



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΙΚΑ ΙΟΝΤΑ ΣΕ ΜΙΑ ΕΝΙΑΙΑ ΟΝΤΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Μαρία Π. Χρυσούλη

Βιολόγος

Msc Γενετική του Ανθρώπου

Msc Ιατρική Χημεία

Επιβλέπων Καθηγητής: **Σωτήριος Κ. Χατζηκακού**
Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ιωάννινα 2021

«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2ος Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Έτος αναγόρευσης: 2021



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΙΚΑ ΙΟΝΤΑ ΣΕ ΜΙΑ ΕΝΙΑΙΑ ΟΝΤΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Μαρία Π. Χρυσούλη

Βιολόγος

Msc Γενετική του Ανθρώπου,

Msc Ιατρική Χημεία

Επιβλέπων Καθηγητής: **Σωτήριος Κ. Χατζηκακού**
Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ιωάννινα 2021

«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2ος Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Έτος αναγόρευσης: 2021

«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: 938^A/9-12-2016

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Δρ. Σ. Κ. Χατζηκακού, Καθηγητής Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μέλη:

Δρ. Ν. Κουρκουμέλης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Δρ. Α. Τασιόπουλος, Καθηγητής Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 9-12-2016

Ημερομηνία Τροποποίησης θέματος: 14-02-2020

Θέμα: «Συνδυασμός αντιβιοτικών με μεταλλικά ιόντα σε μια ενιαία οντότητα για στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου του μαστού»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Συνέλευση: 1038^A/28-5-2021:

- | | |
|-------------------------------------|---|
| 1. Χατζηκακού Σωτήριος | Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| 2. Τασιόπουλος Αναστάσιος | Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου |
| 3. Κουρκουμέλης Νικόλαος | Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| 4. Λέκκα Μαρία -Ελένη | Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| 5. Μιχαηλίδης Θεολόγος | Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| 6. Μητσοπούλου Χριστίνα-Άννα | Καθηγήτρια και Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) |
| 7. Κουτσολέλος Αθανάσιος | Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης |

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 23-06-2021

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Λουλούδη Μαρία, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος

Ξανθή Τουτουνζόγλου

«Τα λάθη που κάνει κάποιος είναι ο δρόμος του για την ανακάλυψη.»

James Joyce

«Εκπαίδευση είναι η βαθμιαία ανακάλυψη της αγνοιάς μας.»

Will Durant

«Η γέννηση της επιστήμης σήμανε το θάνατο της δεισιδαιμονίας.»

Thomas Huxley

«Ο μεγαλύτερος εχθρός της γνώσης δεν είναι η άγνοια, αλλά η ψευδαίσθηση της γνώσης».

Stephen William Hawking

«Κι αν πτωχική την βρεις, η Ιθάκη δεν σε γέλασε.

Έτσι σοφός που έγινες, με τόση πείρα,

ήδη θα το κατάλαβες η Ιθάκες τι σημαίνουν...»

Κωνσταντίνος Π. Καβάφης

Στην οικογένειά μου

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	17
Α' μέρος: Θεωρητικό Υπόβαθρο.....	22
Κεφάλαιο 1: Καρκίνος του μαστού	22
A.1.1 Καρκίνος	22
A.1.2 Βασικά χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων.....	23
A.1.3 Καρκίνος του μαστού.....	40
A.1.3.1 Παράγοντες κινδύνου καρκίνου του μαστού	43
A.1.3.2 Ιστολογικοί Υπότυποι	45
1.3.3 Μοριακοί Υπότυποι	47
A.1.3.4 Σταδιοποίηση	49
A.1.3.5 Διάγνωση.....	52
A.1.3.6 Θεραπεία	54
1.3.7 Οιστρογόνα και οιστρογονικοί υποδοχείς στον καρκίνο του μαστού	65
A.1.4 Καρκινικές σειρές	68
Κεφάλαιο 2: Αντιβιοτικά	70
A.2.1 Ορισμός.....	70
A.2.2 Τρόπος δράσης αντιβιοτικών	71
A.2.3 Κατηγοριοποίηση αντιβιοτικών	74
A.2.4 Σιπροφλοξασίνη	74
A.2.4.1 Τρόπος δράσης σιπροφλοξασίνης.....	76
A.2.5 Ανθεκτικότητα βακτηρίων στα αντιβιοτικά.....	77
A.2.5.1 Ανθεκτικότητα βακτηρίων στη σιπροφλοξασίνη.....	79
A.2.4 Αντικαρκινική δράση σιπροφλοξασίνης.....	79
Κεφάλαιο 3: Οργανοκασσιτελικές ενώσεις	81
A.3.1 Κασσίτερος.....	81
A.3.2 Οργανοκασσιτελικές ενώσεις	82
A.3.3 Βιολογική δράση οργανοκασσιτελικών ενώσεων	84
A.3.3.1 Αντικαρκινική δράση οργανοκασσιτελικών ενώσεων.....	87
A.3.3.2 Αντιμικροβιακή δράση οργανοκασσιτελικών ενώσεων	91
Κεφάλαιο 4: Μικκύλια.....	94
A.4.1 Μικκυλιακοί φορείς φαρμάκων	94
A.4.2 Κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση	96

A.4.3 Τεχνικές παρασκευής μικκυλίων	98
A.4.4 Μικκύλια με επιφανειοδραστικές ενώσεις.....	99
Κεφάλαιο 5: Μικροβίωμα και Καρκίνος	103
A.5.1 Μικροβίωμα και καρκινογένεση.....	103
A.5.2 Μηχανισμοί καρκινογένεσης μικροβίων	104
A.5.3 Καρκίνος του μαστού και μικροβίωμα	106
A.5.4 Πιθανές μελλοντικές θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	108
B' μέρος: Σκοπός.....	112
Γ' μέρος: Υλικά και Μέθοδοι.....	116
Γ.1 Υλικά	116
Γ.2 Μέθοδοι Χαρακτηρισμού	117
Γ.2.1 Σημείο τήξεως.....	117
Γ.2.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR	117
Γ.2.3 Μελέτη περίθλασης ακτίνων X (X-ray Diffraction - XRD).....	117
Γ.2.4 Ανάλυση Περίθλασης ακτίνων X κόνεως (X-ray powder diffraction - XRPD)	117
Γ.2.5 Φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (X-ray Fluorescence Spectroscopy - XRF)	118
Γ.2.6 Φασματοσκοπία Mössbauer	118
Γ.2.7 Θερμική Ανάλυση TG-DTA (Thermogravimetry – Differential Thermal Analysis)	118
Γ.2.8 Διαλυτότητα.....	118
Γ.2.9 Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).....	119
Γ.2.10 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance - NMR)	119
Γ.2.11 Φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού παγίδας ιόντων (Electrospray Ionization Mass Spectrometry - ESI-MS ion trap)	119
Γ.3 Μέθοδος εύρεσης κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης (CMC)	119
Γ.4 Σύνθεση	120
Γ.4.1 Σύνθεση και κρυστάλλωση $\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{CIP})_2$ (CIPTIN).....	120
Γ.4.2 Σύνθεση SLS@CIPTIN	120
Γ.4.3 Σύνθεση CTAB@CIPTIN	121
Γ.4.4 Σύνθεση SLS@DPTD	121
Γ.4.5 Σύνθεση CTAB@DPTD.....	122
Γ.5 Κυτταρικές μελέτες	123
Γ.5.1 Κρυοσυντήρηση κυτταρικών σειρών	123
Γ.5.2 Κυτταρικές καλλιέργειες	124
Γ.5.3 <i>In vitro</i> μελέτη κυτταροτοξικότητας (SRB assay)	124

Γ.5.4 <i>In vivo</i> μελέτη τοξικότητας (Μοντέλο <i>Artemia Salina</i>)	126
Γ.5.5 <i>In vitro</i> μελέτη γονοτοξικότητας (Micronucleus assay).....	127
Γ.5.6 <i>In vivo</i> μελέτη γονοτοξικότητας (Μοντέλο <i>Allium cepa</i>).....	128
Γ.5.7 Μελέτη κυτταρικής μορφολογίας.....	130
Γ.5.8 Μελέτη κατακερματισμού του πυρηνικού DNA.....	130
Γ.5.9 Μελέτη του κυτταρικού κύκλου	131
Γ.5.10 Μελέτη διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης	132
Γ.6 Αντιμικροβιακές μελέτες.....	132
Γ.6.1 Βακτηριακά στελέχη.....	132
Γ.6.2 Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC)	133
Γ.6.3 Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης (MBC).....	134
Γ.6.4 Προσδιορισμός ζωνών αναστολής (IZs)	134
Γ.6.5 Επίδραση στο σχηματισμό βακτηριακού βιοφίλμ	134
Γ.7 Μοριακός μηχανισμός δράσης	135
Γ.7.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης με το DNA.....	135
Δ.1 Σύνθεση	138
Δ.1.1 Σύνθεση και κρυστάλλωση $\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{CIP})_2$ (CIPTIN).....	138
Δ.1.2 Σύνθεση μικκυλίων και προσδιορισμός CMC	139
Δ.2 Χαρακτηρισμός	146
Δ.2.1 Μελέτη περίθλασης ακτίνων X (X-ray Diffraction - XRD)	146
Δ.2.3 Φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (X-ray Fluorescence Spectroscopy - XRF)	151
Δ.2.2 Ανάλυση Περίθλασης ακτίνων X κόνεως (X-ray powder diffraction - XRPD)	152
Δ.2.4 Φασματοσκοπία υπέρυθρου FT-IR	153
Δ.2.5 Φασματοσκοπία ^{119}Sn Mössbauer	159
Δ.2.6 Θερμοβαρυμετρική ανάλυση (Thermo Gravimetric Analysis).....	163
Δ.2.6.1 Θερμική ανάλυση (Thermal Decomposition – TG / DTA).....	163
Δ.2.6.2 Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry - DSC) ..	167
Δ.2.7 Διαλυτότητα	171
Δ.2.8 Μελέτες σταθερότητας.....	171
Δ.2.9 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance - NMR)	175
Δ.2.10 Φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization Mass Spectrometry - ESI-MS)	180
Δ.3 Κυτταρικές μελέτες	181
Δ.3.1 Μελέτη αντιπολλαπλασιαστικής δράσης (SRB assay)	181

Δ.3.2 <i>In vitro</i> μελέτη κυτταροτοξικότητας	184
Δ.3.3 <i>In vivo</i> μελέτη τοξικότητας (Μοντέλο <i>Artemia Salina</i>)	186
Δ.3.4 <i>In vitro</i> μελέτη γονοτοξικότητας (Micronucleus assay).....	188
Δ.3.5 <i>In vivo</i> μελέτη γονοτοξικότητας (Μοντέλο <i>Allium cepa</i>)	195
Δ.3.6 Μελέτη κυτταρικής μορφολογίας.....	208
Δ.3.7 Μελέτη κατακερματισμού του πυρηνικού DNA.....	211
Δ.3.8 Μελέτη του κυτταρικού κύκλου.....	213
Δ.3.9 Μελέτη διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης	218
Δ.4 Αντιμικροβιακές μελέτες.....	219
Δ.4.1 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC).....	219
Δ.4.2 Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης (MBC).....	229
Δ.4.3 Προσδιορισμός ζωνών αναστολής (IZs)	238
Δ.4.4 Επίδραση στο σχηματισμό βακτηριακού βιοφίλμ.....	247
Δ.5 Μοριακός μηχανισμός δράσης	254
Δ.5.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης με το DNA.....	254
Δ.6 Συσχετίσεις αντικαρκινικής και αντιμικροβιακής δράσης	261
Ε' μέρος: Συμπεράσματα.....	272
Ζ' μέρος: Περίληψη.....	284
Abstract.....	287
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	289
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	327

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιολογικής Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη και την καθοδήγηση του κ. Χατζηκακού Σωτήριου, Καθηγητή Ανόργανης Χημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων με προσωπική υποτροφία από το Ίδρυμα Κρατικών υποτροφιών (ΙΚΥ).

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου κ. Σωτήριο Χατζηκακού, για την καθημερινή επιστημονική καθοδήγηση του, την υποστήριξη του, καθώς επίσης και για την αδιάλειπτη διαθεσιμότητά του κατά τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής μου. Τον ευχαριστώ επίσης για την ενθάρρυνση, την έμπνευση και την εμπιστοσύνη του καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών μέχρι και σήμερα και φυσικά για την παραχώρηση της ερευνητικής υποδομής και των αναλωσίμων του εργαστηρίου Βιολογικής Ανόργανης Χημείας, διότι χωρίς αυτήν δεν θα ήταν δυνατή η πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους της διδακτορικής μου διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Νικόλαο Κουρκουμέλη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, και τον κ. Αναστάσιο Τασιόπουλο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου, για τις πολύτιμες επισημάνσεις και επιστημονικές συμβουλές τους κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής. Επίσης, τον κ. Κουρκουμέλη τον ευχαριστώ και για την λήψη των φασμάτων ανάλυσης περίθλασης ακτίνων Χ (XRPD) και τον κ. Τασιόπουλο και την ερευνητική του ομάδα για τις μελέτες περίθλασης ακτίνων Χ (XRD).

Ευχαριστώ θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής την κα. Μαρία-Ελένη Λέκκα, Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, την κα. Χριστίνα-Άννα Μητσοπούλου, Καθηγήτρια και Πρόεδρο του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, τον κ. Αθανάσιο Κουτσολέλο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης και τον κ. Θεολόγο Μιχαηλίδη, Αναπληρωτή Καθηγητή του

Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τον χρόνο που δαπάνησαν για την εξέταση της διδακτορικής μου διατριβής, καθώς και για τις πολύτιμες επιστημονικές τους παρατηρήσεις.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αντώνιο Χατζηδημητρίου Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για τις μελέτες περίθλασης ακτίνων Χ (XRD), την κα Χριστίνα Παπαχριστοδούλου μέλος ΕΔΙΠ του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη λήψη των φασμάτων φθορισμού ακτίνων Χ (XRF), τον κ. Αλέξιο Δούβαλη Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον κ. Θωμά Μπάκα Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη λήψη των φασμάτων Mössbauer, τον κ. Τιβέριο Βαϊμάκη για τις μελέτες Θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (TG / DTA- DSC) και τον κ. Γεώργιο Βαρβούνη Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη λήψη των φασμάτων μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS). Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Μονάδα Περιβαλλοντικής, Οργανικής και Βιοχημικής Ανάλυσης Υψηλής Ευκρίνειας ORBITRAP-LC-MS του Δικτύου Εργαστηρίων Υποστήριξης Έρευνας (Δ.Ε.Υ.Ε.Π.Ι.), τη Μονάδα Ανάλυσης και Ελέγχου Βιοδραστικών Ενώσεων και Φυσικών Προϊόντων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, καθώς και το δίκτυο OPENSREEN-GR για την πρόσβαση στις εγκαταστάσεις του.

Οφείλω και επιθυμώ να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Χριστίνα Μπαντή, Μεταδιδάκτορα του Εργαστηρίου Βιολογικής Ανόργανης Χημείας και Διδάσκουσα Βιολογίας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την πολύτιμη και καθημερινή καθοδήγηση της, την εκπαίδευση που μου παρείχε στις τεχνικές του εργαστηρίου και για τον χρόνο που μου αφιέρωσε και τις συμβουλές της, σε όλη την διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου στο εργαστήριο Βιολογικής Ανόργανης Χημείας.

Οφείλω επίσης θερμές ευχαριστίες στο Ίδρυμα Κρατικών υποτροφιών, για την προσωπική οικονομική ενίσχυση, μέσω της υποτροφίας «ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ»- 2ΟΣ ΚΥΚΛΟΣ»

(MIS-5000432), που μου χορηγήθηκε, με τη συγχρηματοδότηση της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους «στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση» (ΕΣΠΑ 2014-2020) – στο πεδίο των Φυσικών Επιστημών.

Ευχαριστώ επίσης και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Βιολογικής Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας που είχα την τύχη να συναντήσω αυτά τα 5 χρόνια,. Τους ευχαριστώ για την άψογη συνεργασία, τη φιλία τους, την υποστήριξή τους και για τις αγωνίες που μοιραστήκαμε.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο, βαθύ και θερμό ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου για την ανιδιοτελή αγάπη τους και την ηθική και υλική συμπαράστασή τους σε όλη τη διάρκεια της ζωής μου. Ευχαριστώ τους γονείς μου, Παναγιώτη και Ευαγγελία, που με «προίκισαν» με αξίες και στόχους και με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα. Ευχαριστώ την αδερφή μου Μιχαέλα για την αδιαπραγμάτευτη αγάπη της, την ενθάρρυνσή της και για την αμέριστη υποστήριξή της από τα μαθητικά μου χρόνια μέχρι σήμερα. Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τα δύο γελαστά προσωπάκια, τον Γιώργο και τον Παναγιώτη, που γεμίζουν τη ζωή μου με χαρά και αισιοδοξία, καθώς και για την αγάπη που μου προσφέρουν απλόχερα.



Α' ΜΕΡΟΣ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

Α' μέρος: Θεωρητικό Υπόβαθρο

Κεφάλαιο 1: Καρκίνος του μαστού

A.1.1 Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες. Οι στατιστικές δείχνουν ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες (Siegel et al, 2015). Συνήθως προσβάλλει ανθρώπους μεγάλης ηλικίας, υπάρχουν όμως και μορφές καρκίνου που εμφανίζονται σε νεαρής ηλικίας άτομα, ακόμη και σε παιδιά (Ferlay et al, 2012). Ο όρος «καρκίνος» δεν αποδίδεται σε μία και μόνο ασθένεια, αλλά σε μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα στο σώμα μας, τα οποία αυξάνονται διαιρούνται και πεθαίνουν με έναν αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο, τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν διότι συνεχίζουν να διαιρούνται ανεξέλεγκτα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας μάζας κυττάρων, που ονομάζεται όγκος. Οι όγκοι μπορεί να είναι καλοήθεις ή κακοήθεις.

Οι καλοήθεις όγκοι, των οποίων τα κύτταρα περιβάλλονται από συνδετικό ιστό, δεν είναι επεκτατικοί, δηλαδή δεν εισβάλλουν στους γύρω ιστούς και δεν εξαπλώνονται σε άλλα σημεία του σώματος. Γενικά, δεν προκαλούν σοβαρή βλάβη στο σώμα, εκτός εάν λόγω του μεγέθους τους ασκούν πίεση σε ζωτικά όργανα. Αντίθετα, στους κακοήθεις όγκους τα κύτταρα εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία σε σχέση με τα φυσιολογικά, εισβάλλουν στους γειτονικούς ιστούς, ενώ μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή της λέμφου είναι δυνατόν να μεταφερθούν σε άλλα σημεία του σώματος και να σχηματίσουν δευτερογενείς όγκους.

Κάθε καρκίνος (π.χ. καρκίνος του πνεύμονα, της μήτρας, του προστάτη κτλ.) έχει διαφορετικά συμπτώματα, διαφορετική εξέλιξη και επομένως αποτελεί διαφορετική ασθένεια. Οι καρκίνοι του αίματος ονομάζονται λευχαιμίες και λεμφώματα. Τα προβλήματα υγείας που

προκαλούνται στο άτομο εξαρτώνται από το μέγεθος του όγκου, από τη θέση του στο σώμα, από το στάδιο ανάπτυξής του, από το αν έχει εισβάλει στους γειτονικούς ιστούς και σε ποια έκταση, και από το αν έχει υπάρξει μετάσταση.

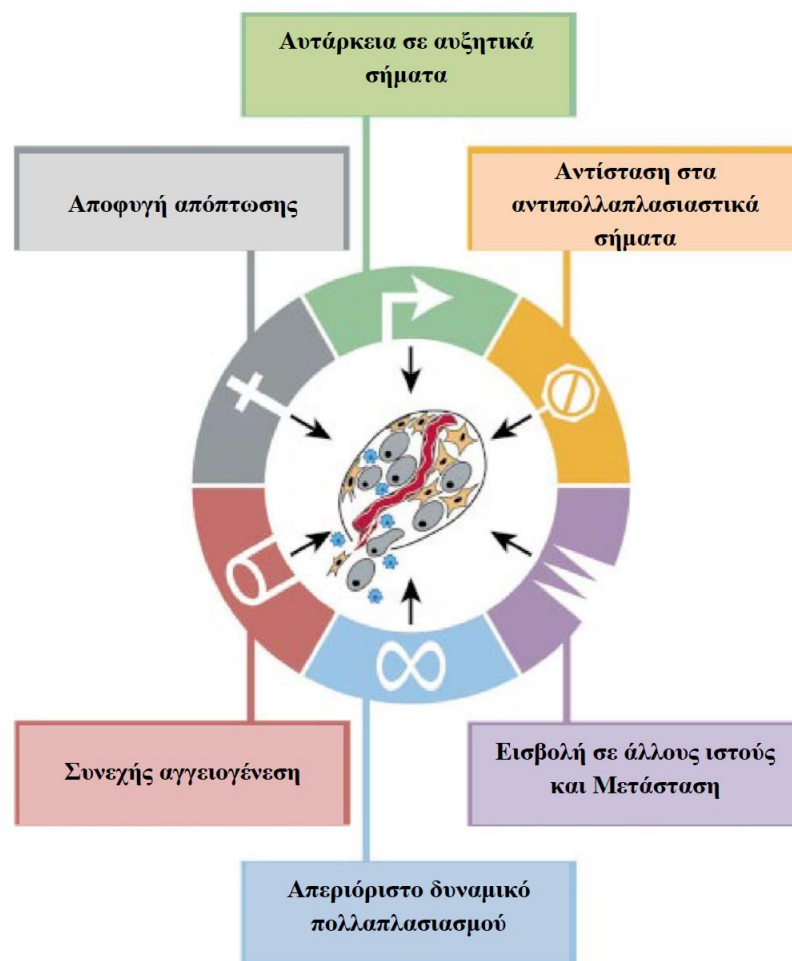
A.1.2 Βασικά χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων

Σήμερα είναι γνωστό ότι η καρκινογένεση στους ανθρώπους είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων και ότι τα βήματα αυτά αντικατοπτρίζουν γενετικές αλλοιώσεις που οδηγούν στον προοδευτικό μετασχηματισμό των φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων σε εξαιρετικά κακοήγη παράγωγά τους. Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, σε διαφορετικές θέσεις και όργανα στο ανθρώπινο σώμα, έχουν αποδείξει ότι οι βλάβες φαίνεται να προκύπτουν μέσω μιας διαδικασίας που αποτελείται από πολλά ενδιάμεσα στάδια, κατά την οποία τα κύτταρα εξελίσσονται προοδευτικά από την ομαλότητα σε επεμβατικούς καρκίνους (Foulds, 1954).

Είναι επίσης γνωστό ότι το γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων έχει υποστεί αλλαγές σε πολλαπλές θέσεις και οι βλάβες μπορεί να είναι από μικρές σημειακές μεταλλάξεις, μέχρι και πολύ εκτεταμένες όπως οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις (Kinzler and Vogelstein, 1996). Ο μετασχηματισμός καλλιεργημένων κυττάρων εργαστηριακά είναι μία διαδικασία πολλαπλών σταδίων. Για παράδειγμα, τα κύτταρα τρωκτικών απαιτούν τουλάχιστον δύο εισαγόμενες γενετικές αλλαγές πριν γίνουν καρκινικά, ενώ τα αντίστοιχα ανθρώπινα είναι πιο δύσκολο να μετασχηματιστούν (Hahn et al., 1999). Συνολικά, οι πειραματικές παρατηρήσεις σε ανθρώπινα και ζωικά μοντέλα, αποδεικνύουν ότι η ανάπτυξη των όγκων προχωρά μέσω μιας διαδικασίας ανάλογης με την εξελικτική θεωρία του Δαρβίνου, κατά την οποία μια διαδοχή γενετικών αλλαγών, η καθεμία από τις οποίες παρέχει ένα πλεονέκτημα ανάπτυξης ή επιβίωσης, οδηγεί στην προοδευτική μετατροπή των φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα (Nowell, 1976).

Οι Hanahan and Weinberg το 2000 πρότειναν ότι υπάρχουν έξι χαρακτηριστικά που εμφανίζουν τα καρκινικά κύτταρα και μοιράζονται από κοινού, οι περισσότεροι, αν όχι όλοι, οι τύποι ανθρώπινων όγκων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Τα χαρακτηριστικά αυτά οδηγούν σε

αλλαγές στην φυσιολογία των κυττάρων και περιλαμβάνουν την αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα, την αντίσταση στα αποπτωτικά σήματα, την αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), το απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού, την παρατεταμένη αγγειογένεση και την εισβολή σε άλλους ιστούς, καθώς και τη μετάσταση (Εικόνα 1) (Hanahan and Weinberg, 2000).



Εικόνα 1: Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων (τροποποίηση από: Hanahan and Weinberg, 2000)

(α) Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα

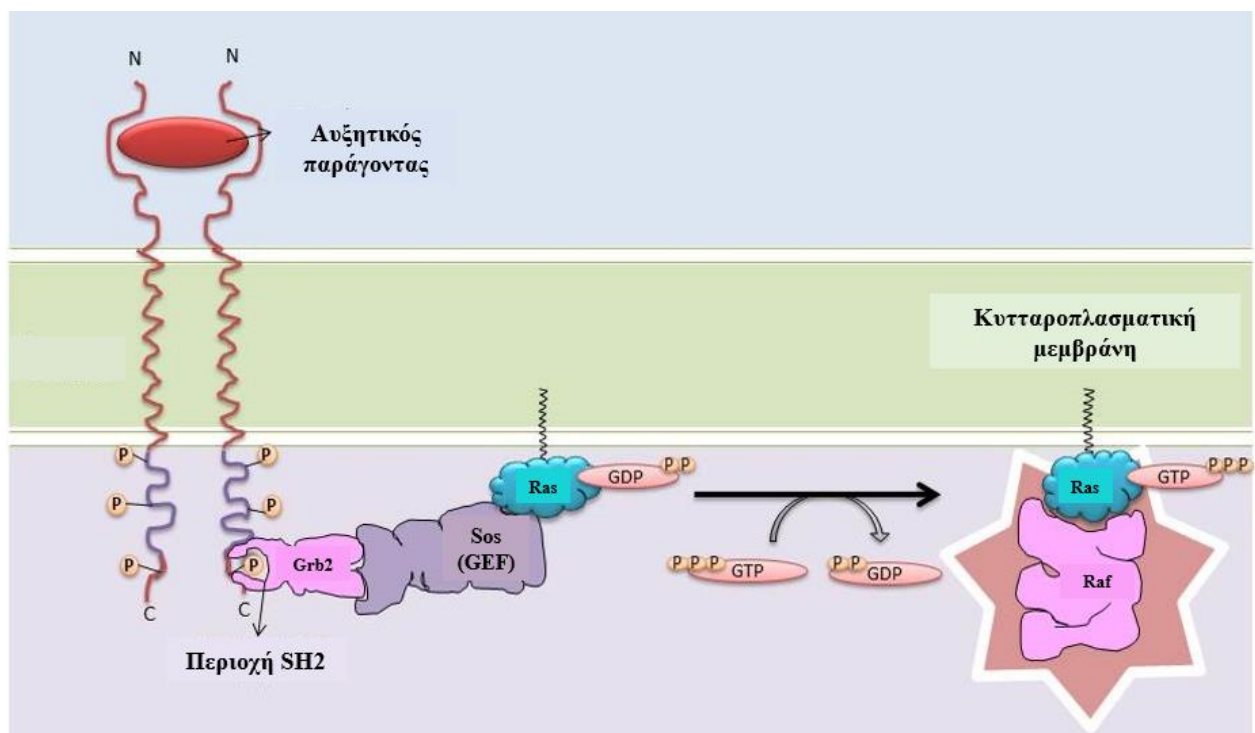
Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα κύτταρα απαιτούν μιτογόνα σήματα ανάπτυξης (Growth Signals - GS) για να μπορέσουν να μεταβούν από την ηρεμία σε μια ενεργή κατάσταση πολλαπλασιασμού. Η μεταγωγή των σημάτων ανάπτυξης στο κύτταρο πραγματοποιείται από

διαμεμβρανικούς υποδοχείς που δεσμεύουν ποικίλα μόρια κυτταρικής σηματοδότησης όπως αυξητικούς παράγοντες (Growth Factors - GF), συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας και μόρια εξωκυτταρικής προσκόλλησης / αλληλεπίδρασης μεταξύ των κυττάρων. Κανένας τύπος φυσιολογικού κυττάρου δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί απουσία τέτοιων διεγερτικών σημάτων, ενώ πολλά από τα ογκογονίδια δρουν καθώς μιμούνται τη φυσιολογική σηματοδότηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Η εξάρτηση της ανάπτυξης των κυττάρων από τη σηματοδότηση είναι εμφανής κατά τον πολλαπλασιασμό φυσιολογικών κυττάρων σε καλλιέργεια, τα οποία πολλαπλασιάζονται μόνο όταν παρέχονται οι κατάλληλοι μιτογόνοι παράγοντες και τα κατάλληλα υποστρώματα - συνδέτες ιντεγκρινών. Αντιθέτως, τα καρκινικά κύτταρα, παρουσιάζουν μειωμένη εξάρτηση από την εξωγενή διέγερση της κυτταρικής ανάπτυξης. Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν πολλά από τα δικά τους σήματα κυτταρικής ανάπτυξης, μειώνοντας έτσι την εξάρτησή τους από τη διέγερση του φυσιολογικού μικροπεριβάλλοντος του ιστού και με αυτό τον τρόπο διαταράσσεται ένας εξαιρετικά σημαντικός μηχανισμός ομοιόστασης που εξασφαλίζει τον ομαλό πολλαπλασιασμό των διαφόρων κυτταρικών τύπων εντός του ιστού.

Οι υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας που μετάγουν σήματα κυτταρικής ανάπτυξης στο εσωτερικό των κυττάρων και μπορεί να αποτελέσουν οι ίδιοι στόχους απορρύθμισης κατά την παθογένεση των όγκων. Οι υποδοχείς GF, που συνήθως έχουν δράση τυροσινικής κινάσης στις κυτταροπλασματικές τους περιοχές, υπερεκφράζονται σε πολλούς καρκίνους. Η υπερέκφραση των υποδοχέων μπορεί να οδηγήσει σε υπερευαισθησία των καρκινικών κυττάρων έναντι χαμηλών επιπέδων GF, που κανονικά δεν θα προκαλούσαν πολλαπλασιασμό. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι ο επιδερμικός υποδοχέας GF (EGF-R/erbB) είναι απορρυθμισμένος σε όγκους του στομάχου, του εγκεφάλου και του μαστού, ενώ ο υποδοχέας HER2/neu υπερεκφράζεται σε καρκινώματα του στομάχου και των μαστών (Slamon et al, 1987). Επιπλέον, δομικές αλλαγές σε περιοχές των υποδοχέων μπορεί να οδηγήσουν σε σηματοδοτήσεις ανεξάρτητες από την σύνδεση του προσδέματος (DiFiore et al., 1987).

Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν επίσης να αλλάξουν τους τύπους των υποδοχέων εξωκυτταρικής μήτρας (ιντεγκρίνες) που εκφράζουν, αυξάνοντας αυτούς που μεταδίδουν σήματα κυτταρικής αύξησης. Οι ιντεγκρίνες είναι διλειειτουργικοί, ετεροδιμερείς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας που συνδέουν φυσιολογικά τα κύτταρα με εξωκυτταρικές υπερδομές γνωστές ως εξωκυττάρια μήτρα (ECM). Η δέσμευση σε συγκεκριμένα τμήματα της ECM επιτρέπει στους υποδοχείς ιντεγκρίνης να μεταφέρουν σήματα στο κυτταρόπλασμα, τα οποία επηρεάζουν τη συμπεριφορά των κυττάρων και μπορούν να τα οδηγήσουν από την κατάσταση ηρεμίας (quiescence) μέχρι και στην αντίσταση στην απόπτωση και την είσοδο τους στον κυτταρικό κύκλο. Αντίθετα, η αποτυχία δέσμευσης των ιντεγκρινών με τα μόρια της ECM, μπορεί να επηρεάσει την κινητικότητα των κυττάρων, να προκαλέσει απόπτωση ή στάση του κυτταρικού κύκλου (Giancotti and Ruoslahti, 1999).



Εικόνα 2: Το σηματοδοτικό μονοπάτι SOS-Ras-Raf-MAPK (τροποποίηση από:

http://namrataheda.blogspot.com/2013/03/the-signal-transduction-pathway-map_12.html)

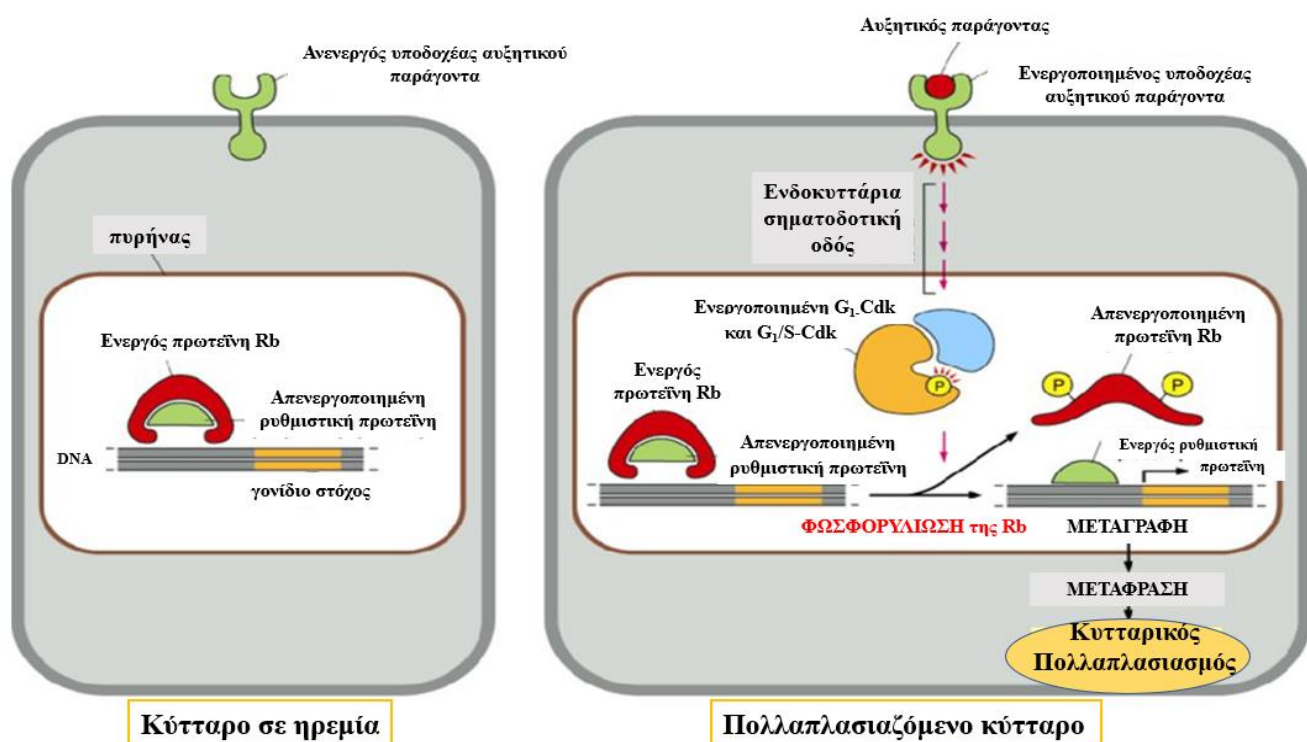
Η αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα των καρκινικών κυττάρων, προέρχεται κυρίως από αλλαγές σε μόρια που λαμβάνουν και επεξεργάζονται τα σήματα στα κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Ένα παράδειγμα είναι το μονοπάτι SOS-Ras-Raf-MAPK που αποτελεί μονοπάτι υποδοχέων κινάσης τυροσίνης και εμπλέκεται στην επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (**Εικόνα 2**). Έχει βρεθεί ότι σε ένα μεγάλο ποσοστό (περίπου 25%) όλων των ανθρώπινων όγκων, οι πρωτεΐνες Ras εντοπίζονται σε δομικά μεταλλαγμένες μορφές, που τους επιτρέπουν να απελευθερώνουν μια ροή μιτογόνων σημάτων στα κύτταρα, χωρίς όμως να υπάρχει η αντίστοιχη διέγερση από τους κανονικούς ενεργοποιητές τους. Η μεταλλαγμένη Ras είναι υπερ-ενεργοποιημένη και επάγει υπερβολικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων και συνεπώς προωθεί την καρκινογένεση. Έρευνες έχουν δείξει ότι στα ανθρώπινα καρκινώματα του παχέος εντέρου, περίπου οι μισοί όγκοι φέρουν μεταλλαγμένα ογκογονίδια ras (Medema and Bos, 1993).

(β) Αντίσταση στα αντιπολλαπλασιαστικά σήματα

Μέσα σε έναν φυσιολογικό ιστό, πολλαπλά αντιπολλαπλασιαστικά σήματα είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της κυτταρικής ηρεμίας και της ομοιόστασης του ιστού. Αυτά τα σήματα περιλαμβάνουν τόσο διαλυτούς αναστολείς αύξησης όσο και ακινητοποιημένους αναστολείς ενσωματωμένους στην ECM και στις επιφάνειες των γειτονικών κυττάρων. Αυτά τα ανασταλτικά για την ανάπτυξη σήματα, δρουν σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας που συνδέονται στη συνέχεια με μονοπάτια ενδοκυτταρικής σηματοδότησης.

Τα σήματα αναστολής της αύξησης μπορούν να εμποδίσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς. Τα κύτταρα μπορεί να εξαναγκαστούν να βγουν από τον κυτταρικό κύκλο και να παραμείνουν σε κατάσταση ηρεμίας (G0) μέχρι να ξαναμπούν μελλοντικά, όταν το επιτρέπουν τα εξωκυττάρια σήματα. Εναλλακτικά, τα κύτταρα μπορεί να αναγκαστούν να εγκαταλείψουν μόνιμα την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα και να οδηγηθούν σε μετα-μιτωτικές καταστάσεις, που συνήθως σχετίζονται με την απόκτηση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών (διαφοροποίηση).

Τα αρχικά καρκινικά κύτταρα πρέπει να αποφύγουν αυτά τα αντιπολλαπλασιαστικά σήματα για να επιβιώσουν. Τα φυσιολογικά κύτταρα κατά τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου «παρακολουθούν» το εξωτερικό περιβάλλον τους κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου και με βάση τα κυτταρικά σήματα αποφασίζουν εάν θα πολλαπλασιαστούν ή θα μουν σε φάση ηρεμίας ή εάν θα εισέλθουν σε μετα-μιτωτική κατάσταση. Σε μοριακό επίπεδο πολλά, αν όχι όλα, αντιπολλαπλασιαστικά σήματα διοχετεύονται μέσω της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb) και των δύο συγγενών πρωτεϊνών p107 και p130 (Weinberg, 1995). Όταν βρίσκεται σε υποφωσφορυλιωμένη μορφή, η pRb αποκλείει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω απομόνωσης και αλλαγής της λειτουργίας των παραγόντων μεταγραφής E2F που ελέγχουν την έκφραση γονιδίων απαραίτητων για την μετάβαση του κυττάρου από την φάση G1 στη φάση S (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb)

Κατά την διακοπή του μονοπατιού pRb, οι μεταγραφικοί παράγοντες E2F απελευθερώνονται και έτσι επιτρέπεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός καθιστώντας τα κύτταρα μη ευαίσθητα στα αντιπολλαπλασιαστικά σήματα που υπό φυσιολογικές συνθήκες λειτουργούν κατά μήκος αυτού του

μονοπατιού για να εμποδίσουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (παραμονή στη φάση G1). Ένα πολύ καλά μελετημένο μόριο είναι ο αυξητικός παράγοντας TGFb, ο οποίος δρα με πολλούς τρόπους έτσι ώστε να προλαμβάνει την φωσφορυλίωση που απενεργοποιεί την pRb. Σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους, ο TGFb καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου c-myc, το οποίο ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο (Moses et al., 1990) και μπορεί να πυροδοτεί τη σύνθεση των πρωτεϊνών p15^{INK4B} και p21, οι οποίες εμποδίζουν τον σχηματισμό των συμπλόκων κυκλίνης-CDK που είναι υπεύθυνα για την φωσφορυλίωση της pRb (Datto et al., 1997).

Το μονοπάτι σηματοδότησης της pRb, μπορεί να διαταραχθεί, από παράγοντες όπως ο TGFb, με ποικίλους τρόπους σε διαφόρους τύπους ανθρώπινων όγκων (Fynan and Reiss, 1993). Έρευνες έχουν αποκαλύψει ότι μερικοί ανθρώπινοι όγκοι δεν ανταποκρίνονται στον TGFb λόγω της μειорύθμισης των υποδοχέων του (downregulation), ενώ άλλοι εμφανίζουν μεταλλαγμένους δυσλειτουργικούς υποδοχείς (Markowitz et al., 1995). Η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Smad4, η οποία μεταδίδει σήματα από υποδοχείς TGFb σε καθοδικούς στόχους, μπορεί να εξαλειφθεί μέσω μετάλλαξης του κωδικοποιητικού γονιδίου της και ο γενετικός τόπος που κωδικοποιεί p15^{INK4B} μπορεί να διαγραφεί (Chin et al., 1998).

Εναλλακτικά, ο άμεσος επόμενος στόχος των δράσεων του, η CDK4, μπορεί να μην ανταποκρίνεται στις ανασταλτικές δράσεις του p15^{INK4B} λόγω μεταλλάξεων που δημιουργούνται από υποκαταστάσεις αμινοξέων στην περιοχή αλληλεπίδρασης INK4A/B. Σε αυτή την περίπτωση, τα προκύπτοντα σύμπλοκα κυκλίνης D:CDK4, μπορούν ελεύθερα να απενεργοποιήσουν το pRb με υπερφωσφορυλίωση (Zuo et al., 1996). Τέλος, η ίδια η pRb, ο τελικός στόχος αυτού του μονοπατιού, μπορεί να χάσει τη λειτουργικότητά της λόγω μετάλλαξης του γονιδίου της. Ωστόσο, σε ορισμένους όγκους που προκαλούνται από DNA ιούς, ιδίως σε καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας, η λειτουργία της pRb χάνεται λόγω της δέσμευσης της από ιογενείς ογκοπρωτεΐνες, όπως η E7 ογκοπρωτεΐνη του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (Dyson et al., 1989).

Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν επίσης να απενεργοποιήσουν την έκφραση ιντεγκρινών και άλλων κυτταρικών μορίων προσκόλλησης που στέλνουν αντιπολλαπλασιαστικά σήματα, ευνοώντας

εκείνα που μεταφέρουν σήματα αύξησης. Αυτά τα αντιπολλαπλασιαστικά σήματα πιθανώς να εμπλέκονται και στο κύκλωμα pRb. Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι ο αντιπολλαπλασιαστικός καταρράκτης της Rb και ο έλεγχος του κύκλου της κυτταρικής διαίρεσης, με τον ένα ή τον άλλο τρόπο, διακόπτεται στην πλειοψηφία των καρκίνων στον άνθρωπο, τονίζοντας την αξία της καταστολής των καρκινικών όγκων.

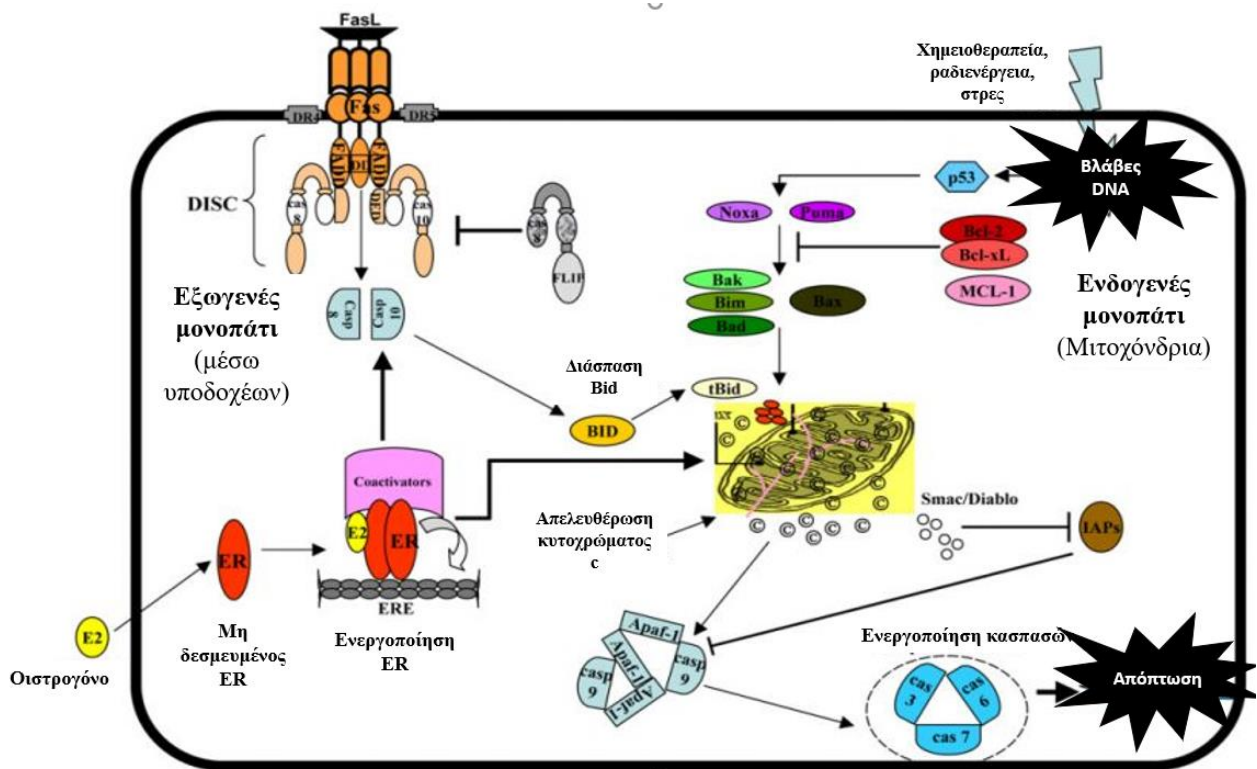
(γ) Αποφυγή απόπτωσης

Η ικανότητα των καρκινικών κυτταρικών πληθυσμών να αυξάνονται σε αριθμό καθορίζεται όχι μόνο από τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αλλά και από τον ρυθμό καταστροφής των κυττάρων. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος - απόπτωση - αντιπροσωπεύει μια σημαντική πτυχή αυτής της κυτταρικής ικανότητας (**Εικόνα 4**). Όλο και περισσότερες μελέτες σε μοντέλα ποντικών, σε κυτταρικές καλλιέργειες, καθώς και περιγραφικές μελέτες σε ανθρώπινα δείγματα βιοψίας αποδεικνύουν ότι η αντίσταση στην απόπτωση, είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των περισσότερων, αν όχι όλων, των τύπων καρκίνου.

Τα αποτελέσματα των πειραματικών παρατηρήσεων την τελευταία δεκαετία αποδεικνύουν ότι το «αποπτωτικό πρόγραμμα» υπάρχει σε λανθάνουσα μορφή σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους σε όλο το σώμα και μόλις ενεργοποιηθεί από μια ποικιλία φυσιολογικών σημάτων, εξελίσσεται μια πολύ συγκεκριμένη σειρά βημάτων. Οι κυτταρικές μεμβράνες διαταράσσονται, οι κυτταροπλασματικοί και οι πυρηνικοί σκελετοί αποδομούνται, τα χρωμοσώματα καταστρέφονται και ο πυρήνας κατακερματίζεται, σε χρονικό διάστημα 30-120 λεπτών. Στο τέλος, τα κυτταρικά θραύσματα απομακρύνονται από γειτονικά κύτταρα του ίδιου ιστού και τα υπολείμματα εξαφανίζονται συνήθως εντός 24 ωρών (Wyllie et al., 1980).

Τα συστατικά του αποπτωτικού μηχανισμού μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες: στους αισθητήρες (sensors) και στους τελεστές (effectors). Οι αισθητήρες είναι υπεύθυνοι για την παρακολούθηση των συνθηκών του εξωκυττάριου και του ενδοκυττάριου περιβάλλοντος, που καθορίζουν το εάν ένα κύτταρο πρέπει να ζήσει ή να πεθάνει. Αυτά τα σήματα ρυθμίζουν τη δεύτερη κατηγορία συστατικών, τα οποία λειτουργούν ως τελεστές του αποπτωτικού θανάτου. Οι ρυθμιστές

της απόπτωσης περιλαμβάνουν υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια που δεσμεύουν παράγοντες επιβίωσης (survival factors) ή παράγοντες θανάτου (death factors). Παραδείγματα ρυθμιστικών ζευγών προσδέτη / υποδοχέα είναι τα σήματα επιβίωσης IGF1 / IGF-2 που μεταβιβάζονται μέσω του υποδοχέα τους IGF-1R και από το IL-3 και τον υποδοχέα IL-3R (Butt et al., 1999).

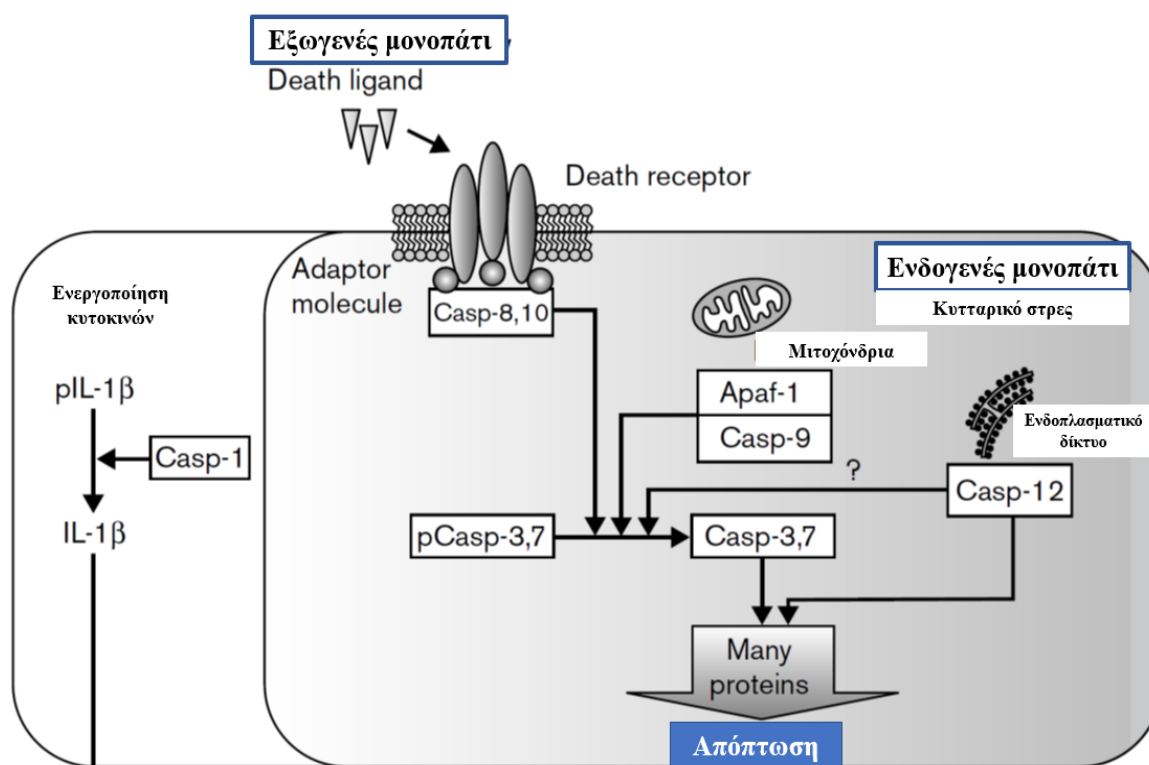


Εικόνα 4: Οδοί του αποπτωτικού μονοπατιού (τροποποίηση από: Zhang et al., 2016)

Τα σήματα κυτταρικού θανάτου μεταφέρονται μέσω του προσδέτη FAS που συνδέεται στον υποδοχέα FAS και με τον TNFα που δεσμεύεται στον υποδοχέα TNF-R1 (Ashkenazi and Dixit, 1999). Ποικίλοι ενδοκυττάριοι αισθητήρες παρακολουθούν τις συνθήκες που επικρατούν στο εσωτερικό του κυττάρου και ενεργοποιούν τον κυτταρικό θάνατο ως απόκριση στην ανίχνευση ανωμαλιών. Τέτοια παραδείγματα είναι οι βλάβες στο DNA, δυσλειτουργίες στην κυτταρική σηματοδότηση που προκαλούνται από τη δράση κάποιου ογκογόνου, η ανεπάρκεια κάποιου παράγοντα επιβίωσης ή η υποξία (Evan and Littlewood, 1998). Στα υπόλοιπα κύτταρα, που οι συνθήκες είναι φυσιολογικές και δεν ανιχνεύονται ανωμαλίες στη λειτουργία τους, συνεχίζουν τον

κύκλο ζωής τους υπακούοντας σε σήματα επιβίωσης κυττάρου / ECM και κυττάρου / κυττάρου. Τόσο τα διαλυτά όσο και τα ακινητοποιημένα αποπτωτικά ρυθμιστικά σήματα, αντικατοπτρίζουν τις ανάγκες των ιστών για διατήρηση των κυττάρων σε συγκεκριμένους αρχιτεκτονικούς σχηματισμούς.

Πολλά από τα σήματα που προκαλούν απόπτωση δρουν στα μιτοχόνδρια, τα οποία ανταποκρίνονται στα προαποπτωτικά σήματα, απελευθερώνοντας το κυτόχρωμα C, που επάγει απόπτωση (Green and Reed, 1998). Τα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2, που εμφανίζουν είτε προαποπτωτική (Bax, Bak, Bid, Bim) είτε αντιαποπτωτική δράση (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W), δρουν εν μέρει ρυθμίζοντας τη σηματοδότηση του μιτοχondριακού θανάτου μέσω της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 μπορεί να προκαλέσει απόπτωση ρυθμίζοντας την έκφραση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bax σε απόκριση στην ανίχνευση βλάβης του DNA. Η Bax διεγείρει με τη σειρά της τα μιτοχόνδρια για την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C.



Εικόνα 5: Ο ρόλος των κασπασών στο αποπτωτικό μονοπάτι (τροποποίηση από: Grütter, 2000)

Οι τελικοί τελεστές της απόπτωσης περιλαμβάνουν μια σειρά ενδοκυττάρων πρωτεασών που ονομάζονται κασπάσες (Thornberry and Lazebnik, 1998). Οι κασπάσες είναι κύρια συστατικά του αποπτωτικού μηχανισμού και συμμετέχουν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις που πυροδοτούνται από προαποπτωτικά σήματα και οδηγούν τελικά στον κατακερματισμό του DNA. Οι εναρκτήριες κασπάσες -8 και -9 ενεργοποιούνται από σήματα στους υποδοχείς «θανάτου» ή από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C, αντίστοιχα. Αυτές οι εναρκτήριες κασπάσες με τη σειρά τους πυροδοτούν την ενεργοποίηση των τελεστικών κασπάσων που εκτελούν τελικά τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, μέσω της επιλεκτικής καταστροφής των κυτταρικών δομών, των οργανιδίων και του γονιδιώματος (**Εικόνα 5**).

Η αξία του αποπτωτικού μηχανισμού ως εμπόδιο στον καρκίνο αποκαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1972, όταν οι Kerr, Wyllie και Currie παρατήρησαν μια μαζική απόπτωση στα κύτταρα ταχέως αναπτυσσόμενων όγκων εξαρτώμενων από ορμόνες, μετά από απομάκρυνση των ορμονών (Kerr et al., 1972). Σήμερα είναι γνωστό ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποκτήσουν αντίσταση στην απόπτωση με ποικίλους τρόπους. Η πιο συχνά εμφανιζόμενη απώλεια προαποπτωτικού ρυθμιστή μέσω μετάλλαξης, είναι του γονιδίου που κωδικοποιεί την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Σε ένα ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των ανθρώπινων όγκων παρατηρούνται λειτουργικές βλάβες στην πρωτεΐνη p53 που έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση ενός βασικού αισθητήρα βλάβης του DNA που μπορεί να πυροδοτήσει τον αποπτωτικό καταρράκτη. (Harris, 1996). Τα σήματα «κινδύνου» που προκαλούνται από άλλες μη φυσιολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της υποξίας και της υπερέκφρασης ογκογονιδίων, διοχετεύονται επίσης εν μέρει μέσω της p53 για να ενεργοποιηθεί ο αποπτωτικός μηχανισμός.

(δ) Απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού

Η αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα, η αντίσταση στα αντιπολλαπλασιαστικά σήματα και η ικανότητα αποφυγής της απόπτωσης, είναι τα τρία χαρακτηριστικά που οδηγούν το καρκινικό κύτταρο να αναπτύσσεται ανεξάρτητα από τα ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια σήματα. Ωστόσο, η απορρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού θα πρέπει να είναι εκτεταμένη για να επιτρέψει τη

δημιουργία των τεράστιων κυτταρικών πληθυσμών που αποτελούν τους μακροσκοπικούς όγκους. Οι έρευνες που πραγματοποιούνται τα τελευταία 30 χρόνια έχουν δείξει ότι η επίκτητη διακοπή της σηματοδότησης μεταξύ των κυττάρων, δεν μπορεί από μόνη της να εξασφαλίζει την επεκτατική ανάπτυξη των όγκων.

Οι περισσότεροι, αν όχι όλοι, οι τύποι κυττάρων στα θηλαστικά φέρουν ένα εγγενές, αυτόνομο κυτταρικό πρόγραμμα που περιορίζει τον πολλαπλασιασμό τους και λειτουργεί ανεξάρτητα από τα μονοπάτια σηματοδότησης κυττάρου/κυττάρου που περιεγράφηκαν παραπάνω. Για να μπορέσει λοιπόν ένας κυτταρικός πληθυσμός να αποκτήσει μεγάλο μέγεθος και να αποτελέσει ένα απειλητικό για τη ζωή όγκο θα πρέπει να διαταραχθεί και αυτό το αυτόνομο κυτταρικό πρόγραμμα που ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Εδώ και δεκαετίες είναι γνωστό ότι τα κύτταρα σε καλλιέργεια έχουν ένα πεπερασμένο δυναμικό αντιγραφής, καθώς οι κυτταρικοί πληθυσμοί μετά από ένα ορισμένο αριθμό διπλασιασμών, σταματούν να αναπτύσσονται - μια διαδικασία που ονομάζεται *γήρανση* (*senescence*) (Hayflick, 1997). Παρατηρήσεις σε καλλιέργειες κυττάρων δείχνουν ότι διάφοροι φυσιολογικοί τύποι ανθρώπινων κυττάρων έχουν την ικανότητα για 60-70 διπλασιασμούς.

Εργαστηριακά, η γήρανση καλλιεργημένων ανθρώπινων ινοβλαστών μπορεί να αποφευχθεί απενεργοποιώντας τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες pRb και p53, επιτρέποντας σε αυτά τα κύτταρα να συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται έως ότου εισέλθουν σε μια δεύτερη κατάσταση που ονομάζεται *κρίση* (*crisis*). Η κατάσταση κρίσης χαρακτηρίζεται από μαζικό κυτταρικό θάνατο, καρυοτυπικές ανωμαλίες που σχετίζονται με τη σύντηξη των άκρων των χρωμοσωμάτων και την εμφάνιση ιδιόμορφων κυττάρων (1 στα 107) που έχουν την ικανότητα του αέναου πολλαπλασιασμού, χαρακτηριστικό που ονομάζεται *αθανатоποίηση* (*immortalization*) (Wright et al., 1989).

Οι περισσότεροι τύποι καρκινικών κυττάρων που πολλαπλασιάζονται σε καλλιέργεια φαίνεται να αθανатоποιούνται, γεγονός που υποδηλώνει ότι το απεριόριστο αναπαραγωγικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων είναι ένας φαινότυπος που αποκτάται *in vivo* κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου και είναι απαραίτητος για την εμφάνιση κακοήθειας (Hayflick, 1997).

Επομένως, σε κάποιο από τα πολλαπλά στάδια κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου, οι εξελισσόμενοι προ-κακοήθεις κυτταρικοί πληθυσμοί υπερβαίνουν τον αριθμό των επιτρεπόμενων διπλασιασμών και αποκτούν απεριόριστο δυναμικό αντιγραφής.

Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ενός κυττάρου καθορίζεται από τα *τελομερή* που είναι ειδικές αλληλουχίες στα άκρα των χρωμοσωμάτων και αποτελούνται από αρκετές χιλιάδες επαναλήψεις ενός γονιδιακού στοιχείου 6 bp. Σε κάθε γενιά έχει βρεθεί ότι χάνονται περίπου 50-100 bp τελομερικού DNA από τα άκρα κάθε χρωμοσώματος, κατά τη διάρκεια κάθε κυτταρικού κύκλου. Αυτή η προοδευτική μείωση των τελομερικών άκρων έχει αποδοθεί στην αδυναμία των DNA πολυμερασών να αναπαράγουν πλήρως τα 3' άκρα του χρωμοσωμικού DNA κατά τη διάρκεια της φάσης S και μετά από αλληπάλληλους διαδοχικούς κύκλους αντιγραφής τελικά χάνουν την ικανότητά τους να προστατεύουν τα άκρα του χρωμοσωμικού DNA. Στη συνέχεια τα απροστάτευτα χρωμοσωμικά άκρα συμμετέχουν σε συντήξεις των χρωμοσωμικών άκρων, οδηγώντας το κύτταρο σε κρίση και σχεδόν αναπόφευκτα σε κυτταρικό θάνατο (Counter et al., 1992).

Η διατήρηση των τελομερικών άκρων είναι εμφανής σε σχεδόν όλους τους τύπους καρκινικών κυττάρων (Shay and Bacchetti, 1997). Το 85% –90% των καρκινικών κυττάρων το καταφέρνουν μέσω της επαγωγής αυξημένης έκφρασης του ενζύμου της τελομεράσης, που προσθέτει νουκλεοτιδικές επαναλήψεις στα άκρα του τελομερικού DNA (Bryan and Cech, 1999). Ένα μικρό ποσοστό καρκινικών κυττάρων έχει εφεύρει έναν τρόπο ενεργοποίησης ενός μηχανισμού που ονομάζεται ALT, ο οποίος φαίνεται να διατηρεί τα τελομερή μέσω διαχρωμοσωμικών ανταλλαγών πληροφοριών αλληλουχίας μέσω ανασυνδυασμού (Bryan et al., 1995). Συμπερασματικά, με τον ένα ή τον άλλο τρόπο, τα τελομερή διατηρούνται ως ένα βαθμό στα καρκινικά κύτταρα, και αυτό με τη σειρά του επιτρέπει τον απεριόριστο πολλαπλασιασμό των κυτταρικών απογόνων.

(ε) Συνεχής αγγειογένεση

Μέσα στον οργανισμό, η παροχέτευση του οξυγόνου και των θρεπτικών συστατικών στα κύτταρα πραγματοποιείται με τη βοήθεια των αγγείων. Έτσι, τα αγγεία είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία και την επιβίωση των κυττάρων και ουσιαστικά υποχρεώνουν όλα τα κύτταρα του

ιστού να βρίσκονται σε ακτίνα 100 μm από κάποιο τριχοειδές αιμοφόρο αγγείο. Κατά τη διάρκεια της οργανογένεσης, αυτή η απόσταση εξασφαλίζεται από τη συντονισμένη ανάπτυξη των αγγείων και του παρεγχύματος. Μόλις σχηματιστεί ένας ιστός, η ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων - η διαδικασία της *αγγειογένεσης* - είναι παροδική και αυστηρώς ρυθμισμένη. Εξαιτίας της εξάρτησης από τα κοντινά τριχοειδή αγγεία, φαίνεται εύλογο ότι τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα μέσα σε έναν ιστό θα έχουν μια ενδογενή ικανότητα να ενεργοποιούν την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων.

Οι μελέτες έχουν δείξει ότι τα κύτταρα που παρουσιάζουν ανώμαλο πολλαπλασιασμό αρχικά δεν έχουν τη ικανότητα για αγγειογένεση και έτσι περιορίζεται η επέκτασή τους. Προκειμένου λοιπόν να αυξηθούν σε μέγεθος οι αρχικές νεοπλασίες, θα πρέπει να αναπτύξουν την ικανότητα για αγγειογένεση. Η διαδικασία της αγγειογένεσης, όπως και άλλες βασικές κυτταρικές λειτουργίες, ρυθμίζεται με τα κατάλληλα θετικά και αρνητικά σήματα που προάγουν ή καταστέλλουν αυτή τη διαδικασία. Μία κατηγορία τέτοιων σημάτων μεταδίδεται από διαλυτούς παράγοντες και τους υποδοχείς τους, οι οποίοι εμφανίζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι ιντεγκρίνες και τα μόρια προσκόλλησης που διαμεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων ή κυττάρων - ECM παίζουν επίσης κρίσιμο ρόλο.

Τα σήματα έναρξης της αγγειογένεσης διαβιβάζονται από τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) και από τους αυξητικούς παράγοντες των ινοβλαστών (FGF1 / 2), οι οποίοι συνδέονται με διαμεμβρανικούς υποδοχείς κινάσης τυροσίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Veikkola and Alitalo, 1999). Γενικά υπάρχουν περισσότεροι από 20 παράγοντες που επάγουν την αγγειογένεση και ένας εξίσου μεγάλος αριθμός ενδογενών πρωτεϊνικών αναστολέων της αγγειογένεσης, όπως η θρομβοσπονδίνη 1. Επίσης, η σηματοδότηση της αγγειογένεσης πραγματοποιείται και μέσω των ιντεγκρινών, καθώς έχει βρεθεί ότι τα αγγεία που βρίσκονται σε ηρεμία εκφράζουν διαφορετικές κατηγορίες ιντεγκρινών από τα αναπτυσσόμενα τριχοειδή αγγεία.

Τα καρκινικά κύτταρα των όγκων φαίνεται να ενεργοποιούν τον «αγγειογενετικό διακόπτη» αλλάζοντας την ισορροπία μεταξύ των επαγωγέων της αγγειογένεσης και των αντισταθμιστικών αναστολέων (Hanahan and Folkman, 1996). Αυτό επιτυγχάνεται συνήθως μέσω της τροποποιημένης

μεταγραφής διαφόρων γονιδίων που εμπλέκονται στην αγγειογένεση. Για παράδειγμα, πολλοί όγκοι παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση των παραγόντων αγγειογένεσης VEGF και / ή FGF σε σύγκριση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς, ενώ σε άλλους φαίνεται ότι η έκφραση των ενδογενών αναστολέων όπως της θρομβοσπονδίνης-1 ή της β-ιντερφερόνης, είναι μειωμένη. Σε ορισμένους όγκους μπορεί να συμβαίνουν και τα δύο (Volpert et al., 1997). Παρόλα αυτά, οι μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνονται αυτές οι μεταβολές στις ισορροπίες των αγγειογενετικών ρυθμιστών παραμένουν υπό διερεύνηση.

(στ) Εισβολή και μετάσταση σε άλλους ιστούς

Αργά ή γρήγορα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των περισσότερων τύπων καρκίνου του ανθρώπου, στις πρωτογενείς μάζες όγκων δημιουργούνται κύτταρα με μοναδικές ικανότητες. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να μετακινούνται, να εισβάλλουν σε παρακείμενους ιστούς και από εκεί να ταξιδεύουν σε απομακρυσμένες θέσεις μέσα στον οργανισμό όπου μπορεί να καταφέρουν να ιδρύσουν νέες αποικίες. Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να μετακινούνται μέσα στον οργανισμό και να εγκαθίστανται σε νέες θέσεις και να πολλαπλασιάζονται, ονομάζεται μετάσταση και είναι η αιτία του 90% των θανάτων από καρκίνο στον άνθρωπο (Sporn, 1996). Η ικανότητα εισβολής και μετάστασης επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να ξεφύγουν από την πρωτογενή μάζα του όγκου και να αποικίσουν μια νέα θέση στο ανθρώπινο σώμα όπου, τουλάχιστον αρχικά, τα θρεπτικά συστατικά και ο χώρος δεν αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες. Όπως και ο σχηματισμός της πρωτογενούς μάζας του όγκου, η επιτυχής εισβολή και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων εξαρτώνται και από τις άλλες πέντε επίκτητες ικανότητες τους.

Η εισβολή και η μετάσταση είναι εξαιρετικά περίπλοκες διεργασίες και οι γενετικοί και βιοχημικοί καθοριστικοί παράγοντες παραμένουν ανεπαρκώς κατανοητοί. Οι δύο διαδικασίες φαίνεται να είναι στενά συνδεδεμένες και χρησιμοποιούν παρόμοιες στρατηγικές και μηχανισμούς, που περιλαμβάνουν αλλαγές στην αλληλεπίδραση των κυττάρων με το μικροπεριβάλλον τους και την ενεργοποίηση εξωκυττάρων πρωτεϊνών. Αρκετές κατηγορίες πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόσδεση των κυττάρων στο περιβάλλον τους, μεταβάλλονται σε κύτταρα που έχουν την ικανότητα

να εισβάλλουν σε άλλους ιστούς. Οι πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνουν μόρια προσκόλλησης κυττάρου / κυττάρου (CAMs) όπως μέλη των οικογενειών των ανοσοσφαιρινών και των εξαρτώμενων από ασβέστιο κατχερινών που διαμεσολαβούν σε αλληλεπιδράσεις κυττάρου / κυττάρου, αλλά και ιντεγκρινών που εμπλέκονται στην προσκόλληση των κυττάρων σε υποστρώματα της εξωκυτταρικής μήτρας. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, όλες αυτές οι αλληλεπιδράσεις «προσκόλλησης» μεταφέρουν ρυθμιστικά σήματα στο κύτταρο (Arlin et al., 1998).

Η πιο ευρέως παρατηρούμενη αλλαγή στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και μικροπεριβάλλοντος στον καρκίνο αφορά την E-καδερίνη, ένα μόριο που εμπλέκεται στη αλληλεπίδραση κυττάρου / κυττάρου και εκφράζεται σε όλα τα επιθηλιακά κύτταρα. Η σύζευξη μεταξύ γειτονικών κυττάρων με γέφυρες E-καδερίνης οδηγεί στη μετάδοση αντιπολλαπλασιαστικών και άλλων σημάτων μέσω ενδοκυτταρικής σηματοδότησης στην οποία εμπλέκεται και ο μεταγραφικός παράγοντας Lef / Tcf. Οι έρευνες έχουν δείξει ότι η λειτουργικότητα της E-καδερίνης χάνεται στην πλειονότητα των επιθηλιακών καρκίνων από μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την απενεργοποίηση γονιδίων E-καδερινών ή β-κατενινών μέσω γονιδιακών μεταλλάξεων. Η εξαναγκασμένη έκφραση της E-καδερίνης σε κυτταρικές καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων καθώς και σε διαγονιδιακά μοντέλα καρκινογένεσης ποντικών, φαίνεται να εμποδίζει την διεισδυτική και μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων. Συνεπώς, η E-καδερίνη χρησιμεύει ως ένας δραστήσιος καταστολέας διείσδυσης και μετάστασης στους επιθηλιακούς καρκίνους, ενώ η δυσλειτουργία της αποτελεί ένα βασικό βήμα, για να αποκτήσουν τα καρκινικά κύτταρα αυτές τις ικανότητες (Christofori and Semb, 1999).

Οι αλλαγές στην έκφραση των CAMs, που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών, φαίνεται επίσης να παίζει κρίσιμο ρόλο στις διαδικασίες διείσδυσης και μετάστασης (Johnson, 1991). Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα περιλαμβάνει το N-CAM, το οποίο υφίσταται αλλαγές στην έκφραση του και μετατρέπεται από μια μορφή με μεγάλη ικανότητα προσκόλλησης σε μία ισομορφή με μικρή ή μηδαμινή ικανότητα προσκόλλησης που εντοπίζεται

συχνά στο νευροβλάστωμα (όγκος του συμπαθητικού νευρικού συστήματος) και στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Kaiser et al., 1996).

Οι αλλαγές στην έκφραση των ιντεγκρινών είναι επίσης συχνές σε διεισδυτικά και μεταστατικά κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της μετάστασης, στις νέες θέσεις τα καρκινικά κύτταρα αντιμετωπίζουν μεταβαλλόμενα μικροπεριβάλλοντα, τα οποία μπορεί να αποτελούνται από διαφορετικά συστατικά ECM. Συνεπώς, για να μπορέσουν να αποικίσουν με επιτυχία τις νέες θέσεις (τόσο των κοντινών, όσο και των πιο απομακρυσμένων σημείων) θα πρέπει να προσαρμοστούν μέσω αλλαγών στις υπομονάδες α ή β των ιντεγκρινών. Αυτές οι αλλαγές οδηγούν σε νέους υπότυπους ιντεγκρινών που εμφανίζουν διαφορετικές προτιμήσεις υποστρώματος και εμφανίζουν προτίμηση στα αποικοδομημένα συστατικά που παράγονται από εξωκυττάρια πρωτεάσες (Lukashev and Werb, 1998).

Συμπερασματικά, η ενεργοποίηση των εξωκυττάρων πρωτεασών και οι αλλαγές στην ικανότητα δέσμευσης των καδερινών, των CAMs και των ιντεγκρινών είναι απαραίτητες για την απόκτηση της ικανότητας εισβολής και μετάστασης των καρκινικών κυττάρων σε γειτονικούς αλλά και απομακρυσμένους ιστούς. Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν αυτές τις μεταβολές παραμένουν άγνωστοι προς το παρόν και φαίνεται να διαφέρουν ανάλογα με το περιβάλλον του ιστού. Στόχος των σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών είναι η δημιουργία ολοκληρωμένων προφίλ έκφρασης και λειτουργίας των πρωτεασών, των ιντεγκρινών και των CAMs σε μια μεγάλη ποικιλία τύπων καρκίνου, πριν και μετά την απόκτηση της ικανότητας εισβολής και μετάστασης, για την ανάπτυξη νέων αποτελεσματικών θεραπευτικών στρατηγικών.

Τα παραπάνω επίκτητα χαρακτηριστικά επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να επιβιώνουν, να πολλαπλασιάζονται και να εισβάλλουν σε άλλους ιστούς. Επίσης, εμφανίζονται σε διάφορους τύπους καρκίνου μέσω ποικίλων μηχανισμών και σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της καρκινογένεσης. Το 2011 οι Hanahan και Weinberg πρόσθεσαν δύο ακόμα χαρακτηριστικά τα οποία αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα: ο επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού και η αποφυγή της καταστροφής τους από το ανοσοποιητικό σύστημα. Ο

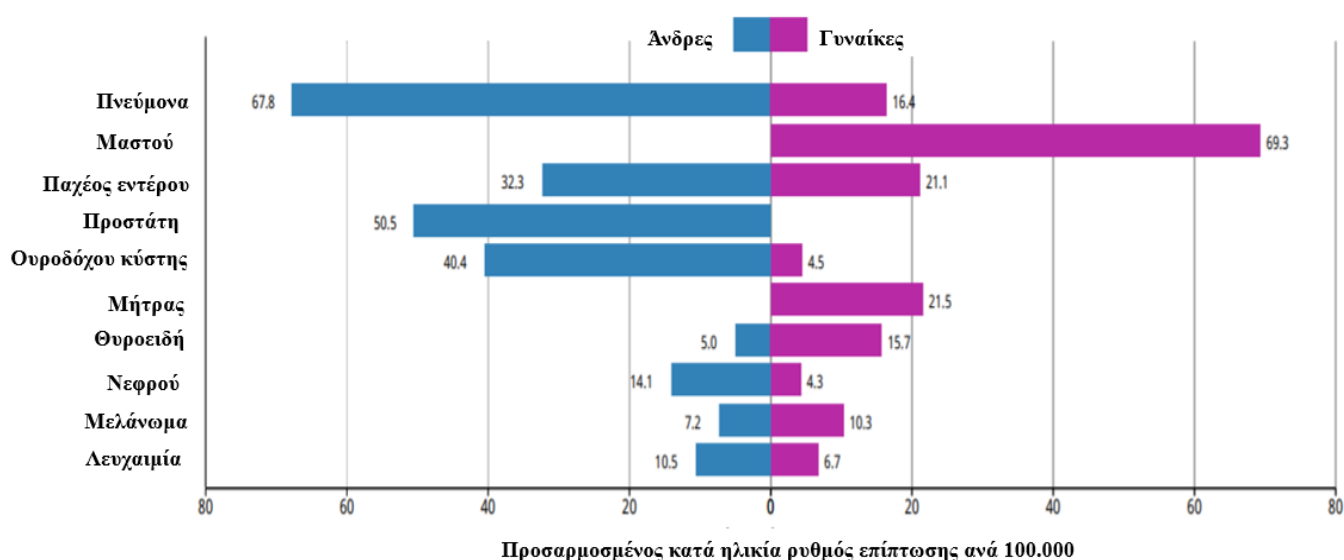
επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού είναι απαραίτητος για την υποστήριξη της συνεχούς ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αντικαθιστώντας το «μεταβολικό πρόγραμμα» που λειτουργεί στους περισσότερους φυσιολογικούς ιστούς και προμηθεύοντας την απαιτούμενη ενέργεια για τις φυσιολογικές λειτουργίες των φυσιολογικών κυττάρων. Το δεύτερο χαρακτηριστικό περιλαμβάνει ενεργή αποφυγή της εξάλειψής των καρκινικών κυττάρων από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

A.1.3 Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια ομάδα ασθενειών στις οποίες τα κύτταρα του μαστικού ιστού «απορρυθμίζονται» και διαιρούνται ανεξέλεγκτα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός όγκου. Σύμφωνα με το Εθνικό Αντικαρκινικό Ινστιτούτο των Ηνωμένων Πολιτειών (National Cancer Institute (NCI) of the United States of America), ο καρκίνος του μαστού είναι ο καρκίνος που αναπτύσσεται στους ιστούς του μαστού, συνήθως στους *πόρους* (που μεταφέρουν γάλα στη θηλή) ή στους *λοβούς* (αδένες που παράγουν γάλα). Απαντάται τόσο σε άντρες, όσο και σε γυναίκες, παρόλο που στους άντρες είναι σπάνιος (Lester, 2007). Ο καρκίνος του μαστού είναι συνήθως ένας μεταστατικός καρκίνος και μπορεί να εμφανιστεί σε απομακρυσμένες θέσεις και όργανα στον οργανισμό όπως τα οστά, το ήπαρ, ο πνεύμονας και ο εγκέφαλος.

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος καρκίνος στις γυναίκες σε όλες τις περιοχές του κόσμου (εκτός από την Ανατολική Αφρική) και ο δεύτερος πιο κοινός καρκίνος στο σύνολο των περιπτώσεων καρκίνου (**Εικόνα 6**) (Ferlay et al., 2018). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Globocan, 2018), ο καρκίνος του μαστού αντιπροσωπεύει το 24,2% των νέων περιπτώσεων καρκίνου στις γυναίκες και το 15,0% των θανάτων από καρκίνο. Στην Ελλάδα το 2018 καταγράφηκαν 67.401 νέες περιπτώσεις καρκίνου. Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το 11,5 % των νέων περιπτώσεων καρκίνου στα δύο φύλα, ενώ στις γυναίκες αντιπροσωπεύει το 27,2 % (**Εικόνα 7**). Τα παραπάνω στατιστικά στοιχεία επιδεινώνονται από το γεγονός ότι η συχνότητα αυτής της ασθένειας αυξάνεται σταθερά στις περισσότερες δυτικές κοινωνίες, αλλά και στις ασιατικές χώρες

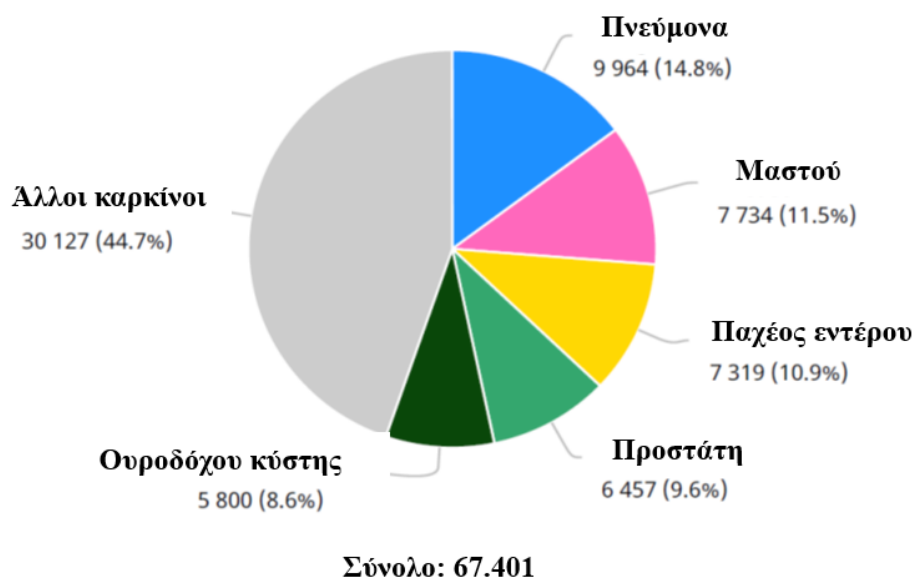
που παραδοσιακά είχαν μικρότερες συχνότητες εμφάνισης καρκίνου του μαστού (Gaudette et al., 1996) και ακόμα περισσότερο από το γεγονός ότι υπάρχει έλλειψη μιας σαφούς κατανόησης της αιτίας αυτής της παγκόσμιας αύξησης.



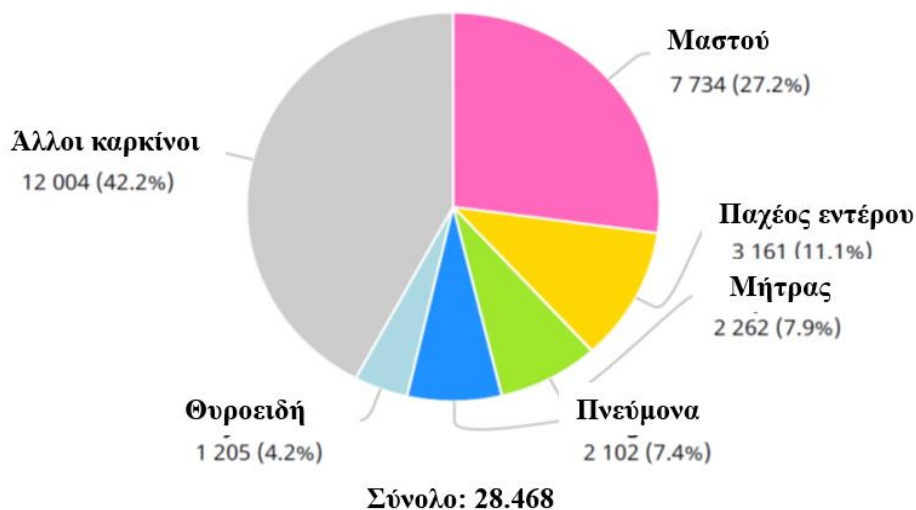
Εικόνα 6: Προσαρμοσμένος κατά ηλικία ρυθμός επίπτωσης ανά φύλο παγκοσμίως για τους δέκα πιο συχνούς τύπους καρκίνου (Προσαρμοσμένο από:

<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/300-greece-fact-sheets.pdf>)

Η αιτιολογία του καρκίνου του μαστού δεν έχει κατανοηθεί ακόμη πλήρως, και οι παράγοντες κινδύνου, εξηγούν μόνο ένα μικρό ποσοστό περιπτώσεων. Οι επιδημιολογικές μελέτες έχουν προτείνει ότι στην αιτιολογία του καρκίνου του μαστού, εμπλέκεται η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού που πυροδοτούνται από ορμονικούς παράγοντες, αλλά ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει διαλευκανθεί (Adami et al., 1995). Η γνώση της αιτιολογίας του καρκίνου του μαστού, είναι πολύ χρήσιμη για τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης του κινδύνου, με σκοπό τον εντοπισμό γυναικών υψηλού κινδύνου. Η έγκαιρη διάγνωση της νόσου μπορεί να οδηγήσει σε καλή πρόγνωση και υψηλό ποσοστό επιβίωσης.



(α)



(β)

Εικόνα 7: Γραφική απεικόνιση των νέων περιπτώσεων καρκίνου (α) στα δύο φύλα και (β) μόνο στις γυναίκες στην Ελλάδα για το 2018 (Ferlay et al., 2018).

Παρόλο που οι περισσότεροι ασθενείς με καρκίνο του μαστού διαγιγνώσκονται αρκετά νωρίς και ο όγκος αντιμετωπίζεται επιτυχώς με χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή συνδυασμό τους (Garcia-Aranda and Redondo, 2017), σχεδόν το 30% των γυναικών που αρχικά διαγνώστηκαν με νόσο πρώιμου σταδίου τελικά θα αναπτύξουν μεταστατική νόσο που τελικά οδηγεί σε θάνατο των ασθενών (Redig and McAllister, 2013). Σε αυτές τις περιπτώσεις, η ανάπτυξη νέων

αποτελεσματικών και στοχευμένων θεραπειών κατά των καρκινικών κυττάρων, είναι πολλά υποσχόμενες σε αντίθεση με τις συμβατικές θεραπείες που δεν είναι επιλεκτικές έναντι των κυττάρων του όγκου και προκαλούν πολλές παρενέργειες.

A.1.3.1 Παράγοντες κινδύνου καρκίνου του μαστού

Η έγκαιρη αναγνώριση των γυναικών υψηλού κινδύνου είναι ένα σημαντικό ζήτημα καθώς σήμερα υπάρχουν διαθέσιμες ποικίλες ιατρικές και χειρουργικές επιλογές για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού (Visvanathan et al., 2009). Ποικίλοι παράγοντες, γενετικοί και περιβαλλοντικοί, έχει βρεθεί κατά τη διάρκεια των χρόνων, ότι τροποποιούν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι ο υψηλός κίνδυνος για εμφάνιση καρκίνου του μαστού σχετίζεται με διάφορους παράγοντες (**Πίνακας 1**) όπως: το οικογενειακό ιστορικό για καρκίνο του μαστού ή των ωοθηκών (Easton et al., 1993), η ηλικία πρώτης πλήρης εγκυμοσύνης, η πρώιμη εμμηναρχή ή η καθυστερημένη εμμηνόπαυση (Petrodidou et al., 1996), η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία σε πρώιμη ηλικία και η κοινωνικοοικονομική κατάσταση (Kelsey and Horn-Ross, 1993).

Ένας από τους παράγοντες που αποτελεί βασικό παράγοντα κινδύνου εμφάνισης της νόσου είναι το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού σε συγγενή πρώτου βαθμού. Μάλιστα ο κίνδυνος είναι σημαντικά υψηλός στην περίπτωση που ο συγγενής εμφάνισε τη νόσο σε νεαρή σχετικά ηλικία (Greene, 1997). Επίσης, καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου διαδραματίζουν οι μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 και BRCA2, αφού υπολογίζεται ότι το 5–10% όλων των περιπτώσεων καρκίνων μαστού μπορεί να αποδοθεί σε γονιδιακή προδιάθεση (Ellisen and Haber, 1998). Ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου σε γυναίκες που έχουν κληρονομήσει γονιδιακές μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1/2 είναι περίπου 60%-85% (Ford et al., 1995).

Η πρώιμη εμμηναρχή και η καθυστερημένη εμμηνόπαυση αποτελούν παράγοντες αυξημένου κινδύνου. Πιο συγκεκριμένα, επιδημιολογικά, κλινικά και πειραματικά αποτελέσματα έχουν αποδείξει ότι το χρονικό διάστημα μεταξύ της εμμηναρχής και της πρώτης πλήρους εγκυμοσύνης

είναι ένα «παράθυρο» κρίσιμης σημασίας για τον δια βίου κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (Lambe et al., 1996). Έτσι, μία μείωση αυτού του παραθύρου, δηλαδή μία καθυστερημένη εμμηναρχή και ολοκληρωμένη εγκυμοσύνη σε μικρή ηλικία παρέχει προστασία, ενώ αντίθετα μία πρόωμη εμμηναρχή και μια πρώτη εγκυμοσύνη σε μεγάλη ηλικία αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού.

Οι ενδογενείς ορμόνες, όπως η οιστραδιόλη, η δεϋδροεπιανδροστερόνη, η τεστοστερόνη και η προλακτίνη έχουν θετική συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Onland-Moret et al., 2003). Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι το υψηλό ανάστημα συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο της νόσου (Tretli, 1989), ενώ το αυξημένο σωματικό βάρος και η παχυσαρκία αυξάνει τον κίνδυνο σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Hunter and Willett, 1993). Στις περιπτώσεις που στην μαστογραφική εξέταση εντοπίζεται πυκνή απεικόνιση σε τουλάχιστον το 75% της επιφάνειας του μαστού, ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου φαίνεται να αυξάνεται σημαντικά (έως και τέσσερις φορές) σε σύγκριση με τις γυναίκες που εμφανίζουν πυκνή απεικόνιση σε < 25% της επιφάνειας (Boyd et al., 1998).

Πίνακας 1: Σημαντικότεροι παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού

Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού	
Γυναικείο Φύλο	Μεγαλύτερη ηλικία 1ης εγκυμοσύνης
Μεγαλύτερη Ηλικία	Θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης
Μεγαλύτερο ύψος	Κατανάλωση οινοπνεύματος
Μετεμμηνοπαυσιακή παχυσαρκία	Ιονίζουσα ακτινοβολία
Άτυπη υπερπλασία μαζικού αδένα	Οικογενειακό ιστορικό
Μαστογραφία υψηλού κινδύνου	Μεταλλάξεις BRCA 1/2
Μικρότερη ηλικία εμμηναρχής	Νεόπλασμα στον άλλο μαστό
Μεγαλύτερη ηλικία εμμηνόπαυσης	

Η ιονίζουσα ακτινοβολία αυξάνει επίσης τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι το χρονικό διάστημα μεταξύ της εμμηναρχής και της πρώτης πλήρους εγκυμοσύνης αντιπροσωπεύει ένα χρονικό διάστημα μέγιστης ευαισθησίας σε εξωτερικούς παράγοντες, όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία που αυξάνει επίσης την επίπτωση του καρκίνου (Hancock et al., 1993). Επίσης, η κατανάλωση οίνοπνεύματος αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, ενώ σε αντίθεση η υιοθέτηση μεσογειακής διατροφής και η σωματική άσκηση, μειώνουν ελαφρώς τον κίνδυνο (Richie and Swanson, 2003). Τέλος, έχει βρεθεί ότι η μακροχρόνια χορήγηση μετεμμηνοπαυσιακών οιστρογόνων αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο της νόσου (Chlebowski et al., 2003).

A.1.3.2 Ιστολογικοί Υπότυποι

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια ετερογενής ασθένεια όσον αφορά την κλινική πορεία, την ιστοπαθολογία και τα χαρακτηριστικά απεικόνισης. Υπάρχουν πολλές ιστολογικές ταξινομήσεις και μία ευρέως χρησιμοποιούμενη είναι η παρακάτω (**Πίνακας 2**) (Deshpande, 2017):

(1) Επιθηλιακοί όγκοι:

(α) Μη διηθητικό καρκίνωμα: Τα μη διηθητικά (*in situ*) καρκινώματα είναι ετερογενής ομάδα αλλοιώσεων που χαρακτηρίζονται από την ανάπτυξη κακοήθους νεοπλασίας εντός των γαλακτοφόρων πόρων χωρίς διήθηση της βασικής μεμβράνης και του συνδετικού ιστού.

- **Πορογενές *in situ* (ductal carcinoma *in situ* – DCIS):** Αποτελεί το 15 – 30 % των ιστολογικών τύπων του καρκίνου του μαστού που ανιχνεύονται μαστογραφικά. Το 95 % των DCIS ανακαλύπτονται σε υποκλινικό στάδιο μετά από μαστογραφικό έλεγχο. Μπορεί να ταξινομηθεί περαιτέρω σε δύο κατηγορίες: φαγεσωρικού τύπου (comedo) και μη φαγεσωρικού τύπου (noncomedo). Το DCIS δύναται να εξελιχτεί σε διηθητικό καρκίνο (κυρίως το DCIS φαγεσωρικού τύπου).
- **Λοβιδιακό *in situ* (lobular carcinoma *in situ* - LCIS):** Το λοβιακό καρκίνωμα *in situ* αποτελεί συνήθως τυχαίο εύρημα σε βιοψία τμημάτων μαστού. Η εύρεση του LCIS δεν θεωρείται προκαρκινική κατάσταση, αλλά δείκτης αυξημένου σχετικού κινδύνου για την

ανάπτυξη διηθητικών καρκινωμάτων και για αυτό συνιστάται συχνή παρακολούθηση και σε μερικές περιπτώσεις προφυλακτική λήψη ορμονοθεραπείας.

(β) Διηθητικό καρκίνωμα: Στα διηθητικά καρκινώματα διηθείται η βασική μεμβράνη και τα νεοπλασματικά συσσωματώματα επεκτείνονται στο μαστικό σώμα.

- **Διηθητικό πορογενές:** Ο πιο συχνός ιστολογικός τύπος διηθητικού καρκινώματος του μαστού (περίπου 75 % των περιπτώσεων).
- **Διηθητικό λοβιδιακό:** Αφορούν το 8-10 % των περιπτώσεων διηθητικού τύπου καρκινωμάτων. Μπορεί να σχετίζεται είτε με λοβιδιακό καρκίνωμα *in situ* είτε με πορογενές
- **Διηθητικό βλεννώδες:** Αντιπροσωπεύει το 2-5 % των περιπτώσεων και εμφανίζεται σε μεγαλύτερης ηλικίας ασθενείς συνήθως. Χαρακτηρίζεται από άφθονες εξωκυττάρειες βλεννώδεις εστίες καρκινικών κυττάρων. Έχει καλύτερη πρόγνωση απ' ό,τι το πορογενές διηθητικό καρκίνωμα.
- **Διηθητικό θηλώδες:** Αντιπροσωπεύει περίπου το 1-5 % των περιπτώσεων. Έχει καλή πρόγνωση. Τυπικά εμφανίζεται σε μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες.
- **Διηθητικό μυελοειδές:** Αποτελεί περίπου το 4 % των περιπτώσεων. Συνήθως δεν εκφράζονται ορμονικοί υποδοχείς. Έχει σχετικά καλή πρόγνωση.
- **Διηθητικό σωληνώδες:** Αποτελεί το 1-3 %. Αποτελεί μια καλά διαφοροποιημένη μορφή διηθητικού καρκινώματος του μαστού και φαίνεται να συσχετίζεται με εστίες πορογενούς *in situ* καρκινώματος. Έχουν πάντα διαστάσεις μικρότερες από 2 cm. Λεμφαδενικές μεταστάσεις παρατηρούνται σε περίπου 15% των περιπτώσεων και συνήθως εμπλέκονται λιγότεροι από τρεις κόμβοι.
- **Νόσος του Paget:** Αφορά το 1-3 % των κακοήθων νόσων του μαστού και εμφανίζεται ως εκζεματοειδής αλλοίωση της θηλής, με ή χωρίς την παρουσία όγκου. Συνήθως συνυπάρχει με πορογενές καρκίνωμα και προέρχεται από τη διήθηση της επιδερμίδας της θηλής από καρκινικά κύτταρα.

(2) Μη επιθηλιακοί όγκοι:

Οι μη επιθηλιακοί όγκοι του μαστού είναι σπάνιοι όγκοι όπως:

- **Σαρκώματα:** κακοήθεις όγκοι που προέρχονται από το συνδετικό ιστό του μαστού ή από προϋπάρχοντα φυλλοειδή όγκο. Έχουν κακή πρόγνωση.
- **Λεμφώματα:** δίνουν αρχικά την εικόνα ενός όγκου του μαστού, ενώ είναι δυνατόν να αποτελούν μεταστάσεις στο μαστό.

Πίνακας 2: Ιστολογική ταξινόμηση βασικών τύπων καρκίνου του μαστού

Επιθηλιακός	Μη Διηθητικός	Μη διηθητικό Πορογενές Καρκίνωμα (DCIS) Μη διηθητικό Λοβιακό Καρκίνωμα (LCIS)
	Διηθητικός	Διηθητικό Πορογενές Αδενοκαρκίνωμα (IDC)
		Διηθητικό Λοβιακό Καρκίνωμα (ILC)
		Διηθητικό βλεννώδες
		Διηθητικό θηλώδες:
		Διηθητικό μυελοειδές
		Διηθητικό σωληνώδες
		Νόσος του Paget
Μη Επιθηλιακός	Σαρκώματα, Λεμφώματα	

1.3.3 Μοριακοί Υπότυποι

Με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά ο καρκίνος του μαστού μπορεί να ταξινομηθεί σε τουλάχιστον τέσσερις βασικούς υπότυπους, ανάλογα με την έκφραση του υποδοχέα του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα Τύπου 2 (HER2) και της έκφρασης ορμονικών υποδοχέων (οιστρογόνων και προγεστερόνης). Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν αλληλεπικαλύψεις μεταξύ των

διαφορετικών κατηγοριών και οι κλινικές προσεγγίσεις αντίστοιχα δεν αντιστοιχούν απόλυτα στους μοριακούς υποτύπους.

- **Αυλικού τύπου A (Luminal A - HR+/HER2-):** Αυτός είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου του μαστού και τείνει να αναπτύσσεται πιο αργά και είναι λιγότερο επιθετικός από τους άλλους υπότυπους. Οι όγκοι αυλικού τύπου A σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση και ανταποκρίνονται συνήθως στις ορμονικές θεραπείες. Τα κύτταρα των όγκων αυτών εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς, οιστρογονικούς (ER) ή/και προγεστερονικούς (PR), δεν εκφράζουν Ki-67 και δεν φέρουν μεταλλάξεις του γονιδίου TP53 (Howlader et al., 2018).
- **Αυλικού τύπου B (Luminal B - HR+/HER2+):** Σε αντίθεση με τους αυλικούς όγκους τύπου A, ο υπότυπος τύπου B χαρακτηρίζεται κλινικά από το γεγονός ότι εκφράζεται ο υποδοχέας HER2. Τα τελευταία χρόνια, ο τύπος αυτός χαρακτηρίζεται κυρίως από την παρουσία της πρωτεΐνης Ki67 (δείκτης μεγάλου αριθμού ενεργών διαιρούμενων κυττάρων) και / ή HER2. Οι όγκοι αυτοί έχουν φτωχότερη πρόγνωση από τους όγκους αυλικού τύπου A και η βιολογική τους συμπεριφορά, πλησιάζει εκείνη των τριπλά αρνητικών όγκων. Οι όγκοι αυλικού τύπου B εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς (Parise and Caggiano, 2017).
- **Βασικού τύπου (Basal-like (HR-/HER2-):** Οι καρκινικοί όγκοι που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία αποκαλούνται και τριπλά αρνητικοί επειδή δεν εκφράζουν οιστρογονικούς (ER) και προγεστερονικούς (PR) υποδοχείς και είναι αρνητικοί στην έκφραση του υποδοχέα HER2. Η πλειονότητα (περίπου 75%) των τριπλών αρνητικών καρκίνων του μαστού ανήκουν στον υπότυπο βασικού τύπου που ορίζεται από το προφίλ γονιδιακής έκφρασης. Οι τριπλά αρνητικοί καρκίνοι του μαστού έχουν φτωχότερη πρόγνωση σε σύγκριση με τους άλλους υπότυπους, εν μέρει επειδή η θεραπευτική πρόοδος έχει καθυστερήσει σε σχέση με τους άλλους υποτύπους. Οι καρκινικοί όγκοι αυτού του τύπου εμφανίζονται με διπλάσιο ρυθμό στις έγχρωμες γυναίκες σε σύγκριση με τις λευκές γυναίκες στις ΗΠΑ και είναι περισσότερο συχνές σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και σε άτομα που φέρουν γονιδιακή μετάλλαξη BRCA1 (Sharma, 2016).

- **Εμπλουτισμένοι σε HER2 (HER2-enriched - HR-/HER2+):** Στο παρελθόν, αυτός ο τύπος καρκίνου είχε την χειρότερη πρόγνωση. Ωστόσο, η ευρεία χρήση των στοχευμένων θεραπειών για καρκίνους θετικούς στον HER2, έχουν πολύ βελτιωμένα αποτελέσματα για αυτούς τους ασθενείς (Wolff et al., 2019). Οι όγκοι αυτοί δεν εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς, ER και/ή PR.

Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα έχει εστιάσει στη μελέτη του μοριακού υπόβαθρου της ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού, των ογκογόνων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων που εμπλέκονται στην πυροδότηση της καρκινογένεσης και στους μηχανισμούς και στις ισορροπίες που διαταράσσονται με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων. Οι έρευνες έχουν δείξει ότι μεταξύ των γονιδίων που έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση της νόσου είναι: το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 (Cui and Donehower, 2000), η τοποϊσομεράση IIα, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και το γονίδιο της πρωτεΐνης Akt1 (Takeda, et al., 2004).

A.1.3.4 Σταδιοποίηση

Η σταδιοποίηση είναι ένας τρόπος περιγραφής του πόσο εκτεταμένος είναι ο καρκίνος του μαστού, συμπεριλαμβανομένου του μεγέθους του όγκου, της εξάπλωσης ή μη στους λεμφαδένες και της μετάστασής του σε άλλες θέσεις στο ανθρώπινο σώμα. Η σταδιοποίηση μπορεί να γίνει είτε πριν είτε μετά από την επέμβαση του ασθενή. Ο γιατρός μπορεί να χρησιμοποιήσει διάφορες διαγνωστικές εξετάσεις για να προσδιορίσει το στάδιο του καρκίνου, επομένως η σταδιοποίηση μπορεί να μην είναι πλήρης έως ότου ολοκληρωθούν όλες οι εξετάσεις. Η γνώση του σταδίου βοηθά τον γιατρό να αποφασίσει ποιο είδος θεραπείας είναι καλύτερο και μπορεί να βοηθήσει στην πρόβλεψη της πρόγνωσης του ασθενούς.

Συνεπώς, η επιλογή και ο σχεδιασμός της θεραπείας, η διατύπωση απόψεων σχετικά με την πρόγνωση της νόσου και η σύγκριση ερευνητικών δεδομένων, αποτελεσμάτων και κλινικών μελετών, βασίζονται στη σταδιοποίηση μιας νόσου. Επίσης ο κοινός τρόπος σταδιοποίησης του καρκίνου του μαστού προσφέρει μια παγκόσμια κοινή γλώσσα επικοινωνίας μεταξύ των

επαγγελματιών υγείας, οι οποίοι ασχολούνται με την φροντίδα αυτών των ασθενών. Υπάρχουν διαφορετικές περιγραφές σταδίων για διαφορετικούς τύπους καρκίνου.

Πίνακας 3: Σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού με βάση το σύστημα TNM

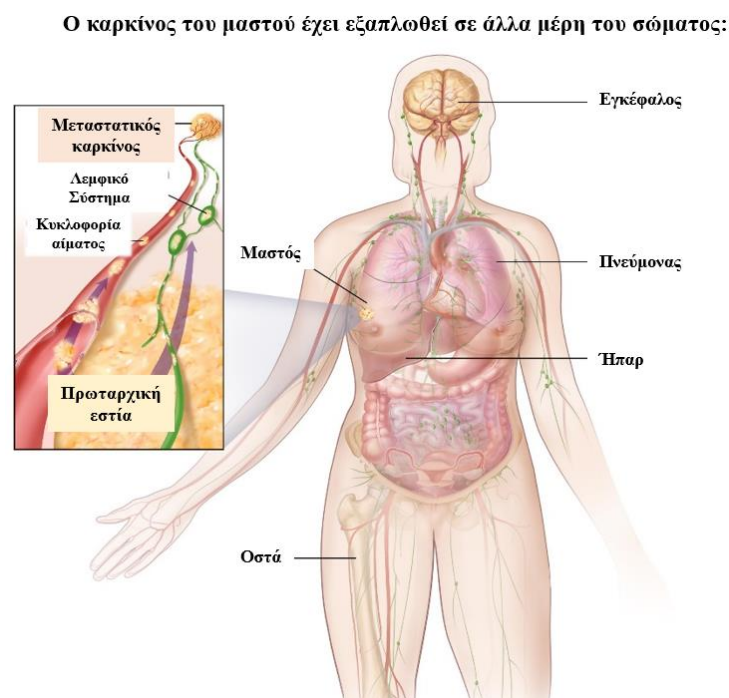
ΣΤΑΔΙΟ	ΠΡΩΤΟΠ. ΟΓΚΟΣ (T)	ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ (N)	ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ (M)
Ia	T1	N0	M0
Ib	T2	N0	M0
IIa	T3	N0	M0
IIb	T1,T2	N1	M0
IIIa	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T1,T2	N2	M0
IIIb	T3	N2	M0
IIIc	T4a	N1,N2	M0
	T4b	Οποιοδήποτε N	M0
	Οποιοδήποτε T	N3	M0
IV	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

Πίνακας 4: Περιγραφή των σταδίων του καρκίνου του μαστού (προσαρμοσμένο από: European society for medical oncology - <https://www.hesmo.gr/images/ESMO/ESMO-ACF-Greek-Breast-Cancer-Guide-for-Patients.pdf>)

Στάδιο	Ορισμός
Στάδιο 0	Τα ανώμαλα κύτταρα περιορίζονται ακόμα στους πόρους, όπου εμφανίστηκαν αρχικά.
Στάδιο I	Η διάμετρος του όγκου είναι μικρότερη από 2 cm και μικρές νησίδες καρκινικών κυττάρων μπορούν να ανευρεθούν στους λεμφαδένες*. Το στάδιο I του καρκίνου του μαστού χωρίζεται σε στάδιο IA και IB.
Στάδιο II	Η διάμετρος του όγκου είναι είτε μικρότερη από 2 cm και έχει επεκταθεί στους μασχालιαίους λεμφαδένες*, είτε είναι μεταξύ 2 και 5 cm, αλλά δεν έχει επεκταθεί στους μασχालιαίους λεμφαδένες. Το στάδιο II του καρκίνου του μαστού χωρίζεται σε στάδιο IIA και IIB.
Στάδιο III	Ο όγκος μπορεί να έχει οποιοδήποτε μέγεθος, αλλά: - έχει επεκταθεί είτε στο θωρακικό τοίχωμα και/ή στο υπερκείμενο δέρμα του μαστού - έχει επεκταθεί σε τουλάχιστον 10 μασχालιαίους λεμφαδένες* ή οι λεμφαδένες της μασχάλης είναι ενωμένοι μεταξύ τους ή με άλλους ιστούς, έχει επεκταθεί σε λεμφαδένες κοντά στο στήθος - έχει επεκταθεί σε λεμφαδένες κάτω ή πάνω από την κλείδα. Το στάδιο III του καρκίνου του μαστού χωρίζεται σε στάδιο IIIA, IIIB και IIIC.
Στάδιο IV	Ο καρκίνος έχει επεκταθεί σε άλλα όργανα του σώματος, πιο συχνά στα οστά, τους πνεύμονες, το ήπαρ ή τον εγκέφαλο. Τέτοιες απομακρυσμένες εναποθέσεις του όγκου ονομάζονται μεταστάσεις*.

Στον καρκίνο του μαστού χρησιμοποιείται ευρέως το σύστημα σταδιοποίησης TNM. Η σταδιοποίηση των όγκων του μαστού πραγματοποιείται με βάση το μέγεθος του πρωτογενούς όγκου (T), τη συμμετοχή επιχώριων λεμφαδένων (N) και την παρουσία ή μη απομακρυσμένων μεταστάσεων (M) (Edge et al., 2010). Τα αποτελέσματα συνδυάζονται για να προσδιορίσουν το στάδιο του καρκίνου για κάθε άτομο (**Πίνακας 3**).

Οι δύο μεγάλες κατηγορίες καρκίνου του μαστού περιλαμβάνουν το μη διηθητικό και το διηθητικό καρκίνο. Οι δύο τύποι διαφέρουν μεταξύ τους, τόσο στον τρόπο αντιμετώπισης όσο και στη έκβαση της νόσου, με τον πρώτο να είναι ιάσιμος στο 100% των περιπτώσεων, εάν αντιμετωπισθεί σωστά και έγκαιρα. Οι καρκίνοι του σταδίου 0 είναι μη διηθητικοί καρκίνοι και υπάρχουν δύο τύποι: το πορογενές καρκίνωμα *in situ* (DCIS) και το λοβιακό καρκίνωμα *in situ* (LCIS). Οι καρκίνοι των σταδίων I, II, III και IV ανήκουν στους διηθητικούς καρκίνους του μαστού (**Πίνακας 4**). Στο στάδιο IV ο καρκίνος έχει κάνει μεταστάσεις σε άλλα απομακρυσμένα όργανα του σώματος, πιο συχνά στα οστά, τους πνεύμονες, το ήπαρ ή τον εγκέφαλο (**Εικόνα 8**). Τέτοιες απομακρυσμένες εναποθέσεις του όγκου ονομάζονται μεταστάσεις.



Εικόνα 8: Μεταστάσεις καρκίνου του μαστού σταδίου IV (τροποποιημένο από:

<https://www.teresewinslow.com/>)

A.1.3.5 Διάγνωση

(α) Μαστογραφία: Η μαστογραφία είναι μια ακτινολογική μέθοδος η οποία επιτρέπει την απεικόνιση της μορφολογίας και της δομής των ανατομικών στοιχείων του μαστού και των παθολογικών αλλοιώσεων αυτού μέσω ακτίνων Χ. Τα πλεονεκτήματα της μαστογραφίας περιλαμβάνουν τη ανίχνευση πιθανών ανωμαλιών μέσω υπολογιστή με βάση αλγόριθμους που προειδοποιούν τον ακτινολόγο. Σε περιπτώσεις ψευδώς θετικών ευρημάτων πραγματοποιούνται επιπλέον απεικονίσεις ή ιστοπαθολογική αξιολόγηση, κυρίως διαδερμική βιοψία μαστού.

(β) Μαγνητική Τομογραφία (Magnetic Resonance Imaging - MRI): Η μαγνητική τομογραφία είναι μια ακτινολογική μέθοδος που παράγει εικόνες υψηλής ανάλυσης χωρίς να απαιτείται εφαρμογή επιβλαβούς ακτινοβολίας. Η μαγνητική τομογραφία του μαστού δεν χρησιμοποιείται συνήθως ως εξέταση ρουτίνας στη διάγνωση του καρκίνου του μαστού, καθώς θεωρείται ότι είναι συμπληρωματική στη διαγνωστική μαστογραφία (Kerlikowske et al., 2011). Παρά τη χαμηλή επιλεκτικότητά, η υψηλή ευαισθησία της μαγνητικής τομογραφίας επιτρέπει την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του μαστού και συμβάλλει στη σταδιοποίηση του και στην αξιολόγηση της θεραπείας (Sinha Sinha, 2009).

(γ) Μοριακή απεικόνιση μαστού (Molecular breast imaging - MBI): Το MBI χρησιμοποιεί ένα ραδιενεργό ιχνηθέτη που εντοπίζει τους καρκινικούς ιστούς του μαστού και στη συνέχεια γίνεται η απεικόνισή τους από έναν σαρωτή. Το MBI έχει συγκρίσιμη ευαισθησία με το MRI και υψηλότερη εξειδίκευση που μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και πολύ μικρές βλάβες του μαστού (O'Connor et al, 2009).

(δ) Βιοψία μαστού: Η οριστική επιβεβαίωση για τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού προέρχεται έπειτα από βιοψία του μαστού (Palmer and Tsangaris, 1993). Υπάρχουν διάφοροι τύποι βιοψιών μαστού. Για να αυξηθεί η διαγνωστική ακρίβεια και να εξαλειφθούν όσο το δυνατόν περισσότερα τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, πραγματοποιείται ταυτόχρονα κλινική εξέταση μαστού, απεικόνιση μαστού και βιοψία μαστού (τριπλή δοκιμή).

(ε) Βιοψία βελόνης: Δύο τύποι βιοψιών βελόνης χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού: κυτταρολογία αναρρόφησης δια λεπτής βελόνης (fine needle aspiration cytology - FNAC) και βιοψία με κόπτουσα βελόνη (core needle biopsy - CNB). Η FNAC είναι η λιγότερο επεμβατική μέθοδος βιοψίας του μαστού. Με την βιοψία FNAC, μια λεπτή, κοίλη βελόνα εισάγεται στο μαστό για να απομονώσει κύτταρα από την ύποπτη βλάβη και να υποβληθούν σε εργαστηριακή ανάλυση. Η FNAC μπορεί να διεξαχθεί γρήγορα και εύκολα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της καταλληλότητας του δείγματος (Chaiwun and Thorner, 2007). Κατά τη CNB χρησιμοποιείται μεγαλύτερη βελόνα από ότι στη FNAC και αντί κυττάρων, αφαιρείται έναν μικρό κομμάτι ιστού περίπου στο μέγεθος ενός κόκκου ρυζιού. Στη συνέχεια, τα δείγματα του ιστού αναλύονται από έναν εξειδικευμένο παθολόγο για την εύρεση πιθανών κακοηθών κυττάρων (Neal, et al., 2014).

(στ) Δοκιμασία ανίχνευσης HER-2: Η ανίχνευση του HER-2 πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση τεχνικών ανοσοϊστοχημείας ή με την τεχνική του φθορίζοντα *in situ* υβριδισμού (FISH test). Με τις τεχνικές ανοσοϊστοχημείας μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντισώματα ως εργαλεία για την ανίχνευση της πρωτεϊνικής έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Τα μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα είναι συμπληρωματικά με το υπο μελέτη αντιγόνο και μπορούν να επισημανθούν με κατάλληλους δείκτες (ορατούς είτε με μικροσκοπία φωτός είτε με φθορισμό), επιτρέποντας την ανίχνευση και τον εντοπισμό των αντισωμάτων που συνδέονται με την επιθυμητή πρωτεΐνη. Οι παραπάνω τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανίχνευση δεικτών που σχετίζονται με συγκεκριμένους τύπους καρκίνου. Η τεχνική FISH χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό της παρουσίας συγκεκριμένων χρωμοσωμάτων ή χρωμοσωμικών περιοχών μέσω υβριδοποίησης με ανιχνευτές DNA, με τη χρήση φθορισμού. Στη συνέχεια, η ανίχνευση φθορίζοντος σήματος επιβεβαιώνει την παρουσία του αντίστοιχου χρωμοσωμικού τμήματος (Kroese et al., 2007).

(ζ) Ανίχνευση βιοδεικτών στο αίμα: Οι βιοδείκτες του καρκίνου του μαστού είναι το καρκινικό αντίγόνο CA 15-3, το καρκινοεμβρυονικό αντιγόνο (CEA) και το καρκινικό αντίγόνο CA 27-29. Οι βιοδείκτες αυτοί επιδεικνύουν χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα και επομένως δεν βοηθούν στην

έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου του μαστού. Η Αμερικανική Εταιρεία Κλινικής Ογκολογίας (American Society of Clinical Oncology – ASCO) συνιστά τη χρήση τους σε ασθενείς με μεταστατικούς όγκους του μαστού.

A.1.3.6 Θεραπεία

Για το σχεδιασμό της θεραπείας του καρκίνου συνεργάζονται γιατροί που ειδικεύονται σε διάφορους τομείς της θεραπείας του καρκίνου όπως στις χειρουργικές επεμβάσεις και στην ογκολογική ακτινοβολία, με ακτινολόγους και παθολόγους για να δημιουργήσουν ένα ολικό θεραπευτικό σχέδιο για τον ογκολογικό ασθενή που συνδυάζει διαφορετικούς τύπους θεραπείας. Οι ομάδες φροντίδας του καρκίνου λοιπόν είναι διεπιστημονικές και αποτελούνται, εκτός από ιατρούς, από μια ποικιλία άλλων επαγγελματιών υγείας, όπως βοηθοί ιατρών, νοσηλευτές, ογκολογικοί νοσοκόμοι, κοινωνικοί λειτουργοί, φαρμακοποιοί, σύμβουλοι, διατροφολόγοι και άλλοι. Οι αποφάσεις για το θεραπευτικό σχήμα που θα ακολουθηθεί λαμβάνονται μετά από αξιολόγηση του σταδίου και των βιολογικών χαρακτηριστικών του καρκινικού όγκου (ορμονικοί υποδοχείς, υποδοχέας HER2), της ηλικίας του ασθενούς, της εμμηνοπαυσιακής κατάστασης και καθώς και των κινδύνων που σχετίζονται με κάθε θεραπευτική επιλογή (Moo et al., 2018).

(α) Χειρουργική επέμβαση

Παρόλο που οι θεραπείες για τον καρκίνο του μαστού γίνονται ολοένα και αποτελεσματικότερες και πιο εξατομικευμένες, η χειρουργική επέμβαση παραμένει η θεραπεία φάρος στην πλειονότητα των καρκίνων του μαστού. Οι περισσότερες γυναίκες με καρκίνο του μαστού υποβάλλονται σε κάποιο είδος χειρουργικής επέμβασης ως μέρος της θεραπείας τους. Υπάρχουν διάφοροι τύποι χειρουργικής επέμβασης του μαστού και μπορεί να γίνουν για διαφορετικούς λόγους, ανάλογα με την κλινική κατάσταση του ασθενούς. Η χειρουργική επέμβαση μπορεί να γίνει για τους παρακάτω λόγους (Mascaro et al., 2010):

- **Αφαίρεση** όσο το δυνατόν μεγαλύτερου μέρους του όγκου (χειρουργική επέμβαση διατήρησης του μαστού ή μαστεκτομή)

- **Διάγνωση** της πιθανής εξάπλωσης του καρκίνου στους λεμφαδένες (βιοψία λεμφαδένα φρουρού ή τομή μασχαλιαίων λεμφαδένων)
- **Ανάπλαση** του σχήματος του μαστού μετά την αφαίρεση του όγκου (ανάπλαση μαστού)
- **Ανακούφιση** του ασθενούς από τα συμπτώματα του προχωρημένου καρκίνου

Η χειρουργική επέμβαση διατήρησης του μαστού (μερική μαστεκτομή ή τμηματική μαστεκτομή) είναι μια χειρουργική επέμβαση στην οποία αφαιρείται μόνο το τμήμα του μαστού που υπάρχει ο όγκος (Marla and Stallard, 2009). Ο στόχος είναι η απομάκρυνση του όγκου, καθώς και ορισμένων παρακείμενων φυσιολογικών ιστών, με σκοπό τη διατήρηση του μαστού και την αποφυγή ως εκ τούτου του φυσικού και ψυχικού ακρωτηριασμού του ασθενούς. Στις περιπτώσεις που ο καρκίνος είναι προχωρημένου σταδίου θα χρειαστεί επίσης και ακτινοθεραπεία. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η μαστεκτομή μπορεί να είναι μια καλύτερη επιλογή, λόγω του τύπου του καρκίνου του μαστού, του μεγάλου μεγέθους του όγκου ή της προηγούμενης θεραπείας με ακτινοβολία. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθενείς που υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση διατήρησης του μαστού συνδυαστικά με ακτινοβολία έχουν ίδια ποσοστά επιβίωσης με αυτούς που υποβάλλονται σε μαστεκτομή (Tang et al., 2018).

Η διάγνωση της πιθανής εξάπλωσης του καρκίνου στους λεμφαδένες γίνεται μετά από αφαίρεση και βιοψία των λεμφαδένων και είναι σημαντική για τον προσδιορισμό του σταδίου και της έκτασης του καρκίνου. Οι λεμφαδένες μπορούν να αφαιρεθούν είτε ως μέρος της χειρουργικής επέμβασης για την απομάκρυνση του όγκου, είτε ως ξεχωριστή επέμβαση. Πολλές γυναίκες που έχουν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση για καρκίνο του μαστού μπορεί να έχουν την επιλογή της ανάπλασης του μαστού. Υπάρχουν διάφοροι τύποι επανορθωτικής χειρουργικής του μαστού και μπορεί να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονα με τη χειρουργική επέμβαση του καρκίνου ή σε δεύτερο χρόνο (Rowland, 2000).

Παρόλο που η χειρουργική επέμβαση είναι σχεδόν απίθανο να θεραπεύσει τον καρκίνο του μαστού που έχει εξαπλωθεί σε άλλα μέρη του σώματος, μπορεί να είναι χρήσιμη είτε για την επιβράδυνση της εξάπλωσης του καρκίνου, είτε για την πρόληψη και την ανακούφιση των

συμπτωμάτων. Για παράδειγμα, η χειρουργική επέμβαση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ενός μικρού αριθμού μεταστάσεων σε ένα συγκεκριμένο μέρος του σώματος, όπως ο εγκέφαλος, όταν μια περιοχή εξάπλωσης πιέζει τον νωτιαίο μυελό και παρέχει ανακούφιση από τον πόνο ή από άλλα συμπτώματα (Benjamin, 2014).

(β) Ακτινοθεραπεία

Η ακτινοθεραπεία είναι η χρήση ιοντιζουσών ακτινοβολιών (φωτονίων, ηλεκτρονίων, πρωτονίων κλπ.) για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων με ταυτόχρονη, όσο τον δυνατόν μεγαλύτερη, προφύλαξη των γειτονικών φυσιολογικών ιστών. Κατά την ακτινοβολήση, η παραγόμενη ακτινοβολία εναποθέτει ενέργεια στα κύτταρα των ιστών από τους οποίους διέρχεται. Σκοπός είναι η ενέργεια αυτή να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα ή να τους προκαλέσει μεταλλάξεις, οι οποίες θα τα οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο. Στον μηχανισμό καταστροφής των καρκινικών κυττάρων εμπλέκονται οι ελεύθερες ρίζες, οι οποίες δημιουργούνται μέσω της απορρόφησης των ιοντιζουσών ακτινοβολιών από τα βιολογικά μόρια και μπορούν να καταστρέψουν τα κύτταρα λόγω της υψηλής δραστηρότητας τους.

Η ακτινοθεραπεία στον καρκίνο του μαστού εφαρμόζεται σε διάφορες καταστάσεις όπως (Cox and Swanson, 2013):

- Μετά τη χειρουργική επέμβαση διατήρησης του μαστού, για να μειωθεί η πιθανότητα εμφάνισης του καρκίνου στον ίδιο μαστό ή σε κοντινούς λεμφαδένες.
- Μετά από μαστεκτομή, ειδικά εάν ο καρκίνος ήταν μεγαλύτερος από 5 cm ή εάν ο καρκίνος εντοπίζεται σε περισσότερους από έναν λεμφαδένες
- Όταν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε άλλα μέρη του σώματος, όπως τα οστά ή τον εγκέφαλο.

Οι δύο βασικοί τύποι ακτινοθεραπείας που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού είναι η εξωτερική ακτινοθεραπεία και η βραχυθεραπεία. Στην εξωτερική θεραπεία, η ακτινοθεραπεία πραγματοποιείται με ειδικούς επιταχυντές που παράγουν υψηλής ενέργειας ακτίνες X, ή ηλεκτρόνια και είναι εντοπισμένη ακριβώς στην περιοχή του όγκου-στόχου. Στη βραχυθεραπεία, η θεραπεία πραγματοποιείται με την τοποθέτηση ραδιενεργών πηγών σε

κοιλότητες του σώματος μέσα στον όγκο ή δίπλα του με στόχο την στοχευμένη ακτινοβολήση του όγκου σε μεγάλες δόσεις (Weichselbaum et al., 2017).

Το βασικό μειονέκτημα της ακτινοθεραπείας είναι ότι η ακτινοβολία βλάπτει και τα υγιή κύτταρα με αποτέλεσμα να υπάρχουν σε κάποιους ασθενείς σοβαρές παρενέργειες. Παρόλα αυτά, γίνονται συνεχώς βελτιώσεις στις χρησιμοποιούμενες μεθόδους ακτινοβολήσης και στο σχεδιασμό της κατανομής της δόσης (treatment planning) που περιορίζουν όλο και περισσότερο τις βλάβες στους υγιείς ιστούς καταστρέφοντας πιο στοχευμένα τα καρκινικά κύτταρα.

(γ) Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία περιλαμβάνει τη χορήγηση στον ασθενή αντικαρκινικών φαρμάκων ενδοφλεβίως ή από το στόμα. Τα φάρμακα μεταφέρονται, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, στα περισσότερα μέρη του σώματος, με στόχο να θανατώσουν τα καρκινικά κύτταρα. Κάποιες φορές, τα χημειοθεραπευτικά μπορεί να χορηγηθούν απευθείας στο νωτιαίο υγρό που περιβάλλει τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό. Η χημειοθεραπεία στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού ακολουθείται συνήθως στις παρακάτω περιπτώσεις:

- **Μετά από χειρουργική επέμβαση (ανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία):** Στην περίπτωση αυτή η ανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία στοχεύει στην εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων που δεν αφαιρέθηκαν με τη χειρουργική επέμβαση ή καρκινικών κυττάρων που μπορεί να έχουν εξαπλωθεί αλλά να μην είναι ορατά ακόμη και σε απεικονιστικές εξετάσεις. Εάν τα κύτταρα αυτά δεν εξαλειφθούν, είναι πιθανό να σχηματίσουν νέους όγκους σε άλλα μέρη του σώματος. Η ανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο επανεμφάνισης του καρκίνου του μαστού.
- **Πριν από τη χειρουργική επέμβαση (νέο-ανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία):** Η νέο-ανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία μπορεί να χορηγηθεί για να συρρικνωθεί ο όγκος, ώστε να γίνει λιγότερο εκτεταμένη χειρουργική επέμβαση και χρησιμοποιείται συχνά για τη θεραπεία όγκων που είναι πολύ μεγάλοι για να αφαιρεθούν με χειρουργική επέμβαση όταν διαγνώστηκαν για πρώτη φορά (τοπικά προχωρημένοι καρκίνοι). Επίσης, κατά τη χορήγηση χημειοθεραπείας πριν απομακρυνθεί ο όγκος, οι γιατροί

μπορούν να έχουν μια αρχική εικόνα για το πώς ανταποκρίνονται τα καρκινικά κύτταρα του όγκου στη συγκεκριμένη θεραπεία. Η νέο-ανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία, όπως και η ανοσοενισχυτική, μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο επανεμφάνισης του καρκίνου του μαστού.

- **Για προχωρημένο καρκίνο του μαστού:** Η χημειοθεραπεία είναι η κύρια θεραπεία στις περιπτώσεις που ο καρκίνος είναι προχωρημένου σταδίου και έχει εξαπλωθεί εκτός του μαστού και της μασχαλιαίας περιοχής.

Στην νέο-ανοσοενισχυτική και στην ανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία χορηγούνται συνήθως οι εξής κατηγορίες φαρμάκων: ανθρακυκλίνες (δοξορουβικίνη και επιρουβικίνη), ταξάνες (πακλιταξέλη και δοσεταξέλη), η 5-φθοριοουρακίλη ή καπεσιταβίνη, το κυκλοφωσφαμίδιο και η καρβοπλατίνη (carboplatin) που είναι μία σύμπλοκη ένωση πλατίνας με αντινεοπλασματική δράση. Στις περιπτώσεις καρκίνου του μαστού προχωρημένου σταδίου χορηγούνται ταξάνες, ανθρακυκλίνες, βινoreλβίνη, καπεσιταβίνη, γεμισιταβίνη, ιξαβεπιλόνη, εριβουλίνη και ενώσεις της πλατίνας όπως η σισπλατίνη και η καρβοπλατίνη (Tong et al., 2018). Στις περιπτώσεις νέο-ανοσοενισχυτικής και ανοσοενισχυτικής χημειοθεραπείας χρησιμοποιούνται τις περισσότερες φορές συνδυασμοί των παραπάνω φαρμάκων. Αντίθετα, στους όγκους του μαστού προχωρημένου σταδίου, τα χημειοθεραπευτικά χρησιμοποιούνται συνήθως μεμονωμένα. (Schirmacher, 2019). Ο τρόπος δράσης των πιο διαδεδομένων χημειοθεραπευτικών αναφέρεται στον **Πίνακα 5**.

Η χημειοθεραπεία είναι μια κυκλική θεραπεία με ενδιάμεσα κενά, για να προλάβει ο ασθενής να ανακάμψει από τις παρενέργειες των φαρμάκων. Οι κύκλοι διαρκούν συνήθως 2 με 3 εβδομάδες, ανάλογα με τα χημειοθεραπευτικά που χορηγούνται. Η νέο-ανοσοενισχυτική και η ανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία διαρκούν συνήθως συνολικά 3 έως 6 μήνες, ανάλογα με τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται. Η διάρκεια της θεραπείας για προχωρημένο καρκίνο του μαστού εξαρτάται από το πόσο αποτελεσματικά είναι τα χημειοθεραπευτικά, αλλά και από την βαρύτητα των παρενεργειών που έχουν στον ασθενή.

Πίνακας 5: Παραδείγματα αντικαρκινικών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και τρόπος δράσης

Αντικαρκινικό φάρμακο	Τρόπος δράσης	Παραπομπές
ανθρακυκλίνες	αναστολή σύνθεσης DNA, RNA και πρωτεϊνών (σχηματισμός συμπλόκου με το DNA με παρεμβολή ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων των νουκλεοτιδίων)	(Yaqub, 2013)
ταξάνες	αποδόμηση ή αναστολή της φυσιολογικής δυναμικής της αναδιοργάνωσης του δικτύου μικροσωληνίσκων	Abal et al., 2003
5-φθοριοουρακίλη	μείωση της σύνθεσης και της επιδιόρθωσης του DNA (ανταγωνιστής της πυριμιδίνης), άρα μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού	Longley et al., 2003
καπεσιταβίνη	παρεμπόδιση της σύνθεσης του DNA (αντίδραση μεθυλίωσης του δεοξυουριδικού οξέος σε θυμιδυλικό οξύ) του RNA και άρα της πρωτεϊνοσύνθεσης	Walko & Lindley, 2005
κυκλοφωσφαμίδη	επίδραση στις φάσεις G2 ή S του κυτταρικού κύκλου	Ahmed and Hombal, 1984
Ενώσεις πλατίνας	αναστολή της σύνθεσης του DNA (σχηματισμός συμπλόκου)	Dasari and Bernard, 2014, Sousa et al, 2014
βινορελβίνη	διαταραχή της οργάνωσης και της λειτουργίας των μικροσωληνίσκων	Gregory and Smith, 2000
γεμισιταβίνη	αναστολή της σύνθεσης του DNA (αντιμεταβολίτης της πυριμιδίνης)	Mini et al., 2006
ιξαβεπιλόνη	διαταραχή της οργάνωσης και της λειτουργίας των μικροσωληνίσκων	Lopus et al., 2015
εριβουλίνη	διαταραχή της οργάνωσης και της λειτουργίας των μικροσωληνίσκων	O'Shaughnessy et al., 2019

(δ) Ορμονική / Ενδοκρινική θεραπεία

Ο καρκίνος του μαστού χαρακτηρίζεται ως ένας από τους ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους. Η ενδοκρινική θεραπεία, όπως η θεραπεία με αντι-οιστρογόνα ή η απομάκρυνση των οιστρογόνων, είναι η θεραπεία επιλογής για ασθενείς με καρκίνο του μαστού όταν εκφράζονται υποδοχείς

οιστρογόνων και / ή υποδοχείς προγεστερόνης (PR). Περίπου 2 στους 3 καρκίνους του μαστού εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς. Η κλινική χρησιμότητα της ενδοκρινικής θεραπείας είναι αποδεδειγμένη στην πρόληψη και σε καταστάσεις ανοσοενίσχυσης, νέο-ανοσοενίσχυσης και μετάστασης. Η ενδοκρινική ευαισθησία, που αξιολογείται από την έκφραση ER και / ή PR, αποτελεί τον μοναδικό αναγνωρισμένο και επικυρωμένο προγνωστικό παράγοντα για την επιλογή των θεραπευτικών αποφάσεων, καθώς το όφελος της ενδοκρινικής θεραπείας περιορίζεται στους ασθενείς με όγκους που εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς (Rastelli and Crispino, 2008).

Στην κλινική πράξη, ο βαθμός της ενδοκρινικής ευαισθησίας του όγκου, ποσοτικοποιείται με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας (IHC) και μπορεί να εκφραστεί ως το ποσοστό των κυττάρων που χρωματίστηκαν μετά από κατεργασία με αντισώματα αντι-ER / PR (Phillips et al., 2007). Οι όγκοι που τουλάχιστον το 10% των κυττάρων τους, εκφράζουν ER / PR θεωρούνται δυνητικά ενδοκρινικά ευαίσθητοι (Lonning, 2007). Η αξία του υποδοχέα HER2 στην καθοδήγηση των αποφάσεων σχετικά με την ενδοκρινική θεραπεία δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, αλλά έχει τεθεί στην κλινική πρακτική ως αιτιολόγηση για την επιλογή της θεραπείας απομάκρυνσης των οιστρογόνων έναντι της θεραπείας με αντιοιστρογόνα. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι όγκοι HER-2 +, μπορεί να είναι λιγότερο ευαίσθητοι σε ενδοκρινικές θεραπείες και συγκεκριμένα, στην ταμοξιφαίνη (Briest and Stearns, 2009; Nagaraj and Ma, 2015). Το γεγονός αυτό, πιθανολογείται ότι οφείλεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των μεταβολικών μονοπατιών των ER και των HER-2 (Ellis et al., 2001) και στην ανίχνευση χαμηλότερων επιπέδων ER όταν ο HER-2 υπερεκφράζεται (De Placido et al., 2003).

Η ορμονική θεραπεία χρησιμοποιείται συνήθως μετά από χειρουργική επέμβαση (ως ανοσοενισχυτική θεραπεία) για τη μείωση του κινδύνου επανεμφάνισης του καρκίνου. Μερικές φορές ξεκινάει πριν από τη χειρουργική επέμβαση ως νέο-ανοσοενισχυτική θεραπεία, για τη μείωση του μεγέθους του πρωτογενούς όγκου πριν από τη ριζική χειρουργική επέμβαση ή την ακτινοθεραπεία, καθώς και για την ανακούφιση και τη συρρίκνωση προχωρημένων όγκων και την βελτίωση της ποιότητας ζωής (Abraham and Staffurth, 2016). Η ενδοκρινική θεραπεία είναι ιδιαίτερα

αποτελεσματική σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο, με υψηλά ποσοστά απόκρισης (Brufsky, 2017).

Στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, η καταστολή των οιστρογόνων επιτυγχάνεται με χημικούς παράγοντες, με χρήση ακτινοβολίας στις ωοθήκες ή με χειρουργική αφαίρεση των ωοθηκών. Η χημική καταστολή είναι αναστρέψιμη και επιτυγχάνεται με τη χορήγηση ανταγωνιστών της γοναδοτροπικής εκλυτικής ορμόνης (GnRHa) όπως η γοσερελίνη, συνήθως με μηνιαία έγχυση. Σήμερα υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός επιλογών ορμονικής θεραπείας για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, ενώ οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες θεραπείες περιλαμβάνουν την ταμοξιφαίνη και τους αναστολείς αρωματάσης (Rugo et al., 2016).

- **Ταμοξιφαίνη:** Η ταμοξιφαίνη είναι ένας εκλεκτικός τροποποιητής των ERs με ποικίλες δράσεις, καθώς εμφανίζει ένα σύνθετο φάσμα αντι-οιστρογονικών και οιστρογονικών φαρμακολογικών δράσεων (Swain, 1996). Οι μελέτες έχουν δείξει ότι σε πρώιμους καρκίνους του μαστού θετικούς σε ER, η χρόνια χορήγηση ταμοξιφαίνης μετά τη χειρουργική επέμβαση, μειώνει το ποσοστό της ετήσιας υποτροπής κατά 41% και το ετήσιο ποσοστό θνησιμότητας κατά 34% (Davies et al., 2013). Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις μείωσης του ποσοστού υποτροπής και θνησιμότητας του καρκίνου του μαστού στην περίπτωση που συνεχιστεί η χορήγηση ταμοξιφαίνης για 10 χρόνια σε ασθενείς με ER-θετικούς όγκους, σε σχέση με αυτούς που σταμάτησε η χορήγηση στην πενταετία (Peto, (1996).
- **Αναστολείς αρωματάσης (AIs):** Πολλές κλινικές δοκιμές Φάσης III που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν καθιερώσει τους AIs τρίτης γενιάς ως το νέο «όπλο» της ανοσοενισχυτικής ορμονικής θεραπείας του πρώιμου καρκίνου του μαστού που είναι θετικός σε ορμονικούς υποδοχείς. Οι παράγοντες αυτοί αντενδείκνυνται σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, εκτός και εάν έχει προηγηθεί αφαίρεση των ωοθηκών. Υπάρχουν τρεις κύριες θεραπευτικές προσεγγίσεις για τον πρώιμο καρκίνο του μαστού: (α) εκ των προτέρων (up-front) χορήγηση για 5 χρόνια, (β) προγραμματισμένη ή μη προγραμματισμένη εναλλαγή (switching), δηλαδή χρήση των AIs για 2-3 χρόνια μετά από χορήγηση για 2-3 χρόνια ταμοξιφαίνης, (γ) παρατεταμένη θεραπεία (extended therapy), δηλαδή για παράδειγμα μετά από χρήση 5 ετών ταμοξιφαίνης (Abraham and Staffurth, 2016). Μια νέα θεραπευτική

προσέγγιση είναι η χρήση AIs σε συνδυασμό με αναστολείς μεταγωγής σημάτων ή μοριακών μονοπατιών. Παράδειγμα αποτελεί το αντικαρκινικό φάρμακο εβερόλιμους (everolimus), ένας εκλεκτικός αναστολέας της κινάσης mTOR, που έχει εγκριθεί και χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την εξεμεστάνη (exemestane) στους μεταστατικούς καρκίνους του μαστού (Baselga et al., 2012).

Δυστυχώς, η ανθεκτικότητα στην ορμονοθεραπεία αναπτύσσεται, με το πέρασμα του χρόνου, σε όλους σχεδόν τους ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού και του προστάτη που αρχικά ανταποκρίνονται στην ορμονική θεραπεία. Ο μοριακός μηχανισμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας δεν είναι ακόμα καλά κατανοητός, αλλά φαίνεται να περιλαμβάνει την αυξημένη ευαισθησία των ορμονικών υποδοχέων, την ενεργοποίηση του μονοπατιού χωρίς έκθεση σε ορμόνες ή ανοδικά ρυθμιζόμενα μονοπάτια επιβίωσης (Abraham and Staffurth, 2016). Η επιστημονική κοινότητα κάνει προσπάθειες αποσαφήνισης των μηχανισμών αυτών, με στόχο την ανάπτυξη νέων παραγόντων απέναντι στους οποίους οι όγκοι θα αδυνατούν να αναπτύξουν ανθεκτικότητα.

(ε) Ανοσοθεραπεία

Ένα από τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων, όπως προαναφέρθηκε, είναι η αποφυγή της καταστροφής τους από το ανοσοποιητικό σύστημα. Το ανοσοποιητικό σύστημα διαδραματίζει διττό ρόλο στον καρκίνο. Από τη μία πλευρά, μπορεί να καταστέλλει την ανάπτυξη του όγκου καταστρέφοντας τα καρκινικά κύτταρα ή αναστέλλοντας την ανάπτυξή τους, αλλά από την άλλη μπορεί να προάγει την εξέλιξη του όγκου είτε επιλέγοντας καρκινικά κύτταρα που είναι πιο πιθανό να επιβιώσουν ή δημιουργώντας τις κατάλληλες συνθήκες μέσα στο μικροπεριβάλλον του όγκου που διευκολύνουν την ανάπτυξή του (Bayraktar et al., 2019).

Η ανοσοθεραπεία είναι η χρήση φαρμάκων για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος ενός ατόμου, ώστε να αναγνωρίζει και να καταστρέφει αποτελεσματικότερα τα καρκινικά κύτταρα. Η ανοσοθεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ορισμένων τύπων καρκίνου του μαστού καθώς ένα μέρος της φυσιολογικής του λειτουργίας είναι να ανιχνεύει και να καταστρέφει τα ανώμαλα κύτταρα και ως επακόλουθο να αποτρέπει ή να περιορίζει την ανάπτυξη πολλών όγκων. Για παράδειγμα, ανοσοκύτταρα εντοπίζονται πολλές φορές μέσα και γύρω από

όγκους. Αυτά τα κύτταρα, που ονομάζονται λεμφοκύτταρα διηθούνται τον όγκο (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs), αποτελούν μια ένδειξη ότι το ανοσοποιητικό σύστημα αποκρίνεται στον όγκο. Οι όγκοι που εμφανίζουν TILs συχνά έχουν καλύτερη πρόγνωση και ανταποκρίνονται στις θεραπείες.

Παρόλο που το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να αποτρέψει ή να επιβραδύνει την ανάπτυξη του καρκίνου, τα καρκινικά κύτταρα έχουν τρόπους να αποφύγουν την καταστροφή από το ανοσοποιητικό σύστημα. Για παράδειγμα, τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να έχουν γενετικές αλλοιώσεις οι οποίες τα καθιστούν λιγότερο ορατά στο ανοσοποιητικό σύστημα, να έχουν πρωτεΐνες στην επιφάνειά τους που απενεργοποιούν τα ανοσοκύτταρα ή να προκαλούν μεταβολές στα γειτονικά φυσιολογικά κύτταρα με αποτέλεσμα να επηρεάζουν τον τρόπο με τον οποίο το ανοσοποιητικό σύστημα ανταποκρίνεται στα καρκινικά κύτταρα. Η ανοσοθεραπεία βοηθά το ανοσοποιητικό σύστημα να δρα καλύτερα έναντι των καρκινικών κυττάρων και περιλαμβάνει τους παρακάτω βασικούς τύπους:

(α) Αναστολείς Σημείων Ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος: είναι φάρμακα που εμποδίζουν τα σημεία ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα σημεία ελέγχου είναι μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος και αποτρέπουν τις ανοσοαποκρίσεις από το να είναι πολύ ισχυρές. Οι αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος είναι μονοκλωνικά αντισώματα που αποκλείουν τους αναστολείς της ενεργοποίησης και λειτουργίας των T κυττάρων και με αυτό τον τρόπο επιτρέπουν στα ανοσοκύτταρα να ανταποκρίνονται πιο έντονα στον καρκίνο.

(β) Θεραπεία μεταφοράς T-κυττάρων: είναι μια θεραπεία που ενισχύει τη φυσική ικανότητα των T-λεμφοκυττάρων να καταπολεμούν τα καρκινικά κύτταρα. Τα ανοσοκύτταρα λαμβάνονται από τον όγκο του ασθενούς και επιλέγονται τα πιο επιθετικά από αυτά ή τροποποιούνται εργαστηριακά για να γίνουν πιο επιθετικά έναντι των καρκινικών κυττάρων και τέλος επανατοποθετούνται στο σώμα ενδοφλεβίως. Η θεραπεία αυτή ονομάζεται και θετή κυτταρική ανοσοθεραπεία.

(γ) Μονοκλωνικά αντισώματα: είναι πρωτεΐνες του ανοσοποιητικού συστήματος που δημιουργούνται στο εργαστήριο και έχουν σχεδιαστεί ώστε να συνδέονται σε συγκεκριμένους στόχους στα καρκινικά κύτταρα. Μερικά μονοκλωνικά αντισώματα σηματοδοτούν τα καρκινικά κύτταρα

έτσι ώστε να είναι καλύτερα ορατά στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και να διευκολύνεται η καταστροφή τους. Τα μονοκλωνικά αντισώματα ονομάζονται επίσης και θεραπευτικά αντισώματα.

(δ) Θεραπευτικά εμβόλια: λειτουργούν κατά των καρκινικών όγκων ενισχύοντας την απόκριση του ανοσοποιητικού σας συστήματος έναντι των καρκινικών κυττάρων.

(ε) Ρυθμιστές ανοσοποιητικού συστήματος: ενισχύουν την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού έναντι των καρκινικών κυττάρων. Μερικοί από αυτούς τους παράγοντες επηρεάζουν συγκεκριμένα μέρη του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ άλλοι επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα με έναν πιο καθολικό τρόπο.

Οι συμβατικές θεραπείες όπως η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία μπορούν επίσης να επηρεάζουν το ανοσολογικό περιβάλλον του όγκου και αυξάνουν τον αριθμό των Τ-κυττάρων που διακινούνται στους όγκους. Η ακτινοθεραπεία μπορεί να αυξήσει την έκκριση κυτοκινών τύπου Ι, αυξάνει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης στα ανοσοκύτταρα και την έκφραση των μορίων του συμπλέγματος μείζονος ιστοσυμβατότητας στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων (Shiao et al., 2010). Οι παραπάνω τροποποιήσεις εξυπηρετούν την προσέλκυση κυττάρων που παρουσιάζουν αντιγόνα στην περιοχή του όγκου και διεγείρουν τα ειδικά στα αντιγόνα Τ-λεμφοκύτταρα. Πολλές χημειοθεραπείες που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία του καρκίνου του μαστού είναι επίσης ικανές να ενισχύσουν την ειδική για τον όγκο ανοσοαπόκριση (Zitvogel, 2013). Όσο περισσότερο προσδιορίζονται τα ανοσολογικά αποτελέσματα των συμβατικών θεραπευτικών παραγόντων, θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν με μεγαλύτερη επιτυχία σε συνδυασμό με άλλους θεραπευτικούς παράγοντες.

Ο αριθμός των νέων θεραπευτικών παραγόντων και προσεγγίσεων για την ανοσιακή ρύθμιση του καρκίνου του μαστού, αυξάνεται συνεχώς. Αν και ορισμένοι υπότυποι καρκίνου του μαστού μπορεί να αντιμετωπίζονται πιο εύκολα με ανοσοθεραπεία από άλλους, είναι σημαντικό ότι σχεδόν όλοι οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού εμφανίζουν κάποιες ενδείξεις προσαρμοστικής ανοσοαπόκρισης είτε στο περιφερικό αίμα είτε στον ίδιο τον όγκο. Ο καλύτερος τρόπος για να

διασφαλιστεί το όφελος της ανοσοθεραπείας για όλους τους ασθενείς φαίνεται να είναι ο συνδυασμός θεραπευτικών παραγόντων, με βάση τα κύρια στοιχεία του ανοσοποιητικού μικροπεριβάλλοντος του ασθενούς (Disis and Stanton, 2018).

1.3.7 Οιστρογόνα και οιστρογονικοί υποδοχείς στον καρκίνο του μαστού

Είναι γνωστό ότι τα οιστρογόνα αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για τη φυσιολογία του οργανισμού. Τα οιστρογόνα εμπλέκονται στην ανάπτυξη, στη διαφοροποίηση και στη λειτουργία των ιστών του αναπαραγωγικού συστήματος των γυναικών όπως των μαστών, της μήτρας, του κόλπου και των ωοθηκών, αλλά και των ανδρών όπως των όρχεων, της επιδιδυμίδας και του προστάτη. Επιπλέον, συμβάλλουν στη διατήρηση της οστικής μάζας, στην παραγωγή παραγόντων πήξης και άλλων πρωτεϊνών του ορού, καθώς και στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων. Στον εγκέφαλο επάγουν την απελευθέρωση των γοναδοτροπινών, ρυθμίζουν την ψυχική διάθεση και συμπεριφορά και πιθανά, επιβραδύνουν την έναρξη και εξέλιξη της νόσου του Alzheimer (Hamilton et al., 2017).

Στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες τα οιστρογόνα εκκρίνονται σε μεγάλα ποσά από τις ωοθήκες, ενώ στις μετεμμηνοπαυσιακές παράγονται από τη μετατροπή των ανδρογόνων, που σχηματίζονται στα επινεφρίδια και τις ωοθήκες, σε οιστρογόνα με την επίδραση του ενζύμου αρωματάση. Η μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα λαμβάνει χώρα σε πολλούς φυσιολογικούς ιστούς, όπως στο λιπώδη ιστό, τους μυς, το ήπαρ και τον εγκέφαλο, καθώς και στα νεοπλασματικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού (Russo and Russo, 2004). Το κυριότερο οιστρογόνο είναι η 17β-οιστραδιόλη (Hamilton et al., 2017).

Η συσχέτιση του καρκίνου του μαστού με τα οιστρογόνα χρονολογείται από το 1896, όταν ο Beatson διαπίστωσε ότι η αφαίρεση των ωοθηκών σε προεμμηνοπαυσιακές ασθενείς ακολουθείται από υποχώρηση της μεταστατικής νόσου (Beatson, 1896). Στη συνέχεια, το 1952 οι Huggins και Bergenstal, ανακοίνωσαν την ανταπόκριση μεταστατικού καρκίνου του μαστού σε μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς μετά από χειρουργική αφαίρεση των επινεφριδίων και ένα έτος

αργότερα, οι Luft και Olivecrona την ύφεση της μεταστατικής νόσου, μετά από χειρουργική αφαίρεση της υπόφυσης.

Οι οιστρογονικοί υποδοχείς (ERs) εκφράζονται στο 54-77% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού. Η αποκάλυψη τους προσέφερε τη δυνατότητα πρόβλεψης της απάντησης της νόσου στις ορμονικές παρεμβάσεις. Πράγματι, όπως απέδειξαν πολλές μελέτες που διεξήχθησαν στις αρχές της δεκαετίας του 1970, η ανταπόκριση στους ορμονικούς χειρισμούς σχετίζεται με την παρουσία ERs στα νεοπλασματικά κύτταρα: όγκοι θετικοί σε ERs εμφανίζουν υψηλές πιθανότητες ανταπόκρισης, ενώ αντίθετα, όγκοι αρνητικοί σε ERs σπανιότατα ανταποκρίνονται σε οποιαδήποτε ορμονική παρέμβαση (Williams, 1974).

Οι ERs αποτελούν μέλη μιας μεγάλης οικογένειας ενδοπυρηνικών πρωτεϊνικών υποδοχέων που εμπλέκονται στη ρύθμιση τη μεταγραφή μιας ποικιλίας γονιδίων που εμπλέκονται, άμεσα ή έμμεσα, στην ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τη διήθηση, την αγγειογένεση και την επιβίωση των νεοπλασματικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού (Osborne and Schiff, 2005). Ο υποδοχέας των οιστρογόνων περιλαμβάνει δύο υποτύπους, τον α και τον β. Ο ERα ταυτοποιήθηκε το 1966 από τους Toft και Gorski, αποτελείται από 595 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 66 kDa, και το γονίδιό του εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6, στη θέση 6q25.1 (MacGregor et al., 1998). Ο ERα περιλαμβάνει 6 διαφορετικά, από λειτουργική άποψη, τμήματα. Το τμήμα A βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο του μορίου του υποδοχέα και μαζί με το γειτονικό του B τμήμα συνιστούν την αμινοτελική λειτουργία ενεργοποίησης 1 (Activation Function 1, AF-1). Το τμήμα C συνιστά την περιοχή σύνδεσης του υποδοχέα με το DNA ενώ το τμήμα D συμβάλλει στην ενδοπυρηνική εντόπιση του υποδοχέα. Τα τμήματα E και F περιλαμβάνουν την περιοχή σύνδεσης με τον ειδικό προσδέτη (ligand), την περιοχή που εμπλέκεται στο σχηματισμό ομοδιμερών ή ετεροδιμερών με τον ERβ, καθώς και την καρβοξυτελική λειτουργία ενεργοποίησης 2 (AF-2).

Οι ERα και ERβ έχουν υψηλή ομολογία στις ακολουθίες τους και ειδικά στις περιοχές δέσμευσης με το DNA και με τους προσδέτες. Η παρουσία του ERα στους ιστούς ή στα κύτταρα στόχους, είναι απαραίτητη για την ανταπόκρισή τους στη δράση των οιστρογόνων. Στην

πραγματικότητα τα επίπεδα έκφρασης του ERα σε έναν συγκεκριμένο ιστό χρησιμοποιούνται ως δείκτες απόκρισης στα οιστρογόνα. Οι ERβ μπορούν να ενεργοποιηθούν όταν συνδεθούν με οιστρογόνα και να απενεργοποιούνται όταν συνδεθεί ένα αντισιστρογόνο (Tsai and O'Malley, 1994). Κατά την ενεργοποίησή τους οι ERβ μπορούν να σχηματίσουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με τους ERα (Paech et al., 1997). Στους περισσότερους ιστούς εκφράζονται αμφότεροι οι ERs, όχι όμως πάντα στον ίδιο βαθμό και όχι αναγκαστικά στο ίδιο κύτταρο. Ο μαστός, η μήτρα, τα οστά, η καρδιά, το ήπαρ, το κεντρικό νευρικό σύστημα, το ουροποιητικό σύστημα καθώς και τα νεοπλασματικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού εκφράζουν και τους δύο υπότυπους, ενώ το έντερο και τα αιμοφόρα αγγεία εκφράζουν αποκλειστικά τον ERβ (Saji et al., 2005).

Σε φυσιολογικές συνθήκες οι ERs ανευρίσκονται, υπό αδρανή μορφή, εντός του πυρήνα, συνδεδεμένοι με ποικίλες ουσίες οι οποίες «αποκρύπτουν» τη θέση σύνδεσής τους με το DNA (White et al., 1998). Μετά τη σύνδεση του ER με τον ειδικό προσδέτη-οιστρογόνο λαμβάνει χώρα η ενεργοποίησή του που περιλαμβάνει την αποσύνδεση της πρωτεΐνης 90 του θερμού shock (heatshock protein-90) και άλλων μικρομοριακών και μεγαλομοριακών ουσιών και την φωσφορυλίωση και την τροποποίηση της διαμόρφωσής του. Στη συνέχεια, τα ενεργοποιημένα πλέον συμπλέγματα ER-ορμόνης σχηματίζουν διμερή τα οποία συνδέονται με ειδικές αλληλουχίες του DNA, τα στοιχεία ανταπόκρισης στα οιστρογόνα (Estrogen Response Elements – EREs), τα οποία εντοπίζονται στον υποκινητή (promoter) των ελεγχόμενων από οιστρογόνα γονιδίων. Τα συνδεδεμένα στα ERE διμερή ενώνονται με συν-ρυθμιστικές πρωτεΐνες και από κοινού ρυθμίζουν τη μεταγραφή των οιστρογονο-ανταποκρινόμενων γονιδίων (Osborne and Schiff, 2005). Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες συμπεριφέρονται σαν συνενεργοποιητές και επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων, ενώ άλλες λειτουργούν σαν συν-καταστολείς και αναστέλλουν τη μεταγραφή των γονιδίων (Mac Gregor and Jordan, 1998).

Στην πλειονότητα των καρκίνων του μαστού, η έκφραση του ERα είναι απορυθμισμένη και αποτελεί χαρακτηριστικό των ορμονοεξαρτώμενων όγκων. Τα επίπεδα του ERβ, σε αντίθεση, μειώνονται στα καρκινικά κύτταρα (Saji et al., 2005). Στον καρκίνο του μαστού ο ERα συνδέεται

άμεσα με την πρόγνωση και την απόκριση στην ενδοκρινική θεραπεία, ενώ δεν υπάρχει σαφής ένδειξη ότι η έκφραση του ERβ συνδέεται με κλινικές παραμέτρους. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε τεχνικές δυσκολίες στον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων ERβ χρησιμοποιώντας τα υπάρχοντα αντιδραστήρια και τεχνικές (Platet et al., 2004).

A.1.4 Καρκινικές σειρές

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια πολύπλοκη και ετερογενής ασθένεια. Ο προσδιορισμός του προφίλ έκφρασης των γονιδίων έχει συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση αυτής της ετερογένειας σε μοριακό επίπεδο, βελτιώνοντας την ιστολογική ταξινόμηση τους. Εργαστηριακά, η μελέτη του καρκίνου του μαστού συχνά μοντελοποιείται χρησιμοποιώντας καθιερωμένες κυτταρικές σειρές. Η πρώτη ανθρώπινη κυτταρική σειρά καθιερώθηκε από τον George Gey και ονομάστηκε HeLa, καθώς πήρε το όνομά από την Henrietta Lacks, την ασθενή από την οποία προήλθε η κυτταρική σειρά (Gey et al., 1952). Οι κυτταρικές σειρές εξελίχθηκαν σε ένα σημαντικό πειραματικό εργαλείο στην έρευνα για τον καρκίνο, καθώς προσφέρουν μία αστείρευτη πηγή σχετικά ομοιογενών κυτταρικών πληθυσμών που είναι ικανοί να αυτοδιπλασιάζονται σε τυπικά θρεπτικά κυτταρικής καλλιέργειας.

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη καρκινική σειρά για τη μελέτη του καρκίνου του μαστού είναι η MCF-7 που καθιερώθηκε το 1973 από το αντικαρκινικό ίδρυμα του Michigan (Michigan Cancer Foundation-7) (Soule et al., 1973). Η επιθηλιακή κυτταρική σειρά MCF-7 προέρχεται από αδenoκαρκίνωμα του μαστού και έχει χαρακτηριστικά διαφοροποιημένου μαστικού επιθηλίου (Osborne et al., 1987). Τα κύτταρα MCF-7 είναι θετικά στους υποδοχείς ERs και για αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μελέτη των μονοπατιών που σχετίζονται με τα οιστρογόνα και για την ανάπτυξη αντι-ορμονικών θεραπειών για τον καρκίνο του μαστού. Επίσης, τα κύτταρα MCF-7 είναι θετικά στους υποδοχείς PRs και αρνητικά στον HER2 (Levenson and Jordan, 1997).

Η κυτταρική σειρά MDA-MB-231 είναι μια επιθηλιακή, ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού που απομονώθηκε από μια Καυκάσια γυναίκα 51 ετών με μεταστατικό αδenoκαρκίνωμα του μαστού και είναι και αυτή μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες κυτταρικές

σειρές καρκίνου του μαστού στα ερευνητικά εργαστήρια. Τα κύτταρα MDA-MB-231 είναι πολύ επιθετικά καρκινικά κύτταρα, διεισδυτικά και φτωχά διαφοροποιημένα. Επίσης, είναι τριπλά αρνητικά καθώς δεν εκφράζουν ούτε ERs, ούτε PRs αλλά ούτε τον υποδοχέα HER2. Όπως προαναφέρθηκε ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού είναι μια πολύ επιθετική μορφή με περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές. Η κατανόηση της μοριακής βάσης του είναι επομένως ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων και για αυτό πολλές μελέτες, έχουν πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά MDA-MB-231.

Κεφάλαιο 2: Αντιβιοτικά

A.2.1 Ορισμός

Τα αντιβιοτικά είναι χαμηλού μοριακού βάρους μεταβολίτες που σε μικρές συγκεντρώσεις αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Οι μεταβολίτες είναι ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα του μεταβολισμού με διάφορες λειτουργίες όπως: καύσιμα, σηματοδοτικά μόρια και επαγωγείς ή αναστολείς ενζυμικής δράσης (συνήθως ως συμπαράγοντες ενζύμων) (Obach, 2013). Ο όρος ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους αναφέρεται σε μόρια το πολύ μέχρι μερικές χιλιάδες daltons. Στον όρο «αντιβιοτικά» δεν περιλαμβάνονται τα ένζυμα όπως η λυσοζύμη και άλλα πολύπλοκα πρωτεϊνικά μόρια που έχουν επίσης αντιμικροβιακή δράση. Με τον αυστηρό ορισμό της έννοιας, μόνο οι ουσίες που αποτελούν φυσικά προϊόντα των μικροοργανισμών μπορούν να θεωρηθούν αντιβιοτικά. Ωστόσο, σήμερα στον ορισμό συμπεριλαμβάνονται και οι παρακάτω ημισυνθετικές αντιβιοτικές ουσίες.

- 1) προϊόντα που λαμβάνονται μετά από χημική τροποποίηση φυσικών αντιβιοτικών ή άλλων προϊόντων του μεταβολισμού των μικροοργανισμών
- 2) προϊόντα που λαμβάνονται μετά από μικροβιακό μετασχηματισμό συνθετικών ενώσεων

Η αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών από ένα αντιβιοτικό είναι η προσωρινή ή μόνιμη αναστολή της ικανότητας του μικροοργανισμού να αναπαράγεται και κατά συνέπεια, αναστέλλεται η αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού και όχι ενός μεμονωμένου κυττάρου. Όταν η αναστολή είναι μόνιμη, η αντιβιοτική δράση ονομάζεται βακτηριοκτόνος (bactericidal ή cidal), ενώ εάν η ανασταλτική δράση του αντιβιοτικού χάνεται όταν το αντιβιοτικό αφαιρεθεί από το θρεπτικό, το αντιβιοτικό λέγεται ότι έχει βακτηριοστατική δράση (bacteriostatic ή static) (Nemeth et al., 2014).

Ο όρος «σε χαμηλή συγκέντρωση» προστίθεται στον ορισμό, καθώς ακόμη και τα συστατικά των κυττάρων μπορούν να προκαλέσουν βλάβη σε υπερβολικές συγκεντρώσεις. Για παράδειγμα, η γλυκίνη, που αποτελεί συστατικό όλων των πρωτεϊνών, έχει ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση έναντι

ορισμένων βακτηρίων εάν ενυπάρχει στο θεραπευτικό μέσο της καλλιέργειας σε συγκεντρώσεις της τάξης του 3 %. Ομοίως, η αιθυλική αλκοόλη που είναι προϊόν ζύμωσης ορισμένων μικροοργανισμών, δεν θεωρείται αντιβιοτικό, επειδή επιδεικνύει την αντιμικροβιακή της δράση μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις. Χαμηλές συγκεντρώσεις γενικά θεωρούνται οι τιμές $<1 \text{ mg / ml}$.

A.2.2 Τρόπος δράσης αντιβιοτικών

Η αντιμικροβιακή δράση των περισσότερων κατηγοριών αντιβιοτικών εφαρμόζεται σε κάποιο μοναδικό δομικό χαρακτηριστικό του βακτηριακού κυττάρου ή σε κάποια από τις μεταβολικές διαδικασίες του (**Εικόνα 9**). Ο τρόπος δράσης ενός αντιβιοτικού μπορεί να είναι ένας από τους παρακάτω (Talaro and Chess, 2008; Wright, 2010):

- Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος
- Καταστροφή της δομής ή της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης
- Καταστροφή της δομής ή της λειτουργικότητας των νουκλεϊκών οξέων
- Αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης
- Απορρύθμιση των βασικών μεταβολικών οδών

Τα περισσότερα βακτηριακά κύτταρα περικλείονται από ένα άκαμπτο στρώμα πεπτιδογλυκάνης, η οποία προστατεύει τα κύτταρα έναντι των συχνά δύσκολων περιβαλλοντικών συνθηκών και τις οσμωτικές πιέσεις. Οι τρανσγλυκοσυνδέσεις και οι τρανσπεπτιδάσεις είναι απαραίτητα ένζυμα για τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, καθώς επιμηκύνουν το μόριο της πεπτιδογλυκάνης και σχηματίζουν τις πεπτιδικές διασυνδέσεις μεταξύ καταλοίπων μουραμικού οξέος και παρακείμενων αλυσίδων γλυκάνης (Park and Uehara, 2008). Αντιβιοτικά, όπως οι πενικιλίνες, οι καρβαπενέμες και οι κεφαλοσπορίνες είναι σε θέση να σταματούν τις πεπτιδικές διασυνδέσεις πεπτιδογλυκάνης μέσω της αναστολής της δημιουργίας πεπτιδικών δεσμών που καταλύεται από τα παραπάνω ένζυμα (Josephine et al., 2004). Επίσης, αντιβιοτικά όπως η βανκομυκίνη αναστέλλουν την σύνθεση των μορίων πεπτιδογλυκάνης λόγω της δέσμευσής τους στις

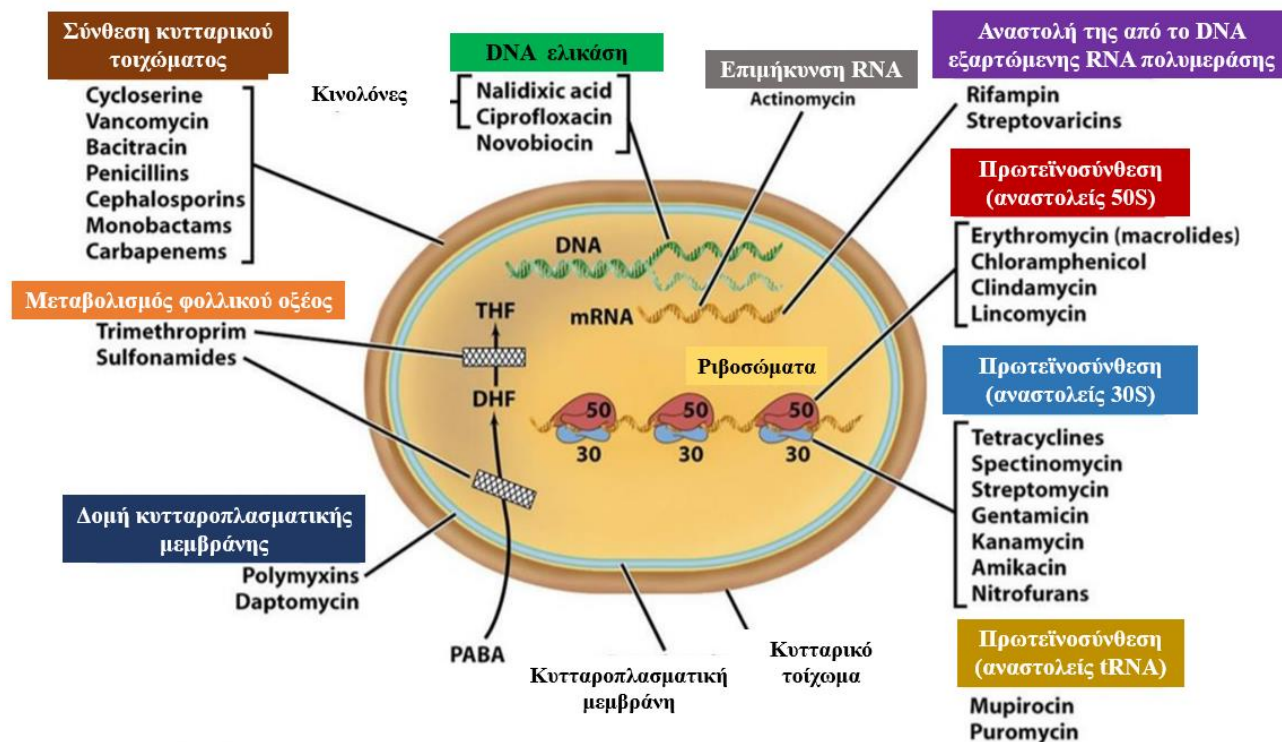
μονάδες πεπτιδογλυκάνης ή λόγω της αναστολής της δραστηριότητας των τρανσγλυκοσυνθεσών και των τρανσπεπτιδασών (Kahne et al., 2005).

Οι κατηγορίες αντιβιοτικών που καταστρέφουν τις κυτταρικές μεμβράνες είναι ειδικές για κάθε βακτηριακό στέλεχος και βασίζονται στις διαφορές της λιπιδιακής τους σύστασης. Για παράδειγμα, η δαπτομυκίνη, με την δέσμευση της στις μεμβράνες των βακτηριακών κυττάρων, προκαλεί αποπόλωση και αυτό οδηγεί στη αναστολή της σύνθεσης των μακρομορίων και στην καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης (Alborn et al., 1991). Οι πολυμυξίνες προκαλούν λύση των βακτηριακών κυττάρων μέσω της ισχυρής δέσμευσής τους στο λιπιδιακό τμήμα των λιποπολυσακχαριτών των βακτηριακών κυττάρων (Falagas et al., 2010).

Τα μεταβολικά μονοπάτια βιοσύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων είναι απαραίτητα για την επιβίωση των βακτηριακών κυττάρων και για αυτό η διακοπή τους είναι καταστροφική για την επιβίωση και την αναπαραγωγή των βακτηριακών κυττάρων. Τα αντιβιοτικά παρεμβαίνουν στην σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων σταματώντας την αντιγραφή ή τη μεταγραφή του DNA. Οι κινολόνες, για παράδειγμα, παρεμβαίνουν στη λειτουργικότητα του ενζύμου DNA γυράση που είναι απαραίτητο για την αντιγραφή και την επιδιόρθωση του DNA (Chen et al., 1996). Επίσης, μερικά αντιβιοτικά που στοχεύουν τα νουκλεϊκά οξέα δρουν στα ένζυμα τοποϊσομεράση II και τοποϊσομεράση IV των βακτηρίων. Η αναστολή της δράσης αυτών των ενζύμων έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της RNA πολυμεράσης και συνεπώς την αναστολή της σύνθεσης των μορίων RNA. Έτσι, οι κινολόνες που αναστέλλουν με αυτό τον τρόπο τη σύνθεση των βακτηριακών νουκλεϊκών οξέων, δεν επηρεάζουν την RNA πολυμεράση των θηλαστικών.

Τα είδη και η ποσότητα των πρωτεϊνών που παράγονται από ένα βακτήριο κάθε χρονική στιγμή εξαρτάται από τις πληροφορίες που περιέχονται στο DNA του. Η μετάφραση του mRNA κατά την πρωτεϊνοσύνθεση, πραγματοποιείται στα ριβοσώματα τα οποία αποτελούνται από RNA και πρωτεΐνες (ριβονουκλεοπρωτεΐνες). Το ριβοσωμικό RNA (rRNA) αποτελείται από δύο υπομονάδες, τη μικρή και τη μεγάλη. Με βάση τον συντελεστή καθίζηση που μετρείται σε μονάδες Svedberg, αυτές οι δύο υπομονάδες στα βακτηριακά ριβοσώματα ονομάζονται συνήθως 30S και 50S,

αντίστοιχα. Η τεράστια διαφορά που υπάρχει μεταξύ των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών ριβοσωμάτων, επέτρεψε την ανάπτυξη αντιβιοτικών που θα στοχεύουν το rRNA των βακτηριακών κυττάρων (Hong et al., 2014). Δεδομένης της τεράστιας σημασίας των πρωτεϊνών στους ζώντες οργανισμούς, τα φάρμακα που αναστέλλουν τη σύνθεση τους είναι μεταξύ των πολυπληθέστερων κατηγοριών των αντιβιοτικών και μπορεί να είναι είτε αναστολείς της 50S υπομονάδας, είτε της 30S.



Εικόνα 9: Μηχανισμός δράσης αντιβιοτικών (τροποποίηση από: Etebu and Arikekpar, 2016)

Αντιβιοτικά όπως η ερυθρομυκίνη, η κλινδαμυκίνη και η λινκομυκίνη, είναι αναστολείς της 50S υπομονάδας και δρουν είτε παρεμποδίζοντας τη φάση έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης, είτε τη φάση της μετάφρασης και επιμήκυνσης της πρωτεϊνικής αλυσίδας. Οι αναστολείς της 30S λειτουργούν κυρίως εμποδίζοντας την πρόσβαση του αμινοακυλ-tRNA στο ριβόσωμα. Παραδείγματα αντιβιοτικών που λειτουργούν με αυτόν τον τρόπο είναι η τετρακυκλίνη, η στρεπτομυκίνη, η σπεκτινομυκίνη, κ.λπ. (Hong et al., 2014). Η τετρακυκλίνη μπορεί επίσης να αναστέλλει τις 50S υπομονάδες (Epe and Woolley, 1984).

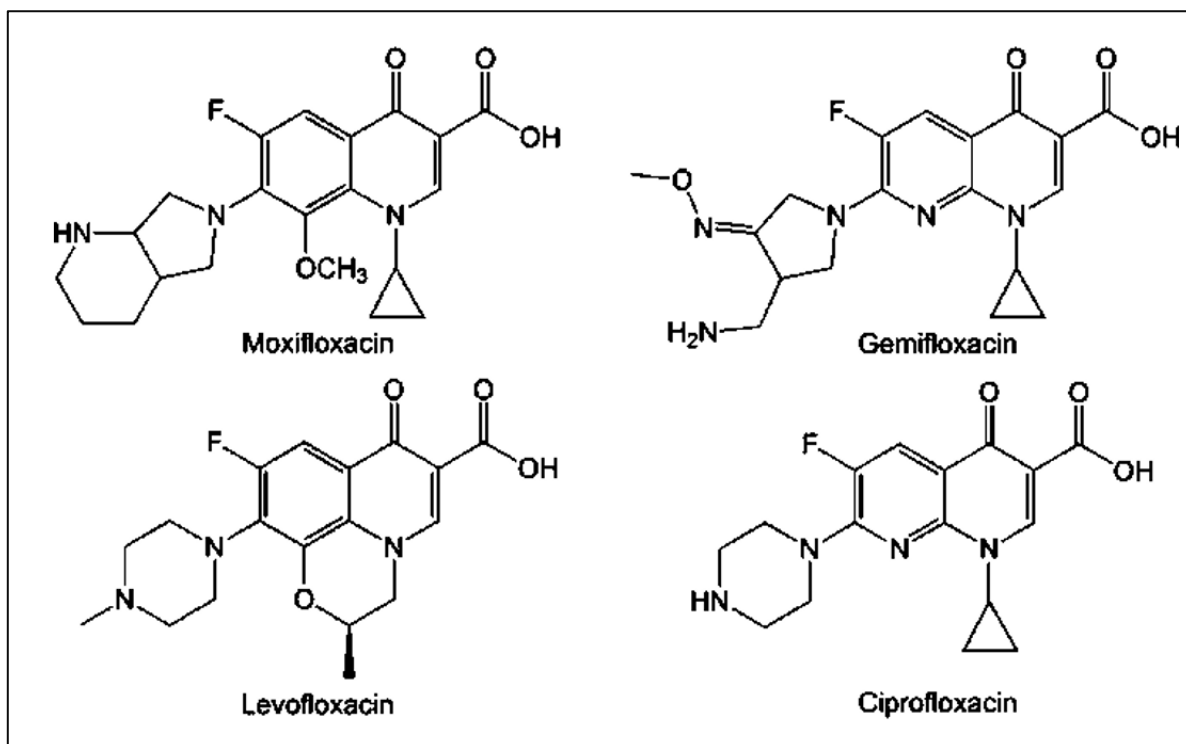
Μερικά αντιβιοτικά όπως τα σουλφοναμίδια έχει αποδειχθεί ότι μιμούνται τα υποστρώματα που απαιτούνται για τον μεταβολισμό των βακτηριακών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, τα σουλφοναμίδια μιμούνται το τετραϋδροφολικό οξύ που απαιτείται για τη σύνθεση του φολικού οξέος στα βακτήρια. Το φολικό οξύ είναι ζωτικής σημασίας για τον μεταβολισμό των νουκλεικών οξέων και των αμινοξέων και για αυτό τα σουλφοναμίδια διαταράσσουν τελικά την βιοσύνθεση τους (Talaro and Chess, 2008).

A.2.3 Κατηγοριοποίηση αντιβιοτικών

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι ταξινόμησης των αντιβιοτικών, αλλά πιο συχνά η ταξινόμηση πραγματοποιείται με βάση τις μοριακές δομές των αντιβιοτικών, τον τρόπο δράσης τους ή το φάσμα δράσης τους. Άλλοι τρόποι κατηγοριοποίησης είναι ανάλογα με την οδό χορήγησης τους (ενέσιμη, από το στόμα ή τοπική). Τα αντιβιοτικά που έχουν παρόμοια δομή γενικά παρουσιάζουν και παρόμοιο μοτίβο αποτελεσματικότητας, τοξικότητας και πιθανών αλλεργικών αντιδράσεων. Μερικές κοινές κατηγορίες αντιβιοτικών με βάση τις χημικές ή μοριακές δομές τους είναι: οι β-λακτάμες, οι μακρολίδες, οι τετρακυκλίνες, οι κινολόνες, οι αμινογλυκοσίδες, οι σουλφοναμίδες, τα γλυκοπεπτίδια και οι οξαζολιδινόνες (Adzitey, 2015).

A.2.4 Σιπροφλοξασίνη

Η σιπροφλοξασίνη (ciprofloxacin) ανήκει στις φθοροκινολόνες δεύτερης γενιάς, μια κατηγορία αντιβιοτικών που είναι κατάλληλη για τη θεραπεία λοιμώξεων ευρέως φάσματος (**Εικόνα 10**). Η ανάπτυξη των νέων αντιβιοτικών φθοροκινολόνες αναζωογόνησε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για την οικογένεια των κινολονών με πρόδρομο το ναλιδιξικό οξύ. Σε σύγκριση με το ναλιδιξικό οξύ, οι κινολόνες νέας γενιάς εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη δραστηριότητα και ένα ευρύτερο φάσμα δράσης. Η σιπροφλοξασίνη είναι μια από τις πιο δραστικές φθοροκινολόνες που βρίσκονται σήμερα σε κλινική χρήση και εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση, τόσο στα αρνητικά (-) κατά Gram, όσο και στα θετικά (+) κατά Gram αερόβια βακτήρια.



Εικόνα 10: Κύριοι εκπρόσωποι φθοριοκινολονών (Fief et al., 2019)

Η χημική ονομασία της σiproφλοξασίνης είναι η t-κυκλοπρόπυλ-6-φθορο-1,4-διυδρο-4-οξo-7- (1-πιπεραζίνυλ) 3- κινολινοκαρβοξυλικό οξύ. Ο 6-φθορο υποκαταστάτης των κινολονών είναι υπεύθυνος για την υψηλή αντιβακτηριακή τους δράση. Η ομάδα 7- πιπεραζίνης, είναι υπεύθυνη για την αντιμικροβιακή δράση έναντι βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*. Επίσης, στην υψηλή αντιμικροβιακή δράση συνεισφέρει και ο υποκαταστάτης κυκλοπροπυλίου (Chin and Neu, 1984).

Η σiproφλοξασίνη δρα συνήθως ως διδοντικός υποκαταστάτης (ligand) μέσω του οξυγόνου της πυριδόνης και ενός καρβοξυλικού οξυγόνου. Βιβλιογραφικά, διάφορες ενώσεις της σiproφλοξασίνης, έχουν συντεθεί και χαρακτηριστεί δομικά. Πιο συγκεκριμένα, έχουν χαρακτηριστεί οι κρυσταλλικές δομές των δυαδικών (binary) συμπλόκων σiproφλοξασίνης με άργυρο(I) (Milionis et al., 2018), χαλκό(II) (Overgaard et al., 2007) και κάδμιο(II) (López-Gresa et al., 2002) και μικτά σύμπλοκα σiproφλοξασίνης με μαγγάνιο(II), κάδμιο(II), κοβάλτιο(II), ψευδάργυρο(II), ασβέστιο(II) (Turel et al., 2003), σίδηρο (III) (Drevenšek et al., 2006) και χαλκό(II) (Xiao et al, 2005). Επίσης, έχουν λυθεί οι κρυσταλλικές δομές δυαδικών συμπλόκων του ανιόντος

της σιπροφλοξασίνης (binary ciprofloxacinato) με κοβάλτιο(II), ψευδάργυρο(II) (López-Gresa et al., 2002), μαγνήσιο(II), μαγγάνιο(II), κάδμιο(II) (Turel et al., 2003) και ευρώπιο(III) (Patel et al., 2013).

A.2.4.1 Τρόπος δράσης σιπροφλοξασίνης

Η σιπροφλοξασίνη, όπως και τα άλλα μέλη της οικογένειας 4-κινολονών, αναστέλλει την αντιγραφή του βακτηριακού DNA και τελικά προκαλεί τη λύση του βακτηριακού κυττάρου (Snyder and Drlica, 1979). Έτσι, ο τρόπος δράσης των κινολονών είναι πολύ διαφορετικός από των άλλων οικογενειών των αντιβιοτικών που συνήθως δρουν στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα ή στα ριβοσώματα. Οι ενδοκυτταριοί στόχοι της σιπροφλοξασίνης είναι το προκαρυωτικό ένζυμο τοποϊσομεράση IV και η DNA γυράση (βακτηριακή τοποϊσομεράση) η οποία ανακαλύφθηκε περίπου μια δεκαετία μετά την κλινική εισαγωγή του ναλιδιξικού οξέος. Η γυράση είναι ένα τετραμερές (A_2B_2) που μπορεί να κόβει και τους δύο κλώνους DNA και στη συνέχεια εισάγει αρνητικά (δεξιόστροφα) υπερσπειράματα στο DNA, χρησιμοποιώντας την υδρόλυση τριφωσφορικών νουκλεοσιδίων (Gelled et al., 1976). Τα αρνητικά υπερσπειράματα οδηγούν στη συμπίεση του DNA και έτσι το καθιστούν πιο ευαίσθητο στο ξετύλιγμα. Η σιπροφλοξασίνη εμποδίζει τη διάσπαση και την επανασύνδεση των αλυσίδων του DNA και προωθεί τη δημιουργία διπλών θραύσεων του DNA σε συγκεκριμένα σημεία της αλυσίδας μέσω της DNA γυράσης (Fisher et al., 1986).

Με τον παραπάνω μηχανισμό, αποφεύγονται οι αρνητικές υπερπεριελίξεις της διπλής αλυσίδας του κυκλικού DNA των μικροβίων, ο διαχωρισμός των δύο κλώνων δυσχεραίνεται και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται ο αναδιπλασιασμός και η μεταγραφή του DNA. Οι δομικές μελέτες έχουν δείξει η σιπροφλοξασίνη δρα στην υπομονάδα α της DNA γυράσης. Οι υπομονάδες β δεσμεύουν τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και παρέχουν τις ενεργειακές απαιτήσεις για την υπερσυσπειρωση του DNA. Η DNA γυράση υπάρχει μόνο στα μικρόβια, ενώ στα ευκαρυωτικά κύτταρα υπάρχει η τοποϊσομεράση II (Gentry and Osheroff, 2013).

A.2.5 Ανθεκτικότητα βακτηρίων στα αντιβιοτικά

Πολλές μικροβιακές λοιμώξεις που μέχρι πριν από λίγα χρόνια μπορούσαν να θεραπευτούν με τη χρήση ορισμένων αντιβιοτικών, είναι σήμερα επικίνδυνες για τη ζωή, καθώς πολλά βακτηριακά στελέχη εμφανίζουν ανθεκτικότητα στις θεραπείες με τα κοινά αντιβιοτικά. Αυτό είναι ένα παγκόσμιο φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί για πολλά (σχεδόν όλα) τα αντιβιοτικά, με τεράστιες συνέπειες στη δημόσια υγεία, καθώς οι λοιμώξεις από ανθεκτικά βακτηριακά στελέχη συμβάλλουν στην αύξηση της νοσηρότητας, της θνησιμότητας και του νοσοκομειακού κόστους (Ventola, 2015). Η κλινική σημασία της ανθεκτικότητας των αντιβιοτικών είναι τεράστια και για αυτό η επιστημονική κοινότητα διερευνά και παρακολουθεί πολύ ενεργά το φαινόμενο σε επιδημιολογικό επίπεδο (Van der Waaij and Nord, 2000). Οι βασικοί όροι που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των αντιβιοτικών αναλύονται παρακάτω (Davison, 2000):

- **Ανθεκτικότητα:** Ένα βακτηριακό στέλεχος που προέρχεται από ένα είδος βακτηρίων που είναι ευαίσθητα σε ένα αντιβιοτικό λέγεται ότι είναι ανθεκτικό όταν δεν αναστέλλεται από την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του αντιβιοτικού (MIC) που αναστέλλει την ανάπτυξη αυτού του είδους. Αυτό το στέλεχος μπορεί φυσικά να ανασταλεί με υψηλότερη συγκέντρωση του ίδιου αντιβιοτικού. Επομένως, είναι προφανές ότι η έννοια της ανθεκτικότητας ισχύει για (α) ένα βακτηριακό στέλεχος, (β) ένα αντιβιοτικό και (γ) μια συγκεκριμένη συγκέντρωση.
- **Πολλαπλή ανθεκτικότητα:** Όταν ένα βακτήριο είναι ανθεκτικό σε δύο ή περισσότερα αντιβιοτικά χωρίς δομικές ομοιότητες μεταξύ τους, η ανθεκτικότητα ονομάζεται πολλαπλή. Τα αντιβιοτικά με παρόμοια χημική δομή αναστέλλουν την ανάπτυξη βακτηρίων με τους ίδιους μηχανισμούς δράσης και συνήθως ένα βακτηριακό στέλεχος που είναι ανθεκτικό σε ένα αντιβιοτικό είναι επίσης ανθεκτικό σε άλλα αντιβιοτικά της ίδιας οικογένειας. Αυτό ονομάζεται διασταυρούμενη ανθεκτικότητα και έχει μεγάλη κλινική σημασία καθώς εάν μια λοίμωξη οφείλεται σε ένα βακτήριο ανθεκτικό σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό, θα πρέπει συνήθως να χορηγηθεί κάποιο άλλο που να μην ανήκει στην ίδια κατηγορία.

➤ **Ανθεκτικότητα ενός σταδίου ή πολλαπλών σταδίων:** Κατά την επίστροφή ενός βακτηριακού στελέχους σε στερεό μέσο καλλιέργειας που περιέχει ένα αντιβιοτικό στο οποίο τα βακτήρια είναι ευαίσθητα, με συγκέντρωση αρκετές φορές μεγαλύτερη από την MIC του αντιβιοτικού, είναι δυνατόν να απομονωθούν ανθεκτικά βακτήρια. Η πλειονότητα των βακτηρίων θα ανασταλεί, αλλά εάν ένας επαρκής αριθμός βακτηριακών κυττάρων επιβιώσει, για παράδειγμα 10^9 ή και περισσότερα, μπορεί να ανιχνευτούν ανθεκτικά κύτταρα που θα δημιουργήσουν μεμονωμένες αποικίες. Συχνά τα βακτήρια σε αυτές τις αποικίες είναι ανθεκτικά όχι μόνο στη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που υπήρχε στο θρεπτικό μέσο στο οποίο αναπτύχθηκαν, αλλά και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Αυτό ονομάζεται αντίσταση ενός σταδίου και εμφανίζεται σε ορισμένα αντιβιοτικά, καθολικά ή καθόλου. Ένα τυπικό παράδειγμα είναι η ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη που αναπτύσσεται σε ένα στάδιο. Σε άλλα αντιβιοτικά όμως, όπως η πενικιλίνη, η ανθεκτικότητα αναπτύσσεται σε πολλά στάδια και για αυτό για να αναπτυχθεί η ανθεκτικότητα θα πρέπει το βακτηριακό στέλεχος να αναπτυχθεί σε συγκεντρώσεις αντιβιοτικών ελαφρώς χαμηλότερων από την MIC και να επιλεγθούν τα λιγότερο ευαίσθητα βακτήρια. Από αυτά, στη συνέχεια, θα προκύψουν βακτηριακά κύτταρα ικανά να αναπτυχθούν παρουσία ελαφρώς υψηλότερων συγκεντρώσεων αντιβιοτικού. Με επαναλαμβανόμενες επιστροφές αυτού του τύπου και επιλέγοντας από μεγάλους πληθυσμούς τα πιο ανθεκτικά στελέχη, μπορεί να προκύπτουν όλο και πιο ανθεκτικά στελέχη. Αυτός ο τύπος σταδιακής ανθεκτικότητας ονομάζεται πολλαπλών σταδίων.

Ένας άλλος όρος που χρησιμοποιείται συχνά είναι η «ευαισθησία». Η «ευαισθησία» ενός βακτηριακού στελέχους δεν θα πρέπει να συγχέεται με τον όρο «ανθεκτικότητα». Πιο συγκεκριμένα, η ανθεκτικότητα χρησιμοποιείται για εκείνα τα βακτηριακά στελέχη που αρχικά ήταν ευαίσθητα έναντι ενός συγκεκριμένου αντιβιοτικού και στη συνέχεια έχασαν την ευαισθησία τους μέσω κάποιας μετάλλαξης ή κάποια άλλης αλλαγής στη γενετική τους πληροφορία. Αντίθετα, τα βακτηριακά στελέχη που «εγγενώς» δεν αναστέλλονται από ένα αντιβιοτικό, για παράδειγμα επειδή δεν έχουν τη χημική δομή την οποία αναγνωρίζει και δρα το αντιβιοτικό, ονομάζονται μη ευαίσθητα ή ανθεκτικά.

A.2.5.1 Ανθεκτικότητα βακτηρίων στη σιπροφλοξασίνη

Η σιπροφλοξασίνη, και άλλα νεότερα αντιβιοτικά της ομάδας των κινολονών γενικά εμφανίζουν βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση και μειωμένη συχνότητα εμφάνισης αυθόρμητης βακτηριακής ανθεκτικότητας, σε σύγκριση με τα παλαιότερα ανάλογα όπως το ναλιδιξικό οξύ. Οι φθοροκινολόνες κατατάσσονται ως μία από τις τέσσερις πιο κρίσιμης σημασίας αντιμικροβιακές ουσίες (WHO, 2012), καθώς έχουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων, όπως η σηψαιμία. Τις τελευταίες δεκαετίες όμως, η αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των βακτηρίων όπως η *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) (Su et al, 2010), η *E. coli* (Fasugba et al., 2015), ο *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*) (Daum et al., 1990) και ο *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) (Burnie and Loudon, 1997) έναντι της σιπροφλοξασίνης.

Δύο μηχανισμοί φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των μικροβίων έναντι της σιπροφλοξασίνης. Στον πρώτο μηχανισμό εμπλέκεται το κύριο ένζυμο-στόχος της σιπροφλοξασίνης μέσα στο βακτηριακό κύτταρο, η DNA γυράση. Μεταλλάξεις στην υπομονάδα α της βακτηριακής DNA γυράσης, μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι του αντιβιοτικού. Ένας δεύτερος τρόπος με τον οποίο μπορούν τα βακτήρια να αποκτήσουν ανθεκτικότητα έναντι της σιπροφλοξασίνης είναι μέσω κάποιας μετάλλαξης που οδηγεί σε μειωμένη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηριακού κυττάρου, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η είσοδος του αντιβιοτικού μέσα στο κύτταρο (Fàbrega et al., 2009).

A.2.4 Αντικαρκινική δράση σιπροφλοξασίνης

Διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η σιπροφλοξασίνη παρουσιάζει αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες έναντι διαφόρων καρκινικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, οι μελέτες δείχνουν ότι η σιπροφλοξασίνη είναι αποτελεσματική έναντι καρκινικών σειρών του παχέος εντέρου, οστεοσαρκώματος και λευχαιμικών ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Somekh et al., 1989; Miclau et al., 1998; Herold et al., 2002). Επιπλέον, φαίνεται ότι η σιπροφλοξασίνη είναι

ένα καλό υποψήφιο φάρμακο για την θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, του πνεύμονα και του προστάτη, λόγω της υψηλής συσσώρευσης του αντιβιοτικού στα ούρα, στους ιστούς του πνεύμονα και στον προστάτη αδένα (Walker, 1999; Haraguchi et al., 2007).

Η αντικαρκινική δράση της σιπροφλοξασίνης οφείλεται κυρίως στην ικανότητά της να αναστέλλει την τοποϊσομεράση II (Topo II) στα ευκαρυωτικά κύτταρα, ένα πυρηνικό ένζυμο που αποτελεί κύριο κυτταρικό στόχο αντικαρκινικών φαρμάκων όπως η ετοποσίδη (Etoposide) και τενιποσίδη (Teniposide) (McClendon et al., 2007). Ταυτόχρονα, η σιπροφλοξασίνη ασκεί την αντικαρκινική της δράση μέσω άλλων μηχανισμών, όπως η επαγωγή του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού (Shen and Pernet, 1985; Aranha et al., 2002) δημιουργώντας διπλές θραύσεις του DNA ή προκαλώντας διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση S / G2 (Aranha et al., 2000). Συνεπώς, η σιπροφλοξασίνη είναι μία πολλά υποσχόμενη χημειοθεραπευτική ένωση για τον σχεδιασμό νέων αντικαρκινικών φαρμάκων. Πρόσφατες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στον μηχανισμό με τον οποίο η σιπροφλοξασίνη επάγει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του μαστού (Beberok et al., 2018).

Κεφάλαιο 3: Οργανοκασσιτερικές ενώσεις

A.3.1 Κασσίτερος

Ο κασσίτερος είναι γνωστός ως μέταλλο από αμνημονεύτων χρόνων και η ανακάλυψη, περίπου το 3500 π.Χ., του σχηματισμού ενός σκληρού κράματος με τον χαλκό, ξεκίνησε την Εποχή του Χαλκού, η οποία κράτησε μέχρι περίπου το 1200 π.Χ. Η αφθονία του κασσίτερου στην επιφάνεια της Γης είναι περίπου 2 ppm, σημαντικά μικρότερη από αυτή του ψευδαργύρου (94 ppm), του χαλκού (63 ppm) και του μόλυβδου (12 ppm). Η πιο σημαντική ορυκτή πηγή κασσιτέρου από τα παλαιότερα χρόνια ως σήμερα, είναι ο κασσιτερίτης (SnO_2) (**Εικόνα 11**). Η αναγωγή του κασσιτερίτη με άνθρακα σε ηλεκτρικούς φούρνους οδηγεί στην απομόνωση του κασσιτέρου σύμφωνα με την αντίδραση: $\text{SnO}_2 + 2\text{C} \rightarrow \text{Sn} + 2\text{CO}$. Περίπου το 75 % της παγκόσμιας παραγωγής προέρχεται από την Κίνα και τη Νοτιοανατολική Ασία και περίπου το 18 % από τη Νότια Αμερική. Επίσης, μια ποσότητα του μετάλλου ανακτάται με τήξη από δοχεία τροφίμων και ποτών και από βιομηχανικά απόβλητα (Gielen et al., 2008).



Εικόνα 11: Κρύσταλλοι κασσιτερίτη (πηγή: <https://geology.com/minerals/cassiterite.shtml>)

Περίπου η μισή παραγωγή κασσίτερου χρησιμοποιείται στη συγκόλληση μετάλλων λόγω της αυξανόμενης ανάπτυξης των τηλεπικοινωνιών και του ηλεκτρονικού εξοπλισμού, καθώς και την ανάγκη εξάλειψης του μόλυβδου, λόγω της τοξικότητάς του. Περίπου το 20 % της παραγωγής κασσίτερου χρησιμοποιείται για επιστρώσεις στις βιομηχανίες κονσερβοποιίας. Παρόλα αυτά, η

χρήση του στην κονσερβοποίηση μειώνεται λόγω του αυξανόμενου ανταγωνισμού του από την χρήση πολυμερικών στρωμάτων στα μεταλλικά κουτιά. Επίσης, περίπου το 14 % της παραγωγής κασσίτερου χρησιμοποιείται για την παραγωγή χημικών. Το τετραχλωρίδιο του κασσίτερου και το τριχλωρίδιο του βουτυλοκασσίτερου χρησιμοποιούνται ευρέως ως πρόδρομες ουσίες για την επικάλυψη του γυαλιού με SnO_2 (Gielen et al., 2008).

Ο κασσίτερος ανήκει στην Ομάδα 14 του Περιοδικού Πίνακα με ατομικό αριθμό 50 και ηλεκτρονιακή διαμόρφωση $[\text{Kr}] 4d^{10} 5s^2 5p^2$. Η βασική κατάσταση σθένους είναι Sn(IV) , αλλά σχεδόν εξίσου σταθερή είναι και η οξειδωτική κατάσταση Sn(II) . Ο κασσίτερος έχει 10 σταθερά ισότοπα, περισσότερα από οποιοδήποτε άλλο χημικό στοιχείο και οδηγεί σε πολύ χαρακτηριστικά φάσματα μάζας. Επίσης έχει δύο κύρια αλλότροπα: σε θερμοκρασία δωματίου το σταθερό αλλότροπο είναι ο *β-κασσίτερος*, ένα ασημόλευκο ελαστικό μέταλλο, ενώ σε χαμηλές θερμοκρασίες, μετατρέπεται στον λιγότερο πυκνό γκρι *α-κασσίτερο*, που έχει την κυβική δομή του διαμαντιού. Ο κασσίτερος δεν οξειδώνεται από τον ατμοσφαιρικό αέρα, δεν αντιδρά με το νερό και τα αραιωμένα οξέα, αλλά όταν αντιδρά με πυκνό υδροχλωρικό οξύ σχηματίζεται SnCl_2 και υδρογόνο, ενώ με πυκνό θειικό οξύ δίδει SnSO_4 και SO_2 . Οι κυριότερες ανόργανες ενώσεις του κασσίτερου περιλαμβάνουν τα χλωρίδια, τα οξείδια και τα φθορίδια των Sn(II) και Sn(IV) , ενώ πολυάριθμες οργανικές ενώσεις του κασσίτερου, με ειδικά σχεδιασμένες δομές, έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια.

A.3.2 Οργανοκασσιτερικές ενώσεις

Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις είναι χημικές ενώσεις που περιέχουν τουλάχιστον ένα δεσμό κασσίτερου – άνθρακα. Η πρώτη οργανοκασσιτερική ένωση, ο διωδιούχος διαιθυλοκασσίτερος, συντέθηκε το 1849 από τον Edward Frankland (Hoch, 2001). Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις έχουν έναν ή περισσότερους ομοιοπολικούς δεσμούς άνθρακα-κασσίτερου που είναι υπεύθυνοι για τις ιδιαίτερες ιδιότητες των μορίων αυτών και όλες οι ενώσεις είναι Sn(IV) . Η μόνη καλά μελετημένη ένωση με κασσίτερο σε οξειδωτική κατάσταση + 2 είναι ο κυκλοπενταδιενυλοκασσίτερος (II). Υπάρχουν τέσσερις ομάδες οργανοκασσιτερικών ενώσεων(IV) ανάλογα με τον αριθμό των δεσμών

άνθρακα-κασσιτέρου: οι μόνο-, δι-, τρι- και τετρα-οργανοκασσιτερικές ενώσεις. Ο γενικός τύπος είναι R_nSnX_{4-n} όπου R = άλκυλο ή άρυλο ομάδα, Sn = το κεντρικό άτομο κασσίτερου σε οξειδωτική κατάσταση +4 και X = ένα μονοανιόν ή μια ανιονική οργανική ομάδα.

Η χημική φύση της ομάδας R έχει ισχυρή επίδραση στις βιολογικές ιδιότητες αυτών των ενώσεων. Η ομάδα X από την άλλη, επηρεάζει τη διαλυτότητά τους και τη μεταβλητότητά τους (volatility). Για παράδειγμα, οι ενώσεις του τετρα-άλκυλοκασσιτέρου(IV) είναι άχρωμες, ενώ οι ενώσεις χαμηλότερου μοριακού βάρους είναι υγρές σε θερμοκρασία δωματίου. Οι τετρα-αρυλοοργανοκασσιτερικές ενώσεις είναι στερεές, Οι τετραοργανοκασσιτερικές ενώσεις(IV) διαθέτουν τυπικούς ομοιοπολικούς δεσμούς και είναι σταθερές παρουσία αέρα και νερού. Ο τετρα-βουτυλοκασσίτερος (IV) είναι ένα άχρωμο ελαιώδες υγρό με ιδιαίτερη οσμή, ενώ ο τετραφαινυλοκασσίτερος είναι μια λευκή κρυσταλλική σκόνη, διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες και αδιάλυτη στο νερό (Graceli et al., 2013).

Σήμερα είναι γνωστές περισσότερες από 800 οργανοκασσιτερικές ενώσεις με διαφορετική εμπορική χρήση. Στις ενώσεις που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία, το R είναι συνήθως μια βουτυλ-, οκτυλ- ή φαίνυλ- ομάδα και το X ένα χλωρίδιο, φθορίδιο, οξείδιο, υδροξείδιο, καρβοξυλικό ή θειολικό. Μέχρι στιγμής, οι μονοϋποκατεστημένες οργανοκασσιτερικές ενώσεις (R_nSnX_{4-n}) είχαν πολύ περιορισμένη βιομηχανική εφαρμογή, αλλά σήμερα χρησιμοποιούνται ως σταθεροποιητές σε μεμβράνες χλωριούχου βινυλίου. Οι διυποκατεστημένες οργανοκασσιτερικές ενώσεις (R_2SnX_2) χρησιμοποιούνται κυρίως στη βιομηχανία πλαστικών, ιδιαίτερα ως σταθεροποιητές και ως καταλύτες στην παραγωγή αφρών πολυουρεθάνης.

Οι τριυποκατεστημένες οργανοκασσιτερικές ενώσεις (R_3SnX) έχουν βιοκτόνο δράση που επηρεάζεται έντονα από τις πλευρικές ομάδες. Οι πιο σημαντικές είναι ο τριβουτυλοκασσίτερος, ο τριφαινυλοκασσίτερος και ο τρικυκλοεξυλοκασσίτερος που χρησιμοποιούνται ως γεωργικά και γενικής χρήσης μυκητοκτόνα, βακτηριοκτόνα, ακαρεοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, μαλακιοκτόνα, εντομοκτόνα, απωθητικά τρωκτικών και ως αντιρρυπαντικά σε χρώματα σκαφών (WHO, 1990). Οι

τετραϋποκατεστημένες οργανοκασσιτερικές ενώσεις (R_4Sn) χρησιμοποιούνται κυρίως ως ενδιάμεσα για την παρασκευή των άλλων (Gielen et al., 2008).

A.3.3 Βιολογική δράση οργανοκασσιτερικών ενώσεων

Ο κασσίτερος σε ανόργανη μορφή είναι μη τοξικός, λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς του, της φτωχής απορρόφησης του, της χαμηλής βιοσυσσωρεύσης του στους ιστούς, και της ταχείας απέκκρισης του. Το τοξικολογικό πρότυπο όμως των οργανοκασσιτερικών ενώσεων είναι πιο περίπλοκο. Η διαλυτότητα των οργανοκασσιτερικών ενώσεων στο νερό είναι πολύ χαμηλή και ανάλογη της θερμοκρασίας, του pH και της συγκέντρωσης αιωρούμενων σωματιδίων. Επίσης, παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τους οργανικούς διαλύτες και τα λιπίδια και επομένως είναι βιοσυσσωρεύσιμες στους ζωντανούς οργανισμούς (Pagliarani et al., 2013).

Η τοξικότητα των οργανοκασσιτερικών ενώσεων εξαρτάται από τον αριθμό των οργανικών ομάδων που συνδέονται με το άτομο του κασσίτερου, καθώς και από τη φύση της οργανικής ομάδας (Mushak et al., 1982). Οι τρι-οργανοκασσιτερικές ενώσεις (IV), που έχουν τρεις δεσμούς $Sn-C$, έχουν μεγαλύτερη βιοκτόνο δράση. Επιπλέον, η φύση της ομάδας άνθρακα προσδιορίζει τα είδη στα οποία η τρι-οργανοκασσιτερική ένωση είναι πιο τοξική (WHO, 1980; WHO, 1990). Για παράδειγμα, οι ενώσεις του τριμεθυλοκασσιτέρου παρουσιάζουν υψηλή τοξικότητα στα έντομα και στα θηλαστικά, ενώ τα παράγωγα του τριφαινυλοκασσιτέρου έχουν υψηλή τοξικότητα έναντι ψαριών, μυκήτων και μαλακίων (Bennett, 1996). Επιπλέον, οι ενώσεις με αλκυλομάδες είναι γενικά, πιο τοξικές από τις ενώσεις με αρυλομάδες (Doctor and Fox, 1982).

Στα παράγωγα R_3SnX , η φύση της ομάδας X έχει μικρή ή καθόλου επίδραση στη βιοκτόνο δράση της ένωσης, εκτός και αν το X επιδεικνύει από μόνο του βιοκτόνο δράση. Σε αυτήν την περίπτωση η βιολογική δραστηριότητα της οργανοκασσιτερικής ένωσης μπορεί να αυξηθεί. Μεταξύ των ενώσεων τριακυλοκασσιτέρου(IV) υπάρχουν σημαντικές διαβαθμίσεις στην τοξικότητα ανάλογα με τη φύση και το μήκος της πλευρικής αλυσίδας των αλκυλομάδων. Συνήθως οι τετραοργανοκασσιτερικές ενώσεις εμφανίζουν ετεροχρονισμένη τοξική δράση στους οργανισμούς,

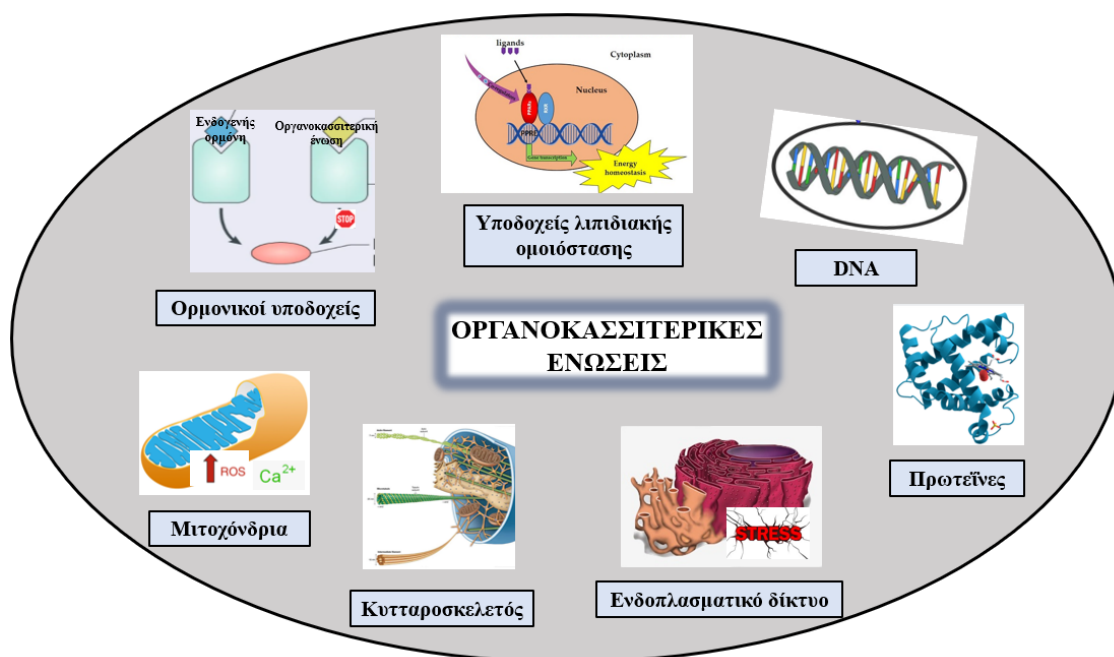
αφού αυτή εκδηλώνεται μετά την αποικοδόμησή τους σε τρι-υποκατεστημένες ενώσεις. Η δράση των οργανοκασσιτερικών ενώσεων μειώνεται, καθώς μειώνεται ο αριθμός των αλκυλομάδων: $R_4Sn > R_3Sn > R_2Sn > RSn > Sn$, ενώ οι μακριές αλκυλο-αλυσίδες όπως η n-όκτυλο δεν εμφανίζουν βιολογική δράση έναντι στα βακτήρια.

Μόλις εισέλθουν σε έναν ζωντανό οργανισμό, οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις ενδέχεται να αλληλεπιδράσουν με βιολογικά μακρομόρια ή με ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, καθώς η αμφίφυλη φύση τους τις καθιστά ικανές να αλληλεπιδρούν με λιπόφιλες δομές μέσω των αλειφατικών ή αρωματικών άκρων τους, ενώ ο κασιτερικός πυρήνας που μπορεί να φέρει ένα ή περισσότερα θετικά φορτία μπορεί να σχηματίζει ισχυρούς ιοντικούς ή ομοιοπολικούς δεσμούς με τα κατάλληλα άτομα των βιομορίων. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικά βιολογικά αποτελέσματα και συνήθως σε τοξικές δράσεις (Pagliarani et al, 2013).

Η βιολογική δραστηριότητα των οργανοκασσιτερικών ενώσεων(IV) μπορεί να οφείλεται στην παρουσία εύκολα υδρολύσιμων χημικών ομάδων (εύκολα διασπώμενοι χηλικοί συνδέτες) με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενδιάμεσων όπως $[R_nSn^{(4-n)+}]$ ($n = 2$ ή 3), τα οποία μπορεί να δεσμευτούν στο DNA, στις πρωτεΐνες, στους υδατάνθρακες και στα λιπίδια. Παλαιότερες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε τρι-οργανοκασσιτερικές (R_3SnX) και δι-οργανοκασσιτερικές (R_2SnXY) ενώσεις, έδειξαν ότι η αξιοσημείωτη βιολογική δράση των ενώσεων οφείλεται είτε στη δράση πιο δραστικών ενδιάμεσων είτε στην είσοδο ολόκληρων των ενώσεων κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης. Η ομάδα X ή XY φαίνεται να επηρεάζει μόνο την μεταφορά του δραστικού τμήματος $[R_3Sn]^+/[R_2Sn]^{2+}$ μέσα στο κύτταρο (Chauhan et al., 1993).

Οι κυτταρικοί στόχοι των οργανοκασσιτερικών ενώσεων μέσα στα κύτταρα είναι ποικίλοι (**Εικόνα 12**). Αρχικά, έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να δρουν ως χημικές ουσίες που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές (endocrine-disrupting chemicals-EDCs), καθώς μιμούνται τις ενδογενείς ορμόνες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εμφάνιση ανδρικών σεξουαλικών χαρακτηριστικών στα θηλυκά γαστρόποδα (imposex), ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε τριβουτυλοκασσιτέρες ενώσεις.

Επιπλέον, κυτταρικός στόχος των οργανοκασσιτερικών ενώσεων είναι και οι πυρηνικοί υποδοχείς PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) που είναι ενεργοί ως ετεροδιμερές με τον RXR (retinoid X receptor) και ρυθμίζουν την διαφοροποίηση των λιποκυττάρων. Οι τριοργανοκασσιτερικές ενώσεις όπως ο τριβουτυλο- και τριφαινυλο- κασσίτερος είναι υποκαταστάτες υψηλής συγγένειας των παραπάνω υποδοχέων, προκαλώντας απορρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων (Pagliarani et al., 2013).



Εικόνα 12: Βασικοί κυτταρικοί στόχοι των οργανοκασσιτερικών ενώσεων

Στόχος των οργανοκασσιτερικών συμπλόκων είναι και τα βιομόρια του κυττάρου. Όταν εισέλθουν στον πυρήνα του κυττάρου, μπορούν να συνδεθούν στο DNA αλλά και στα επιδιορθωτικά ένζυμα και να προκαλέσουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες και τελικά κατακερματισμό του DNA. Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις δρουν και στα μιτοχόνδρια προκαλώντας αύξηση των ιόντων Ca^{2+} και αύξηση της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Επιπλέον, προκαλούν τροποποιήσεις στον κυτταροσκελετό και στρες του ενδοπλασματικού δικτύου λόγω της διαταραχής των ιόντων Ca^{2+} (Pagliarani et al., 2013).

A.3.3.1 Αντικαρκινική δράση οργανοκασσιτερικών ενώσεων

Η τυχαία ανακάλυψη της σισπλατίνης (cis-diamminedichloroplatinum (II)), ενός χημειοθεραπευτικού φαρμάκου που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία συμπαγών όγκων, όπως του καρκίνου των ωοθηκών, των όρχεων, της κεφαλής / λαιμού και της ουροδόχου κύστης (Rosenberg, 1969; Desoize and Madoulet, 2002) , τόνισε την ανάγκη για αναζήτηση άλλων χημειοθεραπευτικών με βάση το μέταλλο. Η ανάπτυξη νέων χημειοθεραπευτικών οντοτήτων για τον καρκίνο είναι ένας ερευνητικός τομέας με μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς πολλά χημειοθεραπευτικά με βάση την πλατίνα έχουν θεραπευτικούς περιορισμούς λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικότητας, της μειωμένης αποτελεσματικότητας ή/και της τοξικότητας και των ανεπιθύμητων παρενεργειών (Bonire and Fricker, 2001; Gaynor and Griffith, 2012). Επομένως, υπάρχει η ανάγκη για σχεδιασμό και ταυτοποίηση νέων αποτελεσματικών χημειοθεραπευτικών με βάση το μέταλλο με διαφορετικό φαρμακολογικό προφίλ που θα υπερνικούν τους εγγενείς και επίκτητους μηχανισμούς ανάπτυξης ανθεκτικότητας (Storr, 2006).

Στο πλαίσιο αυτό, η προσοχή της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί στον σχεδιασμό και την ανάπτυξη μεταλλοθεραπευτικών, εκτός της πλατίνας (Hadjikakou et al., 2008; Banti et al, 2012; Velalopoulou et al, 2012; Banti et al., 2015; Banti et al, 2016; Tsiatouras et al., 2016; Simpson et al., 2019). Μεταξύ αυτών, ο χρυσός (Tiekink, 2008; Chrysouli et al., 2018) και οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις (Koepf-Maier and Koepf, 1987; Gielen, 1996; Xanthopoulou et al., 2008; Xanthopoulou et al., 2003; Alama et al., 2009; Balas et al., 2012), παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της δράσης τους στα μιτοχόνδρια και της ισχυρή τους συγγένειας με τις θειολικές ομάδες σε κυτταρικές πρωτεΐνες και ένζυμα (Robertson and Orrenius, 2002; Barnard and Berners-Price, 2007). Επιπλέον, αρκετές οργανοκασσιτερικές ενώσεις κατέχουν μια σημαντική θέση στις έρευνες για την ανάπτυξη νέων χημειοθεραπευτικών, λόγω της ικανότητας τους να προκαλούν απόπτωση (Nath et al, 2013; Tabassum and Pettinari, 2006).

Η μελέτη της αντικαρκινικής δράσης των οργανοκασσιτερικών ενώσεων ξεκίνησε τη δεκαετία του 80 από τον Gielen. Από τότε έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες από

διάφορες ερευνητικές ομάδες με σκοπό την ανάπτυξη νέων οργανοκασσιτερικών χημειοθεραπευτικών. Οι μελέτες σχέσης δομής-δράσης απέδειξαν ότι όλες οι δραστικές ενώσεις μοιράζονται τα εξής κοινά χαρακτηριστικά (Hadjikakou and Hadjiliadis, 2009):

- τη διαθεσιμότητα θέσεων συντονισμού του κασσιτέρου,
- την ύπαρξη σχετικά σταθερών δεσμών μεταξύ υποκαταστάτη και κασσιτέρου
- την αργή υδρολυτική αποικοδόμησή τους

Η αντικαρκινική δράση των οργανοκασσιτερικών ενώσεων φαίνεται να είναι συνισταμένη του κυτταρικού τύπου. Επίσης, γενικά οι καρβοξυλικές οργανοκασσιτερικές ενώσεις(IV) παρουσιάζουν συνήθως υψηλότερη δραστικότητα έναντι κυτταρικών σειρών ανθρώπινων όγκων από ότι οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις με θειολάτο ή διθειοκαρβαμάτο υποκαταστάτες. Ωστόσο, καλύτερη αντικαρκινική δράση εμφανίζουν οι τρι-οργανοκασσιτερικές ενώσεις σε σύγκριση με τις δι-οργανοκασσιτερικές, ενώ μεταξύ των τρι-οργανοκασσιτερικών ενώσεων ισχυρότερη δράση έχουν οι ενώσεις του τριφαινυλοκασσιτέρου.

Όσον αφορά τη γεωμετρία των οργανοκασσιτερικών ενώσεων, οι ενώσεις με τετραεδρική διάταξη των προσδετών γύρω από τα ιόντα κασσιτέρου(IV), εμφανίζουν ισχυρότερη αντικαρκινική δράση από εκείνα με τριγωνική διπυραμίδα, ενώ την μικρότερη δράση φαίνεται να έχουν οι ενώσεις με οκταεδρική γεωμετρία λόγω της μείωσης των διαθέσιμων θέσεων συντονισμού. Έχουν μελετηθεί αντικαρκινικές ενώσεις με πολύ υψηλότερη αντικαρκινική δράση από αυτή της σισπλατίνης, έως και 3.300 φορές μεγαλύτερη. Η ένωση με την ισχυρότερη αντικαρκινική δράση έναντι κυττάρων MCF-7 είναι η $\text{Et}_2\text{SnCl}_2\text{L}_2$ (όπου $\text{L}_2 = \text{N}-(2\text{-pyridylmethylene})4\text{-Methylamine}$), με IC_{50} 0,004 μM , ενώ οι χαμηλότερες τιμές IC_{50} έναντι κυττάρων HeLa και HepG2 έχουν καταγραφεί για τα σύμπλοκα $[(\text{Ph}_3\text{Sn})_6(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{SeC}_4\text{H}_3\text{S-o})_6]$ ($\text{IC}_{50} = 0,030 \mu\text{M}$) και $[\text{Ph}_4\text{Sn}_2\text{O}(\text{OCH}_3)(\text{OOCL})]_2$ ($\text{IC}_{50} = 0,284 \mu\text{M}$), αντίστοιχα (Banti et al., 2019).

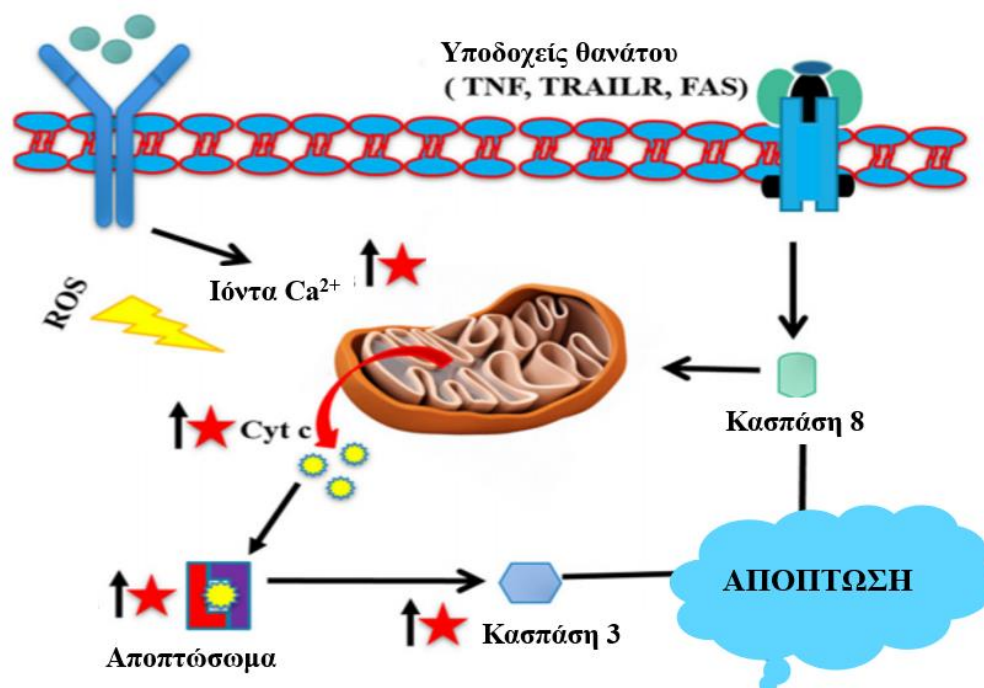
Οι μοριακοί μηχανισμοί της απόπτωσης που ενεργοποιούνται από τις οργανοκασσιτερικές ενώσεις περιλαμβάνουν μια σειρά από βιοχημικούς ρυθμιστές και ένα μεγάλο πλήθος μοριακών αλληλεπιδράσεων. Το κύτταρο μπορεί να οδηγηθεί σε απόπτωση είτε μέσω της αποπτωτικής οδού

που είναι ανεξάρτητη από κασπάσες, είτε συχνότερα μέσω των αποπτωτικών μονοπατιών που εξαρτώνται από τις κασπάσες. Όπως προαναφέρθηκε στο 1^ο Κεφάλαιο, η ενεργοποίηση των προκασπασών καθοδηγείται είτε από τους υποδοχείς θανάτου ή / και μέσω μιτοχονδριακών μονοπατιών. Η επαγωγή της απόπτωσης από τις οργανοκασσιτερικές ενώσεις φαίνεται να επιτυγχάνεται μέσω μιτοχονδριακών μονοπατιών. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις προκαλούν κυτταροσκελετικές τροποποιήσεις και διαταραχή των μιτοχονδριακών λειτουργιών.

Γενικά, το αποπτωτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από τις οργανοκασσιτερικές ενώσεις ξεκινά μετά από την αλληλεπίδραση των οργανοκασσιτερικών με τα κυτταρικά συστατικά. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα (**Εικόνα 13**):

- την διαταραχή της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης των ιόντων Ca^{2+} ,
- την διαταραχή των φυσιολογικών λειτουργιών του ενδοπλασματικού δικτύου (στρες ΕΔ),
- την αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου Ca^{2+} ,
- την διακοπή της παραγωγής ATP,
- την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και
- την απώλεια του δυναμικού μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Τα παραπάνω συμβάντα οδηγούν στη συνέχεια στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια στον κυτταρόπλασμα, στον σχηματισμό των αποπτωσωμάτων, στην ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασών και τελικά στην διόγκωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και στον κατακερματισμό του DNA (Kumar et al., 2020). Η αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων Ca^{2+} και η επακόλουθη απελευθέρωση του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος είναι κρίσιμα βήματα του αποπτωτικού μηχανισμού που προκαλείται από τις οργανοκασσιτερικές ενώσεις.



Εικόνα 13: Μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης οργανοκασσιτερικών ενώσεων (τροποποίηση από: Kumar et al., 2020)

Επιπλέον, διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού, έχουν αποκαλύψει ότι οι οιστρογονικοί υποδοχείς (ERs) εμπλέκονται στον μηχανισμό αντικαρκινικής δράσης των οργανοκασσιτερικών ενώσεων, έναντι του καρκίνου του μαστού (Martin et al., 2003; Balas et al., 2011; Carraher et al., 2011). Στις παραπάνω μελέτες μελετήθηκε η αντικαρκινική δράση σε καρκινικά κύτταρα του μαστού που εκφράζουν ERs (MCF-7) και σε κύτταρα που δεν εκφράζουν (MDA-MB-231) (Balas et al., 2011; Balas et al., 2012). Το εύρημα αυτό μπορεί να αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμο για την στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, καθώς η σύζευξη αντικαρκινικών φαρμάκων με ενώσεις του κασσιτέρου μπορούν να οδηγήσουν στην επιλεκτική στόχευση καρκινικών κυττάρων, αφού οι ERs υπεκφράζονται στο 60 – 70% των καρκίνων του μαστού (Provencher-Mandeville et al., 2008).

Η αποπτωτική διαδικασία εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και την ευαισθησία του κυττάρου, αλλά και από τα χημικά χαρακτηριστικά της αντικαρκινικής ένωσης (αριθμός και είδος υποκατάστατων, μήκος αλυσίδας αλκυλίου) και την ένταση της προσβολής (δόση, συγκεντρώσεις,

χρόνος έκθεσης) των οργανοκασσιτερικών ενώσεων. Παρά τις πολυάριθμες μελέτες σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, οι μηχανισμοί απόπτωσης που ενεργοποιούνται από τις οργανοκασσιτερικές ενώσεις εξακολουθούν να μην έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Οι νέες και πολλά υποσχόμενες έρευνες σχετικά με τους αποπτωτικούς μηχανισμούς που ενεργοποιούνται από τις οργανοκασσιτερικές ενώσεις, εστιάζουν στον προσδιορισμό των οργανοκασσιτερικών αλληλεπιδράσεων με τις αποπτωτικές πρωτεΐνες και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

A.3.3.2 Αντιμικροβιακή δράση οργανοκασσιτερικών ενώσεων

Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις παρουσιάζουν τεράστια ποικιλομορφία σε σχέση με άλλες ομάδες ενώσεων και έχουν ένα μεγάλο φάσμα εφαρμογών που κυμαίνεται από την επιστήμη των υλικών και την κατάλυση, μέχρι τη χρήση τους για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Το εύρος των υπαρχουσών ενώσεων, που περιλαμβάνει δι- και τρι-οργανικά παράγωγα το καθένα από τα οποία μπορεί να συνδεθεί με διαφορετικούς οργανικούς υποκαταστάτες, θα μπορούσε να εξηγήσει την ευρεία φαρμακολογική ποικιλία τους (Casas et al., 2018).

Μέχρι σήμερα, έχουν συντεθεί οργανοκασσιτερικές ενώσεις με βάσεις του Schiff, με αμινοξέα, με καρβοξυλικά οξέα και με άλλους υποκαταστάτες και φαίνεται να έχουν καλή βακτηριοκτόνο και μυκητοκτόνο δράση (Basu Baul, 2008; Chilwal and Narula, 2013; Sharma et al., 2015). Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις με τρεις οργανικές ομάδες μπορεί να είναι ισχυρά μυκητοκτόνα και βακτηριοκτόνα ανάλογα με την R οργανική ομάδα (Sharma et al., 2015). Μερικά παραδείγματα, είναι ο διχλωροδιβουτυλοκασσίτερος, ο χλωροτριβουτυλοκασσίτερος, και ενώσεις του τριφαινυλο- και διφαινυλο- κασιτέρου, που παρουσιάζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση (Annis et al., 2017).

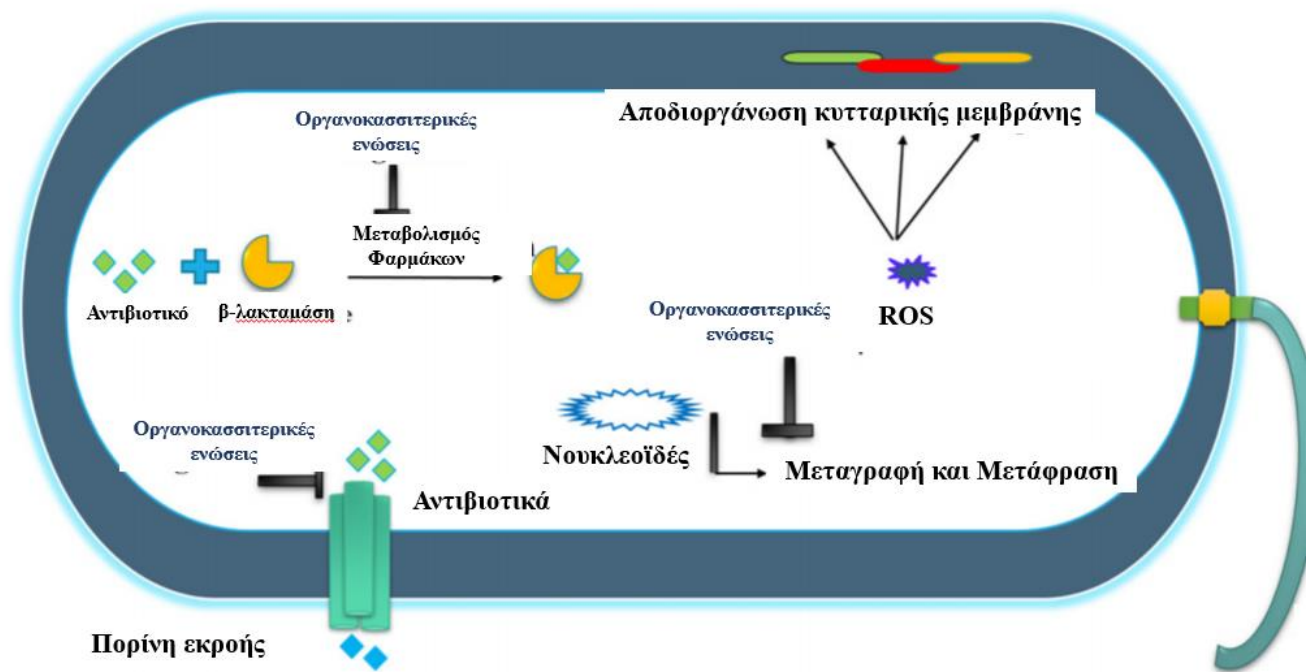
Ο μηχανισμός της αντιμικροβιακής δράσης των οργανοκασσιτερικών ενώσεων περιλαμβάνει την αναστολή της μεταγραφής, της μετάφρασης και της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος που είναι απαραίτητες διαδικασίες για την επιβίωση των βακτηριακών κυττάρων (**Εικόνα 14**). Επιπλέον,

οι έρευνες απέδειξαν ότι οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις εμπλέκονται στην αποφυγή της ανάπτυξης ανθεκτικότητας των βακτηρίων έναντι ορισμένων αντιβιοτικών, καθώς:

- (i) εμποδίζουν τη δράση των βακτηριακών λακταμασών. Οι λακταμάσες είναι βακτηριακά ένζυμα που αδρανοποιούν τις β-λακτάμες, υδρολύοντας τον αμιδικό δεσμό του β-λακταμικού δακτυλίου
- (ii) απενεργοποιούν τις αντλίες ενεργητικής εκροής αντιβιοτικών έξω από το βακτηριακό κύτταρο

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο Κεφάλαιο, λόγω της εμφάνισης βακτηριακής ανθεκτικότητας σε πολλά από τα ευρέως συνταγογραφούμενα αντιβιοτικά, η ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών αποτελεί επείγουσα ανάγκη. Για το σκοπό αυτό συχνά τα υπάρχοντα αντιβιοτικά τροποποιούνται ή / και συζευγνύονται με σάκχαρα, λιπίδια και άλλα μόρια. Πολλές ερευνητικές ομάδες, έχουν εστιάσει στην ανάπτυξη νέων δι-οργανοκασσιτερικών(IV) και τρι-οργανοκασσιτερικών(IV) συμπλόκων με αντιβιοτικά όπως η χλωραμφενικόλη (Pellerito et al., 1998), η κεφαλεξίνη (Di Stefano, 2004), η νορφλοξασίνη, η τετρακυκλίνη και η ερυθρομυκίνη (Barbosa et al., 2018), με σκοπό την ενίσχυση της αντιμικροβιακής τους δράσης και την αποφυγή ανάπτυξης βακτηριακής ανθεκτικότητας.

Η σύζευξη οργανοκασσιτερικών ενώσεων με αντιβιοτικά, φαίνεται να εμποδίζει την ανάπτυξη ανθεκτικότητας, καθώς αυτά δρουν στο βασικό μηχανισμό που εμπλέκεται στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας, τις αντλίες εκροής των αντιβιοτικών που οδηγούν στην μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του αντιβιοτικού και στην επιβίωση των βακτηρίων (Piddock, 2006). Συνεπώς, οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις μπορούν να ενισχύσουν και να ανανεώσουν τη χρήση των συμβατικών αντιβιοτικών έναντι ανθεκτικών στελεχών, με μικρότερες ποσότητες αντιβιοτικού, μειώνοντας την πιθανότητα τοξικότητας και ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών και μειώνοντας το κόστος παραγωγής φαρμάκων.



Εικόνα 14: Μηχανισμός αντιμικροβιακής δράσης οργανοκασσιτερικών ενώσεων(τροποποίηση από: Kumar et al., 2020)

A.4.1 Μικκυλιακοί φορείς φαρμάκων

Τα μικκύλια είναι νανο-φορείς που αποτελούνται από ένα υδρόφοβο πυρήνα και ένα υδρόφιλο περίβλημα που αποτελείται από αμφίφιλα συνπολυμερή ή επιφανειοδραστικές ουσίες. Η δημιουργία μικκυλιακών δομών είναι μια εναλλακτική λύση για τη μεταφορά κυρίως υδρόφοβων φαρμάκων (Joseph et al., 2017). Το κύριο χαρακτηριστικό όμως που διακρίνει τα μικκύλια από τα άλλα συστήματα μεταφοράς και παράδοσης φαρμάκων είναι ότι χρησιμοποιούνται όχι μόνο για τα λιπόφιλα φάρμακα, αλλά και για τα υδρόφιλα. Σε ορισμένες ειδικές περιπτώσεις, όπως κατά την στόχευση υδρόφιλων φαρμάκων σε υδρόφοβα περιβάλλοντα, τα αμφίφιλα συνπολυμερή ή τα επιφανειοδραστικά μπορεί να σχηματίσουν «αντίστροφα μικκύλια» (Trivedi and Kompella, 2010).

Μία άλλη σημαντική διαφορά των μικκυλίων σε σύγκριση με άλλα συστήματα μεταφοράς και παράδοσης φαρμάκων, είναι ότι μπορούν να παραμείνουν σταθερά στο κυκλοφορικό σύστημα για μεγάλο χρονικό διάστημα και έτσι απεκκρίνονται πιο αργά σε σύγκριση με άλλα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Η δυναμική δομή πυρήνα - περιβλήματος παρέχει υψηλή κινητική και θερμοδυναμική σταθερότητα και αργή αποδέσμευση κατά την διάλυση (Owen et al., 2012). Ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου και των επιφανειοδραστικών ουσιών που σχηματίζουν τη μικκυλιακή δομή, ο πυρήνας των μικκυλίων μπορεί να φιλοξενήσει σημαντικές ποσότητες «φιλοξενούμενων» μορίων, αυξάνοντας τη διαλυτότητα τους στο υδατικό περιβάλλον του γαστρεντερικού σωλήνα (Perić et al., 2013). Η μικκυλιακή δομή παρέχει επίσης προστασία έναντι άλλων παραγόντων του κυκλοφορικού συστήματος. Ένα άλλο πλεονέκτημα είναι ότι τα μικκύλια ότι παρασκευάζονται εύκολα, το επιθυμητό μέγεθος των σωματιδίων προσαρμόζεται και μπορούν να στοχεύσουν τον επιθυμητό ιστό αν προστεθεί κάποιο συγκεκριμένο πρόσδεμα, στην μικκυλιακή δομή (Simões et al., 2014).

Όσον αφορά τον καρκίνο, τα μικκύλια έχουν προσελκύσει την προσοχή ως μεταφορείς αντικαρκινικών φαρμάκων λόγω των μοναδικών χαρακτηριστικών τους. Τα υδρόφοβα αντικαρκινικά φάρμακα εγκολπώνονται στην κεφαλή, η οποία παρέχει ένα μη πολικό περιβάλλον για να διαλυθεί το υδρόφοβο φάρμακο και ταυτόχρονα προσδίδει υδροφιλικότητα στο συνολικό σύστημα. Η εγκόλπωση των φαρμάκων στον εσωτερικό πυρήνα μπορεί να τα προστατεύσει από την πρόωρη αποικοδόμηση και να επιτρέψει τη βιοσυσσωρεύσή τους στον όγκο. Το μικρό τους μέγεθος και οι ιδιότητες της επιφάνειάς τους οδηγούν στην μειωμένη πρόσληψη τους από το σύστημα φαγοκυττάρωσης, σε παρατεταμένους χρόνους κυκλοφορίας και στην αυξημένη πρόσβαση σε εξω-αγγειακά καρκινικά κύτταρα (Le Garrec et al., 2004).

Τα πιο δημοφιλή εμπορικά επιφανειοδραστικά για τη μεταφορά αντικαρκινικών φαρμάκων είναι το πολυαιθοξυλιωμένο καστορέλαιο (Cremophor[®] EL) (Szebeni et al., 1998), το οξείδιο του πολυαιθυλενίου (PEO) 660 12-υδροξυστεατικό (Solutol[®] HS15) (Buckingham et al., 1995) και τα πολυσορβικά (λιπαρός εστέρας σορβιτάνης με βάση το PEO, Tween[®]) (Van Zuylen et al., 2001). Το Cremophor[®] EL έχει χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά αντικαρκινικών δραστικών ουσιών όπως η πακλιταξέλη, η ετοποσίδη, η τενιποσίδη, η δοξορουβική και η δαουνορουβική και παρέχει υψηλή ικανότητα διαλυτοποίησης με κάποιες όμως παρενέργειες. Το Πολυσορβικό 80 (Tween[®] 80) έχει χρησιμοποιηθεί για διαλυτοποίηση της δοκεταξέλης, της ετοποσίδης, της πακλιταξέλης και της σισπλατίνης και έχει μικρότερη διαλυτική ικανότητα από το Cremophor[®] EL και λιγότερες παρενέργειες (Le Garrec et al., 2004).

Βιβλιογραφικά, υπάρχουν αρκετά παραδείγματα μικτών μικκυλίων (Alkan-Onyuk et al., 1994; Le Garrec et al., 2004) και έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την επιλεκτική στόχευση των καρκινικών κυττάρων με φάρμακα που εγκολπώνονται σε μικκύλια (Sutton, et al., 2007). Τα προσδέματα στόχευσης μπορεί να είναι μικρά οργανικά μόρια, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και αντισώματα τα οποία είναι συζευγμένα στη μικκυλιακή δομή, ενώ μπορούν να παρασκευασθούν μικκύλια με στοχευμένη δράση, τα οποία είναι ευαίσθητα σε εξωτερικά ερεθίσματα, όπως η θερμοκρασία (Cammis et al., 1997) το pH (Le Garrec et al., 2002) ή οι υπέρηχοι (Marin et al., 2001).

Επίσης, τα μικκύλια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως έκδοχα για την παρασκευή ενισχυμένων αντιμικροβιακών φαρμάκων, αφού έχει βρεθεί ότι ενισχύουν την αντιμικροβιακή δράση των αντιβιοτικών αυξάνοντας την διαλυτότητά τους, την διαπερατότητά τους από τον βλεννογόνο και την απορρόφηση τους από το γαστρεντερικό σύστημα. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η αντιμικροβιακή δράση των αντιβιοτικών ενισχύεται έναντι διαφόρων βακτηριακών στελεχών όπως: το *Helicobacter pylori* (Figura et al., 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (Morteza et al., 2019), *Escherichia coli* (Yuan et al., 2020) και *Staphylococcus aureus* (Tian et al., 2020).

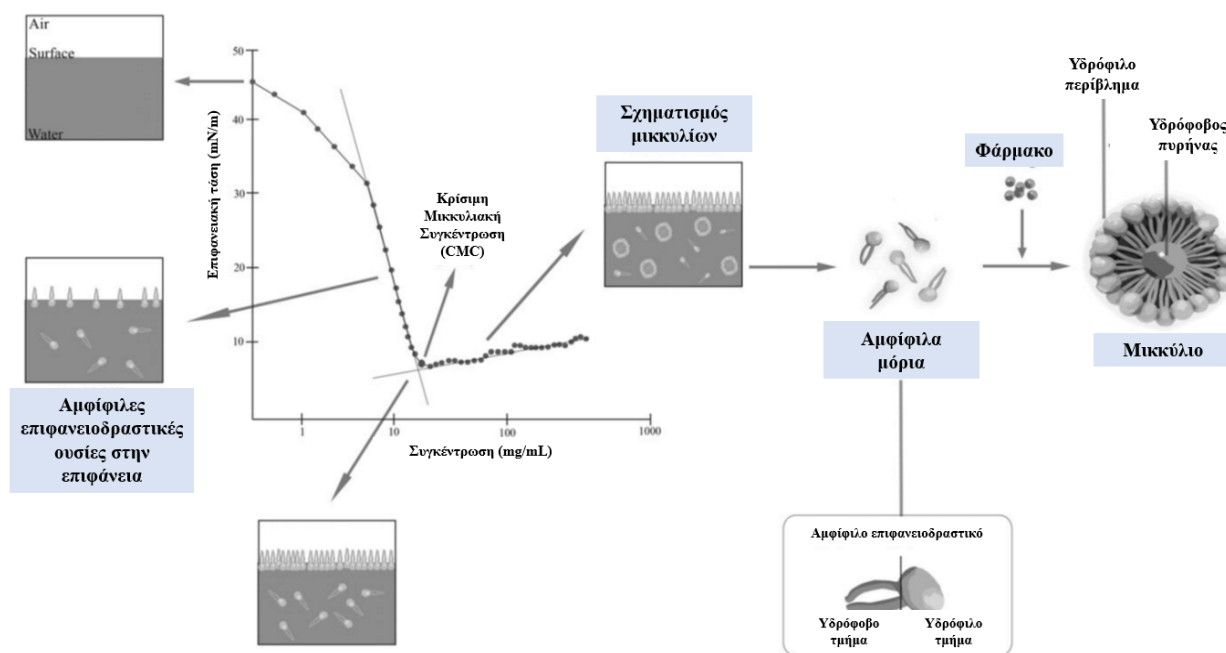
A.4.2 Κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση

Η κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (Critical micelle concentration - CMC) είναι η πιο σημαντική παράμετρος στο σχηματισμό των μικκυλιακών δομών. Τα συστατικά των μικκυλίων, δηλαδή τα αμφίφιλα συμπολυμερή ή οι επιφανειοδραστικές ουσίες, εμφανίζονται ως μεμονωμένες δομές σε υδατικό μέσο σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, οι τασιενεργές ουσίες ή τα μόρια αμφίφιλων συμπολυμερών αυξάνουν τη διεπαφή και το σύστημα φτάνει σε επίπεδο κορεσμού. Εάν συνεχισθεί η προσθήκη μορίων στο σύστημα μετά τον κορεσμό, τα συστατικά συσσωματώνονται και η συγκέντρωση κατά την οποία σχηματίζονται τα μικκύλια ονομάζεται CMC (**Εικόνα 15**).

Η CMC εκφράζει την ευκολία σχηματισμού μικκυλιακών συσσωματωμάτων και για αυτό οι χαμηλές τιμές CMC για ένα είδος τασιενεργού υποδηλώνουν την μεγάλη ικανότητα στο σχηματισμό μικκυλίων. Επίσης, οι χαμηλές τιμές CMC των μικκυλίων ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων παρέχουν ένα μεγάλο πλεονέκτημα, αφού δεν αποσυντίθενται εύκολα στα μονομερή τους και διατηρούν τη σταθερότητά τους για μεγάλο χρονικό διάστημα στην συστηματική κυκλοφορία (Özsoy, et al., 2019).

Οι ιδιότητες των μικκυλίων επηρεάζονται έντονα από τις ιδιότητες των επιφανειοδραστικών ουσιών και για αυτό η CMC αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές φυσικοχημικές παραμέτρους. Για παράδειγμα, η ικανότητα διαλυτοποίησης των επιφανειοδραστικών εμφανίζεται μόνο σε συγκεντρώσεις πολύ μεγαλύτερες από την CMC, αφού στις περισσότερες περιπτώσεις είναι ανάλογη

με τον αριθμό των μικκυλίων στο υδατικό περιβάλλον (Vinařov et al., 2017). Η τοξικότητα των τασιενεργών εξαρτάται επίσης από την CMC, καθώς οι τοξικές επιδράσεις, ειδικά για τα μη φορτισμένα τασιενεργά, εμφανίζονται σε συγκεντρώσεις κοντά ή σε υψηλότερες από την CMC (Inácio et al., 2011).



Εικόνα 15: Δομή και τρόπος σχηματισμού μικκυλιακών δομών (τροποποίηση από: Durgun et al., 2020)

Η CMC των επιφανειοδραστικών ουσιών εξαρτάται κυρίως από την υδροφοβικότητα των αμφίφιλων μορίων όπως για παράδειγμα από το μήκος της υδρόφοβης ουράς. Επίσης, η CMC επηρεάζεται έντονα από τις ιδιότητες των διαλυμάτων όπως από την παρουσία αλάτων. Πειραματικά, η CMC μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας πολλές μεθόδους, οι οποίες θα μπορούσαν να ομαδοποιηθούν στις ποτενσιομετρικές, ηλεκτροχημικές (πχ αγωγιμότητα), οπτικές (πχ δυναμική σκέδαση φωτός) και φασματοσκοπικές (φθορισμομετρία ή υπερηχητική φασματοσκοπία) (Dominguez et al., 1997; Perinelli et al., 2016). Στην πραγματικότητα, οποιαδήποτε τεχνική μπορεί να εντοπίζει σημαντικές αλλαγές, σε κάποια μετρούμενη παράμετρο που σχετίζεται με τις

φυσικοχημικές ιδιότητες, σε συγκεντρώσεις κάτω και πάνω από την CMC, μπορεί να χρησιμοποιηθεί.

A.4.3 Τεχνικές παρασκευής μικκυλίων

Για την παρασκευή των μικκυλιακών δομών χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές. Οι πιο διαδεδομένες είναι οι παρακάτω (Konwar and Ahmed, 2016):

1. Μέθοδος απευθείας διάλυσης (Direct dissolution method)

Η μέθοδος της απευθείας διάλυσης είναι η απλούστερη γνωστή μέθοδος παρασκευής μικκυλίων και βασίζεται στην αρχή ότι το φάρμακο και το πολυμερές ή η επιφανειοδραστική ουσία σχηματίζουν μικκύλια αυθόρμητα. Για να σχηματιστούν αυθόρμητα τα μικκύλια, η συγκέντρωση του πολυμερούς ή της επιφανειοδραστικής ουσίας που υπάρχει στο υδατικό μέσο θα πρέπει να ξεπερνά την CMC. Το κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι η ποσότητα του φαρμάκου που φορτώνεται στο μικκύλιο είναι σχετικά χαμηλή.

2. Μέθοδος ενυδάτωσης λεπτής μεμβράνης (Thin-film hydration method)

Η μέθοδος ενυδάτωσης λεπτής μεμβράνης είναι μια πολύ απλή και γρήγορη μέθοδος παρασκευής μικκυλίων, κατά την οποία ένα διάλυμα του φαρμάκου και του πολυμερούς ή της επιφανειοδραστικής ουσίας διαλύεται σε έναν πτητικό οργανικό διαλύτη ή σε μείγμα οργανικών διαλυτών. Οι οργανικοί διαλύτες στη συνέχεια εξατμίζονται για να δώσουν ένα λεπτό φιλμ/μεμβράνη γύρω από τη φιάλη. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ενυδάτωση της μεμβράνης με υδατική φάση (νερό, ρυθμιστικό διάλυμα ή διάλυμα της προς εγκλωβισμό υδρόφιλης ουσίας) και η αποκόλληση της μεμβράνης πραγματοποιείται μηχανικά.

3. Μέθοδος λυοφιλίωσης

Με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης μπορεί να παραγωγή μικκυλιακών δομών σε μεγάλη κλίμακα, με τον περιορισμό ότι θα πρέπει και το φάρμακο, αλλά και τα πολυμερή / επιφανειοδραστικές ουσίες να είναι ανθεκτικά στη λυοφιλίωση. Αρχικά το φάρμακο και το

πολυμερές / επιφανειοδραστικό διαλύονται σε κατάλληλο οργανικό διαλύτη και στη συνέχεια το διάλυμα λυοφιλοποιείται με ανάμιξη με νερό.

4. Μέθοδος γαλακτώματος ελαίου σε νερό (Oil in-water emulsion method)

Στη μέθοδο γαλακτώματος ελαίου σε νερό, παρασκευάζεται το διάλυμα του φαρμάκου σε οργανικό διαλύτη και αναμιγνύεται με νερό, μέχρι να σχηματιστεί ένα ομοιογενές γαλάκτωμα. Ο οργανικός διαλύτης στη συνέχεια εξατμίζεται. Τα πολυμερή ή οι επιφανειοδραστικές ουσίες είναι διαλυτές στην υδατική φάση ή στον οργανικό διαλύτη.

A.4.4 Μικκύλια με επιφανειοδραστικές ενώσεις

Μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες μικκυλιακών δομών είναι τα μικκύλια με επιφανειοδραστικές ουσίες. Οι επιφανειοδραστικές ή τασιενεργές ουσίες, είναι αμφίφιλα μόρια που αποτελούνται από μια υδρόφιλη (πολική) κεφαλή και μια λιπόφιλη (μη πολική) ουρά (Sekhon, 2013). Λόγω αυτής της ιδιαίτερης δομής τους όταν τα επιφανειοδραστικά διαλύονται σε νερό προσανατολίζονται προς στην επιφάνεια έτσι ώστε οι υδρόφοβες περιοχές να απομακρύνονται από το υδατικό περιβάλλον και να μειώνουν την επιφανειακή τάση των υγρών. Ο λόγος της μείωσης της επιφανειακής τάσης είναι ότι τα μόρια του τασιενεργού αντικαθιστούν μερικά από τα μόρια του νερού στην επιφάνεια και έτσι οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ τασιενεργού και μόριου νερού είναι μικρότερες από αυτές μεταξύ δύο μορίων νερού και συνεπώς η έλξη μειώνεται (Rosen, 1974).

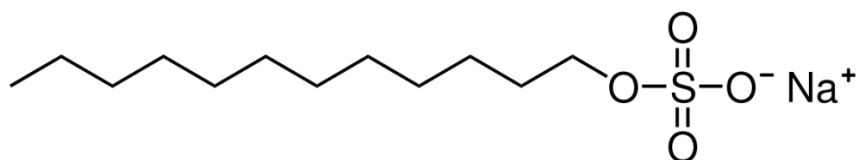
Οι επιφανειοδραστικές ουσίες προσροφώνται επίσης στην διεπιφάνεια μεταξύ δύο μη αναμίξιμων υγρών όπως το λάδι και νερό και προσανατολίζονται με την υδρόφιλη ομάδα τους στο νερό και την υδρόφοβη ομάδα τους στο λάδι. Η διεπιφανειακή τάση σε αυτήν τη διεπιφάνεια, η οποία προκύπτει λόγω μιας παρόμοιας ανισορροπίας των ελκτικών δυνάμεων όπως στην επιφάνεια του νερού, θα μειωθεί κατά την προσρόφηση των επιφανειοδραστικών. Συνεπώς, οι επιφανειοδραστικές ουσίες καθώς προσανατολίζονται στην επιφάνεια της υγρής φάσης, επιτρέπουν τη μείωση της διεπιφανειακής τάσης σε συστήματα διαφορετικών υγρών ή στερεού-υγρού (Cui et al., 2008).

Η ικανότητα των επιφανειοδραστικών να αυτοσυναρμολογούνται και να εμφανίζουν ποικιλία στην μορφολογία τους, ανάλογα με τον τύπο του τασιενεργού, τον διαλύτη, τη θερμοκρασία, το pH και τη συγκέντρωση (Jensen et al., 2013), τους καθιστά μια ελκυστική επιλογή σε κλάδους όπως η φαρμακευτική, η ιατρική και η βιοτεχνολογία. Η παγκόσμια αγορά επιφανειοδραστικών ουσιών άγγιξε τα 43.655 εκατομμύρια δολάρια το 2017 και αναμένεται να φθάσει τα 66.408 εκατομμύρια δολάρια έως το 2025, με ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης 5,4 %. Η υψηλή ζήτηση των τασιενεργών αντιπροσωπεύει την ευρεία χρήση τους που κυμαίνεται από οικιακά απορρυπαντικά και προϊόντα προσωπικής φροντίδας μέχρι τη βιομηχανική χρήση τους όπως σε καθαριστικά, σε τρόφιμα, σε υφάσματα, σε πλαστικά και σε γεωργικά χημικά (Perinelli et al., 2020).

Η κύρια χρήση των επιφανειοδραστικών στην φαρμακευτική επιστήμη είναι η αύξηση της διαλυτότητας των ελάχιστα διαλυτών φαρμάκων σε υδατικό περιβάλλον, όπου δρουν ως παράγοντες διαλυτοποίησης (Vinarov et al., 2017). Επιπλέον, οι τασιενεργές ουσίες μπορούν να αλληλεπιδρούν με τις βιολογικές μεμβράνες, χάρη στην αμφίφιλη δομή τους, αυξάνοντας έτσι τη διαπερατότητα του φαρμάκου από το δέρμα ή το βλεννογόνο. (Joseph et al., 2017). Ταυτόχρονα, χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία των φαρμάκων και των καλλυντικών και ως έκδοχα για τη σταθεροποίηση όλων των διασπειρόμενων συστημάτων, καθώς δρουν ως γαλακτωματοποιητές στην παρασκευή γαλακτωμάτων και κρεμών και ως σταθεροποιητές σε φαρμακευτικά εναιωρήματα (McClements and Jafari, 2018).

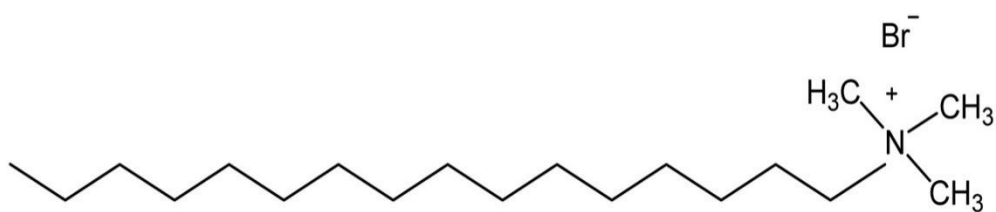
Η χρήση επιφανειοδραστικών ποικίλλει ανάλογα με τη φυσικοχημική τους δομή και τις ιδιότητές τους. Η ταξινόμηση των επιφανειοδραστικών ουσιών πραγματοποιείται ανάλογα με το φορτίο της υδρόφιλης κεφαλής και χωρίζονται σε τέσσερις ομάδες: τα μη ιονικά, τα ανιονικά, τα κατιονικά και τα διπολικά ιόντα ή εσωτερικά άλατα (zwitterion). Τα ανιονικά και κατιονικά τασιενεργά είναι αρνητικά και θετικά φορτισμένα, αντίστοιχα. Τα εσωτερικά άλατα μπορούν είτε να φορτιστούν αρνητικά είτε θετικά ανάλογα με το pH του διαλύματος, ενώ τα μη ιονικά τασιενεργά είναι ουδέτερα.

Το sodium lauryl sulfate (SLS) είναι το πιο διαδεδομένο επιφανειοδραστικό με πολλές εφαρμογές στην ιατρική και στα προϊόντα καθαρισμού και προσωπικής υγιεινής. Είναι ένα ανιονικό επιφανειοδραστικό με χημικό τύπο $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}$ (**Εικόνα 16**). Το SLS μπορεί να προέρχεται από φυσικές πηγές όπως το λάδι καρύδας ή το φοινικέλαιο και μπορεί επίσης να παρασκευασθεί εργαστηριακά. Η συγκέντρωση του SLS στα προϊόντα ποικίλλει, αλλά συνήθως κυμαίνεται από 0,01 % έως 50 % στα καλλυντικά και από 1 % έως 30 % στα προϊόντα καθαρισμού. Το SLS (MW 288,38 g / mol; pH 7,2) είναι μια μη πτητική, υδατοδιαλυτή (100-150 g/L σε θερμοκρασία δωματίου) ένωση (Bondi et al., 2015).



Εικόνα 16: Χημική δομή του sodium lauryl sulfate (SLS)

Το cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τασιενεργή ουσία. Το CTAB αποτελείται από μια ανθρακική ουρά 16 ατόμων άνθρακα και μια κεφαλή που απαρτίζεται από μια ομάδα αμμωνίου στην οποία είναι συνδεδεμένες τρεις μέθυλο-ομάδες (**Εικόνα 17**). Το CTAB είναι ένα κατιονικό επιφανειοδραστικό που χρησιμοποιείται σε πολλές βιομηχανικές διεργασίες και στη σύνθεση φαρμακευτικών παραγόντων, στα απολυμαντικά, στα αντισηπτικά, στα βιοκτόνα, στην γαλακτωματοποίηση και στην αποφυγή της διάβρωσης (Gaidamauskas et al., 2010; Nabi et al., 2018). Επιπλέον, το CTAB έχει χρησιμοποιηθεί για την στόχευση καρκινικών όγκων καθώς είναι γνωστό ότι τα κατιοντικά επιφανειοδραστικά αποτελούν εξαιρετικά «οχήματα μεταφοράς» χημειοθεραπευτικών παραγόντων (Balasubramanian et al., 1989).



Εικόνα 17: Χημική δομή του cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

A.5.1 Μικροβίωμα και καρκινογένεση

Οι πρόσφατες επιστημονικές εξελίξεις έχουν συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση της περίπλοκης σχέσης μεταξύ του ανθρώπινου μικροβιώματος και του καρκίνου. Το σώμα μας εκτίθεται καθημερινά και συνεχώς σε μικροβιακά κύτταρα, που βρίσκονται μόνιμα ή / και παροδικά στον οργανισμό, καθώς και στα υποπροϊόντά τους, συμπεριλαμβανομένων των τοξικών μεταβολιτών. Η απόκτηση ολοκληρωμένων μελετών των μικροβιακών οικοσυστημάτων που σχετίζονται με το ανθρώπινο σώμα (ανθρώπινο μικροβίωμα) κατέστη δυνατή μετά τις εξελίξεις στις αναλύσεις «omics» χρησιμοποιώντας τεχνικές αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS, Next Generation Sequencing) (The Human Microbiome Project Consortium, 2012).



Εικόνα 18: Η πορεία προς την καρκινογένεση και ο ρόλος των μικροβίων (τροποποίηση από: Garrett et al., 2015).

Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του μικροβιώματος και διαφόρων ασθενειών, όπως οι μεταβολικές διαταραχές, οι γαστρεντερικές διαταραχές και διάφορες μολυσματικές ασθένειες και μέχρι σήμερα, έχουν δημοσιευτεί χιλιάδες άρθρα που εστιάζουν στο ρόλο του ανθρώπινου μικροβιώματος για την υγεία και τις ασθένειες (Karlsson et al., 2013, Pedersen et al., 2016, Turnbaugh et al., 2008). Τα τρισεκατομμύρια μικρόβια που κατοικούν στο ανθρώπινο σώμα δημιουργούν ευεργετική σχέση με τον ξενιστή, αλλά είναι σαφές ότι μπορούν να αναπτυχθούν και δυσβιωτικές σχέσεις, μερικές από τις οποίες υποστηρίζεται ότι μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη φλεγμονωδών ασθενειών και καρκίνου (**Εικόνα 18**). Μάλιστα, εκτιμάται ότι το 20 % των όγκων παγκοσμίως προκαλούνται από το μικροβίωμα (Smith et al., 2013).

A.5.2 Μηχανισμοί καρκινογένεσης μικροβίων

Η μεγάλη ποικιλομορφία των μικροβιακών πληθυσμών καθώς και των περιβαλλοντικών συνθηκών στις διάφορες θέσεις του ανθρώπινου σώματος, υποδηλώνει ότι οι μικροβιακοί μηχανισμοί και τα είδη των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στην εμφάνιση καρκίνου θα ποικίλουν επίσης ανάλογα με τη θέση. Αρκετά ζωικά μοντέλα παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τους πιθανούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην πρόκληση καρκινογένεσης από τα μικρόβια (Chen et al., 2008; Dapito et al., 2012; Grivennikov et al., 2012). Ένας τρόπος είναι άμεσα μέσω της απελευθέρωσης γονοτοξινών που μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA του ξενιστή. Επίσης, οι βακτηριακές τοξίνες και ορισμένοι μεταβολίτες μπορεί να προάγουν έμμεσα την καρκινογένεση, καθώς μπορούν να οδηγήσουν σε χρόνια φλεγμονή, η οποία με τη σειρά της μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα κύτταρα του ξενιστή και στο εσωτερικό των ιστών (Schwabe and Jobin, 2013; Garrett et al., 2015). Επιπρόσθετα, είναι γνωστό ότι το μικροβίωμα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της φυσικής και επίκτητης ανοσίας του ξενιστή (Thaiss et al., 2016) και οι ανοσολογικές δυσλειτουργίες ως απόκριση στο εγκατεστημένο μικροβίωμα μπορεί επίσης να οδηγήσουν σε ανάπτυξη όγκου (Chen et al., 2008).

Τα μικρόβια μπορούν επίσης να επηρεάσουν την κυτταρική σηματοδότηση που εμπλέκεται στη σταθερότητα του γονιδιώματος, στην αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ξενιστή. Πολλά βακτήρια προκειμένου να επιβιώσουν και να είναι ανταγωνιστικά ανέπτυξαν μηχανισμούς που προκαλούν βλάβες στο DNA. Αυτοί οι βακτηριακοί αμυντικοί μηχανισμοί μπορεί να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις που συμβάλλουν στην καρκινογένεση. Μερικά παραδείγματα είναι οι τοξίνες κολιβακτίνη (*Enterobacteriaceae* π.χ. *E.coli*), η *Bacteroides fragilis* (Bft) και η CDT (cytolethal distending toxin) που παράγεται από πολλά ε- και γ- πρωτεοβακτήρια.

Η κολιβακτίνη θεωρείται βασικό μόριο στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου και έχει αποδειχθεί η ογκογόνος δράση της σε πειραματικά μοντέλα ποντικού (Arthur et al., 2014). Η κολιβακτίνη και η CDT εμπλέκονται στην καρκινογένεση αφού μπορούν να προκαλέσουν δίκλωνες θραύσεις στο DNA των θηλαστικών κυττάρων (Guerra et al., 2011). Επίσης πληθώρα ερευνητικών δεδομένων σε ανθρώπους και σε μοντέλα ζώων (Wu et al., 2009; Boleij et al., 2014; Dejea et al., 2014), αποδεικνύουν τον έμμεσο ρόλο της τοξίνης Bft στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου, η οποία προκαλεί αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες και μεταλλάξεις στο DNA του ξενιστή (Goodwin et al., 2011).

Εκτός από την πρόκληση βλαβών στο DNA, αρκετά μικρόβια εκφράζουν πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε μονοπάτια του ξενιστή που σχετίζονται με την καρκινογένεση. Το μονοπάτι σηματοδότησης Wnt / b-catenin που ρυθμίζει την πολικότητα, την κυτταρική ανάπτυξη και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι ένα παράδειγμα που εμφανίζει αλλαγές σε πολλές κακοήθειες και έχει βρεθεί ότι πολλά βακτήρια που προκαλούν καρκινογένεση μπορούν να επηρεάζουν και το μονοπάτι Wnt / b-catenin (Clevers and Nusse, 2012). Για παράδειγμα, ογκογόνα στελέχη τύπου 1 *Helicobacter pylori* εκφράζουν μια πρωτεΐνη που ονομάζεται CagA, η οποία εισέρχεται απευθείας στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή και τροποποιεί τη β-κατενίνη, οδηγώντας στην ενεργοποίηση των γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη

μετανάστευση και την αγγειογένεση και τελικά στην ανάπτυξη καρκίνου του στομάχου (Abreu and Peek, 2014).

Το βακτήριο *Fusobacterium nucleatum* είναι μέλος της μικροχλωρίδας της στοματικής κοιλότητας και σχετίζεται με τα ανθρώπινα αδενώματα και αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου (Castellarin et al., 2011). Το *F. nucleatum* εκφράζει το FadA, ένα συστατικό επιφανειακής προσκόλλησης των βακτηριακών κυττάρων που δεσμεύει την E-κατχερίνη του ξενιστή, οδηγώντας σε ενεργοποίηση της β-κατενίνης (Rubinstein et al., 2013). Επίσης, τα βακτήρια *Salmonella typhi* εκκρίνουν AvrA, το οποίο μπορεί να ενεργοποιήσει την επιθηλιακή σηματοδότηση μέσω της β-κατενίνης (Lu et al., 2012) και σχετίζονται με καρκίνο του ήπατος και της χοληδόχου κύστεως (Lazcano-Ponce et al., 2001; Wistuba and Gazdar, 2004).

A.5.3 Καρκίνος του μαστού και μικροβίωμα

Το μικροβίωμα έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στην καρκινογένεση σε διάφορες περιοχές του σώματος, όπως στο στομάχι, στο παχύ έντερο, στο ήπαρ, στους πνεύμονες και στο δέρμα με την ισχυρότερη σύνδεση μέχρι στιγμής στην καρκινογένεση του γαστρεντερικού σωλήνα, ιδίως στον καρκίνο του στομάχου και στα λεμφώματα (*Helicobacter pylori*) και στον καρκίνο του παχέος εντέρου (*Fusobacterium*) (Wotherspoon et al., 1993; Kostic et al., 2011; Schwabe and Jobin, 2013). Η διαφορετική φύση του μικροβιώματος σε κάθε θέση του σώματος υποδηλώνει μια αντίστοιχη ειδίκευση του κάθε οργάνου στις μικροβιακές επιδράσεις στη φλεγμονή και την καρκινογένεση (Schwabe and Jobin, 2013).

Οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στη χλωρίδα του εντέρου έχουν συσχετιστεί με ένα μεγάλο αριθμό κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού. Οι μικροοργανισμοί αυτοί φαίνεται να προάγουν την καρκινογένεση στο μαστό μέσω της επίδρασής τους στο μεταβολισμό των οιστρογόνων και ειδικότερα μέσω της ικανότητάς τους να μεταβάλλουν το προφίλ των κυκλοφορούντων οιστρογόνων και των φυτοοιστρογόνων (Kwa et al., 2016), τον ενεργειακό μεταβολισμό και την ανοσοποιητική λειτουργία (Shapira et al., 2013). Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι

το μικροβίωμα του γάλακτος φαίνεται να συγκεντρώνει ορισμένα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Για παράδειγμα, το σύνολο των μικροοργανισμών του μητρικού γάλακτος φαίνεται να διαφέρει από το μικροβίωμα που υπάρχει σε άλλες θέσεις στο ανθρώπινο σώμα και φαίνεται να διαφέρει και να εμφανίζει μικρότερη ποικιλομορφία στις παχύσαρκες μητέρες (Cabrera-Rubio et al., 2012).

Μια σχετικά πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι εμφανίζονται διαφορετικά βακτηριακά προφίλ στους ιστούς των γυναικών με καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με τις υγιείς γυναίκες που συμμετείχαν στην έρευνα (Urbaniak, et al., 2016). Τα βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae* και *Staphylococcaceae* βρέθηκε ότι βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στο μαστό των ασθενών γυναικών, σε σύγκριση με τους υγιείς. Επίσης, αποδείχθηκε ότι τα βακτήρια *E.coli* και *Staphylococcus epidermidis* που απομονώθηκαν από παρακείμενους υγιείς ιστούς γυναικών με καρκίνο του μαστού, εμφάνισαν την ικανότητα να προκαλούν διπλές θραύσεις στο DNA, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν την συσσώρευση λανθασμένων επιδιορθώσεων και συνεπώς να οδηγήσουν σε γενωμική αστάθεια και καρκινογένεση (Khanna and Jackson, 2001). Βακτήρια του γένους *Bacillus* βρέθηκαν επίσης σε αυξημένες συγκεντρώσεις στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού, σε σύγκριση με τα υγιή δείγματα, ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι τα βακτήρια αυτά εμπλέκονται στην καρκινογένεση καθώς μεταβολίζουν την προγεστερόνη σε 5αP (5 alpha-pregnane-3,20-dione), η οποία υποστηρίζεται ότι ενεργοποιεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Wiebe, 2006).

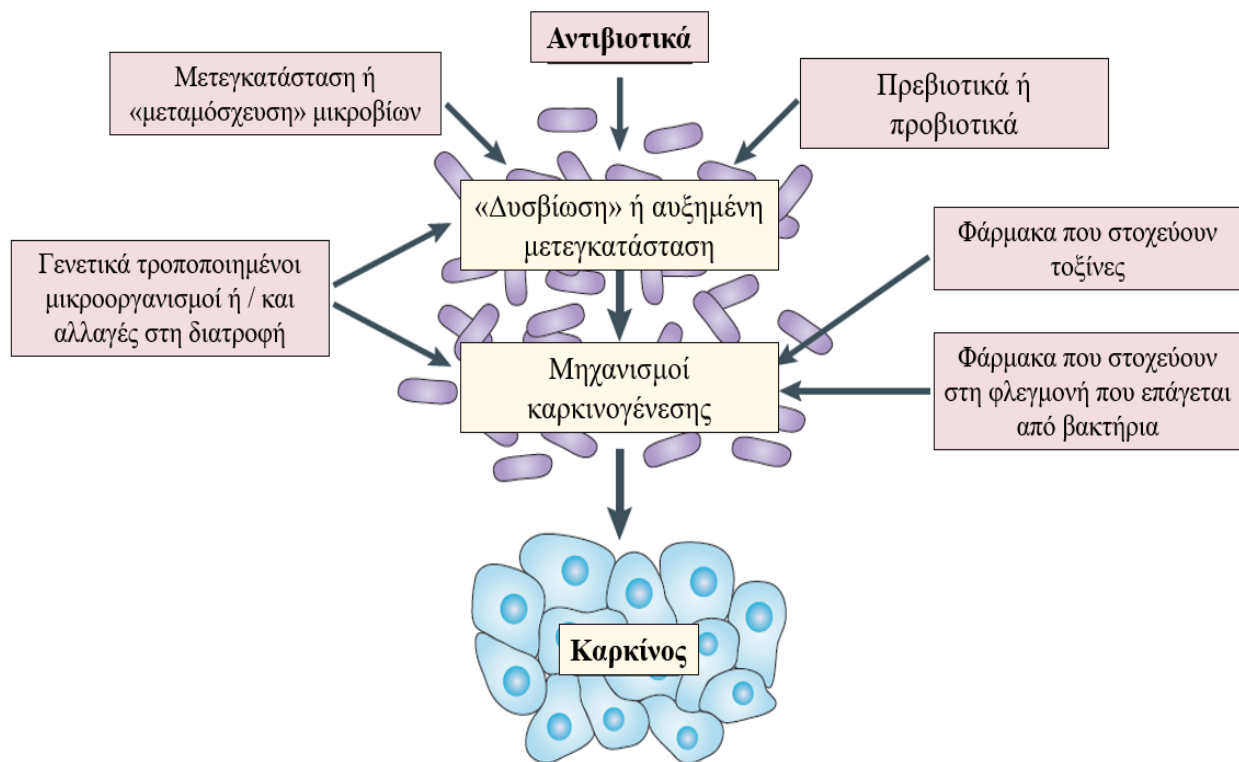
Ταυτόχρονα, διάφορες μελέτες παρέχουν ενδείξεις για την προστατευτική δράση διαφόρων μικροβιακών στελεχών, όπως τα βακτήρια του γένους *Lactococcus* και *Streptococcus* στην εμφάνιση καρκίνου του μαστού. Τα βακτήρια αυτά βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στους ιστούς του μαστού στις υγιείς γυναίκες σε σύγκριση με τις γυναίκες με καρκίνο του μαστού (Urbaniak, et al., 2016). Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών αποδεικνύουν ότι το σύνολο των μικροοργανισμών στους ιστούς του μαστού, αλλά και στους παρακείμενους ιστούς, θα μπορούσε να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού.

A.5.4 Πιθανές μελλοντικές θεραπευτικές προσεγγίσεις

Οι πολλαπλοί μηχανισμοί με τους οποίους το μικροβίωμα ρυθμίζει την καρκινογένεση, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής, του μεταβολισμού και της γονοτοξικότητας, παρέχουν δυνατότητες στόχευσης του μικροβιώματος για την ανάπτυξη θεραπευτικών στρατηγικών πρόληψης και αντιμετώπισης του καρκίνου (**Εικόνα 19**). Τα πρεβιοτικά, τα προβιοτικά και η «μεταμόσχευση» συγκεκριμένων μικροβιακών ειδών (microbiota transplants) στα κατάλληλα σημεία, μπορούν να αποκαταστήσουν την αρμονική συνύπαρξη / «ευβίωση» (eubiosis) σε καταστάσεις χρόνιας νόσου, μειώνοντας έτσι τη γονοτοξικότητα που επάγεται από τα μικρόβια και την ενεργοποίηση των φλεγμονωδών, πολλαπλασιαστικών και αντιαποπτωτικών μονοπατιών (Schwabe and Jobin, 2013).

Τα αντιβιοτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να στοχεύσουν γενotoξικά βακτήρια, βακτήρια που έχουν μετακινηθεί σε άλλες περιοχές του σώματος ή βακτήρια που παράγουν μεταβολίτες, όπως το δεοξυχολικό οξύ (DCA), οι οποίοι σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου (Helmink et al., 2019). Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν γενετικά τροποποιημένα μικρόβια που εκφράζουν ή έχει αποσιωπηθεί η έκφραση ορισμένων ενζύμων, σε συνδυασμό με την κατάλληλη διατροφή, για να επιτευχθούν υψηλότερα επίπεδα φυτοχημικών που καταστέλλουν τους όγκους, χαμηλότερα επίπεδα ουσιών που έχει βρεθεί ότι προάγουν την ανάπτυξη όγκου ή να κατασταλούν βακτηριακά είδη που εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου (Khazaie et al., 2012).

Με την φαρμακολογική στόχευση των μονοπατιών που εμπλέκονται στη φλεγμονή και ενεργοποιούνται από βακτήρια μπορεί να μειωθεί η φλεγμονή που επάγεται από το μικροβίωμα και ποικίλες φαρμακολογικές προσεγγίσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη στόχευση βακτηριακών τοξινών και ενζύμων που προωθούν την ανάπτυξη καρκίνου. Η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους το βακτηριακό μικροβίωμα εμπλέκεται στην καρκινογένεση θα συμβάλει στην ανάπτυξη νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων και οδηγιών πρόληψης. Αν και είναι πιθανό ότι πολλοί από τους υποκείμενους μηχανισμούς είναι ειδικοί για κάθε ασθένεια ή όργανο, η διερεύνηση του μικροβιώματος ειδικά στον καρκίνο είναι πολλά υποσχόμενη και μπορεί να αποτελέσει ένα νέο πεδίο ιατρικής έρευνας για την καταπολέμηση του καρκίνου.



Εικόνα 19: Θεραπευτικές προσεγγίσεις στόχευσης των βακτηριακών μικροβίων για αποφυγή της καρκινογένεσης (τροποποίηση από: Schwabe and Jobin, 2013)

Β' ΜΕΡΟΣ: ΣΚΟΠΟΣ

Β' μέρος: Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η σύνθεση και η μελέτη της αντικαρκινικής δράσης νέων οργανοκασσιτερικών ενώσεων με το αντιβιοτικό σιπροφλοξασίνη. Επιπλέον, θα μελετηθεί και η αντιμικροβιακή δράση των νέων βιοδραστικών ενώσεων, καθώς όλο και περισσότερες μελέτες αποκαλύπτουν τον σημαντικό ρόλο του βακτηριακού μικροβιώματος στην καρκινογένεση διαφόρων οργάνων (Schwabe and Jobin, 2013; Ohtani, 2014), συμπεριλαμβανομένου του μαστού (Rao et al., 2006; Xuan et al., 2014; Banerjee et al., 2015; Urbaniak et al., 2016). Διάφορα βακτηριακά στελέχη όπως ο *Staphylococcus epidermidis*, ο *Staphylococcus aureus* και η *Escherichia coli*, βρίσκονται σε υψηλότερα ποσοστά στον μικροβίωμα ασθενών με καρκίνο του μαστού και φαίνεται να εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού, κυρίως μέσω της πρόκλησης βλαβών στο DNA (Urbaniak et al., 2016). Τέλος, θα διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση μεταξύ αντικαρκινικής και αντιμικροβιακής δράσης που επιδεικνύουν οι βιοδραστικοί παράγοντες.

Οι ενώσεις του κασσιτέρου αποτελούν ενδιαφέροντα υποψήφια φάρμακα έναντι του καρκίνου του μαστού, καθώς παρουσιάζουν ισχυρή αντικαρκινική δράση και δρουν στους οιστρογονικούς υποδοχείς (ERs) (Martin et al., 2003; Carraher et al., 2011; Balas et al., 2012). Επιπλέον, οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις μπορεί να εμφανίζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι διαφόρων βακτηριακών στελεχών (Chilwal and Narula, 2013; Sharma et al., 2015; Annissa et al., 2017).

Η σιπροφλοξασίνη, από την άλλη, εμφανίζει επίσης αντιμικροβιακή (Chalkley and Koornhof, 1985) και αντικαρκινική (Beberok et al., 2018) δράση. Ο συνδυασμός του αντιβιοτικού σιπροφλοξασίνη με μεταλλικά ιόντα κασσιτέρου σε μια ενιαία οντότητα (Conjugation of Metals with specific classes of Drugs-CoMeD), αναμένεται να οδηγήσει στην ενίσχυση της αντικαρκινικής και αντιμικροβιακής τους δράσης, λόγω του συνεργιστικού φαινομένου. Επιπλέον, η εγκόλπωση βιοδραστικών ενώσεων ή φαρμακευτικών ουσιών σε μικκυλιακούς φορείς αναμένεται να ενισχύσει την αντικαρκινική και αντιμικροβιακή δράση τους βελτιώνοντας την υδροφιλία τους.

Για το σκοπό αυτό, αρχικά μελετήθηκε η αντίδραση του άλατος του διχλωροδιφαινυλοκασσιτέρου με την σιπροφλοξασίνη, σε διάφορες αναλογίες και συνθήκες και συντέθηκε το νέο μεταλλοθεραπευτικό $\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{CIP})_2$ (CIPTIN) (HCIP = σιπροφλοξασίνη). Στη συνέχεια, χαρακτηρίστηκε με μεθόδους στερεάς (σημείο τήξεως, φασματοσκοπία FT-IR, ανάλυση περίθλασης ακτίνων X κόνεως - XRPD, φασματοσκοπία Mössbauer, Φασματοσκοπία Φθορισμού Ακτίνων X - XRF, Θερμοβαρυμετρία - Διαφορική Θερμική Ανάλυση - TG-DTA) και υγρής (φασματοσκοπία UV-Vis, φασματοσκοπία ^1H -NMR, φασματομετρία μάζας ιοντισμού με ηλεκτροψεκάσμο - ESI-MS) κατάστασης, ενώ η κρυσταλλική δομή του νέου μεταλλοφαρμάκου προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων X. Στη συνέχεια συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν με διάφορες τεχνικές (φασματοσκοπία UV-Vis, φασματοσκοπία ^1H -NMR, φασματοσκοπία FT-IR, ανάλυση XRF, θερμική ανάλυση TG-DTA) μικκύλια του CIPTIN και του διφαινυλοκασσιτέρου με τις επιφανειοδραστικές ενώσεις CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) και SLS (Sodium lauryl sulfate). Συνολικά συντέθηκαν τέσσερα μικκύλια με CTAB και SLS που εγκολπώνουν είτε το νέο μεταλλοαντιβιοτικό, είτε τον $\text{phe}_2\text{SnCl}_2$.

Η αντικαρκινική δράση των νέων ενώσεων ελέγχθηκε έναντι καρκινικών κυττάρων του μαστού απουσία οιστρογονικών υποδοχέων (MDA-MB-231) και παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων (MCF-7). Η τοξικότητα των ενώσεων που συντέθηκαν μελετήθηκε *in vitro* έναντι φυσιολογικών κυττάρων MRC-5 και *in vivo* με το ζωικό μοντέλο *Artemia Salina*, ενώ η γονοτοξικότητα ελέγχθηκε *in vitro* με μελέτη των μικροπυρηνίσκων και *in vivo* με τη βοήθεια του μοντέλου *Allium cepa*. Η ικανότητα του νέου μεταλλοθεραπευτικού και των μικκυλίων να προκαλούν αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο διερευνήθηκε *in vitro* με μελέτη της κυτταρικής μορφολογίας, του κατακερματισμού του πυρηνικού DNA, του κυτταρικού κύκλου και με μελέτες της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Επιπλέον, διερευνήθηκε *ex vivo* και ο μοριακός μηχανισμός με τον οποία αλληλεπιδρά το νέο μεταλλοθεραπευτικό και τα μικκύλια του με το DNA.

Η πιθανή ενίσχυση της αντιμικροβιακής δράσης του μεταλλοφαρμάκου και των μικκυλίων ελέγχθηκε έναντι Gram θετικών (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*) και Gram

αρνητικών (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) βακτηριακών στελεχών με προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης (MBC) και των ζωνών αναστολής. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση των νέων ενώσεων στον σχηματισμό βακτηριακού βιοφίλμ έναντι των βακτηριακών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* και υπολογίστηκε η συγκέντρωση εξάλειψης του βακτηριακού βιοφίλμ (Biofilm Elimination Concentration - BEC).

Γ' ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γ' μέρος: Υλικά και Μέθοδοι

Γ.1 Υλικά

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν χημικώς καθαροί.

Το διμεθυσουλφοξείδιο (DMSO) αγοράστηκε από την εταιρία Riedel-de Haen.

Η υδροχλωριωμένη σιπροφλοξασίνη προέρχεται από πρόγραμμα συνεργασίας με την εταιρία Help Pharmaceuticals.

Το άλας του διφαινυλοχλώροκασιτέρου (Diphenyltin dichloride) και το Sodium Lauryl Sulfate (SLS), αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich.

Το Cetrimonium bromide (CTAB) είναι της εταιρίας Merk India (MITC).

Το CT-DNA αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich και το βορικό οξύ από την Riedel-de Haen.

Για τις βιολογικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

Το θρεπτικό υλικό (Dulbecco's modified Eagle's Medium - DMEM), ο ορός εμβρύου βοοειδών Fetal Bovine serum – FBS), η γλουταμίνη και η θρυψίνη, αγοράστηκαν από την εταιρία Gibco, Glasgow, UK. Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate buffer saline - PBS), η χρωστική Acridine orange hemi (zinc chloride) salt, το Trizma Base, το propidium iodide, το ethidium bromide, το Triton X-100, η αгарόζη (agarose), το ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) και τα ένζυμα RNase A και Proteinase K, αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich. Η χρωστική sulforodamine B sodium salt (SRB) είναι της εταιρίας Alfa Aesar, ενώ το αντιδραστήριο Schiff (Schiff's reagent) είναι της εταιρίας Merck.

Τα συστατικά των θρεπτικών υλικών Tryptone, tryptophan, Soytone, Peptone και Beef extract, αγοράστηκαν από την εταιρία Biolife.

Το εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract) και το άγαρ (Agar) αγοράστηκαν από την εταιρία Fluka Analytical.

Τα αντιδραστήρια NaCl, di potassium hydrogen phosphate trihydrate, D (+)-glucose και η χρωστική Crystal violet αγοράστηκαν από την Merck.

Γ.2 Μέθοδοι Χαρακτηρισμού

A) ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

Γ.2.1 Σημείο τήξεως

Τα σημεία τήξεως του συμπλόκου και των μικκυλίων μετρήθηκαν στη συσκευή Stuart Scientific apparatus και δεν είναι διορθωμένα.

Γ.2.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR

Τα φάσματα υπερύθρου FT-IR (Fourier Transform-InfraRed) στην περιοχή $4000 - 370 \text{ cm}^{-1}$ λήφθηκαν με το φασματοφωτόμετρο Cary 670 FTIR της Agilent Technologies.

Γ.2.3 Μελέτη περίθλασης ακτίνων X (X-ray Diffraction - XRD)

Τα δεδομένα της κρυσταλλικής δομής του CIPTIN και της HCIP, συλλέχθηκαν με τη χρήση του οργάνου Oxford Diffractions CCD και μονοχρωματική Mo ακτινοβολία ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$). Οι παράμετροι κυψελίδας προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων των δεδομένων περίθλασης από 25 αντανakλάσεις. Όλα τα δεδομένα διορθώθηκαν ως προς τα αποτελέσματα και την απορρόφηση του φαινομένου πόλωσης Lorentz. Οι δομές λύθηκαν με άμεσες μεθόδους με SHELXS97 και αποσαφηνίστηκαν με full-matrix διαδικασίες ελάχιστων τετραγώνων στο F2 με SHELXL97. Τα άτομα υδρογόνου τοποθετήθηκαν σε υπολογισμένες θέσεις.

Γ.2.4 Ανάλυση Περίθλασης ακτίνων X κόνεως (X-ray powder diffraction - XRPD)

Η μελέτη της ανάλυσης περίθλασης ακτίνων X κόνεως πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός μετρητή περίθλασης D8 AdvanceBruker. Το δείγμα που μετρήθηκε με τον παραπάνω μετρητή περίθλασης ήταν σε μορφή λεπτής σκόνης.

Γ.2.5 Φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (X-ray Fluorescence Spectroscopy - XRF)

Οι μετρήσεις φασματοσκοπίας φθορισμού ακτίνων-X πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μια ραδιο-ισοτοπική πηγή Am-241 με ακτινοβολία διέγερσης στα 59.5 keV.

Γ.2.6 Φασματοσκοπία Mössbauer

Τα φάσματα Mössbauer ^{119}Sn λήφθηκαν σε θερμοκρασία δείγματος 85 K με φασματοφωτόμετρο σταθερής επιτάχυνσης εξοπλισμένο με πηγή CaSnO_3 διατηρούμενη σε θερμοκρασία δωματίου. Η βαθμονόμηση του φασματομέτρου πραγματοποιήθηκε με πηγή ^{57}Co και απορρόφηση Fe σε θερμοκρασία δωματίου. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε κασσίτερο υπολογίστηκε να είναι περίπου 4 mg Sn στην περιοχή των 2-cm² της υποδοχής του δείγματος.

Γ.2.7 Θερμική Ανάλυση TG-DTA (Thermogravimetry – Differential Thermal Analysis)

Η Θερμοβαρυνμετρία – Διαφορική θερμική ανάλυση των δειγμάτων διεξήχθη χρησιμοποιώντας τη συσκευή Seiko SH TG / DTA 7200 υπό ροή N_2 (40 cm³ min⁻¹) με ρυθμό θέρμανσης 10 K min⁻¹.

B) ΥΓΡΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

Γ.2.8 Διαλυτότητα

Η διαλυτότητα του συμπλόκου και των μικκυλίων πραγματοποιήθηκε τοποθετώντας μικρή και ισόποση ποσότητα της κάθε ένωσης σε δοκιμαστικούς σωλήνες με τους παρακάτω διαλύτες: n-εξάνιο, τολουόλιο, διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2), χλωροφόρμιο (CHCl_3), ακετόνη, μεθανόλη (MeOH), ακετονιτρίλιο (MeCN), διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και H_2O .

Γ.2.9 Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Τα φάσματα UV-Vis των ενώσεων λήφθηκαν με το UV-1600 PC series φασματοφωτόμετρο της VWR. Επίσης με φασματοσκοπία UV-Vis ελέγχθηκε και η σταθερότητα των ενώσεων για χρονικό διάστημα 2 ημερών.

Γ.2.10 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance - NMR)

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (^1H -NMR) της νέας ένωσης και των μικκυλίων λήφθηκαν σε δευτεριωμένο DMSO (d_6 -DMSO) χρησιμοποιώντας το Bruker AC 250, 400 MHFT-NMR. Με το ίδιο όργανο ελέγχθηκε και η σταθερότητα των ενώσεων σε διάλυμα για 4 ημέρες, ενώ η επεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Mestrec23.

Γ.2.11 Φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού με παγίδα ιόντων (Electrospray Ionization Mass Spectrometry - ESI-MS, ion trap)

Η ανάλυση μαζών πραγματοποιήθηκε με παγίδα ιόντων. Οι ενώσεις διαλύθηκαν σε 1 ml MeOH που περιείχε 0.01 % μυρμιγκικό οξύ και τα φάσματα Φασματομετρίας μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού λήφθηκαν με το όργανο Agilent 1100/LC-MS system.

Γ.3 Μέθοδος εύρεσης κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης (CMC)

Η εύρεση της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης (CMC) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αγωγιμότητας. Οι μετρήσεις της αγωγιμότητας πραγματοποιήθηκαν στους 37 °C με τη χρήση του αγωγιμόμετρου WTF LF-91.

Γ.4 Σύνθεση

Γ.4.1 Σύνθεση και κρυστάλλωση $\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{CIP})_2$ (CIPTIN)

Σε 8 ml ddH₂O διαλύονται 0,5 mmol υδροχλωριωμένης σιπροφλοξασίνης ($\text{HCIP} \cdot \text{HCl}$) (0,184 g) και ο υποκαταστάτης αναδεύεται μέχρι να διαλυθεί και να προκύψει ομοιογενές διάλυμα και στη συνέχεια προστίθενται 0,75 mmol KOH (750 μL 1 N). Σε 3 ml MeOH διαλύεται ποσότητα 0,25 mmol diphenyltin dichloride (DPTD) (0,086 g) και προστίθεται στο υδατικό διάλυμα της σιπροφλοξασίνης κάτω από συνεχή ανάδευση και το λευκό ίζημα που προκύπτει διηθείται αμέσως. Κρύσταλλοι του CIPTIN κατάλληλοι για ανάλυση ακτίνων X αναπτύσσονται από αργή εξάτμιση του διηθήματος MeOH / ddH₂O την επόμενη ημέρα.

Σημείο τήξεως: > 300 °C

IR (cm^{-1}), (KBr): 3906w, 2965w, 2698w, 2487w, 2111w, 1918w, 1604w, 1474w, 1265s, 1142s, 1025s, 944vs, 809s, 739vs, 628s, 446s

¹H-NMR (ppm) in DMSO- d_6 : 8,87 (s, H[N_{piperazine ring}]), 8,67 (s, H[²C]), 7,95–7,92 (d, H[⁵C]), 7,79–7,81 (d, H[⁸C]), 7,72–7,58 (m, Ph-), 7,31–7,16 (m, Ph-), 3,85 (s, H[^aC]), 3,47 (d, H[^cC]), 1,33 (m, cyclopropyl CH₂), 1,19 (m, cyclopropyl CH₂)

Γ.4.2 Σύνθεση SLS@CIPTIN

Η σύνθεση των μικκυλίων SLS@CIPTIN πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της απευθείας διάλυσης. Για τη σύνθεση τους 0,01962 g (0,021 mmol) CIPTIN, μετά από κονιορτοποίηση, προστέθηκαν σε υδατικό διάλυμα SLS (0,0605 g, 0,21 mmol σε 20 ml ddH₂O στους 37 °C υπό ανάδευση). Η μοριακή αναλογία του [SLS] / [CIPTIN] σύμφωνα με την CMC, βρέθηκε 10/1. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση στους 37 °C για 3 ώρες και διαυγάσει. Στη συνέχεια, το διάλυμα αφήνεται στον απαγωγό μέχρι να εξατμιστεί το ddH₂O και το ελαιώδες ίζημα που προκύπτει διαλύεται σε 10 ml διεθυλαιθέρα. Τα μικκύλια SLS@CIPTIN προκύπτουν μετά από αργή εξάτμιση του διαηγούς διαλύματος αιθέρα.

Σημείο τήξεως: 218 - 222 °C

IR (cm^{-1}), (KBr): 3449(s), 2955(w), 2917(vs), 2851(s), 1648(w), 16,27(w), 1612(s), 1475(s), 1442(w), 1378(w), 1219(vs), 1079(vs), 1019(w), 996,3(w), 830,2(w), 721,2(w), 632,5(s), 587,2(s)

$^1\text{H-NMR}$ (ppm) in $\text{DMSO-}d_6$: 8,87(s), 8,68(s), 7,96-7,91(d), 7,79-7,77(d), 7,70-7,56(m), 7,35-7,17(m), 3,85(s), 3,66(m), 3,34(m), 1,47(s), 1,24(m), 0,85(m).

Γ.4.3 Σύνθεση CTAB@CIPTIN

Η σύνθεση των μικκυλίων CTAB@CIPTIN πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της απευθείας διάλυσης. Για τη σύνθεση τους 0,05417 g (0,058 mmol) CIPTIN, μετά από κονιορτοποίηση, προστέθηκαν σε υδατικό διάλυμα CTAB (0,190 g, 0,522 mmol σε 20 ml ddH₂O στους 37 °C (υπο ανάδευση). Η μοριακή αναλογία του [CTAB] / [CIPTIN] σύμφωνα με την CMC, βρέθηκε 5/1. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση στους 37 °C για 3 ώρες και διαυγάζει. Στη συνέχεια, το διάλυμα διηθείται και αφήνεται στον απαγωγό μέχρι να εξατμιστεί το ddH₂O. Τα μικκύλια CTAB@CIPTIN προκύπτουν μετά από αργή εξάτμιση του διαυγούς υδατικού διαλύματος.

Σημείο τήξεως: 201- 206 °C

IR (cm^{-1}), (KBr): 3515(w), 3362(w), 3015(w), 2918(w), 2848(vs), 2706(w), 2620(w), 1703(s), 1621(s), 1517(w), 1476(s), 1461(s), 1405(w), 1382(w), 1300(w), 1271(s), 1185(w), 1140(w), 1043(w), 1021(w), 981,2(w), 961,6(s), 939,6(w), 909,4(s), 831,6(w), 801,2(w), 775,2(w), 719,4(s), 693,2(w), 572,1(w), 533,2(w), 473,3(w), 436,0(s), 413,7(s)

$^1\text{H-NMR}$ (ppm) in $\text{DMSO-}d_6$: 8,92(s), 8,72(s), 8,00-7,94(d), 7,84-7,80(d), 7,70-7,61(m), 7,37-7,22(m), 3,91(s), 3,37-3,26(m), 3,08(s), 1,69(s), 1,27(s), 0,90-0,87(s).

Γ.4.4 Σύνθεση SLS@DPTD

Η σύνθεση των μικκυλίων SLS@DPTD πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της απευθείας διάλυσης. Για τη σύνθεση τους 0,14283 g (0,47 mmol) DPTD, μετά από κονιορτοποίηση, προστέθηκαν σε υδατικό διάλυμα SLS (2,846 g, 9,87 mmol σε 30 ml ddH₂O στους 37 °C υπό

ανάδευση). Η μοριακή αναλογία του [SLS] / [DPTD] σύμφωνα με την CMC, βρέθηκε 21/1. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση στους 37 °C για 3 ώρες και διαυγάζει. Στη συνέχεια, το διάλυμα αφήνεται στον απαγωγό μέχρι να εξατμιστεί το ddH₂O και το ίζημα (gel) που προκύπτει διαλύεται σε 20 ml διεθυλαιθέρα. Τα μικκύλια SLS@DPTD προκύπτουν μετά από αργή εξάτμιση του διαυγούς διαλύματος αιθέρα.

Σημείο τήξεως: 190 - 195 °C

IR (cm⁻¹), (KBr): 3462 9 (w), 2918 (vs), 2851 (vs), 1606 (w), 1468 (s), 1379 (w), 1216 (vs), 1077 (vs), 1017 (w), 991,4 (w), 808,0 (s), 628,6 (s)

¹H-NMR (ppm) in DMSO-d₆: 7,96-7,78 (m), 7,46-7,33 (m), 3,67-6,65 (m), 3,32 (s), 1,49-1,44 (m), 1,24 (s), 0,87-0,83 (m).

Γ.4.5 Σύνθεση CTAB@DPTD

Η σύνθεση των μικκυλίων SLS@DPTD πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της απευθείας διάλυσης. Για τη σύνθεση τους 0,14007 g (0,46 mmol) DPTD, μετά από κονιορτοποίηση, προστέθηκαν σε υδατικό διάλυμα CTAB (0,838 g, 2,3 mmol σε 30 ml ddH₂O στους 37 °C υπό ανάδευση). Η μοριακή αναλογία του [CTAB] / [DPTD] σύμφωνα με την CMC, βρέθηκε 5/1. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση στους 45 °C για 3 ώρες και διαυγάζει. Στη συνέχεια, το διάλυμα αφήνεται στον απαγωγό μέχρι να εξατμιστεί το ddH₂O και το ίζημα (gel) που προκύπτει διαλύεται σε 20 ml διεθυλαιθέρα. Τα μικκύλια SLS@DPTD προκύπτουν μετά από αργή εξάτμιση του διαυγούς διαλύματος αιθέρα.

Σημείο τήξεως: 172 - 180 °C

IR (cm⁻¹), (KBr): 3015 (w), 2914 (vs), 2847 (vs), 1699 (w), 1621 (w), 1464 (vs), 1461 (vs), 1405 (w), 1382 (w), 1271 (w), 1244 (w), 1185 (w), 1140 (w), 1047 (w), 1021 (w), (961,6 vs), 916,9 (s), 909,4 (vs), 831,1 (w), 801,3(w), 730,5 (s), 719,3 (vs), 458,4 (w), 421,1 (s).

¹H-NMR (ppm) in DMSO-d₆: 8,11-7,82 (m), 7,40-7,27 (m), 3,36-3,30 (m), 3,09 (s), 1,69 (s), 1,28 (s), 0,90-0,87 (m).

Γ.5 Κυτταρικές μελέτες

Γ.5.1 Κρυοσυντήρηση κυτταρικών σειρών

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δύο εμπορικά διαθέσιμες καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού απουσία οιστρογονικών υποδοχέων (MDA-MB-231) και παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων (MCF-7) και μια κυτταρική σειρά φυσιολογικών εμβρυϊκών ινοβλαστών πνεύμονα (MRC-5). Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, διατηρήθηκαν για μεγάλα χρονικά διαστήματα κατεψυγμένες σε ειδικά δοχεία που περιείχαν υγρό άζωτο ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Η διαδικασία κατάψυξης που ακολουθήθηκε, ήταν η εξής:

- Κύτταρα στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους συλλέγονται και φυγοκεντρούνται σε σωληνάρια falcon των 15 ml στις 3000 στροφές ανά λεπτό για 7 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 950 μl (90%) εμβρυϊκό ορό μόσχου (FBS).
- Το παραπάνω κυτταρικό διάλυμα μεταφέρεται σε ειδικά σωληνάρια κατάψυξης (cryotubes) που περιέχουν 50 μl (10%) διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), το οποίο είναι κρυοπροστατευτικό και εμποδίζει τους κρυστάλλους πάγου που δημιουργούνται να διαπεράσουν και να καταστρέψουν την κυτταρική μεμβράνη..
- Αρχικά, τα cryotubes τοποθετούνται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 48 ώρες, ενώ έπειτα μεταφέρονται σε δοχεία υγρού αζώτου, όπου και μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Για την επανακαλλιέργεια της κυτταρικής σειράς, τα κύτταρα μεταφέρονται από το υγρό άζωτο σε θερμοκρασία $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Το περιεχόμενο του σωληναρίου κατάψυξης μεταφέρεται σε τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας και γίνεται προσθήκη θρεπτικού υλικού, έτσι ώστε ο τελικός όγκος στο τρυβλίο να είναι 10 ml. Μετά από 24 ώρες γίνεται αλλαγή θρεπτικού έτσι ώστε να απομακρυνθεί το DMSO από την καλλιέργεια.

Γ.5.2 Κυτταρικές καλλιέργειες

Η ανάπτυξη όλων των κυτταρικών σειρών έγινε σε επωαστικό κλίβανο, ο οποίος παρέχει σταθερή θερμοκρασία 37°C κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) το οποίο εμπλουτίζεται πριν τη χρήση του με ορό εμβρύου βοός (fetal bovine serum, FBS) σε αναλογία 10% του όγκου (50 ml) του θρεπτικού υλικού, ο οποίος παρέχει τους απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και με 1% (5 ml) από τα αντιβιοτικά πενικιλίνη (100 IU/ml) και στρεπτομυκίνη (100 µg/ml) και με το αμινοξύ L-γλουταμίνη (L-glutamine) (2.5 ml). Το πλήρες θρεπτικό υλικό διατηρείται στους 4°C.

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν όταν τα κύτταρα είχαν αυξήσει τον πληθυσμό τους και είχαν καλύψει σχεδόν όλη την επιφάνεια των τρυβλίων. Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων απαιτείται η αποκόλλησή τους. Αρχικά, γίνεται αφαίρεση του καλλιεργητικού υλικού από το τρυβλίο, έκπλυση με 10ml ρυθμιστικού διαλύματος Phosphate Buffer Saline (PBS) και κατόπιν προσθήκη θρυψίνης (1ml). Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο, το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων με την επιφάνεια προσκόλλησής τους και έτσι τα κύτταρα αποκολλώνται και μπορούν να συλλεχθούν.

Στη συνέχεια, τα τρυβλία παραμένουν στον επωαστικό κλίβανο για 5 λεπτά περίπου μέχρι τα κύτταρα να αποκολληθούν (μέγιστος χρόνος 8 λεπτά). Η αποκόλληση των κυττάρων επιβεβαιώνεται στο μικροσκόπιο και στη συνέχεια, για τη διακοπή της δράσης της θρυψίνης, προστίθεται άμεσα πλήρες θρεπτικό υλικό σε πενταπλάσια ποσότητα από αυτή της θρυψίνης (5 ml). Τέλος, μεταφέρεται η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων σε ένα νέο τρυβλίο και προστίθεται ανάλογη ποσότητα καλλιεργητικού υλικού (τελικός όγκος 7 ml).

Γ.5.3 *In vitro* μελέτη κυτταροτοξικότητας (SRB assay)

Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας των ουσιών *in vitro* πραγματοποιήθηκε με χρήση της χρωστικής Sulforhodamine B (SRB assay). Η μέθοδος έχει την ικανότητα να προσδιορίζει την

πυκνότητα των κυττάρων, με βάση τη μέτρηση της περιεκτικότητας τους σε κυτταρικές πρωτεΐνες, καθώς βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής SRB να δεσμεύεται σε κυτταρικά πρωτεϊνικά συστατικά τα οποία έχουν μονιμοποιηθεί με τρι-χλωρο-ακετικό οξύ (TCA). Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι επιτρέπει τον έλεγχο κυτταροτοξικότητας ενός μεγάλου αριθμού ενώσεων σε μικρό χρονικό διάστημα, και με σχετικά χαμηλό κόστος αντιδραστηρίων και εξοπλισμού (Vichai and Kirtikara, 2006). Η μέθοδος SRB χρησιμοποιείται ευρέως για τον έλεγχο της τοξικότητας των φαρμάκων σε καρκινικές και μη κυτταρικές σειρές (Banti et al., 2016).

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι ίδιο με αυτό της ανακαλλιέργειας των κυττάρων, μέχρι και το σημείο της αποκόλλησης των κυττάρων και την απενεργοποίηση της θρυψίνης με θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκονται στο τρυβλίο μέσω της πλάκας Neubauer και τα κύτταρα επιστρώνονται (100 μ l ανά well) σε τρυβλίο των 96-well με διαφορετικές πυκνότητες εμβολιασμού κυττάρων, έτσι ώστε να υπάρχει ο απαιτούμενος αριθμός κυττάρων ανάλογα με την υπό μελέτη κυτταρική σειρά (MCF-7 και MDA-MB-231: 6000 κύτταρα/well, MRC-5: 2000 κύτταρα/well).

Τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες στους 37 °C, 5% CO₂ και έπειτα προστίθενται οι προς μελέτη ενώσεις. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάζονται κάθε φορά διαλύματα 0,01M, σε DMSO για το CIPTIN ή σε ddH₂O για τα μικκύλια, και στη συνέχεια αραιώνονται με θρεπτικό υλικό έως την επιθυμητή συγκέντρωση (τελικός όγκος 200 μ l). Η επώαση των κυττάρων με τις ουσίες διαρκεί 48 ώρες και μετά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθεται κρύο διάλυμα TCA 10% (50 μ l/well) και το τρυβλίο επωάζεται για 30 min στους 4° C. Γίνονται πλύσεις (5 $\times$) με απιονισμένο νερό και το τρυβλίο αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 24 ώρες.

Μόλις το τρυβλίο στεγνώσει γίνεται προσθήκη 70 μ l SRB 0.4% w/v (διαλυμένη σε διάλυμα 1% οξικού οξέος) σε κάθε well και το τρυβλίο επωάζεται για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιείται προσεκτική αφαίρεση της χρωστικής, πλύσεις (5 $\times$) με ακετικό οξύ 1% και ακολουθεί η προσθήκη 200 μ l 10Mm unbuffered Tris-Base σε κάθε well και ανάδευση για τη διαλυτοποίηση της προσδεδεμένης χρωστικής. Η μέτρηση της απορρόφησης του 96-well τρυβλίου

πραγματοποιείται στα 540nm σε μηχανήμα Elisa (MMP-96 HiPo, Biosan). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε τιμές IC₅₀, που είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων κατά 50% σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου (control), μετά από 48 ώρες επώασης των συμπλοκών.

Γ.5.4 *In vivo* μελέτη τοξικότητας (Μοντέλο *Artemia Salina*)

Η *in vivo* μελέτη τοξικότητας του νέου μεταλλοθεραπευτικού και των μικκυλίων πραγματοποιήθηκε με το ζωικό μοντέλο *Artemia Salina*. Η δοκιμή θνησιμότητας στις γαρίδες άλμης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια αρχική δοκιμή τοξικότητας και αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την πρόβλεψη της κυτταροτοξικής δράσης ενός υποψήφιου φαρμάκου. Η ταχύτητα, η απλότητα και οι χαμηλές απαιτήσεις σε αντιδραστήρια, χώρους και μηχανήματα είναι σημαντικά πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου. Επιπλέον, διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της θανατηφόρας συγκέντρωσης που σκοτώνει το 50% του εκτεθειμένου πληθυσμού (LC₅₀) της γαρίδας άλμης και των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας οξείας τοξικότητας εκ του στόματος σε ποντίκια (Hamidi and Jovanova, 2014). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Ενυδάτωση 1 gr από τα αυγά της γαρίδας άλμης με φρέσκο H₂O για 1 ώρα μέσα σε γυάλινη χοάνη.
- Το θαλασσινό νερό παρασκευάστηκε μετά από διάλυση 17 gr θαλασσινού αλατιού σε 500 ml dH₂O.
- Τα αυγά αφήνονται για τουλάχιστον 48 ώρες (μέχρι να εκκολαφθούν) μέσα στην γυάλινη χοάνη με συνεχή παροχή φρέσκου αέρα σε θερμοκρασία δωματίου και παρουσία φωτός.
- Μετά την εκκόλαψη, οι προνύμφες που απελευθερώθηκαν από τα αυγά, συλλέγονται με τη χρήση φωτεινής πηγής και μιας μικροπιπέτας.
- Οι προνύμφες μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν NaCl (0.9% w/v).
- Μία ποσότητα (100μl) από το διάλυμα με τις προνύμφες που περιέχει περίπου 8-15 προνύμφες τοποθετείται σε κάθε well ενός 24-well τρυβλίου και στη συνέχεια προστίθενται

οι προς μελέτη ουσίες σε συγκεντρώσεις 3, 30 και 300 μM (τελικός όγκος 1 ml) για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

- Μετά από 24 ώρες παρατηρείται και καταγράφεται η επιβίωση του πληθυσμού *Artemia Salina* σε κάθε συγκέντρωση με τη βοήθεια στερεοσκοπίου. Η προνύμφες θεωρούνται νεκρές εάν δεν παρουσιάζουν κανένα σημάδι κίνησης μετά από 10 δευτερόλεπτα παρατήρησης.

Γ.5.5 *In vitro* μελέτη γονοτοξικότητας (Micronucleus assay)

Η τεχνική της *in vitro* μελέτη της γονοτοξικότητας μέσω του σχηματισμού μικροπυρηνίσκων έχει αναπτυχθεί για την παρακολούθηση της πρόκλησης γενετικών βλαβών σε φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα από υποψήφιους φαρμακευτικούς παράγοντες. Το εργαλείο αυτό είναι αρκετά ευαίσθητο για τον έλεγχο της τοξικότητας και είναι ικανό να μειώσει τη χρήση των ζώων στις τοξικολογικές δοκιμές (Banti and Hadjikakou, 2019). Η μελέτη των μικροπυρηνίσκων πραγματοποιήθηκε σε φυσιολογικούς εμβρυικούς ινοβλάστες (MRC-5) με την παρακάτω διαδικασία:

- Σπορά 40.000 κύτταρα σε κάθε well (τελικός όγκος 3 ml). Η σπορά των κυττάρων πραγματοποιείται σε 6-well τρυβλίο επάνω σε καλυπτρίδα
- Επώαση κυττάρων για 24 ώρες στους 37 °C, 5% CO₂
- Προσθήκη ένωσης σε συγκέντρωση ίση με την τιμή IC₅₀ για 48 ώρες
- Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού και ξέπλυμα κάθε well με 1 ml PBS (3x)
- Απομάκρυνση PBS, προσθήκη 1 ml KCl 75 mM σε κάθε well και επώαση του τρυβλίου σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min
- Απομάκρυνση KCl και έκπλυση του κάθε well με 2 ml διαλύματος 1/3 οξικού οξέος/αιθανόλης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές και μετά την απομάκρυνση του διαλύματος οξικού οξέος/αιθανόλης, γίνονται πλύσεις με παγωμένη μεθανόλη που περιέχει 1% οξικό οξύ

- Προσθήκη 3 ml διαλύματος χρωστικής acridine orange ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) διαλυμένης σε θρεπτικό υλικό και επώαση για 15 min στους 37°C στον επωαστικό θάλαμο
- Έκπλυση κάθε well με 1 ml PBS (3x) για την απομάκρυνση περίσσειας χρωστικής
- Μεταφορά της καλυπτρίδας από κάθε well ανάποδα πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και παρατήρηση και μέτρηση των μικροπυρηνίσκων σε μικροσκόπιο φθορισμού

Το ποσοστό εμφάνισης μικροπυρηνίσκων υπολογίζεται ανά 1000 κύτταρα για κάθε δείγμα.

Οι μικροπυρηνίσκοι προσμετρώνται εφόσον πληρούν τα εξής κριτήρια: (1) Η περιοχή εμφάνισης του μικροπυρηνίσκου θα πρέπει να αντιστοιχεί στο $1/256$ έως το $1/9$ της περιοχής του κύριου πυρήνα, (2) το σχήμα του μικροπυρηνίσκου θα πρέπει να είναι στρογγυλό ή οβάλ, (3) ο μικροπυρηνίσκος θα πρέπει να είναι ευδιάκριτος, (4) ο μικροπυρηνίσκος δεν θα πρέπει να συνδέεται με τον κύριο πυρήνα, (5) ο μικροπυρηνίσκος μπορεί να αγγίζει, αλλά όχι να επικαλύπτει τον κύριο πυρήνα και τα όρια του μικροπυρηνίσκου θα πρέπει να διακρίνονται από τα πυρηνικά όρια και (6) ο μικροπυρηνίσκος πρέπει να έχει την ίδια ένταση φθορισμού με τους κύριους πυρήνες.

Γ.5.6 *In vivo* μελέτη γονοτοξικότητας (Μοντέλο *Allium cepa*)

Η *in vivo* μελέτη της γονοτοξικότητας των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε βολβούς κρεμμυδιών *Allium cepa*. Το μοντέλο *Allium cepa* παρουσιάζει υψηλή συσχέτιση με τα συστήματα δοκιμών σε θηλαστικά και χρησιμοποιείται ευρέως για την αξιολόγηση των κυτταροτοξικών και μεταλλαξιογόνων επιδράσεων φαρμακευτικών παραγόντων. Με το μοντέλο *Allium cepa* μπορούν να εκτιμηθούν βλάβες στο DNA κατά τη διάρκεια της μίτωσης, όπως χρωμοσωμικές ανωμαλίες, πυρηνικές ανωμαλίες και μικροπυρηνίσκοι. Οι μεταβολές αυτές μπορεί να υποδηλώνουν τη γονοτοξική επίδραση ενός παράγοντα, καθώς οι βλάβες του DNA σε χρωμοσωμικό επίπεδο αποτελούν σημαντικά γεγονότα στην καρκινογένεση (Banti and Hadjikakou, 2019). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Καθαρισμός ριζών *Allium cepa* (διαμέτρου ~ 1,0-1,5 cm) – απομάκρυνση των πιο ξερών καφέ στρωμάτων
- Τοποθέτηση ριζών σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 10 ml ddH₂O
- Επώαση για 48 ώρες (25 °C, 50-60% υγρασία, 12 ώρες φως / 12 ώρες σκοτάδι)
- Παρασκευή διαλυμάτων των ουσιών (0,01 M), κατάλληλη αραίωση με ddH₂O και προσθήκη στους δοκιμαστικούς σωλήνες για επώαση των ριζών σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (3, 30 και 300 μM).
- Επώαση δύο ριζών για κάθε συγκέντρωση συμπλόκου για 48 ώρες. Οι ρίζες που αναπτύσσονται μόνο σε ddH₂O χρησιμοποιούνται ως control
- Μονιμοποίηση ριζών σε 1/3 ακετικό οξύ/μεθανόλη για 24 ώρες στους 4 °C
- Υδρόλυση ριζών σε 6N HCl σε θερμοκρασία 37 °C για 10 min
- Πλύσεις για 1 min με dH₂O
- Χρώση με αντιδραστήριο Schiff (1.0-1.5 ml) για 40 min σε σκοτεινό μέρος στους 37°C
- Πλύση της ρίζας για 1 λεπτό σε 45% οξικό οξύ
- Τοποθέτηση ρίζας σε αντικειμενοφόρο πλάκα
- Αφαίρεση περιβλήματος ρίζας
- Εμβάπτιση 1mm μεριστώματος σε 45% οξικό οξύ
- Σπάσιμο ιστού σε μονά κύτταρα
- Παρατήρηση κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο και λήψη βίντεο με το πρόγραμμα ISCapture

Για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιείται λήψη βίντεο για τουλάχιστον 6 ρίζες και από τους δύο βολβούς συνολικά. Τέλος, από κάθε ρίζα ελέγχονται περίπου 300 κύτταρα καταγράφοντας τις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και αξιολογώντας πιθανές χρωμοσωμικές και πυρηνικές ανωμαλίες, καθώς και την ύπαρξη μικροπυρηνίσκων. Ο μιτωτικός δείκτης (MI), είναι η αναλογία μεταξύ του συνολικού αριθμού των μεμονωμένων κυττάρων που βρίσκονται σε κάποια φάση του κυτταρικού κύκλου (προφάση, αναφάση, μεταφάση, τελοφάση) προς τον συνολικό αριθμό των

κυττάρων. Τα επίπεδα κυτταροτοξικότητας ενός παράγοντα μπορούν να προσδιοριστούν από την αύξηση ή μείωση του ΜΙ.

Γ.5.7 Μελέτη κυτταρικής μορφολογίας

Η μελέτη της κυτταρικής μορφολογίας πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα MCF-7 με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου. Η μελέτη των αλλαγών στην μορφολογία των κυττάρων πραγματοποιείται έπειτα από καλλιέργεια κυττάρων MCF-7, απουσία και παρουσία των υπο μελέτη ουσιών σε συγκέντρωση ίση με την (IC_{50}). Η επώαση των ουσιών διαρκεί 48 ώρες και οι αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων μπορούν να προτείνουν τον κυτταρικό θάνατο μέσω του αποπτωτικού μηχανισμού.

Γ.5.8 Μελέτη κατακερματισμού του πυρηνικού DNA

Οι μελέτες του κατακερματισμού του DNA από το νέο μεταλλοθεραπευτικό και τα μικκύλια, πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα MCF-7. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα MCF-7 καλλιεργήθηκαν (300.000 κύτταρα / τρυβλίο των 10 ml) και στη συνέχεια επωάστηκαν με τις υπό μελέτη ουσίες για 48 ώρες στους 37 °C, 5% CO₂. Το θεραπευτικό υλικό μεταφέρεται σε falcons όπως και τα προσκολλημένα κύτταρα στον τάπητα των τρυβλίων, τα οποία εκπλύθηκαν δύο φορές με 5 ml PBS και αποκολλήθηκαν με τη βοήθεια σιλικονούχας σπάτουλας. Τα falcons φυγοκεντρήθηκαν στις 4.000 rpm για 15 min, και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 1 ml PBS και μεταφέρθηκαν σε eppendorf.

Στη συνέχεια, ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 10.000 στροφές για 10 min, απομάκρυνση του υπερκειμένου, προσθήκη 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (lysis buffer) (100 mM Tris pH=7,4, 50mM EDTA pH=8, w/v SDS) και επώαση στον πάγο για 30 min με συνεχές tapping. Το προϊόν λύσης φυγοκεντρήθηκε 10.000 rpm για 20 min, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε αποστειρωμένο eppendorf και επωάζεται με 2 μl RNase A (10 mg ml⁻¹) για 2 ώρες στους 37°C και ακολούθως με 2,5

μl πρωτεΐνάσης K (20 mg ml⁻¹) για 2 ώρες στους 37 °C σε υδατόλουτρο. Τα δείγματα DNA μεταφέρονται στους -20 °C, αφού προστεθούν 20 μl NaCl 5M και 120 μl ισοπροπανόλης.

Την επόμενη ημέρα, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13.000 rpm για 15 min και αφού στεγνώσουν τα ιζήματα επαναιωρούνται σε 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE (0,01 M Tris-HCl / 0,001 M EDTA, pH = 7,4). Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 3 ώρες στους 37 °C σε υδατόλουτρο και αποθήκευση στους -20 °C μέχρι την ηλεκτροφόρηση. Την ημέρα της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων, σε κάθε eppendorf προστίθενται 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (loading buffer), το οποίο περιείχε 50 % γλυκερόλη, 0,1% χρωστική bromophenol blue και 0,001 M EDTA pH = 8). Η ηλεκτροφόρηση του DNA πραγματοποιήθηκε σε γέλη αгарόζης (1,6 %) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,5 × TBE (από 5 × TBE stock ρυθμιστικό διάλυμα – 4 M Tris, 0,02 M EDTA pH = 8 και 0,4 M βορικό οξύ), η οποία περιείχε επίσης 0,5 μg ml⁻¹ βρωμιούχο αιθίδιο. Τα δείγματα του DNA ηλεκτροφορήθηκαν για 100 min στους 40 V και ο κατακερματισμός του DNA εμφανίστηκε κάτω από υπεριώδες φως.

Γ.5.9 Μελέτη του κυτταρικού κύκλου

Η μελέτη του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα MCF-7. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η σπορά των κυττάρων (120.000 κύτταρα / well) σε 6-well τρυβλίο. Έπειτα, τα κύτταρα επώαστηκαν με τις νέες ουσίες σε συγκεντρώσεις ίσες με τις τιμές IC₅₀ για 48 ώρες. Μετά τις 48 ώρες, το θρεπτικό υλικό μεταφέρθηκε σε falcon, ακολούθησαν εκπλύσεις του κάθε well με 3 ml PBS και μεταφορά τους σε falcon και σε κάθε well έγινε προσθήκη 300 μl θρυψίνης και επώαση του 6-well για 5 – 10 min στους 37 °C, 5 % CO₂. Στη συνέχεια, γίνονται διαδοχικές πλύσεις των well με PBS και φυγοκεντρήσεις (x2) (5 min στις 5.000 στροφές) και το υπερκείμενο μεταφέρεται κάθε φορά στο αντίστοιχο falcon. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, προστίθενται 500 μl cold ethanol (70 %) και τα δείγματα αποθηκεύονται overnight στους -20 °C. Για να πραγματοποιηθεί η μελέτη, γίνεται απομάκρυνση της αιθανόλης μετά από φυγοκέντρηση και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1 ml PBS. Τα δείγματα ακολούθως επωάζονται με 20 μl RNase για 20 min στους 37 °C (C_{τελ} = 0.2 mg

/ ml) και με 50 μ l propidium iodide (PI) για 20 min στους 37 °C ($C_{\text{τελ}} = 0.05 \text{ mg / ml}$). Η μετρήσεις των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε κυτταρόμετρο ροής (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Για κάθε δείγμα καταγράφηκαν 10.000 συμβάντα (events). Τα ιστογράμματα DNA σχεδιάστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό FlowJo.

Γ.5.10 Μελέτη διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης

Η μελέτη της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης πραγματοποιήθηκε μέσω του kit “Mitochondria Membrane Potential Kit for Microplate Readers” (Mak 147) της εταιρίας Sigma Aldrich. Αρχικά πραγματοποιήθηκε σπορά των κυττάρων σε ειδικό plate (8.000 κύτταρα / well) και τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες με τις ουσίες σε συγκεντρώσεις ίσες με τις τιμές IC_{50} . Στη συνέχεια, η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού
- Προσθήκη 100 μ l / well dye loading solution (προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας της χρωστικής 200 $\times$ Mitochondrial Potential Dye σε assay buffer A)
- Επώαση κυττάρων στους 37 °C, 5 % CO_2 για 30 min
- Προσθήκη 50 μ l assay buffer B
- Επώαση του plate για 30 min
- Η ένταση του φθορισμού μετρήθηκε για $\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$ και $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$

Γ.6 Αντιμικροβιακές μελέτες

Γ.6.1 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των ενώσεων, ήταν τα παρακάτω:

- *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*),
- *Escherichia coli* Dh5a (*E. coli*),

- *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) subsp. *aureus* (ATCC®25923™) και
- *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) (ATCC® 14990™).

Γ.6.2 Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC)

Ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration - MIC) ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση ενός αντιμικροβιακού παράγοντα που εμποδίζει την οπτική ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού. Ο προσδιορισμός της τιμής MIC αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την αρχική αξιολόγηση ενός αντιμικροβιακού παράγοντα.

Για τον προσδιορισμό της MIC, τα βακτηριακά στελέχη αναπτύσσονται σε κατάλληλο στερεό θρεπτικό υλικό και επωάζονται για 18-24 ώρες στους 37 °C. Ακολούθως, μεταφέρονται 3-5 μεμονωμένες αποικίες όμοιες μορφολογικά, με τη βοήθεια αποστειρωμένου κρίκου σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 2 ml 0,9M NaCl. Η τελική οπτική απορρόφηση προσαρμόζεται αν χρειαστεί με αραίωση, με σκοπό να έχουμε τελικά απορρόφηση 0,1 στα 620 nm, η οποία αντιστοιχεί σε 10^8 cfu (colony forming unit) / ml. Υπολογίζονται οι κατάλληλοι όγκοι θρεπτικού, ουσίας και μικροβίου, σε τελικό όγκο 2ml έτσι ώστε να έχουμε 5×10^5 cfu /ml (10μl μικροβίου).

Τα αρχικά stock διαλύματα των ενώσεων παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση 10^{-2} M και χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον δύο δοκιμαστικοί σωλήνες ως θετικά control (1990 μl θρεπτικό υλικό και 10 μl βακτηριακού διαλύματος) και 2 δοκιμαστικοί σωλήνες ως αρνητικά control που περιείχαν 2 ml θρεπτικό υλικό. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται ελαφρά με αναδευτή (vortex) και τοποθετούνται σε επωαστή στους 37° C για 20 ώρες υπό ανάδευση σε τάραχτρο. Μετά το πέρας των 20 ωρών μετρείται η οπτική απορρόφηση των δοκιμαστικών σωληνίων στα 620 nm, μηδενίζοντας με το αρνητικό control. Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των οπτικών απορροφήσεων είναι το Spectro UV-VIS RS Spectrophotometer (LaboMed, Inc.). Η τιμή MIC προσδιορίστηκε ως η συγκέντρωση της ένωσης που αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη του υπό μελέτη βακτηρίου, η οποία επιβεβαιώθηκε από τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος.

Γ.6.3 Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης (MBC)

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι τιμές της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration - MBC) των νέων ουσιών, τα βακτήρια αρχικά καλλιεργήθηκαν παρουσία του CIPTIN, των μικκυλίων ή των υποκαταστατών, για 20 ώρες σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Μετά τις 20 ώρες 4 μl από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρθηκαν σε κατάλληλο στερεό θρεπτικό. Η βακτηριοκτόνος δράση εμφανίζεται στη συγκέντρωση που δεν παρατηρείται σχηματισμός αποικιών. Η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία οι υπό μελέτη ενώσεις προκαλούν πλήρη αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης ορίζεται ως τιμή MBC.

Γ.6.4 Προσδιορισμός ζωνών αναστολής (IZs)

Για τον προσδιορισμό των ζωνών αναστολής που προκαλούν οι υπό μελέτη ουσίες, αρχικά παρασκευάστηκαν τρυβλία με 20ml στερεό θρεπτικό υλικό. Τα βακτήρια (10^8 cfu / ml) επιστρώθηκαν ομοιόμορφα σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου με την βοήθεια αποστειρωμένου βαμβakoφόρου στειλεού, ο οποίος εμβαπτίστηκε στο διάλυμα του βακτηρίου και εφόσον απομακρύνθηκε η περίσσεια του υγρού στα τοιχώματα του σωλήνα, απλώθηκε στο θρεπτικό άγαρ. Στη συνέχεια, αποστειρωμένοι χάρτινοι δίσκοι διαμέτρου 0,9 cm εμβαπτίστηκαν για 10 δευτερόλεπτα σε διαλύματα των νέων ουσιών (10^{-3} M) με την βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας, και αφού διώχθηκε η περίσσεια της ουσίας στα τοιχώματα του erpendorf, τοποθετήθηκαν στο τρυβλίο σε σωστή απόσταση μεταξύ τους και ασκώντας ελαφριά πίεση προκειμένου να σταθεροποιηθούν πάνω στην επιφάνεια του θρεπτικού. Μετά από επώαση 20h στους 37 °C μετρήθηκε η διάμετρος των ζωνών αναστολής σε mm.

Γ.6.5 Επίδραση στο σχηματισμό βακτηριακού βιοφίλμ

Τα βακτηριακά βιοφίλμ είναι κοινότητες βακτηρίων που είναι προσκολλημένες σε μια επιφάνεια ή / και μεταξύ τους και παράγουν μια μήτρα που αποτελείται από πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και DNA. Η μήτρα αυτή δρα προστατευτικά για τα βακτήρια και για αυτό τα βιοφίλμ

είναι δύσκολο να εξαλειφθούν ακόμα και από αντιβιοτικά. Συνεπώς, το βακτηριακό βιοφίλμ είναι ένας μηχανισμός επιβίωσης των βακτηρίων (Vestby et al., 2020).

Για την μελέτη της επίδρασης των νέων ενώσεων στο σχηματισμό βακτηριακού βιοφίλμ, εμβολιάστηκαν 10 μl βακτηριακού διαλύματος (10^8 cfu/ml) σε 1,5 ml υγρό θρεπτικό μέσο και επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37 °C προκειμένου να δημιουργηθεί το βακτηριακό βιοφίλμ. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η *P. aeruginosa* που δημιουργεί βιοφίλμ στην διεπιφάνεια του θρεπτικού με τον αέρα και ο *S. aureus* που σχηματίζει σε όλη την επιφάνεια του σωλήνα. Μετά το πέρας των 24 ωρών το διάλυμα απορρίπτεται και γίνονται πλύσεις με αποστειρωμένο διάλυμα NaCl (0,9 % w / v) για να απομακρυνθούν τα βακτηριακά κύτταρα που δεν ανήκουν στο βιοφίλμ. Το βιοφίλμ είναι πολύ σταθερό και δεν επηρεάζεται από τις πλύσεις. Ακολούθως, προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες των υπο μελέτη ουσιών (25 – 900 μM) σε τελικό όγκο 2 ml. Το αρνητικό control περιέχει μόνο υγρό θρεπτικό υλικό. Τα βιοφίλμ επωάζονται με τις ενώσεις για 20 ώρες στους 37 °C.

Το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωλήνων απορρίπτεται και προστίθεται διάλυμα της χρωστικής crystal violet (0,1% w / v) για 15 λεπτά και έπειτα η περίσσεια χρωστικής απομακρύνεται με αρχικά με 1 ml μεθανόλης και 2 ml ddH₂O και στη συνέχεια με 3 ml ddH₂O. Οι σωλήνες αφήνονται να στεγνώσουν overnight και η διαλυτοποίηση της χρωστικής που δεσμεύτηκε στο βιοφίλμ πραγματοποιείται με 2 ml οξικό οξύ 30 %. Μετά από 15 min γίνεται η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των δοκιμαστικών σωλήνων. Η οπτική πυκνότητα του διαλύματος στα 550 nm, είναι ανάλογη με τη βιομάζα του βιοφίλμ.

Γ.7 Μοριακός μηχανισμός δράσης

Γ.7.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης με το DNA

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης με το DNA πραγματοποιήθηκε για το CIPTIN και τα μικκύλια του (SLS@CIPTIN και CTAB@CIPTIN). Το stock διάλυμα DNA παρασκευάστηκε διαλύοντας CT-

DNA (calf thymus DNA) σε διάλυμα που περιείχε 15 mM trisodium citrate και 150 mM NaCl σε pH = 7. Ο λόγος των απορροφήσεων του stock διαλύματος στα 260 και 280 nm (A_{260}/A_{280}) υπολογιζόταν κάθε φορά για αποφυγή πρωτεϊνικών προσμίξεων στο διάλυμα του DNA. Οι ιδανικές τιμές του λόγου (A_{260}/A_{280}) είναι μεταξύ 1,8 και 1,9, καθώς στα 260 nm απορροφά το DNA, ενώ οι πρωτεΐνες στα 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίστηκε με φασματοσκοπία UV στα 260 nm.

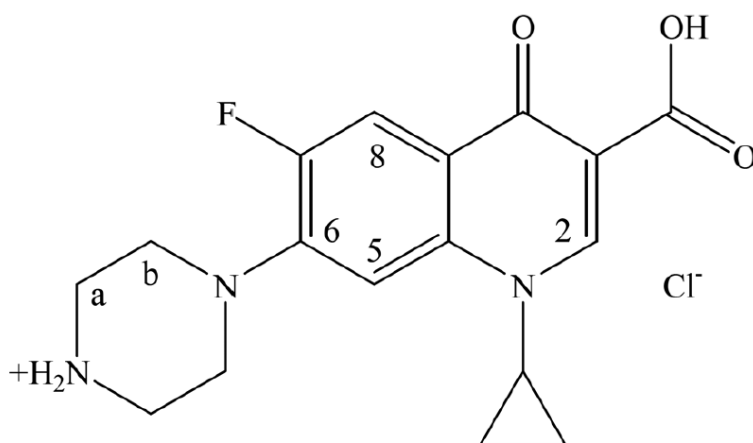
Για τα αρχικά πειράματα (titration) λήφθηκαν τα φάσματα του CT DNA σε διάλυμα παρουσία και απουσία των υπο μελέτη ενώσεων για $r = 0, 0.02, 0.05, 0.07, 0.09, 0.10$ και 0.12 ($r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$). Στη συνέχεια για τον υπολογισμό των τιμών των σταθερών K_b , λήφθηκαν τα φάσματα UV του συμπλόκου, παρουσία και απουσία CT DNA για $r = 1, 0.5, 0.25, 0.17, 0.125$ και 0.1 ($r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$, $[\text{σύμπλοκο}] = 10 \mu\text{M}$) στα 300-310 nm.

Δ' ΜΕΡΟΣ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α.1 Σύνθεση

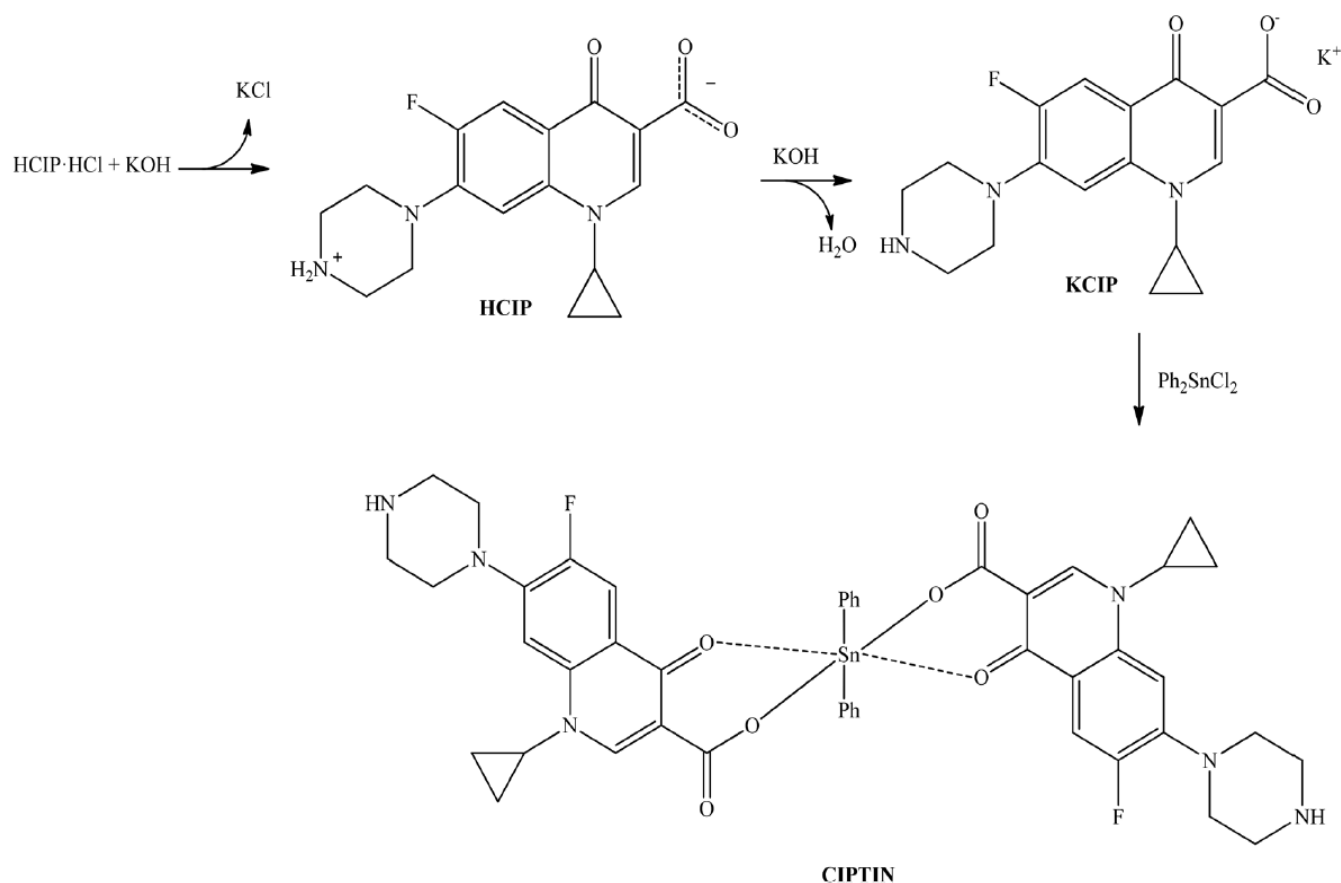
Α.1.1 Σύνθεση και κρυστάλλωση $\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{CIP})_2$ (CIPTIN)

Για τη σύνθεση του νέου μεταλλοθεραπευτικού $\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{CIP})_2$ (CIPTIN) παρασκευάστηκε αρχικά ένα υδατικό διάλυμα υδροχλωριωμένης σιπροφλοξασίνης 0,5 mmol ($\text{HCIP} \cdot \text{HCl}$) (**Σχήμα 1**) και ακολούθως η σιπροφλοξασίνη εξουδετερώθηκε με περίσσεια (750 μl) υδροξυλίου του νατρίου (KOH) σε αναλογία 1:1,5 και σχηματίστηκε KCIP . Στη συνέχεια παρασκευάστηκε διάλυμα 0,25 mmol Ph_2SnCl_2 (DPTD) σε 3 ml μεθανόλη (MeOH) με συνεχής ανάδευση, το οποίο στη συνέχεια προστέθηκε στο διάλυμα KCIP . Η πορεία των χημικών αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν απεικονίζονται αναλυτικά στο **Σχήμα 2**.



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση της δομής του υποκαταστάτη ($\text{HCIP} \cdot \text{HCl}$)

Αμέσως μόλις προστέθηκε το διάλυμα του DPTD, έγινε απευθείας διήθηση του εναιωρήματος με διπλό διηθητικό χαρτί. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το ίζημα που παρέμεινε στο διηθητικό χαρτί και την επόμενη ημέρα στο διήθημα αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι του CIPTIN μετά από αργή εξάτμιση του διαλύματος $\text{ddH}_2\text{O}/\text{MeOH}$. Επίσης, απομονώθηκαν κρύσταλλοι HCIP από το διήθημα του ενδιάμεσου διαλύματος (**Σχήμα 2**). Το CIPTIN είναι σταθερό όταν αποθηκεύεται στις συνήθεις περιβαλλοντικές συνθήκες.



Σχήμα 2: Σχηματική απεικόνιση των αντιδράσεων παρασκευής του CIPTIN

Δ.1.2 Σύνθεση μικκυλίων και προσδιορισμός CMC

Στην παρούσα διατριβή συντέθηκαν τέσσερα μικκύλια με τη χρήση των επιφανειοδραστικών ουσιών SLS και CTAB που χρησιμοποιούνται ευρέως στη δημιουργία μικκυλιακών συστημάτων για τη μεταφορά και την παράδοση φαρμακευτικών παραγόντων (Meretoudi et al., 2020). Πιο αναλυτικά, συντέθηκαν δύο μικκύλια του νέου μεταλλοθεραπευτικού CIPTIN (SLS@CIPTIN και CTAB@CIPTIN), καθώς και δύο μικκύλια του DPTD (SLS@DPTD και CTAB@DPTD), με τη μέθοδο της απευθείας διάλυσης, όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι».

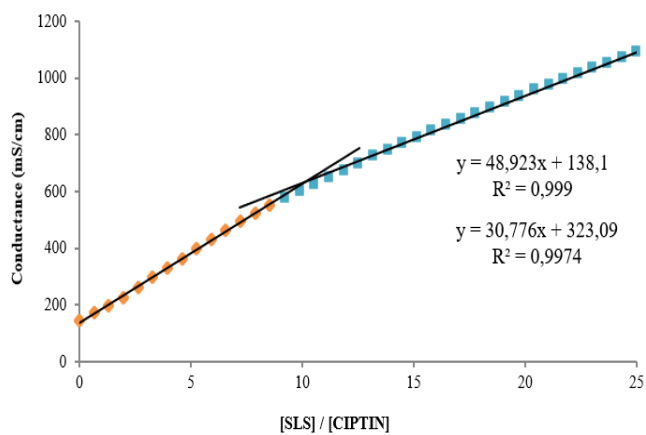
Προκειμένου να προσδιοριστούν οι τιμές CMC για τον σχηματισμό των μικκυλίων, πραγματοποιήθηκε αγωγιμομετρία στους 37 °C και σχεδιάστηκαν τα γραφήματα των τιμών αγωγιμότητας [SLS] / [CIPTIN], [CTAB] / [CIPTIN], [SLS] / [DPTD] και [CTAB] / [DPTD] (**Εικόνα 20**). Πιο συγκεκριμένα, διαλύματα των επιφανειοδραστικών ουσιών SLS ή CTAB (0,2 M)

σε ddH₂O προστίθενται σταδιακά με δόσεις των 50 μ l ή 100 μ l σε διάλυμα (20 ml) CIPTIN ή DPTD (0,001 M) και παράλληλα καταγράφονται οι τιμές αγωγιμότητας.

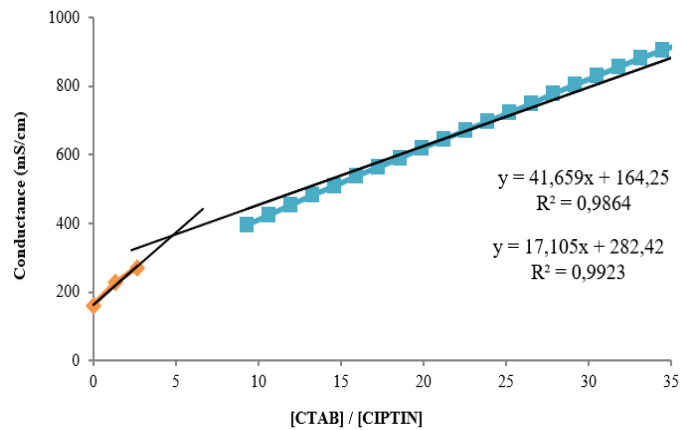
Σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τις τιμές CMC, τα μόρια του επιφανειοδραστικού συγκεντρώνονται και σχηματίζουν αυθόρμητα μικκυλιακές δομές, εγκολλώνοντας τα μόρια του επιθυμητού βιοδραστικού παράγοντα. Κατά το σχηματισμό των μικκυλίων παρατηρείται στο γράφημα ένα σημείο καμπής (αλλαγή κλίσης) (Karetsi et al., 2019). Οι τιμές CMC των [SLS] / [CIPTIN], [CTAB] / [CIPTIN], [SLS] / [DPTD] και [CTAB] / [DPTD] λαμβάνονται σε μοριακές αναλογίες 10/1, 5/1, 21/1, και 5/1, αντίστοιχα. Από τις παραπάνω αναλογίες προκύπτει ότι το ποσοστό του CIPTIN στα μικκύλια SLS@CIPTIN και CTAB@CIPTIN είναι 24,4 % w/w και 33,9 % w/w, αντίστοιχα. Ομοίως, το ποσοστό του DPTD στο SLS@DPTD υπολογίστηκε 5,4 % w/w και στο CTAB@DPTD 15,9 % w/w.

Η περιεκτικότητα των μικκυλίων σε βιοδραστικές ενώσεις προσδιορίστηκε και με φασματοσκοπία UV-vis. Για το σκοπό αυτό, λήφθηκαν φάσματα UV-vis δέκα διαλυμάτων, αυξανόμενων συγκεντρώσεων (1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 3×10^{-5} , 4×10^{-5} , 5×10^{-5} , 6×10^{-5} , 7×10^{-5} , 8×10^{-5} , 9×10^{-5} και 1×10^{-4} M), του CIPTIN (**Εικόνα 21A**) και του DPTD (1×10^{-4} , 2×10^{-4} , 3×10^{-4} , 4×10^{-4} , 5×10^{-4} , 6×10^{-4} , 7×10^{-4} , 8×10^{-4} , 9×10^{-4} και 1×10^{-3} M) (**Εικόνα 22A**). Στις **Εικόνες 21B** και **22B**, απεικονίζονται οι γραφικές παραστάσεις των απορροφήσεων του CIPTIN ($\lambda_{\max} = 322$ nm) και του DPTD ($\lambda_{\max} = 261$ nm) σε DMSO αντίστοιχα, σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση.

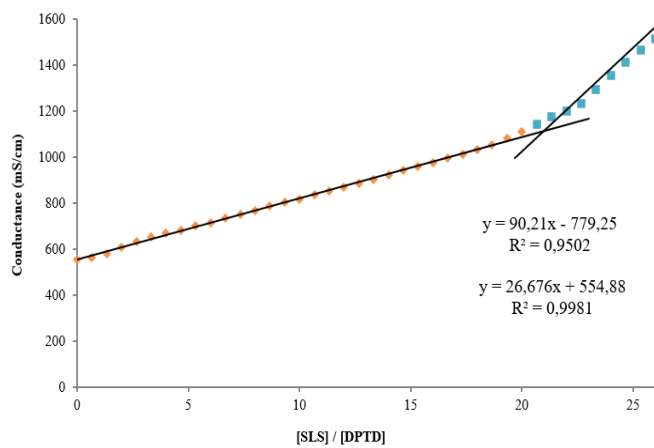
Στην **Εικόνα 23**, παρουσιάζονται τα φάσματα UV/vis του CIPTIN, των μικκυλίων του (SLS@CIPTIN και CTAB@CIPTIN) και των επιφανειοδραστικών ουσιών (SLS και CTAB), ενώ στην **Εικόνα 24** παρουσιάζονται τα φάσματα UV/vis του DPTD, των μικκυλίων του (SLS@DPTD και CTAB@DPTD) και των επιφανειοδραστικών ουσιών. Όπως φαίνεται και από τα φάσματα UV/vis, τόσο το SLS (**Εικόνα 23**), όσο και το CTAB (**Εικόνα 23**), δεν απορροφούν στα 322 nm και στα 261 nm. Συνεπώς οποιαδήποτε απορρόφηση στα συγκεκριμένα μήκη κύματος, μπορεί να αποδοθεί στο CIPTIN ή στο DPTD, αντίστοιχα. Με δεδομένο αυτό, υπολογίστηκαν οι περιεκτικότητες των μικκυλίων σε βιοδραστικές ενώσεις.



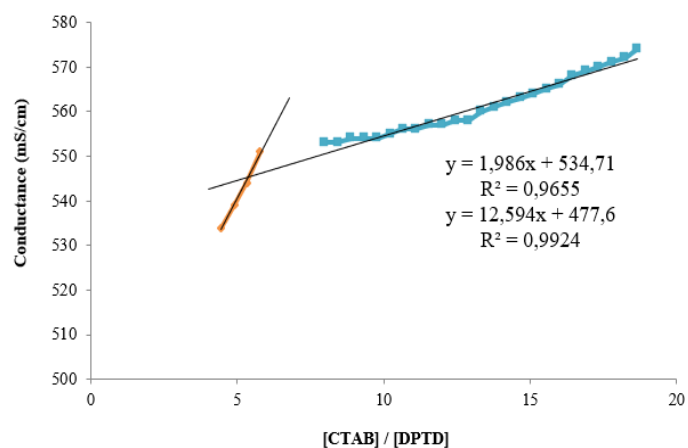
(A)



(B)

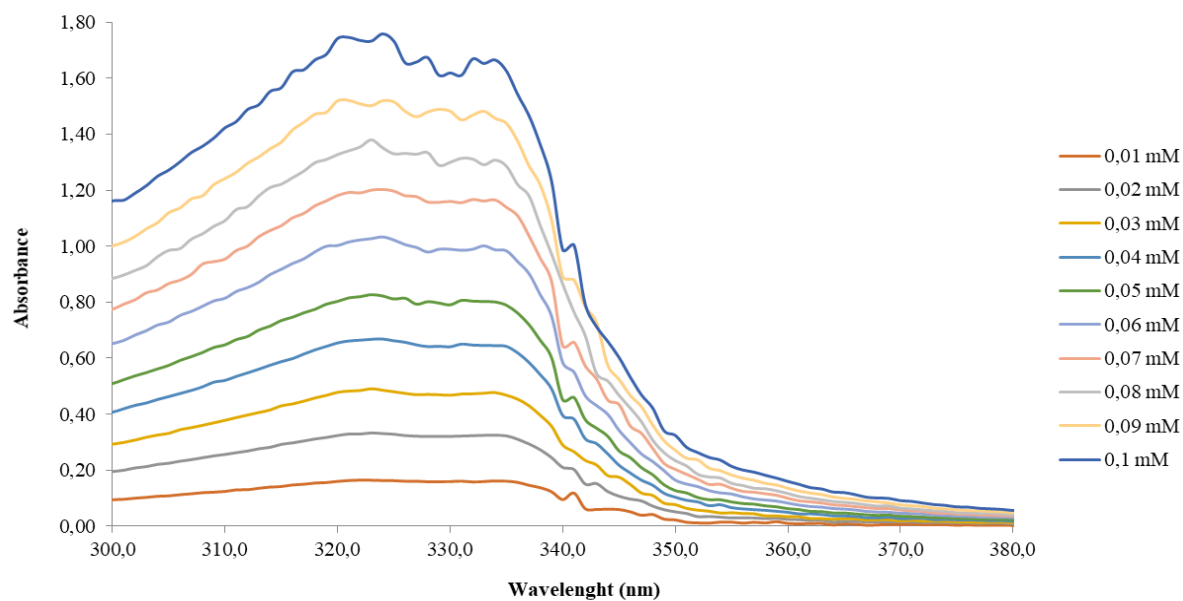


(Γ)

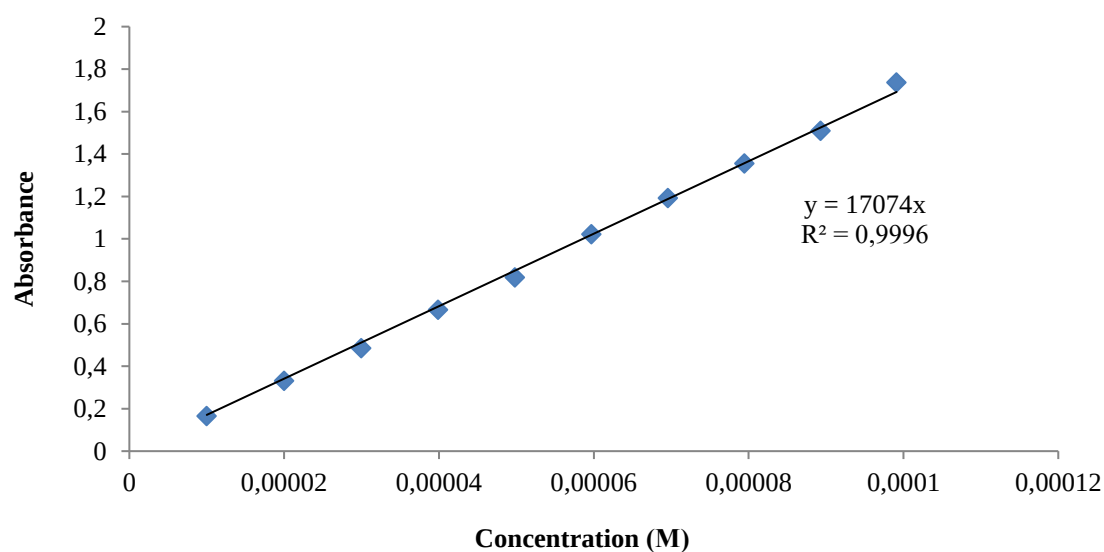


(Δ)

Εικόνα 20: Διαγράμματα τιμών αγωγιμότητας έναντι [SLS] / [CIPTIN] (A), [CTAB] / [CIPTIN] (B), [SLS] / [DPTD] (Γ) και [CTAB] / [DPTD] (Δ), για τον προσδιορισμό των CMC

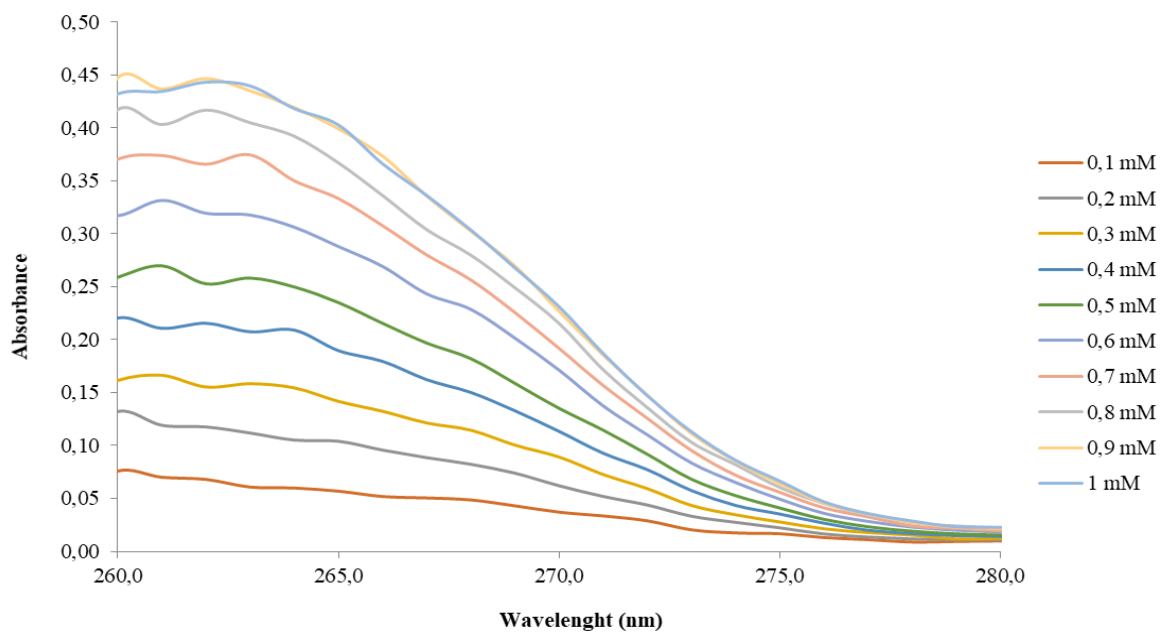


(A)

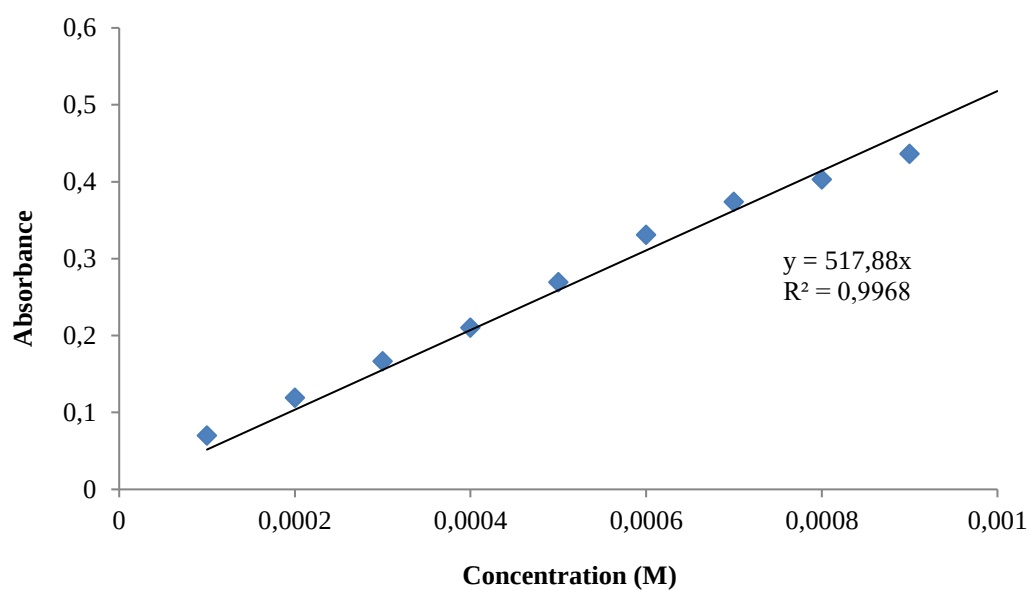


(B)

Εικόνα 21: (A) Φάσματα UV του CIPTIN σε DMSO (1×10^{-5} - 1×10^{-4} M), (B) Γράφημα της απορρόφησης διαλύματος CIPTIN σε DMSO ($\lambda_{\max} = 322$ nm) έναντι των συγκεντρώσεων



(A)



(B)

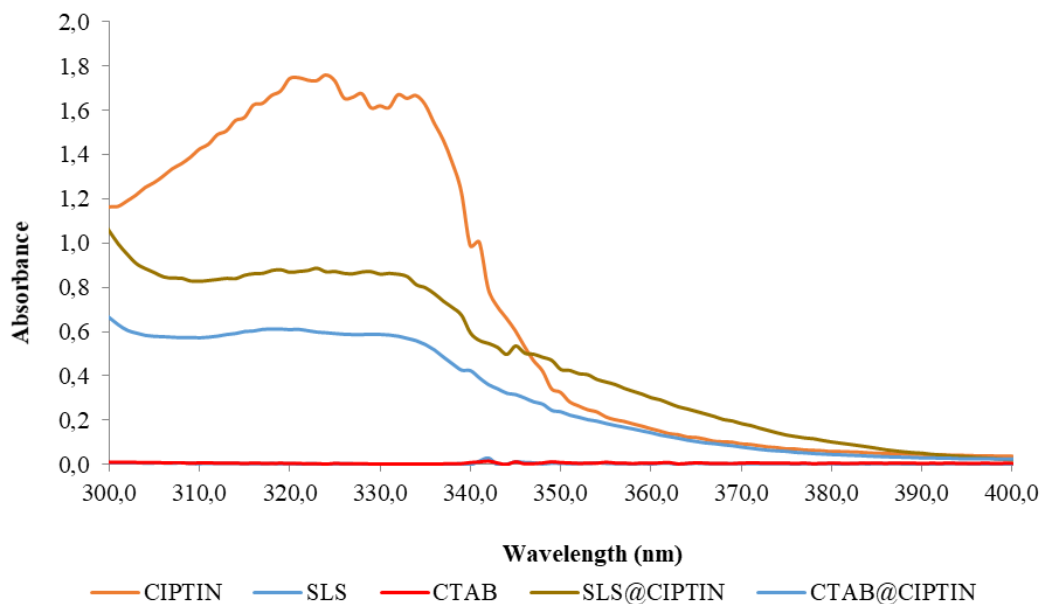
Εικόνα 22: (A) Φάσματα UV του DPTD σε DMSO (1×10^{-4} - 1×10^{-3} M), (B) Γράφημα της απορρόφησης διαλύματος DPTD σε DMSO ($\lambda_{\max} = 261$ nm) έναντι των συγκεντρώσεων

Η περιεκτικότητα του CIPTIN στα μικκύλια SLS@CIPTIN και CTAB@CIPTIN, υπολογίστηκε φασματοφωτομετρικά. Ποσότητα μικκυλίου ζυγίζεται και καταγράφονται τα φάσματα UV-vis του μικκυλίου. Στη συνέχεια, με χρήση της εξίσωσης που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη του CIPTIN η οποία για $\lambda_{\max} = 322 \text{ nm}$ είναι $y = 17074x$ (**Εικόνα 21B**) και της απορρόφησης που καταγράφηκε στα 322 nm του μικκυλίου, υπολογίζεται η περιεκτικότητα αυτών σε CIPTIN. Για το SLS@CIPTIN η απορρόφηση βρέθηκε ίση με 0,8768, άρα στο μικκύλιο περιέχονται $5,1355 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ CIPTIN, δηλαδή 0,0479 g/l CIPTIN ($M_r = 933$). Η ποσότητα του μικκυλίου που ζυγίστηκε ήταν 0,00039 g και διαλύθηκε σε 2ml DMSO, δηλαδή 0,195.g μικκυλίου ανά λίτρο. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η % περιεκτικότητα του SLS@CIPTIN σε CIPTIN είναι 24,7 % w/w. Η περιεκτικότητα αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με την υπολογιζόμενη από την CMC (24,4 % w/w).

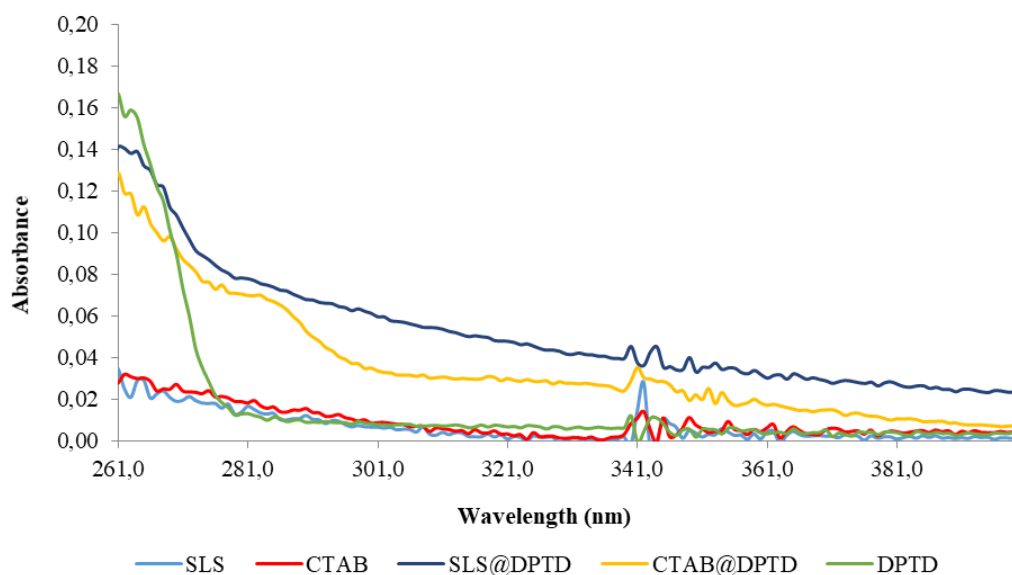
Για το CTAB@CIPTIN η ποσότητα που ζυγίστηκε ήταν 0,00022 g και η απορρόφηση στα 322 nm ισούται με 0,6039 και με τον ίδιο τρόπο το ποσοστό του CTAB@CIPTIN σε CIPTIN υπολογίστηκε 30,8 % w/w. Η υπολογιζόμενη περιεκτικότητα του CIPTIN από την CMC ισούται με 33,9 % w/w.

Για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας του DPTD στα μικκύλια SLS@DPTD και CTAB@DPTD, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση που προέκυψε από την πρότυπη καμπύλη ($y = 517,88x$) του DPTD στα 261 nm (**Εικόνα 22B**). Η απορρόφηση του SLS@DPTD στα 261 nm μετρήθηκε 0,1408, άρα στο μικκύλιο περιέχονται $27,1844 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ DPTD, δηλαδή 0,0934 g/l DPTD ($M_r = 343,8$). Η ποσότητα του μικκυλίου που διαλύθηκε ήταν 0,00487 g σε 2ml DMSO, δηλαδή 2,435.g μικκυλίου ανά λίτρο. Συνεπώς, η περιεκτικότητα του SLS@DPTD σε DPTD βρέθηκε 3,8 % w/w. Η παραπάνω περιεκτικότητα βρίσκεται σε συμφωνία με την υπολογιζόμενη από την CMC (5,3 % w/w) για το μικκύλιο SLS@DPTD. Για το CTAB@DPTD ζυγίστηκαν 0,00138 g μικκυλίου και η απορρόφηση στο φάσμα UV-vis στα 261 nm βρέθηκε ίση με 0,128586. Με τον ίδιο τρόπο η περιεκτικότητα του μικκυλίου CTAB@DPTD σε DPTD υπολογίστηκε 12,4 % w/w, ενώ από την CMC υπολογίστηκε 15,9 % w/w. Όλες οι βιολογικές μελέτες των μικκυλίων πραγματοποιήθηκαν με

βάση τα ποσοστά που υπολογίστηκαν με φασματοφωτομετρικά με UV/vis αφού αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη τεχνική.



Εικόνα 23: Φάσματα UV/vis του CIPTIN (10^{-4}), του SLS (10^{-4}), του CTAB (10^{-4}), του SLS@CIPTIN (195,0 mg/l) και του CTAB@CIPTIN (107,5 mg/l)



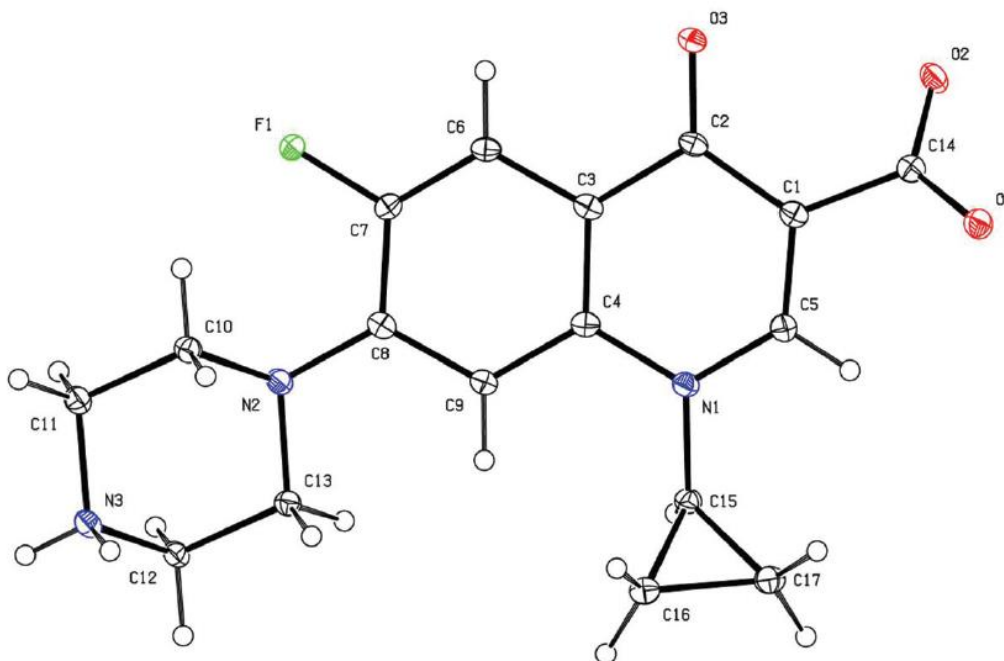
Εικόνα 24: Φάσματα UV/vis του DPTD (3×10^{-4}), του SLS (10^{-4}), του CTAB (10^{-4}), του SLS@DPTD (2435 mg/l) και του CTAB@DPTD (690 mg/l)

Δ.2 Χαρακτηρισμός

Α) ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

Δ.2.1 Μελέτη περίθλασης ακτίνων X (X-ray Diffraction - XRD)

Στην παρούσα διατριβή προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά οι κρυσταλλικές δομές του άνδρου εσωτερικού άλατος της σιπροφλοξασίνης (HCIP) και του νέου μεταλλοφαρμάκου CIPTIN, με τη χρήση κρυσταλλογραφίας ακτίνων X μονοκρυστάλλου. Σε προηγούμενη μελέτη, έχουν προσδιοριστεί μόνο οι παράμετροι της μοναδιαίας κυψελίδας της άνδρης HCIP με χρήση των δεδομένων της ανάλυσης περίθλασης ακτίνων X κόνεως (Fabbiani et al., 2009). Οι παράμετροι που υπολογίστηκαν αποδεικνύουν ότι η HCIP κρυσταλλώνει στην ομάδα χώρου P1 (P1 space group) με παρόμοιες παραμέτρους μοναδιαίας κυψελίδας με αυτές που υπολογίστηκαν στη μελέτη των Fabbiani et al.



Εικόνα 25: Διάγραμμα ORTEP της HCIP

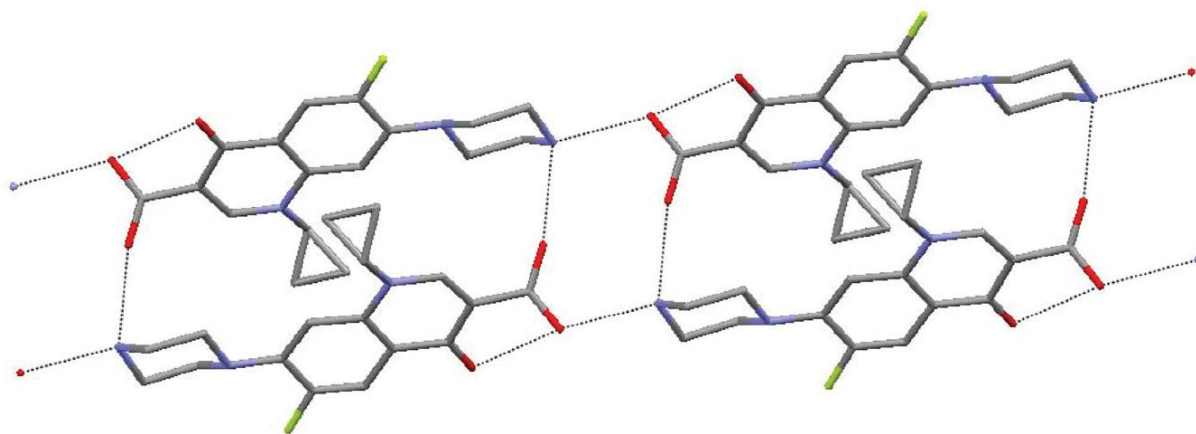
Δεδομένου ότι το αρχικό αντιδρών για τη σύνθεση του νέου μεταλλοφαρμάκου CIPTIN, είναι η υδροχλωριωμένη σιπροφλοξασίνη (HCIP HCl), η HCIP αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν της

παρασκευής του. Για αυτό τον λόγο, πραγματοποιήθηκε η μελέτη και ο προσδιορισμός των παραμέτρων της κρυσταλλικής δομής του HCIP, παρόλο που δεν αποτελεί τελικό προϊόν για περαιτέρω μελέτες στη συγκεκριμένη διατριβή. Στην **Εικόνα 25** απεικονίζεται το διάγραμμα ORTEP της HCIP, ενώ στον **Πίνακα 6**, παρατίθενται επιλεγμένα μήκη δεσμών και γωνίες από την επίλυση της κρυσταλλικής δομής της ένωσης.

Οι αποστάσεις των δύο δεσμών C-O της καρβοξυλικής ομάδας στο μόριο της άνυδρης HCIP ($O1-C14 = 1,247(3)$ και $O2-C14 (1,266(3) \text{ \AA})$ είναι ισοδύναμοι, γεγονός που υποδηλώνει την αποπρωτονίωσή της. Τα μήκη δεσμών $C1-O1$, $C1-O2$ και η γωνία δεσμού $O1-C14-O2$ που υπολογίστηκαν για την HCIP, είναι σε συμφωνία με τις αντίστοιχες τιμές που έχουν υπολογιστεί για την $HCIP \cdot 6H_2O$ σε παλαιότερη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας (Milionis et al., 2018). Οι αποστάσεις των δεσμών $N3-C11$ και $N3-C12$, είναι $1,481(3)$ και $1,485(3) \text{ \AA}$, αντίστοιχα, προτείνοντας απλούς δεσμούς N-C (**Εικόνα 25**). Αυτό ενισχύεται και από το γεγονός ότι η γωνία δεσμού $C11-N3-C12$ ισούται με $109,0(2)^\circ$ ($108^\circ 28'$ για sp^3 υβριδισμό). Η ομάδα $[-NH_2-]$ της HCIP αποκτά θετικό φορτίο λόγω των δύο ατόμων υδρογόνου που συνδέονται στο N3 (**Σχήμα 2**). Οι δεσμοί υδρογόνου $N3[H3] \cdots O2 = 2,623(3) \text{ \AA}$ και $N3[H3] \cdots O1 = 2,882(3) \text{ \AA}$, υποδηλώνουν τον σχηματισμό δικτύου λόγω δεσμών υδρογόνου μιας διάστασης (1D) (**Εικόνα 26**).

Πίνακας 6: Επιλεγμένα μήκη δεσμών ($\text{\AA}$) και τιμές γωνιών ($^\circ$) της HCIP

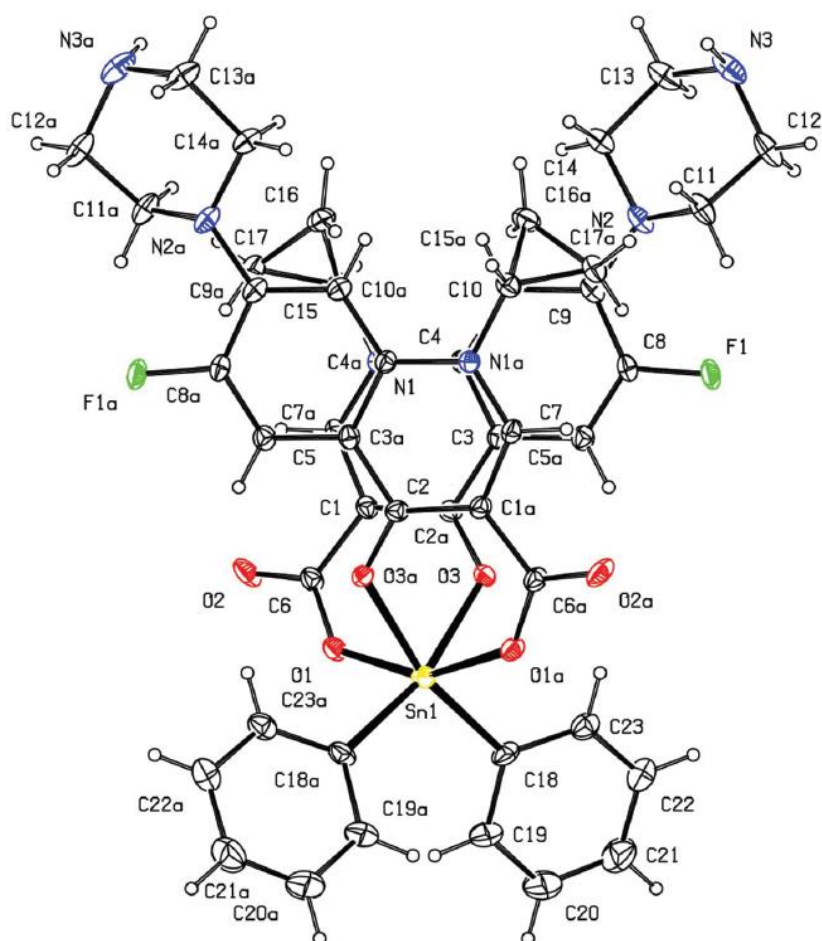
Μήκη δεσμών ($\text{\AA}$)		Γωνίες δεσμών ($^\circ$)	
$O1-C14$	$1,247(3)$	$O1-C14-O2$	$125,3(2)$
$O2-C14$	$1,266(3)$	$O3-C2-C1$	$125,0(2)$
$C1-C2$	$1,453(3)$	$C11-N3-C12$	$109,0(2)$
$O3-C2$	$1,241(3)$		
$N3-C11$	$1,481(3)$		
$N3-C12$	$1,485(3)$		



Εικόνα 26: Απεικόνιση της αρχιτεκτονικής του 1D δικτύου δεσμών υδρογόνου της HCIP

Επίσης, προσδιορίστηκε η κρυσταλλική δομή του νέου μεταλλοφαρμάκου. Το CIPTIN είναι μια ομοιοπολική οργανοκασσιτερική ένωση που αποτελείται από δύο υποκαταστάτες σιπροφλοξασίνης και μια ομάδα $\text{Ph}_2\text{Sn(IV)}$. Η σιπροφλοξασίνη εντάσσεται στο άτομο κασσιτέρου(IV) μέσω του ανιονικού ατόμου οξυγόνου της αποπρωτονιωμένης καρβοξυλικής ομάδας και του οξυγόνου της κέτο-ομάδας. Έτσι, τα δύο άτομα οξυγόνου από κάθε μόριο σιπροφλοξασίνης και τα δύο άτομα άνθρακα των φαινυλικών ομάδων σχηματίζουν μια παραμορφωμένη οκταεδρική (Oh) διάταξη γύρω από το ιόν του κασσιτέρου(IV). Στην **Εικόνα 27** απεικονίζεται το διάγραμμα ORTEP του CIPTIN, ενώ στον **Πίνακα 7**, παρατίθενται επιλεγμένα μήκη δεσμών και γωνίες από την επίλυση της κρυσταλλικής δομής.

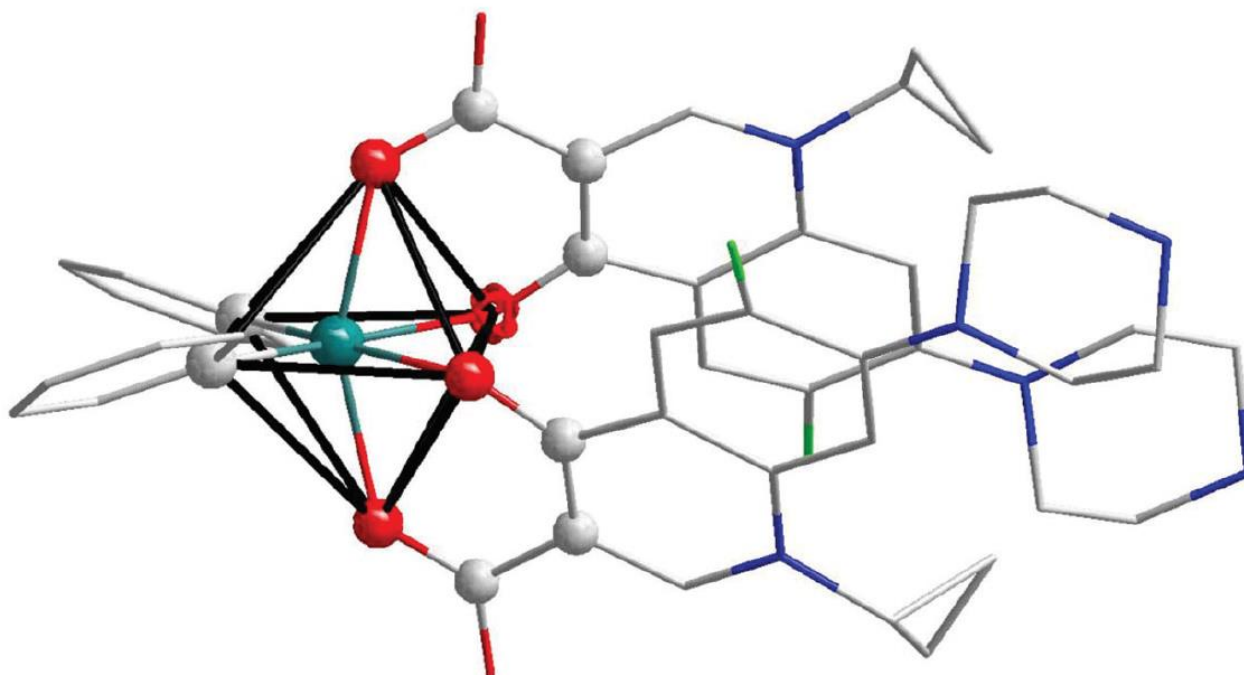
Το ισημερινό επίπεδο (equatorial plane) του οκταέδρου γύρω από το ιόν κασσιτέρου(IV) αποτελείται από δύο άτομα οξυγόνου (O3 και O3a) της κέτο ομάδας και δύο άτομα άνθρακα των φαινυλικών ομάδων ($\text{O3-Sn1-O3a} = 80.96(11)^\circ$ και $\text{O3-Sn1-C18a} = 166.12(15)^\circ$). Οι αξονικές θέσεις καταλαμβάνονται από τα δύο καρβοξυλικά άτομα οξυγόνου (O1 και O1a) ($\text{O1-Sn1-O1a} = 155.64(11)^\circ$) και μόνο το Δ-cis- $[\text{Ph}_2\text{Sn(CIP)}_2]$ ισομερές (**Εικόνα 28**) απομονώθηκε στο κρυσταλλικό πλέγμα, γεγονός που αποδεικνύει την στερεοειδικότητα της αντίδρασης σύνθεσης του CIPTIN.



Εικόνα 27: Διάγραμμα ORTEP του CIPTIN

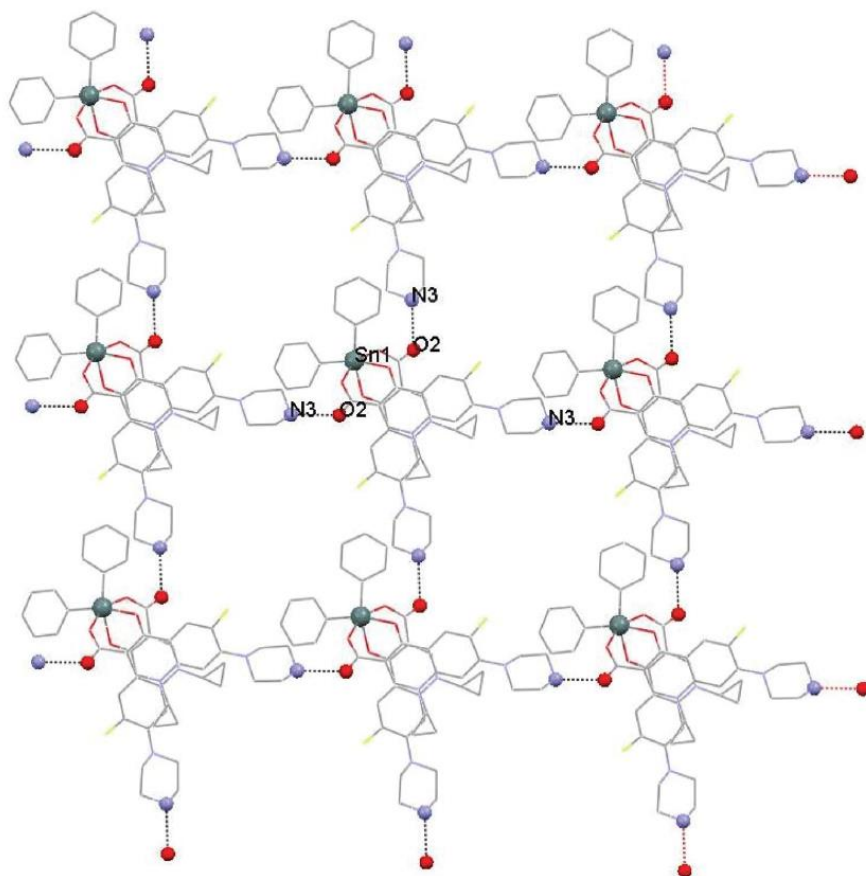
Πίνακας 7: Επιλεγμένα μήκη δεσμών (Å) και τιμές γωνιών (°) του CIPTIN

Μήκη δεσμών (Å)		Γωνίες δεσμών (°)	
Sn1–O1	2,135(3)	O1–Sn1–O3	79,93(11)
Sn1–O3	2,158(3)	O1–Sn1–O1_a	155,64(11))
Sn1–C18	2,120(5)	O1–Sn1–O3_a	81,60(11)
Sn1–O1_a	2,135(3)	O1_a–Sn1–O3	81,60(11)
Sn1–O3_a	2,158(3)	O3–Sn1–O3_a	80,96(11)
Sn1–C18_a	2,120(5)	O1_a–Sn1–O3_a	79,93(11)
O3–C2	1,284(5)		
O1–C6	1,298(5)		
O2–C6	1,216(5)		



Εικόνα 28: Απεικόνιση του στερεοϊσομερούς Δ-cis- $[\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{CIP})_2]$

Οι δύο αποστάσεις δεσμών των C–O της καρβοξυλικής ομάδας ($\text{O1}–\text{C6} = 1,298(5)$ και $\text{O2}–\text{C6} = 1,216(5)$ Å) είναι σχεδόν ισοδύναμες, γεγονός που επιβεβαιώνει την αποπρωτονίωση που υφίσταται. Ο δεσμός $\text{O1}–\text{C6}$ είναι ελαφρώς μακρύτερος από τον αντίστοιχο $\text{O2}–\text{C6}$, λόγω της προσφοράς του ατόμου O1 στον κασσίτερο(IV). Το μήκος δεσμού C–O της κετο-ομάδας ($\text{O3}–\text{C2} = 1,284(5)$ Å) προτείνει τη διατήρηση της διπλής φύσης αυτού του δεσμού. Οι ισχυρές αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου $\text{N3} [\text{H3}] \cdots \text{O2} = 2,733(6)$ Å υποδηλώνουν τον σχηματισμό ενός δικτύου δεσμών υδρογόνου δύο διαστάσεων (2D layers). Το 2D δίκτυο αποτελείται από τετραγωνικά πλέγματα που σχηματίζονται από τέσσερα μόρια CIPTIN ($\text{Sn} \cdots \text{Sn} = 13,969$ Å και $\text{Sn}–\text{Sn}–\text{Sn} = 87.03^\circ$) (Εικόνα 29).



Εικόνα 29: Απεικόνιση της αρχιτεκτονικής του 2D δικτύου δεσμών υδρογόνου του CIPTIN

Δ.2.3 Φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (X-ray Fluorescence Spectroscopy - XRF)

Με την τεχνική της φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X, επιβεβαιώθηκε η παρουσία του κασσιτέρου και προσδιορίστηκε το ποσοστό του στις νέες ενώσεις. Το ποσοστό του κασσιτέρου στο CIPTIN με XRF υπολογίστηκε 15.5 ± 2.3 κ.β %, ενώ το θεωρητικά υπολογισμένο ποσοστό για το $C_{46}H_{44}F_2N_6O_6Sn$ είναι 12.75 %.

Τα φάσματα XRF των μικκυλίων επιβεβαιώνουν την ύπαρξη κασσιτέρου σε αυτά, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι οι βιοδραστικές ενώσεις του κασσιτέρου έχουν ενθυλακωθεί μέσα στα μικκύλια. Τα ποσοστά του κασσιτέρου υπολογίστηκαν $7,3 \pm 1,1$ % κ.β., $1,9 \pm 0,2$ % κ.β, $1,0 \pm 0,1$ % κ.β και $1,7 \pm 0,2$ % κ.β για τα μικκύλια SLS@CIPTIN, CTAB@CIPTIN, SLS@DPTD και CTAB@DPTD, αντίστοιχα. Τα θεωρητικά υπολογισμένα ποσοστά του κασσιτέρου για τα μικκύλια

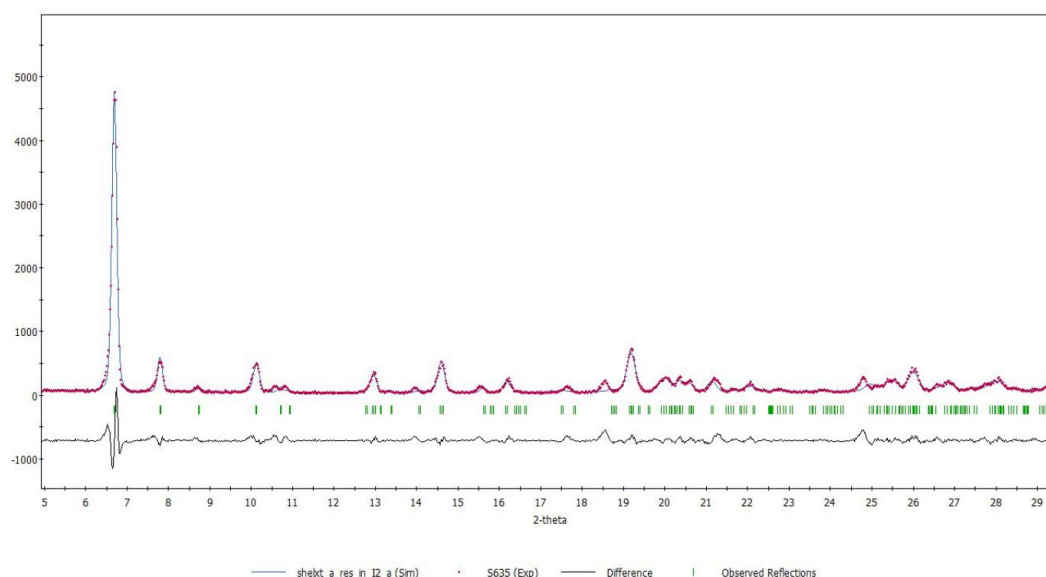
είναι: 4,26 % κ.β, ,3,92 % κ.β, 1,33 % κ.β και 4,28 % κ.β. Τα παραπάνω ποσοστά παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον **Πίνακα 8**.

Πίνακας 8: Ποσοστά κασσιτέρου με XRF και θεωρητικά υπολογισμένα

Μικκύλιο	XRF % Sn (κ.β.)	Θεωρητικό % Sn (κ.β.)
SLS@CIPTIN	7,3 ± 1,1	4,26
CTAB@CIPTIN	1,9 ± 0,2	3,92
SLS @DPTD	1,0 ± 0,1	1,33
CTAB@DPTD	1,7 ± 0,2	4,28

Δ.2.2 Ανάλυση Περίθλασης ακτίνων X κόνεως (X-ray powder diffraction - XRPD)

Η ανάλυση Περίθλασης ακτίνων X κόνεως πραγματοποιήθηκε για να επιβεβαιωθεί ότι το CIPTIN παραμένει αμετάβλητο σε όλο το δείγμα κόνεως. Για το σκοπό αυτό, το φάσμα XRPD κόνεως του CIPTIN συγκρίθηκε με το διάγραμμα που προήλθε από την ανάλυση περίθλασης ακτίνων X μονοκρυστάλλου. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 30**, το μοτίβο του φάσματος XRPD του CIPTIN από τα δεδομένα της ανάλυσης XRD , ταυτίζεται επαρκώς με το μοτίβο που προήλθε από την ανάλυση XRPD (πειραματικό).



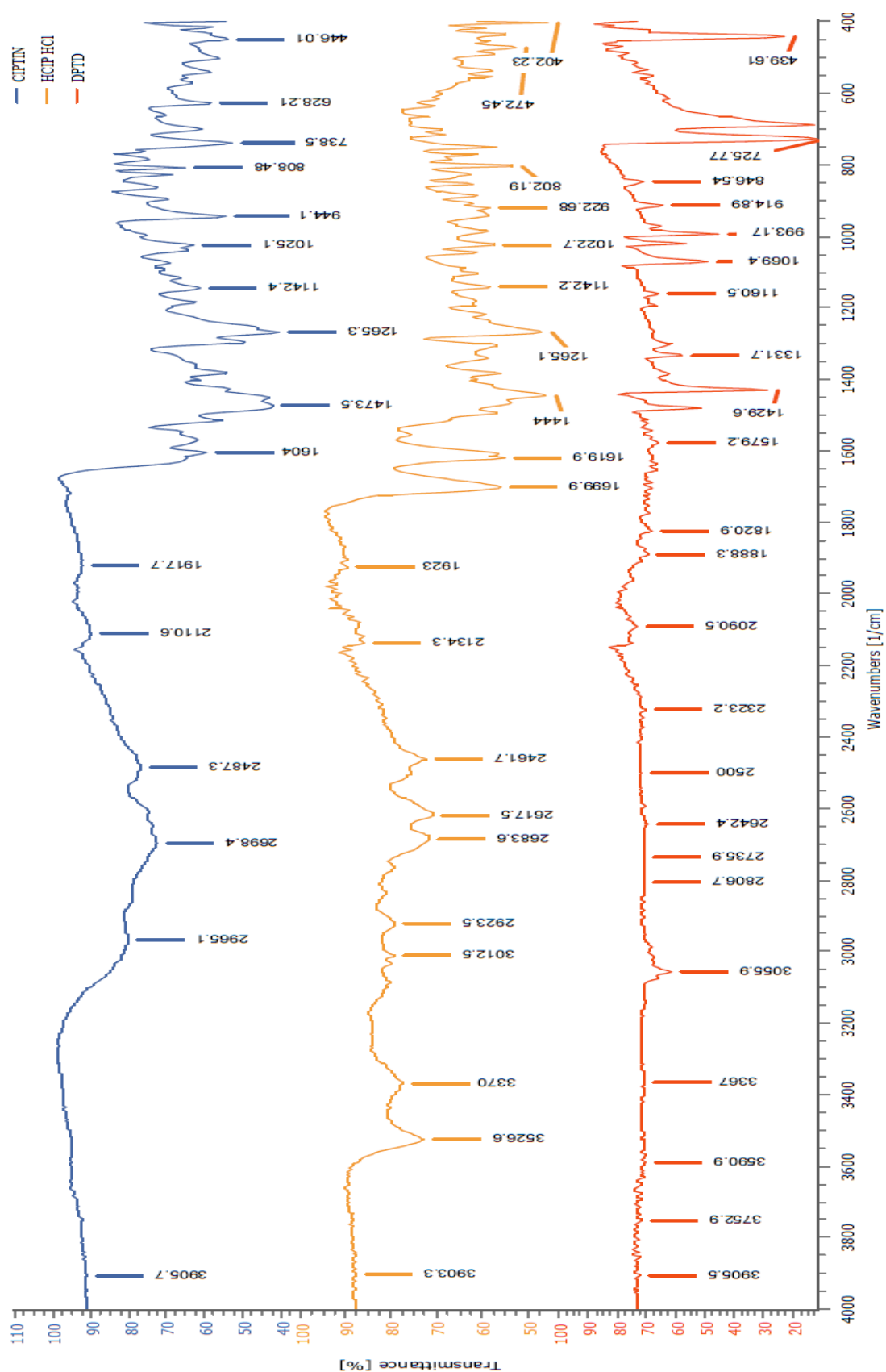
Εικόνα 30: Φάσμα XRPD του CIPTIN από τα δεδομένα της ανάλυσης XRD (-----) συγκρίσει του πειραματικού (-----)

Λ.2.4 Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR

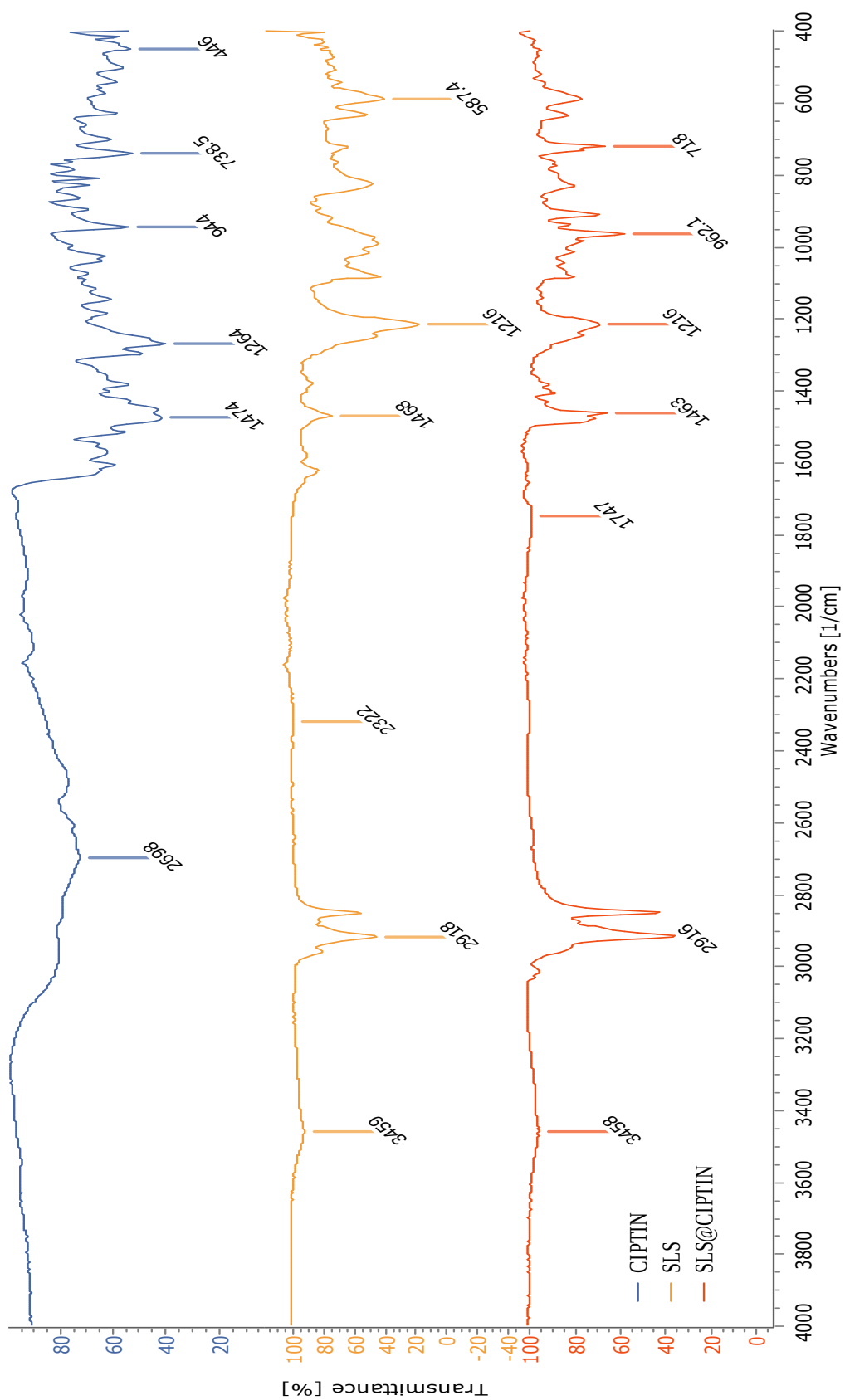
Το νέο μεταλλοφάρμακο και τα μικκύλια χαρακτηρίστηκαν σε στερεά κατάσταση και με φασματοσκοπία υπερύθρου. Οι χαρακτηριστικές δονήσεις στο φάσμα της $\text{HCIP} \cdot \text{HCl}$ στα 1710 cm^{-1} , 1620 cm^{-1} και 1385 cm^{-1} , οφείλονται στην παρουσία των C=O , $\nu_{\text{as}}(-\text{COO}-)$ και $\nu_{\text{sym}}(-\text{COO}-)$ δονήσεων, αντίστοιχα (**Εικόνα 31**). Η απουσία της χαρακτηριστικής δόνησης στα 1710 cm^{-1} στο φάσμα του CIPTIN, υποδεικνύει την ένταξη του ligand στο σύμπλοκο μέσω του οξυγόνου της κέτο (C=O) ομάδας. Από την άλλη, οι χαρακτηριστικές δονήσεις της $\text{HCIP} \cdot \text{HCl}$ $\nu_{\text{as}}(-\text{COO}-)$ και $\nu_{\text{sym}}(-\text{COO}-)$ στο φάσμα του μεταλλοφαρμάκου έχουν μετατοπιστεί στα 1622 cm^{-1} και 1381 cm^{-1} , επιβεβαιώνοντας τη συμμετοχή και της καρβοξυλικής ομάδας στην ένταξη.

Επίσης, η παρουσία της δόνησης του δεσμού C-N του CIPTIN στα 1272 cm^{-1} οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το άτομο αζώτου δεν συμμετέχει στην σφαίρα ένταξης του μετάλλου. Όσον αφορά την απουσία της δόνησης στα 3520 cm^{-1} που οφείλεται στο δεσμό O-H στο φάσμα FT-IR του CIPTIN, επιβεβαιώνει την αποπρωτονίωση της καρβοξυλικής ομάδας. Από τις παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώνεται ότι η σιπροφλοξασίνη εντάσσεται στο μεταλλικό ιόν κασσιτέρου μέσω του οξυγόνου της κέτο- και της καρβοξυλικής ομάδας.

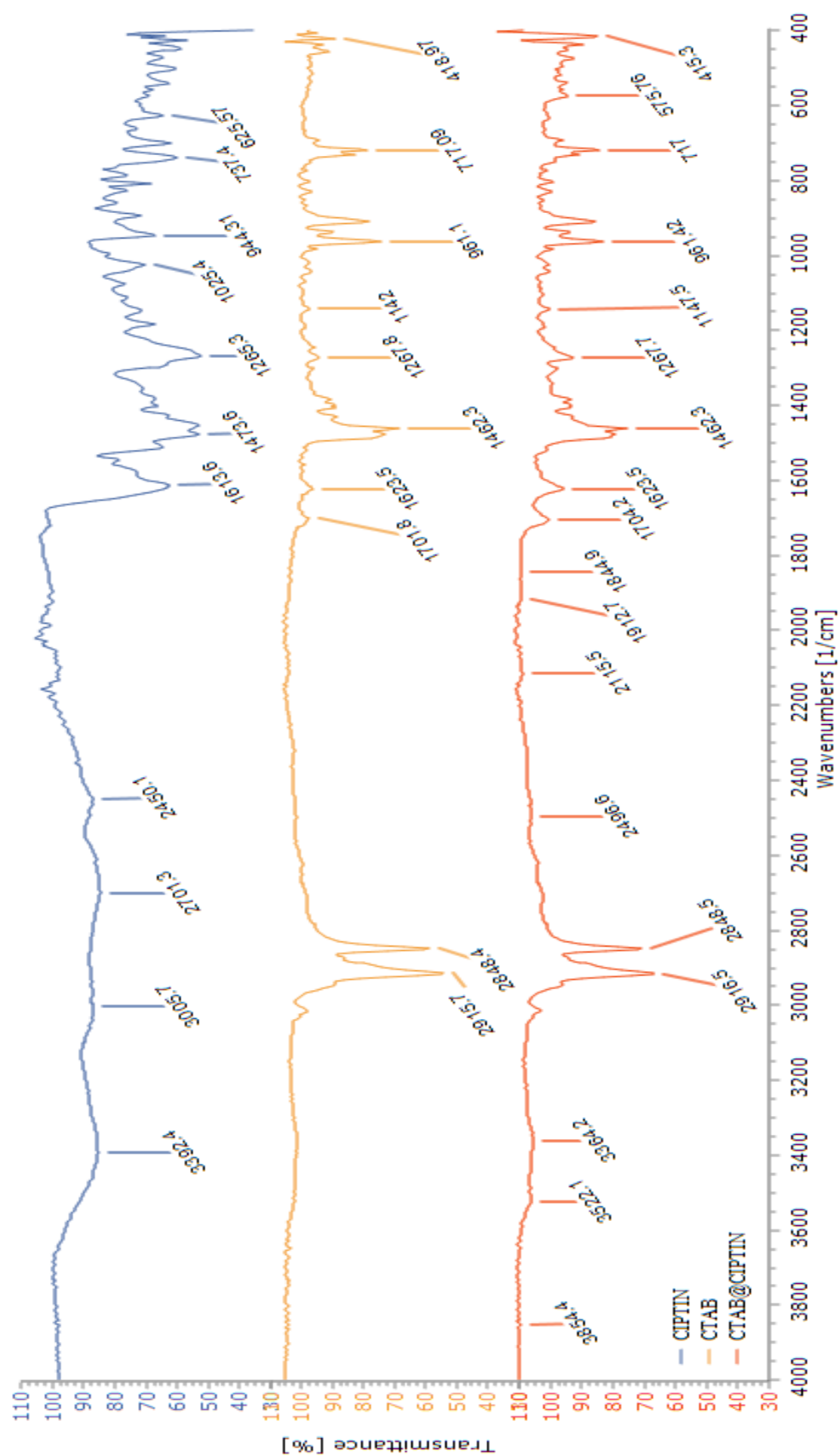
Στο φάσμα FT-IR του μικκυλίου SLS@CIPTIN κυριαρχούν κυρίως οι χαρακτηριστικές δονήσεις του επιφανειοδραστικού SLS λόγω της χαμηλής στοιχειομετρικής αναλογίας του CIPTIN/SLS (**Εικόνα 32**). Στο φάσμα IR του CTAB@CIPTIN δεν μπορούν επίσης να εντοπιστούν χαρακτηριστικές κορυφές του CIPTIN, λόγω της χαμηλής στοιχειομετρικής αναλογίας CIPTIN/CTAB (**Εικόνα 33**). Ομοίως, στα φάσματα IR των μικκυλίων SLS@DPTD και CTAB@DPTD , (**Εικόνες 34 και 35**) φαίνεται ότι και πάλι κυριαρχούν οι χαρακτηριστικές δονήσεις των επιφανειοδραστικών ουσιών SLS και CTAB, αντίστοιχα.



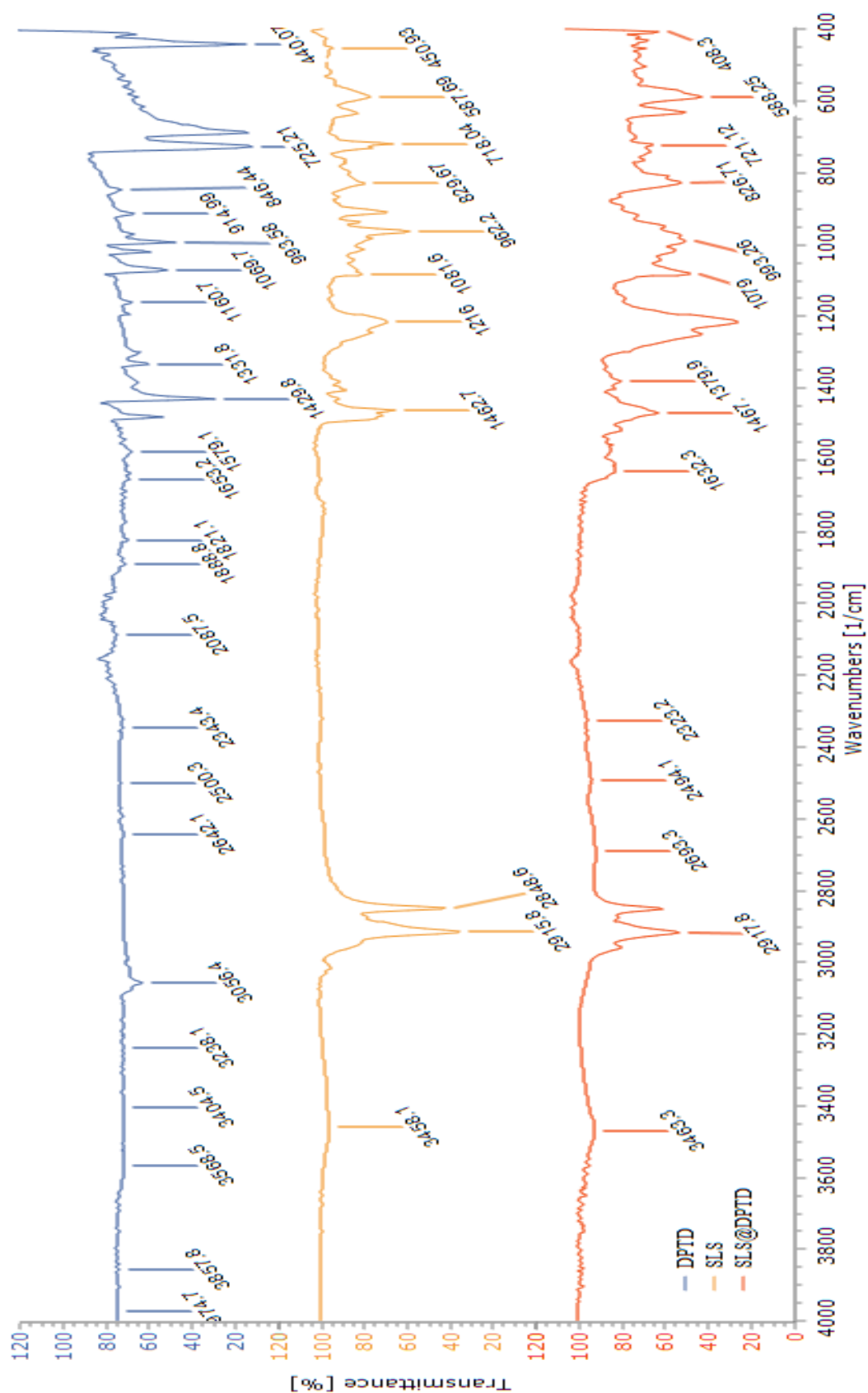
Εικόνα 31: Φάσμα FT-IR του CIPTIN, της HCIP·HCl, και του DPTD



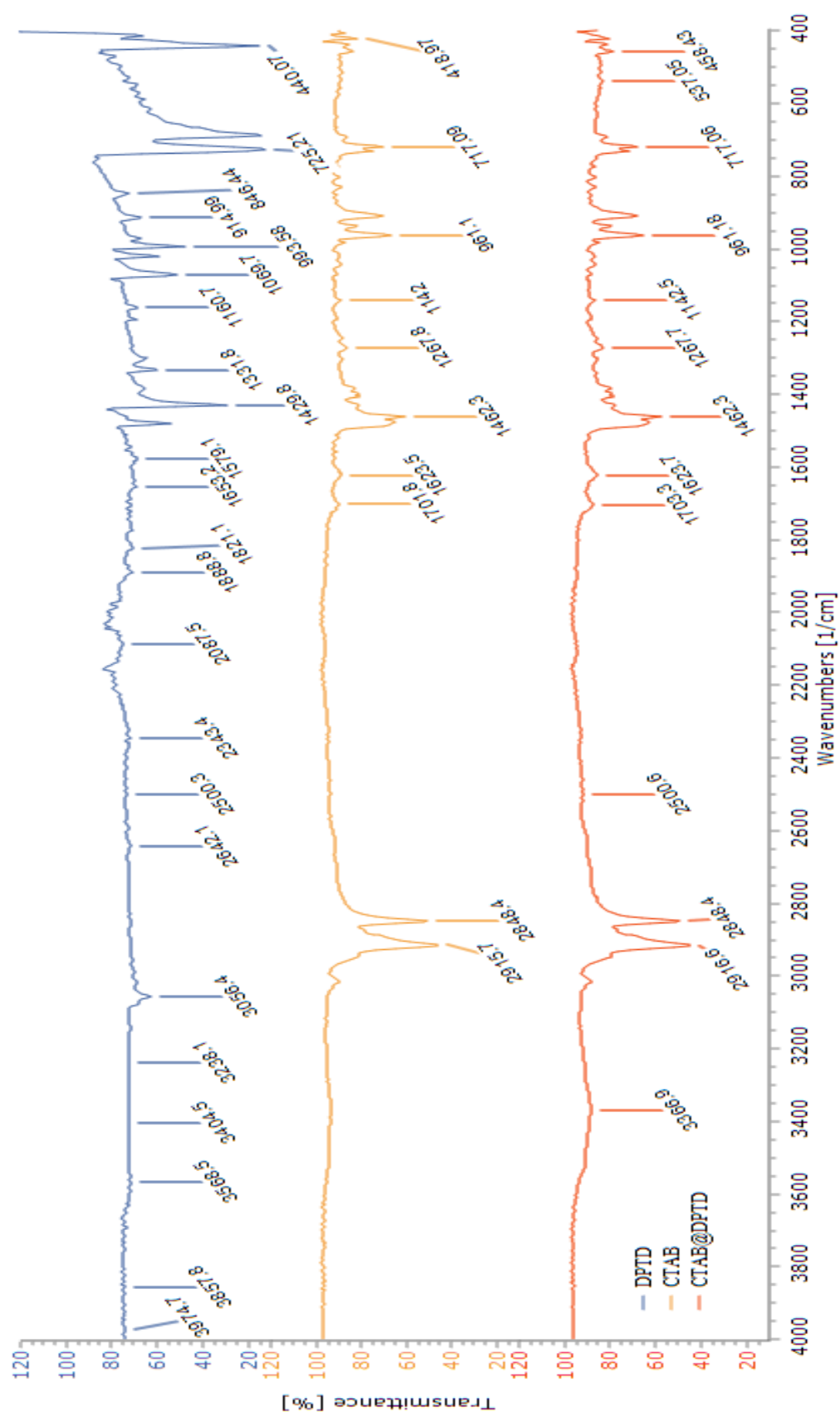
Εικόνα 32: Φάσμα FT-IR του CIPTIN, του SLS, και του SLS@CIPTIN



Εικόνα 33: Φάσμα FT-IR του CIPTIN, του CTAB, και του CTAB@CIPTIN



Εικόνα 34: Φάσμα FT-IR του DPTD, του SLS, και του SLS@DPTD



Εικόνα 35: Φάσμα FT-IR του DPTD, του CTAB, και του CTAB@DPTD

Α.2.5 Φασματοσκοπία ^{119}Sn Mössbauer

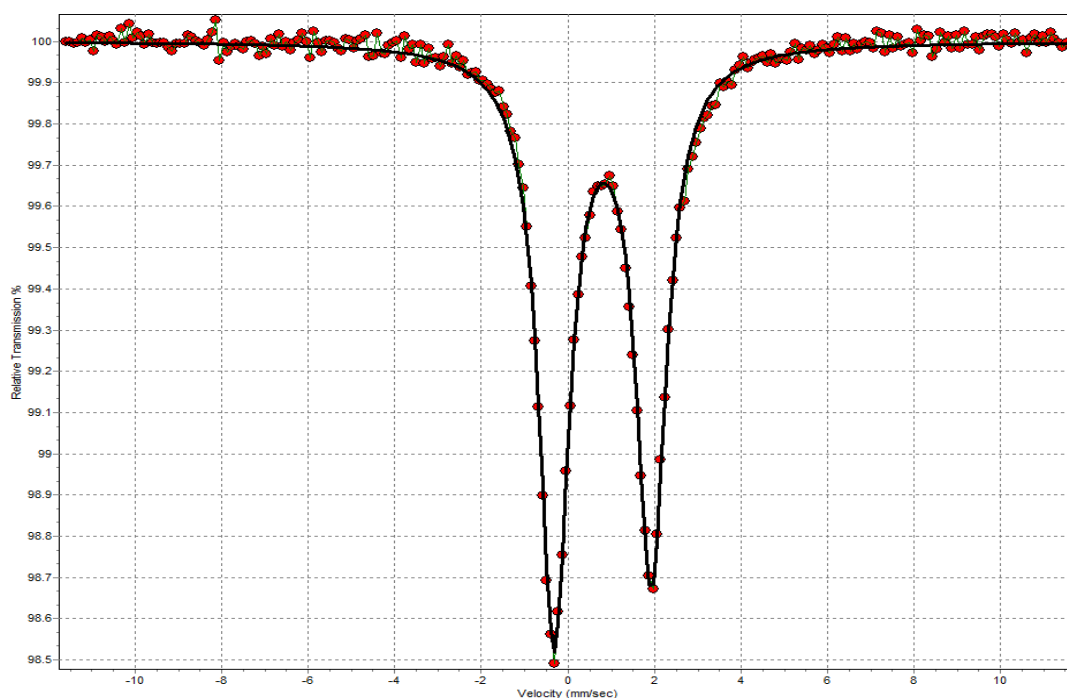
Η φασματοσκοπία ^{119}Sn Mössbauer είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για το δομικό χαρακτηρισμό ενώσεων σε ατομικό επίπεδο και μπορεί να δώσει πληροφορίες για το περιβάλλον του κασσιτερικού ατόμου, καθώς είναι ευαίσθητη τεχνική σε μικρές αλλαγές στο χημικό περιβάλλον ορισμένων πυρήνων (Unzueta et al., 2017). Οι βασικές παράμετροι που προσδιορίζονται με φασματοσκοπία Mössbauer είναι: (α) Η τιμή της ισομερούς μετατόπισης (Isomer Shift, IS, δ) και (β) η τιμή της τετραπολικής αλληλεπίδρασης (Quadrupole Splitting, QS, ΔE_Q).

Στην **Εικόνα 36** παρουσιάζεται το φάσμα ^{119}Sn Mössbauer του CIPTIN στους 77 K, το οποίο αποτελείται από μία ασύμμετρη διπλή Λορεντζιανή γραμμή (Lorentzian doublet). Η παρουσία μια Λορεντζιανής γραμμής υποδηλώνει είτε την παρουσία ενός είδους κασσιτερικού ατόμου, είτε την παρουσία ενός δομικού ισομερούς (Smith, 1998). Η τιμή IS του CIPTIN είναι $+0,80 \text{ mm s}^{-1}$ και υποδηλώνει πως το άτομο του κασσιτέρου βρίσκεται στην 4 (+) οξειδωτική κατάσταση (Sn(IV)), καθώς οι τιμές IS για τα οργανοκασσιτερικά παράγωγα $\text{R}_2\text{Sn(IV)}$ κυμαίνονται μεταξύ $+0,737$ και $+1,777 \text{ mm s}^{-1}$ (Smith, 1998). Η τιμή QS του CIPTIN μετρήθηκε $2,24 \text{ mm s}^{-1}$ και υποδηλώνει πως η γεωμετρία των ομάδων R γύρω από το άτομο του κασσιτέρου(IV) στο μεταλλοφάρμακο είναι cis-οκταεδρική (Smith, 1998). Αυτή η τιμή QS αντιστοιχεί σε οκταεδρική γεωμετρία ($QS = 1,3 - 2,5 \text{ mm s}^{-1}$) γύρω από το άτομο κασσιτέρου με cis- $\text{R}_2\text{Sn(IV)}$ ($\text{R} = \text{alkyl}$) και είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X μονοκρυστάλλου.

Οι τιμές των παραμέτρων ^{119}Sn Mössbauer των μικκυλίων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9**. Τα φάσματα Mössbauer του SLS@CIPTIN (**Εικόνα 37**), του CTAB@CIPTIN (**Εικόνα 38**) και του CTAB@DPTD (**Εικόνα 40**) αποτελούνται από μία ασύμμετρη διπλή Λορεντζιανή γραμμή, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη ενός ατόμου κασσιτέρου στα μικκύλια. Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 9**, οι τιμές των παραμέτρων IS και QS του SLS@CIPTIN και του CTAB@CIPTIN είναι παραπλήσιες με αυτή του CIPTIN γεγονός που αποδεικνύει την ενθυλάκωση του CIPTIN μέσα στα μικκύλια.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η τιμή ισομερούς μετατόπισης για τον DPTD είναι $1,37 \text{ mm s}^{-1}$ και η τιμή της τετραπολικής αλληλεπίδρασης ισούται με $2,83 \text{ mm s}^{-1}$ (Llengme et al., 1972). Οι

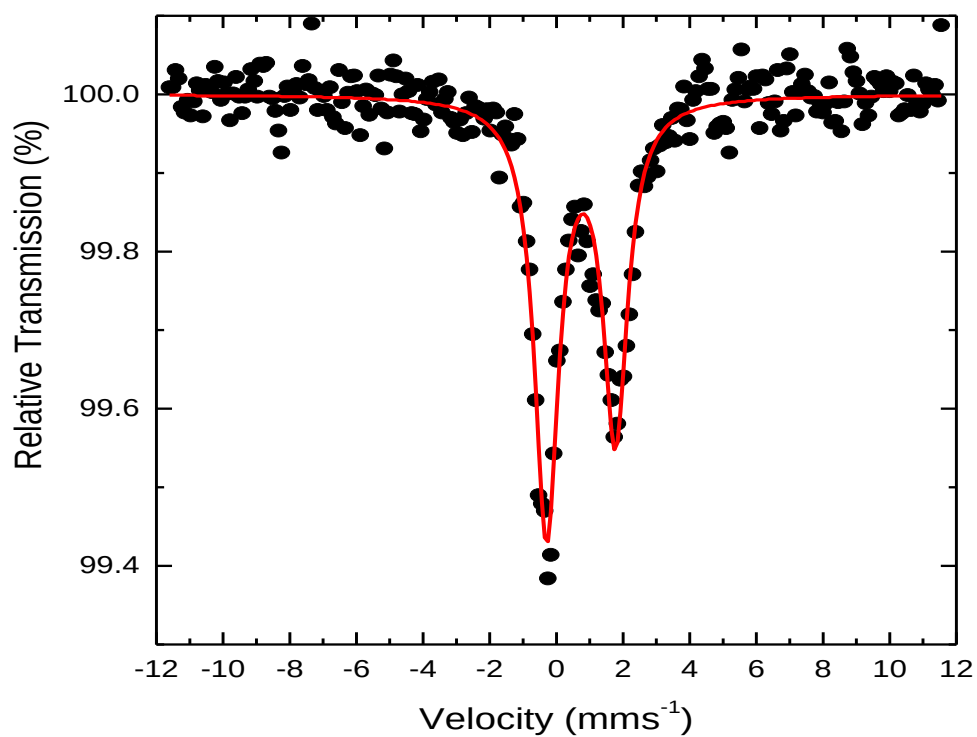
τιμές αυτές είναι παραπλήσιες με τις τιμές (1,38 και 3,38 αντίστοιχα) που μετρήθηκαν με ^{119}Sn Mössbauer για το μικκύλιο CTAB@DPTD, επιβεβαιώνοντας την ενθυλάκωση του DPTD μέσα στο μικκύλιο του επιφανειοδραστικού παράγοντα CTAB (**Εικόνα 39**). Η απόκλιση που παρατηρείται στις τιμές των παραμέτρων IS και QS του μικκυλίου SLS @DPTD σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές του DPTD, πιθανόν να οφείλεται στην αλληλεπίδραση του DPTD με το SLS.



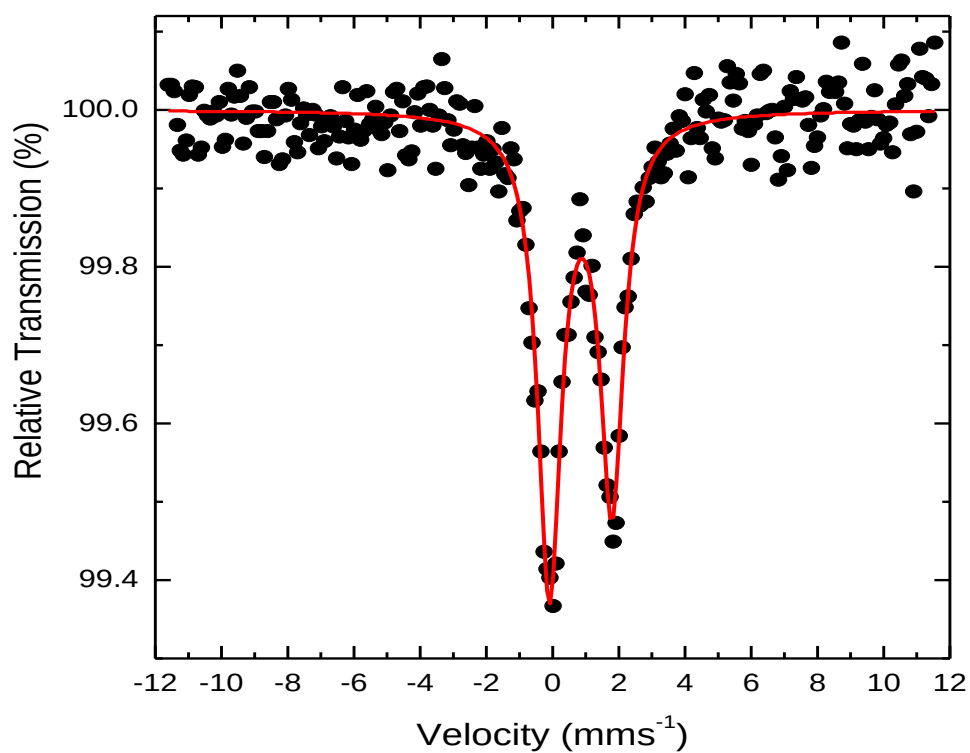
Εικόνα 36: Φάσμα ^{119}Sn Mössbauer του CIPTIN

Πίνακας 9: Παράμετροι της φασματοσκοπίας ^{119}Sn Mössbauer

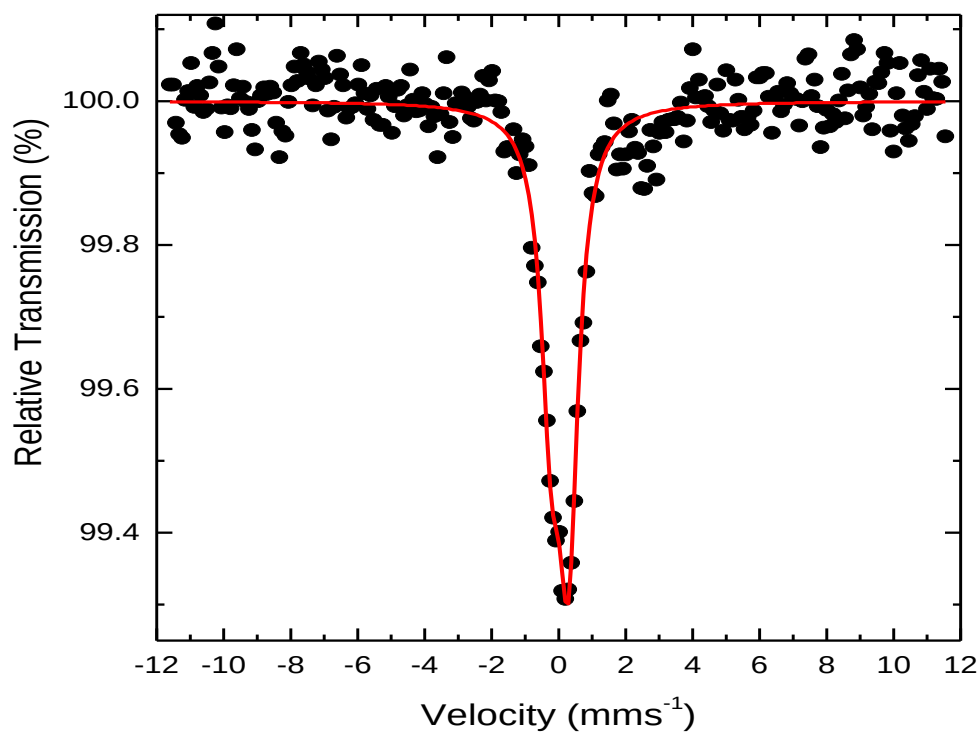
Ένωση	IS (mm s ⁻¹)	QS (mm s ⁻¹)	Area (%)
CIPTIN	0,80	2,24	100
SLS@CIPTIN	0,74	2,06	100
CTAB@CIPTIN	0.85	1,89	100
SLS @DPTD	0,03	0,52	100
CTAB@DPTD	1,38	3,38	100
DPTD Llengme et al., 1972	1,37	2,83	



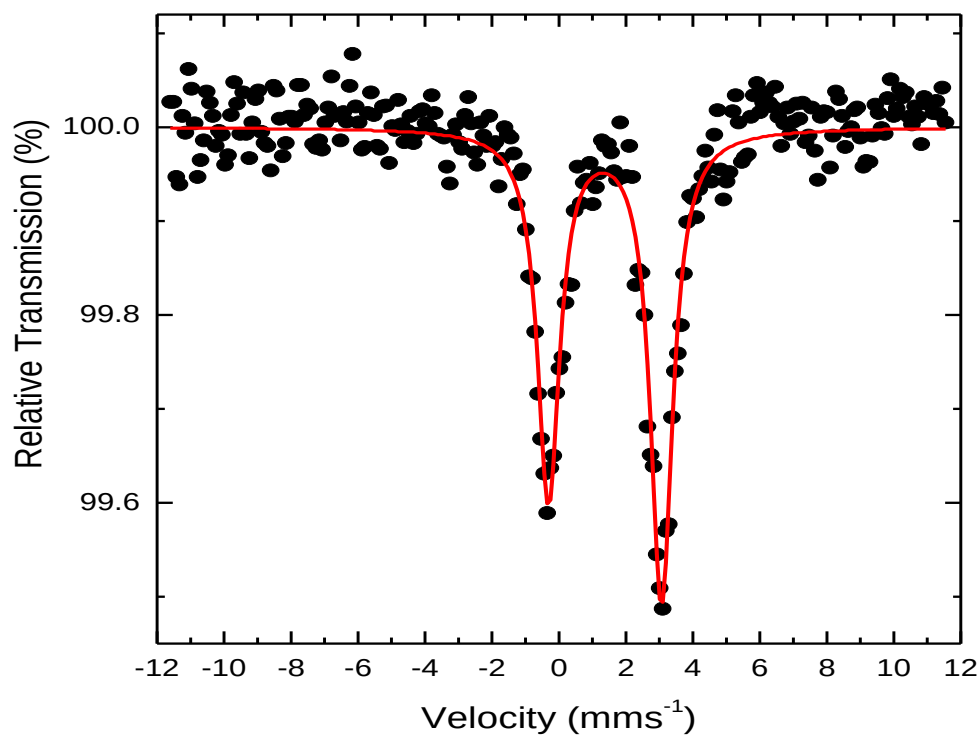
Εικόνα 37: Φάσμα ^{119}Sn Mössbauer του SLS@CIPTIN



Εικόνα 38: Φάσμα ^{119}Sn Mössbauer του CTAB@CIPTIN



Εικόνα 39: Φάσμα ^{119}Sn Mössbauer του SLS@DPTD



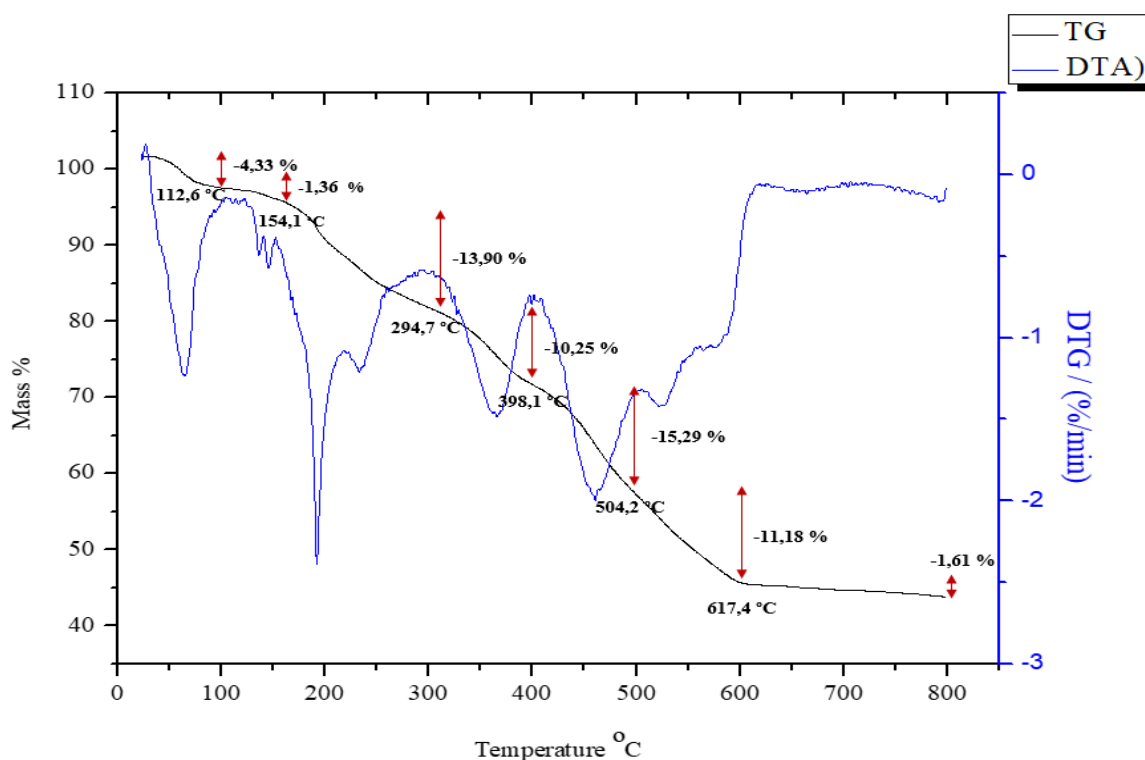
Εικόνα 40: Φάσμα ^{119}Sn Mössbauer του CTAB@DPTD

Δ.2.6 Θερμοβαρυνμετρική ανάλυση (Thermo Gravimetric Analysis)

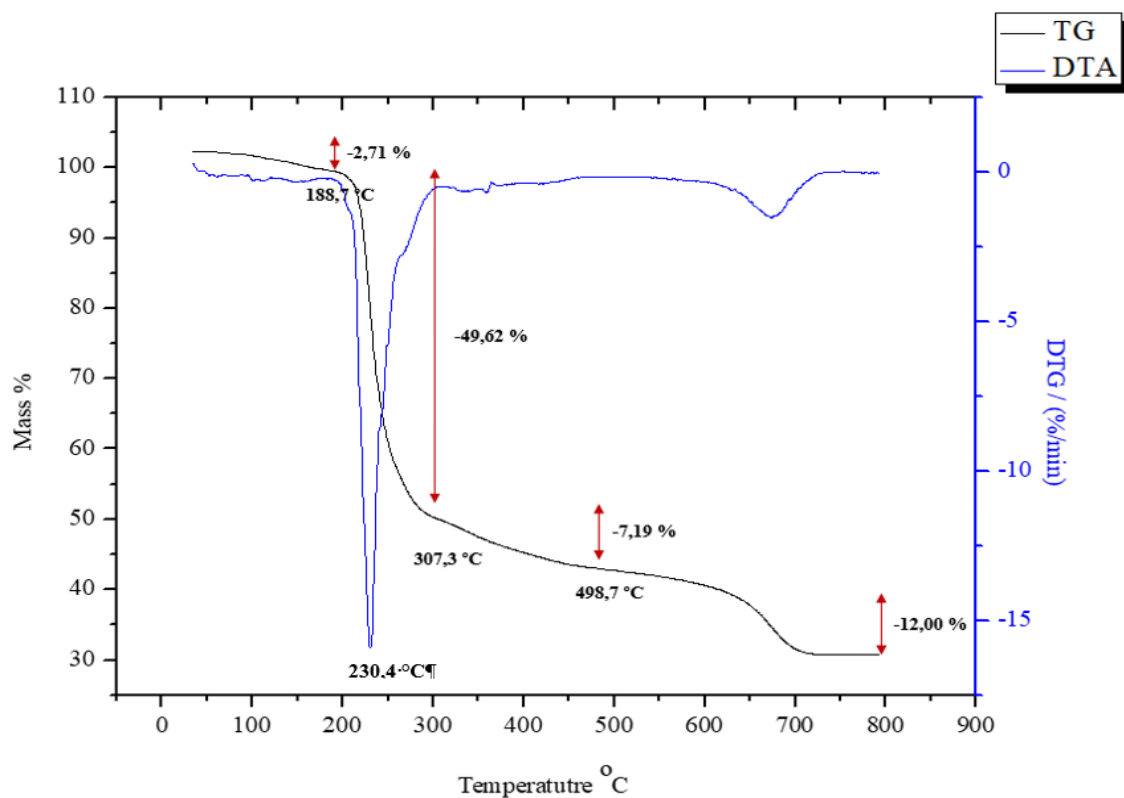
Δ.2.6.1 Θερμική ανάλυση (Thermal Decomposition – TG / DTA)

Οι αναλύσεις TG / DTA πραγματοποιήθηκαν υπό άζωτο. Από την ανάλυση του CIPTIN προκύπτει ότι το CIPTIN αποσυντίθεται σε 6 στάδια (112,6–617,4 °C) με συνολική απώλεια μάζας 57,92 % (**Εικόνα 41**). Η εναπομένουσα μάζα 42,08 % αντιστοιχεί στο οξείδιο του κασσιτέρου SnO_2 . Αυτό το ποσοστό οξειδίου αντιστοιχεί σε 13,68 % κασσίτερο, ενώ το υπολογισμένο ποσοστό του κασσιτέρου για την ένωση $\text{C}_{46}\text{H}_{44}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_6\text{Sn}$ είναι 12,75 %.

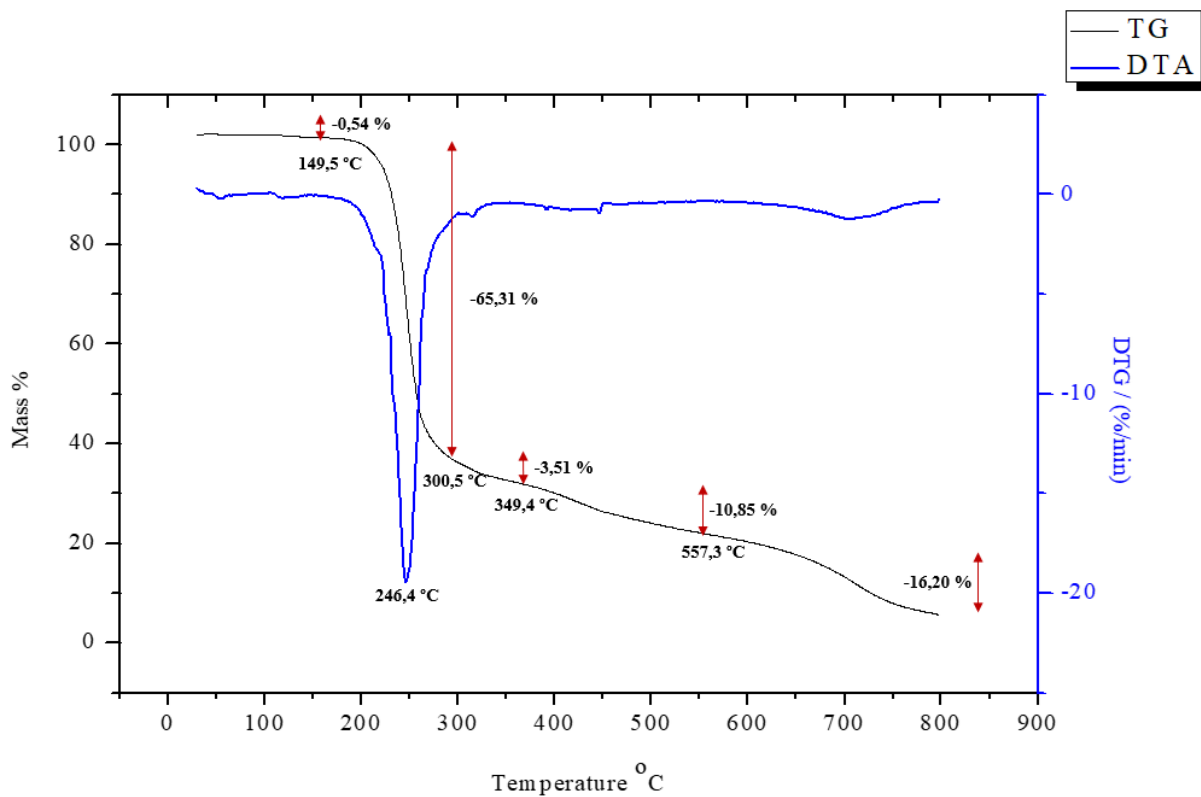
Θερμική ανάλυση πραγματοποιήθηκε και για τα μικκύλια που συντέθηκαν με σκοπό να επιβεβαιωθεί η καθαρότητά τους. Το μικκύλιο SLS@CIPTIN αποσυντίθεται σε 2 εξώθερμα στάδια: 188,7 - 307,3 °C (απώλεια μάζας 49,62 %) και 307,3 - 498,7 °C (απώλεια μάζας 7,19 %) (**Εικόνα 42**). Η εναπομένουσα μάζα είναι ίση με 30,73 %. Το μικκύλιο CTAB@CIPTIN αποσυντίθεται σε 3 εξώθερμα στους 149,5 - 300,5 °C (απώλεια μάζας 65,31 %), στους 300,5 - 349,4 °C (απώλεια μάζας 3,51 %), στους 349,4 - 557,3 °C (απώλεια μάζας 10,85 %) (**Εικόνα 43**). Η εναπομένουσα μάζα είναι ίση με 5,69 %.



Εικόνα 41: Γράφημα TD/DTA του CIPTIN

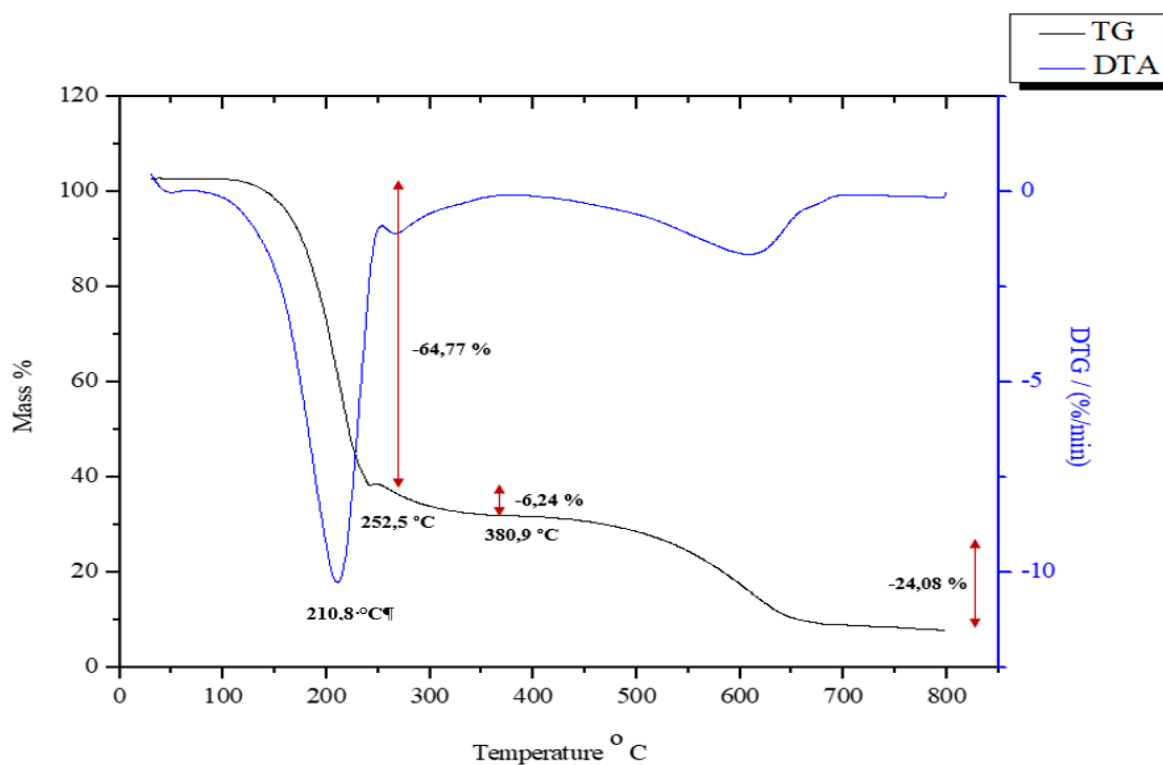


Εικόνα 42: Γράφημα TD/DTA του SLS@CIPTIN

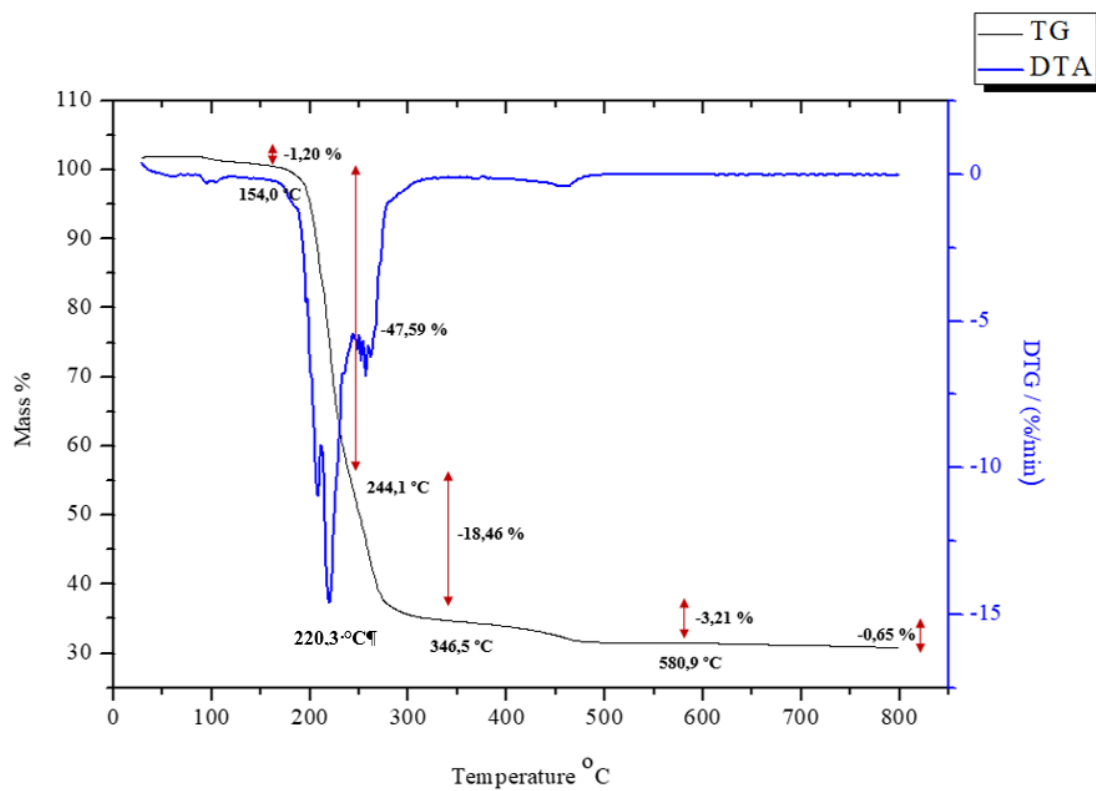


Εικόνα 43: Γράφημα TD/DTA του CTAB@CIPTIN

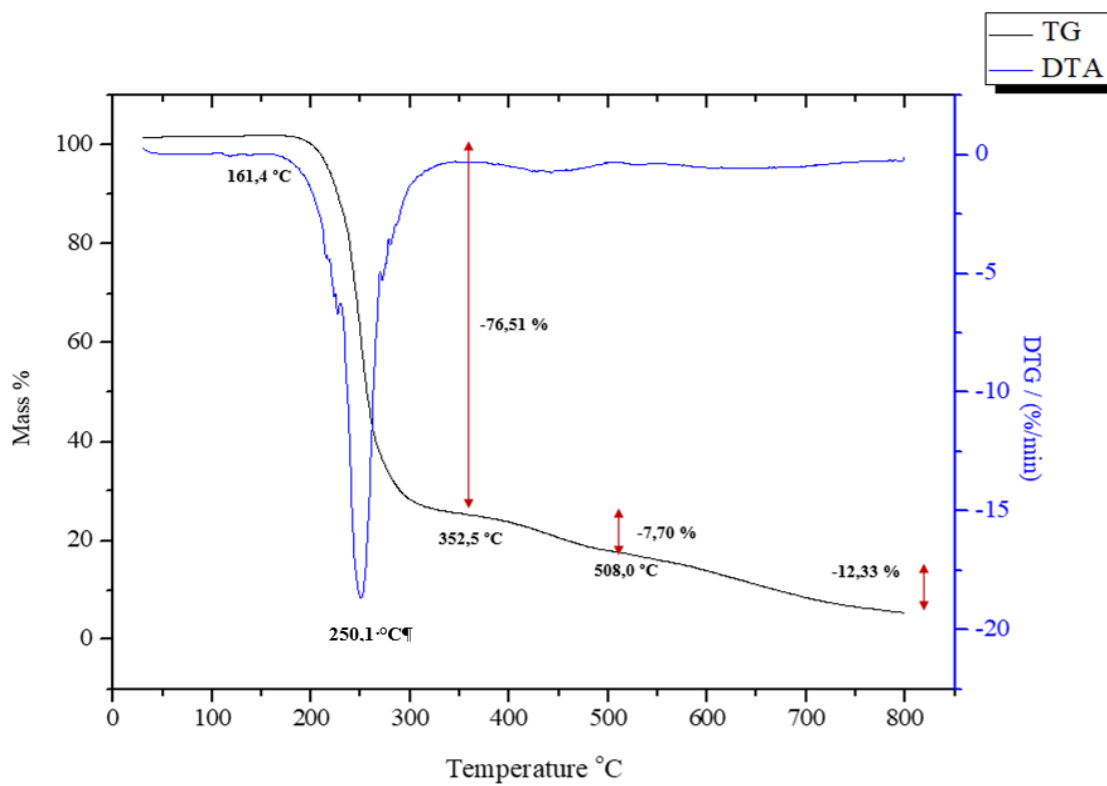
Το διάγραμμα TG / DTA του DPTD υποδεικνύει ότι το άλας του διφαινυλοδιχλωροκαρβοκασιτέρου αποσυντίθεται σε 2 εξώθερμα στάδια: στους 30,2 - 252,5 °C και στους 252,5 - 380,9 °C με απώλεια μάζας 64,77 % και 6,24 %, αντίστοιχα (**Εικόνα 44**). Το μικκύλιο SLS@DPTD αποσυντίθεται σε 3 εξώθερμα στάδια: στους 154,0 - 244,1 °C με απώλεια μάζας 47,59 %, στους 244,1 - 346,5 °C με απώλεια μάζας 18,46 % και στους 346,5 - 580,9 °C με απώλεια μάζας 3,21 % (**Εικόνα 45**). Η μάζα του SLS@DPTD που απομένει είναι ίση με 30,80 %. Το CTAB@DPTD από την άλλη αποσυντίθεται σε 2 στάδια στους 161,4 - 352,5 °C και στους 352,5 - 508,0 °C με απώλεια μάζας 76,51 % και 7,70 %, αντίστοιχα (**Εικόνα 46**). Η μάζα του μικκυλίου που απομένει είναι ίση με 5,42 %.



Εικόνα 44: Γράφημα TD/DTA του DPTD



Εικόνα 45: Γράφημα TD/DTA του SLS@DPTD



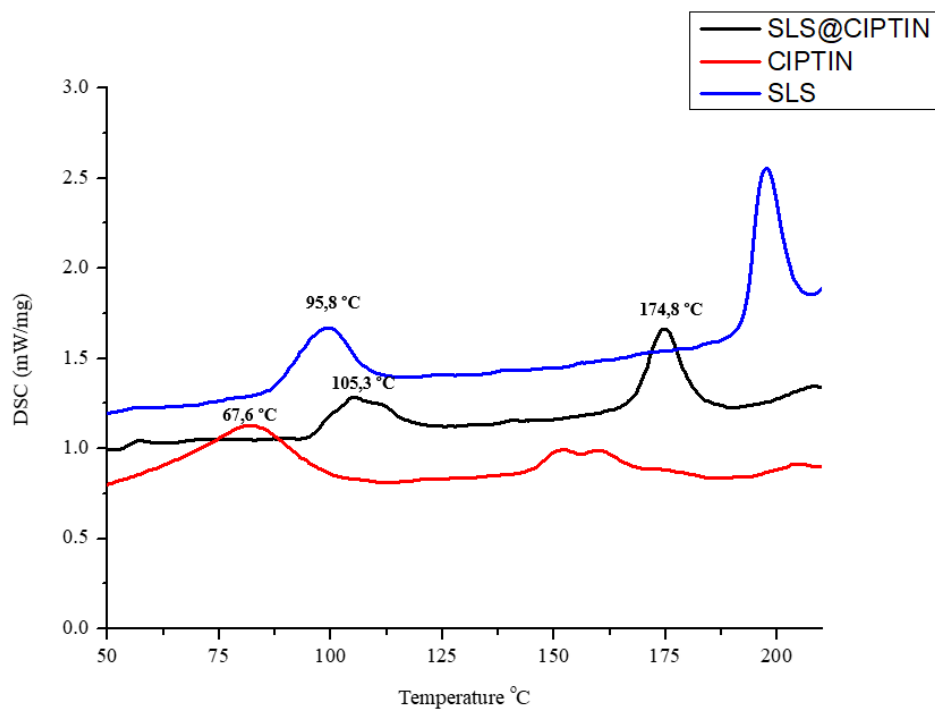
Εικόνα 46: Γράφημα TD/DTA του CTAB@DPTD

Δ.2.6.2 Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry - DSC)

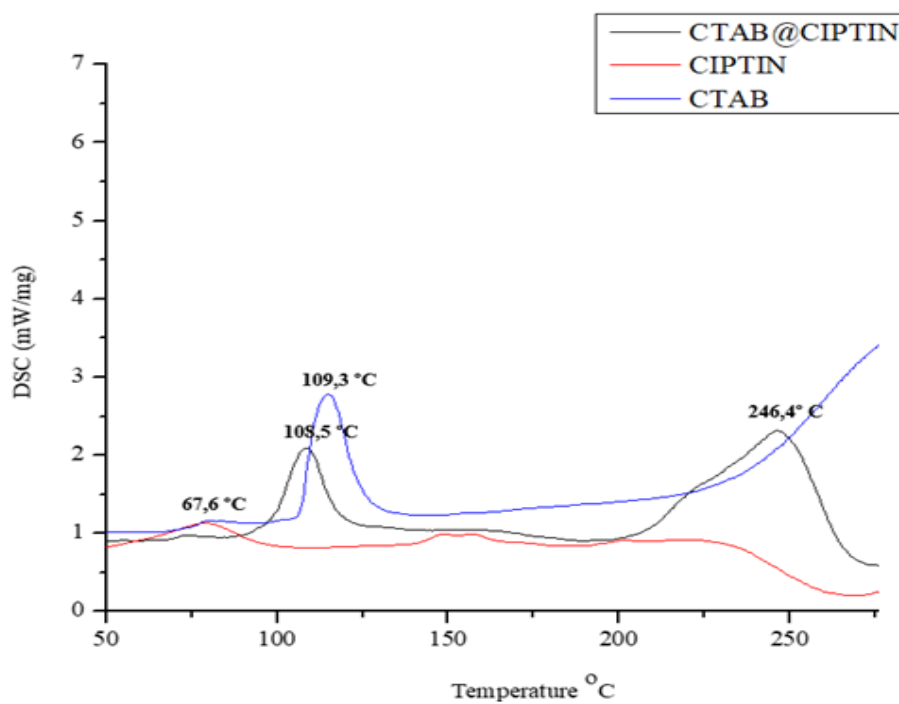
Οι μελέτες διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να επιβεβαιωθεί εάν οι βιοδραστικές ουσίες CIPTIN και DPTD αλληλεπιδρούν με τις επιφανειοδραστικές ουσίες SLS ή CTAB σε στερεά κατάσταση για να δώσουν είτε σύνθετα υλικά είτε μείγματα. Στις **Εικόνες 47 και 48** παρουσιάζονται τα διαγράμματα DSC του SLS@CIPTIN και του CTAB@CIPTIN, ενώ στις **Εικόνες 49 και 50** τα διαγράμματα των SLS@DPTD και CTAB@DPTD, αντίστοιχα. Επίσης, στην **Εικόνα 51** παρουσιάζεται το διάγραμμα του SLS@CIPTIN σε σύγκριση με του CTAB@CIPTIN και στην **Εικόνα 52** το διάγραμμα του SLS@DPTD και του CTAB@DPTD.

Στο διάγραμμα του SLS@CIPTIN εμφανίζονται δύο φάσεις ενδόθερμης μετάβασης (στους 105,3 °C και στους 174,8 °C) μέχρι τους 200 °C, ενώ οι ενδόθερμες μεταβάσεις στο διάγραμμα του CTAB@CIPTIN εμφανίζονται στους 108,5 °C και στους 246,4 °C. Η φάση ενδόθερμης μετάβασης του CIPTIN στους 67,6 °C και του SLS στους 95,8 °C δεν εμφανίζονται στο διάγραμμα του SLS@CIPTIN, αποδεικνύοντας το σχηματισμό ενός σύνθετου υλικού. Αντίστοιχα, η φάση που παρατηρείται στους 67,6 °C στο διάγραμμα του CIPTIN δεν εμφανίζεται στο διάγραμμα του CTAB@CIPTIN, αποδεικνύοντας ότι και το μικκύλιο CTAB@CIPTIN είναι σύνθετο υλικό και όχι μείγμα.

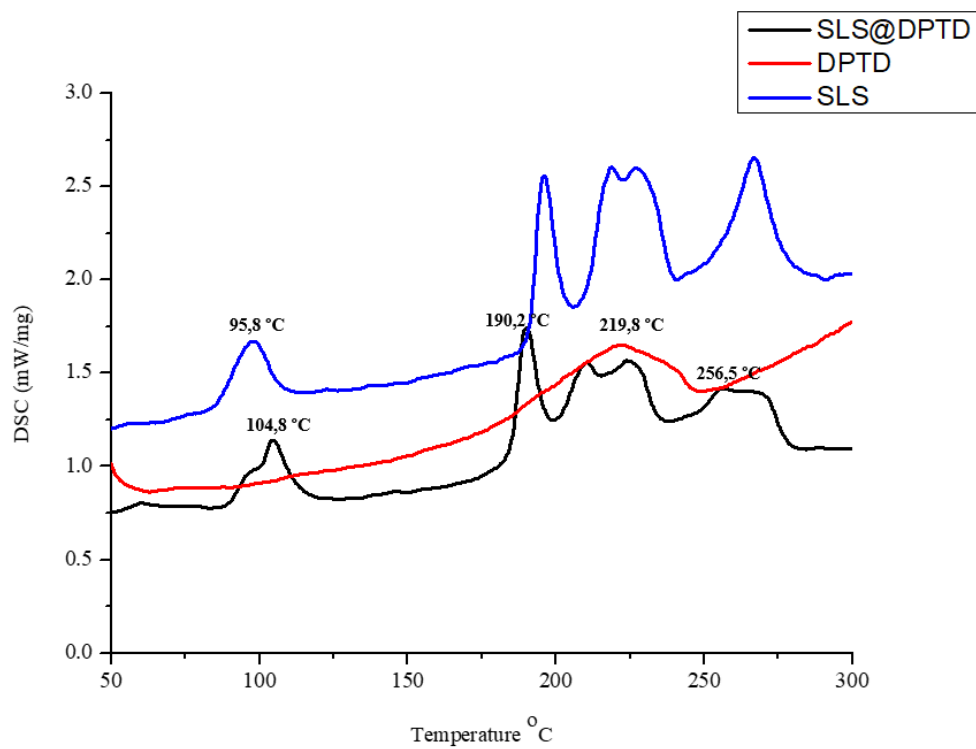
Όσον αφορά τα μικκύλια του DPTD, στο διάγραμμα DSC του SLS@DPTD παρατηρούνται τρεις φάσεις ενδόθερμης μετάβασης στους 104,8 °C, στους 190,2 °C και στους 256,5 °C. Η φάση ενδόθερμης μετάβασης του SLS στους 95,8 °C εμφανίζεται μετατοπισμένη στους 104,8 °C, αποδεικνύοντας τη δημιουργία ενός σύνθετου υλικού. Αντίστοιχα, η φάση του DPTD στους 219,8 °C παρουσιάζει σημαντική μετατόπιση στους 243,5 °C. Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι όλα τα μικκύλια που συντέθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι σύνθετα υλικά και όχι μείγματα.



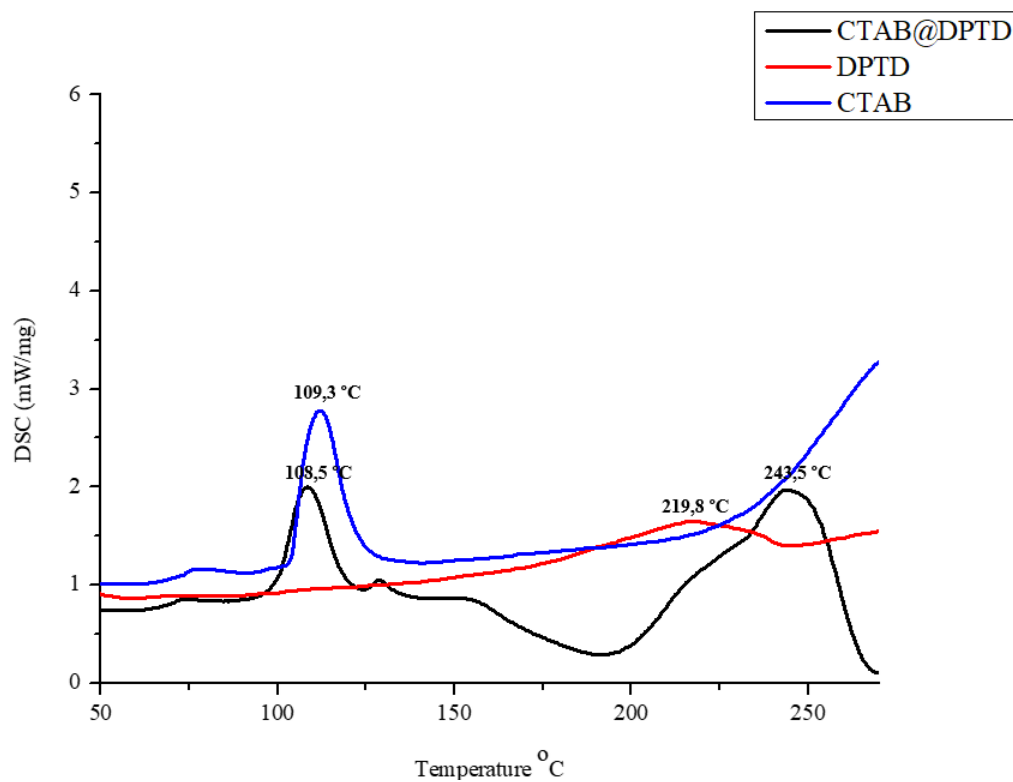
Εικόνα 47: Διάγραμμα διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC) του SLS@CIPTIN, του CIPTIN και του SLS



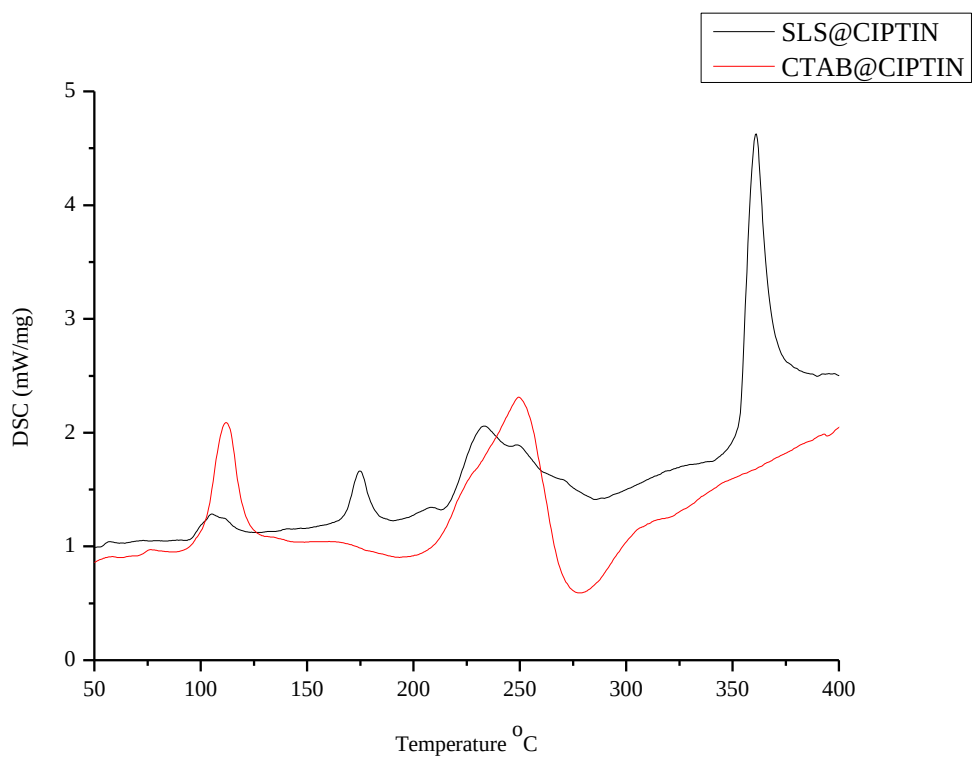
Εικόνα 48: Διάγραμμα διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC) του CTAB@CIPTIN, του CIPTIN και του CTAB



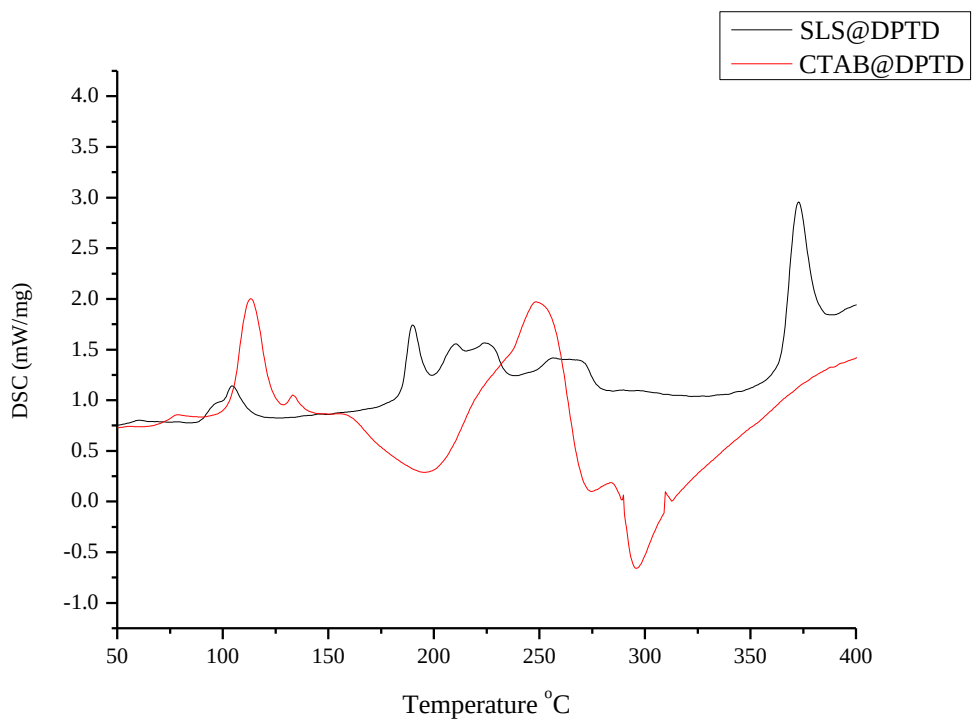
Εικόνα 49: Διάγραμμα διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC) του SLS@DPTD, του DPTD και του SLS



Εικόνα 50: Διάγραμμα διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC) του CTAB@DPTD, του DPTD και του CTAB



Εικόνα 51: Διάγραμμα διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC) του SLS@CIPTIN και του CTAB@CIPTIN



Εικόνα 52: Διάγραμμα διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC) του SLS@DPTD και του CTAB@DPTD

B) ΥΓΡΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

Α.2.7 Διαλυτότητα

Η διαλυτότητα των νέων ενώσεων ελέγχθηκε στους εξής διαλύτες: n-εξάνιο, τολουόλιο, διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2), χλωροφόρμιο (CHCl_3), ακετόνη, μεθανόλη (MeOH), ακετονιτρίλιο (MeCN), διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και H_2O .

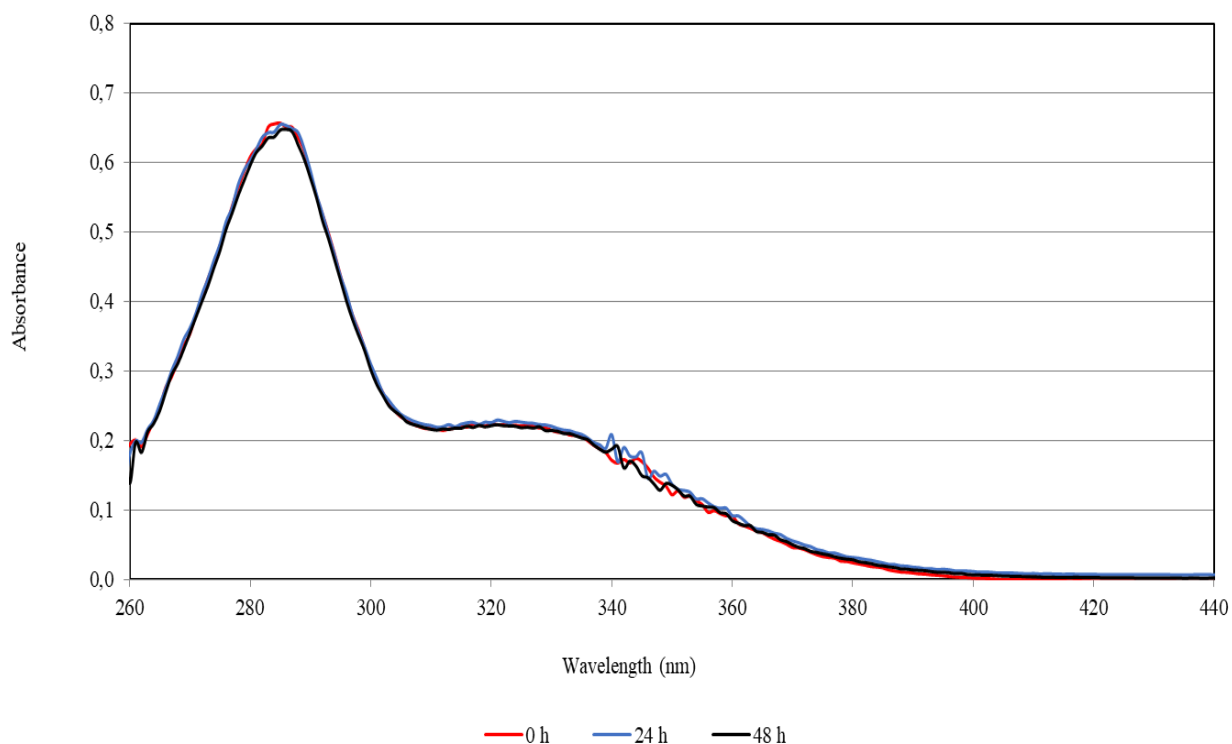
Το νέο μεταλλοφάρμακο CIPTIN είναι διαλυτό στους παρακάτω διαλύτες: MeOH , CH_2Cl_2 , DMSO και ακετόνη. Το μικκύλιο SLS@CIPTIN είναι πολύ διαλυτό στην ακετόνη, στη MeOH , στο DMSO και στο νερό και λιγότερο διαλυτό στο CHCl_3 και στο CH_2Cl_2 . Το CTAB@CIPTIN διαλύεται εύκολα σε MeOH , MeCN , DMSO και H_2O . Τα μικκύλια του DPTD με την επιφανειοδραστική ένωση SLS είναι διαλυτά στη MeOH , στο DMSO και στο H_2O . Τα μικκύλια CTAB@DPTD είναι διαλυτά στο CH_2Cl_2 , στο CHCl_3 , στη MeOH , στο DMSO και στο H_2O .

Α.2.8 Μελέτες σταθερότητας

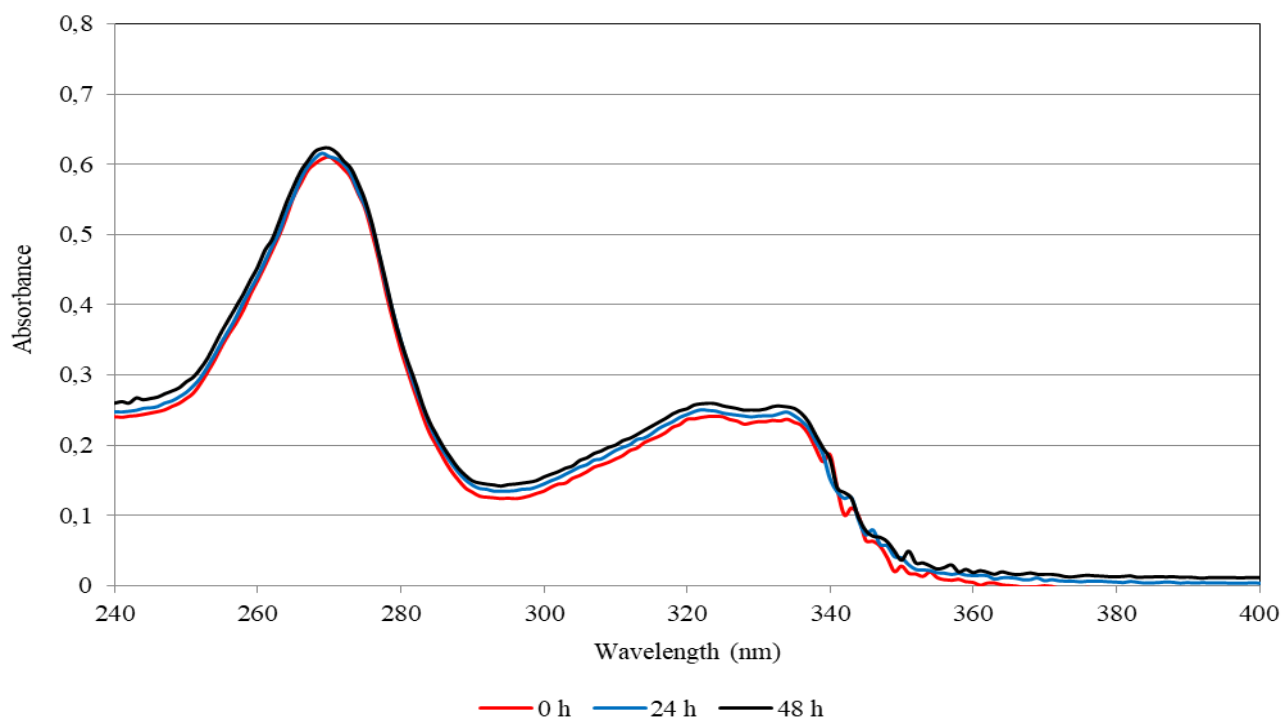
Οι μελέτες σταθερότητας πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι οι ενώσεις δεν διασπώνται σε επιμέρους μόρια. Η σταθερότητα του CIPTIN σε διάλυμα ελέγχθηκε με φασματοσκοπία UV σε διάλυμα DMSO και σε διάλυμα $\text{DMSO}/\text{ddH}_2\text{O}$ για 48 ώρες (**Εικόνα 53** και **54**). Επίσης, η σταθερότητα του CIPTIN μελετήθηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR για 96 ώρες (**Εικόνα 55**). Το χρονικό διάστημα αυτό επιλέχθηκε καθώς τα βιολογικά πειράματα απαιτούν 24 ή 48 ώρες επώασης με τις προς μελέτη ουσίες. Από τις μελέτες αποδεικνύεται ότι το CIPTIN παραμένει σταθερό σε διάλυμα, καθώς δεν παρατηρούνται αλλαγές μεταξύ των αρχικών φασμάτων UV-vis και ^1H NMR και των φασμάτων που λήφθηκαν μετά το πέρας των 48 ή των 96 ωρών, αντίστοιχα.

Η σταθερότητα των μικκυλίων σε διάλυμα ελέγχθηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR για 96 ώρες. Από τα φάσματα ^1H NMR αποδεικνύεται ότι τα μικκύλια SLS@CIPTIN (**Εικόνα 56**), CTAB@CIPTIN (**Εικόνα 57**), SLS@DPTD (**Εικόνα 58**) και CTAB@DPTD (**Εικόνα 59**) που

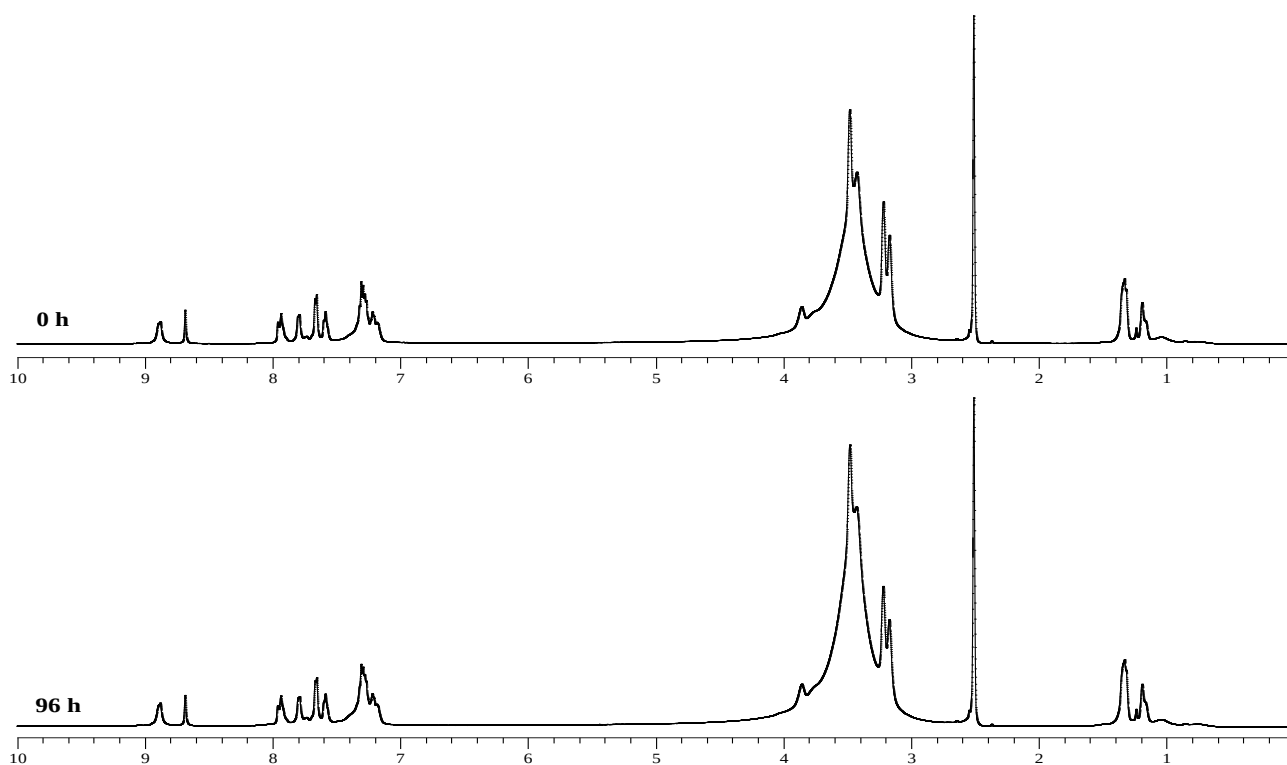
συντέθηκαν, παραμένουν σταθερά σε διάλυμα για τουλάχιστον 48 ώρες, δηλαδή για όλο το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την επώαση των ουσιών στα *in vitro* και *in vivo* βιολογικά πειράματα.



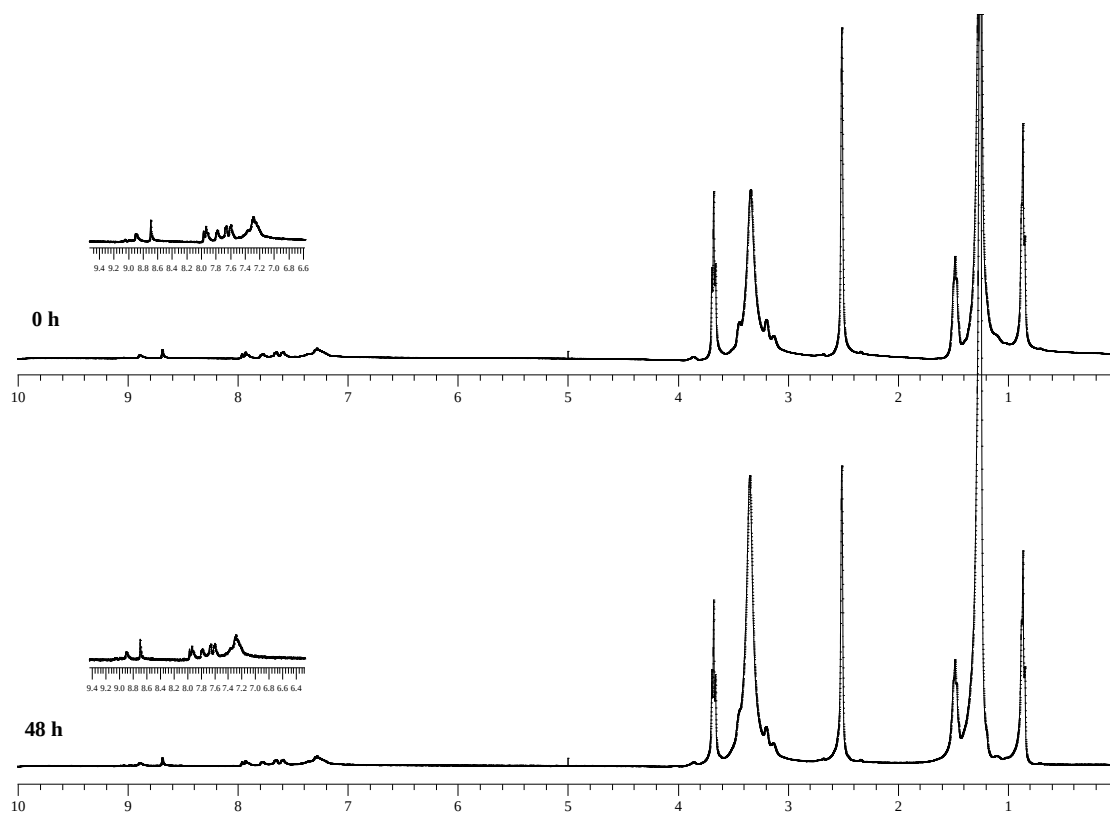
Εικόνα 53: Φάσμα UV-vis του CIPTIN σε DMSO (1.5×10^{-5} M) στις 0, 24 και 48 ώρες



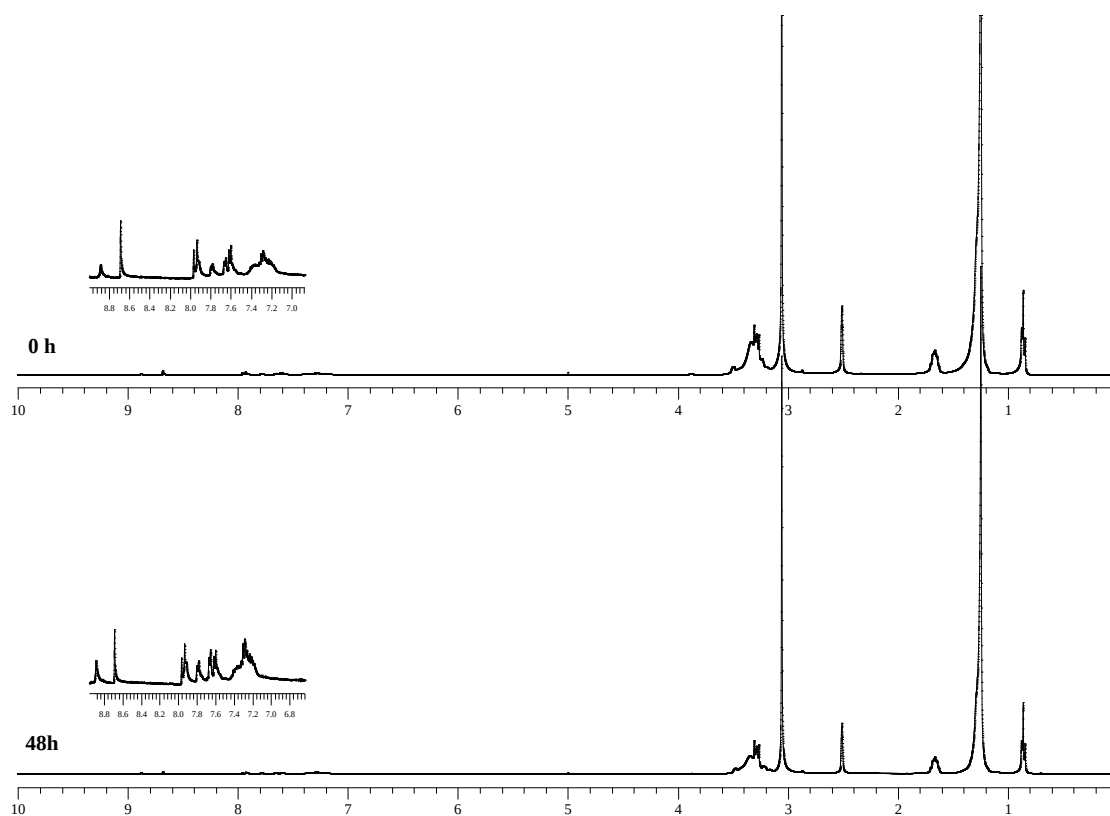
Εικόνα 54: Φάσμα UV-vis του CIPTIN σε DMSO/ddH₂O (1.5×10^{-5} M) στις 0, 24 και 48 ώρες



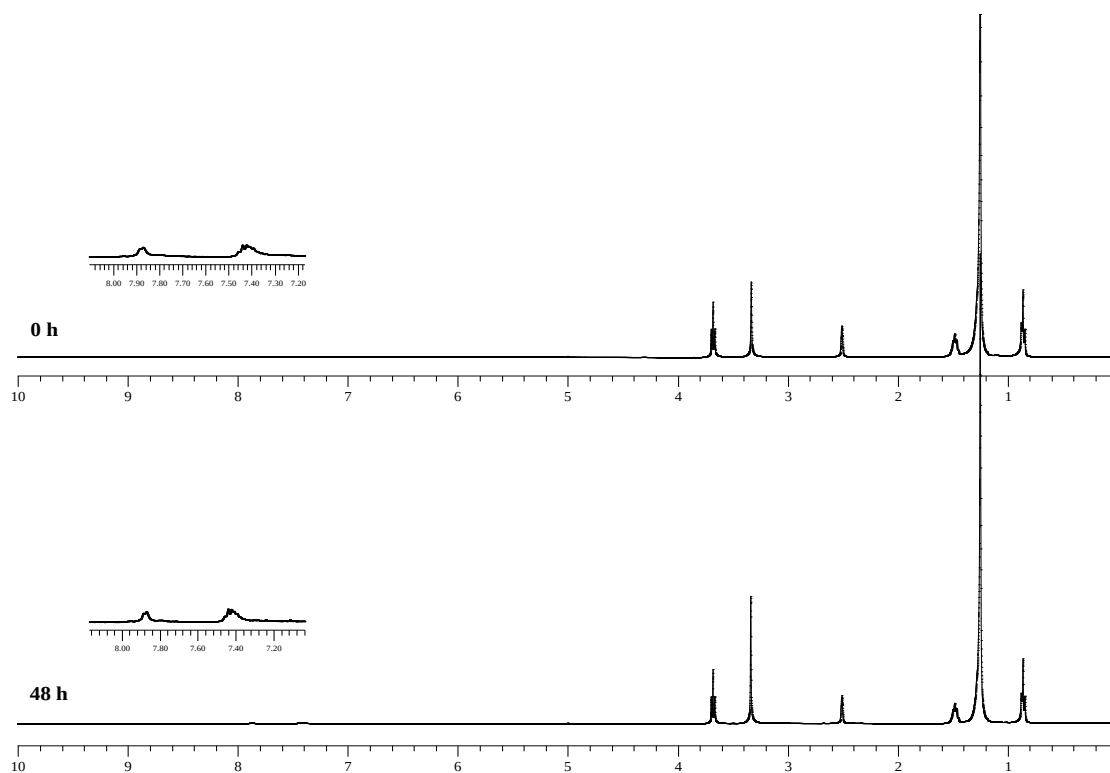
Εικόνα 55: Φάσμα ^1H -NMR του CIPTIN σε $\text{dmsO-}d_6$ στις 0 και στις 96 ώρες



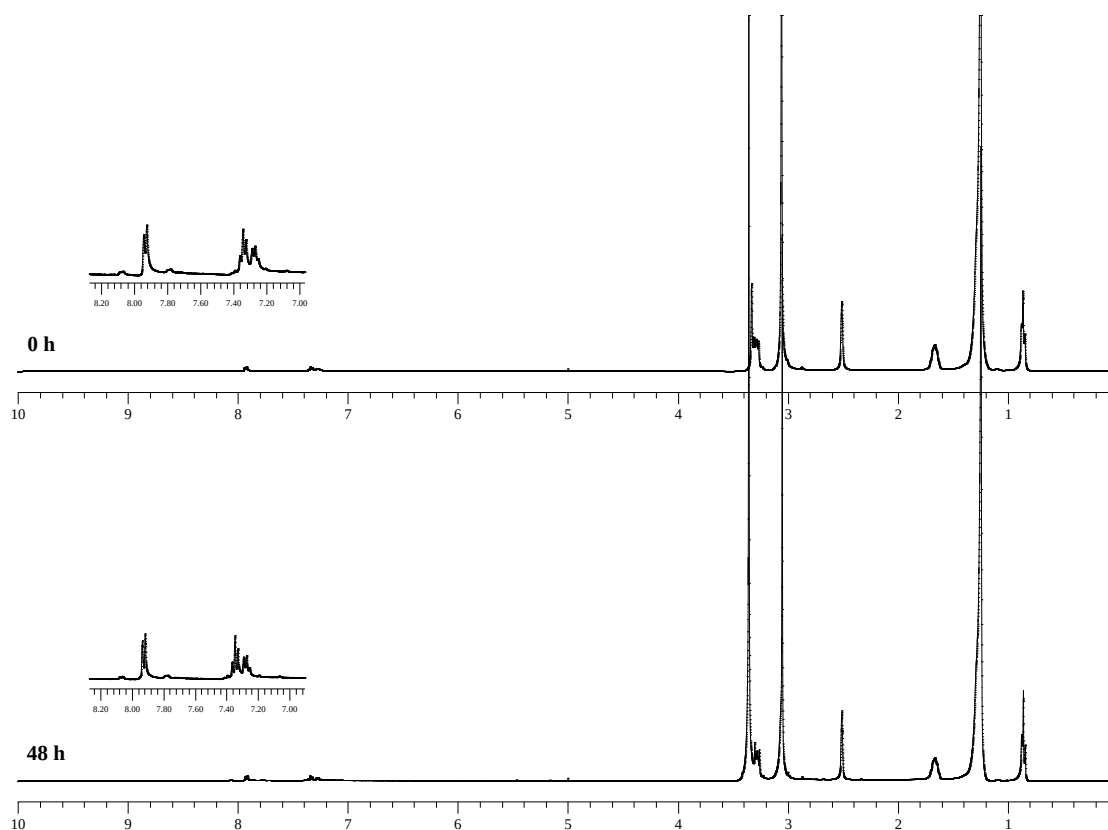
Εικόνα 56: Φάσμα ^1H -NMR του SLS@CIPTIN σε $\text{dmsO-}d_6$ στις 0 και στις 48 ώρες



Εικόνα 57: Φάσμα ^1H -NMR του CTAB@CIPTIN σε $\text{dmsO-}d_6$ στις 0 και στις 48 ώρες



Εικόνα 58: Φάσμα ^1H -NMR του SLS@DPTD σε $\text{dmsO-}d_6$ στις 0 και στις 48 ώρες

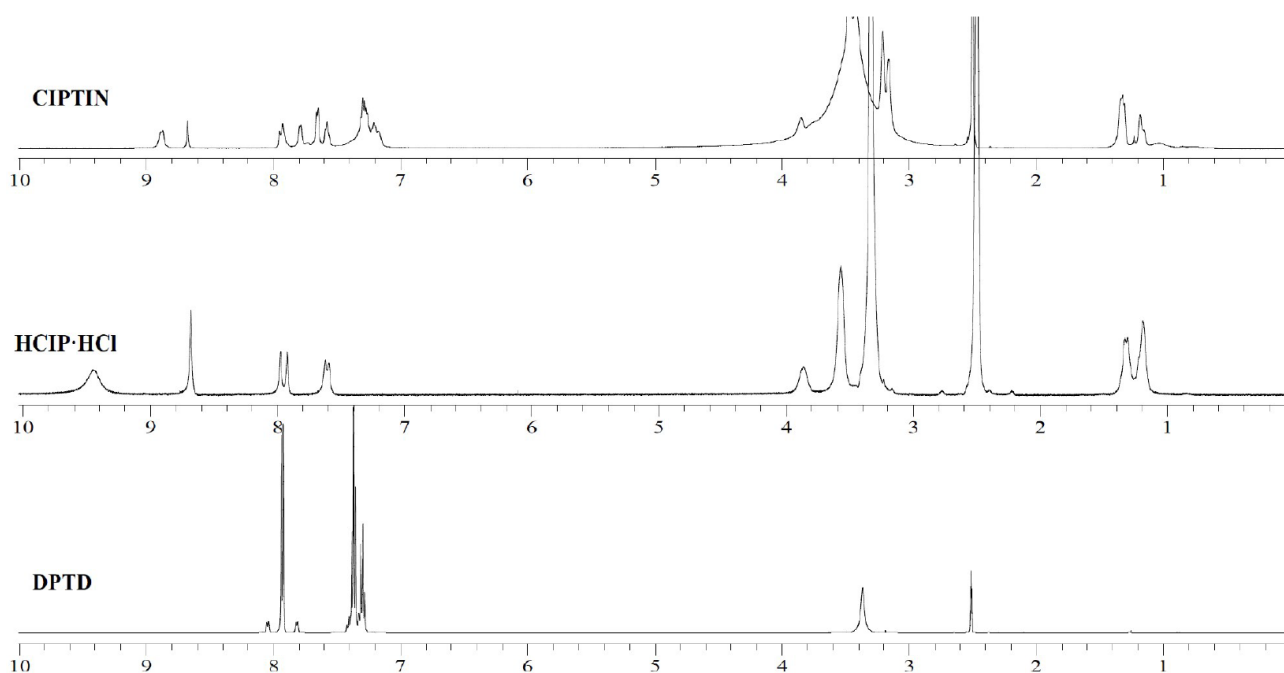


Εικόνα 59: Φάσμα ^1H -NMR του CTAB@DPTD σε $\text{dmsO-}d_6$ στις 0 και στις 48 ώρες

Δ.2.9 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance - NMR)

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (^1H -NMR) του μεταλλοφαρμάκου, των μικκυλίων και των ligands λήφθηκαν σε διαλύτη d_6 -DMSO. Το ευρύ σήμα συντονισμού στα 9,45 ppm στο φάσμα ^1H -NMR της HCIP·HCl οφείλεται στο πρωτόνιο του δακτυλίου πιπεραζίνης (**Εικόνα 60**). Το σήμα αυτό στο φάσμα του CIPTIN έχει μετατοπιστεί στα 8.87 ppm. Τα σήματα συντονισμού στα 8,68, 7,97–7,92, και 7,62–7,59 ppm στο φάσμα της HCIP·HCl οφείλονται στα πρωτόνια $\text{H}[^2\text{C}]$, $\text{H}[^5\text{C}]$ και $\text{H}[^8\text{C}]$, αντίστοιχα (**Σχήμα 1**). Αυτά τα σήματα συντονισμού εμφανίζονται στα 8,67, 7,95–7,92 και 7,79–7,81 ppm στο φάσμα του CIPTIN. Όσον αφορά τα σήματα συντονισμού των $\text{H}[^a\text{C}]$, $\text{H}[^b\text{C}]$ και $(-\text{CH}_2-)$ της κυκλοπρόπυλο ομάδας στο φάσμα της HCIP·HCl, εμφανίζονται στα 3,85, 3,47, και 1,33–1,19 ppm αντίστοιχα και δεν έχουν μετατοπιστεί στο φάσμα ^1H -NMR του CIPTIN.

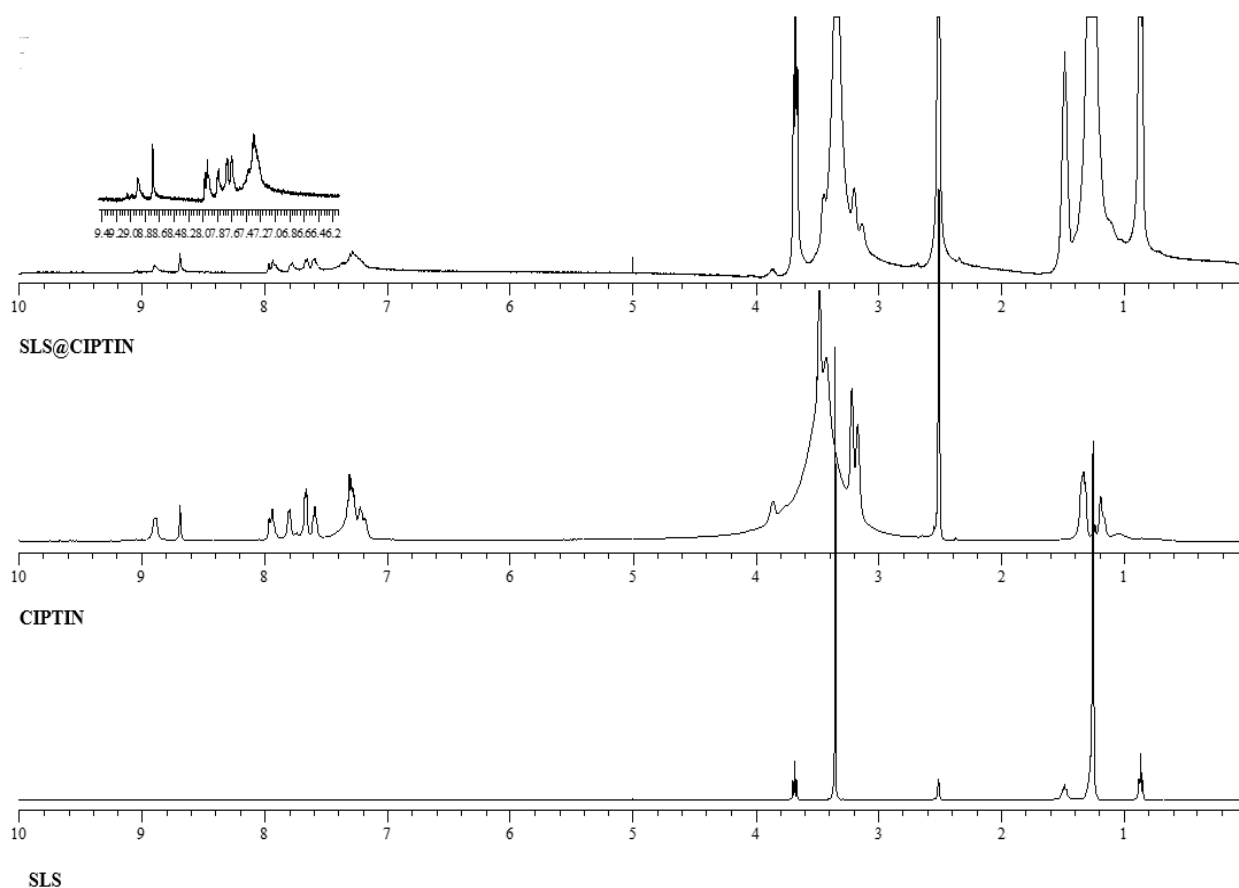
Τα σήματα συντονισμού του DPTD στα 8,05–7,80 και 7,42–7,28 ppm έχουν μετατοπιστεί στο φάσμα του CIPTIN στα 7,72–7,58 και 7,31–7,16 ppm, αντίστοιχα, γεγονός που υποδηλώνει την ένταξη του κασσιτερικού ατόμου στο αντιβιοτικό. Το σήμα συντονισμού στο φάσμα του CIPTIN, στα 3,16 ppm αποδίδεται στη MeOH, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης κατά την αντίδραση σύνθεσης.



Εικόνα 60: Φάσμα ^1H -NMR του CIPTIN, της HCIP·HCl και του DPTD σε DMSO- d_6

Στο φάσμα ^1H -NMR του SLS@CIPTIN μπορούν να εντοπιστούν τα σήματα συντονισμού του μεταλλοφαρμάκου CIPTIN ελαφρώς μετατοπισμένα. Πιο συγκεκριμένα, τα σήματα συντονισμού στα 8,87 (s, $\text{H}[\text{N}_{\text{piperazine ring}}]$), στα 8,67 (s, $\text{H}[^2\text{C}]$), στα 7,95–7,92 (d, $\text{H}[^5\text{C}]$), στα 7,79–7,81 (d, $\text{H}[^8\text{C}]$), στα 7,72–7,58 (m, Ph-), στα 7,31–7,16 (m, Ph-), στα 3,85 (s, $\text{H}[^a\text{C}]$), στα 3,47 (d, $\text{H}[^c\text{C}]$), στα 1,33 (m, cyclopropyl CH_2) και στα 1,19 (m, cyclopropyl CH_2) ppm, εμφανίζονται στο φάσμα του μικκυλίου στα 8,87 (s), στα 8,68 (s), στα 7,96–7,91 (d), στα 7,79–7,77 (d), στα 7,70–7,56 (m), στα 7,35–7,17 (m), στα 3,85 (s), στα 3,34 (d), στα 1,24 (m) και στα 1,08 (m) ppm, αντίστοιχα (**Εικόνα 61**).

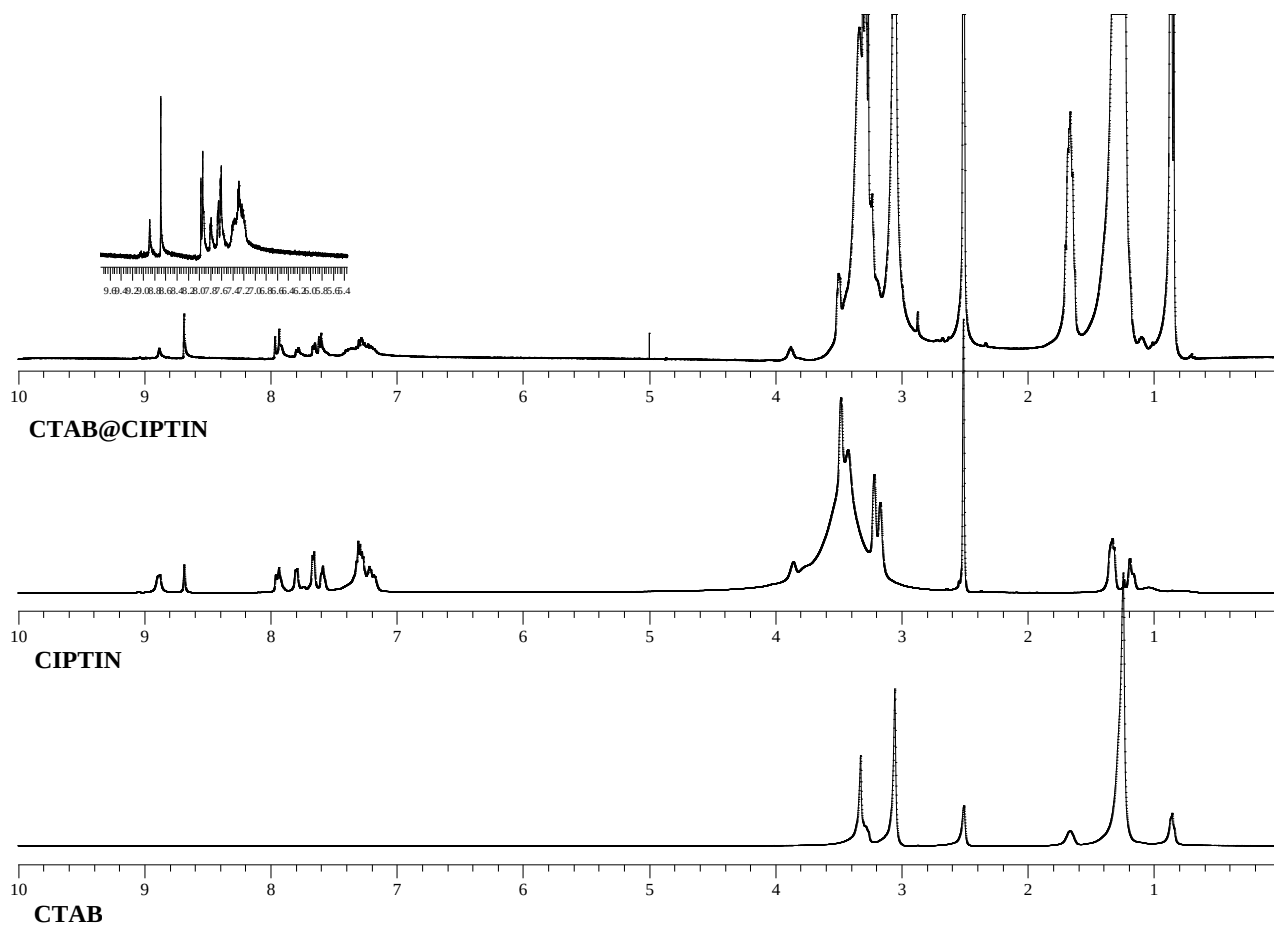
Η παρουσία των σημάτων συντονισμού του CIPTIN στο φάσμα ^1H -NMR του SLS@CIPTIN, επιβεβαιώνει την ενθυλάκωση του συμπλόκου μέσα στο μικκύλιο. Επιπλέον, στο φάσμα του μικκυλίου μπορούν να εντοπιστούν τα σήματα συντονισμού του SLS (3,69-3,66 (m), 3,40-3,33 (m), 1,50-1,47 (m) και 0,88-0,84 (m) ppm) στα 3,68-3,64 (m), 3,41-3,26 (m), 1,47 (s) και 0,86-0,84 ppm.



Εικόνα 61: Φάσμα ^1H -NMR του SLS@CIPTIN, του CIPTIN και του SLS σε DMSO- d_6

Το φάσμα ^1H -NMR του CTAB@CIPTIN παρουσιάζεται στην **Εικόνα 62**. Τα χαρακτηριστικά σήματα συντονισμού του CIPTIN στα 8,87 (s, $\text{H}[\text{N}_{\text{piperazine ring}}]$), 8,67 (s, $\text{H}[^2\text{C}]$), 7,95–7,92 (d, $\text{H}[^5\text{C}]$), 7,79–7,81 (d, $\text{H}[^8\text{C}]$), 7,72–7,58 (m, Ph-), 7,31–7,16 (m, Ph-) και 3,85 (s, $\text{H}[\text{aC}]$) ppm μπορούν να ανιχνευτούν στο φάσμα του μικκυλίου στα 8,92 (s), 8,72 (s), 8,00-7,94 (d), 7,84-7,80 (d), 7,70-7,61 (m), 7,37-7,22 (m), 3,91 (s) 3,37-3,26 (m), 3,08 (s), 1,69 (s), 1,27 (s), 0,90-0,87 (s) αντίστοιχα, γεγονός που επιβεβαιώνει τον εγκλεισμό του CIPTIN στα μικκύλια. Επιπλέον, στο

φάσμα ανιχνεύονται σήματα συντονισμού του CTAB (3,36-3,32 (m), 3,09 (s), 1,70 (s), 1,28 (s) και 0,90-0,87 (s) ppm) στα 3,37-3,26 (m), 3,08 (s), 1,69 (s), 1,27 (s) και 0,90-0,87 (s) ppm.

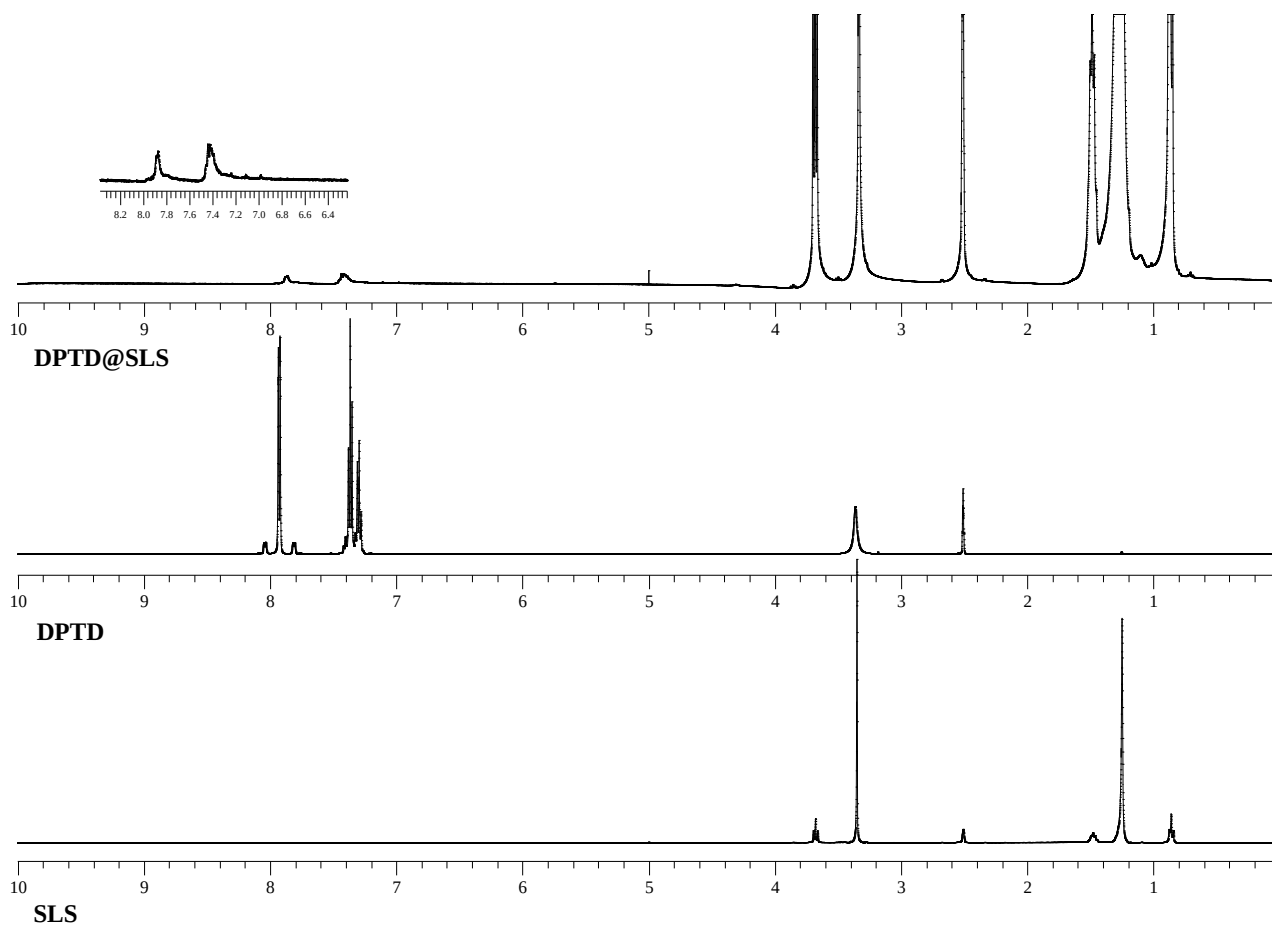


Εικόνα 62: Φάσμα ^1H -NMR του CTAB@CIPTIN, του CIPTIN και του CTAB σε DMSO-d_6

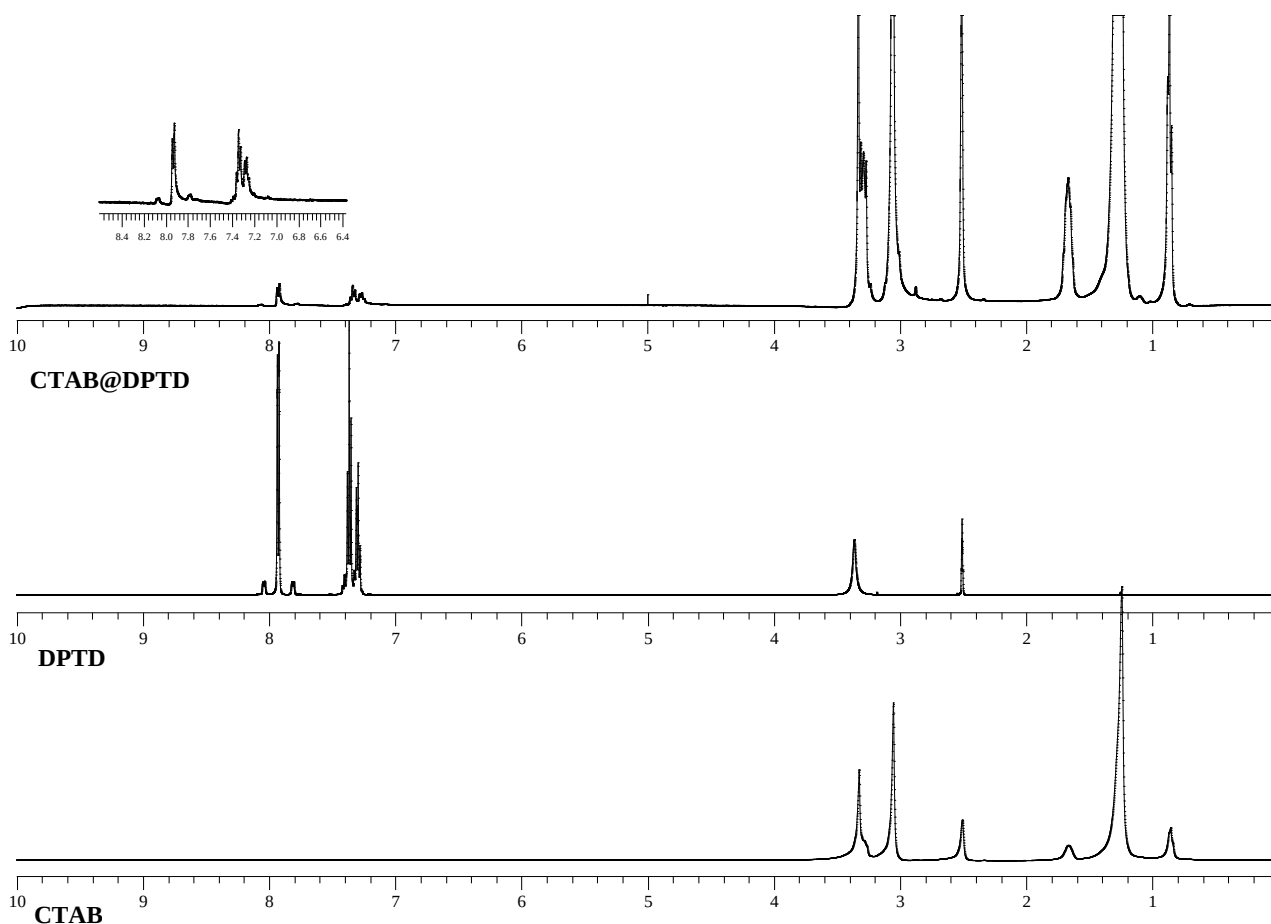
Στο φάσμα ^1H -NMR του μικκυλίου SLS@DPTD εμφανίζονται τα χαρακτηριστικά σήματα συντονισμού του DPTD (8,04-7,8 (m), 7,39-7,27 (m), 3,35 (s) ppm) στα 7,96-7,78 (m), 7,46-7,33 (m), 3,32 (s) ppm (**Εικόνα 63**). Επίσης, στο φάσμα εντοπίζονται τα σήματα συντονισμού στα 3,67-3,65 (m), 1,49-1,44 (m), 1,24 (s) και 0,87-0,83 (m) ppm του SLS (3,69-3,66 (m), 1,50-1,47 (m), 1,24 (s) και 0,87-0,83 (m) ppm). Ο εντοπισμός των παραπάνω σημάτων συντονισμού μπορεί να επιβεβαιώσει την εγκόλπωση του DPTD στα μικκύλια του επιφανειοδραστικού παράγοντα SLS.

Ομοίως στο φάσμα ^1H -NMR του μικκυλίου CTAB@DPTD εμφανίζονται τα χαρακτηριστικά σήματα συντονισμού του DPTD στα 8,11-7,82 (m), 7,40-7,27 (m), 3,36-3,30 (m) ppm, αλλά και του

επιφανειοδραστικού παράγοντα CTAB στα 3,09 (s), 1,69 (s), 1,28 (m) και 0,90-0,87 ppm, με μικρές μετατοπίσεις (**Εικόνα 64**). Ο εντοπισμός των σημάτων αυτών επιβεβαιώνει την εγκόλπωση του DPTD στα μικκύλια του επιφανειοδραστικού παράγοντα CTAB.



Εικόνα 63: Φάσμα ^1H -NMR του SLS@DPTD, του CIPTIN και του CTAB σε DMSO-d_6



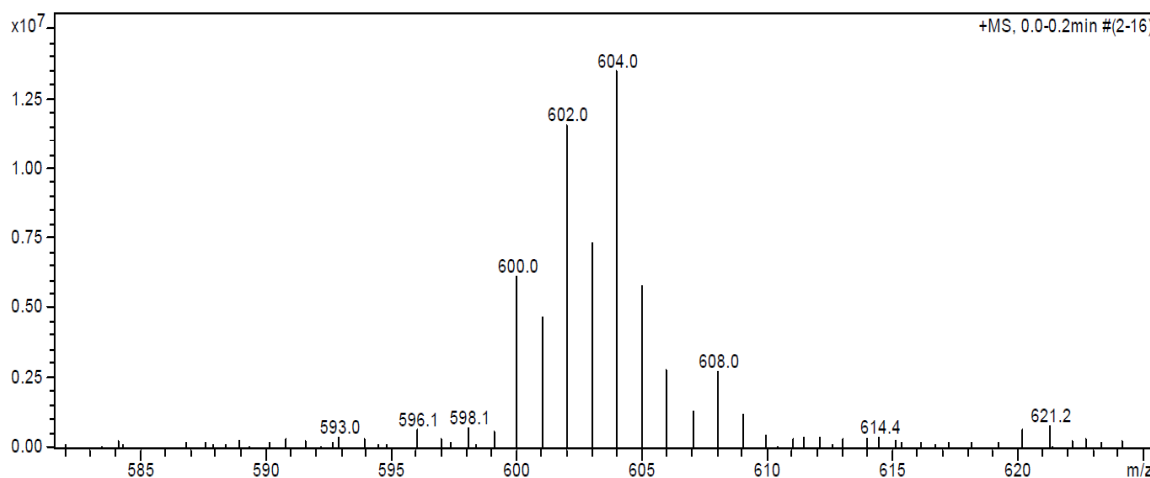
Εικόνα 64: Φάσμα ^1H -NMR του CTAB@DPTD, του DPTD και του CTAB σε DMSO-d_6

Δ.2.10 Φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization Mass Spectrometry - ESI-MS)

Η φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση μεταλλικών θραυσμάτων και βασίζεται στα ειδικά, για κάθε μέταλλο, μοτίβα των ισοτόπων του (Tsednee et al., 2016). Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η διατήρηση της δομής του CIPTIN σε διάλυμα MeOH , λήφθηκε το φάσμα του συμπλόκου με φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού με παγίδα ιόντων.

Στο φάσμα ESI-MS του CIPTIN φαίνεται ότι κυριαρχεί το μοριακό θραύσμα $[\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{CIP})]^+$ στα 600,0–609,0 m/z (**Εικόνα 65**). Το αντίστοιχο θεωρητικά υπολογισμένο μοριακό θραύσμα $[\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3\text{FSn-H}^+]$ βρίσκεται στα 599,1 – 609,1 m/z . Τα συγκεκριμένα μοριακά θραύσματα προέρχονται από τη διάσπαση του Sn-C (Ph) δεσμού του CIPTIN, αποτελούν ένδειξη του μοτίβου

αποδόμησης του $[\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{CIP})_2\text{-H}^+]$ και της αρχικής παρουσίας του CIPTIN στο διάλυμα πριν την αποδόμηση του.



Εικόνα 65: Φάσμα ESI-MS του CIPTIN σε διάλυμα MeOH

Δ.3 Κυτταρικές μελέτες

Δ.3.1 Μελέτη αντιπολλαπλασιαστικής δράσης (SRB assay)

Η αντιπολλαπλασιαστική δράση του νέου μεταλλοαντιβιοτικού και των μικκυλίων ελέγχθηκε έναντι των δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενων καρκινικών κυτταρικών σειρών του μαστού. Τα κύτταρα MCF-7 εκφράζουν υποδοχείς ορμονών (ERs +), ενώ τα κύτταρα MDA-MB-231 δεν φέρουν υποδοχείς ορμονών (ERs -). Η εύρεση των τιμών IC_{50} (συγκέντρωση που μειώνει την ανάπτυξη των κυττάρων στο 50%) πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Sulforodamine B (SRB) assay, μετά από επώαση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των υπό μελέτη ουσιών για 48 ώρες.

Οι τιμές IC_{50} του μεταλλοφαρμάκου, των μικκυλίων, των ligands HCIP·HCl, HCIP, DPTD και των επιφανειοδραστικών ουσιών, που υπολογίστηκαν έναντι των δύο καρκινικών σειρών, συγκεντρώνονται στον **Πίνακα 10**. Από τα αποτελέσματα, αποδεικνύεται ότι το νέο μεταλλοφάρμακο παρουσιάζει ισχυρή αντικαρκινική δράση έναντι και των δύο καρκινικών σειρών του μαστού που μελετήθηκαν με τιμές IC_{50} $1,47 \pm 0,24 \mu\text{M}$ έναντι των MCF-7 και $0,85 \pm 0,09 \mu\text{M}$

έναντι των MDA-MB-231 κυττάρων. Το αντιβιοτικό HCIP·HCl, αλλά και η εξουδετερωμένη μορφή του δεν εμφανίζουν αντικαρκινική δράση στις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν ($IC_{50} > 30,0 \mu M$). Επίσης, παρατηρείται ότι το CIPTIN είναι πιο δραστικό έναντι των καρκινικών κυττάρων του μαστού που δεν εκφράζουν υποδοχείς ορμονών.

Το μικκύλιο SLS@CIPTIN ($1,33 \pm 0,27 \mu M$) εμφανίζει βελτιωμένη αντικαρκινική δράση σε σχέση με το CIPTIN ($1,47 \pm 0,24 \mu M$) έναντι μόνο των καρκινικών κυττάρων MCF-7 και παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς τα κύτταρα MDA-MB-231. Η εγκόλπωση του CIPTIN σε μόρια του επιφανειοδραστικού παράγοντα CTAB και η επακόλουθη δημιουργία μικκυλίων, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της αντικαρκινικής δράσης του CIPTIN κατά 5,4 φορές έναντι των κυττάρων MCF-7 ($0,27 \mu M$) και κατά 2,7 φορές έναντι των κυττάρων MDA-MB-231 ($0,31 \mu M$).

Μεταξύ των μικκυλίων που συντέθηκαν, το CTAB@DPTD παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση έναντι των δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν με τιμές IC_{50} $0,25 \pm 0,06 \mu M$ και $0,22 \pm 0,02 \mu M$, έναντι των MCF-7 και MDA-MB-231, αντίστοιχα. Το μικκύλιο SLS@DPTD εμφανίζει επίσης ισχυρή αντικαρκινική δράση έναντι των δυο κυτταρικών ουσιών παρουσιάζοντας εκλεκτικότητα ως προς τα κύτταρα που δεν εκφράζουν υποδοχείς ορμονών, όπως και το άλας του διφαινυλοδιχλωροκασσιτέρου. Από τα αποτελέσματα αποδεικνύεται ότι τα μικκύλια στα οποία ενθυλακώθηκε ο DPTD, εμφανίζουν ισχυρότερη αντικαρκινική δράση σε σχέση με τον DPTD. Η δράση του DPTD αυξήθηκε έως και 3,5 φορές έναντι των κυττάρων MCF-7 και έως 2,3 φορές έναντι των κυττάρων MDA-MB-231, με το σχηματισμό του μικκυλίου CTAB@DPTD. Συμπερασματικά, η ενθυλάκωση των βιοδραστικών ουσιών σε μικκυλιακές δομές, αποδεικνύεται ότι ενίσχυσε την αντικαρκινική δράση τους, καθώς η ενθυλάκωση φαρμάκων σε μικκύλια επιφανειοδραστικών παραγόντων αυξάνει την υδατοδιαλυτότητα των φαρμάκων και βελτιώνει τη βιοδιαθεσιμότητα αφού οι τασιενεργές ουσίες μπορούν να αλληλεπιδρούν με τις βιολογικές μεμβράνες, χάρη στην αμφίφιλη δομή τους.

Το νέο μεταλλοφάρμακο CIPTIN και τα μικκύλια που συντέθηκαν παρουσιάζουν ισχυρότερη αντικαρκινική δράση σε σύγκριση με το cisplatin έναντι και των δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών

που μελετήθηκαν (**Πίνακας 10**). Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά το CIPTIN εμφανίζει 3,7 και 31,2 φορές ισχυρότερη αντικαρκινική δράση από το cisplatin έναντι των MCF-7 και MDA-MB-231 κυττάρων, αντίστοιχα. Το μικκύλιο του CIPTIN SLS@CIPTIN εμφανίζει 4,2 (MCF-7) και 22,6 φορές (MDA-MB-231) ισχυρότερη αντικαρκινική δράση από το cisplatin, ενώ το μικκύλιο CTAB@CIPTIN εμφανίζει 20,4 (MCF-7) και 86,1 φορές (MDA-MB-231).

Πίνακας 10: Τιμές IC₅₀ έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών του μαστού (MCF-7 και MDA-MB-231), των νέων ενώσεων, των ligands και των επιφανειοδραστικών ενώσεων.

IC ₅₀ (μM)			
Ένωση	MCF-7	MDA-MB-231	Βιβλιογραφία
CIPTIN	1,47 ± 0,24	0,85 ± 0,09	
SLS@CIPTIN	1,33 ± 0,27	1,18 ± 0,19	
CTAB@CIPTIN	0,27 ± 0,08	0,31 ± 0,07	
SLS@DPTD	0,26 ± 0,06	0,35 ± 0,07	
CTAB@DPTD	0,25 ± 0,06	0,22 ± 0,02	
HCIP·HCl	> 30,0	> 30,0	
HCIP	> 30,0	> 30,0	
DPTD	0,88 ± 0,22 (0,81±0.03)	0,51 ± 0,03 (0.42±0.01)	(Stathopoulou et al., 2021)
SLS	> 30,0	> 30,0	
CTAB	3,47 ± 0,79	3,85 ± 0,47	
cisplatin	5,5 ± 0,40	26,7 ± 1,1	(Banti et al., 2016)

Τα μικκύλια του DPTD εμφανίζουν επίσης πολύ ισχυρότερη δράση από το ευρέως χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό φάρμακο cisplatin. Για το μικκύλιο SLS@DPTD υπολογίστηκε ότι εμφανίζει 21,2 φορές μεγαλύτερη αντικαρκινική δράση από το cisplatin έναντι των κυττάρων MCF-

7 και 76,3 φορές ισχυρότερη αντικαρκινική δράση έναντι των κυττάρων MDA-MB-231. Αντίστοιχα, υπολογίστηκε ότι το μικκύλιο CTAB@DPTD έχει 22 και 121,4 φορές ισχυρότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών MCF-7 και MDA-MB-231, αντίστοιχα.

Δ.3.2 *In vitro* μελέτη κυτταροτοξικότητας

Η τοξικότητα των νέων ενώσεων και των ligands μελετήθηκε *in vitro* σε φυσιολογικούς ανθρώπινους εμβρυϊκούς ινοβλάστες πνευμόνων (MRC-5), με τη μέθοδο της χρωστικής sulforodamine B (sulforodamine B assay - SRB). Οι τιμές IC_{50} των νέων ενώσεων που υπολογίστηκαν μετά από επώαση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των ενώσεων για 48 ώρες έναντι της κυτταρικής σειράς MRC-5 είναι $1,62 \pm 0,17 \mu M$, $1,59 \pm 0,18 \mu M$, $0,80 \pm 0,100 \mu M$ και $0,22 \pm 0,03 \mu M$ για τις ενώσεις CIPTIN, SLS@CIPTIN, CTAB@CIPTIN, SLS@DPTD και CTAB@DPTD, αντίστοιχα (Πίνακας 11). Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, την ισχυρότερη *in vitro* τοξικότητα παρουσιάζει το μικκύλιο SLS@DPTD, ενώ το μεταλλοφάρμακο CIPTIN εμφανίζει τη χαμηλότερη.

Ο θεραπευτικός δείκτης (therapeutic potency index - TPI) προσδιορίστηκε προκειμένου να μελετηθεί εάν οι βιοδραστικοί παράγοντες έχουν εκλεκτικότητα ως προς τα καρκινικά κύτταρα. Το TPI ορίζεται ως η τιμή IC_{50} έναντι των φυσιολογικών κυττάρων ως προς την αντίστοιχη τιμή IC_{50} έναντι καρκινικών κυττάρων παρόμοιου ιστού (Banti et al., 2016). Όταν οι τιμές TPI ενός βιοδραστικού παράγοντα είναι μεγαλύτερες από 1 υποδεικνύουν την εκλεκτικότητα του ως προς τα καρκινικά κύτταρα έναντι των φυσιολογικών και συνεπώς όσο υψηλότερη είναι η τιμή TPI τόσο καλύτερη και πιο στοχευμένη είναι η μεταλλοθεραπευτική ουσία.

Παρατηρούμε ότι ο θεραπευτικός δείκτης των μικκυλίων που εγκολλώνουν CIPTIN είναι εμφανώς βελτιωμένος και για τις δύο κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, ο θεραπευτικός δείκτης του CIPTIN υπολογίστηκε 1,10 έναντι των κυττάρων MCF-7 και 1,90 έναντι των κυττάρων MDA-MB-231. Το μικκύλιο SLS@CIPTIN έχει θεραπευτικό δείκτη 1,20 και 1,34,

ενώ το CTAB@CIPTIN έχει θεραπευτικό δείκτη 2,96 και 2,58 έναντι των κυττάρων MCF-7 και MDA-MB-231, αντίστοιχα. Συνεπώς, η δημιουργία μικκυλιακών δομών που εμπεριέχουν το νέο μεταλλοφάρμακο CIPTIN, βελτιώνουν την τοξικότητα του μεταλλοθεραπευτικού έναντι των υγιών κυττάρων και ενισχύουν την αντικαρκινική του δράση.

Πίνακας 11: Τιμές IC₅₀ των νέων ενώσεων, των ligands και των επιφανειοδραστικών ενώσεων έναντι της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς MRC-5 και τιμές του θεραπευτικού δείκτη (TPI)

Ένωση	IC ₅₀ (μM)	Θεραπευτικός δείκτης (TPI)	
	MRC-5	MCF-7	MDA-MB-231
CIPTIN	1,62 ± 0,17	1,10	1,90
SLS@CIPTIN	1,59 ± 0,18	1,20	1,34
CTAB@CIPTIN	0,80 ± 0,10	2,96	2,58
SLS@DPTD	0,22 ± 0,03	0,85	0,63
CTAB@DPTD	0,63 ± 0,09	2,86	2,86
HCIP·HCl	> 30		
HCIP	> 30		
DPTD	0,62± 0,10 (0,58 ± 0,02 Stathopoulou et al., 2021)	0,70	1,22
SLS	> 30		
CTAB	5,07 ± 0,50	1,46	1,32
cisplatin	1,1 ± 0,20 (Banti et al., 2016)	0,20	0,04

Για τα μικκύλια που εμπεριέχουν DPTD, οι θεραπευτικοί δείκτες του SLS@DPTD υπολογίστηκαν 0,85 (MCF-7) και 0,63 (MDA-MB-231), ενώ του CTAB@DPTD 2,86 έναντι και των δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών. Συνεπώς, παρατηρούμε ότι στην περίπτωση του μικκυλίου SLS@DPTD, ο θεραπευτικός δείκτης του DPTD αυξήθηκε ελαφρώς (0,85 από 0,70) έναντι των

κυττάρων MCF-7, ενώ μειώθηκε (0,63 από 1,22) έναντι των κυττάρων MDA-MB-231. Από την άλλη στην περίπτωση του CTAB@DPTD ο θεραπευτικός δείκτης αυξήθηκε 4,1 φορές έναντι των κυττάρων MCF-7 και κατά 2,4 φορές έναντι των κυττάρων MDA-MB-231, αποδεικνύοντας ότι η ενθυλάκωση του DPTD στον επιφανειοδραστικό παράγοντα CTAB προσδίδει εκλεκτικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων.

Ο θεραπευτικός δείκτης του cisplatin, που αποτελεί ένα πολύ επιτυχημένο χημειοθεραπευτικό για τον καρκίνο των ωοθηκών και των όρχεων είναι 0,20 για τα κύτταρα MCF-7 και 0,04 για τα κύτταρα MDA-MB-231. Οι τιμές TPI των ουσιών που συντέθηκαν είναι πολύ μεγαλύτερες από τις τιμές του cisplatin έως και 14,8 φορές (CTAB@CIPTIN) έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς MCF-7 και έως 71,5 φορές (CTAB@DPTD) έναντι των καρκινικών κυττάρων MDA-MB-231. Επομένως, οι ενώσεις που συντέθηκαν μπορούν να θεωρηθούν πιο εκλεκτικοί παράγοντες από το cisplatin έναντι των καρκινικών κυττάρων του μαστού, ανεξάρτητα από το αν τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν ή όχι οιστρογονικούς υποδοχείς.

Δ.3.3 *In vivo* μελέτη τοξικότητας (Μοντέλο *Artemia Salina*)

Η *in vivo* μελέτη της τοξικότητας του CIPTIN και των μικκυλίων που συντέθηκαν, πραγματοποιήθηκε με το ζωντανό ζωικό μοντέλο *Artemia Salina* (γαρίδα άλμης) (**Εικόνα 66**). Το *A. salina* είναι ένας δημοφιλές μοντέλο οργανισμού για τοξικολογικές δοκιμές, λόγω του μικρού κύκλου ζωής του, της ευκολίας στην ανάπτυξή του, της υψηλής παραγωγής απογόνων, της εύκολης εμπορικής διαθεσιμότητας των αυγών του, της διαθεσιμότητας του όλο το χρόνο, του χαμηλού κόστους και της ασφάλειας και ταυτόχρονα οι δοκιμές απαιτούν μικρές ποσότητες των υπο μελέτη παραγόντων. Ταυτόχρονα, το μοντέλο αυτό έχει αποδειχθεί ότι δείχνει μια καλή συσχέτιση με τα δεδομένα τοξικότητας στα τρωκτικά και στους ανθρώπους (Banti and Hadjidakou, 2021).

Η επιβίωση (%) των προνυμφών *A. salina* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις διαλυμάτων με ή χωρίς τις υπό μελέτη ουσίες μετά από 24 ώρες συνοψίζονται στον **Πίνακα 12**. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Η πιθανή τοξική δράση των νέων ενώσεων ελέγχθηκε σε συγκεντρώσεις οι οποίες ήταν ίδιες με αυτές που ελέγχθηκαν και στον ζωντανό οργανισμό *Allium cepa* (3, 30, και 300 μM). Από τα αποτελέσματα αποδεικνύεται ότι το CIPTIN εμφανίζει τη μικρότερη *in vivo* τοξικότητα σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, ενώ ακολουθούν τα μικκύλια SLS@CIPTIN και CTAB@CIPTIN, τα οποία εμφανίζουν πολύ υψηλή βιωσιμότητα μέχρι και τη συγκέντρωση των 3 μM ($88,6 \pm 3,6 \%$ και $88,0 \pm 6,4 \%$, αντίστοιχα).



(A)



(B)

Εικόνα 66: Φωτογραφίες (A) ζωντανής και (B) νεκρής προνύμφης *Artemia Salina* (γαρίδα άλμης) από οπτικό μικροσκόπιο

Για τα μικκύλια του DPTD τα αποτελέσματα δείχνουν ότι εμφανίζουν υψηλότερη *in vivo* τοξικότητα από το νέο μεταλλοφάρμακο του CIPTIN και τα μικκύλια που το εγκολπώνουν. Πιο συγκεκριμένα, το μικκύλιο SLS@DPTD εμφανίζει υψηλή τοξικότητα έναντι των προνυμφών *A. salina* στη συγκέντρωση των 3 μM , αφού η βιωσιμότητα είναι $11,4 \pm 4,5 \%$. Σε συγκεντρώσεις του SLS@DPTD ίσες ή μεγαλύτερες από τα 30 μM , δεν επιβιώνει καμία προνύμφη *A. salina*. Το μικκύλιο CTAB@DPTD είναι λιγότερο τοξικό από το SLS@DPTD, αφού σε συγκέντρωση ίση με 3 μM επιζούν περίπου οι μισές προνύμφες ($55,6 \pm 7,5 \%$), ενώ σε συγκεντρώσεις ίσες ή μεγαλύτερες από τα 30 μM , η τοξικότητα του μικκυλίου είναι πολύ υψηλή.

Πίνακας 12: Ποσοστό (%) επιβίωσης του ζωντανού οργανισμού *Artemia salina* μετά από επώαση με τις νέες ενώσεις σε συγκεντρώσεις 3 μM , 30 μM και 300 μM

Ποσοστό βιωσιμότητας (%)				
Ένωση	Control	3 μM	30 μM	300 μM
CIPTIN	$98,3 \pm 2,9$	$90,2 \pm 4,8$	$74,0 \pm 4,9$	$23,7 \pm 5,7$
SLS@CIPTIN	$98,3 \pm 2,9$	$88,6 \pm 3,6$	$11,4 \pm 3,0$	$3,0 \pm 0,19$
CTAB@CIPTIN	100	$88,0 \pm 6,4$	$14,1 \pm 1,2$	0
SLS@DPTD	100	$11,4 \pm 4,5$	0	0
CTAB@DPTD	100	$55,6 \pm 7,5$	$6,2 \pm 2,9$	0

Δ.3.4 *In vitro* μελέτη γονοτοξικότητας (Micronucleus assay)

Η γονοτοξικότητα των νέων ενώσεων μελετήθηκε με τη μέθοδο των μικροπυρηνίσκων σε φυσιολογικούς εμβρυικούς ινοβλάστες (MRC-5) προκειμένου να μελετηθεί η γονοτοξικότητά τους σε υγιή κύτταρα. Η παρουσία μικροπυρηνίσκων είναι ένας σημαντικός βιοδείκτης για τις μεταλλαξιογόνες ή γονοτοξικές επιδράσεις ενός παράγοντα (Torres-Bugarín et al., 2014). Έχει βρεθεί ότι παρουσία εξωγενών παραγόντων, όπως για παράδειγμα χημικών παραγόντων, οι μικροπυρηνίσκοι σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της μετάβασης από τη μετάφαση στην ανάφαση

της μίτωσης. Οι μικροπυρηνίσκοι εμφανίζονται σαν μικρά μεμβρανικά θραύσματα του DNA στο κυτταρόπλασμα των μεσοφασικών κυττάρων (Banti and Hadjikakou, 2019).

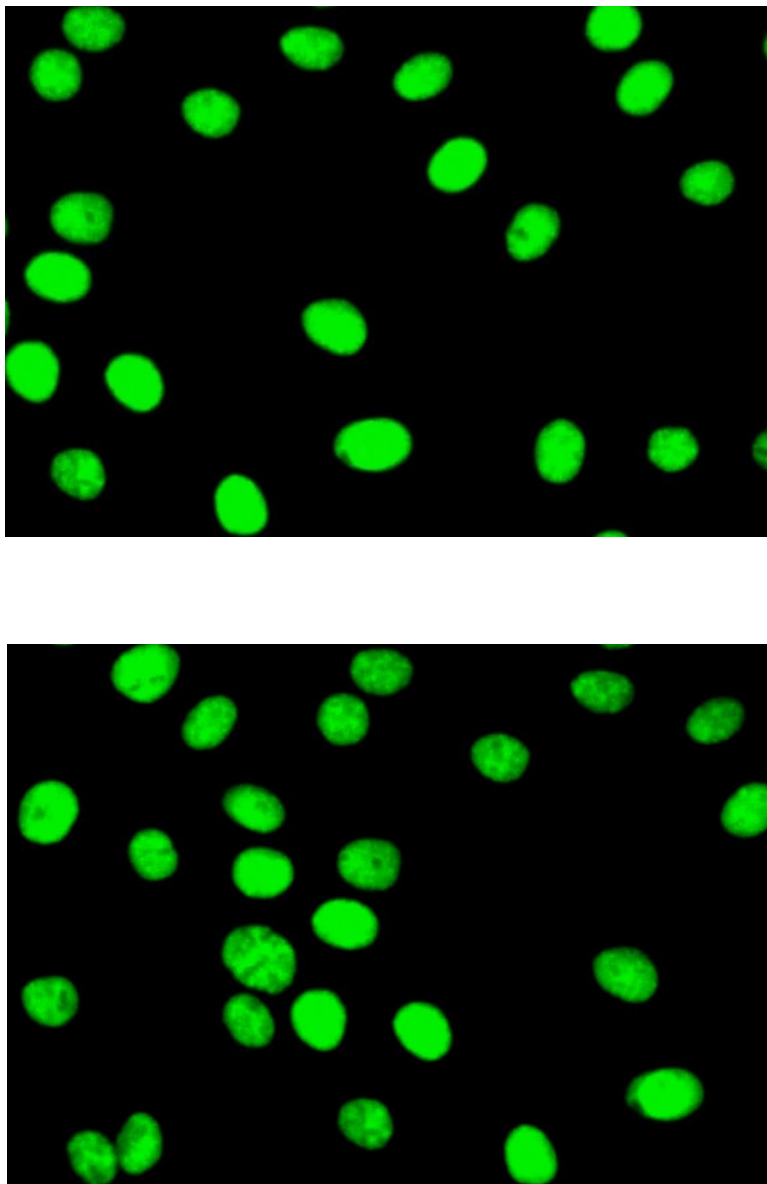
Προκειμένου να διερευνηθεί η γονοτοξικότητα και η πιθανή δημιουργία μικροπυρηνίσκων η οποία προκαλείται σε φυσιολογικά κύτταρα από τις νέες ενώσεις, κύτταρα MRC-5 επώαστηκαν με συγκεντρώσεις των ουσιών ίσες με το IC₅₀. Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν οι συχνότητες εμφάνισης μικροπυρηνίσκων για κάθε ουσία (**Πίνακας 13**), ενώ υπολογίστηκε ότι στα κύτταρα που δεν επώαστηκαν με κάποια ουσία η συχνότητα των μικροπυρηνίσκων είναι 0,78 % (**Εικόνα 67**). Από τα αποτελέσματα αποδεικνύεται ότι το νέο μεταλλοθεραπευτικό CIPTIN (**Εικόνα 68**) καθώς και τα μικκύλια που το εγκολώνουν (**Εικόνα 69 - 70**) δεν εμφανίζουν *in vitro* γονοτοξικότητα, αφού δεν αυξήθηκε η συχνότητα των μικροπυρηνίσκων μετά την επώαση των κυττάρων (**Πίνακας 13**).

Πίνακας 13: Ποσοστό (%) εμφάνισης μικροπυρηνίσκων στα κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση τους με τις νέες ενώσεις (συγκέντρωση ίση με το IC₅₀)

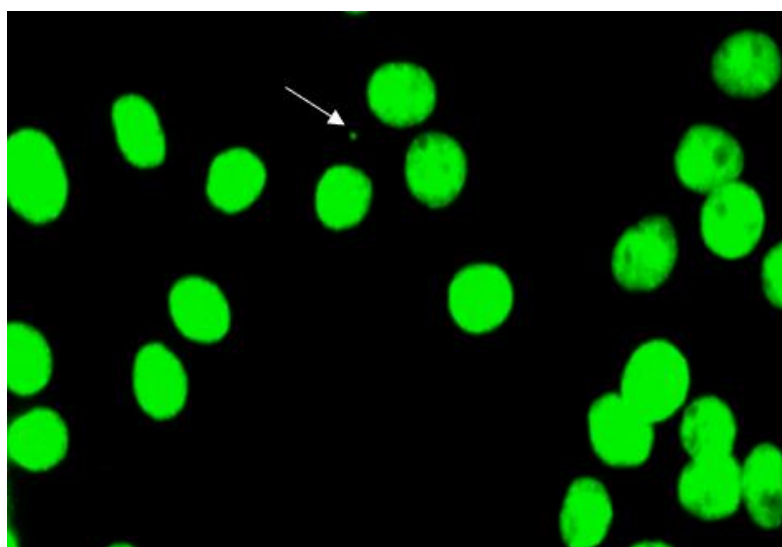
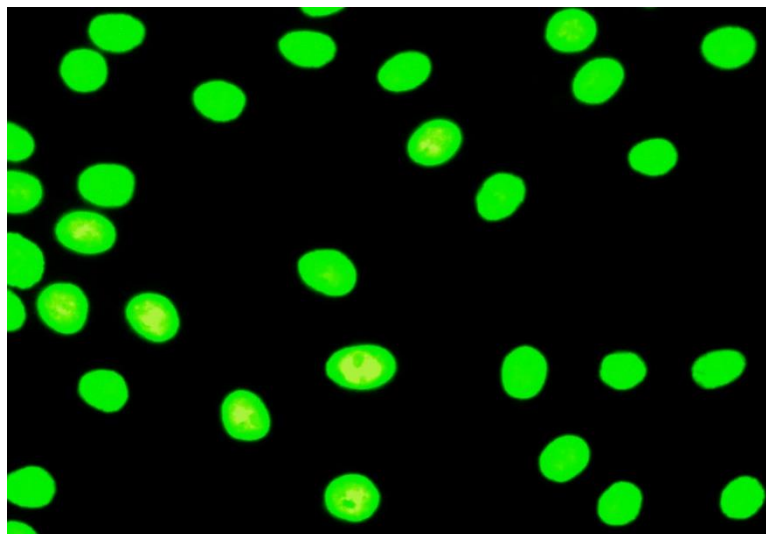
Ένωση	Ποσοστό Μικροπυρηνίσκων (%)
Control	0,78 ± 0,03
CIPTIN	0,81 ± 0,02
SLS@CIPTIN	0,84 ± 0,02
CTAB@CIPTIN	0,85 ± 0,03
SLS@DPTD	1,14 ± 0,09
CTAB@DPTD	0,94 ± 0,03
Cisplatin (Banti et al., 2016)	1,6

Μετά την επώαση των κυττάρων MRC-5 με το μικκύλιο CTAB@DPTD (**Εικόνα 71**) το ποσοστό εμφάνισης των μικροπυρηνίσκων αυξήθηκε από 0,78 % των κυττάρων control σε 0,94 %, υποδηλώνοντας ότι το μικκύλιο προκαλεί *in vitro* γονοτοξικότητα. Τέλος, υπολογίστηκε ότι τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε το μικκύλιο SLS@DPTD (**Εικόνα 72**)

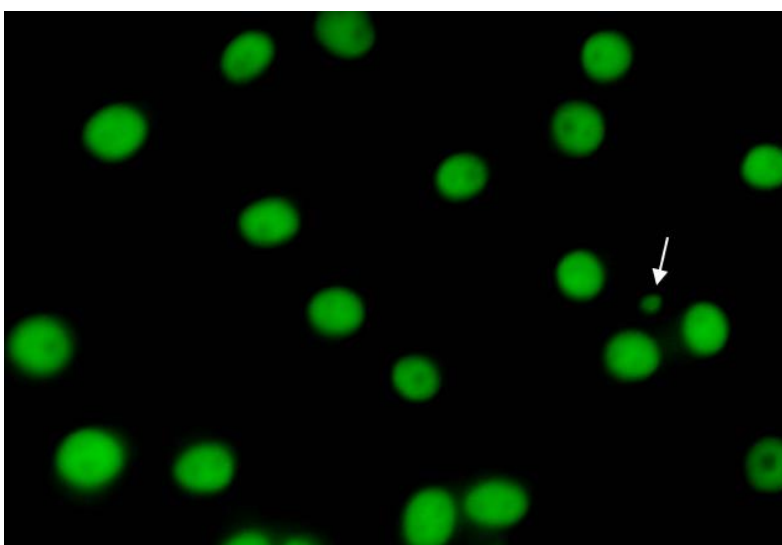
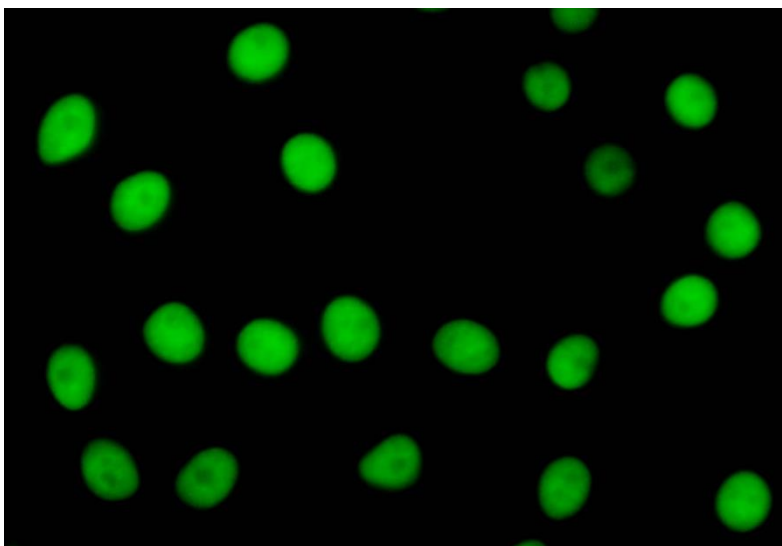
σε συγκέντρωση ίση με την IC_{50} , η συχνότητα των μικροπυρηνίσκων αυξήθηκε στο 1,14 %. Βιβλιογραφικά είναι γνωστό ότι κύτταρα που έχουν επωαστεί με cisplatin εμφανίζουν συχνότητα μικροπυρηνίσκων ίση με 1,6%. Συνεπώς, συνολικά τα ποσοστά των μικροπυρηνίσκων που υπολογίστηκαν για τις νέες ενώσεις είναι χαμηλότερα από αυτά που προκαλούνται μετά από την επώαση των κυττάρων MRC-5 με cisplatin, αποδεικνύοντας τη χαμηλή γονοτοξικότητα τους.



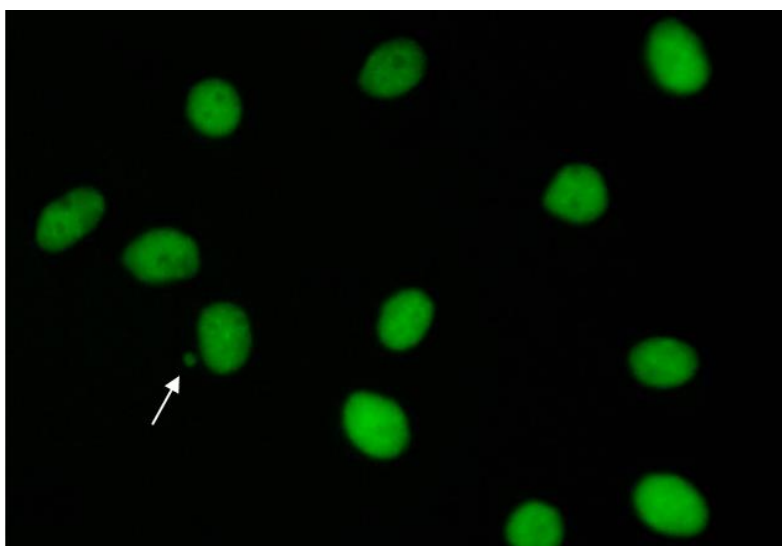
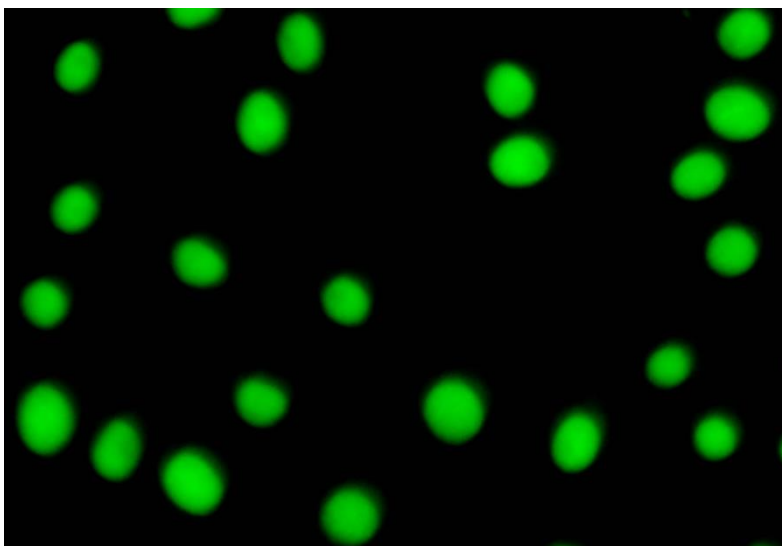
Εικόνα 67: Αντιπροσωπευτικές εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού σε κύτταρα MRC-5 που δεν επώαστηκαν με κάποια ένωση (control). Με τα άσπρα βέλη δηλώνονται οι μικροπυρηνίσκοι.



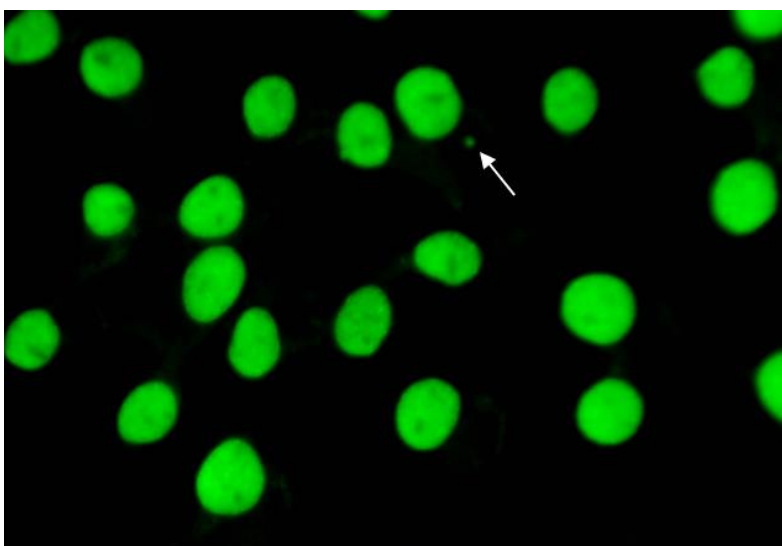
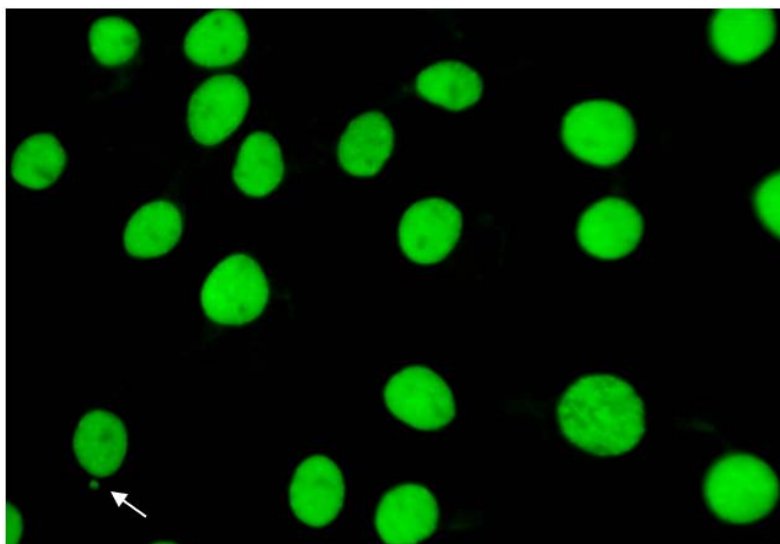
Εικόνα 68: Αντιπροσωπευτικές εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού σε κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών με CIPTIN σε συγκέντρωση ίση με την τιμή IC_{50} . Με τα άσπρα βέλη δηλώνονται οι μικροκυρηγίσκοι.



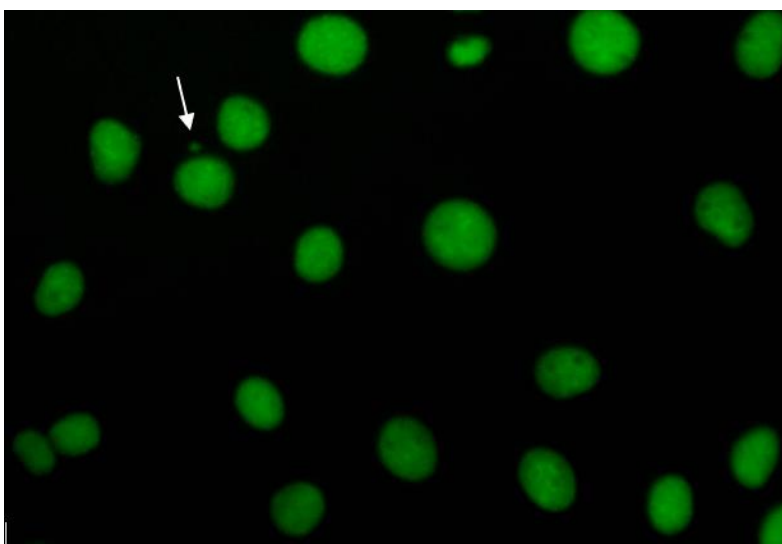
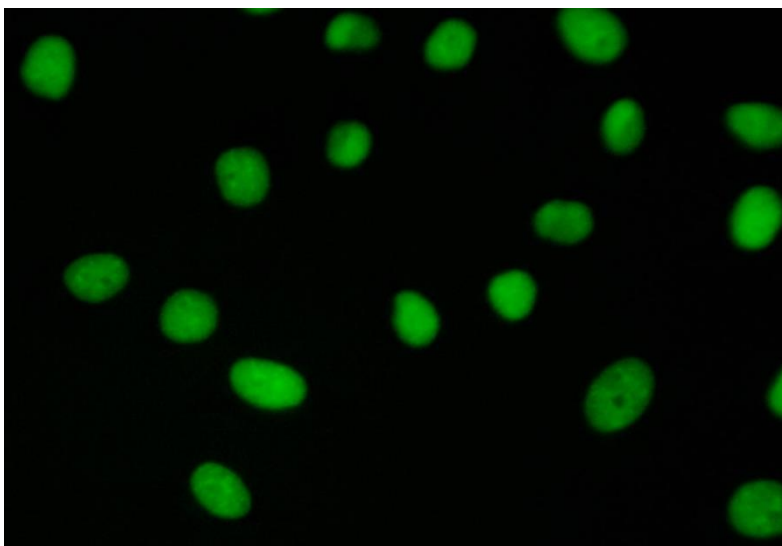
Εικόνα 69: Αντιπροσωπευτικές εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού σε κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών με SLS@CIPTIN σε συγκέντρωση ίση με την τιμή IC_{50} . Με τα άσπρα βέλη δηλώνονται οι μικροκυρηγίσκοι.



Εικόνα 70: Αντιπροσωπευτικές εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού σε κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών με CTAB@CIPTIN σε συγκέντρωση ίση με την τιμή IC_{50} . Με τα άσπρα βέλη δηλώνονται οι μικροπυρηνίσκοι.



Εικόνα 71: Αντιπροσωπευτικές εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού σε κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών με SLS@DPTD σε συγκέντρωση ίση με την τιμή IC_{50} . Με τα άσπρα βέλη δηλώνονται οι μικροπυρηνίσκοι.



Εικόνα 72: Αντιπροσωπευτικές εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού σε κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών με CTAB@DPTD σε συγκέντρωση ίση με την τιμή IC_{50} . Με τα άσπρα βέλη δηλώνονται οι μικροκυτταρίδες.

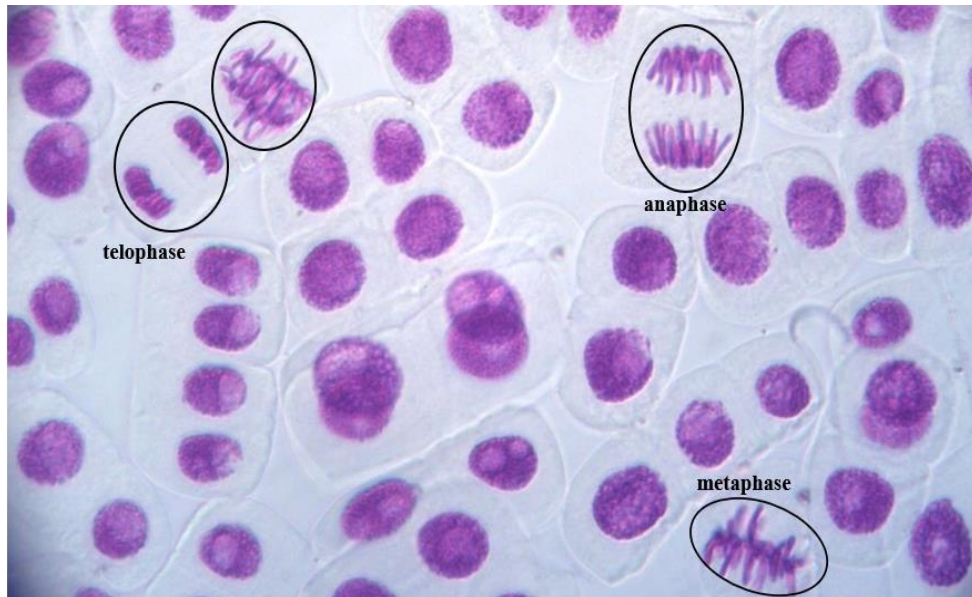
Δ.3.5 *In vivo* μελέτη γονοτοξικότητας (Μοντέλο *Allium cepa*)

Η ανάπτυξη νέων φαρμάκων δημιουργεί την ανάγκη της διερεύνησης της πιθανής τοξικότητας των φαρμάκων σε πειραματικά μοντέλα. Ένα πολύ χρήσιμο μοντέλο για την μελέτη της

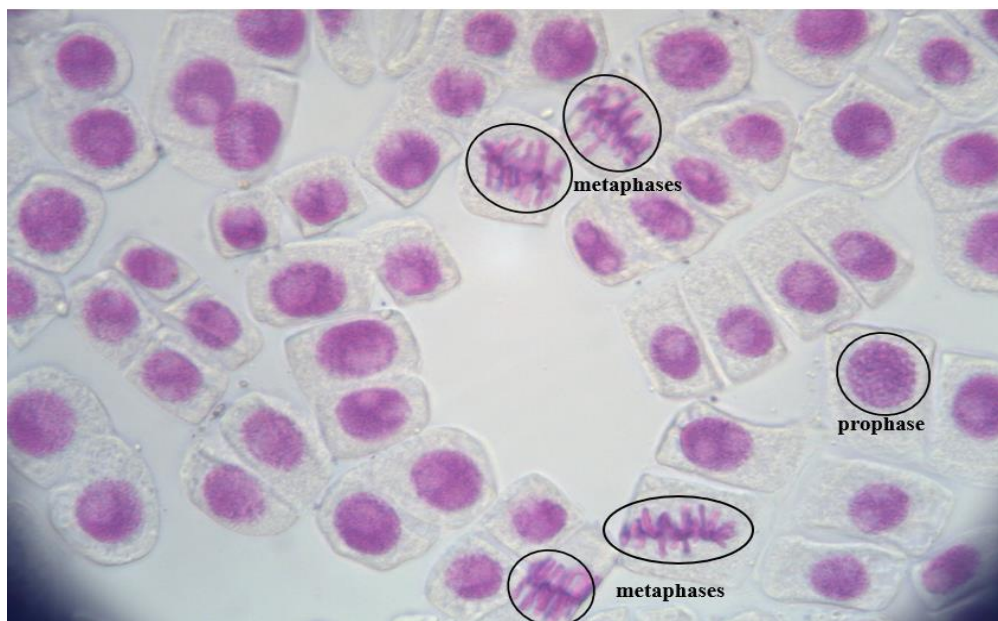
τοξικότητας των φαρμάκων *in vivo* είναι το μοντέλο *Allium cepa*. Το μοντέλο *Allium cepa* χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τον έλεγχο της γονοτοξικότητας των ενώσεων που συντέθηκαν *in vivo*. Το συγκεκριμένο μοντέλο χρησιμοποιείται συχνά για τη μελέτη των κυτταροτοξικών, μεταλλαξιογόνων, γονοτοξικών επιδράσεων των διαφόρων ουσιών και θεωρείται πρότυπο μοντέλο για γρήγορες δοκιμές, δεδομένου ότι εμφανίζει υψηλή συσχέτιση με τα ζωικά μοντέλα (Leme and Marin-Morales, 2009; Banti and Hadjikakou, 2019).

Ο μιτωτικός δείκτης (%) ορίζεται ως η αναλογία των κυττάρων σε έναν κυτταρικό πληθυσμό που βρίσκεται στο στάδιο της μίτωσης σε σχέση με τα κύτταρα που δεν βρίσκονται στο στάδιο της μίτωσης. Η αναστολή των διαδικασιών της μίτωσης χρησιμοποιείται συχνά για τον εντοπισμό κυτταροτοξικών ουσιών. Τα επίπεδα κυτταροτοξικότητας ενός παράγοντα μπορεί να προσδιοριστούν από τη μείωση ή την αύξηση του μιτωτικού δείκτη. Έχει βρεθεί ότι η μείωση του μιτωτικού δείκτη, σε σχέση με το αρνητικό control, αποδεικνύει ότι υπάρχουν σημαντικές αλλαγές στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη των εκτιθέμενων οργανισμών που οφείλονται στον χημικό παράγοντα (Banti and Hadjikakou, 2019).

Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες μπορούν να δημιουργηθούν έπειτα από έκθεση του οργανισμού σε φυσικούς ή χημικούς παράγοντες και χαρακτηρίζονται από αλλαγές είτε στη δομή των χρωμοσωμάτων, είτε αλλαγές στο συνολικό αριθμό των χρωμοσωμάτων. Ένα χαρακτηριστικό είδος χρωμοσωμικών ανωμαλιών είναι οι χρωμοσωμικές γέφυρες και τα χρωμοσωμικά θραύσματα που αποτελούν σημαντικούς δείκτες για τον προσδιορισμό μεταλλαξιογόνων ουσιών. Οι πυρηνικές ανωμαλίες χαρακτηρίζονται από μορφολογικές αλλαγές του μεσοφασικού πυρήνα, σαν αποτέλεσμα της έκθεσης σε κυτταροτοξικούς παράγοντες. Η μελέτη των μικροπυρηνίσκων αποτελεί την πιο αποτελεσματική και απλή μέθοδο για τον προσδιορισμό των μεταλλαξιογόνων ενώσεων. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι οι μικροπυρηνίσκοι δημιουργούνται από χρωμοσωμικά θραύσματα, χρωμοσωμικές απώλειες και πολυπλοειδίες (Leme and Marin-Morales, 2009).

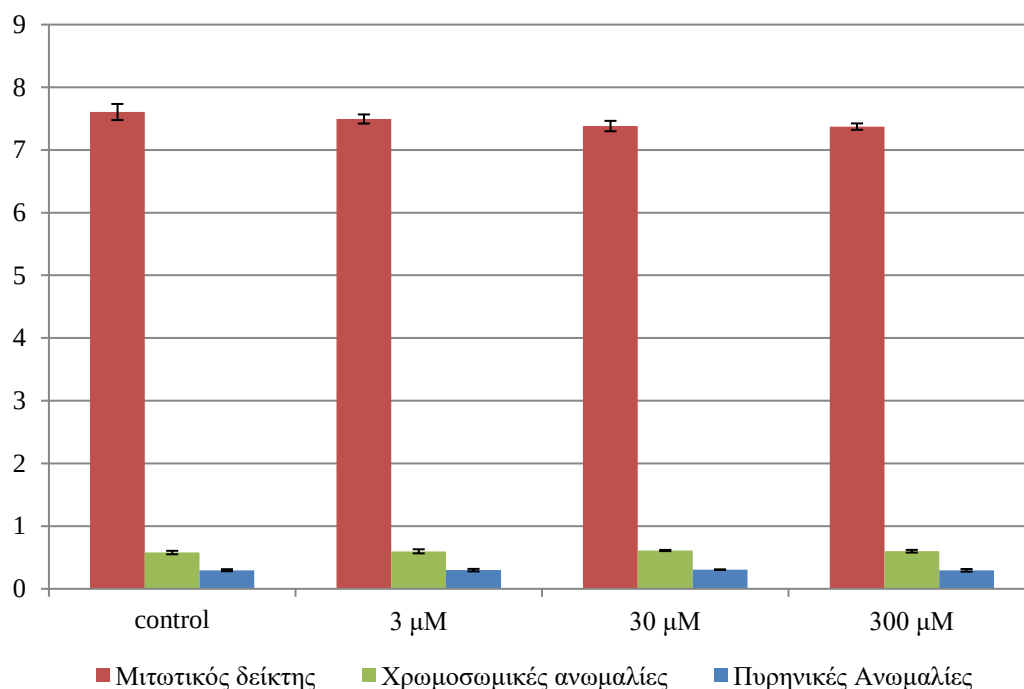


(A)



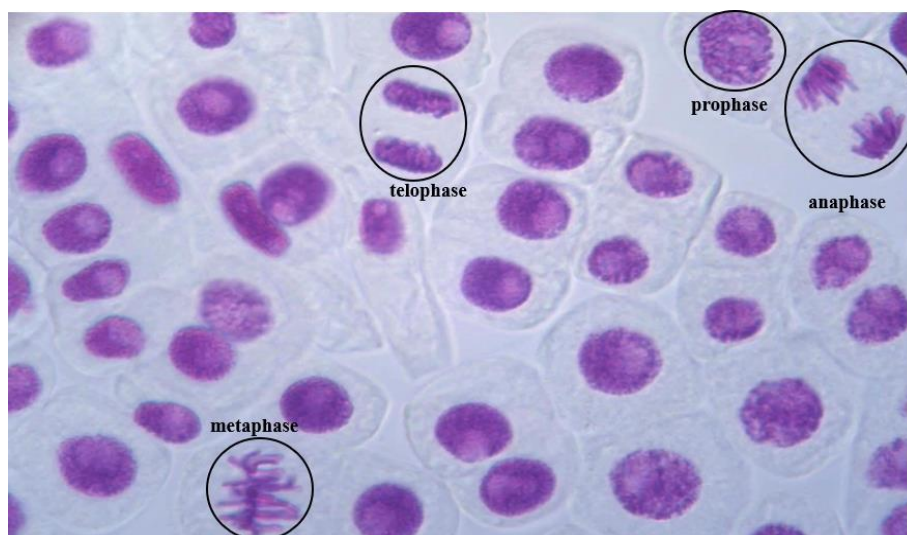
(B)

Εικόνα 73: Χαρακτηριστικές εικόνες μεριστωματικών κυττάρων *Allium cepa* χωρίς επώαση
(control)

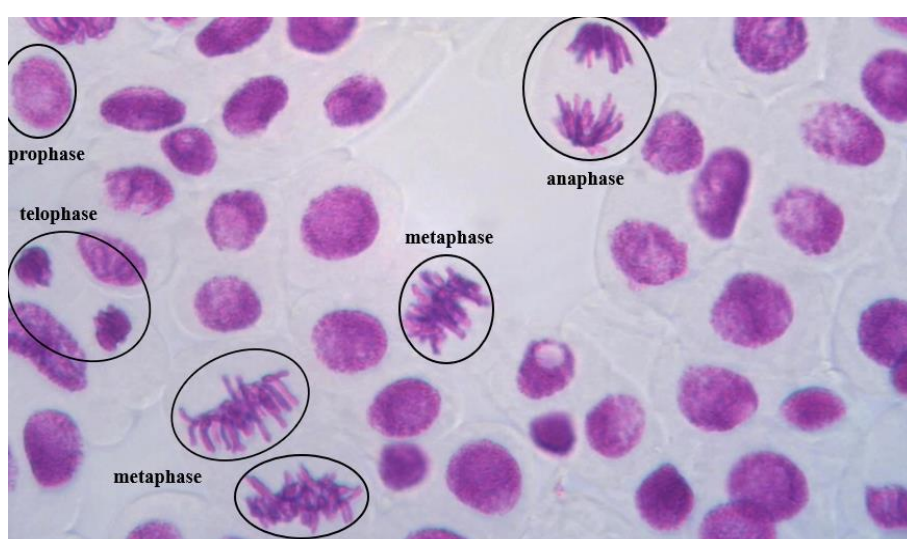


Εικόνα 74: Το ποσοστό (%) του μιτωτικού δείκτη, των χρωμοσωμικών ανωμαλιών και των πυρηνικών ανωμαλιών, μετά από επώαση των κυττάρων *Allium cepa* με CIPTIN

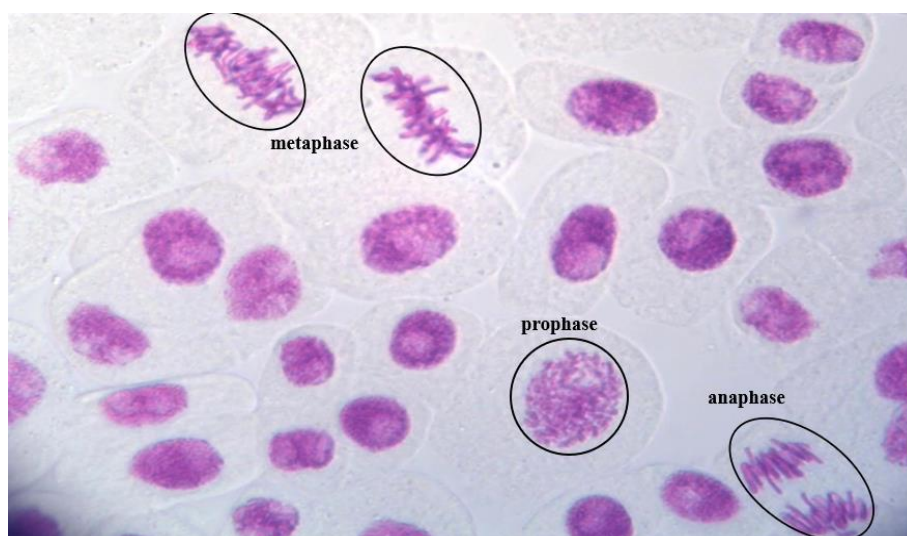
Στην **Εικόνα 74** παρουσιάζονται ο μιτωτικός δείκτης, οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες και οι πυρηνικές ανωμαλίες που παρατηρήθηκαν όταν τα *Allium Cera* επώαστηκαν για 48 ώρες με συγκεντρώσεις 3, 30, 300 μM του CIPTIN (**Εικόνα 75**), αλλά και απουσία συμπλόκου (control) (**Εικόνα 73**). Το εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκε για όλες τις ενώσεις είναι μεγαλύτερο από τις τιμές IC_{50} έναντι των φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων και από τις τιμές MIC έναντι των βακτηριακών στελεχών που μελετήθηκαν. Η μελέτη αποδεικνύει ότι δεν υπάρχει μείωση του μιτωτικού δείκτη μετά την επώαση κυττάρων *Allium cepa* με το μεταλλοφάρμακο CIPTIN σε συγκεντρώσεις 3 ($7,50 \pm 0,07$ %), 30 ($7,38 \pm 0,08$ %) και 300 ($7,37 \pm 0,05$ %) μM σε σύγκριση με τα κύτταρα control ($7,60 \pm 0,12$ %) (**Εικόνα 74**). Ομοίως τα ποσοστά εμφάνισης μικροπυρηνίσκων και πυρηνικών ανωμαλιών δεν μεταβάλλονται. Επομένως, το CIPTIN δεν εμφανίζει μεταλλαξιογόνα ή γονοτοξική δράση σε συγκέντρωση έως 300 μM, δηλαδή έως 353 φορές μεγαλύτερη από τις τιμές IC_{50} έναντι των καρκινικών κυττάρων και 305 φορές μεγαλύτερη από τις τιμές MIC έναντι των βακτηριακών κυττάρων.



(A)

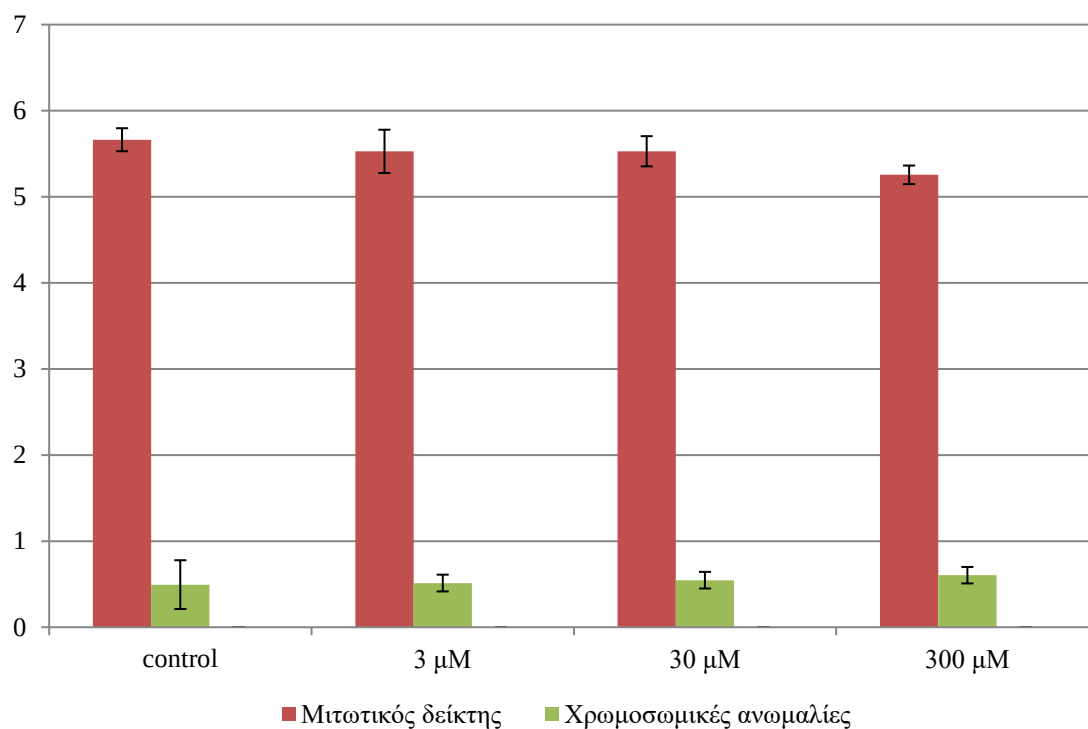


(B)



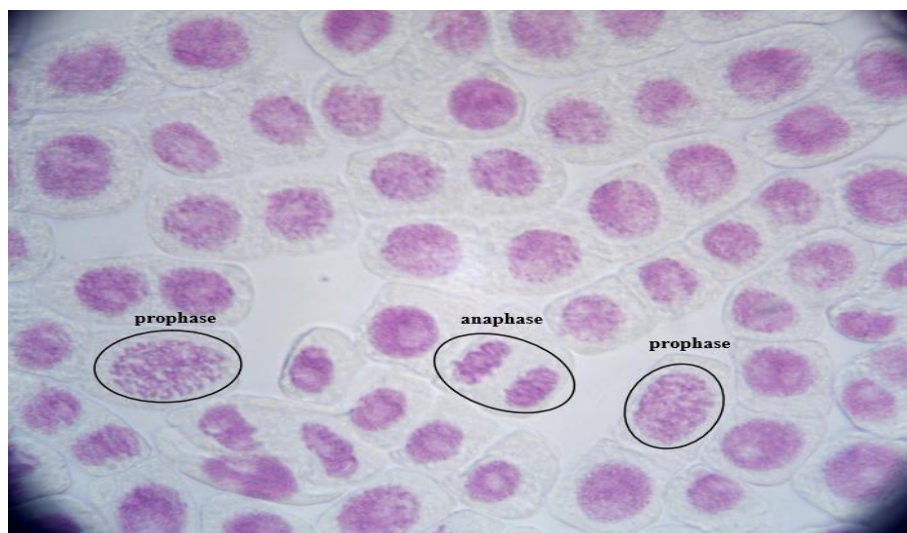
(Γ)

Εικόνα 75: Χαρακτηριστικές εικόνες μεριστωματικών κυττάρων *Allium cepa* μετά από επώαση με 3 (A), 30 (B) και 300 (Γ) μM CIPTIN

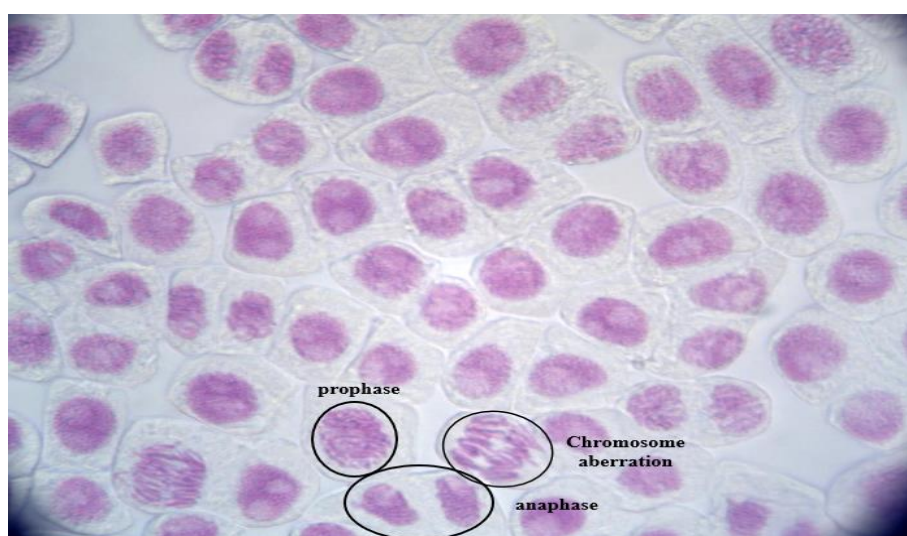


Εικόνα 76: Το ποσοστό (%) του μιτωτικού δείκτη και των χρωμοσωμικών ανωμαλιών, μετά από επώαση των κυττάρων *Allium cepa* με SLS@CIPTIN

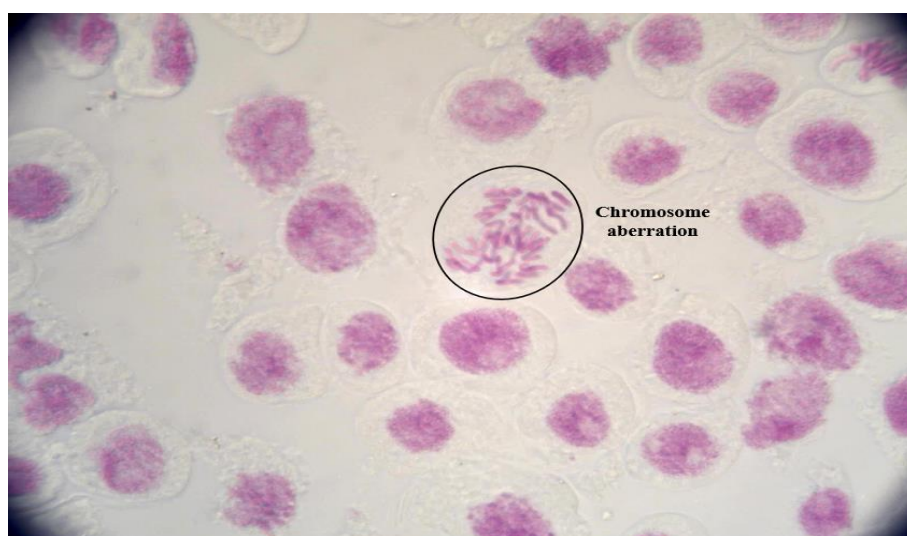
Μετά από επώαση των κυττάρων *Allium cepa* με το μικκύλιο SLS@CIPTIN σε συγκεντρώσεις 3 (5,53 ± 0,25 % 30 (5,53 ± 0,18 %) και 300 μM (5,26 ± 0,18 %), ο μιτωτικός δείκτης δεν μειώνεται σε σύγκριση με τα κύτταρα control (5,66 ± 0,11 %) (**Εικόνα 76 -Εικόνα 77**). Το ποσοστό εμφάνισης χρωμοσωμικών ανωμαλιών αυξάνεται στην περίπτωση που τα κύτταρα επωάζονται με το μικκύλιο SLS@CIPTIN σε συγκέντρωση 300 μM (0,60 ± 0,10 % σε σύγκριση με 0,49 ± 0,28 % των κυττάρων control). Επίσης, δεν παρατηρείται αύξηση στην εμφάνιση πυρηνικών ανωμαλιών και μικροπυρηνίσκων. Συνεπώς, το μικκύλιο SLS@CIPTIN δεν προκαλεί καταστροφικές αλλαγές στον πυρήνα των κυττάρων, αφού δεν παρατηρήθηκε ούτε εμφάνιση πυρηνικών ανωμαλιών, ούτε μικροπυρηνίσκων, ενώ μειώνει τον μιτωτικό δείκτη σε συγκεντρώσεις πολύ μεγαλύτερες (> 30 μM) από τις τιμές IC₅₀ έναντι των καρκινικών κυττάρων (έως και 25,4 φορές) και των MIC έναντι των μικροβίων.



(A)



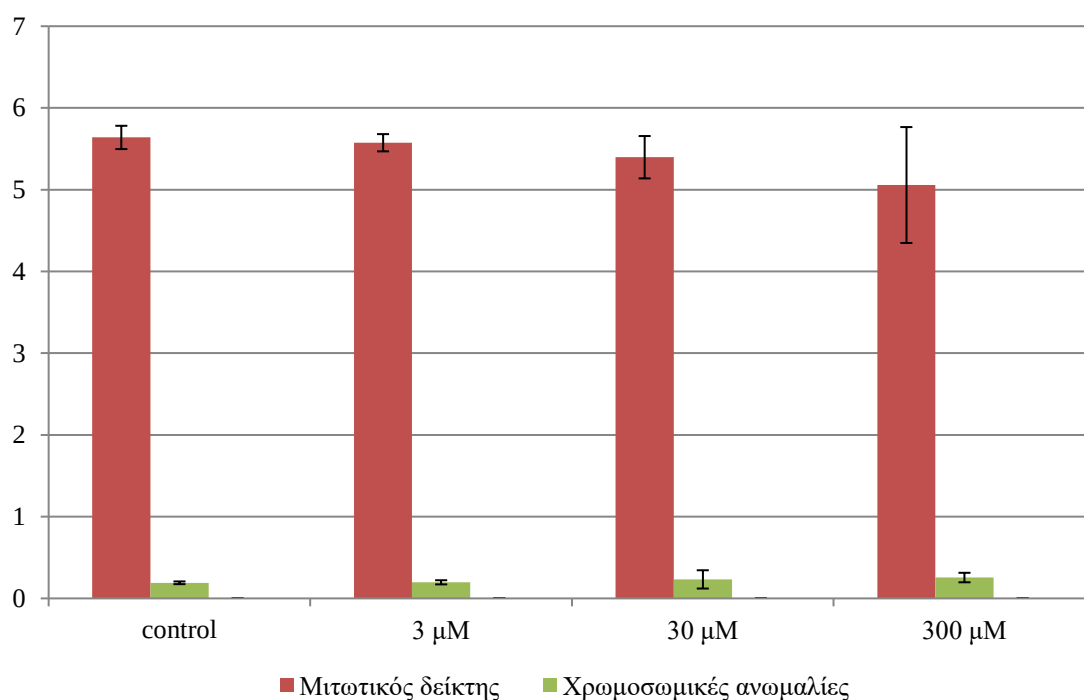
(B)



(Γ)

Εικόνα 77: Χαρακτηριστικές εικόνες μεριστωματικών κυττάρων *Allium cepa* μετά από επώαση με 3 (A), 30 (B) και 300 (Γ) μM SLS@CIPTIN

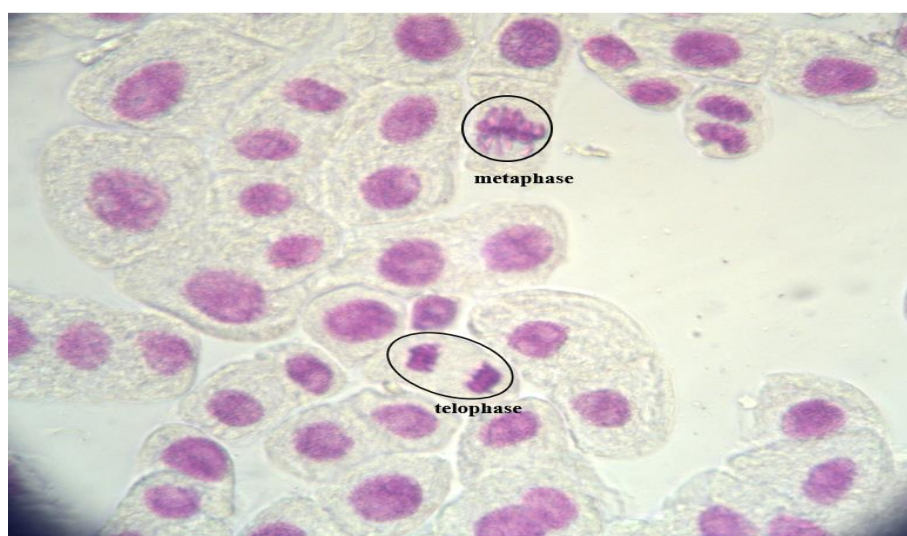
Οι μελέτες *in vivo* γονοτοξικότητας του μικκύλιου CTAB@CIPTIN απέδειξαν ότι ο μιτωτικός δείκτης δεν μειώνεται σημαντικά ακόμα και μετά από επώαση των κυττάρων *Allium cepa* σε συγκέντρωση 300 μM ($5,64 \pm 0,14$ % σε σύγκριση με $5,04 \pm 0,78$ % των κυττάρων control) (Εικόνες 78 και 79). Τα ποσοστά χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε συγκεντρώσεις 3, 30 και 300 μM μικκύλιου είναι $0,20 \pm 0,03$ %, $0,23 \pm 0,11$ % και $0,26 \pm 0,06$ % αντίστοιχα, ενώ για τα control κύτταρα υπολογίστηκε $0,19 \pm 0,02$ %. Μετά την επώαση των κυττάρων με το μικκύλιο δεν παρατηρείται εμφάνιση πυρηνικών ανωμαλιών και μικροπυρηνίσκων. Συνεπώς, τα μικκύλια που εγκολπώνουν το μεταλλοφάρμακο CIPTIN δεν εμφανίζουν μεταλλαξιογόνα ή γονοτοξική δράση.



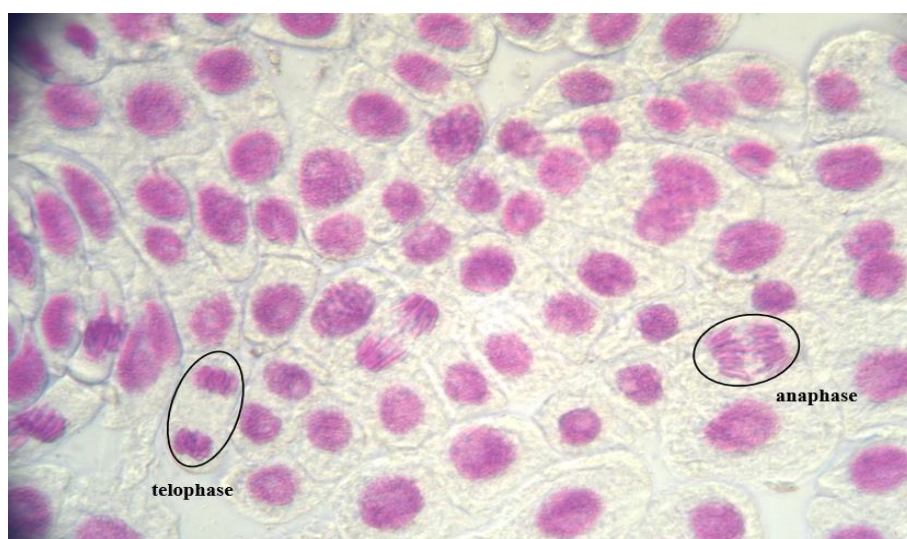
Εικόνα 78: Το ποσοστό (%) του μιτωτικού δείκτη και των χρωμοσωμικών ανωμαλιών, μετά από επώαση των κυττάρων *Allium cepa* με CTAB@CIPTIN



(A)

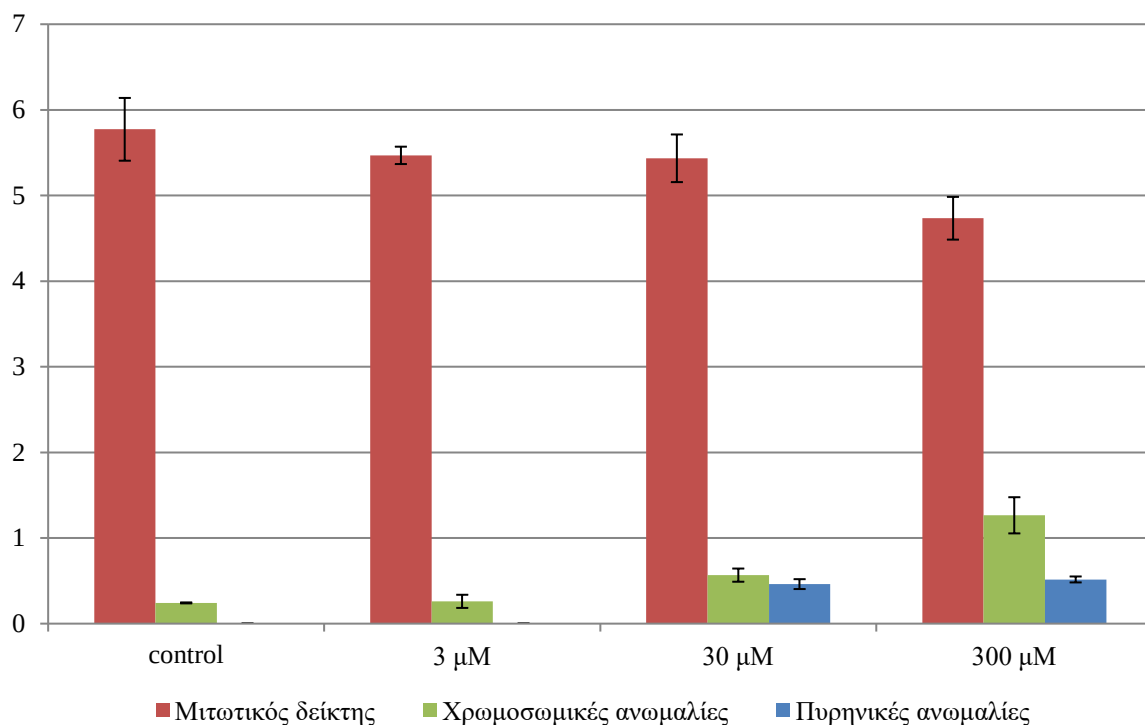


(B)



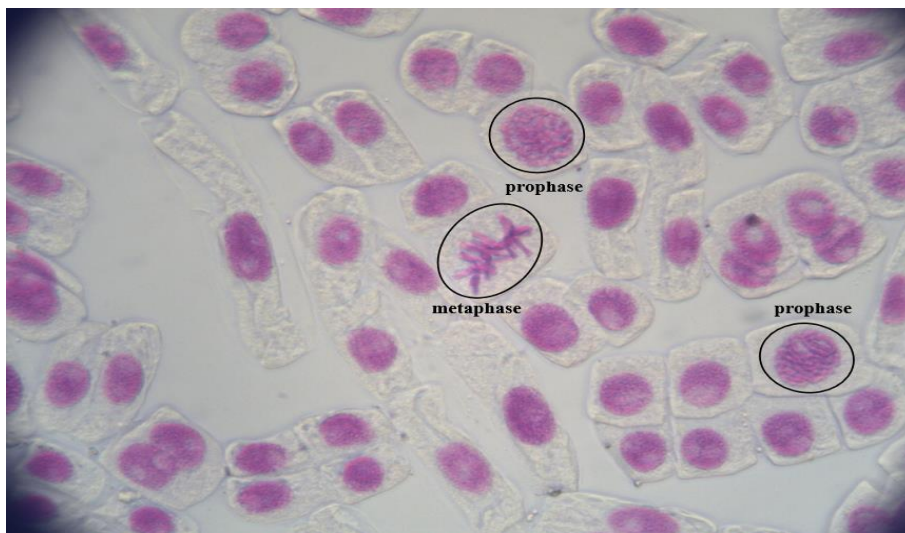
(Γ)

Εικόνα 79: Χαρακτηριστικές εικόνες μεριστωματικών κυττάρων *Allium cepa*, μετά από επώαση με 3 (A), 30 (B) και 300 (Γ) μM CTAB@CIPTIN

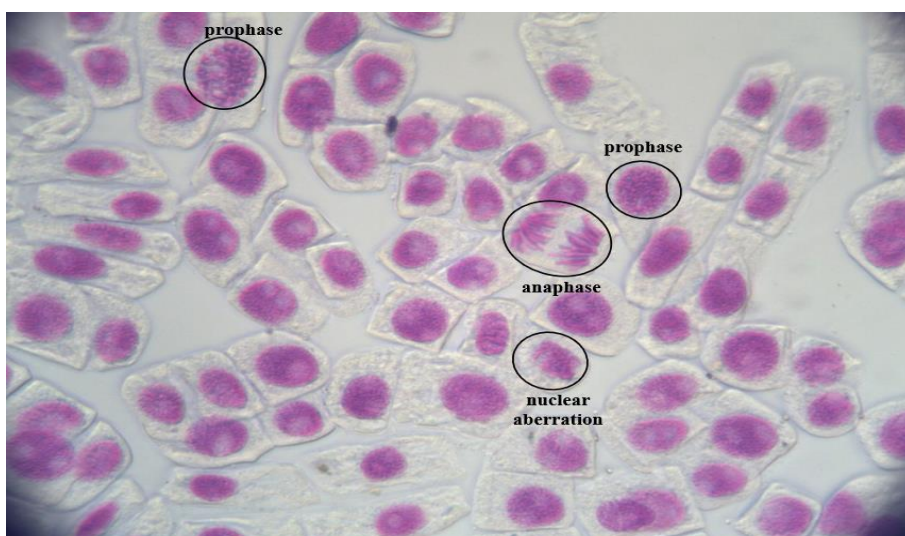


Εικόνα 80: Το ποσοστό (%) του μιτωτικού δείκτη, των χρωμοσωμικών ανωμαλιών και των πυρηνικών ανωμαλιών, μετά από επώαση των κυττάρων *Allium cepa* με SLS@DPTD

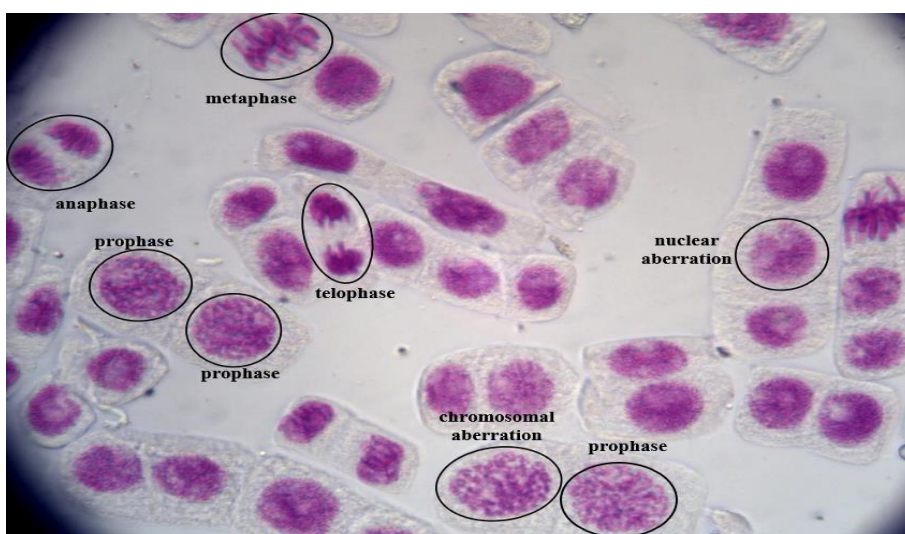
Όσον αφορά τα μικκύλια του DPTD, οι μελέτες αποδεικνύουν ότι ο μιτωτικός δείκτης μειώνεται μετά από επώαση των κυττάρων *Allium cepa* με το μικκύλιο SLS@DPTD στις συγκεντρώσεις 3 ($5,47 \pm 0,10$ %), 30 ($5,44 \pm 0,28$ %) και 300 ($4,73 \pm 0,25$ %) μM (Εικόνες 80 και 81) σε σύγκριση με τα κύτταρα control ($5,77 \pm 0,37$ %). Επίσης, το ποσοστό των χρωμοσωμικών ανωμαλιών αυξάνεται στις συγκεντρώσεις 30 και 300 μM ($0,57 \pm 0,08$ και $1,27 \pm 0,21$ % σε σύγκριση με $0,24 \pm 0,01$ % των κυττάρων control), ενώ στις ίδιες συγκεντρώσεις το μικκύλιο προκαλεί πυρηνικές ανωμαλίες στα κύτταρα *Allium cepa*. Αυτό υποδηλώνει πως το μικκύλιο SLS@DPTD εμφανίζει μεταλλαξιογόνα και γονοτοξική δράση σε συγκεντρώσεις από 30 μM , η οποία είναι πολύ μεγαλύτερη (έως και 115,4 φορές από τις τιμές IC_{50} έναντι των καρκινικών κυττάρων).



(A)



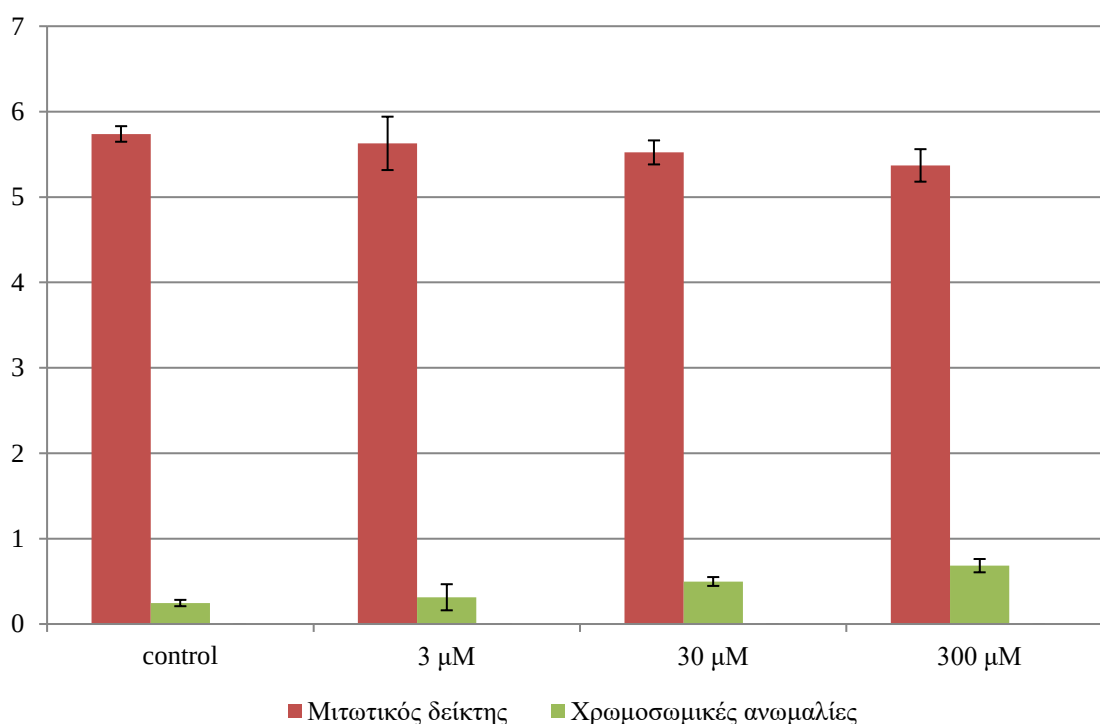
(B)



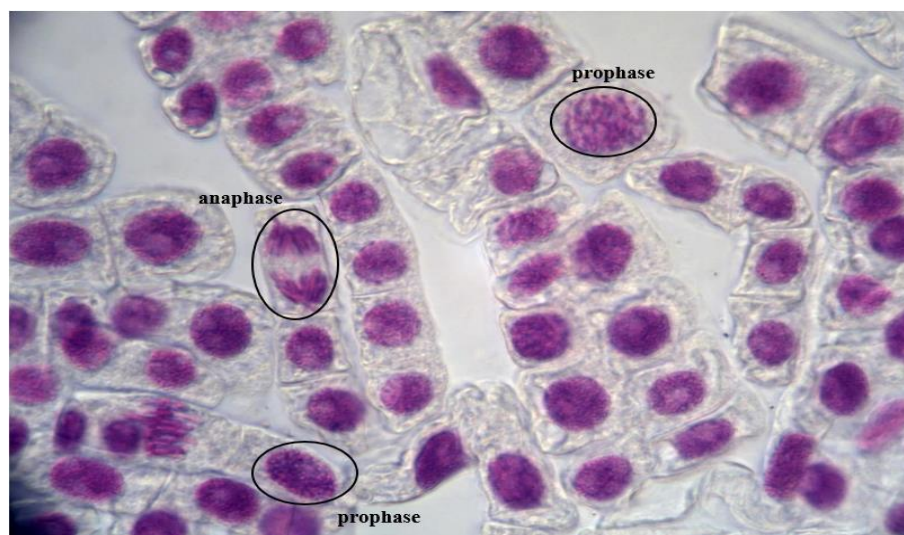
(Γ)

Εικόνα 81: Χαρακτηριστικές εικόνες μεριστωματικών κυττάρων *Allium cerea*, μετά από επώαση με 3 (A), 30 (B) και 300 (Γ) μM SLS@DPTD

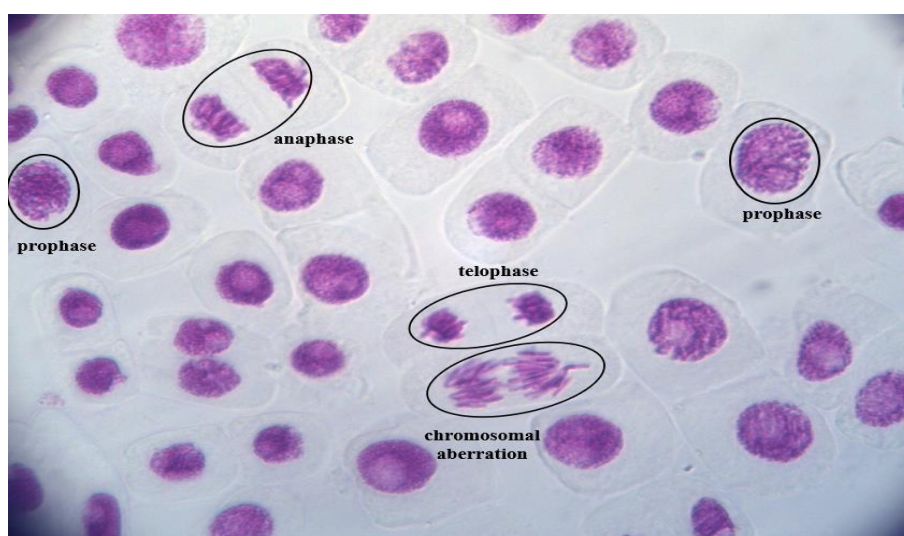
Για το μικκύλιο CTAB@DPTD παρατηρούμε πως ο μιτωτικός δείκτης δεν εμφανίζει μεγάλη μείωση μέχρι και σε συγκέντρωση 300 μM ($5,37 \pm 0,19 \%$) σε σύγκριση με το control ($5,74 \pm 0,09 \%$) (Εικόνες 82 και 83). Αύξηση στο ποσοστό χρωμοσωμικών ανωμαλιών παρατηρείται σε συγκέντρωση 300 μM ($0,68 \pm 0,08 \%$) σε σύγκριση με το control ($0,25 \pm 0,04 \%$) και δεν παρατηρείται δημιουργία πυρηνικών ανωμαλιών ή μικροπυρηνίσκων, μετά την επώαση των κυττάρων με το μικκύλιο. Συνεπώς, το μικκύλιο CTAB@DPTD δεν εμφανίζει μεταλλαξιογόνο ή γονοτοξική δράση μέχρι και σε συγκέντρωση ίση με 30 μM (136 φορές μεγαλύτερη από τις τιμές IC_{50} έναντι των καρκινικών κυττάρων).



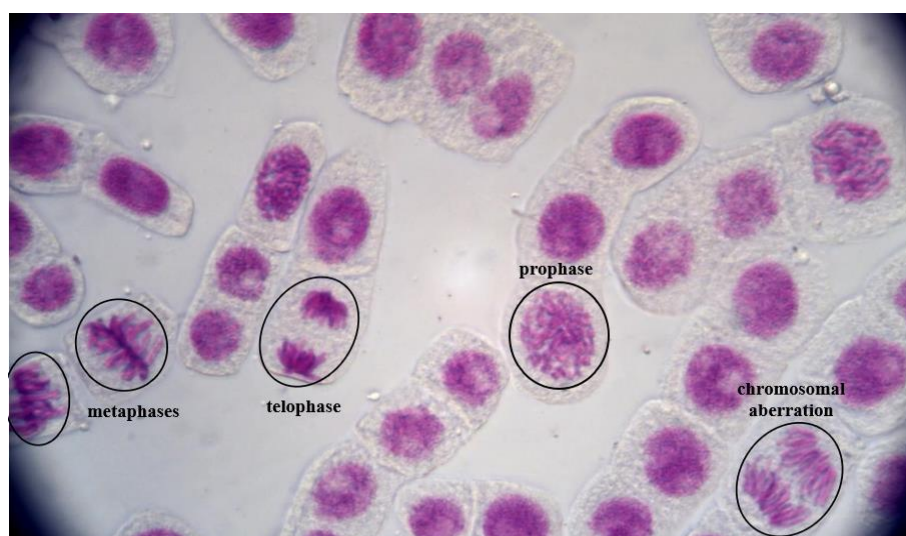
Εικόνα 82: Το ποσοστό (%) του μιτωτικού δείκτη και των χρωμοσωμικών ανωμαλιών, μετά από επώαση των κυττάρων *Allium cepa* με CTAB@DPTD



(A)



(B)

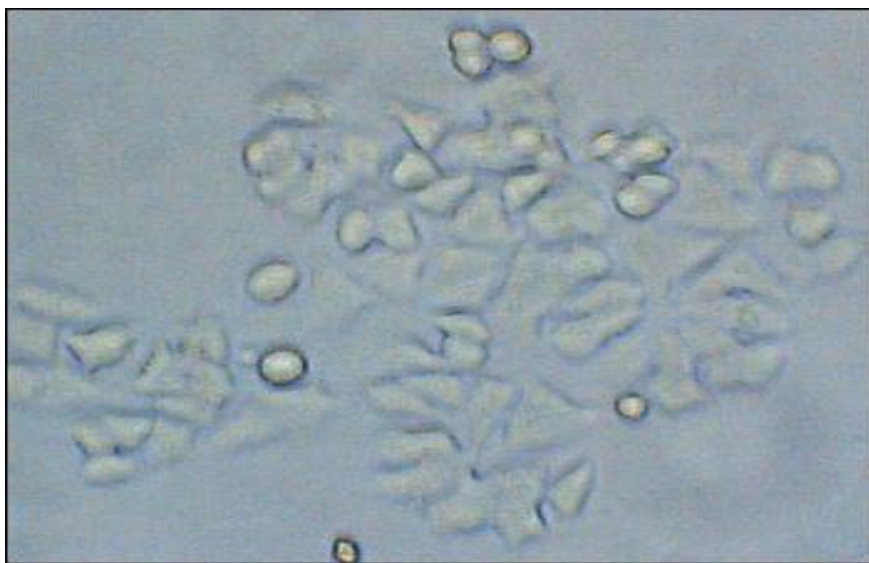


(Γ)

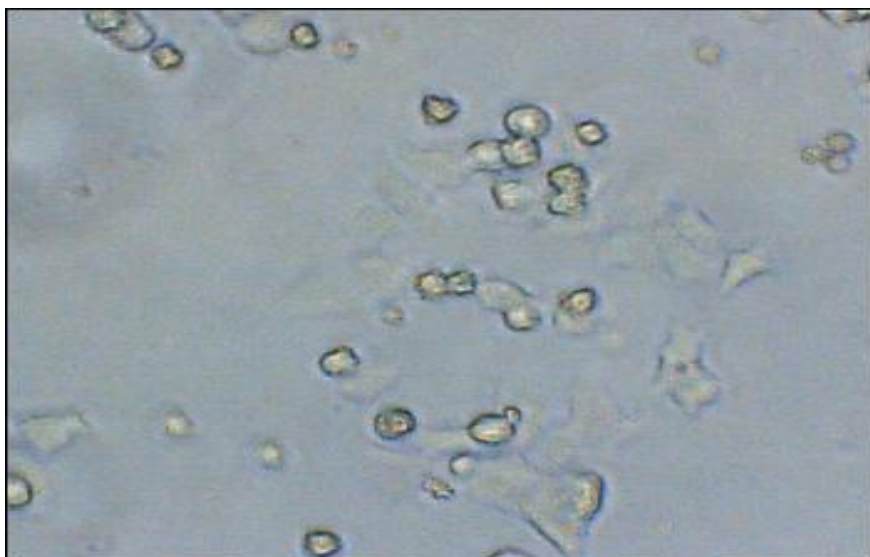
Εικόνα 83: Χαρακτηριστικές εικόνες μεριστωματικών κυττάρων *Allium cepa*, μετά από επώαση με 3 (A), 30 (B) και 300 (Γ) μM CTAB@DPTD

Δ.3.6 Μελέτη κυτταρικής μορφολογίας

Οι μελέτες της μορφολογίας των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να προσδιοριστεί ο τύπος του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από την επώαση των κυττάρων με τις υπό μελέτη ενώσεις. Οι μορφολογικές μελέτες μπορούν να αποκαλύψουν σημαντικές μορφολογικές αλλαγές που είναι χαρακτηριστικές για τα αποπτωτικά ή τα νεκρωτικά κύτταρα και έτσι να αποκαλύψουν τον τύπο κυτταρικού θανάτου. Οι αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων μελετήθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από καλλιέργεια κυττάρων MCF-7 απουσία (**Εικόνα 84**) και παρουσία του CIPTIN (**Εικόνα 85**), του SLS@CIPTIN (**Εικόνα 86**), του CTAB@CIPTIN (**Εικόνα 87**), του SLS@DPTD (**Εικόνα 88**) ή του CTAB@DPTD (**Εικόνα 89**) στην κυτταρική καλλιέργεια για 48 ώρες σε συγκεντρώσεις ίσες με τις τιμές IC_{50} .



Εικόνα 84: Μορφολογία των κυττάρων MCF-7 απουσία των υπο μελέτη ενώσεων (control)



Εικόνα 85: Αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων MCF-7 παρουσία CIPTIN σε συγκέντρωση ίση με την τιμή IC_{50} για 48 ώρες



Εικόνα 86: Αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων MCF-7 παρουσία SLS@CIPTIN σε συγκέντρωση ίση με την τιμή IC_{50} για 48 ώρες



Εικόνα 87: Αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων MCF-7 παρουσία CTAB@CIPTIN σε συγκέντρωση ίση με την τιμή IC_{50} για 48 ώρες



Εικόνα 88: Αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων MCF-7 παρουσία SLS@DPTD σε συγκέντρωση ίση με την τιμή IC_{50} για 48 ώρες



Εικόνα 89: Αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων MCF-7 παρουσία CTAB@DPTD σε συγκέντρωση ίση με την τιμή IC_{50} για 48 ώρες

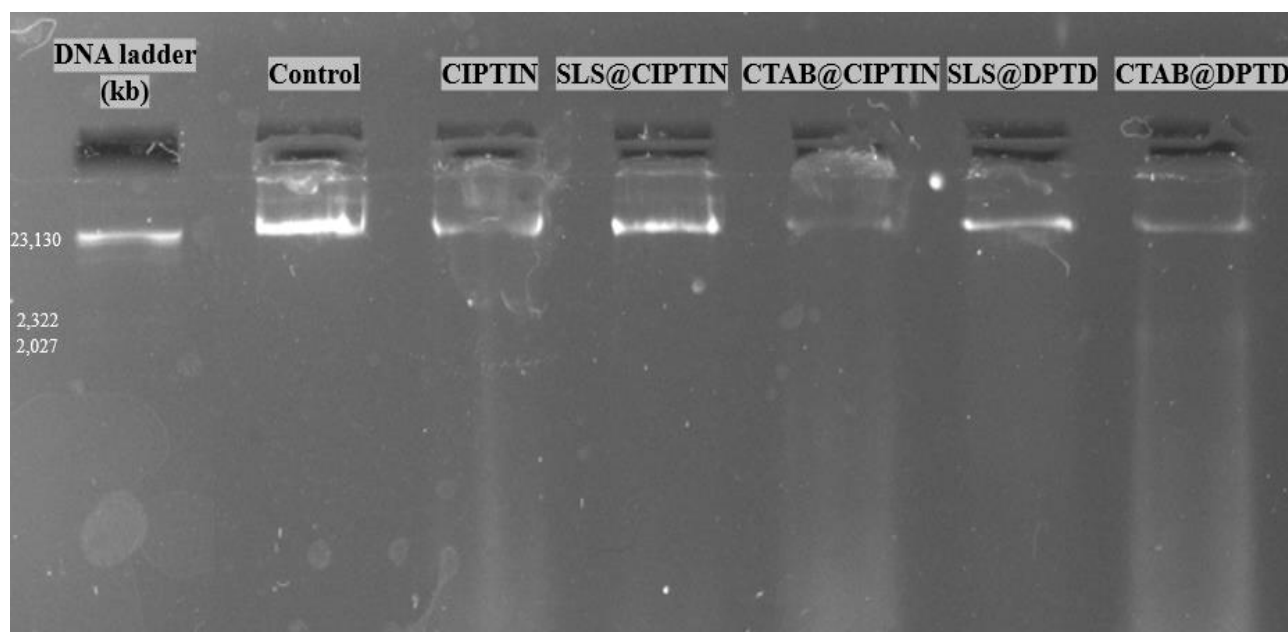
Από τη μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων αποδεικνύεται ότι ο τύπος κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από τις υπό μελέτη ενώσεις είναι ο αποπτωτικός. Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης που παρατηρούνται είναι ότι τα κύτταρα αλλάζουν σχήμα, γίνονται στρογγυλά, χάνονται οι δομές κυτταρικής επικοινωνίας και σιγά σιγά αρχίζουν και ξεκολλάνε από το ταπήτιο του τρυβλίου (**Εικόνα 85 – Εικόνα 89**). Αντίθετα όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 84**, τα κύτταρα που δεν καλλιεργήθηκαν παρουσία CIPTIN ή των μικκυλίων που συντέθηκαν, εμφανίζουν φυσιολογική μορφολογία. Βιβλιογραφικά είναι γνωστό ότι και το μεταλλοφάρμακο cisplatin προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω αποπτωτικών μονοπατιών και τα κύτταρα που επωάζονται με το cisplatin εμφανίζουν παρόμοια μορφολογία (Banti et al., 2016).

Δ.3.7 Μελέτη κατακερματισμού του πυρηνικού DNA

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο κυτταρικός θάνατος των κυττάρων μέσω αποπτωτικών μηχανισμών πραγματοποιήθηκαν μελέτες του κατακερματισμού του πυρηνικού DNA σε κύτταρα MCF-7. Τα κύτταρα MCF-7 επώστηκαν με CIPTIN, SLS@CIPTIN, CTAB@CIPTIN,

SLS@DPTD ή CTAB@DPTD σε συγκεντρώσεις ίσες με τις τιμές IC_{50} και στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση ελέγχθηκε η ικανότητά τους να προκαλούν κατακερματισμό του DNA (**Εικόνα 90**).

Το ευρέως χρησιμοποιούμενο μεταλλοφάρμακο cisplatin προκαλεί κατακερματισμό του πυρηνικού DNA, το οποίο είναι χαρακτηριστικό του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (Banti et al., 2016). Οι υπό μελέτη ενώσεις αποδείχθηκε ότι προκαλούν επίσης κατακερματισμό του πυρηνικού DNA των κυττάρων MCF-7, γεγονός που αποδεικνύει την αποπτωτική δράση των νέων ενώσεων σε αντίθεση με τα κύτταρα που δεν επώαστηκαν με τις ενώσεις (control) και δεν παρατηρείται κατακερματισμός του DNA. Άρα, η μελέτη κατακερματισμού του πυρηνικού DNA έρχεται σε συμφωνία με τις μελέτες της κυτταρικής μορφολογίας οι οποίες προτείνουν ότι οι νέες ουσίες προκαλούν κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης.



Εικόνα 90: Ηλεκτροφόρηση DNA από κύτταρα MCF-7 τα οποία επώαστηκαν με CIPTIN, SLS@CIPTIN, CTAB@CIPTIN, SLS@DPTD ή CTAB@DPTD, για 48 ώρες σε συγκεντρώσεις ίσες με τις τιμές IC_{50}

Α.3.8 Μελέτη του κυτταρικού κύκλου

Ένα από τα ορόσημα της απόπτωσης είναι τα ενδοκυτταρικά θραύσματα του DNA. Τα θραύσματα DNA των αποπτωτικών κυττάρων μπορούν να υπολογισθούν με τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου, καθώς τα κυτταρικά θραύσματα εμφανίζονται στην περιοχή sub-G1 στα ιστογράμματα κατανομής συχνότητας του κυτταρικού κύκλου (Kajstura et al., 2007). Κατ'έκταση η ανίχνευση κορυφής στην περιοχή sub-G1 με κυτταρομετρία ροής, αποδεικνύει την παρουσία αποπτωτικών κυττάρων (Shiao et al., 1998).

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από πέντε φάσεις. Στην φάση G1 το κύτταρο αυξάνεται σε μέγεθος και συνθέτει τα απαραίτητα ένζυμα για το επόμενο στάδιο που πραγματοποιείται η αντιγραφή του DNA (S φάση). Στη φάση G2 το κύτταρο συνεχίζει την αύξηση και την πρωτεϊνοσύνθεση και στη συνέχεια στη φάση M το κύτταρο χωρίζεται σε δύο όμοια θυγατρικά κύτταρα. Τέλος, μερικά κύτταρα όπως για παράδειγμα τα ηπατικά, παραμένουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στη G0 φάση, στην οποία το κύτταρο παραμένει μεταβολικά ενεργό. Σε περίπτωση που το κύτταρο χρειαστεί να διαιρεθεί όπως για παράδειγμα σε περίπτωση τραυματισμού, εισέρχεται και πάλι στη φάση G1.

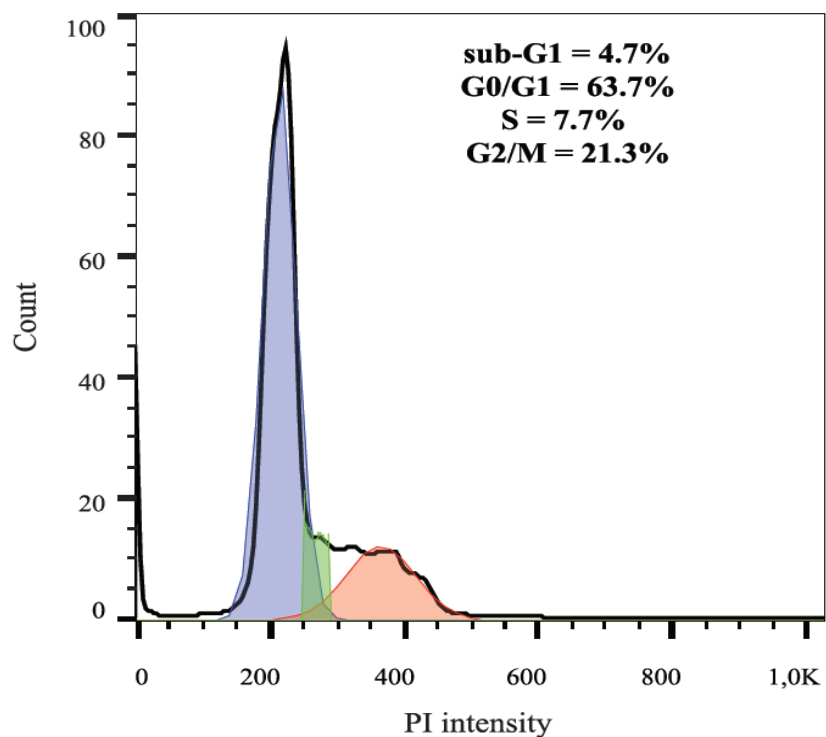
Στην παρούσα μελέτη οι μελέτες του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να προσδιοριστεί η επίδραση των ενώσεων που συντέθηκαν στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις με κυτταρομετρία ροής και ποσοτικοποιήθηκε το ποσοστό των MCF-7 κυττάρων που είναι αποπτωτικά και συνεπώς εμφανίζουν κορυφή στην sub-G1. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν με τις νέες ενώσεις σε συγκεντρώσεις ίσες με τις τιμές IC₅₀ για 48 ώρες και στη συνέχεια έγινε χρώση αυτών με ιωδιούχο προπίδιο και έγινε ανάλυση των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής.

Στις **Εικόνα 91 – Εικόνα 96** παρουσιάζονται τα ιστογράμματα κατανομής συχνότητας της μελέτης του κυτταρικού κύκλου και από τα οποία αποκαλύπτεται η επίδραση των ενώσεων στα κύτταρα MCF-7 με ανάλυση του αριθμού των κυττάρων σε σχέση με την περιεκτικότητα του DNA στις φάσεις sub-G1, G0/G1, S, και G2/M. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κύτταρα που δεν

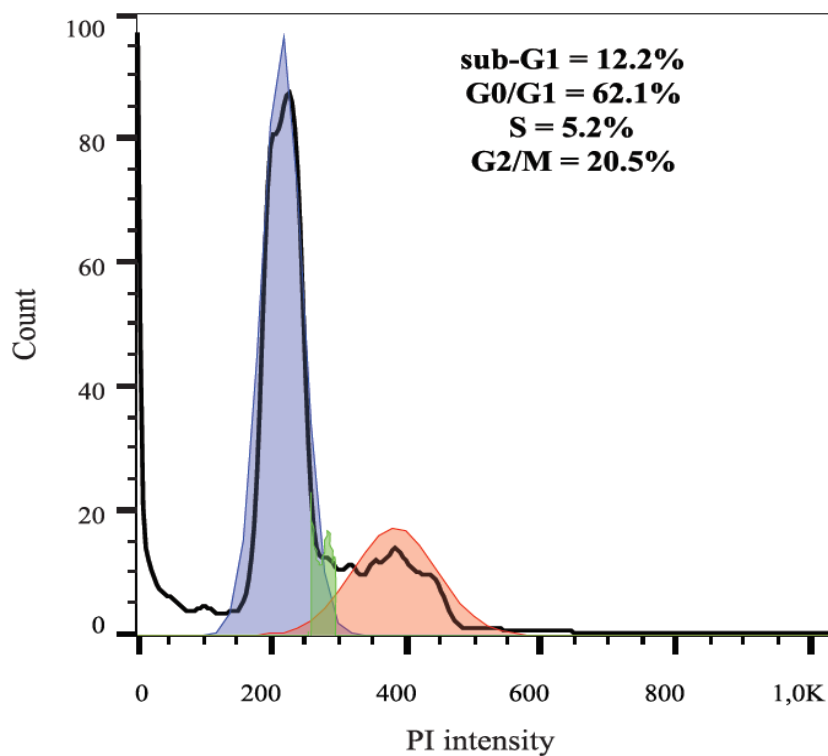
επώαστηκαν με κάποια ουσία κατανέμονται στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου ως εξής: 4,65 % στην sub-G1, 63,7 % στην G0/G1, 7,69 % στην S και 21,3 % στην G2/M (**Εικόνα 91**). Όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με το μεταλλοφάρμακο CIPTIN παρατηρήθηκε μεγάλη αύξηση στο ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση sub-G1 (12,2 %), γεγονός που αποδεικνύει ότι το σύμπλοκο προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω αποπτωτικών μονοπατιών (**Εικόνα 92**).

Στην περίπτωση του μικκυλίου SLS@CIPTIN το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση sub-G1 είναι 11,0 %, ενώ παρατηρείται και μια αύξηση στον ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση S (12,0 %) που υποδηλώνει ότι το μικκύλιο επάγει απόπτωση σε κύτταρα MCF-7 και σταματάει τον κυτταρικό κύκλο στην S φάση, αναστέλλοντας τη σύνθεση του DNA (**Εικόνα 93**). Το μικκύλιο CTAB@CIPTIN προκαλεί επίσης αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση sub-G1 (9,1 %), αλλά και του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G2/M (33,0 %) (**Εικόνα 94**).

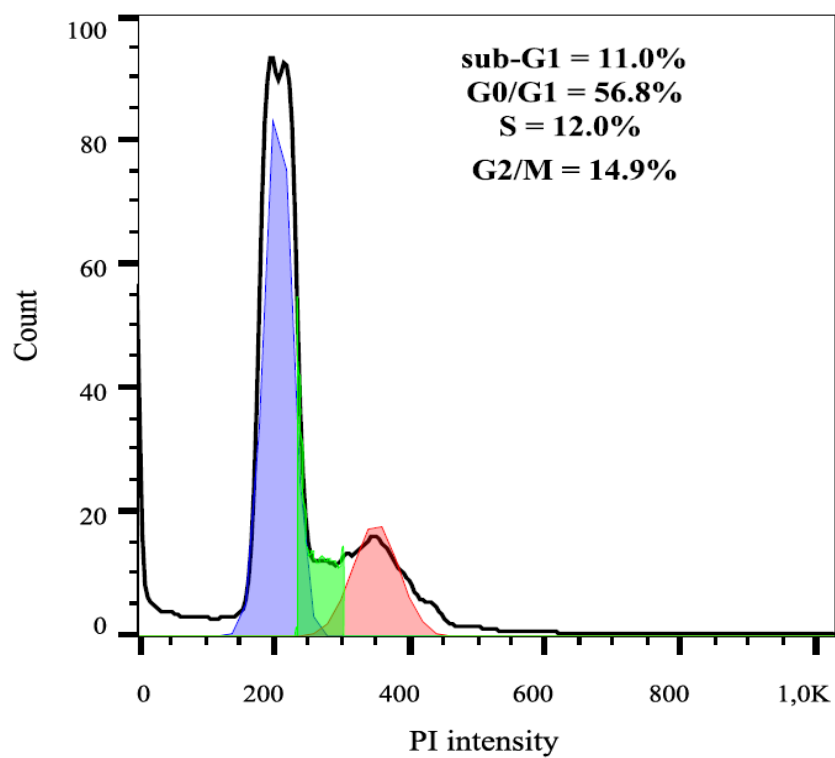
Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι το μικκύλιο του DPTD, SLS@DPTD προκαλεί αύξηση στο ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση sub-G1 (9,3 %) και στάση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M (24,1 %) (**Εικόνα 95**). Το μικκύλιο CTAB@DPTD προκαλεί τη μεγαλύτερη αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση sub-G1 (17,2 %), αλλά και στάση του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις S (10,5 %) και G2/M (22,2 %) (**Εικόνα 96**). Από τα παραπάνω επιβεβαιώνεται ότι οι ενώσεις που συντέθηκαν προκαλούν κυτταρικό θάνατο μέσω των αποπτωτικών μονοπατιών όπως προτείνεται και από τις προηγούμενες μελέτες (κυτταρική μορφολογία, κατακερματισμός πυρηνικού DNA). Προηγούμενες έρευνες έχουν αποδείξει ότι και το cisplatin προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης και στάση του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις S ή G2/M (Chrysouli et al., 2018).



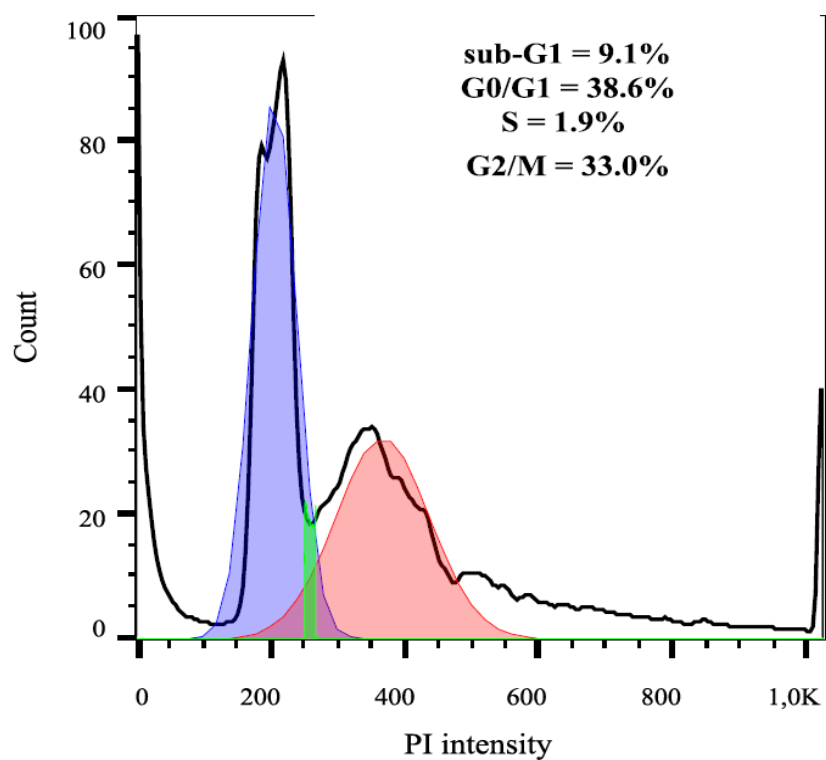
Εικόνα 91: Μελέτη του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα MCF-7 χωρίς επώαση με τις υπό μελέτη ενώσεις



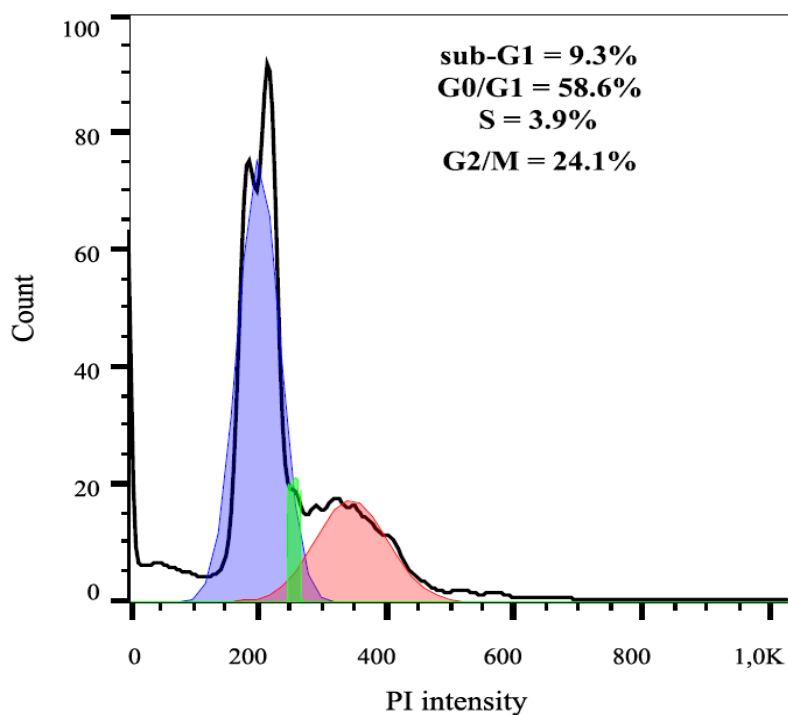
Εικόνα 92: Μελέτη του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα MCF-7 μετά από επώαση με CIPTIN σε συγκέντρωση ίση με την τιμή IC₅₀ για 48 ώρες



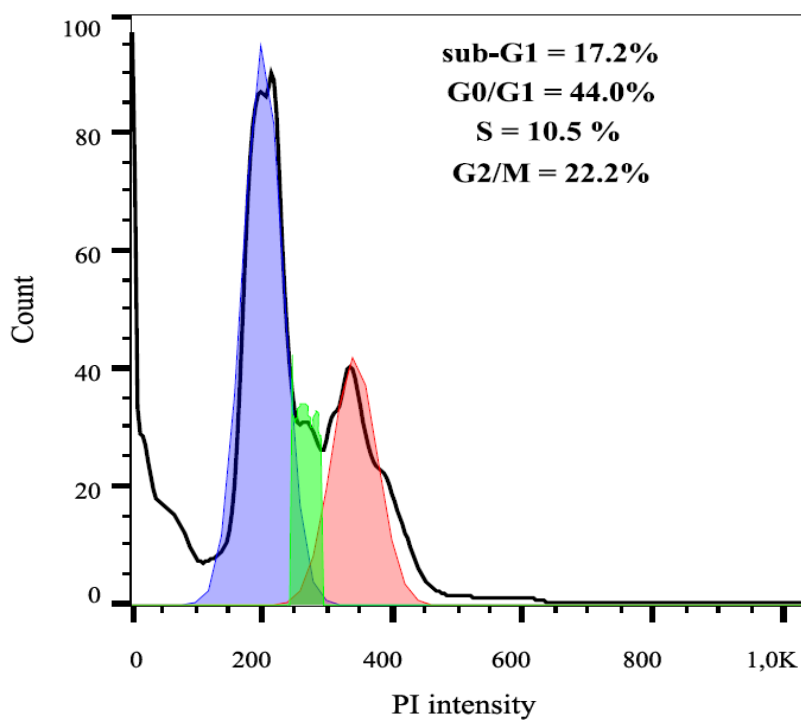
Εικόνα 93: Μελέτη του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα MCF-7 μετά από επώαση με SLS@CIPTIN σε συγκέντρωση ίση με την τιμή IC₅₀ για 48 ώρες



Εικόνα 94: Μελέτη του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα MCF-7 μετά από επώαση με CTAB@CIPTIN σε συγκέντρωση ίση με την τιμή IC₅₀ για 48 ώρες



Εικόνα 95: Μελέτη του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα MCF-7 μετά από επώαση με SLS@DPTD σε συγκέντρωση ίση με την τιμή IC_{50} για 48 ώρες



Εικόνα 96: Μελέτη του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα MCF-7 μετά από επώαση με CTAB@DPTD σε συγκέντρωση ίση με την τιμή IC_{50} για 48 ώρες

Δ.3.9 Μελέτη διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης

Ένα από τα σημαντικότερα αποπτωτικά μονοπάτια στα κύτταρα των θηλαστικών είναι η εγγενής οδός του μηχανισμού απόπτωσης που ονομάζεται και μιτοχονδριακό μονοπάτι λόγω της καθοριστικής συμμετοχής των μιτοχονδρίων (Wang and Youle, 2009). Τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των κασπασών μέσω της απελευθέρωσης αποπτωτικών παραγόντων που υπό κανονικές συνθήκες βρίσκονται στον ενδομεμβρανικό χώρο της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το άνοιγμα του μιτοχονδριακού πόρου μετάπτωσης (mitochondrial permeability transition pore), την αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και την επακόλουθη απελευθέρωση διαλυτών πρωτεϊνών όπως του κυτοχρώματος c. Είναι γνωστό ότι η επαγωγή του μιτοχονδριακού πόρου μετάπτωσης στα καρκινικά κύτταρα αποτελεί στόχο της θεραπείας ενάντια στον καρκίνο (Kroemer et al., 2007).

Προκειμένου να ανιχνευτεί η απώλεια της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης (mitochondrial membrane permeabilization), κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν με τις νέες ενώσεις σε συγκέντρωση ίση με τις τιμές IC_{50} . Η παραπάνω τεχνική στηρίζεται στο γεγονός ότι η κατιοντική υδρόφοβη χρωστική που χρησιμοποιήθηκε συσσωρεύεται φυσιολογικά στα μιτοχόνδρια, ενώ στα κύτταρα που έχουν επωαστεί με αντικαρκινικούς παράγοντες προκαλείται άνοιγμα του μιτοχονδριακού πόρου μετάπτωσης και συνεπώς παρατηρείται μείωση των επιπέδων φθορισμού, αποδεικνύοντας την επαγωγή της απόπτωσης και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα (Banti et al., 2016).

Τα ποσοστά μείωσης των επιπέδων φθορισμού που καταγράφηκαν μετά την επώαση των κυττάρων με το CIPTIN και με μικκύλια που συντέθηκαν, συγκεντρώνονται στον **Πίνακα 14**. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι μετά την επώαση των κυττάρων με τις υπο μελέτη ουσίες, η διαπερατότητα των μιτοχονδριακών μεμβρανών των MCF-7 αυξάνεται, γίνεται απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και ενεργοποιείται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Μεταξύ των υπο μελέτη ενώσεων, το μικκύλιο CTAB@DPTD εμφανίζει τη μεγαλύτερη δράση με ποσοστό μείωσης φθορισμού 34,5 %.

Πίνακας 14: Ποσοστά (%) μείωσης του φθορισμού σε κύτταρα MCF-7 μετά από επώαση τους με τις νέες ενώσεις (συγκεντρώσεις ίσες με το IC₅₀)

Ένωση	Ποσοστό μείωσης φθορισμού (%)
CIPTIN	23,6
SLS@CIPTIN	25,9
CTAB@CIPTIN	25,5
SLS@DPTD	21,5
CTAB@DPTD	34,5
Cisplatin (Chrysouli et al., 2018)	54,9

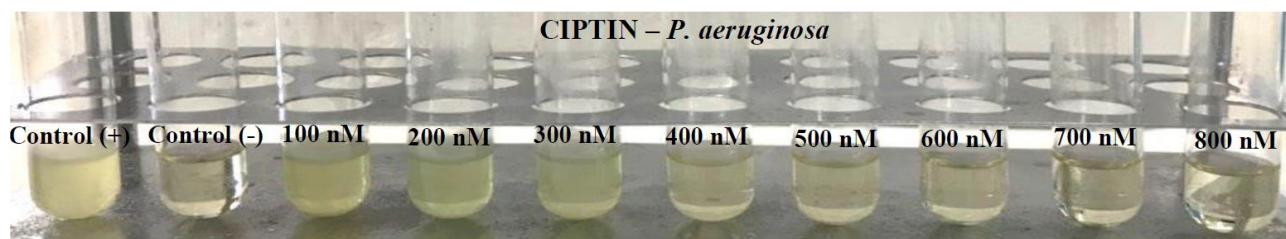
Το ευρέως χρησιμοποιούμενο μεταλλοφάρμακο cisplatin προκαλεί 54,9 % μείωση του φθορισμού αποδεικνύοντας την υψηλή δραστικότητα του cisplatin και τον αποπτωτικό μηχανισμό δράσης της. Από τις παραπάνω μελέτες γίνεται κατανοητό ότι οι νέες ενώσεις προκαλούν απόπτωση των κυττάρων μέσω μιτοχονδριακών μονοπατιών, γεγονός που αποδεικνύεται και από τις μελέτες της μορφολογίας των κυττάρων, του κατακερματισμού του πυρηνικού DNA, αλλά και από τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου.

Δ.4 Αντιμικροβιακές μελέτες

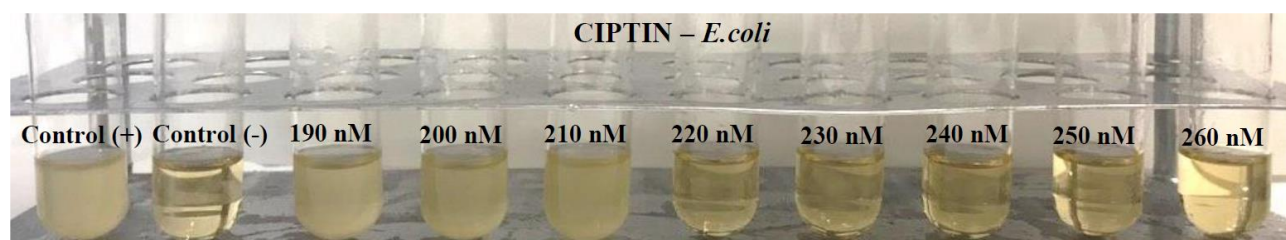
Δ.4.1 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC)

Ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) πραγματοποιήθηκε έναντι των Gram (-) βακτηρίων (*P. aeruginosa* και *E. coli*) και των Gram (+) βακτηρίων *S. aureus* και *S. epidermidis*. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν εμπλέκονται στο πρόβλημα της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Η τιμή MIC ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση ενός αντιμικροβιακού παράγοντα που απαιτείται για την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης. Η αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης επιβεβαιώνεται μετά από μέτρηση της οπτικής πυκνότητας

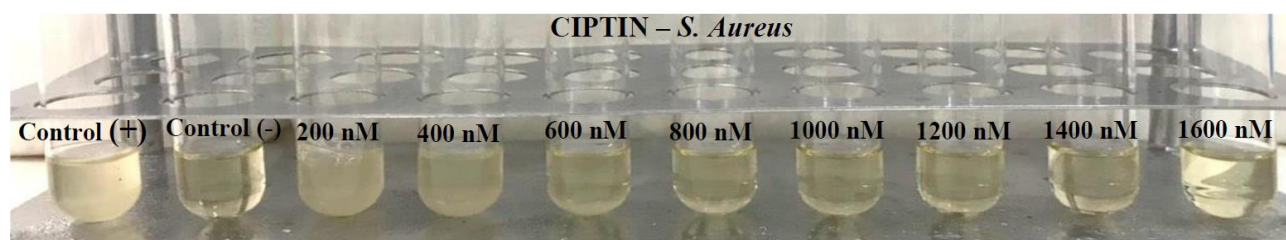
του διαλύματος. Στην παρούσα διατριβή προσδιορίστηκαν οι τιμές MIC των ενώσεων CIPTIN, HCIP, DPTD, καθώς και των μικκυλίων SLS@CIPTIN, CTAB@CIPTIN, SLS@DPTD και CTAB@DPTD (Εικόνα 97 - Εικόνα 103).



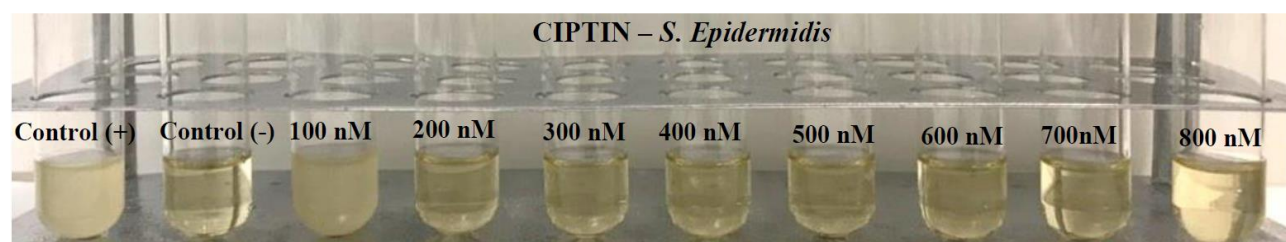
(A)



(B)

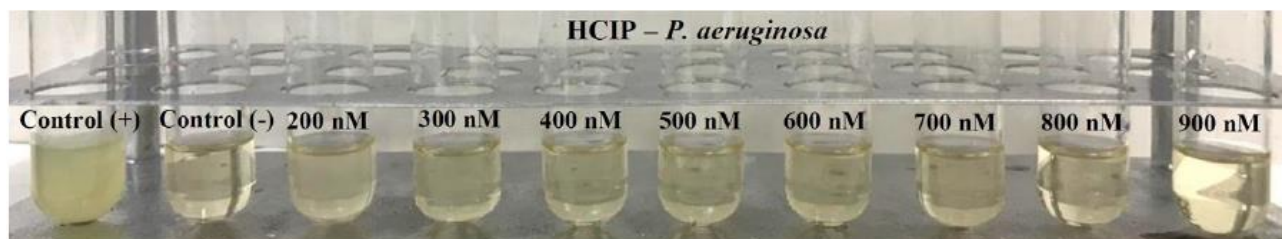


(Γ)

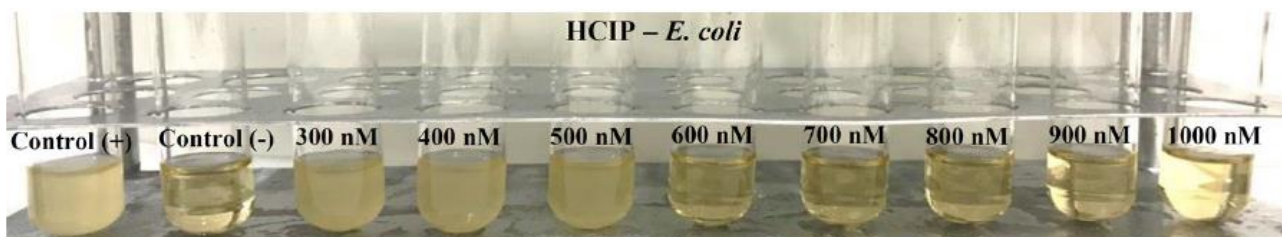


(Δ)

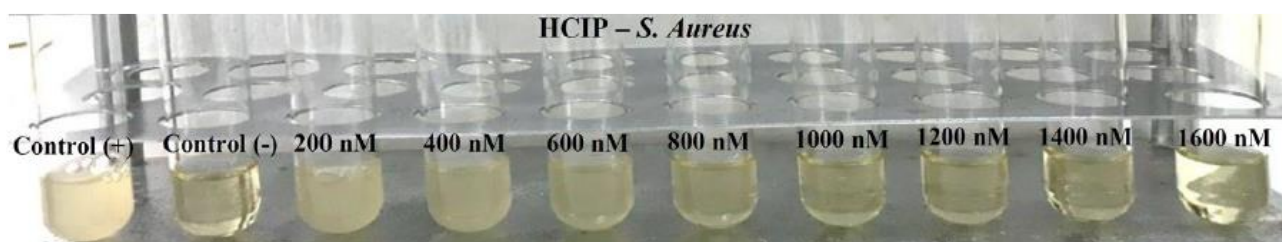
Εικόνα 97: Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του CIPTIN έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



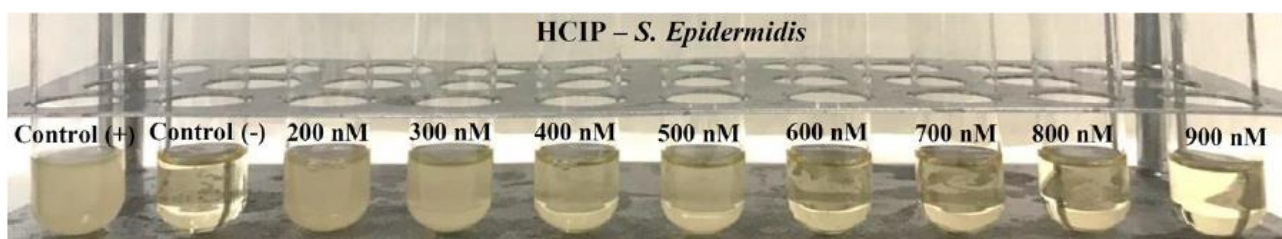
(A)



(B)

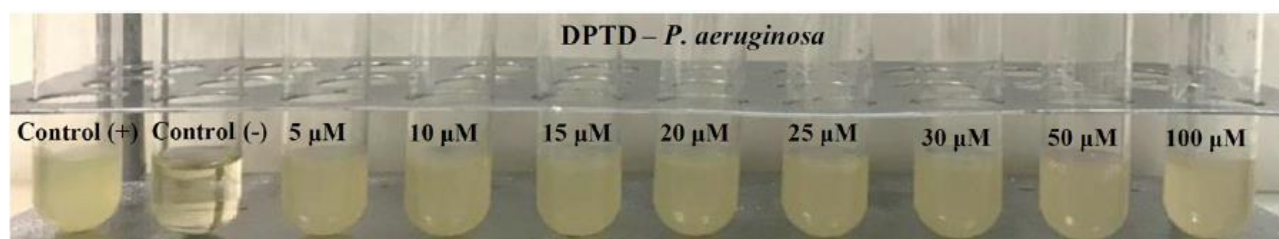


(Γ)

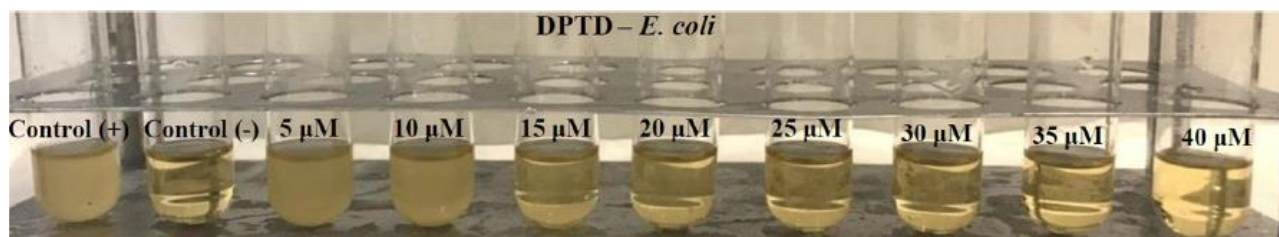


(Δ)

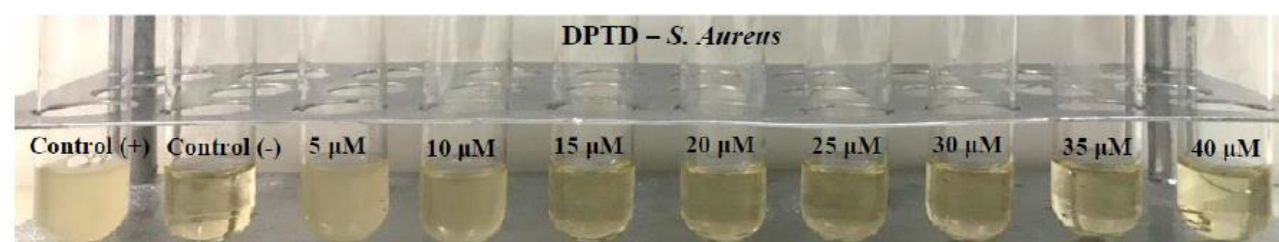
Εικόνα 98: Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης της HCIP έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



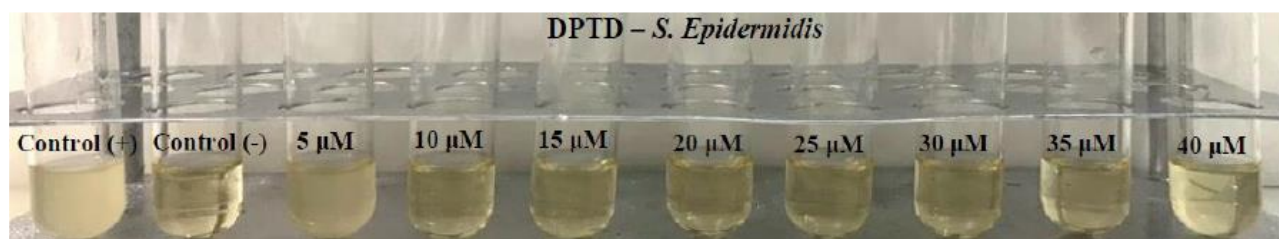
(A)



(B)

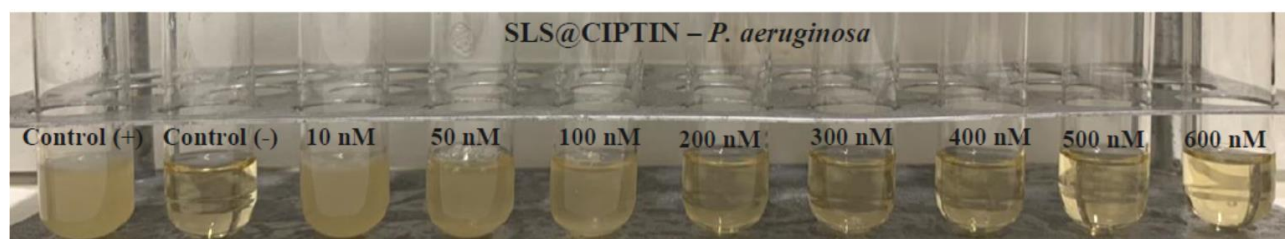


(Γ)

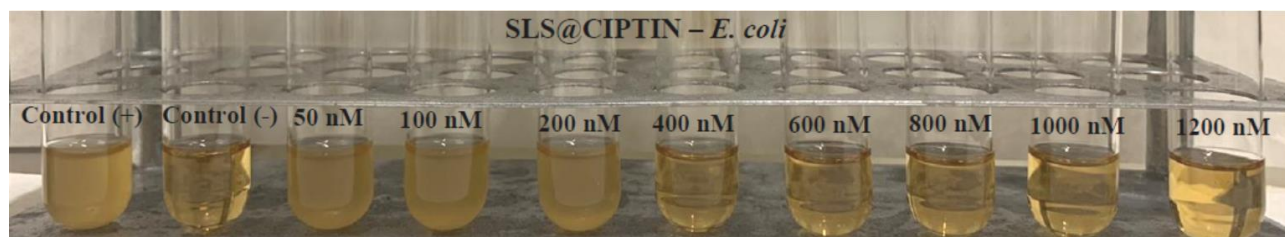


(Δ)

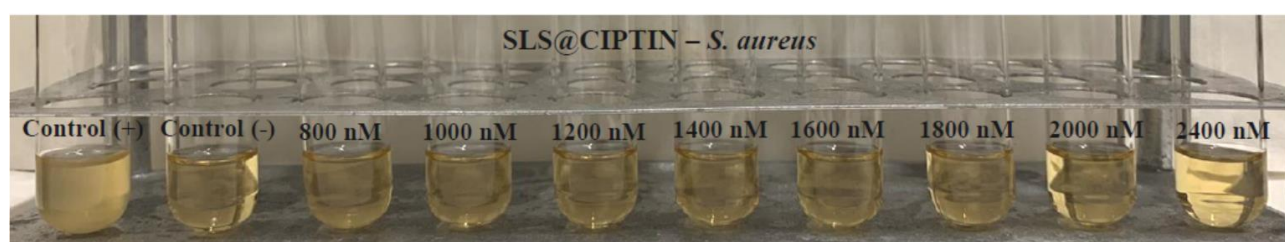
Εικόνα 99: Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του DPTD έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



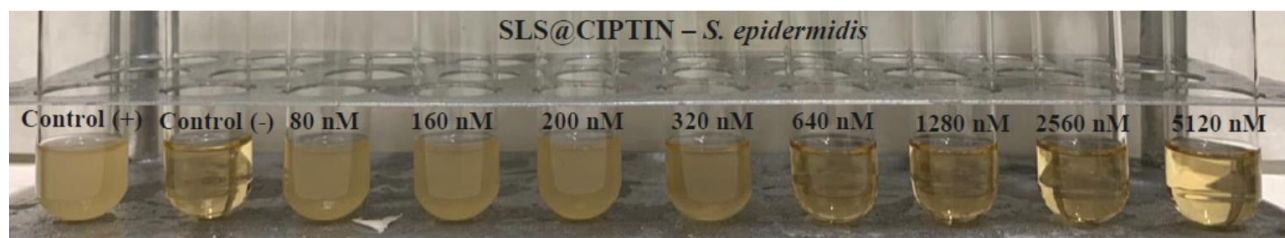
(A)



(B)

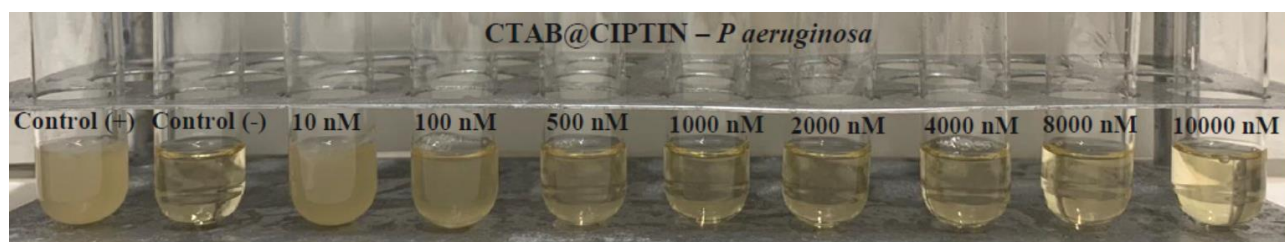


(Γ)

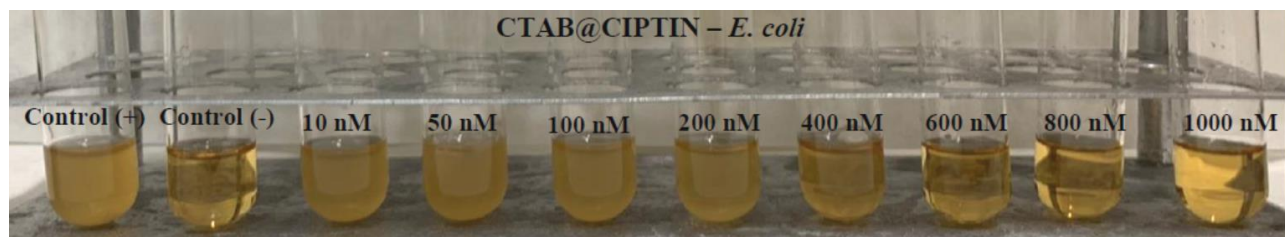


(Δ)

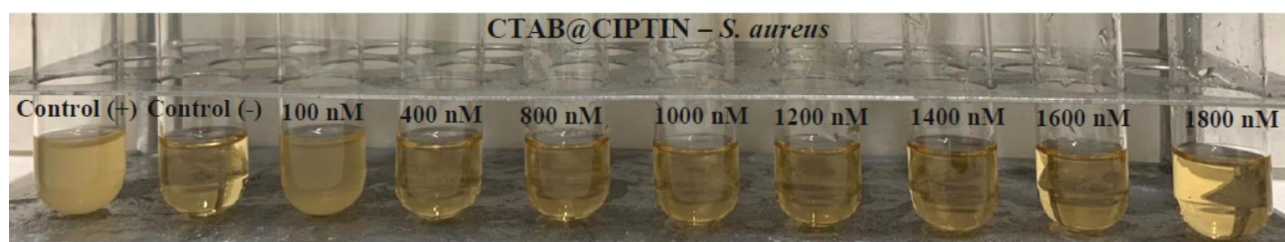
Εικόνα 100: Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του SLS@CIPTIN έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



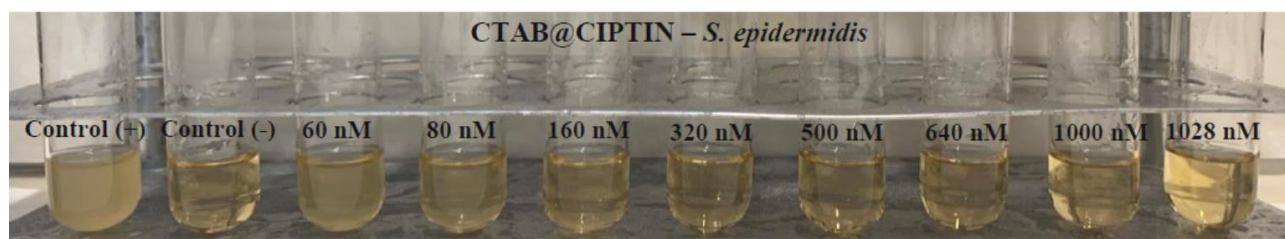
(A)



(B)

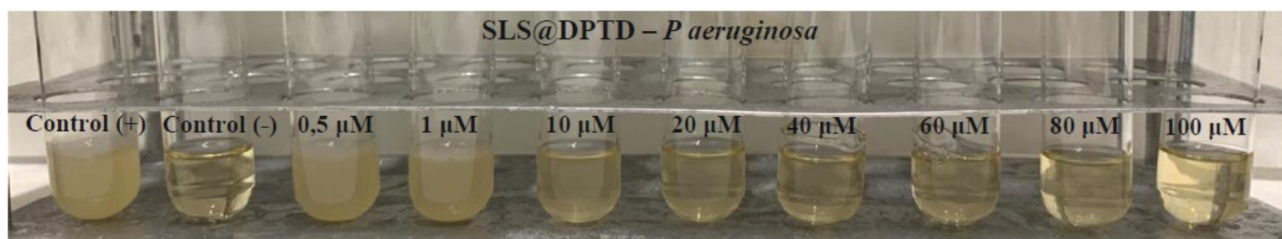


(Γ)

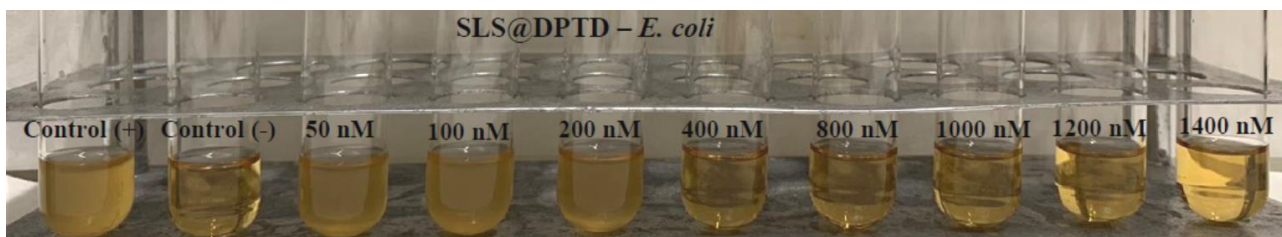


(Δ)

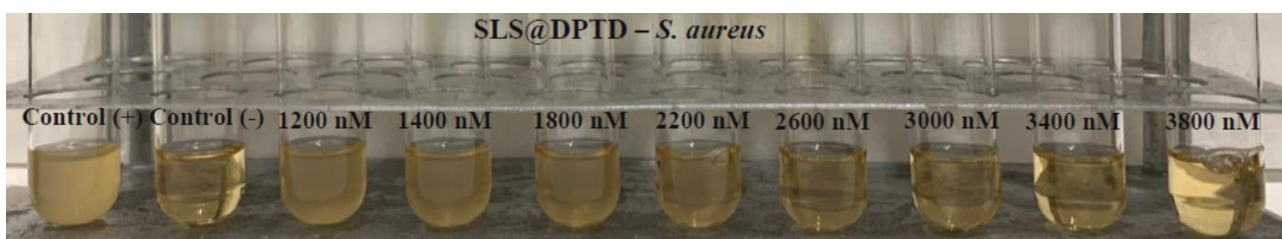
Εικόνα 101: Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του CTAB@CIPTIN έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



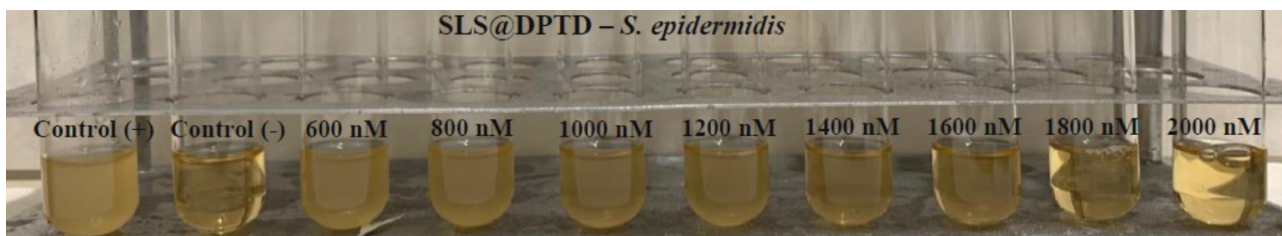
(A)



(B)

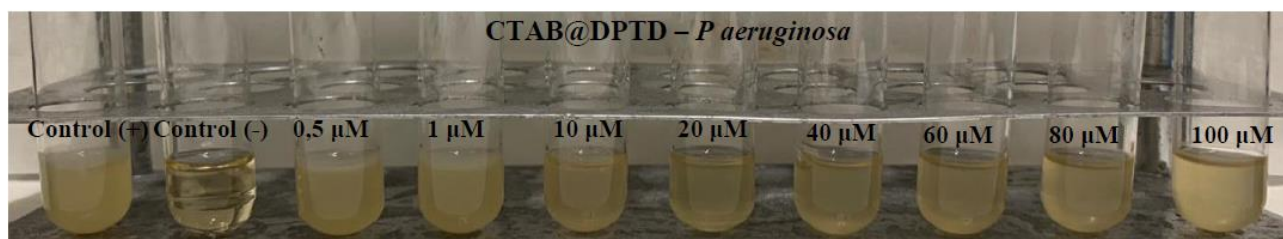


(Γ)

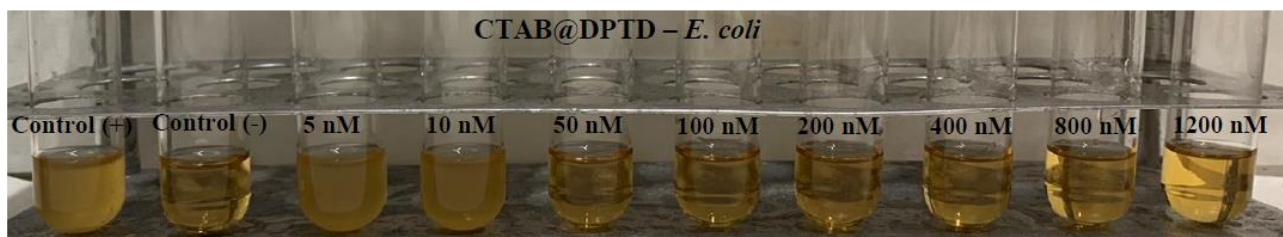


(Δ)

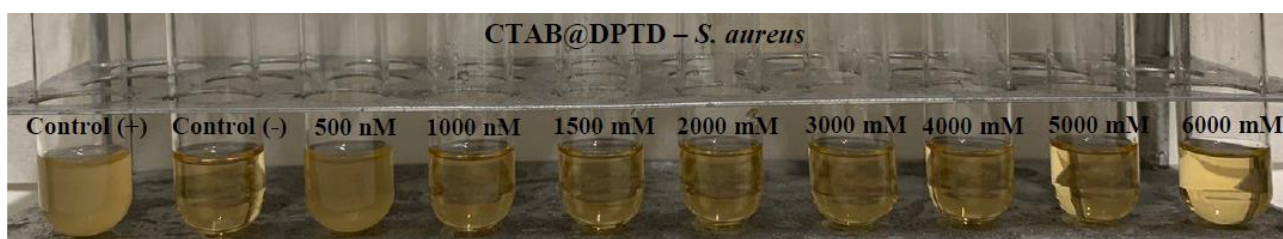
Εικόνα 102: Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του SLS@DPTD έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



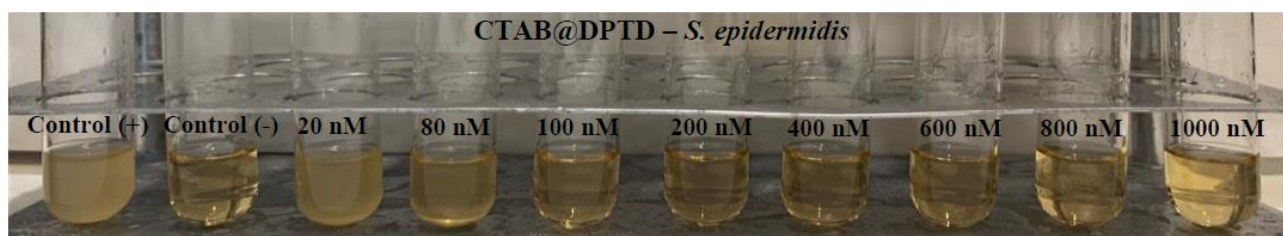
(A)



(B)



(Γ)



(Δ)

Εικόνα 103: Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του CTAB@DPTD έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)

Από τον Πίνακα 15 προκύπτει ότι οι τιμές MIC του CIPTIN βρίσκονται στη νάνο-κλίμακα έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* και *S. epidermidis* ($0,741 \pm 0,035$, $0,301 \pm 0,062$, $1,179 \pm 0,083$ και $0,255 \pm 0,041$ μM , αντίστοιχα). Οι αντίστοιχες τιμές MIC της εμπορικά διαθέσιμης υδροχλωριωμένης σιπροφλοξασίνης και του εσωτερικού άλατος του αντιβιοτικού είναι: $1,174 \pm 0,221$ μM και $1,048 \pm 0,037$ μM (*P. aeruginosa*), $0,938 \pm 0,347$ μM και $0,443 \pm 0,041$ μM (*E. coli*), $1,454 \pm 0,123$ μM και $1,459 \pm 0,013$ μM (*S. aureus*) και $1,079 \pm 0,121$ μM και $0,699 \pm 0,025$ μM (*S. epidermidis*), αντίστοιχα. Οι τιμές MIC του DPTD, από την άλλη πλευρά, βρίσκονται στη μικρο-κλίμακα έναντι των βακτηριακών στελεχών *P. aeruginosa* (> 100 μM), *E. coli* ($25,713 \pm 1,535$ μM), *S. aureus* ($47,529 \pm 8,761$ μM) και *S. epidermidis* ($13,743 \pm 0,263$ μM).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι το νέο μεταλλοφάρμακο CIPTIN εμφανίζει 1,2 έως 4,2 φορές ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση από εκείνη της HCIP·HCl και της HCIP έναντι και των Gram (-) και των Gram (+) βακτηρίων. Η ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση του CIPTIN εμφανίζεται έναντι του *S. epidermidis*, η οποία είναι έως και 4,2 φορές υψηλότερη από αυτή της υδροχλωριωμένης σιπροφλοξασίνης και έως και 2,7 φορές υψηλότερη από αυτή του εσωτερικού άλατος της σιπροφλοξασίνης. Επιπλέον, η αντιμικροβιακή δράση του CIPTIN είναι έως και 135 φορές ισχυρότερη από τη δράση του DPTD έναντι των βακτηρίων που μελετήθηκαν. Επομένως, το CIPTIN παρουσιάζει ενισχυμένη αντιμικροβιακή δράση σε σύγκριση με εκείνη των πρόδρομων μορίων του (σιπροφλοξασίνη και DPTD).

Όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση των νέων μικκυλιακών δομών στις οποίες εγκολώθηκε το CIPTIN, παρατηρούμε ότι η δράση τους βελτιώνεται έναντι του βακτηρίου *P. aeruginosa*. Πιο συγκεκριμένα, το μικκύλιο SLS@CIPTIN εμφανίζει 2,4 φορές ισχυρότερη δράση, ενώ το μικκύλιο CTAB@CIPTIN εμφανίζει 1,3 φορές ισχυρότερη δράση από το CIPTIN έναντι του *P. aeruginosa*. Με το σχηματισμό των μικκυλίων του DPTD, η αντιμικροβιακή δράση του διφαινυλοδιχλωρου κασσιτέρου ενισχύεται έναντι των βακτηρίων *E. coli*, *S. aureus* και *S. epidermidis*. Το μικκύλιο SLS@CIPTIN εμφανίζει 61,4 φορές υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση έναντι της *E. coli*, 17,9 φορές έναντι του *S. aureus* και 7,4 φορές έναντι του *S. epidermidis*. Η

αντιμικροβιακή δράση του DPTD ενισχύεται και μετά από τον σχηματισμό των μικκυλίων CTAB@CIPTIN, 314 φορές έναντι της *E. coli*, 26 φορές έναντι του *S. aureus* και 60 φορές έναντι του *S. epidermidis*.

Σύμφωνα με τους Shungu et al., ένα μικρόβιο θεωρείται ευαίσθητο σε ένα αντιμικροβιακό παράγοντα όταν η τιμή MIC είναι μικρότερη από 50 μM , ενώ όταν η τιμή MIC είναι μεγαλύτερη από 100 μM , ο μικροοργανισμός θεωρείται ανθεκτικός έναντι του παράγοντα. Συνεπώς, τα βακτήρια που μελετήθηκαν είναι ευαίσθητα σε όλες τις ενώσεις που συντέθηκαν στην παρούσα διατριβή, με εξαίρεση το βακτήριο *P. aeruginosa* που είναι ανθεκτική στα μικκύλια που εγκολλώνουν DPTD.

Πίνακας 15: Τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του CIPTIN, των μικκυλίων και των ligands έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* και *S. epidermidis*

Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (μM)					
Ένωση	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	Βιβλιογραφία
CIPTIN	$0,741 \pm 0,035$	$0,301 \pm 0,062$	$1,179 \pm 0,083$	$0,255 \pm 0,041$	
SLS@CIPTIN	$0,314 \pm 0,033$	$0,608 \pm 0,036$	$2,433 \pm 0,239$	$0,854 \pm 0,079$	
CTAB@CIPTIN	$0,559 \pm 0,134$	$0,695 \pm 0,032$	$1,121 \pm 0,061$	$0,263 \pm 0,009$	
SLS@DPTD	>100	$0,419 \pm 0,084$	$2,654 \pm 0,237$	$1,865 \pm 0,102$	
CTAB@DPTD	>100	$0,082 \pm 0,007$	$1,827 \pm 0,073$	$0,229 \pm 0,060$	
HCIP·HCl	$1,174 \pm 0,221$	$0,938 \pm 0,347$	$1,454 \pm 0,123$	$1,079 \pm 0,121$	Milionis et al., 2018
HCIP	$1,048 \pm 0,037$	$0,443 \pm 0,041$	$1,459 \pm 0,013$	$0,699 \pm 0,025$	
DPTD	>100	$25,713 \pm 1,535$	$47,529 \pm 8,761$	$13,743 \pm 0,263$	
SLS	>250	$39,80 \pm 0,60$	$49,70 \pm 0,40$	$42,90 \pm 6,20$	Karetsi et al., 2019
CTAB	>300	$5,08 \pm 1,11$	$0,36 \pm 0,09$	$1,95 \pm 0,36$	Meretoudi et al., 2020

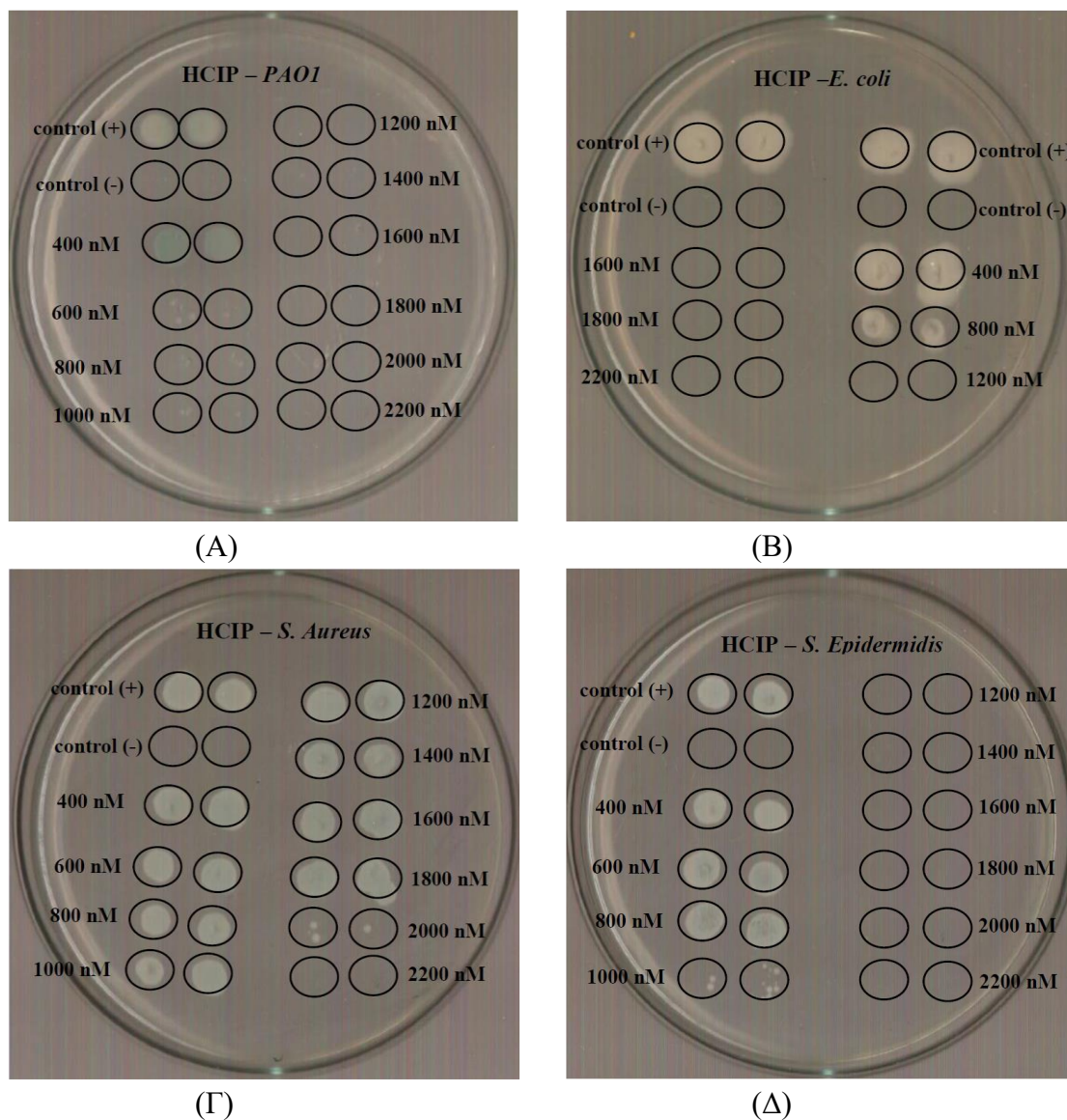
Δ.4.2 Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης (MBC)

Για τον προσδιορισμό της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης (MBC) έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* και *S. epidermidis* τα βακτήρια αρχικά καλλιεργήθηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων σε υγρό θρεπτικό για 20 ώρες. Έπειτα, μια ποσότητα από το υγρό θρεπτικό μεταφέρεται σε τρυβλίο με κατάλληλο στερεό θρεπτικό υλικό και η βακτηριοστατική δράση εμφανίζεται στη συγκέντρωση που δεν παρατηρείται σχηματισμός αποικιών. Έτσι, η τιμή MBC ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία οι υπό μελέτη ενώσεις προκαλούν πλήρη αναστολή της ανάπτυξης των μικροβίων (**Εικόνα 104- Εικόνα 110**).

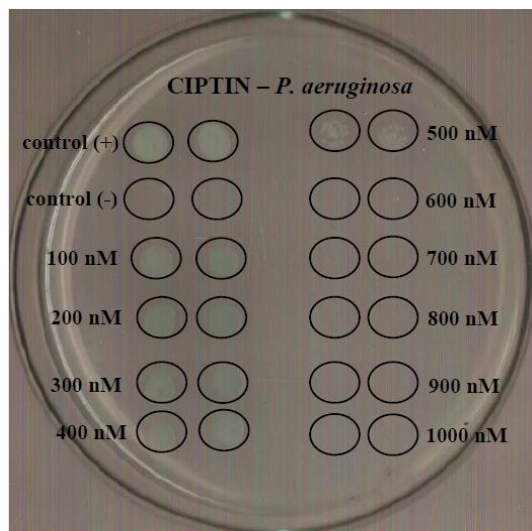
Οι τιμές MBC του CIPTIN έναντι των Gram (-) βακτηρίων *P. aeruginosa* και *E. coli* είναι $0,800 \pm 0,195 \mu\text{M}$ και $0,445 \pm 0,040 \mu\text{M}$ αντίστοιχα, και έναντι των Gram (+) βακτηρίων *S. aureus* και *S. epidermidis* είναι $1,600 \pm 0,110 \mu\text{M}$ και $0,667 \pm 0,045 \mu\text{M}$, αντίστοιχα (**Πίνακας 16**). Οι αντίστοιχες τιμές MBC της HCIP·HCl και του εσωτερικού άλατος HCIP είναι $1,200\text{--}2,225 \mu\text{M}$ έναντι και των Gram (-) και των Gram (+) βακτηρίων (**Πίνακας 16**). Επιπλέον, οι τιμές MBC που υπολογίστηκαν για τον DPTD είναι μεγαλύτερες από $100 \mu\text{M}$ έναντι όλων των βακτηριακών στελεχών που μελετήθηκαν (**Εικόνα 106**). Συνεπώς, το νέο μεταλλοφάρμακο CIPTIN εμφανίζει μέχρι και 3,6 φορές μεγαλύτερη βακτηριοστατική δράση από την HCIP·HCl και μέχρι 2,8 φορές μεγαλύτερη βακτηριοστατική δράση από το HCIP, ενώ ο DPTD δεν εμφανίζει βακτηριοστατική δράση στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν.

Όσον αφορά τα μικκύλια στα οποία ενθυλακώθηκε το CIPTIN, παρατηρούμε ότι η βακτηριοστατική δράση του φαρμάκου ενισχύεται έναντι του βακτηρίου *P. aeruginosa*, αφού οι τιμές MBC υπολογίστηκαν $0,520 \pm 0,052 \mu\text{M}$ και $0,630 \pm 0,103 \mu\text{M}$, αντίστοιχα. Επιπλέον, το μικκύλιο CTAB@CIPTIN εμφανίζει μεγαλύτερη βακτηριοστατική δράση έναντι του *S. epidermidis* σε σύγκριση με το CIPTIN. Οι τιμές MBC για το μικκύλιο SLS@DPTD υπολογίστηκαν $0,900 \pm 0,115 \mu\text{M}$ έναντι της *E. coli*, $5,083 \pm 0,204 \mu\text{M}$ έναντι του *S. aureus*, και $2,867 \pm 0,230 \mu\text{M}$ έναντι του *S. epidermidis*. Οι αντίστοιχες τιμές για το μικκύλιο CTAB@DPTD είναι $0,320 \pm 0,164 \mu\text{M}$, $3,188 \pm 0,458 \mu\text{M}$ και $1,2 \pm 0,000 \mu\text{M}$. Συνεπώς, η βακτηριοστατική δράση του DPTD ενισχύεται

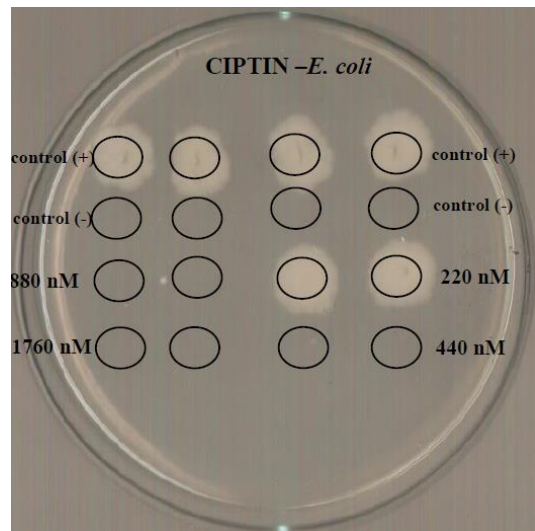
τουλάχιστον 111, 19,8 και 34,9 φορές έναντι των βακτηρίων *E. coli*, *S. aureus* και *S. epidermidis* αντίστοιχα, μετά τον σχηματισμό των μικκυλίων με τους επιφανειοδραστικούς παράγοντες SLS και CTAB.



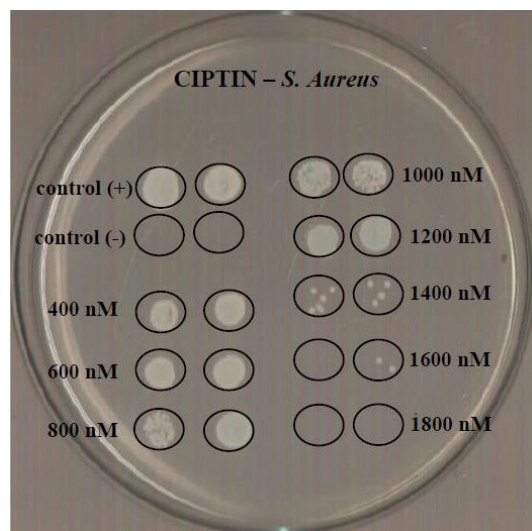
Εικόνα 104: Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης της HCIP έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (Α), *E. coli* (Β), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



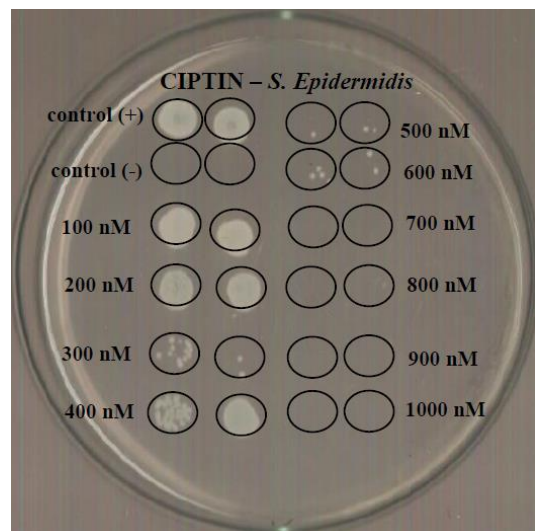
(A)



(B)

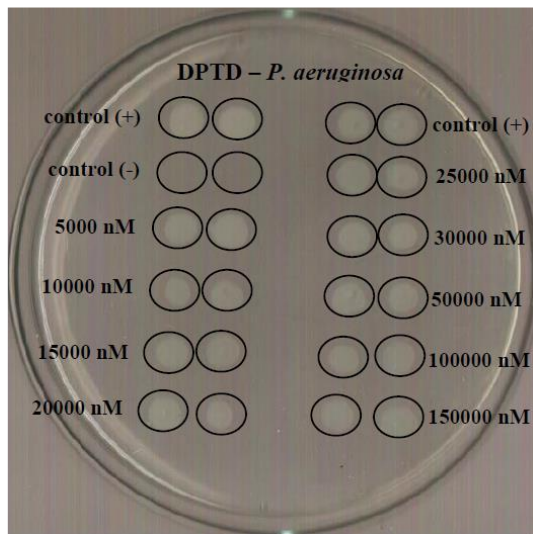


(Γ)

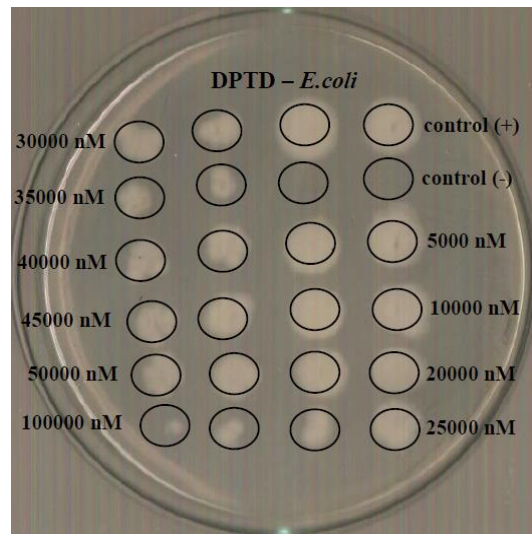


(Δ)

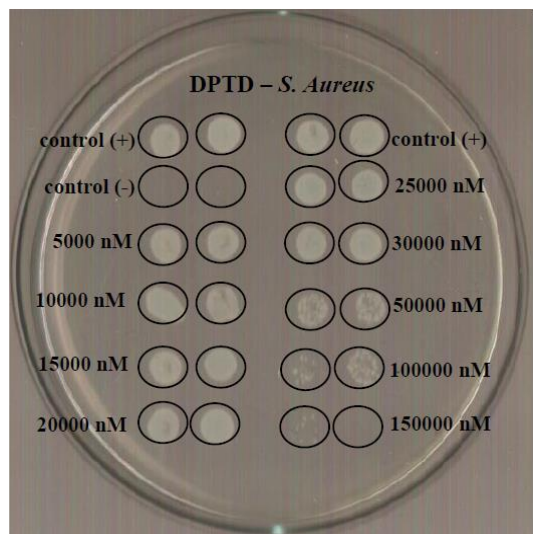
Εικόνα 105: Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης του CIPTIN έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



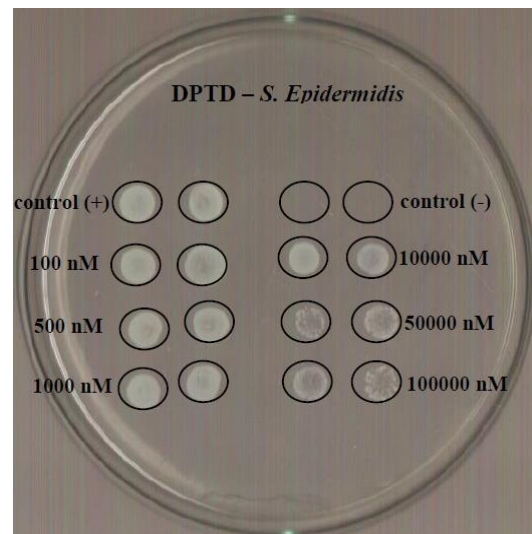
(A)



(B)

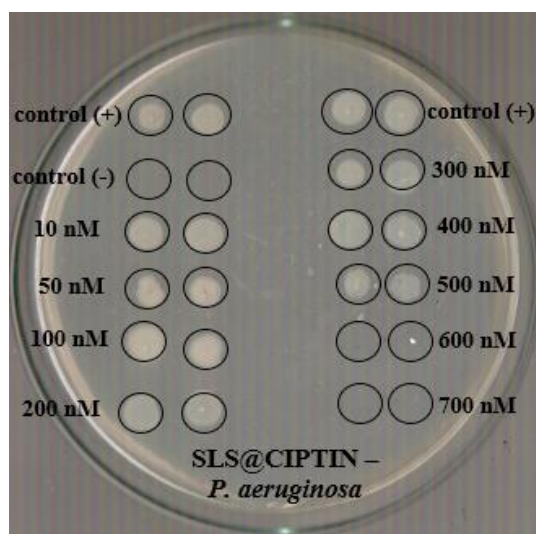


(Γ)

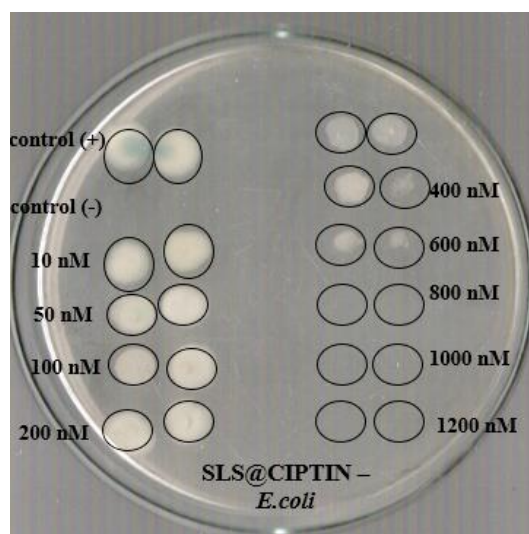


(Δ)

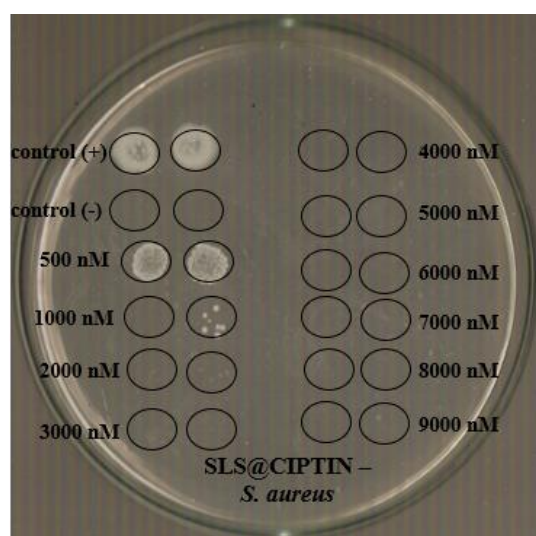
Εικόνα 106: Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης του DPTD έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



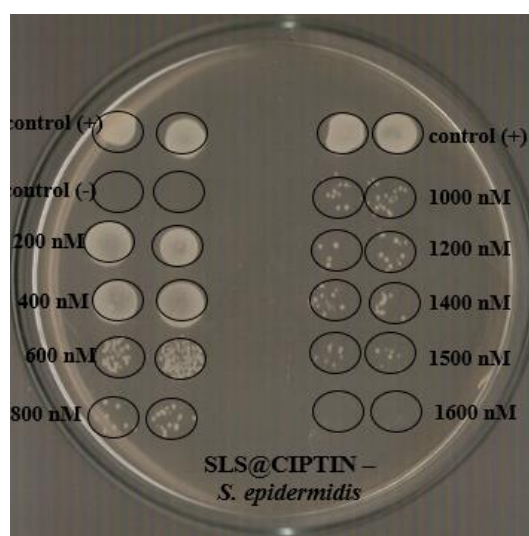
(A)



(B)

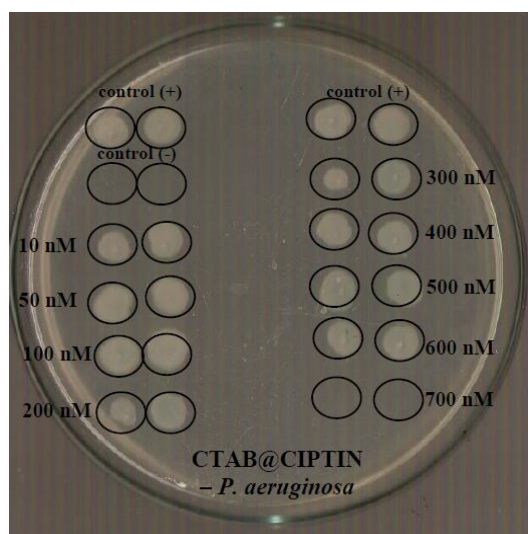


(Γ)

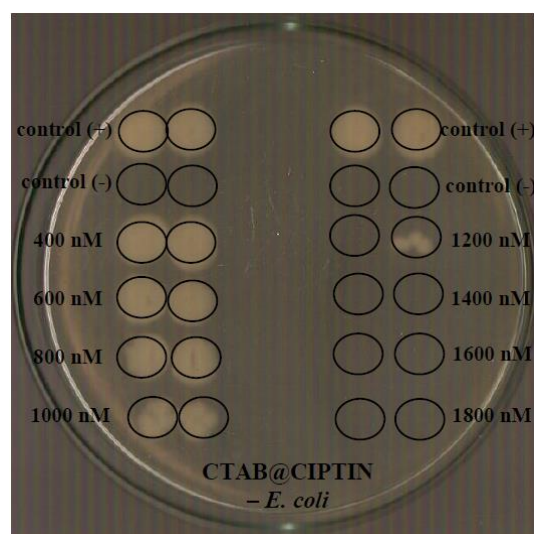


(Δ)

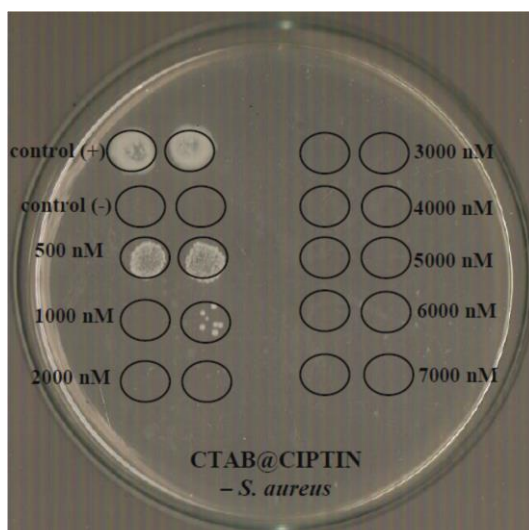
Εικόνα 107: Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης του SLS@CIPTIN έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



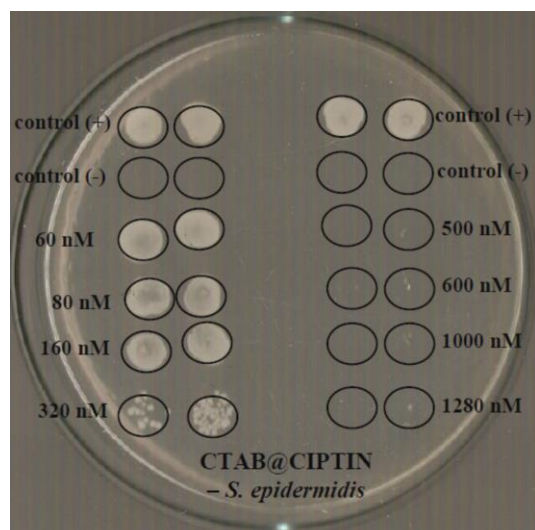
(A)



(B)

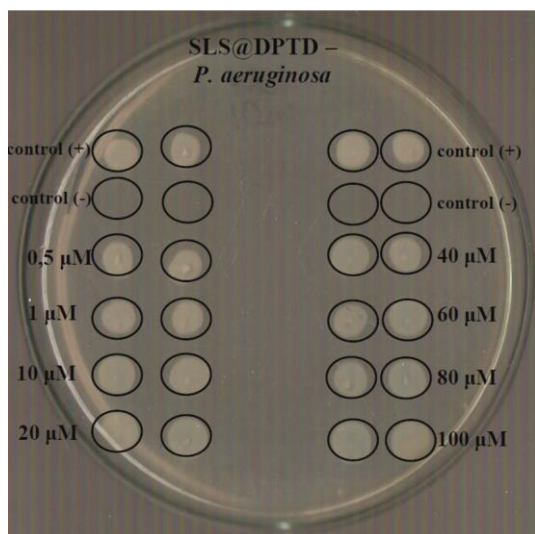


(Γ)

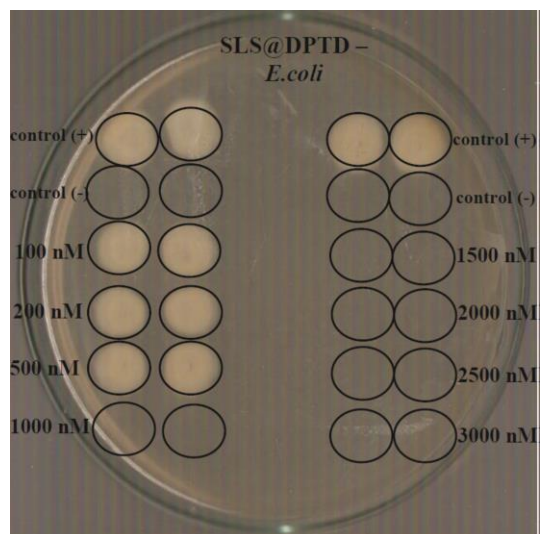


(Δ)

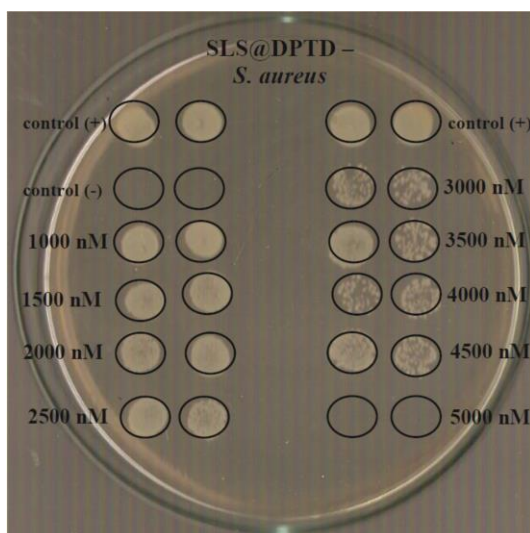
Εικόνα 108: Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης του CTAB@CIPTIN έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



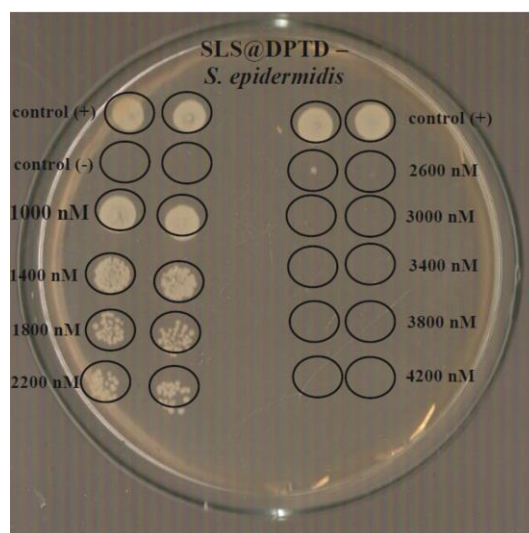
(A)



(B)

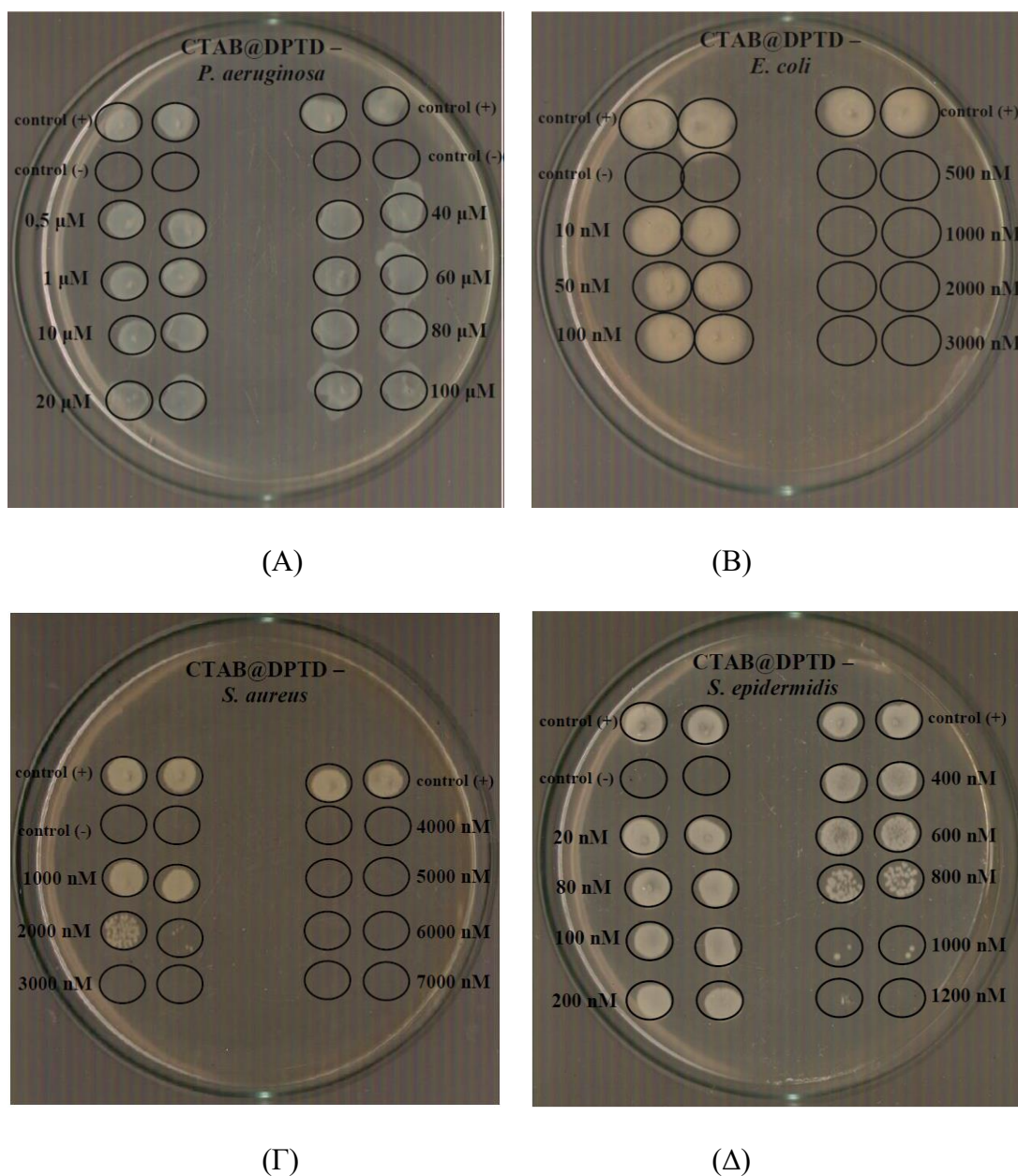


(Γ)



(Δ)

Εικόνα 109: Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης του SLS@DPTD έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



Εικόνα 110: Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης του CTAB@DPTD έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ένας αντιμικροβιακός παράγοντας είναι βακτηριοκτόνος όταν το πηλίκο MBC/MIC είναι μικρότερο ή ίσο του 2 και σημαίνει ότι ο παράγοντας σκοτώνει το 99,9 % των βακτηρίων, ενώ όταν το πηλίκο είναι μεγαλύτερο ή ίσο του 4 ο παράγοντας είναι

βακτηριοστατικός και αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων χωρίς όμως να τα θανατώνει. Μετά τον υπολογισμό των MBC/MIC για κάθε ένωση, αποδεικνύεται ότι το CIPTIN και το μικκύλιο CTAB@CIPTIN έχει βακτηριοκτόνο δράση έναντι όλων των βακτηρίων που μελετήθηκαν εκτός του *S. epidermidis*, ενώ το μικκύλιο SLS@CIPTIN είναι βακτηριοκτόνο έναντι όλων των μικροβίων. (Πίνακας 17). Επίσης, το μικκύλιο SLS@DPTD είναι βακτηριοκτόνο έναντι των Gram (+) βακτηρίων *S. aureus* και *S. epidermidis* και το μικκύλιο CTAB@DPTD έναντι του *S. aureus*. Αντίθετα, ο DPTD δεν εμφανίζει βακτηριοκτόνο δράση έναντι των βακτηρίων που μελετήθηκαν γεγονός που επιβεβαιώνει την ενίσχυση της αντιμικροβιακής δράσης του DPTD, μετά τον σχηματισμό των μικκυλιακών δομών.

Πίνακας 16: Τιμές ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης του CIPTIN, των μικκυλίων και των ligands έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* και *S. epidermidis*

Ελάχιστη βακτηριοστατική συγκέντρωση (μM)					
Ένωση	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	Βιβλιογραφία
CIPTIN	0,800 ± 0,195	0,445 ± 0,040	1,600 ± 0,110	0,667 ± 0,045	
SLS@CIPTIN	0,520 ± 0,052	0,700 ± 0,110	3,200 ± 1,095	1,540 ± 0,300	
CTAB@CIPTIN	0,630 ± 0,103	1,025 ± 0,071	1,800 ± 0,245	0,547 ± 0,070	
SLS@DPTD	> 100	0,900 ± 0,115	5,083 ± 0,204	2,867 ± 0,230	
CTAB@DPTD	> 100	0,320 ± 0,164	3,188 ± 0,458	1,2 ± 0,000	
HCIP·HCl	1,6	1,624 ± 0,127	2,000	1,600	Milionis et al., 2018
HCIP	1,280 ± 0,096	1,250 ± 0,098	2,225 ± 0,050	1,200 ± 0,160	
DPTD	> 100	> 100	> 100	> 100	
SLS	>250	>250	100	60	Karetsi et al., 2019
CTAB	>300	150,0 ± 40,0	5,30 ± 0,70	10,0 ± 0,0	Meretoudi et al., 2020

Πίνακας 17: Τιμές MBC/MIC του CIPTIN, των μικκυλίων και των ligands έναντι των βακτηρίων

P. aeruginosa, *E. coli*, *S. aureus* και *S. epidermidis*

MBC/MIC				
Ένωση	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
CIPTIN	1,08	1,48	1,36	2,62
SLS@CIPTIN	1,66	1,15	1,32	1,80
CTAB@CIPTIN	1,13	1,47	1,61	2,08
SLS@DPTD	-	2,15	1,92	1,54
CTAB@DPTD	-	3,90	1,74	5,24
HCIP·HCl	1,36	1,73	1,38	1,48
HCIP	1,22	2,82	1,53	1,72
DPTD	-	-	-	-

Δ.4.3 Προσδιορισμός ζωνών αναστολής (IZs)

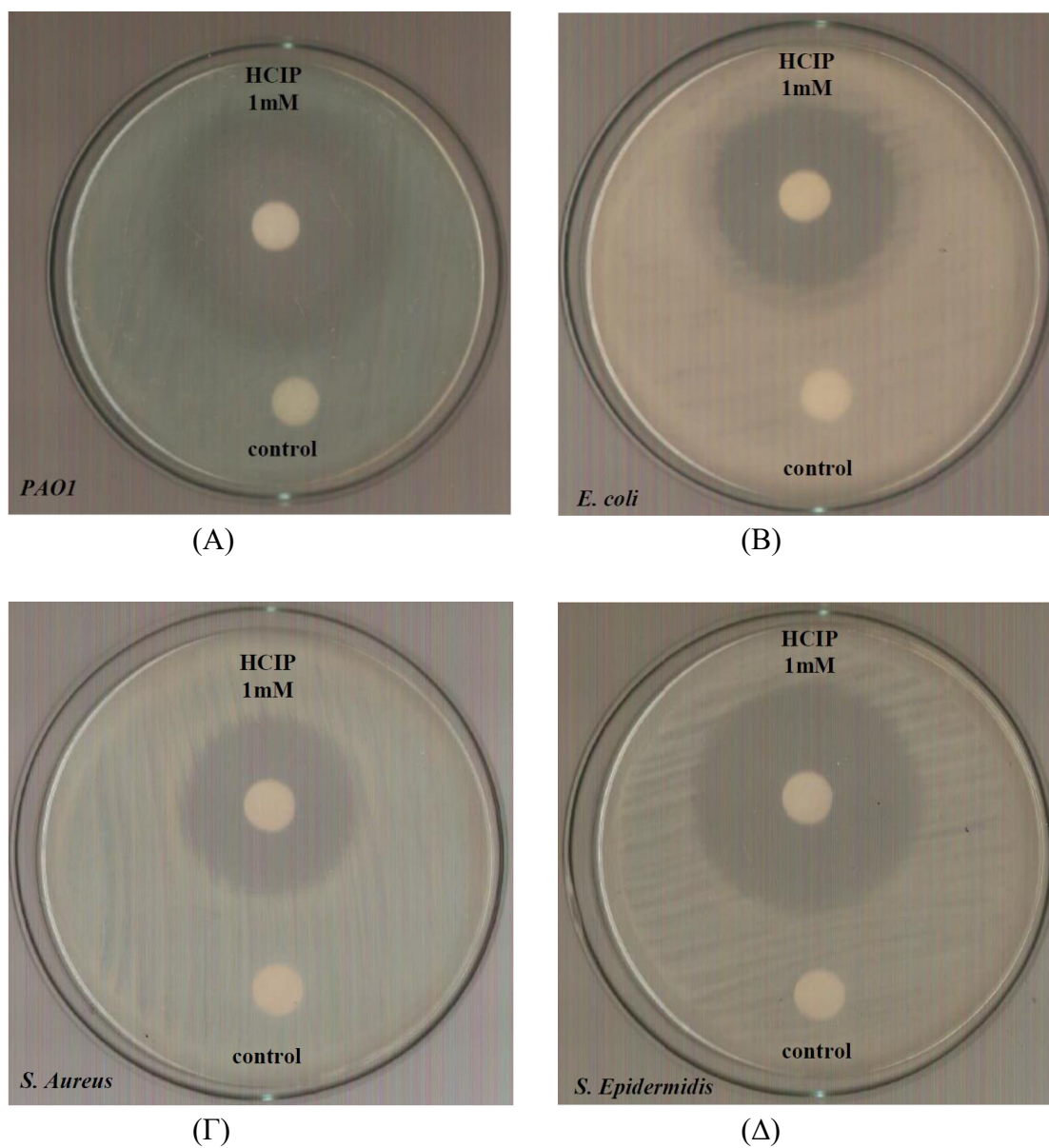
Η αντιμικροβιακή δράση των ενώσεων που συντέθηκαν αξιολογήθηκε και ως προς την ικανότητά τους να δημιουργούν ζώνες αναστολής με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ. Με την τεχνική αυτή ελέγχθηκε η ευαισθησία των βακτηρίων *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* και *S. epidermidis* έναντι των νέων ενώσεων και στη συνέχεια συγκρίθηκε με αυτή των πρόδρομων ουσιών (**Εικόνα 111- Εικόνα 117**). Για τον προσδιορισμό των ζωνών αναστολής, χάρτινοι δίσκοι εμποτίζονται με τις υπο μελέτη ουσίες και στη συνέχεια μεταφέρονται σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό που προηγουμένως έχουν επιστρωθεί με τα βακτηριακά στελέχη (10^8 cfu/mL). Στη συνέχεια τα βακτήρια επωάζονται και γύρω από το δίσκο αναπτύσσεται μια ορατή περιοχή χωρίς βακτηριακές αποικίες στην περίπτωση που η υπό μελέτη ένωση σταματάει την ανάπτυξη ή θανατώνει τα βακτηριακά κύτταρα. Αυτή η ορατή περιοχή ονομάζεται ζώνη αναστολής (IZ) και η διάμετρος της χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας ενός αντιβιοτικού (Bonev et al., 2008).

Με βάση τη διάμετρο των ζωνών αναστολής που σχηματίζεται μετά από επώαση των μικροβίων με αντιμικροβιακούς παράγοντες, τα βακτηριακά στελέχη μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 3 ομάδες (Shungu et al., 1983). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα βακτήρια στα οποία η ζώνη που σχηματίζεται είναι μεγαλύτερη ή ίση από 17 mm ($IZ \geq 17$ mm) και θεωρούνται ευαίσθητα στον αντιμικροβιακό παράγοντα. Στην δεύτερη κατηγορία κατατάσσονται τα ενδιάμεσα βακτηριακά στελέχη όπου ο παράγοντας προκαλεί ζώνη αναστολής από 13 έως 16 mm ($13 \leq IZ \leq 16$ mm) και στην τρίτη κατηγορία τα μικρόβια που είναι ανθεκτικά στον αντιμικροβιακό παράγοντα και η ζώνη αναστολής που σχηματίζεται είναι μικρότερη ή ίση από 12 mm ($IZ \leq 12$ mm).

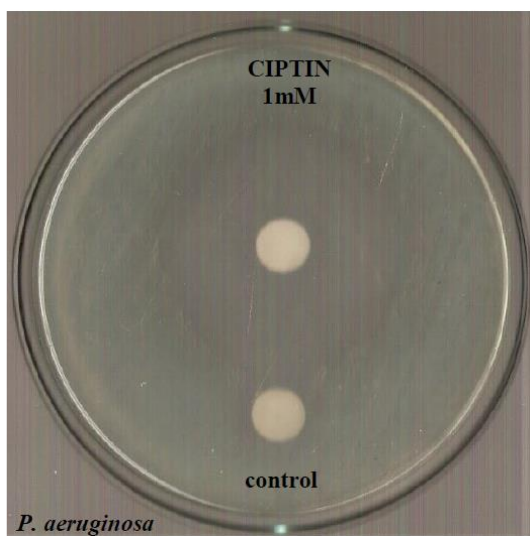
Οι ζώνες αναστολής που μετρήθηκαν για το νέο μεταλλοφάρμακο CIPTIN είναι ίσες με: $40,8 \pm 1,5$ mm έναντι της *P. aeruginosa*, $34,0 \pm 0,8$ mm έναντι της *E. coli*, $36,0 \pm 1,1$ mm έναντι του *S. aureus* και $42,7 \pm 0,8$ mm έναντι του *S. epidermidis* (**Πίνακας 18**). Άρα, τα Gram (-) και Gram (+) βακτήρια που μελετήθηκαν θεωρούνται ευαίσθητα στο CIPTIN (**Εικόνα 112**). Αντίστοιχα, τα βακτήρια είναι ευαίσθητα στην HCIP·HCl και το άλας HCIP, αφού οι ζώνες αναστολής που δημιουργήθηκαν για αυτές τις ενώσεις είναι από 32,0 έως 35,5 mm έναντι των Gram (-) βακτηρίων και από 24,0 έως 39,2 mm έναντι των Gram (+) βακτηρίων (**Πίνακας 18**). Οι αντίστοιχες τιμές των ζωνών αναστολής που υπολογίστηκαν για τον DPTD είναι μεταξύ των 10,0 και 18,7 mm έναντι των βακτηρίων που μελετήθηκαν και για αυτό τα βακτηριακά στελέχη ταξινομούνται ως ανθεκτικά ή ενδιάμεσα έναντι του DPTD. Γενικά, παρατηρούμε ότι η δράση του CIPTIN είναι ισχυρότερη από αυτή των πρόδρομων ενώσεων του, αφού προκαλεί μεγαλύτερες ζώνες αναστολής έναντι και των Gram (-) και των Gram (+) βακτηρίων, σε σύγκριση με το εμπορικά διαθέσιμο αντιβιοτικό και τον DPTD.

Οι ζώνες αναστολής που προκαλεί το μικκύλιο SLS@CIPTIN είναι $43,8 \pm 0,5$ mm, $40,3 \pm 1,3$ mm, $34,3 \pm 1,2$ mm και $39,7 \pm 1,5$ mm έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* και *S. epidermidis*, αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες ζώνες αναστολής που σχηματίζονται μετά από επώαση με το μικκύλιο CTAB@CIPTIN υπολογίστηκαν: $43,3 \pm 0,5$ mm, $33,3 \pm 1,0$ mm, $34,3 \pm 0,5$ mm και $40,5 \pm 1,7$ mm (**Πίνακας 18**). Από τις παραπάνω τιμές αποδεικνύεται ότι η αντιμικροβιακή δράση

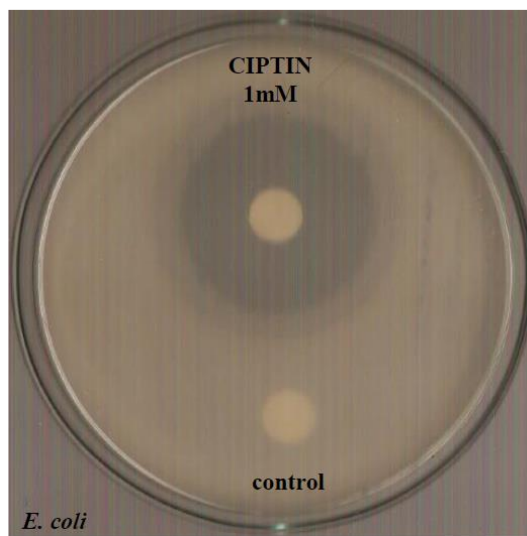
του CIPTIN βελτιώνεται έναντι των Gram (-) βακτηριακών στελεχών *P. aeruginosa* και *E. coli*, μετά την ενθυλάκωση του CIPTIN στους επιφανειοδραστικούς παράγοντες SLS και CTAB.



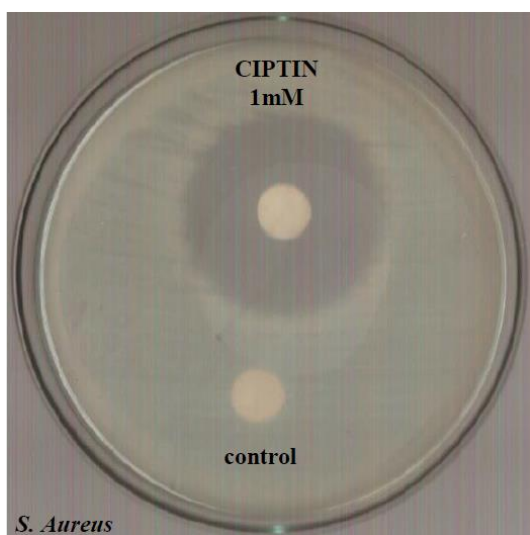
Εικόνα 111: Ζώνες αναστολής της HCIP έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (Α), *E. coli* (Β), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



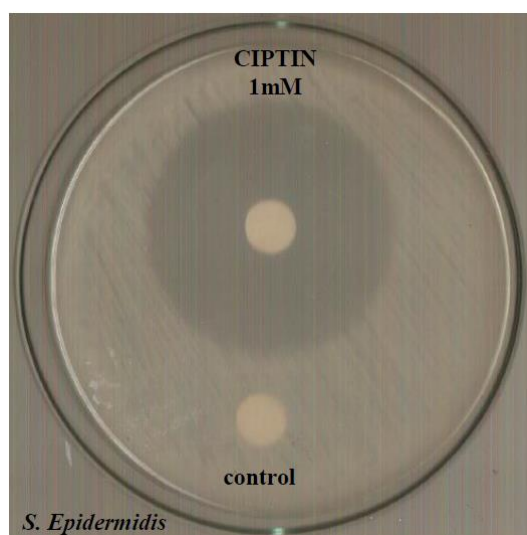
(A)



(B)

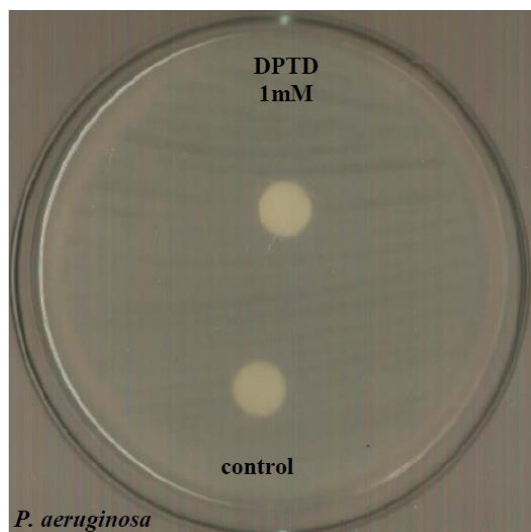


(Γ)

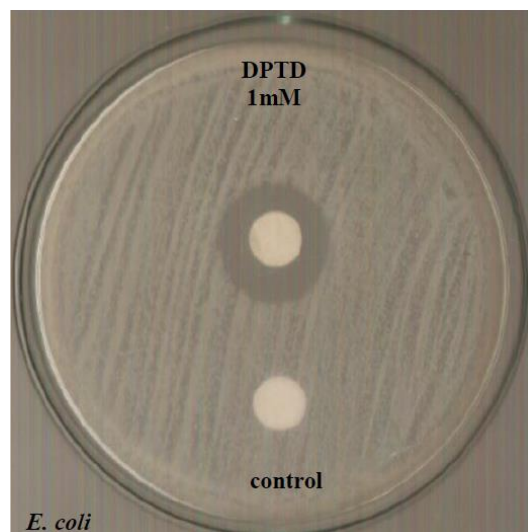


(Δ)

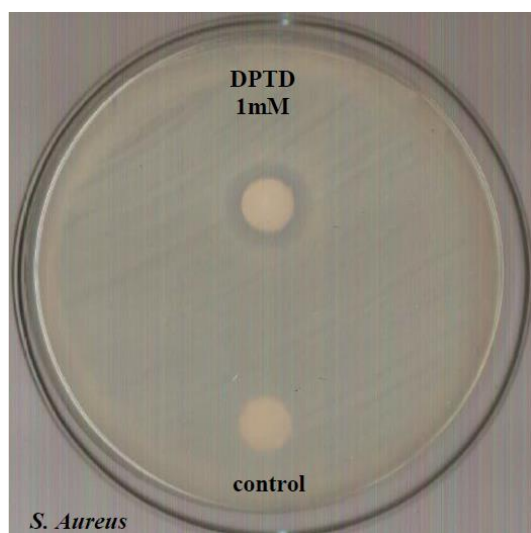
Εικόνα 112: Ζώνες αναστολής του CIPTIN έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



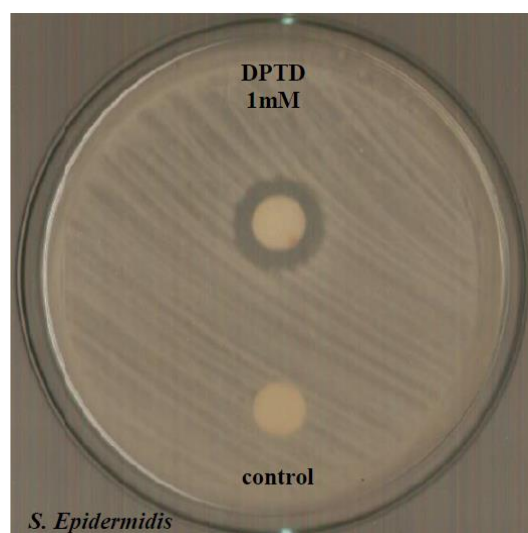
(A)



(B)

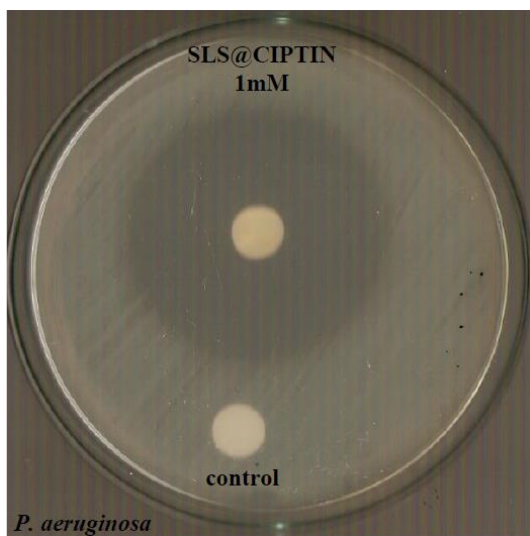


(Γ)

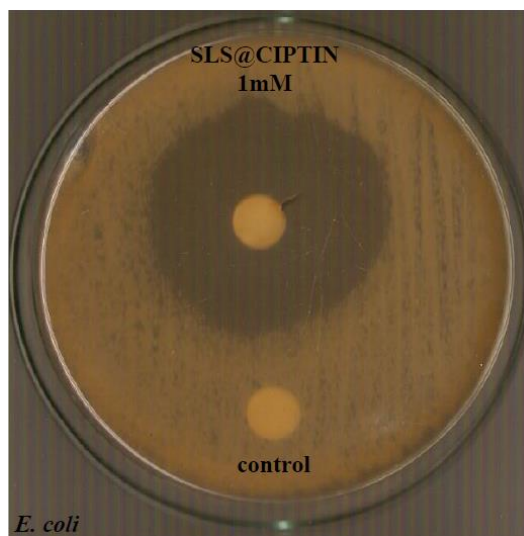


(Δ)

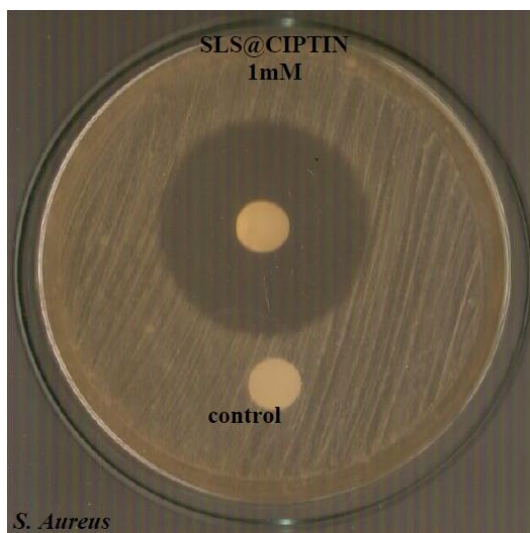
Εικόνα 113: Ζώνες αναστολής του DPTD έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



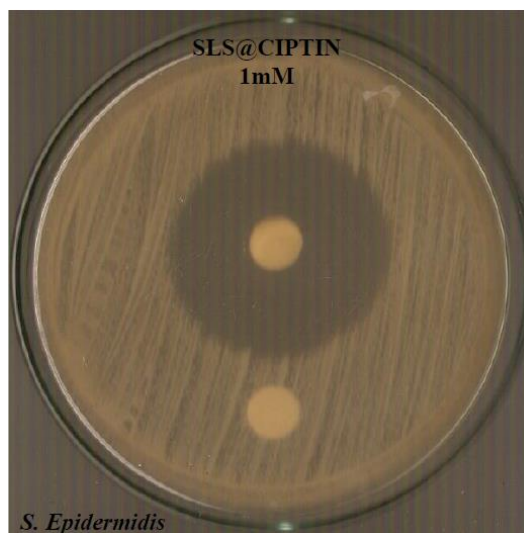
(A)



(B)

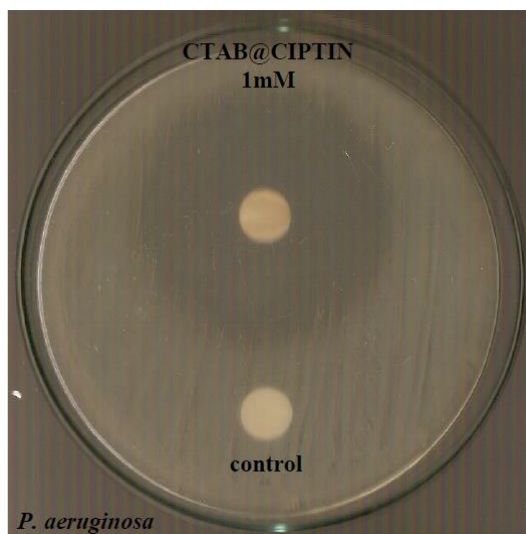


(Γ)

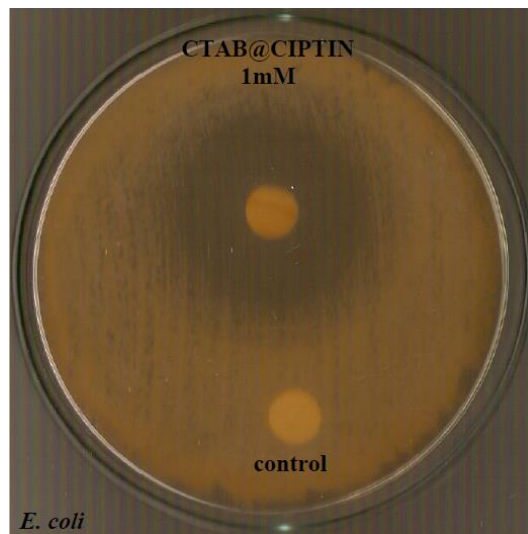


(Δ)

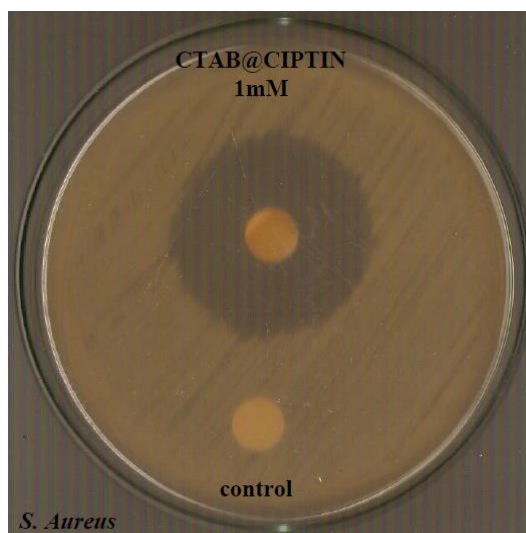
Εικόνα 114: Ζώνες αναστολής του SLS@CIPTIN έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



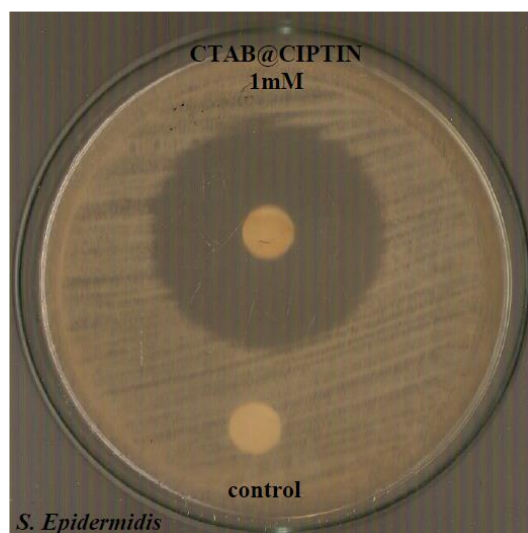
(A)



(B)

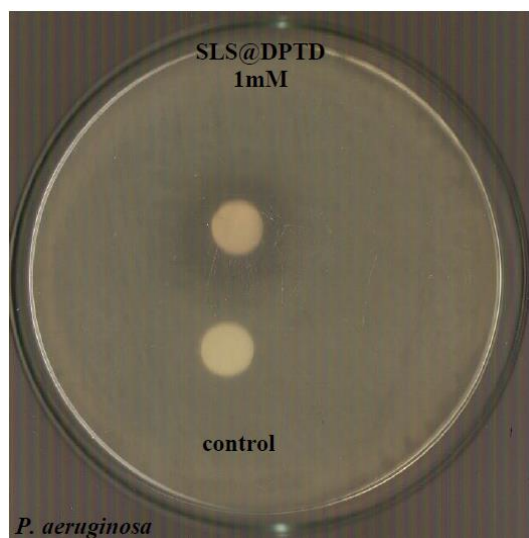


(Γ)

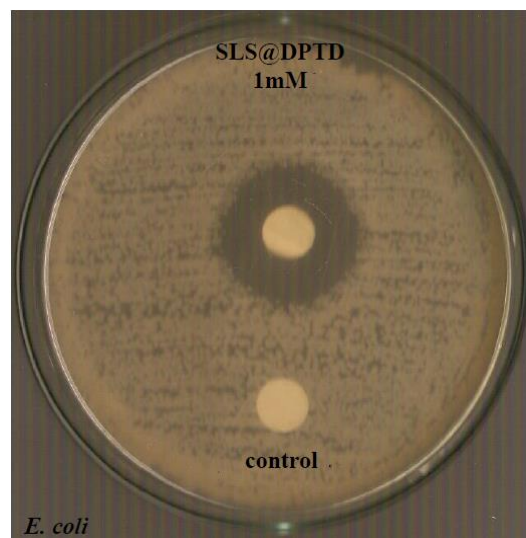


(Δ)

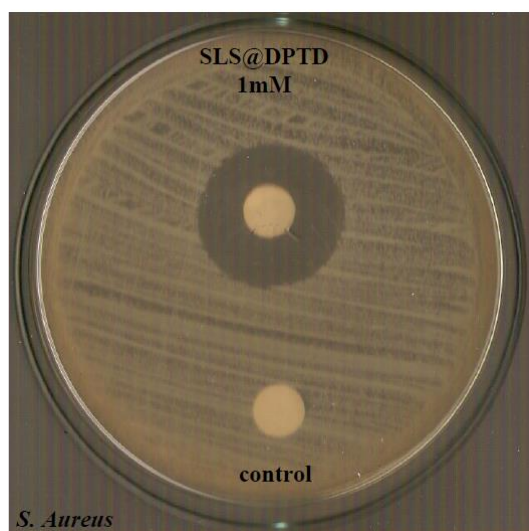
Εικόνα 115: Ζώνες αναστολής του CTAB@CIPTIN έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



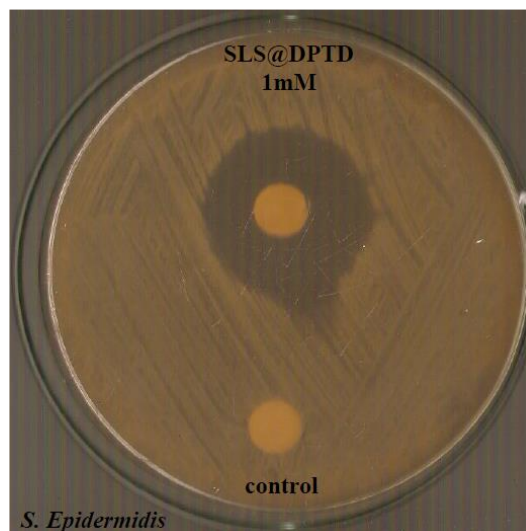
(A)



(B)

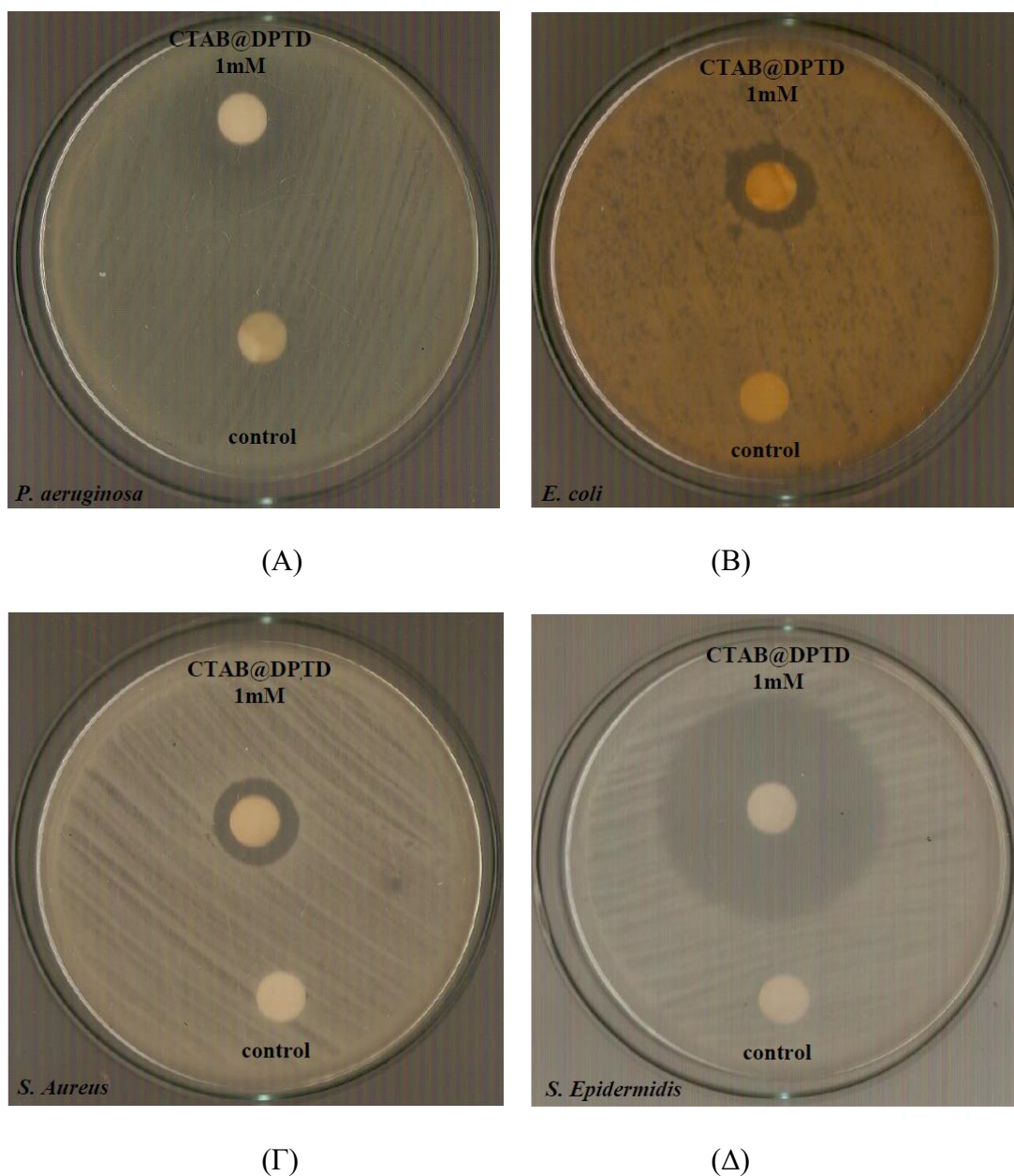


(Γ)



(Δ)

Εικόνα 116: Ζώνες αναστολής του SLS@DPTD έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)



Εικόνα 117: Ζώνες αναστολής του CTAB@DPTD έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (Γ) και *S. epidermidis* (Δ)

Το εύρος των ζωνών αναστολής που προκαλεί ο DPTD έναντι των Gram (-) βακτηριακών στελεχών είναι από $10,0 \pm 0,0$ mm έως $18,7 \pm 0,9$ mm και από $13,1 \pm 0,6$ mm έως $15,8 \pm 0,4$ mm έναντι των Gram (+) βακτηρίων. Οι ζώνες αναστολής για το μικκύλιο SLS@DPTD έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* και *S. epidermidis* υπολογίστηκαν $17,8 \pm 1,7$ mm, $26,0$

$\pm 1,0$ mm, $24,2 \pm 1,1$ mm και $30,6 \pm 1,5$ mm, ενώ οι αντίστοιχες ζώνες για το μικκύλιο SLS@CTAB υπολογίστηκαν $16,25 \pm 0,5$ mm, $16,5 \pm 0,6$ mm, $17,25 \pm 1,3$ mm και $33,6 \pm 1,5$ mm. Συνεπώς, η αντιμικροβιακή δράση του DPTD, ενισχύεται έναντι σχεδόν όλων των βακτηριακών στελεχών, μετά από την εγκόλπωση του στις μικκυλιακές δομές. Σύμφωνα με την ταξινόμηση των Shungu et al., τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν είναι ευαίσθητα σε όλες τις ουσίες που συντέθηκαν.

Πίνακας 18: Ζώνες αναστολής του CIPTIN, των μικκυλίων και των ligands έναντι των βακτηρίων

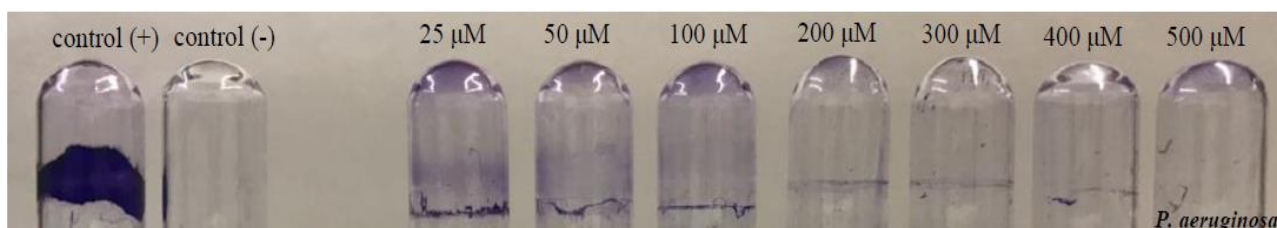
P. aeruginosa, *E. coli*, *S. aureus* και *S. epidermidis*

Ζώνες Αναστολής (mm)					
Ένωση	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	Βιβλιογραφία
CIPTIN	$40,8 \pm 1,5$	$34,0 \pm 0,8$	$36,0 \pm 1,1$	$42,7 \pm 0,8$	
SLS@CIPTIN	$43,8 \pm 0,5$	$40,3 \pm 1,3$	$34,3 \pm 1,2$	$39,7 \pm 1,5$	
CTAB@CIPTIN	$43,3 \pm 0,5$	$33,3 \pm 1,0$	$34,3 \pm 0,5$	$40,5 \pm 1,7$	
SLS@DPTD	$17,8 \pm 1,7$	$26,0 \pm 1,0$	$24,2 \pm 1,1$	$30,6 \pm 1,5$	
CTAB@DPTD	$16,25 \pm 0,5$	$16,5 \pm 0,6$	$17,25 \pm 1,3$	$33,6 \pm 1,5$	
HCIP·HCl	32,0	$32,0 \pm 0,8$	24,0	36,0	Milionis et al., 2018
HCIP	$35,5 \pm 0,6$	$33,0 \pm 0,8$	$30,5 \pm 0,6$	$39,2 \pm 0,9$	
DPTD	$10,0 \pm 0,0$	$18,7 \pm 0,9$	$13,1 \pm 0,6$	$15,8 \pm 0,4$	
SLS	Δεν αναπτύχθηκε	Δεν αναπτύχθηκε	Δεν αναπτύχθηκε	Δεν αναπτύχθηκε	Karetsi et al., 2019
CTAB	Δεν αναπτύχθηκε	$12,0 \pm 0,6$	$14,3 \pm 1,3$	$14,3 \pm 0,7$	Meretoudi et al., 2020

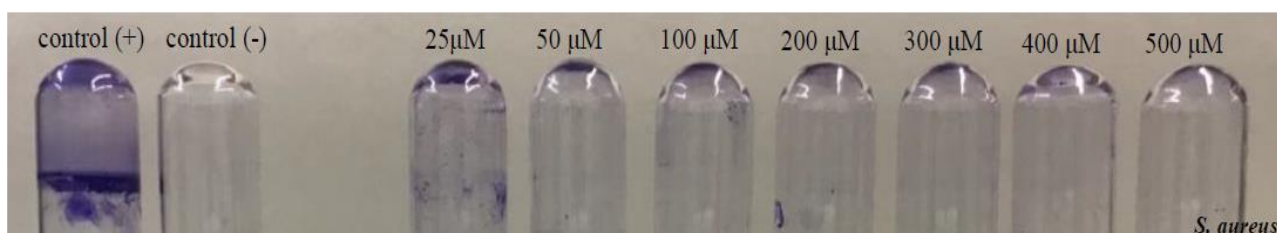
Δ.4.4 Επίδραση στο σχηματισμό βακτηριακού βιοφίλμ

Η επίδραση των νέων ενώσεων στο σχηματισμό βακτηριακού βιοφίλμ ελέγχθηκε έναντι των Gram (+) βακτηριακών στελεχών *P. aeruginosa* και *S. Aureus* με χρήση της χρωστικής crystal violet (Milionis et al., 2018). Τα βακτηριακά βιοφίλμ είναι κοινότητες βακτηρίων που είναι

προσκολλημένες σε μια επιφάνεια και συνήθως και μεταξύ τους και παράγουν μια μήτρα που αποτελείται από πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και DNA, η οποία δρα προστατευτικά (Flemming and Wingender, 2010). Τα βιοφίλμ έχουν τεράστιο αντίκτυπο στην ιατρική, καθώς τα βακτηριακά κύτταρα όταν σχηματίζουν βιοφίλμ, μπορούν να προστατευτούν και να γίνουν 10-1000 φορές πιο ανθεκτικά έναντι αντιμικροβιακών παραγόντων (Stewart, 2002).



(A)

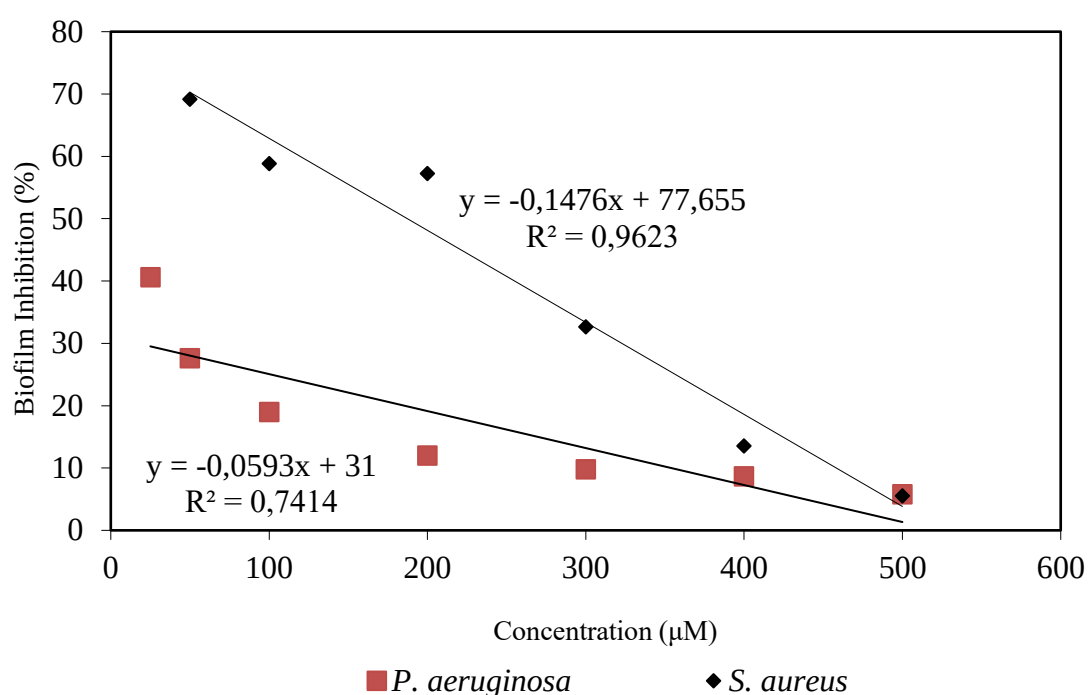


(B)

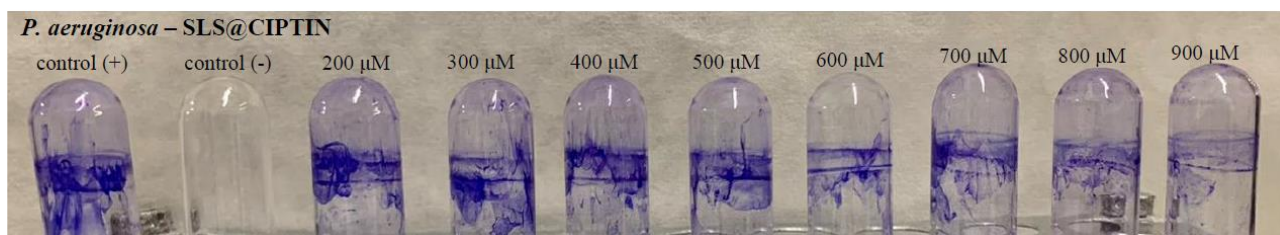
Εικόνα 118: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων CIPTIN έναντι του βακτηριακού βιοφίλμ της *P. aeruginosa* (A) και του *S. aureus* (B)

Οι συγκεντρώσεις εξάλειψης του βακτηριακού βιοφίλμ (Biofilm Elimination Concentrations – BECs) που προσδιορίστηκαν για κάθε ένωση (**Εικόνα 118 – Εικόνα 127**) αντιπροσωπεύουν τις συγκεντρώσεις που απαιτούνται για να μειωθεί η βιωσιμότητα του βακτηριακού βιοφίλμ το λιγότερο κατά 99,9 % (Chrysouli et al., 2020). Η τιμή BEC που υπολογίστηκε για το CIPTIN έναντι του βακτηρίου *P. aeruginosa* είναι 656 μM , ενώ έναντι του *S. aureus* είναι 752 μM (**Πίνακας 19**). Οι αντίστοιχες τιμές BEC που έχουν υπολογιστεί για το αντιβιοτικό HCIP·HCl έναντι της *P. aeruginosa* και του *S. aureus* είναι 670 μM και 952 μM , αντίστοιχα, ενώ οι τιμές BEC του εσωτερικού άλατος HCIP είναι 2140 μM και 2463 μM , αντίστοιχα (Milionis et al., 2018). Από τα παραπάνω δεδομένα

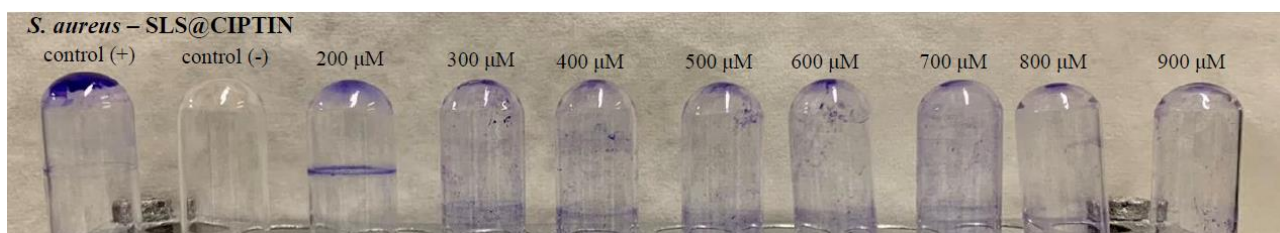
αποδεικνύεται ότι το CIPTIN εξαλείφει τα βακτηριακά βιοφίλμ, που σχηματίζονται από τα βακτηριακά στελέχη *P. aeruginosa* και *S. aureus*, πιο αποτελεσματικά από το HCIP και από το εμπορικά διαθέσιμο αντιβιοτικό HCIP·HCl. Στον **Πίνακα 19** παρουσιάζονται επίσης οι τιμές BEC που υπολογίστηκαν για τα μικκύλια SLS@CIPTIN (**Εικόνα 120-121**), CTAB@CIPTIN (**Εικόνα 122-123**), SLS@DPTD (**Εικόνα 124-125**) και CTAB@DPTD (**Εικόνα 126-127**) έναντι των βακτηριακών στελεχών *P. aeruginosa* και *S. aureus*.



Εικόνα 119: Διάγραμμα της απορρόφησης του βακτηριακού βιοφίλμ της *P. aeruginosa* και του *S. aureus* σε σχέση με τη συγκέντρωση CIPTIN

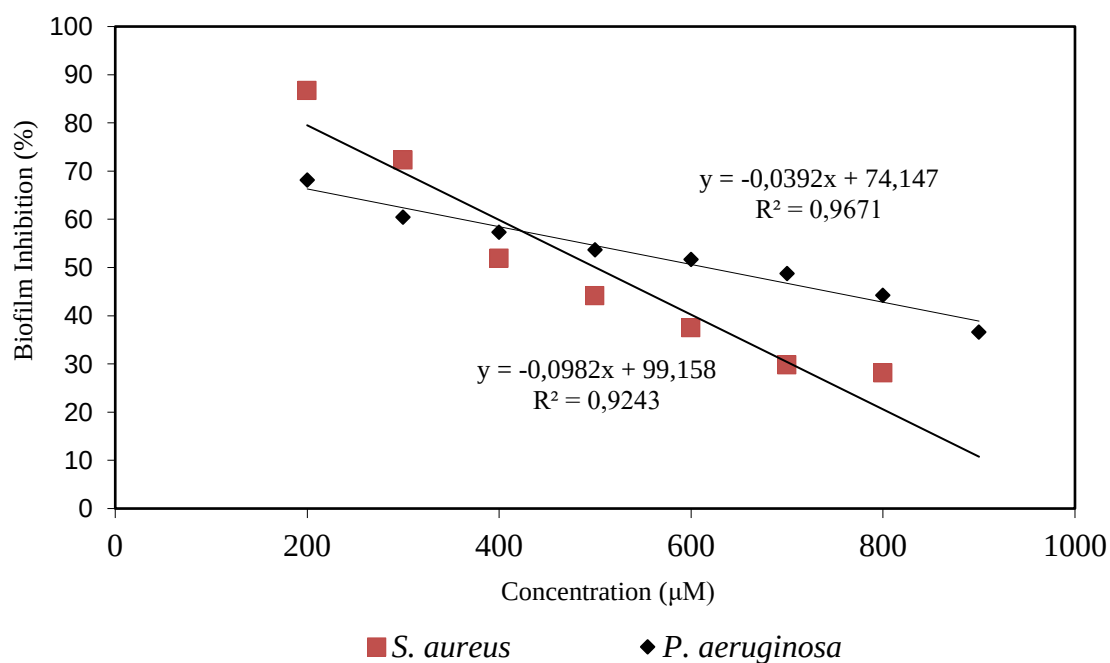


(A)

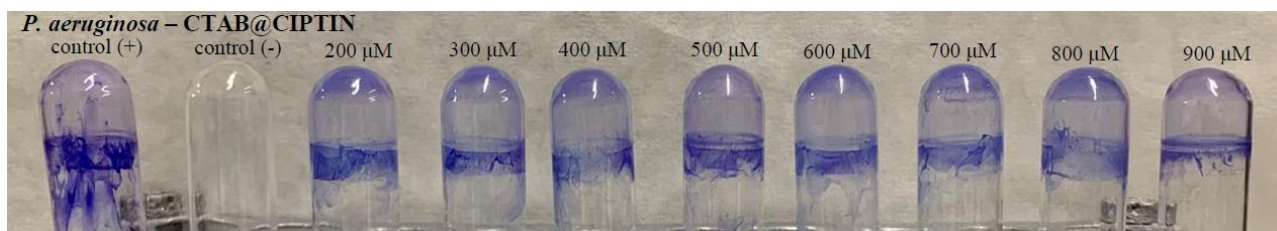


(B)

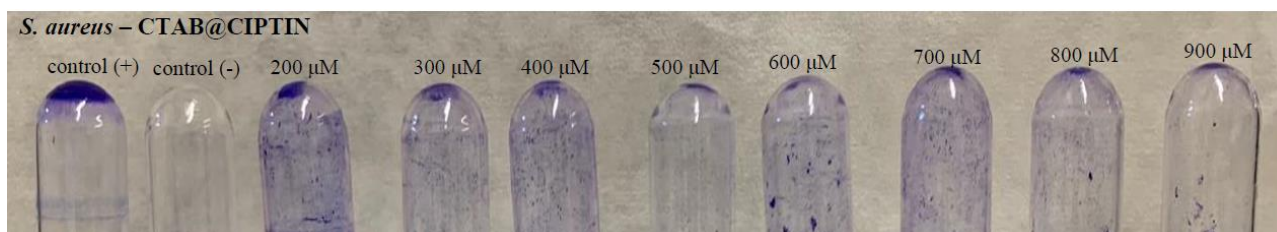
Εικόνα 120: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων SLS@CIPTIN έναντι του βακτηριακού βιοφίλμ της *P. aeruginosa* (A) και του *S. aureus* (B)



Εικόνα 121: Διάγραμμα της απορρόφησης του βακτηριακού βιοφίλμ της *P. aeruginosa* και του *S. aureus* σε σχέση με τη συγκέντρωση SLS@CIPTIN

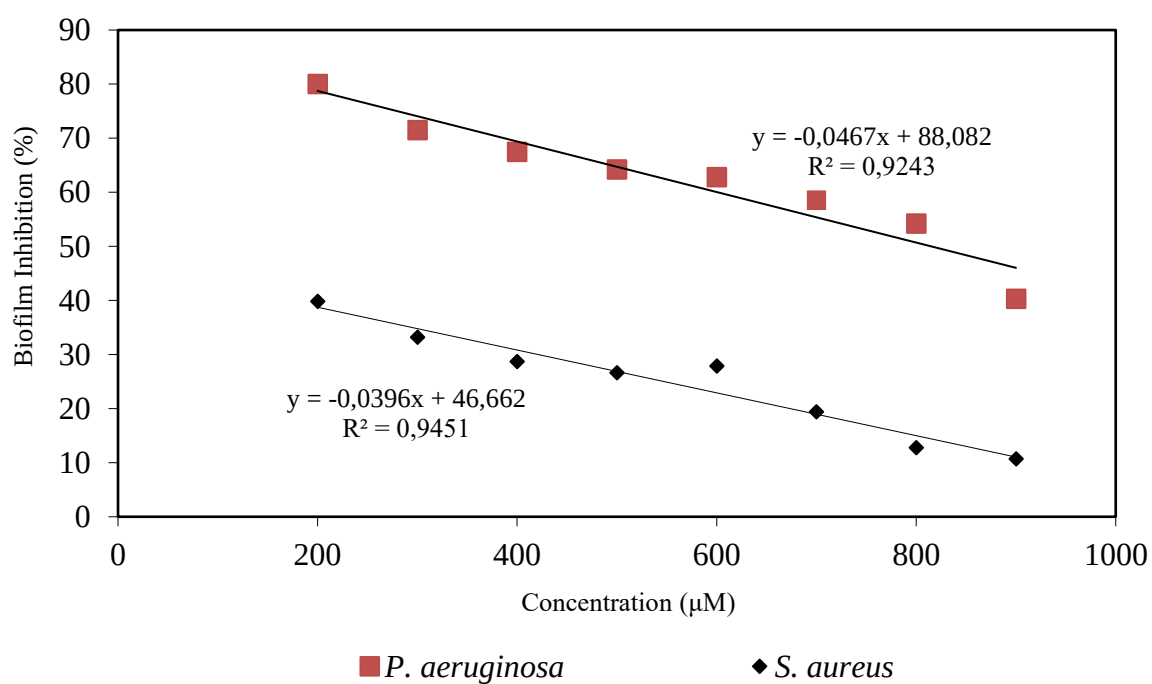


(A)

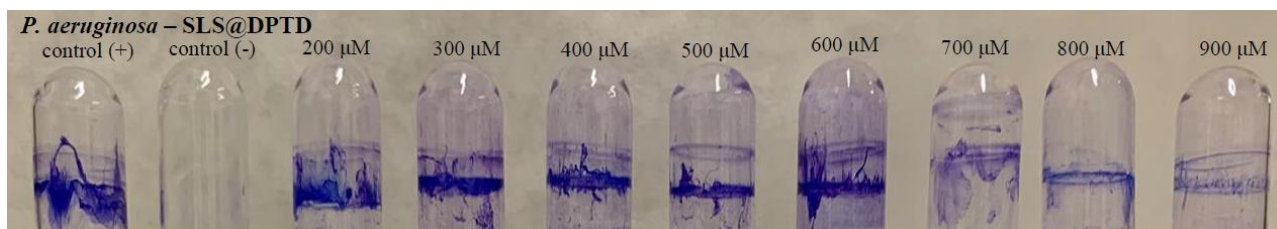


(B)

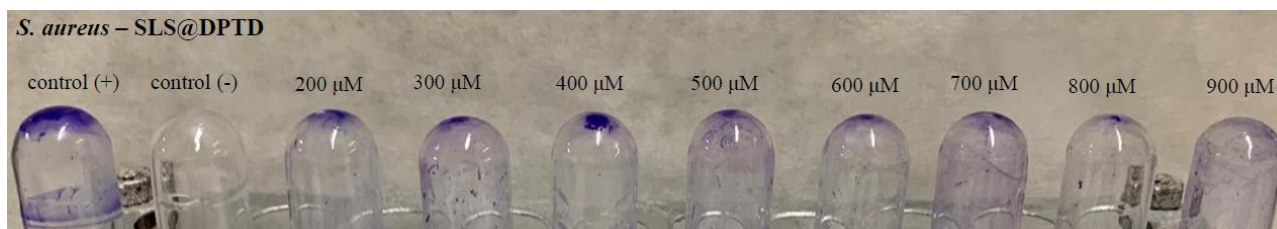
Εικόνα 122: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων CTAB@CIPTIN έναντι του βακτηριακού βιοφίλμ της *P. aeruginosa* (A) και του *S. aureus* (B)



Εικόνα 123: Διάγραμμα της απορρόφησης του βακτηριακού βιοφίλμ της *P. aeruginosa* και του *S. aureus* σε σχέση με τη συγκέντρωση CTAB@CIPTIN

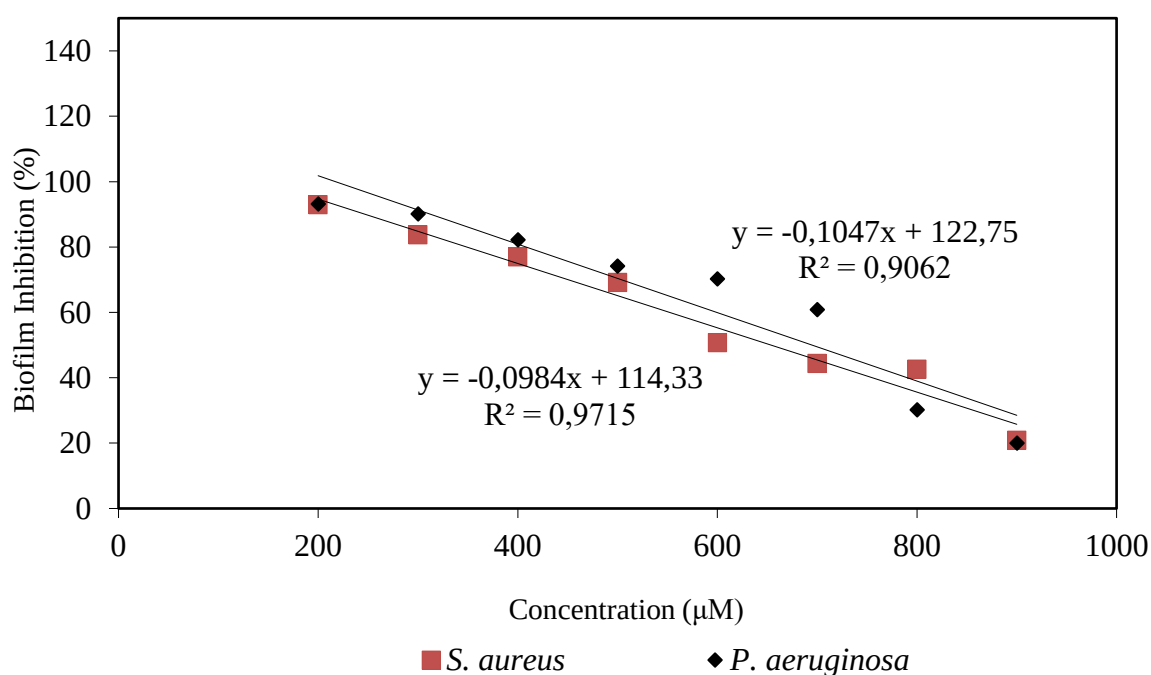


(A)

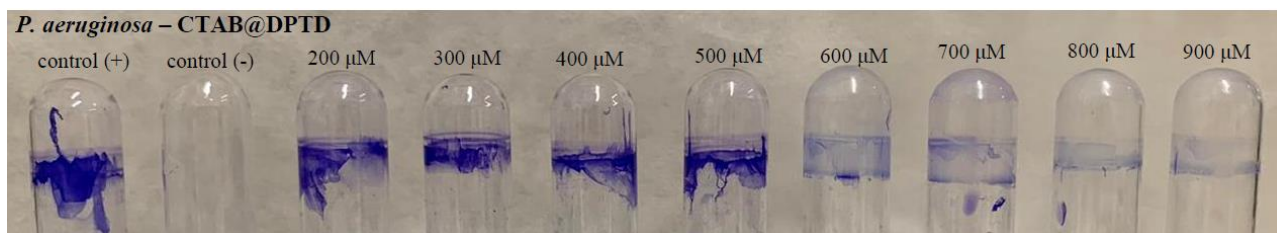


(B)

Εικόνα 124: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων SLS@DPTD έναντι του βακτηριακού βιοφίλμ της *P. aeruginosa* (A) και του *S. aureus* (B)



Εικόνα 125: Διάγραμμα της απορρόφησης του βακτηριακού βιοφίλμ της *P. aeruginosa* και του *S. aureus* σε σχέση με τη συγκέντρωση SLS@DPTD

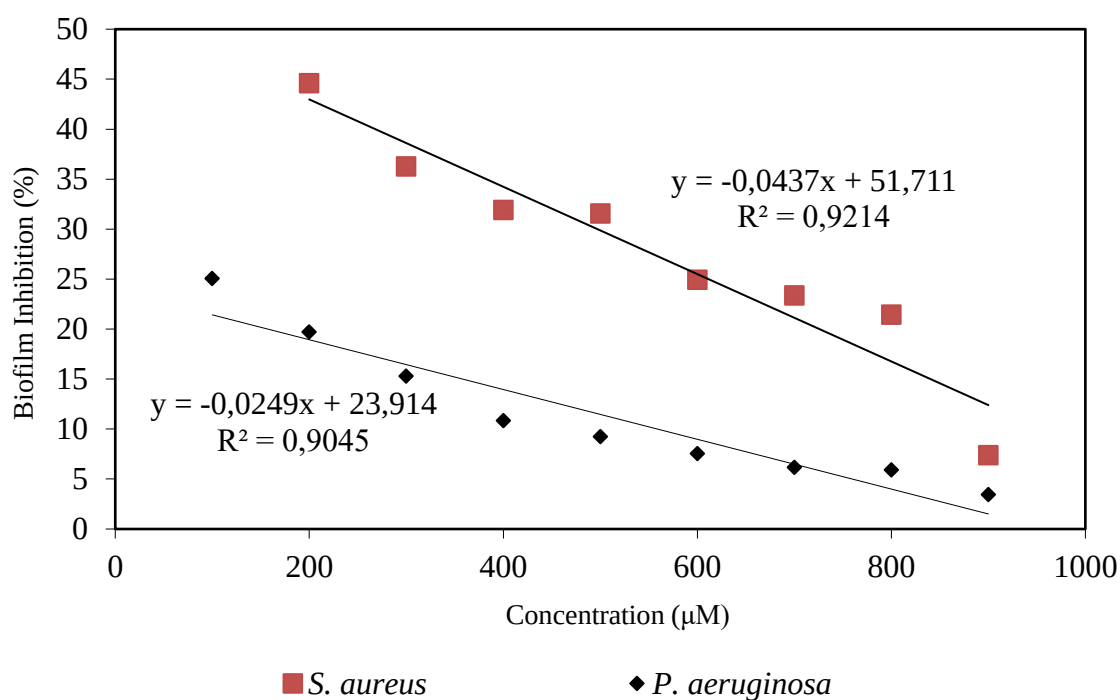


(A)



(B)

Εικόνα 126: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων CTAB@DPTD έναντι του βακτηριακού βιοφίλμ της *P. aeruginosa* (A) και του *S. aureus* (B)



Εικόνα 127: Διάγραμμα της απορρόφησης του βακτηριακού βιοφίλμ της *P. aeruginosa* και του *S. aureus* σε σχέση με τη συγκέντρωση CTAB@DPTD

Πίνακας 19: Συγκέντρωση εξάλειψης του βακτηριακού βιοφίλμ του CIPTIN, των μικκυλίων και των ligands έναντι των βακτηρίων *P. aeruginosa* και *S. aureus*

Συγκέντρωση εξάλειψης του βακτηριακού βιοφίλμ (μM)			
Ένωση	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	Βιβλιογραφία
CIPTIN	656	752	
SLS@CIPTIN	1740	1147	
CTAB@CIPTIN	1704	1081	
SLS@DPTD	1268	1172	
CTAB@DPTD	948	1141	
HCIP·HCl	670	952	Milionis et al., 2018
HCIP	2140	2463	Chrysouli et al., 2020

Δ.5 Μοριακός μηχανισμός δράσης

Δ.5.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης με το DNA

Το DNA αποτελεί εδώ και πολλά χρόνια έναν βασικό στόχο για χημειοθεραπευτικές παρεμβάσεις στον ανθρώπινο καρκίνο (Neidle, 2001). Η μεγάλη και η μικρή αύλακα στη διπλή έλικα του DNA λειτουργούν ως μεταφορείς της γενετικής πληροφορίας που είναι απαραίτητη για σύνδεση του DNA με άλλα μόρια, αφού τα υδρογονικά κέντρα σύνδεσης στις βάσεις του DNA βρίσκονται σε αυτές τις αύλακες. Έτσι τα μικρά μόρια αλληλεπιδρούν με το DNA είτε με παρεμβολή μεταξύ των ζευγών βάσεων, είτε συνδέονται με τη μικρή αύλακα ή και με τους δύο τρόπους (Barawkar and Ganesh, 1995). Για τους παραπάνω λόγους, η ανάπτυξη νέων μικρών μορίων σύνδεσης στο DNA, τα οποία παρεμβάλλονται, είτε στις μικρές είτε στις μεγάλες αυλακώσεις, αποτελούν ένα σημαντικό ζήτημα για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων.

Από την άλλη πλευρά, η μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ του DNA και μεταλλικών συμπλόκων είναι σημαντική για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης του συμπλόκου. Η χρήση

της φασματοσκοπίας UV είναι μια διαδεδομένη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό και την μελέτη των ιδιοτήτων πρόσδεσης μεταλλικών ενώσεων στο DNA. Οι μεταλλικές ενώσεις είναι δυνατόν να αλληλεπιδρούν ομοιοπολικά ή μη ομοιοπολικά με το DNA, ενώ είναι γνωστό ότι τα μόρια DNA απορροφούν βέλτιστα στα 260 nm. Η ικανότητα σύνδεσης του συμπλόκου με το CT-DNA (calf thymus DNA) χαρακτηρίζεται από τις μετρήσεις των επιπτώσεών του στο φάσμα UV. Ο υπερχρωϊσμός ή ο υποχρωϊσμός που παρατηρείται στο φάσμα UV του CT-DNA–συμπλόκου και του αντίστοιχου φάσματος του ελεύθερου CT-DNA, σχετίζεται με τη διαμόρφωση της δομής της διπλής έλικας του DNA (Noguchi et al., 2005).

Μεταλλικές ουσίες οι οποίες προσδένονται στο DNA προκαλούν μεταβολή στο φάσμα απορρόφησης, σε σύγκριση με το φάσμα απορρόφησης του ελεύθερου DNA. Ο υπερχρωϊσμός ή ο υποχρωϊσμός που παρατηρείται στο φάσμα UV του CT-DNA–συμπλόκου και του αντίστοιχου φάσματος του ελεύθερου CT-DNA, σχετίζεται με τη διαμόρφωση της δομής της διπλής έλικας του DNA (Noguchi et al., 2005). Συνεπώς, με φασματοσκοπία UV αντλούνται πληροφορίες για τον τρόπο αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA καθώς και για το πόσο ισχυρή είναι η σύνδεση της ένωσης με αυτό υπολογίζοντας τη σταθερά σύνδεσης με το DNA (K_b) (Chao et al, 2002; Banti et al., 2014; Chrysouli et al., 2018).

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης μιας ένωσης με το DNA μέσω της φασματοσκοπίας UV περιλαμβάνει δύο στάδια. Αρχικά μελετώνται οι μεταβολές των φασμάτων UV διαλύματος CT-DNA, στην περιοχή $\lambda_{max} = 200-400$ nm με την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων της υπό μελέτη ένωσης σε διάφορες αναλογίες ($r = [ένωση]/[DNA]$). Πιο συγκεκριμένα, εξετάζεται η μεταβολή του λ_{max} , καθώς και οι μεταβολές των απορροφήσεων στο λ_{max} . Έτσι, εξετάζεται αν και με ποιο τρόπο η ένωση μπορεί να αλληλεπιδράσει με το CT-DNA. Η εμφάνιση οποιασδήποτε μεταβολής της απορρόφησης στο λ_{max} αποτελεί ένδειξη αλληλεπίδρασης.

Οι μεταβολές που καταγράφονται στα φάσματα UV μπορεί να υποδηλώνουν είτε υποχρωϊσμό, είτε υπερχρωϊσμό. Στον υποχρωϊσμό παρατηρείται μείωση της απορρόφησης που προκαλείται κατά την παρεμβολή ή κατά την ηλεκτροστατική δέσμευση της ένωσης στο CT-DNA.

Στην περίπτωση του υπερχρωϊσμού υποδηλώνεται συναρμογή της ένωσης στην εξωτερική επιφάνεια του DNA (external binding ή groove binding) ή αποδιάταξη της ελικοειδούς δομής του DNA λόγω της καταστροφής των δεσμών υδρογόνου που σταθεροποιούν τη δευτεροταγή δομή του DNA (Chao et al, 2002; Dimiza et al., 2011; Banti et al., 2012). Τα φάσματα των απορροφήσεων που λήφθηκαν για τον προσδιορισμό του τρόπου αλληλεπίδρασης των ενώσεων CIPTIN, SLS@CIPTIN, και CTAB@CIPTIN παρουσιάζονται στις **Εικόνες 128-130**, ενώ τα ποσοστά υπερχρωϊσμού συγκεντρώνονται στον **Πίνακα 20**.

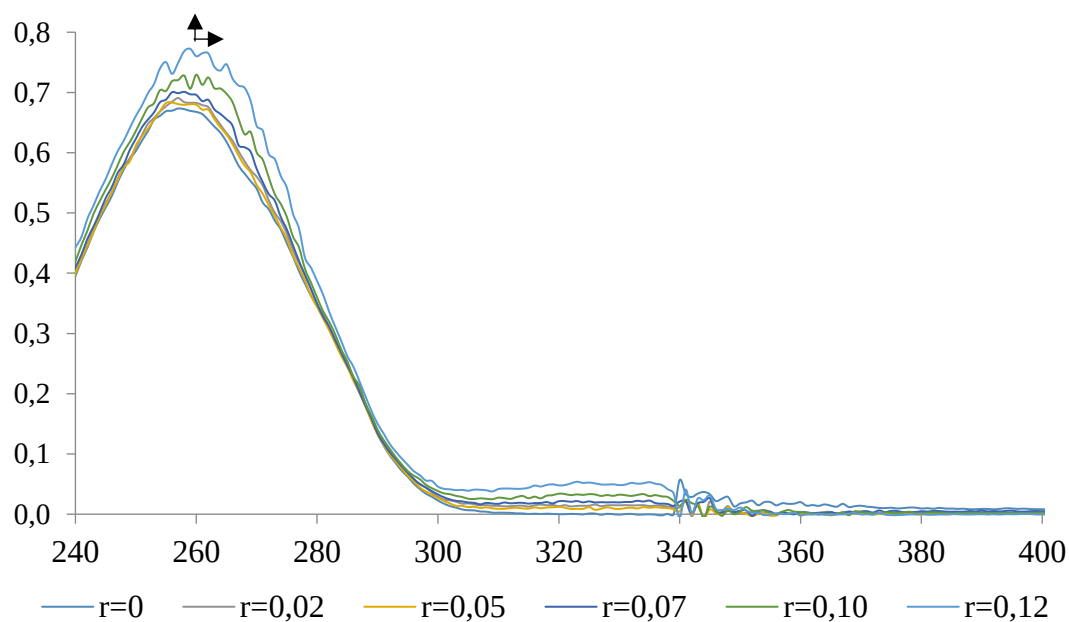
Στο επόμενο στάδιο μελετήθηκαν οι μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στα φάσματα UV διαλύματος της ένωσης με την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων του CT DNA σε διάφορες αναλογίες ($r = [\text{ένωση}]/[\text{DNA}]$), όπου καταγράφονται οι μεταβολές τόσο της απορρόφησης όσο και της τιμής του $\lambda_{\max}$. Οι παρατηρούμενες μεταβολές μπορούν να οδηγήσουν σε αξιόπιστα συμπεράσματα σχετικά με το είδος της αλληλεπίδρασης. Η σταθερά σύνδεσης, K_b , της ένωσης με το CT DNA προσδιορίζεται από το λόγο της τεταγμένης επί της αρχής προς την κλίση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων που προσδιορίζεται σε διαγράμματα του λόγου σε συνάρτηση με τη $[\text{DNA}]$ με βάση την εξίσωση:

$$\frac{[DNA]}{(\varepsilon_A - \varepsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} + \frac{1}{K_b (\varepsilon_b - \varepsilon_f)}$$

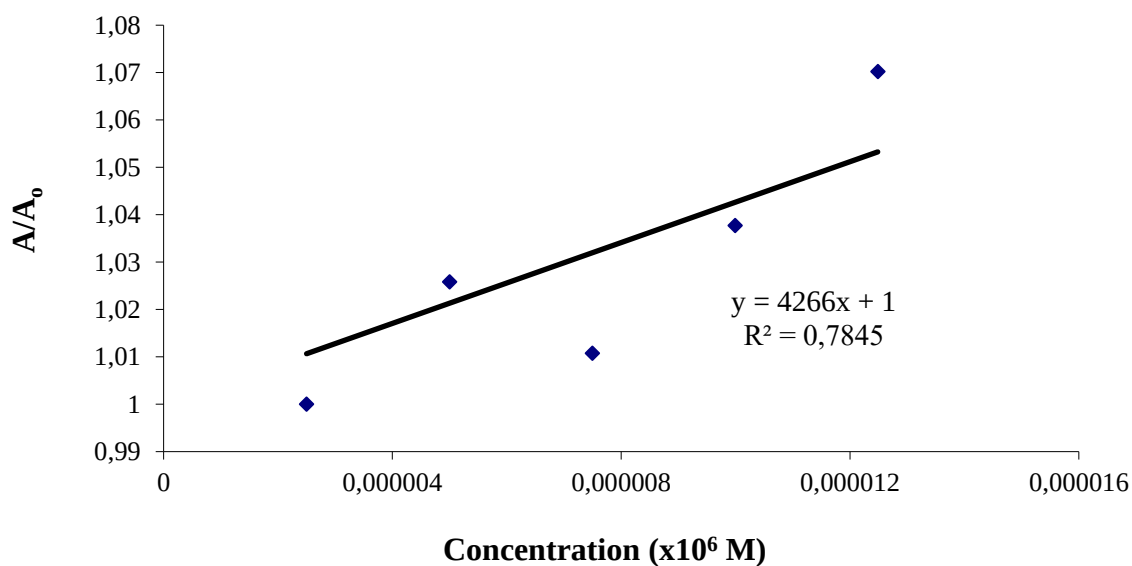
όπου $[\text{DNA}]$: συγκέντρωση του DNA, ε_A : λόγος της απορρόφησης προς την συγκέντρωση της ένωσης σε κάθε μέτρηση ($= [A]/[\text{ένωση}]$), ε_f : είναι ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της ελεύθερης ένωσης, ε_b : είναι ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της πλήρως δεσμευμένης ένωσης στο DNA και K_b : σταθερά ισχύος σύνδεσης της ένωσης με το DNA.

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης του CIPTIN με το CT-DNA αποκάλυψε ότι το μεταλλοφάρμακο δεσμεύεται στο DNA με συναρμογή στην αύλακα του DNA (groove binding), αφού παρατηρείται αύξηση των απορροφήσεων (υπερχρωϊσμός) σε ποσοστό $4,1 \pm 0,5 \%$ και βαδυχρωμία (red shift) δηλαδή μετατόπιση του μήκους κύματος απορρόφησης προς μεγαλύτερα

μήκη κύματος (**Εικόνα 128**). Η σύνδεση του CIPTIN στο DNA είναι αρκετά ισχυρή, αφού υπολογίστηκε ότι η σταθερά δέσμευσης (K_b) ισούται με $(8,4 \pm 1,2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (**Πίνακας 20**).



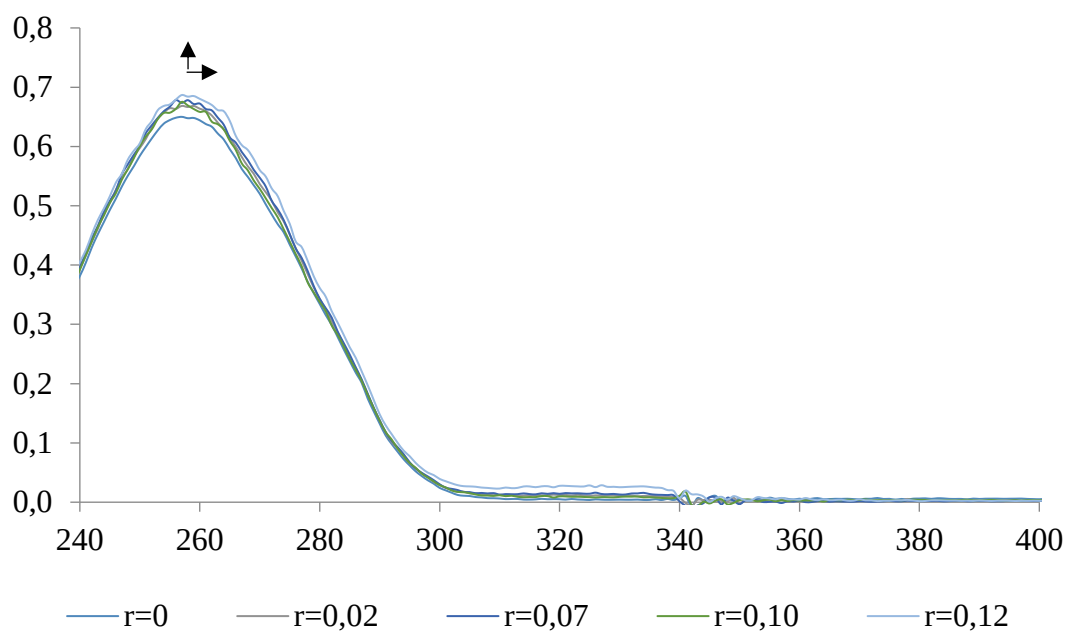
(A)



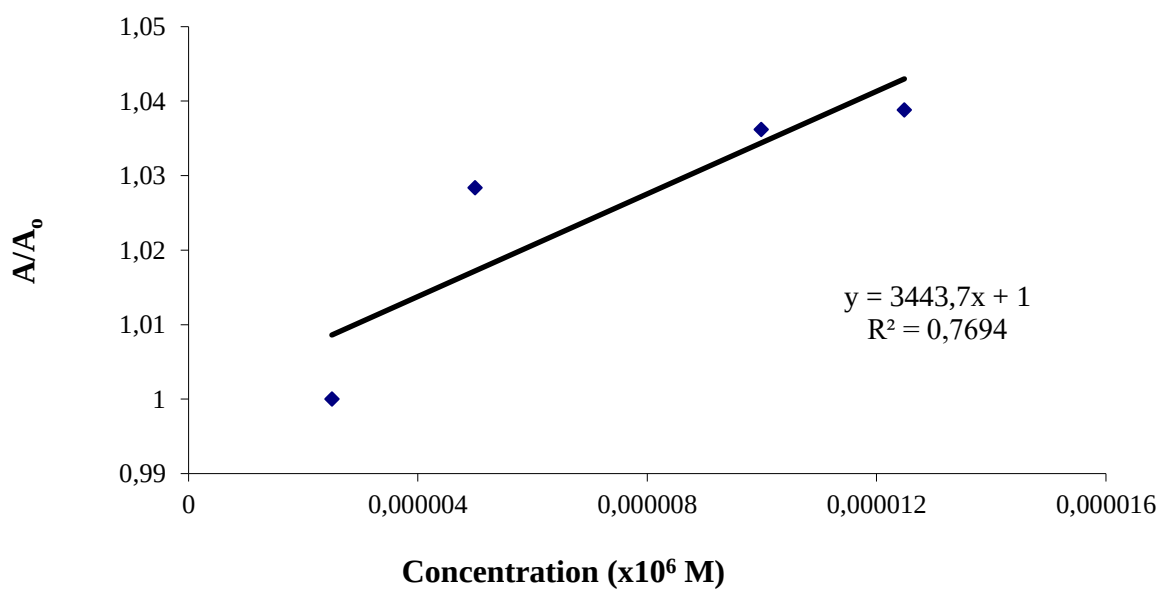
(B)

Εικόνα 128: (A) Φάσμα UV του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία CIPTIN για $r = 0, 0,02, 0,05, 0,07, 0,1$ και $0,12$ ($r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$), (B) Διάγραμμα

A/A_0 με $[\text{complex}]$ στο $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$

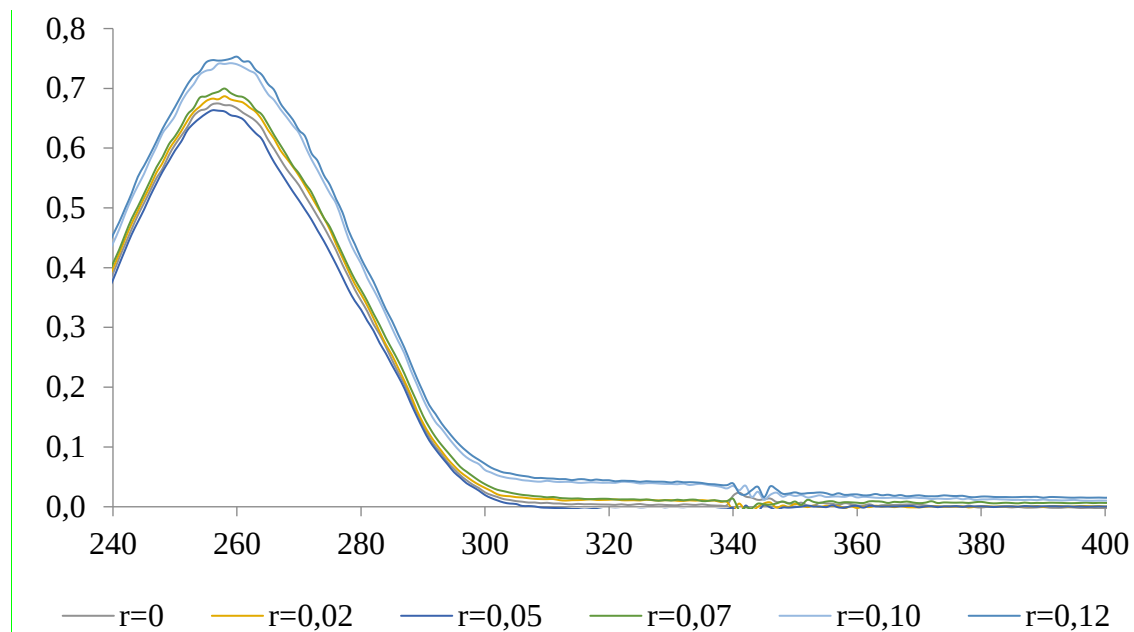


(A)

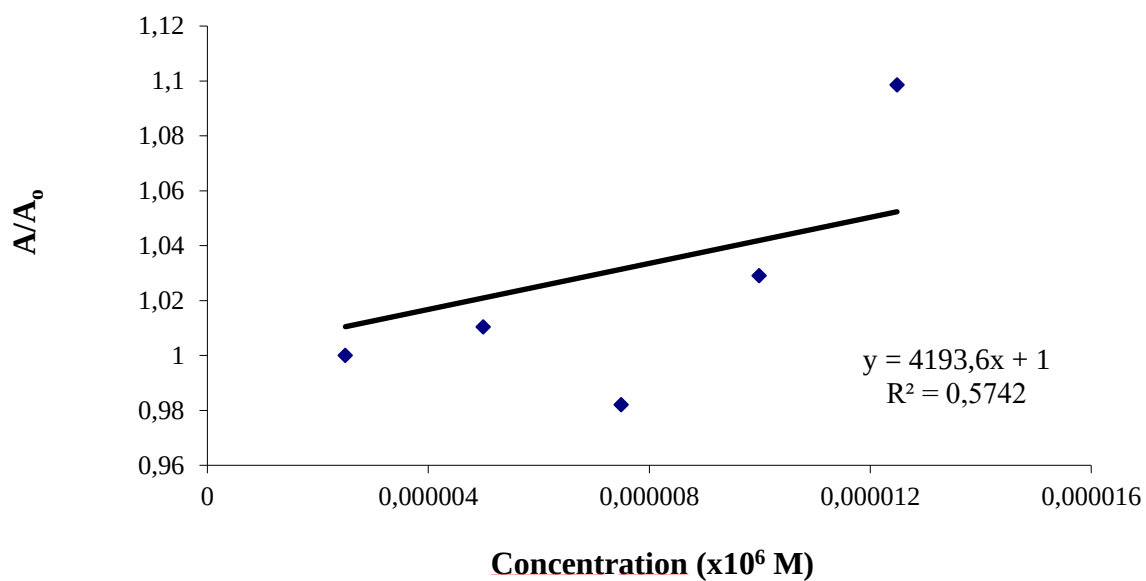


(B)

Εικόνα 129: (A) Φάσμα UV του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία SLS@CIPTIN για $r = 0, 0,02, 0,05, 0,07, 0,1$ και $0,12$ ($r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$), (B) Διάγραμμα A/A_0 με $[\text{complex}]$ στο $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$



(A)



(B)

Εικόνα 130: (A) Φάσμα UV του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία CTAB@CIPTIN για $r = 0, 0,02, 0,05, 0,07, 0,1$ και $0,12$ ($r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 5 \times 10^{-5}$ M), (B) Διάγραμμα A/A_0 με $[\text{complex}]$ στο $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$

Το μικκύλιο SLS@CIPTIN αλληλεπιδρά με το DNA με τον ίδιο τρόπο με το CIPTIN, αφού εμφανίζει υπερχρωισμό σε ποσοστό $6,9 \pm 1,8 \%$ και η σταθερά δέσμευσης του μικκυλίου υπολογίστηκε $(7,7 \pm 0,7) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (**Εικόνα 129**). Τέλος, και το μικκύλιο CTAB@CIPTIN αποδεικνύεται ότι αλληλεπιδρά με το DNA και προκαλεί το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου και συναρμογή της ένωσης στην εξωτερική επιφάνεια του αφού παρατηρείται υπερχρωισμός $10,7 \pm 0,2 \%$ και βαθυχρωμία (**Εικόνα 130**). Η δέσμευση του CTAB@CIPTIN στο DNA είναι πολύ ισχυρή, καθώς η σταθερά K_b του μικκυλίου υπολογίστηκε $(31,7 \pm 2,4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Βιβλιογραφικά, είναι γνωστό ότι η αντίστοιχη τιμή K_b για το cisplatin, είναι $(4,7 \pm 1,8) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (N'soukroé-Kossi et al., 2008). Συνεπώς, οι νέες ενώσεις CIPTIN, SLS@CIPTIN και CTAB@CIPTIN που μελετήθηκαν, εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια δέσμευσης με το DNA σε σύγκριση με το cisplatin με την εξής σειρά: CTAB@CIPTIN > CIPTIN > SLS@CIPTIN.

Πίνακας 20: Συνολικά αποτελέσματα της μελέτης της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA

Ένωση	Υπερχρωισμός	$\Delta\lambda$ (nm)	Μετατόπιση (shift)	Σταθερά δέσμευσης $K_b (1 \times 10^4) \text{ M}^{-1}$	Τρόπος αλληλεπίδρασης
CIPTIN	$4,1 \pm 0,5$	10	Βαθυχρωμία (red)	$8,4 \pm 1,2$	Συναρμογή στην αύλακα
SLS@CIPTIN	$6,9 \pm 1,8$	11	Βαθυχρωμία (red)	$7,7 \pm 0,7$	Συναρμογή στην αύλακα
CTAB@CIPTIN	$10,7 \pm 0,2$	7	Βαθυχρωμία (red)	$31,7 \pm 2,4$	Συναρμογή στην αύλακα

Λ.6 Συσχετίσεις αντικαρκινικής και αντιμικροβιακής δράσης

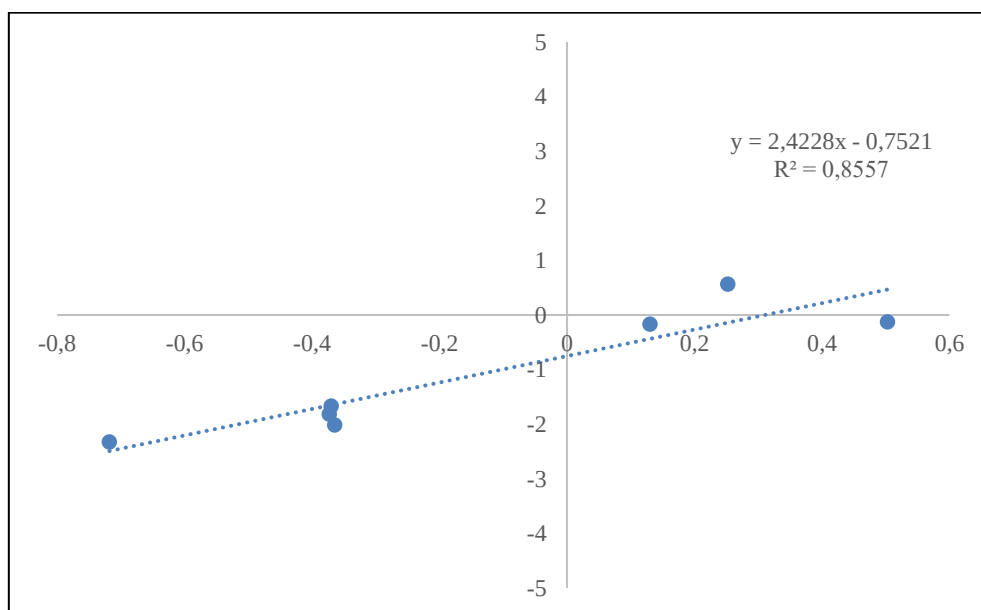
Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες μελέτες, επικεντρώνονται στη διερεύνηση της σχέσης που υπάρχει ανάμεσα στο μικροβίωμα και στην ανάπτυξη διάφορων τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού (Goodman and Gardner, 2018). Επίσης, τα μέχρι τώρα στοιχεία υποδεικνύουν ότι το μικροβίωμα μπορεί να επηρεάσει ακόμα και την ανταπόκριση του ασθενή στις χημειοθεραπευτικές παρεμβάσεις (Helmink et al., 2019). Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν δημοσιευμένες έρευνες που να έχει μελετηθεί η πιθανή σχέση μεταξύ της αντικαρκινικής και αντιμικροβιακής δράσης που επιδεικνύουν οι βιοδραστικοί παράγοντες.

Στο πλαίσιο αυτό, ένας από τους στόχους της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι και η διερεύνηση και η ανάδειξη της σχέσης μεταξύ της αντικαρκινικής και αντιμικροβιακής δράσης των βιοδραστικών ενώσεων. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ της αντικαρκινικής και αντιμικροβιακής δράσης που εμφανίζουν οι ενώσεις που συντέθηκαν σε συνδυασμό με κάποιες βιβλιογραφικά γνωστές ενώσεις. Οι συσχετίσεις μεταξύ της αντικαρκινικής και αντιμικροβιακής δράσης που εμφανίζουν οι ενώσεις, πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστά για κάθε μικροβιακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη διατριβή και για κάθε καρκινική κυτταρική σειρά.

Στους **Πίνακες 21** και **22** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τιμών IC_{50} και pIC_{50} που υπολογίστηκαν για τις ενώσεις έναντι των κυττάρων MCF-7 και MDA-MB-231, αντίστοιχα, καθώς και οι τιμές MIC και pMIC έναντι του βακτηρίου *P. aeruginosa*. Επίσης, στις **Εικόνες 131** και **132** παρατίθενται τα αντίστοιχα διαγράμματα των τιμών pIC_{50} έναντι των κυττάρων MCF-7 και MDA-MB-231 συναρτήσει των τιμών pMIC έναντι της *P. aeruginosa*. Από τα παραπάνω αποδεικνύεται ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ της αντικαρκινικής δράσης που εμφανίζει ένας παράγοντας έναντι και των δύο διαφορετικών κυτταρικών καρκινικών σειρών του μαστού και της αντιμικροβιακής δράσης που επιδεικνύει έναντι του βακτηριακού στελέχους *P. aeruginosa*.

Πίνακας 21: Τιμές IC_{50} και pIC_{50} έναντι των κυττάρων MCF-7, και τιμές MIC και $pMIC$ έναντι της *P. aeruginosa*.

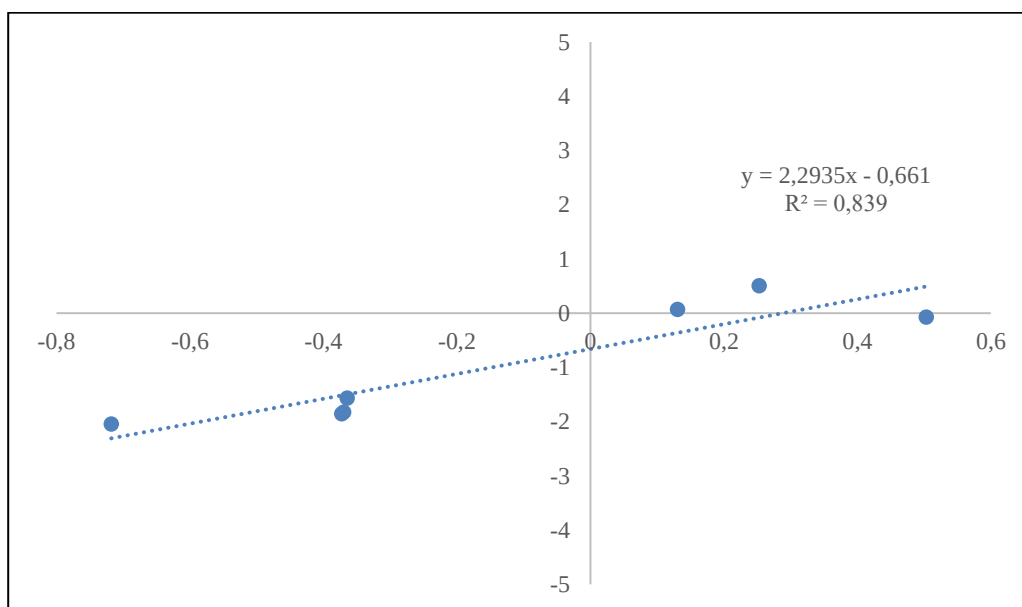
Ένωση	IC_{50} (μM)	$pIC_{50} = -\log (IC_{50})$	MIC (μM)	$pMIC = -\log (MIC)$	Βιβλιογραφία
CIPTIN	1,47	-0,16732	0,741	0,130182	
SLS@CIPTIN	1,33	-0,12385	0,314	0,50307	
CTAB@CIPTIN	0,27	0,568636	0,559	0,252588	
$C_{10}H_{13}N_3O_2S$	210,2	-2,32263	5,22	-0,71799	Ucar et al., 2020
$C_{20}H_{22}N_6O_4S_2Co$	46,8	-1,66997	2,34	-0,36978	Ucar et al., 2020
$C_{20}H_{22}N_6O_4S_2Zn$	103,4	-2,01452	2,32	-0,36456	Ucar et al., 2020
$C_{20}H_{22}N_6O_4S_2Mn$	64,8	-1,81158	2,36	-0,373052	Ucar et al., 2020



Εικόνα 131: Διάγραμμα συσχέτισης των τιμών pIC_{50} έναντι των κυττάρων MCF-7 και των τιμών $pMIC$ έναντι της *P. aeruginosa*.

Πίνακας 22: Τιμές IC_{50} και pIC_{50} έναντι των κυττάρων MDA-MB-231, και τιμές MIC και $pMIC$ έναντι της *P. aeruginosa*.

Ένωση	IC_{50} (μM)	$pIC_{50} = -\log (IC_{50})$	MIC (μM)	$pMIC = -\log (MIC)$	Βιβλιογραφία
CIPTIN	0,85	0,07058	0,741	0,130182	
SLS@CIPTIN	1,18	-0,07188	0,314	0,50307	
CTAB@CIPTIN	0,31	0,50864	0,559	0,252588	
$C_{10}H_{13}N_3O_2S$	110,7	-2,04415	5,22	-0,71799	Ucar et al., 2020
$C_{20}H_{22}N_6O_4S_2Co$	66,3	-1,82178	2,34	-0,36978	Ucar et al., 2020
$C_{20}H_{22}N_6O_4S_2Zn$	36,9	-1,56726	2,32	-0,36456	Ucar et al., 2020
$C_{20}H_{22}N_6O_4S_2Mn$	71,8	-1,85625	2,36	-0,373052	Ucar et al., 2020

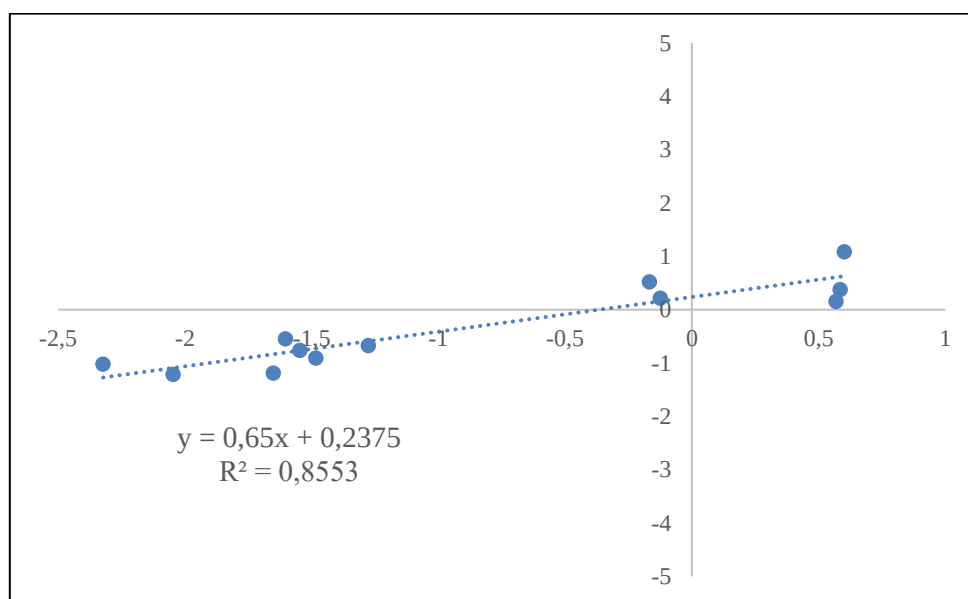


Εικόνα 132: Διάγραμμα συσχέτισης των τιμών pIC_{50} έναντι των κυττάρων MDA-MB-231 και των τιμών $pMIC$ έναντι της *P. aeruginosa*.

Πίνακας 23: Τιμές IC_{50} και pIC_{50} έναντι των κυττάρων MCF-7, και τιμές MIC και $pMIC$ έναντι της *E.coli*.

Ένωση	IC_{50} (μM)	$pIC_{50} = -\log (IC_{50})$	MIC (μM)	$pMIC = -\log (MIC)$	Βιβλιογραφία
CIPTIN	1,47	-0,16732	0,301	0,52143	
SLS@CIPTIN	1,33	-0,12385	0,608	0,21610	
CTAB@CIPTIN	0,27	0,56864	0,695	0,15802	
SLS@DPTD	0,26	0,58503	0,419	0,37779	
CTAB@DPTD	0,25	0,60206	0,082	1,08619	
ahpv	44,8	-1,65135	15,4	-1,18709	Abdel-Rahman et al., 2016
[Ni(ahpv)H₂O]·H₂O	30,4	-1,48287	8,05	-0,90576	Abdel-Rahman et al., 2016
C₂₈H₃₄N₄O₂	111,3	-2,04650	7,5	-1,21420	Abdel-Rahman et al., 2020
C₂₈H₃₉N₄O_{5.5}Cu	18,9	-1,27646	4,72	-0,67404	Abdel-Rahman et al., 2020
C₂₈H₃₂N₄O₂Pd	35,2	-1,54654	5,78	-0,76184	Abdel-Rahman et al., 2020
C₂₈H₃₃N₄O₂Ag	40,1	-1,60314	3,54	-0,54914	Abdel-Rahman et al., 2020
C₁₀H₁₃N₃O₂S	210,2	-2,32263	10,45	-1,01902	Ucar et al., 2020

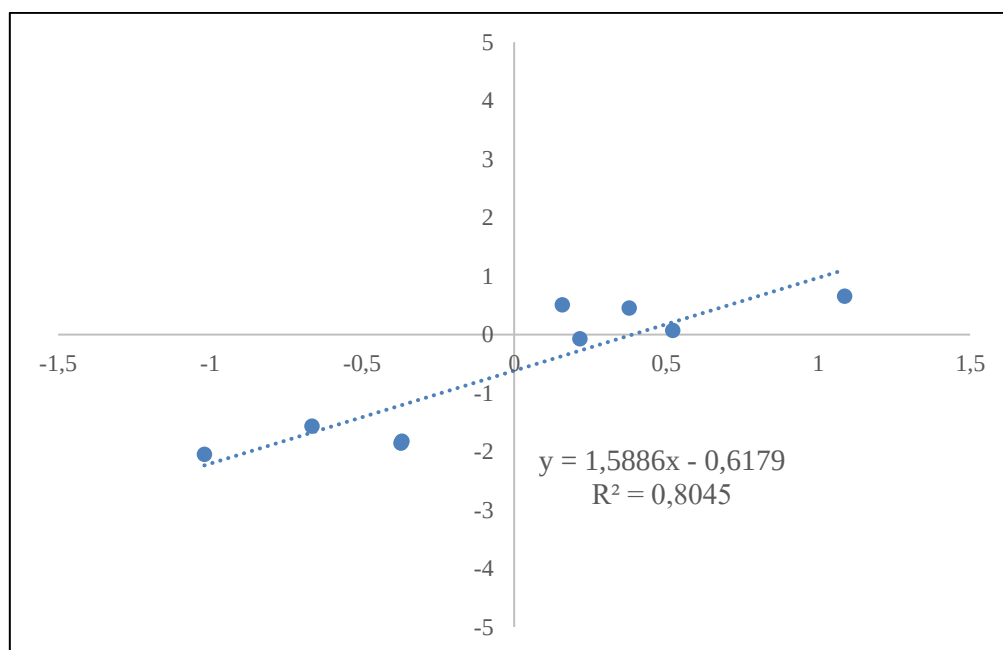
όπου ahpv = 2-amino-3-hydroxypyridine



Εικόνα 133: Διάγραμμα συσχέτισης των τιμών pIC_{50} έναντι των κυττάρων MCF-7 και των τιμών $pMIC$ έναντι της *E.coli*.

Πίνακας 24: Τιμές IC_{50} και pIC_{50} έναντι των κυττάρων MDA-MB-231, και τιμές MIC και $pMIC$ έναντι της *E.coli*.

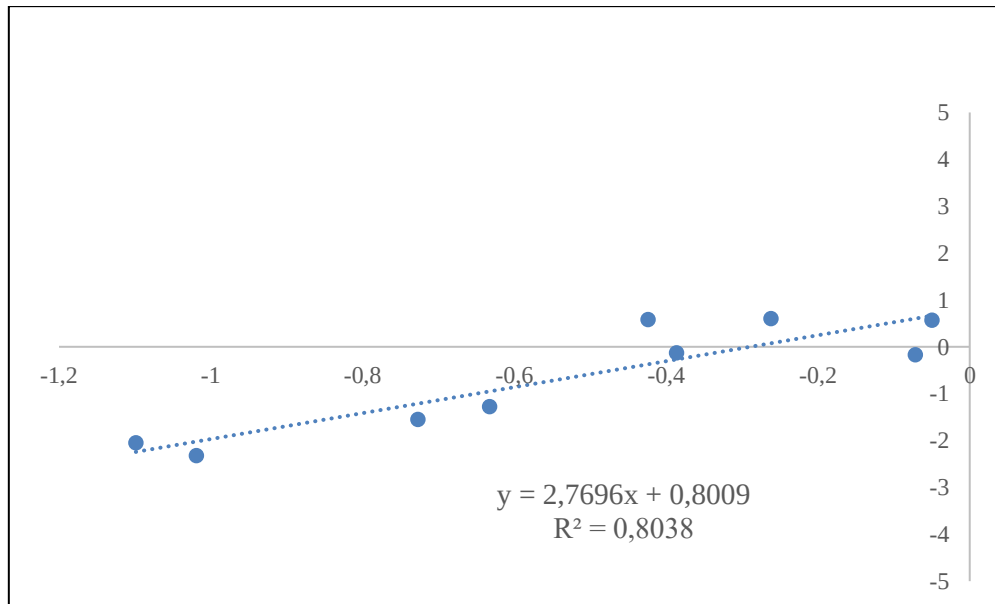
Ένωση	IC_{50} (μM)	$pIC_{50} = -\log (IC_{50})$	MIC (μM)	$pMIC = -\log (MIC)$	Βιβλιογραφία
CIPTIN	0,85	0,07058	0,301	0,52143	
SLS@CIPTIN	1,18	-0,07188	0,608	0,21610	
CTAB@CIPTIN	0,31	0,50864	0,695	0,15802	
SLS@DPTD	0,35	0,45593	0,419	0,37779	
CTAB@DPTD	0,22	0,65758	0,082	1,08619	
$C_{10}H_{13}N_3O_2S$	110,7	-2,04415	10,45	-1,01902	Ucar et al., 2020
$C_{20}H_{22}N_6O_4S_2Co$	66,34	-1,82178	2,34	-0,36978	Ucar et al., 2020
$C_{20}H_{22}N_6O_4S_2Zn$	36,92	-1,56726	4,63	-0,66559	Ucar et al., 2020
$C_{20}H_{22}N_6O_4S_2Mn$	71,82	-1,85625	2,36	-0,37305	Ucar et al., 2020



Εικόνα 134: Διάγραμμα συσχέτισης των τιμών pIC_{50} έναντι των κυττάρων MDA-MB-231 και των τιμών $pMIC$ έναντι της *E.coli*.

Πίνακας 25: Τιμές IC_{50} και pIC_{50} έναντι των κυττάρων MCF-7, και τιμές MIC και $pMIC$ έναντι του *S.aureus*.

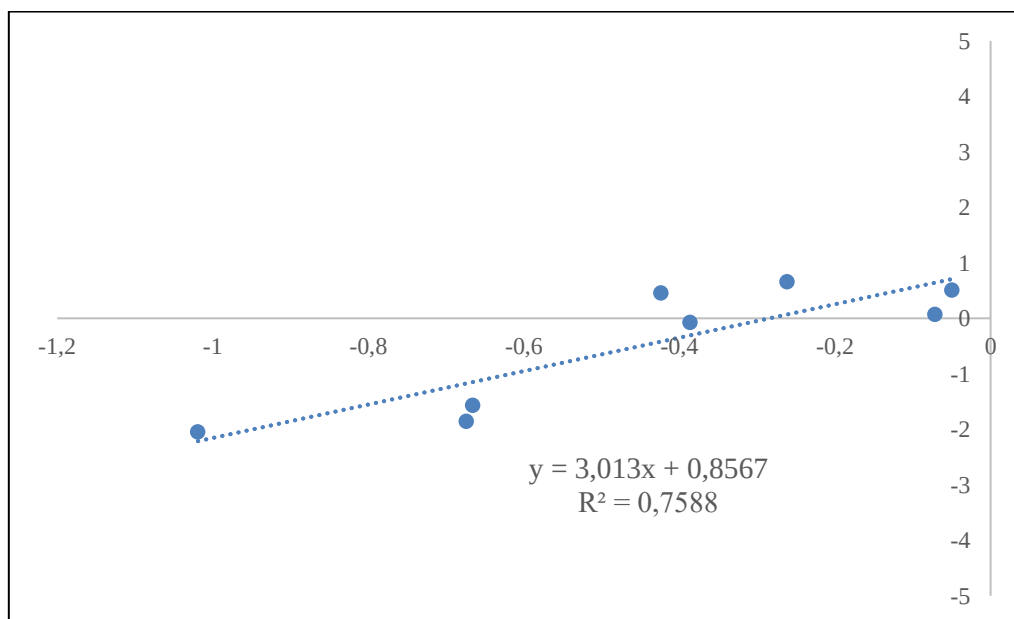
Ένωση	IC_{50} (μM)	$pIC_{50} = -\log(IC_{50})$	MIC (μM)	$pMIC = -\log(MIC)$	Βιβλιογραφία
CIPTIN	1,47	-0,16732	1,179	-0,07151	
SLS@CIPTIN	1,33	-0,12385	2,433	-0,38614	
CTAB@CIPTIN	0,27	0,56864	1,121	-0,04961	
SLS@DPTD	0,26	0,58503	2,654	-0,42390	
CTAB@DPTD	0,25	0,60206	1,827	-0,26174	
$C_{28}H_{34}N_4O_2$	111,3	-2,04650	12,55	-1,09880	Abdel-Rahman et al., 2020
$C_{28}H_{39}N_4O_{5.5}Cu$	18,9	-1,27646	4,29	-0,63264	Abdel-Rahman et al., 2020
$C_{28}H_{32}N_4O_2Pd$	35,2	-1,54654	5,33	-0,72708	Abdel-Rahman et al., 2020
$C_{10}H_{13}N_3O_2S$	210,2	-2,32263	10,44	-1,01901	Ucar et al., 2020



Εικόνα 135: Διάγραμμα συσχέτισης των τιμών pIC_{50} έναντι των κυττάρων MCF-7 και των τιμών $pMIC$ έναντι του *S. aureus*.

Πίνακας 26: Τιμές IC_{50} και pIC_{50} έναντι των κυττάρων MDA-MB-231, και τιμές MIC και $pMIC$ έναντι του *S.aureus*.

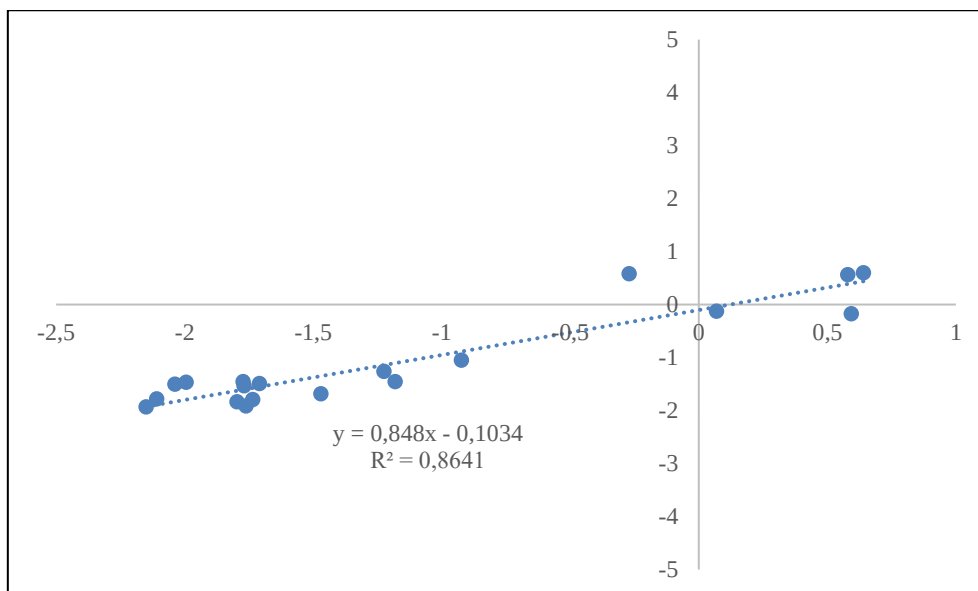
Ένωση	IC_{50} (μM)	$pIC_{50} = -\log (IC_{50})$	MIC (μM)	$pMIC = -\log (MIC)$	Βιβλιογραφία
CIPTIN	0,85	0,07058	1,179	0,52143	
SLS@CIPTIN	1,18	-0,07188	2,433	0,21610	
CTAB@CIPTIN	0,31	0,50864	1,121	0,15802	
SLS@DPTD	0,35	0,45593	2,654	0,37779	
CTAB@DPTD	0,22	0,65758	1,827	1,08619	
$C_{10}H_{13}N_3O_2S$	110,7	-2,04415	10,45	-1,01902	Ucar et al., 2020
$C_{20}H_{22}N_6O_4S_2Zn$	36,92	-1,56726	4,63	-0,66559	Ucar et al., 2020
$C_{20}H_{22}N_6O_4S_2Mn$	71,82	-1,85625	2,36	-0,37305	Ucar et al., 2020



Εικόνα 136: Διάγραμμα συσχέτισης των τιμών pIC_{50} έναντι των κυττάρων MDA-MB-231 και των τιμών $pMIC$ έναντι του *S. aureus*.

Πίνακας 27: Τιμές IC₅₀ και pIC₅₀ έναντι των κυττάρων MCF-7, και τιμές MIC και pMIC έναντι του *S. epidermidis*.

Ένωση	IC ₅₀ (μM)	pIC ₅₀ = -log (IC ₅₀)	MIC (μM)	pMIC = -log (MIC)	Βιβλιογραφία
CIPTIN	1,47	-0,16732	0,255	0,59346	
SLS@CIPTIN	1,33	-0,12385	0,854	0,06854	
CTAB@CIPTIN	0,27	0,56864	0,263	0,58004	
SLS@DPTD	0,26	0,58503	1,9	-0,27068	
CTAB@DPTD	0,25	0,60206	0,229	0,64016	
C₁₉H₁₉FN₄O₂	84,9	-1,92865	141,1	-2,1495	Narsimha et al., 2020
C₁₉H₁₈ClFN₄O₂	59,4	-1,77386	128,6	-2,10922	Narsimha et al., 2020
C₁₉H₁₇Cl₂FN₄O₂	48,2	-1,47029	29,5	-1,47029	Narsimha et al., 2020
C₁₉H₁₈BrFN₄O₂	81,7	-1,76118	57,7	-1,76118	Narsimha et al., 2020
C₁₉H₁₈F₂N₄O₂	18,2	-1,22491	16,8	-1,22491	Narsimha et al., 2020
C₁₉H₁₈F₂N₄O₂	11,2	-0,92318	8,4	-0,92318	Narsimha et al., 2020
C₂₀H₁₈F₄N₄O₂	28,1	-1,77224	59,2	-1,77224	Narsimha et al., 2020
C₁₉H₁₈FN₅O₄	68,2	-1,79655	62,6	-1,79655	Narsimha et al., 2020
C₂₁H₂₀FN₅O₂S	33,6	-1,76906	58,8	-1,76906	Narsimha et al., 2020
C₂₁H₂₀FN₅O₄S	31,6	-2,03829	109,2	-2,03829	Narsimha et al., 2020
C₂₅H₂₂FN₅OS	61,9	-1,73562	54,4	-1,73562	Narsimha et al., 2020
C₂₀H₁₇BrFN₅OS₂	29,2	-1,99447	98,7	-1,99447	Narsimha et al., 2020
C₂₁H₁₉BrFN₅O₃	30,6	-1,70943	51,2	-1,70943	Narsimha et al., 2020
C₂₀H₁₈FN₅O₂S	28,1	-1,18156	15,2	-1,18156	Narsimha et al., 2020



Εικόνα 137: Διάγραμμα συσχέτισης των τιμών pIC₅₀ έναντι των κυττάρων MCF-7 και των τιμών pMIC έναντι του *S. epidermidis*.

Με βάση τις τιμές pIC₅₀ των ουσιών που συντέθηκαν στην παρούσα διατριβή, έναντι των δύο καρκινικών σειρών και τις τιμές pMIC αυτών έναντι των βακτηρίων *E.coli* (Πίνακες 23 και 24), *S. aureus* (Πίνακες 25 και 26) και *S. epidermidis* (Πίνακας 27), σχεδιάστηκαν τα διαγράμματα συσχέτισης των τιμών pIC₅₀ συναρτήσει των pMIC. Ομοίως, αποδεικνύεται η γραμμική συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ της αντικαρκινικής δράσης των ενώσεων έναντι των δύο κυτταρικών καρκινικών σειρών του μαστού και της αντιμικροβιακής τους δράσης έναντι των βακτηρίων *E.coli* (Εικόνες 133 και 134), *S. aureus* (Εικόνες 135 και 136) και *S. epidermidis* (Εικόνα 137). Στην περίπτωση του βακτηρίου *S. epidermidis* μελετήθηκαν μόνο οι συσχετίσεις για την καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7, καθώς δεν υπάρχουν επαρκή βιβλιογραφικά δεδομένα από μελέτες αντικαρκινικής δράσης σε κύτταρα MDA-MB-231 και στο βακτήριο *S. epidermidis*.

Ε' ΜΕΡΟΣ: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ε' μέρος: Συμπεράσματα

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή συντέθηκε και χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά το νέο μεταλλοφάρμακο CIPTIN [$\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{CIP})_2$], από την αντίδραση του εμπορικά διαθέσιμου αντιβιοτικού σιπροφλοξασίνης ($\text{HCIP} \cdot \text{HCl}$) με διφαινυλοδιχλωροκασσίτερο (DPTD). Ταυτόχρονα, απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε το εσωτερικό άλας της σιπροφλοξασίνης (HCIP), το οποίο αποτελεί πρόδρομο μόριο στην αντίδραση παρασκευής του CIPTIN. Επιπλέον, συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν τέσσερις μικκυλιακές δομές με τη χρήση των επιφανειοδραστικών παραγόντων SLS (Sodium lauryl sulphate) και CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide), δύο μικκύλια στα οποία πραγματοποιήθηκε η ενθυλάκωση του μεταλλοφαρμάκου CIPTIN και δύο μικκύλια στα οποία εγκολλώθηκε ο DPTD.

Ο χαρακτηρισμός του CIPTIN πραγματοποιήθηκε σε στερεά και υγρή κατάσταση με μελέτη της περίθλασης ακτίνων X (XRD), ανάλυση της περίθλασης ακτίνων X κόνεως (XRPD), φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (XRF), φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR), φασματοσκοπία ^{119}Sn Mössbauer, θερμική ανάλυση (TG / DTA), διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC), μελέτη του σημείου τήξεως, φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (^1H -NMR) και με φασματομετρία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS). Ο χαρακτηρισμός των μικκυλιακών δομών που συντέθηκαν πραγματοποιήθηκε με μελέτη του σημείου τήξεως, με φασματοσκοπικές τεχνικές φθορισμού ακτίνων X, υπερύθρου, ^{119}Sn Mössbauer, πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου, με θερμική ανάλυση και με διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης.

Από τις μελέτες περίθλασης ακτίνων X, αποδεικνύεται ότι το CIPTIN είναι μια ομοιοπολική οργανοκασσιτερική ένωση που αποτελείται από δύο προσδέτες σιπροφλοξασίνης και μια ομάδα διφαινυλοκασσιτέρου. Η σιπροφλοξασίνη εντάσσεται στο άτομο κασσιτέρου(IV) μέσω του ανιονικού οξυγόνου της αποπρωτονιωμένης καρβοξυλικής ομάδας και του οξυγόνου της κέτο-ομάδας και η γεωμετρία γύρω από το μεταλλικό κασσιτερικό κέντρο είναι οκταεδρική. Επιπλέον, από τις μελέτες αποκαλύφθηκε ότι η αντίδραση σύνθεσης του CIPTIN είναι στερεοειδική, καθώς μόνο το Δ-cis-ισομερές [$\Delta\text{-cis-}[\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{CIP})_2]$] απομονώθηκε στο κρυσταλλικό πλέγμα. Οι ισχυρές

αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου υποδηλώνουν τον σχηματισμό ενός δικτύου δεσμών υδρογόνου δύο διαστάσεων (2D) που αποτελείται από υπερμοριακά συγκροτήματα που σχηματίζονται από τέσσερα μόρια CIPTIN.

Η ανάλυση της περίθλασης ακτίνων X κόνεως επιβεβαιώνει ότι το CIPTIN παραμένει αμετάβλητο σε όλο το δείγμα κόνεως, αφού το φάσμα XRPD κόνεως του ταυτίζεται με το διάγραμμα που προήλθε από την ανάλυση περίθλασης ακτίνων X μονοκρυστάλλου. Από τα πειράματα φασματοσκοπίας φθορισμού ακτίνων X, επιβεβαιώνεται η παρουσία του κασσιτερικού ατόμου στο νέο μεταλλοφάρμακο, αλλά και στα μικκύλια που συντέθηκαν γεγονός που αποδεικνύει ότι οι βιοδραστικές ενώσεις του κασσιτέρου έχουν ενθυλακωθεί μέσα στα μικκύλια. Επιπλέον τα ποσοστά εμφάνισης του κασσιτέρου που υπολογίστηκαν για τις νέες ενώσεις συμφωνούν με τα αντίστοιχα θεωρητικά υπολογισμένα ποσοστά.

Από τις μετατοπίσεις των χαρακτηριστικών δονήσεων του πρόδρομου μορίου HCIP·HCl που παρατηρούνται στα φάσματα FT-IR που λήφθηκαν με φασματοσκοπία υπέρυθρου, προκύπτει ότι το μόριο της σιπροφλοξασίνης εντάσσεται στο μεταλλικό ιόν κασσιτέρου μέσω του οξυγόνου της κέτο- και της καρβοξυλικής ομάδας. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τη μελέτη περίθλασης ακτίνων X. Όσον αφορά τα φάσματα FT-IR των μικκυλίων, εμφανίζονται κυρίως οι χαρακτηριστικές δονήσεις των επιφανειοδραστικών ουσιών SLS ή CTAB, λόγω της χαμηλής στοιχειομετρικής αναλογίας των βιοδραστικών ενώσεων που εγκολπώθηκαν, σε σύγκριση με τους επιφανειοδραστικούς παράγοντες που βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερη αναλογία.

Από τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας ^{119}Sn Mössbauer αποδεικνύεται ότι το άτομο κασσιτέρου στο CIPTIN είναι τετρασθενές Sn(IV). Επιπλέον, από τις τιμές τετραπολικής αλληλεπίδρασης (QS) που υπολογίστηκαν προκύπτει ότι η γεωμετρία γύρω από το κασσιτερικό άτομο είναι cis-οκταεδρική, όπως αποδείχθηκε και από την κρυσταλλογραφία ακτίνων X μονοκρυστάλλου. Τα φάσματα Mössbauer των μικκυλίων SLS@CIPTIN, CTAB@CIPTIN, και CTAB@DPTD αποδεικνύουν την ύπαρξη ενός ατόμου κασσιτέρου στα μικκύλια, ενώ οι τιμές των παραμέτρων ισομερούς μετατόπισης και τετραπολικής αλληλεπίδρασης είναι παραπλήσιες με αυτές

των πρόδρομων μορίων, γεγονός που αποτελεί άλλη μια απόδειξη της ενθυλάκωση τους μέσα στα μικκύλια.

Από τις αναλύσεις TG / DTA προκύπτει ότι το CIPTIN αποσυντίθεται σε 6 στάδια και η μάζα που απομένει είναι 42,08 % (διμερές διοξείδιο του κασσιτέρου) και βρέθηκε ότι αντιστοιχεί σε 13,68 % κασσίτερο. Το ποσοστό αυτό συμφωνεί με το θεωρητικά υπολογισμένο ποσοστό του κασσιτέρου (12,75 %). Επίσης, αποδεικνύεται ότι τα στάδια αποσύνθεσης των μικκυλίων διαφέρουν από αυτά των βιοδραστικών ενώσεων, επιβεβαιώνοντας τον σχηματισμό νέων ουσιών. Οι μελέτες διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να επιβεβαιωθεί εάν οι ουσίες CIPTIN και DPTD αλληλεπιδρούν με τις επιφανειοδραστικές ουσίες SLS ή CTAB σε στερεά κατάσταση. Οι φάσεις ενδόθερμης μετάβασης όλων των μικκυλίων διαφέρουν σε σύγκριση με τις αντίστοιχες φάσεις των πρόδρομων ουσιών και των επιφανειοδραστικών παραγόντων, αποδεικνύοντας ότι όλα τα μικκύλια που συντέθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι σύνθετα υλικά και όχι μείγματα.

Τα αποτελέσματα της μελέτης φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ επιβεβαιώνουν την ένταξη του κασσιτερικού ατόμου στο αντιβιοτικό της σιπροφλοξασίνης λόγω των μετατοπίσεων των χαρακτηριστικών σημάτων συντονισμού του $\text{H}[\text{N}_{\text{δακτύλιος πιπεραζίνης}}]$, του $[\text{C}^2]$, του $\text{H}[\text{C}^5]$ και του $\text{H}[\text{C}^8]$, της $\text{HCIP} \cdot \text{HCl}$ και των σημάτων συντονισμού του DPTD στο φάσμα του CIPTIN. Επιπλέον, η ανίχνευση χαρακτηριστικών σημάτων συντονισμού, τόσο των επιφανειοδραστικών ενώσεων όσο και των βιοδραστικών ουσιών που ενθυλακώθηκαν στα φάσματά των μικκυλίων, αποτελεί ισχυρή ένδειξη του σχηματισμού τους. Τέλος, με την τεχνική φασματομετρίας μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού ταυτοποιήθηκε μοριακό θραύσμα που προκύπτει από την απόσπαση ενός μορίου σιπροφλοξασίνης από το μόριο του CIPTIN και μπορεί να αποτελέσει ένδειξη της αρχικής παρουσίας του CIPTIN στο διάλυμα.

Συμπερασματικά, όλες οι μελέτες χαρακτηρισμού του CIPTIN επιβεβαιώνουν την ένταξη του κασσιτερικού ατόμου στο μόριο της σιπροφλοξασίνης και το σχηματισμό ενός νέου μεταλλοφαρμάκου. Η γεωμετρία που προτείνεται γύρω από το μεταλλικό κέντρο του κασσιτέρου από την μελέτη ακτίνων X μονοκρυστάλλου, αλλά και από τη φασματοσκοπία ^{119}Sn Mössbauer είναι

η οκταεδρική. Επίσης, τα αποτελέσματα της περίθλασης ακτίνων X, της φασματοσκοπίας FT-IR και της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ συμφωνούν ότι η ένταξη της σιπροφλοξασίνης στο άτομο κασσιτέρου(IV) πραγματοποιείται μέσω του οξυγόνου της αποπρωτονιωμένης καρβοξυλικής ομάδας και του οξυγόνου της κέτο-ομάδας. Αντίστοιχα, οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των μικκυλίων (φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X, φασματοσκοπία ^{119}Sn Mössbauer, θερμική ανάλυση TG / DTA, διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης και φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$), αποδεικνύουν ότι έχει πραγματοποιηθεί η εγκόλπωση των ενώσεων CIPTIN και DPTD στους επιφανειοδραστικούς παράγοντες SLS και CTAB.

Η σταθερότητα των ενώσεων που συντέθηκαν επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού (UV-Vis) και με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$, προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι *in vitro* και *in vivo* βιολογικές μελέτες, οι οποίες απαιτούν έως και 48 ώρες επώαση με τις υπό μελέτη ουσίες. Η μελέτη της σταθερότητας των νέων ουσιών είναι σημαντική καθώς αποδεικνύει ότι οι ενώσεις δεν διασπώνται σε επιμέρους ομάδες ή σε ιόντα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και συνεπώς η βιολογική δράση που εμφανίζουν οφείλεται σε ολόκληρο το μόριο.

Η αντικαρκινική δράση του νέου μεταλλοαντιβιοτικού και των μικκυλίων που συντέθηκαν ελέγχθηκε έναντι των δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενων καρκινικών κυτταρικών σειρών του μαστού των MCF-7 (ERs +) και των MDA-MB-231 (ERs -). Ένας από τους στόχους της διατριβής ήταν η σύνθεση νέων ενώσεων από δυο διαφορετικές χημικές οντότητες με αντικαρκινική δράση, έτσι ώστε να δημιουργηθεί μια νέα ένωση, οποία λόγω συνεργίας θα εμφανίζει ενισχυμένη βιολογική δράση (Conjugation of Metals with specific classes of Drugs-CoMeD). Για την εκπλήρωση αυτού του στόχου συντέθηκε το μεταλλοφάρμακο CIPTIN από την συνένωση του αντιβιοτικού σιπροφλοξασίνη με μεταλλικά ιόντα κασσιτέρου. Πράγματι οι μελέτες της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης του CIPTIN απέδειξαν ότι τα μεταλλικά ιόντα κασσιτέρου που ενώθηκαν στη σιπροφλοξασίνη, ενίσχυσαν την αντιπολλαπλασιαστική της δράση τουλάχιστον 20,4 φορές έναντι των αντικαρκινικών κυττάρων MCF-7 και τουλάχιστον 35,2 φορές έναντι των κυττάρων των MDA-MB-231.

Ένας επόμενος στόχος της διατριβής ήταν η περαιτέρω ενίσχυση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης του μεταλλοφαρμάκου και του μεταλλικού υποκαταστάτη που χρησιμοποιήθηκε (διφαινυλοδιχλωροκασσίτερος), μέσω του σχηματισμού μικκυλιακών συστημάτων και της εγκόλπωσης βιοδραστικών ενώσεων σε αυτά. Το μικκύλιο SLS@CIPTIN που συντέθηκε εμφανίζει καλύτερη αντιπολλαπλασιαστική δράση από το CIPTIN έναντι των καρκινικών κυττάρων MCF-7 και το μικκύλιο CTAB@CIPTIN εμφανίζει 5,4 φορές ισχυρότερη δράση έναντι των κυττάρων MCF-7 και 2,7 φορές έναντι των κυττάρων MDA-MB-231. Στην περίπτωση του DPTD φαίνεται ότι η ήδη ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική του δράση ενισχύεται τουλάχιστον 3,3 φορές έναντι των κυττάρων που εκφράζουν οιστρογονικούς υποδοχείς και τουλάχιστον 1,5 φορά έναντι των κυττάρων που δεν εκφράζουν οιστρογονικούς υποδοχείς.

Η ενίσχυση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης του CIPTIN και του DPTD μέσω της εγκόλπωσης τους σε μικκυλιακά συστήματα είναι πολύ πιθανόν να οφείλεται στην βελτιωμένη υδροφιλικότητα που προσφέρουν οι μικκυλιακοί φορείς φαρμάκων οι οποίοι παρέχουν ένα κατάλληλο μη πολικό περιβάλλον, όπου μπορούν να διαλυθούν τα υδρόφοβα φάρμακα. Επιπλέον, η εγκόλπωση των βιοδραστικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε καθώς οι μικκυλιακές δομές είναι γνωστό ότι προσφέρουν επιπλέον πλεονεκτήματα ως φορείς μεταφοράς και παράδοσης αντικαρκινικών φαρμάκων, αφού παρέχουν προστασία από την πρόωρη αποικοδόμηση του φαρμάκου μέσα στον οργανισμό και συμβάλουν στην βιοσυσσωρευση του φαρμάκου στους όγκους (Le Garrec et al., 2004).

Όλες οι ουσίες που συντέθηκαν στην διατριβή εμφανίζουν ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση, μεγαλύτερη από αυτή που επιδεικνύει το μεταλλοφάρμακο cisplatin, έναντι των καρκινικών σειρών που μελετήθηκαν. Ενδεικτικά, το CIPTIN εμφανίζει 31,2 φορές ισχυρότερη δράση από το cisplatin, το μικκύλιο CTAB@CIPTIN εμφανίζει 86,1 φορές μεγαλύτερη δράση από το cisplatin, ενώ το μικκύλιο CTAB@DPTD εμφανίζει περίπου 120 φορές ισχυρότερη δράση από αυτή του cisplatin έναντι των κυττάρων MDA-MB-231. Όσον αφορά το CIPTIN και τα μικκύλια στα οποία έχει εγκολληθεί, την ισχυρότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση εμφανίζει το μικκύλιο

CTAB@CIPTIN έναντι και των δύο καρκινικών σειρών του μαστού με τιμές IC_{50} 0,27 (MCF-7) και 0,31 μM (MDA-MB-231). Αντίστοιχα, για τις ενώσεις του DPTD παρατηρείται ότι το μικκύλιο CTAB@DPTD έχει την ισχυρότερη δράση έναντι και των δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών (IC_{50} 0,25 μM έναντι των MCF-7 και 0,22 μM έναντι των MDA-MB-231. Η ισχυρότερη δράση που εμφανίζουν τα μικκύλια που σχηματίστηκαν με τον επιφανειοδραστικό παράγοντα CTAB σε σύγκριση με αυτά που σχηματίστηκαν με SLS είναι αναμενόμενη καθώς το CTAB εμφανίζει ισχυρότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση από το SLS.

Η επιλογή των δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών του μαστού, που διαφέρουν ως προς την έκφραση τους σε οιστρογονικούς υποδοχείς, πραγματοποιήθηκε για να ελεγχθεί η πιθανή εκλεκτικότητα των νέων ενώσεων ως προς την έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων. Δηλαδή, για να μελετηθεί εάν οι νέες ενώσεις «αναγνωρίζουν» και «καταστρέφουν» επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα ανάλογα με το αν εκφράζουν οιστρογονικούς υποδοχείς ή όχι. Από τη συγκεκριμένη μελέτη προέκυψε ότι οι ενώσεις που συντέθηκαν δεν εμφανίζουν εκλεκτικότητα που να σχετίζεται με την παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων, αλλά από τους θεραπευτικούς δείκτες που υπολογίστηκαν αποδεικνύεται ότι όλες οι ενώσεις που συντέθηκαν, με εξαίρεση το μικκύλιο SLS@DPTD, παρουσιάζουν εκλεκτικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων σε σύγκριση με τα υγιή κύτταρα, είτε αυτά εκφράζουν οιστρογονικούς υποδοχείς, είτε όχι.

Σε ένα επόμενο στάδιο μελετήθηκε η τοξικότητα των ενώσεων που συντέθηκαν, καθώς ο προκλινικός έλεγχος τοξικότητας σε διάφορα βιολογικά συστήματα είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη φαρμάκων και αποκαλύπτει πληροφορίες για τις τοξικές επιδράσεις των υπό ανάπτυξη βιοδραστικών παραγόντων (Weaver and Valentin, 2019). Η τοξικότητα των ενώσεων που συντέθηκαν εξετάστηκε *in vitro* έναντι της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς MRC-5 και *in vivo* στον ζωντανό οργανισμό *Artemia Salina*. Μεταξύ των ενώσεων που μελετήθηκαν την μεγαλύτερη *in vitro* και *in vivo* τοξικότητα εμφανίζουν τα μικκύλια στα οποία έχει εγκολπωθεί ο DPTD, ενώ και από τις δύο μελέτες αποδεικνύεται ότι το CIPTIN εμφανίζει τη μικρότερη τοξικότητα. Από τα παραπάνω αποδεικνύεται ότι η τοξικότητα των μικκυλίων εξαρτάται κυρίως από τη βιοδραστική ένωση που

εγκολπώνουν και όχι από τον επιφανειοδραστικό παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεσή τους.

Το εύρος των τιμών του θεραπευτικού δείκτη για τις ενώσεις που συντέθηκαν είναι από 0,85 έως 2,96 έναντι των καρκινικών κυττάρων MCF-7 και από 0,63 έως 2,86 έναντι των κυττάρων MDA-MB-231. Οι αντίστοιχοι θεραπευτικοί δείκτες, έναντι των συγκεκριμένων καρκινικών σειρών του μαστού, του αντικαρκινικού φαρμάκου cisplatin είναι 0,20 και 0,04 (Banti et al., 2016). Συνεπώς, όλες οι ενώσεις που συντέθηκαν εμφανίζουν μεγαλύτερο θεραπευτικό δείκτη από αυτό του cisplatin και άρα μειωμένη τοξικότητα έναντι των υγιών κυττάρων ενός οργανισμού. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αρκετά ενθαρρυντικό, καθώς ένα βασικό μειονέκτημα του κυτταροστατικού φαρμάκου cisplatin είναι οι σοβαρές παρενέργειές του στους υγιείς ιστούς (Dasari and Bernard Tchounwou, 2014).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν και μελέτες για τον έλεγχο της γονοτοξικότητας των νέων ενώσεων, καθώς οι ενώσεις με γονοτοξική δράση οδηγούν σε έμμεσες ή άμεσες επιδράσεις στο DNA, συμπεριλαμβανομένων της επαγωγής μεταλλάξεων και της πρόκλησης βλαβών στο DNA που μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο ή/και σε κληρονομικές αλλοιώσεις του γενετικού κώδικα (Brambilla et al., 1982). Οι μελέτες γονοτοξικότητας πραγματοποιήθηκαν *in vitro* με τη μέθοδο των μικροπυρηνίσκων σε φυσιολογικούς εμβρυικούς ινοβλάστες (MRC-5), αλλά και *in vivo* με τη βοήθεια του ζωντανού οργανισμού *Allium cepa*. Από τις μελέτες αποδεικνύεται ότι τα μικκύλια που εγκολπώνουν DPTD εμφανίζουν τη μεγαλύτερη γονοτοξική δράση, ενώ το CIPTIN δεν εμφανίζει γονοτοξική δράση, όπως άλλωστε αποδείχθηκε και από τις μελέτες της *in vitro* και *in vivo* τοξικότητας. Ωστόσο, τα ποσοστά εμφάνισης μικροπυρηνίσκων για όλες τις ενώσεις που συντέθηκαν (0,78-1,14 %) είναι μικρότερα από αυτά του cisplatin (1,6 %). Επίσης, η γονοτοξική δράση των μικκυλίων του DPTD εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις τουλάχιστον 97 φορές μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις IC₅₀ έναντι των δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών.

Οι μελέτες της κυτταρικής μορφολογίας, του κατακερματισμού του πυρηνικού DNA, του κυτταρικού κύκλου και της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης πραγματοποιήθηκαν με

σκοπό να διερευνηθεί ο τρόπος με τον οποίο οι ουσίες που συντέθηκαν δρουν ως αντιπολλαπλασιαστικοί παράγοντες και προκαλούν τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών είναι σε συμφωνία και προτείνουν ότι οι βιοδραστικοί παράγοντες που συντέθηκαν προκαλούν αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο μέσω μιτοχονδριακών μονοπατιών. Πιο συγκεκριμένα, οι χαρακτηριστικές αποπτωτικές μορφολογικές αλλαγές, η αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων που βρίσκονται στη sub-G1 κατά την μελέτη του κυτταρικού κύκλου και ο κατακερματισμός του πυρηνικού DNA που παρατηρήθηκε στα κύτταρα MCF-7 μετά την επώασή τους με τις ενώσεις, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι ενώσεις προκαλούν κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης. Στη συνέχεια, οι μελέτες της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης αποκάλυψαν ότι οι νέες ενώσεις προκαλούν απόπτωση καθώς δρουν στα μιτοχόνδρια.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης των οργανοκασσιτερικών ενώσεων, περιλαμβάνει μια σειρά από συμβάντα τα οποία οδηγούν στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια στον κυτταρόπλασμα, στον σχηματισμό των αποπτωσωμάτων και τελικά στην διόγκωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και στον κατακερματισμό του DNA (Kumar et al., 2020). Συνεπώς, ο μηχανισμός με τον οποίο βρέθηκε ότι δρουν οι ενώσεις που συντέθηκαν, έρχεται σε συμφωνία με τον μηχανισμό που προτείνεται βιβλιογραφικά.

Σε ένα επόμενο στάδιο ελέγχθηκε και η ικανότητα των νέων ενώσεων να αλληλεπιδρούν με το DNA, καθώς το μόριο αυτό αποτελεί στόχο διαφόρων χημειοθεραπευτικών, όπως το cisplatin (Ghosh, 2019). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το CIPTIN και τα μικκύλια που το εγκολπώνουν αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω συναρμογής στην εξωτερική αύλακα αφού παρατηρήθηκε υπερχρωϊσμός και βαθυχρωμία. Επίσης, βρέθηκε ότι το μικκύλιο CTAB@CIPTIN έχει τη μεγαλύτερη σταθερά δέσμευσης για το DNA και άρα συνδέεται ισχυρότερα με αυτό.

Σήμερα πολλές επιδημιολογικές συσχετίσεις μεταξύ συγκεκριμένων βακτηρίων και καρκινικών τύπων αρχίζουν να γίνονται κατανοητές σε μοριακό επίπεδο (Goodman and Gardner, 2018). Ταυτόχρονα, η ανάπτυξη των τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενιάς επιτρέπει τη

διεξοδική διερεύνηση του μικροβιώματος, όπως αυτή του ανθρώπινου εντέρου, επιτρέποντας την παρατήρηση των ταξινομικών και μεταβολικών σχέσεων μεταξύ του μικροβιώματος και του καρκίνου. Στο πλαίσιο της συσχέτισης του μικροβιώματος με την ανάπτυξη καρκίνου και σε συνδυασμό με την ανάγκη εύρεσης νέων αντιμικροβιακών ενώσεων λόγω του παγκοσμίου προβλήματος της μικροβιακής ανθεκτικότητας έναντι των αντιβιοτικών, πραγματοποιήθηκαν οι αντιμικροβιακές μελέτες των ενώσεων που συντέθηκαν και ελέγχθηκε η σχέση μεταξύ της αντικαρκινικής και αντιμικροβιακής δράσης των νέων ενώσεων.

Οι αντιμικροβιακές μελέτες πραγματοποιήθηκαν έναντι βακτηριακών στελεχών (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*) που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού (Urbaniak et al., 2016, Chiba et al., 2019). Από τις μελέτες του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) αποδεικνύεται ότι το CIPTIN έχει ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση από την εμπορικά διαθέσιμη HCIP·HCl έως και 4,2 φορές (*S. epidermidis*) και έως και 135 φορές μεγαλύτερη δράση από τον DPTD, λόγω της συνεργιστικής δράσης των πρόδρομων αυτών μορίων. Επίσης, βρέθηκε ότι η δράση των μικκυλίων που εγκολπώνουν CIPTIN βελτιώνεται έναντι της *P. aeruginosa* έως και 2,4 φορές, ενώ η εγκόλπωση του DPTD σε μικκύλια βελτιώνει τη δράση του έως και 314 φορές όπως στην περίπτωση της *E. coli*. Σύμφωνα με την κατάταξη του Shungu (Shungu et al., 1983), τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν είναι ευαίσθητα στις ενώσεις που συντέθηκαν με εξαίρεση την *P. aeruginosa* που είναι ανθεκτική στα μικκύλια που εγκολπώνουν DPTD.

Από τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης (MBC) επιβεβαιώνεται ότι το CIPTIN εμφανίζει ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση από την σιπροφλοξασίνη έως και 3,6 φορές έναντι όλων των βακτηριακών στελεχών που μελετήθηκαν, ενώ η δράση του έναντι της *P. aeruginosa* και του *S. epidermidis* βελτιώνεται ακόμα περισσότερο όταν αυτό εγκολπωθεί στους επιφανειοδραστικούς παράγοντες CTAB και SLS. Επίσης, ο DPTD δεν έχει δράση σε συγκεντρώσεις μέχρι 100μM ενώ όταν εγκολπωθεί σε μικκυλιακές δομές αποκτά ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι της *E. coli*, του *S. aureus* και του *S. epidermidis*. Το μεταλλοφάρμακο

CIPTIN και το μικκύλιο CTAB@CIPTIN έχει βακτηριοκτόνο δράση έναντι όλων των βακτηρίων που μελετήθηκαν εκτός του *S. epidermidis*, ενώ το μικκύλιο SLS@CIPTIN είναι βακτηριοκτόνο έναντι όλων των βακτηριακών στελεχών.

Ο προσδιορισμός των ζωνών αναστολής που προκαλούν οι νέες ενώσεις απέδειξε ότι το CIPTIN προκαλεί μεγαλύτερες ζώνες αναστολής από ότι το εμπορικά διαθέσιμο αντιβιοτικό της σιπροφλοξασίνης έναντι της *P. aeruginosa* και των *S. aureus* και *S. epidermidis* λόγω του συνεργιστικού φαινομένου. Η αντιμικροβιακή δράση του μικκύλιου SLS@CIPTIN ενισχύθηκε έναντι της *E.coli*, όπως και η δράση των μικκυλίων του κασσιτέρου έναντι όλων σχεδόν των βακτηριακών στελεχών, αυξάνοντας την κυτταρική διαπερατότητα των μη υδατοδιαλυτών ενώσεων (Croy and Kwon, 2006). Σύμφωνα με την ταξινόμηση του Shungu (Shungu et al., 1983), τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν είναι ευαίσθητα σε όλες τις ουσίες που συντέθηκαν. Επίσης, οι μελέτες της επίδρασης των νέων ενώσεων στο βακτηριακό βιοφίλμ απέδειξαν ότι το νέο μεταλλοφάρμακο CIPTIN εξαλείφει το σχηματισμό βακτηριακού βιοφίλμ πιο αποτελεσματικά από ότι το εμπορικά διαθέσιμο φάρμακο της σιπροφλοξασίνης, καθώς η αντιμικροβιακή δράση της HCIP·HCl ενισχύεται μετά την συμπλοκοποίηση της με τα κασσιτερικά ιόντα που εμφανίζουν επίσης αντιμικροβιακή δράση (συνεργιστική δράση).

Τέλος, η διερεύνηση της σχέσης μεταξύ της αντικαρκινικής και αντιμικροβιακής δράσης των ενώσεων που συντέθηκαν, αποκάλυψε ότι υπάρχει μια γραμμική σχέση μεταξύ των δυο αυτών δράσεων στους βιοδραστικούς παράγοντες. Η γραμμική σχέση μεταξύ της αντικαρκινικής και αντιμικροβιακής δράσης που εμφανίζουν οι ενώσεις, βρέθηκε να εμφανίζεται ανάμεσα στην αντικαρκινική δράση των ενώσεων έναντι και των δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών του μαστού και στην αντιμικροβιακή δράση των ενώσεων έναντι όλων των μικροβιακών στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη διατριβή. Μελλοντικές μελέτες, σε μεγαλύτερο αριθμό βιοδραστικών ενώσεων και σε διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, είναι απαραίτητες για την εξαγωγή καλύτερων συσχετίσεων και την γενίκευση των συμπερασμάτων.

Z' ΜΕΡΟΣ: ΠΕΡΙΛΗΨΗ

(Στην ελληνική και στην αγγλική γλώσσα)

Z' μέρος: Περίληψη

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή συντέθηκε και χαρακτηρίστηκε πλήρως το νέο μεταλλοθεραπευτικό $\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{CIP})_2$ (**CIPTIN**) (HCIP = σιπροφλοξασίνη) από την αντίδραση του εμπορικά διαθέσιμου αντιβιοτικού υδροχλωριωμένη σιπροφλοξασίνη (**HCIP·HCl**) με το άλας του διφαινυλοδιχλωροκασσιτέρου (Ph_2SnCl_2 **DPTD**). Επίσης απομονώθηκε και λύθηκε η κρυσταλλική δομής του εσωτερικού άλατος της σιπροφλοξασίνης (**HCIP**), που αποτελεί πρόδρομο μόριο στην αντίδραση παρασκευής του **CIPTIN**. Στη συνέχεια, με σκοπό να ενισχυθεί η υδατοδιαλυτότητα και κατ' επέκταση η βιολογική δράση και η βιοδιαθεσιμότητα του **CIPTIN** και του **DPTD**, παρασκευάστηκαν τα μικκύλια **SLS@CIPTIN**, **CTAB@CIPTIN**, **SLS@DPTD** και **CTAB@DPTD** (SLS = sodium lauryl sulphate and CTAB = cetrimonium bromide).

Το νέο μεταλλοθεραπευτικό χαρακτηρίστηκε σε στερεά κατάσταση με μελέτη της περίθλασης ακτίνων X (XRD), ανάλυση της περίθλασης ακτίνων X κόνεως (XRPD), φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (XRF), φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR), φασματοσκοπία ^{119}Sn Mössbauer, θερμική ανάλυση (TG / DTA), διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC), μελέτη του σημείου τήξεως και σε υγρή κατάσταση με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-VIS), φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (^1H -NMR) και με φασματοσκοπία μάζας ιοντικού ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS). Ο χαρακτηρισμός των μικκυλίων πραγματοποιήθηκε με μελέτη του σημείου τήξεως, με φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X, υπερύθρου, ^{119}Sn Mössbauer, πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου, με θερμική ανάλυση και με διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης.

Η αντιπολλαπλασιαστική δράση του **CIPTIN** και των μικκυλίων **SLS@CIPTIN**, **CTAB@CIPTIN**, **SLS@DPTD** και **CTAB@DPTD**, μελετήθηκε έναντι των ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών του μαστού: MCF-7 (εκφράζουν οιστρογονικούς υποδοχείς) και MDA-MB-231 (δεν εκφράζουν οιστρογονικούς υποδοχείς). Το **CIPTIN** εμφανίζει τουλάχιστον 20,4 φορές ισχυρότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση από την **HCIP·HCl** έναντι των κυττάρων MCF-7 και τουλάχιστον 35,2 φορές έναντι των κυττάρων των MDA-MB-231, λόγω της συνεργιστικής

δράσης των πρόδρομων μορίων (Conjugation of Metals with specific classes of Drugs-CoMeD). Τα μικκύλια που συντέθηκαν εμφανίζουν βελτιωμένη αντιπολλαπλασιαστική δράση (έως και 5,4 φορές) έναντι και των δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν, σε σύγκριση με τα αρχικά μόρια **CIPTIN** και **DPTD** που εγκολπώθηκαν στις μικκυλιακές δομές. Όλες οι ουσίες που συντέθηκαν στην διατριβή εμφανίζουν πολύ ισχυρότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση από το μεταλλοφάρμακο cisplatin, έως και 120 φορές όπως στην περίπτωση του **CTAB@DPTD** έναντι των κυττάρων MDA-MB-231. Επίσης, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης οιστρογονικών υποδοχέων και της αντιπολλαπλασιαστικής ικανότητας των ενώσεων, ενώ οι θεραπευτικοί δείκτες που υπολογίστηκαν απέδειξαν ότι όλες οι ενώσεις, εκτός από το μικκύλιο **SLS@DPTD**, παρουσιάζουν εκλεκτικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων σε σύγκριση με τα υγιή κύτταρα, είτε αυτά εκφράζουν οιστρογονικούς υποδοχείς, είτε όχι.

Η τοξικότητα των ενώσεων ελέγχθηκε *in vitro* έναντι φυσιολογικών κυττάρων MRC-5 και *in vivo* με το ζωικό μοντέλο *Artemia Salina*, ενώ η πιθανή γονοτοξικότητα ελέγχθηκε *in vitro* με μελέτη των μικροπυρηνίσκων και *in vivo* με τη βοήθεια του μοντέλου *Allium cepa*. Μεταξύ των ενώσεων που συντέθηκαν τα μικκύλια στα οποία εγκολπώθηκε ο **DPTD** (**SLS@DPTD** και **CTAB@DPTD**) εμφανίζουν τη μεγαλύτερη τοξική και γονοτοξική δράση, ενώ το μεταλλοφάρμακο **CIPTIN** εμφανίζει τη μικρότερη. Ωστόσο, το μεταλλοφάρμακο cisplatin εμφανίζει μεγαλύτερη τοξική και γονοτοξική δράση, σε σύγκριση με όλες τις ενώσεις που συντέθηκαν στη διατριβή.

Οι μελέτες της μορφολογίας των κυττάρων, του κυτταρικού κύκλου και του κατακερματισμού του πυρηνικού DNA που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα MCF-7 μετά την επώασή τους με τις ενώσεις που συντέθηκαν, προτείνουν ότι οι νέες ενώσεις προκαλούν κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης. Ταυτόχρονα, οι μελέτες της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης αποκάλυψαν ότι οι νέες ενώσεις προκαλούν απόπτωση μέσω της επίδρασής τους στα μιτοχονδριακά μονοπάτια των κυττάρων. Επιπλέον, με τις μελέτες της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA αποκαλύφθηκε ότι οι το **CIPTIN** και τα μικκύλια **SLS@CIPTIN** και **CTAB@CIPTIN**

έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τα μόρια DNA μέσω συναρμογής στην διπλή έλικα, ενώ το μικκύλιο **CTAB@CIPTIN** εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγγένεια (σταθερά δέσμευσης) για το DNA

Η αντιμικροβιακή δράση των νέων ενώσεων μελετήθηκε έναντι των βακτηριακών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) και *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), με προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης (MBC), των ζωνών αναστολής (IZs) και της επίδρασης των ενώσεων στο σχηματισμό βακτηριακού βιοφιλμ. Το μεταλλοθεραπευτικό **CIPTIN** εμφανίζει ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση από το αντιβιοτικό **HCIP·HCl** έναντι των Gram αρνητικών and Gram θετικών βακτηρίων που ελέγχθηκαν λόγω της συνεργιστικής δράσης των πρόδρομων μορίων. Η αντιμικροβιακή δράση του CIPTIN και του DPTD ενισχύθηκε επίσης μετά την εγκόλπωσή τους στις μικκυλιακές δομές, καθώς αυξήθηκε η υδατοδιαλυτότητα τους. Τέλος, από τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων των μελετών της αντικαρκινικής και αντιμικροβιακής δράσης των ενώσεων, αποκαλύπτεται ότι υπάρχει μια γραμμική σχέση μεταξύ της αντικαρκινικής δράσης των ενώσεων και της αντιμικροβιακής τους δράσης.

Abstract

The new metalloantibiotic of formula $\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{CIP})_2$ (**CIPTIN**) (HCIP = ciprofloxacin) was synthesized and fully characterized, by reacting the commercially available drug ciprofloxacin hydrochloride (**HCIP·HCl**) with diphenyltin dichloride (Ph_2SnCl_2 **DPTD**). The crystal structure of the inner salt of ciprofloxacin (**HCIP**), a precursor molecule in the **CIPTIN** preparation reaction, was also isolated and characterized. With the aim to improve the water solubility and consequently the biological activity and the bioavailability of **CIPTIN** and **DPTD**, the micelles of formulae **SLS@CIPTIN**, **CTAB@CIPTIN**, **SLS@DPTD** and **CTAB@DPTD** (SLS = sodium lauryl sulphate and CTAB = cetrimonium bromide) were synthesized.

The new metallotherrapeutic drug was characterized in the solid state by X-ray crystallography (XRD), X-ray Powder Diffraction (XRPD) analysis, X-ray Fluorescence (XRF) spectroscopy, Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), ^{119}Sn Mössbauer spectroscopy, Thermogravimetry / Differential Thermal Analysis (TG-DTA), differential scanning calorimetry (DTG/DSC), melting point and in solution by UV-Vis, ^1H NMR spectroscopy and Electrospray Ionisation Mass Spectrometry (ESI-MS). The micelles were characterized by melting point (m.p.), X-ray Fluorescence spectroscopy, FT-IR, ^{119}Sn Mössbauer spectroscopy, ^1H NMR spectroscopy, Thermogravimetry / Differential Thermal Analysis (TG-DTA) and differential scanning calorimetry (DTG/DSC).

The antiproliferative activity of **CIPTIN**, **SLS@CIPTIN**, **CTAB@CIPTIN**, **SLS@DPTD** and **CTAB@DPTD** was evaluated against human breast adenocarcinoma cancer cells: MCF-7 (positive to hormone receptors) and MDA-MB-231 (negative to hormone receptors). **CIPTIN** exhibits at least 20,4-fold higher antiproliferative activity against MCF-7 cells and at least 35,2-fold higher against MDA-MB-231 than **HCIP·HCl**, due to the synergistic effect of precursor molecules (Conjugation of Metals with specific classes of Drugs-CoMeD). Generally, micelles show better activity (up to 5,4-fold) than that of **CIPTIN** or **DPTD** against both cancer cell lines. The synthesized compounds exhibit stronger antiproliferative activity than cisplatin up to 120-fold, as in the case of

CTAB@DPTD (against MDA-MB-231). No correlation was found between estrogen receptor expression and the antiproliferative activity of the compounds. The calculated therapeutic indexes show that compounds (except **SLS@DPTD**) are selective against cancer cells, whether they express estrogen receptors or not.

The toxicity was examined *in vitro* against normal human fetal lung fibroblast cells (MRC-5 cells) and *in vivo* by brine shrimp *Artemia Salina* assay. The genotoxicity was tested *in vitro* by micronucleus (MN) assay against MRC-5 cells and *in vivo* by *Allium cepa* test. Among the compounds, micelles which encapsulate **DPTD** (**SLS@DPTD** and **CTAB@DPTD**) exhibit the highest toxicity and genotoxicity, while **CIPTIN** has the lowest one. However, cisplatin exhibits higher toxicity and genotoxicity in comparison to the synthesized compounds.

The determination of the apoptotic cell death, caused by new synthesized compounds, was confirmed by cell morphology study, cell cycle study and DNA fragmentation study. The permeabilization of the mitochondrial membrane test revealed that tested compounds induce apoptosis via mitochondrial pathways. Moreover, DNA binding studies demonstrated that **CIPTIN**, **SLS@CIPTIN** and **CTAB@CIPTIN** interact with DNA molecules by groove binding. **CTAB@CIPTIN** has the highest affinity (binding constant) towards DNA.

The antibacterial activity of the compounds was evaluated against the bacterial species *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), by the means of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC), Inhibition Zones (IZs) and Biofilm Elimination Concentration (BEC). The metalloantibiotic **CIPTIN** exhibits better antibacterial activity than the antibiotic **HCIP·HCl** against both tested Gram negative and Gram positive bacteria due to synergistic effect. The antimicrobial effect of the micelles against tested microbes was enhanced too, since the water solubility of **CIPTIN** and **DPTD** was increased. Finally, this study reveals that there is a linear correlation between the anticancer activity of a compound and its antimicrobial activity.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abal, M., Andreu, J., & Barasoain, I. (2003). Taxanes: Microtubule and Centrosome Targets, and Cell Cycle Dependent Mechanisms of Action. *Current Cancer Drug Targets*, 3(3), 193–203.
- Abdel-Rahman, L. H., Abu-Dief, A. M., El-Khatib, R. M., & Abdel-Fatah, S. M. (2016). Sonochemical synthesis, DNA binding, antimicrobial evaluation and in vitro anticancer activity of three new nano-sized Cu(II), Co(II) and Ni(II) chelates based on tri-dentate NOO imine ligands as precursors for metal oxides. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 162, 298–308.
- Abdel-Rahman, L. H., Adam M. S., Abu-Dief A. M., Ahmed H. E-S., Nafady A. (2020). Non-Linear Optical Property and Biological Assays of Therapeutic Potentials Under In Vitro Conditions of Pd(II), Ag(I) and Cu(II) Complexes of 5-Diethyl amino-2-({2-[(2-hydroxy-Benzylidene)-amino]-phenylimino}-methyl)-phenol. *Molecules*, 25(21), 5089-5096.
- Abraham, J., & Staffurth, J. (2016). Hormonal therapy for cancer. *Medicine*, 44(1), 30–33.
- Abreu, M. T. and Peek, R. M. (2014). Gastrointestinal Malignancy and the Microbiome. *Gastroenterology*, 146(6), 1534–1546.
- Adami, H. O., Persson, I., Ekblom, A., Wolk, A., Ponten, J., Trichopoulos, D. (1995). The aetiology and pathogenesis of human breast cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 333(1-2), 29–35.
- Adzitey, F. (2015). Antibiotic classes and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from selected poultry; a mini review. *World's Veterinary Journal*, 5(3), 36-41.
- Ahmed, A. R. and Hombal, S. M. (1984). Cyclophosphamide (Cytosan). *Journal of the American Academy of Dermatology*, 11(6), 1115–1126.
- Alama, A., Tasso, B., Novelli, F., Sparatore, F. (2009). Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotin as antitumor agents. *Drug Discovery Today*, 14(9-10), 500–508.

- Alborn, W. E., Allen, N. E., & Preston, D. A. (1991). Daptomycin disrupts membrane potential in growing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(11), 2282–2287.
- Alkan-Onyuksel, H., Ramakrishnan, S., Chai, H., & Pezzuto, J. M. (1994). A Mixed Micellar Formulation Suitable for the Parenteral Administration of Taxol. *Pharmaceutical Research*, 11(2), 206–212.
- Annissa, A., Suhartati, T., Yandri, Y., Hadi, S. (2017). Antibacterial Activity of Diphenyltin(IV) and Triphenyltin(IV) 3-Chlorobenzoate Againsts *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. *Oriental Journal of Chemistry*, 33(3), 1133–1139.
- Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K., Juliano, R. L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacological Reviews*, 50(2), 197–263.
- Aranha, O., Wood, D. P., Sarkar, F. H. (2000). Ciprofloxacin mediated cell growth inhibition, S/G2-M cell cycle arrest, and apoptosis in a human transitional cell carcinoma of the bladder cell line. *Clinical Cancer Research*, 6(3), 891-900.
- Aranha, O., Zhu, L., Alhasan, S., Wood, D. P., Kuo, T. H, Sarkar, F. H. (2002). Role of mitochondria in ciprofloxacin induced apoptosis in bladder cancer cells. *The Journal of Urology*, 167(3), 1288-1294.
- Arthur, J. C., Gharaibeh, R. Z., Mühlbauer, M., Perez-Chanona, E., Uronis, J. M., McCafferty, J., Jobin, C. (2014). Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer. *Nature Communications*, 5(1), 4724-4747.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(2), 255–260.
- Balas, V. I., Banti, C. N., Kourkoumelis, N., Hadjidakou, S. K., Geromichalos, G. D., Sahpazidou, D., Hadjiliadis, N. (2012). Structural and In Vitro Biological Studies of Organotin(IV) Precursors;

Selective Inhibitory Activity Against Human Breast Cancer Cells, Positive to Estrogen Receptors. *Australian Journal of Chemistry*, 65(12), 1625-1637.

Balas, V. I., Verginadis, I. I., Geromichalos, G. D., Kourkouvelis, N., Male, L., Hursthouse, M. B., Hadjikakou, S. K. (2011). Synthesis, structural characterization and biological studies of the triphenyltin(IV) complex with 2-thiobarbituric acid. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(7), 2835–2844.

Balasubramanian, D., Srinivas, V., Gaikar, V. G., & Sharma, M. M. (1989). Aggregation behavior of hydrotropic compounds in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry*, 93(9), 3865–3870.

Banerjee, S., Wei, Z., Tan, F., Peck, K. N., Shih, N., Feldman, M., Robertson, E. S. (2015). Distinct microbiological signatures associated with triple negative breast cancer. *Scientific Reports*, 5(1), 1-14.

Banti, C. N. and Hadjikakou, S. K. (2021). Evaluation of Toxicity with Brine Shrimp Assay. *Bio-protocol*, 11(2), 3895-3901.

Banti, C. N., Giannoulis, A. D., Kourkouvelis, N., Owczarzak, A. M., Kubicki, M., Hadjikakou, S. K. (2015). Silver(I) compounds of the anti-inflammatory agents salicylic acid and p-hydroxylbenzoic acid which modulate cell function. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 142(1), 132–144.

Banti, C. N., Giannoulis, A. D., Kourkouvelis, N., Owczarzak, A. M., Kubicki, M., Hadjikakou, S. K. (2014). Novel metallo-therapeutics of the NSAID naproxen. Interaction with intracellular components that leads the cells to apoptosis. *Dalton Transactions*, 43(18), 6848-6863.

Banti, C. N., Giannoulis, A. D., Kourkouvelis, N., Owczarzak, A. M., Poyraz, M., Kubicki, M., Charalabopoulos K., Hadjikakou, S. K. (2012). Mixed ligand–silver(i) complexes with anti-inflammatory agents which can bind to lipoxigenase and calf-thymus DNA, modulating their function and inducing apoptosis. *Metallomics*, 4(6), 545-560.

Banti, C. N., Hadjikakou, S. K., Sismanoglu, T., Hadjiliadis, N. (2019). Anti-proliferative and antitumor activity of organotin(IV) compounds. An overview of the last decade and future perspectives. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 194(1), 114-152.

Banti, C. N., Papatriantafyllopoulou, C., Manoli, M., Tasiopoulos, A. J., Hadjikakou, S. K. (2016). Nimesulide Silver Metallodrugs, Containing the Mitochondriotropic, Triaryl Derivatives of Pnictogen; Anticancer Activity against Human Breast Cancer Cells. *Inorganic Chemistry*, 55(17), 8681–8696.

Banti, C. N. and Hadjikakou, S. K. (2019). Evaluation of Genotoxicity by Micronucleus Assay in vitro and by Allium cepa Test in vivo. *Bio-protocol*, 9(14), 3311-3322.

Banti, C. N., Giannoulis, A. D., Kourkoumelis, N., Owczarzak, A. M., Poyraz, M., Kubicki, M., Charalabopoulos, K., Hadjikakou, S. K. (2012). Mixed ligand-silver(I) complexes with anti-inflammatory agents which can bind to lipoxygenase and calf-thymus DNA, modulating their function and inducing apoptosis. *Metallomics*, 4(6), 545-560.

Banti, C. N., Papatriantafyllopoulou, C., Manoli, M., Tasiopoulos, A. J., Hadjikakou S. K. (2016). Nimesulide Silver Metallodrugs, Containing the Mitochondriotropic, Triaryl Derivatives of Pnictogen; Anticancer Activity against Human Breast Cancer Cells. *Inorganic Chemistry*. 55(17), 8681-8696.

Barawkar, D. A. and Ganesh, K. N. (1995). Fluorescent d(CGCGAATTCGCG): characterization of major groove polarity and study of minor groove interactions through a major groove semantophore conjugate. *Nucleic Acids Research*, 23(1), 159-164.

Barbosa, A. S. L., Guedes, J. de S., da Silva, D. R., Meneghetti, S. M. P., Meneghetti, M. R., da Silva, A. E., Mendonça-Junior, F. J. B. (2018). Synthesis and evaluation of the antibiotic and adjuvant antibiotic potential of organotin(IV) derivatives. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 180(1), 80-88.

Barnard, P. J. and Berners-Price, S. J. (2007). Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, 251(13-14), 1889-1902.

- Baselga, J., Campone, M., Piccart, M., Burris, H. A., Rugo, H. S., Sahmoud, T., Hortobagyi, G. N. (2012). Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(6), 520-529.
- Basu Baul, T. S. (2008). Antimicrobial activity of organotin(IV) compounds: a review. *Applied Organometallic Chemistry*, 22(4), 195-204.
- Bayraktar, S., Batoo, S., Okuno, S., Glück, S. (2019). Immunotherapy in breast cancer. *Journal of Carcinogenesis*, 18(1), 2-16.
- Beatson, G.T (1896). On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: Suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *A Cancer Journal for Clinicians*, 33(2), 108-121.
- Beberok, A., Wrześniok, D., Rok, J., Rzepka, Z., Respondek, M., Buszman, E. (2018). Ciprofloxacin triggers the apoptosis of human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells via the p53/Bax/Bcl-2 signaling pathway. *International Journal of Oncology*. 52(5), 1727-1737.
- Benjamin, D. J. (2014). The efficacy of surgical treatment of cancer – 20 years later. *Medical Hypotheses*, 82(4), 412–420.
- Bennett, R. F. (1996). Industrial manufacture and application of tributyltin compounds. Cambridge: Cambridge University Press.
- Boleij, A., Hechenbleikner, E. M., Goodwin, A. C., Badani, R., Stein, E. M., Lazarev, M. G., Sears, C. L. (2014). The *Bacteroides fragilis* toxin gene is prevalent in the Colon Mucosa of Colorectal Cancer Patients. *Clinical Infectious Diseases*, 60(2), 208-215.
- Bondi, C. A. M., Marks, J. L., Wroblewski, L. B., Raatikainen, H. S., Lenox, S. R., & Gebhardt, K. E. (2015). Human and Environmental Toxicity of Sodium Lauryl Sulfate (SLS): Evidence for Safe Use in Household Cleaning Products. *Environmental Health Insights*, 9(1), 27-31.

- Bonev, B., Hooper, J., Parisot, J. (2008). Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1295–1301.
- Bonire, J. J. and Fricker, S. P. (2001). The in vitro antitumour profile of some 1,2-diaminocyclohexane organotin complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 83(2-3), 217–221.
- Boyd, N. F, Lockwood, G. A., Byng, J. W., Tritchler, D. L., Yaffe, M. J. (1998). Mammographic densities and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 7(12), 1133–1144.
- Brambilla, G., Cavanna, M., De Flora, S. (1982). Genotoxic Effects of Drugs: Experimental Findings Concerning Some Chemical Families of Therapeutic Relevance. *Chemical Carcinogenesis*, 53(1), 193–221.
- Briest, S. and Stearns, V. (2009). Tamoxifen metabolism and its effect on endocrine treatment of breast cancer. *Clinical Advances in Hematology and Oncology*, 7(3), 185-192.
- Brufsky, A. M. (2017). Long-term management of patients with hormone receptor-positive metastatic breast cancer: Concepts for sequential and combination endocrine-based therapies. *Cancer Treatment Reviews*, 59(1), 22-32.
- Buckingham, L. E., Balasubramanian, M., Emanuele, R. M., Clodfelter, K. E., Coon, J. S. (1995). Comparison of solutol HS 15, cremophor EL and novel ethoxylated fatty acid surfactants as multidrug resistance modification agents. *International Journal of Cancer*, 62(4), 436–442.
- Burnie, J. P. and Loudon, K. (1997). Ciprofloxacin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and hands. *The Lancet*, 349(9052), 649-658.
- Butt, A. J., Firth, S. M., Baxter, R. C. (1999). The IGF axis and programmed cell death. *Immunology & Cell Biology*, 77(3), 256–262.
- Cabrera-Rubio, R., Collado, M. C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E., Mira, A. (2012). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 96(3), 544–551.

- Cammas, S., Suzuki, K., Sone, C., Sakurai, Y., Kataoka, K., Okano, T. (1997). Thermo-responsive polymer nanoparticles with a core-shell micelle structure as site-specific drug carriers. *Journal of Controlled Release*, 48(2-3), 157-164.
- Carraher, C. E., Roner, M. R., Shahi, K., Barot, G. (2011). Structural consideration in designing organotin polyethers to arrest the growth of breast cancer cells in vitro. *Materials*, 4(4), 801-815.
- Casas, J. S., Couce, M. D., Sánchez, A., Seoane, R., Sordo, J., Perez-Estévez, A., Vázquez-López, E. (2018). Triphenyltin derivatives of sulfanylcaboxylic esters. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 180(1), 163-170.
- Castellarin, M., Warren, R. L., Freeman, J. D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., Holt, R. A. (2011). *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research*, 22(2), 299–306.
- Chaiwun, B. and Thorner, P. (2007). Fine needle aspiration for evaluation of breast masses. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 9(1), 48-55.
- Chalkley, L. J. and Koornhof, H. J. (1985). Antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* determined by the killing curve method: antibiotic comparisons and synergistic interactions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 28(2), 331–342.
- Chao, H., Mei, W. J., Huang, Q. W., Ji, L. N. (2002). DNA binding studies of ruthenium(II) complexes containing asymmetric tridentate ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 92(3-4), 165–170.
- Chauhan, H. P. S, Bhargava, A., Rao, R. J. (1993). Organotin(IV) derivatives of o-hydroxy-acetophenone glycine. *Indian Journal of Chemistry -Section A*, 32(2), 157-60.

- Chen, C. R., Malik, M., Snyder, M., Drlica K. (1996). DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone – induced DNA cleavage. *Journal of Molecular Biology*, 258(4), 627-637.
- Chen, G. Y., Shaw, M. H., Redondo, G., Nunez, G. (2008). The Innate Immune Receptor Nod1 Protects the Intestine from Inflammation-Induced Tumorigenesis. *Cancer Research*, 68(24), 10060-10067.
- Chiba, A., Bawaneh, A., Velazquez, C., Clear, K. Y., Wilson, A. S., Howard-McNatt, M., Levine E. A., Levi-Polyachenko, N., Yates-Alston, S. A., Diggle, S. P., Soto-Pantoja, D. R., Cook, K. L. (2019). Neoadjuvant chemotherapy shifts breast tumor microbiota populations to regulate drug responsiveness and the development of metastasis. *Molecular Cancer Research*, 18(1), 130-139.
- Chilwal, A. and Narula, A. K. (2013). Synthesis, Characterization, and Thermal and Antibacterial Studies of Diorganotin(IV) Derivatives of Amino Acids. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 188(10), 1369-1381.
- Chin, L., Pomerantz, J. and DePinho, R. A. (1998). The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene—two products—two pathways. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(8), 291-296.
- Chin, N. X., & Neu, H. C. (1984). Ciprofloxacin, a quinolone carboxylic acid compound active against aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 25(3), 319-326.
- Chlebowski, R. T., Hendrix, S. L., Langer, R. D., Stefanick, M. L., Gass, M., Lane, D., WHI Investigators. (2003). Influence of Estrogen Plus Progestin on Breast Cancer and Mammography in Healthy Postmenopausal Women. *JAMA*, 289(24), 3243-3253.
- Christofori, G. and Semb, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(2), 73–76.

- Chrysouli, M. P., Banti, C. N., Kourkouvelis, N., Panayiotou, N., Markopoulos, G. S., Tasiopoulos, A. J., Hadjikakou, S. K. (2018). Chloro(triphenylphosphine)gold(I) a forefront reagent in gold chemistry as apoptotic agent for cancer cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 179(1), 107–120.
- Chrysouli, M. P., Banti, C. N., Kourkouvelis, N., Moushi, E., Tasiopoulos, A., Douvalis, A. P., Papachristodoulou, C., Hatzidimitriou, A.G, Bakas, T., Hadjikakou, S. K. (2020). Ciprofloxacin conjugated to diphenyltin(IV); A novel formulation with enhanced antimicrobial activity. *Dalton Transactions*. 49(1), 11522-11535.
- Clevers, H. and Nusse, R. (2012). Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell*, 149(6), 1192-1205.
- Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO Journal*, 11(5), 1921-1929.
- Cox, J. A. and Swanson, T. A. (2013). Current modalities of accelerated partial breast irradiation. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10(6), 344-356.
- Croy, S. and Kwon, G. (2006). Polymeric Micelles for Drug Delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 12(36), 4669–4684.
- Cui, X., Mao, S., Liu, M., Yuan, H., Du, Y. (2008). Mechanism of Surfactant Micelle Formation. *Langmuir*, 24(19), 10771–10775.
- Cui, X. S. and Donehower, L. A. (2000). Differential gene expression in mouse mammary adenocarcinomas in the presence and absence of wild type p53. *Oncogene*, 19(52), 5988-5996.
- Dapito, D. H., Mencin, A., Gwak, G.-Y., Pradere, J. P., Jang, M.-K., Mederacke, I., Schwabe, R. F. (2012). Promotion of Hepatocellular Carcinoma by the Intestinal Microbiota and TLR4. *Cancer Cell*, 21(4), 504–516.
- Dasari, S. and Bernard T., P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740(1), 364–378.

- Datto, M. B., Hu, P. P., Kowalik, T. F., Yingling, J., & Wang, X. F. (1997). The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. *Molecular and Cellular Biology*, 17(4), 2030-2037.
- Daum, T. E., Schaberg, D. R., Terpenning, M. S., Sottile, W. S., Kauffman, C. A. (1990). Increasing resistance of *Staphylococcus aureus* to ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(9), 1862–1863.
- Davies, C., Pan, H., Godwin, J., Gray, R., Arriagada, R., Raina, V., Peto, R. (2013). Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *The Lancet*, 381(9869), 805–816.
- Davison, H. C., Woolhouse, M. E. J., Low, J. C. (2000). What is antibiotic resistance and how can we measure it? *Trends in Microbiology*, 8(12), 554–559.
- De Placido, S., De Laurentiis, M., Carlomagno, C., Gallo, C., Perrone, F., Pepe, S., Ruggiero, A., Marinelli, A., Pagliarulo, C., Panico, L., Pettinato, G., Petrella, G., Bianco, A. R. (2003). Twenty-year results of the Naples GUN randomized trial: predictive factors of adjuvant tamoxifen efficacy in early breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 9(3), 1039-1046.
- Dejea, C. M., Wick, E. C., Hechenbleikner, E. M., White, J. R., Mark Welch, J. L., Rossetti, B. J., Sears, C. L. (2014). Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(51), 18321-18326.
- Deshpande, T. M., Pandey, A. K., Shyama, S. K. (2017) Review: Breast cancer and etiology. *Trends in Medicine*, 17(1), 1-7.
- Desoize, B. and Madoulet, C. (2002). Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42(3), 317–325.
- Di Stefano, R., Scopelliti, M., Pellerito, C., Casella, G., Fiore, T., Stocco, G. C., Sciacca, I. D. (2004). Organometallic complexes with biological molecules. XVIII. Alkyltin(IV) cephalaxinate complexes:

synthesis, solid state and solution phase investigations. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(3), 534–546.

DiFiore, P. P., Pierce, J. H., Kraus, M. H., Segatto, O., King, C. R., Aaronson, S. A. (1987). *erbB-2* is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science*, 237(4811), 178–182.

Dimiza, F., Perdih, F., Tangoulis, V., Turel, I., Kessissoglou, D. P., Psomas, G. (2011). Interaction of copper(II) with the non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen and diclofenac: Synthesis, structure, DNA- and albumin-binding. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(3), 476–489.

Disis, M. L. and Stanton, S. E. (2018). Immunotherapy in breast cancer: An introduction. *The Breast*, 37(1), 196–199.

Doctor, S. V., & Fox, D. A. (1982). Effects of organotin compounds on maximal electroshock seizure (MES) responsiveness in mice. II. Tricyclohexyltin and triphenyltin. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 10(1), 53–58.

Dominguez, A., Fernandez, A., Gonzalez, N., Iglesias, E., Montenegro, L. (1997). Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *Journal of Chemical Education*, 74(10), 1227.

Drevenšek, P., Ulrih, N. P., Majerle, A., Turel, I. (2006). Synthesis, characterization and DNA binding of magnesium–ciprofloxacin (cfH) complex $[Mg(cf)_2] \cdot 2.5H_2O$. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(10), 1705–1713.

Durgun, M. E., Güngör, S., Özsoy, Y. (2020). Micelles: Promising Ocular Drug Carriers for Anterior and Posterior Segment Diseases. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 36(6), 323–341.

Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K., Harlow, E. (1989). The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243(4893), 934–937.

- Easton, D. F., Bishop, D. T., Ford, D., Crockford, G. P. (1993). The breast cancer linkage consortium. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. *The American Journal of Human Genetics*, 52(4), 678-701.
- Edge, S. B. and Compton, C. C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Annals of Surgical Oncology*, 17(6), 1471–1474.
- Ellis, M. J., Coop, A., Singh, B., Mauriac, L., Llombert-Cussac, A., Jänicke, F., Miller, W. R., Evans, D. B., Dugan, M., Brady, C., Quebe-Fehling, E., Borgs, M. (2001). Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than Tamoxifen for ErbB-1- and/orErbB2-positive, estrogen receptor positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*, 19(18), 3808-3816.
- Ellisen, L.W. and Haber, D.A. (1998). Hereditary breast cancer. *Annual Review of Medicine*, 49(1), 425–436.
- Epe, B. and Woolley, P. (1984). The binding of 6-demethylchlortetracycline to 70S, 50S and 30S ribosomal particles: A quantitative study by fluorescence anisotropy. *The EMBO Journal*, 3(1), 121-126.
- Etebu, E. and Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 4(1), 90-101.
- Evan, G., and Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*, 281(5381), 1317–1322.
- Fabbiani, F. P., Dittrich, B., Florence, A. J., Gelbrich, T., Hursthouse, M. B., Kuhs, W. F., Shankland, N., Sowa, H. (2009). Crystal structures with a challenge: high-pressure crystallisation of ciprofloxacin sodium salts and their recovery to ambient pressure. *CrystEngComm*, 11(7), 1396-1404.

- Fàbrega., A., Madurga, S., Giralt, E., Vila, J. (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial Biotechnology*, 2(1), 40–61.
- Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., & Matthaiou, D. K. (2010). Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resistance Updates*, 13(4-5), 132–138.
- Fasugba, O., Gardner, A., Mitchell, B. G., & Mnatzaganian, G. (2015). Ciprofloxacin resistance in community- and hospital-acquired *Escherichia coli* urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 545-561.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Bray, F. (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), 359-386.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Bray, F. (2018). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, 144(8), 1-13.
- Fief, C. A., Hoang, K. G., Phipps, S. D., Wallace, J. L., Deweese, J. E. (2019). Examining the Impact of Antimicrobial Fluoroquinolones on Human DNA Topoisomerase II α and II β . *ACS Omega*, 4(2), 4049–4055.
- Figura, N., Marcolongo, R., Cavallo, G., Santucci, A., Collodel, G., Spreafico, A., Moretti, E. (2012). Polysorbate 80 and *Helicobacter pylori*: a microbiological and ultrastructural study. *BMC Microbiology*, 12(1), 217-227.
- Flemming, H. C. and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633.
- Ford, D., Easton, D. F., Peto, J. (1995). Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *The American Journal of Human Genetics*, 57(6), 1457–1462.

- Fynan, T.M. and Reiss, M. (1993). Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor- β and its role in oncogenesis. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 4(5), 493–540.
- Gaidamauskas, E., Cleaver, D. P., Chatterjee, P. B., Crans, D. C. (2010). Effect of Micellar and Reverse Micellar Interface on Solute Location: 2,6-Pyridinedicarboxylate in CTAB Micelles and CTAB and AOT Reverse Micelles. *Langmuir*, 26(16), 13153–13161.
- García-Aranda, M., & Redondo, M. (2017). Protein Kinase Targets in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2542-2543.
- Garrett, W. S. (2015). Cancer and the microbiota. *Science*, 348(6230), 80–86.
- Gaudette, L. A., Silberberg, C., Altmayer, C. A., Gao, R. N. (1996). Trends in breast cancer incidence and mortality. *Health Reports*, 8(2), 29-40.
- Gaynor, D., and Griffith, D. M. (2012). The prevalence of metal-based drugs as therapeutic or diagnostic agents: beyond platinum. *Dalton Transactions*, 41(43), 13239-13248.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O’Dea, M. H., Itoh, T., & Tomizawa, J.-I. (1977). Nalidixic acid resistance: A second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 4772–4776.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O’Dea, M. H., & Nash, H. A. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(11), 3872–3876.
- Fisher, L. M., Barot, H. A., & Cullen, M. E. (1986). DNA gyrase complex with DNA: determinants for site-specific DNA breakage. *The EMBO Journal*, 5(6), 1411–1418.
- Gentry, A. C., & Osheroff, N. (2013). DNA Topoisomerases: Type II. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 1(2), 163-168.
- Gey, G. O., Coffman, W. D., Kubicek, M. T. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*, 12(1), 264-265.

- Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The First Metal Based Anticancer Drug. *Bioorganic Chemistry*, 88(1), 102925-102947.
- Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science*, 285(1), 1028–1032.
- Gielen, M. (1996). Tin-based antitumour drugs. *Coordination Chemistry Reviews*, 151(1), 41-51.
- Gielen, M., Davies, A. G., Pannell, K., Tiekink, E. (2008). *Tin chemistry: fundamentals, frontiers, and applications*. Wiley, Hoboken.
- Goodman, B. and Gardner, H. (2018). The microbiome and cancer. *The Journal of Pathology*, 244(5), 667–676.
- Goodwin, A. C., Shields, C. E. D., Wu, S., Huso, D. L., Wu, X., Murray-Stewart, T. R., ... Casero, R. A. (2011). Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced colon tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37), 15354–15359.
- Graceli, J. B., Sena, G. C., Lopes, P. F. I., Zamprogno, G. C., da Costa, M. B., Godoi, A. F. L., dos Santos Fernandez, M. A. (2013). Organotins: A review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate. *Reproductive Toxicology*, 36(1), 40–52.
- Green, D. R. and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281(5381), 1309–1312.
- Greene, M. H. (1997). Genetics of Breast Cancer. *Mayo Clinic Proceedings*, 72(1), 54–65.
- Gregory, R. K., Smith, I. E. (2000). Vinorelbine – a clinical review. *British Journal of Cancer*, 82(12), 1907–1913.
- Grivennikov, S. I., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C. A., Schnabl, B., Jauch, D., Karin, M. (2012). Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*, 491(7423), 254–258.
- Grütter, M. G. (2000). Caspases: key players in programmed cell death. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(6), 649–655.

- Guerra, L., Guidi, R., Frisan, T. (2011). Do bacterial genotoxins contribute to chronic inflammation, genomic instability and tumor progression? *FEBS Journal*, 278(23), 4577–4588.
- Hadjikakou, S. K., Ozturk, I. I., Xanthopoulou, M. N., Zachariadis, P. C., Zartilas, S., Karkabounas, S., Hadjiliadis, N. (2008). Synthesis, structural characterization and biological study of new organotin(IV), silver(I) and antimony(III) complexes with thioamides. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102(5-6), 1007–1015.
- Hadjikakou, S. K. and Hadjiliadis, S. N. (2009). Antiproliferative and anti-tumor activity of organotin compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, 253(1-2), 235–249.
- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., & Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400(6743), 464–468.
- Hamidi, M. R., Jovanova, B., Panovska T. K. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 60(1), 9-18.
- Hamilton, K. J., Hewitt, S. C., Arao, Y., Korach, K. S. (2017). Estrogen Hormone Biology. *Nuclear Receptors in Development and Disease*, 125(1), 109–146.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(1), 353–364.
- Hancock, S. L., Tucker, M. A., & Hoppe, R. T. (1993). Breast Cancer After Treatment of Hodgkin's Disease. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 85(1), 25–31.

- Haraguchi, S., Hioki, M., Yamashita, K., Orii, K., Yamashita, Y., Kawamura, J., Shimizu, K. (2007). Ciprofloxacin Penetration into the Pulmonary Parenchyma in Japanese Patients. *Surgery Today*, 37(4), 282–284.
- Harris, C. C. (1996). p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic—an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*, 17(1), 1187–1198.
- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry*, 62(1), 1180–1190.
- Helmink, B, A., Wadud Khan M. A., Hermann, A., Gopalakrishnan, V., Wargo J. A. (2019). The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nature Medicine*, 25(1), 377–388.
- Herold, C., Ocker, M., Ganslmayer, M., Gerauer, H., Hahn, E. G., Schuppan, D. (2002). Ciprofloxacin induces apoptosis and inhibits proliferation of human colorectal carcinoma cells. *British Journal of Cancer*, 86(3), 443-448.
- Hoch, M. (2001). Organotin compounds in the environment — an overview. *Applied Geochemistry*, 16(7-8), 719–743.
- Hong, W., Zeng, J., & Xie, J. (2014). Antibiotic drugs targeting bacterial RNAs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(4), 258–265.
- Howlader, N., Cronin, K. A., Kurian, A. W., Andridge, R. (2018). Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 27(6), 619–626.
- Russo, J., & Russo, I. H. (2004). The Role of Estrogen in Breast Cancer. *Molecular Basis of Breast Cancer*, 4(1), 89–135.
- Huggins, C. (1965). Two principles in endocrine therapy of cancers: Hormone deprivation and hormone interference. *Cancer Research*, 25(7), 1163-1167.

- Hunter, D. J. and Willett, W. C. (1993). Diet, Body Size, and Breast Cancer. *Epidemiologic Reviews*, 15(1), 110–132.
- Hüttinger, K., Müller, H., Bomar, M. (1982). Synthesis and effect of carrier-bound disinfectants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 88(1), 274–285.
- Inácio, Â. S., Mesquita, K. A., Baptista, M., Ramalho-Santos, J., Vaz, W. L. C., & Vieira, O. V. (2011). In Vitro Surfactant Structure-Toxicity Relationships: Implications for Surfactant Use in Sexually Transmitted Infection Prophylaxis and Contraception. *PLoS ONE*, 6(5), 19850-1964.
- Jensen, G. V., Lund, R., Gummel, J., Monkenbusch, M., Narayanan, T., & Pedersen, J. S. (2013). Direct Observation of the Formation of Surfactant Micelles under Nonisothermal Conditions by Synchrotron SAXS. *Journal of the American Chemical Society*, 135(19), 7214–7222.
- Johnson, J. P. (1991). Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer and Metastasis Review*, 10(1), 11–22.
- Joseph, M., Trinh, H. M., Mitra, A. K. (2017). Peptide and Protein-Based Therapeutic Agents. *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices*, 26(8), 145–167.
- Josephine, H. R., Kumar, I., & Pratt, R. F. (2004). The Perfect Penicillin? Inhibition of a Bacterial DD-Peptidase by Peptidoglycan-Mimetic β -Lactams. *Journal of the American Chemical Society*, 126(26), 8122–8123.
- Kaiser, U., Auerbach, B., & Oldenburg, M. (1996). The neural cell adhesion molecule NCAM in multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma*, 20(5-6), 389–395.
- Kajstura, M., Halicka, H. D., Pryjma, J., Darzynkiewicz, Z. (2007). Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete “sub-G1” peaks on DNA content histograms. *Cytometry Part A*, 71(3), 125–131.

- Karetsi, V. A., Banti, C. N., Kourkoumelis, N., Papachristodoulou, C., Stalikas, C. D., Raptopoulou, C. P., Hadjikakou, S. K. (2019). An Efficient Disinfectant, Composite Material {SLS@[Zn3(CitH)2]} as Ingredient for Development of Sterilized and Non Infectious Contact Lens. *Antibiotics*, 8(4), 213-228.
- Karlsson, F., Tremaroli, V., Nielsen, J., Backhed, F. (2013). Assessing the Human Gut Microbiota in Metabolic Diseases. *Diabetes*, 62(10), 3341–3349.
- Kelsey, J. L., & Horn-Ross, P. L. (1993). Breast Cancer: Magnitude of the Problem and Descriptive Epidemiology. *Epidemiologic Reviews*, 15(1), 7–16.
- Kerlikowske, K. (2011). Comparative Effectiveness of Digital Versus Film-Screen Mammography in Community Practice in the United States. *Annals of Internal Medicine*, 155(8), 493-509.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257.
- Khanna, K. K. and Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 27(3), 247–254.
- Khazaie, K., Zadeh, M., Khan, M. W., Bere, P., Gounari, F., Dennis, K., Mohamadzadeh, M. (2012). Abating colon cancer polyposis by *Lactobacillus acidophilus* deficient in lipoteichoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), 10462–10467.
- Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996). Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell*, 87(2), 159–170.
- Konwar, R. and Ahmed, A. B. (2016). Nanoparticle: An overview of preparation, characterization and application. *International Research Journal of Pharmacy*, 4(4), 47–57.
- Kostic, A. D., Gevers, D., Pedamallu, C. S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A. M., Meyerson, M. (2011). Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Research*, 22(2), 292–298.

- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews*, 87(1), 99–163.
- Kroese, M., Zimmern, R. L., Pinder, S. E. (2007). HER2 status in breast cancer--an example of pharmacogenetic testing. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 100(7), 326–329.
- Kumar, M., Abbas, Z., Tuli, H. S., Rani, A. (2020). Organotin Complexes with Promising Therapeutic Potential. *Current Pharmacology Reports*, 6(3), 1-15.
- Kwa, M., Plottel, C. S, Blaser, M. J., Adams, S. The Intestinal Microbiome and Estrogen Receptor–Positive Female Breast Cancer. (2016). *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 108(8), 29-39.
- Lacroix, M., Leclercq G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Research and Treatment*, 83 (3), 249–289.
- Lambe, M., Hsieh, C., Chan, H., Ekblom, A., Trichopoulos, D., & Adami, H.-O. (1996). Parity, age at first and last birth, and risk of breast cancer: A population-based study in Sweden. *Breast Cancer Research and Treatment*, 38(3), 305–311.
- Latsis, G., Banti, C., Kourkouvelis, N., Papatriantafyllopoulou, C., Panagiotou, N., Tasiopoulos, A. Hadjidakou, S. (2018). Poly Organotin Acetates against DNA with Possible Implementation on Human Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 2055-2064.
- Lazcano-Ponce, E. C., Miquel, J. F., Munoz, N., Herrero, R., Ferrecio, C., Wistuba, I. I., Nervi, F. (2001). Epidemiology and Molecular Pathology of Gallbladder Cancer. *A Cancer Journal for Clinicians*, 51(6), 349–364.
- Le Garrec, D., Ranger, M., Leroux, J. C. (2004). Micelles in Anticancer Drug Delivery. *American Journal of Drug Delivery*, 2(1), 15–42.

- Le Garrec, D., Taillefer, J., Van Lier, J. E., Lenaerts, V., Leroux, J. C. (2002). Optimizing pH-responsive Polymeric Micelles for Drug Delivery in a Cancer Photodynamic Therapy Model. *Journal of Drug Targeting*, 10(5), 429–437.
- Leme, D. M. and Marin-Morales, M. A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(1), 71–81.
- Lester, J. (2007). Breast Cancer in 2007: Incidence, Risk Assessment, and Risk Reduction Strategies. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 11(5), 619–622.
- Levenson, A. S. and Jordan, V. C. (1997). MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research*, 57(1), 3071-3078.
- Llengme, B. V., Randall, R. S., Sams, J. R. (1972). Preparation, Mössbauer and Vibrational Spectra of some Penta- and Hexacoordinated Addition Compounds of Dimethyl and Diphenyltin(IV) Dichloride. *Canadian Journal of Chemistry*, 50(19), 3212–3222.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330–338.
- Lønning, P. E. (2007). Adjuvant Endocrine Treatment of Early Breast Cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 21(2), 223–238.
- López-Gresa, M., Ortiz, R., Perelló, L., Latorre, J., Liu-González, M., García-Granda, S., Cantón, E. (2002). Interactions of metal ions with two quinolone antimicrobial agents (cinoxacin and ciprofloxacin). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 92(1), 65–74.
- Lopus, M., Smiyun, G., Miller, H., Oroudjev, E., Wilson, L., & Jordan, M. A. (2015). Mechanism of action of ixabepilone and its interactions with the β III-tubulin isotype. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 76(5), 1013–1024.
- Lu, R., Liu, X., Wu, S., Xia, Y., Zhang, Y., Petrof, E. O., Sun, J. (2012). Consistent activation of the β -catenin pathway by *Salmonella* type-three secretion effector protein AvrA in chronically infected

- intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303(10), 1113–1125.
- Luft, R., Olivecrona, H. (1953). Experiences with hypophysectomy in man. *Journal of Neurosurgery*, 10(1), 301-316.
- Lukashev, M. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends in Cell Biology*, 8(11), 437–441.
- MacGregor, J. and Jordan, V. (1998) Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacological Reviews*, 50(2), 151-196.
- Madigan, M. T. and Martinko, J. M. (2006). *Brock biology of microorganisms*. 11th edition. Pearson Prentice Hall Inc.
- Marin, A., Muniruzzaman, M., Rapoport, N. (2001). Acoustic activation of drug delivery from polymeric micelles: effect of pulsed ultrasound. *Journal of Controlled Release*, 71(3), 239–249.
- Markowitz, S., Wang, J., Meyeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R., Zborowska, E., Kinzler, K., Vogelstein, B. (1995). Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, 268(5215), 1336–1338.
- Marla, S. and Stallard, S. (2009). Systematic review of day surgery for breast cancer. *International Journal of Surgery*, 7(4), 318–323.
- Martin, M. B., Reiter, R., Pham, T., Avellanet, Y. R., Camara, J., Lahm, M., Stoica, A. (2003). Estrogen-Like Activity of Metals in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Endocrinology*, 144(6), 2425–2436.
- Mascaro, A., Farina, M., Gigli, R., Vitelli, C. E., Fortunato, L. (2010). Recent advances in the surgical care of breast cancer patients. *World Journal of Surgical Oncology*, 8(1), 5-19.
- McClements, D. J. and Jafari, S. M. (2018). Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 251(1), 55–79.

- McClendon, A. K. and Osheroff, N. (2007). DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 623(1-2), 83–97.
- Medema, R. H. and Bos, J. L. (1993). The role of p21-ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 4(6), 615–661.
- Meretoudi, A., Banti, C. N., Siafarika, P., Kalampounias, A. G., Hadjikakou, S. K. (2020). Tetracycline Water Soluble Formulations with Enhanced Antimicrobial Activity. *Antibiotics*, 9(12), 845-853.
- Miclau, T., Edin, M. L., Lester, G. E., Lindsey, R. W., Dahners, L. E. (1998). Effect of ciprofloxacin on the proliferation of osteoblast-like MG-63 human osteosarcoma cells in vitro. *Journal of Orthopaedic Research*, 16(4), 509–512.
- Milionis, I., Banti, C. N., Sainis, I., Raptopoulou, C. P., Psycharis, V., Kourkoumelis, N., & Hadjikakou, S. K. (2018). Silver ciprofloxacin (CIPAG): a successful combination of chemically modified antibiotic in inorganic–organic hybrid. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(5), 705–723.
- Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I., Mazzei, T. (2006). Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology*, 17(5), 7–12.
- Moo, T.A., Sanford, R., Dang, C., Morrow, M. (2018). Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clinics*, 13(3), 339–354.
- Morteza, M., Roya, S., Hamed, H., Amir, Z., Abolfazl, A. (2019). Synthesis and evaluation of polymeric micelle containing piperacillin/tazobactam for enhanced antibacterial activity. *Drug Delivery*, 26(1), 1292–1299.
- Moses, H. L., Yang, E. Y., Pietenpol, J. A. (1990). TGF- β stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell*, 63(1), 245–247.

- Mushak, P., Krigman, M. R., Mailman, R. B. (1982). Comparative organotin toxicity in the developing rat: somatic and morphological changes and relationship to accumulation of total tin. *Neurotoxicology and Teratology*, 4(2), 209-15.
- N'soukpoé-Kossi, C. N., Descôteaux, C., Asselin, É., Tajmir-Riahi, H. A., Bérubé, G. (2008). DNA Interaction with Novel Antitumor Estradiol–Platinum(II) Hybrid Molecule: A Comparative Study with Cisplatin Drug. *DNA and Cell Biology*, 27(2), 101–107.
- Nabi, A., Tasneem, S., Jesudason, C. G., Lee, V. S., Zain, S. B. M. (2018). Study of interaction between cationic surfactant (CTAB) and paracetamol by electrical conductivity, tensiometric and spectroscopic methods. *Journal of Molecular Liquids*, 256(1), 100–107.
- Nagaraj, G. and Ma, C. (2015). Revisiting the estrogen receptor pathway and its role in endocrine therapy for postmenopausal women with estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 150(1), 231–242.
- Narsimha, S., Nukala, S. K., Jyostna, T. S., Ravinder, M., Rao M. S., Reddy, N. V. (2020). One-pot synthesis and biological evaluation of novel 4-[3-fluoro-4-(morpholin-4-yl)]phenyl-1H-1,2,3-triazole derivatives as potent antibacterial and anticancer agents. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 57(4), 1-11.
- Nath, M., Vats, M., Roy, P. (2013). Tri- and diorganotin(IV) complexes of biologically important orotic acid: Synthesis, spectroscopic studies, in vitro anti-cancer, DNA fragmentation, enzyme assays and in vivo anti-inflammatory activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 59(1), 310–321.
- Neal, L., Sandhu, N. P., Hieken, T. J., Glazebrook, K. N., Mac Bride, M. B., Dilaveri, C. A., ... Visscher, D. W. (2014). Diagnosis and Management of Benign, Atypical, and Indeterminate Breast Lesions Detected on Core Needle Biopsy. *Mayo Clinic Proceedings*, 89(4), 536–547.
- Neidle, S. (2001). DNA minor-groove recognition by small molecules (up to 2000). *Natural Product Reports*, 18(3), 291–309.

- Nemeth, J., Oesch, G., Kuster, S. P. (2014). Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(2), 382–395.
- Noguchi, R., Sugie, A., Okamoto, Y., Hara, A., Nomiya, K. (2005). Syntheses, Structures, and Antimicrobial Activities of Light-Stable and Di- and Mononuclear Silver(I) Carboxylate Complexes Composed of Triphenylphosphine, and Chiral and Racemic Forms of 2-Pyrrolidone-5-carboxylic Acid (H₂pyrrld). A Variety of Ag–O Bonding Modes in the Silver(I) Complexes Constructed with Hard Oxygen and Soft Phosphorus Atoms. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 78(11), 1953–1962.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(1), 23–28.
- Obach, R. S. (2013). Pharmacologically Active Drug Metabolites: Impact on Drug Discovery and Pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, 65(2), 578–640.
- Ohtani, N. (2014). Microbiome and cancer. *Seminars in Immunopathology*, 37(1), 65–72.
- Onland-Moret, N. C., Kaaks, R., van Noord, P. A. H., Rinaldi, S., Key, T., Grobbee, D. E., & Peeters, P. H. M. (2003). Urinary endogenous sex hormone levels and the risk of postmenopausal breast cancer. *British Journal of Cancer*, 88(9), 1394–1399.
- Osborne, C. K., Hobbs, K., Trent, J. M. (1987). Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Research and Treatment*, 9(2), 111–121.
- Osborne, C. K. and Schiff, R. (2005). Estrogen-Receptor Biology: Continuing Progress and Therapeutic Implications. *Journal of Clinical Oncology*, 23(8), 1616–1622.
- Overgaard, J., Hibbs, D. E., Rentschler, E., Timco, G. A., Larsen, F. K. (2003). Experimental and Theoretical Electron Density Distribution and Magnetic Properties of the Butterfly-like Complex [Fe₄O₂(O₂CCMe₃)₈(NC₅H₄Me)₂]·2CH₃CN. *Inorganic Chemistry*, 42(23), 7593–7601.

- Owen, S. C., Chan, D. P. Y., Shoichet, M. S. (2012). Polymeric micelle stability. *Nano Today*, 7(1), 53–65.
- Özsoy, Y., Güngör, S., Kahraman, E., Durgun, M. E. (2019). Polymeric micelles as a novel carrier for ocular drug delivery. *Nanoarchitectonics in Biomedicine*, 248(4), 85–117.
- Paech, K. (1997). Differential Ligand Activation of Estrogen Receptors ER and ER at AP1 Sites. *Science*, 277(5331), 1508–1510.
- Pagliarani, A., Nesci, S., Ventrella, V. (2013). Toxicity of organotin compounds: Shared and unshared biochemical targets and mechanisms in animal cells. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 978–990.
- Palmer, M. L. and Tsangaris, T. N. (1993). Breast biopsy in women 30 years old or less. *The American Journal of Surgery*, 165(6), 708–712.
- Parise, C. A. and Caggiano, V. (2017). Risk of mortality of node-negative, ER/PR/HER2 breast cancer subtypes in T1, T2, and T3 tumors. *Breast Cancer Research and Treatment*, 165(3), 743–750.
- Park, J. T. and Uehara, T. (2008). How Bacteria Consume Their Own Exoskeletons (Turnover and Recycling of Cell Wall Peptidoglycan). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2), 211–227.
- Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W., Walsh, C. (2005). Glycopeptide and Lipoglycopeptide Antibiotics. *Chemical Reviews*, 105(2), 425–448.
- Patel, M. N., Patel, C. R., Joshi, H. N. (2013). Metal-Based Biologically Active Compounds: Synthesis, Characterization, DNA Interaction, Antibacterial, Cytotoxic and SOD Mimic Activities. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(4), 1329–1345.
- Pedersen, H. K., Gudmundsdottir, V., Nielsen, H. B., Hyotylainen, T., Nielsen, T., Jensen, B. A. H., Pedersen, O. (2016). Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*, 535(7612), 376–381.

- Pellerito, A., Fiore, T., Pellerito, C., Fontana, A., Di Stefano, R., Pellerito, L., Mansueto, C. (1998). Organometallic complexes with biological molecules. XI. Solid state and in vivo investigations of some diorganotin(IV)-chloramphenicol and cycloserine derivatives. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 72(3-4), 115–125.
- Pepić, I., Lovrić, J., Filipović-Grčić, J. (2013). How do polymeric micelles cross epithelial barriers? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(1), 42–55.
- Perinelli, D. R., Cespi, M., Casettari, L., Vllasaliu, D., Cangiotti, M., Ottaviani, M. F., Palmieri, G. F. (2016). Correlation among chemical structure, surface properties and cytotoxicity of N-acyl alanine and serine surfactants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 109(1), 93–102.
- Perinelli, D. R., Cespi, M., Lorusso, N., Palmieri, G. F., Bonacucina, G., Blasi, P. (2020). Surfactant Self-Assembling and Critical Micelle Concentration: One Approach Fits All? *Langmuir*, 36(21), 5745-5753.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752.
- Peto, R. (1996). Five years of tamoxifen—or more? *Journal of the National Cancer Institute*, 88(24), 1791–1793.
- Petridou, E., Syrigou, E., Toupadaki, N., Zavitsanos, X., Willett, W., & Trichopoulos, D. (1996). Determinants of age at menarche as early life predictors of breast cancer risk. *International Journal of Cancer*, 68(2), 193–198.
- Phillips, T., Murray, G., Wakamiya, K., Askaa, J., Huang, D., Welcher, R., Allred, D. C. (2007). Development of Standard Estrogen and Progesterone Receptor Immunohistochemical Assays for Selection of Patients for Antihormonal Therapy. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 15(3), 325–331.

- Piddock, L. J. V. (2006). Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), 382–402.
- Platet, N., Cathiard, A. M., Gleizes, M., Garcia, M. (2004). Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 51(1), 55–67.
- Provencher-Mandeville, J., Descôteaux, C., Mandal, S. K., Leblanc, V., Asselin, É., Bérubé, G. (2008). Synthesis of 17 β -estradiol-platinum(II) hybrid molecules showing cytotoxic activity on breast cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(7), 2282–2287.
- Rao, V. P., Poutahidis, T., Ge, Z., Nambiar, P. R., Horwitz, B. H., Fox, J. G., Erdman, S. E. (2006). Proinflammatory CD4⁺CD45RBhi Lymphocytes Promote Mammary and Intestinal Carcinogenesis in ApcMin/+ Mice. *Cancer Research*, 66(1), 57–61.
- Rastelli, F. and Crispino, S. (2008). Factors Predictive of Response to Hormone Therapy in Breast Cancer. *Tumori Journal*, 94(3), 370–383.
- Redig, A. J., & McAllister, S. S. (2013). Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *Journal of Internal Medicine*, 274(2), 113–126.
- Richie, R. C. and Swanson, J. O. (2003). Breast cancer: A review of the literature. *Journal of insurance medicine*, 35(2), 85–101.
- Robertson, J. D. and Orrenius, S. (2002). Role of mitochondria in toxic cell death. *Toxicology*, 181-182, 491–496.
- Rosen, M. J. (1974). Relationship of structure to properties in surfactants: II. Efficiency in surface or interfacial tension reduction. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 51(10), 461–465.
- Rosenberg, B., Vancamp, L., Trosko, J. E., Mansour, V. H. (1969). Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, 222(5191), 385–386.

- Rowland, J. H. (2000). Role of Breast Reconstructive Surgery in Physical and Emotional Outcomes Among Breast Cancer Survivors. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(17), 1422–1429.
- Rubinstein, M. R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., & Han, Y. W. (2013). *Fusobacterium nucleatum* Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin/ β -Catenin Signaling via its FadA Adhesin. *Cell Host & Microbe*, 14(2), 195–206.
- Rugo, H. S., Rumble, R. B., Macrae, E., Barton, D. L., Connolly, H. K., Dickler, M. N., Burstein, H. J. (2016). Endocrine Therapy for Hormone Receptor–Positive Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Guideline. *Journal of Clinical Oncology*, 34(25), 3069–3103.
- Omoto, Y., & Iwase, H. (2015). Clinical significance of estrogen receptor β in breast and prostate cancer from biological aspects. *Cancer Science*, 106(4), 337–343.
- Schirmacher, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *International Journal of Oncology*, 54(2), 407–419.
- Schwabe, R. F. and Jobin, C. (2013). The microbiome and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(11), 800–812.
- Segel, I. H., (1976). *Biochemical Calculations*, New York: J. Wiley & Sons Inc.
- Sekhon, B. S. (2013). Surfactants: Pharmaceutical and medicinal aspects. *Journal of Pharmaceutical Technology, Research and Management*, 1(1), 11–36.
- Shapira, I., Sultan, K., Lee, A., Taioli, E. (2013). Evolving Concepts: How Diet and the Intestinal Microbiome Act as Modulators of Breast Malignancy. *ISRN Oncology*, 2013(1), 1–10.
- Shaposhnik, Z. and Tamanoi, F. (2014). Smart-Drug Delivery and Target-Specific Therapy. *Comprehensive Biomedical Physics* 1(1), 369–377.
- Sharma, P. (2016). Biology and Management of Patients with Triple Negative Breast Cancer. *Oncologist*, 21(9), 1050–1062.

- Sharma, A., Jain, A., Saxena, S. (2015). The structure-activity relationship of some hexacoordinated dimethyltin(IV) complexes of fluorinated β -diketone/ β -diketones and sterically congested heterocyclic β -diketones. *Applied Organometallic Chemistry*, 29(8), 499–508.
- Shay, J. W. and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer*, 33(5), 787–791.
- Shen, L. L. and Pernet, A. G. (1985). Mechanism of inhibition of DNA gyrase by analogues of nalidixic acid: the target of the drugs is DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(2), 307–311.
- Shiao, S. L. and Coussens, L. M. (2010). The Tumor-Immune Microenvironment and Response to Radiation Therapy. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(4), 411–421.
- Shiao, Y. (1998). Cell cycle arrest, apoptosis and p53 expression in nickel(II) acetate- treated Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis*, 19(7), 1203–1207.
- Shungu, D. L., Weinberg, E., Gadebusch, H. H. (1983). Tentative interpretive standards for disk diffusion susceptibility testing with norfloxacin (MK-0366, AM-715). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 23(2), 256–260.
- Simões, S. M., Figueiras, A. R., Veiga, F., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C. (2014). Polymeric micelles for oral drug administration enabling locoregional and systemic treatments. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12(2), 297–318.
- Simpson, P. V., Desai, N. M., Casari, I., Massi, M., Falasca, M. (2019). Metal-based antitumor compounds: beyond cisplatin. *Future Medicinal Chemistry*, 11(2), 119-135.
- Sinha, S., & Sinha, U. (2009). Recent advances in breast MRI and MRS. *NMR in Biomedicine*, 22(1), 3–16.

- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235(1), 177–182.
- Smith, P. J. (1998). *Chemistry of Tin*. Netherlands: Springer.
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., Garrett, W. S. (2013). The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science*, 341(6145), 569–573.
- Snyder, M. and Drlica, K. (1979). DNA gyrase on the bacterial chromosome: DNA cleavage induced by oxolinic acid. *Journal of Molecular Biology*, 131(2), 287–302.
- Somekh, E., Douer, D., Shaked, N. Rubinstein, E. (1989). In vitro effects of ciprofloxacin and pefloxacin on growth of normal human hematopoietic progenitor cells and on leukemic cell lines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 248 (1), 415-418.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma 2. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1409–1416.
- Sousa, G. F., Wlodarczyk, S. R., Monteiro, G. (2014). Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(4), 693–701.
- Sporn, M. B. (1996). The war on cancer. *The Lancet*, 347(9012), 1377–1381.
- Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2), 107–113.
- Storr, T., Thompson, K. H., Orvig, C. (2006). Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry. *Chemical Society Reviews*, 35(6), 534.
- Su, H. C., Ramkissoon, K., Doolittle, J., Clark, M., Khatun, J., Secrest, A., Giddings, M. C. (2010). The Development of Ciprofloxacin Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Involves Multiple

Response Stages and Multiple Proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4626–4635.

Sutton, D., Nasongkla, N., Blanco, E., Gao, J. (2007). Functionalized Micellar Systems for Cancer Targeted Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*, 24(6), 1029–1046.

Swain, S. M. (1996). Tamoxifen: the Long and Short of It. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 88(21), 1516–1516.

Szebeni, J., Alving, C. R., Muggia, F. M. (1998). Complement Activation by Cremophor EL as a Possible Contributor to Hypersensitivity to Paclitaxel: an In Vitro Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(4), 300–306.

Tabassum, S. and Pettinari, C. (2006). Chemical and biotechnological developments in organotin cancer chemotherapy. *Journal of Organometallic Chemistry*, 691(8), 1761–1766.

Takeda, A., Osaki, M., Adachi, K., Honjo, S., Ito, H. (2004). Role of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Akt Signal Pathway in the Proliferation of Human Pancreatic Ductal Carcinoma Cell Lines. *Pancreas*, 28(3), 353–358.

Talaro, K. P. and Chess, B. (2008). *Foundations in microbiology*. 8th Ed., New York: McGraw Hill Education.

Tang, V., Zhao, S., Boscardin, J., Sudore, R., Covinsky, K., Walter, L. C., Finlayson, E. (2018). Functional Status and Survival After Breast Cancer Surgery in Nursing Home Residents. *JAMA Surgery*, 153(12), 1090-1096.

Thaiss, C. A., Zmora, N., Levy, M., Elinav, E. (2016). The microbiome and innate immunity. *Nature*, 535(7610), 65–74.

The Human Microbiome Project Consortium. (2012). A framework for human microbiome research. *Nature*, 486(7402), 215–221.

Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science*, 281(1), 1312–1316.

- Tian, S., Su, L., Liu, Y., Cao, J., Yang, G., Ren, Y., Huang, F., Liu, J., An, Y., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., Shi, L. (2020). Self-targeting, zwitterionic micellar dispersants enhance antibiotic killing of infectious biofilms—An intravital imaging study in mice. *Science Advances*, 6(33), 1-13.
- Tiekink, E. R. (2008). Anti-cancer potential of gold complexes. *Inflammopharmacology*, 16(3), 138–142.
- Toft, D., & Gorski, J. (1966). A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 55(6), 1574–1581.
- Tong, C. W., Wu, M., Cho, W. C., To, K. W. (2018). Recent Advances in the Treatment of Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 8(227), 1-10.
- Torres-Bugarín, O., Zavala-Cerna, M. G., Nava, A., Flores-García, A., & Ramos-Ibarra, M. L. (2014). Potential Uses, Limitations, and Basic Procedures of Micronuclei and Nuclear Abnormalities in Buccal Cells. *Disease Markers*, 2014(1), 1–13.
- Tretli, S. (1989). Height and weight in relation to breast cancer morbidity and mortality. A prospective study of 570,000 women in Norway. *International Journal of Cancer*, 44(1), 23–30.
- Trivedi, R. and Kompella, U. B. (2010). Nanomicellar formulations for sustained drug delivery: strategies and underlying principles. *Nanomedicine*, 5(3), 485–505.
- Tsai, M., & O'Malley, B. W. (1994). Molecular Mechanisms of Action of Steroid/Thyroid Receptor Superfamily Members. *Annual Review of Biochemistry*, 63(1), 451–486.
- Tsednee, M., Huang, Y.-C., Chen, Y.-R., Yeh, K.-C. (2016). Identification of metal species by ESI-MS/MS through release of free metals from the corresponding metal-ligand complexes. *Scientific Reports*, 6(1), 1-13.
- Tsiatouras, V., Banti, C. N., Grześkiewicz, A. M., Rossos, G., Kourkoumelis, N., Kubicki, M., Hadjikakou, S. K. (2016). Structural, photolysis and biological studies of novel mixed metal Cu(I)-

- Sb(III) mixed ligand complexes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 163(1), 261–268.
- Turel, I., Golobič, A., Klavžar, A., Pihlar, B., Buglyó, P., Tolis, E., Sepčić, K. (2003). Interactions of oxovanadium(IV) and the quinolone family member—ciprofloxacin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 95(2-3), 199–207.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Gordon, J. I. (2008). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), 480–484.
- Unzueta, I., López-García, J., Sánchez-Alarcos, V., Recarte, V., Pérez-Landazábal, J. I., Rodríguez-Velamazán, J. A., Plazaola, F. (2017). ¹¹⁹Sn Mössbauer spectroscopy for assessing the local stress and defect state towards the tuning of Ni-Mn-Sn alloys. *Applied Physics Letters*, 110(18), 181908-181912.
- Urbaniak, C., Gloor, G. B., Brackstone, M., Scott, L., Tangney, M., Reid, G. (2016). The Microbiota of Breast Tissue and Its Association with Breast Cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(16), 5039–5048.
- Van der Waaij, D. and Nord, C. E. (2000). Development and persistence of multi-resistance to antibiotics in bacteria; an analysis and a new approach to this urgent problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16(3), 191–197.
- Van Zuylen, L., Verweij, J., Sparreboom, A. (2001). *Investigational New Drugs*, 19(2), 125–141.
- Veikkola, T., & Alitalo, K. (1999). VEGFs, receptors and angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 9(3), 211–220.
- Velalopoulou, A., Batsala, G. K., Kourkouvelis, N., Karkabounas, S., Evangelou, A., Hadjidakou, S. K. (2012). Photo-activated metalloterapeutics: copper(I) or silver(I) mixed ligand complexes with 2-mercaptopyrimidine and triphenylphosphine. *Medicinal Chemistry Research*, 22(5), 2260–2265.

- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacology & Therapeutics*, 40(4), 277-283.
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., Nesse, L. L. (2020). Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics*, 9(2), 59-77.
- Vichai, V. and Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112–1116.
- Vinarov, Z., Katev, V., Radeva, D., Tcholakova, S., & Denkov, N. D. (2017). Micellar solubilization of poorly water-soluble drugs: effect of surfactant and solubilize molecular structure. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(4), 677–686.
- Visvanathan, K., Chlebowski, R. T., Hurley, P., Col, N. F., Ropka, M., Collyar, D., ... Lippman, S. M. (2009). American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on the Use of Pharmacologic Interventions Including Tamoxifen, Raloxifene, and Aromatase Inhibition for Breast Cancer Risk Reduction. *Journal of Clinical Oncology*, 27(19), 3235–3258.
- Volpert, O. V., Dameron, K. M., Bouck, N. (1997). Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene*, 14(12), 1495–1502.
- Walker, R. C. (1999). The Fluoroquinolones. *Mayo Clinic Proceedings*, 74(10), 1030–1037.
- Walko, C. M., Lindley, C. (2005). Capecitabine: A review. *Clinical Therapeutics*, 27(1), 23–44.
- Wang, C. and Youle, R. J. (2009). The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 95–118.
- Weaver, R. J., & Valentin, J.-P. (2019). Today’s challenges to de-risk and predict drug safety in human “Mind-the-gap.” *Toxicological Sciences*, 167(2), 307–321.
- Weichselbaum, R. R., Liang, H., Deng, L., & Fu, Y.-X. (2017). Radiotherapy and immunotherapy: a beneficial liaison? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(6), 365–379.
- Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81(1), 323–330.

- White, R., Parker, M. G. (1998). Molecular mechanisms of steroid hormone action. *Endocrine-Related Cancer*, 5(1), 1-14.
- Wiebe, J. P. (2006). Progesterone metabolites in breast cancer. *Endocrine Related Cancer*, 13(3), 717–738.
- Williams, D. L. (1974). The estrogen receptor: a re-view. *Life Science*, 15(1), 583-597.
- Wistuba, I. I. and Gazdar, A. F. (2004). Gallbladder cancer: lessons from a rare tumour. *Nature Reviews Cancer*, 4(9), 695–706.
- Wolff, A. C., Tung, N. M., Carey, L.A. (2019). Implications of Neoadjuvant Therapy in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 37(25), 2189-2192.
- World Health Organisation - WHO. (1980). Environmental Health Criteria 15: Tin and organotin compounds. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organisation - WHO. (1990). Environmental Health Criteria 116: Tributyltin compounds. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organisation - WHO. (2012). Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine-3rd Revision. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf
- Wotherspoon, A. C., Diss, T. C., Pan, L., Isaacson, P. G., Doglioni, C., Moschini, A., de Boni, M. (1993). Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *The Lancet*, 342(8871), 575–577.
- Wright, W. E., Pereira-Smith, O. M., Shay, J. W. (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 9(7), 3088–3092.

- Wu, S., Rhee, K.-J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H.-R., Sears, C. L. (2009). A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nature Medicine*, 15(9), 1016–1022.
- Xanthopoulou, M. N., Hadjikakou, S. K., Hadjiliadis, N., Milaeva, E. R., Gracheva, J. A., Tyurin, V. Y., Charalabopoulos, K. (2008). Biological studies of new organotin(IV) complexes of thioamide ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(2), 327–335.
- Xanthopoulou, M. N., Hadjikakou, S. K., Hadjiliadis, N., Schürmann, M., Jurkschat, K., Michaelides, A., Charalabopoulos, K. (2003). 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. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 96(2-3), 425–434.
- Xiao, D.-R., Wang, E.-B., An, H.-Y., Su, Z.-M., Li, Y.-G., Gao, L., Xu, L. (2005). Rationally Designed, Polymeric, Extended Metal-Ciprofloxacin Complexes. *Chemistry - A European Journal*, 11(22), 6673–6686.
- Xuan, C., Shamonki, J. M., Chung, A., DiNome, M. L., Chung, M., Sieling, P. A., Lee, D. J. (2014). Microbial Dysbiosis Is Associated with Human Breast Cancer. *PLoS ONE*, 9(1), 83744-83758.
- Yaqub, F. (2013). Mechanism of action of anthracycline drugs. *The Lancet Oncology*, 14(8), 296-303.
- Yuan, H., Li, G., Dai, E., Lu, G., Huang, X., Hao, L., Tan, Y. (2020). Ordered Honeycomb-Pattern Membrane. *Chinese Journal of Chemistry*, 38(12), 1767-1779.
- Zhang, F., Zhao, X., Shen, H., Zhang, C. (2016). Molecular mechanisms of cell death in intervertebral disc degeneration (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 37(6), 1439–1448.

- Zhuang, W.-R., Wang, Y., Cui, P.-F., Xing, L., Lee, J., Kim, D., Jiang, H.-L., Oh, Y.-K. (2018). Applications of π - π stacking interactions in the design of drug-delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 294(28), 311-326.
- Zitvogel, L., Galluzzi, L., Smyth, M. J., Kroemer, G. (2013). Mechanism of Action of Conventional and Targeted Anticancer Therapies: Reinstating Immunosurveillance. *Immunity*, 39(1), 74–88.
- Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., Goldstein, A. M., Tucker, M. A., Walker, G. J., Dracopoli, N. C. (1996). Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nature Genetics*, 12(1), 97–99.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Κατά τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής προέκυψαν οι παρακάτω ανακοινώσεις / δημοσιεύσεις:

Ανακοινώσεις σε συνέδρια:

- 18ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Φαρμακοχημείας, Τίτλος poster: “Ciprofloxacin conjugated into diphenyltin(IV); A novel tool for the healthcare associated infections treatment.”, 25-27 Φεβρουαρίου 2021, Αθήνα
- 5ο Συνέδριο Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τίτλος poster,: «Αντικαρκινική δράση μεταλλοθεραπευτικής ένωσης του χρυσού», 29-30 Σεπτεμβρίου 2017, Ιωάννινα
- 50ο Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, Τίτλος ομιλίας: «Μελέτη αποτελεσματικότητας και τοξικότητας ενός νέου αντιμικροβιακού συμπλόκου (AgMNA) για υγρά πολλαπλών χρήσεων (MPS) καθαρισμού φακών επαφής», 18-20 Μαΐου 2017, Ρόδος
- 22ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας, Τίτλος poster: «Μελέτη του μηχανισμού αντικαρκινικής δράσης μεταλλοθεραπευτικής ένωσης του χρυσού», 2-4 Δεκεμβρίου 2016, Θεσσαλονίκη

Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά:

- **Chrysouli, M.**, Banti, C. N., Kourkouvelis, N., Moushi, E., Tasiopoulos, A., Douvalis, A. P., Papachristodoulou, C., Hatzidimitriou, A. G., Hadjikakou, S. K. (2020). Ciprofloxacin conjugated to diphenyltin(IV); A novel formulation with enhanced antimicrobial activity. Dalton Transactions. 49, 11522-11535.
- **Chrysouli, M. P.**, Banti, C. N., Milionis, I., Koumaki, D., Raptopoulou, C. P., Psycharis, V., Sainis, I., Hadjikakou, S. K. (2018). A water-soluble silver(I) formulation as an effective disinfectant of contact lenses cases. Materials Science and Engineering: C. 93, 902-910
- **Chrysouli, M. P.**, Banti, C. N., Kourkouvelis, N., Panayiotou, N., Markopoulos, G. S., Tasiopoulos, A. J., & Hadjikakou, S. K. (2018). Chloro(triphenylphosphine)gold(I) a forefront

reagent in gold chemistry as apoptotic agent for cancer cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 179, 107–120.

- Ozturk, I. I., Yasar, S., Banti, C. N., Kourkoumelis, N., **Chrysouli**, M. P., Manoli, M., Tasiopoulos, A. J., Hadjikakou, S. K. (2017). QSAR studies on antimony(III) halide complexes with N-substituted thiourea derivatives. *Polyhedron*, 123, 152–161.