. Έχουν εξερευνηθεί πολλές διαφορετικές στρατηγικές για την επέκταση της επικουρικής ενδοκρινικής θεραπείας από 5 χρόνια σε ≤ 10 έτη, συμπεριλαμβανομένης 10ετούς θεραπείας με αναστολέα αρωματάσης, 10 χρόνων θεραπείας με ταμοξιφένη ή 5χρονης πορείας με ταμοξιφένη ακολουθούμενης από 2-5 χρόνια θεραπεία με έναν αναστολέα αρωματάσης [22].

Επί του παρόντος, τα περισσότερα από τα διαθέσιμα δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα άτομα με τον υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής που έλαβαν 5 έτη ταμοξιφένη και έως 3 έτη αναστολέα αρωματάσης, έχουν τα καλύτερα αποτελέσματα με παρατεταμένη θεραπεία (με ταμοξιφένη ή αναστολέα αρωματάσης για 5 χρόνια) [22]. Είναι σημαντικό ότι η εκτεταμένη χρήση της ενδοκρινικής θεραπείας δεν πρέπει να θεωρείται αποκλειστικό, αυτόματο πρότυπο φροντίδας [22]. Οι μελλοντικές εξελίξεις στον τομέα αυτό πρέπει να επικεντρωθούν περαιτέρω στην ανάπτυξη βιοδεικτών [22].

Άλλοι τύποι θεραπείας

Άλλοι παράγοντες που στοχεύουν σε νέους μηχανισμούς, είναι το palbociclib, το ribociclib, το abemaciclib και το everolimus, και έχουν λάβει ρυθμιστική έγκριση για τη θεραπεία ασθενών με ER +, HER2- καρκίνο του μαστού [22]. Ωστόσο η ανοχή και η τήρηση των ενδοκρινικών θεραπειών καθίστανται ανησυχητικές, καθώς οι ενδοκρινικές θεραπείες γίνονται πιο τοξικές, με παρατεταμένες διάρκειες [22].

Το επόμενο βήμα στην ανάπτυξη ανοσοθεραπειών για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού θα είναι η συνδυασμένη θεραπεία, είτε με τη χρήση δύο ανοσοθεραπευτικών παραγόντων είτε με μια ανοσοθεραπεία και έναν στοχευμένο παράγοντα [22]. Δεδομένου ότι τα υπάρχοντα δεδομένα δείχνουν μια σχέση μεταξύ της μεταλλαξιογόνου επιβάρυνσης και της ανταπόκρισης στις ανοσοθεραπείες, ο συνδυασμός των αναστολέων PARP και της ανοσοθεραπείας βρίσκεται σε εξέλιξη στο στάδιο της προχωρημένης ασθένειας και πιθανότατα θα μεταφερθεί στα αρχικά στάδια της ασθένειας τα επόμενα χρόνια [22].

Οι υπόλοιπες θεραπείες που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν στοχευμένες θεραπείες μέσω μικρομοριακών αναστολέων (small molecule inhibitors, SMI), ή μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal antibodies, mAbs) [11,46]. Τα τελευταία χρόνια, δύο νέοι τύποι ανοσοθεραπείας είχαν αξιοσημείωτο αντίκτυπο στην ογκολογία: τα ανασταλτικά mAb των

σημείων ελέγχου και τα T-κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με χημειοθεραπευτικό αντιγονοειδικό υποδοχέα [46]. Η ανοσοθεραπεία του καρκίνου έχει αποδειχθεί ότι είναι ικανή να παράγει ανθεκτικές απαντήσεις σε πολυάριθμους τύπους καρκίνου [46]. Ειδικές ανοσοαποκρίσεις σε αντιγόνα μπορεί να είναι αξιοσημείωτα αποτελεσματικές, ακόμη και σε ασθένειες τελικού σταδίου [46]. Επιπλέον, αναπτύχθηκαν δύο άλλοι τύποι βιολογικής θεραπείας, αυτοί των αντικαρκινικών εμβολίων και ογκολυτικών ιών (OVs), οι οποίοι είναι φυσιολογικοί και καλά ανεκτοί [46].

Ένα από τα πρώτα εγκεκριμένα από τον FDA mAbs είναι το trastuzumab (Herceptin), το οποίο στοχεύει τον υποδοχέα HER2 στην κυτταρική επιφάνεια που εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα του μαστού [11,46,53]. Η αντικαρκινική του δράση δεν είναι πλήρως κατανοητή αλλά θεωρείται ότι προκαλείται από διάφορους μηχανισμούς που ακολουθούν τη σύνδεση του αντισώματος με την εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα HER2 [53]. Επίσης, δεκάδες άλλα θεραπευτικά mAb είναι διαθέσιμα για εφαρμογή σε ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου [11,46].

Παρά τις ικανοποιητικές δράσεις, ωστόσο, σχεδόν όλοι οι καρκίνοι αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στις στοχευμένες θεραπείες [54]. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη θεραπεία είναι ένα χαρακτηριστικό της μεταστατικής νόσου που εμφανίζεται με την πάροδο του χρόνου μετά από κάθε θεραπεία, η οποία περιορίζει τον έλεγχο της νόσου [40].

1.4. Καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες καρκινικές κυτταρικές σειρές για τον καρκίνο του μαστού είναι η MCF-7, όπου τα κύτταρα αυτής εκφράζουν τους υποδοχείς ορμονών (τριπλά θετική), και η MDA-MB-231, όπου τα κύτταρα δεν εκφράζουν τους υποδοχείς ορμονών

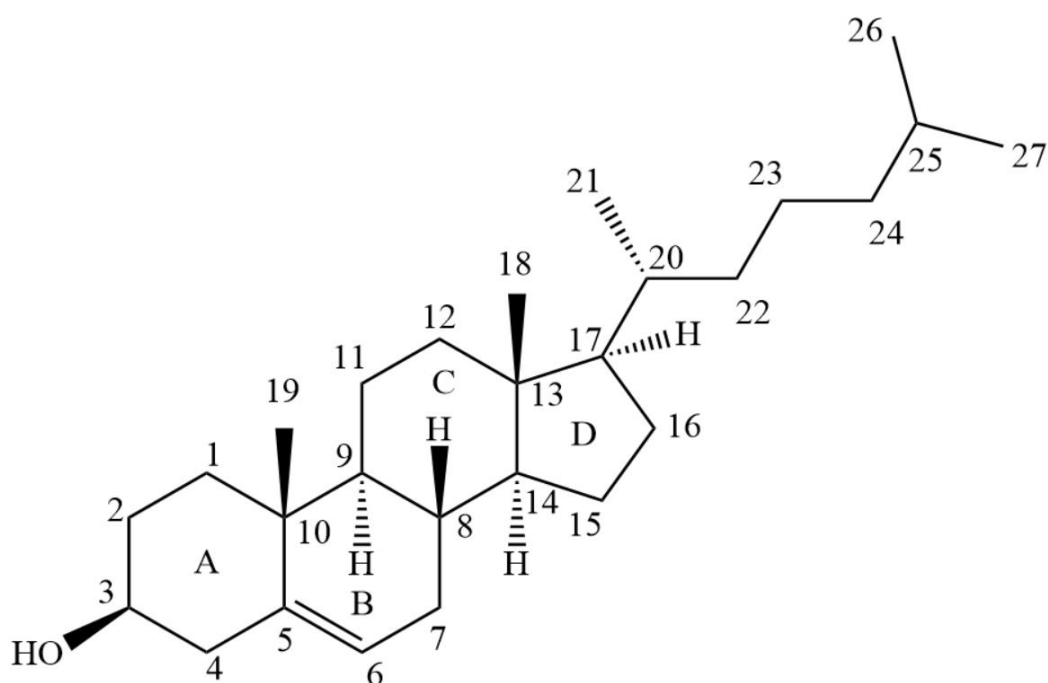
(τριπλά αρνητική) [5,18,38-39]. Αυτές οι δύο κυτταρικές σειρές συχνά χρησιμεύουν ως ζεύγος όταν εξετάζεται η ικανότητα των διαφόρων ενώσεων να αναστέλλουν την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού [5].

Τα MCF-7 κύτταρα απομονώθηκαν αρχικά το 1970. Είναι χρήσιμα για *in vitro* μελέτες για τον καρκίνο του μαστού επειδή η κυτταρική σειρά έχει διατηρήσει αρκετά ιδανικά χαρακτηριστικά ειδικά για το επιθήλιο του μαστού [5]. Αυτές περιλαμβάνουν την ικανότητα αυτών των κυττάρων να επεξεργάζονται τα οιστρογόνα με τη μορφή οιστραδιόλης [5]. Έτσι, η MCF-7 κυτταρική σειρά αποτελεί σειρά θετικού ελέγχου των ER υποδοχέων [5]. Η καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MDA-MB-231 ελήφθη από την ασθενή M. D. Anderson το 1973 [5]. Έχουν ένα διεισδυτικό φαινότυπο *in vitro*, με καλή δράση στη δοκιμασία χημειοταξίας [5]. *In vivo*, έχει βρεθεί να σχηματίζουν όγκους στο μαστικό λίπος [5].

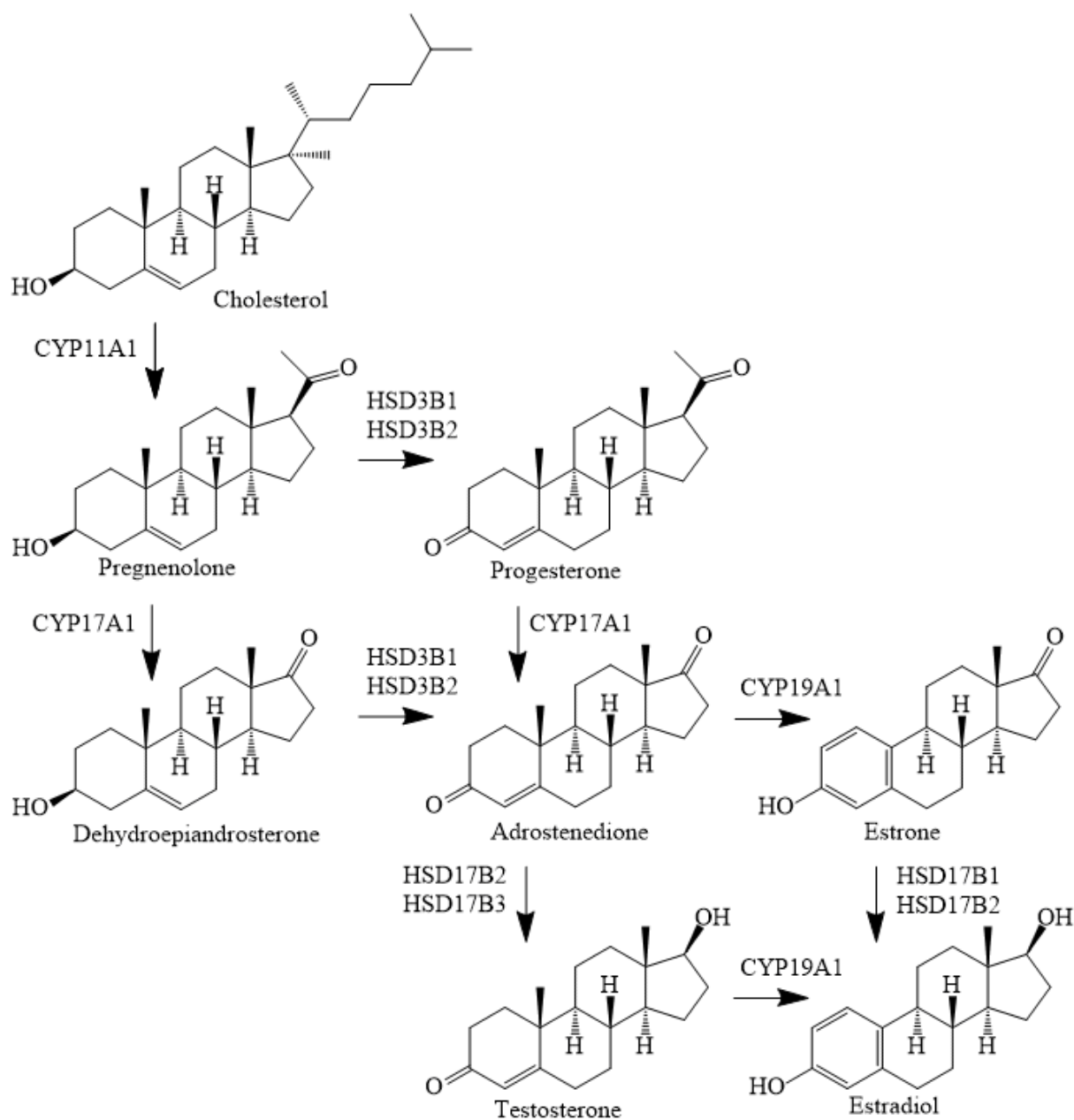
Κεφάλαιο 2

2.1. Χολικά οξέα.

Τα στεροειδή είναι μια μεγάλη τάξη οργανικών μορίων και παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των ζώων, των φυτών και των μικροοργανισμών [55]. Το πιο γνωστό στεροειδές μόριο είναι η χοληστερόλη (Εικόνα 2.1.1) και απομονώθηκε από τον Chevreul από χολόλιθους σχεδόν πριν από δύο αιώνες [55]. Αυτή η στερόλη είναι σημαντικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών (κυτταρική μεμβράνη, εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και του ενδοπλασματικού δικτύου [56]) των θηλαστικών [55,58-59] και επίσης βρίσκεται σε σημαντικές συγκεντρώσεις στον εγκέφαλο και το νευρικό σύστημα [55]. Είναι βιοσυνθετικός πρόδρομος για μια πληθώρα παραγώγων με συγκεκριμένες βιολογικές δράσεις όπως οι στεροειδείς ορμόνες (Εικόνα 2.1.2), τα χολικά οξέα, η βιταμίνη D και οι λιποπρωτεΐνες [55].



Εικόνα 2.1.1. Το μόριο της χοληστερόλης. Οι αριθμοί δηλώνουν τα άτομα άνθρακα, ενώ τα A-D την αρίθμηση των δακτυλίων.



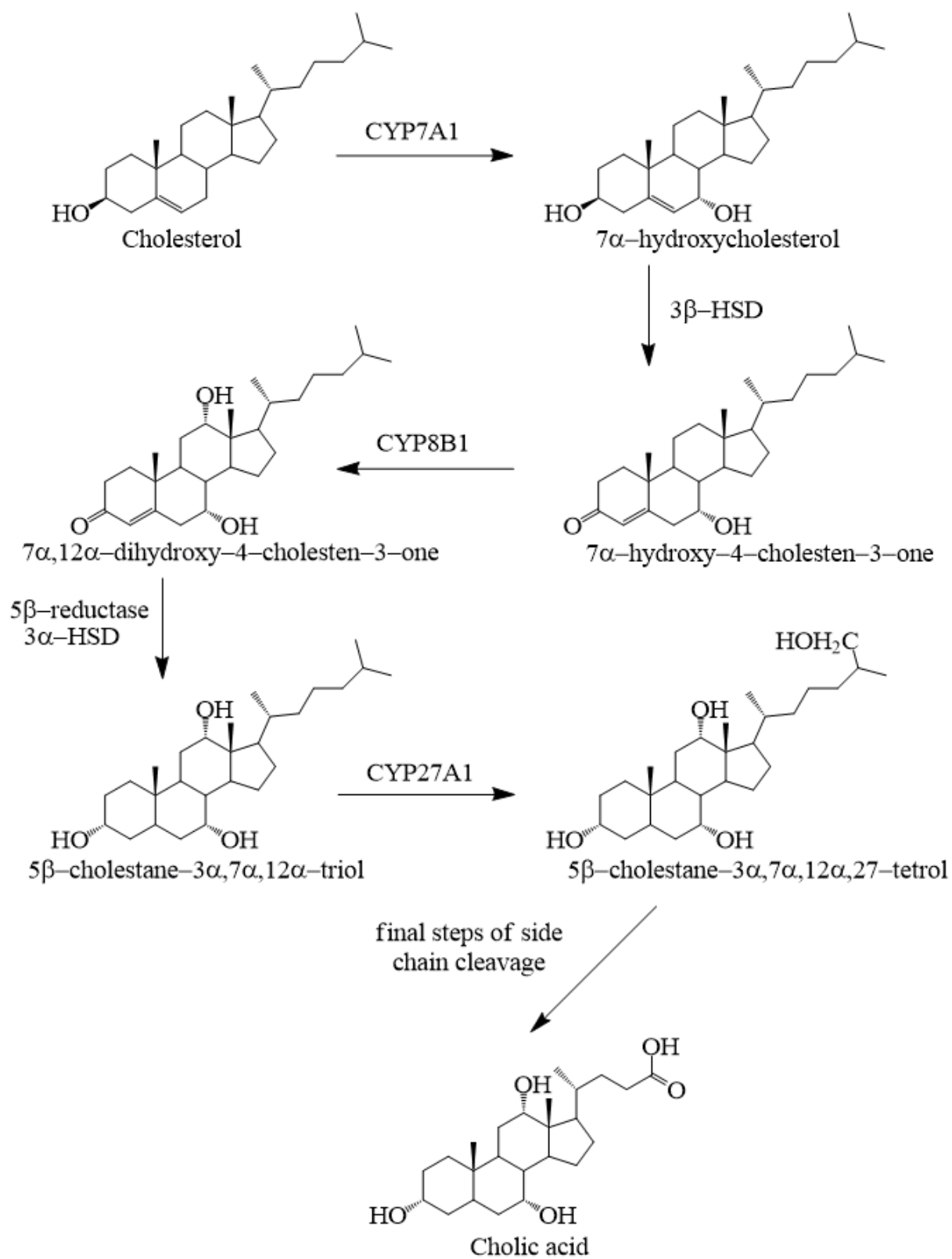
Εικόνα 2.1.2. Βιοσυνθετική οδός των ορμονών.

Όλες οι στερόλες είναι κρυσταλλικές ενώσεις με μια δευτεροταγή υδροξυλομάδα στον άνθρακα-3 (C-3) του στεροειδικού σκελετού, έχοντας έναν ή δύο διπλούς δεσμούς και διαφορετικές πλευρικές αλυσίδες [55]. Οι A/B δακτύλιοι του στεροειδικού σκελετού μπορεί να έχουν είτε *trans* (άλλο-σειρές) ή *cis* (κανονικές-σειρές) γεωμετρία [55]. Οι στερόλες με την

υδροξυλομάδα στον C-3 σχηματίζουν τις β-στερόλες σε σχέση με το μέσο επίπεδο του δακτυλίου [55]. Από την άλλη τα χολικά οξέα που έχουν υδροξυλομάδα στον C-3 προτιμούν τον α-προσανατολισμό [55].

Τα πιο άφθονα χολικά οξέα στα ανώτερα σπονδυλωτά είναι παράγωγα του χολανικού οξέος (χολικό οξύ) [57]. Η δομή και η ονοματολογία αυτής της κατηγορίας ενώσεων έχει περιγραφεί λεπτομερώς από τους Fieser, Kritchevsky και Van Belle [57]. Η διασαφήνιση της δομής των χολικών οξέων οφείλεται στις πρώιμες παρατηρήσεις του Adolf Windaus και του Heinrich Wieland ότι το χολανικό οξύ μπορεί να ληφθεί είτε από την χοληστερόλη είτε από το χολικό οξύ [57]. Έτσι κατέληξαν πως τα χολικά οξέα έχουν στεροειδή φύση [57]. Ο Windaus είχε προηγουμένως υποθέσει ότι οι στερόλες και τα χολικά οξέα έχουν δομική συγγένειαομικά συγγενή [57].

Γενικά τα χολικά οξέα έχουν 24 άτομα άνθρακα σε αντίθεση με τα 27 άτομα άνθρακα που έχει το μόριο της χοληστερόλης [57]. Αυτά τα πρωτογενή χολικά οξέα προέρχονται από την χοληστερόλη με μια σειρά υδροξυλιώσεων του πυρήνα της στερόλης, ακολουθούμενη από την απώλεια ενός ισοπροπυλικού θραύσματος από την πλευρική αλυσίδα (Εικόνα 2.1.3) [57]. Μπορούν να έχουν μέχρι και τρεις υδροξυλομάδες στους άνθρακες C-3, C-7 ή/και C-12 και μια εκτεταμένη αλκυλική αλυσίδα στον άνθρακα C-17 που καταλήγει σε μια καρβοξυλική ομάδα, η οποία μπορεί να συζευχθεί με ταυρίνη ή γλυκίνη [60, 55].



Εικόνα 2.1.3. Βιοσυνθετική οδός χολικών οξέων.

Τα χολικά οξέα χαρακτηρίζονται ως αμφίφιλα μόρια όξινων στεροειδών και έχουν συγκεκριμένα φυσικά, χημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά [6,55-58,61-65]. Σχηματίζονται από την χοληστερόλη στο ήπαρ και στη συνέχεια εκκρίνονται μέσω της χολής στο έντερο [6,55-58,61-65]. Απομονώνονται από τη χολή των ανώτερων ζώων, όπου βρίσκονται ως άλατα νατρίου πεπτιδικών συζευγμάτων με τη γλυκίνη και την ταυρίνη [55]. Διαθέτουν τον υδρόφοβο και άκαμπτο σκελετό των στεροειδών μαζί με υδρόφιλες υδροξυλομάδες που ποικίλουν σε αριθμό, θέση και στερεοχημεία, μαζί με μια εύκαμπτη όξινη πλευρική αλυσίδα [56,66]. Το αρχικό στάδιο της σύνθεσης χολικών οξέων καταλύεται από τη μικροσωμική 7α-υδροξυλάση της χοληστερόλης [64]. Η κυτοχρωμική P450 7α-υδροξυλάση της χοληστερόλης ρυθμίζεται τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο όσο και στο επίπεδο του mRNA ως απόκριση σε πολλαπλούς φυσιολογικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της ποσότητας ή/και της φύσης των χολικών οξέων που επιστρέφουν στο ήπαρ μέσω της πυλαίας φλέβας, των θρεπτικών και ορμονικών παραγόντων, από τη φωσφορυλίωση-αποφωσφορυλίωση και από κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες [64].

Τα χολικά οξέα προάγουν την απορρόφηση των λιπιδίων διατροφής, συμπεριλαμβανομένων των λιποδιαλυτών βιταμινών [6,58,61], καθώς και τη χολική απέκκριση της μη μεταβολικής χοληστερόλης στη χολή, αλλά επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα ως φάρμακα για τη θεραπεία των νόσων του ήπατος, των χολόλιθων, της φλεγμονής και άλλων ασθενειών [6,58,61,65]. Επιπλέον μπορούν και ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων που ελέγχουν την ομοιόσταση της χοληστερόλης [62]. Έχει βρεθεί επίσης πως ελέγχουν και τον δικό τους μεταβολισμό και παίζουν σημαντικό ρόλο στην προαγωγή των καρκίνων του οισοφάγου και του εντέρου, στο χολαγγειοκαρκίνωμα, καθώς και στην ανάπτυξη και μετάσταση του καρκίνου του μαστού [67].

Τα πρωτογενή χολικά οξέα είναι το κενοδεοξυχολικό (chenodeoxycholic, CDCA) και το χολικό οξύ (cholic acid, CAH) και συντίθενται από τη χοληστερόλη στο ήπαρ σε πολλά ενζυματικά στάδια με την προσθήκη υδροξυλομάδων και την οξείδωση της πλευρικής αλυσίδας για τον σχηματισμό ενός υδατοδιαλυτού τελικού προϊόντος [6,55-59,65,68]. Στη συνέχεια, μετασχηματίζονται στα δευτερογενή χολικά οξέα, όπως το ουρσοδεοξυχολικό (ursodeoxycholic, UDCA), το δεοξυχολικό (deoxycholic, DCA) και το λιθοχολικό (lithocholic, LCA) οξύ, στο έντερο μέσω βακτηριακού βιομετασχηματισμού των πρωτογενών χολικών οξέων [6,55-56,68]. Ο συνδυασμός αυτών των δύο σημαντικών ομάδων στεροειδών από τον δακτύλιο 1,2,3-τριαζόλης επιτρέπει τη σύνθεση νέων συζευγμάτων με μια ποικιλία εφαρμογών [56]. Η σύνθεση νέων στεροειδικών συζευγμάτων με τροποποίηση των λειτουργικών ομάδων των μορίων αυτών συνεπάγεται τη δυνατότητα λήψης περισσότερων ενώσεων με υψηλή βιολογική και φαρμακολογική δράση [55-56].

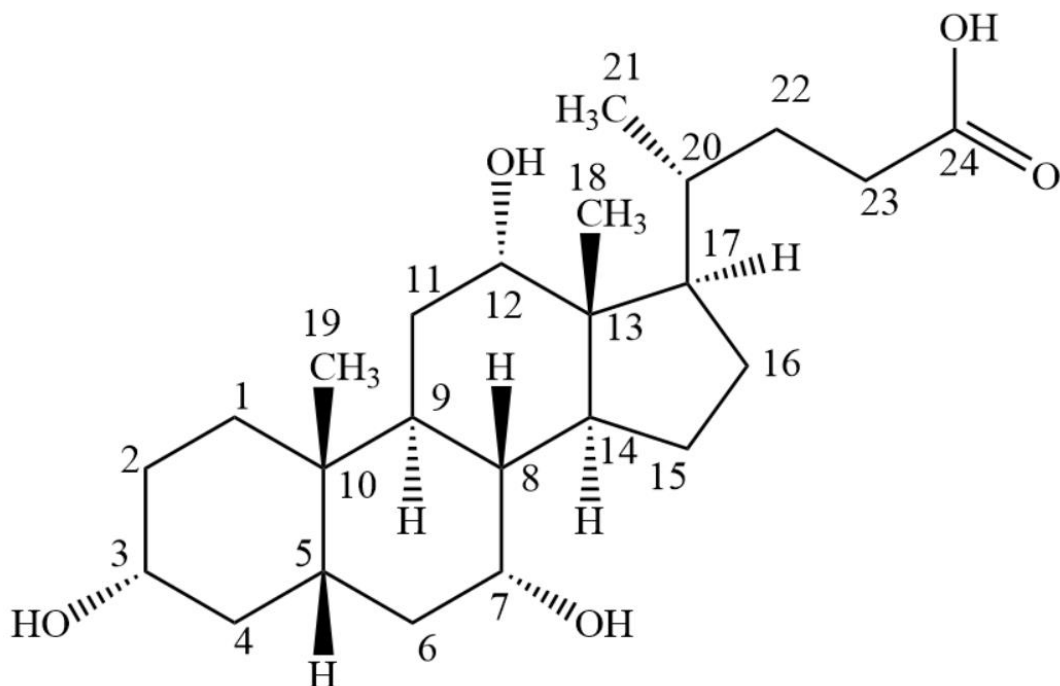
Οι μικρές διαφορές στη χημική δομή μεταξύ πρωτοταγών και δευτερογενών χολικών οξέων τα κάνουν να συμπεριφέρονται διακριτά στο βιολογικό περιβάλλον [63,68]. Κάποιες αναφορές για υδρόφοβα χολικά οξέα έδειξαν την κυτταροτοξική τους συμπεριφορά προς τους φυσιολογικούς ιστούς, ενώ το υδρόφοβο χολικό οξύ UDCA προστατεύει τα φυσιολογικά κύτταρα από την απόπτωση που προκαλείται από την άμεση διατάραξη των μιτοχονδριακών μεμβρανών [63,66,68]. Από την άλλη έχει βρεθεί πως η συνεχής έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις υδρόφοβων χολικών οξέων, όπως το CDCA και αυτή που εμφανίζεται σε χρόνια χολοστατικά ηπατικά νοσήματα, σχετίζεται με οξειδωτικό στρες, διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης, δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, βλάβη στο DNA και τελικά απόπτωση, εμπλέκοντας έτσι τα χολικά οξέα ως αιτία εμφάνισης διαφόρων καρκίνων όπως του οισοφάγου, του στομάχου, του λεπτού εντέρου, του ήπατος, της χοληφόρου οδού, του παγκρέατος και του ορθού [63,66]. Το UDCA βρέθηκε να μειώνει σημαντικά το μέγεθος και τον αριθμό των όγκων του εντέρου που επάγονται από *N*-μεθυλονιτροουρία ή το αζοξυμεθάνιο

σε αρουραίους και έχει αξιολογηθεί σε δοκιμή φάσης III για την πρόληψη της υποτροπής του ορθοκολικού αδενώματος [66]. Απαιτούνται ωστόσο περαιτέρω κλινικές μελέτες για να υποστηρίξουν (ή όχι) τη χρήση του UDCA για τη χημειοπροφύλαξη του ορθοκολικού καρκίνου [66].

Διάφορες αναφορές των τελευταίων χρόνων υποδηλώνουν την επαγωγή απόπτωσης από υδρόφοβα παράγωγα χολικού οξέος σε πολλά ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα, όπως στον καρκίνο του προστάτη, τη λευχαιμία, τον καρκίνο του ήπατος, τον καρκίνο του εντέρου, του μαστού, των οστών και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας [68]. Ωστόσο, η χαμηλή κυτταροτοξικότητα ($IC_{50} > 100 \mu M$) και η ικανότητα προαγωγής όγκων ορισμένων παραγώγων χολικών οξέων έχει οδηγήσει στον σχεδιασμό πιο αποτελεσματικών παραγώγων τους με ισχυρές αντιπολλαπλασιαστικές και αποπτωτικές ιδιότητες [68]. Έτσι, οι μελέτες της φυσιολογίας και της ικανότητας καρκινογένεσης των παραγώγων των χολικών οξέων παρουσίασαν σημαντική πρόοδο την τελευταία δεκαετία [68].

Η ιστορία του χολικού οξέος (cholic acid, CAH) (Εικόνα 2.1.4) σχετίζεται με αυτή της απομόνωσης και της χημείας των χολικών οξέων [57]. Απομονώθηκε το 1838 και το 1843 αλλά μελετήθηκε για πρώτη φορά προσεκτικά από τον Strecker το 1848 [57]. Το όνομα χολικό οξύ δόθηκε από τον Demarcay [57].

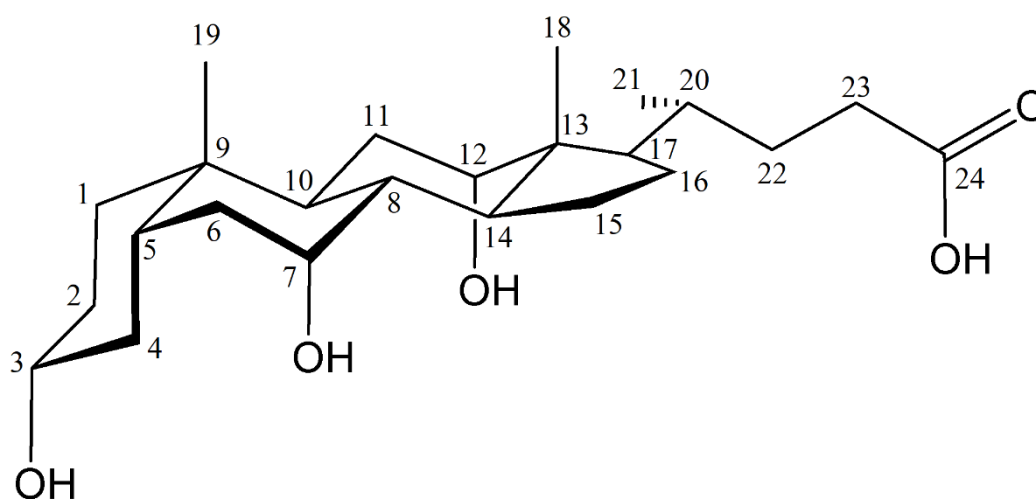
Το όνομα χολικό οξύ είχε καθιερωθεί, αλλά υπήρχαν και άλλες ονομασίες λόγω του ατελούς χαρακτηρισμού του μορίου αυτού, οπότε η εξέταση της ονοματολογίας ήταν μέρος της πρώτης έκθεσης του Wieland για τα χολικά οξέα το 1912 [57]. Μια επισκόπηση των τότε διαθέσιμων στοιχείων περιλάμβανε ότι χολικό οξύ ήταν ένα τριυδρόξυ, μονοκαρβοξυλικό οξύ και δύο από τα υδροξύλια του ήταν δευτεροταγή [57]. Η τελική παρουσίαση της δομής του χολικού οξέος περίμενε τη σωστή σύνθεση στεροειδών το 1932. Έτσι εκείνη την εποχή καθιερώθηκε η δομική σχέση μεταξύ των στερολών και των χολικών οξέων [57].



Εικόνα 2.1.4. Το μόριο του χολικού οξέος. Οι αριθμοί δηλώνουν τα άτομα άνθρακα του μορίου του χολικού οξέος.

Το πλέον άφθονο στη φύση παράγωγο των χολικών οξέων στα ανώτερα σπονδυλωτά είναι τα παράγωγα του 5β-χολανικού οξέος (χολικό οξύ ή το 3-, 7-, 12-τριϋδροξυ-5β-χολάν-24-οϊκό οξύ) [66,69]. Έχει τρεις υδροξυλομάδες που παρουσιάζουν πολύ διαφορετικές δράσεις ανάλογα με τη θέση τους στον στεροειδή σκελετό [69-70]. Πράγματι, η ομάδα -OH στη θέση C-3 είναι πιο δραστική από τις άλλες -OH ομάδες [69]. Σ' αυτό, επίσης, οι δακτύλιοι A και B συγχωνεύονται σε *cis*-διάταξη, η οποία προσδίδει μια ελαφρά καμπυλότητα στον στεροειδή πυρήνα αφήνοντας τις μεθυλομάδες στην κυρτή υδρόφοβη β- πλευρά και τις πολικές υδροξυλομάδες στην κοίλη υδρόφιλη α-πλευρά (Εικόνα 2.1.5), με εξαίρεση το UDCA με μια 7β-OH ομάδα και αυξημένη υδροφιλικότητα [66,70]. Επιπλέον, το χολικό οξύ έχει και πλευρική αλυσίδα πέντε ατόμων άνθρακα και η σύνδεση μέσω του καρβοξυλικού άκρου προσδίδει ευκαμψία γύρω από την ενδεχόμενη σύνδεση με άλλη μονάδα ολιγομερούς [70]. Οι

αμφιφιλικές τους ιδιότητες, η χειρική ακαμψία του σκελετού και η μοναδική διάθεση ομάδων υδροξυλίου στη μία πλευρά του μορίου καθιστούν αυτές τις ενώσεις ενδιαφέρουσες πρώτες ύλες στη σύνθεση διαφόρων ενώσεων (βιομίμηση, μοριακή, αναγνώριση) [60].



Εικόνα 2.1.5. Η διάταξη του χολικού οξέος. Στη κοίλη πλευρά εντοπίζονται οι -OH ομάδες ενώ στην κυρτή οι -CH₃ ομάδες [218].

Το χολικό οξύ είναι ένα από τα σημαντικότερα ανθρώπινα χολικά οξέα [71-73]. Τα παράγωγα/ανάλογα του χολικού οξέος είναι μια σημαντική κατηγορία ενώσεων με μια σειρά φαρμακολογικών δραστηριοτήτων [71-73]. Τα χολικά οξέα θα μπορούσαν εύκολα να τροποποιηθούν στις λειτουργικές ομάδες του στεροειδούς πυρήνα [71-72]. Τα μη τοξικά παράγωγα άλατος του χολικού οξέος (ως αμφίφιλες ενώσεις) χρησιμοποιούνται ευρέως σε σκευάσματα φαρμάκων ως έκδοχα (ενισχυτές εντερικής απορρόφησης, προαγωγείς) και μπορούν να επηρεάσουν τη διαλυτότητα στο στόμα, την απορρόφηση και τη χημική/ενζυμική σταθερότητα των φαρμάκων [71-73]. Επίσης παράγωγα του χολικού οξέος έχουν μελετηθεί ως

ενισχυτές διαδερμικής διείσδυσης [71-73]. Ο λόγος της δραστικότητάς τους μπορεί να είναι τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους, όπως η διαλυτοποίηση και η αυτοσυναρμολόγηση [71-73].

Το χολικό οξύ (CAH) έχει βρεθεί πως μπορεί και προσδένει στον υποδοχέα X των φαρνεσοειδών (farnesoid X receptor, FXR) ο οποίος είναι ένας ετεροδιμερής πυρηνικός υποδοχέας των χολικών οξέων που έχει βρεθεί σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού και, κατόπιν ενεργοποίησης από τα χολικά οξέα, μπορεί να προκαλέσει απόπτωση των κυττάρων [59,65]. Το αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα μετά την ενεργοποίηση του FXR, καθιστά τον υποδοχέα κατάλληλο στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού [59]. Το δεϋδροξυχολικό οξύ (dehydroxycholic acid, DHCA) είναι ένα συνθετικό χολικό οξύ και έχει βρεθεί ότι δεσμεύεται στον FXR με διακριτή συγγένεια [59].

Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και η επαγωγή της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα μπορεί να επιτευχθεί με φυσικά καθώς και με συνθετικά χολικά οξέα [66]. Το CDCA και το DCA έδειξαν σημαντική δοσο-εξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση *in vitro* έναντι ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών [66]. Τα συζεύγματα χολικών οξέων (CDCA και UDCA) με εστέρες αμινοξέων, όπως τα HS-1183, HS-1199 και HS-1200, είναι ισχυροί αναστολείς του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε μια ποικιλία ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών, συμπεριλαμβανομένων του ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του μαστού (MDA-MB-231, MCF-7), του καρκίνου του προστάτη (PC-3), του καρκίνου του εντέρου (HCT116 και HT-29), του καρκίνου του ήπατος (HepG2) και της λευχαιμίας (T-κύτταρα Jurkat) [66]. Η αντιπολλαπλασιαστική τους δράση συνδέθηκε με τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και την επαγωγή της απόπτωσης ή την αναστολή της αγγειογένεσης [62,66].

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση χολικών οξέων ως ικριωμάτων στην υπερμοριακή, την ιατρική και χημεία των υλικών καθώς και σε νανοτεχνολογικές εφαρμογές, έχει αποτελέσει το

επίκεντρο έντονης έρευνας εξαιτίας της βιολογικής τους σημασίας και των αμφίφιλων και ιδιοτήτων οξέος/βάσης που φέρουν [66,69,74]. Επιπλέον έχουν αναπτυχθεί αρκετές εφαρμογές τους στη φαρμακευτική και βιοϊατρική επιστήμη εξαιτίας των ιδιόμορφων φυσικοχημικών και βιολογικών ιδιοτήτων τους [66]. Η διαθεσιμότητα και το χαμηλό κόστος των χολικών οξέων, τα οποία μπορούν εύκολα να παραγωγοποιηθούν, μετατρέπουν αυτά τα χειρικά πρότυπα σε ελκυστικά δομικά στοιχεία για τον σχεδιασμό νέων φαρμάκων, προφαρμάκων και συστημάτων φορέων φαρμάκων [6,66,70,73-75]. Επιπλέον έχουν δημιουργηθεί αμφίφιλα μόρια με βάση τα χολικά οξέα με πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές ως βακτηριοκτόνα, ως αντικαρκινικά και ως νευροπροστατευτικά μέσα [66]. Μπορούν να δράσουν ως φορείς ειδικών φαρμάκων για το ήπαρ, ως ενισχυτές απορρόφησης και ως παράγοντες μείωσης της χοληστερόλης [75].

Οι υδρόφοβες στεροειδείς μονάδες που φέρουν έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τις κυτταρικές μεμβράνες και να διέρχονται από αυτές [76]. Επομένως, μπορούν να επιτρέψουν τη μεταφορά διαφόρων δομών μέσω των μεμβρανών. Μία από τις συχνότερες θέσεις για τροποποιήσεις των αρχικών μορίων των στεροειδών είναι η θέση του άνθρακα C-17 [76].

Οι λειτουργικές ομάδες των χολικών οξέων μπορούν να υποστούν διάφορες χημικές τροποποιήσεις [69]. Για παράδειγμα, αλειφατικές αλυσίδες μπορούν να συνδεθούν στα χολικά οξέα προκειμένου να δημιουργηθούν οργανωμένες δομές ή μπορούν να προστεθούν φωτοευαίσθητες ομάδες για την ταυτοποίηση των φορέων χολικών αλάτων [69]. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως δομικό στοιχείο για την προετοιμασία μακροκυκλικών ενώσεων σε μελέτες μοριακής αναγνώρισης [69]. Επίσης μπορούν να παρασκευαστούν διάφορα ενδιαφέροντα πολυμερή χολικών οξέων για αργή απελευθέρωση σε φαρμακευτικές εφαρμογές [69]. Λόγω της βιολογικής τους σημασίας, έχει μελετηθεί εκτενώς ο στερεοεκλεκτικός μετασχηματισμός και οι χημικές τροποποιήσεις των χολικών οξέων [69].

Το UDCA και τα παράγωγά του έχουν μελετηθεί εκτενώς ως ισχυρά ικρίώματα στη φαρμακευτική χημεία [68,77]. Μελέτες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* έχουν δείξει τη χημειοπροστατευτική συμπεριφορά του UDCA ως προς τον ορθοκολικό καρκίνο [68,77]. Το UDCA έχει χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη γαστρεντερικών διαταραχών σε ασθενείς με διάφορους καρκίνους όπως ο καρκίνος του στομάχου, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του μαστού και του ήπατος [68,77], ενώ έχει ελεγχθεί ως φάρμακο στην κλινική δοκιμή φάσης III για την πρόληψη της υποτροπής του ορθοκολικού αδενώματος [68,77]. Μια μελέτη αναφέρει πως το UDCA έχει αντικαρκινική δράση σε ανθρώπινα στοματικά πλακώδη καρκινώματα HSC-3 μέσω των κασπασών [68,77]. Επίσης σύμπλοκα του UDCA με μέταλλα μείωσαν τη βιωσιμότητα και τον πολλαπλασιασμό όγκων ανθρώπου και ζώων με τρόπο εξαρτώμενο από τον χρόνο και τη συγκέντρωση [68,77]. Επιπλέον, το UDCA εκφράζει ανασταλτική επίδραση στην επαγωγή της έκφρασης της P-γλυκοπρωτεΐνης και των δραστικών ειδών οξυγόνου από τη δοξορουβικίνη (doxorubicin) σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2 [68,77].

2.2. Χολικά οξέα και συζεύγματά τους με αντικαρκινικά φάρμακα.

Τα στεροειδή είναι υδρόφοβα οργανικά μόρια χαμηλού μοριακού βάρους που δρουν σε πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών που με τη σειρά τους λειτουργούν ως παράγοντες μεταγραφής που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων στόχων [78].

Οι κύριοι τρόποι δράσης των συζευγμάτων οιστρογόνου-φαρμάκου μπορεί να είναι [78]: α) παρεμβολή στη βιοσύνθεση των στεροειδών, β) παρεμβολή σε σφαιρίνες που μεταφέρουν οιστρογόνα, γ) παρεμβολή στους ER υποδοχείς, δ) διαμόρφωση των συνενεργοποιητών των ER υποδοχέων, ε) διαμόρφωση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τους ER υποδοχείς (π.χ. κινάσες που φωσφορυλιώνουν τους ER υποδοχείς), και στ) άμεση επίδραση στο DNA [78].

Όσον αφορά τη δομική βελτιστοποίηση της βιολογικής αποτελεσματικότητας (είτε θεραπευτικής είτε διαγνωστικής) τέτοιων συζευγμάτων, πρέπει να αξιολογηθούν οι ακόλουθες ιδιότητες [78]: α) η χημική σταθερότητα υπό φυσιολογικές συνθήκες, β) η επιλεκτικότητα πρόσληψης από τους ιστούς και τα κύτταρα στόχους, γ) η συγγένεια δέσμευσης στους ER υποδοχείς, δ) ο χαρακτήρας (οιστρογονικός ή αντιοιστρογονικός) και το μέγεθος της απόκρισης κατά τη σύνδεση του συζεύγματος, και ε) το μέγεθος του επιθυμητού αποτελέσματος (πρόσδεση στο DNA/πρωτεΐνη, κυτταροτοξικότητα, αναστολή της ανάπτυξης) [78].

Η ποσότητα σύζευξης του φαρμάκου σε ένα φορέα καθώς και τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας του φορέα είναι πολύ σημαντικές παράμετροι στη χημειοθεραπεία του καρκίνου [50]. Τα χολικά οξέα, δομικά, είναι ιδανικά ως μεταφορείς φαρμάκων καθώς έχουν άκαμπτο στεροειδικό σκελετό, αμφίφιλο χαρακτήρα, χημικά διαφορετικές υδροξυλομάδες, εναντιομερική καθαρότητα, χαμηλό κόστος και είναι εύκολα διαθέσιμα [50,79]. Έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σύζευξη φαρμάκων χρησιμοποιώντας τις -OH και -COOH ως λειτουργικές ομάδες [2,50].

Το χολικό οξύ παρέχεται ως ιδανικό ικρίωμα σε εφαρμογές διανομής φαρμάκου, η οποία εξαρτάται έντονα από το φορτίο και την υδροφοβικότητα των μορίων, ελέγχοντας τις αλληλεπιδράσεις του με τις κυτταρικές μεμβράνες [50]. Έτσι τα συζεύγματα των χολικών οξέων-φαρμάκων μπορούν να δρουν ως δούρειοι ίπποι [66]. Τα προφάρμακα λαμβάνονται με πρόσδεση του φαρμάκου με απευθείας δεσμό ή μέσω διαχωριστικών μορίων στην όξινη πλευρική αλυσίδα ή στις χημικώς διαφορετικές υδροξυλομάδες στους άνθρακες C-3, C-7 και C-12 του στεροειδικού σκελετού του χολικού οξέος [66]. Επιπλέον η φύση του προσδέτη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη ρύθμιση της απελευθέρωσης του φαρμάκου [66].

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει την αυξημένη στοματική βιοδιαθεσιμότητα του acyclovir μετά τη σύζευξη του με το χολικό οξύ [50]. Παρομοίως, συζεύγματα χολικού οξέος-cisplatin έχουν ελεγχθεί για τις αντικαρκινικές δράσεις σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές [2,50,79]. Ο Sengupta και οι συνεργάτες του έχουν αναφέρει τη σύζευξη της cisplatin στη χοληστερόλη για αντικαρκινική δράση [50]. Άλλοι ερευνητές απέδειξαν ότι η cisplatin σε σύζευγμα με χολικά οξέα απορροφάται αποτελεσματικά από το ήπαρ αρουραίων και στη συνέχεια εκκρίνεται στη χολή [80]. Επίσης έχει ερευνηθεί η ιδέα των συζευγμάτων χολικού οξέος-φαρμάκου που συνδέονται με ένα διαχωριστικό μόριο [79].

Έχουν παρασκευαστεί ανάλογα της cisplatin (BAMETs) αντικαθιστώντας το ένα ή και τα δύο άτομα χλωρίου που φέρει η cisplatin με ένα από τα χολικά οξέα [66]. Τα παράγωγα με CAH και με UDCA, BAMET-R2 και BAMET-UD2 αντίστοιχα, βρέθηκε να εντοπίζονται στο ήπαρ, να έχουν ισχυρή *in vitro* και *in vivo* κυτταροστατική δράση, και ήταν σε θέση να ξεπεράσουν την ανθεκτικότητα που εμφανίζουν αρκετές εντεροηπατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές στη cisplatin [66]. Επιπλέον, το σύζευγμα BAMET-UD2 δεν εμφάνισε τις τοξικές παρενέργειες που εμφανίζει η cisplatin σε αρουραίους, υποδηλώνοντας ένα προστατευτικό αποτέλεσμα του UDCA [66]. Επιπλέον συζεύγματα χολικών οξέων με σύμπλοκα γαδολινίου (III) έχουν αναπτυχθεί ως παράγοντες σκιαγράφησης που κατευθύνονται στα ηπατοκύτταρα για απεικόνιση με μαγνητικό συντονισμό [66]. Πέρα από τη cisplatin που φέρει το μέταλλο του λευκοχρύσου έχουν δημιουργηθεί και άλλα σύμπλοκα χολικών οξέων με μέταλλα, όπως του UDCA με κοβάλτιο, νικέλιο, χαλκό και ψευδάργυρο χωρίς ωστόσο να έχει ελεγχθεί η βιολογική τους δράση [74].

Ο Yadav και οι συνεργάτες του έδειξαν πως ένα σύζευγμα χολικού οξέος-ταμοξιφένης (tamoxifen, TAM) που προέρχεται από αμίνη (Am) και φέρει τρία μόρια ταμοξιφένης είναι πιο ισχυρό από το σύζευγμα αμίνης λιθοχολικού οξέος που έχει ένα μόριο ταμοξιφένης [2]. Επίσης

έδειξαν πως η μη αντικαρκινική δράση του συζεύγματος λιθοχολικού οξέος-ταμοξιφένης οφείλεται σε αδύναμες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τις κυτταρικές μεμβράνες προκαλώντας ελάχιστες διαταραχές σε αυτές [2]. Πιο συγκεκριμένα τα συζεύγματα ταμοξιφένης-χολικών οξέων (LCA-Tam1-Ad, DCA-Tam2-Ad, CAH-Tam3-Ad) έδειξαν κυτταρικό θάνατο κατά 50% σε υψηλές συγκεντρώσεις, μεταξύ 17-50 μM [50]. Η χαμηλή αποτελεσματικότητα των προϊόντων σύζευξης χολικών οξέων-ταμοξιφένης που έχουν όξινες ομάδες μπορεί να οφείλεται σε αναστρέψιμες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των συζευγμάτων και της κυτταρικής μεμβράνης και ως εκ τούτου έλλειψη διείσδυσης τους στη μεμβράνη οδηγώντας σε χαμηλή ενδοκυτταρική συσσώρευση της ταμοξιφένης [50]. Ωστόσο τα συζεύγματα χολικού οξέος-ταμοξιφένης με ομάδες αμίνης (LCA-Tam1-Am, DCA-Tam2-Am) εμφάνισαν παρόμοιες κυτταρικές τοξικότητες με υψηλές τιμές IC_{50} [50]. Το CAH-Tam3-Am που φέρει τρία μόρια ταμιξιφένης βρέθηκε να είναι το πιο ισχυρό με τιμές IC_{50} στα $\sim 5 \mu\text{M}$, $\sim 8 \mu\text{M}$ και $\sim 9 \mu\text{M}$ σε σχέση με την ταμοξιφένη σε κυτταρικές σειρές θετικές σε ER υποδοχείς (4T1, MCF-7 και T47D αντίστοιχα), με αποτελεσματικότητα δύο-τρεις φορές καλύτερη της ταμοξιφένης [50]. Σε κυτταρικές σειρές αρνητικές για υποδοχείς ER (MDA-MB-231), το CAH-Tam3-Am έδειξε παρόμοιες αντικαρκινικές δράσεις όπως η ταμοξιφένη [50]. Έτσι η σύζευξη τριών μορίων ταμιξιφένης στο χολικό οξύ που έχει ομάδα αμίνης αυξάνει την ενδοκυτταρική συσσώρευση της ταμοξιφένης, εξηγώντας την αποτελεσματικότητα αυτού του συζεύγματος [50]. Επιπλέον έχουν συνθέσει σύμπλοκα της ταμοξιφένης με το λιθοχολικό οξύ και με την παρουσία διαφόρων άλλων ομάδων/μορίων όπως τα τριμέθυλο-αμμώνιο, μορφολίνη, διμέθυλα-άμινο πυριδίνη, πιπεριδίνη κ.ά., και έχει ελεγχθεί και η αντικαρκινική τους δράση [2].

Σε άλλη μελέτη, ελέγχθηκαν οι τιμές IC_{50} από εννιά παράγωγα χολικού οξέος έναντι της MCF-7 καρκινικής κυτταρικής σειράς του μαστού [6]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μεταξύ των εννιά παραγώγων χολικού οξέος ο αιθυλεστέρας και ο *n*-βουτυλεστέρας του

χολικού οξέος είχαν υψηλή αντικαρκινική δράση και ταυτόχρονα χαμηλή τοξική επίδραση στα φυσιολογικά κύτταρα, υποδεικνύοντας ότι αυτές οι δύο ενώσεις θα ήταν καλοί υποψήφιοι για την ανάπτυξη νέων παραγώγων του χολικού οξέος ως αντικαρκινικοί παράγοντες [6].

Άλλα παράγωγα του χολικού οξέος με polyoxometalates (POM), όπως το CAH-POM-CAH, δοκιμάστηκε έναντι δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών και έδειξε μεγαλύτερη αναστολή της ανάπτυξης και στις δύο, συγκριτικά με το Tris-POM-Tris το οποίο δεν είχε κανέναν προσδέτη και έδειξε μέτρια ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης [59]. Η τιμές IC_{50} του CAH-POM-CAH στα MCF-7 και MDA-MB-231 είναι 55.9 μM και 37.9 μM αντίστοιχα, οι οποίες είναι πολύ μικρότερες από τις τιμές IC_{50} του Tris-POM-Tris (291.7 μM για MCF-7 και 216.3 μM για MDA-MB-231) και την τιμή IC_{50} του χολικού οξέος ($> 1000 \mu M$ στα MCF-7) [59]. Επιπλέον τόσο το CAH-POM-CAH όσο και το DHCA-POM-DHCA (δεϋδρο-χολικό οξύ, dehydrocholic acid, DHCA) φαίνεται ότι αναστέλλουν επιλεκτικά την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων χωρίς να εμφανίζουν σημαντική αντι-πολλαπλασιαστική δράση στα φυσιολογικά κύτταρα MCF-10A ($IC_{50}= 278.2 \mu M$) [59]. Προτείνεται πως η αύξηση στην κυτταροτοξικότητα που δείχνουν αυτά τα συζεύγματα μπορεί να οφείλεται στην απόπτωση των κυττάρων που επάγεται και από το POM, καθώς και από την ενεργοποίηση του υποδοχέα FXR μετά τη σύνδεσή του με το τμήμα χολικού οξέος [59]. Το DHCA-POM-DHCA σύζευγμα είχε χαμηλότερη συγγένεια πρόσδεσης στον υποδοχέα FXR, και έτσι το συνεργιστικό αποτέλεσμα δεν ήταν τόσο έντονο όσο του CAH-POM-CAH [59].

Άλλα συζεύγματα CAH με άμινο αρυλο/ετεροαρυλο αμίδια βρέθηκε να έχουν επιλεκτική κυτταροτοξικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων του μαστού ή κυττάρων γλοιοβλαστώματος ανάλογα με τον αμιδικό υποκαταστάτη [66]. Επίσης από τα συζεύγματα CDCA υποκατεστημένα με πιπεραζινυλ-αμίδιο, η κιναμική ομάδα προκάλεσε απόπτωση στην καρκινική κυτταρική σειρά πολλαπλού μυελώματος (KMS-11), ενώ η βενζυλομάδα βελτίωσε

την αντι-πολλαπλασιαστική δράση σε αρκετά κύτταρα αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου [66,68]. Συζεύγματα χολικών οξέων-πολυαμινοκαρβοξυλικών που περιέχουν τον πιθανό χηλικό παράγοντα σιδήρου NE3TA, έδειξαν σημαντική κυτταροτοξικότητα έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών του τραχήλου (HeLa) και του εντέρου (HT29) [66,68]. Ακόμη, το BANB-6, ένα παράγωγο του UDCA που προκύπτει μετά από σύζευξη με μια αζωτούχο βάση, έδειξε υψηλή κυτταροστατική δράση *in vitro* και ήταν αποτελεσματικό έναντι των κυττάρων Hera 1-6/R που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στη cisplatin, υποδεικνύοντας ένα πιθανό ρόλο στη χημειοθεραπεία των εντεροηπατικών όγκων [66]. Επιπλέον, ένα εστερικό παράγωγο του UDCA (U12) εμφάνισε αντιηπατική δράση και η ανάλυση σχέσης δομής-δράσης έδειξε ότι η ακετυλίωση στην 7-OH του UDCA είναι κρίσιμη για την αντικαρκινική του δράση και τη χαμηλή τοξικότητα στα φυσιολογικά ηπατικά κύτταρα [66].

Άλλη μελέτη έδειξε πως από τη σύζευξη των υδροξυλικών ομάδων των LCA, CDCA, DCA και CAH με ομάδες τριμεθυλαμμωνίου, το λιγότερο φορτισμένο και περισσότερο υδρόφοβο παράγωγο LCA εμφάνισε τη μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα λόγω ισχυρότερων αλληλεπιδράσεων με τις κυτταρικές μεμβράνες [66]. Επίσης η σύζευξη της υδροξυλομάδας του LCA με διαφορετικές χαρακτηριστικές αμινομάδες εμφάνισε υψηλότερη δραστικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων του εντέρου για το παράγωγο με πιπεριδίνη [66]. Επιπλέον, η παρουσία ενός 9(11)-διπλού δεσμού σε παράγωγα του DCA που σχετίζεται με αυξημένη πολικότητα του δακτυλίου A λόγω οξειδωσης ή σύντηξης με ένα δακτύλιο ισοαζόλης, βελτίωσε την αντι-πολλαπλασιαστική δράση σε καρκινικά κύτταρα του δωδεκαδάκτυλου και του ήπατος [66].

Πολλά άλλα συζεύγματα χολικών οξέων-αμινοξέων έχουν μελετηθεί για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες [68]. Έτσι έχουν συντεθεί τα συζεύγματα HS-1030 (UDCA με μεθυλεστέρα της γλυκίνης), HS-1183 (UDCA με βενζυλεστέρα της L-φαινυλαλανίνης), HS-

1199 (CDCA με βενζυλεστέρα της *L*-φαινυλαλανίνης) και HS-1200 (CDCA με βενζυλεστέρα β-αλανίνης) [62,67-68]. Από αυτά, τα HS-1200, HS-1199 και HS-1183 έδειξαν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στην επαγωγή της απόπτωσης με τιμές IC_{50} 25-50 μ M έναντι καρκινικών κυττάρων του τραχήλου (HeLa), 30-45 μ M για τα MDA-MB-231 κύτταρα και 30-150 μ M έναντι των MCF-7 κυττάρων [67-68]. Επίσης παράγωγα του λιθοχολικού οξέος και του χολικού οξέος τα οποία έχουν συζευχθεί με την 3-καρβοξυλική κινολίνη και την 9-καρβοξυλική ακριδίνη στη θέση 3 ή/και 24 έχει αναφερθεί να έχουν ασθενή δράση ενάντια των καρκινικών κυτταρικών σειρών MCF-7 (μαστού) και SKOV-3 (ωοθηκών) [67].

Άλλες αναφορές υποδεικνύουν επίσης πως τα μη φυσικά συζεύγματα χολικού οξέος-αμινοξέων μακράς αλυσίδας έχουν ισχυρή αντικαρκινική δράση εναντίον αρκετών καρκινικών κυτταρικών σειρών του μαστού (MDA-MB-231, MCF-7), του τραχήλου της μήτρας (HeLa) και του προστάτη (PC-3) [68]. Επίσης μελέτες σύνθεσης και δομής συζευγμάτων του χολικού οξέος με την 4-αμινοπυριδίνη, με *N*-(2-αμινοαιθυλ)-αμίδιο, με αρένιο και με γλουταμυλ-πυριδίνες έχουν περιγραφεί, χωρίς να έχει ελεγχθεί η αντικαρκινική τους δράση [68].

Έχουν δημιουργηθεί συζεύγματα χολικών οξέων με τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας τους (χολικά, υδροχολικά, δεοξυχολικά, υδροδεσοξυχολικά και 12 -κετοχολικά οξέα) με σύζευξη τους με αιθυλεστέρα του 11-αμινοενδεκανοϊκού οξέος με φυσικά αμινοξέα διαφορετικού μήκους ανθρακικής αλυσίδας, και βρέθηκε να επηρεάζουν σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [67]. Τα ληφθέντα συζεύγματα και οι αιθυλεστέρες έδειξαν ενισχυμένη αντιπολλαπλασιαστική δράση σε σύγκριση με τα αρχικά χολικά οξέα, με κάποια από αυτά (εστέρας, αμίδιο) να δείχνουν ισχυρή δράση έναντι των κυττάρων MCF-7 σε σύγκριση με τα αδρανή χολικά οξέα [67]. Παρόμοια συμπεριφορά έδειξαν και άλλες ενώσεις έναντι των κυττάρων HeLa S-3 [67]. Συμπερασματικά αυτές οι ενώσεις θα μπορούσαν να

χρησιμεύσουν ως βάση για πιο δραστικούς παράγοντες εναντίον πληθώρας καρκινικών κυτταρικών σειρών [67].

Έχουν συντεθεί και διάφορα σύμπλοκα με φυσικά και συνθετικά οιστρογόνα και ανδρογόνα με μια σειρά διαφορετικών οργανομεταλλικών και συντονιστικών προσδετών προκειμένου να δράσουν στους υποδοχείς στεροειδών [81]. Διάφορα οργανομεταλλικά θα μπορούσαν να συνδεθούν στη θέση 17R της οιστραδιόλης, διατηρώντας την ικανότητα δέσμευσης στον υποδοχέα των οιστρογόνων [81]. Η ομάδα αιθυνυλίου βρέθηκε να είναι επιτυχής συνδέτης, καθώς παρείχε επαρκή διαχωρισμό μεταξύ του στεροειδούς και του προσδέτη [81]. Ωστόσο, το οιστρογόνο δεν είναι απαραίτητως το πιο ενδιαφέρον από τα ορμονικά στεροειδή [81]. Έτσι, ελέγχθηκε το μόριο της τεστοστερόνης ενώ βρέθηκε να έχει υψηλή δράση συγκριτικά με άλλα μη-δραστικά σύμπλοκα λευκοχρύσου (II) [81]. Επίσης έχουν αναφερθεί ορισμένα αντικαρκινικά βιοσυζεύγματα οργανολευκοχρύσου (II) του τύπου $[Pt(ET-dmba)Cl(L)]$ (L=διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και PTA, dmba= διμεθυλοβενζυλαμίνη) με ετικέτα αιθιστερόνης (ET) [81]. Επιπλέον έχει συντεθεί ένα σύμπλοκο με ρουθένιο και 17-R-[2φαινυλπυρίδιν-4-αιθυνυλ]-19-νορτεστοστερόνη (17-R-[2-phenylpyridyl-4-ethynyl]-19-nortestosterone) ενώ έχει ελεγχθεί ως προς τη δράση του ενάντια σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού και των ωοθηκών [81].

Χρησιμοποιώντας την οιστραδιόλη (E2) ως μόριο-φορέα, θα μπορούσε θεωρητικά ένα αντικαρκινικό φάρμακο να κατευθυνθεί με ακρίβεια στα εξαρτώμενα από ορμόνες κύτταρα του μαστού, της μήτρας και των ωοθηκών [41]. Αρκετές οιστρογονικές ενώσεις έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί για τη σύνδεση ενός τοξικού τμήματος με βάση τον λευκόχρυσο (II) σε διάφορες θέσεις του στεροειδούς σκελετού [41-42]. Επιπλέον διάφορα στεροειδή παράγωγα με ετεροκυκλικούς δακτυλίους έχουν προσελκύσει μεγάλη προσοχή [14]. Βρέθηκε πως τα αντικαρκινικά ετεροκυκλικά στεροειδή έχουν τόσο ορμονικές όσο και κυτταροτοξικές δράσεις

σε καρκινικά κύτταρα [14]. Έτσι, μία ποικιλία συνθετικών στεροειδών παραγώγων έχουν δημιουργηθεί, με τα περισσότερα από αυτά να μπορούν να αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς στεροειδών λόγω της ομοιότητας που παρουσιάζουν [14].

Τα μέταλλα μετάπτωσης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες απεικόνισης για διάγνωση αφού καταστεί δυνατό να μπορούν να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη [82]. Επιπλέον θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ένας φορέας διανομής, που χρησιμοποιώντας μια κυτταρική οδό μεταφοράς, να εισάγει το μέταλλο στο κύτταρο [82]. Ως πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου θα μπορούσε να θεωρηθεί το γεγονός πως με έναν φορέα διανομής μπορούν να εισαχθούν στο κύτταρο πολλά διαφορετικά μέταλλα [82]. Συζεύγματα στεροειδών (οιστρογόνα) με χηλικά μέταλλα αντιπροσωπεύουν έναν ελκυστικό φορέα διανομής για μια τέτοια στρατηγική [82]. Είναι γνωστό ότι τα οιστρογόνα μεταφέρονται μέσω του αίματος και αφού διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, δεσμεύονται με τους ER υποδοχείς στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρονται τελικά στον πυρήνα του κυττάρου [82]. Επιπλέον, εντοπίζονται σε συγκεκριμένους ιστούς (π.χ. μαστός), οι οποίοι παρέχουν ένα επίπεδο στόχευσης [82]. Έτσι έχει παρασκευαστεί μια ποικιλία συμπλόκων στεροειδούς-μετάλλου με βάση τα οιστρογόνα που βασίζονται σε 17-λειτουργικά οιστρογόνα και σχετικές συγγένειες δέσμευσης των ενώσεων με απομονωμένους ER υποδοχείς και με ER υποδοχείς στα MCF-7 κύτταρα [82].

Κεφάλαιο 3

3.1. Κασσίτερος γενικά.

Ο κασσίτερος είναι γνωστός ως μέταλλο από πολύ παλιά και η ανακάλυψη έγινε περίπου το 3500 π.Χ. [83,84]. Ανήκει στην 14^η ομάδα του περιοδικού πίνακα με ηλεκτρονιακή κατανομή $[Kr] 4d^{10} 5s^2 5p^2$ και η κύρια κατάσταση σθένους είναι Sn(IV), ωστόσο είναι κοινές και ενώσεις με σθένος Sn(II). Επιπλέον πολλές οργανικές ενώσεις του κασσιτέρου με ειδικά σχεδιασμένες δομές έχουν παρασκευαστεί τα τελευταία χρόνια [83,84]. Ο κασσίτερος έχει 10 σταθερά ισότοπα, που είναι ο μεγαλύτερος αριθμός ισοτόπων για οποιαδήποτε στοιχείο, και οδηγεί σε ένα χαρακτηριστικό φάσμα μάζας [83,84]. Τα ισότοπα ^{117}Sn και ^{119}Sn , που έχουν σπιν $\frac{1}{2}$, χρησιμοποιούνται στη φασματοσκοπία NMR. Το γ-ενεργό ισότοπο ^{119}Sn , που παρασκευάζεται μετά από ακτινοβολία με νετρόνια του εμπλουτισμένου ^{118}Sn ισότοπου, χρησιμοποιείται στην φασματοσκοπία Mössbauer [83].

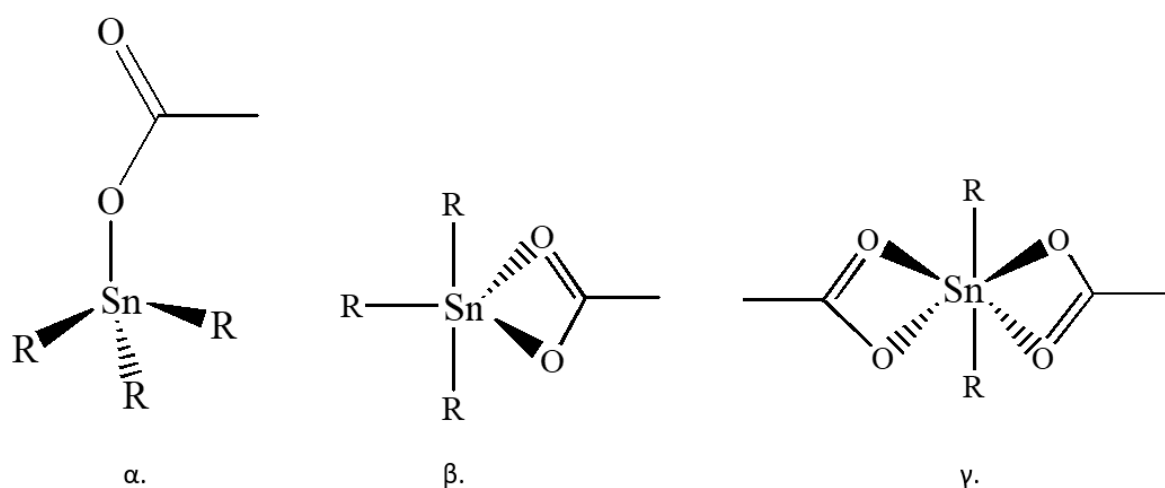
Σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος, ο κασσίτερος είναι σχετικά μη δραστήσιος και είναι αδρανής στο οξυγόνο, το άζωτο, το υδρογόνο, το νερό και την αμμωνία [84]. Η επιφανειακή οξείδωση λαμβάνει χώρα σε υψηλές θερμοκρασίες, οδηγώντας σε σημαντικό θάμπωμα/μαύρισμα της επιφάνειας στους 200° C [84]. Σε λευκή θέρμανση, ο κασσίτερος καίγεται με μια λευκή φλόγα οδηγώντας στη δημιουργία οξειδίου Sn(IV) [84]. Οι υδρατμοί μπορούν να αντιδρούν με την επιφάνεια του κασσιτέρου σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 700°C δίνοντας φιλμ οξειδίου και υδρογόνο [84]. Ο μεταλλικός κασσίτερος μπορεί να προσβληθεί με χλώριο ή βρώμιο και να δώσει τα αντίστοιχα αλογονίδια Sn(IV) [84].

Ο κασσίτερος έχει την ικανότητα να δημιουργεί σταθερούς και σχετικά ισχυρούς δεσμούς με μια πληθώρα στοιχείων [84]. Οι περισσότεροι δεσμοί κατά κύριο λόγο είναι ομοιοπολικού χαρακτήρα, αλλά μπορεί να σχηματίζει και ιοντικούς δεσμούς με βαρύτερα

αλκαλικά μέταλλα και τις αλκαλικές γαίες [84]. Αυτή η τεράστια ευελιξία στη δημιουργία δεσμών συνδέεται με τη διαθεσιμότητα ενός ευρέος φάσματος γεωμετριών και δομικών τύπων πλέγματος, οδηγώντας σε έναν πλούτο χημείας στερεάς κατάστασης [84].

Ο κασσίτερος δημιουργεί ανόργανες ενώσεις στην 4+ οξειδωτική κατάσταση χρησιμοποιώντας όλα τα ηλεκτρόνια σθένους κατά τη δημιουργία των δεσμών, ενώ στην 2+ οξειδωτική κατάσταση χρησιμοποιούνται μόνο τα p-ηλεκτρόνια αφήνοντας αδεύσμευτο ένα ζεύγος ηλεκτρονίων [84,85]. Είναι γνωστές πολλές ενώσεις και στις δύο καταστάσεις οξείδωσης. Οι ενώσεις με 4+ οξειδωτική κατάσταση είναι πιο σταθερές και οι ενώσεις με 2+ οξειδωτική κατάσταση είναι μέτρια δυνατοί αναγωγικοί παράγοντες [84,85].

Η δομική χημεία των ανόργανων παραγώγων Sn(IV) είναι απλή και κατά κύριο λόγο βασίζεται στον τετραεδρικό συντονισμό στις μοριακές ενώσεις, και σε οκταεδρική γεωμετρία σε ενώσεις με περισσότερους ιοντικούς δεσμούς (Εικόνα 3.1.1) [84,85]. Μπορεί επίσης να έχουν και δομή τριγωνικής πυραμίδας [85]. Ωστόσο υπάρχουν και παραδείγματα πέντα-, έπτα- και όκτω-συντονισμού [84].



Εικόνα 3.1.1. Γεωμετρίες γύρω από το άτομο του κασσιτέρου (Sn) με προσδέτη που φέρει καρβοξυλική ομάδα: α. τετραεδρική, β. τριγωνική διπυραμίδα, γ. οκταεδρική.

Κάποιες χρήσεις του μεταλλικού κασσιτέρου είναι ως παράγοντας συγκόλλησης, σε λευκοσιδηρικά σκεύη, ως κράμα κασσιτέρου, ως μέταλλο babbitt, και ως χημικό για παράδειγμα ο τετραχλωριούχος κασσίτερος και ο τριχλωριούχος βούτυλ-κασσίτερος έχουν χρησιμοποιηθεί για την επικάλυψη γυαλιού με SnO_2 [83]. Το γυαλί επιπλεύσεως επιπλέον παράγεται μέσα σε μια πισίνα λιωμένου κασσιτέρου [83].

3.2. Οργανοκασσιτερικές ενώσεις.

Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις (organotin compounds, OTC) ανήκουν σε μια ομάδα οργανομεταλλικών ενώσεων με γενικό τύπο $\text{R}_n\text{SnX}_{4-n}$ όπου το άτομο του κασσιτέρου είναι συνδεδεμένο ομοιοπολικά με έναν ή περισσότερους υποκαταστάτες, στους οποίους ως R είναι μια οργανική άλκυλο- ή άρυλο- ομάδα και έχει τουλάχιστον έναν ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ Sn-C [83-88], και ως X είναι ένας ανόργανος ή οργανικός προσδέτης [86-89]. Κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τον αριθμό των οργανικών ομάδων ως μόνο-οργανοκασσιτερικές (R_1SnX_3), δι-οργανοκασσιτερικές (R_2SnX_2), τρι-οργανοκασσιτερικές (R_3SnX) και τετρα-οργανοκασσιτερικές (R_4Sn) ενώσεις [86-89]. Ο προσδέτης X συνήθως είναι κάποιο από τα ανιόντα όπως χλώριο, φθόριο, οξείδιο, υδροξείδιο και κάποια καρβοξυλική ή θειολική ομάδα [84].

Εκτός από τις μεθυλοκασσιτερικές ενώσεις, όλες οι υπόλοιπες οργανικές μορφές είναι ανθρωπογενούς προέλευσης [87]. Οι χημικές και οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες καθώς και η τοξικότητά τους διαφέρει αρκετά και εξαρτάται από τον αριθμό και τη φύση των R ομάδων και τον τύπο του προσδέτη X [83,87-88]. Οι τρι-υποκατεστημένες οργανοκασσιτερικές ενώσεις επιδεικνύουν τη μεγαλύτερη τοξικότητα έναντι των μόνο-, δι- και τετρά-οργανοκασσιτερικών ενώσεων ή του ανόργανου κασσιτέρου, ο οποίος θεωρείται ως μη-τοξικός [83,87-88]. Η ανιονική ομάδα X ωστόσο στα τρι-υποκατεστημένα οργανοκασσιτερικά

παράγωγα δεν παίζει μεγάλο ρόλο στην τοξικότητά τους, εκτός αν είναι βιολογικά δραστική από μόνη της, οπότε μπορεί να ενισχυθεί η ενεργότητα της ένωσης [83].

Η διαλυτότητα τους στο νερό τείνει να μειώνεται τόσο με τον αριθμό όσο και με το μέγεθος των οργανικών υποκαταστατών [87]. Ανάλογα όμως την ομάδα X που φέρουν, μπορεί να αυξάνεται η υδατοδιαλυτότητα τους και τότε να έχουν καλύτερη δράση [83]. Η τοξικότητά τους επίσης διαφέρει αρκετά ανάλογα με τον αριθμό και τη φύση των οργανικών ομάδων [83,87-88]. Η βιολογική τους δράση πάλι εξαρτάται από τον αριθμό και τη φύση των άλκυλο- ή άρυλο- ομάδων που προσδένονται στο μέταλλο ενώ η φύση της ανιονικής ομάδας έχει δευτερεύουσα σημασία [87].

Η πρώτη οργανοκασσιτερική ένωση, το διαίθυλο-κασσιτερικό διχλωρίδιο, παρασκευάστηκε από τον Frankland το 1849 με τη θέρμανση αιθυλοχλωριδίου μαζί με μεταλλικό κασσίτερο και σηματοδοτεί την έναρξη της οργανομεταλλικής χημείας [83-84,86-87].

Τα οργανοκασσιτερικά ανήκουν στις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες οργανομεταλλικές ενώσεις, με εκτιμώμενη ετήσια παραγωγή 60000 τόνους [83]. Έτσι η χημεία τους θεωρείται από τις ισχυρότερες περιοχές στον διεπιστημονικό τομέα λόγω του ευρέως φάσματος βιομηχανικών, συνθετικών, γεωργικών και βιολογικών εφαρμογών [83].

Η πρώτη εφαρμογή των οργανοκασσιτερικών ενώσεων έγινε γύρω στο 1943, όταν αρχικά χρησιμοποιήθηκαν ως σταθεροποιητές PVC ενάντια στη θερμότητα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας [83,87,90-93]. Μια ποικιλία εφαρμογών είναι επίσης οι βιομηχανικές και βιολογικές, π.χ. ως βιομηχανικά βιοκτόνα [18,83,94] και αντιμυκητιακοί παράγοντες [83,95-96], ως βιομηχανικοί καταλύτες [83,87,90,92-93,97], ως παράγοντες επιφανειακής σκλήρυνσης, ως ανιχνευτές σπινθηρισμού για ακτίνες γ και X, ως βαλλιστικά πρόσθετα για

καύσιμα κινητήρων στερεών πυραύλων, και ως ιονοφόρα στην υγρή μεμβράνη ιοντο-εκλεκτικών ηλεκτροδίων [83].

Τρι-οργανοκασσιτερικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των τρι-*n*-βούτυλ-κασσιτερικών, τρικυκλοξυλ-κασσιτερικών και τριφαίνυλ-κασσιτερικών ενώσεων, έχουν χρησιμοποιηθεί στη γεωργία ως μυκητοκτόνα [18,83,93-96,98-105], μαλακιοκτόνα, ακαρεοκτόνα, παρασιτοκτόνα [83,87,98,100,101,103,106], ως βακτηριοκτόνα και γενικά βιοκτόνα [10,18,83,90-102,104,106-107]. Επιπλέον έχουν χρησιμοποιηθεί ως θαλάσσιες αντιρρυπαντικές ουσίες σε χρώματα για μεγάλα πλοία, προκειμένου να εμποδίσουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε αυτά [83,87-91,93,96,106-108], καθώς και ως συντηρητικά ξύλου [87,90-91,105-106].

Εκτός από τις προαναφερθείσες εφαρμογές οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί ως απολυμαντικά και ενάντια στη μούχλα των πλυντηρίων ρούχων, ως αποθητικά τροφτικών και ως νοσοκομειακά και κτηνιατρικά απολυμαντικά [83]. Άλλες χρήσεις μπορεί να είναι ιατρικές όπως ως αντι-ιικά, αντι-παρασιτικά, αντι-υπερτασικά, ως αντι-υπερλιπιδαιμικά, αντι-φλεγμονώδη [99], και τέλος ως αντικαρκινικά φάρμακα [92-93,99].

Μαζί με αυτές τις πολυάριθμες εφαρμογές και την ταχεία ανάπτυξη της παραγωγής και της κατανάλωσης οργανοκασσιτερικών ενώσεων αυξήθηκε η ανησυχία για πιθανές επιπτώσεις στο περιβάλλον και την υγεία. Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις είναι περιβαλλοντικοί ρύποι που βρίσκονται παντού και έχουν ιδιαίτερη σημασία για τα υδατικά οικοσυστήματα [83,89,108]. Η αύξηση της τοξικότητας τους μπορεί να σχετίζεται με την αδιαλυτότητα τους στο νερό, επειδή η υδροφοβικότητα τους είναι το κύριο χημικό χαρακτηριστικό που είναι υπεύθυνο για τη βιοσυσσωρεύσή τους [89]. Αυτό έχει προκαλέσει φυσικά την ανησυχία ότι ο κασσίτερος μπορεί να εισέλθει και να συσσωρευτεί στο

περιβάλλον, και επομένως στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα. Στα ανώτερα είδη, συμπεριλαμβανομένων των θηλαστικών, οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις τείνουν να συσσωρεύονται σε ορισμένα όργανα, και πιο συγκεκριμένα στο ήπαρ, τα νεφρά και τον εγκέφαλο [83,109].

Έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες *in vitro* για να εξηγηθεί ο μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την τοξικότητα των οργανοκασσιτερικών ενώσεων σε ολόκληρους οργανισμούς [83,108]. Τα διαλυτά άλατα κασσιτέρου είναι ερεθιστικά του στομάχου και η διατροφή που περιέχει υψηλά επίπεδα κασσιτέρου προκαλεί αναιμία σε αρουραίους [85]. Επιπλέον οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις απορροφώνται πιο εύκολα από το έντερο απ' ότι οι ανόργανες ενώσεις [109]. Το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας μπορεί να επηρεάσει την απορρόφηση, με τις βραχύτερες αλυσίδες να απορροφώνται πιο εύκολα από την εντερική οδό [109]. Τα οργανοκασσιτερικά απορροφώνται επίσης εύκολα μέσω του δέρματος με τις ενώσεις τριαλκυλοκασσιτέρου να επιδεικνύουν την υψηλότερη δραστηριότητα [109]. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι παρεμβαίνουν στον μεταβολισμό της αιμοποίησης καθώς και στο καρδιαγγειακό σύστημα [83].

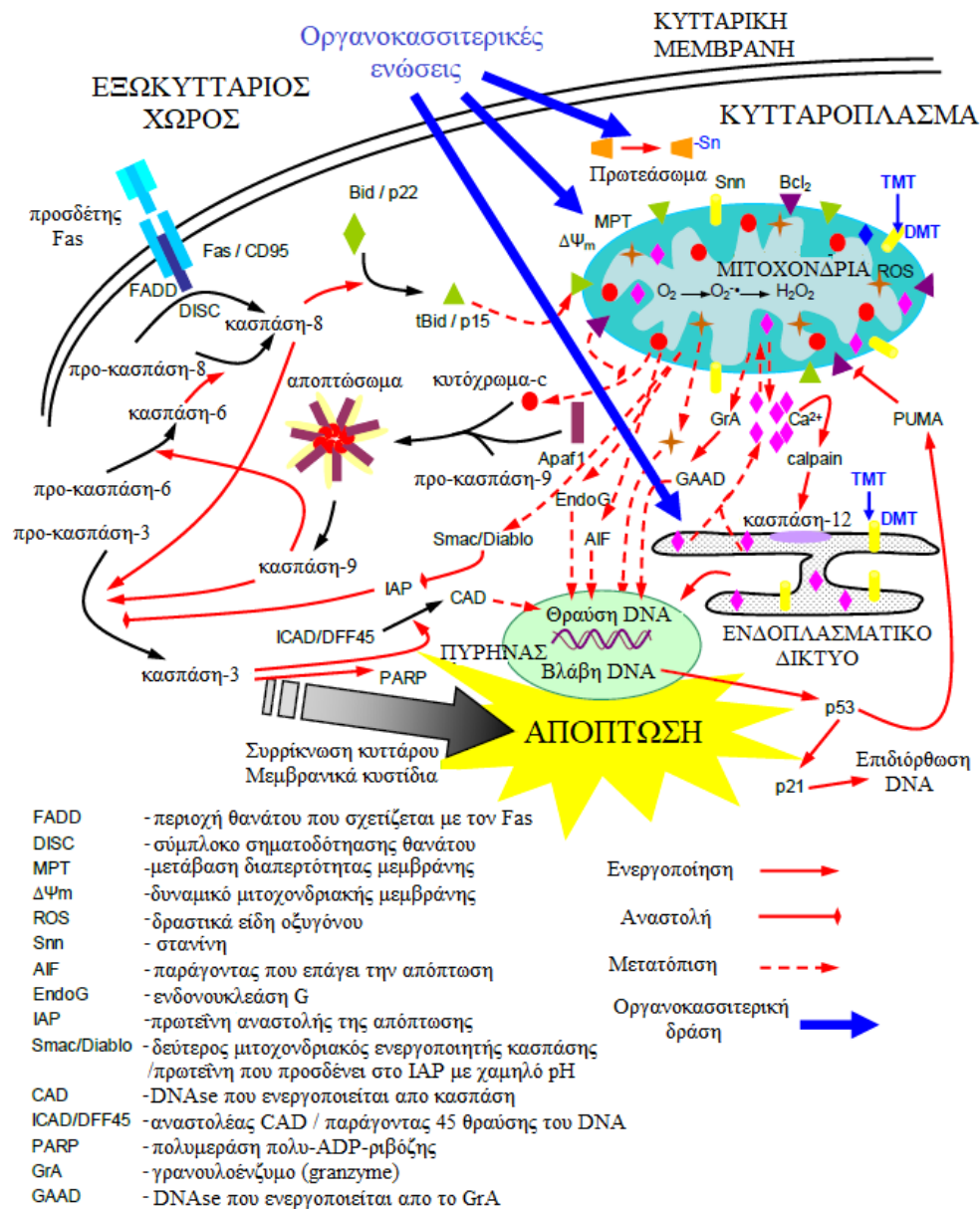
Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις έχουν το πλεονέκτημα έναντι των πολύ αποτελεσματικών ενώσεων υδραργύρου να αποικοδομούνται σε σχετικά αβλαβείς ανόργανες ενώσεις κασσιτέρου [83,89]. Αν και η χρήση τους μειώνεται, επειδή η βιοαποικοδόμησή τους είναι πολύ αργή, οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις είναι πολύ ανθεκτικές στο περιβάλλον, προκαλώντας έτσι τοξικολογικά προβλήματα, όπως ορμονικές διαταραχές [87] σε ανθρώπους και ζώα, και προκαλούν *imposex* (επιβολή αρσενικού χαρακτήρα στον θηλυκό) σε διάφορα θαλάσσια είδη [83,89,103,107-108,110]. Επίσης έχουν νευροτοξικές [83,87,92] και ανοσοτοξικές επιδράσεις [83,85,87,103,109], καθώς και αναπαραγωγική τοξικότητα [92], και μπορούν να προκαλέσουν ερεθιστική δερματίτιδα [85].

Ο τρόπος που δρουν οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις δεν είναι μελετημένος [83,92,107,92]. Η γνώση του τρόπου δράσης τους θα βοηθούσε στον σχεδιασμό νέων ενώσεων [83,107]. Επιπλέον τα οργανοκασσιτερικά θα είναι πιο φιλικά προς το περιβάλλον αν αυξηθεί η υδατοδιαλυτότητά τους, μειώνοντας ακόμα και την ποσότητα της ένωσης που απαιτείται για να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα [83,107].

Γενικά οι τρι-οργανοκασσιτερικές ενώσεις έχουν μεγαλύτερο εύρος βιολογικής δράσης έναντι των δι- και μόνο- αναλόγων εξαιτίας της ικανότητας τους να προσδένονται σε πρωτεΐνες [93]. Μπορούν επίσης να προσδένουν στον υποδοχέα X των ρετινοειδών καθώς και σε άλλους πυρηνικούς υποδοχείς [87-88]. Επιπλέον η αλληλεπίδρασή τους με το DNA φέρει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς τέτοιες ενώσεις ίσως μπορούν να αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες στο DNA, να αλλάζουν τοπικά τη δομή του, να εμποδίζουν την πρόσδεση ενεργοποιητικών ή κατασταλτικών πρωτεϊνών σε αυτό, και έτσι να αλλάζουν ολοκληρωτικά την γονιδιακή έκφραση [87]. Επιπλέον έχει βρεθεί πως ενεργοποιούν παράγοντες που εμπλέκονται στις οδούς της απόπτωσης, όπως ο ογκοκαταστολέας p53, ο υποδοχέας TRAIL, οι κασπάσες και οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 [83,87-88,104,111-112]. Η αντικαρκινική δράση που φέρουν οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις μπορεί να οφείλεται στη δράση τους έναντι γονιδιακών οδών στα καρκινικά κύτταρα [83,87-88,104].

Μια ακόμα δράση των ενώσεων αυτών είναι η αναστολή του ενεργειακού μεταβολισμού στα μιτοχόνδρια και η επακόλουθη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, καθώς και η αλληλεπίδρασή τους με τις κυτταρικές μεμβράνες αλλάζοντας την διαπεραστικότητα τους και τη λιπιδιακή τους σύνθεση [109], αυξάνοντας τη συγκέντρωση του Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα οδηγώντας στη δημιουργία δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) [4,109], που ακολουθείται από την ενεργοποίηση των κασπασών, τον κατακερματισμό του DNA και τελικά οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης (Εικόνα 3.2.1) [83,88-89,109,111-112].

Επιπλέον εμποδίζουν τη σύνθεση των πρωτεϊνών, του DNA και του RNA [4,87,89,108-109], μπορούν και συσσωρεύονται στη συσκευή Golgi και το ενδοπλασματικό δίκτυο, αλλάζουν τα επίπεδα του cAMP, και αναστέλλουν τις μιτοχονδριακές και $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ΑΤΡασες [4,109]. Η πρόσδεσή τους στο DNA και η πρόκληση απελίκωσης της διπλής έλικας του [109] οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο με νέκρωση [89,109].



Εικόνα 3.2.1. Πρόκληση απόπτωσης από τις οργανοκασσιτερικές ενώσεις (OTC) [88].

Οι ενώσεις τριαιθυλοκασσιτέρου έχουν αποδειχθεί ισχυροί αναστολείς οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια [85,109]. Οι τρι-οργανοκασσιτερικές ενώσεις φαίνεται να διαταράσσουν περεταίρω τη λειτουργία των μιτοχονδρίων με τρεις τρόπους: πρώτον, με δευτερογενείς αποκρίσεις που προκαλούνται από την αποφόρτιση της διαβάθμισης υδροξυγλωριδίου διαμέσου των μιτοχονδριακών μεμβρανών, δεύτερον, με αλληλεπίδραση με το βασικό σύστημα εξοικονόμησης ενέργειας που εμπλέκεται στη σύνθεση του ATP και τρίτον, με αλληλεπίδραση με τις μιτοχονδριακές μεμβράνες οδηγώντας στη διόγκωση και διάρρηξη [109]. Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στον αποπτωτικό καταρράκτη εξυπηρετώντας ως ένα συγκλινόν κέντρο αποπτωτικών σημάτων που προέρχονται τόσο από τις εξωγενείς όσο και από τις ενδογενείς οδούς. Οι μεταβολές που προκλήθηκαν στο δυναμικό της μεμβράνης των μιτοχονδρίων έχουν αναφερθεί προηγουμένως ότι αντιπροσωπεύουν έναν καθοριστικό παράγοντα στην εκτέλεση κυτταρικού θανάτου [113].

Έχει αναφερθεί πως οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις είναι πιθανοί τροποποιητές της βιοσύνθεσης των οιστρογόνων [4,89,109]. Η θεωρία είναι πως δρουν ως ανταγωνιστικοί αναστολείς της αρωματάσης, ένζυμο το οποίο μετατρέπει τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα [87,89,108], οδηγώντας έτσι στη συσσώρευση των ανδρογόνων [87,108,110]. Ωστόσο οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις για την αναστολή της αρωματάσης είναι σχετικά υψηλές [87,108,110]. Εκτός από την αναστολή της αρωματάσης μπορούν να αναστέλλουν τη βιοσύνθεση της οιστραδιόλης, αναστέλλοντας τα ένζυμα 17β-υδροξυστεροειδή δεϋδρογονάση τύπου I (hydroxysteroid dehydrogenase type I (17β-HSD-I), μετατρέπει την οιστρόνη στη πιο βιολογικά ενεργή οιστραδιόλη 17-β), 3β-υδροξυστεροειδή δεϋδρογονάση (hydroxysteroid dehydrogenase) και 5α-αναγωγάση (5α-reductase) [87,108,110].

Η πρόσδεση των οργανοκασσιτερικών ενώσεων σε πυρηνικούς υποδοχείς και σε παράγοντες μεταγραφής που επάγονται από ορμονικούς ή άλλους βιολογικούς προσδέτες

μπορεί να προκαλεί έκπληξη αλλά υπάρχει μεγάλος αριθμός αποδείξεων πως οι οργανοκασιτερικές ενώσεις προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές μέσω αλληλεπιδράσεων με μεταγραφικούς ρυθμιστές και μερικώς με πυρηνικούς και στεροειδικούς υποδοχείς [87,103]. Οι τρι-βούτυλο και τρι-φαίνυλο κασσίτεροι έχουν αναγνωρισθεί ως νανομοριακοί αγωνιστές του υποδοχέα X των ρετινοειδών και των υποδοχέων υπεροξειδίου (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs), οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων [87,108,110,112].

Τέλος είναι πολύτιμη η ανάπτυξη αξιόπιστων ποσοτικών σχέσεων δομής-δράσης (Quantitative structure–activity relationship (QSAR)) (θεωρητικών υπολογισμών) μορίων οργανοκασιτερικής φύσης. Αφενός θα επέτρεπε να ελέγχεται η τοξικότητα νέων ή/και μη δοκιμασμένων ενώσεων, αφετέρου θα βοηθούσε επίσης και στην ιεράρχηση το ποιες ενώσεις θα ήταν καταλληλότερες για αρχικές δοκιμές [83]. Η σχέση μεταξύ δομής και δράσης (structure–activity relationship, SAR) των οργανοκασιτερικών (IV) ενώσεων έδειξε πως όλες οι δραστικές ενώσεις χαρακτηρίζονται από: (i) τη διαθεσιμότητα θέσεων συντονισμού του Sn, (ii) την εμφάνιση σχετικά σταθερών δεσμών μεταξύ προσδέτη-Sn, π.χ. Sn-N και Sn-S και (iii) την αργή υδρολυτική αποσύνθεση [111,114]. Πρόσφατα έχουν περιγραφεί μερικά πρότυπα από τη συσχέτιση μεταξύ δομής-δράσης που βασίζονται στις ομάδες R και L των τρι- και δι-οργανοκασιτερικών καρβοξυλικών παραγώγων (R_2SnL_2 , R_3SnL , L=διδοτικός προσδέτης με άτομα δότες O ή N) τα οποία προβλέπουν την αντικαρκινική δράση [115].

3.3. Οργανοκασιτερικές ενώσεις και καρκίνος.

Οι οργανομεταλλικές ενώσεις παρέχουν ευέλικτες πλατφόρμες για τον σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων [4]. Από τη στιγμή που οι οργανομεταλλικές ενώσεις είναι σταθερές, συνήθως χωρίς φορτίο και είναι σχετικά λιπόφιλες, προσφέρουν ευκαιρίες

σύνθεσης μιας νέας κατηγορίας φαρμακευτικών ενώσεων, ενδεχομένως με δράση που εξαρτάται από το μέταλλο, ενάντια στα διάφορα βιομόρια που μπορεί να στοχεύουν[4].

Οι ενώσεις με βάση το μέταλλο ήταν ευρέως παρούσες σε παλαιές φαρμακοποιίες μαζί με ακατέργαστα φάρμακα φυσικής (φυτικής και ζωικής) προέλευσης. Τα μεταλλικά παράγωγα ωστόσο παραγκωνίστηκαν λόγω της περιορισμένης επιλεκτικότητας και της τοξικότητάς τους και άρχισαν να χρησιμοποιούνται οι πιο αξιόπιστες οργανικές ενώσεις, είτε συνθετικές είτε απομονωμένες σε καθαρή μορφή από φυσικές πηγές. Έτσι, ο αριθμός των φαρμάκων με βάση το μέταλλο μειώθηκε, ακόμη και αν νέες μορφές ή/και νέες θεραπευτικές ενδείξεις προτάθηκαν για μερικά από αυτά στην ιατρική χρήση. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθούν ορισμένα παράγωγα τριών στοιχείων της ομάδας Va (As, Sb, Bi), όπως το melarsaprol (για τα τελευταία στάδια της αφρικανικής τρυπανοσωμίας), το sodium stibogluconate (για λεϊσμανίαση και άλλες λοιμώξεις από πρωτόζωα) και κιτρικό ή υποσαλικυλικό βισμούθιο (για τη διάρροια των ταξιδιωτών και την εξάλειψη του *Helicobacter pylori*). Σε αυτά, θα πρέπει να προστεθεί η σουλφαδιαζίνη με άργυρο και η ορονοφίνη (auronofin), που περιέχουν μέταλλα της ομάδας Ib. Το πρώτο εξακολουθεί να αντιπροσωπεύει έναν παράγοντα επιλογής για την πρόληψη των λοιμώξεων στα εγκαύματα, ενώ το δεύτερο, που κάποτε ήταν εξαιρετικά πολύτιμο για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, αντικαθίσταται από ανοσοκατασταλτικά και ανταγωνιστές των υποδοχέων των κυτοκινών. Τέλος, το ανθρακικό ή κιτρικό λίθιο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε μεγάλο βαθμό στο παρελθόν ως διουρητικό, αποτελεί πλέον βασικό παράγοντα για τη θεραπεία της μανίας και την προφύλαξη των διπολικών διαταραχών [112].

Το δυναμικό οξειδοαναγωγής του μετάλλου μπορεί να αλληλεπιδράσει με την ισορροπημένη κυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση, τροποποιώντας τη βιωσιμότητα του

κυττάρου είτε άμεσα είτε μέσω της μετατροπής μιας αδρανούς ένωσης σε μια ενεργή, ρυθμίζοντας έτσι την εγγενή τοξικότητα του φαρμάκου [112].

Οι πρώτες αναφορές για τη θεραπευτική χρήση των μετάλλων ή των ενώσεών τους στον καρκίνο και τη λευχαιμία χρονολογούνται από τον 16^ο και 19^ο αιώνα [116]. Ο πρώτος ανόργανος χημειοθεραπευτικός παράγοντας είναι η cisplatin που ακόμα και σήμερα είναι ο πρώτος που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου των όρχεων, των ωοθηκών και άλλων ειδών [112,116-119]. Ωστόσο οι σημαντικές τοξικές παρενέργειες και η ανθεκτικότητα που εμφανίζουν κάποιοι όγκοι, είτε εγγενή είτε μετά από κάποιες θεραπείες, είναι οι κύριοι παράγοντες που ευθύνονται για την υποτροπή και τη νοσηρότητα του καρκίνου και έχουν περιορίσει την κλινική αποτελεσματικότητα της cisplatin και των αναλόγων της [112,117-119]. Έτσι υπάρχει ανάγκη να βρεθούν νέοι ανόργανοι παράγοντες και μη-φέροντες τον λευκόχρυσο ως μέταλλο για να χρησιμοποιηθούν ως χημειοθεραπευτικά κατά του καρκίνου, που να έχουν βελτιωμένη ειδικότητα και μειωμένες τοξικές παρενέργειες [111,114,117-119].

Μεταξύ των οργανομεταλλικών ενώσεων, οι οργανοκασσιτερικές (IV) ενώσεις έχουν αποκτήσει σημαντική προσοχή λόγω των ισχυρά αντικαρκινικών τους δράσεων και του διαφορετικού μηχανισμού δράσης σε σχέση με τη cisplatin ή τα παράγωγά της [4,118], καθώς και εξαιτίας του ανώτερου κυτταροστατικού και τοξικολογικού προφίλ που εμφανίζουν σε σύγκριση με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα όπως η καρβοπλατίνη (carboplatin), η 5-φθοριοουρακίλη (5-fluorouracil), και η δοξορουβικίνη [118]. Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις έχει βρεθεί πως είναι λιγότερο τοξικές σε σχέση με τη cisplatin [120]. Άλλες μεταλλικές ενώσεις περιέχουν μέταλλα της κύριας ομάδας όπως το γάλλιο, το γερμάνιο, και το βισμούθιο, μέταλλα της πρώτης σειράς μετάπτωσης όπως το τιτάνιο, το βανάδιο, το νιόβιο, το μολυβδένιο και το ρήνιο, και της τελευταίας μεταπτώτικης σειράς, όπως το ρουθένιο, το ρόδιο, το ιρίδιο, ο λευκόχρυσος, ο χαλκός και ο χρυσός [116].

Η cisplatin προσδένεται στο DNA δημιουργώντας διασυνδέσεις [4], ενώ τα οργανοκασσιτερικά μπορούν να προσδένουν τόσο στις βάσεις του DNA όσο και στα οξυγόνα των φωσφορικών ομάδων της διπλής έλικας [4,115], οδηγώντας σε εναλλακτικά θεραπευτικά πρωτόκολλα που παρουσιάζουν πλεονέκτημα τόσο ως προς την χαμηλότερη τοξικότητα και την αντίσταση που προκαλείται στη cisplatin [4]. Ωστόσο η αντικαρκινική δράση των ενώσεων Sn(IV) μπορεί να μην οφείλεται στην άμεση αλληλεπίδραση τους με τα συστατικά του DNA, έτσι θα μπορούσε να ελεγχθεί η αλληλεπίδρασή τους με ένζυμα όπως η λιποξυγονάση [109].

Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις έχουν εφαρμοστεί έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών λευχαιμίας ποντικού (P388 και L1210) [4,115,121], καθώς επίσης και έναντι διαφορετικών ομάδων ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών [4,105,112,115,117,122]. Τα οργανοκασσιτερικά (IV) σύμπλοκα θα μπορούσαν να σχεδιαστούν με ελκυστικές ιδιότητες όπως η αυξημένη υδατοδιαλυτότητα, η μικρότερη γενική τοξικότητα από τα φάρμακα του λευκοχρύσου, με καλύτερη απομάκρυνση από το σώμα, με λιγότερες παρενέργειες και χωρίς εμετογένεση [115]. Το πιο σημαντικό είναι πως αυτά τα σύμπλοκα δεν αναπτύσσουν την ανοχή του όγκου στο φάρμακο που είναι καλά εδραιωμένη για τη cisplatin και τα ανάλογά της [115].

Η βιολογική δραστηριότητα των οργανοκασσιτερικών ενώσεων είναι γνωστή για πάνω από 100 χρόνια και για περισσότερο από 80 χρόνια είναι γνωστό πως εμποδίζουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων [98,117,123]. Ο λευκόχρυσος και ο κασσίτερος έχουν κοινές ιδιότητες (π.χ. οι πιθανές οξειδωτικές καταστάσεις), έτσι οι ενώσεις του κασσιτέρου ελέγχθηκαν από το 1980 [121], αν και η τοξικότητα τους αναφέρθηκε αρχικά το 1886 [83]. Συγκεκριμένα πολλά οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα κατέχουν ενδιαφέρουσα αντικαρκινική δράση και το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (National Cancer Institute, NCI) έχει ελέγξει

περισσότερες από 2000 ενώσεις με κασσίτερο, οι περισσότερες που έχουν ελεγχθεί και φέρουν μέταλλο [83,98,117,123]. Τα πρώτα ενεργά *in vitro* σύμπλοκα σχεδιάστηκαν ώστε να θυμίζουν τον σκελετό της cisplatin ή των παραγώγων της, καρβοπλατίνη και παραπλατίνη (paraplatin) [83,121], αλλά έδειξαν διάφορα μειονεκτήματα, όπως χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, χαμηλή δραστηριότητα και υψηλή τοξικότητα *in vivo* [83].

Πρόσφατα διοργανοκασσιτερικές ενώσεις ελέγχθηκαν για την αντικαρκινική τους δράση [94,121], και βρέθηκε να έχουν καλή έως υψηλή κυτταροτοξικότητα κατά διαφόρων ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών και πολλές φορές καλύτερη και από αυτή της cisplatin [19,101,104,124].

Γενικά, η βιοχημική δραστηριότητα των οργανοκασσιτερικών ενώσεων επηρεάζεται από τη δομή των ενώσεων που προκύπτουν και από τη φύση και τον αριθμό των οργανικών ομάδων που συνδέονται με τον κασσίτερο [19,121]. Επομένως, η επιλογή του προσδέτη είναι επιτακτική για τις βιολογικές δράσεις των οργανοκασσιτερικών ενώσεων, όπως η διαλυτότητα και η βιοδιαθεσιμότητα [19,119]. Μια συνετή επιλογή προσδέτη όχι μόνο μπορεί να ελαχιστοποιήσει τα μειονεκτήματα, αλλά μπορεί να ενισχύσει ή να διαμορφώσει τη δράση των ενώσεων, καθώς ο προσδέτης παίζει βασικό ρόλο στη μεταφορά και την κατεύθυνση του μορίου στην περιοχή στόχο, όπως π.χ. σε έναν όγκο [19].

Από τις πρώτες οργανοκασσιτερικές ενώσεις που αναφέρθηκε ότι εμφανίζουν αντικαρκινική δράση είναι τα οργανοκασσιτερικά οξείδια (R_2SnO), διοργανοκασσιτερικά υδροξείδια ($R_2Sn(OH)X$), διστανοξάνες ($[(XR_2Sn)_2O]$) και τα δι-μέθυλ-καρβονυλμεθοξείδια ($[(R_2Sn(CH_2COMe)_2]$). Μια ακόμα τάξη που έχει δράση ενάντια στη P388 λευχαιμία έχει γενικό τύπο $R_2SnX_2L_2$, όπου το L_2 είναι συνήθως ένας διδοτικός προσδέτης με δότη άτομο οξυγόνο ή άζωτο [85]. Αυτές οι ενώσεις έχουν οκταεδρική διάταξη [85]. Ο διδοτικός χαρακτήρας της

L2 ένωσης έχει μια *cis* διάταξη των 2 ατόμων χλωρίου. Η μεγαλύτερη δραστικότητα σχετίζεται με αυτόν τον δομικό τύπο ο οποίος είναι ανάλογος της *cisplatin* [85].

Η βιοενεργότητα των συμπλόκων με διοργανοκασσιτερικά αλογονίδια έχει αναφερθεί από τους Crowe το 1980 και τους Saxena και Huber το 1989 [4]. Επιπλέον, ο M. Gielen έχει δείξει κάποια αποτελέσματα αντικαρκινικών ενώσεων με βάση τον κασσίτερο και βρήκε πως η αντικαρκινική δράση *in vitro* κάποιων δι-*n*-βουτυλκασσιτερικών, δι-*t*-βουτυλκασσιτερικών και διφαινυλο-κασσιτερικών 2,6 πυριδινοδικαρβοξυλικών συμπλόκων είναι καλύτερη από της *cisplatin* ενάντια στις καρκινικές σειρές WiDr (καρκίνος του εντέρου) και MCF-7 (καρκίνος του μαστού), δείχνοντας πως οι R ομάδες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντικαρκινική δράση των οργανοκασσιτερικών [4,111].

Η πρώτη οργανοκασσιτερική ένωση ελέγχθηκε για την αντικαρκινική της δράση το 1929 [105,112,122], ενώ το 1972 αποδείχθηκε πως το οξικό άλας του τριφαινυλοκασσιτέρου καθυστέρησε την ανάπτυξη καρκίνου στα ποντίκια [105,112,117,122]. Αρκετά οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα εμφανίζουν υψηλή αντιπολλαπλασιαστική δράση *in vitro* έναντι μιας ποικιλίας στερεών και αιματολογικών καρκίνων. Επιπλέον έχουν μελετηθεί εκτενώς οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα με προσδέτες καρβοξυλικά, θειολικά και διθειοκαρβαμιδικά [117].

Έρευνες για την περιεκτικότητα του κασσιτέρου σε διάφορα όργανα οδήγησε τον Cardarelli και τους συνεργάτες του να υποθέσουν πως οι διαλυτές οργανοκασσιτερικές ενώσεις διαφόρων τύπων που εισέρχονται στο σώμα συγκεντρώνονται στον θύμο αδένα [105]. Έπειτα ο κασσίτερος τροποποιείται σε ένα ή περισσότερα βιοχημικά στοιχεία που δρουν ως αντικαρκινογόνα ή/και αντιογκογόνα [105]. Η απομόνωση και η αξιολόγηση των θυμικών εκχυλισμάτων έδειξε πως τα άγνωστα αντιογκογονικά βιοχημικά που φέρουν κασσίτερο είναι στεροειδούς φύσης [105]. Αυτά τα στεροειδή κασσιτέρου, και πιθανώς τα πεπτίδια που παράγονται από τον θύμο, είναι πολυλειτουργικά και δρουν ως ορμόνες στην καταστολή της

ογκογένεσης [105]. Έτσι με βάση αυτή την υπόθεση ο Cardarelli και οι συνεργάτες κατοχύρωσαν με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας αρκετές οργανοκασσιτερικές ενώσεις στεροειδών που εμφανίζουν έντονη αντικαρκινική δράση [105]. Ωστόσο, δεν κατέστη δυνατό να γίνουν συσχετίσεις δομής-δράσης καθώς τα περισσότερα από τα δείγματα που ελέγχθηκαν περιείχαν μία ή περισσότερες μονάδες που φέρουν κασσίτερο [105].

Έχουν παρασκευαστεί πολλά οργανοκασσιτερικά παράγωγα με καρβοξυλικά και δι-καρβοξυλικά οξέα [121]. Είναι εύκολο να παρασκευαστούν αναμιγνύοντας ένα αδιάλυτο πολυμερές δι-οργανοκασσιτερικό οξείδιο και ένα καρβοξυλικό οξύ σε ένα διαλύτη, όπως το τολουόλιο, όπου το νερό που σχηματίζεται απομακρύνεται με αζεοτροπική απόσταξη [121]. Τα παράγωγα που προκύπτουν εξαρτώνται από την αναλογία κασσιτέρου/COOH. Όταν χρησιμοποιείται 1:2 αναλογία σχηματίζεται δι-οργανοκασσιτερικό δικαρβοξύλιο [121]. Σε αντίθεση η αναλογία 1:1 δίνει τετραοργανοδικαρβοξυλικά-διστανοξανικά διμερή (tetraorganodicarboxylatodis-tannoxane dimers) [121]. Η επιρροή του οργανικού τμήματος στην αντικαρκινική δράση ελέγχθηκε για διάφορα δι-οργανοκασσιτερικά καρβοξυλικά σύμπλοκα, ενώ είναι ήδη γνωστό στη βιβλιογραφία πως έχει αποδειχθεί αδρανής η ένωση του διμέθυλο-κασσιτέρου [121].

Αυτές οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις έχουν μικρότερη τοξικότητα, μεγαλύτερη απομάκρυνση από το σώμα και λιγότερες παρενέργειες συγκριτικά με τα φάρμακα του λευκοχρύσου [111]. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό τους είναι πως τα δεν αναπτύσσεται ανοηκτικότητα σε αυτά και δείχνουν μικρότερη τοξικότητα [111].

Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις είναι υποψήφιες για τη χημειοθεραπεία κατά του καρκίνου επάγοντας βιοχημικά αυτοφαγικές, αποπτωτικές και αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες [97,99,104]. Η απόπτωση των κυττάρων από τα οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα προκαλείται είτε με την επέμβαση τους στις κυτταρικές οδούς οξειδοαναγωγής (συσσώρευση

ROS), είτε με τη διατάραξη της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, την ενεργοποίηση του αποπτωτικής οδού των κασπασών και την αλληλεπίδρασή τους με το DNA [111,114]. Η πρόσδεση στο DNA μπορεί να γίνει είτε από τις αζωτούχες-ομάδες των βάσεων, είτε από τις φωσφορικές ομάδες στον σκελετό του DNA οδηγώντας στην απελίκωση του [4,83,119]. Έχει αποδειχθεί πως τα $[SnR_n]_{(4-n)}$ ($n=2$ ή 3) μπορούν να προσδένουν σε μεμβρανικές πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες ή σε κυτταρικές πρωτεΐνες [115]. Επίσης έχει προταθεί ότι τα οργανοκασσιτερικά μπορούν να προσδένονται στις θειολικές ομάδες των πρωτεϊνών και να αλλάζουν τη δομή τους [83,113]. Η αναστολή ενζύμων από τα οργανοκασσιτερικά, όπως η λιποξυγονάση, ένα ένζυμο που παίρνει μέρος στην ογκογένεση [119], έχει βρεθεί να συμφωνεί και με την αντικαρκινική τους δράση [111,113]. Επιπλέον οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις μπορούν να προωθήσουν το οξειδωτικό στρες καθώς και την υπεροξείδωση των λιπιδίων της κυτταρικής και μιτοχονδριακής μεμβράνης [113].

Η δράση τους, επιπλέον, μπορεί να συμβαίνει μέσω της παρέμβασης σε ένζυμα όπως είναι η αρωματάση ένα ένζυμο που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση των οιστρογόνων [111]. Το τελευταίο θα μπορούσε να εξηγήσει την επιλεκτικότητα που εμφανίζουν οι οργανοκασσιτερικές (IV) ενώσεις έναντι των καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7 (εξαρτώνται από ορμόνες) σε σχέση με τα καρκινικά κύτταρα του μαστού MDA-MB 231 (ανεξάρτητα από ορμόνες) [111].

Ωστόσο, όπως πολλοί από τους τυπικούς αντικαρκινικούς παράγοντες, η αποτελεσματικότητα και η εφαρμογή οργανοκασσιτερικών παραγώγων φαίνεται να περιορίζεται από τη μικρή υδατοδιαλυτότητά τους [124]. Ως εκ τούτου, η σύνθεση οργανοκασσιτερικών ενώσεων με μεγαλύτερη υδατοδιαλυτότητα είναι σημαντική [124], αν και η αντικαρκινική τους δράση μπορεί να οφείλεται στη σχετική λιποφιλικότητα μεταξύ των οργανοκασσιτερικών (IV) χαρακτηριστικών ομάδων [111].

Τα τρι-οργανοκασσιτερικά παράγωγα έχουν καλύτερη δράση από τα δι-οργανοκασσιτερικά ή μονο-οργανοκασσιτερικά παράγωγα, με τα τετρα-άλκυλ-κασσιτερικά να είναι πολύ τοξικά σε διάφορα είδη συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου [4,107,114], και μεταξύ των τρι-υποκατεστημένων αυτά που φέρουν φαίνυλο-ομάδες είναι πιο δραστικά [4,111]. Ωστόσο τα πολυμερικά τρι-οργανοκασσιτερικά παράγωγα έχει βρεθεί να επιδεικνύουν την ισχυρότερη δράση [111].

Οι Huber και Saxena έδειξαν πως, όσον αφορά στη δράση βάση της διάταξής τους στον χώρο, τα τετραεδρικά έχουν την ισχυρότερη δράση σε σχέση με αυτά που φέρουν διάταξη τριγωνικής δι-πυραμίδας, και αυτά με τη σειρά τους πιο ισχυρά από αυτά με οκταεδρική γεωμετρία [111]. Γενικά η τοξικότητα των οργανοκασσιτερικών ενώσεων φαίνεται να αυξάνει με την αύξηση στο μήκος της αλυσίδας των άλκυλο-ομάδων, που είναι πιο δραστικά από τα άρυλο-, και έχουν την εξής σειρά $R_3Sn > R_2Sn > RSn$ [4,83]. Επιπροσθέτως, η ανασταλτική δράση αυξάνεται με τη σειρά $Et < Bu < Ph$, υποδηλώνοντας ότι η τοξικότητα των οργανοκασσιτερικών (IV) ενώσεων σχετίζεται στενά με την υδροφοβικότητα και τη λιποφιλικότητα των οργανικών ομάδων [107]. Έτσι στη δημιουργία ενός νέου αντικαρκινικού φαρμάκου θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η διαλυτότητα και η λιποφιλία του για να υπάρχει αποτελεσματικότητα [4,83].

Επιπλέον οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις θα πρέπει να έχουν διαθέσιμες θέσεις συντονισμού γύρω από το άτομο του κασσιτέρου και να έχουν χαμηλή υδρολυτική διάσπαση των Sn-άλκυλο (ή Sn-άρυλο) δεσμών [4], και γι' αυτό οι τρι-οργανοκασσιτερικές ενώσεις παρουσιάζουν δράση [111].

Ορισμένες οργανοκασσιτερικές ενώσεις αποτελούν υποσχόμενους αντικαρκινικούς παράγοντες, αλλά εμφανίζουν ποικίλες ανεπιθύμητες παρενέργειες και με διάφορους μηχανισμούς [109]. Ωστόσο δείχνουν ότι μερικές οργανοκασσιτερικές ενώσεις μπορεί να

είναι χρήσιμες στην υπερνίκηση της ανθεκτικότητας των φαρμάκων που σχετίζονται με οποιαδήποτε χημειοθεραπευτική αγωγή, και ειδικά με φάρμακα με βάση τα μέταλλα [109].

Ο σχεδιασμός νέων οργανοκασσιτερικών (IV) αντικαρκινικών παραγόντων που να είναι περισσότερο αποτελεσματικοί δυσχεραίνεται από την έλλειψη πληροφοριών σχετικά με τους κυτταρικούς στόχους αυτών των ενώσεων, τους μηχανισμούς δράσης τους και την τοξικότητά τους [4]. Επομένως, ένας ορθολογικός σχεδιασμός του σκελετού του προσδέτη που συντονίζεται με το οργανοκασσιτερίκο θραύσμα θα μπορούσε να προσδώσει επιθυμητά χαρακτηριστικά για την επίτευξη της ειδικής στόχευσης, να ρυθμίσει τη δραστηριότητα των συμπλόκων και να ελαχιστοποιήσει τη συστημική τους τοξικότητα [4]. Ο προσαρμοσμένος προσδέτης όχι μόνο θα μπορούσε να ελαττώνει την πιθανή τοξικότητα των μεταλλοφαρμάκων αλλά επίσης να μεταβάλλει σημαντικά την δραστηριότητα του μεταλλικού ιόντος και έτσι να επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την απορρόφηση και την παράδοση του συμπλόκου, και μερικές φορές, ακόμη και την ειδική αναγνώριση του στόχου [4].

Τις τελευταίες δεκαετίες εμφανίζει μεγάλο ενδιαφέρον η σύνθεση οργανοκασσιτερικών συμπλόκων που προέρχονται από φυσιολογικούς ενεργούς προσδέτες, όπως τα νουκλειικά οξέα, οι πουρίνες, οι β-λακταμικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες, τα αντιβιοτικά μακρολιδίων, τα στεροειδή, τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, οι υδατάνθρακες, οι πορφυρίνες και διάφορες βιταμίνες [118].

Εκτός από αλογονίδια (Cl^- , Br^-) ή ψευδοαλογονίδια (SCN^-), οι περισσότερες οργανοκασσιτερίκες ενώσεις περιέχουν κατάλοιπα καρβοξυλικού οξέος ως προσδέτη [112]. Τα τρι-οργανοκασσιτερικά καρβοξυλικά μπορεί να υπάρχουν σε μονομερείς ή πολυμερείς μορφές, ενώ τα δι-οργανοκασσιτερικά παράγωγα μπορεί να υπάρχουν ως δικαρβοξυλικά άλατα ή ως άλατα διστανοξάνης $[(\text{R}_2\text{SnOCOR}')_2\text{O}]$ και μπορούν να συσσωματωθούν περαιτέρω με διάφορους τρόπους που επηρεάζουν τόσο τη διαλυτότητα όσο και τη βιοδιαθεσιμότητά τους [112].

Τα καρβοξυλικά οργανοκασσιτερικά (IV) είναι μια σημαντική κατηγορία ενώσεων και έχουν λάβει αυξημένη προσοχή τα τελευταία χρόνια [91,125], καθώς έχουν δομική ποικιλομορφία που κυμαίνεται από μονομερή, διμερή, τετραμερή, ολιγομερή έως πολυμερή μοτίβα [125]. Τρεις παράγοντες εμπλέκονται στη σχέση δομής-δράσης για τα οργανοκασσιτερικά (IV) παράγωγα $R_nSnX_{4-n}(L)_x$: 1) η φύση της οργανικής ομάδας R, 2) του αλογονιδίου ή του ψευδοαλογονιδίου X και 3) του προσδέτη L [126]. Τα δι-οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα με σύνθεση $R_2SnCl_2.L$, μοιάζουν δομικά με τις δραστικές ενώσεις του λευκοχρύσου, όπως τη cisplatin και τη καρβοπλατίνη, και συνεπώς ένας μεγάλος αριθμός τέτοιων συμπλόκων έχει ελεγχθεί για αντικαρκινική τους δράση [126].

Οι πληροφορίες για τις δομές των οργανοκασσιτερικών καρβοξυλικών ενώσεων συνεχίζουν να συσσωρεύονται και, ταυτόχρονα, ανακαλύπτονται νέες εφαρμογές τέτοιων ενώσεων, οι οποίες είναι σχετικές με βιομηχανικές και ιατρικές εφαρμογές [91]. Όταν τα οργανοκασσιτερικά αλογονίδια διαλύονται σε νερό, το pH του διαλύματος μειώνεται δραματικά επειδή μετατρέπονται αργά σε οργανοκασσιτερικά υδροξείδια και κατόπιν σε οξείδια δις (τρι-οργανοκασσιτερικά) ή δι-οργανοκασσιτερικά. Αντιθέτως, τα δι- και τρι-οργανοκασσιτερικά καρβοξύλια δεν έχουν αυτό το μειονέκτημα και γενικά παραμένουν άθικτα στο νερό για μεγάλα χρονικά διαστήματα [104]. Αυτό το είδος ενώσεων έχει βρεθεί ότι είναι δραστικό προς ένα αριθμό καρκινικών κυττάρων [92,100,117,124].

Πραγματοποιήθηκαν επίσης αρκετές προσπάθειες για τη σύνθεση τριφαινυλκασσιτερικών καρβοξυλικών ενώσεων τροποποιώντας το καρβοξυλικό τμήμα με βιολογικά δραστικές καρβοξυλικές μονάδες και επίσης ενσωματώνοντας λιπόφιλες/υδρόφιλες ιδιότητες σε αυτές, αφού οι λιπόφιλες ιδιότητες είναι απαραίτητες για να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, ενώ οι υδρόφιλες για να γίνουν αποδεκτές από το πλούσιο σε νερό κύτταρο [104]. Η ελπιδοφόρα εξέλιξη στην έρευνα για αντικαρκινικές οργανοκασσιτερικές ενώσεις έχει επιτευχθεί με ορισμένα τριφαινυλοκασσιτερικά (IV) καρβοξυλικά, όπως τα 3,6-

διοξαεπτανοϊκό και 3,6,9-τριοξαδεκανοϊκό, το 4-καρβοξυβενζο-15-κορώνα-5- και το 4-καρβοξυβενζο-18-κορώνα-6, το στεροειδο-καρβοξυλικό και το τερεβικό (terebates) [104]. Τα αποτελέσματα τέτοιων δοκιμών έδειξαν ότι αυτές οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις που περιέχουν οξυγόνο είναι ακόμη πιο αποτελεσματικές από τη cisplatin [100], και έτσι έχουν αναδειχθεί ως δυνητικά βιολογικώς δραστικές ενώσεις μεταξύ μεταλλοφαρμακευτικών χημειοθεραπευτικών ουσιών εκτός από του λευκοχρύσου [102,117]. Εμφανίζουν επίσης αντικαρκινικές δράσεις με πολύ υψηλότερη δράση από τις κλινικώς χρησιμοποιούμενες ενώσεις αναφοράς όπως η cisplatin, η δοξορουβικίνη και η μεθοτρεξάτη [99,125]. Τα οργανοκασσιτερικά καρβοξυλικά συνήθως παρουσιάζουν την υψηλότερη κυτταροτοξική δράση έναντι ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών σε αντίθεση με τις ενώσεις οργανοκασσιτέρου (IV) με υποκαταστάτες θειολικά ή διθειοκαρβαμιδικά [111].

Ακόμα κάποια οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα που φαίνεται να έχουν θεραπευτική δράση είναι με βάσεις του Schiff που προέρχονται από αμινοξέα [104]. Οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα με φαίνυλο-προπιονικά και άλλα με πεντανοϊκό σκελετό έχει βρεθεί να είναι πιο δραστικά από τη cisplatin [104].

Ένας μεγάλος αριθμός οργανοκασσιτερικών καμφορικών εστέρων, στεροειδοκαρβοξυλικών και καρβοξυλικών που περιέχουν το τμήμα του πολυοξαλκυλίου και ως εκ τούτου είναι διαλυτά στο νερό έχουν αναφερθεί από τον Gielen και τους συνεργάτες του και η κυτταροτοξικότητά τους μελετήθηκε σε υδατικά μέσα κατά αρκετών ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών [83].

Στην περίπτωση οργανοκασσιτερικών-θειοαμιδικών συμπλόκων που μελετήθηκαν, την υψηλότερη κυτταροτοξική δράση φαίνεται να έχει το έξα-συντονισμένο $\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{cmbzt})_2$ σύμπλοκο, το οποίο έχει λιγότερες ελεύθερες θέσεις συντονισμού, ενώ οι αποστάσεις των δεσμών Sn-S και Sn-N είναι βραχύτερες από εκείνες που βρίσκονται στα τριorganοκασσιτερικά σύμπλοκα. Τα οργανοκασσιτερικά-θειοαμιδικά σύμπλοκα επίσης

αναστέλλουν έντονα την υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος από το ένζυμο λιποξυγονάση (LOX), ένα ένζυμο που εμπλέκεται στον μηχανισμό της φλεγμονής και της ογκογένεσης [109], ενώ υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ της αναστολής της LOX και της κυτταροτοξικής δράσης αυτών των συμπλοκών [114]. Επομένως παρατηρείται πως η οργανική ομάδα R, ο προσδέτης L, ο αριθμός των ατόμων κασσιτέρου καθώς και ο αριθμός των διαθέσιμων θέσεων συντονισμού που προσφέρονται, παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιπολλαπλασιαστική δράση των οργανοκασσιτερικών ενώσεων [114].

Ενώ το οργανοκασσιτερικό τμήμα είναι ζωτικής σημασίας για την κυτταροτοξικότητα, ο προσδέτης παίζει βασικό ρόλο στη μεταφορά του μορίου στον στόχο, αντισταθμίζοντας τις αλληλεπιδράσεις με βιομόρια [112]. Οι προσδέτες που περιέχουν θείο (το οποίο μπορεί να αντιπροσωπεύει ευρέως διαφορετικές χημικές δομές) φαίνονται κατάλληλοι, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις η αποχωρούσα ομάδα μπορεί να απελευθερώνεται αργά ώστε παρατηρηθεί δραστικότητα [112]. Πολλά θειολικά οργανοκασσιτερικά βρέθηκαν δραστικά έναντι κυττάρων σαρκώματος, καθώς επίσης παρεμπόδιζαν την επαγόμενη από τη λιποξυγονάση υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος [112].

Ο Yin και οι συνεργάτες του είχαν συνθέσει έξι δι-*n*-βουτυλοκασσιτερικά δισ-ετεροαρωματικά καρβοξυλικά και τα εξέτασαν *in vitro* έναντι της ανθρώπινης μαστικής καρκινικής κυτταρικής σειράς MCF-7 [83]. Είναι διαλυτά στο νερό και εμφανίζουν αρκετά υψηλή δραστικότητα, πολύ υψηλότερη από αυτή της cisplatin [83]. Επίσης ενώσεις δι- και τρι-οργανοκασσιτέρου που περιέχουν το ανιόν του 3-μαλεϊμιδοπροπιονικού οξέος έχουν αναφερθεί ότι παρουσιάζουν πολλά υποσχόμενη κυτταροτοξική δράση έναντι των κυττάρων καρκίνου του μαστού (MCF-7 και EVSA-T), του καρκίνου του εντέρου (WiDr), του καρκίνου των ωοθηκών (IGROV) και του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (M226) [83]. Επιπλέον έχει ελεγχθεί η κυτταροτοξικότητα μιας σειράς οργανοκασσιτερικών (IV) παραγώγων της *N*-μαλεοϋλγλυκίνης 19 και οργανοκασσιτερικών 2-μαλεϊμιδοπροπανοϊκών,

τα οποία εμφανίζουν *in vitro* δραστικότητα κατά επτά καρκινικών κυτταρικών σειρών [83]. Η χρήση του 2-μαλεϊμιδοπροπανοϊκού προσδέτη αυξάνει την υδροφιλία αυτών των συμπλοκών [83].

Έχει συντεθεί ένας αριθμός πολυαιθέρων προερχόμενος από πολυ(αιθυλενογλυκόλες) με κάλυμμα υδροξυλίου [109]. Αυτές οι ενώσεις επιπλέον, αντιπροσωπεύουν τις πρώτες υδατοδιαλυτές οργανοκασσιτερικές ενώσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και έχουν ισχυρή αντικαρκινική δράση κατά δυο καρκινικών κυτταρικών σειρών του παγκρέατος (AsPC-1, PANC-1) [109].

Διάφορα οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα με μια ποικιλία προσδετών όπως τα θειοαμίδια (2-μέρκαπτο-νικοτινικό οξύ, 2-μερκαπτο-βενζο-θειαζόλη 2-μερκαπτο-πυριδίνη και άλλες πυριδίνες) [18,94-95,127-130,136,140-142], διάφορες φαινόλες [18,113,131], το θειοβαρβιτουρικό οξύ [113,132,137-138], το οξικό οξύ [133], τα *o*- και *p*- υδροξυβενζοϊκά οξέα [134,139], το φλουφεναμικό οξύ [135], τα 3- και 4 μεθοξυφαινυλοξικά οξέα, το 2,5-διμέθυλο-3-φουροϊκό οξύ ή το 1,4-βενζοδιοξαν-6-καρβοξυλικό οξύ [115], την κυστεΐνη [143], διάφορα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα όπως το naproxen, piroxicam, και το tenoxicam [144-146,164], καθώς και πρόδρομα στη σύνθεση των οργανοκασσιτερικών ενώσεων (οξειδίων) [96], έδειξαν αντικαρκινική δράση ενάντια διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών και όλα έχουν καλύτερη δράση από τη cisplatin. Επιπλέον σε κάποια έχει μελετηθεί η ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης, της οξειδωσης του λινελαϊκού οξέος ή και η πρόσδεση τους στο DNA [94,96,127-128,130,132-134,164]. Τα σύμπλοκα με το θειοβαρβιτουρικό έδειξαν επιπλέον και εκλεκτικότητα έναντι του καρκίνου του μαστού θετικού σε υποδοχείς ορμονών [18,96,132]. Άλλες διάφορες οργανοκασσιτερικές συστάδες (organotin oxo-clusters) έχουν συντεθεί χωρίς να έχει διερευνηθεί η δράση τους [147].

Ο Marcel Gielen άρχισε την έρευνα για την αντικαρκινική δράση των οργανοκασσιτερικών ενώσεων γύρω στο 1980 και η περισσότερη εργασία του έχει

κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας [111,114]. Η ομάδα του συνέθεσε πλήθος οργανοκασσιτερικών ενώσεων με προσδέτες όπως το 2,3-διφθοροβενζοϊκό [148-149], το 4-μονοφθοροβενζοϊκό [148-149], το πενταφθοροβενζοϊκό [150], το διυδροξύ-βενζοϊκό οξύ [3-μεθοξυσαλικυλικό οξύ 151-152], τα φαινολοξικά [150] και τα κιναιμικά [150]. Κάποιες από αυτές τις ενώσεις κατοχυρώθηκαν με διπλώματα ευρεσιτεχνίας [149,152] και περεταίρω ελέγχθηκαν για την αντικαρκινική τους δράση που είναι καλύτερη από της cisplatin.

Το ανάλογο της καρβοπλατίνης με δι-*n*-βουτυλοκασσίτερο συντέθηκε και ελέγχθηκε κατά των MCF-7 και WiDr, δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών ανθρώπινης προέλευσης [121]. Βρέθηκαν τιμές ID₅₀ 63 και 121 ng/ml, ενώ οι τιμές για τη cisplatin είναι 600 και 967 ng/ml [121]. Ωστόσο αυτές οι δύο ενώσεις δεν μπορούν να συγκριθούν διότι, σε αντίθεση με τα παράγωγα της cisplatin, η ένωση του κασσιτέρου δεν είναι μονομερές [121]. Αντίθετα, είναι ένα πολυμερές στο οποίο μια καρβοξυλική ομάδα του κυκλοβούτυλο-δικαρβοξυλικού τμήματος συντονίζεται ως δισθενής προσδέτης σε ένα άτομο κασσιτέρου, ενώ το άλλο καρβοξυλικό τμήμα συνδέεται, επίσης ως δισθενής προσδέτης, σε ένα και στο επόμενο άτομο κασσιτέρου μια άπειρης πολυμερικής αλυσίδας [121].

3.4. Οργανοκασσιτερικές ενώσεις και στεροειδή.

Αρκετές οργανοκασσιτερικές ενώσεις με στεροειδές τμήμα έχουν συντεθεί και χρησιμοποιηθεί έναντι μιας πληθώρας καρκινικών κυτταρικών σειρών καθώς και συμπαγών όγκων και έχει βρεθεί ότι φέρουν αντικαρκινική δράση [153].

Οργανοκασσιτερικές ενώσεις που έχουν εγχυθεί σε αρουραίους φάνηκε ότι έχουν συγγένεια ως προς τους όγκους, ενώ άλλα στοιχεία της ίδιας περιοδικής ομάδας δεν το κάνουν [154]. Ως εκ τούτου, οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις έχουν προκαλέσει σημαντικό ενδιαφέρον και μελετώνται ως αντικαρκινικές [154]. Όπως έχει προταθεί, οι ενώσεις κασσίτερου που

προσλαμβάνονται από τα θηλαστικά, μεταβάλλονται στον θύμο αδένα σε αντιογκογονικά στεροειδή κασσίτερου τα οποία στη συνέχεια κυκλοφορούν είτε ως ορμονικοί παράγοντες είτε μεταφέρονται από T-κύτταρα σε όλο το σώμα [154]. Επιπλέον ορισμένα οργανοκασσιτερικά στεροειδή έχουν κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας ως αντineοπλασματικοί παράγοντες [154-156]. Τα οργανοκασσιτερικά στεροειδικά παράγωγα παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση *in vivo* σε ποντίκια, όπως για παράδειγμα το χολικό με τριφαινυλοκασσιτέρο που ελέγχθηκε κατά μεταμοσχευμένων καρκινικών τμημάτων (αδενοκαρκίνωμα μαστού) σε AK-1 ποντίκια που είναι επιρρεπή σε καρκίνο [85,155].

Έχει υποτεθεί ότι, στην καταστολή του όγκου, η στεροειδική κεφαλή μίας τέτοιας ένωσης επιτρέπει τη διείσδυση στη φωσφολιπιδική μεμβράνη και επακολούθως στην επίθεση κατά των μιτωτικών περιφερικών καρκινικών κυττάρων [154]. Οι στεροειδικοί προσδέτες σε αυτή την εργασία ήταν η χοληστερόλη και δεσοξυχολικό οξύ και τα οργανοκασσιτερικά παράγωγα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το τριφαινυλοκασσιτερικό χλωρίδιο, το διμεθοξείδιο του διμεθυλοκασσιτέρου και το υδροξείδιο του τριφαινυλοκασσιτέρου αλλά δεν ελέγχθηκαν για την αντικαρκινική τους δράση [154].

Έχει αναφερθεί ότι οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις με βάση τα στεροειδή, στις οποίες το άτομο κασσιτέρου συνδέεται με ένα στεροειδές τμήμα μέσω δεσμού άνθρακα-κασσιτέρου, παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση [157]. Παρομοίως, όταν το στεροειδές περιέχει έναν δεσμό Sn-O όπως σε δύο οργανοκασσιτερικά στεροειδοκαρβοξυλικά, το τριφαινυλοκασσιτερικό-χολικό και το τρι-*n*-βουτυλοκασσιτερικό-δεοξυχολικό, παρατηρήθηκε να έχουν αντineοπλασματική δράση έναντι ορισμένων καρκινικών μοντέλων [157]. Οι στεροειδείς προσδέτες σε αυτή την εργασία ήταν το 3α-, 12α-δεοξυχολικό, το 3α-λιθοξυχολικό, το 3α,7α-κενοδεσοξυχολικό, το δεϋδροξυχολικό και το 3α,7β-ουρσοδεοξυχολικό τα οποία αντέδρασαν με το οξικό άλας του τρι-*n*-βουτυλοκασσιτέρου, το υδροξείδιο του τριφαινυλοκασσιτέρου ή οξείδιο του δι-*n*-βουτυλοκασσιτέρου [157]. Όλες οι

ενώσεις απέτυχαν να παρέχουν μονοκρυστάλλο κατάλληλο για ανάλυση με περίθλαση ακτίνων X [157].

Τα αποτελέσματα του *in vitro* ελέγχου των παραπάνω ενώσεων, σε σύγκριση με μερικές ενώσεις αναφοράς που χρησιμοποιούνται κλινικά (cisplatin, καρβοπλατίνη, 5-φθοροουρακίλη, μεθοτρεξάτη, δοξορουβικίνη), έναντι επτά ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών (MCF-7 και EVSA-T, και οι δύο καρκίνου του μαστού, WiDr καρκίνος του εντέρου, IGROV καρκίνος των ωοθηκών, M19-MEL μελάνωμα, A498 καρκίνος νεφρού και H226, μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα) [157], έδειξε πως οι αντικαρκινικές δράσεις της ένωσης με τον δι-η-βουτυλοκασσίτερο βρίσκονται μεταξύ αυτών που χαρακτηρίζουν τη 5-φθοροουρακίλη και τη δοξορουβικίνη [157]. Οι δράσεις των υπόλοιπων τριοργανοκασσιτερικών ενώσεων είναι συγκρίσιμες με εκείνες της μεθοτρεξάτης ή της δοξορουβικίνης έναντι όλων των καρκινικών κυτταρικών σειρών, εκτός από την EVSA-T έναντι της οποίας είναι σημαντικά πιο δραστικές [157].

Μεταξύ των δι-και τρι-οργανοκασσιτερικών στεροειδοκαρβοξυλικών, τα τρι-οργανοκασσιτερικά στεροειδοκαρβοξυλικά παράγωγα είναι πιο ισχυρά από τα διμερή διστανοζάνια και φαίνεται ότι έχουν υψηλή *in vitro* κυτταροτοξικότητα, αν και η μικρή τους υδατοδιαλυτότητα παραμένει ένα μειονέκτημα που πιθανώς επηρεάζει τις *in vivo* ιδιότητές τους [158].

Η σειρά των στεροειδοκαρβοξυλικών είναι σαφώς μία από τις σημαντικότερες εξελίξεις στον τομέα της αντικαρκινικής δράσης [121]. Αμφότερες οι ενώσεις δι- και τρι-οργανοκασσιτέρου έχουν εξεταστεί, ενώ κάποια από αυτές έδειξε δράση έναντι του όγκου Colon 26 σε ποντίκια [121].

Φαίνεται ότι κατέχουν έντονη *in vitro* αντικαρκινική δράση, αλλά η διαλυτότητα εξακολουθεί να παραμένει ένα μειονέκτημα επηρεάζοντας έτσι τις *in vivo* ιδιότητες τους [121]. Για να καταστεί περισσότερο ευδιάλυτος αυτός ο τύπος ένωσης, σχεδιάστηκε μια

λιγότερο περίπλοκη δομή, που περιέχει και πάλι ένα τμήμα πέντε δακτυλίων και επίσης πολικούς υποκαταστάτες [121]. Αυτό οδήγησε, για παράδειγμα, στη σύνθεση των οργανοκασσιτερικών τερεβικών [121]. Τα οργανοκασσιτερικά τερεβικά βρέθηκαν να παρουσιάζουν υψηλή *in vitro* αντινεοπλασματική δραστικότητα [121].

Μεταξύ όλων, τα δι- και τρι οργανοκασσιτερικά τερεβικά και λιθοχολικά, που δοκιμάστηκαν έναντι μιας ομάδας επτά ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών, βρέθηκαν να είναι πολύ δραστικά και πιο ισχυρά από τη cisplatin με τιμές ID₅₀ στην περιοχή <3-134 ng/ml (<4.5- 245 nM) [112]. Και στις δύο περιπτώσεις, τα τριβούτυλο παράγωγα έδειξαν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από τα τριφαίνυλο και διβούτυλο παράγωγα. Παρόλα αυτά, αν και παρατηρήθηκε κάποια *in vivo* δράση του τριβουτυλοκασσιτερικού τερεβικού, αναφέρθηκε επίσης τοξικότητα [112].

B. Σκοπός.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η σύνθεση και η μελέτη νέων οργανοκασσιτερικών ενώσεων με μόρια που φέρουν στεροειδή σκελετό προκειμένου να ελεγχθεί η εκλεκτική δράση τους έναντι του καρκίνου του μαστού θετικού σε υποδοχείς ορμονών. Οι νέες ενώσεις αναμένεται να έχουν μεγαλύτερη δράση καθώς είναι γνωστή αφενός η οιστρογονομιμητική δράση των οργανοκασσιτερικών ενώσεων και αφετέρου η σχέση της δομής των οιστρογόνων με τον στεροειδικό σκελετό.

Η στοχευμένη θεραπεία έχει το πλεονέκτημα ειδικής στόχευσης των καρκινικών κυττάρων έναντι των υγιών και έχει κερδίσει έδαφος στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Ο καρκίνος του μαστού είναι καρκίνος που εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τη δράση των οιστρογόνων τα οποία βοηθούν στην ανάπτυξή του. Ο κασσίτερος και οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις είναι γνωστό πως έχουν οιστρογονομιμητική δράση και έτσι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού.

Με στόχο να ελέγξουμε αν η σύζευξη οργανοκασσιτερικών ενώσεων με οιστρογόνα θα έδινε καλύτερους αντικαρκινικούς παράγοντες που να είναι εκλεκτικοί έναντι των καρκινικών κυττάρων του μαστού, θα συντεθούν νέα σύμπλοκα με το χολικό οξύ (στεροειδικός σκελετός) και πέντε οργανοκασσιτερικά παράγωγα (τριβούτυλο-, τριφαίνυλο-, διφαίνυλο-, διβούτυλο- και διμέθυλο- οργανοκασσιτερικά παράγωγα). Τα σύμπλοκα αυτά θα χαρακτηριστούν με διάφορες μεθόδους (σημείο τήξης, φασματοσκοπία FT-IR, φασματοσκοπία UV-Vis, φασματοσκοπία ^1H , ^{13}C , ^{119}Sn -NMR, φασματοσκοπία Mössbauer, ανάλυση XRF, ανάλυση XRPD, Ατομική απορρόφηση, φασματομετρίες μάζας ESI-MS και HRMS) και έπειτα θα ελεγχθεί η δράση τους.

Θα ελεγχθεί περεταίρω η εκλεκτική αντικαρκινική τους δράση έναντι καρκινικών κυττάρων μαστού που φέρουν ή όχι υποδοχείς ορμονών (MCF-7 καρκινικά κύτταρα μαστού

με υποδοχείς ορμονών· MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού χωρίς υποδοχείς ορμονών). Επιπλέον θα ελεγχθεί η τοξικότητά τους τόσο *in vitro*, σε μια φυσιολογική κυτταρική σειρά (MRC-5, φυσιολογικοί ινοβλάστες πνεύμονος), όσο και η *in vivo* χρησιμοποιώντας ως μοντέλο το ζωντανό οργανισμό *Artemia salina* (γαρίδα άλμης). Στη συνέχεια θα ελεγχθεί και η γονοτοξικότητά τους, *in vitro* μέσω του πειράματος των μικροπυρήνων, και *in vivo* στο ζωντανό οργανισμό-μοντέλο *Allium cepa*.

Τέλος, θα μελετηθεί και ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο δρουν τα σύμπλοκα έναντι της ικανότητάς τους να αναστέλλουν το ένζυμο της λιποξυγονάσης (LOX), να προκαλούν την οξειδωση του λινελαϊκού οξέος απουσία ενζύμου, και να επιδρούν στο DNA. Η λιποξυγονάση είναι ένζυμο το οποίο βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και βοηθάει στη φλεγμονή και την εξέλιξη του καρκίνου και έτσι η αναστολή του θα βοηθούσε σε αναστολή της καρκινικής εξέλιξης. Επιπλέον το λινελαϊκό οξύ βρίσκεται τόσο στην κυτταρική όσο και μιτοχονδριακή μεμβράνη και έτσι η οξειδωσή του θα μπορούσε να οδηγήσει στη διατάραξη των μεμβρανών αυτών και άρα στον θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Η επίδρασή τους στο DNA θα δείξει αν αυτά τα σύμπλοκα οφείλουν τη δράση λόγω του εντοπισμού τους στον πυρήνα και στην αλληλεπίδρασή τους με το μόριο του DNA.

Γ. Πειραματικό μέρος.

Κεφάλαιο 4

4.1. Χημικό πειραματικό μέρος.

4.1.1. Σύνθεση της ένωσης Ph₃SnCA (1).

Σε 8 ml H₂O διαλύεται 0.5 mmol sodium cholate (CANa) (0.215 gr) και ο υποκαταστάτης αναδεύεται μέχρι να διαλυθεί. Σε 3 ml MeOH διαλύεται ποσότητα 0.5 mmol Ph₃SnCl (0.193 gr) και προστίθεται στο υδατικό διάλυμα. Αμέσως δημιουργείται ένα λευκό ίζημα το οποίο αφήνεται σε ανάδευση για 5 ώρες. Το λευκό ίζημα παραλαμβάνεται με διήθηση σε ηθμό από διηθητικό χαρτί και πλένεται 2 φορές με H₂O. Η ένωση ξηραίνεται και χρησιμοποιείται ως έχει.

Απόδοση: 86%.

Σημείο τήξης: 93-98° C (110° C).

Φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS): Βρέθηκε (m/z): 736 και υπολογίστηκε για [C₃₆H₅₀O₆SnK]⁺: 736.

Φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS): Βρέθηκε (m/z): 697 και υπολογίστηκε για [C₃₆H₅₀O₆SnH]⁺: 697.

IR (cm⁻¹): 3370 (br), 3068 (w), 3048 (w), 2976 (s), 2931 (s), 2865 (s), 1651 (vw), 1636 (w), 1625 (w), 1577 (w), 1573 (w), 1558 (vw), 1539 (vw), 1524 (s), 1480 (w), 1457 (vw), 1446 (vw), 1431 (s), 1405 (wbr), 1375 (m), 1334 (m), 1305 (m), 1256 (w), 1233 (vw), 1192 (m), 1155 (w), 1118 (w), 1075 (s), 1040 (m), 1025 (vw), 1021 (vw), 998 (m), 980 (m), 950 (m), 913 (m), 898 (vw), 857 (m), 853 (m), 812 (w), 793 (vw), 779 (w), 730 (vs), 726 (vs), 696 (vs), 659 (w), 611 (m), 559 (vw), 547 (vw), 536 (vw), 521 (wv), 503 (vw), 492 (vw), 473 (vw), 449 (s), 424 (w), 413 (vw), 402 (w).

$^1\text{H-NMR}$ (ppm): 7.85-7.71 (m, Ph-ring), 7.42-7.37 (m, Ph-ring), 4.30 (s, OH3) 4.04 (s, OH12), 3.97 (s, OH7), 3.73 (s, H12), 3.60 (s, H7), 3.17 (s, H3), 0.83-0.82 (d, H21), 0.80 (s, H19) 0.49 (s, 18) (d_6 -DMSO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm): 143.38 (^{25}C), 136.7 ($^{26,30}\text{C}$), 128.76 ($^{27,29}\text{C}$), 128.17 (^{28}C), 71.08 (C12), 70.51 (C3), 66.32 (C7), 46.46 (C17), 41.59 (C5), 41.40 (C14), 39.95 (C8), 39.85 (C4), 35.37 (C1), 35.07 (C20), 34.92 (C6), 33.05 (C23), 31.89 (C22), 30.05 (C2), 28.56 (C11), 27.35 (C16), 26.25 (C9), 22.88 (C15), 22.70 (C19), 16.95 (C21), 12.36 (C18) (d_6 -DMSO).

$^{119}\text{Sn-NMR}$: -257.39 (d_6 -DMSO).

Η ένωση αυτή είναι διαλυτή σε διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2), χλωροφόρμιο (CH_3Cl), ακετόνη, μεθανόλη (MeOH), ακετονιτρίλιο (MeCN) και διμεθυσουλφοξείδιο (DMSO).

4.1.2. Σύνθεση της ένωσης $n\text{-Bu}_3\text{SnCA}$ (2).

Σε 8 ml H_2O διαλύεται 0.5 mmol sodium cholate (CANa) (0.215 gr) και ο υποκαταστάτης αναδεύεται μέχρι να διαλυθεί. Σε 3 ml MeOH διαλύεται ποσότητα 0.5 mmol Bu_3SnCl (0.163 gr, 135 μl) και προστίθεται στο υδατικό διάλυμα. Αμέσως δημιουργείται ένα λευκό ίζημα, ελαφρώς κολλώδες, το οποίο αφήνεται σε ανάδευση για 5 ώρες. Το λευκό ίζημα παραλαμβάνεται με διήθηση σε ηθμό από διηθητικό χαρτί και πλένεται 2 φορές με H_2O . Η ένωση ξηραίνεται και χρησιμοποιείται ως έχει.

Απόδοση: 74%.

Σημείο τήξης: 60-73° C.

Φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS): Βρέθηκε (m/z): 699 και υπολογίστηκε για $[\text{C}_{36}\text{H}_{66}\text{O}_5\text{SnH}]^+$: 699.

Φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS): Βρέθηκε (m/z): 699 και υπολογίστηκε για $[\text{C}_{36}\text{H}_{66}\text{O}_5\text{SnH}]^+$: 699.

IR (cm⁻¹): 3357 (br), 2954 (s), 2921 (vs), 2866 (s), 2855 (s), 1621 (m), 1573 (s), 1545 (s), 1461 (m), 1442 (m), 1420 (w), 1401 (w), 1368 (w), 1364 (w), 1331 (w), 1316 (vw), 1301 (m), 1252 (w), 1234 (w), 1193 (m), 1155 (m), 1118 (m), 1078 (s), 1044 (s), 1014 (w), 1003 (w), 980 (s), 950 (s), 924 (vw), 913 (s), 898 (vw), 879 (vw), 857 (m), 812 (m), 793 (vw), 782 (w), 745 (w), 734 (vw), 693 (w), 665 (s), 611 (s), 592 (w), 559 (w), 544 (w), 525 (vw), 510 (vw), 503 (vw), 492 (vw), 469 (w), 454 (w), 436 (m), 413 (m), 400 (m).

¹H-NMR (ppm): 4.30 (s, OH-3), 4.08 (s, OH-12), 3.98 (s, OH-7), 3.77 (s, H-12), 3.60 (s, H-7), 3.17 (s, H-3), 1.57-1.51 (m, ²⁶CH₂-Sn), 1.29-1.23 (m, ²⁵CH₂-CH₂-Sn), 1.04-1.01 (t, ²⁷CH₂-CH₂-CH₂-Sn) 0.89-0.88 (d, H21), 0.86-0.83 (t, ²⁸CH₃-CH₂-CH₂-CH₂-Sn), 0.80 (s, H19), 0.57 (s, H18) (*d*₆-DMSO).

¹³C-NMR (ppm): 177.86 (C24), 71.12 (C12), 70.53 (C3), 66.33 (C7), 46.59 (C17), 45.81 (C13), 41.60 (C5), 41.45 (C14), 39.95 (C4), 39.83 (C8), 35.38 (C1), 35.16 (C20), 34.94 (C6), 34.45 (C10), 33.18 (C23), 32.14 (C22), 30.46 (C2), 28.60 (C11), 27.74 (²⁶C-Sn), 27.40 (C16), 26.56 (²⁷C-Sn), 26.28 (C9), 22.90 (C15), 22.70 (C19), 18.31 (²⁵C-Sn), 17.00 (C21), 13.73 (²⁸C-Sn), 12.37 (C18) (*d*₆-DMSO).

¹¹⁹Sn-NMR: -16.51 (*d*₆-DMSO).

Η ένωση αυτή είναι διαλυτή σε διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂), χλωροφόρμιο (CH₃Cl), ακετόνη, μεθανόλη (MeOH) και διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO).

4.1.3. Σύνθεση της ένωσης Ph₂Sn(CA)₂ (**3**).

Σε 8 ml H₂O διαλύεται 0.5 mmol sodium cholate (CANa) (0.215 gr) και ο υποκαταστάτης αναδεύεται μέχρι να διαλυθεί. Σε 3 ml MeOH διαλύεται ποσότητα 0.25 mmol Ph₂SnCl₂ (0.086 gr) και προστίθεται στο υδατικό διάλυμα. Αμέσως δημιουργείται ένα λευκό ίζημα το οποίο αφήνεται σε ανάδευση για 5 ώρες. Το λευκό ίζημα παραλαμβάνεται με διήθηση

σε ηθμό από διηθητικό χαρτί και πλένεται 2 φορές με H₂O. Η ένωση ξηραίνεται και χρησιμοποιείται ως έχει.

Απόδοση: 88%.

Σημείο τήξης: 277-286° C.

Φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS): Βρέθηκε (m/z): 1089 και υπολογίστηκε για [C₆₀H₈₈O₁₀SnH]⁺: 1089.

Φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS): Βρέθηκε (m/z): 1089 και υπολογίστηκε για [C₆₀H₈₈O₁₀SnH]⁺: 1089.

IR (cm⁻¹): 3344 (br), 3072 (w), 3048 (w), 2977 (s), 2932 (s), 2867 (s), 1715 (vw), 1685 (s), 1651 (vw), 1636 (vw), 1577 (w), 1558 (w), 1543 (m), 1510 (vw), 1472 (vw), 1446 (vw), 1431 (m), 1409 (vw), 1375 (m), 1364 (vw), 1338 (m), 1308 (br), 1297 (br), 1275 (w), 1252 (m), 1237 (vw), 1223 (vw), 1196 (s), 1174 (vw), 1155 (w), 1122 (m), 1077 (s), 1036 (s), 998 (m), 980 (s), 950 (s), 928 (w), 913 (s), 902 (vw), 898 (vw), 883 (vw), 857 (m), 853 (m), 808 (w), 793 (w), 779 (w), 729 (vs), 696 (vs), 659 (w), 637 (vw), 611 (m), 559 (vw), 547 (vw), 525 (vw), 503 (vw), 492 (vw), 480 (vw), 469 (w), 445 (s), 424 (w), 421 (vw), 413 (w), 402 (m).

¹H-NMR (ppm): 7.91-7.28 (m, Ph-ring), 4.31 (s, OH₃) 4.09 (s, OH₁₂), 3.99 (s, OH₇), 3.76 (s, H₁₂), 3.60 (s, H₇), 3.17 (s, H₃), 0.88-0.84 (d, H₂₁), 0.80 (s, H₁₉) 0.54 (s, H₁₈) (d₆-DMSO).

¹³C-NMR (ppm): 134.7 (²⁵C), 133.91 (^{26,30}C), 128.32 (^{27,29}C), 127.77 (²⁸C), 71.00 (C₃), 70.44 (C₁₂), 66.25 (C₇), 46.22 (C₁₇), 45.75 (C₁₃), 41.52 (C₅), 41.36 (C₁₄), 39.89 (C₄), 39.77 (C₈), 35.31 (C₁), 35.02 (C₂₀), 34.86 (C₆), 34.38 (C₁₀), 30.96 (C₂₂, C₂₃), 30.40 (C₂), 28.51 (C₁₁), 26.19 (C₉), 27.28 (C₁₆), 22.82 (C₁₅), 22.36 (C₁₉), 16.36 (C₂₁), 12.34 (C₁₈) (d₆-DMSO).

¹¹⁹Sn-NMR: -526.99 (d₆-DMSO).

Η ένωση αυτή είναι διαλυτή σε ακετόνη, μεθανόλη (MeOH), μερικώς στο ακετονιτρίλιο (MeCN), και διμεθυσουλφοξείδιο (DMSO).

4.1.4. Σύνθεση της ένωσης $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{CA})_2$ (**4**).

Σε 8 ml H_2O διαλύεται 0.5 mmol sodium cholate (CANa) (0.215 gr) και ο υποκαταστάτης αναδεύεται μέχρι να διαλυθεί. Σε 3 ml MeOH διαλύεται ποσότητα 0.25 mmol Bu_2SnCl_2 (0.076 gr) και προστίθεται στο υδατικό διάλυμα. Αμέσως δημιουργείται ένα λευκό ίζημα το οποίο αφήνεται σε ανάδευση για 5 ώρες. Το λευκό ίζημα παραλαμβάνεται με διήθηση σε ηθμό από διηθητικό χαρτί και πλένεται 2 φορές με H_2O . Η ένωση ξηραίνεται και χρησιμοποιείται ως έχει.

Απόδοση: 80%.

Σημείο τήξης: 133-141° C.

Φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS): Βρέθηκε (m/z): 1047 και υπολογίστηκε για $[\text{C}_{56}\text{H}_{96}\text{O}_{10}\text{SnH}]^-$: 1047.

Φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS): Βρέθηκε (m/z): 1049 και υπολογίστηκε για $[\text{C}_{56}\text{H}_{96}\text{O}_{10}\text{SnH}]^+$: 1049.

IR (cm^{-1}): 3342 (br), 2964 (s), 2927 (s), 2863 (s), 1715 (m), 1700 (m), 1685 (m), 1674 (w), 1651 (m), 1636 (w), 1625 (w), 1614 (w), 1606 (vw), 1599 (vw), 1592 (vw), 1577 (w), 1558 (s), 1543 (s), 1521 (m), 1506 (m), 1487 (m), 1472 (w), 1457 (m), 1446 (vw), 1435 (w), 1420 (w), 1398 (w), 1374 (m), 1364 (vw), 1338 (m), 1308 (m), 1293 (m), 1275 (w), 1252 (m), 1196 (m), 1155 (w), 1122 (w), 1076 (s), 1036 (s), 1014 (w), 998 (vw), 980 (m), 950 (m), 928 (vw), 913 (m), 902 (vw), 879 (w), 857 (m), 812 (w), 793 (vw), 779 (w), 730 (w), 685 (w), 667 (w), 659 (vw), 612 (m), 577 (vw), 566 (vw), 564 (vw), 547 (vw), 536 (vw), 521 (vw), 503 (w), 492 (w), 484 (vw), 473 (w), 458 (w), 447 vw 436 (w), 421 (m), 404 (m).

$^1\text{H-NMR}$ (ppm): 4.31-4.30 (d, OH3), 4.10 (d, OH12), 4.00-3.99 (d, OH7), 3.78 (s, H12), 3.60 (s, H7), 3.17-3.16 (d, H3), 0.92-0.91 (d, H21), 0.84-0.82 (t, $^d\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Sn}$), 0.80 (s, H19), 0.58 (s, H18) ($d_6\text{-DMSO}$).

^{13}C -NMR (ppm): 71.00 (C3), 70.42 (C12), 66.23 (C7), 46.28 (C17), 45.75 (C13), 41.51 (C5), 41.36 (C14), 39.89 (C4), 39.77 (C8), 35.29 (C1), 35.07 (C20), 34.96 (C6), 34.37 (C10), 31.22 (C22, C23), 28.60 (C2), 28.52 (C11), 27.31 (C16), 26.84 (^{26}C), 26.19 (^{27}C), 25.69 (C9), 22.83 (C15), 22.61 (C19), 16.87 (C21), 13.62 (^{28}C), 12.31 (C18) (d_6 -DMSO).

^{119}Sn -NMR: -305.58 (d_6 -DMSO).

Η ένωση αυτή είναι διαλυτή σε διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2), χλωροφόρμιο (CH_3Cl), ακετόνη, μεθανόλη (MeOH), και διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO).

4.1.5. Σύνθεση της ένωσης $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{CA})_2$ (5).

Σε 8 ml H_2O διαλύεται 0.5 mmol sodium cholate (CANa) (0.215 gr) και ο υποκαταστάτης αναδεύεται μέχρι να διαλυθεί. Σε 3 ml MeOH διαλύεται ποσότητα 0.25 mmol Me_2SnCl_2 (0.055 gr) και προστίθεται στο υδατικό διάλυμα. Αμέσως δημιουργείται ένα λευκό ίζημα το οποίο αφήνεται σε ανάδευση για 5 ώρες. Το λευκό ίζημα παραλαμβάνεται με διήθηση σε ηθμό από διηθητικό χαρτί και πλένεται 2 φορές με H_2O . Η ένωση ξηραίνεται και χρησιμοποιείται ως έχει.

Απόδοση: 92%.

Σημείο τήξης: 163-172° C.

Φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS): Βρέθηκε (m/z): 965 και υπολογίστηκε για $[\text{C}_{50}\text{H}_{84}\text{O}_{10}\text{SnH}]^+$: 965.

Φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS): Βρέθηκε (m/z): 965 και υπολογίστηκε για $[\text{C}_{50}\text{H}_{84}\text{O}_{10}\text{SnH}]^+$: 965.

IR (cm^{-1}): 3359 (br), 2977 (vw), 2922 (s), 2867 (w), 1715 (w), 1700 (m), 1685 (m), 1670 (w), 1651 (m), 1636 (w), 1625 (w), 1606 (vw), 1592 (vw), 1577 (vw), 1558 (m), 1539 (w), 1521 (m), 1510 (vw), 1487 (vw), 1472 (vw), 1459 (s), 1435 (m), 1420 (w), 1398 (w), 1375 (s), 1338

(w), 1319 (w), 1305 (w), 1249 (w), 1226 (w), 1200 (m), 1174 (vw), 1148 (vw), 1114 (vw), 1080 (s), 1047 (vw), 1032 (s), 1014 (m), 998 (w), 980 (s), 946 (s), 924 (w), 909 (m), 898 (vw), 875 (m), 853 (m), 812 (vw), 793 (m), 779 (vw), 745 (vw), 730 (vw), 711 (vw), 685 (vw), 667 (vw), 643 (s), 611 (m), 588 (w), 577 (vw), 566 (vw), 547 (w), 525 (vw), 503 (w), 492 (vw), 480 (vw), 469 (w), 462 (w), 458 (w), 447 (vw), 436 (vw), 421 (m), 402 (m).

¹H-NMR (ppm): 4.30 (s, OH3), 4.09 (s, OH12), 3.99 (s, OH7), 3.77 (s, H12), 3.60 (s, H7), 3.17 (s, H3), 0.91-0.90 (d, H21), 0.80 (s, H19), 0.65 (CH₃-Sn), 0.57 (s, H18) (*d*₆-DMSO).

¹³C-NMR (ppm): 71.01 (C12), 70.44 (C3), 66.26 (C7), 48.60 (C13), 46.24 (C17), 45.78 (C10), 41.52 (C5), 41.36 (C14), 39.87 (C4), 39.77 (C8), 35.31 (C1), 35.08 (C20), 34.87 (C6), 34.39 (C22), 31.24 (C23), 30.57 (C2), 28.95 (C11), 27.31 (C16), 26.20 (C9), 22.83 (C15), 22.62 (C19), 16.94 (C21), 12.35 (C18), 11.10 (²⁵C) (*d*₆-DMSO).

¹¹⁹Sn-NMR: -294.71 (*d*₆-DMSO).

Η ένωση αυτή είναι διαλυτή σε διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂) (ελαφρώς), χλωροφόρμιο (CH₃Cl) (ελαφρώς), ακετόνη, μεθανόλη (MeOH), και διμεθυσουλφοξείδιο (DMSO).

4.1.6. Σημείο τήξης.

Για την εύρεση του σημείου τήξεως των ενώσεων **1-5** χρησιμοποιήθηκαν τριχοειδή σωληνάκια BRIS micro haematocrit tubes (Soda Lime Glass, Vitrex Medical) και η συσκευή Melting Point SMP1-Bibbi, Stuart Scientific και η μέτρηση της θερμοκρασίας καταγράφηκε με τη χρήση ενός θερμομέτρου.

4.1.7. Διαλυτότητα.

Η διαλυτότητα των ενώσεων έγινε τοποθετώντας ισόποσα μικρή ποσότητα της κάθε ένωσης σε δοκιμαστικούς σωλήνες και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: *n*-hexane, toluene, CH₃Cl, CH₂Cl₂, ακετόνη, MeOH, MeCN, DMSO και H₂O.

4.1.8. Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR.

Οι ενώσεις **1-5** χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR (Fourier Transform-InfraRed) χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Cary 630 FTIR Spectrometer της Agilent.

4.1.9. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR).

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (¹H-NMR) των ενώσεων **1-5** πάρθηκαν σε δευτεριωμένο DMSO (*d*₆-DMSO) χρησιμοποιώντας το φασματόμετρο Bruker Avance 500 (500MHz). Επιπλέον ελέγχθηκε και η σταθερότητα των συμπλόκων σε διάλυμα στις 0 ώρες και μια εβδομάδα μετά. Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με το πρόγραμμα Mestrec23.

4.1.10. Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

Ο χαρακτηρισμός και η σταθερότητα (0 ώρες-1εβδομάδα) των ενώσεων **1-5** ελέγχθηκε και με φάσματα υπεριώδους-ορατού και ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε είναι η MeOH. Το φασματοφωτόμετρο στο οποίο πάρθηκαν τα φάσματα είναι το U.V. 1600PC Spectrometer VWR και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το M.Wave Professional 1.0.

4.1.11. Ατομική απορρόφηση.

Η μάζα του κασσιτέρου που περιέχεται στα σύμπλοκα ελέγχθηκε με ατομική απορρόφηση σε κλίβανο γραφίτη (GFAAS). Ζυγίστηκε ποσότητα από τις ενώσεις **1-5** και χωνεύθηκε σε 0.5 ml καθαρού νιτρικού οξέος πριν από την μέτρηση.

4.1.12. Φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (X-ray Fluorescence Spectroscopy, XRF).

Η μάζα του κασσιτέρου υπολογίστηκε και με φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων-X χρησιμοποιώντας μια ραδιο-ισοτοπική πηγή Am-241 με ακτινοβολία διέγερσης στα 59.5 keV.

4.1.13. Φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization Mass Spectrometry, ESI-MS).

Τα δείγματα των ενώσεων διαλύθηκαν σε 1 ml MeOH που περιείχε 0.01 % μυρμηγκικό οξύ (formic acid) και τα φάσματα πάρθηκαν στο φασματοφωτόμετρο LC-MS/MS Agilent 1100.

4.1.14. Φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (High Resolution Mass Spectrometry, HR-MS).

Δείγματα των ενώσεων διαλύθηκαν σε MeOH και πάρθηκαν τα φάσματα τους χρησιμοποιώντας το φασματογράφο ORBITRAP-LC-MS για τον προσδιορισμό του μοριακού τους θραύσματος.

4.1.15. Φασματοσκοπία Mössbauer.

Τα φάσματα Mössbauer ^{119}Sn πάρθηκαν σε θερμοκρασία δείγματος 80 K χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο σταθερής επιτάχυνσης εξοπλισμένο με πηγή $\text{Ca}^{119\text{m}}\text{SnO}_3$ διατηρούμενη σε θερμοκρασία δωματίου. Οι τιμές της ισομερούς μετατόπισης (isomer shift) των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των φασμάτων δίνονται σε σχέση με το SnO_2 σε θερμοκρασία δωματίου. Τα φάσματα Mössbauer καταγράφηκαν με σταθερή επιτάχυνση στο φασματοφωτόμετρο WissEl-Wissenschaftliche Elektronik GmbH (Starnberg, Germany).

4.2. Βιολογικό πειραματικό μέρος.

4.2.1. Συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων.

Οι τρεις κυτταρικές σειρές, 2 καρκινικές (MCF-7, MDA-MB-231) και μια φυσιολογική (MRC-5), αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο που παρέχει σταθερή θερμοκρασία 37° C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO_2 . Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε είναι το Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) το οποίο εμπλουτίζεται με ορό εμβρύου βοός (fetal bovine serum, FBS) σε αναλογία 10% (50 ml), με 1% (5 ml) από τα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη (100 $\mu\text{g/ml}$) και πενικιλίνη (100 IU/ml), και με το αμινοξύ L-γλουταμίνη (L-glutamine) (2.5 ml).

4.2.2. Συνθήκες ανακαλλιέργειας των κυττάρων.

Ανάλογα με τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων γίνεται ανακαλλιέργεια στα κύτταρα ανά ~3 μέρες αφήνοντας το 1/3 αυτών στο τρυβλίο. Η διαδικασία που ακολουθείται για την

ανακαλλιέργεια είναι η εξής: ● αφαίρεση του θρεπτικού από το τρυβλίο, ● ξέπλυμα των κυττάρων με διάλυμα Phosphate Buffer Saline (PBS) προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του θρεπτικού που έμεινε στο τρυβλίο, ● προσθήκη 1ml θρυψίνης 1x και επώαση στους 37° C για 3-5 λεπτά, προκειμένου να αποκολληθούν τα κύτταρα από το ταπήτιο του τρυβλίου. Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων με την επιφάνεια προσκόλλησής τους στο τρυβλίο, και για να δράσει απαιτείται πλήρης απομάκρυνση του θρεπτικού αλλιώς ο ορός που περιέχει την απενεργοποιεί. ● Τα κύτταρα ελέγχονται στο μικροσκόπιο και αν δεν έχουν αποκολληθεί τα βοηθάμε μηχανικά χτυπώντας ελαφρώς το τρυβλίο με το χέρι. ● Στη συνέχεια προστίθενται 5 ml από το θρεπτικό DMEM για να απενεργοποιηθεί το ένζυμο και το εναιώρημα κυττάρων αναδεύεται με την πιπέτα κυκλικά προκειμένου να αποκολληθούν τα εναπομείναντα κύτταρα. ● Τέλος κρατείται η επιθυμητή ποσότητα των κυττάρων, ενώ τα υπόλοιπα απορρίπτονται, και προστίθεται θρεπτικό DMEM μέχρι τελικό όγκο 7 ml.

4.2.3. Συνθήκες κρυοσυντήρησης των κυττάρων.

Προκειμένου να δημιουργηθεί μια τράπεζα κυττάρων επιλέγεται η κρυοσυντήρηση τους σε υγρό άζωτο (N₂) (-196° C). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η παρακάτω: ● τα κύτταρα αποκολλούνται από το τρυβλίο, τοποθετούνται σε σωληνάρια falcon των 15 ml και φυγοκεντρούνται στις 3000 στροφές για 7 min. ● Γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται με 950 μl FBS. ● Το παραπάνω κυτταρικό διάλυμα μεταφέρεται σε cryotubes που περιέχουν 50 μl DMSO, το οποίο είναι κρυοπροστατευτικό και εμποδίζει τους παγοκρυστάλλους που δημιουργούνται να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη. ● Τα cryotubes τοποθετούνται στους -80° C για 24 ώρες. Έπειτα μεταφέρονται σε δοχείο που περιέχει υγρό N₂, όπου και διατηρούνται για μακρά χρονικά διαστήματα.

Για την επανακαλλιέργεια των κυττάρων, τα κύτταρα μεταφέρονται από το υγρό N₂ και τοποθετούνται σε ζεστό νερό ώστε να ξεπαγώσουν και κατόπιν μεταφέρονται σε τρυβλίο που περιέχει θρεπτικό DMEM. Μετά από 24 ώρες γίνεται αλλαγή του θρεπτικού προκειμένου να απομακρυνθεί το DMSO καθώς, φυσιολογικά, είναι κυτταροτοξικό.

4.2.4. Μέθοδος εύρεσης κυτταροτοξικότητας μιας ουσίας *in vitro* με χρήση της Sulforhodamine B.

Προκειμένου να βρεθεί η κυτταροτοξική δράση μια ουσίας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της sulforodamine B (sulforodamine B assay, SRB). Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε το 1990 και παραμένει μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για έλεγχο της κυτταροτοξικότητας *in vitro*. Η SRB μπορεί να προσδένεται σε πρωτεϊνικά μέρη του κυττάρου τα οποία έχουν μονιμοποιηθεί με τρι-χλώρο-ακετικό οξύ (trichloroacetic acid, TCA). Είναι μια χρωστική αμινοξανθάνη με δύο θειολικές ομάδες οι οποίες μπορούν και προσδένουν σε βασικά αμινοξικά κατάλοιπα σε όξινες συνθήκες αλλά αποδεσμεύονται από αυτά σε βασικές συνθήκες [16,159]. Το πλεονέκτημα της χρωστικής είναι η υψηλή ευαισθησία και η χρώση των κυττάρων ανεξάρτητα από την μεταβολική τους κατάσταση [16,159]. Η έντονη χρώση της SRB επιτρέπει στη μέθοδο να εφαρμοστεί σε τρυβλίο με 96 βοθρία [159].

Η εύρεση της συγκέντρωσης μιας ουσίας που αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων στο 50% είναι σημαντική για να ελεγχθεί η κυτταροτοξική της δράση (Inhibitory Concentration 50%, IC₅₀). Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι ίδιο μέχρι την αποκόλληση των κυττάρων και την απενεργοποίηση του ενζύμου με θρεπτικό. Μετά γίνεται υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται στο τρυβλίο μέσω χρήσης της πλάκας Neubauer. Ο αριθμός των κυττάρων (N) που μετρείται επεξεργάζεται ως εξής: $(N/4) \times (5.8) \times (10^4)$, όπου 5.8 είναι τα ml της αραιώσης που πραγματοποιήθηκε και 4 είναι τα τετράγωνα της πλάκας. Μετά ανάλογα τον

αριθμό των κυττάρων που απαιτούνται μέσα σε κάθε βοθρίο από ένα τρυβλίο με 96 βοθρία (MCF-7, MDA-MB-231: 6000 κύτταρα/βοθρίο, MRC-5: 2000 κύτταρα/βοθρίο), λαμβάνεται ο κατάλληλος όγκος κυττάρων από την κυρίως καλλιέργεια, πραγματοποιείται η κατάλληλη αραιώση με θρεπτικό, και με την χρήση πολυπιπέτας διανέμονται στα βοθρία σε τελικό όγκο 100 μ l.

Τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες και κατόπιν γίνεται η προσθήκη των προς μελέτη ενώσεων. Από τα 96 βοθρία τα 12 χρησιμοποιούνται ως control, ενώ τα υπόλοιπα χωρίζονται ως διπλή επανάληψη μέχρι 6 ουσιών σε επτά συγκεντρώσεις σε τελικό όγκο 200 μ l. Οι ενώσεις διαλύονται σε DMSO με αρχική συγκέντρωση 10^{-2} M και στη συνέχεια αραιώνονται με θρεπτικό DMEM σε συγκέντρωση 10^{-4} - 10^{-7} M.

Η επώαση των κυττάρων με τις ουσίες γίνεται για 48 ώρες. Κατόπιν αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και προστίθεται κρύο διάλυμα τρι-χλωρο-ακετικού οξέος 10% (50 μ l/βοθρίο) και το τρυβλίο επωάζεται για 30 min στους 4° C. Ακολουθούν πλύσεις (5x) με διαβαθμισμένο όγκο δις-απεσταγμένου νερού (ddH₂O) και το τρυβλίο αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για ~24 ώρες ώστε να στεγνώσει.

Προστίθενται σε κάθε βοθρίο 70 μ l της χρωστικής SRB 0.4% w/v διαλυμένη σε διάλυμα 1% οξικού οξέος και το τρυβλίο επωάζεται για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν πλύσεις (5x) με διαβαθμισμένο όγκο διαλύματος οξικού οξέος 1%. Η προσδεμένη στα κύτταρα χρωστική διαλυτοποιείται με 200 μ l διαλύματος unbuffered Tris-Base 10 mM και η απορρόφηση μετρείται σε μηχανήμα Elisa (MMP-96 HiPo, Biosan) στα 540 nm. Κάθε πείραμα επαναλαμβάνεται τρεις φορές.

4.2.5. Έλεγχος της *in vitro* γονοτοξικότητας μιας ουσίας με την μέθοδο των μικροπυρήνων (Micronucleus assay).

Η παρουσία μικροπυρήνων (micronucleus, MN) στα κύτταρα είναι βιοδείκτης της μεταλλαξιογόνου, γονοτοξικής ή/και τερατογόνου επίδρασης μιας ουσίας. Παρουσία εξωγενών παραγόντων, όπως οι χημικές ουσίες, σχηματίζονται μικροπυρήνες στο στάδιο της μίτωσης κατά την μετάβαση από την μετάφαση στην ανάφαση. Εμφανίζονται στο κυτταρόπλασμα μεσοφασικών κυττάρων ως μικρά θραύσματα DNA προσκολλημένα στην μεμβράνη, καθώς μετά τη μίτωση δεν μπορούν να ενσωματωθούν στα θυγατρικά κύτταρα. Η μέθοδος των μικροπυρήνων χρησιμοποιείται ευρέως για τον έλεγχο γενετικών βλαβών σε διάφορους τύπους ιστών και κυττάρων. Προκειμένου να αποφευχθεί ο έλεγχος τοξικότητας ουσιών σε ζώα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανθρώπινες κυτταροκαλλιέργειες λόγω της μεγάλης ευαισθησίας που παρέχουν [16].

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι το εξής [16,162α]: ● τοποθετείται μια καλυπτρίδα σε κάθε βοθρίο σε ένα τρυβλίο με 6 βοθρία, και πάνω σε αυτή προστίθεται ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων (40000 κύτταρα MRC-5/βοθρίο) σε τελικό όγκο 3ml. Το τρυβλίο τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες. ● Την επόμενη μέρα προστίθεται η ουσία της οποίας η γονοτοξική δράση θα ελεγχθεί σε διπλή επανάληψη και αφήνεται για επώαση 48 ωρών. ● Αφαιρείται το θρεπτικό και κάθε βοθρίο ξεπλένεται με 1 ml PBS (3x). ● Προστίθεται σε κάθε βοθρίο 1 ml KCl 75 mM και το τρυβλίο επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. ● Ακολουθεί έκπλυση (3x) με 2 ml διαλύματος οξικού οξέος-αιθανόλης 1/3 v/v. ● Γίνεται έκπλυση (1x) με 2 ml μεθανόλης που περιέχει οξικό οξύ 1% v/v. ● Προστίθεται σε κάθε βοθρίο 2 ml από τη χρωστική acridine orange (50 µg/ml) διαλυμένη σε θρεπτικό DMEM και ακολουθεί επώαση στον επωαστικό κλίβανο για 15 min. ● Ακολουθεί έκπλυση (3x) με 1 ml PBS. ● Τέλος αφαιρείται η καλυπτρίδα από κάθε βοθρίο και τοποθετείται

ανάποδα πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και παρακολουθείται η ύπαρξη μικροπυρήνων σε μικροσκόπιο φθορισμού. Το ποσοστό εμφάνισης μικροπυρήνων μετρείται ανά 1000 κύτταρα.

4.2.6. Έλεγχος της *in vivo* γονοτοξικότητας μια ουσίας χρησιμοποιώντας τον οργανισμό μοντέλο *Allium cepa* (*Allium cepa* test).

Η μέθοδος *Allium cepa* (κρεμμύδι) δείχνει μεγάλη συσχέτιση με τα τεστ σε ζωικούς οργανισμούς-μοντέλα και χρησιμοποιείται ευρέως για να ελεγχθεί η κυτταροτοξική και μεταλλαξιογόνος δράση διαφόρων ουσιών. Είναι δοκιμή χαμηλού κόστους και είναι εύκολη στον χειρισμό, επιτρέποντας την αξιολόγηση διάφορων παραμέτρων όπως: • οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες, για τον εντοπισμό της γονοτοξικότητας, • ο μιτωτικός δείκτης και οι πυρηνικές ανωμαλίες, για έλεγχο της κυτταροτοξικότητας, και • οι μικροπυρήνες, για έλεγχο της μεταλλαξιογόνου δράσης μιας ουσίας. Οι βλάβες αυτές είναι δείκτης γονοτοξικής δράσης μιας ουσίας καθώς βλάβη στο DNA σε χρωμοσωμικό επίπεδο συμβάλλει στην καρκινογένεση. Οι κυτταροτοξική δράση μιας ουσίας μπορεί να ελεγχθεί από την αύξηση ή την μείωση του μιτωτικού δείκτη. Ο μιτωτικός δείκτης χαρακτηρίζεται ως η αναλογία μεταξύ των κυττάρων που βρίσκονται ή όχι σε μίτωση [17,160-161].

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι το παρακάτω [17,161-162α]: • τοποθετείται περίσσεια βολβών κρεμμυδιών (*Allium cepa*) σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 16 ml ddH₂O και επωάζονται για 48 ώρες σε κατάλληλες συνθήκες (25° C, 12 ώρες φως, 12 ώρες σκοτάδι, 50-60% υγρασία) ώστε να αναπτύξουν ρίζες. • Έπειτα επιλέγονται δύο βολβοί με το ίδιο μήκος ριζών για κάθε συγκέντρωση (control και 3 συγκεντρώσεις). Οι ενώσεις διαλύονται σε DMSO με αρχική συγκέντρωση 10⁻² M και οι τελικές συγκεντρώσεις υπολογίζονται σε τελικό όγκο 16 ml. Κατόπιν οι βολβοί αφήνονται να αναπτύξουν τις ρίζες τους παρουσία των ουσιών για ακόμα 48 ώρες στις ίδιες συνθήκες. • Ακολουθεί μονιμοποίηση των ριζών με

διάλυμα οξικού οξέος-μεθανόλης 1/3 v/v για 24 ώρες στους 4° C. Μετά την μονιμοποίηση οι βολβοί μπορούν να αποθηκευτούν σε διάλυμα αιθανόλης 70%.

Προκειμένου να παρατηρηθούν τα κύτταρα του μεριστοματικού άκρου των ριζών του *Allium cepa* ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: ● αφαιρούνται 6-8 ρίζες περίπου ίδιου μήκους από κάθε βολβό και τοποθετούνται σε διάλυμα HCl 6N για 5 min στους 37° C ώστε να υδρολυθούν. ● Κατόπιν αφαιρείται το HCl και οι ρίζες ξεπλένονται με H₂O για 1 min. ● Έπειτα οι ρίζες τοποθετούνται σε erpendorf που περιέχει την χρωστική βάση του Schiff και επωάζονται με αυτή για 40-70 min στους 37° C. ● Ακολούθως αφαιρούνται οι ρίζες από την χρωστική και τοποθετούνται σε erpendorf που περιέχει διάλυμα οξικού οξέος 45% v/v/ μέχρι να τις επεξεργαστούμε. ● Κάθε ρίζα τοποθετείται πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και με την χρήση μια λεπίδας αποκόπτεται το μεριστοματικό της άκρο (1-2 mm) καθώς είναι αυτό που πολλαπλασιάζεται και έτσι θα είναι εμφανής η επίδραση της ουσίας. ● Προστίθενται λίγες σταγόνες από το διάλυμα του οξικού οξέος μέσα στο οποίο βρίσκονται οι ρίζες, και τοποθετείται μια καλυπτρίδα πάνω από κάθε μεριστοματικό άκρο. Πιέζεται καλά η καλυπτρίδα με τη σβήστρα ενός μολυβιού προκειμένου να χωριστεί το μεριστοματικό άκρο σε μονά κύτταρα. ● Τέλος κάθε ρίζα παρατηρείται σε οπτικό μικροσκόπιο και γίνεται λήψη βίντεο χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ISCapture και την κάμερα Tuscen Camera.

Γίνεται λήψη βίντεο για τουλάχιστον 6 ρίζες από κάθε συγκέντρωση και το control και από τους δύο βολβούς συνολικά. Έπειτα τα βίντεο επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Free Video to JPEG Converter (DVDVideoSoft) προκειμένου να μετατραπούν σε εικόνες για την περεταίρω επεξεργασία τους. Από κάθε ρίζα ελέγχονται περίπου 300 κύτταρα καταγράφοντας τις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

4.2.7. Έλεγχος της *in vivo* τοξικότητας μιας ουσίας χρησιμοποιώντας τον ζωντανό οργανισμό μοντέλο *Artemia salina*.

Η δοκιμή θνησιμότητας στον ζωντανό οργανισμό *Artemia salina* (γαρίδα άλμης) είναι μια από τις αρχικές δοκιμές τοξικότητας που μπορούν να γίνουν και είναι χρήσιμη για την πρόβλεψη διάφορων βιολογικών δράσεων των προς μελέτη ουσιών, όπως κυτταροτοξικές, φωτοτοξικές και παρασιτοκτόνες. Επομένως οι φαρμακολογικές δράσεις διαφόρων βιοδραστικών ουσιών μπορούν να ελεγχθούν με τη δοκιμασία θνησιμότητας της γαρίδας άλμης. Αυτό οφείλεται στην ευρεία κατανομή τους, τον μικρό κύκλο ζωής που έχουν, τον μη εκλεκτικό τρόπο ανάπτυξης και την ευαισθησία τους σε τοξικές ουσίες [162β].

Το πρωτόκολλο της δοκιμασίας αυτής είναι το εξής [162β]: ● ποσότητα 1 gr από τα αυγά της γαρίδας άλμης ενυδατώνονται με φρέσκο H₂O για περίπου μια ώρα μέσα σε ένα εκχυλιστικό χωνί. Οι συνθήκες θαλασσινού νερού προσομοιάστηκαν με την διάλυση 17 gr θαλασσινού αλατιού σε 500 ml απεσταγμένου H₂O. ● Το δοχείο ανάπτυξής τους εξοπλίζεται με συνεχή παροχή φρέσκου αέρα σε θερμοκρασία δωματίου και συνεχή παρουσία φωτός. Αφήνονται σε αυτές τις συνθήκες για τουλάχιστον 48 ώρες μέχρι να εκκολαφθούν τα αυγά. ● Αφού εκκολαφθούν τα αυγά, οι προνύμφες της γαρίδας άλμης συλλέγονται με μικροπιπέτα κοντά στην φωτεινή πλευρά του δοχείου ανάπτυξης με τη χρήση σταθερής πηγής φωτός. ● Μετά τη συλλογή τους οι προνύμφες διαχωρίζονται από τα αυγά σε ένα ποτήρι που περιέχει NaCl 0.9% w/v. ● Έπειτα μια κατάλληλη ποσότητα από το διάλυμα με τις προνύμφες (0.5 ml) που περιέχει ~10-12 προνύμφες τοποθετείται σε κάθε βοθρίο ενός τρυβλίου με 24 βοθρία. Οι ενώσεις παρασκευάζονται σε συγκέντρωση 10⁻² M σε DMSO και αραιώνονται με NaCl 0.9% w/v προκειμένου να επιτευχθούν οι τελικές συγκεντρώσεις των ουσιών σε τελικό όγκο 1 ml και σε διπλή επανάληψη η κάθε μια. ● Η επιβίωση του πληθυσμού της γαρίδας άλμης παρατηρήθηκε μετά από επώαση με τις ουσίες για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με την

βοήθεια στερεοσκοπίου. Οι προνύμφες θεωρήθηκαν νεκρές αν δεν έδειχναν κανένα σημάδι κίνησης για 10 sec παρακολούθησης. Κάθε πείραμα επαναλαμβάνεται τρεις φορές.

4.3. Μοριακός μηχανισμός δράσης.

4.3.1. Αναστολή του ενζύμου της λιποξυγονάσης (lipoxygenase, LOX).

Για την αναστολή του ενζύμου της λιποξυγονάσης παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα: ρυθμιστικό διάλυμα βορικού οξέος, διάλυμα με το υπόστρωμα του ενζύμου, λινελαϊκό οξύ (linoleic acid, LA) και διάλυμα του ενζύμου της λιποξυγονάσης.

Το ρυθμιστικό διάλυμα του βορικού οξέος συγκέντρωσης 0.2 M παρασκευάζεται ως εξής: ζυγίζονται 6.18 gr βορικού οξέος και διαλύονται αρχικά σε 300 ml ddH₂O και κατόπιν ρυθμίζεται το pH με κατάλληλο όγκο διαλύματος NaOH 50% w/v ώστε να γίνει pH= 9. Μετά την ρύθμιση του pH προστίθενται ακόμα 200 ml ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος να είναι 500 ml. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4° C.

Το διάλυμα του λινελαϊκού οξέος παρασκευάστηκε ως εξής: σε μια κωνική φιάλη των 50 ml προστίθενται 50 μl αιθανόλης 95% και 50 μl λινελαϊκού οξέος και αναδεύονται καλά με πιπέτα μέχρι να ομογενοποιηθούν. Στη συνέχεια προστίθενται σταδιακά 50 ml H₂O με συνεχή ανάδευση του διαλύματος. Αυτό είναι το stock διάλυμα του λινελαϊκού οξέος συγκέντρωσης 3.2 mM. Από αυτό το stock διάλυμα πραγματοποιούνται αραιώσεις ώστε να δημιουργηθούν διαλύματα λινελαϊκού οξέος συγκέντρωσης 0.457 mM, παίρνοντας 5 ml από το stock διάλυμα και προσθέτοντας 30 ml ρυθμιστικού διαλύματος βορικού οξέος. Τόσο το stock όσο και τα αραιά διαλύματα αποθηκεύονται με πάμα και parafilm στους -20° C. Καθ' όλη την παραπάνω διαδικασία τόσο τα σκεύη όσο και τα διαλύματα/διαλύτες απαερώνονται με την παροχή N₂.

Το διάλυμα του ενζύμου παρασκευάστηκε ως εξής: ζυγίζεται μια ποσότητα του ενζύμου και διαλύεται σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ώστε να είναι 10,000 Units/ml (0.001 gr ενζύμου αντιστοιχούν σε 131,000 Units). Τα παραπάνω βήματα έγιναν παρουσία πάγου για να διατηρηθεί η ενεργότητα του ενζύμου. Το τελικό διάλυμα του ενζύμου χωρίζεται σε aliquots του 1 ml που αποθηκεύονται στους -20° C. Κατά την διάρκεια του πειράματος το ένζυμο διατηρείται σε πάγο [130,163].

Η ενεργότητα του ενζύμου παρακολουθήθηκε με φασματοσκοπία UV-Vis. Σε τελικό όγκο 3 ml μέσα σε κυψελίδα χαλαζία προστίθενται 2 ml υποστρώματος (διάλυμα λινελαϊκού οξέος), ώστε η συγκέντρωση μέσα στην κυψελίδα να είναι σταθερά 0.3 mM, κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος και τέλος προστίθενται 50 μ l από το διάλυμα του ενζύμου. Για να ελεγχθεί η αναστολή του ενζύμου από την εκάστοτε ένωση, προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα από διάλυμα των ενώσεων ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις να είναι 5, 10, 20 και 30 μ M σε τελικό όγκο 3 ml, με τους όγκους του υποστρώματος και του ενζύμου να παραμένουν σταθεροί. Η ενεργότητα ή/και αναστολή του ενζύμου ελέγχθηκε παρακολουθώντας την αύξηση στην απορρόφηση του τελικού προϊόντος υπερόξο-λινελαϊκού οξέος, που προκύπτει από την επίδραση (οξειδωση) του ενζύμου στο λινελαϊκό οξύ στα 234 nm ($\epsilon = 25,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε 3 φορές.

4.3.2. Καταλυτική δράση των ενώσεων στην υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος.

Στο πείραμα αυτό απουσιάζει το ένζυμο και ελέγχεται η ικανότητα της εκάστοτε ένωσης να οξειδώνει το λινελαϊκό οξύ. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για να ελεγχθεί η καταλυτική δράση των ενώσεων στην υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος σε υπερόξο-λινελαϊκό οξύ είναι ίδια με αυτά που παρασκευάστηκαν για τον έλεγχο της αναστολής του ενζύμου της λιποξυγονάσης (ρυθμιστικό διάλυμα βορικού οξέος, stock διάλυμα υποστρώματος

3.2 mM). Η συγκέντρωση του λινελαϊκού οξέος μέσα στην κυψελίδα παραμένει σταθερή (0.2 mM) σε τελικό όγκο 3 ml. Οι όγκοι του ρυθμιστικού διαλύματος και της ένωσης αλλάζουν ανάλογα με τη συγκέντρωση της ένωσης (2, 4, και 20 μ M). Οι αναλογίες λινελαϊκού οξέος προς την ένωση/καταλύτη που ελέγχθηκαν είναι 1/100, 1/50, και 1/10. Οι μετρήσεις έγιναν στα 234 nm. Η κινητική σταθερά V_0 υπολογίστηκε από την εξίσωση $I_d = C + A_1 \exp(-b_1 t) + A_2 \exp(-b_2 t)$ και η αρχική κλίση της αντίδρασης υπολογίστηκε από την εξίσωση $V_0 = -(A_1 b_1 + A_2 b_2)$ [16,164].

4.3.3. Αλληλεπίδραση των ενώσεων με το DNA: πείραμα με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

Για τον έλεγχο πρόσδεσης των ενώσεων στο μόριο του DNA παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 15 mM κιτρικό τρι-νάτριο (trisodium citrate) και 150 mM NaCl σε τελικό όγκο 500 ml και το pH ρυθμίστηκε με διάλυμα NaOH 1 M ώστε να είναι pH=7. Το stock διάλυμα του CT-DNA (calf thymus DNA) παρασκευάστηκε σε αναλογία CT-DNA-νερό-ρυθμιστικό διάλυμα να είναι 1:1:19. Η καθαρότητα του CT-DNA ως προς την παρουσία πρωτεϊνών υπολογίστηκε από την αναλογία των απορροφήσεων στο UV στα 260 και 280 nm (A_{260}/A_{280}) και ιδανικά πρέπει να είναι >1.8 ώστε να μην υπάρχει επιμόλυνση του DNA από πρωτεΐνες, καθώς στα 260 nm απορροφά το DNA ενώ στα 280 nm οι πρωτεΐνες. Η συγκέντρωση του CT-DNA υπολογίστηκε από την από την απορρόφηση στο UV στα 260 nm μετά από αραίωση 1:20 χρησιμοποιώντας $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [16,165].

Για τα πειράματα τιτλοδότησης καταγράφηκαν φάσματα στο UV του CT-DNA στο ρυθμιστικό διάλυμα, απουσία ή παρουσία της ένωσης προς έλεγχο σε διάφορες αναλογίες $r = 0, 0.02, 0.05, 0.07, 0.10, 0.12$ ($r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$). Οι ενώσεις σε αυτό το πείραμα διαλύθηκαν σε MeOH σε αρχική συγκέντρωση 10^{-3} M .

Για τον υπολογισμό της σταθεράς πρόσδεσης K_b λήφθηκαν φάσματα στο UV των ενώσεων παρουσία ή απουσία του CT-DNA σε διάφορες αναλογίες $r = 1, 0.5, 0.25, 0.16, 0.125, 0.1$ ($r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$, $[\text{complex}] = 10\mu\text{M}$).

4.3.4. Αλληλεπίδραση των ενώσεων με το DNA: πείραμα ιξωδομετρίας.

Το κινηματικό ιξώδες του DNA παρουσία ή απουσία της προς μελέτη ένωσης μετρήθηκε σε ένα γυάλινο τριχοειδές ιξωδόμετρο τύπου Ubbelohde. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ίδια με το πείραμα με φασματοσκοπία UV-Vis. Η αρχική συγκέντρωση του CT-DNA υπολογίστηκε με UV-Vis για να ελεγχθεί η καθαρότητα του από πρωτεΐνες. Η τιμή του κινηματικού ιξώδους υπολογίστηκε ως ο μέσος όρος μετρήσεων σε τριπλή επανάληψη σε σταθερή θερμοκρασία (25°C) [133]. Το διάλυμα του CT-DNA (0.1 mM) επωάστηκε με τις ενώσεις ώστε η αναλογία $[\text{complex}]/[\text{DNA}]$ να είναι $r = 0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2, 0.24, 0.28, 0.32$. Το σχετικό ιξώδες του DNA (η/η_0) σχετίζεται με το μήκος του DNA (L/L_0) μέσω της εξίσωσης $L/L_0 = (\eta/\eta_0)^{1/3}$, όπου η = ιξώδες DNA παρουσία της ένωσης, η_0 = ιξώδες DNA χωρίς την ένωση, L_0 = μήκος του DNA χωρίς της ένωση [39,166-167]. Το ιξώδες η υπολογίζεται ως εξής: $\eta = (t - t_0)/(t_0)$, όπου t = ο χρόνος ροής του CT-DNA παρουσία ή απουσία της ένωσης, και t_0 = ο χρόνος ροής του ρυθμιστικού διαλύματος μόνο [167].

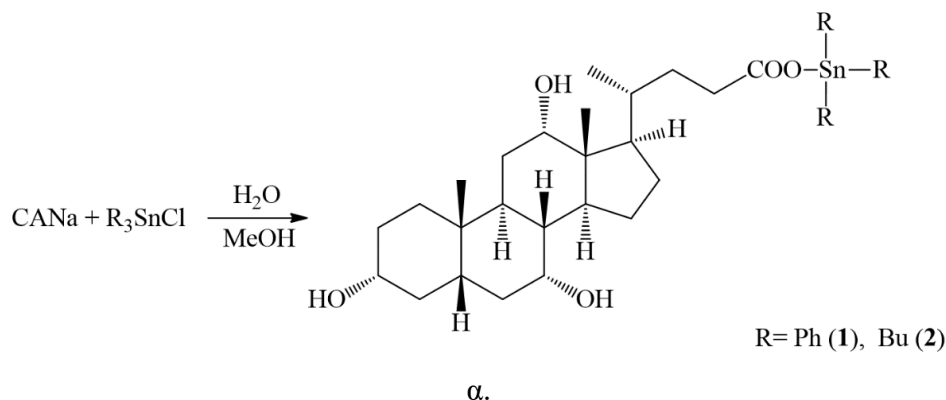
Δ. Αποτελέσματα.

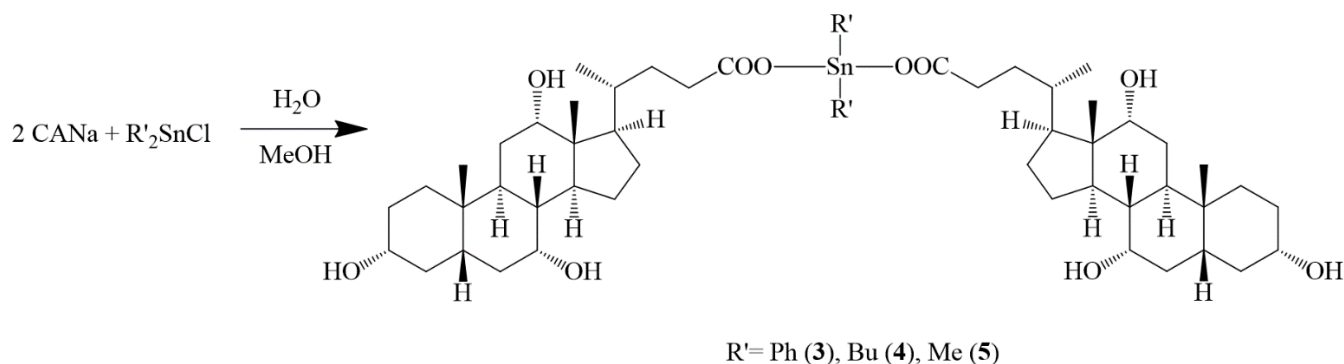
Κεφάλαιο 5

Αποτελέσματα Χημικού μέρους.

Γενικό μέρος.

Οι ενώσεις **1-5** συντέθηκαν από την αντίδραση του χολικού άλατος με νάτριο (sodium cholate, CANa) με τα R_3SnCl και R'_2SnCl_2 οργανοκασσιτερικά παράγωγα ($R = Ph$ (**1**), Bu (**2**), $R' = Ph$ (**3**), Bu (**4**), Me (**5**)) σε αναλογία 1:1 και 2:1 αντίστοιχα, σε διάλυμα νερού-μεθανόλης (Σχήμα 5). Το λευκό ίζημα που δημιουργείται διηθείται, ξεπλένεται με νερό και ξηραίνεται στον αέρα. Οι ενώσεις **1-5** χαρακτηρίστηκαν με σημείο τήξης, φασματοσκοπίες δονήσεων υπέρυθρου (FT-IR), ^{119}Sn Mössbauer, πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^{119}Sn -NMR), υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), φθορισμού ακτίνων X (XRF), με φασματομετρίες μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS) και υψηλής ανάλυσης (HR-MS), ανάλυση περίθλασης σκόνης ακτίνων X (XRPD) και ατομική απορρόφηση. Οι ενώσεις **1-5** είναι διαλυτές σε μεθανόλη, DMSO και ακετόνη.





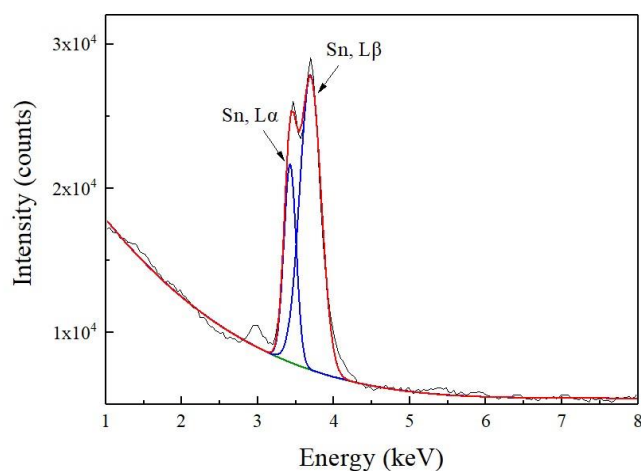
β.

Σχήμα 5. Πορεία αντίδρασης των ενώσεων α) 1-2 και β) 3-5.

Χαρακτηρισμός των συμπλόκων 1-5.

5.1. Φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (X-ray fluorescence spectroscopy, XRF).

Η φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (XRF) που πραγματοποιήθηκε για τα σύμπλοκα 1-5 επιβεβαιώνει την παρουσία του Sn στα σύμπλοκα. Στην Εικόνα 5.1.1 απεικονίζεται ένα τυπικό φάσμα XRF που δείχνει την αποσυμπύκνωση των κορυφών ακτίνων-X του κασσιτέρου La και Lβ. Η μέγιστη τιμή στα 2.96 keV αντιστοιχεί στην Kα εκπομπή του ατμοσφαιρικού αργού.



Εικόνα 5.1.1. Τυπικό φάσμα XRF.

Πιο συγκεκριμένα τα ποσοστά του κασσιτέρου στα σύμπλοκα **1-5** είναι, $18.8 \pm 2.8 \%$ (**1**), $19.6 \pm 2.9 \%$ (**2**), $14.4 \pm 2.2 \%$ (**3**), $13.9 \pm 2.1 \%$ (**4**) και $14.4 \pm 2.1 \%$ (**5**). Τα θεωρητικά υπολογισμένα ποσοστά του κασσιτέρου στα σύμπλοκα έχουν υπολογιστεί για $C_{42}H_{54}O_5Sn$ (**1**), $C_{36}H_{66}O_5Sn$ (**2**), $C_{60}H_{88}O_{10}Sn$ (**3**), $C_{56}H_{96}O_{10}Sn$ (**4**) και $C_{50}H_{84}O_{10}Sn$ (**5**) και βρέθηκε να είναι 15.7% , 17.1% , 11.0% , 11.6% και 12.3% , αντίστοιχα (Πίνακας 5.1.1). Τα παραπάνω πειραματικά και θεωρητικά υπολογισμένα ποσοστά κασσιτέρου στα σύμπλοκα συμφωνούν, προτείνοντας τους παρακάτω μοριακούς τύπους $Ph_3Sn(CA)$ (**1**), $n-(Bu_3)Sn(CA)$ (**2**), $Ph_2Sn(CA)_2$ (**3**), $n-(Bu_2)Sn(CA)_2$ (**4**) και $Me_2Sn(CA)_2$ (**5**).

Πίνακας 5.1.1. Ποσοστά ύπαρξης κασσιτέρου (Sn) με υπολογισμένα με XRF και θεωρητικά.

Σύμπλοκο	XRF % Sn (κ.β.)	Θεωρητικό % Sn (κ.β.)
1	18.8 ± 2.8	15.7
2	19.6 ± 2.9	17.1
3	14.4 ± 2.2	11
4	13.9 ± 2.1	11.4
5	14.4 ± 2.1	12.3

5.2. Δονητική φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR).

Τα φάσματα IR των ενώσεων **1-5** φαίνονται στις Εικόνες 5.2.1-5.2.5. Η ασύμμετρη ($\nu_{as}(-COO^-)$) και συμμετρική ($\nu_s(-COO^-)$) δονητικές ταινίες για το χολικό άλας με νάτριο (CANa) εμφανίζονται στα 1578 cm^{-1} (ν_{as}) και 1399 cm^{-1} (ν_s) [168-170], ενώ για το χολικό οξύ

(CAH) εμφανίζονται στα 1714 cm^{-1} (ν_{as}) και 1375 cm^{-1} (ν_s) [57]. Στα σύμπλοκα **1-5** οι ν_{as} και ν_s εμφανίζονται στα 1524 cm^{-1} και 1431 cm^{-1} για το σύμπλοκο **1**, 1573 cm^{-1} και 1401 cm^{-1} για το **2**, 1543 cm^{-1} και 1431 cm^{-1} για το **3**, 1558 cm^{-1} και 1374 cm^{-1} για το **4** και 1521 cm^{-1} και 1435 cm^{-1} για το σύμπλοκο **5**, αντίστοιχα. Η τιμή της διαφοράς $\Delta\nu$ ($\Delta\nu=[\nu_{as}(\text{COO}^-) - \nu_s(\text{COO}^-)]$) του προσδέτη CANa είναι 179 cm^{-1} ενώ των συμπλόκων **1-5** είναι 93 cm^{-1} (**1**), 172 cm^{-1} (**2**), 112 cm^{-1} (**3**), 184 cm^{-1} (**4**), και 86 cm^{-1} (**5**). Ο μονοδοντικός συντονισμός της καρβοξυλικής ομάδας έχει ως αποτέλεσμα τις πολύ υψηλές τιμές της διαφοράς $\Delta\nu$ στο σύμπλοκο σε σχέση με τις ιοντικές ενώσεις του προσδέτη, ενώ όταν ο προσδέτης συντονίζεται χηλικά, η τιμή $\Delta\nu$ είναι πολύ μικρότερη από τις ιοντικές ενώσεις [134]. Οι τιμές για τον ασύμμετρα διδοντικό συντονισμό κυμαίνονται στην περιοχή του μονοδοντικού [134]. Όταν η καρβοξυλική ομάδα έχει γεφυρωτικό συντονισμό με τα μεταλλικά ιόντα, οι τιμές $\Delta\nu$ είναι μεγαλύτερες από αυτές του χηλικού συντονισμού και σχεδόν ίδιες με τις τιμές που παρατηρούνται για τις ιοντικές ενώσεις του προσδέτη [134]. Έτσι για τις ενώσεις **1-3** και **5** προκύπτει ο χηλικός τρόπος ένταξης του χολικού οξέος στον κασσίτερο, ενώ για την ένωση **4** ο ασύμμετρος διδοντικός.

Οι δονήσεις των -OH ομάδων του προσδέτη εμφανίζονται στα $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ και ακριβέστερα στα 3523 cm^{-1} , 3318 cm^{-1} και 3176 cm^{-1} ενώ για το άλας με νάτριο σε 3392 cm^{-1} , 3366 cm^{-1} και 3260 cm^{-1} (Εικόνα 5.2.6) [57,170]. Στα σύμπλοκα **1-5** οι δονήσεις αυτές γίνονται μια ευρεία ταινία δόνησης (3370 cm^{-1} (**1**), 3357 cm^{-1} (**2**), 3344 cm^{-1} (**3**), 3342 cm^{-1} (**4**), 3359 cm^{-1} (**5**)). Στους $2800\text{-}3000$ κυμματάριθμους παρατηρούμε να εμφανίζονται οι δονήσεις των κορεσμένων ομάδων -C-H του χολικού οξέος [170-171]. Στο ίδιο εύρος δονήσεων, και χωρίς μετατοπίσεις, συμπίπτουν και οι μεθυλομάδες του $n\text{-Bu}_3\text{SnCl}$ και $n\text{-Bu}_2\text{SnCl}_2$ για τα σύμπλοκα **2** και **4**, αντίστοιχα. Για τα σύμπλοκα **1** και **3** οι επιπλέον δονήσεις των αρωματικών -C-H και -C-C των φαινυλομάδων παρατηρούνται στα $3050\text{-}3070\text{ cm}^{-1}$ και σε $630\text{-}730\text{ cm}^{-1}$, αντίστοιχα [172-173] ελαφρώς μετατοπισμένες σε σχέση με τα οργανοκασσιτερικά παράγωγα. Σύμφωνα

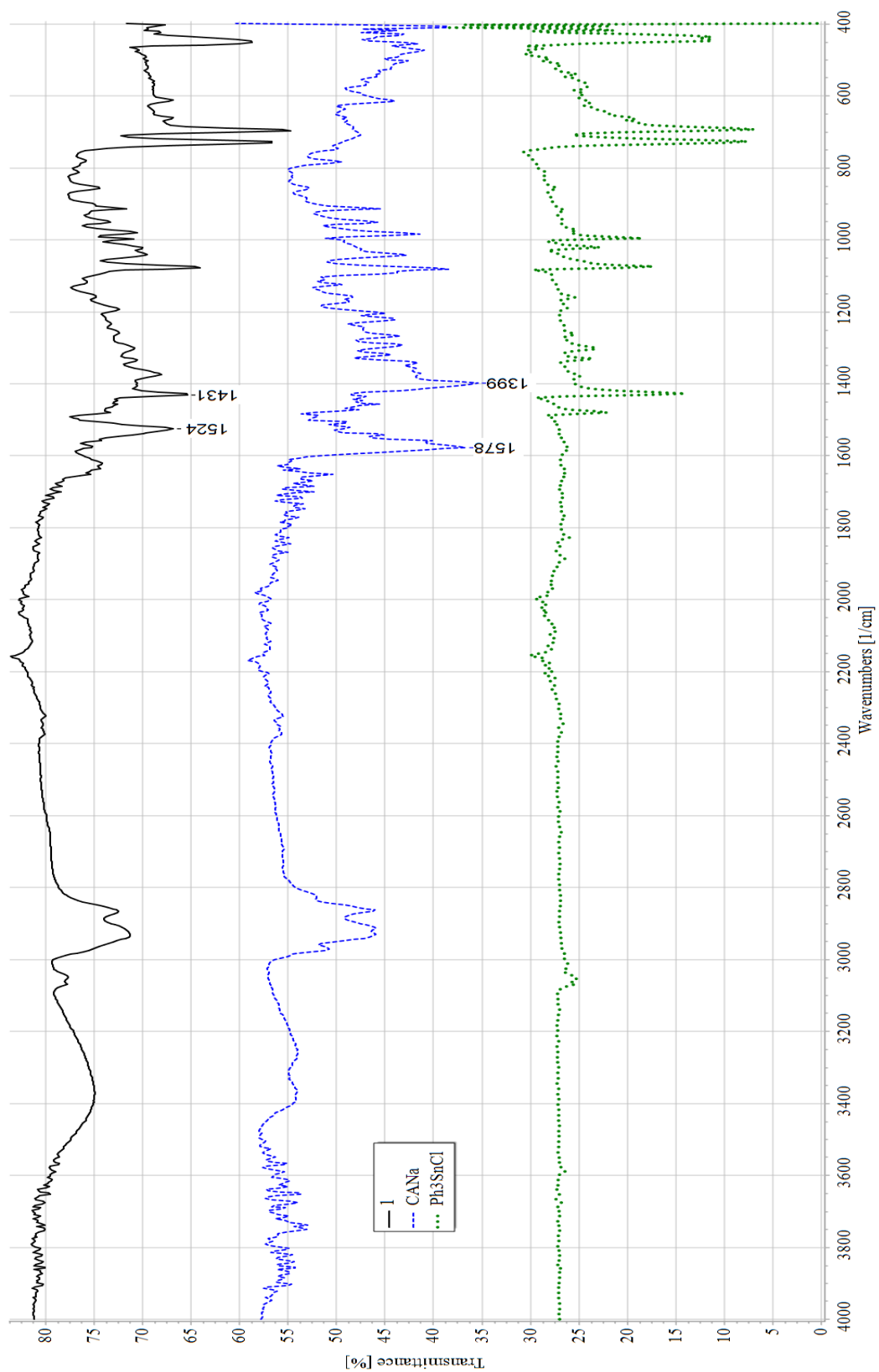
με τη βιβλιογραφία στους 1100-980 κυματάριθμους εμφανίζονται οι δονήσεις των δεσμών C-OH του χολικού οξέος [57,169], ενώ σε 600-620 cm^{-1} παρατηρούνται οι -C-H δονήσεις κάμψης του επιπέδου (Πίνακας 5.2.1) [169]. Οι δονήσεις των δεσμών -Sn-C και -Sn-O για τα σύμπλοκα **1-5** δίνονται στον Πίνακα 5.2.2 [174-176]. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα από το FT-IR καταλήγουμε στον συντονισμό του CA^- στα σύμπλοκα **1-5**.

Πίνακας 5.2.1. Δονήσεις δεσμών των συμπλόκων **1-5**.

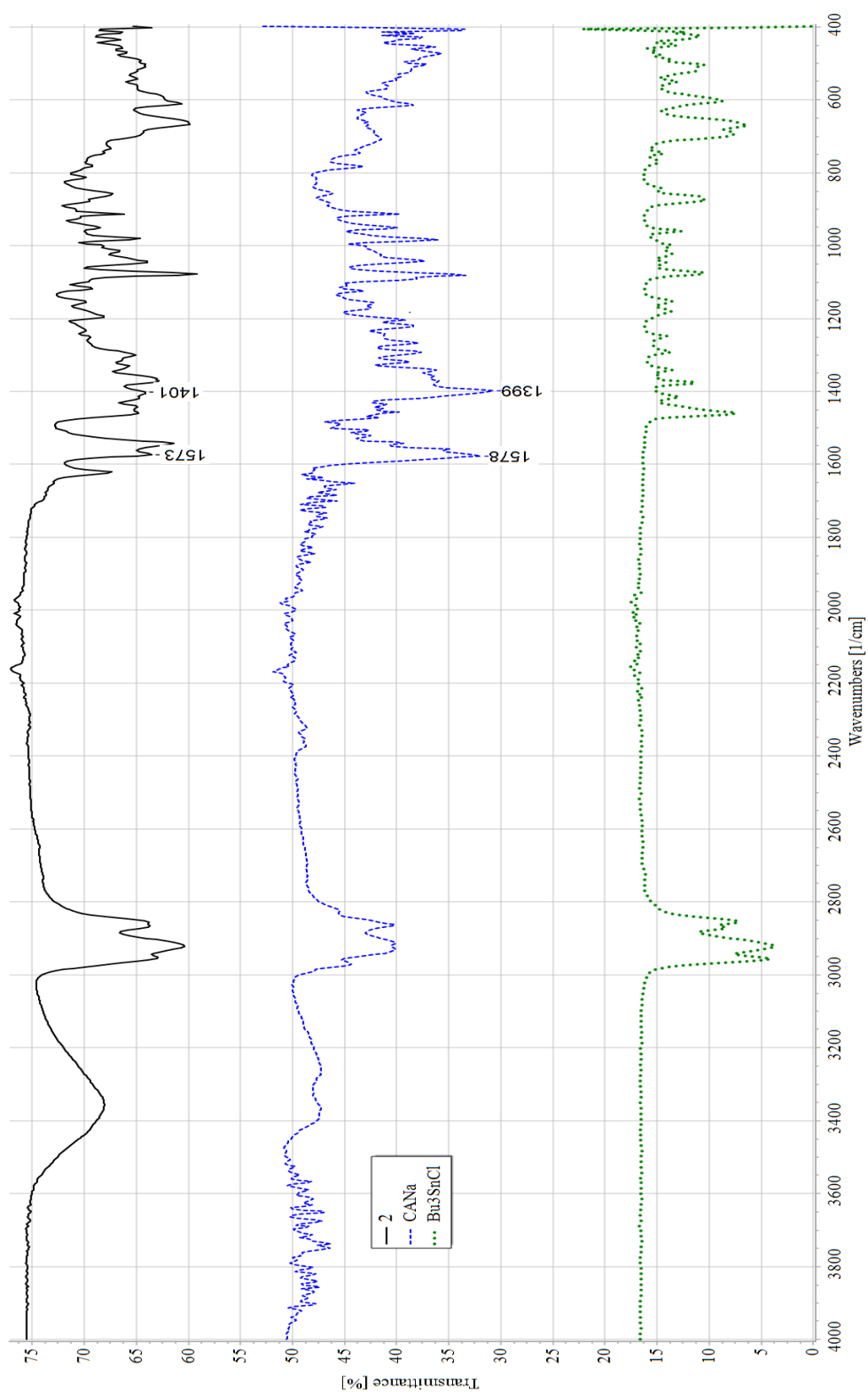
	Δονήσεις (cm^{-1})						
Σύμπλοκο	$\nu_{as}(\text{-COO}^-)$	$\nu_s(\text{-COO}^-)$	-O-H	-C-H κορεσμένα	-C-H αρωματικά	-C-C αρωματικά	-C-H κάμψης
1	1524(s)	1431(s)	3370(br)	2976-2865(s)	3068- 3048(w)	730-696(vs) (726-693, Ph_3SnCl)	611(m)
2	1573(s)	1401(w)	3357(br)	2954-2855(s)	—	—	611(s)
3	1543(m)	1431(m)	3344(br)	2977-2867(s)	3072- 3048(w)	729-696(vs) (726- 689, Ph_2SnCl_2)	611(m)
4	1558(s)	1374(m)	3342(m)	2964-2863(s)	—	—	612(m)
5	1521(m)	1435(m)	3359(br)	2977-2867(s)	—	—	611(m)
CANa	1578(s)	1399(s)	3393(m), 3365(m), 3259(m)	2970-2862(s)	—	—	614(m)
CAH	1714(vs)	1375(vs)	3523(s), 3317(m), 3174(m)	2984-2854(s)	—	—	611(m)

Πίνακας 5.2.2. Δονήσεις δεσμών Sn-C και Sn-O στα σύμπλοκα **1-5** και στα οργανοκασσιτερικά παράγωγα.

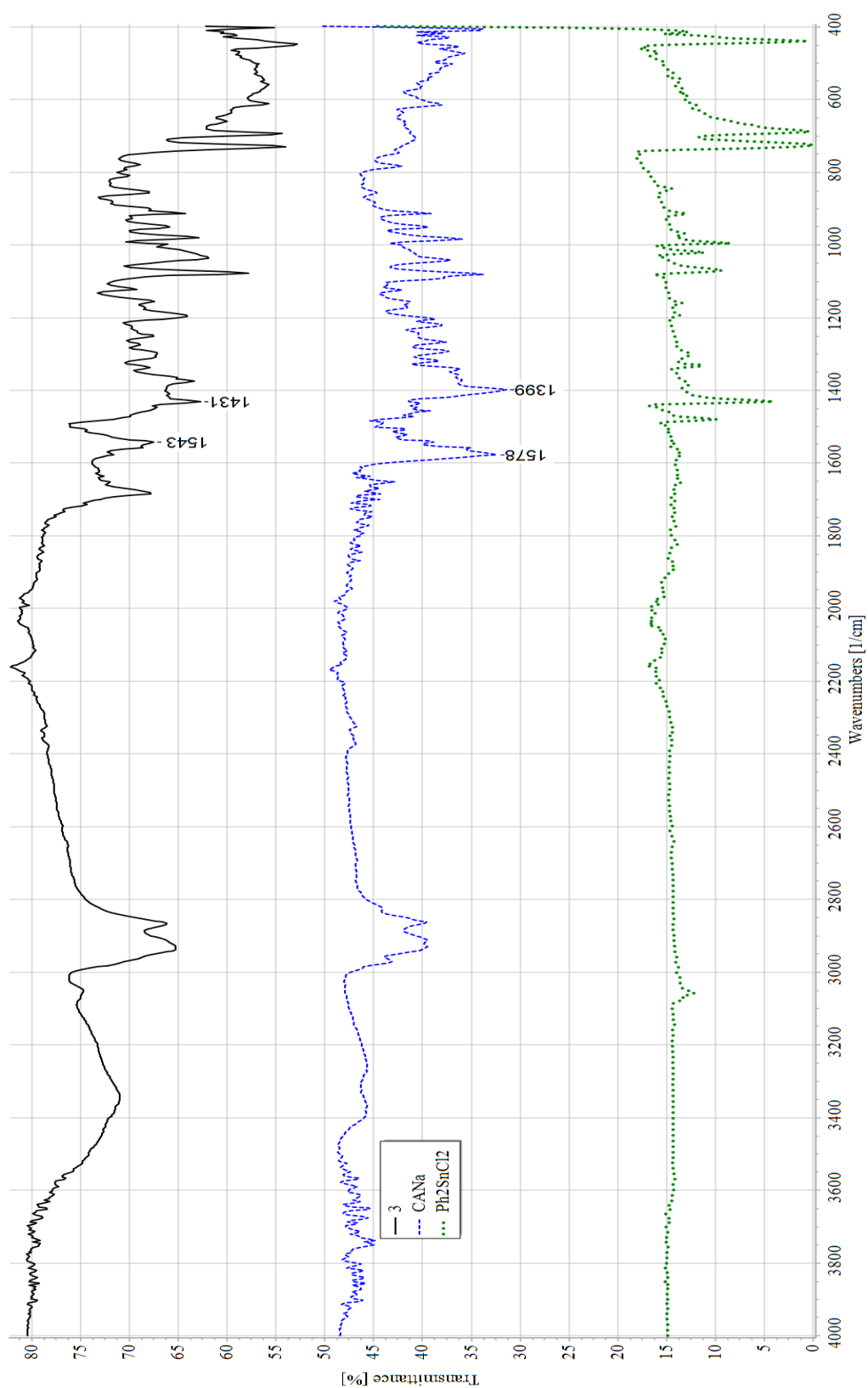
Σύμπλοκο	Δονήσεις (cm ⁻¹)	
	Sn-C	Sn-O
1	521 (vw), 473 (vw)	559 (vw)
2	525 (vw), 469 (w)	559 (w)
3	525 (vw), 469 (w)	559 (vw)
4	521 (vw), 473 (w)	564 (vw)
5	529 (vw), 469 (w)	566 (vw)
Ph ₃ SnCl	515 (w), 469 (w)	—
<i>n</i> -Bu ₃ SnCl	525 (vw), 469 (vw)	—
Ph ₂ SnCl ₂	529 (w), 472 (w)	—
<i>n</i> -Bu ₂ SnCl ₂	521 (vw), 476 (vw)	—
Me ₂ SnCl ₂	517 (m), 470 (w)	—



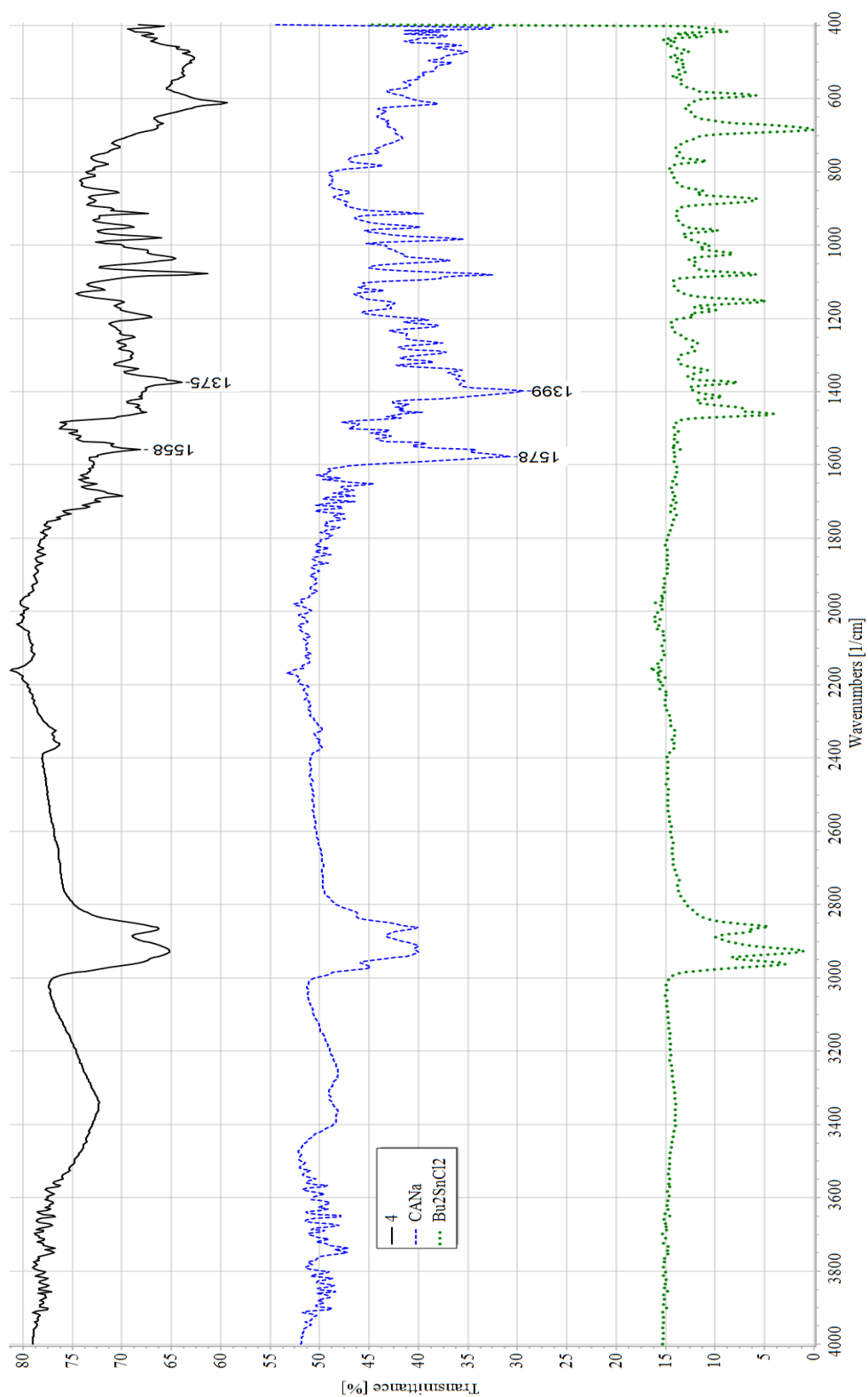
Εικόνα 5.2.1. Φάσμα FT-IR του συμπλόκου **1** σε σύγκριση με των CANa και του Ph₃SnCl.



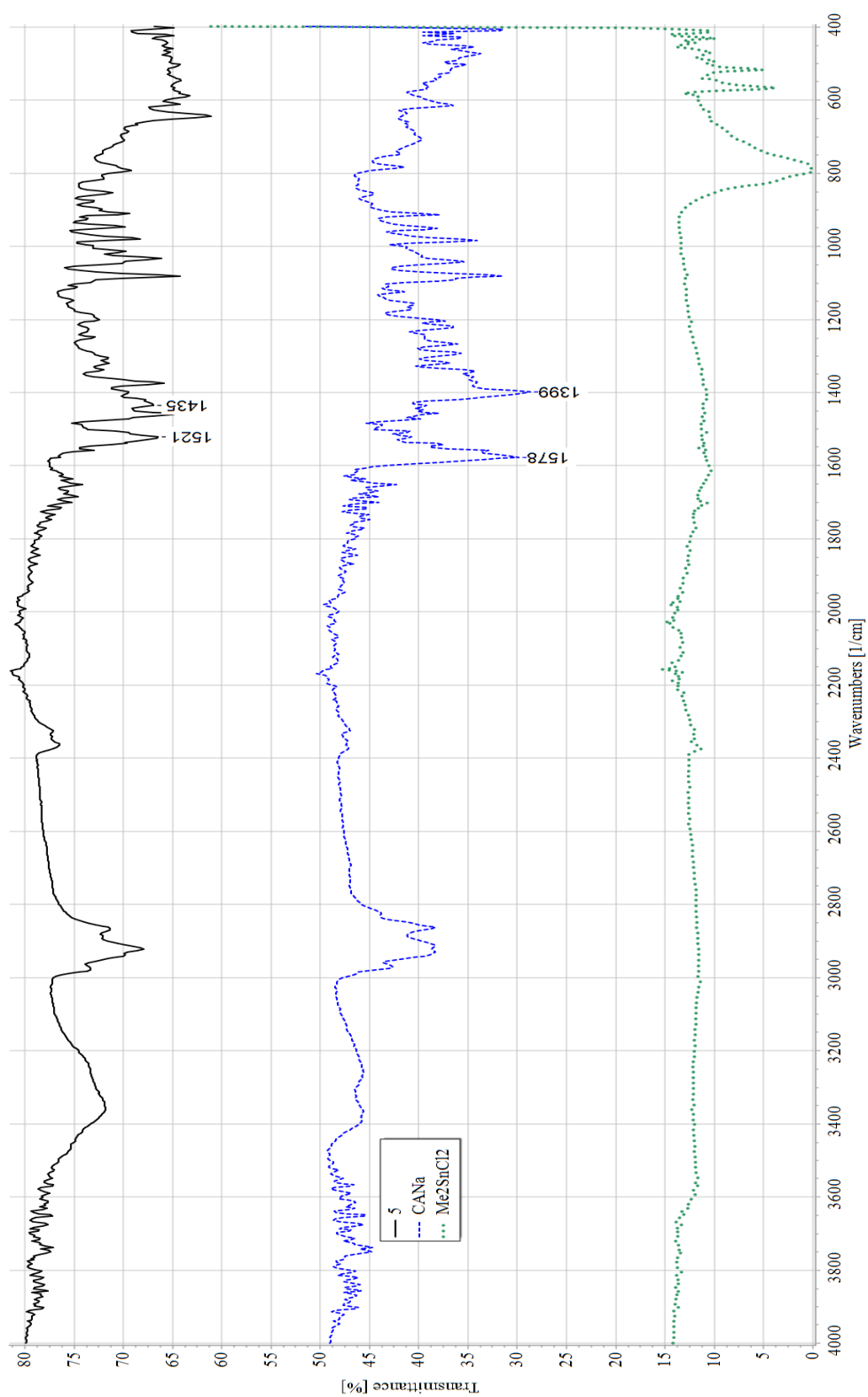
Εικόνα 5.2.2. Φάσμα FT-IR του συμπλόκου **2** σε σύγκριση με των CANa και του *n*-Bu₃SnCl.



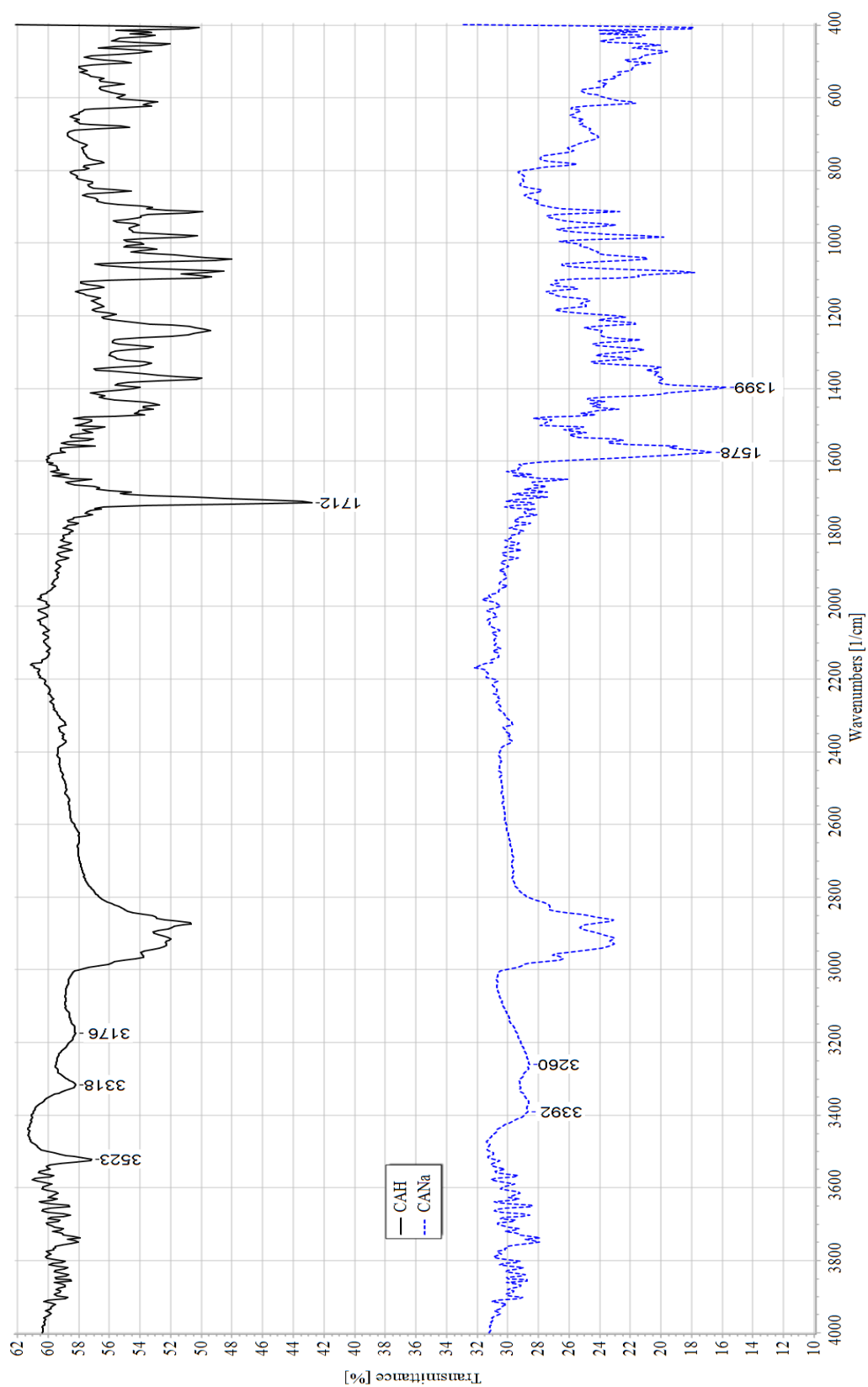
Εικόνα 5.2.3. Φάσμα FT-IR του συμπλόκου **3** σε σύγκριση με των CANa και του Ph₂SnCl₂.



Εικόνα 5.2.4. Φάσμα FT-IR του συμπλόκου **4** σε σύγκριση με των CANa και του *n*-Bu₂SnCl₂.



Εικόνα 5.2.5. Φάσμα FT-IR του συμπλόκου **5** σε σύγκριση με των CANa και του Me₂SnCl₂.



Εικόνα 5.2.6. Φάσματα FT-IR του προσδέτη CAH και του αλατός του με νάτριο, CANa.

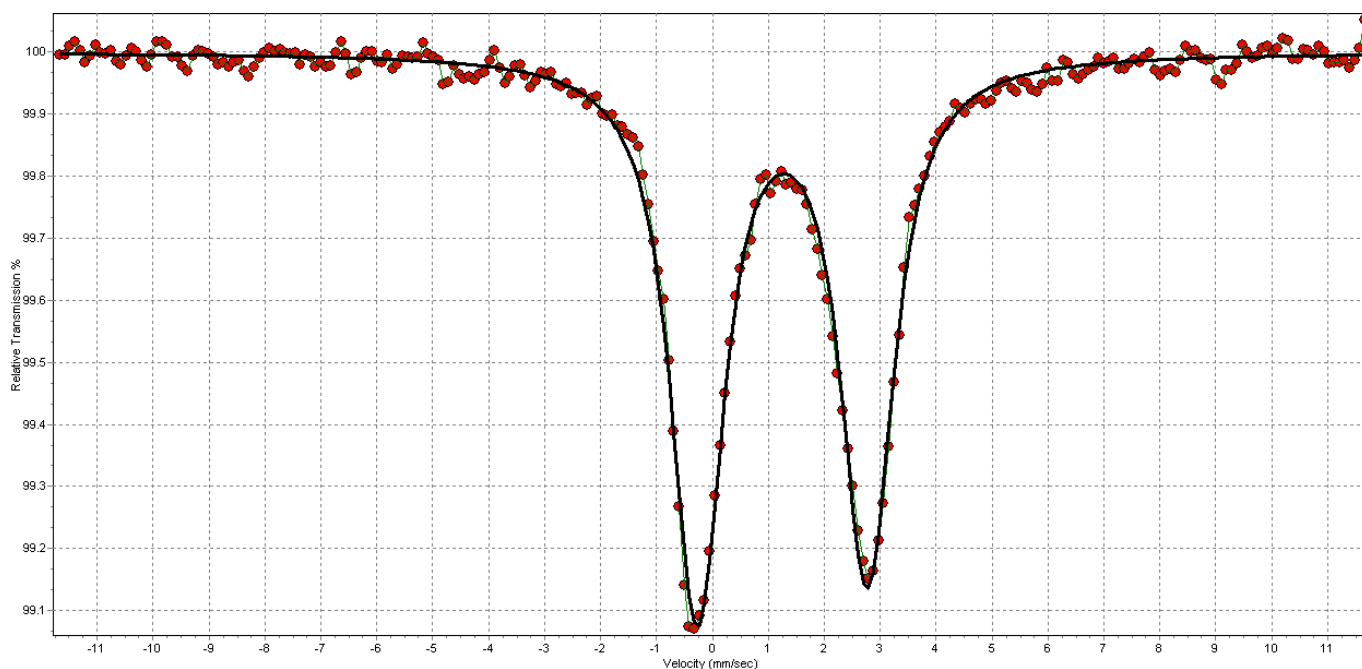
5.3. Φασματοσκοπία ^{119}Sn Mössbauer.

Το περιβάλλον γύρω από το άτομο του κασσιτέρου (Sn) μελετήθηκε με φασματοσκοπία ^{119}Sn Mössbauer. Οι πληροφορίες που μπορούν να ληφθούν από τη φασματοσκοπία ^{119}Sn Mössbauer είναι 1) η κατάσταση σθένους του Sn σε ανόργανα παράγωγα, 2) η δομή και οι δεσμοί γύρω από το μέταλλο (κυρίως σε οργανοκασσιτερικά παράγωγα), και 3) η δυναμική των πυρήνων του Sn που πιθανώς σχετίζεται με τη φύση του υποστρώματος (μονομερές/πολυμερές) [84]. Οι τιμές των παραμέτρων της ισομερούς μετατόπισης (Isomer Shift, IS, δ) της τετραπολικής αλληλεπίδρασης (Quadrupole Splitting, QS, ΔE_Q) και η αναλογία (%) για τα σύμπλοκα **1-5** και τα οργανοκασσιτερικά παράγωγα δίνονται στον Πίνακα 5.3.1. Η οξειδωτική κατάσταση μια ένωσης, Sn(II) ή Sn(IV), μπορεί να βρεθεί με βεβαιότητα από τις τιμές δ [84].

Το φάσμα της ένωσης **1** αποτελείται από μια ασύμμετρη διπλή Λορεντζιανή γραμμή (Lorentzian doublet) που μας δηλώνει γεωμετρία συντονισμού γύρω από ένα άτομο κασσιτέρου (Εικόνα 5.3.1). Η τιμή της ισομερούς μετατόπισης, δ , γι' αυτό το σύμπλοκο είναι 1.25 mm s^{-1} και μας δηλώνει πως το άτομο του κασσιτέρου βρίσκεται στην 4 (+) οξειδωτική κατάσταση (Sn(IV)) [84]. Η τιμή της τετραπολικής αλληλεπίδρασης, ΔE_Q , είναι 3.04 mm s^{-1} δεικνύοντας γεωμετρία τριγωνικής διπυραμίδας γύρω από το άτομο του κασσιτέρου με τις ομάδες R να είναι σε μεσημβρινή ή ισημερινή διάταξη, ή τετραεδρική γεωμετρία [84]. Η τιμή δ είναι μικρότερη από αυτή του τρι-φαίνυλο χλωριδίου δηλώνοντας την δημιουργία συμπλόκου **1**.

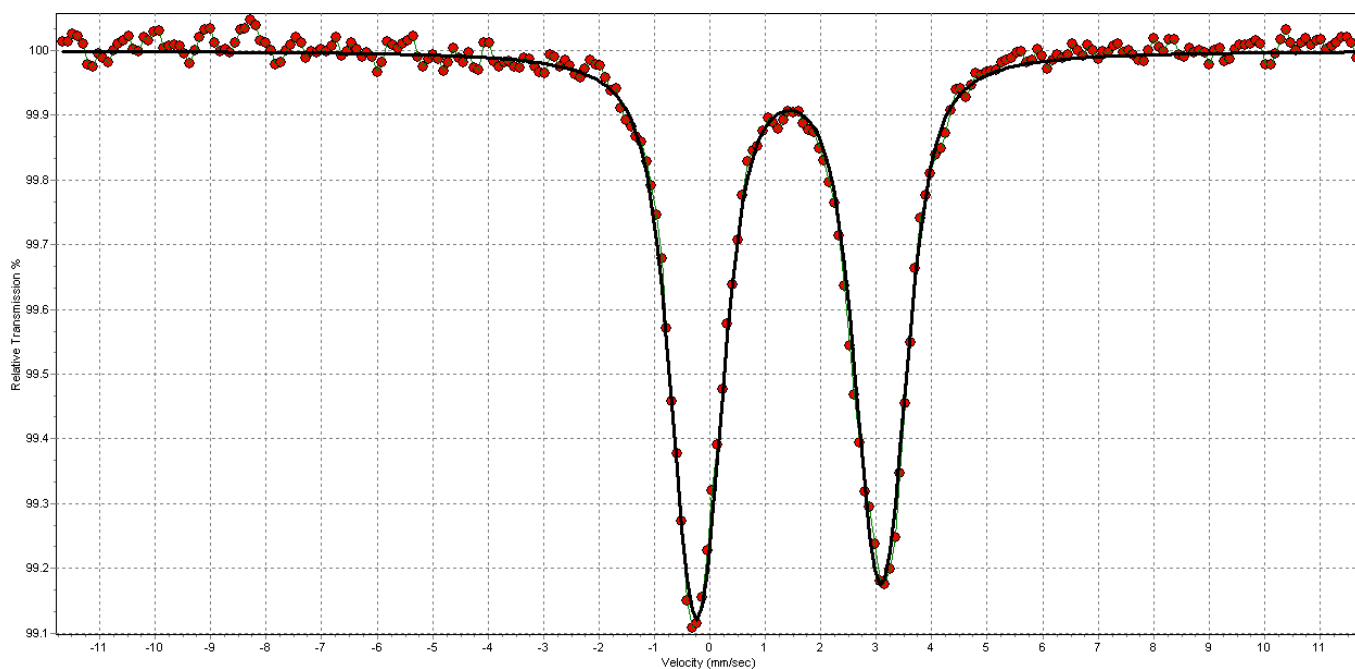
Πίνακας 5.3.1. Παράμετροι της φασματοσκοπίας ^{119}Sn Mössbauer για τα σύμπλοκα **1-5**.

Σύμπλοκο	Ισομερής μετατόπιση, δ (mm s ⁻¹)	Τετραπολική αλληλεπίδραση, ΔE_Q (mm s ⁻¹)	A (%)	Βιβλιογραφία
1	1.25	3.04	100	—
2	1.42	3.32	100	—
3	1.15	2.71	100	—
4	1.33	3.25	100	—
5	1.35	4.35	100	—
Ph ₃ SnCl	1.31-1.35	2.52-2.55	—	[178-182]
<i>n</i> -Bu ₃ SnCl	1.56	3.43	—	[177-178]
Ph ₂ SnCl ₂	1.37-1.41	2.83	—	[181,183]
<i>n</i> -Bu ₂ SnCl ₂	1.62-1.64	3.45-3.47	—	[184-185]
Me ₂ SnCl ₂	1.55	3.60	—	[183]



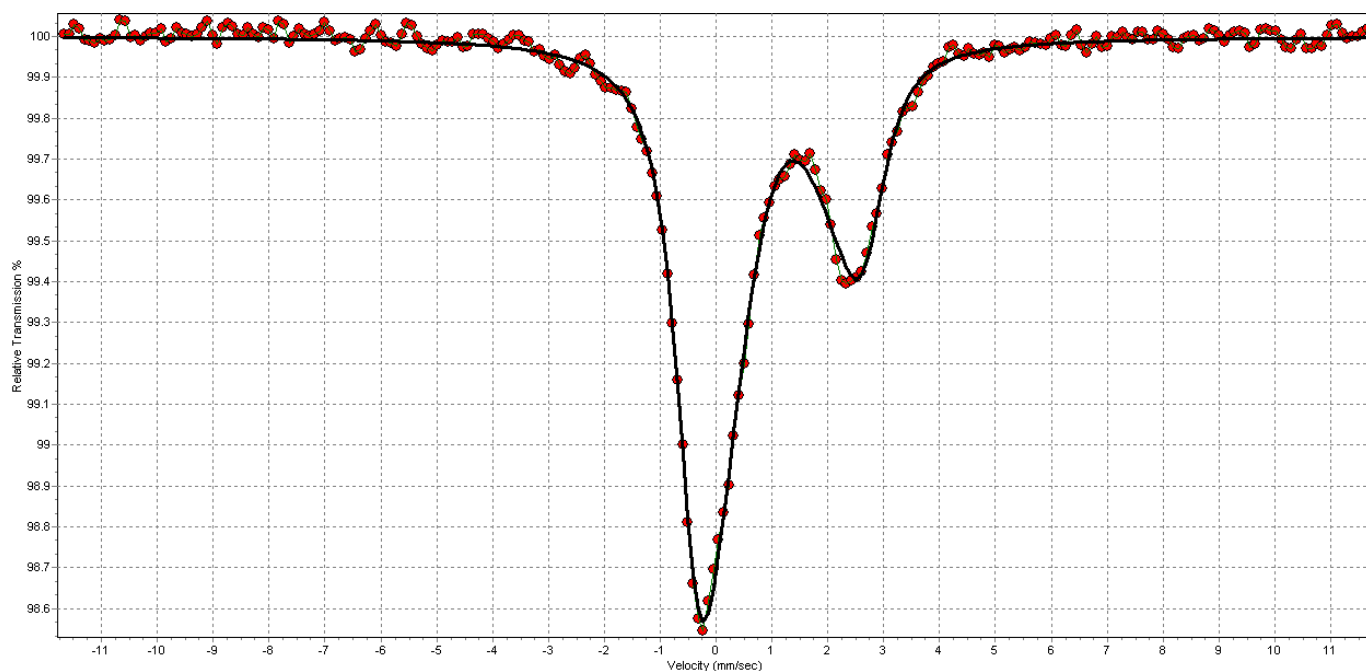
Εικόνα 5.3.1. Φάσμα ^{119}Sn Mössbauer του συμπλόκου **1**.

Το φάσμα του συμπλόκου **2** αποτελείται από μια ασύμμετρη διπλή Λορεντζιανή γραμμή, που δηλώνει την ύπαρξη ενός ατόμου κασσιτέρου και φαίνεται στην Εικόνα 5.3.2. Η τιμή δ γι' αυτό το σύμπλοκο είναι 1.42 mm s^{-1} και μας δείχνει πως ο κασσίτερος είναι στην 4 (+) οξειδωτική κατάσταση [84]. Η τιμή ΔE_Q είναι 3.32 mm s^{-1} και υποδηλώνει πως η γεωμετρία των ομάδων R γύρω από το άτομο του κασσιτέρου είναι σε τριγωνική διπυραμίδα με μεσημβρινή ή ισημερινή διάταξη [84]. Η τιμή δ για το σύμπλοκο **2** είναι μικρότερη από του τρι-βούτυλο χλωριδίου του κασσιτέρου επιβεβαιώνοντας την δημιουργία του συμπλόκου.



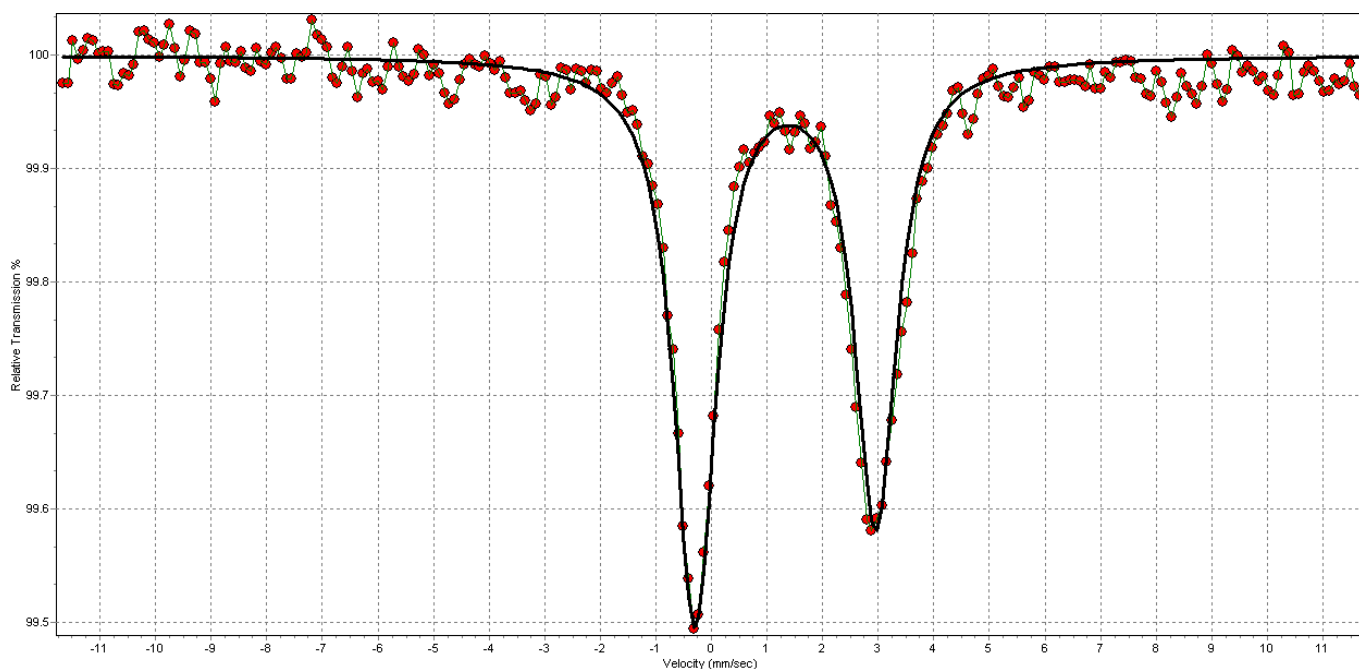
Εικόνα 5.3.2. Φάσμα ^{119}Sn Mössbauer του συμπλόκου 2.

Για το σύμπλοκο 3 στο φάσμα ^{119}Sn Mössbauer εμφανίζονται μια ασύμμετρη διπλή Λορεντζιανή γραμμή (Εικόνα 5.3.3) που δηλώνει την παρουσία ενός ατόμου κασσιτέρου. Η τιμή δ γι' αυτό το σύμπλοκο είναι 1.15 mm s^{-1} όπου δηλώνει πως ο κασσίτερος είναι στην 4 (+) οξειδωτική κατάσταση [84]. Η τιμή της τετραπολικής αλληλεπίδρασης είναι 2.71 mm s^{-1} και δηλώνει πως η γεωμετρία των R ομάδων γύρω από το άτομο του κασσιτέρου είναι είτε σε οκταεδρική γεωμετρία με *trans*, είτε ως τριγωνική διπυραμίδα με *cis* ή *trans* διάταξη, ή τετραεδρική γεωμετρία [84].



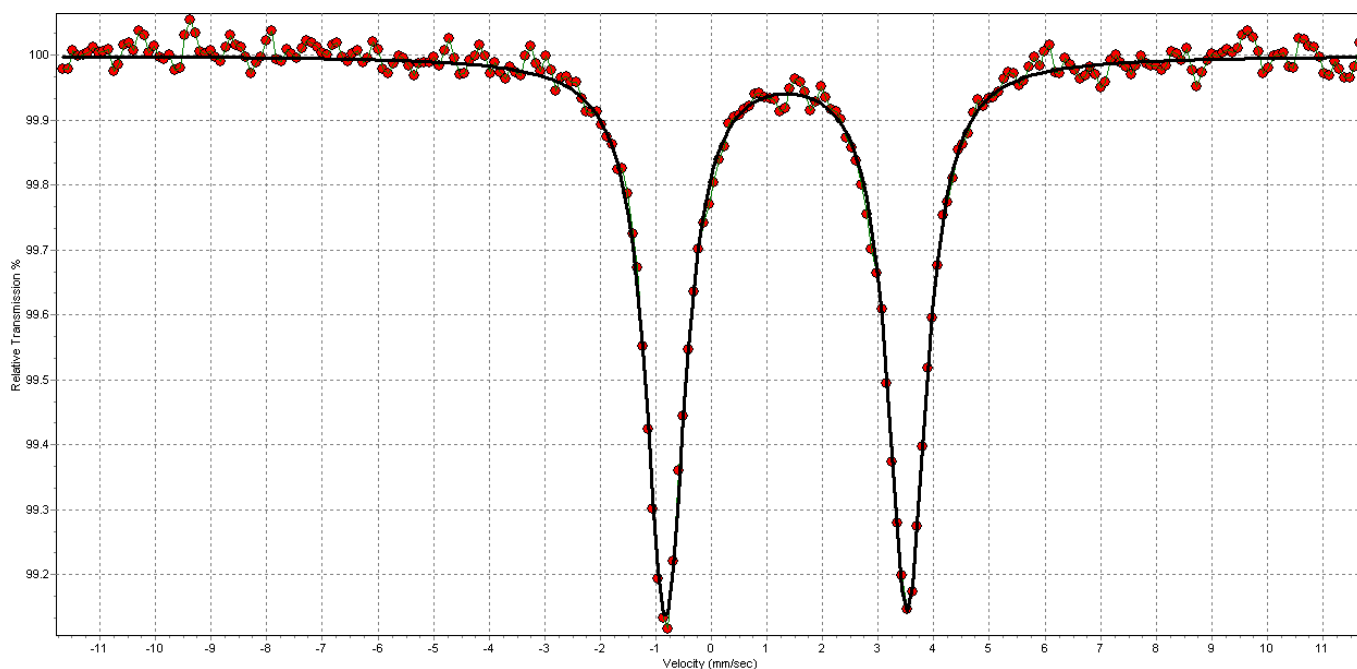
Εικόνα 5.3.3. Φάσμα ^{119}Sn Mössbauer του συμπλόκου 3.

Στο σύμπλοκο 4 υπάρχει μια ασύμμετρη διπλή Λορεντζιανή γραμμή που μας δείχνει την ύπαρξη ενός ατόμου κασσιτέρου (Εικόνα 5.3.4). Η τιμή της ισομερούς μετατόπισης, δ , είναι 1.33 mm s^{-1} που δεικνύει πως ο κασσίτερος είναι στην 4 (+) οξειδωτική κατάσταση [84]. Η τιμή ΔE_Q γι' αυτό το σύμπλοκο είναι 3.25 mm s^{-1} και υποδηλώνει πως η γεωμετρία των R ομάδων γύρω από το άτομο του κασσιτέρου είναι είτε τριγωνική διπυραμίδα με *trans* ή *cis* διάταξη των ομάδων R, είτε οκταεδρική με *trans* διάταξη των R ομάδων, ή πενταγωνική διπυραμίδα, καθώς αυτή η τιμή ΔE_Q συμπίπτει με όλες τις παραπάνω γεωμετρίες [84]. Η τιμή δ είναι μικρότερη από του δι-βούτυλο χλωριδίου δηλώνοντας μας τη δημιουργία του συμπλόκου 4.



Εικόνα 5.3.4. Φάσμα ^{119}Sn Mössbauer του συμπλόκου 4.

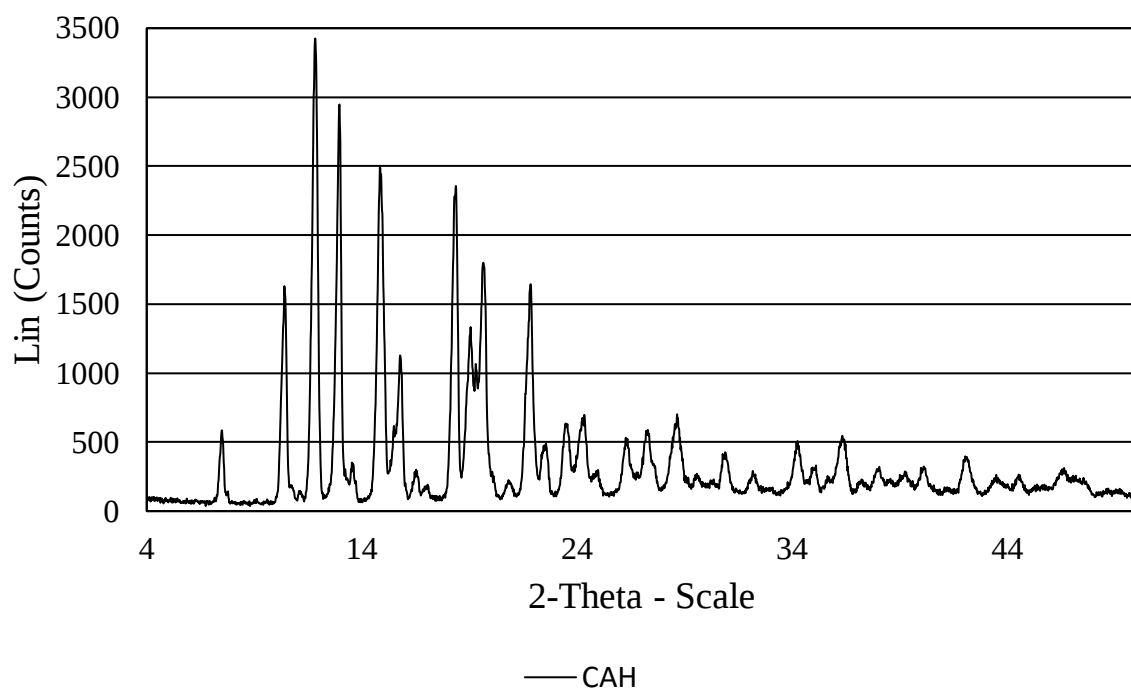
Το φάσμα ^{119}Sn Mössbauer του συμπλόκου 5 αποτελείται από μια ασύμμετρη διπλή Λορεντζιανή γραμμή που δηλώνει την ύπαρξη ενός ατόμου κασσιτέρου στο σύμπλοκο αυτό (Εικόνα 5.3.5). Η τιμή της ισομερούς μετατόπισης, δ , είναι 1.35 mm s^{-1} και μας δείχνει πως το άτομο του κασσιτέρου είναι στην 4 (+) οξειδωτική κατάσταση [84]. Επιπλέον η τιμή αυτή είναι μικρότερη από αυτή του δι-μέθυλο χλωριδίου υποδηλώνοντας τη δημιουργία του συμπλόκου 5. Η τιμή της τετραπολικής αλληλεπίδρασης, ΔE_q , είναι 4.35 mm s^{-1} που μας υποδηλώνει πως η γεωμετρία των R ομάδων γύρω από τον κασσίτερο είναι είτε οκταεδρική με *trans* διάταξη, ή πενταγωνική διπυραμίδα [84].



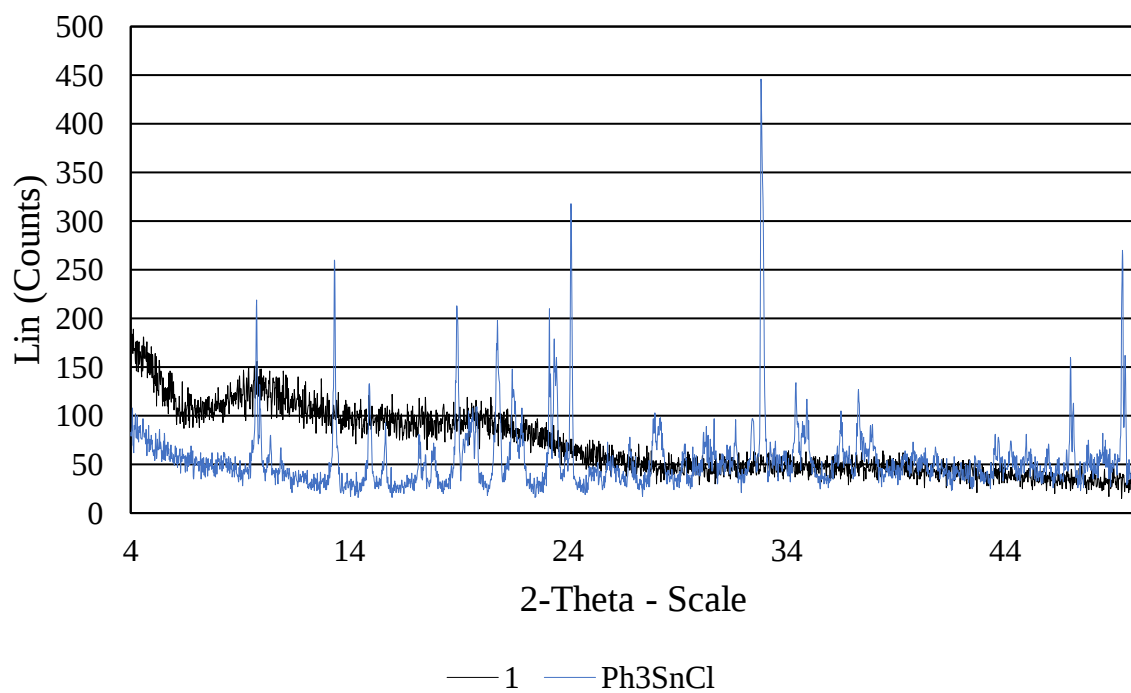
Εικόνα 5.3.5. Φάσμα ^{119}Sn Mössbauer του συμπλόκου 5.

5.4. Ανάλυση περίθλασης ακτίνων X σε σκόνη (X-ray powder diffraction, XRPD).

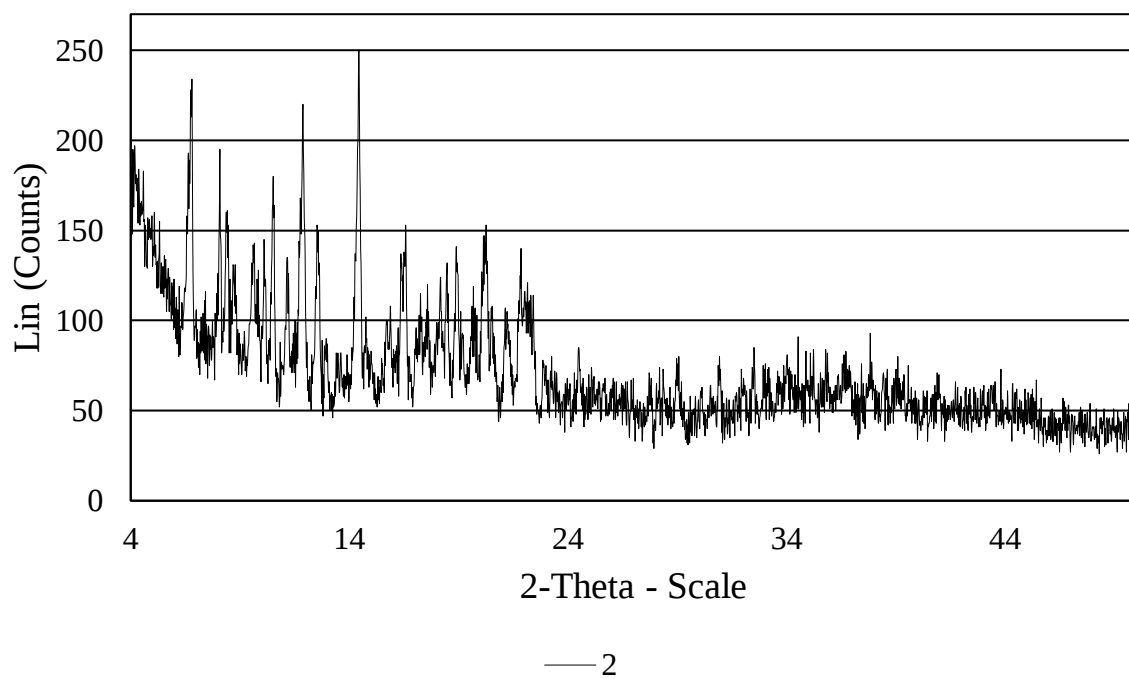
Η ανάλυση περίθλασης ακτίνων X (XRPD) επιβεβαίωσε τη δημιουργία των συμπλόκων, καθώς τα φάσματα που προκύπτουν για τα σύμπλοκα διαφέρουν από αυτά του προσδέτη CAH και των οργανοκασσιτερικών παραγώγων (Εικόνες 5.4.1-5.4.6). Πιο συγκεκριμένα για το σύμπλοκο **1** παρατηρούνται ευρεία χαρακτηριστικά περίθλασης ενός άμορφου πλαισίου, ενώ για τα σύμπλοκα **2-5** παρατηρείται η μικροκρυσταλλική φύση των ενώσεων.



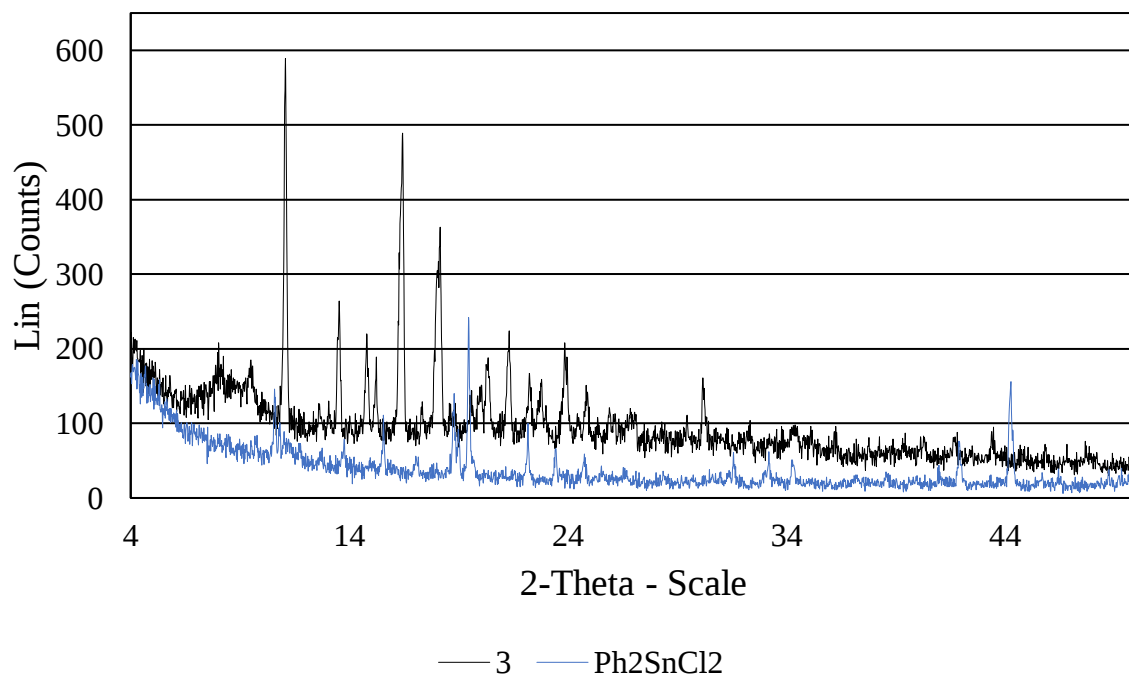
Εικόνα 5.4.1. Φάσμα XRPD του προσδέτη CAH.



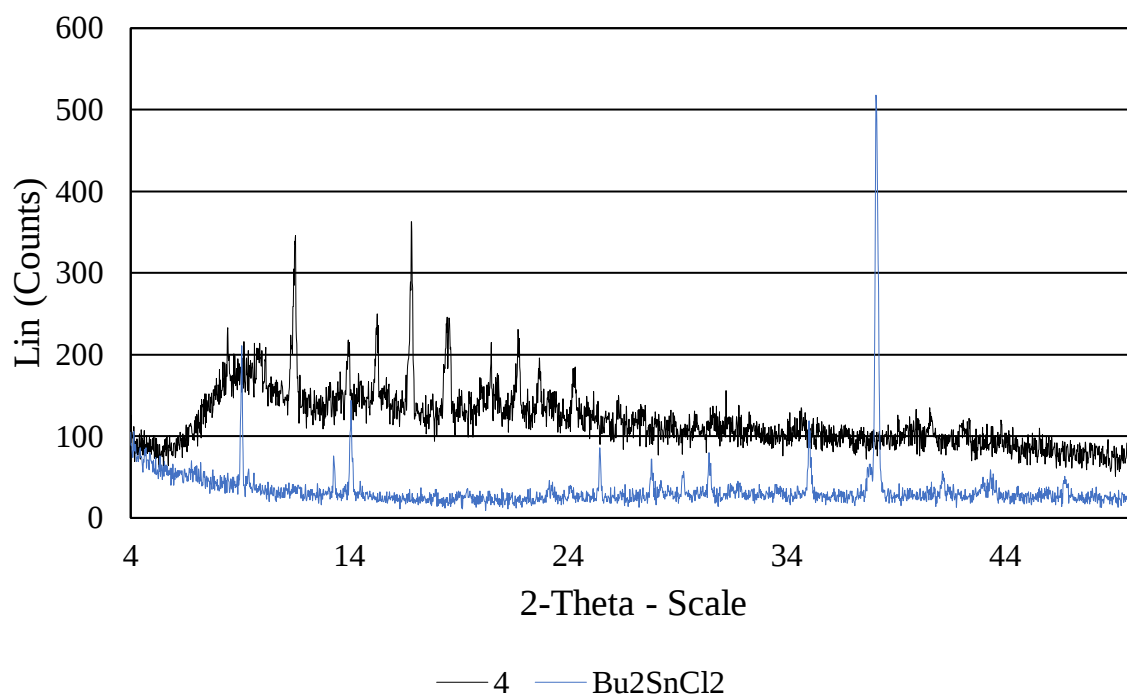
Εικόνα 5.4.2. Φάσμα XRPD του συμπλόκου **1** συγκρίσει του Ph₃SnCl.



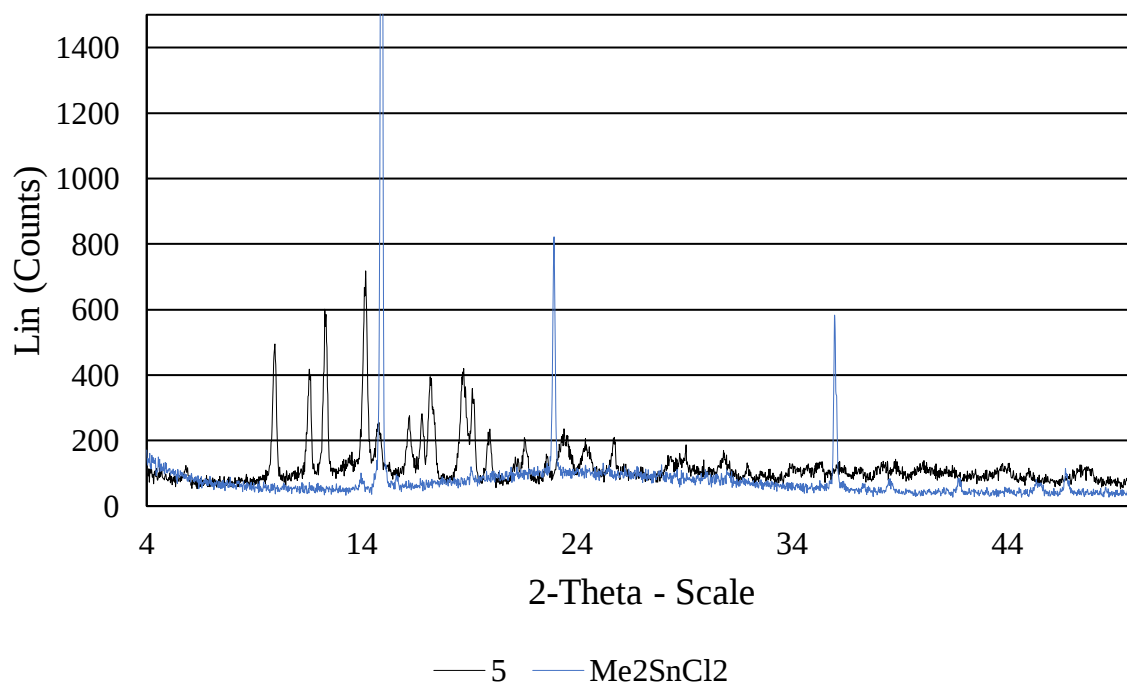
Εικόνα 5.4.3. Φάσμα XRPD του συμπλόκου 2.



Εικόνα 5.4.4. Φάσμα XRPD του συμπλόκου 3 συγκρίσει του Ph₂SnCl₂.



Εικόνα 5.4.5. Φάσμα XRPD του συμπλόκου **4** συγκρίσει του $n\text{-Bu}_2\text{SnCl}_2$.



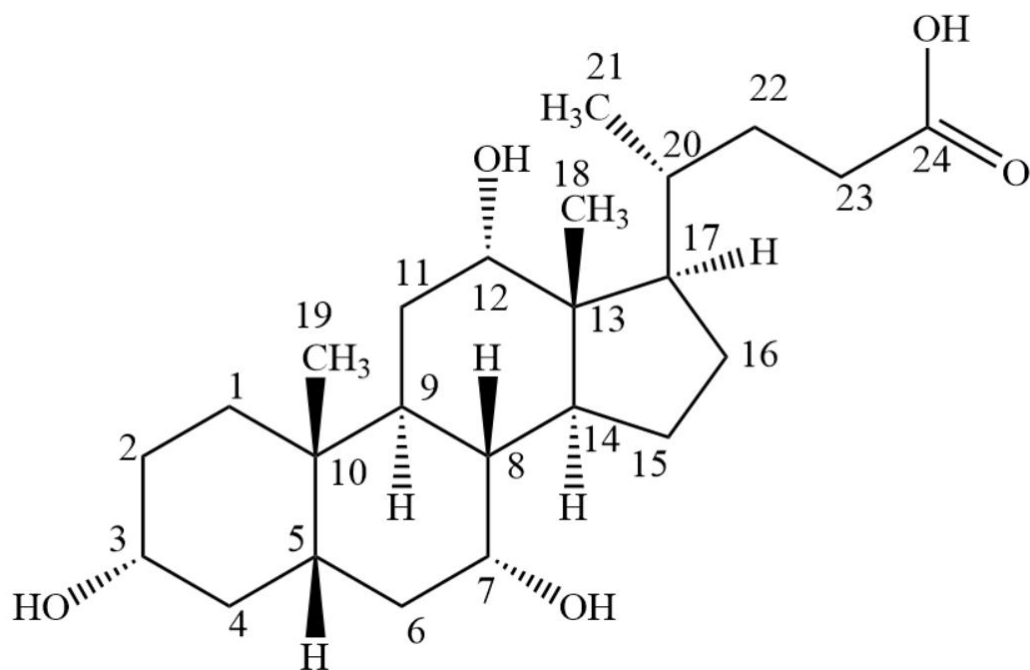
Εικόνα 5.4.6. Φάσμα XRPD του συμπλόκου **5** συγκρίσει του Me_2SnCl_2 .

5.5. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR, ^1H , ^{13}C , ^{119}Sn).

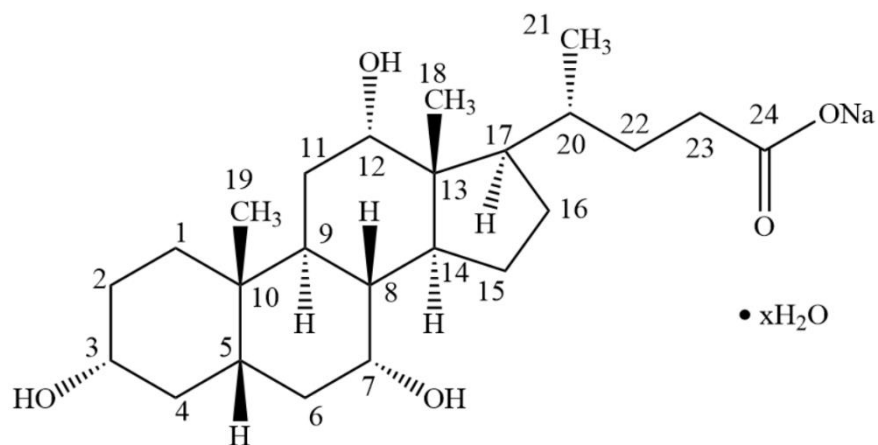
Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου, άνθρακα και κασσιτέρου (Nuclear Magnetic Resonance, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^{119}Sn -NMR) για τα σύμπλοκα **1-5** καθώς και πρωτονίου (^1H -NMR) για το χολικό οξύ (CAH) και το άλας του με νάτριο (CANa) λήφθηκαν σε διαλύτη d_6 -DMSO.

^1H -NMR

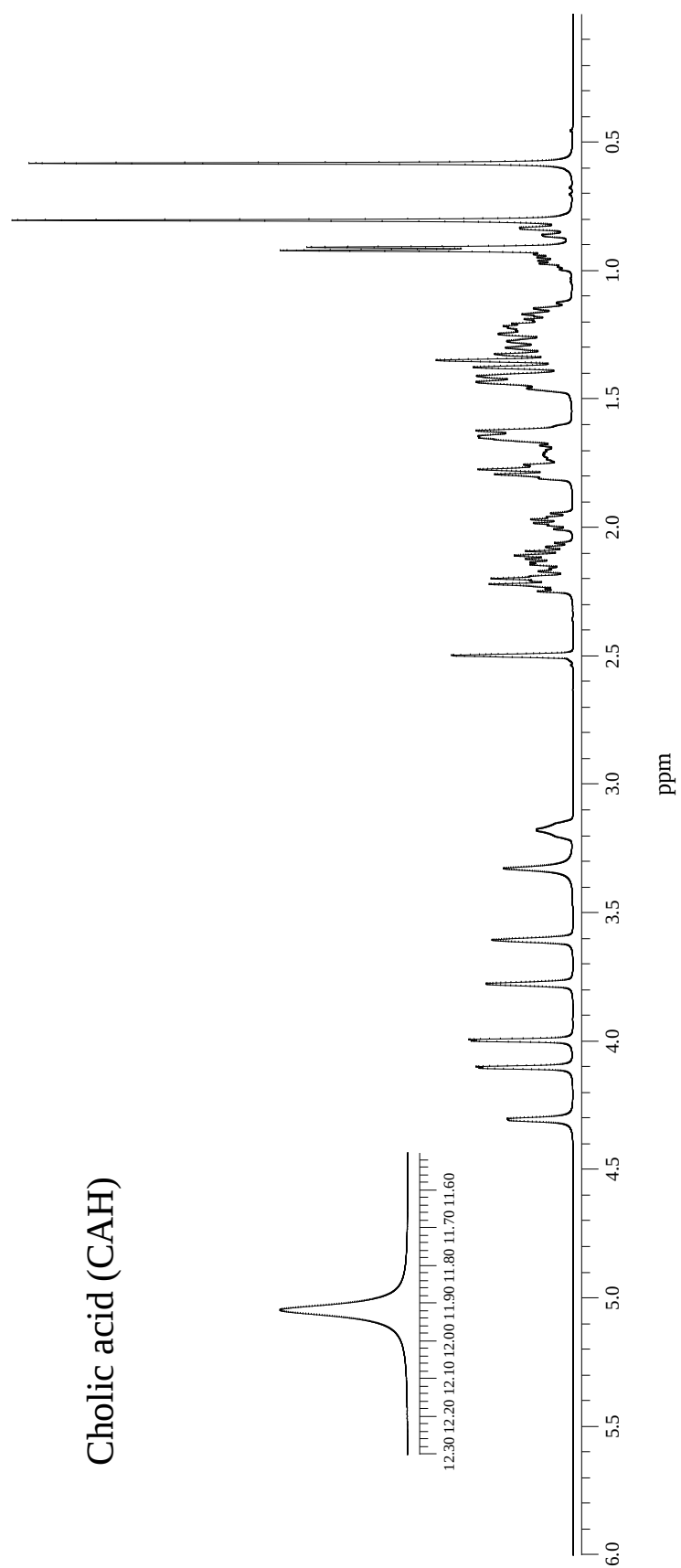
Το σήμα συντονισμού στα 12 ppm στο φάσμα του χολικού οξέος (CAH) οφείλεται στο πρωτόνιο της καρβοξυλομάδας ($\text{H}[\text{OOC}24]$, Σχήμα 1, Εικόνα 5.5.1). Αυτό το σήμα απουσιάζει στο φάσμα του χολικού άλατος με νάτριο (Σχήμα 2, Εικόνα 5.5.2) καθώς και στα σύμπλοκα **1-5** επιβεβαιώνοντας τον συντονισμό του χολικού οξέος στον κασσίτερο μέσω της καρβοξυλομάδας του. Τα σήματα συντονισμού στα 3.78, 3.61 3.18 ppm στο φάσμα του CAH και 3.78, 3.60, 3.18 ppm στο φάσμα του CANa αντιστοιχούν στα πρωτόνια $\text{H}[\text{C}12]$, $\text{H}[\text{C}7]$, και $\text{H}[\text{C}3]$, αντίστοιχα. Τα σήματα των υδροξυλομάδων του χολικού οξέος εμφανίζονται στα 4.31, 4.10, 3.99 ppm και του χολικού άλατος με νάτριο στα 4.36, 4.11 και 4.02 και αντιστοιχούν στα $\text{H}[\text{OC}3]$, $\text{H}[\text{OC}12]$ και $\text{H}[\text{OC}7]$ αντίστοιχα (Σχήματα 1 και 2) [186-187]. Τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων $\text{H}[\text{C}21]$, $\text{H}[\text{C}19]$ και $\text{H}[\text{C}18]$ για το χολικό οξύ εμφανίζονται στα 0.92-0.91, 0.80 και 0.58 ppm και για το άλας με νάτριο στα 0.90-0.89, 0.80 και 0.58 ppm, αντίστοιχα [186-187]. Τα σήματα συντονισμού για τα υπόλοιπα πρωτόνια εμφανίζονται μεταξύ 2.25-1.00 ppm [186-188].



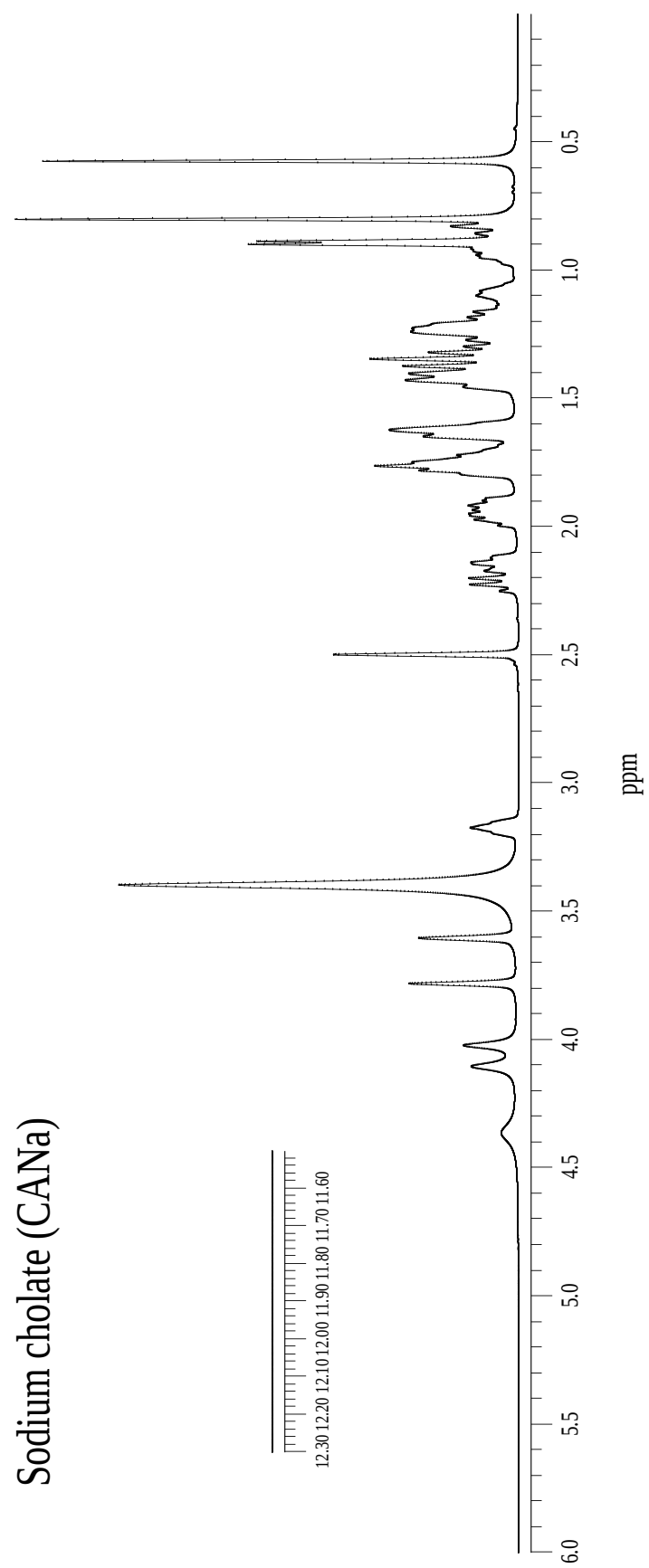
Σχήμα 1. Το μόριο του χολικού οξέος (CAH). Η αρίθμηση αφορά τα άτομα άνθρακα του χολικού οξέος.



Σχήμα 2. Το μόριο του χολικού άλατος με νάτριο (CANa). Η αρίθμηση αφορά τα άτομα άνθρακα του CANa.



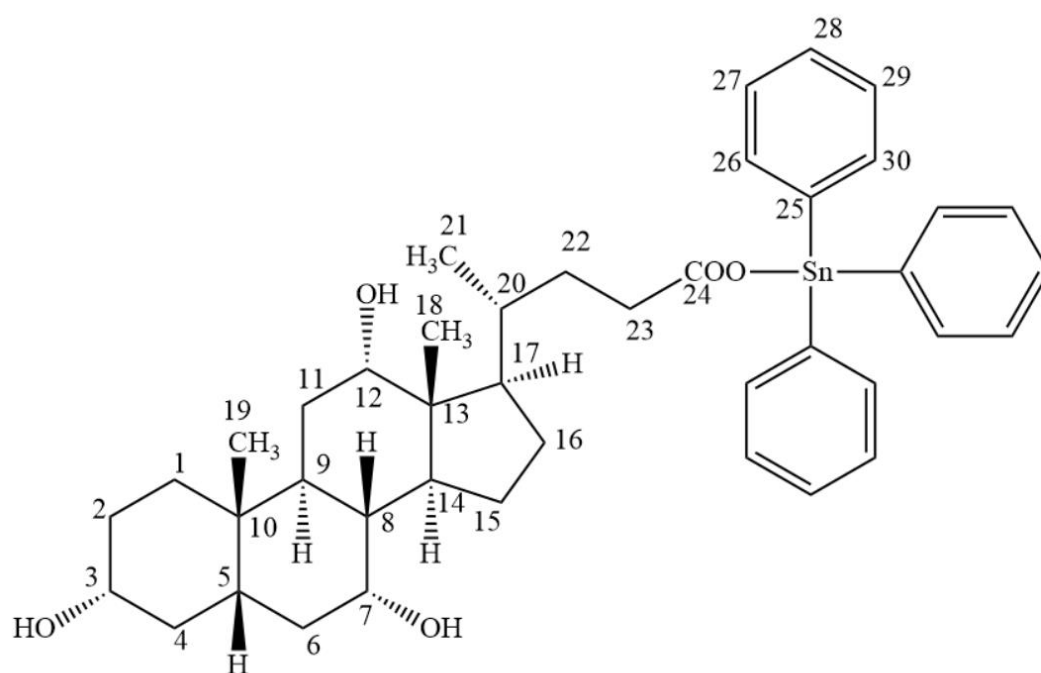
Εικόνα 5.5.1. Φάσμα ^1H -NMR του χολικού οξέος (CAH).



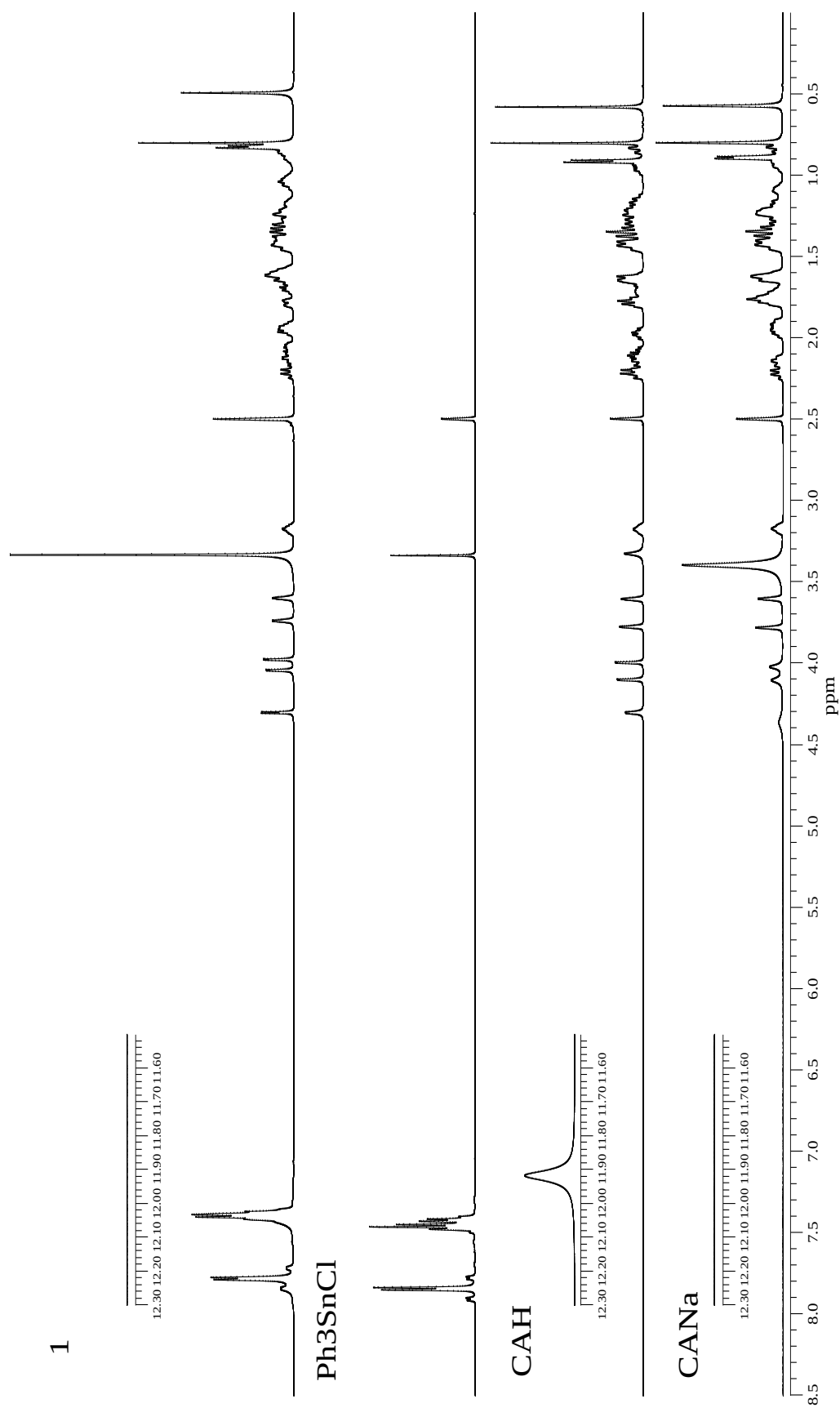
Εικόνα 5.5.2. Φάσμα ^1H -NMR του χολικού άλατος με νάτριο (CANa).

Για το σύμπλοκο **1** (Σχήμα 3, Εικόνα 5.5.3) παρατηρούμε την ύπαρξη σημάτων συντονισμού των αρωματικών πρωτονίων της φαινυλομάδας του τρι-φαινυλο-κασσιτέρου να εμφανίζονται μετατοπισμένα στα 7.85-7.71 και 7.42-7.37 ppm (Πίνακας 5.5.2). Τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων του χολικού οξέος H[C21] και H[C18] στο σύμπλοκο **1** έχουν μετατοπιστεί στα 0.83-0.82 ppm και 0.49 ppm αντίστοιχα. Επιπλέον τα σήματα των πρωτονίων των ανθράκων 3, 7 και 12 όσο και των υδροξυλομάδων σε αυτούς τους άνθρακες εμφανίζουν μικρή μετατόπιση (Πίνακας 5.5.1). Τα υπόλοιπα πρωτόνια δεν εμφανίζουν κάποια μετατόπιση.

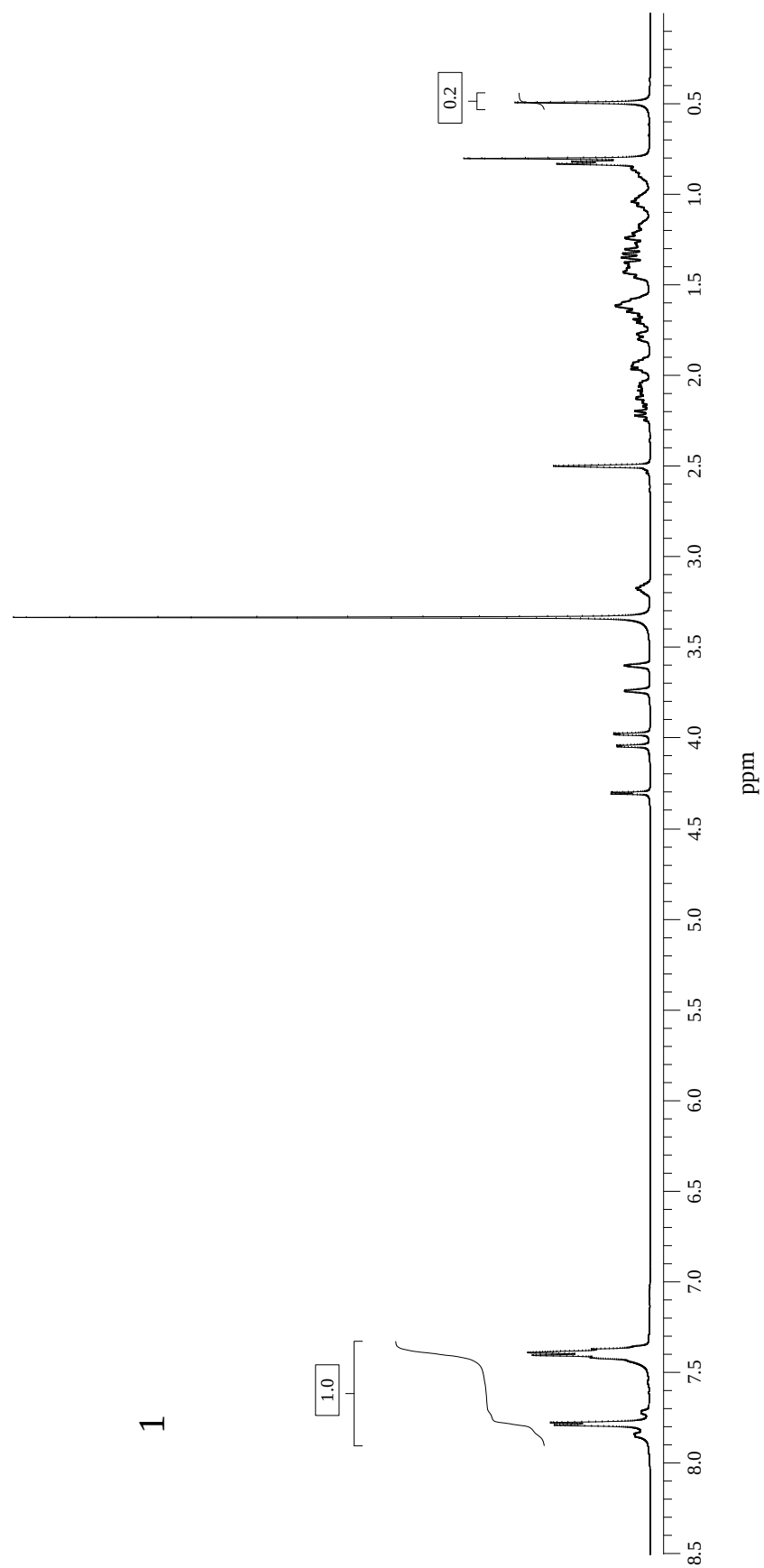
Από την ολοκλήρωση των σημάτων συντονισμού των φαινυλομάδων του Ph₃SnCl (15 πρωτόνια) και των πρωτονίων H[C18] του χολικού οξέος (3 πρωτόνια), προκύπτει πως το σύμπλοκο **1** έχει δημιουργηθεί με αναλογία 1:1 (3/15=0.2) (Εικόνα 5.5.4).



Σχήμα 3. Το μόριο του συμπλόκου **1**. Οι αριθμοί δηλώνουν τα άτομα άνθρακα.



Εικόνα 5.5.3. Το φάσμα ^1H -NMR του συμπλόκου **1** συγκρίσει των Ph_3SnCl , CAH και CANa.



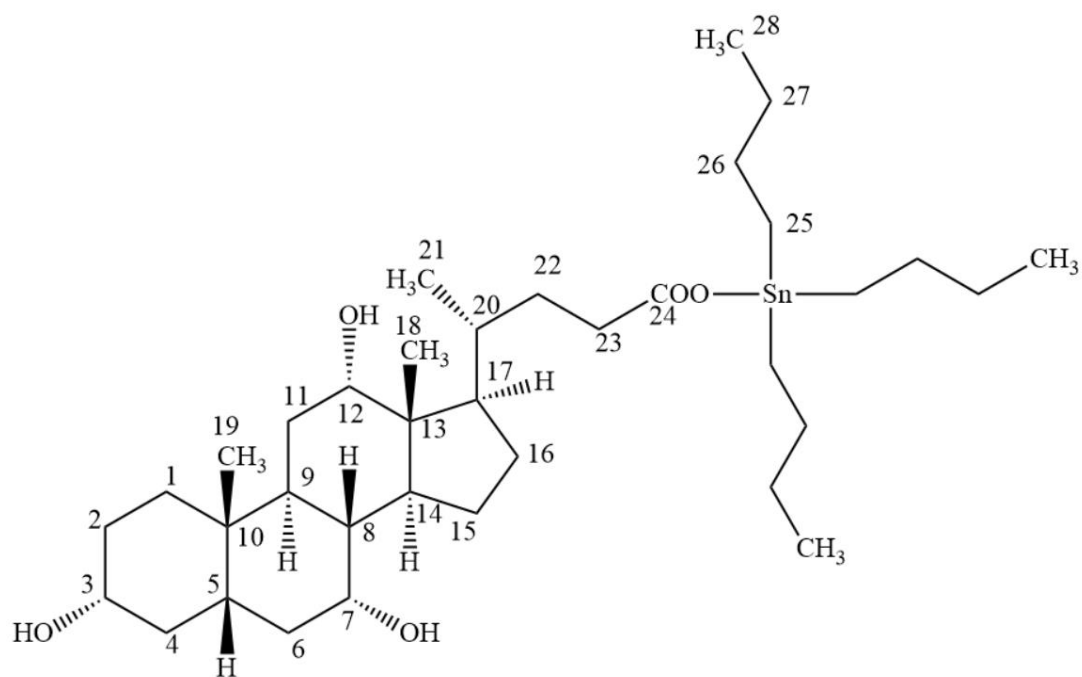
Εικόνα 5.5.4. Ολοκλήρωση σημάτων συντονισμού χαρακτηριστικών για το σύμπλοκο **1**.

Πίνακας 5.5.1. Χαρακτηριστικά πρωτόνια για το σύμπλοκο **1**, τον προσδέτη και το οργανοκασσιτερικό παράγωγο, Ph₃SnCl.

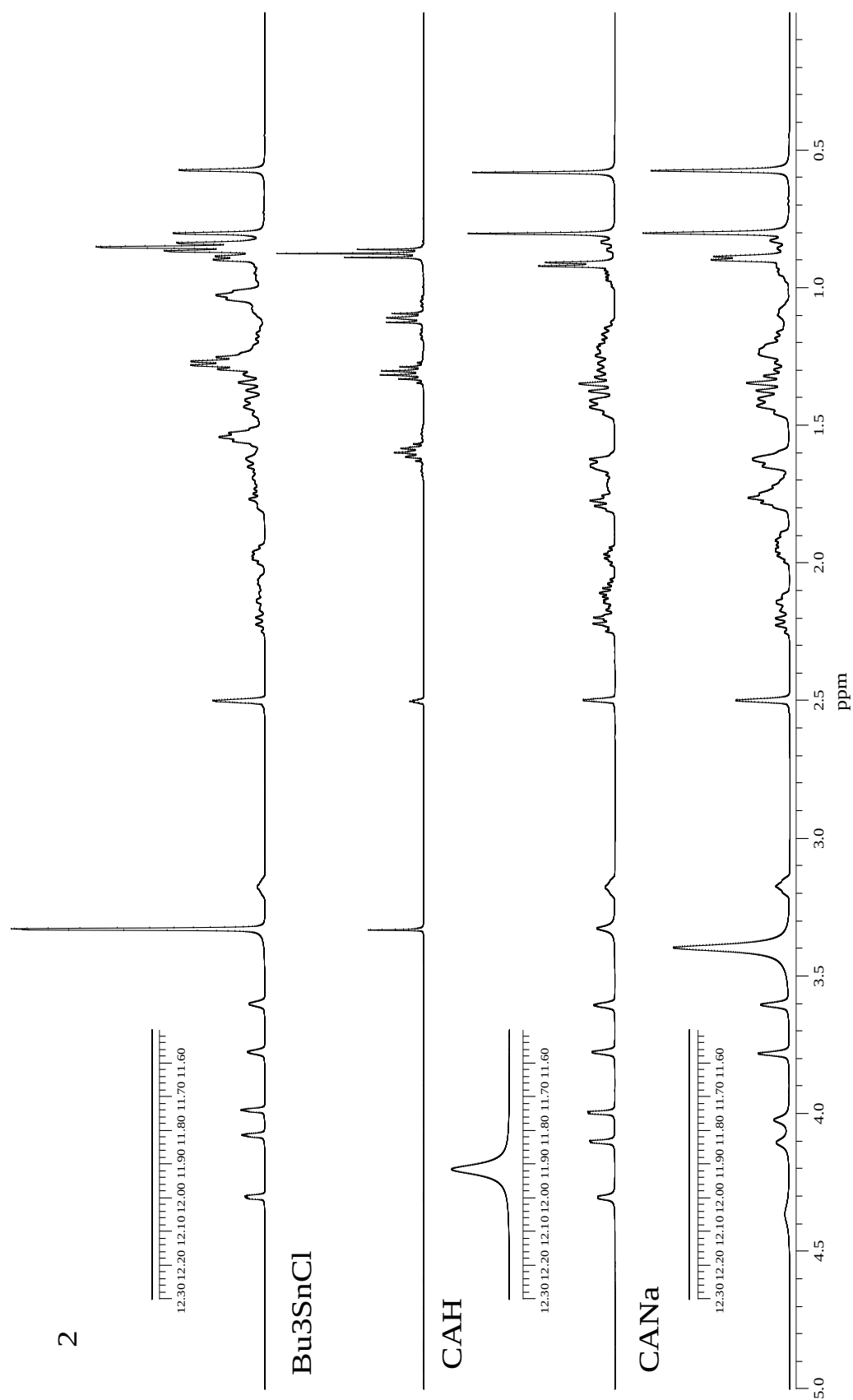
	Σύμπλοκο			
¹ H	1 (ppm)	CAH (ppm)	CANa (ppm)	Ph ₃ SnCl (ppm)
3	3.18	3.18	3.18	—
7	3.60	3.61	3.60	—
12	3.74	3.78	3.78	—
18	0.49	0.58	0.58	—
19	0.80	0.80	0.80	—
21	0.83-0.82	0.92-0.91	0.90-0.89	—
OH-3	4.30	4.31	4.36	—
OH-7	3.97	3.99	4.02	—
OH-12	4.04	4.10	4.11	—
Ph ring	7.85-7.37	—	—	7.94-7.40

Για το σύμπλοκο **2** (Σχήμα 4, Εικόνα 5.5.5) παρατηρούμε την ύπαρξη σημάτων συντονισμού των μεθυλομάδων του τρι-βούτυλο κασσιτέρου στα 1.57-1.51 ppm (m, ⁻²⁶CH₂-CH₂-Sn), 1.29-1.23 ppm (t, ⁻²⁷CH₂-CH₂-CH₂-Sn), 1.04-1.01 ppm (m, ⁻²⁵CH₂-Sn) και 0.86-0.83 ppm (t, ²⁸CH₃-CH₂-CH₂-CH₂-Sn) τα οποία έχουν μετατοπιστεί σε σχέση με το χλωρίδιο (Πίνακας 5.5.2). Επιπλέον τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων του προσδέτη H[C21] και H[C18] έχουν μετατοπιστεί στα 0.89-0.88 ppm και 0.57 ppm αντίστοιχα. Δεν παρατηρείται μετατόπιση στα υπόλοιπα πρωτόνια του προσδέτη για το σύμπλοκο **2**.

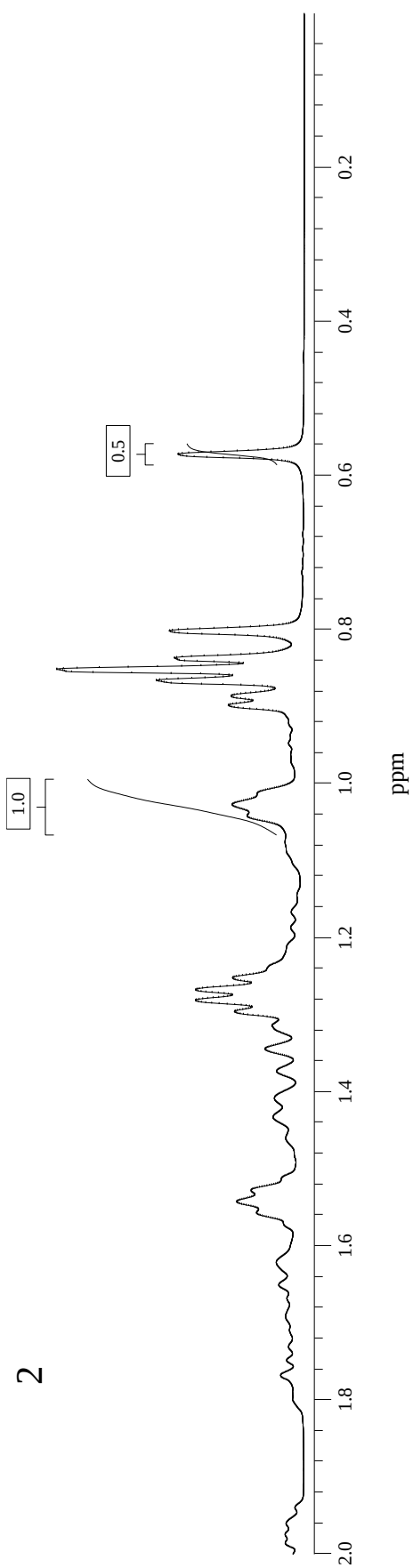
Από την ολοκλήρωση των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων ⁻²⁵CH₂-Sn του *n*-Bu₃SnCl (6 πρωτόνια) και των πρωτονίων H[C18] του χολικού οξέος (3 πρωτόνια) στο σύμπλοκο **2**, προκύπτει πως το σύμπλοκο **2** έχει δημιουργηθεί με αναλογία 1:1 (3/6=0.5) (Εικόνα 5.5.6).



Σχήμα 4. Το μόριο του συμπλόκου 2. Η αρίθμηση αφορά στα άτομα άνθρακα.



Εικόνα 5.5.5. Το φάσμα ^1H -NMR του συμπλόκου **2** συγκρίσει των *n*-Bu₃SnCl, CAH και CANa.



Εικόνα 5.5.6. Ολοκλήρωση των χαρακτηριστικών σημάτων συντονισμού για το σύμπλοκο 2.

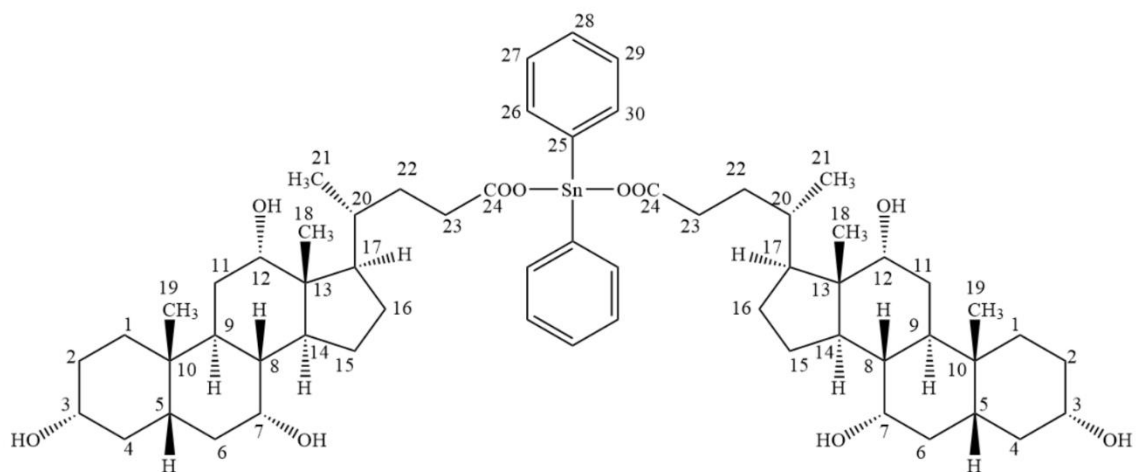
Πίνακας 5.5.2. Χαρακτηριστικά πρωτόνια για το σύμπλοκο **2**, τον προσδέτη και το οργανοκασσιτερικό παράγωγο, *n*-Bu₃SnCl.

	Σύμπλοκο			
¹ H	2 (ppm)	CAH (ppm)	CANa (ppm)	<i>n</i> -Bu ₃ SnCl (ppm)
3	3.18	3.18	3.18	—
7	3.60	3.61	3.60	—
12	3.78	3.78	3.78	—
18	0.57	0.58	0.58	—
19	0.80	0.80	0.80	—
21	0.89-0.88	0.92-0.91	0.90-0.89	—
OH-3	4.30	4.31	4.36	—
OH-7	3.99	3.99	4.02	—
OH-12	4.10	4.10	4.11	—
25	1.04-1.01	—	—	1.12-1.10
26	1.57-1.51	—	—	1.62-1.56
27	1.29-1.23	—	—	1.34-1.27
28	0.86-0.83	—	—	0.89-0.86

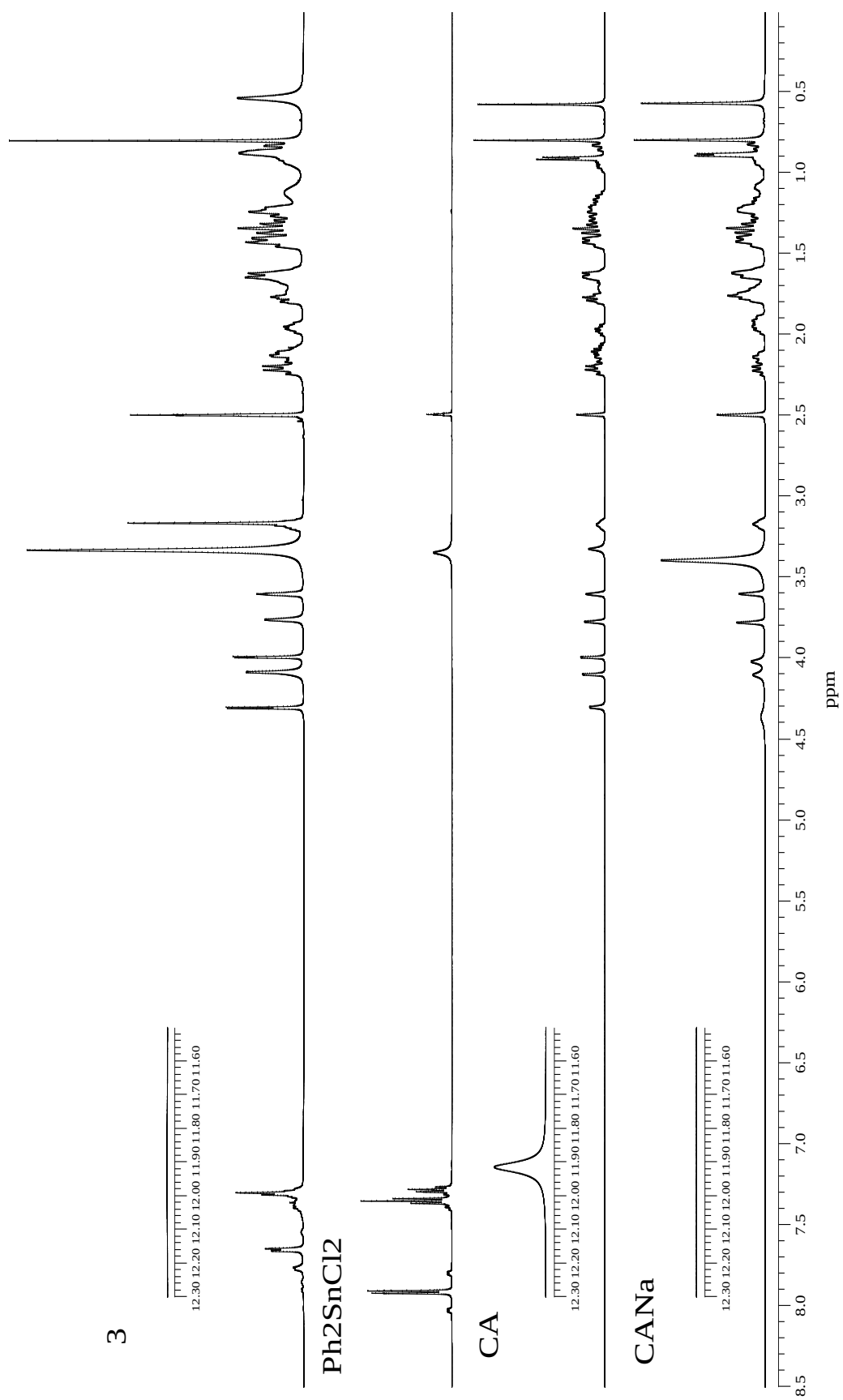
Στο σύμπλοκο **3** (Σχήμα 5, Εικόνα 5.5.7) παρατηρούμε τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων της φαινυλομάδας του δι-φαινύλο-κασσιτέρου να έχουν μετατοπιστεί στα 7.91-7.28 ppm σε σχέση με το χλωρίδιο (Πίνακας 5.5.3). Επιπλέον τα σήματα των πρωτονίων H[C21] και H[C18] του χολικού οξέος έχουν μετατοπιστεί στα 0.88-0.84 και 0.54 ppm αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα πρωτόνια του CAH στο σύμπλοκο **3** δεν εμφανίζουν κάποια μετατόπιση.

Η ολοκλήρωση μεταξύ των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων της φαινυλομάδας του Ph₂SnCl₂ (10 πρωτόνια) και των πρωτονίων H[C18] του χολικού οξέος (6 πρωτόνια)

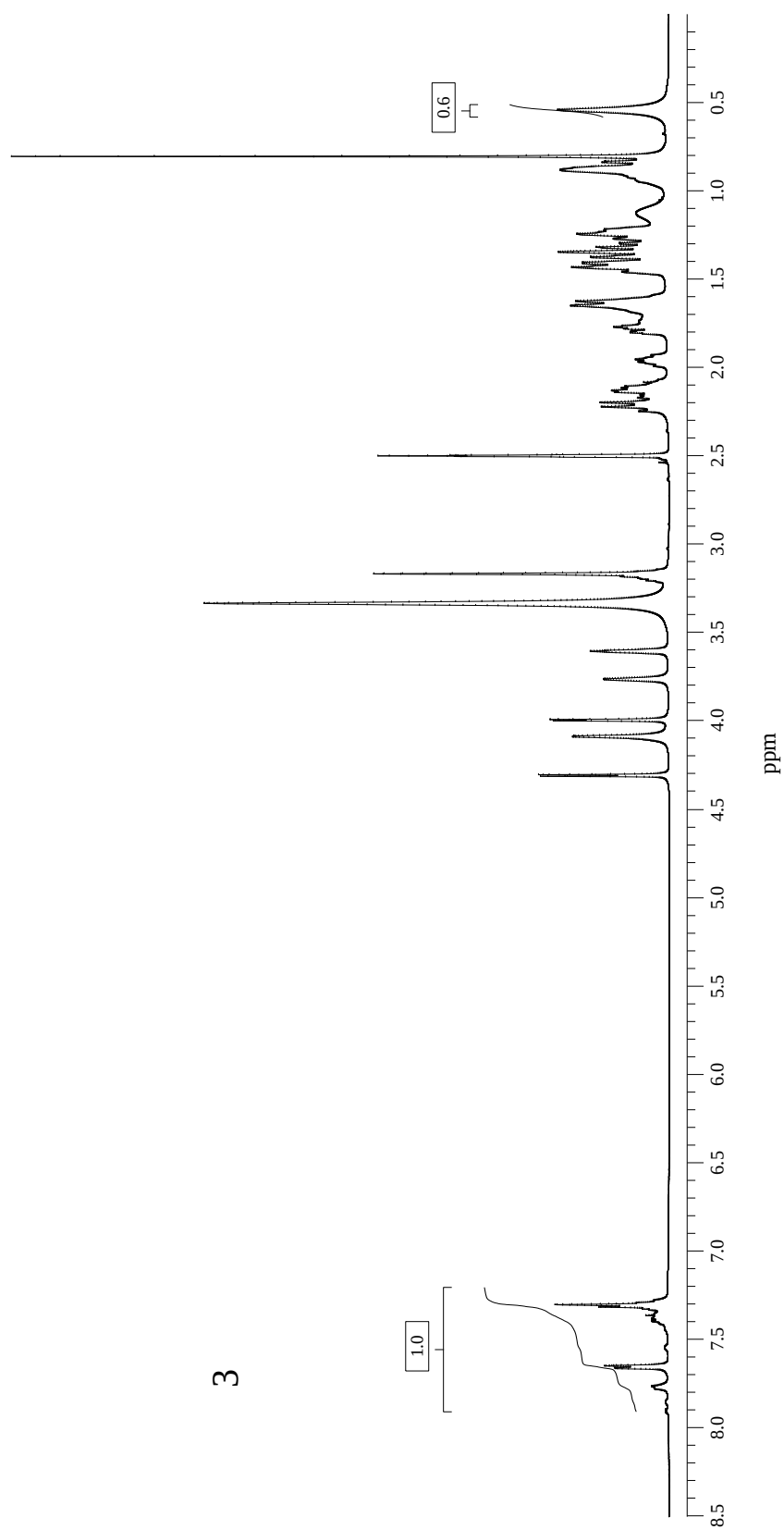
δηλώνει πως το σύμπλοκο **3** έχει δημιουργηθεί με αναλογία 1:2, ένας κασσίτερος με δυο χολικά οξέα (6/10=0.6) (Εικόνα 5.5.8).



Σχήμα 5. Το μόριο του συμπλόκου **3**. Η αρίθμηση αναφέρεται στα άτομα άνθρακα.



Εικόνα 5.5.7. Το φάσμα ^1H -NMR του συμπλόκου **3** συγκρίσει των Ph_2SnCl_2 , CAH και CANa .

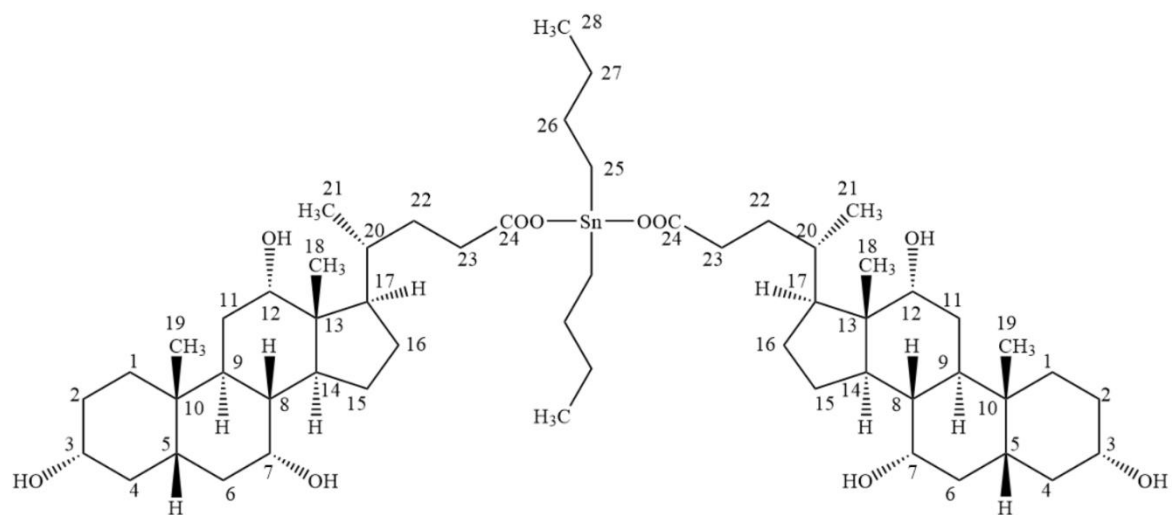


Εικόνα 5.5.8. Ολοκλήρωση των χαρακτηριστικών σημάτων για το σύμπλοκο **3**.

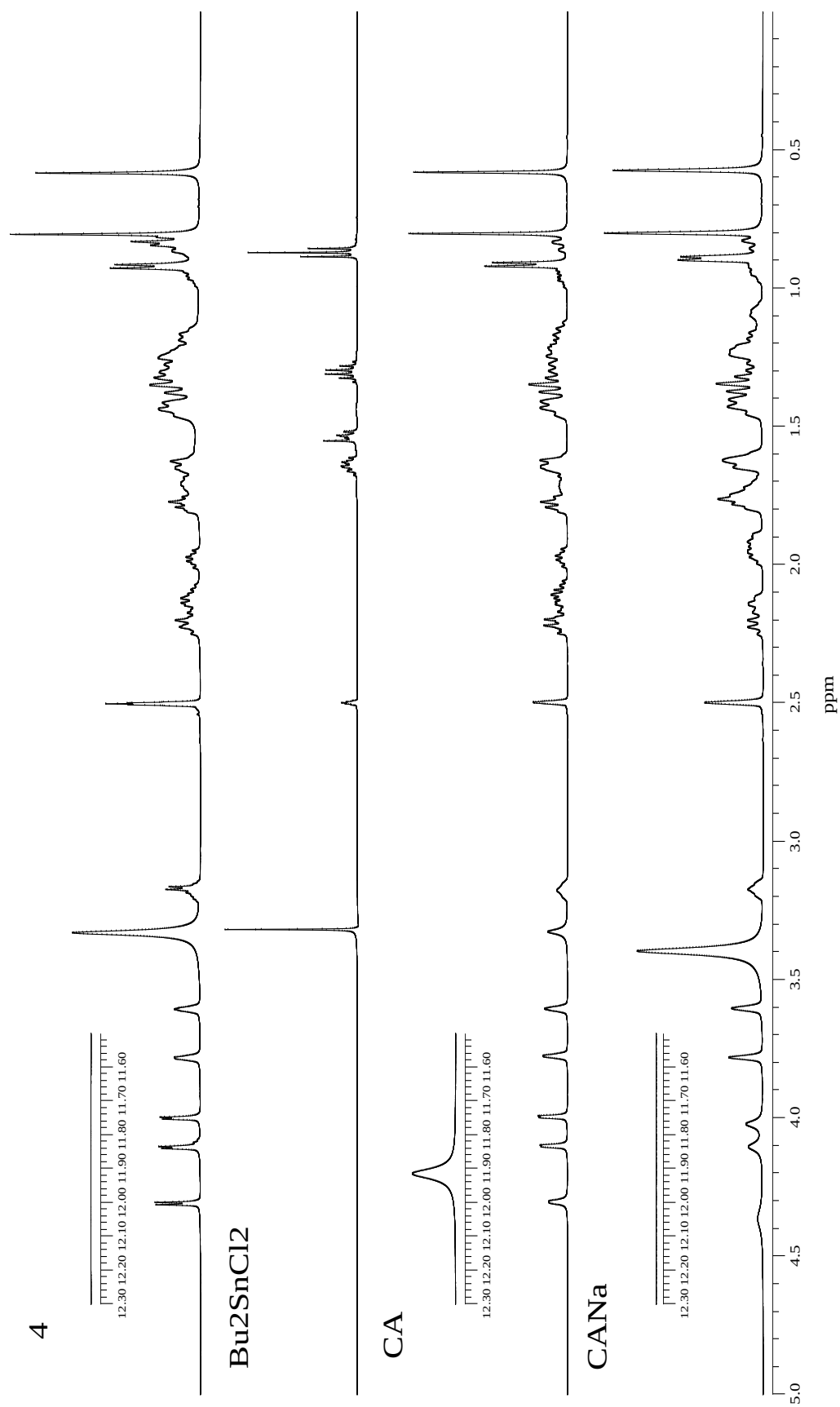
Πίνακας 5.5.3. Χαρακτηριστικά πρωτόνια του συμπλόκου **3**, του προσδέτη και του οργανοκασσιτερικού παραγώγου, Ph₂SnCl₂.

	Σύμπλοκο			
¹ H	3 (ppm)	CAH (ppm)	CANa (ppm)	Ph ₂ SnCl ₂ (ppm)
3	3.17	3.18	3.18	—
7	3.61	3.61	3.60	—
12	3.76	3.78	3.78	—
18	0.54	0.58	0.58	—
19	0.80	0.80	0.80	—
21	0.88-0.84	0.92-0.91	0.90-0.89	—
OH-3	4.31	4.31	4.36	—
OH-7	3.99	3.99	4.02	—
OH-12	4.09	4.10	4.11	—
Ph-ring	7.91-7.28	—	—	8.03-7.26

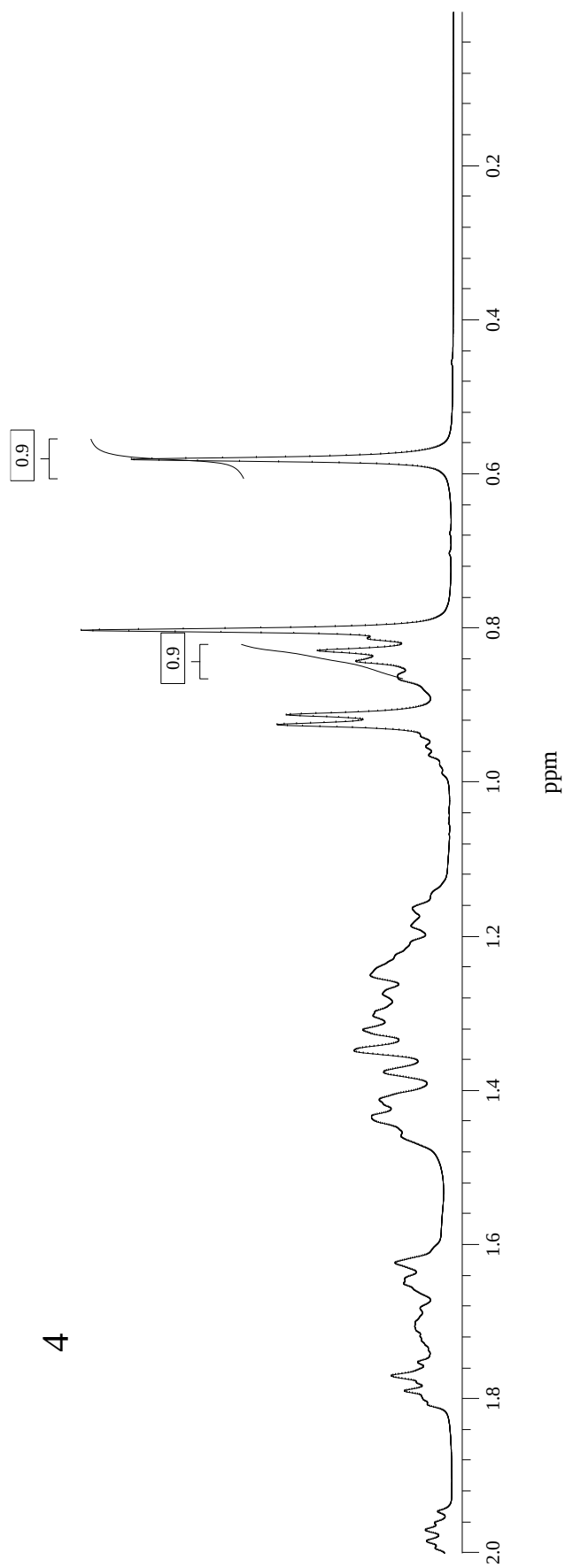
Τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων του διβούτυλο-κασσιτέρου δεν είναι καλά εμφανή στο σύμπλοκο **4** (Σχήμα 6, Εικόνα 5.5.9), ωστόσο το σήμα συντονισμού των πρωτονίων ²⁸CH₃-CH₂-CH₂-CH₂-Sn εμφανίζονται στα 0.86-0.82 ppm μετατοπισμένα σε σχέση με του χλωριδίου (Πίνακας 5.5.4). Επιπλέον δεν παρατηρείται κάποια μετατόπιση στα σήματα των πρωτονίων του προσδέτη. Η ολοκλήρωση μεταξύ των εμφανών σημάτων του *n*-Bu₂SnCl₂ (6 πρωτόνια) με τα πρωτόνια H[C18] του προσδέτη CAH (6 πρωτόνια) προκύπτει πως το σύμπλοκο **4** έχει δημιουργηθεί με αναλογία 1:2 (6/6=1) (Εικόνα 5.5.10).



Σχήμα 6. Το μόριο του συμπλόκου **4**. Η αριθμοί δηλώνουν τα άτομα άνθρακα.



Εικόνα 5.5.9. Το φάσμα ^1H -NMR του συμπλόκου **4** συγκρίσει των $n\text{-Bu}_2\text{SnCl}_2$, CAH και CANa.



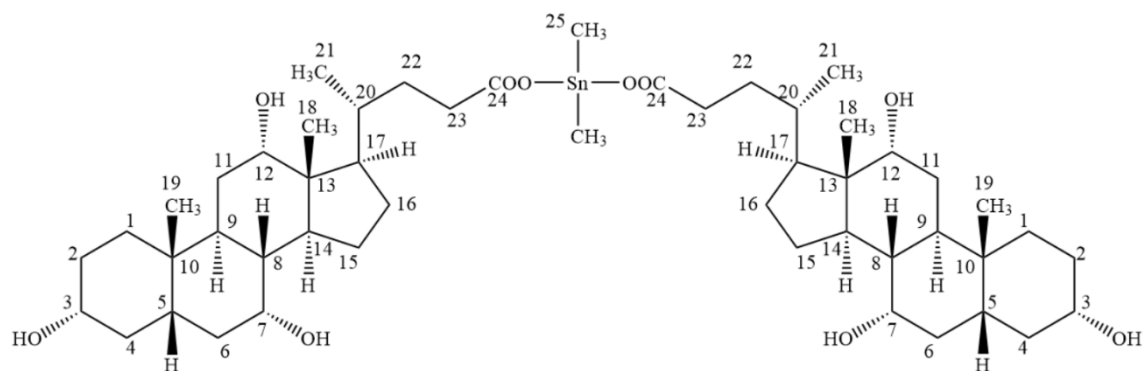
Εικόνα 5.5.10. Η ολοκλήρωση των χαρακτηριστικών σημάτων του συμπλόκου **4**.

Πίνακας 5.5.4. Χαρακτηριστικά πρωτόνια του συμπλόκου **4**, του προσδέτη και του οργανοκασσιτερικού παραγώγου, *n*-Bu₂SnCl₂.

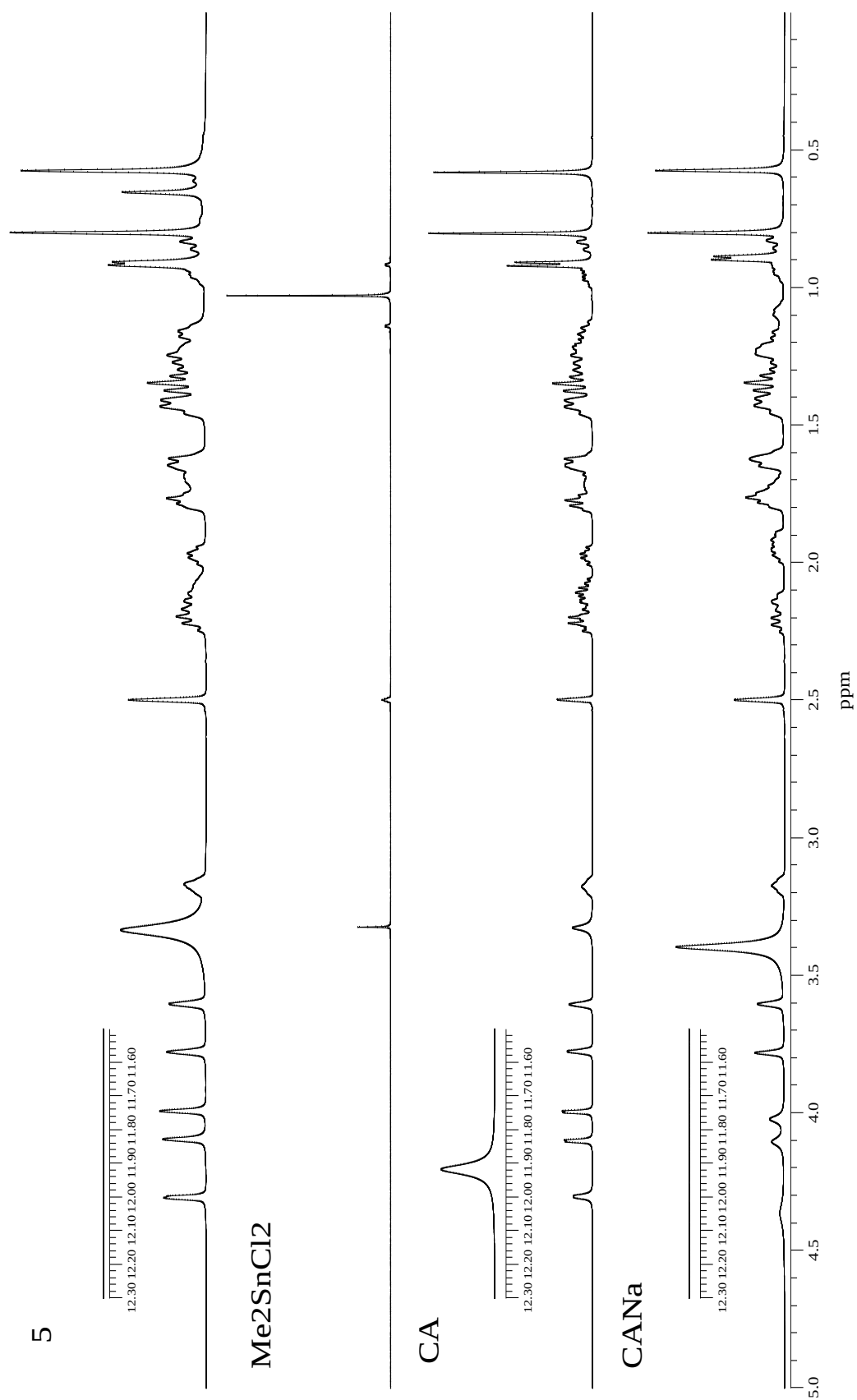
	Σύμπλοκο			
¹ H	4 (ppm)	CAH (ppm)	CANa (ppm)	<i>n</i> -Bu ₂ SnCl ₂ (ppm)
3	3.18	3.18	3.18	—
7	3.60	3.61	3.60	—
12	3.78	3.78	3.78	—
18	0.58	0.58	0.58	—
19	0.80	0.80	0.80	—
21	0.93-0.91	0.92-0.91	0.90-0.89	—
OH-3	4.31	4.31	4.36	—
OH-7	4.00	3.99	4.02	—
OH-12	4.11	4.10	4.11	—
25	—	—	—	1.67-1.61
26	—	—	—	1.55-1.51
27	—	—	—	1.34-1.27
28	0.86-0.82	—	—	0.88-0.86

Στο σύμπλοκο **5** (Σχήμα 7, Εικόνα 5.5.11) παρατηρείται η ύπαρξη του σήματος συντονισμού των μεθυλομάδων του διμέθυλο-κασσιτέρου στα 0.65 ppm όπου έχει μετατοπιστεί από τα 1.03 ppm στο χλωρίδιο. Επίσης τα σήματα συντονισμού του προσδέτη CAH των πρωτονίων H[C21] και H[C18] έχουν μια μικρή μετατόπιση στο σύμπλοκο **5** στα 0.92-0.90 ppm και 0.57 ppm αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα πρωτόνια του προσδέτη δεν παρουσιάζουν κάποια μετατόπιση στο σύμπλοκο **5** (Πίνακας 5.5.5). Από την ολοκλήρωση των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων του Me₂SnCl₂ (6 πρωτόνια) και των πρωτονίων H[C18]

του προσδέτη (6 πρωτόνια) στο σύμπλοκο **4** προκύπτει πως το σύμπλοκο αυτό έχει γίνει σε αναλογία 1:2 ($6/6=1$) (Εικόνα 5.5.12).

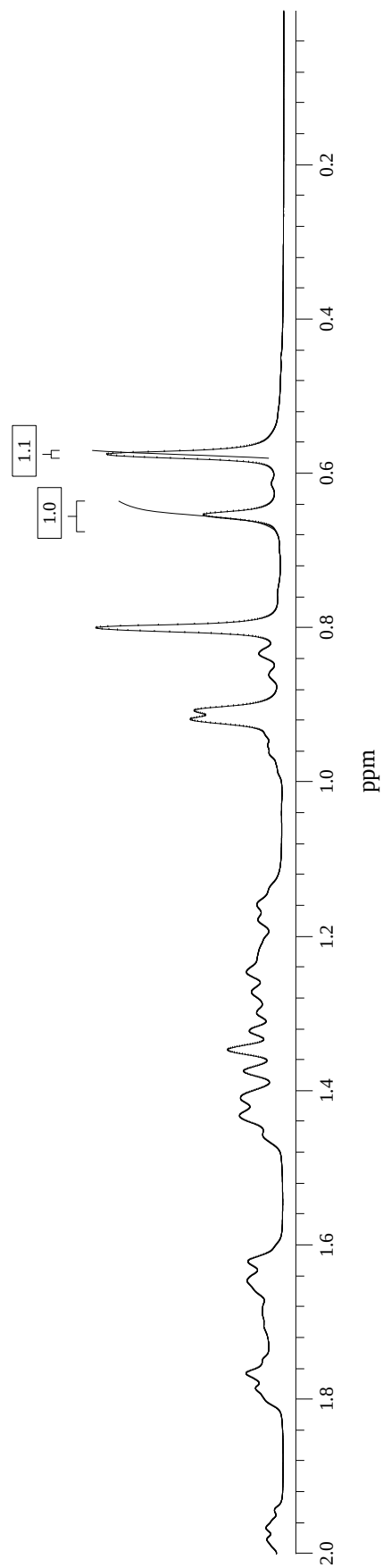


Σχήμα 7. Το μόριο του συμπλόκου **5**. Οι αριθμοί δηλώνουν τα άτομα άνθρακα.



Εικόνα 5.5.11. Το φάσμα ^1H -NMR του συμπλόκου **5** συγκρίσει των Me_2SnCl_2 , CAH και CANa.

5



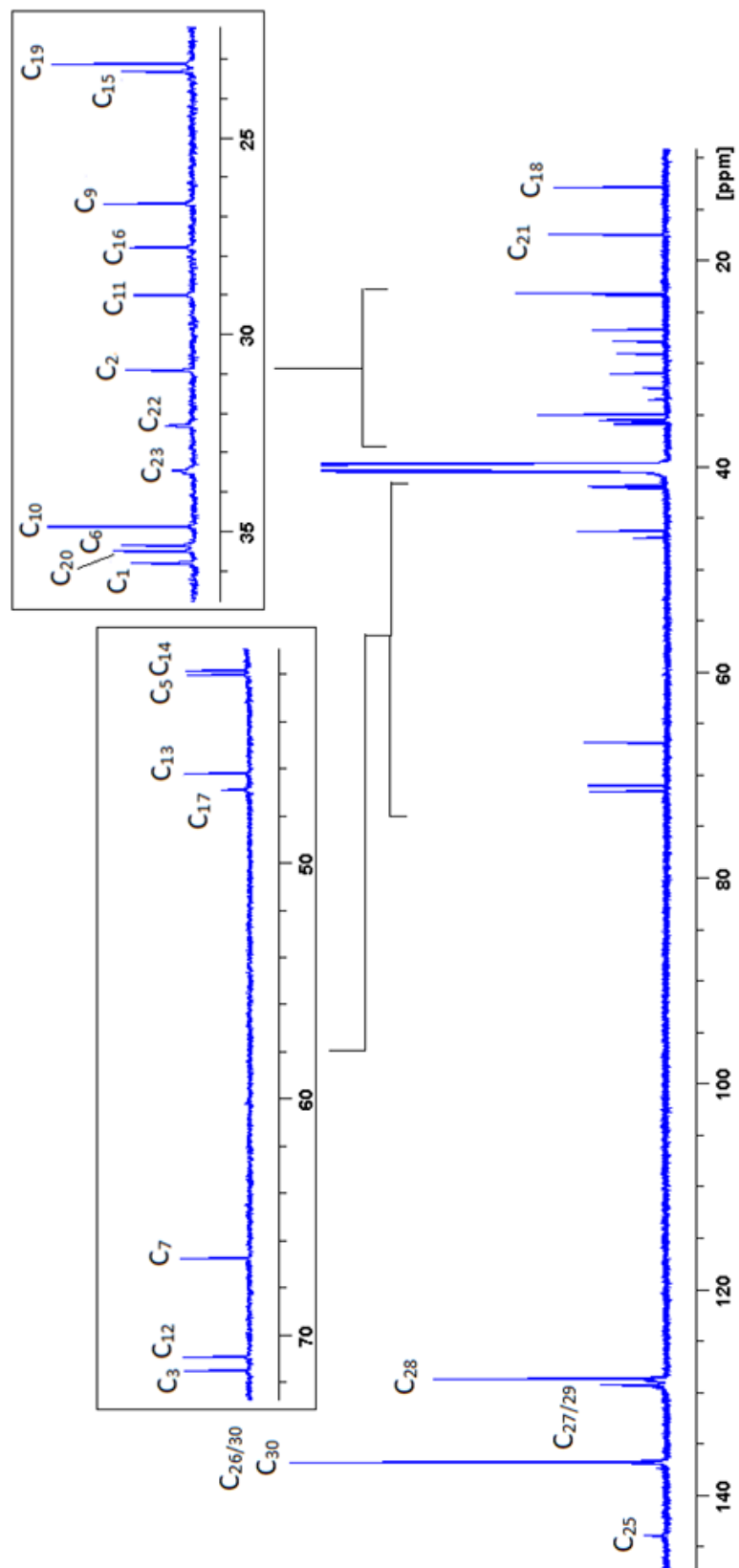
Εικόνα 5.5.12. Η ολοκλήρωση των χαρακτηριστικών σημάτων για το σύμπλοκο 5.

Πίνακας 5.5.5. Χαρακτηριστικά πρωτόνια του συμπλόκου 5, του προσδέτη και του οργανοκασσιτερικού παραγώγου, Me₂SnCl₂.

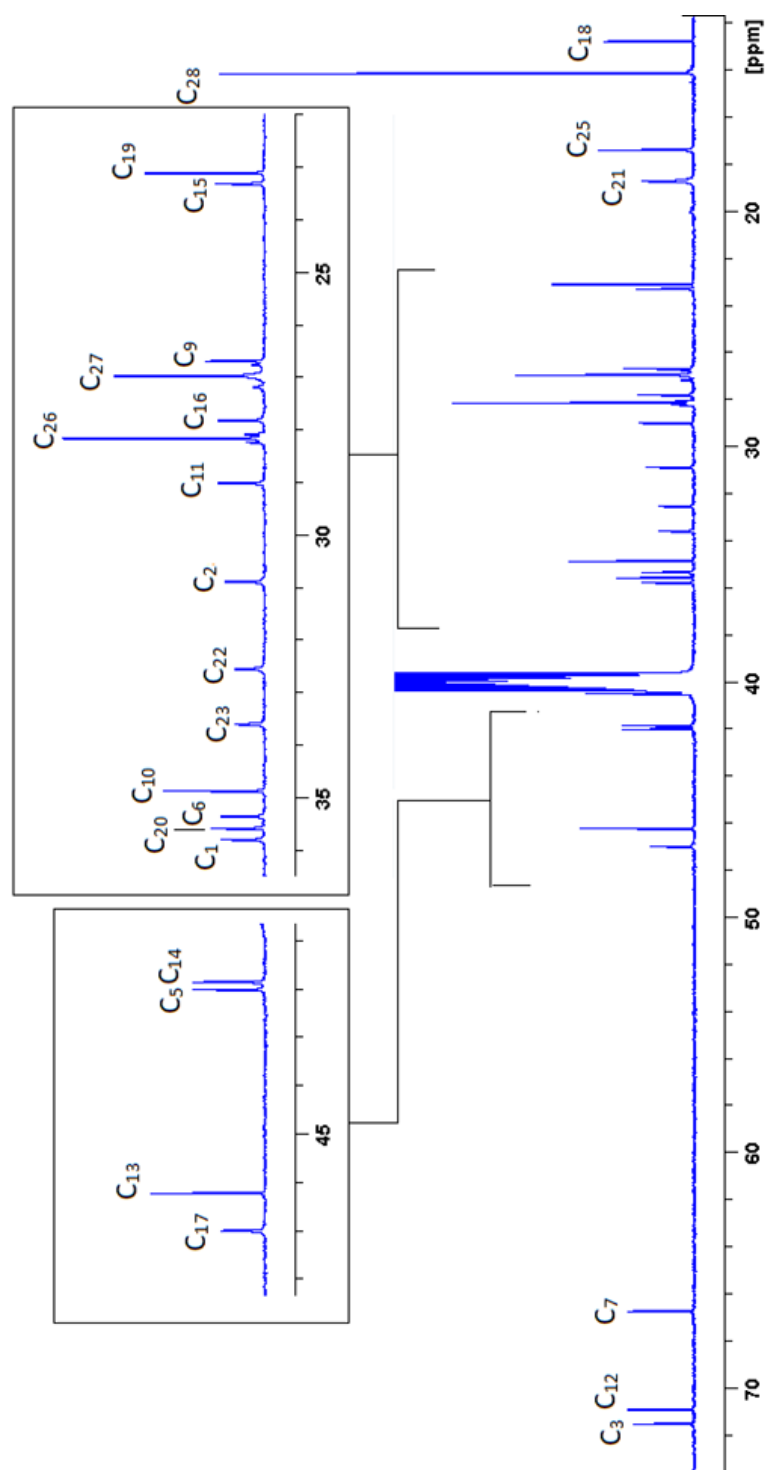
	Σύμπλοκο			
¹ H	5 (ppm)	CAH (ppm)	CANa (ppm)	Me ₂ SnCl ₂ (ppm)
3	3.17	3.18	3.18	—
7	3.60	3.61	3.60	—
12	3.78	3.78	3.78	—
18	0.57	0.58	0.58	—
19	0.80	0.80	0.80	—
21	0.92-0.90	0.92-0.91	0.90-0.89	—
OH-3	4.31	4.31	4.36	—
OH-7	3.99	3.99	4.02	—
OH-12	4.10	4.10	4.11	—
25	0.65	—	—	1.03

¹³C-NMR

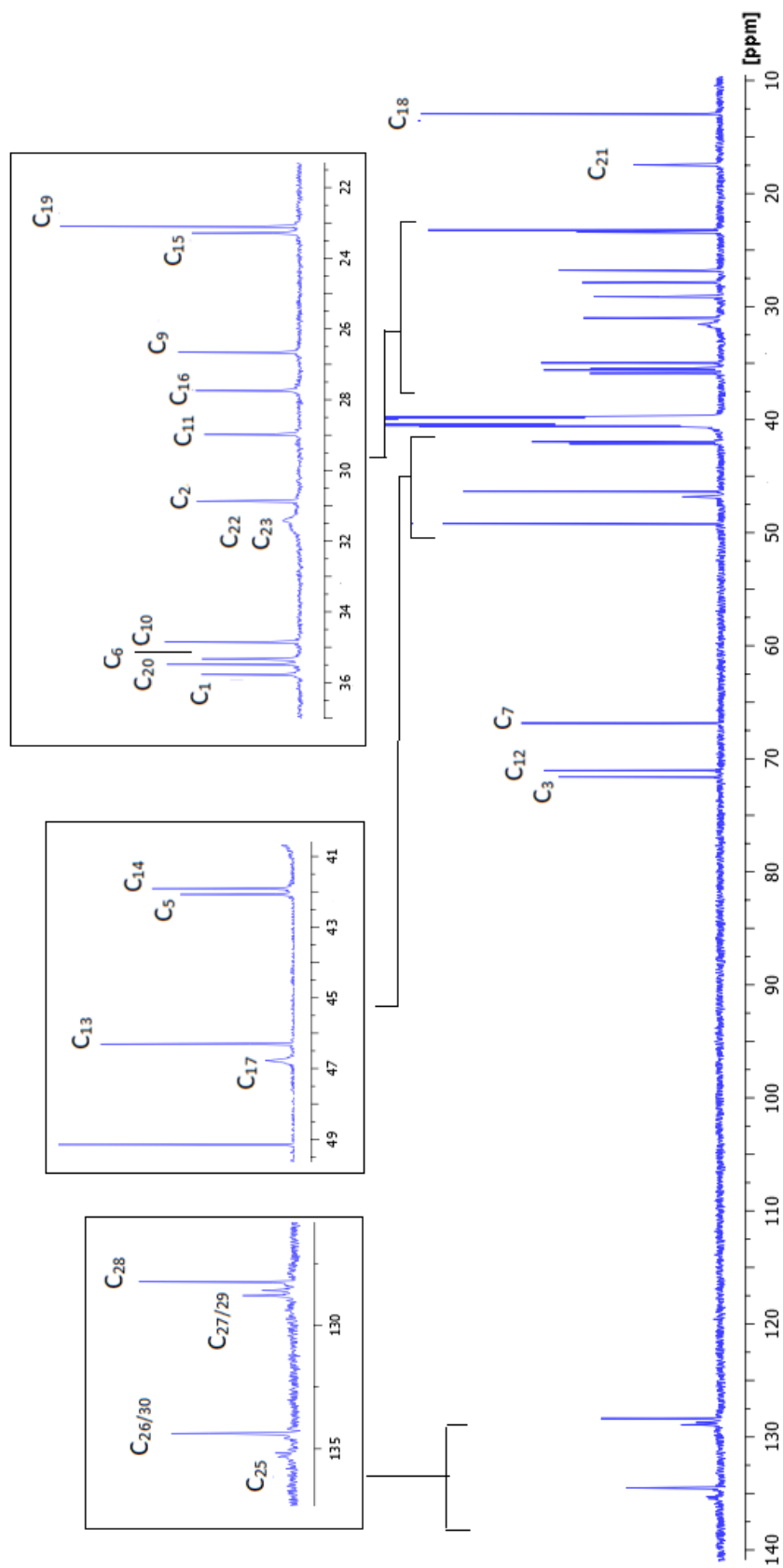
Τα φάσματα ¹³C-NMR για το σύμπλοκα 1-5 εμφανίζονται στις Εικόνες 5.5.13-5.5.17. Σε αυτά παρατηρούμε την ύπαρξη όλων των ανθράκων του προσδέτη καθώς επιπλέον εμφανίζονται και οι άνθρακες των οργανοκασσιτερικών παραγώγων. Ωστόσο για τα σύμπλοκα με τα δι-οργανοκασσιτερικά παράγωγα δεν είναι όλοι εμφανείς και βρέθηκαν κατόπιν πειραμάτων με 2D-NMR (Πίνακας 5.5.6).



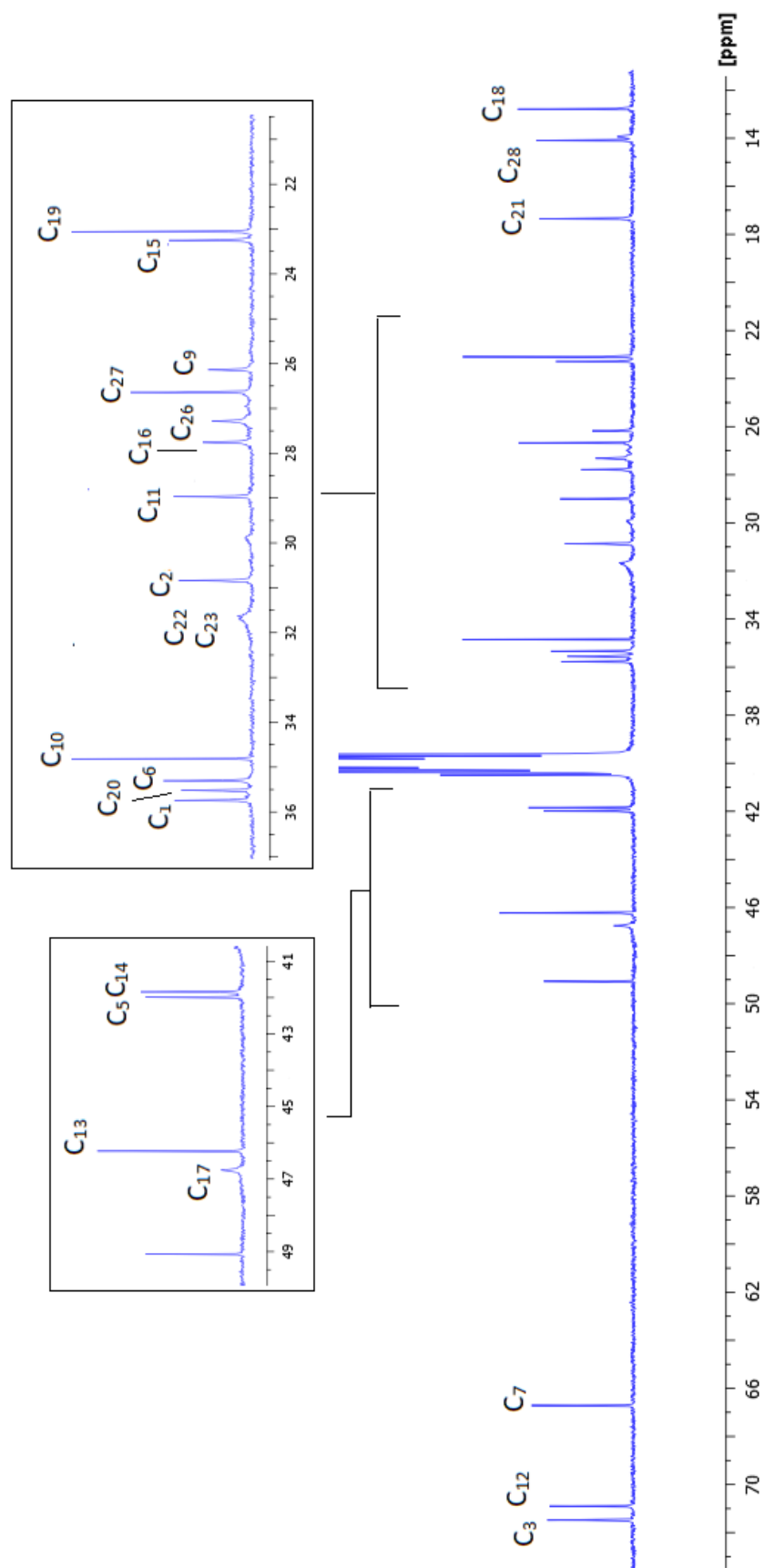
Εικόνα 5.5.13. Το φάσμα ^{13}C -NMR του συμπλόκου **1**. Η αρίθμηση αναφέρεται στο Σχήμα 3.



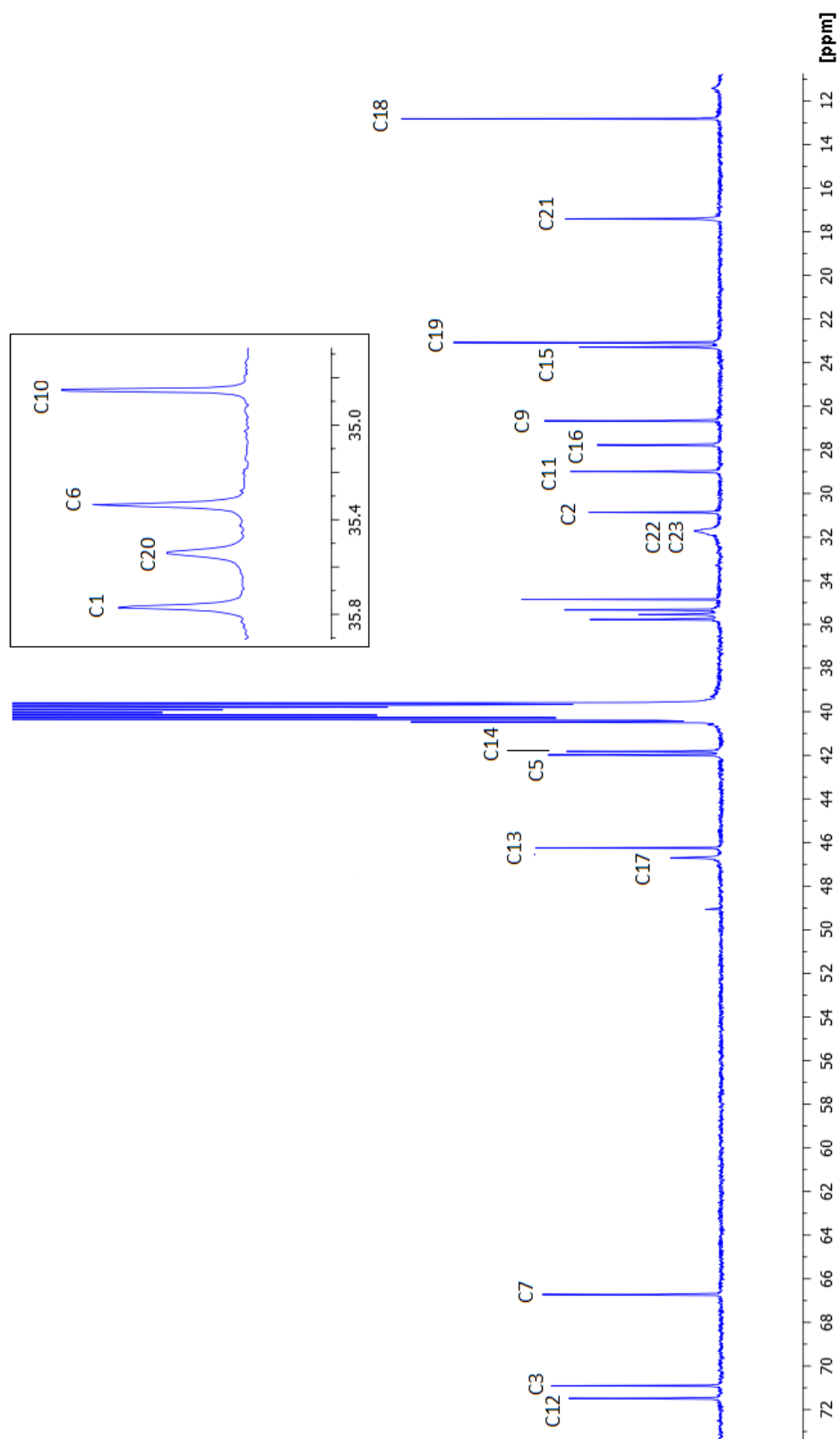
Εικόνα 5.5.14. Το φάσμα ^{13}C -NMR του συμπλόκου 2. Η αρίθμηση αναφέρεται στο Σχήμα 4.



Εικόνα 5.5.15. Το φάσμα ^{13}C -NMR του συμπλόκου **3**. Η αρίθμηση αναφέρεται στο Σχήμα 5.



Εικόνα 5.5.16. Το φάσμα ^{13}C -NMR του συμπλόκου **4**. Η αρίθμηση αναφέρεται στο Σχήμα 6.



Εικόνα 5.5.17. Το φάσμα ^{13}C -NMR του συμπλόκου 5. Η αριθμηση αναφέρεται στο Σχήμα 7.

Πίνακας 5.5.6. Οι τιμές των ατόμων άνθρακα στα σύμπλοκα **1-5** και τους προσδέτες.

	Σύμπλοκα						
¹³ C	1 (ppm)	2 (ppm)	3 (ppm)	4 (ppm)	5 (ppm)	CAH (ppm)	CANa
1	35.4	35.4	35.3	35.3	35.3	36.5 (37.7)*	30.1
2	30.1	30.5	30.4	28.6	30.6	31.2 (32.1)	33.1
3	70.5	70.5	71.0	71.0	70.4	72.9 (74.4)	69.4
4	39.9	39.9	39.9	39.9	39.9	40.5 (41.2)	39.2
5	41.6	41.6	41.5	41.5	41.5	43.2 (43.9)	41.8
6	34.9	34.9	34.9	34.9	34.9	35.9 (36.7)	34.5
7	66.3	66.3	66.3	66.2	66.3	69.1 (71.1)	72.5
8	39.9	39.8	39.8	39.8	39.8	41.0 (42.1)	39.8
9	26.3	26.3	26.2	25.7	26.2	27.9 (29.2)	27.2
10	–	34.4	34.4	–	45.8	35.9 (37.2)	35.1
11	28.6	28.6	28.5	28.5	28.9	29.6 (30.5))	28.3
12	71.1	71.1	70.4	70.4	71.0	74.0 (75.9)	74.2
13	–	45.8	45.8	45.8	48.6	47.6 (48.9)	46.9
14	41.4	41.5	41.4	41.4	41.4	43.0 (44.3)	42.4
15	22.9	22.9	22.8	22.8	22.8	24.2 (25.8)	23.6
16	27.4	27.4	27.3	27.3	27.3	28.7 (30.1)	28.0
17	46.5	46.6	46.2	46.3	46.2	48.1 (49.4)	47.6
18	12.4	12.4	12.3	12.3	12.4	13 (14.9)	12.7
19	22.7	22.7	22.6	22.6	22.6	23.2 (24.9)	17.1
20	35.1	35.2	35.0	35.1	35.1	37.8 (38.3)	36.1
21	16.9	17.0	16.4	16.9	16.9	17.7 (19.6)	22.7
22	31.9	32.1	30.9	31.2	34.4	32.4 (35.1)	35.4
23	33.1	33.2	30.9	31.2	31.2	32 (37.3)	35.4
24	–	177.8	–	–	–	178.3 (187.2)	185.5
25	143.4	18.3	134.7	–	11.1	–	–
26	136.7	27.7	133.9	26.8	–	–	–
27	128.8	26.6	128.3	26.2	–	–	–
28	128.2	13.7	127.8	13.6	–	–	–
29	128.8	–	128.3	–	–	–	–
30	136.7	–	134.7	–	–	–	–

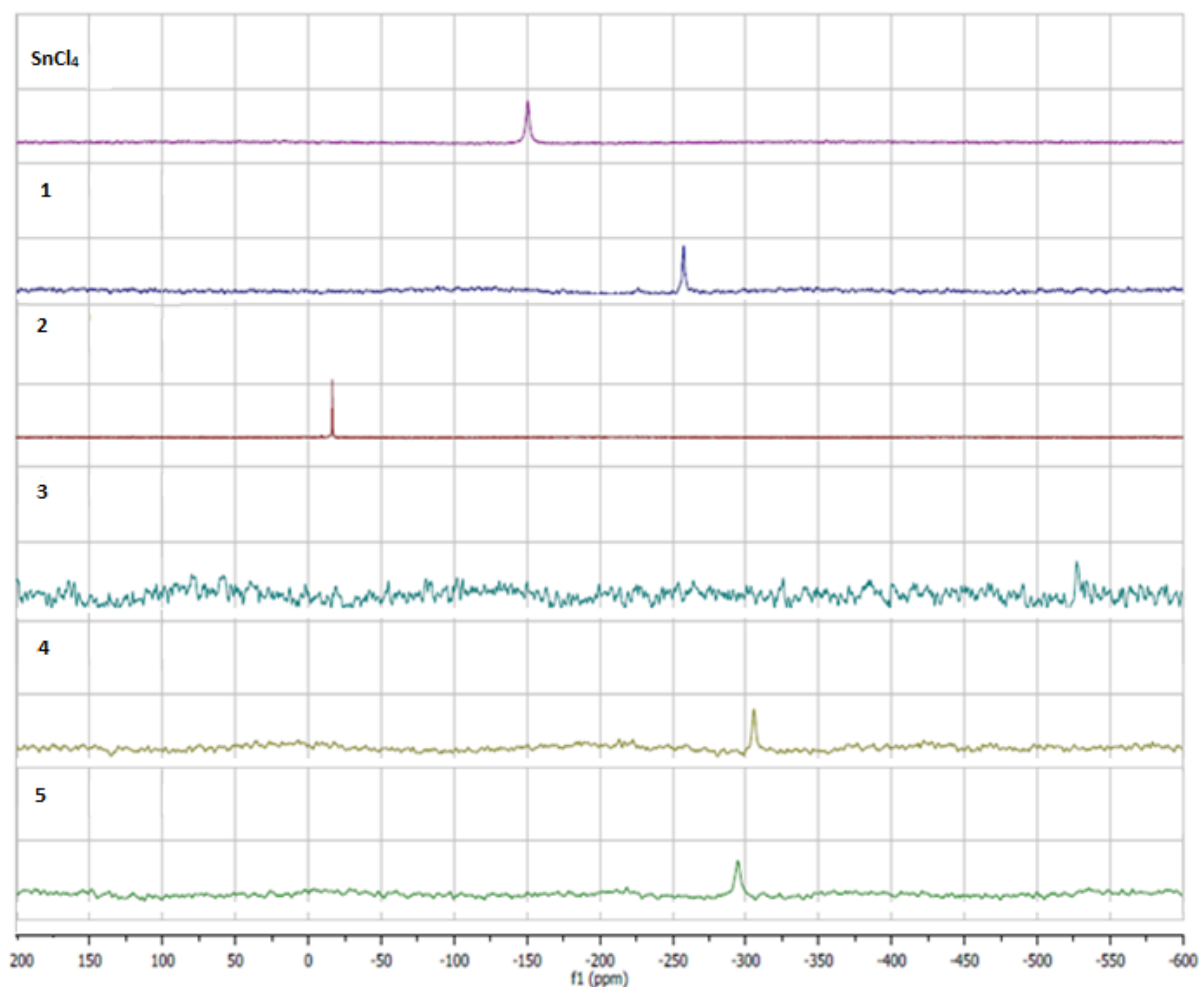
* Η τιμή στην παρένθεση αφορά στην πηγή [187]. Τα φάσματα για τα σύμπλοκα πάρθηκαν σε *d*₆-

DMSO ενώ για τους προσδέτες είναι σε D₂O.

Οι χημικές μετατοπίσεις στα φάσματα του ¹¹⁹Sn-NMR είναι ευαίσθητες σε αλλαγές στον αριθμό συντονισμού του κασσιτέρου καθώς και στη φύση και ηλεκτροαρνητικότητα των ομάδων ή ατόμων που προσδένονται απευθείας στο άτομο του κασσιτέρου. Όσο αυξάνει η ηλεκτροαρνητικότητα, αυξάνονται και οι χημικές μετατοπίσεις στα φάσματα του ¹¹⁹Sn-NMR [189]. Οι χημικές μετατοπίσεις των διαμαγνητικών κασσιτερικών ενώσεων καλύπτουν ένα εύρος 6500 ppm από ca. +4000 έως -2500 ppm με τη μετατόπιση του Me₄Sn = 0 [83,190]. Όσο αυξάνει η δυνατότητα απελευθέρωσης ηλεκτρονίων των αλκυλ-ομάδων, το άτομο του κασσιτέρου γίνεται πιο προστατευμένο και η τιμή του σήματος συντονισμού του ¹¹⁹Sn μετακινείται σε υψηλότερο πεδίο [190].

Ανάλογα τον αριθμό ένταξης του κεντρικού ατόμου κασσιτέρου εμφανίζονται και οι τιμές μετατόπισης του σήματος ¹¹⁹Sn έτσι βρίσκεται πως ο τέτρα-ενταγμένος κασσίτερος έχει μετατόπιση από +200 έως -60 ppm, ο πέντε-ενταγμένος από -90 έως -330 ppm και ο έξι-ενταγμένος κασσίτερος δίνει σήματα μετατόπισης από -210 έως -515 ppm [194-195,198]. Η γεωμετρία γύρω από τον τέτρα-ενταγμένο κασσίτερο είναι τετραεδρική, από τον πέντε-ενταγμένο είναι τριγωνική διπυραμίδα ή τετραγωνική πυραμίδα, ενώ για τον έξι-ενταγμένο κασσίτερο βρίσκεται να είναι οκταεδρική [84].

Τα φάσματα ¹¹⁹Sn-NMR φαίνονται στην Εικόνα 5.5.18. Η μετατόπιση του Sn στα σύμπλοκα σε σχέση με την πρότυπη ουσία SnCl₄ (-150.4 ppm) μας δηλώνει αρχικά την παρουσία του κασσιτέρου στα σύμπλοκα **1-5** καθώς επίσης και τη γεωμετρία γύρω από το άτομο του κασσιτέρου. Οι τιμές των σημάτων συντονισμού του ¹¹⁹Sn είναι -257.4 ppm (**1**), -16.5 ppm (**2**), -526.9 (**3**), -305.6 ppm (**4**) και -294.7 ppm (**5**).



Εικόνα 5.5.18. Τα φάσματα ^{119}Sn -NMR των συμπλόκων **1-5** συγκρίσει του SnCl_4 .

Για τα σύμπλοκα με τα τρι-οργανοκασσιτερικά παράγωγα **1-2** ο κασσίτερος είναι πέντε-υποκατεστημένος για το σύμπλοκο **1** και τέτρα-υποκατεστημένος στο σύμπλοκο **2** με βάσει τα όρια που δόθηκαν παραπάνω. Έτσι η γεωμετρία γύρω από το άτομο του κασσιτέρου για το σύμπλοκο **1** είναι τριγωνική διπυραμίδα, ενώ η γεωμετρία για το σύμπλοκο **2** είναι τετραεδρική [191-195]. Όσον αφορά το σύμπλοκο **1** τα αποτελέσματα συμφωνούν και με τα αποτελέσματα του Mössbauer, ενώ για το σύμπλοκο **2** παρατηρείται διαφορετική γεωμετρία.

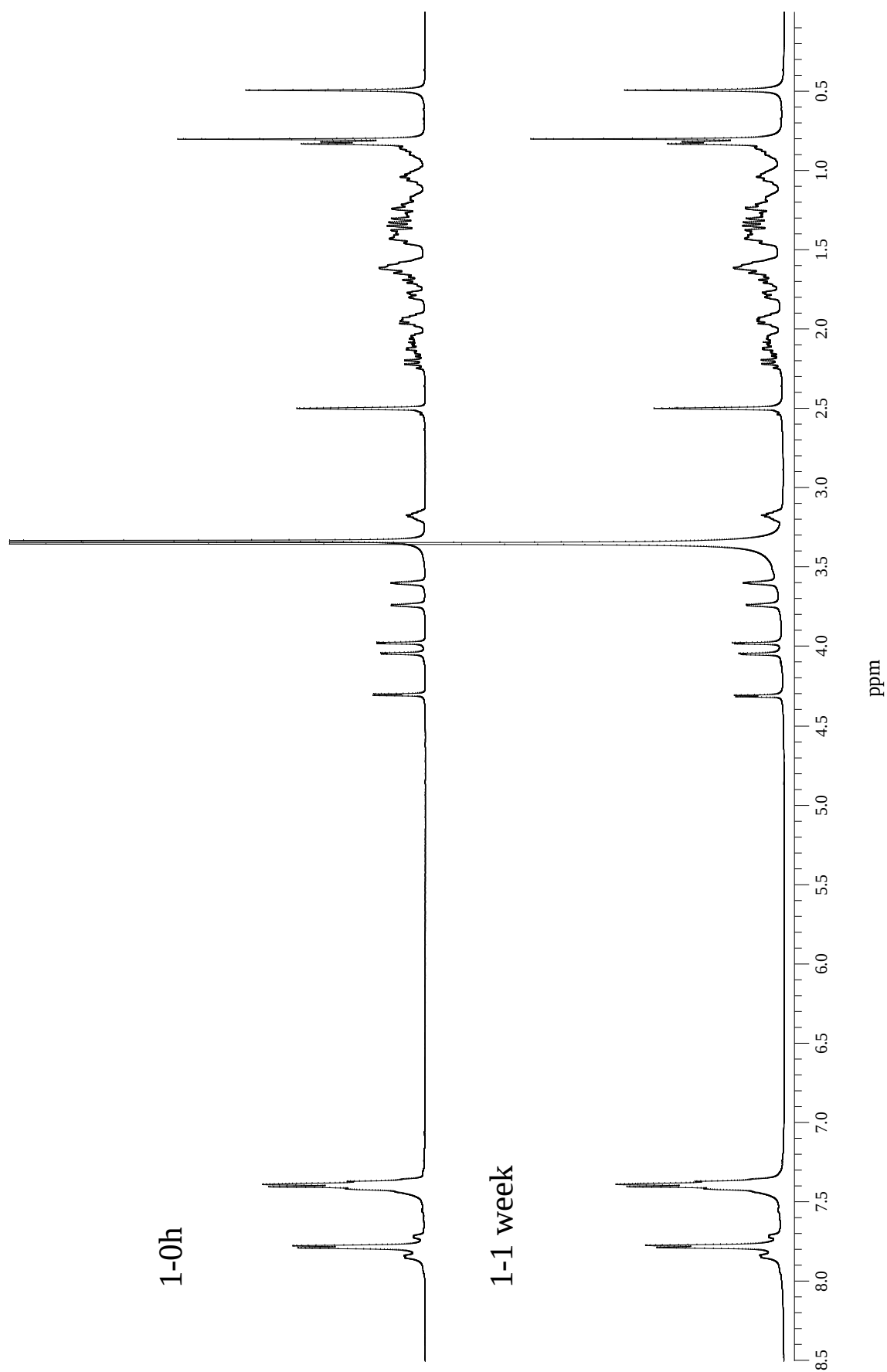
Για τα σύμπλοκα με τα δι-οργανοκασσιτερικά παράγωγα **3-5** ο κασσίτερος είναι έξα-ενταγμένος και η γεωμετρία γύρω του είναι οκταεδρική καθώς τα εύρη των μετατοπίσεων του

σήματος συντονισμού του ^{119}Sn βρίσκεται στην περιοχή μετατοπίσεων του έξα-ενταγμένου κασσιτέρου [194-199]. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα από την φασματοσκοπία Mössbauer.

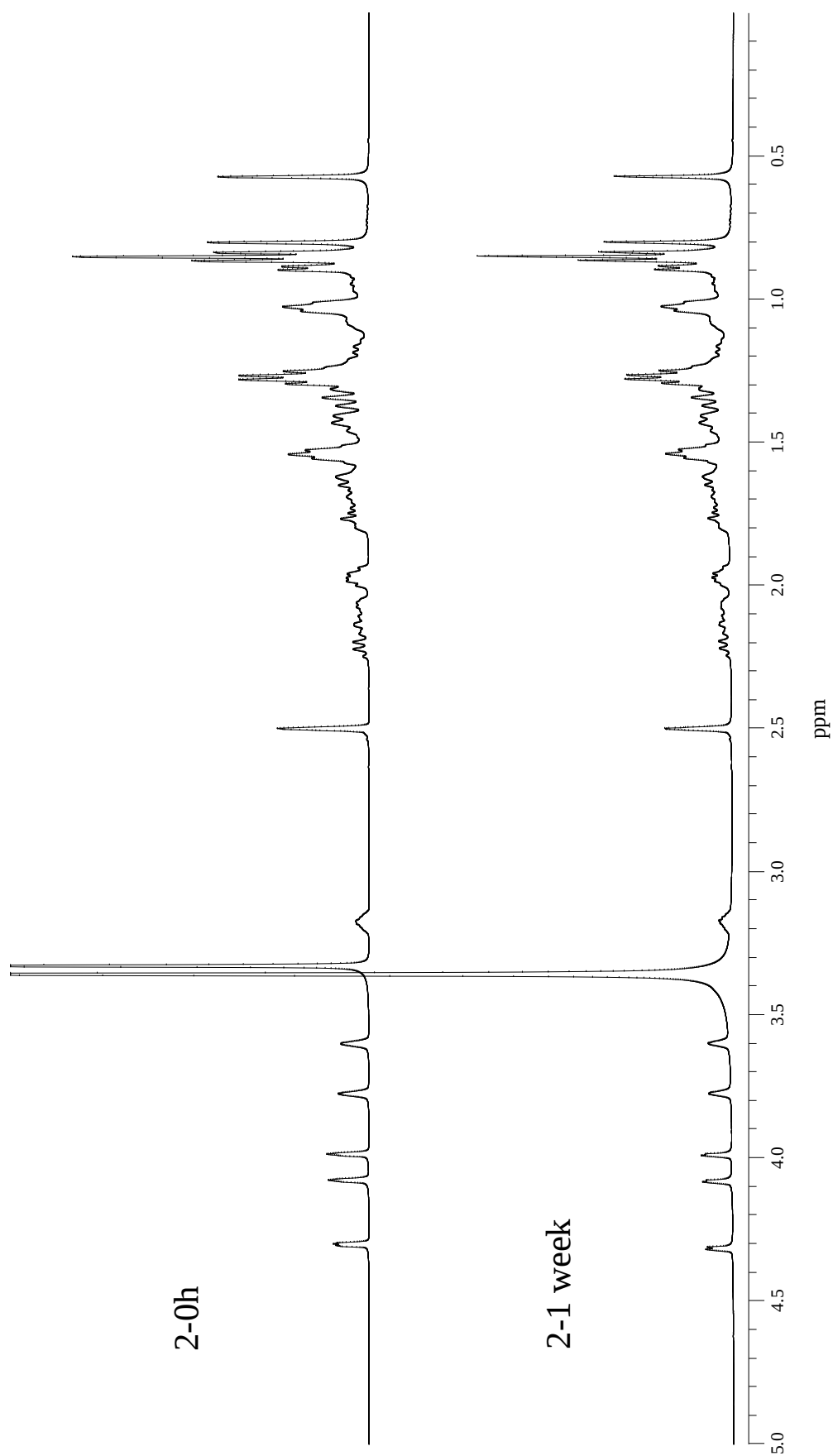
5.6. Σταθερότητα σε διάλυμα με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (^1H -NMR).

Προκειμένου να ελεγχθεί η σταθερότητα των συμπλόκων **1-5** σε διάλυμα για χρονικό διάστημα από 0 ώρες μέχρι και μια εβδομάδα πάρθηκαν φάσματα διαλυμάτων των ενώσεων χρησιμοποιώντας φασματόμετρο NMR. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα σταθερότητας με ^1H -NMR φασματοσκοπία είναι το d_6 -DMSO. Τα χρονικά διαστήματα που ελέγχθηκε η σταθερότητα περιλαμβάνουν όλους τους χρόνους επώασης με τα σύμπλοκα που απαιτούνται για τα βιολογικά πειράματα.

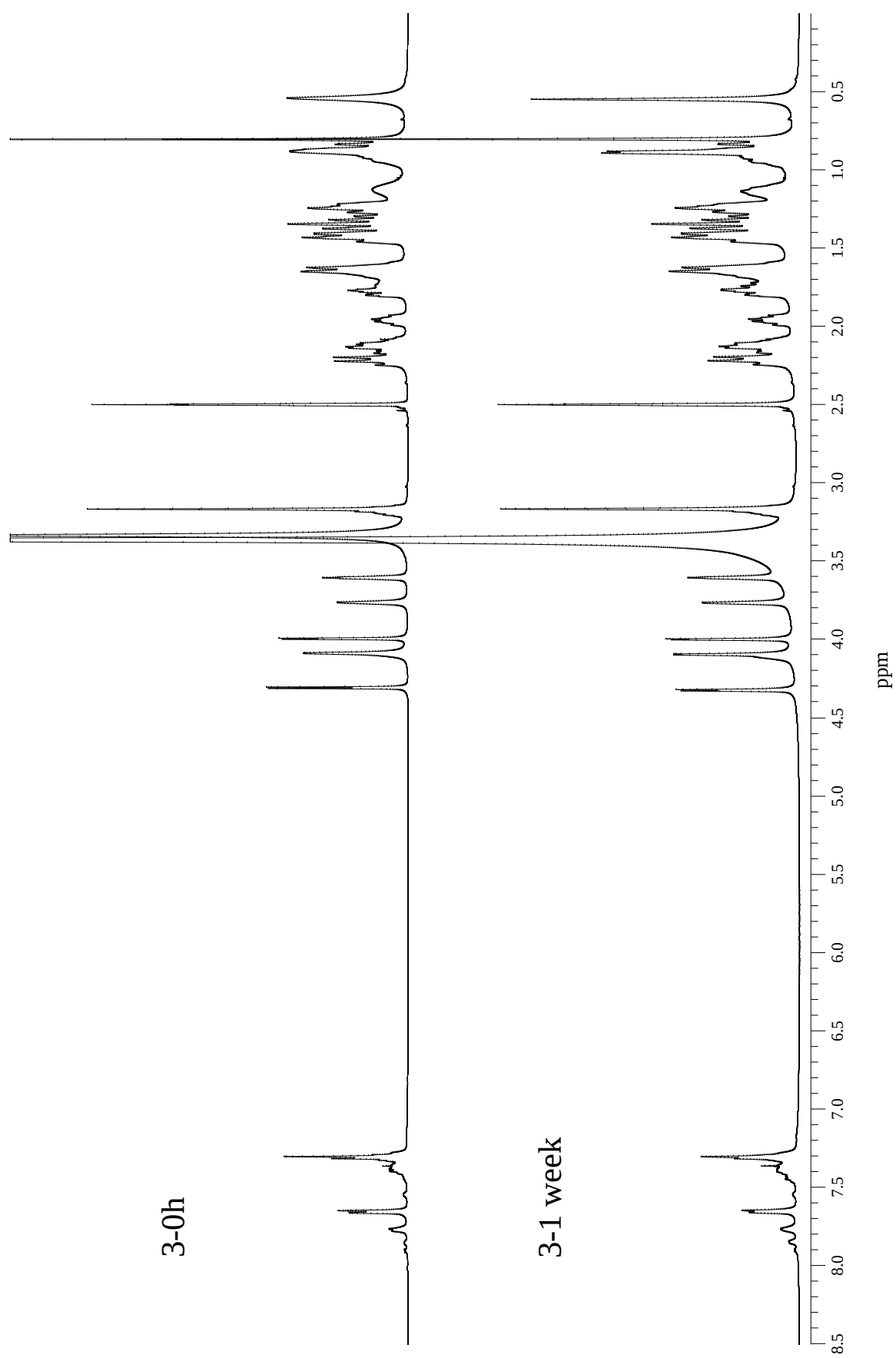
Τα αποτελέσματα της σταθερότητας με ^1H -NMR φασματοσκοπία φαίνονται στις Εικόνες 5.6.1-5.6.5. Τα σύμπλοκα **1-5** βρέθηκε να είναι σταθερά σε διάλυμα για διάστημα μέχρι και μια εβδομάδα.



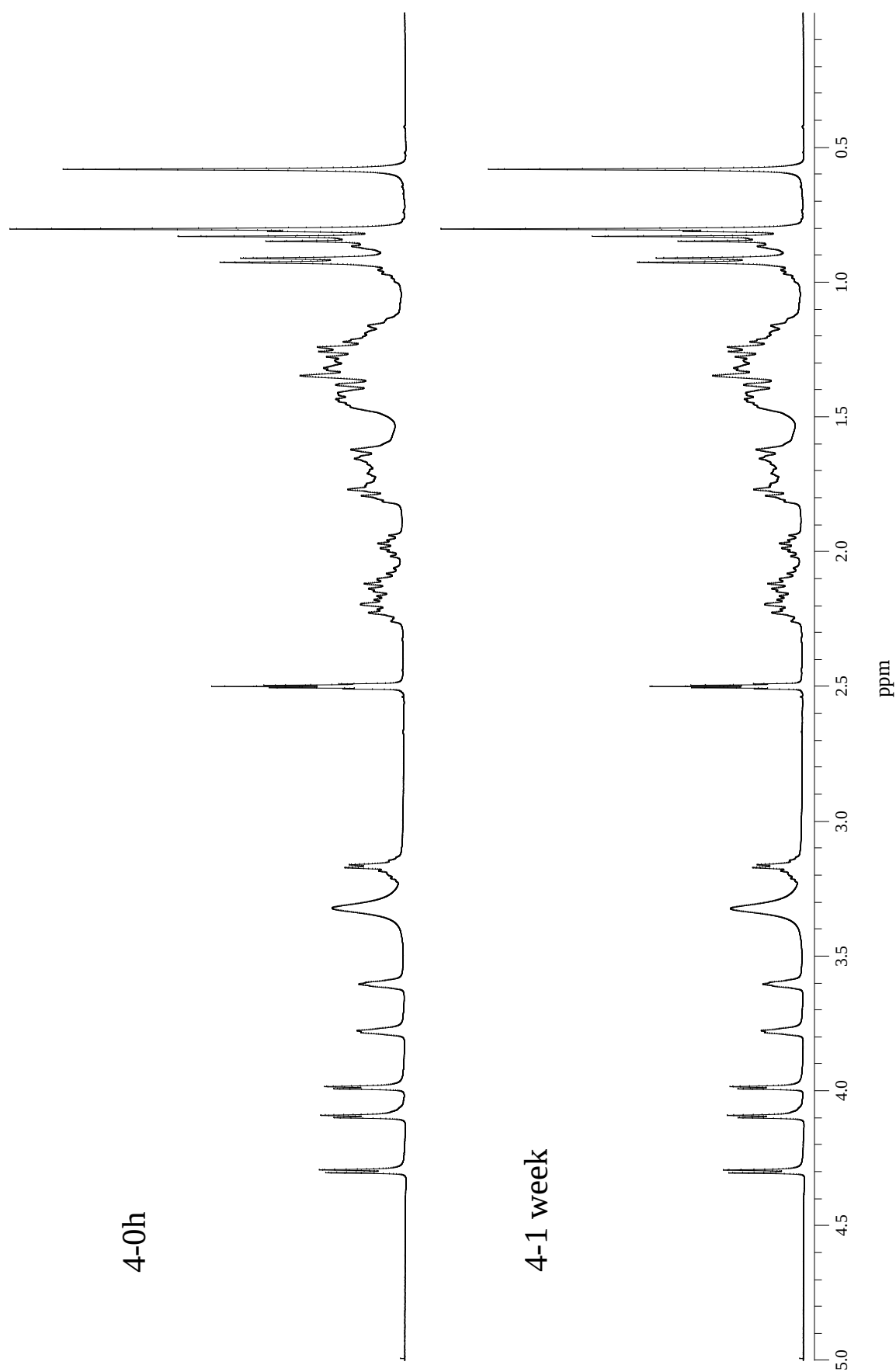
Εικόνα 5.6.1. Φάσμα ^1H -NMR για τη σταθερότητα του συμπλόκου **1**.



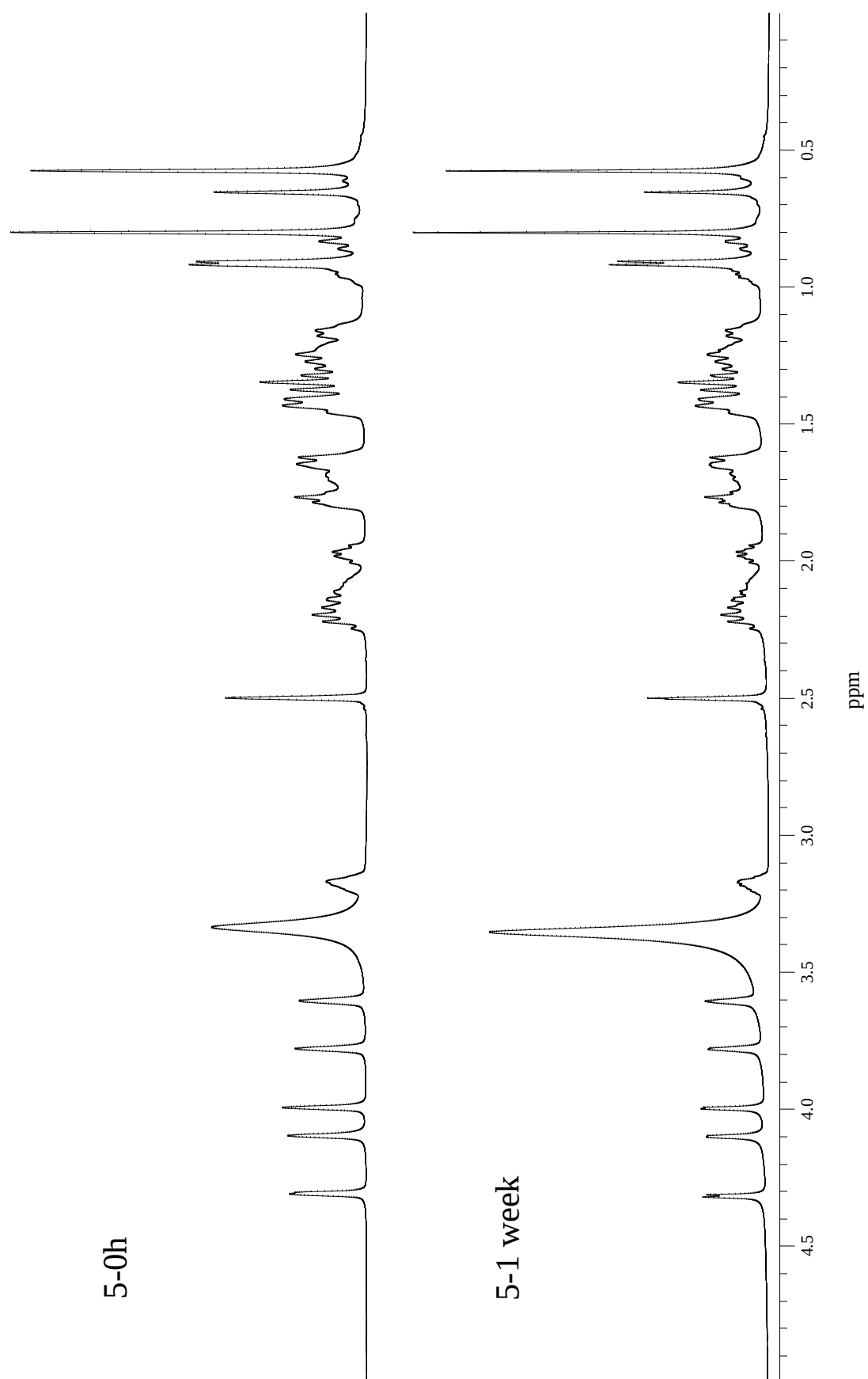
Εικόνα 5.6.2. Φάσμα ^1H -NMR για τη σταθερότητα του συμπλόκου **2**.



Εικόνα 5.6.3. Φάσμα ^1H -NMR για τη σταθερότητα του συμπλόκου **3**.



Εικόνα 5.6.4. Φάσμα ^1H -NMR για τη σταθερότητα του συμπλόκου **4**.

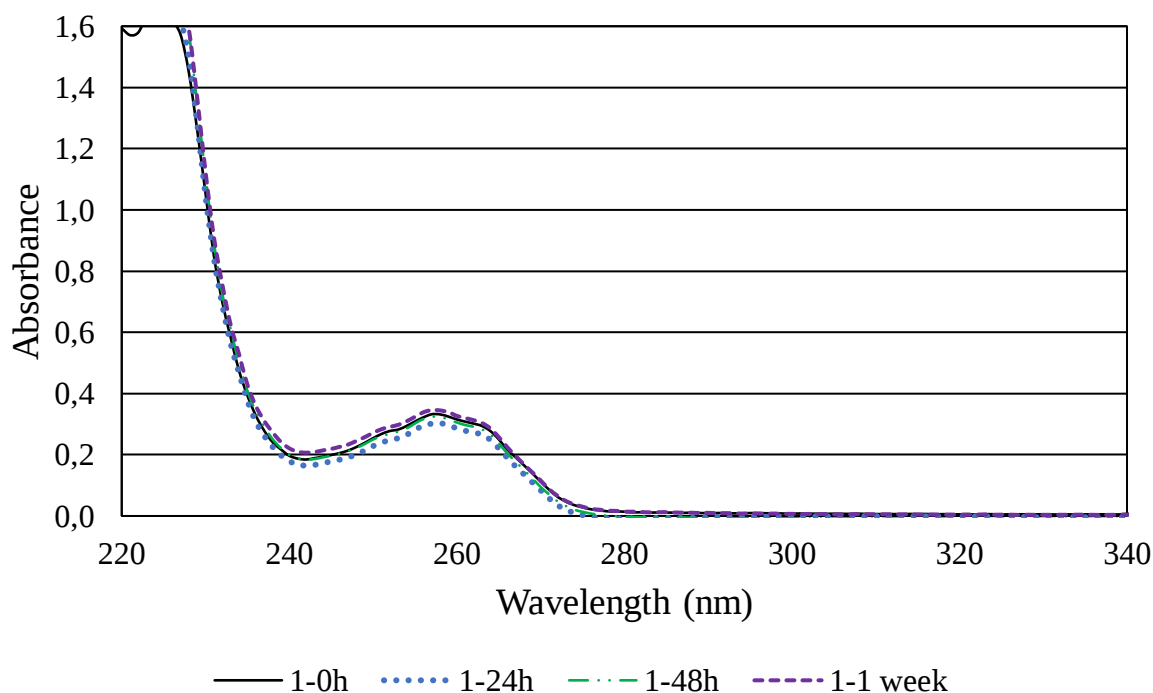


Εικόνα 5.6.5. Φάσμα ^1H -NMR για τη σταθερότητα του συμπλόκου **5**.

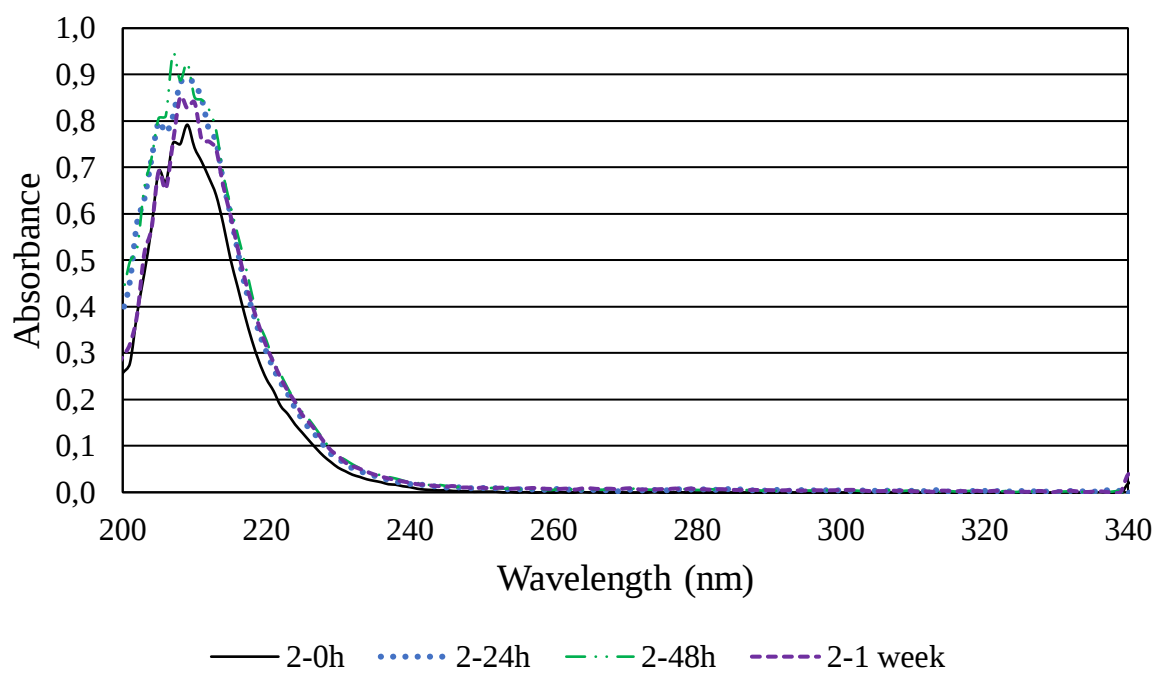
5.7. Σταθερότητα σε διάλυμα με φασματοσκοπία υπεριώδους/ορατού (UV-Vis).

Η σταθερότητα των συμπλόκων **1-5** σε διάλυμα ελέγχθηκε περαιτέρω και με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (ultraviolet-visible, UV-Vis). Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα σταθερότητας με UV-Vis φασματοσκοπία είναι η MeOH. Τα χρονικά διαστήματα που ελέγχθηκε η σταθερότητα περιλαμβάνουν όλους τους χρόνους επώασης με τα σύμπλοκα που απαιτούνται για τα βιολογικά πειράματα.

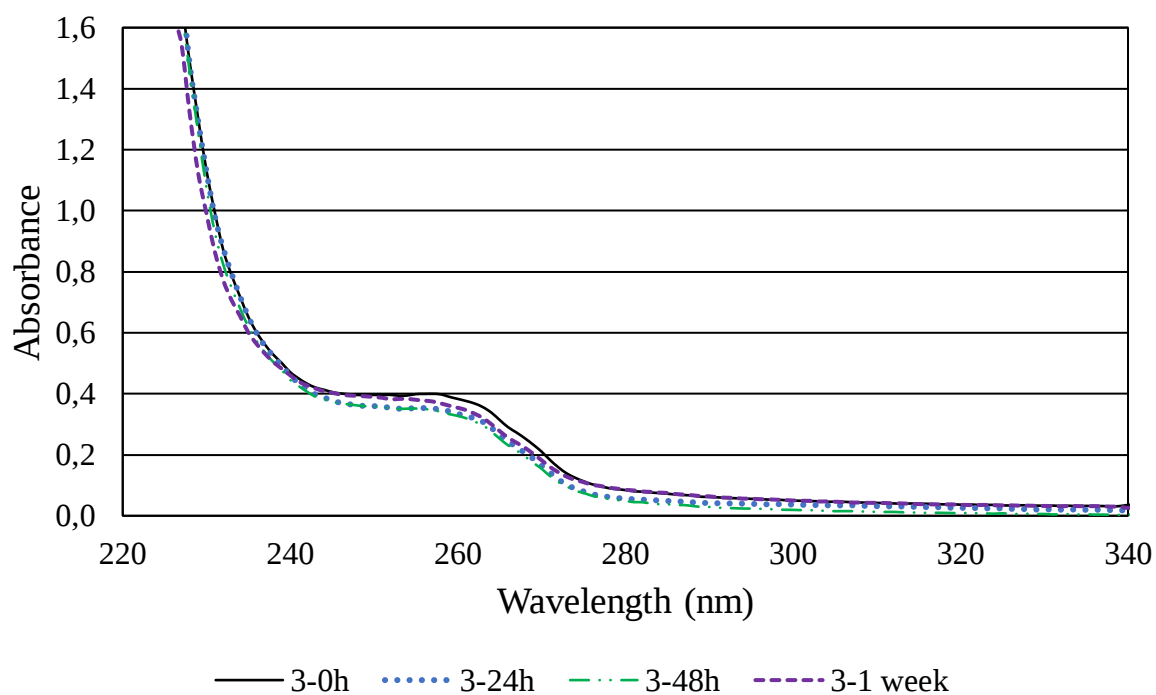
Τα αποτελέσματα της σταθερότητας με UV-Vis φασματοσκοπία φαίνονται στις Εικόνες 5.7.1-5.7.5. Τα σύμπλοκα **1-5** βρέθηκε να είναι σταθερά σε διάλυμα μέχρι και για μια εβδομάδα, και τα χρονικά διαστήματα που ελέγχθηκαν είναι οι 0, 24, 48 ώρες και μια εβδομάδα μετά την λήψη του πρώτου φάσματος. Το σύμπλοκο **4** με βάση τη φασματοσκοπία UV είναι σταθερό μέχρι και τις 48 ώρες. Επομένως επιβεβαιώνεται και με την φασματοσκοπία UV-Vis πως τα σύμπλοκα **1-5** είναι σταθερά για διάστημα μιας εβδομάδας από την πρώτη διάλυση τους.



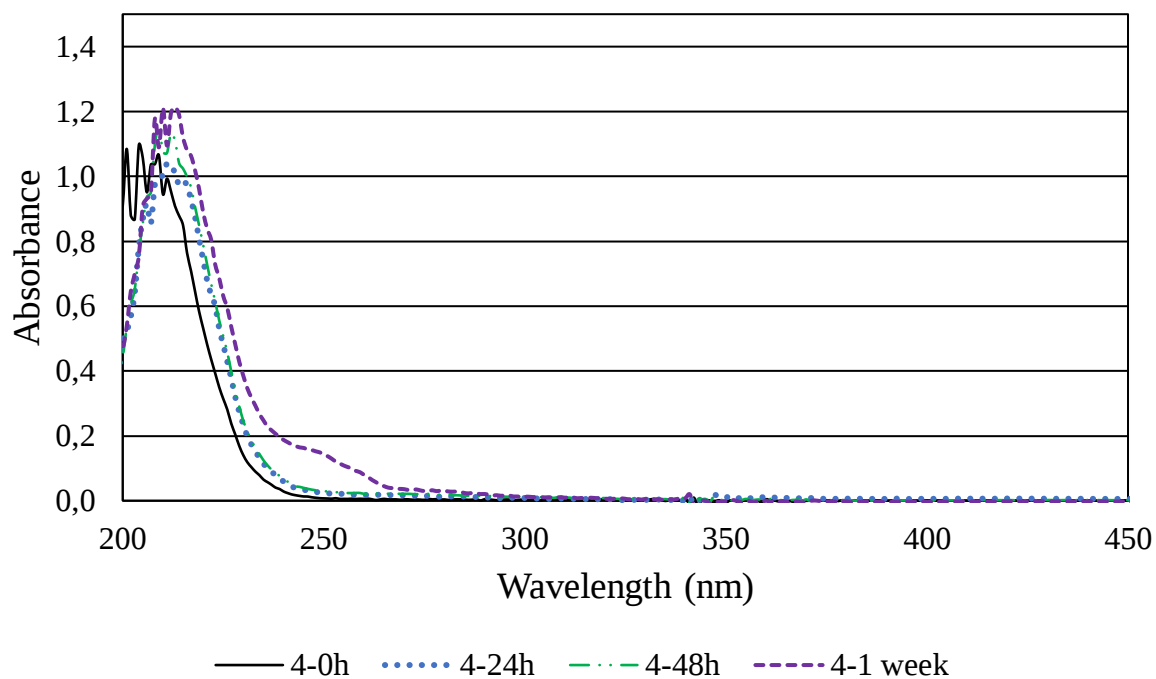
Εικόνα 5.7.1. Φάσμα UV-Vis για τη σταθερότητα του συμπλόκου **1**.



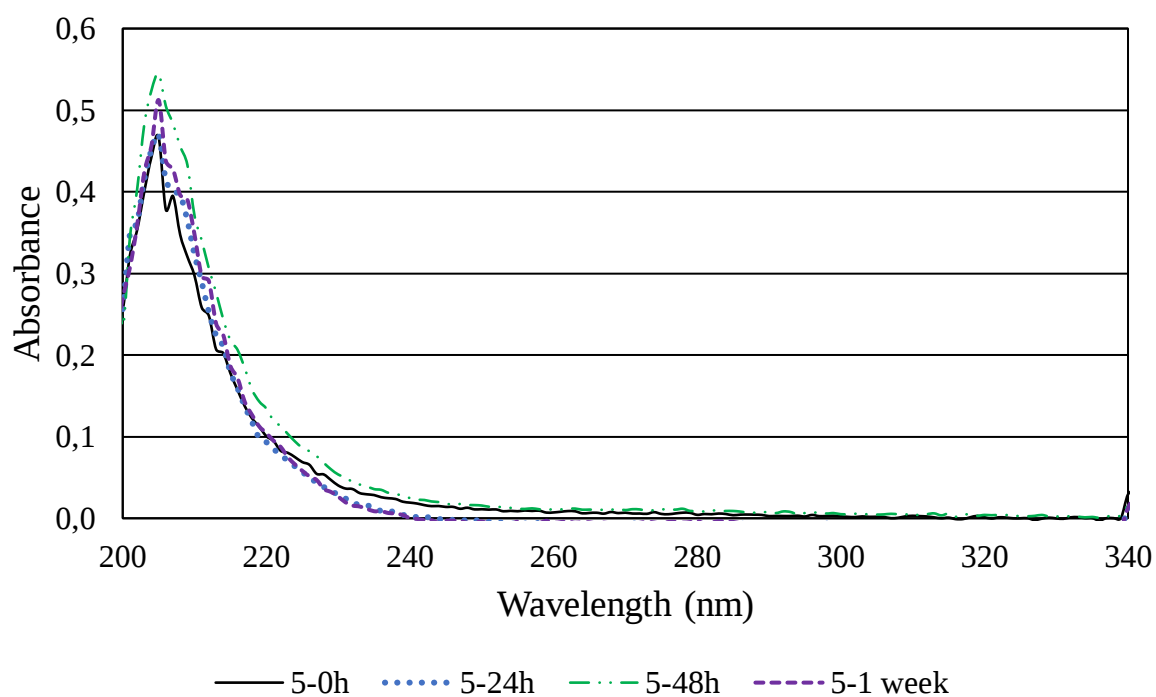
Εικόνα 5.7.2. Φάσμα UV-Vis για τη σταθερότητα του συμπλόκου 2.



Εικόνα 5.7.3. Φάσμα UV-Vis για τη σταθερότητα του συμπλόκου 3.



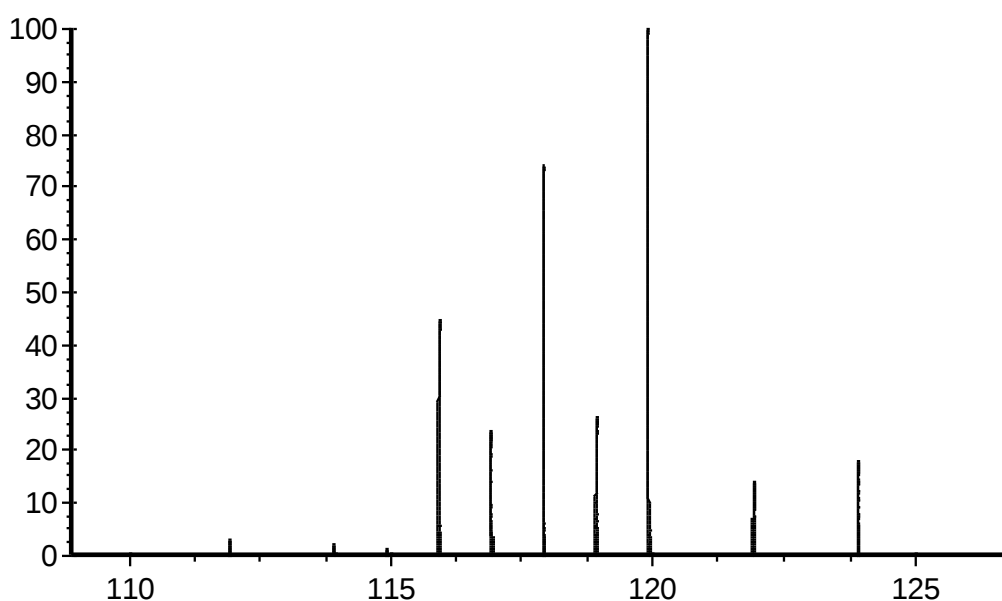
Εικόνα 5.7.4. Φάσμα UV-Vis για τη σταθερότητα του συμπλόκου 4.



Εικόνα 5.7.5. Φάσμα UV-Vis για τη σταθερότητα του συμπλόκου 5.

5.8. Φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS).

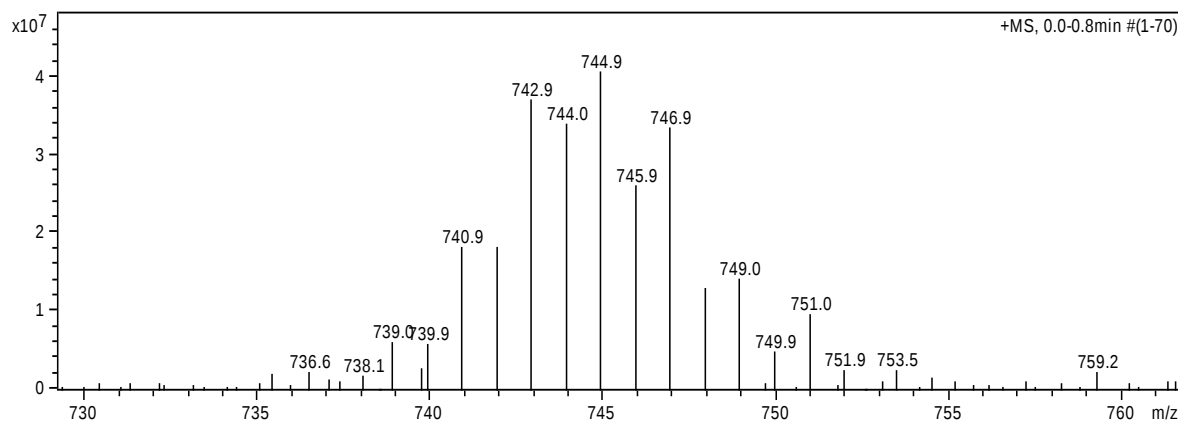
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αναλογία και το μοριακό βάρος των συμπλόκων **1-5** πάρθηκαν φάσματα των συμπλόκων με φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (electron spray ionization mass spectrometry, ESI-MS). Βρέθηκαν τα μοριακά θραύσματα των ενώσεων τα οποία φέρουν και το χαρακτηριστικό πρότυπο του κασσιτέρου (Εικόνα 5.8.1).



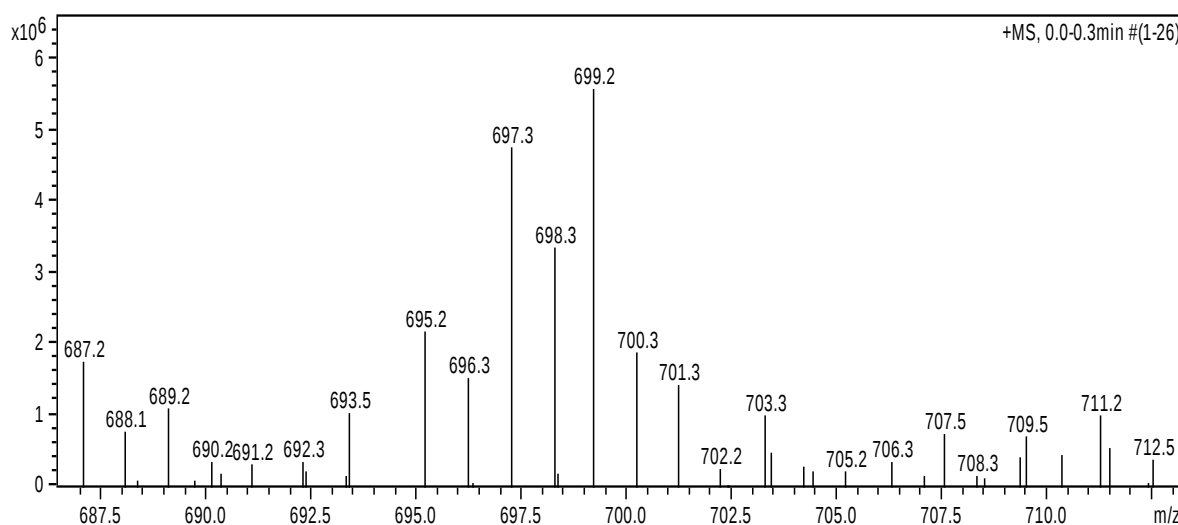
Εικόνα 5.8.1. Το χαρακτηριστικό πρότυπο του κασσιτέρου ^{119}Sn . Υπολογίστηκε με το πρόγραμμα IsoPro 3.1.

Πιο συγκεκριμένα για το σύμπλοκο **1** είχε υπολογιστεί M.B.= 758 για αναλογία μετάλλου/χολικού οξέος 1:1. Βρέθηκε μοριακό θραύσμα (m/z) 736 (Εικόνα 5.8.3) και υπολογίστηκε για $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{O}_6\text{SnK}^+$. Η διαφορά στα μοριακά βάρη οφείλεται στην απώλεια μιας φαινυλομάδας και στην προσθήκη μιας υδροξυλομάδας, κάτι που είναι πιθανό να συμβεί κατά την λήψη της μέτρησης.

Παρόμοια για το σύμπλοκο 2 βρέθηκε μοριακό θραύσμα (m/z) 699 και είχε υπολογιστεί για $C_{36}H_{66}O_5SnH^+$ (Εικόνα 5.8.2). Το θεωρητικό μοριακό βάρος (M.B.) για το σύμπλοκο αυτό είχε υπολογιστεί για αναλογία 1 χολικό οξύ/1 κασσίτερο και είχε βρεθεί 698 gr/mol κάτι που συμφωνεί με το εύρημα του ESI-MS.



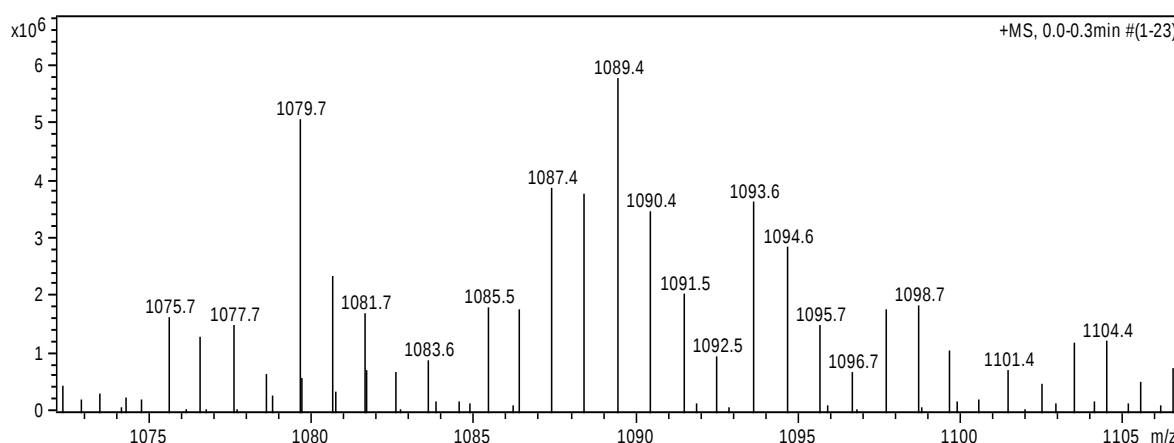
Εικόνα 5.8.2. Φάσμα ESI-MS για το σύμπλοκο 1.



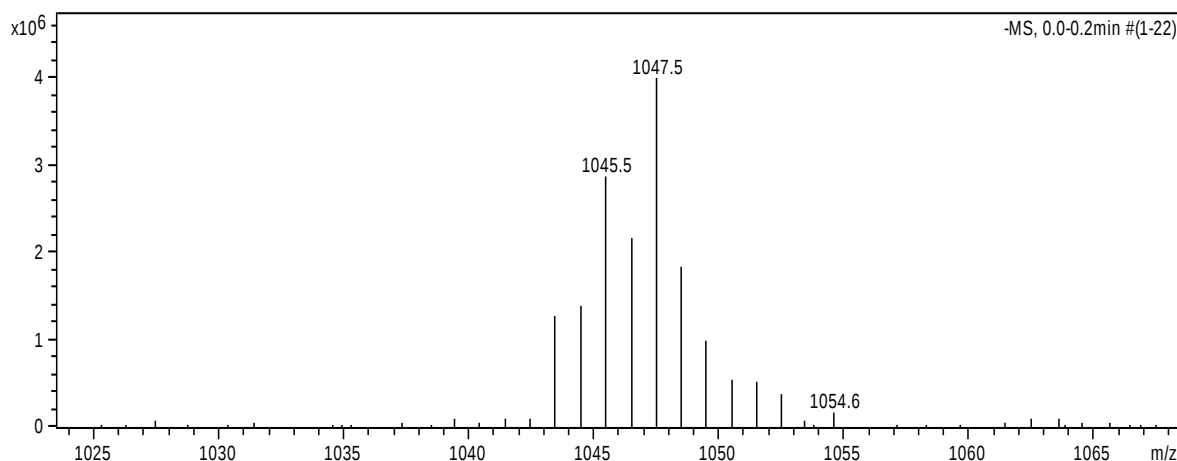
Εικόνα 5.8.3. Φάσμα ESI-MS για το σύμπλοκο 2.

Όσον αφορά το σύμπλοκο **3** βρέθηκε (m/z/) 1089 και υπολογίστηκε για $C_{60}H_{88}O_{10}SnH^+$ (Εικόνα 5.8.4). Το θεωρητικό M.B. για το σύμπλοκο **3** είχε υπολογιστεί για αναλογία χολικού οξέος/ κασσιτέρου 2:1 και είχε βρεθεί 1088 gr/mol, τιμή που συμφωνεί με το εύρημα του ESI-MS.

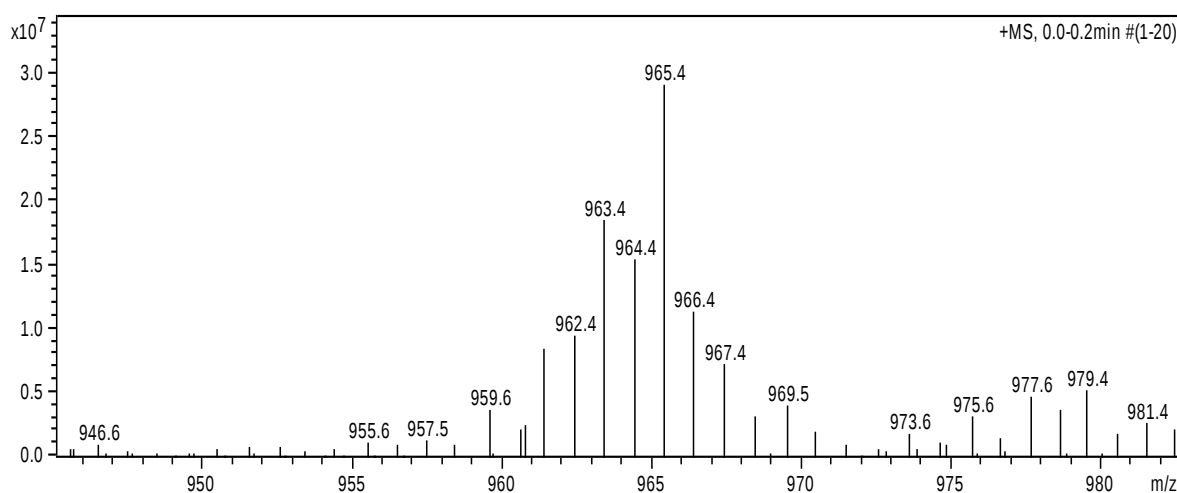
Για τα σύμπλοκα **4** και **5** τα θεωρητικά M.B. είχαν υπολογιστεί πάλι για αναλογία χολικού οξέος/κασσιτέρου 2:1 και οι τιμές τους είχαν βρεθεί 1048 gr/mol και 964 gr/mol, αντίστοιχα. Τα μοριακά θραύσματα που βρέθηκαν για τα σύμπλοκα **4** και **5** είναι (m/z) 1047 και 965 αντίστοιχα, και υπολογίστηκαν για $C_{59}H_{97}O_{10}SnH^-$ (**4**) και $C_{50}H_{84}O_{10}SnH^+$ (**5**) αντίστοιχα (Εικόνες 5.8.5-5.8.6).



Εικόνα 5.8.4. Φάσμα ESI-MS για το σύμπλοκο **3**.



Εικόνα 5.8.5. Φάσμα ESI-MS για το σύμπλοκο 4.



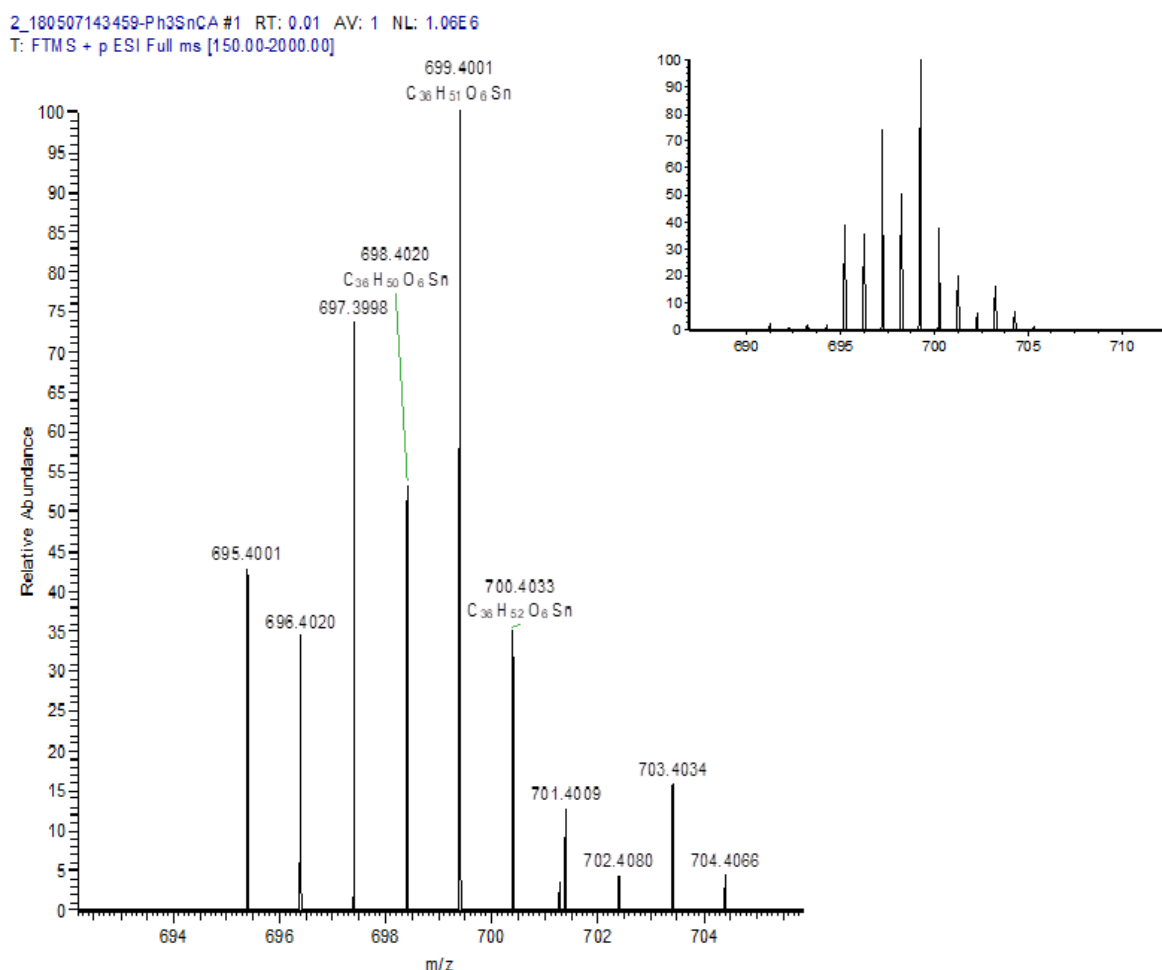
Εικόνα 5.8.6. Φάσμα ESI-MS για το σύμπλοκο 5.

5.9. Φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS).

Τα παραπάνω μοριακά βάρη που βρέθηκαν για τα σύμπλοκα 1-5 επιβεβαιώθηκαν και με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (high resolution mass spectrometry, HR-MS). Στις Εικόνες 5.9.1-5.9.5 εμφανίζονται ένθετα τα θεωρητικά υπολογισμένα φάσματα μάζας μέσω

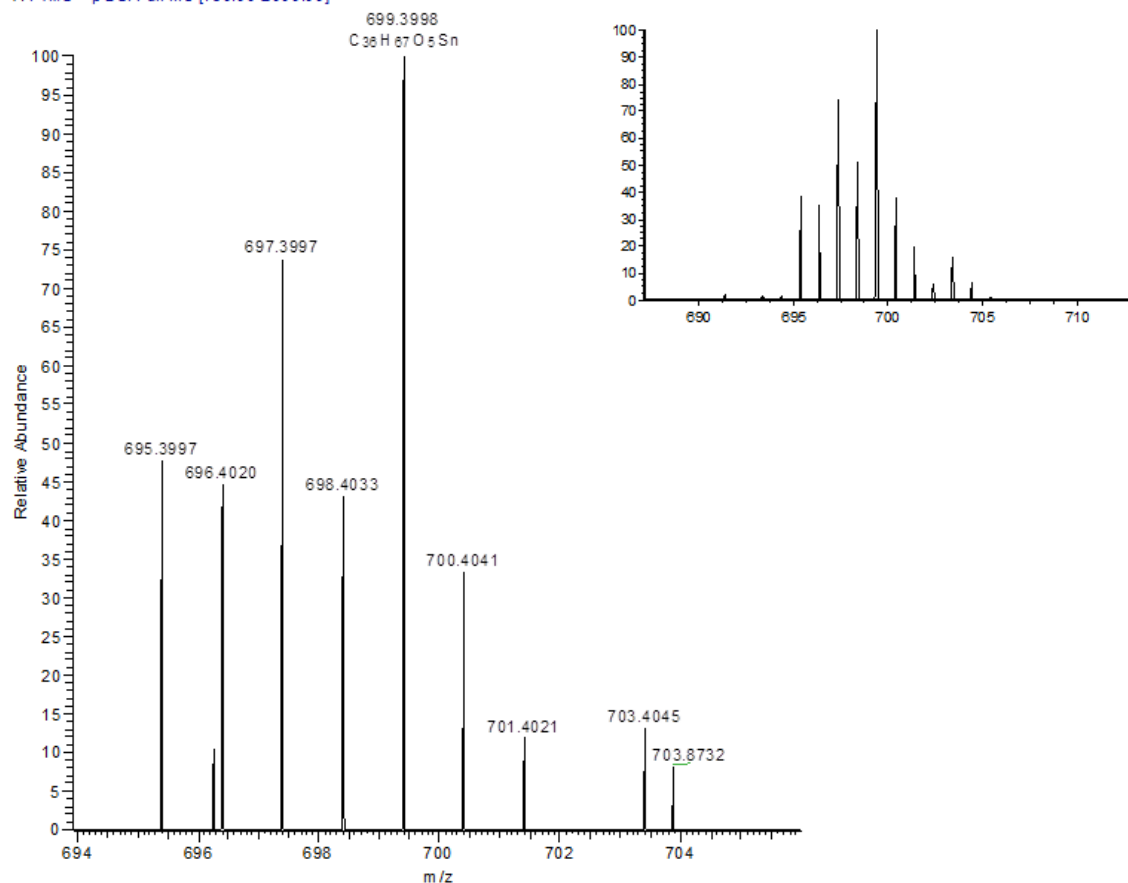
του προγράμματος IsoPro 3.1 στις αναλογίες των συμπλόκων που αναφέρονται στις ενότητες 5.8 και 5.9.

Το σύμπλοκο **1** βρέθηκε να έχει (m/z) 697, το οποίο συμφωνεί με την απουσία της φαινυλομάδας που προτάθηκε από το ESI-MS, και στο φάσμα του HR-MS υπολογίστηκε για $C_{36}H_{50}O_6SnH^+$ (Εικόνα 5.9.1). Παρόμοια για το σύμπλοκο **2** βρέθηκε (m/z) 699 το οποίο συμφωνεί με το θεωρητικό μοριακό βάρος και με αυτό που βρέθηκε από το ESI-MS (Εικόνα 5.9.2).



Εικόνα 5.9.1 Φάσμα HR-MS για το σύμπλοκο **1**.

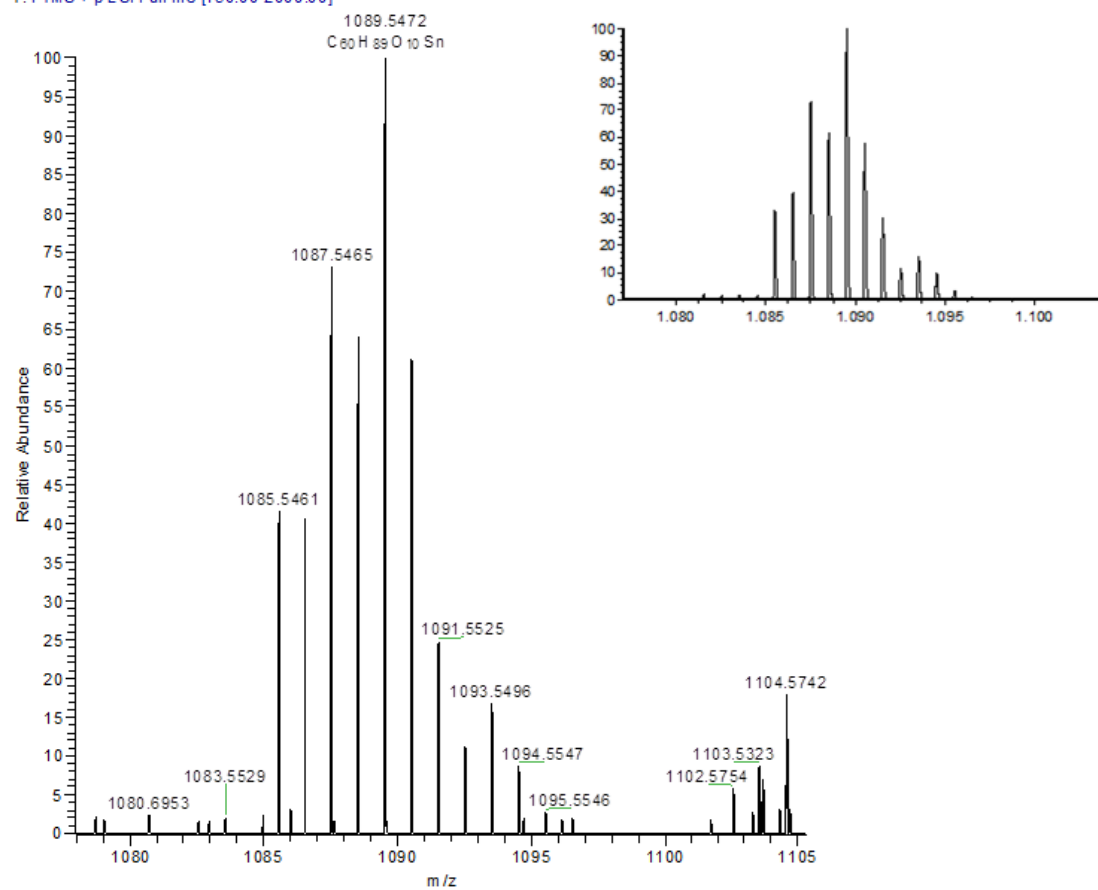
1_180507143459#3 RT: 0.03 AV: 1 NL: 5.04E5
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



Εικόνα 5.9.2. Φάσμα HR-MS για το σύμπλοκο 2.

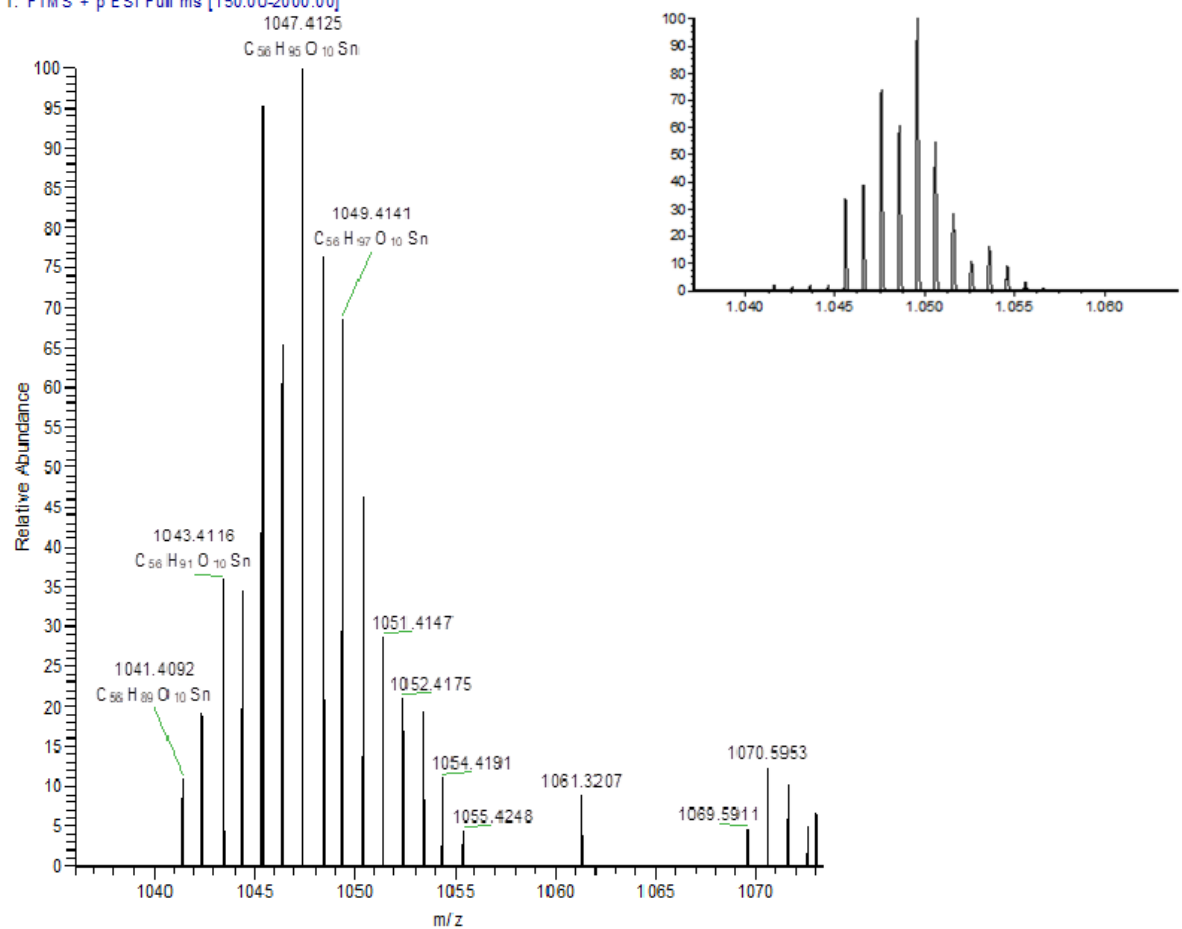
Για τα σύμπλοκα 3-5 βρέθηκαν (m/z) 1089 (3), 1049 (4) και 965 (5) τα οποία συμφωνούν με τα αποτελέσματα από το ESI-MS, καθώς και τα θεωρητικά υπολογισμένα (Εικόνες 5.9.3-5.9.5). Εδώ για το σύμπλοκο 4 υπολογίστηκε για $C_{56}H_{96}O_{10}SnH^+$, ενώ για τα σύμπλοκα 3 και 5 όπως αναφέρθηκε στο ESI-MS.

4_180507143459#1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.65E6
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



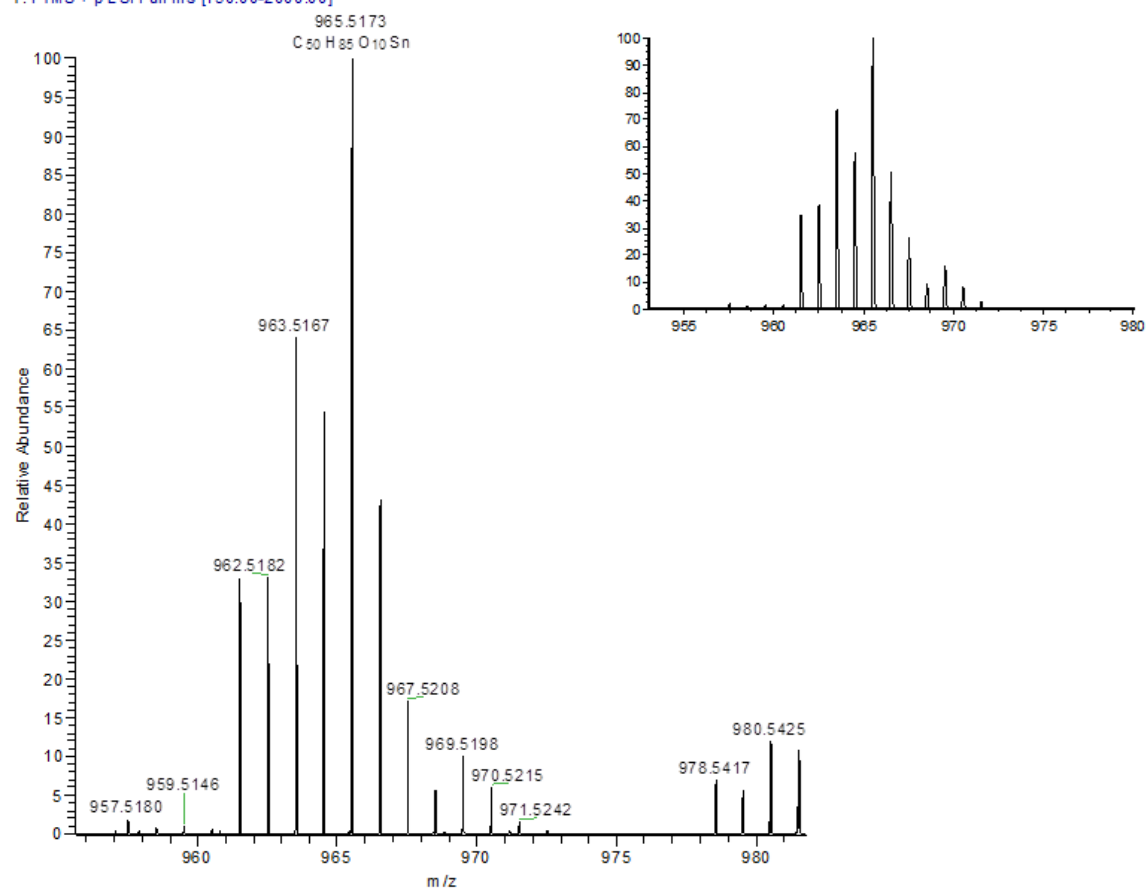
Εικόνα 5.9.3. Φάσμα HR-MS για το σύμπλοκο 3.

5_180507143459-Bu2Sn(CA)2 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.15E6
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



Εικόνα 5.9.4. Φάσμα HR-MS για το σύμπλοκο 4.

3_180507143459#1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.14E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



Εικόνα 5.9.5. Φάσμα HR-MS για το σύμπλοκο 5.

5.10. Ατομική απορρόφηση.

Μια ακόμα μέθοδος για να υπολογιστεί το ποσοστό του κασσιτέρου (% Sn) στα σύμπλοκα 1-5 ήταν η ατομική απορρόφηση (ΑΑ). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 5.10.1. Τα % Sn που βρέθηκαν από την ατομική απορρόφηση συνάδουν τόσο με τα θεωρητικά υπολογισμένα όσο και με τα αποτελέσματα της XRF ανάλυσης.

*Σύμπλοκο	% Sn ΑΑ	% Sn Θεωρητικό
1	16.0	15.7
2	17.8	17.1
3	12.2	11.0
4	11.8	11.4
5	12.3	12.3

Κεφάλαιο 6

Αποτελέσματα Βιολογικού μέρους.

6.1. Αντιπολλαπλασιαστική δράση έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών.

Η αντιπολλαπλασιαστική δράση των συμπλόκων **1-5** ελέγχθηκε έναντι 2 καρκινικών κυτταρικών σειρών. Η εύρεση των τιμών της ανασταλτικής συγκέντρωσης που μειώνει την ανάπτυξη των κυττάρων στο 50% (IC₅₀) έγινε χρησιμοποιώντας την μέθοδο της Sulforodamine B (SRB) [16]. Η πρώτη καρκινική κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε είναι τα κύτταρα MCF-7 τα οποία είναι θετικά στους υποδοχείς ορμονών. Η δεύτερη κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε είναι τα κύτταρα MDA-MB-231 τα οποία δεν φέρουν υποδοχείς ορμονών [5,18,38-39]. Αυτές οι δυο καρκινικές κυτταρικές σειρές χρησιμοποιούνται συνήθως για να ελεγχθεί η αντικαρκινική δράση κάποιας ουσίας έναντι του καρκίνου του μαστού [5].

Όλα τα σύμπλοκα έδειξαν αντιπολλαπλασιαστική δράση έναντι των 2 καρκινικών κυτταρικών σειρών. Ωστόσο το σύμπλοκο με το διμέθυλο οργανοκασσιτερικό παράγωγο (**5**) στις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν (0.5-30 μ M) δεν παρουσίασε κάποια δράση. Γενικότερα τα σύμπλοκα **1-2** τα οποία φέρουν τρι-οργανοκασσιτερικά παράγωγα έδειξαν καλύτερη αντικαρκινική δράση σε σχέση με τα σύμπλοκα **3-5** τα οποία φέρουν δι-οργανοκασσιτερικά παράγωγα. Η καλύτερη δραστηριότητα συμπλόκων που φέρουν τρι-οργανοκασσιτερικά παράγωγα είναι γνωστή και από την βιβλιογραφία [4,107,114]. Οι τιμές IC₅₀ για τα σύμπλοκα **1-5**, για τον προσδέτη και τα οργανοκασσιτερικά παράγωγα δίνονται στον Πίνακα 6.1.1.

Μεταξύ των οργανοκασσιτερικών παραγώγων, τα σύμπλοκα με τα τρι-οργανοκασσιτερικά παράγωγα **1-2** βρέθηκε να έχουν εκλεκτική δράση έναντι των MCF-7 καρκινικών κυττάρων, που φέρουν υποδοχείς ορμονών, σε σχέση με τα MDA-MB-231, τα οποία δεν φέρουν τους υποδοχείς αυτούς. Ωστόσο από τα σύμπλοκα **3-5** το σύμπλοκο **3**

εμφάνισε εκλεκτική δράση έναντι των MDA-MB-231 κυττάρων σε σχέση με την άλλη καρκινική κυτταρική σειρά.

Πίνακας 6.1.1. Τιμές IC₅₀ έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών του μαστού, MCF-7 και MDA-MB-231, για τα σύμπλοκα 1-5, τον προσδέτη και τα οργανοκασσιτερικά παράγωγα.

Σύμπλοκο	IC ₅₀ (μM)		Cisplatin/Σύμπλοκο	
	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231
1	0.10 ± 0.00	0.16 ± 0.01	55.0	166.9
2	0.13 ± 0.00	0.35 ± 0.01	42.3	76.3
3	1.32 ± 0.03	0.68 ± 0.03	4.2	39.3
4	0.42 ± 0.01	0.40 ± 0.02	13.8	66.8
5	>30	>30	—	—
Ph ₃ SnCl	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.01	50.0	166.9
<i>n</i> -Bu ₃ SnCl	0.06 ± 0.00	0.21 ± 0.00	91.7	127.1
Ph ₂ SnCl ₂	0.81 ± 0.03	0.42 ± 0.01	6.8	63.6
<i>n</i> -Bu ₂ SnCl ₂	0.41 ± 0.02	0.31 ± 0.01	13.4	86.1
Me ₂ SnCl ₂	>30	>30	—	—
Cholic acid (CAH)	>30	>30	—	—
^[17,133] Cisplatin	5.5 ± 0.40	26.7 ± 1.1	—	—

Ελέγχθηκε και η δράση του προσδέτη καθώς και των οργανοκασσιτερικών παραγώγων (οργανοκασσιτερικά χλωρίδια) έναντι των 2 καρκινικών κυτταρικών σειρών του μαστού. Ο

προσδέτης δεν εμφάνισε κάποια δράση έναντι των δυο τύπων κυττάρων στις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν. Για τα οργανοκασσιτερικά παράγωγα, εκτός του δι-μέθυλο παραγώγου, βρέθηκαν τιμές IC_{50} που κυμαίνονται σε χαμηλότερα εύρη τιμών σε σχέση με των συμπλόκων **1-5** (Πίνακας 6.1.1). Ωστόσο η εκλεκτικότητα που εμφανίζουν τα οργανοκασσιτερικά παράγωγα διατηρείται και στα στεροειδικά σύμπλοκα.

Συγκριτικά με τη δράση της cisplatin έναντι αυτών των κυτταρικών σειρών τα σύμπλοκα **1-4** έχουν ισχυρότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση. Πιο συγκεκριμένα για τα καρκινικά κύτταρα MCF-7 τα σύμπλοκα **1-4** έχουν κατά 55 (1), 42.3 (2), 4.2 (3) και 13.8 (4) φορές ισχυρότερη δράση από τη cisplatin. Για τα MDA-MB-231 τα σύμπλοκα **1-4** πάλι βρέθηκε να είναι ισχυρότερα από τη cisplatin κατά 166.9 (1), 76.3 (2), 39.3 (3) και 66.8 (4) φορές (Πίνακας 6.1.1).

6.2. Τοξικότητα in vitro σε φυσιολογικά κύτταρα MRC-5.

Η δράση των συμπλόκων **1-5** ελέγχθηκε και έναντι της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς MRC-5. Τα MRC-5 είναι φυσιολογικοί ανθρώπινοι ινοβλάστες πνεύμονος που προέρχονται από έμβρυο και συνήθως χρησιμοποιούνται για να ελεγχθεί η τοξικότητα των εκάστοτε συμπλόκων ενώσεων [16]. Οι τιμές IC_{50} για τα σύμπλοκα **1-5** φαίνονται στον Πίνακα 6.2.1. Όπως προκύπτει είναι παρόμοιες με τις τιμές έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών ωστόσο ελαφρώς μεγαλύτερες.

Για να ελεγχθεί η εκλεκτικότητα και συνεπώς η σχετική ασφάλεια ενός φαρμάκου στα καρκινικά κύτταρα, υπολογίζεται ο θεραπευτικός δείκτης (Therapeutic Potent Index, TPI), που ορίζεται ως η τιμή IC_{50} στα φυσιολογικά κύτταρα προς την τιμή IC_{50} στα καρκινικά κύτταρα. Όσο μεγαλύτερη της μονάδας (>1) είναι η τιμή TPI τόσο πιο εύκολα φαίνεται πως ένα πιθανό φάρμακο στοχεύει εκλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα παρά τα υγιή [16]. Η τιμή TPI που

προκύπτει για το σύμπλοκο **2** είναι ίση με 1.30 έναντι της MCF-7 καρκινικής κυτταρικής σειράς, κάτι που δηλώνει πως το σύμπλοκο αυτό δείχνει εκλεκτικότητα έναντι των MCF-7 καρκινικών κυττάρων παρά των υγιών MRC-5. Έτσι αυτό το σύμπλοκο έχει καλύτερη αντιπολλαπλασιαστική δράση παρά τοξική. Επιπλέον το σύμπλοκο **3**, με τιμή TPI= 1.11, δείχνει να στοχεύει εκλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα MDA-MB-231 παρά τα υγιή. Τα υπόλοιπα σύμπλοκα εμφανίζουν τιμές TPI παρόμοιες με αυτές της cisplatin (Πίνακας 6.2.1).

Πίνακας 6.2.1. Τιμές IC₅₀ έναντι της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς MRC-5 των σύμπλοκων ενώσεων **1-5**, του προσδέτη και των οργανοκασσιτερικών παραγώγων. Επιπλέον φαίνονται και οι τιμές του θεραπευτικού δείκτη, TPI, έναντι των MCF-7 και MDA-MB-231 καρκινικών κυτταρικών σειρών.

Σύμπλοκο	IC ₅₀ (μM)	TPI	
	MRC-5	MCF-7	MDA-MB-231
1	0.07 ± 0.00	0.70	0.44
2	0.17 ± 0.00	1.30	0.49
3	0.76 ± 0.02	0.58	1.11
4	0.39 ± 0.01	0.93	0.98
5	>30		
Ph ₃ SnCl	0.05± 0.00	0.45	0.31
<i>n</i> -Bu ₃ SnCl	0.06 ± 0.00	1	0.29
Ph ₂ SnCl ₂	0.58 ± 0.02	0.71	1.38
<i>n</i> -Bu ₂ SnCl ₂	0.34 ± 0.02	0.82	1.09
Me ₂ SnCl ₂	>30		
Cholic acid (CAH)	>30		
^[17,133] Cisplatin	1.1 ± 0.20	0.20	0.04

Επιπλέον, οι τιμές IC₅₀ των οργανοκασσιτερικών χλωριδίων έναντι των φυσιολογικών κυττάρων σε σχέση με τα σύμπλοκα είναι μικρότερες, δηλώνοντας ισχυρότερη δράση. Ωστόσο οι τιμές του θεραπευτικού δείκτη για τα σύμπλοκα είναι μεγαλύτερες από των οργανοκασσιτερικών χλωριδίων. Έτσι τα σύμπλοκα καθίστανται ιδανικά ως προς την αντικαρκινική τους δράση σε σχέση με τα οργανοκασσιτερικά χλωρίδια. Επιπροσθέτως οι θεραπευτικοί δείκτες των συμπλόκων είναι καλύτεροι από της cisplatin, γεγονός που τα καθιστά λιγότερο τοξικά σε σχέση με τη cisplatin που είναι γνωστό για την τοξικότητα της.

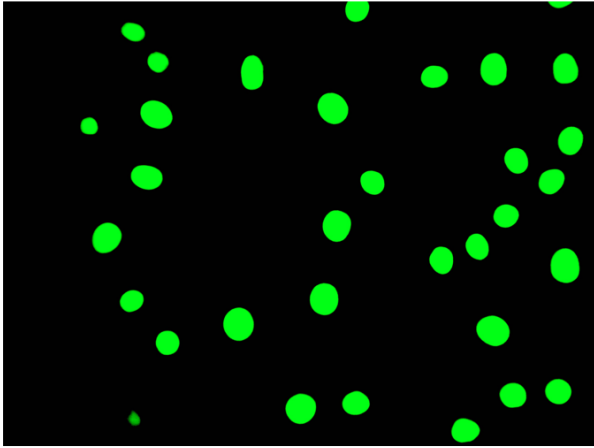
6.3. Έλεγχος της in vitro γονοτοξικότητας με τη μέθοδο των μικροπυρήνων.

Η γονοτοξικότητα των συμπλόκων 1-5 ελέγχθηκε με τη μέθοδο των μικροπυρήνων σε φυσιολογικά κύτταρα MRC-5. Η παρουσία των μικροπυρήνων (micronucleus, MN) στα κύτταρα είναι βιοδείκτης μεταλλαξιογόνου, γονοτοξικής ή τερατογόνου δράσης μιας ουσίας. Σχηματίζονται στη μίτωση κατά την μετάβαση από την μετάφαση προς την ανάφαση. Εμφανίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων ως μικρά στρόγγυλα θραύσματα DNA, τα οποία αδυνατούν να ενσωματωθούν στα θυγατρικά κύτταρα μετά το πέρας της μίτωσης. Η ύπαρξή τους ή όχι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση πρόκλησης γενετικών βλαβών από μια ουσία [16].

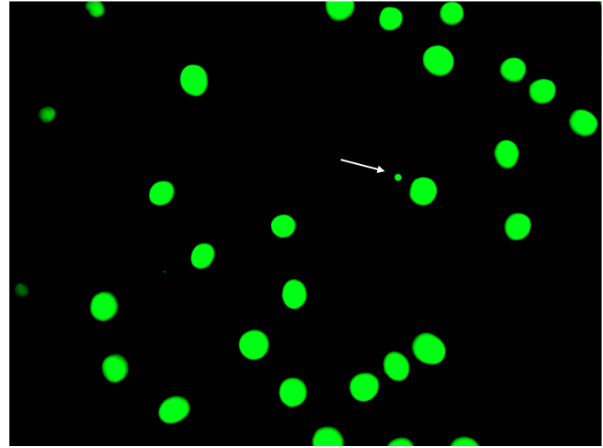
Πίνακας 6.3.1. Ποσοστό (%) εμφάνισης μικροπυρήνων στα κύτταρα MRC-5 μετά από την επώαση στις τιμές IC₅₀ των συμπλόκων 1-5.

Σύμπλοκο	Συχνότητα μικροπυρήνων (%)
Control	0.85 ± 0.20
1	1.80 ± 0.40
2	0.95 ± 0.10
3	1.11 ± 0.30
4	2.45 ± 0.70
5	2.35 ± 0.1
^[16] Cisplatin	1.6

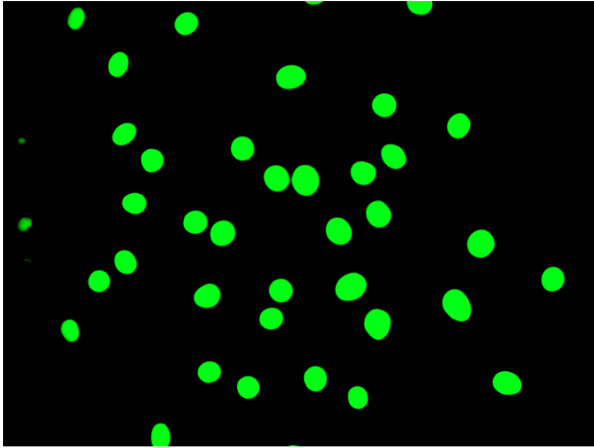
Τα αποτελέσματα του ποσοστού εμφάνισης μικροπυρήνων μετά την εφαρμογή των συμπλόκων 1-5 στα κύτταρα MRC-5 στις τιμές IC₅₀ φαίνονται στον Πίνακα 6.3.1. Για το σύμπλοκο 5 η τιμή που ελέγχθηκε είναι 30 μM, καθώς δεν βρέθηκε τιμή IC₅₀. Παρατηρούμε πως τα ποσοστά των μικροπυρήνων που εμφανίζονται για τα σύμπλοκα 1-5 είναι παρόμοια με αυτά που εμφανίζονται μετά από την επώαση των κυττάρων με τη cisplatin, δεικνύοντας τη χαμηλή γονοτοξικότητα των συμπλόκων. Στην Εικόνα 6.3.1 φαίνονται χαρακτηριστικές εικόνες από τα πειράματα που έγιναν σε μικροσκόπιο φθορισμού.



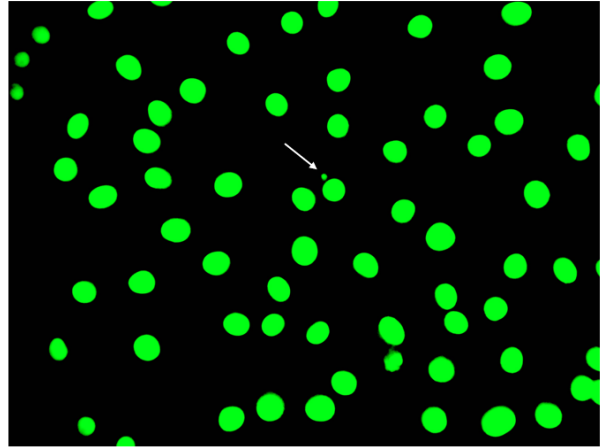
α.



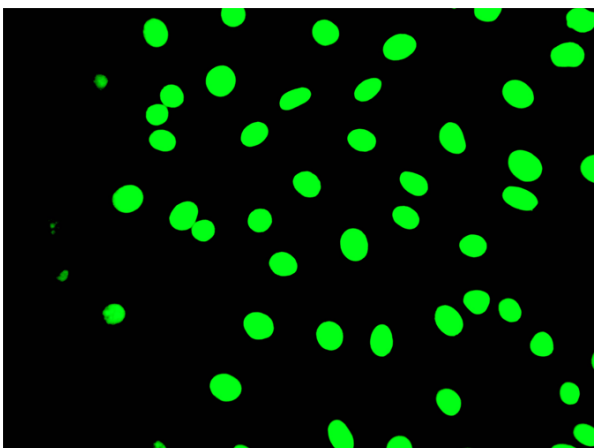
β.



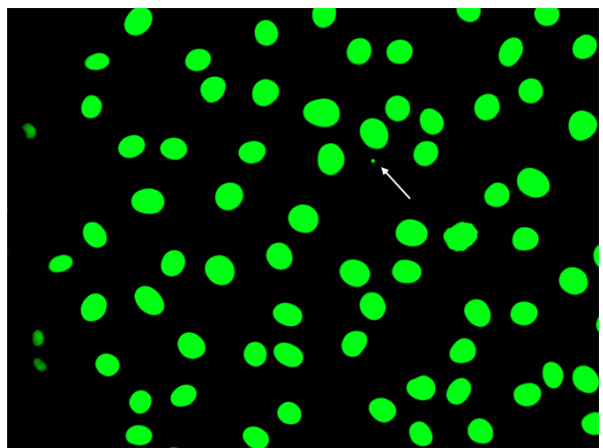
γ.



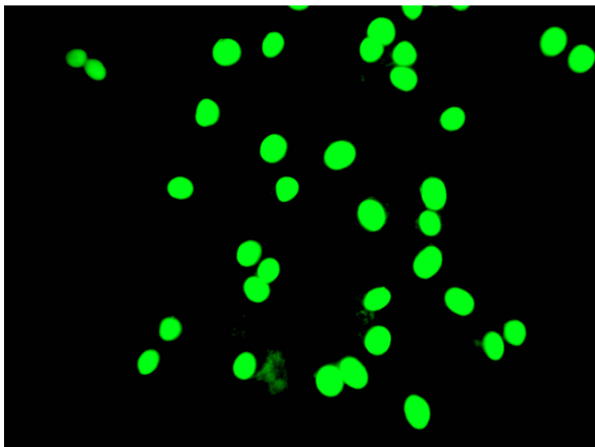
δ.



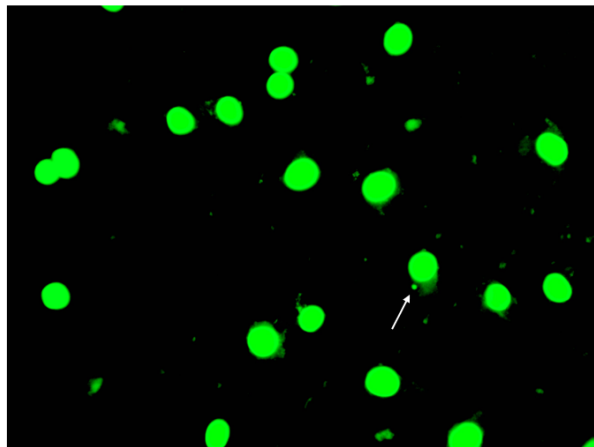
ε.



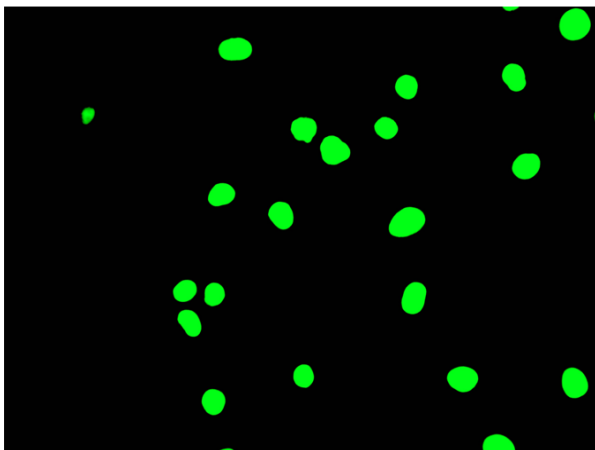
στ.



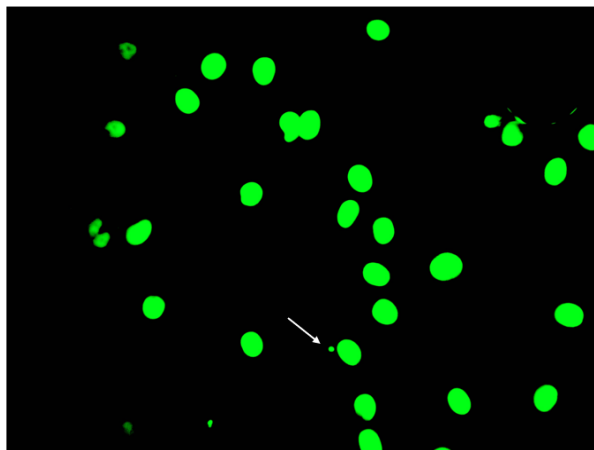
ζ.



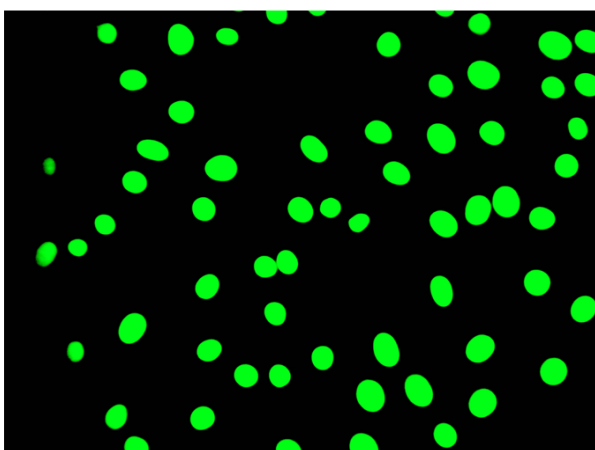
η.



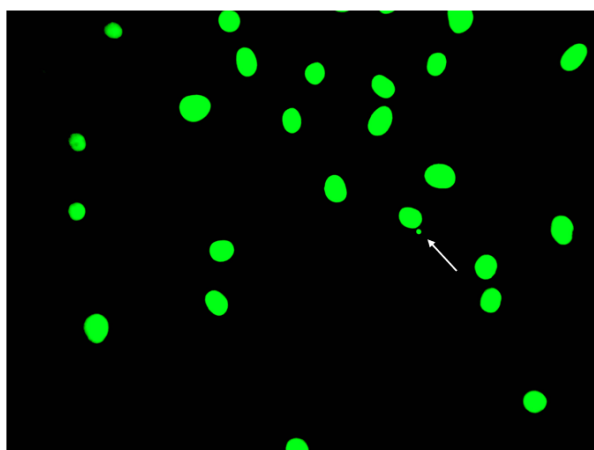
θ.



ι.



κ.



λ.

Εικόνα 6.3.1. Αντιπροσωπευτικές εικόνες με μικροπυρήνες που σχηματίστηκαν στα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών απουσία (α, β) ή παρουσία των συμπλόκων 1-5 (γ, δ (1), ε, στ (2), ζ, η (3), θ, ι (4), κ, λ (5)). Με τα βέλη δηλώνονται οι μικροπυρήνες.

6.4. Έλεγχος της *in vivo* γονοτοξικότητας στον ζωντανό οργανισμό *Allium cepa*.

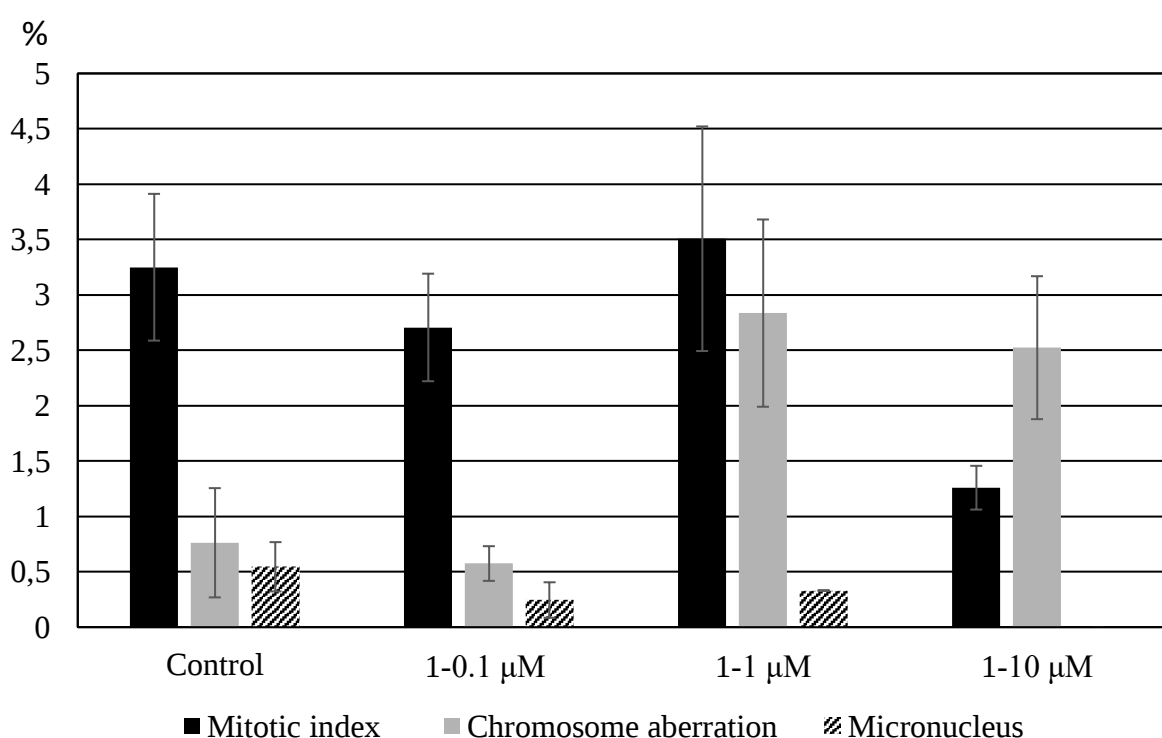
Η γονοτοξικότητα των συμπλόκων **1-4** ελέγχθηκε *in vivo* στον ζωντανό οργανισμό *Allium cepa* (κρεμμύδι). Για το σύμπλοκο **5** δεν ελέγχθηκε η γονοτοξικότητα *in vivo* καθώς δεν εμφάνισε αντιπολλαπλασιαστική δράση στις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν στις κυτταρικές σειρές (καρκινικές και φυσιολογικές).

Μέσω του μοντέλου *Allium cepa* μπορούν να ελεγχθούν βλάβες στο DNA, όπως χρωμοσωμικές και πυρηνικές ανωμαλίες καθώς και η εμφάνιση μικροπυρήνων. Τέτοιου είδους αλλαγές στο γενετικό υλικό μπορούν να προσδιορίσουν τη γονοτοξικότητα που έχει κάποια ουσία, καθώς βλάβες στο χρωμοσωμικό επίπεδο υποδηλώνουν την καρκινογενετική ικανότητα της ουσίας. Επιπλέον η κυτταροτοξικότητα μιας ουσίας μπορεί να ελεγχθεί από αλλαγές που υφίσταται ο μιτωτικός δείκτης (mitotic index, MI), που αποτελεί την αναλογία κυττάρων σε μίτωση ή όχι [17,160-161].

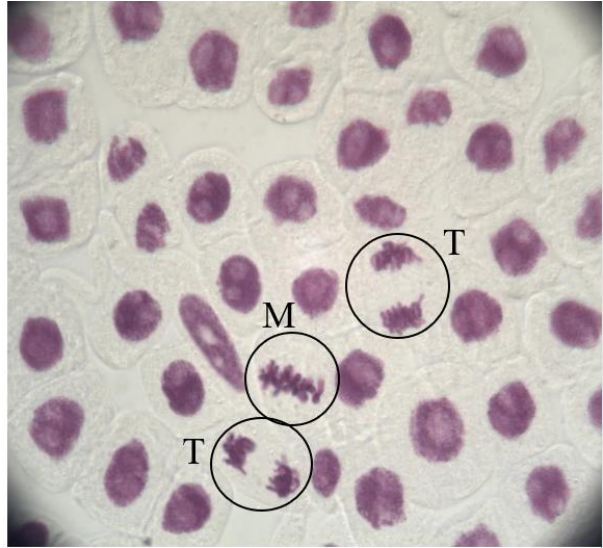
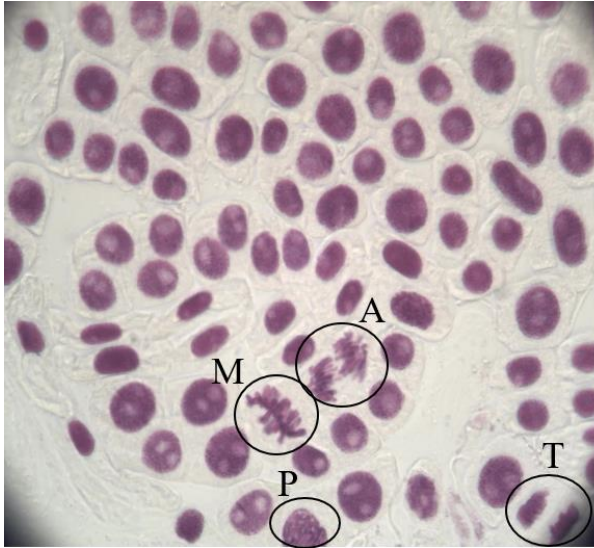
Οι συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν για τα σύμπλοκα **1-4** είναι 0.1, 1 και 10 μM , εύρος που περιλαμβάνει τις τιμές IC_{50} για τα σύμπλοκα αυτά. Κατόπιν υπολογίστηκαν οι αλλαγές στον μιτωτικό δείκτη καθώς και στην εμφάνιση χρωμοσωμικών/πυρηνικών ανωμαλιών και μικροπυρήνων.

Για το σύμπλοκο **1** παρατηρούμε πως ο μιτωτικός δείκτης στη συγκέντρωση 0.1 μM δεν αλλάζει σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (control) υποδηλώνοντας πως το σύμπλοκο αυτό δεν είναι μεταλλαξιογόνο ή γονοτοξικό στη συγκέντρωση αυτή (Εικόνα 6.4.1). Αυτή η συγκέντρωση αποτελεί και τη χαμηλότερη τιμή IC_{50} που βρέθηκε στις κυτταρικές σειρές. Στις συγκεντρώσεις 1 και 10 μM που είναι μεγαλύτερες από τις τιμές IC_{50} κατά 6.3-14.3 και 62.5-142.9 φορές, αντίστοιχα, αυξάνεται το ποσοστό εμφάνισης χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Επιπλέον στη συγκέντρωση 10 μM μειώνεται και το ποσοστό του μιτωτικού δείκτη. Επομένως

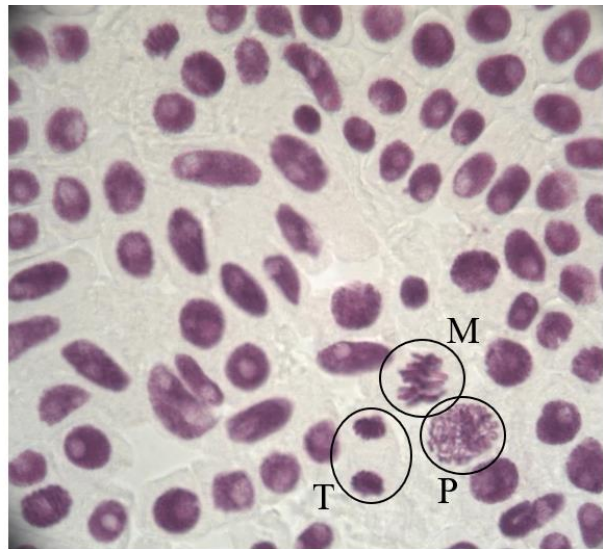
συμπεραίνεται πως το σύμπλοκο αυτό δεν είναι γονοτοξικό στις συγκεντρώσεις IC₅₀ που βρέθηκαν στα κύτταρα. Στην Εικόνα 6.4.2 εμφανίζονται χαρακτηριστικές εικόνες από την εφαρμογή του συμπλόκου **1** στο *Allium cepa*. Με τα γράμματα συμβολίζονται οι διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου (πρόφαση (prophase, P), μετάφαση (metaphase, M), ανάφαση (anaphase, A), τελόφαση (telophase, T)) καθώς και οι χρωμοσωπικές ανωμαλίες (chromosome aberrations, CA) και οι μικροπυρήνες (micronucleus, MN).



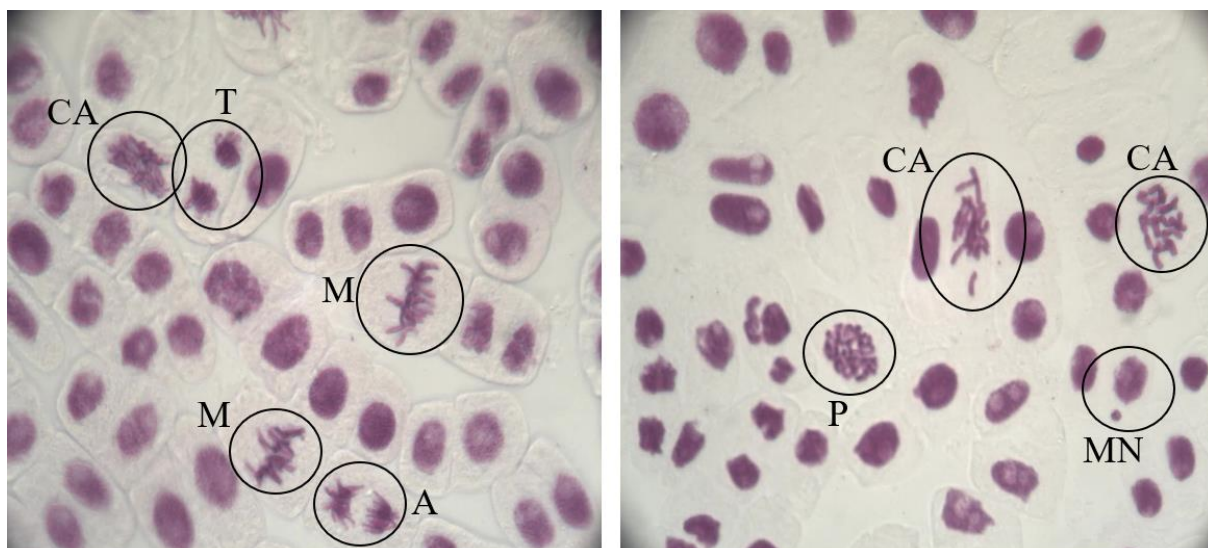
Εικόνα 6.4.1. Το ποσοστό (%) του μιτωτικού δείκτη, χρωμοσωμικών ανωμαλιών και μικροπυρήνων μετά από επώαση του *Allium cepa* με το σύμπλοκο **1**.



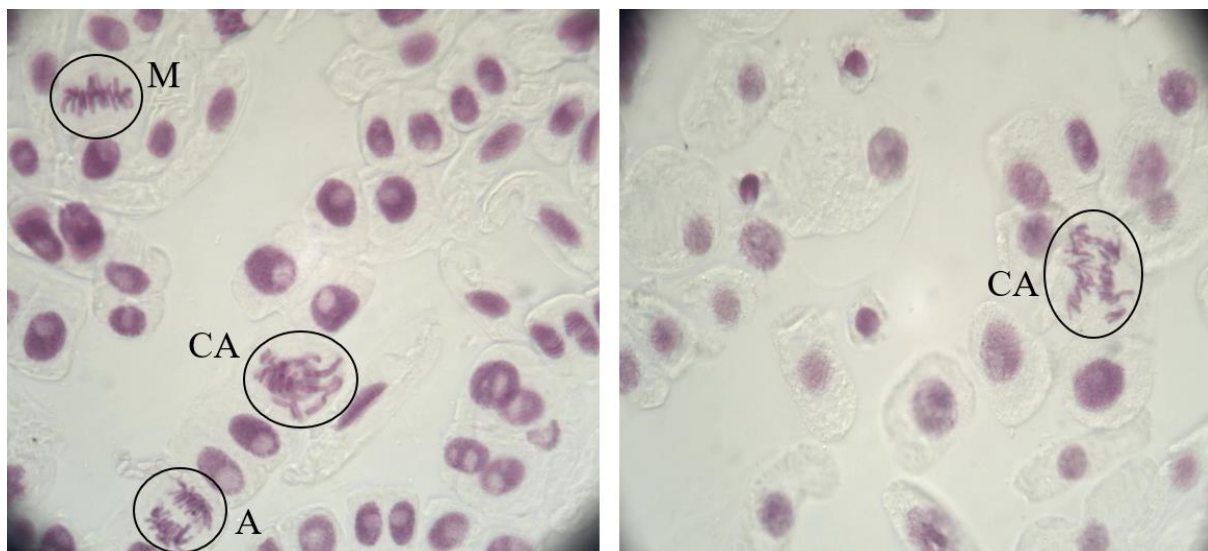
α .



β .



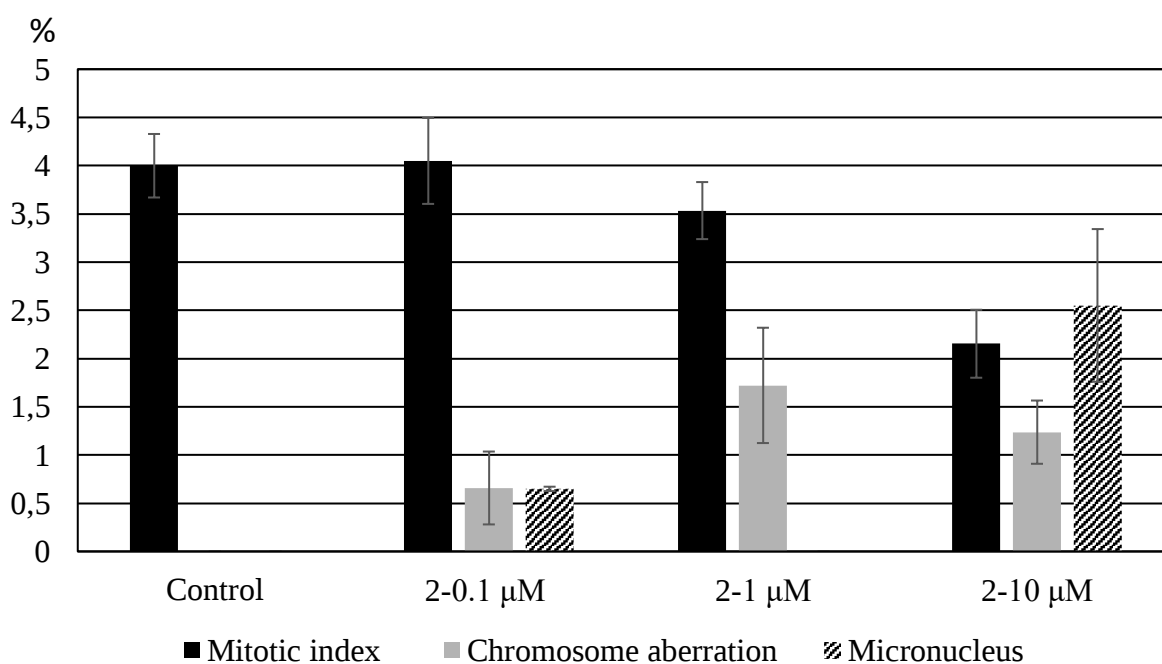
γ.



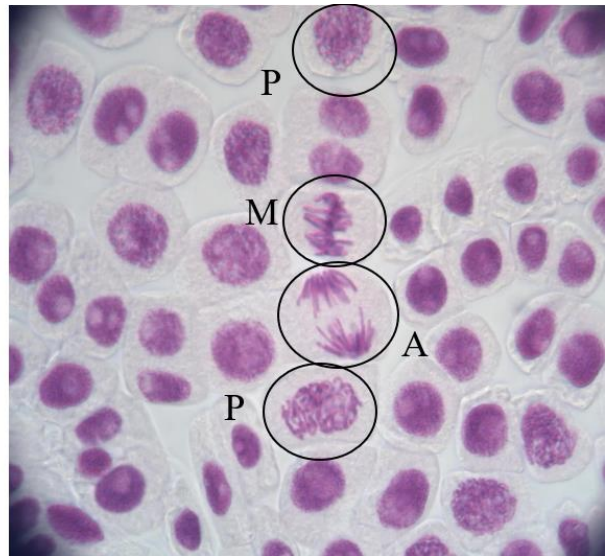
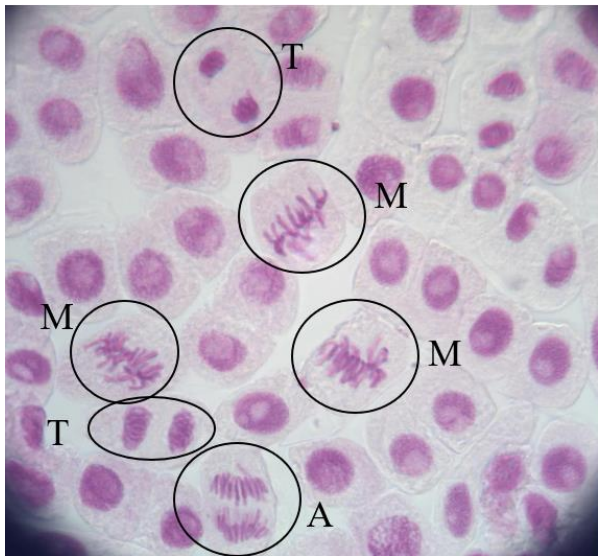
δ.

Εικόνα 6.4.2. Χαρακτηριστικές εικόνες των μεριστοματικών κυττάρων του *Allium cepa* του control (α), και μετά από έκθεση στο σύμπλοκο **1** σε συγκέντρωση 0.1 μM (β), 1 μM (γ) και 10 μM (δ). P= prophase, M= metaphase, A= anaphase, T= telophase, CA= chromosome aberration, MN= micronucleus.

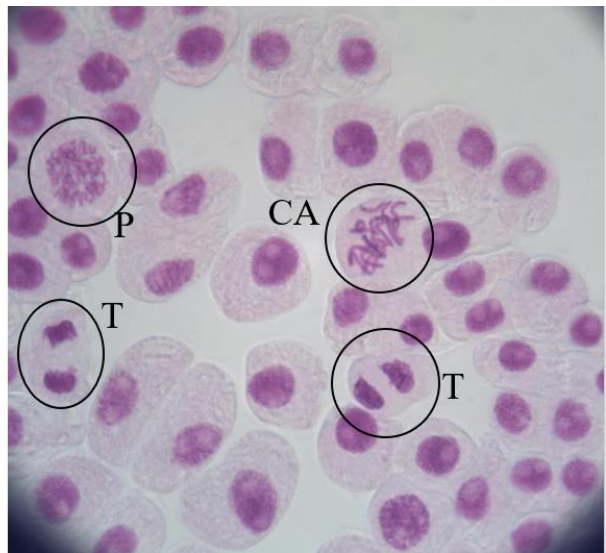
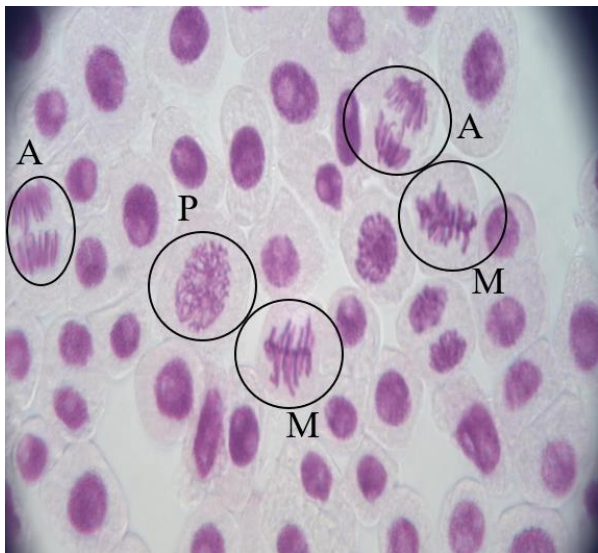
Στο σύμπλοκο 2 παρατηρούμε πως ο μιτωτικός δείκτης δεν αλλάζει στις συγκεντρώσεις 0.1 και 1 μM σε σχέση με το control (Εικόνα 6.4.3). Αυτό υποδηλώνει πως το σύμπλοκο 2 δεν είναι μεταλλαξιογόνο ή γονοτοξικό ακόμα και στη συγκέντρωση 1 μM , που είναι 2.9-7.7 φορές μεγαλύτερη από τις IC_{50} τιμές που βρέθηκαν στις κυτταρικές σειρές. Στην συγκέντρωση 10 μM παρατηρείται μείωση του μιτωτικού δείκτη και αύξηση στην εμφάνιση τόσο χρωμοσωμικών ανωμαλιών όσο και μικροπυρήνων, ωστόσο η συγκέντρωση αυτή είναι 28.6-76.9 φορές μεγαλύτερη των IC_{50} τιμών. Στην Εικόνα 6.4.4 φαίνονται χαρακτηριστικές εικόνες από τα κύτταρα του μεριστοματικού άκρου των ριζών του *Allium cepa* μετά την επώαση με το σύμπλοκο 2.



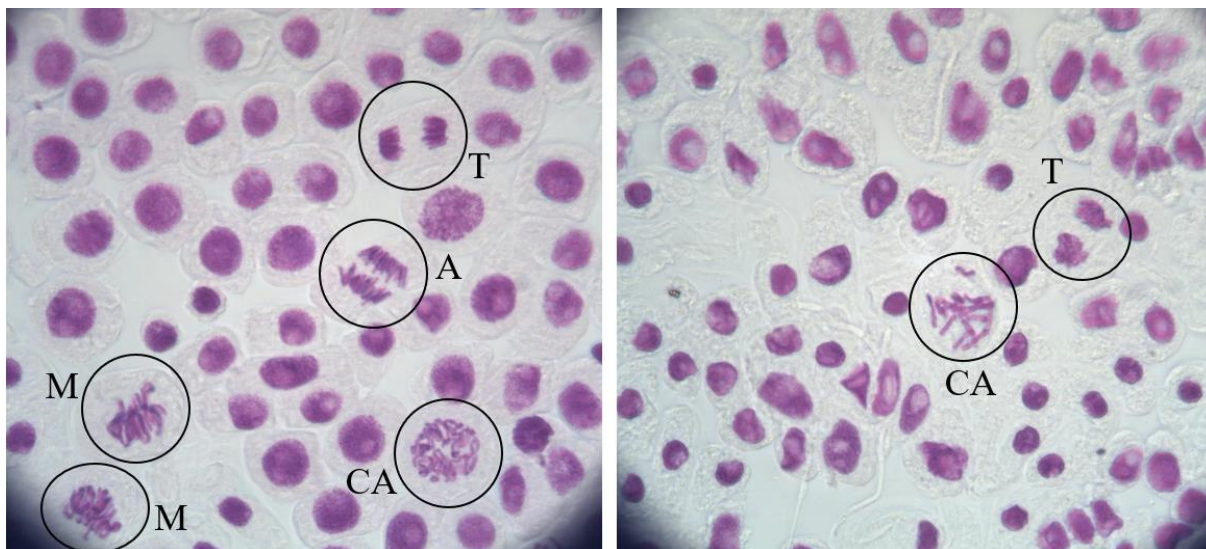
Εικόνα 6.4.3. Το ποσοστό (%) του μιτωτικού δείκτη, χρωμοσωμικών ανωμαλιών και μικροπυρήνων μετά από επώαση του *Allium cepa* με το σύμπλοκο 2.



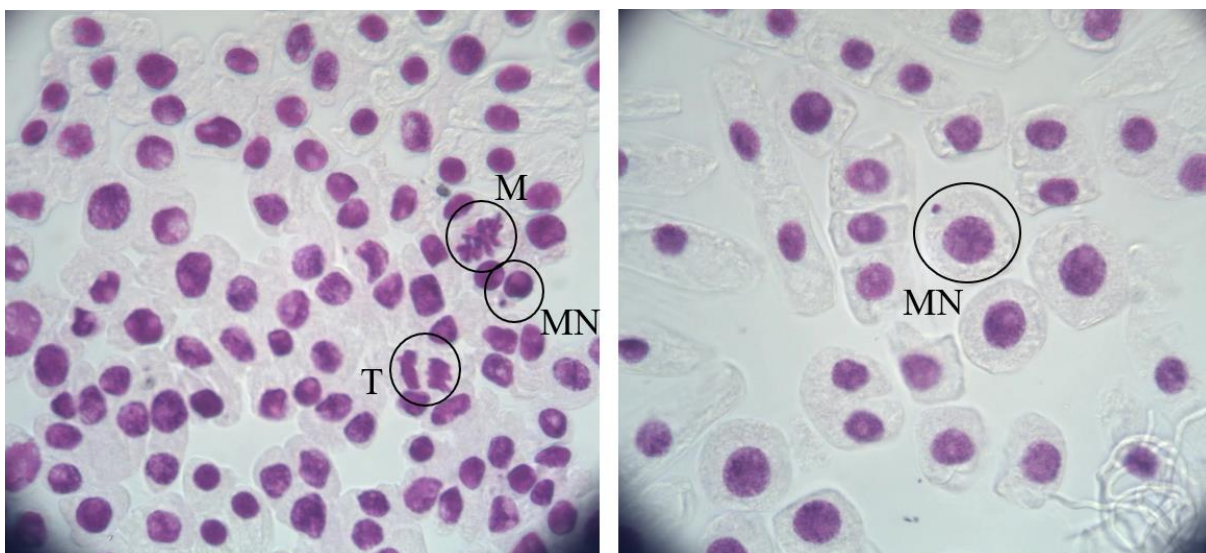
α.



β.



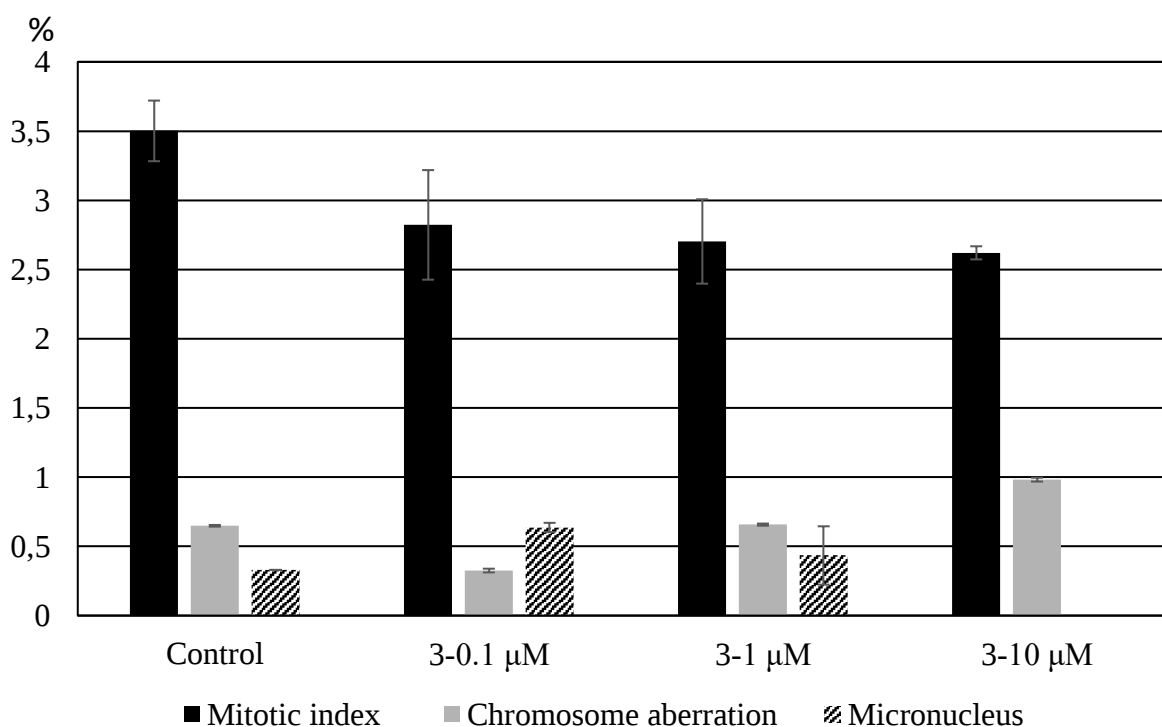
γ.



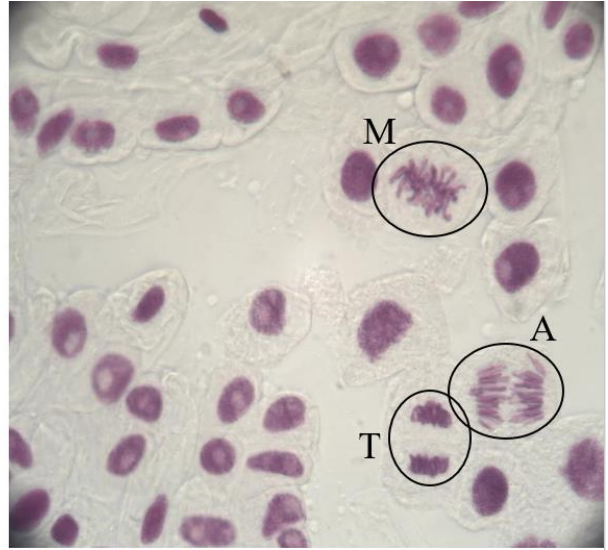
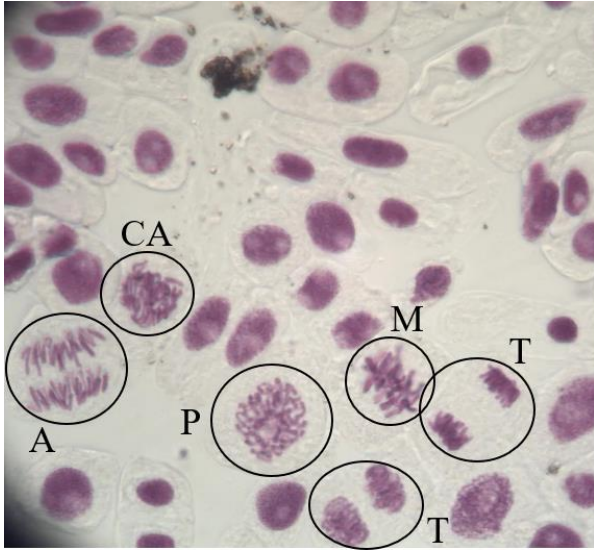
δ.

Εικόνα 6.4.4. Χαρακτηριστικές εικόνες των μεριστοματικών κυττάρων του *Allium cepa* του control (α), και μετά από έκθεση στο σύμπλοκο **2** σε συγκέντρωση 0.1 μM (β), 1 μM (γ) και 10 μM (δ). P= prophase, M= metaphase, A= anaphase, T= telophase, CA= chromosome aberration, MN= micronucleus.

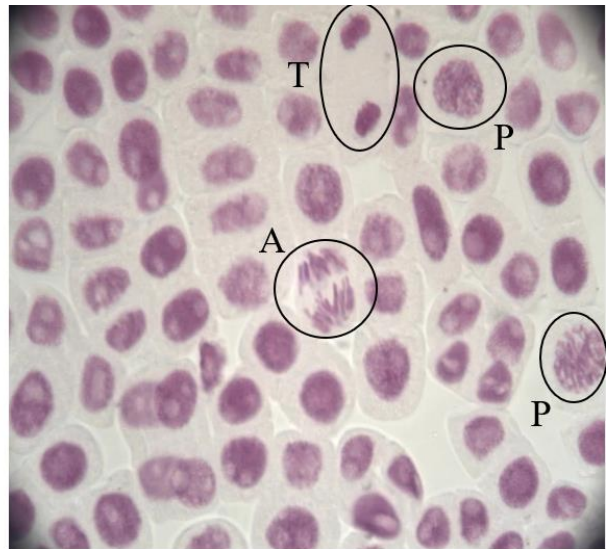
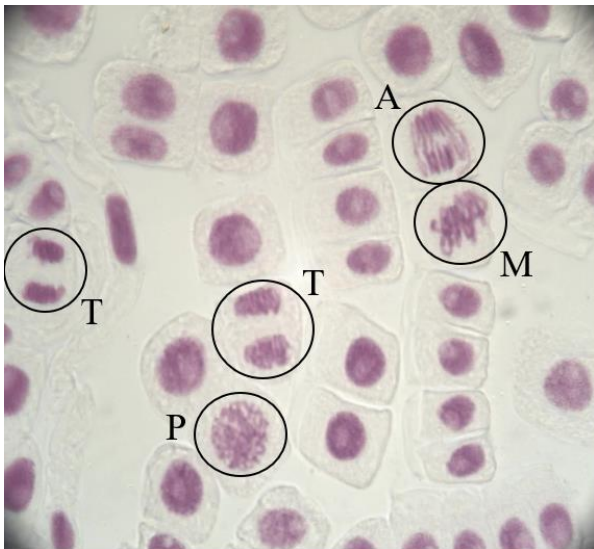
Στο σύμπλοκο **3** σε όλες τις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες αλλαγές στο ποσοστό του μιτωτικού δείκτη όσο και στην εμφάνιση χρωμοσωμικών ανωμαλιών και μικροπυρήνων σε σχέση με το control (Εικόνα 6.4.5). Η συγκέντρωση 1 μM είναι 1.3-1.5 φορές μεγαλύτερη από τις τιμές IC_{50} που βρέθηκαν για τις κυτταρικές σειρές ενώ η συγκέντρωση 10 μM είναι 7.6-14.7 φορές μεγαλύτερη. Έτσι συμπεραίνεται πως το σύμπλοκο **3** δεν προκαλεί γονοτοξικότητα. Στην Εικόνα 6.4.6 φαίνονται χαρακτηριστικές εικόνες από την εφαρμογή του συμπλόκου **3** στο *Allium cepa*.



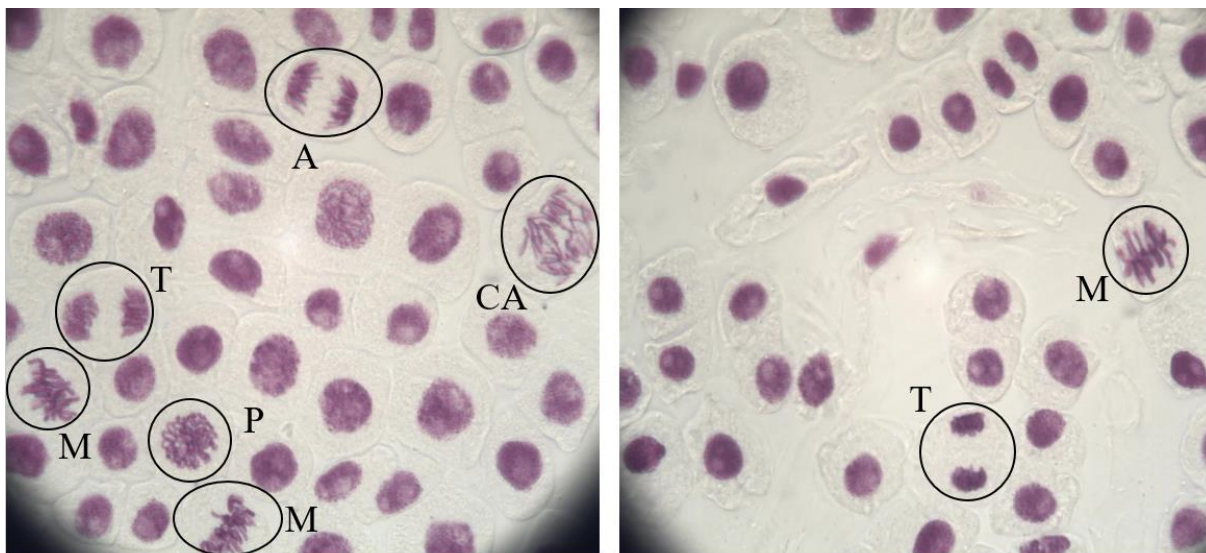
Εικόνα 6.4.5 Το ποσοστό (%) του μιτωτικού δείκτη, χρωμοσωμικών ανωμαλιών και μικροπυρήνων μετά από επώαση του *Allium cepa* με το σύμπλοκο **3**.



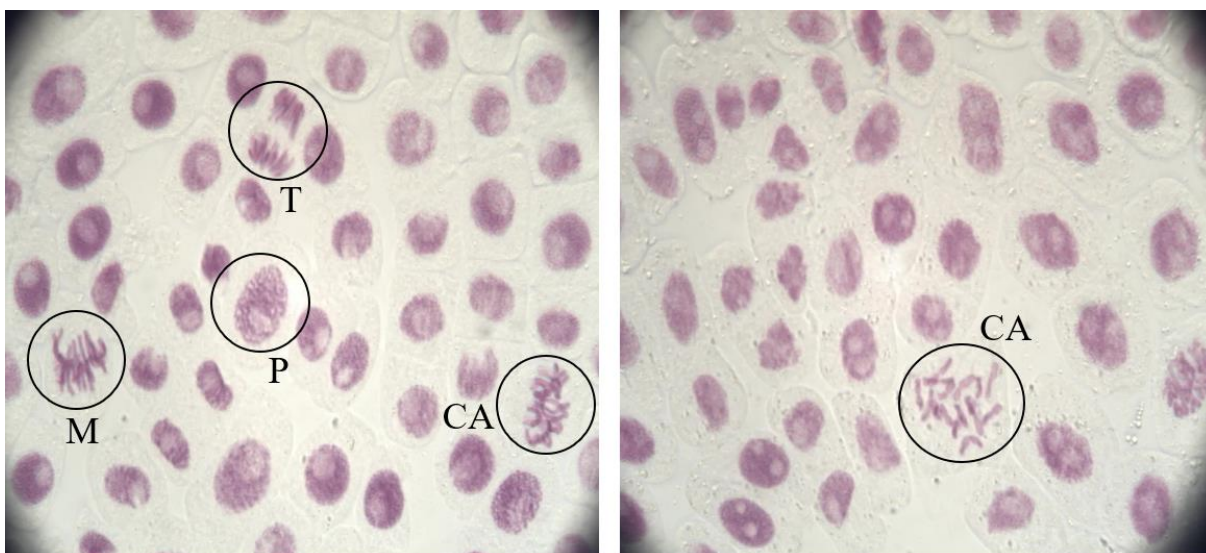
α.



β.



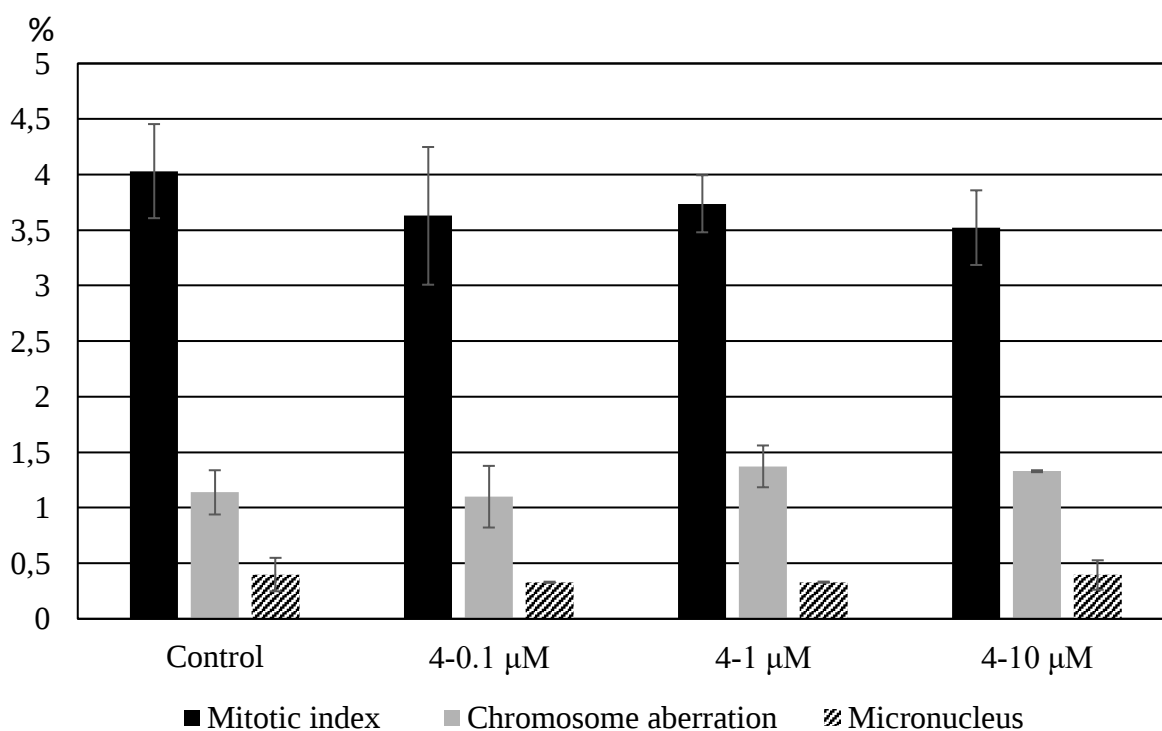
γ.



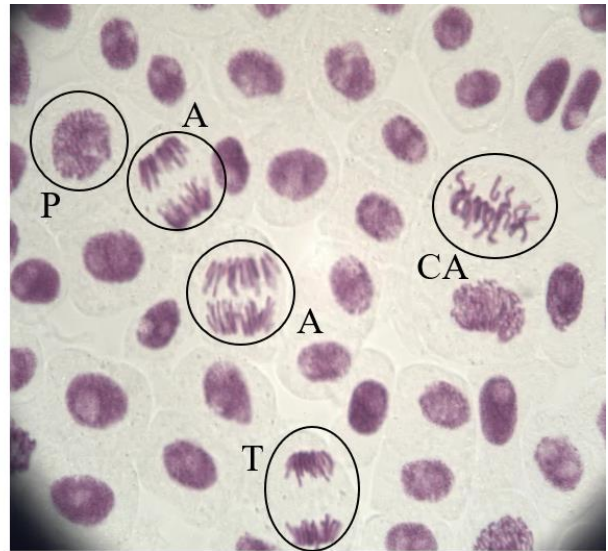
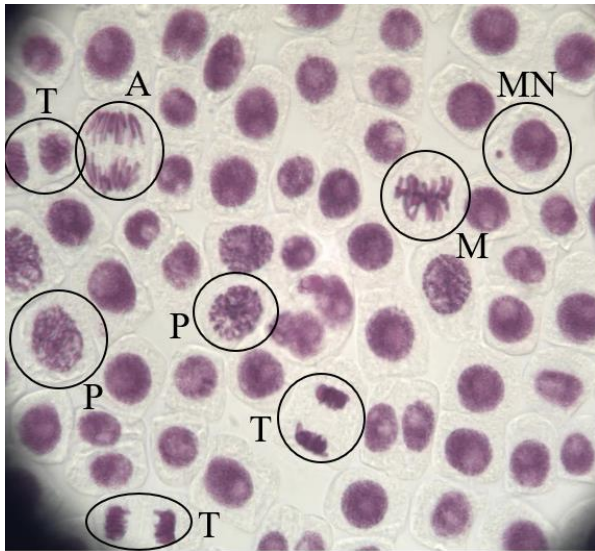
δ.

Εικόνα 6.4.6. Χαρακτηριστικές εικόνες των μεριστοματικών κυττάρων του *Allium cepa* του control (α), και μετά από έκθεση στο σύμπλοκο **3** σε συγκέντρωση 0.1 μM (β), 1 μM (γ) και 10 μM (δ). P= prophase, M= metaphase, A= anaphase, T= telophase, CA= chromosome aberration, MN= micronucleus.

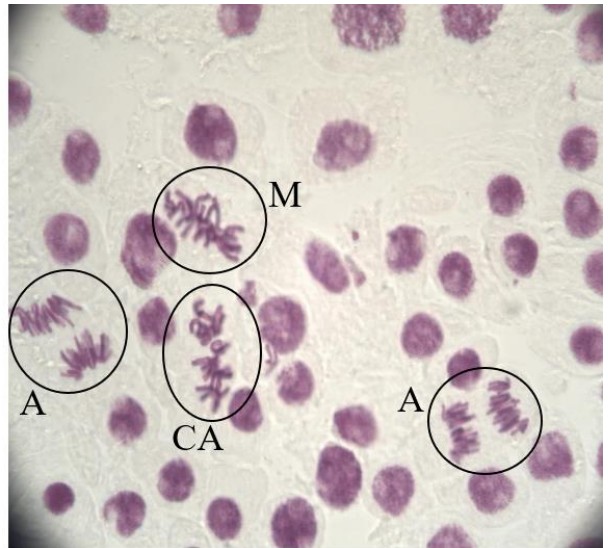
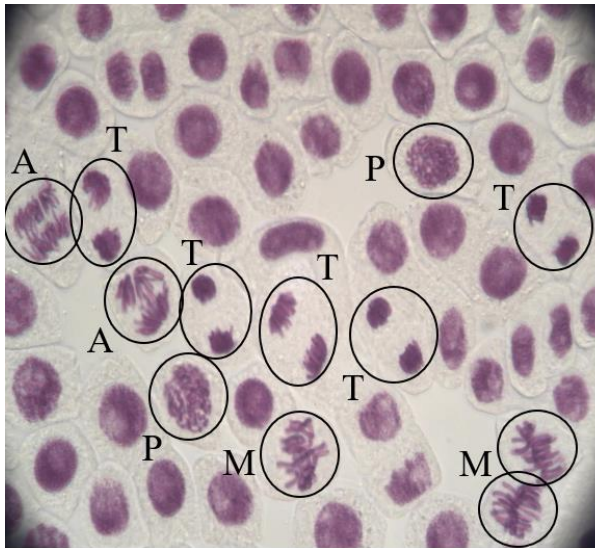
Στο σύμπλοκο 4 παρατηρούμε παρόμοια αποτελέσματα με το σύμπλοκο 3. Δεν παρατηρούνται αλλαγές στον μιτωτικό δείκτη ή στην εμφάνιση χρωμοσωμικών ανωμαλιών και μικροπυρήνων στις συγκεντρώσεις 0.1, 1 και 10 μM , σε σχέση με το control (Εικόνα 6.4.7). Η συγκέντρωση 1 μM είναι 2.4-2.6 φορές μεγαλύτερη από τις τιμές IC_{50} που βρέθηκαν για τις κυτταρικές σειρές, και η συγκέντρωση 10 μM είναι μεγαλύτερη κατά 23.8-25.6 φορές. Επομένως συμπεραίνεται και γι' αυτό το σύμπλοκο πως δεν προκαλεί γονοτοξικότητα. Στην Εικόνα 6.4.8 φαίνονται χαρακτηριστικές εικόνες από την εφαρμογή του συμπλόκου 4 στο *Allium cepa*.



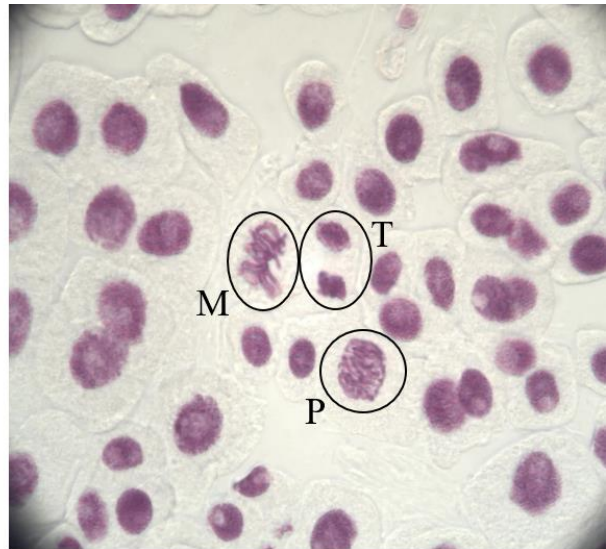
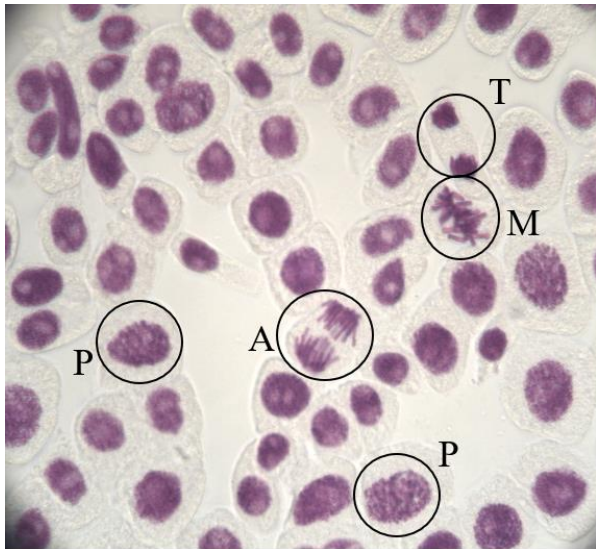
Εικόνα 6.4.7. Το ποσοστό (%) του μιτωτικού δείκτη, χρωμοσωμικών ανωμαλιών και μικροπυρήνων μετά από επώαση του *Allium cepa* με το σύμπλοκο 4



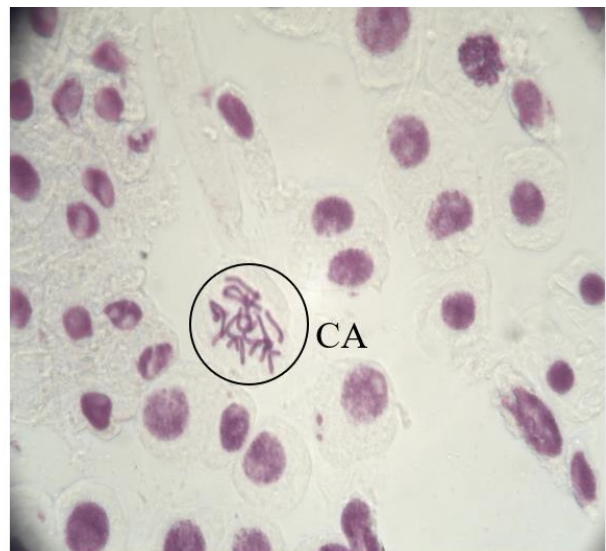
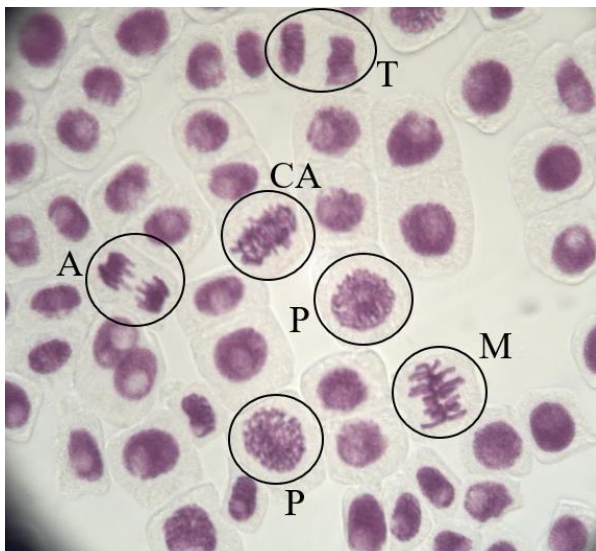
α.



β.



γ.



δ.

Εικόνα 6.4.8. Χαρακτηριστικές εικόνες των μεριστοματικών κυττάρων του *Allium cepa* του control (α), και μετά από έκθεση στο σύμπλοκο **4** σε συγκέντρωση 0.1 μM (β), 1 μM (γ) και 10 μM (δ). P= prophase, M= metaphase, A= anaphase, T= telophase, CA= chromosome aberration, MN= micronucleus.

6.5. Έλεγχος της in vivo τοξικότητας στον ζωντανό οργανισμό *Artemia salina*.

Η τοξικότητα των συμπλόκων **1-4** πέρα από τα φυσιολογικά κύτταρα (*in vitro*) ελέγχθηκε και *in vivo* χρησιμοποιώντας τον ζωντανό οργανισμό μοντέλο *Artemia salina* (γαρίδα άλμης). Η δοκιμασία τοξικότητας σε αυτό τον οργανισμό εφαρμόζεται για να προσδιοριστούν διάφορες δράσεις ενός παράγοντα, όπως είναι οι φυτοτοξικές/παρασιτοκτόνες καθώς και οι κυτταροτοξικές [162β].

Πίνακας 6.5.1. Ποσοστό (%) επιβίωσης του ζωντανού οργανισμού *Artemia salina*.

	Ποσοστό βιωσιμότητας (%)			
Σύμπλοκο	Control	0.1 μ M	1 μ M	10 μ M
1	93.70 $\pm$ 6.70	92.50 $\pm$ 9.40	90.10 $\pm$ 13.20	14.10 $\pm$ 5.80
2	91.50 $\pm$ 8.40	75.20 $\pm$ 18.60	67.20 $\pm$ 16.10	0
3	100 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00	95.00 $\pm$ 6.70	78.00 $\pm$ 19.50
4	100 $\pm$ 0.00	92.50 $\pm$ 9.40	49.40 $\pm$ 22.50	39.20 $\pm$ 11.40

Οι συγκεντρώσεις στις οποίες ελέγχθηκε η πιθανή τοξική δράση των ενώσεων **1-4** ήταν ίδιες με αυτές που εφαρμόστηκαν και στον ζωντανό οργανισμό *Allium cepa* (0.1, 1, και 10 μ M). Για τα σύμπλοκα **1** και **2** παρατηρείται η ικανοποιητική βιωσιμότητα της γαρίδας άλμης (> 65%) μέχρι και την συγκέντρωση 1 μ M συγκριτικά με το control, όπου δεν έχει εφαρμοστεί ο παράγοντας (Πίνακας 6.5.1). Η μικρή (14.1%, **1**) έως καθόλου βιωσιμότητα του οργανισμού στη συγκέντρωση 10 μ M συμβαδίζει με τα αποτελέσματα που εξάγονται και από τη δοκιμασία

με το *Allium cepa*, καθώς σε αυτή τη συγκέντρωση υπάρχει μείωση του μιτωτικού δείκτη και αυξημένο ποσοστό χρωμοσωμικών ανωμαλιών και μικροπυρήνων για τα δυο αυτά σύμπλοκα.

Αντίστοιχα, για τα σύμπλοκα **3** και **4** παρατηρείται πάλι συμφωνία των αποτελεσμάτων σε σχέση με τη δοκιμασία του *Allium cepa*. Έτσι η βιωσιμότητα της γαρίδας άλμης είναι αρκετά αυξημένη (> 40%) ακόμα και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση των 10 μM (Πίνακας 6.5.1).

Κεφάλαιο 7

Αποτελέσματα Μοριακού μηχανισμού δράσης.

7.1. Αναστολή του ενζύμου της λιποξυγονάσης.

Είναι ευρέως γνωστό ότι η αλληλεπίδραση βαρέων μετάλλων με ελεύθερες σουλφυδρυλ-ομάδες σε πρωτεΐνες, και συνεπώς η παραμόρφωση της πρωτεϊνικής δομής, είναι ένας από τους προτεινόμενους μηχανισμούς του επαγόμενου από μέταλλο κυτταρικού θανάτου [128].

Η λιποξυγονάση (lipoxygenase, LOX) είναι μια διοξυγενάση μη αιμικού σιδήρου που καταλύει, ως πρωταρχική αντίδραση, την υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος και άλλων πολυακόρεστων λιπιδίων μέσω μοριακού οξυγόνου [200-206]. Η έλεγχος της αντίδρασης γίνεται παρακολουθώντας την αύξηση της απορρόφησης στα 234 nm που αφορά στο μόριο του υπερόξο λινελαϊκού οξέος που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης [200].

Η λιποξυγονάση, είναι μια κατηγορία ενζύμων που κατά κύριο λόγο κατανέμεται στο μιτοχόνδριο [16,165,207,213]. Καταλύει την οξειδωση του αραχιδονικού οξέος σε λευκοτριένια και του λινελαϊκού οξέος σε προσταγλανδίνες, καθώς και άλλων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε βιολογικά ενεργούς μεταβολίτες [16,94,130,163,165,202,212,214]. Οι προσταγλανδίνες, τα τελικά προϊόντα που σχηματίζονται από τον μεταβολισμό του λινελαϊκού οξέος, έχει βρεθεί πως συμβάλουν στην ογκογένεση, ενεργώντας ως παράγοντες αγγειογένεσης [94,127,130,163,205].

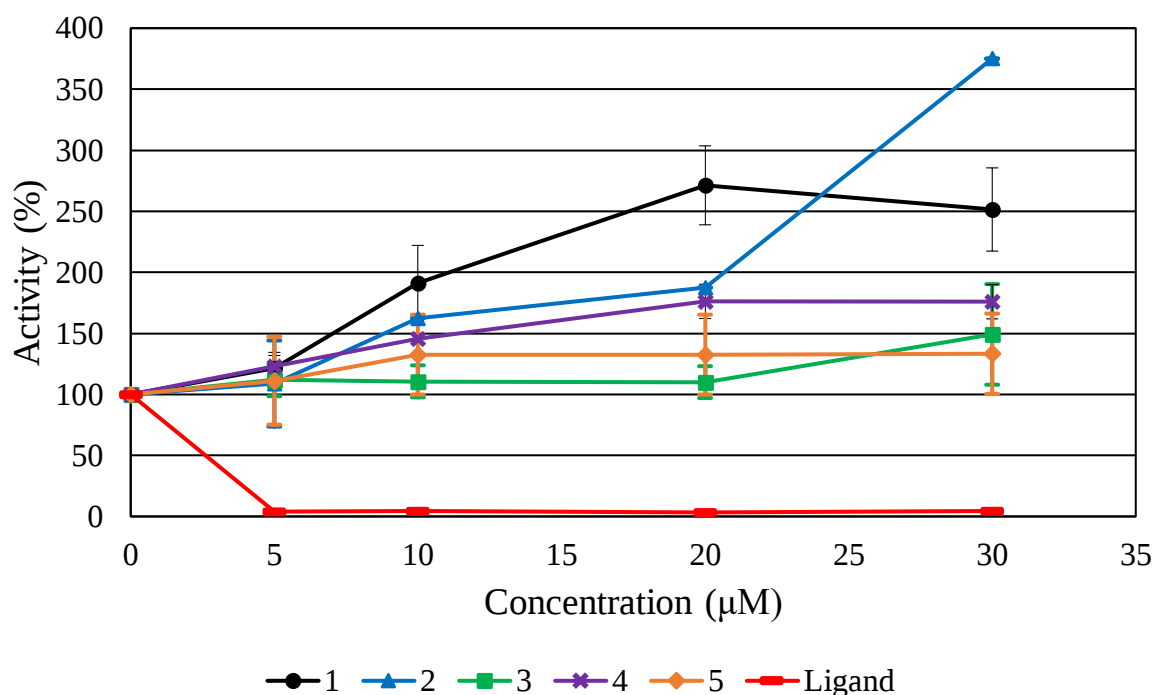
Η σχέση μεταξύ του μεταβολισμού των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (π.χ. λινελαϊκό και αραχιδονικό οξύ) από ένζυμα όπως η λιποξυγονάση, και της καρκινογένεσης έχει εξεταστεί εκτενώς σε πολλές βιοχημικές μελέτες [132]. Τα υπεροξειδία που προέρχονται από τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων μπορούν να ρυθμίσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

[132,208]. Επιπλέον το ένζυμο αυτό παίρνει μέρος και στον μηχανισμό της φλεγμονής [96,165,206-207]. Ο καρκίνος και η φλεγμονή συνδέονται στενά λόγω συγκεκριμένων οξειδωτικών διεργασιών στο μικροπεριβάλλον του όγκου [203]. Οι λιποξυγονάσες και τα προϊόντα κατάλυσής τους σχετίζονται με καρκινογόνες διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η διαφοροποίηση και η απόπτωση [203].

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει πως η LOX σχετίζεται με την ανάπτυξη των ανθρώπινων καρκίνων, μεταξύ των οποίων ο καρκίνος του παγκρέατος, του μαστού, του προστάτη και του εντέρου [205,209-210]. Οι μεταβολίτες της LOX βοηθούν στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού, προωθώντας την εισβολή των καρκινικών κυττάρων στα λεμφικά αγγεία και τελικά στη δημιουργία μετάστασης στους λεμφαδένες [203].

Έτσι η αναστολή της LOX παρέχει ένα πιθανό νέο στόχο για τη θεραπεία και χημειοπροστασία σε διάφορους καρκίνους.[132,208]. Έχει βρεθεί πως η αναστολή της LOX επάγει την απόπτωση στα κύτταρα, καθώς η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία σχετίζεται με τη μειωμένη ικανότητα οξείδωσης των λιπαρών οξέων [16,96,165,207-208,210]. Επομένως η μελέτη αναστολής της LOX σχετίζεται με τη βλάβη στα μιτοχόνδρια στα καρκινικά κύτταρα [16].

Τα σύμπλοκα 1-5 βρέθηκε να έχουν αμελητέα ανασταλτική δράση ενάντια στη LOX και δεν μπόρεσαν να βρεθούν τιμές IC_{50} στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (5, 10, 20 και 30 μM) (Εικόνα 7.1.1). Έτσι τα σύμπλοκα αυτά ενώ έχουν υψηλή κυτταροτοξική δράση, δεν έχουν ικανότητα αναστολής της LOX, επομένως πρέπει να δρουν με διαφορετικό μηχανισμό [96].



Εικόνα 7.1.1. Η ενεργότητα του ενζύμου της λιποξυγονάσης LOX (A%) συναρτήσει διάφορων συγκεντρώσεων των συμπλόκων **1-5** και του προσδέτη CANa.

Παρατηρούμε επιπλέον πως όχι μόνο δεν ευρίσκεται τιμή IC_{50} εντός των ορίων συγκεντρώσεων που ελέγχθηκαν για την αναστολή του ενζύμου από τα σύμπλοκα **1-5**, αλλά και αύξηση στην αρχική ταχύτητα δράσης του ενζύμου. Σε αντίθεση ο προσδέτης (ligand= CANa) προκαλεί αναστολή του ενζύμου της LOX με τιμή $IC_{50}=4.4 \mu M$. Αυτό μπορεί να σημαίνει πως είτε τα σύμπλοκα **1-5** μπορεί να δρουν ως συμπαραγόντες του ενζύμου, βοηθώντας στην καταλυτική του δράση, είτε μπορούν να δρουν κατ' ευθείαν στο υπόστρωμα οξειδώνοντάς το, και φαινομενικά να παρατηρείται αύξηση στην αρχική ταχύτητα του ενζύμου. Παράγοντες που ρυθμίζουν την δράση της LOX μπορεί να διευκολύνουν την πρόσβαση των υποστρωμάτων του ενζύμου καθώς και να σταθεροποιούν τη δομή του ενεργού ενζύμου [211-212]. Στην περίπτωση που τα σύμπλοκα **1-5** δρουν ως οξειδωτικοί παράγοντες απευθείας στο υπόστρωμα, η ενζυμική αντίδραση της LOX μπορεί να συνεχιστεί από την επίδραση των

υπεροξειδικών προϊόντων και αναλόγων που αυτές παράγουν, καθώς αυτά μπορεί να οξειδώνουν τον μη-αιμικό σίδηρο της πρωτεΐνης [213].

7.2. Καταλυτική δράση των συμπλόκων 1-5 στην υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος.

Ο ρόλος των λιπαρών οξέων στο κύτταρο είναι πολύ σημαντικός [164]. Δυο σημαντικά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι το λινελαϊκό και το α-λινολενικό οξύ, τα οποία είναι σημαντικά για τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου [164,206]. Το λινελαϊκό οξύ (linoleic acid, LA) είναι το πιο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ στη διατροφή του ανθρώπου [214]. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή ενέργειας, να εστεροποιηθεί για να δώσει ουδέτερα και πολικά λιπίδια, μπορεί να είναι μέρος των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων παίζοντας ρόλο στη ρευστότητα της μεμβράνης και όταν απομακρύνεται από τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια μπορεί να οξειδωθεί ενζυμικά [164,206,214]. Επιπλέον μπορεί να δρα ως σηματοδοτικό μόριο και ως πρόδρομη ουσία για τη σύνθεση των εικοσανοειδών, όπως οι προσταγλανδίνες [164,206]. Οι προσταγλανδίνες συμβάλουν στην ογκογένεση δρώντας ως παράγοντες αγγειογένεσης [94,127,130,163,205]. Επιπλέον τα ω-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το λινελαϊκό και το αραχιδονικό οξύ είναι γνωστό πως ενισχύουν την ογκογένεση [210]. Το λινελαϊκό οξύ που βρίσκεται στα γαλακτοκομικά προϊόντα και στο βόειο κρέας, έχει αποδειχθεί ως πιθανός αναστολέας της μεταλλαξογένεσης [94,127,130,163]. Έτσι η μελέτη οξείδωσης του λινελαϊκού οξέος είναι μεγάλου ενδιαφέροντος [127].

Το λινελαϊκό οξύ είναι ένα από τα κύρια συστατικά της μιτοχονδριακής μεμβράνης το οποίο οξειδώνεται ενζυμικά όταν απομακρυνθεί από αυτή [16]. Επιπλέον το 13-S-υδροξυοκταδεκαδιενοϊκό οξύ (13-S-hydroxyoctadecadienoic acid, 13-S-HODE), ένας

μεταβολίτης του λινελαϊκού οξέος επηρεάζει δυσμενώς τη μιτοχονδριακή λειτουργία και οδηγεί το μιτοχόνδριο σε αποδόμηση [16,205].

Επιπροσθέτως έχει βρεθεί πως οι λιπόφιλες οργανοκασσιτερικές ενώσεις R_nSnX_{4-n} είναι ξενοβιοτικά που δρουν στις μεμβράνες, προκαλώντας οξειδωτικό στρες όταν συσσωρεύονται στη κυτταρική λιπιδική διπλοστιβάδα [130]. Η κύρια οδός αυτών των διεργασιών σχετίζεται με την προαγωγική επίδραση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων παρουσία των οργανοκασσιτερών ενώσεων [130]. Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις R_nSnX_{4-n} είναι ικανές να αλληλεπιδρούν με τις υπεροξειδικές ρίζες $RCOO^\bullet$ που σχηματίζονται κατά την υπεροξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων $R'H$ από διοξυγόνο, και παράγουν δραστικές οργανικές ρίζες $R^\bullet$ λόγω της ομολυτικής διάσπασης των δεσμών $Sn-C$ σε αντιδράσεις υποκατάστασης ριζών [130].

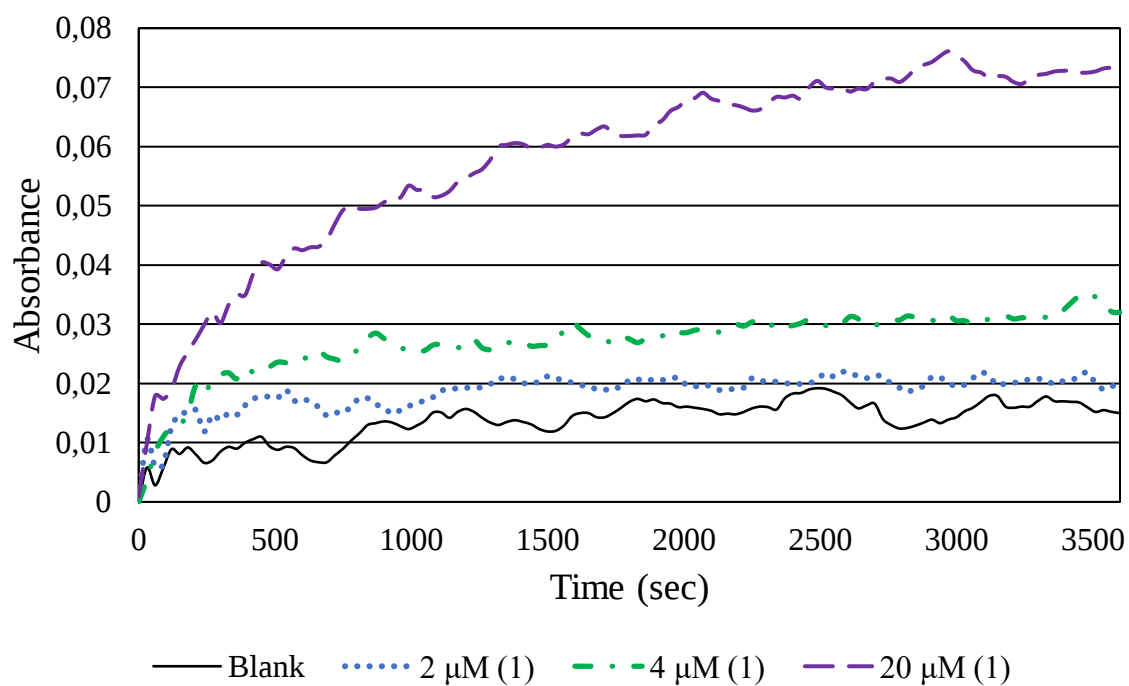
Προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση των συμπλόκων **1-5** ενάντια στις μεμβράνες ελέγχτηκε η αλληλεπίδραση τους με το λινελαϊκό οξύ (0.2 mM) σε τρεις συγκεντρώσεις 2, 4 και 20 μM που αντιστοιχούν σε διάφορες αναλογίες λινελαϊκού οξέος/συμπλόκου (1/100, 1/50, 1/10 αντίστοιχα). Η καταλυτική οξείδωση του λινελαϊκού οξέος μπορεί να προκαλέσει βλάβη στη κυτταρική ή μιτοχονδριακή μεμβράνη, δεδομένου ότι το λινελαϊκό οξύ είναι βασικό συστατικό της μεμβράνης [16-17]. Επιπλέον μόλις αρχίσει η υπεροξείδωση των λιπιδίων, οι υπεροξειδικές ρίζες αυτών διαδίδουν την αντίδραση κάτι που μπορεί να προκαλέσει καταστροφή των κυττάρων, καθώς επηρεάζουν τις λειτουργίες της μεμβράνης και η συσσώρευσή τους μπορεί να οδηγήσει στη νέκρωση [215-216].

Πίνακας 7.2.1. Οι αρχικές ταχύτητες (V_0) οξείδωσης του λινελαϊκού οξέος απουσία (blank) ή παρουσία των συμπλόκων **1-5** και του προσδέτη (CANa).

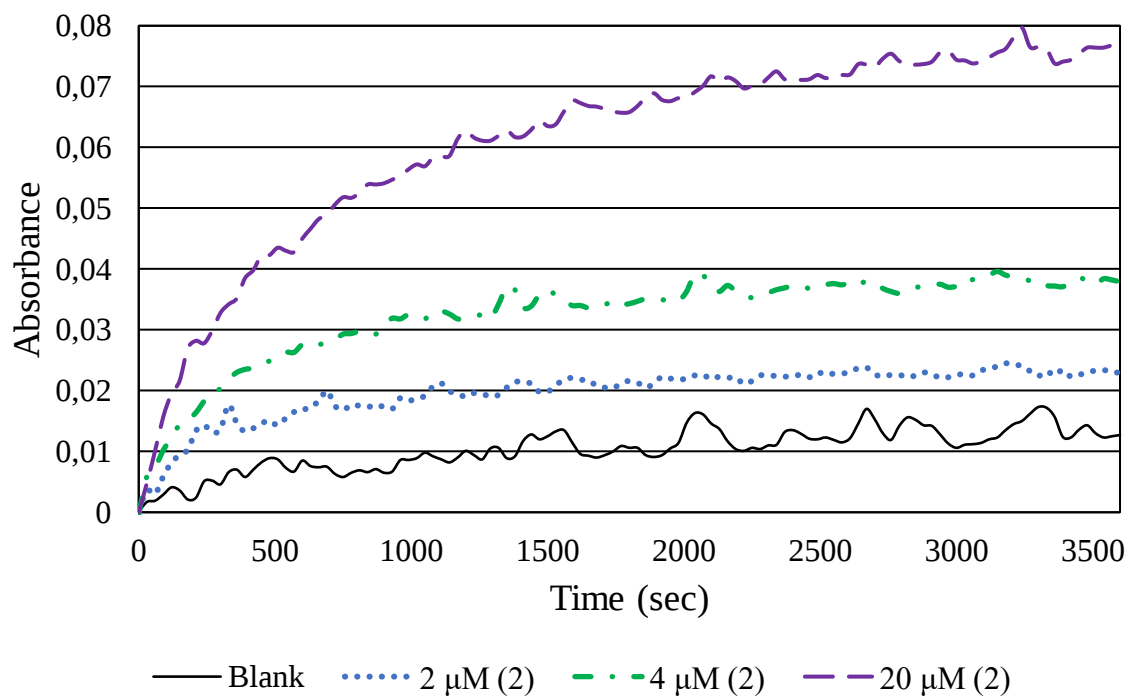
	$V_0 \times 10^{-5} \text{ (s}^{-1}\text{)}$			
Σύμπλοκο	Blank	2 μM	4 μM	20 μM
1	1.5	16.4	14.1	23.4
2	3.5	11.1	12.2	19.4
3	1.4	5.3	10.0	16.7
4	3.5	5.7	6.3	28.1
5	3.5	6	4.1	28.6
Προσδέτης	1.8	2.1	12.1	31.8

Παρατηρούμε πως τα σύμπλοκα **1-5** καταλύουν την οξείδωση του λινελαϊκού οξέος ακόμα και στη μικρότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε που είναι τα 2 μM (αναλογία 1/100). Οι αρχικές ταχύτητες οξείδωσης του λινελαϊκού οξέος φαίνονται στον Πίνακα 7.2.1. Τα σχετικά διαγράμματα απεικόνισης της συσσώρευσης του λινελαϊκού οξέος απουσία ή παρουσία των συμπλόκων **1-5** ή του προσδέτη φαίνονται στις Εικόνες 7.2.1-7.2.6.

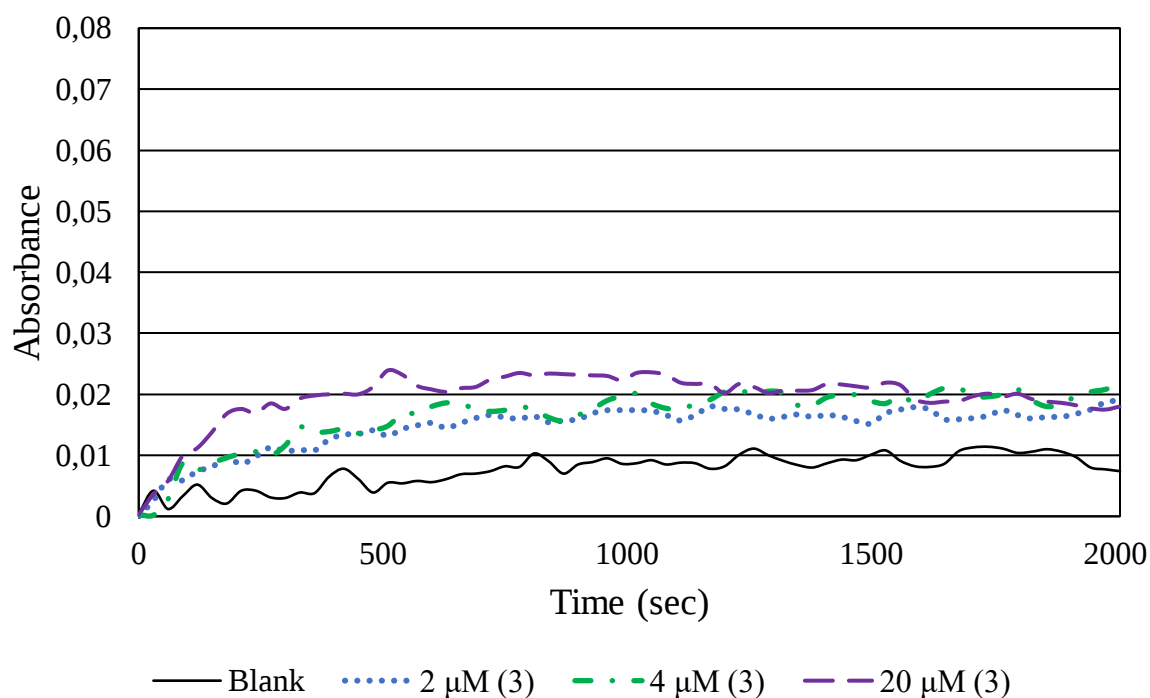
Ενώ παρατηρούμε αύξηση της αρχικής ταχύτητας και παρουσία του προσδέτη (ligand= CANa), στο διάγραμμα της Εικόνας 7.2.6, που φαίνεται η οξείδωση του λινελαϊκού οξέος από τον προσδέτη, παρατηρούμε πως δεν συνεχίζεται η οξείδωση του υποστρώματος με την πάροδο του χρόνου. Εν αντιθέσει η οξείδωση παρουσία των συμπλόκων **1-5** συνεχίζεται καθ' όλη την διάρκεια της μέτρησης. Επιπλέον, ενώ το σύμπλοκο **5** δείχνει ικανότητα οξείδωσης έναντι του υποστρώματος, εντούτοις δεν παρατηρήθηκε κάποια κυτταροτοξική δράση ενάντια των κυτταρικών σειρών που ελέγχθηκαν.



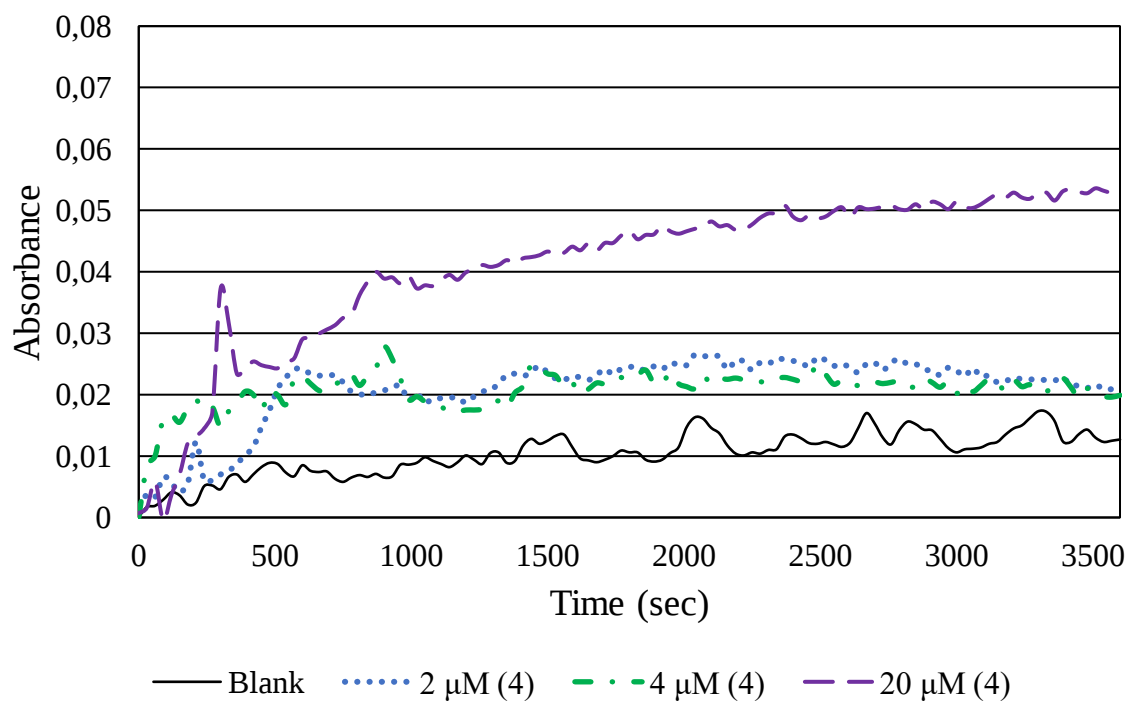
Εικόνα 7.2.1. Συσσώρευση του υπεροξο-λινελαϊκού οξέος στους 25° C απουσία (blank) ή παρουσία του συμπλόκου **1** σε συγκέντρωση 2 μM (1/100), 4 μM (1/50), και 20 μM (1/10).



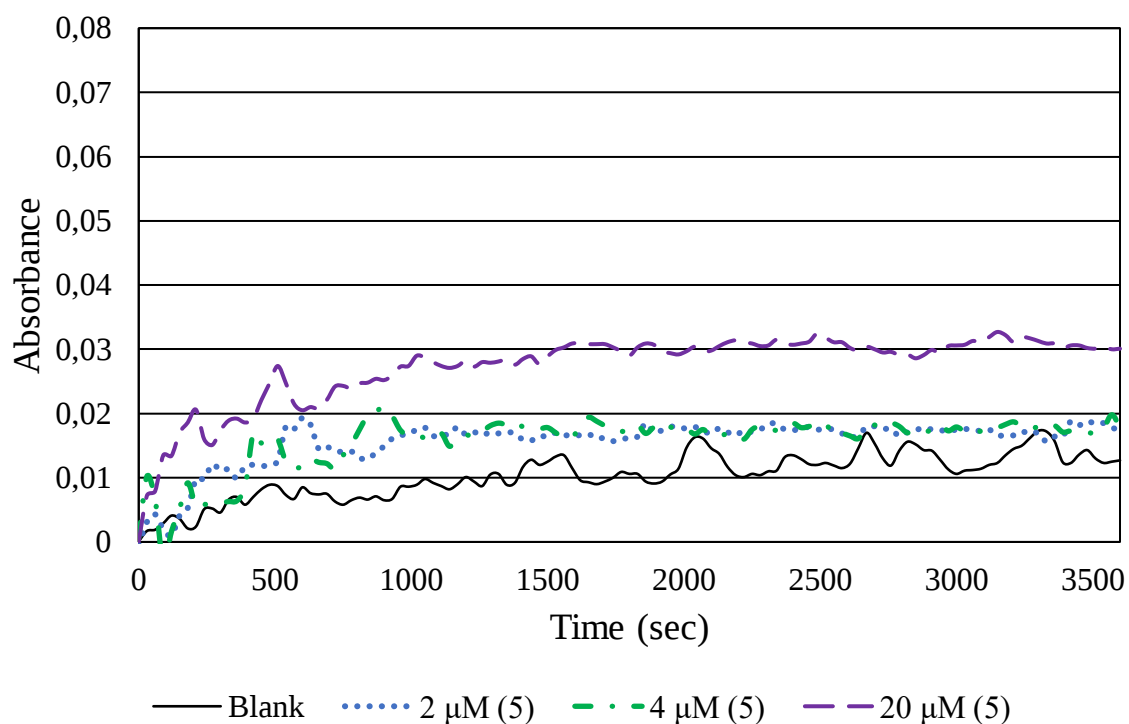
Εικόνα 7.2.2. Συσσώρευση του υπερόξο-λινελαϊκού οξέος στους 25° C απουσία (blank) ή παρουσία του συμπλόκου **2** σε συγκέντρωση 2 μM (1/100), 4 μM (1/50), και 20 μM (1/10).



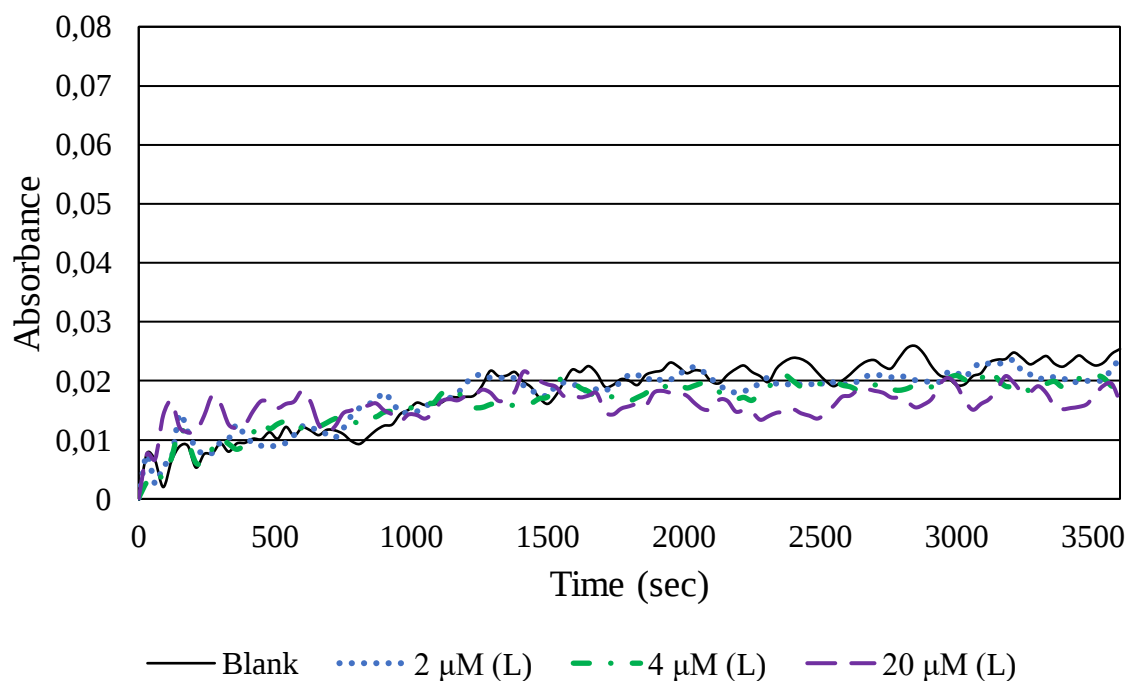
Εικόνα 7.2.3. Συσσώρευση του υπερόξο-λινελαϊκού οξέος στους 25° C απουσία (blank) ή παρουσία του συμπλόκου **3** σε συγκέντρωση 2 μM (1/100), 4 μM (1/50), και 20 μM (1/10).



Εικόνα 7.2.4. Συσσώρευση του υπερόξο-λινελαϊκού οξέος στους 25° C απουσία (blank) ή παρουσία του συμπλόκου **4** σε συγκέντρωση 2 μM (1/100), 4 μM (1/50), και 20 μM (1/10).



Εικόνα 7.2.5. Συσσώρευση του υπερόξο-λινελαϊκού οξέος στους 25° C απουσία (blank) ή παρουσία του συμπλόκου 5 σε συγκέντρωση 2 μM (1/100), 4 μM (1/50), και 20 μM (1/10).



Εικόνα 7.2.6. Συσσώρευση του υπερόξο-λινελαϊκού οξέος στους 25° C απουσία (blank) ή παρουσία του προσδέτη (L) σε συγκέντρωση 2 μM (1/100), 4 μM (1/50), και 20 μM (1/10).

7.3. Αλληλεπίδραση των συμπλόκων 1-5 με το DNA: έλεγχος με

φασματοσκοπία UV-Vis.

Το DNA είναι στόχος των χημειοθεραπευτικών που χρησιμοποιούνται ενάντια των διαφόρων καρκίνων [164]. Η μικρή και η μεγάλη αύλακα της διπλής έλικας του DNA παρέχουν τις μοριακές πληροφορίες που απαιτούνται για την αλληλεπίδραση του DNA με άλλα μόρια, δεδομένου πως οι δεσμοί υδρογόνου των βάσεων του DNA βρίσκονται μέσα στις αύλακες [164]. Επιπλέον τα μεγάλα μόρια που προσδένουν στα νουκλεϊκά οξέα αλληλεπιδρούν με την μεγάλη αύλακα του DNA, ενώ τα μικρότερα αλληλεπιδρούν είτε μέσω παρεμβολής ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων ή προσδένουν στη μικρή αύλακα, ή και τα δύο [164]. Επομένως η ανάπτυξη νέων προσδετών του DNA, που προσδένονται στη μεγάλη ή τη μικρή αύλακα, είναι σημαντική για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων [164]. Ο υπερχρωισμός (hyperchromism) ή υποχρωισμός (hypochromism) που παρατηρείται σε φάσματα UV του DNA παρουσία ή απουσία κάποιας ουσίας, σχετίζονται με τη διαμόρφωση της δομής της διπλής έλικας του DNA. [96,164-165]

Ένα μεταλλοφάρμακο μπορεί να προσδένεται στο DNA είτε μέσω ομοιοπολικών δεσμών ή μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων [17,39,165,207,217]. Υπάρχουν τρεις τρόποι πρόσδεσης κάποιας ουσίας στο DNA: 1) μέσω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του σκελετού του DNA, οι οποίες εμφανίζονται στην εξωτερική μεριά της διπλής έλικας του DNA και δεν δείχνουν εκλεκτικότητα, 2) μέσω πρόσδεσης στις αύλακες της διπλής έλικας του DNA, και 3) μέσω παρεμβολής ανάμεσα στις βάσεις του DNA [16-17,39,165,207,217]. Η διαμόρφωση της δομής της διπλής έλικας του DNA εξαιτίας της αλληλεπίδρασης με κάποιο μεταλλοφάρμακο μπορεί να αποδοθεί είτε μέσω υποχρωισμού ή μέσω υπερχρωισμού [12,16]. Ο υποχρωισμός αποδίδεται είτε σε παρεμβολή ή σε ηλεκτροστατική κατάσταση πρόσδεσης που μπορούν και σταθεροποιούν τη διπλή έλικα του DNA, ενώ ο υπερχρωισμός αποδίδεται στη θραύση των δεσμών υδρογόνου, οι οποίοι σταθεροποιούν τη δευτεροταγή δομή του DNA [12,16-17,165]. Έτσι η αλληλεπίδραση

συμπλόκων με μέταλλα μπορεί να προκαλέσει και διάσπαση του DNA οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης [96].

Προκειμένου να ελεγχθεί περαιτέρω ο μηχανισμός δράσης των συμπλόκων **1-5** πραγματοποιήθηκαν πειράματα αλληλεπίδρασης με το DNA, δεδομένου πως η cisplatin, το κύριο αντικαρκινικό φάρμακο που χρησιμοποιείται στη χημειοθεραπεία του καρκίνου, προσδένει στο DNA [4]. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το calf thymus-DNA (CT-DNA) και η αλληλεπίδρασή του με τα σύμπλοκα **1-5** ελέγχθηκε με UV-Vis φασματοσκοπία. Επιλέχθηκε το CT-DNA επειδή η διπλή του έλικα υιοθετεί τη B μορφή στη διαμόρφωση της, και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο του κυτταρικού DNA το οποίο υιοθετεί την ίδια διαμόρφωση σε διάλυμα σε φυσιολογικές συνθήκες (ουδέτερο pH, θερμοκρασία δωματίου, ~200 mM NaCl) [21].

Πίνακας 7.3.1. Οι τιμές υπέρ- ή υπό- χρωισμού του CT-DNA για τα σύμπλοκα **1-5**.

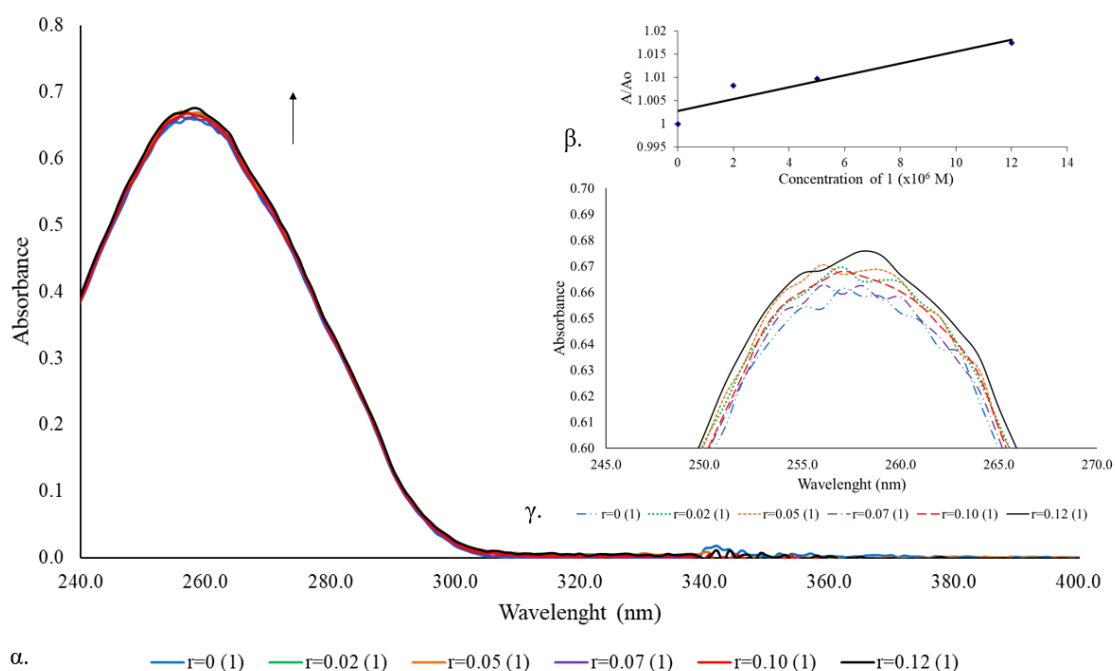
Σύμπλοκο	$\Delta\lambda$ (nm)	Μετατόπιση (Shift)	Υπερχρωισμός/ Υποχρωισμός	H (%)
1	1	Ερυθρή	Υπέρ	1.5 ± 0.3
2	2	Ερυθρή	Υπέρ	1.6 ± 0.2
3	1	Ερυθρή	Υπέρ	1.3 ± 0.1
4	—	—	Υπέρ	0.6 ± 0.05
5	—	—	Υπέρ	1.0 ± 0.2
Προσδέτης (L)	2	Ερυθρή	Υπό	0.9 ± 0.5

Στις εικόνες 7.3.1-7.3.6 φαίνονται τα φάσματα UV του CT-DNA (σε σταθερή συγκέντρωση) σε ρυθμιστικό διάλυμα σε διάφορες αναλογίες r ($r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 10^{-4}$ M), καθώς και τα διαγράμματα A/A_0 συναρτήσει της συγκέντρωσης του συμπλόκου ($[\text{σύμπλοκο}]$). Στον Πίνακα 7.3.1 συνοψίζονται τα ποσοστά (%) υπερχρωισμού ή υποχρωισμού (hyperchromism or hypochromism (H), $H = [(A_{rmax} - A_{rmin})/A_{rmin}]$, $A_{rmax} =$

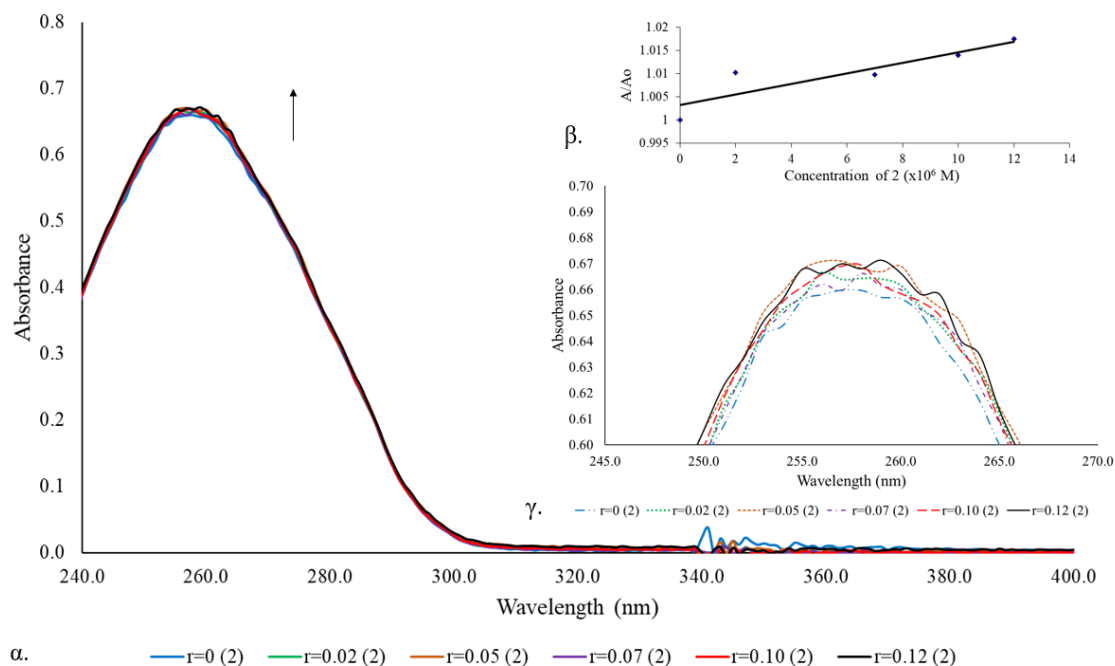
απορρόφηση του μέγιστου r , A_{rmin} = απορρόφηση του ελάχιστου r) των συμπλόκων **1-5** και του προσδέτη.

Για τα σύμπλοκα **1-5** παρατηρείται υπερχρωισμός καθώς βλέπουμε μια ελαφριά αύξηση στην απορρόφηση (σε λ_{max} = 257 (**1-3**, προσδέτης), 258 (**4**), 259 (**5**)) παρουσία των συμπλόκων, σε διάφορες αναλογίες r (r = [σύμπλοκο]/[DNA], [DNA]= 10^{-4} M, r =0, 0.02, 0.05, 0.07, 0.10, 0.12). Το ποσοστό υπερχρωισμού για τα σύμπλοκα **1-5** είναι 1.5 ± 0.3 % (**1**), 1.6 ± 0.2 % (**2**), 1.3 ± 0.1 % (**3**), 0.6 ± 0.05 % (**4**), και 1.0 ± 0.2 % (**5**) αντίστοιχα. Τα ποσοστά αυτά προτείνουν μικρή αλληλεπίδραση των συμπλόκων **1-5** με το CT-DNA, κάτι που μπορεί οφείλεται είτε στην εξωτερική πρόσδεση στο DNA ή σε απελίκωση της έλικας του DNA (θραύση δεσμών υδρογόνου) [16,96,165,207]. Αντιθέτως στον προσδέτη (ligand= CANa) παρατηρείται ελαφριά μείωση στην απορρόφηση στις διάφορες αναλογίες r , με το ποσοστό υποχρωισμού να είναι 0.9 ± 0.5 %, προτείνοντας παρεμβολή ή ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με το μόριο του DNA [16-17]. Στα σύμπλοκα **1-3** καθώς και στον προσδέτη παρατηρείται και μετατόπιση στο λ_{max} (αύξηση το λ_{max}) (Πίνακας 7.3.1). Εξαιτίας των μικρών ποσοστών υπερχρωισμού δεν κατέστη δυνατό να υπολογιστούν οι σταθερές πρόσδεσης των συμπλόκων στο CT-DNA.

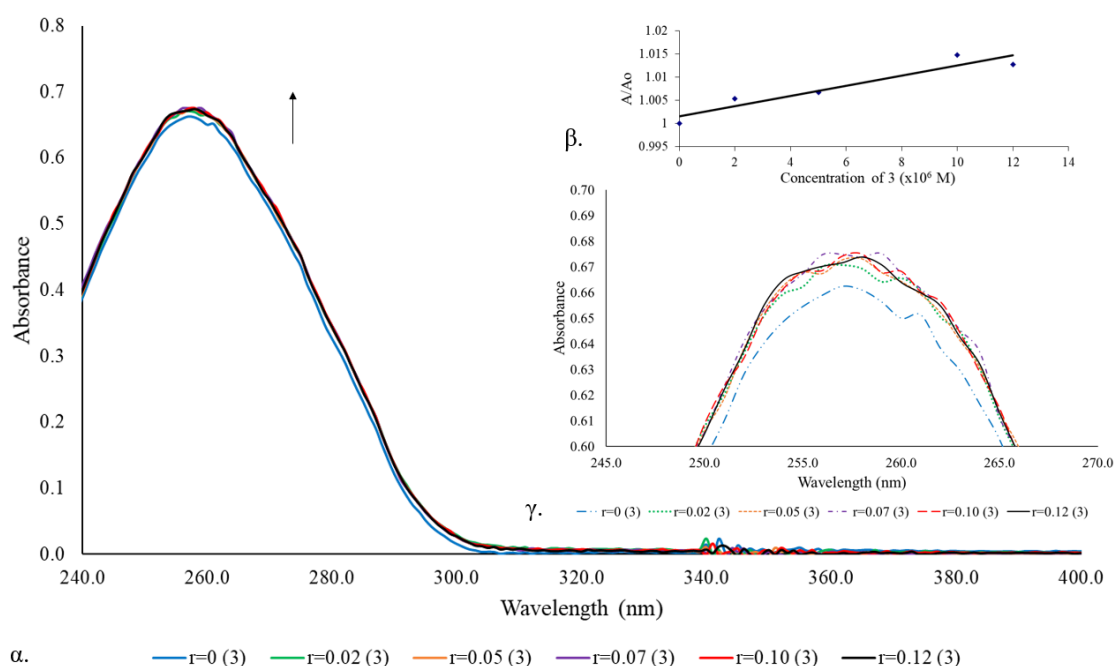
Επομένως η αλληλεπίδραση των συμπλόκων **1-5** με το μόριο του DNA είναι μικρή. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός πως κάποια νουκλεοτίδια μπορούν να αντιδρούν με οργανοκασσιτερικά (IV) σύμπλοκα σε τιμές $pH < 4$ μέσω των φωσφορικών ομάδων και σε τιμές $pH > 9.5$ μέσω των ατόμων οξυγόνου των σακχάρων. Έτσι σε φυσιολογικές τιμές pH , η αντικαρκινική δράση των οργανοκασσιτερικών (IV) συμπλόκων πιθανόν δεν περιλαμβάνει την αλληλεπίδρασή τους με το DNA [127].



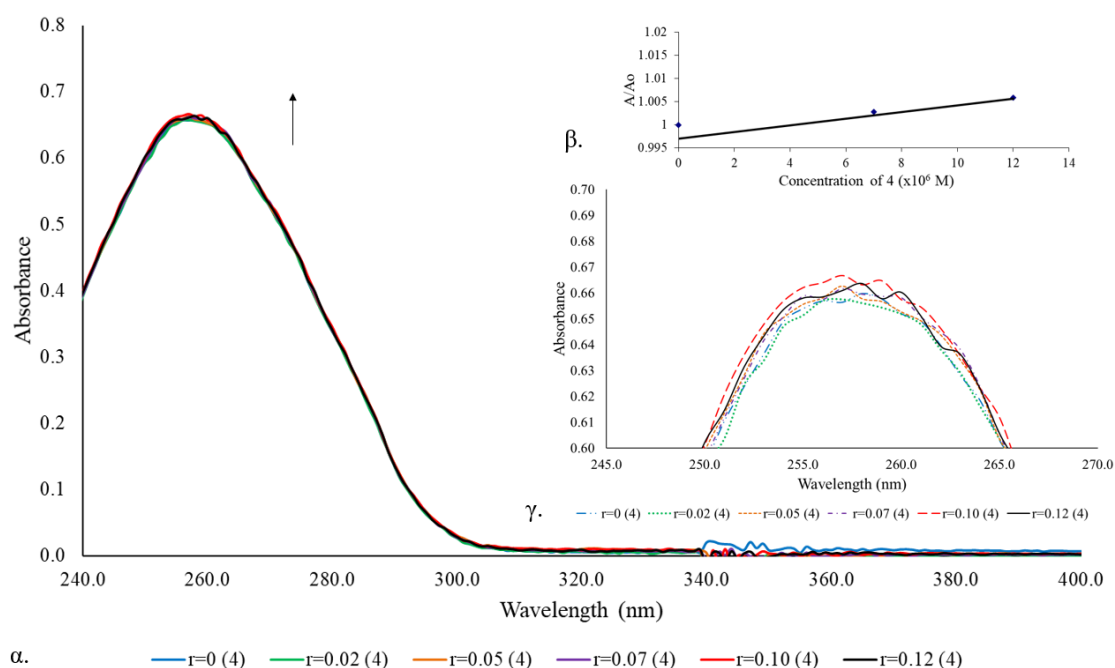
Εικόνα 7.3.1. α. Φάσμα UV του CT-DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία ή παρουσία του συμπλόκου **1**, σε διάφορες αναλογίες $r=0, 0,02, 0,05, 0,07, 0,10$, και $0,12$ ($r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 10^{-4}$ M). β. Το γράφημα A/A_0 vs $[\text{σύμπλοκο}]$ σε $\lambda_{\text{max}} = 257$. γ. Μεγέθυνση της εικόνας α.



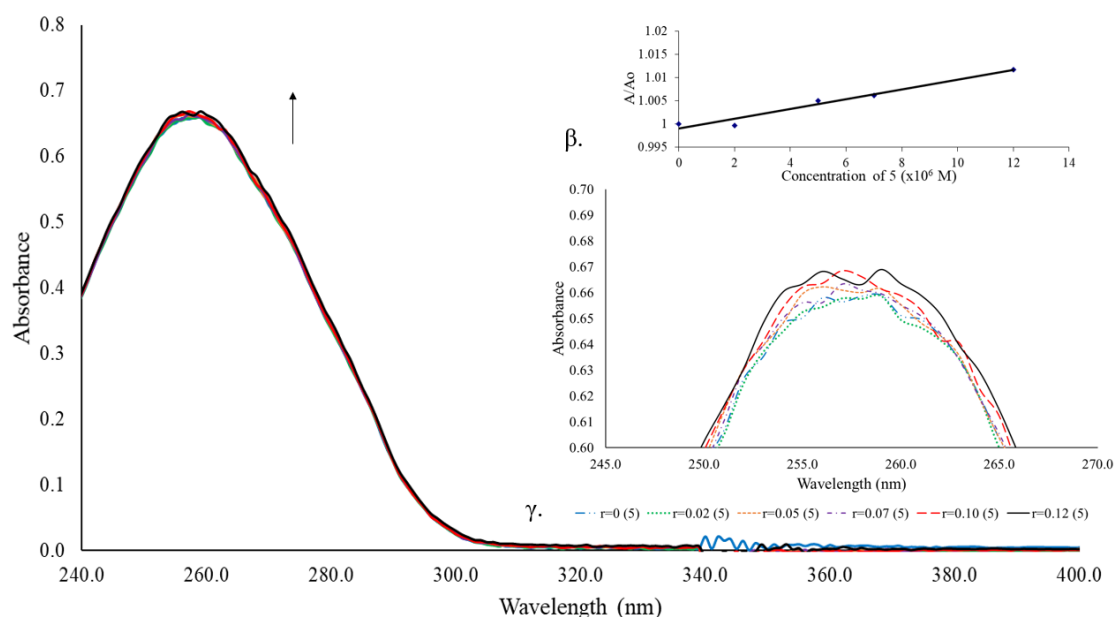
Εικόνα 7.3.2. α. Φάσμα UV του CT-DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία ή παρουσία του συμπλόκου **2**, σε διάφορες αναλογίες $r=0, 0,02, 0,05, 0,07, 0,10$, και $0,12$ ($r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 10^{-4}$ M). β. Το γράφημα A/A_0 vs $[\text{σύμπλοκο}]$ σε $\lambda_{\text{max}} = 257$. γ. Μεγέθυνση της εικόνας α.



Εικόνα 7.3.3. α. Φάσμα UV του CT-DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία ή παρουσία του συμπλόκου **3**, σε διάφορες αναλογίες $r=0, 0.02, 0.05, 0.07, 0.10$, και 0.12 ($r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 10^{-4}$ M). β. Το γράφημα A/A_0 vs $[\text{σύμπλοκο}]$ σε $\lambda_{\text{max}} = 257$. γ. Μεγέθυνση της εικόνας α.

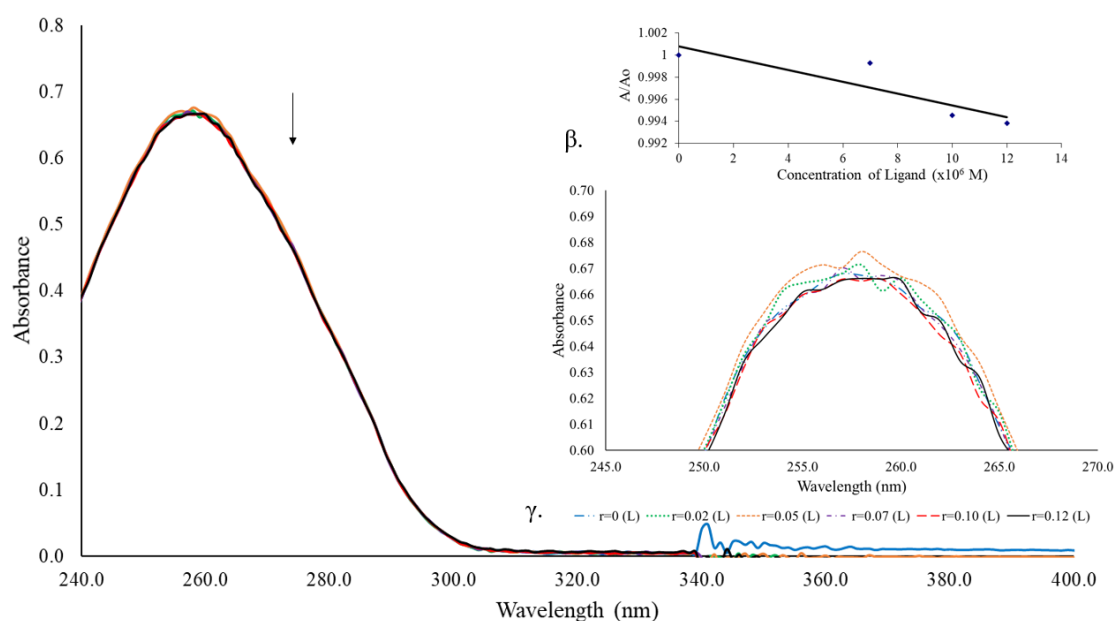


Εικόνα 7.3.4. α. Φάσμα UV του CT-DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία ή παρουσία του συμπλόκου **4**, σε διάφορες αναλογίες $r=0, 0.02, 0.05, 0.07, 0.10$, και 0.12 ($r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 10^{-4}$ M). β. Το γράφημα A/A_0 vs $[\text{σύμπλοκο}]$ σε $\lambda_{\text{max}} = 258$. γ. Μεγέθυνση της εικόνας α.



α. $r=0$ (5) $r=0.02$ (5) $r=0.05$ (5) $r=0.07$ (5) $r=0.10$ (5) $r=0.12$ (5)

Εικόνα 7.3.5. α. Φάσμα UV του CT-DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία ή παρουσία του συμπλόκου **5**, σε διάφορες αναλογίες $r=0, 0.02, 0.05, 0.07, 0.10$, και 0.12 ($r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 10^{-4}$ M). β. Το γράφημα A/A_0 vs $[\text{σύμπλοκο}]$ σε $\lambda_{\text{max}} = 259$. γ. Μεγέθυνση της εικόνας α.



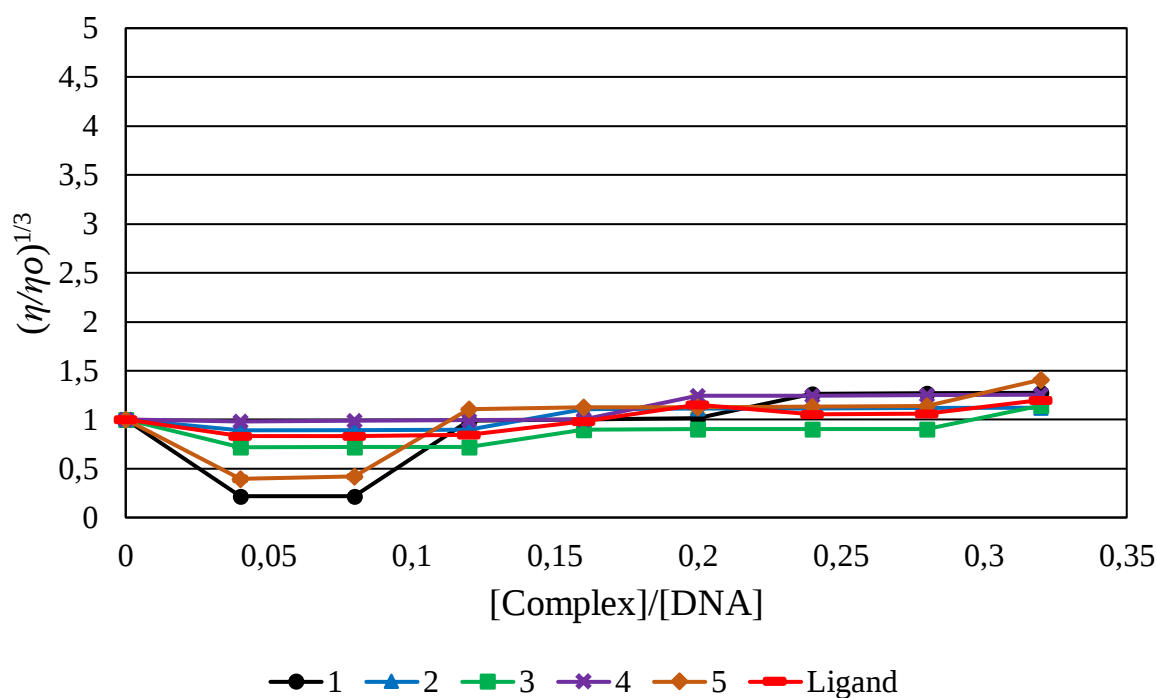
α. $r=0$ (L) $r=0.02$ (L) $r=0.05$ (L) $r=0.07$ (L) $r=0.10$ (L) $r=0.12$ (L)

Εικόνα 7.3.6. α. Φάσμα UV του CT-DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία ή παρουσία του προσδέτη (L), σε διάφορες αναλογίες $r=0, 0.02, 0.05, 0.07, 0.10$, και 0.12 ($r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 10^{-4}$ M). β. Το γράφημα A/A_0 vs $[\text{σύμπλοκο}]$ σε $\lambda_{\text{max}} = 257$. γ. Μεγέθυνση της εικόνας α.

7.4. Αλληλεπίδραση των συμπλόκων **1-5** με το DNA: έλεγχος με ιξωδομετρία.

Το μήκος του DNA μπορεί να αλλάζει μετά από επίδραση ενός αντικαρκινικού παράγοντα με αποτέλεσμα να επηρεάζεται το ιξώδες (η) του διαλύματός του [39,133]. Πιο συγκεκριμένα, όταν μια ουσία παρεμβάλλεται στο DNA οδηγεί στην επιμήκυνση του DNA με επακόλουθη αύξηση του ιξώδους [39,133,166-167]. Αν ο παράγοντας αντιδρά ηλεκτροστατικά με το DNA δεν παρατηρείται αλλαγή στο μήκος του DNA και επομένως δεν παρατηρείται αλλαγή στο ιξώδες του [39,133,166]. Στην περίπτωση που το DNA κατακερματίζεται από τον εξωγενή παράγοντα, το μήκος του μειώνεται, και επομένως μειώνεται και το ιξώδες [39,133,166]. Επίσης μείωση του ιξώδους συμβαίνει και όταν μια ουσία κάμπτεται το μόριο του DNA [39,133,166-167]. Επομένως οι αλλαγές στο ιξώδες επιδεικνύουν μεγάλη ευαισθησία στις αλλαγές που υφίσταται το DNA και χρησιμοποιείται και για τη μελέτη των διαφόρων τρόπων πρόσδεσης εξωγενών παραγόντων στο DNA [39,133]. Επιπλέον η μέτρηση του ιξώδους αποτελεί έναν έλεγχο του τρόπου πρόσδεσης μιας ουσίας απουσία κρυσταλλογραφικών δεδομένων ή φασμάτων NMR [167].

Δεδομένου των αποτελεσμάτων της μη πρόσδεσης των συμπλόκων **1-5** στο DNA από τα πειράματα με φασματοσκοπία UV-Vis, ελέγχθηκε ο τρόπος πρόσδεσης και μέσω μέτρησης του ιξώδους διαλυμάτων του CT-DNA απουσία ή παρουσία των συμπλόκων **1-5**. Στην Εικόνα 7.4.1 φαίνεται το σχετικό ιξώδες $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ συναρτήσει της αναλογίας πρόσδεσης. Το σχετικό ιξώδες των διαλυμάτων CT-DNA (η/η_0) σχετίζεται με το μήκος του DNA (L/L_0) από την εξίσωση $L/L_0 = (\eta/\eta_0)^{1/3}$. Διάλυμα του CT-DNA ($[DNA] = 0.1 \text{ mM}$) επωάζεται με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των συμπλόκων **1-5** όπου οι αναλογίες $r = [\text{σύμπλοκο}]/[DNA]$ έχουν ως τιμές $r = 0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.20, 0.24, 0.28$, και 0.32 .



Εικόνα 7.4.1. Επίδραση των συμπλόκων **1-5** στο ιξώδες διαλύματος CT-DNA ($[DNA] = 0.1$ mM) σε διάφορες αναλογίες $r = [\text{σύμπλοκο}]/[DNA]$, όπου η είναι το ιξώδες του DNA παρουσία των συμπλόκων **1-5** και του προσδέτη και η_0 το ιξώδες του DNA απουσία παράγοντα.

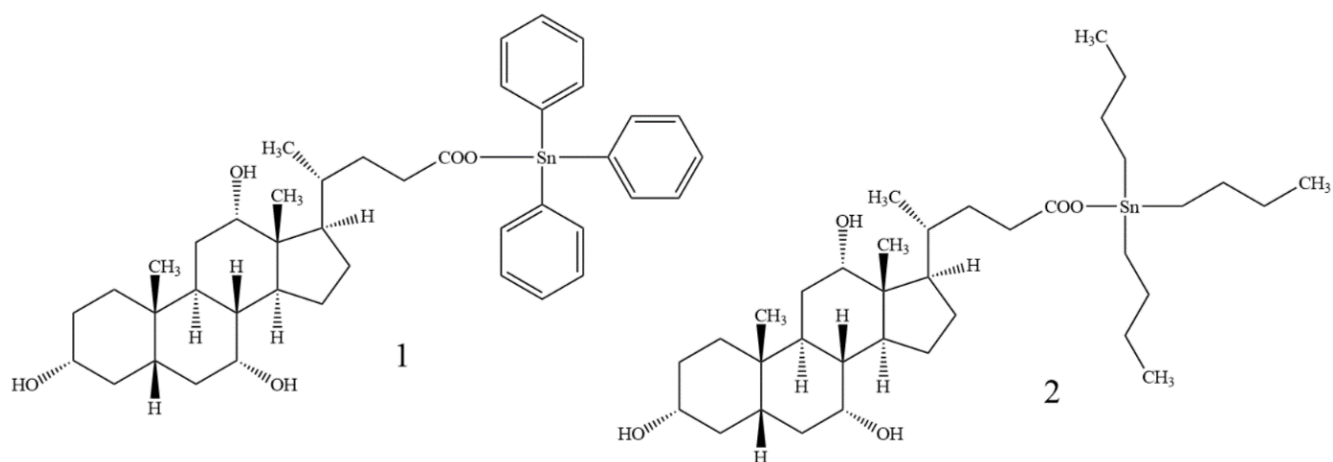
Αρχικά μέχρι την αναλογία $r = 0.12$ παρουσία των συμπλόκων **1-5** παρατηρείται ελαφριά μείωση του ιξώδους, υποδηλώνοντας κατακερματισμό ή κάμψη του DNA, κάτι που συμφωνεί με τα αποτελέσματα από την φασματοσκοπία UV-Vis. Ωστόσο σε μεγαλύτερες αναλογίες παρατηρείται μικρή αύξηση στο ιξώδες των διαλυμάτων του DNA παρουσία των συμπλόκων. Αυτές οι μικρές μεταβολές στο ιξώδες του διαλύματος του DNA δηλώνουν πως τα σύμπλοκα **1-5** δεν αλληλεπιδρούν μαζί του ή προσδένονται πολύ ασθενώς, κάτι που συμφωνεί με τα αποτελέσματα και από την UV-Vis φασματοσκοπία.

Ε. Συμπεράσματα.

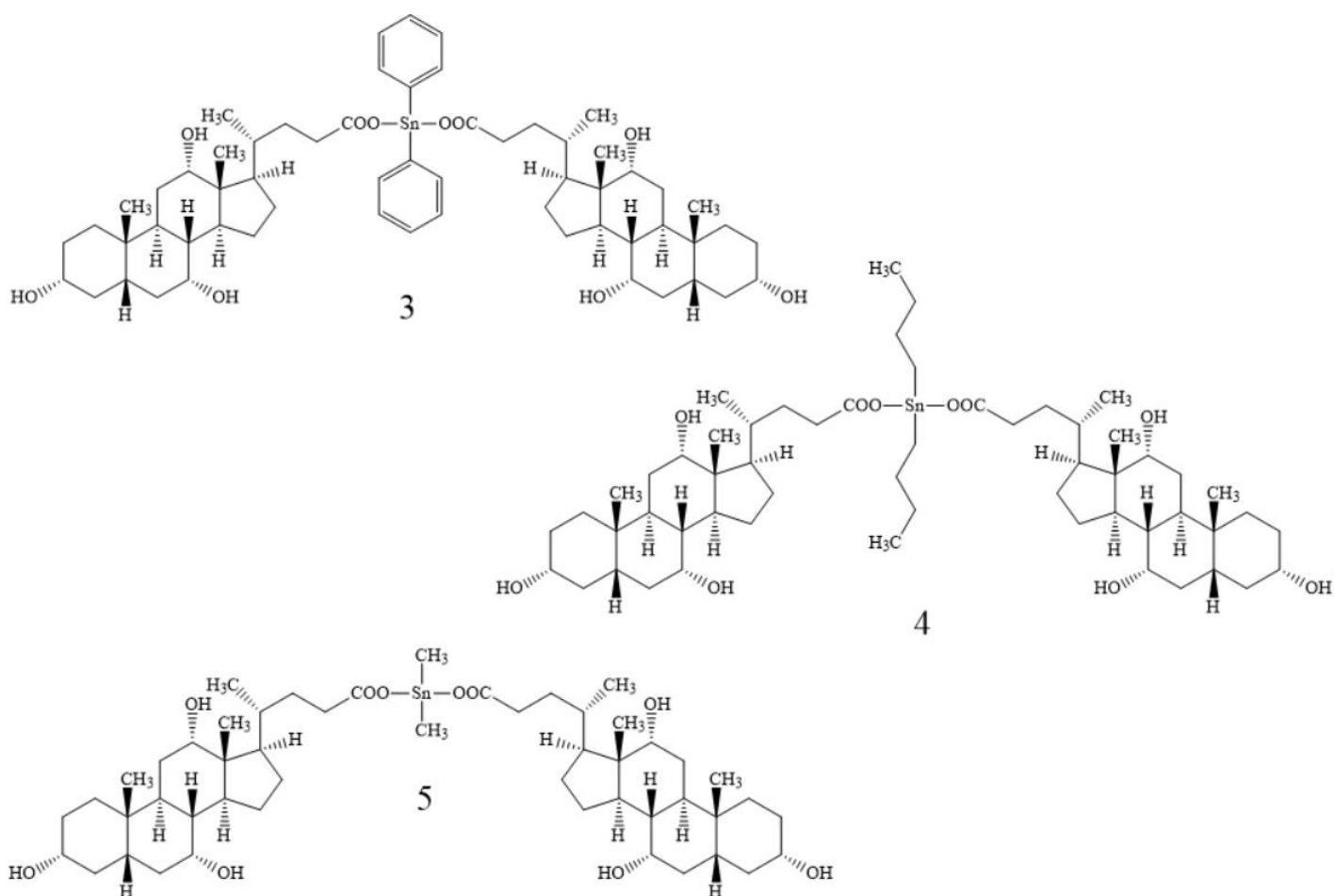
Κεφάλαιο 8

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν πέντε οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα με το χολικό οξύ, το οποίο έχει τον στεροειδικό σκελετό. Συγκεκριμένα, τα οργανοκασσιτερικά παράγωγα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα τριφαίνυλο- (Ph_3SnCl), τριβούτυλο- ($n\text{-Bu}_3\text{SnCl}$), διφαίνυλο- (Ph_2SnCl_2), διβούτυλο- ($n\text{-Bu}_2\text{SnCl}_2$) και διμεθύλο- (Me_2SnCl_2) χλωρίδια. Οι μοριακοί τύποι των συμπλόκων είναι $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CA})$ (**1**), $n\text{-(Bu}_3\text{)Sn}(\text{CA})$ (**2**), $\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{CA})_2$ (**3**), $n\text{-(Bu}_2\text{)Sn}(\text{CA})_2$ (**4**) και $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{CA})_2$ (**5**) (Εικόνα 8.1). Προκειμένου να χαρακτηριστούν τα οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα **1-5** πάρθηκαν μετρήσεις σημείου τήξεως, φασματοσκοπίας φθορισμού ακτίνων X (XRF), υπερύθρου (FT-IR), ^{119}Sn Mössbauer, πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^{119}\text{Sn-NMR}$) και υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Επιπλέον έγινε ανάλυση περίθλασης ακτίνων X (XRPD), μετρήσεις μάζας με φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS) και υψηλής ανάλυσης (HR-MS) καθώς και μέτρηση της ατομικής απορρόφησης.

Τα τρι-οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα **1-2** έχουν αναφερθεί και παλαιότερα στις πατέντες του 1985 και 1987 των Cardarelli και Kanakkanatt [155-156]. Ωστόσο αντικαρκινικός έλεγχος έγινε μόνο για το τριφαίνυλο χολικό παράγωγο σε AK/I-επίμυες που τους είχαν μεταμοσχευθεί καρκινικά κύτταρα (αδενοκαρκίνωμα του μαστού) και βρέθηκε να καταστέλλουν την ανάπτυξη των όγκων αυτών, καθώς και ενάντια της ανθρώπινης καρκινικής κυτταρικής σειράς KB και της σειράς P-388 (λευχαιμία, ποντικός) και βρέθηκε να έχει καλή ανασταλτική/αντικαρκινική δράση.



α.



β.

Εικόνα 8.1. Τα σύμπλοκα της διατριβής 1-2 (α.) και 3-5 (β.).

Από τα πειράματα με φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (XRF) εξάγεται το συμπέρασμα πως υπάρχει το άτομο του κασσιτέρου στα σύμπλοκα **1-5**. Επιπλέον το ποσοστό ύπαρξής του σε αυτά συμφωνεί με το θεωρητικά υπολογισμένο για αναλογίες χολικού οξέος/κασσιτέρου 1:1, για τα σύμπλοκα **1-2**, και 2:1 για τα σύμπλοκα **3-5**.

Από την δονητική φασματοσκοπία υπέρυθρου (FT-IR) προκύπτει πως το χολικό οξύ εντάσσεται στο άτομο του κασσιτέρου μέσω του ατόμου οξυγόνου της καρβοξυλομάδας του (COOH), καθώς παρατηρείται μετατόπιση στις δονητικές ταινίες ν_{as} και ν_s της COOH ομάδας. Επιπλέον παρατηρείται και η ταινία δόνησης του δεσμού Sn-O, αν και είναι αρκετά ασθενής. Εξάγεται το συμπέρασμα πως ο τρόπος ένταξης είναι χηλικός για τα σύμπλοκα **1-5** μόνο που στο σύμπλοκο **4** οι δεσμοί Sn-O είναι ασύμμετροι.

Η φασματοσκοπία ^{119}Sn Mössbauer μας δείχνει την κατάσταση που επικρατεί γύρω από το άτομο του κασσιτέρου. Για τα σύμπλοκα **1-5** προκύπτει πως ο κασσίτερος είναι τετρασθενής Sn(IV). Επιπλέον η γεωμετρία που προκύπτει γύρω από το άτομο του κασσιτέρου από τις τιμές της τετραπολικής αλληλεπίδρασης (ΔE_Q) φαίνεται να είναι τριγωνική διπυραμίδα για τα σύμπλοκα **1-2**, ενώ για τα σύμπλοκα **3-5** μπορεί να είναι οκταεδρική ή τετραεδρική για το σύμπλοκο **3**, οκταεδρική ή τριγωνική διπυραμίδα ή πενταγωνική διπυραμίδα για το σύμπλοκο **4** και οκταεδρική ή τριγωνική διπυραμίδα για το σύμπλοκο **5**.

Τα αποτελέσματα από το ^1H -NMR επιβεβαιώνουν την δημιουργία των συμπλόκων και την ένταξη του χολικού οξέος στον κασσίτερο μέσω της καρβοξυλομάδας του πρώτου, καθώς το σήμα συντονισμού, χαρακτηριστικό αυτής της ομάδας στα 12 ppm, απουσιάζει από τα φάσματα των συμπλόκων **1-5**. Επιπλέον μετατοπίσεις στα σήματα συντονισμού τόσο των πρωτονίων του χολικού οξέος όσο και των οργανοκασσιτερικών παραγώγων προτείνουν τη δημιουργία συμπλόκου, καθώς η αλλαγή της γεωμετρίας των αντιδρώντων μετά τη δημιουργία ενός συμπλόκου αποτυπώνεται στα φάσματα NMR. Επίσης από την ολοκλήρωση

χαρακτηριστικών σημάτων συντονισμού πρωτονίων του χολικού οξέος και των οργανοκασσιτερικών παραγώγων προτείνει πως η αναλογία χολικού/κασσιτέρου είναι 1:1 για τα σύμπλοκα με τα τρι-οργανοκασσιτερικά παράγωγα (**1-2**), και 2:1 για τα σύμπλοκα με τα δι-οργανοκασσιτερικά παράγωγα (**3-5**). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αυτά που προέκυψαν από τα πειράματα με φασματοσκοπία XRF, έτσι καταλήγουμε πως οι αναλογίες χολικού οξέος προς τον κασσίτερο είναι 1:1 για τα σύμπλοκα **1-2**, και 2:1 για τα σύμπλοκα **3-5**.

Τα φάσματα ^{13}C -NMR δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες μετατοπίσεις σε σχέση με τον προσδέτη ή τα οργανοκασσιτερικά παράγωγα, ωστόσο εμφανίζονται οι άνθρακες των οργανοκασσιτερικών παραγώγων στα σύμπλοκα γεγονός που μας επιβεβαιώνει την δημιουργία τους. Από τα φάσματα ^{119}Sn -NMR μπορεί να εξαχθεί η γεωμετρία γύρω από το άτομο του κασσιτέρου στα σύμπλοκα **1-5**. Έτσι προκύπτει πως το σύμπλοκο **1** είναι πέντε ενταγμένο έχοντας γεωμετρία γύρω από το άτομο του κασσιτέρου που αντιστοιχεί σε τριγωνική διπυραμίδα, το σύμπλοκο **2** είναι τέτρα-ενταγμένο έχοντας τετραεδρική γεωμετρία, ενώ για τα σύμπλοκα **3-5** ο κασσίτερος εμφανίζεται έξι-ενταγμένος και η γεωμετρία γύρω του είναι οκταεδρική. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα του ^{119}Sn Mössbauer για τα σύμπλοκα **1** και **3-5**. Για το σύμπλοκο **2** παρατηρείται διαφορετική γεωμετρία σε σχέση με το αποτέλεσμα της φασματοσκοπίας ^{119}Sn Mössbauer, ωστόσο οι τιμές της μετατόπισης του ^{119}Sn στο NMR προτιμώνται για την εκτίμηση του αριθμού ένταξης του κασσιτέρου [196].

Η δημιουργία των συμπλόκων στις αναλογίες που προτάθηκαν επιβεβαιώνεται περεταίρω από τις φασματομετρίες μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS) και υψηλής ανάλυσης (HR-MS). Τα αποτελέσματα της ατομικής απορρόφησης συμφωνούν επίσης με τις προτεινόμενες αναλογίες, καθώς το ποσοστό Sn συμφωνεί τόσο με το θεωρητικά υπολογισμένο όσο και με το αποτέλεσμα από την φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (XRF). Τέλος τα

αποτελέσματα από την ανάλυση περίθλασης ακτίνων X (XRPD) επιβεβαιώνει περεταίρω τη δημιουργία των συμπλόκων **1-5** καθώς τα φάσματα τους διαφέρουν από του προσδέτη ή των οργανοκασσιτερικών παραγώγων.

Προκειμένου να ελεγχθεί η κυτταροτοξική τους δράση καθώς και η τοξικότητα έναντι των ζωντανών οργανισμών, είναι απαραίτητο τα σύμπλοκα **1-5** να παραμένουν σταθερά σε διάλυμα για τουλάχιστον 48 ώρες, χρόνος που απαιτείται για την επώαση με τα βιολογικά συστήματα. Τα 5 σύμπλοκα βρέθηκε να είναι σταθερά για χρονικό διάστημα έως και μια εβδομάδα, χρονικό όριο που περιλαμβάνει τις 48 ώρες, τόσο μέσω πειραμάτων φασματοσκοπίας UV-Vis με διαλύτη την MeOH, όσο και με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ με διαλύτη το $d_6\text{-DMSO}$. Η σταθερότητα είναι σημαντική προκειμένου να δείξει πως το σύμπλοκο δεν διασπάται σε επιμέρους ομάδες ή ιόντα και ότι η δράση που μπορεί να επιδεικνύει οφείλεται σε ολόκληρο το μόριο.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την εύρεση ανασταλτικής δράσης των συμπλόκων **1-5** σε δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού MCF-7 και MDA-MB-231, με την πρώτη να είναι θετική στην έκφραση υποδοχέων ορμονών ενώ τη δεύτερη όχι [5,18,38-39]. Αυτές οι καρκινικές κυτταρικές σειρές επιλέχθηκαν για να ελεγχθεί και η εκλεκτική δράση των συμπλόκων **1-5**, πέραν της αντικαρκινικής, και ενάντια στον καρκίνο του μαστού [5]. Βρέθηκε πως όλα τα σύμπλοκα έχουν αντικαρκινική δράση, εκτός από το σύμπλοκο **5**. Αυτό μπορεί να συγκριθεί και με τη μη δράση του διμέθυλο-οργανοκασσιτερικού χλωριδίου στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, και επιπλέον είναι γνωστό από την βιβλιογραφία πως η ένωση του διμέθυλο-κασσιτέρου είναι αδρανής [121].

Μεταξύ των συμπλόκων **1-4**, τα σύμπλοκα **1-2** βρέθηκε να έχουν καλύτερη αντικαρκινική δράση σε σχέση με τα σύμπλοκα **3-4**. Αυτό σημαίνει πως τα σύμπλοκα με τα τρι-οργανοκασσιτερικά παράγωγα (**1-2**) έχουν καλύτερη δραστηριότητα σε σχέση με τα

σύμπλοκα **3-4** που φέρουν δι-οργανοκασσιτερικά παράγωγα, κάτι που συμφωνεί και με τη βιβλιογραφία πως οι τρι-υποκατεστημένες οργανοκασσιτερικές ενώσεις έχουν καλύτερη δραστικότητα [4,107,114].

Επιπλέον ως προς την εκλεκτική δράση έναντι καρκίνων θετικών σε υποδοχείς ορμονών, τα σύμπλοκα **1-2** έδειξαν εκλεκτική δράση έναντι της MCF-7 καρκινικής κυτταρικής σειράς έχοντας μικρότερες τιμές IC_{50} σε σχέση με την MDA-MB-231 καρκινική κυτταρική σειρά. Από την άλλη το σύμπλοκο **3** επέδειξε εκλεκτική δράση έναντι καρκίνων που δεν εκφράζουν υποδοχείς ορμονών, εμφανίζοντας μικρότερη τιμή IC_{50} στην MDA-MB-231 καρκινική κυτταρική σειρά. Το σύμπλοκο **4** δεν εμφάνισε κάποια εκλεκτικότητα.

Σε σύγκριση με τη δράση της cisplatin τα σύμπλοκα **1-4** έχουν καλύτερη αντιπολλαπλασιαστική και συνεπώς αντικαρκινική δράση. Συγκεκριμένα, η δράση των συμπλόκων **1-4** κυμαίνεται να είναι από 8.1 έως 55 φορές καλύτερη έναντι των MCF-7 καρκινικών κυττάρων και από 39.3 έως 166.9 φορές καλύτερη έναντι των MD-MB-231 καρκινικών κυττάρων από την δράση που έχει η cisplatin σε αυτά.

Η τοξικότητα των συμπλόκων **1-5** ελέγχθηκε έναντι της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς MRC-5. Οι τιμές IC_{50} που βρέθηκαν είναι παρόμοιες με αυτές που βρέθηκαν για τα καρκινικά κύτταρα, ωστόσο είναι ελαφρώς μεγαλύτερες, ενώ το σύμπλοκο **5** δεν εμφάνισε κάποια δράση. Οι τιμές του θεραπευτικού δείκτη TPI για το σύμπλοκο **2** και το σύμπλοκο **3** είναι μεγαλύτερες της μονάδας (1.30 και 1.11, αντίστοιχα) εμφανίζοντας εκλεκτική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων MCF-7 και MDA-MB-231 αντίστοιχα, σε σχέση με τα υγιή κύτταρα MRC-5. Για τα υπόλοιπα σύμπλοκα οι τιμές TPI είναι μεγαλύτερες από αυτές της cisplatin αλλά μικρότερες/ίσες με τη μονάδα. Έτσι τα σύμπλοκα **1-4** εμφανίζουν μειωμένη τοξικότητα σε σχέση με αυτή που δείχνει η cisplatin.

Οι τιμές IC_{50} των οργανοκασσιτερικών χλωριδίων (Πίνακες 6.1.1 και 6.2.1) έναντι τόσο των καρκινικών κυτταρικών σειρών όσο και έναντι της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς εμφανίζονται μικρότερες σε σχέση με των συμπλόκων **1-4**. Ωστόσο παρατηρείται πως στα σύμπλοκα **1-4** διατηρείται η εκλεκτική δράση που επιδεικνύουν τα οργανοκασσιτερικά παράγωγα έναντι των δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών. Επιπλέον τα σύμπλοκα **1-4** έχουν μεγαλύτερες τιμές TPI σε σχέση με τα οργανοκασσιτερικά χλωρίδια καθιστώντας τα ιδανικά για χρήση ως αντικαρκινικές ουσίες, καθώς εμφανίζουν μικρότερη τοξικότητα στα υγιή κύτταρα διατηρώντας την εκλεκτικότητα για τα καρκινικά. Επιπλέον τόσο ο προσδέτης (χολικό οξύ) όσο και το διμεθυλοκασσιτερικό χλωρίδιο δεν εμφανίζουν κάποια δράση ενάντια στις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν (φυσιολογική και καρκινικές).

Ελέγχθηκε περεταίρω και η ικανότητα των συμπλόκων **1-5** να έχουν γονοτοξική δράση *in vitro*, καθώς η γονοτοξικότητα μπορεί να προκαλέσει γενετικές βλάβες εν δυνάμει κληρονομήσιμες [160]. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των μικροπυρήνων καθώς η εμφάνισή τους μετά την εφαρμογή ενός παράγοντα δηλώνουν βλάβη στο DNA. Τα ποσοστά εμφάνισης μικροπυρήνων στις τιμές IC_{50} (**1-4**) και στην συγκέντρωση 30 μM (**5**) είναι παρόμοια με αυτά της cisplatin, δηλώνοντας πως τα σύμπλοκα δεν είναι γονοτοξικά σε αυτές τις συγκεντρώσεις.

Η γονοτοξική δράση ελέγχθηκε και *in vivo*, χρησιμοποιώντας τον ζωντανό οργανισμό *Allium cepa*. Οι συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν περιλαμβάνουν το εύρος των τιμών IC_{50} που βρέθηκαν για τα σύμπλοκα **1-4** ενάντια των κυτταρικών σειρών. Επειδή δεν βρέθηκε τιμή IC_{50} για το σύμπλοκο **5** δεν ελέγχθηκε η γονοτοξικότητά του *in vivo*. Το σύμπλοκο **1**, δεν εμφανίζει γονοτοξικότητα στις τιμές IC_{50} , όμως στις συγκεντρώσεις 1 μM και 10 μM που ελέγχθηκαν, παρατηρείται αύξηση στις χρωμοσωμικές ανωμαλίες χαρακτηριστικές της γονοτοξικότητας, ωστόσο οι τιμές αυτών των συγκεντρώσεων είναι 6.3-14.3 και 62.5-142.9 φορές μεγαλύτερες από τις IC_{50} αντίστοιχα. Για το σύμπλοκο **2** δεν εμφανίζεται γονοτοξικότητα στις τιμές IC_{50} για

τις κυτταρικές σειρές, ακόμη και σε συγκέντρωση που είναι 2.9-7.7 φορές μεγαλύτερη από τις IC₅₀ τιμές. Ωστόσο, σε συγκέντρωση 28.6-76.9 φορές μεγαλύτερη των τιμών IC₅₀ παρατηρούμε εμφάνιση γονοτοξικότητας για το σύμπλοκο 2. Τα σύμπλοκα 3 και 4 στις συγκεντρώσεις 0.1, 1 και 10μM δεν εμφανίζουν ιδιαίτερες αλλαγές στην εμφάνιση χρωμοσωμικών ανωμαλιών ή μικροπυρήνων, καθιστώντας τα σύμπλοκα αυτά μη γονοτοξικά. Η συγκέντρωση 1 μM είναι 1.3-1.5 και 2.4-2.6 φορές μεγαλύτερη από τις IC₅₀ τιμές για τα σύμπλοκα 3 και 4 αντίστοιχα, ενώ η συγκέντρωση 10 μM είναι 7.6-14.7 (3) και 23.8-25.6 (4) φορές, αντίστοιχα.

Πέραν της *in vitro* τοξικότητας στα φυσιολογικά κύτταρα MRC-5, ελέγχθηκε και η *in vivo* τοξικότητα χρησιμοποιώντας τον ζωντανό οργανισμό-μοντέλο *Artemia salina*. Οι συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν για τα σύμπλοκα 1-4 είναι ίδιες με αυτές που εφαρμόστηκαν και στη μέθοδο του *Allium cepa* (0.1, 1 και 10μM). Τα ποσοστά επιβίωσης στη συγκέντρωση 0.1 μM είναι από 75.2-100 % για τα σύμπλοκα 1-4, ενώ ακόμα και στη συγκέντρωση 1μM η επιβίωση του οργανισμού είναι αυξημένη με τα ποσοστά να κυμαίνονται από 49.4-95.0 %. Ωστόσο τα ποσοστά επιβίωσης είναι μηδενικά μετά την εφαρμογή των συμπλόκων 1-2 στη συγκέντρωση 10μM, ενώ για τα σύμπλοκα 3 και 4 τα ποσοστά επιβίωσης είναι αρκετά υψηλά, με τα ποσοστά να είναι 78% (3) και 39.2% (4) για τη συγκέντρωση αυτή.

Συμπερασματικά τα σύμπλοκα 1-4 έχουν εκλεκτική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων σε σχέση με τα υγιή κύτταρα (θεραπευτικός δείκτης), και επιπλέον τα σύμπλοκα 1-2 δείχνουν εκλεκτικότητα έναντι των κυττάρων θετικών σε υποδοχείς ορμονών, ενώ το σύμπλοκο 3 δείχνει εκλεκτική δράση έναντι καρκινικών κυττάρων μαστού που δεν εκφράζουν υποδοχείς ορμονών. Επιπροσθέτως τα σύμπλοκα 1-4 βρέθηκε πως δεν είναι τοξικά *in vivo*, καθώς επίσης δεν βρέθηκε να είναι γονοτοξικά τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Οι Hadjidakou και Hadjiliadis [114] προτείνουν πως η οργανική ομάδα του κασσιτέρου R, ο προσδέτης, ο

αριθμός των ατόμων κασσιτέρου καθώς και οι ελεύθερες θέσεις συντονισμού που είναι διαθέσιμες, παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιπολλαπλασιαστική δράση των οργανοκασσιτερικών ενώσεων. Οι Huber και Saxena έχουν προτείνει επιπλέον πως όσον αφορά τη δραστικότητα βάση της διάταξής τους στον χώρο, οι τετραεδρικές οργανοκασσιτερικές ενώσεις έχουν την ισχυρότερη δράση σε σχέση με αυτές που φέρουν διάταξη τριγωνικής δι-πυραμίδας, και αυτές με τη σειρά τους είναι πιο ισχυρές από αυτές με οκταεδρική γεωμετρία [111]. Αυτή η σχέση δομής-δράσης παρατηρείται και για τα σύμπλοκα **1-5**, καθώς το σύμπλοκο **1** έχει διάταξη τριγωνικής διπυραμίδας ($^{119}\text{Sn-NMR}$, ^{119}Sn Mössbauer), το σύμπλοκο **2** έχει τετραεδρική γεωμετρία ($^{119}\text{Sn-NMR}$), και τα σύμπλοκα **3-5** έχουν οκταεδρική γεωμετρία ($^{119}\text{Sn-NMR}$, ^{119}Sn Mössbauer).

Εφόσον η φλεγμονή παίρνει μέρος στην ανάπτυξη και την εξέλιξη ενός καρκίνου, η δυνατότητα αναστολής του ενζύμου της λιποξυγονάσης από κάποιον παράγοντα θα ωφελούσε στην αναστολή της εξέλιξης του όγκου. Επιπλέον είναι ένα ένζυμο που εντοπίζεται στο μιτοχόνδριο και θα μπορούσε να ελεγχθεί η στόχευση ενός παράγοντα στο οργανίδιο αυτό, του οποίου η διατάραξη οδηγεί σε θάνατο του κυττάρου μέσω απόπτωσης. Έτσι ελέγχθηκε η ικανότητα των συμπλόκων **1-5** να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης. Τα σύμπλοκα **1-5** βρέθηκε πως δεν αναστέλλουν την λιποξυγονάση στις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν. Επιπλέον παρατηρήθηκε αύξηση στην οξειδωση του λινελαϊκού οξέος προς υπερόξο-λινελαϊκό οξύ παρουσία του ενζύμου και των συμπλόκων **1-5**. Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει πως είτε τα σύμπλοκα **1-5** δρουν ως συμπαράγοντες του ενζύμου, ενισχύοντας τη δράση του, ή να οξειδώνουν απευθείας το υπόστρωμα του ενζύμου [211-213].

Εν συνεχεία ελέγχθηκε η δυνατότητα απευθείας οξειδωσης του λινελαϊκού οξέος από τα σύμπλοκα **1-5**. Το λινελαϊκό οξύ είναι σημαντικό στοιχείο τόσο της κυτταρικής όσο και μιτοχονδριακής μεμβράνης, και η οξειδωσή του μπορεί να οδηγήσει στη διατάραξη αυτών των

μεμβρανών και στον επακόλουθο θάνατο του κυττάρου [16,164,206,214]. Βρέθηκε πως τα σύμπλοκα 1-5 οξειδώνουν το λινελαϊκό οξύ στις διάφορες αναλογίες που εφαρμόστηκαν (λινελαϊκό οξύ/σύμπλοκο= 1/100, 1/50, 1/10).

Ένας ακόμη πιθανός στόχος των διάφορων χημειοθεραπευτικών είναι το μόριο του DNA. Η δράση του ευρέως χρησιμοποιούμενου αντικαρκινικού φαρμάκου cisplatin οφείλεται στη στόχευσή του στο DNA [4]. Επομένως ελέγχθηκε η πιθανή στόχευση των συμπλόκων 1-5 στο μόριο του DNA. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η πρόσδεση των συμπλόκων στο DNA περιλαμβάνουν τόσο τη φασματοσκοπία UV-Vis όσο και την ιξωδομετρία. Παρατηρήθηκε και με τις δύο μεθόδους πως τα σύμπλοκα 1-5 προσδένουν ασθενώς στο μόριο του DNA.

Εν τέλει, η κυτταροτοξική δράση των συμπλόκων 1-4 οφείλεται στη δράση τους στις μεμβράνες των κυττάρων καθώς οξειδώνουν το λινελαϊκό οξύ και δεν αναστέλλουν αναστέλλουν το ένζυμο της λιποξυγονάσης. Το σύμπλοκο 5 αν και βρέθηκε να οξειδώνει το λινελαϊκό οξύ, δεν εμφάνισε κάποια κυτταροτοξική δράση ενάντια στις κυτταρικές σειρές που εφαρμόστηκε. Επιπλέον η ασθενή τους πρόσδεση στο DNA μπορεί να δηλώνει έναν δευτερεύοντα τρόπο στην αντικαρκινική δράση των συμπλόκων αυτών.

ΣΤ. Περίληψη.

Συντέθηκαν, χαρακτηρίστηκαν και μελετήθηκε η βιολογική δράση πέντε νέων οργανοκασσιτερικών παραγώγων του χολικού οξέος (cholic acid, CAH). Τα σύμπλοκα **1-5** χαρακτηρίστηκαν με σημείο τήξης, φασματοσκοπίες υπερύθρου (FT-IR), ^{119}Sn Mössbauer, πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου, άνθρακα και κασσιτέρου (^1H -, ^{13}C -, ^{119}Sn -NMR), υπεριώδους ορατού (UV-Vis) και φθορισμού ακτίνων X (XRF), καθώς και με τις φασματομετρίες μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS) και υψηλής ανάλυσης (HR-MS), με ανάλυση περίθλασης ακτίνων X και με ατομική απορρόφηση. Οι μοριακοί τους τύποι είναι οι $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CA})$ (**1**), $n\text{-Bu}_3\text{Sn}(\text{CA})$ (**2**), $\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{CA})_2$ (**3**), $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{CA})_2$ (**4**) και $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{CA})_2$ (**5**). Επιπλέον ελέγχθηκε η σταθερότητα τους σε διάλυμα με φασματοσκοπία UV-Vis και ^1H -NMR.

Το χολικό οξύ προσδένεται στον κασσίτερο μέσω της καρβοξυλομάδας. Οι αναλογίες χολικού οξέος/κασσιτέρου στα σύμπλοκα είναι 1:1 (**1-2**) και 2:1 (**3-5**). Επιπλέον η γεωμετρία γύρω από το άτομο του κασσιτέρου (Sn) είναι τριγωνική διπυραμίδα για το **1**, τετραεδρική για το **2**, ενώ τα **3-5** εμφανίζουν οκταεδρική γεωμετρία. Τα σύμπλοκα **1-5** είναι σταθερά σε διάλυμα για χρονικό διάστημα μιας εβδομάδας.

Για τον έλεγχο της εκλεκτικής αντικαρκινικής τους δράσης ενάντια στον καρκίνο του μαστού, βρέθηκαν οι τιμές IC_{50} μέσω της μεθόδου Sulforhodamine B (SRB) σε δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού: την MCF-7, η οποία εκφράζει υποδοχείς ορμονών, και την MDA-MB-231, όπου απουσιάζουν οι υποδοχείς ορμονών. Όλα τα σύμπλοκα έδειξαν αντικαρκινική δράση, με εξαίρεση το **5**. Επιπλέον τα **1-2** έδειξαν εκλεκτική δράση έναντι των κυττάρων MCF-7, και επομένως εκλεκτικότητα έναντι του καρκίνου του μαστού θετικού σε υποδοχείς ορμονών. Το **3** έδειξε εκλεκτικότητα έναντι των κυττάρων MDA-MB-231. Όλα τα σύμπλοκα είναι 4.2-166.9 φορές πιο δραστικά από τη cisplatin έναντι των δυο καρκινικών

κυτταρικών σειρών. Επιπλέον τα τρι-οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα **1-2** έχουν καλύτερη δράση από τα δι-οργανοκασσιτερικά **3-4**.

Η τοξικότητά τους ελέγχθηκε *in vitro* στους φυσιολογικούς ινοβλάστες MRC-5, όπου τα σύμπλοκα εμφάνισαν μεγαλύτερες τιμές IC₅₀ σε σχέση με τις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Τα **2** και **3** έχουν καλύτερο θεραπευτικό δείκτη και άρα μειωμένη τοξικότητα, ενώ όλα τα σύμπλοκα έχουν μικρότερη τοξικότητα συγκριτικά με τη cisplatin και τα οργανοκασσιτερικά χλωρίδια. Επιπλέον η τοξικότητά τους ελέγχθηκε και *in vivo* στον ζωντανό οργανισμό *Artemia salina* όπου βρέθηκε να μην είναι τοξικά σε συγκεντρώσεις 1.3-25.6 φορές μεγαλύτερες των τιμών IC₅₀ των συμπλόκων.

Για την εκτίμηση της γονοτοξικότητας τους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των μικροπυρήνων, *in vitro*, και ο ζωντανός οργανισμός *Allium cepa*, *in vivo*. Τα σύμπλοκα δεν εμφάνισαν γονοτοξικότητα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* στις τιμές IC₅₀, και επιπλέον σε συγκεντρώσεις 1.3-25.6 φορές μεγαλύτερες των τιμών αυτών *in vivo*.

Τέλος, ελέγχθηκε ο μοριακός μηχανισμός δράσης των **1-5** εναντίον του ενζύμου της λιποξυγονάσης (μιτοχόνδριο), του λινελαϊκού οξέος (μεμβράνες) και της πρόσδεσής τους στο DNA (πυρήνας). Τα **1-5** δεν αναστέλλουν το ένζυμο της λιποξυγονάσης, ωστόσο οξειδώνουν το λινελαϊκό προς υπερόξο-λινελαϊκό οξύ και επομένως στοχεύουν τις μεμβράνες. Δευτερευόντως θα μπορούσαν να προσδένουν στο DNA, καθώς δεσμεύονται ασθενώς σε αυτό.

Z. Abstract.

Five new complexes of organotin(IV) and cholic acid (CAH), were synthesized and characterized by melting point, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), ^{119}Sn Mössbauer, Nuclear Magnetic Resonance (^1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^{119}Sn -NMR), Ultraviolet-Visible spectroscopy (UV-Vis), X-ray Fluorescence spectroscopy (XRF), X-ray Powder Diffraction analysis (XRPD), Electron spray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS), High Resolution Mass Spectrometry (HR-MS) and atomic absorption. The formulae of the complexes are Ph_3SnCl (**1**), $n\text{-Bu}_3\text{SnCl}$ (**2**), $\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{CA})_2$ (**3**), $n\text{-Bu}_2\text{Sn}(\text{CA})_2$ (**4**) and $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{CA})_2$ (**5**). Furthermore, their stability in solution was examined with UV-Vis and ^1H -NMR spectroscopies. Finally their bioactivity studied against normal and breast cancer cell lines.

Cholic acid coordinates tin(IV) via the oxygen atom of its carboxylic group. The ratio of cholic acid/organotin(IV) in complexes **1-5** found to be 1:1 for tri-organotin complexes **1-2**, while for **3-5** is 2:1. The geometries around tin(IV) atom found to be trigonal bipyramidal for complex **1**, tetrahedral for complex **2**, while complexes **3-5** appeared to have octahedral geometry. Complexes **1-5** were stable in solution for a week period of time.

In order to examine their selective antitumoral activity against breast cancer, their cytotoxicity against MCF-7 (hormone receptor positive) and MDA-MB-231 (hormone receptor negative) breast adenocarcinoma cell lines was calculated by means of Sulforhodamine B assay (SRB). All complexes showed anticancer activity, except for complex **5**. Complexes **1-2** showed selective inhibition of MCF-7 cells, while complex **3** inhibits selectively MDA-MB-231 cells. All complexes showed better activity, 4.2-166.9-fold higher, than cisplatin shows against the two breast cancer cell lines. Generally, tri-organotin complexes **1-2** have better activity than di-organotin **3-4**.

Their cytotoxicity was further examined against the normal fibroblast cell line MRC-5. The IC₅₀ values of **1-5** were higher than those against cancer cell lines. In addition, complexes **2** and **3** have a higher therapeutic potent index (TPI) and therefore reduced toxicity, while all complexes exhibit reduced toxicity compared to cisplatin and organotin chlorides. Their toxicity was also examined *in vivo* against *Artemia salina* (brine shrimp) and concluded that they were nontoxic even in concentrations 1.3-25.6-fold higher of the IC₅₀ values.

For the evaluation of their genotoxicity both micronucleus (*in vitro*) and *Allium cepa* (*in vivo*) assays were used. Complexes **1-5** did not show genotoxic activity at the IC₅₀ values both *in vitro* and *in vivo*. Moreover, *in vivo*, at concentrations 1.3-25.6-fold higher of the IC₅₀ values, they did not appear to have genotoxic activity.

Finally, in order to ascertain their way of action, their ability to inhibit lipoxygenase enzyme (mitochondria), to oxidize linoleic acid (membranes) and binding to DNA (nucleus) was examined. Complexes **1-5** did not inhibit lipoxygenase activity; however, they do oxidize linoleic to hydroperoxy-linoleic acid and therefore possibly attack membranes. Another, less possible, way of action is to bind to DNA, because their binding activity towards DNA was found to be weak.

H. Βιβλιογραφία.

- 1) American Cancer Society, *Cancer Facts & Figures 2020*, Atlanta: © 2020, American Cancer Society; Inc., Surveillance Research.
- 2) K. Yadav, P. Bhargava, S. Bansal, M. Singh, S. Gupta, G. Sandhu, S. Kumar, V. Sreekanth, A. Bajaj, Nature of the charged head group dictates the anticancer potential of lithocholic acid-tamoxifen conjugates for breast cancer therapy, 2015, *Med. Chem. Commun.*, 6, 778-787.
- 3) M.M Abd Elhalim, N.S.M. Ismail, S.M.M. Yahya, Y.Y. Omar, A.A. Abd Rabou, D.S. Lasheen, M.F. Zawrah, G.A. Elmegeed, Synthesis, Characterization, and Evaluation of Cytotoxic Effects of Novel Hybrid Steroidal Heterocycles as PEG Based Nanoparticles, 2017, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 18(7), 1937-1946.
- 4) S. Tabassum, S. Yadav, F. Arjmand, Exploration of glycosylated-organotin(IV) complexes as anticancer drug candidates, 2014, *Inorg. Chim. Acta*, 423, 38-45.
- 5) C.E. Carraher Jr., M.R. Roner, K. Shahi, A. Moric-Johnson, L. Miller, G. Barot, A. Battin, N.T. Trang, N. Sookdeo, Z. Islam, Control of Breast Cancer Using Organotin Polymers, 2015, *Int. J. Polym. Mater.*, 64, 800-814.
- 6) T.-C. Zhang et.al. (eds), Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012), Lecture Notes in Electrical Engineering 250, 2014, Springer-Verlag, 827.
- 7) M.A. Tantawy, M.S. Nafie, G.A. Elmegeed, I.A.I. Ali, Auspicious role of the steroidal heterocyclic derivatives as a platform for anti-cancer drugs, 2017, *Bioorg. Chem.*, 73, 128-146.
- 8) R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer Statistics, 2020, *CA Cancer J. Clin.*, 70, 7-30.

- 9) Y. Yang, M. Hong, L. Xu, J. Cui, G. Chang, D. Li, C. Li, Organotin(IV) complexes derived from Schiff base N'-[(1E)-(2-hydroxy-3-methoxyphenyl)methylidene]pyridine-3-carbohydrazone: Synthesis, in vitro cytotoxicities and DNA/BSA interaction, 2016, *J. Organomet. Chem.*, 804, 48-58.
- 10) Y.-F. Win, C.-S. Choong, J.-C. Dang, M.A. Iqbal, C.K. Quah, S.R. Kanuparth, R.A. Haque, M.B. Khadeer Ahamed, S.-G. Teoh, Synthesis, crystal structures and spectroscopic properties of two new organotin (IV) complexes and their antiproliferative effect against cancerous and non-cancerous cells, 2015, *C. R. Chimie*, 18, 137-148.
- 11) N. A. Seebacher, A. E. Stacy, G. M. Porter, A. M. Merlot, Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies, 2019, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 38, 156-194.
- 12) C.N. Banti, A.D. Giannoulis, N. Kourkoumelis, A.M. Owczarzak, M. Kubicki, S.K. Hadjikakou, Novel metallo-therapeutics of the NSAID naproxen. Interaction with intracellular components that leads the cells to apoptosis, 2014, *Dalton Trans.*, 43, 6848-6863.
- 13) GLOBOCAN 2018, The Global Cancer Observatory, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization.
- 14) G.A. Elmegeed, W.K.B. Khalil, R.M. Mohareb, H.H. Ahmed, M.M. Abd-Elhalim, G.H. Elsayed, Cytotoxicity and gene expression profiles of novel synthesized steroid derivatives as chemotherapeutic anti-breast cancer agents, 2011, *Bioorg. Med. Chem.*, 19, 6860-6872.

- 15) M.C. Oliveira, C. Neto, G. Ribeiro Moraes, T. Thiemann, Steroid Receptor Ligands for Breast Cancer Targeting: An Insight into Their Potential Role as Pet Imaging Agents, 2013, *Curr. Med. Chem.*, 20, 222-245.
- 16) C.N. Banti, C. Papatriantafyllopoulou, M. Manoli, A.J. Tasiopoulos, S.K. Hadjikakou, Nimesulide Silver Metallodrugs, Containing the Mitochondriotropic, Triaryl Derivatives of Pnictogen; Anticancer Activity against Human Breast Cancer Cells, 2016, *Inorg. Chem.*, 55, 8681-8696.
- 17) M.P. Chrysouli, C.N. Banti, N. Kourkouvelis, N. Panayiotou, G.S. Markopoulos, A.J. Tasiopoulos, S.K. Hadjikakou, Chloro(triphenylphosphine)gold(I) a forefront reagent in gold chemistry as apoptotic agent for cancer cells, 2018, *J. Inorg. Biochem.*, 179, 107-120.
- 18) D.B. Shpakovsky, C.N. Banti, G. Beaulieu-Houle, N. Kourkouvelis, M. Manoli, M.J. Manos, A.J. Tasiopoulos, S.K. Hadjikakou, E.R. Milaeva, K. Charalabopoulos, T. Bakas, I.S. Butler, N. Hadjiliadis, Synthesis, structural characterization and *in vitro* inhibitory studies against human breast cancer of the bis-(2,6-di-tert-butylphenol)tin(IV) dichloride and its complexes, 2012, *Dalton Trans.*, 41, 14568-14582.
- 19) S. Fani, B. Kamalidehghan, K.M. Lo, N.M. Hashim, K.M. Chow, F. Ahmadipour, Synthesis, structural characterization, and anticancer activity of a monobenzyltin compound against MCF-7 breast cancer cells, 2015, *Drug Des. Dev. Ther.*, 9, 6191-6201.
- 20) M. Wolff, F.K. Kosyna, J. Dunst, W. Jelkmann, R. Depping, Impact of hypoxia inducible factors on estrogen receptor expression in breast cancer cells, 2017, *Arch. Biochem. Biophys.*, 613, 23-30.

- 21) C.N. Banti, L. Kyros, G.D. Geromichalos, N. Kourkouvelis, M. Kubicki, S.K. Hadjikakou, A novel silver iodide metallo-drug: Experimental and computational modelling assessment of its interaction with intracellular DNA, lipoxygenase and glutathione, 2014, *Eur. J. Med. Chem.*, 77, 388-399.
- 22) N.F. Pondé, D. Zardavas, M. Piccart, Progress in adjuvant systemic therapy for breast cancer, 2019, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 16, 27-44.
- 23) M. Ignatiadis, C. Sotiriou, Luminal breast cancer: from biology to treatment, 2013, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 10, 494-506.
- 24) M. Mego, S.A. Mani, M. Cristofanilli, Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications, 2010, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 7, 693-701.
- 25) S.B. Matthews, C.A. Sartorius, Steroid Hormone Receptor Positive Breast Cancer Patient-Derived Xenografts, 2017, *Horm. Canc*, 8, :4-15.
- 26) M. Pokhrel, E. Ma, Synthesis and Screening of Aromatase Inhibitory Activity of Substituted C19 Steroidal 17-Oxime Analogs, 2011, *Molecules*, 16, 9868-9885.
- 27) R. Pingaew, V. Prachayasittikul, N. Anuwongcharoen, S. Prachayasittikul, S. Ruchirawat, V. Prachayasittikul, Synthesis and molecular docking of *N,N'*-disubstituted thiourea derivatives as novel aromatase inhibitors, 2018, *Bioorg. Chem.*, 79, 171-178.
- 28) A. Gupta, P. Saha, C. Descôteaux, V. Leblanc, É. Asselin, G. Bérubé, Design, synthesis and biological evaluation of estradiol-chlorambucil hybrids as anticancer agents, 2010, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 1614-1618.
- 29) V. Perron, D. Rabouin, E. Asselin, S. Parent, R.C.-Gaudreault, G. Berube, Synthesis of 17 β -estradiol-linked platinum(II) complexes and their cytotoxic activity on estrogen-dependent and -independent breast tumor cells, 2005, *Bioorg. Chem.*, 33, 1-15.

- 30) S. Cunha, L. Gano, G.R. Morais, T. Thiemann, M.C. Oliveira, Progesterone receptor targeting with radiolabelled steroids: An approach in predicting breast cancer response to therapy, 2013, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 137, 223-241.
- 31) K.-L.D. Dao, R.N. Hanson, Targeting the Estrogen Receptor using Steroid-Therapeutic Drug Conjugates (Hybrids), 2012, *Bioconjugate Chem.*, 23(11), 2139-2158.
- 32) A. Majumder, M. Singh, S.C. Tyagi, Post-menopausal breast cancer: from estrogen to androgen receptor, 2017, *Oncotarget*, 8(60), 102739-102758.
- 33) F. Andre, M. Arnedos, A. Goubar, A. Ghouadni, S. Delaloge, Ki67-no evidence for its use in node-positive breast cancer, 2015, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, advance online publication, 1-6.
- 34) R. Jeselsohn, G. Buchwalter, C. De Angelis, M. Brown, R. Schiff, ESR1 mutations-a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer, 2015, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, advance online publication, 1-11.
- 35) K. Subik, J.-F. Lee, L. Baxter, T. Strzepek, D. Costello, P. Crowley, L. Xing, M.-C. Hung, T. Bonfiglio, D.G. Hicks, P. Tang, The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines, 2010, *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 4, 35-41.
- 36) S. Osati, H. Ali, B. Guerin, J.E. van Lier, Synthesis and spectral properties of estrogen- and androgen-BODIPY conjugates, 2017, *Steroids*, 123, 27-36.
- 37) T. Misawa, K. Tanaka, Y. Demizu, M. Kurihara, Efficient synthesis of a multi-substituted diphenylmethane skeleton as a steroid mimetic, 2017, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27, 2590-2593.

- 38) V. Tsiatouras, C.N. Banti, A.M. Grzeřkiewicz, G. Rossos, N. Kourkoumelis, M. Kubicki, S.K. Hadjikakou, Structural, photolysis and biological studies of novel mixed metal Cu(I)-Sb(III) mixed ligand complexes, 2016, *J. Photochem. Photobiol.*, 163, 261-268.
- 39) C.N. Banti, V. Tsiatouras, K. Karanickolas, N. Panagiotou, A.J. Tasiopoulos, N. Kourkoumelis, S.K. Hadjikakou, Antiproliferative activity and apoptosis induction, of organo-antimony(III)–copper(I) conjugates, against human breast cancer cells, 2019, *Mol. Divers.*
- 40) C.D. Hart, I. Migliaccio, L. Malorni, C. Guarducci, L. Biganzoli, A. Di Leo, Challenges in the management of advanced, ER-positive, HER2-negative breast cancer, 2015, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, advance online publication, 1-12.
- 41) C. Descoteaux, V. Leblanc, G. Belanger, S. Parent, E. Asselin, G. Berube, Improved synthesis of unique estradiol-linked platinum(II) complexes showing potent cytotoxic activity and affinity for the estrogen receptor α and β , 2008, *Steroids*, 73, 1077-1089.
- 42) M. Hasan, R.K. Leak, R.E. Stratford, D.P. Zlotos, P.A. Witt-Enderby, Drug conjugates- an emerging approach to treat breast cancer, 2018, *Pharmacol Res Perspect.*, 6, e00417.
- 43) G. Rajapaksa, C. Thomas, J.-Å. Gustafsson, Estrogen signaling and unfolded protein response in breast cancer, 2016, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 163, 45-50.
- 44) A. Wawruszak, J.J. Luszczki, J. Kalafut, K. Okla, M. Halasa, A. Rivero-Muller, A. Stepulak, Additive Pharmacological Interaction between Cisplatin (CDDP) and Histone Deacetylase Inhibitors (HDIs) in MDA-MB-231 Triple Negative Breast Cancer (TNBC) Cells with Altered Notch1 Activity-An Isobolographic Analysis, 2019, *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 3663-3679.

- 45) M. Królik, H. Milnerowicz, The Effect of Using Estrogens in the Light of Scientific Research, 2012, *Adv. Clin. Exp. Med.*, 21(4), 535-543.
- 46) V. Schirmacher, From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review), 2019, *Int. J. Oncol.*, 54, 407-419.
- 47) M. Durante, R. Orecchia, J.S. Loeffler, Charged-particle therapy in cancer: clinical uses and future perspectives, 2017, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, advance online publication, 1-13.
- 48) R.R. Weichselbaum, H. Liang, L. Deng, Y.-X. Fu, Radiotherapy and immunotherapy: a beneficial liaison?, 2017, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 14, 365-379.
- 49) J.A. Cox, T.A. Swanson, Current modalities of accelerated partial breast irradiation, 2013, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 10, 344-356.
- 50) V. Sreekanth, S. Bansal, R.K. Motiani, S. Kundu, S.K. Muppu, T.D. Majumdar, K. Panjamurthy, S. Sengupta, A. Bajaj, Design, Synthesis, and Mechanistic Investigations of Bile acid-Tamoxifen Conjugates for Breast Cancer Therapy, 2013, *Bioconjug. Chem.*, 24(9), 1468-1484.
- 51) Shamsuzzaman, T. Siddiqui, M.G. Alam, A.M. Dar, Synthesis, characterization and anticancer studies of new steroidal oxadiazole, pyrrole and pyrazole derivatives, 2015, *J. Saudi Chem. Soc.*, 19, 387-391.
- 52) K. Beelen, W. Zwart, S.C. Linn, Can predictive biomarkers in breast cancer guide adjuvant endocrine therapy?, 2012, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 9, 529-541.
- 53) C.L. Arteaga, M.X. Sliwkowski, C. K. Osborne, E.A. Perez, F. Puglisi, L. Gianni, Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives, 2012, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 9, 16-32.

- 54) I. Dagogo-Jack, A.T. Shaw, Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies, 2017, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, advance online publication, 1-14.
- 55) B. Brycki, H. Koenig, I. Kowalczyk, T. Pospieszny, Synthesis, Spectroscopic and Theoretical Studies of New Quaternary *N,N*-Dimethyl-3-phthalimidopropylammonium Conjugates of Sterols and Bile Acids, 2014, *Molecules*, 19, 4212-4233.
- 56) T. Pospieszny, Design and Synthesis of New Bile Acid-Sterol Conjugates Linked via 1,2,3-Triazole Ring, 2015, *Helv. Chim. Acta*, 98, 1337-1350.
- 57) P.P. Nair, D. Kritchevsky, The Bile Acids. Chemistry, Physiology and Metabolism, Volume 1: Chemistry, 1971, ©Springer Science and Business Media.
- 58) M. Norlin, K. Wikvall, Enzymes in the Conversion of Cholesterol into Bile Acids, 2007, *Curr. Mol. Med.*, 7, 199-218.
- 59) H.-K. Yang, Y.-X. Cheng, M.-M. Su, Y. Xiao, M.-B. Hu, W. Wang, Q. Wang, Polyoxometalate–biomolecule conjugates: A new approach to create hybrid drugs for cancer therapeutics, 2013, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23, 1462-1466.
- 60) S. Gouin, X.X. Zhu, Synthesis of 3 α - and 3 β -dimers from selected bile acids, 1996, *Steroids*, 61, 664-669.
- 61) T. Li, J.Y.L. Chiang, Regulation of Bile Acid and Cholesterol Metabolism by PPARs, 2009, *Hindawi Publishing Corporation PPAR Research*, Article ID 501739, 15 pages.
- 62) S.-B. Yee, Y.S. Song, S.H. Jeong, H.S. Lee, S.Y. Seo, J.H. Kim, H. Suh, N.D. Kim, Y.H. Yoo, A novel chenodeoxycholic derivative HS-1200 enhances radiation-induced apoptosis in MCF-7 cells, 2007, *Oncol. Rep.*, 17, 919-923.

- 63) E. Im, Y.H. Choi, K.-J. Paik, H. Suh, Y. Jin, K.-W. Kim, Y.H. Yoo, N.D. Kim, Novel bile acid derivatives induce apoptosis via a p53-independent pathway in human breast carcinoma cells, 2001, *Cancer Lett.*, 163, 83-93.
- 64) B. Czerny, M. Teister, Z. Juzyszyn, A. Modrzejewski, A. Pawlik, Effect of 4-hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione (formestane) on the bile secretion and metabolism of 4-¹⁴C-cholesterol to bile acids, 2005, *Pharmacol. Rep.*, 57, 896-900.
- 65) L. Dyakova, D.-C. Culita, G. Marinescu, M. Alexandrov, R. Kalfin, L. Patron, R. Alexandrova, Metal Zn(II), Cu(II), Ni (II) complexes of ursodeoxycholic acid as putative anticancer agents, 2014, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 28(3), 543-551.
- 66) C. Faustino, C. Serafim, P. Rijo, C. Pinto Reis, Bile acids and bile acid derivatives: use in drug delivery systems and as therapeutic agents, 2016, *Expert Opin Drug Deliv.*, 13(8), 1133-1148.
- 67) K.N. Kuhajda, S.M. Cvjeticanin, E.A. Djurendic, M.N. Sakac, K.M. Penov Gasi, V.V. Kojic, G.M. Bogdanovic, Synthesis and Cytotoxic Activity of a Series of Bile Acid Derivatives, 2009, *Hem. Ind.*, 63(4), 313-318.
- 68) D.S. Agarwal, H.S. Anantaraju, D. Sriram, P. Yogeewari, S.H. Nanjegowda, P. Mallu, R. Sakhuja, Synthesis, characterization and biological evaluation of bile acidaromatic/heteroaromatic amides linked via amino acids as anti-cancer agents, 2016, *Steroids*, 107, 87-97.
- 69) J.K. Denike, M. Moskova, X.X. Zhu, Stereoselective synthesis of 3 β -bile acid derivatives from the 3-analog, 1995, *Chem. Phys. Lipids*, 77, 261-267.
- 70) I. Cerny, M. Budesínsky, V. Pouzar, P. Drasar, Steroids linked with amide bond-Extended cholesterol, 2009, *Steroids*, 74, 88-94.

- 71) L. Mrózek, L. Dvoráková, Z. Mandelová, L. Rárová, A. Rezacová, L. Placek, R. Opatrilová, J. Dohnal, O. Paleta, V. Král, P. Drasar, J. Jampílek, Investigation of new acyloxy derivatives of cholic acid and their esters as drug absorption modifiers, 2011, *Steroids*, 76, 1082-1097.
- 72) B. Yu, X.-N. Sun, X.-J. Shi, P.-P. Qi, Y. Fang, E. Zhang, D.-Q. Yu, H.-M. Liu, Stereoselective synthesis of novel antiproliferative steroidal (E, E) dienamides through a cascade aldol/cyclization process, 2013, *Steroids*, 78, 1134-1140.
- 73) L. Mrózek, L. Coufalová, L. Rárová, L. Placek, R. Opatrilová, J. Dohnal, K. Králová, O. Paleta, V. Král, P. Drašar, J. Jampílek, New polyfluorothiopropanoyloxy derivatives of 5b-cholan-24-oic acid designed as drug absorption modifiers, 2013, *Steroids*, 78, 832-844.
- 74) D.C. Culita, G. Marinescu, L. Patron, F. Țuna, N. Stanica, M. Yun, Coordination Compounds of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) with Ursodeoxycholic Acid, 2010, *Rev. Roum. Chim.*, 55(1), 63-67.
- 75) J.T. Tamminen, E.T. Kolehmainen, M.H. Haapala, H.T. Salo, J.M. Linnanto, Synthesis and ¹³C NMR chemical shift assignments of 2,2'-bipyridine-4,4'-dicarboxylates of bile acid methyl esters, 2000, *Arkivoc*, (i), 80-86.
- 76) N.M. Krstic, V.D. Pavlovic, I.T. Novakovic, I.Z. Matic, D.M. Sladi, Synthesis, characterization and biological evaluation of some novel P-heterocyclic androst-4-ene derivatives, 2013, *Mol. Divers*, 17, 547-561.
- 77) D. Brossard, L. El Kihel, M. Clément, W. Sebbahi, M. Khalid, C. Roussakis, S. Rault, Synthesis of bile acid derivatives and *in vitro* cytotoxic activity with pro-apoptotic

- process on multiple myeloma (KMS-11), glioblastoma multiforme (GBM), and colonic carcinoma (HCT-116) human cell lines, 2010, *Eur. J. Med. Chem.*, 45, 2912-2918.
- 78) B. Biersack and R. Schobert, Metallodrug Conjugates with Steroids and Selective Estrogen Receptor Modulators (SERM), 2009, *Curr. Med. Chem.*, 16, 2324-2337.
 - 79) R. Paschke, J. Kalbitz, C. Paetz, Novel spacer linked bile acid-cisplatin compounds as a model for specific drug delivery, synthesis and characterization, 2000, *Inorg. Chim. Acta*, 304, 241-249.
 - 80) R. Paschke, J. Kalbitz, C. Paetz, M. Luckner, T. Mueller, H.-J. Schmoll, H. Mueller, E. Sorkau, E. Sinn, Cholic acid-carboplatin compounds (CarboChAPt) as models for specific drug delivery: synthesis of novel carboplatin analogous derivatives and comparison of the cytotoxic properties with corresponding cisplatin compounds, 2003, *J. Inorg. Biochem.*, 94, 335-342.
 - 81) J. Ruiz, V. Rodríguez, N. Cutillas, A. Espinosa, M.J. Hannon, A Potent Ruthenium(II) Antitumor Complex Bearing a Lipophilic Levonorgestrel Group, 2011, *Inorg. Chem.*, 50, 9164-9171.
 - 82) A. Jackson, J. Davis, R.J. Pither, A. Rodger, M.J. Hannon, Estrogen-Derived Steroidal Metal Complexes: Agents for Cellular Delivery of Metal Centers to Estrogen Receptor-Positive Cells, 2001, *Inorg. Chem.*, 40, 3964-3973.
 - 83) A.G. Davies, M. Gielen, K.H. Pannell, E.R. Tiekink, Tin Chemistry, Fundamentals, Frontiers, and Applications, © 2008 John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 978-0-470-51771-0.
 - 84) P.J. Smith, Chemistry of Tin, Second Edition, © 1998 Springer Science+Business Media Dordrecht, ISBN 978-94-010-6072-1 ISBN 978-94-011-4938-9 (eBook).

- 85) J.M Tsangaris, D.R Williams, Tin in pharmacy and nutrition, 1992, *Appl. Organomet. Chem.*, 6, 3-18.
- 86) C.E. Carraher Jr., M.R. Roner, Organotin Polyethers as Biomaterials, 2009, *Materials*, 2, 1558-1598.
- 87) J. Brtko, Z. Dvorak, Triorganotin compounds - ligands for “rexinoid” inducible transcription factors: Biological effects, 2015, *Toxicol. Lett.*, 234, 50-58.
- 88) A. Pagliarani, F. Trombetti, V. Ventrella, Biochemical and Biological Effects of Organotins, ©2012 Bentham Science Publishers, eBook.
- 89) J.B. Graceli, G.C. Sena, P.F.I. Lopes, G.C. Zamprogno, M.B. da Costa, A.F.L. Godoi, D.M. dos Santos, M.R.R. de Marchi, M.A. dos Santos Fernandez, Organotins: A review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate, 2013, *Reprod. Toxicol.*, 36, 40– 52.
- 90) J. Wiecek, V. Dokorou, Z. Ciunik, D. Kovala-Demertzi, Organotin complexes of pyruvic acid thiosemicarbazone: Synthesis, crystal structures and antiproliferative activity of neutral and cationic diorganotin complexes, 2009, *Polyhedron*, 28, 3298–3304.
- 91) D. Kovala-Demertzi, V. Dokorou, A. Primikiri, R. Vargas, C. Silvestru, U. Russo, M.A. Demertzis, Organotin meclofenamic complexes: Synthesis, crystal structures and antiproliferative activity of the first complexes of meclofenamic acid - Novel anti-tuberculosis agents, 2009, *J. Inorg. Biochem.*, 103, 738-744.
- 92) T.S. Basu Baul, D. Dutta, A. Duthie, R. Prasad, N. Kumar Rana, B. Koch, E.R.T. Tiekink, Triphenyltin(IV) benzoates with diazenyl/imino scaffold exhibiting remarkable apoptosis mediated by reactive oxygen species, 2017, *J. Inorg. Biochem.*, 173, 79-92.
- 93) N. Muhammad, Z.-ur-Rehman, S. Ali, A. Meetsma, F. Shaheen, Organotin(IV) 4-methoxyphenylethanoates: Synthesis, spectroscopic characterization, X-ray structures

- and *in vitro* anticancer activity against human prostate cell lines (PC-3), 2009, *Inorg. Chim. Acta*, 362, 2842-2848.
- 94) M.N. Xanthopoulou, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, M. Kubicki, S. Skoulika, T. Bakas, M. Baril, I.S. Butler, Synthesis, Structural Characterization, and Biological Studies of Six- and Five-Coordinate Organotin(IV) Complexes with the Thioamides 2-Mercaptobenzothiazole, 5-Chloro-2-mercaptobenzothiazole, and 2-Mercaptobenzoxazole, 2007, *Inorg. Chem*, 46, 1187-1195.
 - 95) M.N. Xanthopoulou, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, M. Schurmann, K. Jurkschat, A. Michaelides, S. Skoulika, T. Bakas, J. Binolis, S. Karkabounas, K. Charalabopoulos, Synthesis, structural characterization and *in vitro* cytotoxicity of organotin(IV) derivatives of heterocyclic thioamides, 2-mercaptobenzothiazole, 5-chloro-2-mercaptobenzothiazole, 3-methyl-2-mercaptobenzothiazole and 2-mercaptonicotinic acid, 2003, *J. Inorg. Biochem.*, 96, 425-434.
 - 96) V.I. Balas, C.N. Banti, N. Kourkoumelis, S.K. Hadjikakou, G.D. Geromichalos, D. Sahpazidou, L. Male, M.B. Hursthouse, B. Bednarz, M. Kubicki, K. Charalabopoulos, N. Hadjiliadis, Structural and *In Vitro* Biological Studies of Organotin(IV) Precursors; Selective Inhibitory Activity Against Human Breast Cancer Cells, Positive to Estrogen Receptors, 2012, *Aust. J. Chem.*, A-M.
 - 97) Y.-R. Qiu, R.-F. Zhang, S.-L. Zhang, S. Cheng, Q.-L. Li, C.-L. Ma, Novel organotin(IV) Complexes derived from 4-fluorophenylselenoacetic acid: synthesis, characterization and *in vitro* cytostatic activity evaluation, 2016, *J. Name.*, 00, 1-3.
 - 98) X. Shang, J. Cui, J. Wu, A.J.L. Pombeiro, Q. Li, Polynuclear diorganotin(IV) complexes with arylhydroxamates: Syntheses, structures and *in vitro* cytotoxic activities, 2008, *J. Inorg. Biochem.*, 102, 901-909.

- 99) K.N. de Oliveira, V. Andermark, L.A. Onambebe, G. Dahl, A. Prokop, I. Ott, Organotin complexes containing carboxylate ligands with maleimide and naphthalimide derived partial structures: TrxR inhibition, cytotoxicity and activity in resistant cancer cells, 2014, *Eur. J. Med. Chem.*, 87, 794-800.
- 100) M.-L. Sun, B.-F. Ruan, Q. Zhang, Z.-D. Liu, S.-L. Li, J.-Y. Wu, B.-K. Jin, J.-X. Yang, S.-Y. Zhang, Y.-P. Tian, Synthesis, crystal structures, electrochemical studies and anti-tumor activities of three polynuclear organotin(IV) carboxylates containing ferrocenyl moiety, 2011, *J. Organomet. Chem.*, 696, 3180-3185.
- 101) M. Khandani, T. Sedaghat, N. Erfani, M.R. Haghshenas, H.R. Khavasi, Synthesis, spectroscopic characterization, structural studies and antibacterial and antitumor activities of diorganotin complexes with 3-methoxysalicylaldehyde thiosemicarbazone, 2013, *J. Mol. Struct.*, 1037, 136-143.
- 102) V. Dokorou, A. Primikiri, D. Kovala-Demertzi, The triphenyltin(VI) complexes of NSAIDs and derivatives. Synthesis, crystal structure and antiproliferative activity. Potent anticancer agents, 2011, *J. Inorg. Biochem.*, 105, 195-201.
- 103) E. Bollo, R. Guglielmino, S. Sant, P. Pregel, F. Riondato, B. Miniscalco, E. Cornaglia, C. Nebbia, M. Dacasto, Biochemical, ultrastructural and molecular characterization of the triphenyltin acetate (TPTA)-induced apoptosis in primary cultures of mouse thymocytes, 2006, *Cell Biol. Toxicol.*, 22, 275-284.
- 104) T.S. Basu Baul, S. Basu, D. de Vos, A. Linden, Amino acetate functionalized Schiff base organotin(IV) complexes as anticancer drugs: synthesis, structural characterization, and *in vitro* cytotoxicity studies, 2009, *Invest New Drugs*, 27, 419-431.
- 105) A.K. Saxena, Organotin Compounds and Cancer Chemotherapy, 1989, *Coord. Chem. Rev.*, 95 (1989) 109-123.

- 106) J. Lintelmann, A. Katayama, N. Kurihara, L. Shore, A. Wenzel, Endocrine Disruptors in the Environment, 2003, *Pure Appl. Chem.*, 75(5), 631-681.
- 107) C.S. Rocha , B.P. de Moraes, B.L. Rodrigues, C.L. Donnici, G.M. de Lima, J.D. Ardisson J.A. Takahashi, R.S. Bitzer, Spectroscopic and X-ray structural characterization of new organotin carboxylates and their *in vitro* antifungal activities, 2016, *Polyhedron*, 117, 35-47.
- 108) N. Pavlikova, T.M. Kortner, A. Arukwe, Modulation of acute steroidogenesis, peroxisome proliferator-activated receptors and CYP3A/PXR in salmon interrenal tissues by tributyltin and the second messenger activator, forskolin, 2010, *Chem.-Biol. Interact.*, 185, 119-127.
- 109) C.E. Carraher Jr, M.R. Roner, Organotin polymers as anticancer and antiviral agents, 2014, *J. Organomet. Chem.*, 751, 67-82.
- 110) Y. Hiromori, H. Yui, J. Nishikawa, H. Nagase, T. Nakanishi, Organotin compounds cause structure-dependent induction of progesterone in human choriocarcinoma Jar cells, 2016, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 155, 190-198.
- 111) C.N. Banti, S.K. Hadjikakou, T. Sismanoglu, N. Hadjiliadis, Anti-proliferative and antitumor activity of organotin(IV) compounds. An overview of the last decade and future perspectives, 2019, *J. Inorg. Biochem.*, 194, 114-152.
- 112) A. Alama, B. Tasso, F. Novelli, F. Sparatore, Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotins as antitumor agents, 2009, *Drug Discovery Today*, 14(9/10), 500-508.
- 113) E.R. Milaeva, D.B. Shpakovsky, Y.A. Gracheva, T.A. Antonenko, D.I. Osolodkin, V.A. Palyulin, P.N. Shevtsov, M.E. Neganova, D.V. Vinogradova, E.F. Shevtsova, Some insight into the mode of cytotoxic action of organotin compounds with protective 2,6-di-tert-butylphenol fragments, 2015, *J. Organomet. Chem.*, 782, 96-102.

- 114) S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, Antiproliferative and anti-tumor activity of organotin compounds, 2009, *Coord. Chem. Rev.*, 253, 235-249.
- 115) G.N. Kaluderovic, R. Paschke, Anticancer Metallotherapeutics in Preclinical Development, 2011, *Curr. Med. Chem.*, 18, 4738-4752.
- 116) R. Kopf-Maier, Complexes of metals other than platinum as antitumour agents, 1994, *Eur. J. Clin. Pharmacol*, 47, 1-16.
- 117) M.K. Amir, S. Khan, Z. ur-Rehman, A. Shah, I.S. Butler, Anticancer activity of organotin(IV) carboxylates, 2014, *Inorg. Chim. Acta*, 423, 14-25.
- 118) J.M. Galvan-Hidalgo, E. Gomez, T. Ramirez-Apan, A. Nieto-Camacho, S. Hernandez-Ortega, Synthesis and cytotoxic activity of dibutyltin complexes derived from pyridoxamine and salicylaldehydes, 2015, *Med. Chem. Res.*, 24, 3621-3631.
- 119) T. Anasamy, C.K. Thy, K.M. Lo, C.F. Chee, S.K. Yeap, B. Kamalidehghan, L.Y. Chung, Tribenzyltin carboxylates as anticancer drug candidates: Effect on the cytotoxicity, motility and invasiveness of breast cancer cell lines, 2017, *Eur. J. Med. Chem.*, 125, 770-783.
- 120) M. Gielen, M. Biesemans, D. de Vos, R. Willem, Synthesis, characterization and *in vitro* antitumor activity of di- and triorganotin derivatives of polyoxa- and biologically relevant carboxylic acids, 2000, *J. Inorg. Biochem.*, 79, 139-145.
- 121) M. Gielen, Organotin compounds and their therapeutic potential: a report from the Organometallic Chemistry Department of the Free University of Brussels, 2002, *Appl. Organometal. Chem.*, 16, 481-494.
- 122) Y.-l. Li, Z.-w. Wang, P. Guo, L. Tang, R. Ge, S.-r. Ban, Q.-y. Chai, L. Niu, Q.-s. Li, Diorganotin(IV) derivatives of substituted *N*-hydroxybenzamides with selective cytotoxicity *in vitro* and potent antitumor activity *in vivo*, 2014, *J. Inorg. Biochem.*, 133, 1-7.

- 123) C.E. Carraher Jr., M.R. Roner, R.E. Lambert, L. Arroyo, L.C. Miller, Synthesis of Organotin Polyamine Ethers Containing Thiamine (Vitamin B1) and Preliminary Ability to Inhibit Select Cancer Cell Lines, 2015, *J. Inorg. Organomet. Polym.*, 25, 1414-1424.
- 124) S. Gómez-Ruiz, G.N. Kaluderovic, S. Prashar, E. Hey-Hawkins, A. Eric, Z. Zizak, Z.D. Juranic, Study of the cytotoxic activity of di and triphenyltin(IV) carboxylate complexes, 2008, *J. Inorg. Biochem.*, 102, 2087-2096.
- 125) M. Nath, M. Vats, P. Roy, Mode of action of tin-based anti-proliferative agents: Biological studies of organotin(IV) derivatives of fatty acids, 2015, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 148, 88-100.
- 126) T.S. Basu Baul, D. de Vos, In vitro cytotoxic evaluation of novel dichlorodiorgano [*N*-(2-pyridylmethylene)arylamine]tin(IV) derivatives in human tumor cell lines, 2010, *Invest. New Drugs*, 28, 609-614.
- 127) S.K. Hadjikakou, I.I. Ozturk, M.N. Xanthopoulou, P.C. Zachariadis, S. Zartilas, S. Karkabounas, N. Hadjiliadis, Synthesis, structural characterization and biological study of new organotin(IV), silver(I) and antimony(III) complexes with thioamides, 2008, *J. Inorg. Biochem.*, 102, 1007-1015.
- 128) M.N. Xanthopoulou, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, M. Kubicki, S. Karkabounas, K. Charalabopoulos, N. Kourkoumelis, T. Bakas, Synthesis and characterization of a new chloro-di-phenyltin(IV) complex with 2-mercapto-nicotinic acid: Study of its influence upon the catalytic oxidation of linoleic acid to hydroperoxylinoleic acid by the enzyme lipoxygenase, *J. Organomet. Chem.*, 691, 1780-1789.
- 129) I.I. Verginadis, S. Karkabounas, Y. Simos, E. Kontargiris, S.K. Hadjikakou, A. Batistatou, A. Evangelou, K. Charalabopoulos, Anticancer and cytotoxic effects of a triorganotin compound with 2-mercapto-nicotinic acid in malignant cell lines and tumor bearing Wistar rats, 2011, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 42, 253-261.

- 130) M.N. Xanthopoulou, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, E.R. Milaeva, J.A. Gracheva, V.Y. Tyurin, N. Kourkouvelis, K.C. Christoforidis, A.K. Metsios, S. Karkabounas, K. Charalabopoulos, Biological studies of new organotin(IV) complexes of thioamide ligands, 2008, *Eur. J. Med. Chem.*, 43, 327-335.
- 131) D.B. Shpakovsky, C.N. Banti, E.M. Mukhatova, Y.A. Gracheva, V.P. Osipova, N.T. Berberova, D.V. Albov, T.A. Antonenko, L.A. Aslanov, E.R. Milaeva, S.K. Hadjikakou, Synthesis, antiradical activity and *in vitro* cytotoxicity of novel organotin complexes based on 2,6-di-tert-butyl-4-mercaptophenol, 2014, *Dalton Trans.*, 43, 6880.
- 132) V.I. Balas, I.I. Verginadis, G.D. Geromichalos, N. Kourkouvelis, L. Male, M.B. Hursthouse, K.H. Repana, E. Yiannaki, K. Charalabopoulos, T. Bakas, S.K. Hadjikakou, Synthesis, structural characterization and biological studies of the triphenyltin(IV) complex with 2-thiobarbituric acid, 2011, *Eur. J. Med. Chem.*, 46, 2835-2844.
- 133) G.K. Latsis, C.N. Banti, N. Kourkouvelis, C. Papatriantafyllopoulou, N. Panagiotou, A. Tasiopoulos, A. Douvalis, A.G. Kalampounias, T. Bakas, S.K. Hadjikakou, Poly Organotin Acetates against DNA with Possible Implementation on Human Breast Cancer, 2018, *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 2055.
- 134) M.A. Abdellah, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, M. Kubicki, T. Bakas, N. Kourkouvelis, Y.V. Simos, S. Karkabounas, M.M. Barsan, I.S. Butler, Synthesis, Characterization, and Biological Studies of Organotin(IV) Derivatives with o- or p-hydroxybenzoic Acids, 2009, *Bioinorg. Chem. Appl.*, Article ID 542979, 1-12.
- 135) C.N. Banti, S.K. Hadjikakou, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Metal Complexes and Their Effect at the Cellular Level, 2016, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 3048–3071.
- 136) M.N. Xanthopoulou, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, M. Schurmann, K. Jurkschat, J. Binolis, S. Karkabounas, K. Charalabopoulos, Synthesis of a Novel Triphenyltin(IV)

- Derivative of 2-Mercaptonicotinic Acid with Potent Cytotoxicity in vitro., 2003, *Communication*, 1(3-4), 227-231.
- 137) M. Kubicki, A. Owczarzak, V.I. Balas, S.K. Hadjikakou, Structural characterization of polymeric potassium salts with 2-thiobarbituric acid: influence of organotin(IV) chlorides on potassium cation -solvation, 2012, *J. Coord.Chem.*, 65(7), 1107-1117.
- 138) V.I. Balas, S.K. Hadjikakou, N.Hadjiliadis, N. Kourkouvelis, M.E. Light, M. Hursthouse, A.K. Metsios, S. Karkabounas, Crystal Structure and Antitumor Activity of the Novel Zwitterionic Complex of tri-n-Butyltin(IV) with 2-Thiobarbituric Acid, 2008, *Bioinorg. Chem. Appl.*, art.no 654137.
- 139) M.S. Agiorgiti, A. Evangelou, P. Vezyraki, S.K. Hadjikakou, V. Kalfakakou, I. Tsanaktsidis, A. Batistatou, J. Zelovitis, Y.V. Simos, V. Ragos, S. Karkabounas, D. Peschos, Cytotoxic effect, antitumour activity and toxicity of organotin derivatives with ortho- or para-hydroxy-benzoic acids, 2018, *Med. Chem. Res.*, 27, 1122-1130.
- 140) M.N. Xanthopoulou, N. Kourkouvelis, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, M. Kubicki, S. Karkabounas, T. Bakas, Structural and biological studies of organotin(IV) derivatives with 2-mercapto-benzoic acid and 2-mercapto-4-methyl-pyrimidine, 2008, *Polyhedron*, 27, 3318-3324.
- 141) M.N. Xanthopoulou, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, N. Kourkouvelis, E.R. Milaeva, Y.A. Gracheva, V.Y. Tyurin, I. Verginadis, S. Karkabounas, M. Baril, I.S. Butler, Biological studies of organotin(IV) complexes with 2-mercaptopyrimidine, 2007, *Russ. Chem. Bull.*, International Edition, 56(4), 767-773.
- 142) α) S.K. Hadjikakou, M.A. Demertzis, M. Kubicki, D. Kovala-Demertzi, Organotin adducts with pyrimidinethione: crystal structure of dimethyldi(pyrimidine-2-thiolato)tin(IV) and diphenyldi(pyrimidine-2-thiolato)tin(IV), 2000, *Appl. Organometal. Chem.*, 14, 727-734. β) S.K. Hadjikakou, K. Jurkschat, M. Schurmann, Novel

- organotin(IV) compounds derived from bis(organostannyl)methanes: Synthesis and crystal structures of bis[diphenyl(pyridin-2-onato)stannyl]methane and bis[bromophenyl(pyrimidine-2-thionato)stannyl]methane·C₇H₈, 2006, *J. Organomet. Chem.*, 691, 1637-1642.
- 143) C.T. Chasapis, S.K. Hadjikakou, A. Garoufis, N. Hadjiliadis, T. Bakas, M. Kubicki, Y. Ming, Organotin(IV) Derivatives of L-Cysteine and their in vitro Anti-Tumor Properties., 2004, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2(1-2), 43-45.
- 144) S.K. Hadjikakou, M.A. Demertzis, J.R. Miller, D. Kovala-Demertzi, Synthesis and characterisation of the first organotin complex of piroxicam. An extended network system via non-hydrogen, hydrogen bonding linkages and C–H··· π contacts, 1999, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 5, 663-666.
- 145) α) D. Kovala-Demertzi, Recent advances on non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs: Organotin complexes of NSAIDs, 2006, *J. Organomet. Chem.*, 691, 1767-1774.
 β) V. Dokorou, M.A. Demertzis, D. Kovala-Demertzi, Recent advances on: Organotin complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs. Anti-tuberculosis agents, 2008, *Pharmakeftiki*, 21(1), 1-9.
- 146) M.A. Demertzis, S.K. Hadjikakou, D. Kovala-Demertzi, A. Koutsodimou, M. Kubicki, Organotin-Drug Interactions. Organotin Adducts of Tenoxicam: Synthesis and Characterization of the First Organotin Complex of Tenoxicam, 2000, *Helv. Chim. Acta*, 83, 2787-2801.
- 147) M. Mehring, G. Gabriele, S.K. Hadjikakou, M. Schürmann, D. Dakternieks, K. Jurkschat, Solvent-controlled assembling by hydrogen bridges and halogen-halogen interactions of novel organotin oxo clusters, 2002, *Chem Commun.*, 834-835.
- 148) M. Gielen, E.R.T. Tiekink, A. Bouhdid, D. de Vos, M. Biesemans, I. Verbruggen, R. Willem, Synthesis, Characterization and *in-vitro* Antitumour Activity of Dibutyltin

- Carboxylates Involving the Perfluorophenyl Moiety: Crystal Structure of the Dimeric Bis[(4-fluoro- and Pentafluoro-benzoate)di-*n*-butyltin] Oxides, 1995, *Appl. Organomet. Chem.*, 9, 639-648.
- 149) M. Gielen, R. Willem, A. Bouhdid, D. de Vos, Eur. Pat. Publ., EP 0700921 A1, Appl. 94/202.612.1, 09/09/1994.
- 150) R. Willem, A. Bouhdid, M. Biesemans, J.C. Martins, D. de Vos, E.R.T. Tiekink, M. Gielen, Synthesis and characterization of triphenyl- and tri-*n*-butyltin pentafluorobenzoates, -phenylacetates and -cinnamates. X-ray structure determination of tri-*n*-butyltin pentafluorocinnamate, 1996, *J. Organomet. Chem.*, 514, 203-212.
- 151) M. Gielen, A. Bouhdid, F. Kayser, M. Biesemans, D. de Vos, B. Mahieu, R. Willem, Di(*n*-butyl)tin Bis(di-hydroxybenzoate)s: Synthesis, Spectroscopic Characterization and *in vitro* Antitumour Activity, 1995, *Appl. Organomet. Chem.*, 9, 251-257.
- 152) M. Gielen, R. Willem, A. Bouhdid, D. de Vos, Eur. Pat. Publ., EP 0677528 A1, Appl. 94/201.012.5, 12/04/1994.
- 153) M. Gielen, P. Lelieveld, D. de Vos, H. Pan, R. Willem, M. Bieseman, H. H. Fiebig, *In vitro* effect of organotin-substituted steroids in human tumor cell lines, 1992, *Inorg. Chim. Acta*, 196, 115-117.
- 154) A Saxena, F Huber, L Pellerito, A Girasolo, Organoelement derivatives of steroids: Synthesis and structural features of organosilicon,-tin and -lead derivatives of cholesterol and desoxycholic acid, 1987, *Appl. Organomet. Chem.*, 1, 413-421.
- 155) N.F. Cardarelli, S.V. Kanakkanatt, US Patent Publ. 4541956, 1985.
- 156) N.F. Cardarelli, S.V. Kanakkanatt, US Patent Publ., 4634693, 1987.
- 157) R. Willem, H. Dalil, P. Broekaert, M. Biesemans, L. Ghys, K. Nooter, D. de Vos, F. Ribot, M. Gielen, Di-*n*-butyl, Tri-*n*-butyl- and Triphenyltin Steroidcarboxylates:

- Synthesis, NMR characterization and *in vitro* Antitumor Activity, 1997, *Main Group Met. Chem.*, 20(8), 535-542.
- 158) M. Gielen, M. Biesemans, R. Willem, Organotin compounds: from kinetics to stereochemistry and antitumour activities, 2005, *Appl. Organometal. Chem.*, 19, 440-450.
- 159) V. Vichai, K. Kirtikara, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, 2006, *Nat. Protoc.*, 1(3), 1112-1116.
- 160) D.M. Leme, M.A. Marin-Morales, *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application, 2009, *Mutat. Res.*, 682, 71-81.
- 161) M.-E.K. Stathopoulou, C.N. Banti, N. Kourkouvelis, A.G. Hatzidimitriou, A.G. Kalampounias, S.K. Hadjikakou, Silver complex of salicylic acid and its hydrogel-cream in wound healing chemotherapy, 2018, *J. Inorg. Biochem.*, 181, 41-55.
- 162) α) C.N. Banti, S.K. Hadjikakou, Evaluation of Genotoxicity by Micronucleus Assay *in vitro* and by *Allium cepa* Test *in vivo*, 2019, *Bio-protocol*, 9(14), 3311. β) I. Ketikidis, C.N. Banti, N. Kourkouvelis, C.G. Tsiafoulis, C. Papachristodoulou, A.G. Kalampounias, S.K. Hadjikakou, Conjugation of Penicillin-G with Silver(I) Ions Expands Its Antimicrobial Activity against Gram Negative Bacteria, 2020, *Antibiotics*, 9, 25-42.
- 163) I. Ozturk, S. Filimonova, S.K. Hadjikakou, N. Kourkouvelis, V. Dokorou, M.J. Manos, A.J. Tasiopoulos, M.M. Barsan, I.S. Butler, E.R. Milaeva, J. Balzarini, N. Hadjiliadis, Structural Motifs and Biological Studies of New Antimony(III) Iodide Complexes with Thiones, 2010, *Inorg. Chem.*, 49, 488-501.
- 164) C.N. Banti, E.I. Gkaniatsou, N. Kourkouvelis, M.J. Manos, A.J. Tasiopoulos, T. Bakas, S.K. Hadjikakou, Assessment of organotins against the linoleic acid, glutathione and CT-DNA, 2014, *Inorg. Chim. Acta*, 423, 98-106.
- 165) C.N. Banti, A.D. Giannoulis, N. Kourkouvelis, A.M. Owczarzak, M. Poyraz, M. Kubicki, K. Charalabopoulos, S.K. Hadjikakou, Mixed ligand–silver(I) complexes with

- anti-inflammatory agents which can bind to lipoxygenase and calf-thymus DNA, modulating their function and inducing apoptosis, 2012, *Metallomics*, 4, 545-560.
- 166) M. Kyropoulou, C.P. Raptopoulou, V. Psycharis, G. Psomas, Ni(II) complexes with non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Structure and interaction with DNA and albumins, 2013, *Polyhedron*, 61, 126-136.
- 167) L. Tabrizi, H. Chiniforoshan, P. McArdle, M. Ebrahimi, T. Khayamian, A novel bioactive Cd(II) polymeric complex with mefenamic acid: Synthesis, crystal structure and biological evaluations, 2015, *Inorg. Chim. Acta*, 432, 176-184.
- 168) D. Maity, S. Pattanayak, M.R. Mollick, D. Rana, D. Mondal, B. Bhowmick, S.K. Dash, S. Chattopadhyay, B. Das, S. Roy, M. Chakraborty, D. Chattopadhyay, Green one step morphosynthesis of silver nanoparticles and their antibacterial and anticancerous activities, 2016, *New J. Chem.*, 40, 2749-2762.
- 169) X. Wu, H. Li, S. Song, R. Zhang, W. Hou, Facile synthesis of camptothecin intercalated layered double hydroxide nanohybrids via a coassembly route, 2013, *Int. J. Pharm.*, 454, 453-461.
- 170) L. Yang, Y. Xu, Y. Su, J. Wu, K. Zhao, J. Chen, M. Wang, FT-IR spectroscopic study on the variations of molecular structures of some carboxyl acids induced by free electron laser, 2005, *Spectrochim. Acta A*, 62, 1209-1215.
- 171) Beauchamp, Spectroscopy Tables, (https://www.cpp.edu/~psbeauchamp/pdf/spec_ir_nmr_spectra_tables.pdf).
- 172) J. Coates, Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2006, ©John Wiley & Sons Ltd.
- 173) T. Bezrodna, T. Gavrillo, G. Puchkovska, V. Shimanovska, J. Baran, M. Marchewka, Spectroscopic study of TiO₂ (rutile)–benzophenone heterogeneous systems, 2002, *J. Mol. Struct.*, 614, 315-324.

- 174) H. Qiao, H. Sun, J. Li, H. Chen, C. Xing, J. Yang, H. Dong, J. Wang, X. Yin, Z.-M. Qi, F. Shi, Structure, Intrinsic properties and Vibrational Spectra of $\text{Pr}(\text{Mg}_{1/2}\text{Sn}_{1/2})\text{O}_3$ Ceramic Crystal, 2017, *Sci. Rep.*, 7, 13336.
- 175) C.M. Campo, J.E. Rodríguez, A.E. Ramírez, Thermal behaviour of romarchite phase SnO in different atmospheres: a hypothesis about the phase transformation, 2016, *Heliyon*, 2, e00112.
- 176) W. Jiazhu, H. Jingshuo, H. Liyiao, Antitumor Activity of Organotin Compounds. Reaction, Synthesis and Structure of $\text{Et}_2\text{SnCl}_2(\text{phen})$ with 5-Fluorouracil, 1988, *Inorg. Chim. Acta*, 152, 61-69.
- 177) G. Eng, O. Bathersfield, Mössbauer Studies of the Speciation of Tributyltin Compounds in Seawater and Sediment Samples, 1986, *Water, Air, and Soil Pollut.*, 27, 191-197.
- 178) X. Song, A. Zapata, L. May, G. Eng, Effects of pH on the speciation of several triorganotin compounds in Anacostia River sediments using Mössbauer spectroscopy, 2005, *Main Group Chem.*, 4(1), 39-48.
- 179) L. May, G. Eng, S.P. Coddington, L.L. Stockton, Mössbauer Spectral Studies of the Interaction between Triphenyltin Compounds and *Ceratocystis ulmi*, 1988, *Hyperfine Interact.*, 42, 909-912.
- 180) R.A Lucero, M.A Otieno, L. May, G. Eng, Speciation of some triphenyltin compounds in estuarine sediments using Mössbauer spectroscopy, 1992, *Appl. Organomet. Chem.*, 6, 273-278.
- 181) R.C. Santos, J.R. Da S. Maia, A. Abras, C.A.L. Filgueiras, A ^{119}Sn Mössbauer Spectroscopic Investigation of Tin Complexes with Amidines, 2002, *Hyperfine Interact.*, 142, 495-501.
- 182) R.W.J. Wedd, J.R. Sams, A Mössbauer study of adducts of triphenyltin chloride with oxygen-donor substances, 1970, *Can. J. Chem.*, 48, 71-74.

- 183) B.V. Liengme, R.S. Randall, J.R. Sams, Preparation, Mössbauer and Vibrational Spectra of some Penta- and Hexacoordinated Addition Compounds of Dimethyl and Diphenyltin (IV) Dichloride, 1972, *Can. J. Chem.*, 50, 3212-3222.
- 184) J.S. Brooks, R.W. Clarkson, A ^{119}Sn Mössbauer Study of the State of Association of Dibutyltin Dichloride Dispersed in PVC, 1983, *J. Organomet. Chem.*, 243, 411-415.
- 185) J.S Brooks, D.W Allen, J. Unwin, A ^{119}Sn variable-temperature Mössbauer study of tin(IV) chloride and dibutyltin dichloride when dispersed in a poly(vinyl chloride) matrix, 1987, *Appl. Organomet. Chem.*, 1, 319-323.
- 186) D.V. Waterhous, S. Barnes, D.D. Muccio, Nuclear magnetic resonance spectroscopy of bile acids. Development of two-dimensional NMR methods for the elucidation of proton resonance assignments for five common hydroxylated bile acids, and their parent bile acid, 5 β -cholanoic acid, 1985. *J. Lip. Res.*, 26, 1068-1078.
- 187) O.B. Ijare, B.S. Somashekar, Y. Jadegoud, G.A. Nagana Gowda, ^1H and ^{13}C NMR Characterization and Stereochemical Assignments of Bile Acids in Aqueous Media, 2005, *Lipids*, 40 (10), 1031-1041.
- 188) S. Barnes, J.M. Geckle, High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy of bile salts: individual proton assignments for sodium cholate in aqueous solution at 400 MHz, 1982, *J. Lip. Res.*, 23, 161-170.
- 189) N. Jaiswal, A.K. Kushwaha, A.P. Singh, R.K. Dubey, Synthesis, spectroscopic characterization and computational studies of Schiff base complexes of tin(IV) chloride, 2019, *Main Group Met. Chem.*, 42, 28-36.
- 190) H. Masood, S. Ali, M. Mazhar, S. Shahzadi, K. Shahid, ^1H , ^{13}C , ^{119}Sn NMR, Mass, Mössbauer and Biological Studies of Tri-, Di- and Chlorodiorganotin(IV) Carboxylates, 2004, *Turk J. Chem.*, 28, 75-85.

- 191) J. Holecek, M. Nadvornik, K. Handlir, A. Lycka, ^{13}C and ^{119}Sn NMR Study of some Four- and Five- Coordinate Triphenyltin(IV) Compounds, 1983, *J. Organomet. Chem.*, 241, 177-184.
- 192) M. Nadvornik, J. Holecek, K. Handlir, A. Lycka, The ^{13}C and ^{119}Sn NMR spectra of some four- and five-coordinate tri-*n*-butyltin(IV) compounds, 1984, *J. Organomet. Chem.*, 275, 43-51.
- 193) R. Willem, A. Bouhdid, B. Mahieu, L. Ghys, M. Biesemans, E.R.T. Tiekink, D. de Vos, M. Gielen, Synthesis, characterization and *in vitro* antitumour activity of triphenyl- and tri-*n*-butyltin benzoates, phenylacetates and cinnamates, 1997, *J. Organomet. Chem.*, 531, 151-158.
- 194) J. Holecek, M. Nadvornik, K. Handlir, A. Lycka, ^{13}C and ^{119}Sn NMR spectra of di-*n*-butyltin(IV) compounds, 1986, *J. Organomet. Chem.*, 315, 299-308.
- 195) J. Otera, ^{119}Sn chemical shifts in five- and six-coordinate organotin chelates, 1981, *J. Organomet. Chem.*, 221, 57-61.
- 196) J. Otera, A. Kusaba, T. Hinoishi, Studies on ^{119}Sn and ^{207}Pb NMR spectra of seven-coordinate organotin-tin and -lead chelates, 1982, *J. Organomet. Chem.*, 228, 223-228.
- 197) D. Kovala-Demertzi, P. Tauridou, U. Russo, M. Gielen, Adducts of organotin(IV), tin(IV) and tin(II) halides with 1-methylimidazoline-2(3H)-thione (Hmimt) and imidazoline-2(1,3H)-thione (Himt). Synthesis, spectroscopic (IR, Mössbauer and ^1H , ^{13}C , ^{119}Sn NMR) studies and *in vitro* antitumour activity, 1995, *Inorg. Chim. Acta*, 239, 177-183.
- 198) R. Schmiedgen, F. Huber, H. Preut, G. Ruisi, R. Barbieri, Synthesis and Characterization of Diorganotin(IV) Derivatives of 2-Mercaptopyridine and Crystal Structure of Diphenyl Pyridine-2-thiolatochlorotin(IV), 1994, *Appl. Organomet. Chem.*, 8, 397-407.
- 199) F. Huber, R. Schmiedgen, M. Schürmann, R. Barbieri, G. Ruisi, A. Silvestri, Mono-organotin(IV) and Tin(IV) Derivatives of 2-Mercaptopyridine and 2-

- Mercaptopyrimidine: X-ray Structures of Methyl-tris(2-pyridinethiolato)tin(IV) and Phenyl-tris(2-pyridinethiolato)tin(IV)·1.5CHCl₃, 1997, *Appl. Organomet. Chem.*, 11, 869-888.
- 200) B. Axelrod, T.M. Cheesbrough, S. Laakso, Lipoxygenase from Soybeans, EC 1.13.11.12 Linoleate: oxygen oxidoreductase, 1981, *Method Enzymol.*, 71, 441-451.
- 201) M.L. Rojas, V. Montes de Gomez, C.A. Ocampo, Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust., 1993, *Physiol. Mol. Plant. P.*, 43, 209-219.
- 202) R.G. Snodgrass, B. Brüne, Regulation and Functions of 15-Lipoxygenases in Human Macrophages, 2019, *Front. Pharmacol.*, 10, 1-12.
- 203) R. Wisastra, F.J. Dekker, Inflammation, Cancer and Oxidative Lipoxygenase Activity are Intimately Linked, 2014, *Cancers*, 6, 1500-1521.
- 204) V. Sanda Chedea, M. Jisaka, Inhibition of Soybean Lipoxygenases – Structural and Activity Models for the Lipoxygenase Isoenzymes Family, 2011, DOI: 10.5772/17976.
- 205) G.P. Pidgeon, J. Lysaght, S. Krishnamoorthy, J.V. Reynolds, K. O'Byrne, D. Nie, K.V. Honn, Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival, 2007, *Cancer Metastasis Rev.*, 26, 503-524.
- 206) K.A. Youdim, A. Martin, J.A. Joseph, Essential fatty acids and the brain: possible health implications, 2000, *Int. J. Devl. Neuroscience*, 18, 383-399.
- 207) C.N. Banti, A.G. Hatzidimitriou, N. Kourkoumelis, S.K. Hadjikakou, Diclofenac conjugates with biocides through silver(I) ions (CoMeD's); Development of a reliable model for the prediction of anti-proliferation of NSAID's-silver formulations., 2019, *J. Inorg. Biochem.*, 194, 7-18.

- 208) I.I. Ozturk, S. Yasar, C.N. Banti, N. Kourkoumelis, M.P. Chrysouli, M. Manoli, A.J. Tasiopoulos, S.K. Hadjikakou, QSAR studies on antimony(III) halide complexes with N-substituted thiourea derivatives, 2017, *Polyhedron*, 123, 152-161.
- 209) W.-G. Tong, X.-Z. Ding, R.C. Witt, T.E. Adrian, Lipoxygenase Inhibitors Attenuate Growth of Human Pancreatic Cancer Xenografts and Induce Apoptosis through the Mitochondrial Pathway, 2002, *Mol. Cancer Ther.*, 1, 929-935.
- 210) X.-Z. Ding, C.A. Kuszynski, T.H. El-Metwally, T.E. Adrian, Lipoxygenase Inhibition Induced Apoptosis, Morphological Changes, and Carbonic Anhydrase Expression in Human Pancreatic Cancer Cells, 1999, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226, 392-399.
- 211) O. Radmark, O. Werz, D. Steinhilber, B. Samuelsson, 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity, 2007, *Trends Biochem. Sci.* 32(7), 332-341.
- 212) O. Radmark, B. Samuelsson, Regulation of 5-lipoxygenase enzyme activity, 205, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 102-110.
- 213) D. Riendeau, D. Denis, L.Y. Choo, D.J. Nathaniel, Stimulation of 5-lipoxygenase activity under conditions which promote lipid peroxidation, 1989, *Biochem. J.*, 263, 565-572.
- 214) J. Whelan, K. Fritsche, Linoleic acid, 2013, *Adv. Nutr.*, 4, 311-312.
- 215) S.A. Avdiushko, X.S. Ye, D.F. Hildebrand, J. Kuc, Induction of lipoxygenase activity in immunized cucumber plants, 1993, *Physiol. Mol. Plant. P.*, 42, 83-95.
- 216) A. Kunstler, L. Kiraly, M. Pogany, I. Tobias, G. Gullner, Lipoxygenase and Glutathione Peroxidase Activity in Tobacco Leaves Inoculated with Tobacco Mosaic Virus, 2007, *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.*, 42(2), 197-207.
- 217) F. Dimiza, A.N. Papadopoulos, V. Tangoulis, V. Psycharis, C.P. Raptopoulou, D.P. Kessissoglou, G. Psomas, Biological evaluation of non-steroidal anti-inflammatory drugs-cobalt(II) complexes, 2010, *Dalton Trans.*, 39, 4517-4528.

- 218) A.P. Davis, Bile Acid Scaffolds in Supramolecular Chemistry: The Interplay of Design and Synthesis, 2007, *Molecules*, 12, 2106-2122.