Έτος αναγόρευσης: 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΣΥΖΕΥΞΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΤΡΟΠΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΜΕ ΟΞΑΔΙΑΖΟΛΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ

Γεώργιος Β. Βαγενάς Χημικός MSc

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

Ιωάννινα 2024

Έτος αναγόρευσης: 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΣΥΖΕΥΞΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΤΡΟΠΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΜΕ ΟΞΑΔΙΑΖΟΛΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ

Γεώργιος Β. Βαγενάς Χημικός MSc

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

Ιωάννινα 2024

Έτος αναγόρευσης: 2024

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

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Συνέλευση: 28-01-2020

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Δρ. Σ.Κ. Χατζηκακού, Καθηγητής Τμήμα Χημείας, Πανεπιστημίο Ιωαννίνων Μέλη:

Δρ. Ν. Κουρκουμέλης, Καθηγητής Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Δρ. Αθ. Κουτσολέλος, Καθηγητής Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ημερομηνία ορισμού θέματος:13-01-2020 Ημερομηνία Τροποποίησης θέματος: 15-07-2022 **Θέμα: «**Ανάπτυξη νέων καινοτόμων χημειοθεραπευτικών από την σύζευξη

μιτοχονδριοτροπικών παραγόντων με οξαδιαζολικά παράγωγα»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Συνέλευση: 1119/5-4-2024

1.	Χατζηκακού Σωτήριος	Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του
		Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2.	Κουρκουμέλης Νικόλαος	Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής του
		Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3.	Κουτσολέλος Αθανάσιος	Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του
		Πανεπιστημίου Κρήτης
4.	Μητσοπούλου Χριστίνα-Άννα	Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του
		Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου
		Αθηνών
5.	Σαλίφογλου Αθανάσιος	Καθηγητής του Τμήματος Χημικών
		Μηχανικών του ΑΠΘ
6.	Ψυχάρης Βασίλειος	Ερευνητής Α΄, Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και
		Νανοτεχνολογίας (ΙΝΝ) του ΕΚΕΦΕ
7.	Καραμάνος Νικόλαος	Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του
		Πανεπιστημίου Πατρών

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 11-06-2024

Ο Πρόεδρος του Τμήματος

Η Γραμματέας του Τμήματος

Πλακατούρας Ιωάννης Καθηγητής

Τουτουνζόγλου Ξανθή

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	16
Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ	18
1.1 Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα	21
1.2 Αντίσταση στα σήματα αντιπολλαπλασιασμού κυττάρων	23
1.3 Αποφυγή της απόπτωσης	24
1.4 Απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού	26
1.5 Συνεχής αγγειογένεση	28
1.6 Εισβολή και μετάσταση στους ιστούς	30
1.7 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	32
1.8 ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	34
1.9 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	37
1.9α Δημογραφικοί παράγοντες	38
1.9β Αναπαραγωγικοί παράγοντες	38
1.9γ Ορμονικοί παράγοντες	39
1.9δ Κληρονομικοί παράγοντες	40
1.9ε Παράγοντες τρόπου ζωής	41
1.9στ Άλλοι παράγοντες κινδύνου	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	44
2.1 XHMEIOØEPAΠΕΙΑ	45
2.2 ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΑΓΩΓΕΣ	47

2.3 ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	67
2.4 ΕΙΔΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗΣ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ	. 69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΩΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ	. 71
3.1ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΙ	N 74
3.2 XHMEIA TOY APFYPOY	82
3.2.1 Γενικά στοιχεία	82
3.2.2 Αντιμικροβιακές ιδιότητες και μηχανισμός δράσης	82
3.2.3 Αντικαρκινικές ιδιότητες συμπλόκων αργύρου	84
3.2.4 Σύμπλοκα αργύρου με ligands καρβοξυλικά οξέα	85
3.2.5 Σύμπλοκα αργύρου (Ι) με ligands δότες άτομα αζώτου, δότες	
αζώτου-οξυγόνου, δότες άτομα αζώτου-θείου και δότες θείου	87
3.2.6 Σύμπλοκα αργύρου (Ι) με ligands δότες άτομα φωσφόρου	90
3.3 ΟΞΑΔΙΑΖΟΛΙΑ	92
3.3.1 ΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΟΞΑΔΙΑΖΟΛΙΩΝ	92
3.3.2 ΣΥΜΠΛΟΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΤΩΝ 2-ΘΕΙΟΝΟ-1,3,4-ΟΞΑΔΙΑΖΟΛΙΩΝ	96
Β. ΣΚΟΠΟΣ	.102
Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	.104
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	.104
4.1 Χημικά Αντιδραστήρια	.104
4.2 Σύνθεση 5-υποκατεστημένων-2-θειονο-1,3,4-οξαδιαζολίων (ligands)	
(X=H, o-Cl, m-Cl, o-F, p-F)	.105
4.3 Σύνθεση συμπλόκων ενώσεων	. 107

KE⊄	ΦΑΛΑΙΟ 5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ	110
5.1	Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR	110
5.2	Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)	110
5.3	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹ Η NMR)	110
5.4	Φασματοσκοπία φθορισμού	110
5.5	Κρυοσκοπία	111
5.6	Σημεία τήξης	111
5.7	Ιξωδομετρία	111
5.8	Λιποφιλικότητα	111
5.9	Περίθλαση ακτίνων X (X-ray Diffraction – XRD)	111
5.10) Μελέτη σταθερότητας ενώσεων	124
KE⊄	ΦΑΛΑΙΟ 6. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ	124
6.1	Κρυοσυντήρηση κυτταρικών σειρών	124
6.2	Κυτταρικές καλλιέργειες	125
6.3	In vitro μελέτη κυτταροτοξικότητας (SRB assay)	126
6.4	In vitro μελέτη γονοτοξικότητας (Micronucleus assay)	128
6.5	Μελέτη κυτταρικής μορφολογίας	130
6.6	Μελέτη κατακερματισμού του πυρηνικού DNA	130
6.7	Μελέτη διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης	132
KE⊄	ΦΑΛΑΙΟ 7. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ex vivo	132
7.1	Αλληλεπίδραση των ενώσεων με το DNA: Φασματοσκοπία	
υπε	ριώδους-ορατού(UV-Vis)	132

7.2 Αλληλεπίδραση των ενώσεων με το DNA: Πείραμα φθορισμομετρίας…134
7.3 Αλληλεπίδραση των ενώσεων με το DNA: Πείραμα ιξωδομετρίας 134
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΧΗΜΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ
8.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ-Μελέτη περίθλασης
ακτίνων X (XRD)
8.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ-
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ FT-IR
8.3. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ- ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ
¹ H NMR
8.4. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ- ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ
UV-Vis
UV-Vis
UV-Vis
 UV-Vis
UV-Vis. 176 8.5. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ. 180 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ. 190 9.1.ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ (SRB) 190 9.2. In vitro ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ. 192
 UV-Vis
UV-Vis. 176 8.5. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ. 180 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ. 190 9.1.ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ (SRB) 190 9.2. In vitro ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ. 192 9.3. In vitro ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ. 194
UV-Vis. 176 8.5. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ. 180 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ. 190 9.1.ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ (SRB) 190 9.2. In vitro ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ. 192 9.3. In vitro ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕ 194 9.4. ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ. 203
UV-Vis 176 8.5. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ 180 KEΦΑΛΑΙΟ 9. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ 190 9.1.ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ (SRB) 190 9.2. In vitro ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ (SRB) 192 9.3. In vitro ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ 194 9.4. ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ 203 9.5. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ
UV-Vis 176 8.5. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ 180 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ 190 9.1.ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ (SRB) 190 9.2. In vitro ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ (SRB) 190 9.3. In vitro ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ME ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ 194 9.4. ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ 203 9.5. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ 207

ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA	. 212
9.7. ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ	
ΤΗΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΙΑΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ	. 214
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	. 217
10.1. <i>Εχ νίνο</i> ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ	
ΜΕ ΤΟ DNA-ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ UV-Vis	. 217
10.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ	
ΜΕ ΤΟ ΕΒ-ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	. 231
10.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕ ΤΟ	
CT-DNA: ΙΞΩΔΟΜΕΤΡΙΑ	239
Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	244
ΣΤ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	. 248
Z. ABSTRACT	250
Η. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	252

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιολογικής Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κάτω από την επίβλεψη και τη καθοδήγηση του κ. Χατζηκακού Σωτηρίου, Καθηγητού Ανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα κ. Σωτήριο Χατζηκακού για την συνεχή επιστημονική καθοδήγησή του, την ενθάρρυνση και την υποστήριξή του, καθώς επίσης και για την αδιάλειπτη διαθεσιμότητά του κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής. Τον ευχαριστώ επίσης για την παραχώρηση της ερευνητικής υποδομής και των αναλώσιμων του εργαστήριου Βιολογικής Ανόργανης Χημείας, γιατί χωρίς αυτήν δεν θα ήταν δυνατή η πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους της διδακτορικής διατριβής μου.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Νικόλαο Κουρκουμέλη, Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον κ. Αθανάσιο Κουτσολέλο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, για τις πολύτιμες επισημάνσεις και επιστημονικές συμβουλές τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής μου.

Ευχαριστώ θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς Εξεταστικής επιτροπής, την κα Χριστιάνα-Άννα Μητσοπούλου, Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, τον κο Α. Σαλίφογλου, Καθηγητή του

Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Αριστοτέλειου Πανεπιστήμιου Θεσσαλονίκης, τον κο Βασίλειο Ψυχάρη, Ερευνητή Α΄ του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και τον κο Νικόλαο Καραμάνο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών για τον χρόνο που δαπάνησαν για την εξέταση της διδακτορικής διατριβής μου, καθώς και για τις πολύτιμες επιστημονικές παρατηρήσεις τους.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Βασίλειο Ψυχάρη, Ερευνητή Α΄ του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας (ΙΝΝ) του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» για τις μελέτες περίθλασης ακτίνων Χ (XRD).

Επιθυμώ και οφείλω 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 καθοδήγησή της, την εκπαίδευση που μου παρείχε στις τεχνικές του εργαστηρίου και για τον χρόνο που μου αφιέρωσε και τις συμβουλές της.

Τέλος ένα πολύ μεγάλο, βαθύ και θερμό ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου και ιδιαίτερα στη σύζυγο μου και συνάδελφο Δρ. Δέσποινα Παπαδοπούλου για την ηθική συμπαράσταση και την αμέριστη υποστήριξή της σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής μου.

Αφιερώνω την παρούσα διδακτορική διατριβή στους αείμνηστους γονείς μου που με στήριξαν σε κάθε βήμα μου και σε αυτούς οφείλω ότι έχω πετύχει μέχρι τώρα.

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Ο καρκίνος αποτελεί γνωστή ασθένεια από την αρχαιότητα και έχει επηρεάσει σημαντικά την ανθρώπινη εξέλιξη σε όλη την χρονική περίοδο μέχρι σήμερα. Πάρα πολλά μέλη της επιστημονικής κοινότητας, εργάζονται πυρετωδώς στην αντικαρκινική θεραπεία και κυρίως στην αντικαρκινική έρευνα, λόγω των πολλών διαφορετικών μορφών του καρκίνου και της υψηλής θνησιμότητας που εμφανίζουν αυτές. Λόγω των προαναφερόμενων, ο σκοπός κάθε αντικαρκινικής έρευνας είναι η σύνθεση νέων ενώσεων που να δρουν επιλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα και να μην προκαλούν βλάβες στα υγιή ανθρώπινα κύτταρα. Στα πλαίσια αυτής της προσέγγισης στην παρούσα διατριβή συντέθηκαν και μελετώνται σύμπλοκα του Ag για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού. 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 (1). Σύμφωνα με το The Global Observatory (2) στην Ελλάδα το 2022 διαγνώστηκαν 65.703 νέες περιπτώσεις καρκίνου. Συνήθως προσβάλλει ανθρώπους μεγάλης ηλικίας, υπάρχουν όμως και μορφές καρκίνου που εμφανίζονται σε νεαρής ηλικίας άτομα, ακόμη και σε παιδιά (3).

Ο όρος «καρκίνος» δεν αποδίδεται σε μία μόνον ασθένεια, αλλά σε μία ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σε αντίθεση με τα υγιή κύτταρα του σώματός μας, που αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με έναν αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο, τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν γιατί συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται χωρίς να ελέγχονται από κάποιο μηχανισμό. Αυτό

έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας μάζας κυττάρων, γνωστής ως όγκος. Οι όγκοι, (που δημιουργούνται) χαρακτηρίζονται ως καλοήθεις ή κακοήθεις.

Οι καλοήθεις όγκοι, των οποίων τα κύτταρα περιβάλλονται από συνδετικό ιστό, δεν είναι επεκτατικοί. Αυτό σημαίνει ότι δεν εισβάλλουν στους γύρω ιστούς και δεν εξαπλώνονται σε άλλα σημεία του σώματος. Συνήθως, δεν προκαλούν σοβαρή βλάβη στο ανθρώπινο σώμα, εκτός εάν λόγω του μεγέθους τους ασκούν πίεση σε ζωτικά όργανα. Αντίθετα, τα κύτταρα των κακοηθών όγκων διαφέρουν μορφολογικά σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, εισβάλλουν στους γειτονικούς ιστούς, ενώ μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή του λεμφικού συστήματος είναι δυνατόν να μεταφερθούν σε άλλα σημεία του σώματος και να σχηματίσουν δευτερογενείς όγκους (μεταστάσεις).

Σύμφωνα με τα ευρήματα επιστημονικών ερευνών για τον του καρκίνο, η καρκινογένεση στα ανθρώπινα κύτταρα είναι μία διαδικασία πολλαπλών σταδίων. Τα στάδια αυτά περιέχουν γενετικές αλλοιώσεις (μεταλλάξεις) που οδηγούν τα κανονικά ανθρώπινα κύτταρα με προοδευτικό μετασχηματισμό σε παράγωγά τους που εμφανίζουν υψηλή κακοήθεια.

Ο Renan (4) διατύπωσε τη θεωρία ότι πολλοί τύποι καρκίνου που εμφανίζονται στον ανθρώπινο πληθυσμό και έχουν σχέση με την αύξηση της ηλικίας του ανθρώπου αναπτύσσονται σε τέσσερα έως επτά διαδοχικά στάδια. Ο Foulds το 1954 (5), μετά από εξέταση διαφόρων ανθρώπινων οργάνων ανακάλυψε αλλοιώσεις που φαίνεται ότι αντιπροσωπεύουν τα ενδιάμεσα στάδια μιας διαδικασίας μέσω της οποίας κανονικά κύτταρα μετατρέπονται προοδευτικά μέσω μιας σειράς προκακοηθών σταδίων σε επιθετικούς καρκίνους. Η ομάδα του Hahn (6) μελετώντας τη μετατροπή των

εργαστηριακά καλλιεργημένων κυττάρων τρωκτικών ανακάλυψε ότι απαιτούνται τουλάχιστον δύο γενετικές αλλαγές για να αποκτήσουν ογκογόνο ικανότητα. Αντίθετα τα ομόλογα ανθρώπινα κύτταρα είναι πιο δύσκολο να μετασχηματιστούν με τον ίδιο τρόπο.

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη τους ανθρώπινους καρκίνους καθώς και τα πειραματικά μοντέλα, οι Foulds (5) και Nowell (7) διατύπωσαν την άποψη ότι η ανάπτυξη καρκινικών όγκων ακολουθεί μία διαδικασία ανάλογη της εξελικτικής θεωρίας του Δαρβίνου, στην οποία μία διαδοχική πορεία γενετικών αλλαγών, καθεμία από τις οποίες παρέχει πλεονέκτημα ανάπτυξης, οδηγεί στην προοδευτική μετατροπή των κανονικών ανθρώπινων κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα.

Επειδή έχουν βρεθεί περισσότερα από 100 διακριτά είδη καρκίνου και υπάρχουν ακόμη περισσότερα υποείδη καρκίνου σε συγκεκριμένα ανθρώπινα όργανα, δημιουργούνται πολύπλοκα ερωτήματα σχετικά με τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων που είναι πολύ δύσκολο να απαντηθούν. Έτσι, οι Hanahan και Weinberg (8) πρότειναν την ύπαρξη έξι βασικών χαρακτηριστικών μεταβολών στη φυσιολογία του κυττάρου, τα οποία συλλογικά υποδηλώνουν κακοήθη ανάπτυξη (Σχήμα 1):

1. Αυτάρκεια σε σήματα μιτογενικής αύξησης

2. Ελάχιστη έως ανύπαρκτη ευαισθησία σε σήματα αναστολής ανάπτυξης των κυττάρων

Αποφυγή του προγραμματισμένου θανάτου των κυττάρων (απόπτωση)

4. Ανεξάντλητο δυναμικό πολλαπλασιασμού κυττάρων

5. Παρατεταμένη δημιουργία αγγείων (αγγειογένεση) και

6. Εισβολή σε ιστούς και μετάσταση.



Σχήμα 1: Χαρακτηριστικές μεταβολές φυσιολογίας του καρκινικού κυττάρου (8)

Κάθε μία από τις προαναφερόμενες φυσιολογικές αλλαγές αντιπροσωπεύουν την επιτυχή παραβίαση του μηχανισμού της αντικαρκινικής άμυνας εμπλέκοντας τα κύτταρα και τους ιστούς.

1.1 Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα

Τα φυσιολογικά κύτταρα χρειάζονται σήματα μιτογενικής ανάπτυξης (GS-Growth Signals) πριν αυτά μετακινηθούν από την κατάσταση ηρεμίας στην κατάσταση ενεργού πολλαπλασιασμού. Τα σήματα αυτά μεταδίδονται εντός του κυττάρου μέσω διαμεμβρανιακών υποδοχέων που δεσμεύουν συγκεκριμένες κατηγορίες σηματοδοτικών κυττάρων: διάχυτους αυξητικούς παράγοντες, εξωκυτταρικά συστατικά υποστρώματος (matrix) και μόρια προσκόλλησης /αλληλεπίδρασης μεταξύ κυττάρων.

Σύμφωνα με τις μέχρι τώρα έρευνες, κανένα είδος φυσιολογικού κυττάρου δεν πολλαπλασιάζεται με την απουσία τέτοιου είδους αυξητικών σημάτων. Αντίθετα, τα αυξητικά σήματα είναι απαραίτητα στην ανάπτυξη κανονικών κυττάρων σε καλλιέργεια, τα οποία πολλαπλασιάζονται μόνον εφόσον εφοδιαστούν με τους κατάλληλους μιτογενικούς παράγοντες και το κατάλληλο υπόστρωμα σύνδεσης για τις ιντεργκρίνες τους.

Τα καρκινικά κύτταρα, σε αντίθεση με τα κανονικά κύτταρα, εμφανίζουν ελαττωμένη εξάρτηση από την εξωγενή διέγερση της ανάπτυξης των κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν μόνα τους τους παράγοντες αύξησης ελαττώνοντας έτσι την εξάρτησή τους από το κανονικό μικροπεριβάλλον του ιστού.

Οι υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου που μετουσιώνουν τα σήματα της έναρξης της ανάπτυξης στο εσωτερικό του κυττάρου είναι και οι ίδιοι στόχοι απορρύθμισης κατά τη διάρκεια της παθογένεσης του όγκου. Οι υποδοχείς GF, συχνά μεταφέρουν τις δράσεις της κινάσης τυροσίνης στο κυτοπλασμικό περιβάλλον και υπερεκφράζονται σε πολλά είδη καρκίνου. Η υπερέκφραση του υποδοχέα μπορεί να

καταστήσει ικανό το καρκινικό κύτταρο να υπερανταποκριθεί σε μέτρια επίπεδα GF, τα οποία συνήθως δεν προκαλούν πολλαπλασιασμό των κυττάρων (9).

Ως παράδειγμα, αναφέρεται ο επιδερμικός υποδοχέας GF (EGF-R/erb) που απορυθμίζεται σε όγκους του στομάχου, του εγκεφάλου και του στήθους, ενώ ο υποδοχέας HER2/neu υπερεκφράζεται σε καρκινώματα του στομάχου και των μαστών (10,11).

1.2 Αντίσταση στα σήματα αντιπολλαπλασιασμού κυττάρων

Εντός ενός φυσιολογικού ιστού, τα πολλαπλά αντιπολλαπλασιαστικά σήματα φροντίζουν για τη διατήρηση της ηρεμίας των κυττάρων και της ομοιόστασης των ιστών. Αυτά τα σήματα περιλαμβάνουν ταυτόχρονα διαλυτούς αναστολείς αύξησης και ακινητοποιημένους αναστολείς ενσωματωμένους στο εξωκυτταρικό υπόστρωμα (ECM) και στις επιφάνειες των γειτονικών κυττάρων. Αυτά τα σήματα αναστολής ανάπτυξης λαμβάνονται από τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου σε συνδυασμό με δίκτυα ενδομοριακής ανταλλαγής σημάτων.

Τα σήματα αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων μπορούν να σταματήσουν τον πολλαπλασιασμό τους με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς. Τα κύτταρα μπορεί να εξαναγκαστούν να αφήσουν τον ενεργό πολλαπλασιαστικό κύκλο και να περιέλθουν στην κατάσταση ηρεμίας (G_o), από την οποία μπορεί μελλοντικά να επιστρέψουν στον πολλαπλασιαστικό κύκλο εφόσον το επιτρέψουν τα σήματα εκτός του κυττάρου. Εναλλακτικά, τα κύτταρα μπορεί να υποχρεωθούν σε μόνιμη εγκατάλειψη της

πολλαπλασιαστικής ικανότητάς τους και να εισέλθουν σε μεταμιτωτικές καταστάσεις, που συνήθως σχετίζονται με την απόκτηση χαρακτηριστικών διαφοροποίησης.

Τα αρχικά καρκινικά κύτταρα πρέπει να αποφύγουν αυτά τα αντιπολλαπλασιαστικά σήματα εφόσον θέλουν να επιβιώσουν. Έτσι τα φυσιολογικά κύτταρα ελέγχοντας το εξωτερικό περιβάλλον κατά τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου ανάπτυξης με βάση τα σήματα που λαμβάνουν, αποφασίζουν είτε να πολλαπλασιαστούν, είτε να βρεθούν σε κατάσταση ηρεμίας ή να εισέλθουν σε μεταμιτωτική κατάσταση. Σε μοριακό επίπεδο, πολλά και πιθανώς όλα τα σήματα αναχαίτησης του πολλαπλασιασμού διοχετεύονται μέσω της πρωτείνης του ρετινοβλαστώματος (pRb) και των συγγενών πρωτεινών p107 και p130. Όταν η pRb βρίσκεται σε υποφωσφορυλιομένη μορφή σταματάει τον πολλαπλασιασμό απομονώνοντας και τροποποιώντας τη λειτουργία των παραγόντων μεταγραφής E2F που ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων που είναι απαραίτητα για τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στη φάση S (12).

Η διακοπή του μονοπατιού της πρωτείνης pRb προκαλεί απελευθέρωση των παραγόντων E2F και έτσι επιτρέπεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων που καθιστά τα κύτταρα αναίσθητα στους παράγοντες αναστολής της ανάπτυξής τους, που συνήθως δρουν σε αυτό το μονοπάτι σταματώντας την ανάπτυξη μέσω της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου.

1.3 Αποφυγή της απόπτωσης

Η ικανότητα των καρκινικών κυτταρικών πληθυσμών να αυξάνονται σε αριθμό καθορίζεται όχι μόνον από το ρυθμό αύξησης των κυττάρων, αλλά επίσης και από το

ρυθμό φθοράς των κυττάρων. Η απόπτωση -ο προγραμματισμένος θάνατος των κυττάρων- αντιπροσωπεύει την κύρια πηγή αυτής της φθοράς. Το γεγονός αυτό προκύπτει κυρίως από έρευνες σε ποντίκια και καλλιέργειες κυττάρων, όπως επίσης και από περιγραφικές αναλύσεις από βιοψίες ανθρωπίνων καρκινικών όγκων και η αντίσταση στην απόπτωση είναι χαρακτηριστικό των περισσοτέρων και πιθανώς όλων των ειδών καρκίνου.

Μελέτες που έχουν γίνει τη δεκαετία του 1990 έδειξαν ότι η απόπτωση είναι παρούσα σε λανθάνουσα μορφή πρακτικά σε όλα τα είδη των κυττάρων του ανθρωπίνου σώματος. Εάν αρχίσει από μία ποικιλία φυσιολογικών σημάτων, η απόπτωση εξελίσσεται σε μία λεπτομερή σειρά σταδίων. Οι μεμβράνες των κυττάρων λύονται, οι κυτοπλασμικοί και οι πυρηνικοί σκελετοί του κυττάρου καταστρέφονται, το διαλυτό κυτταρόπλασμα εξέρχεται από το κύτταρο, τα χρωμοσώματα καταστρέφονται, ο πυρήνας κατακερματίζεται και όλα αυτά συμβαίνουν σε χρονικό διάστημα 30-120 λεπτών. Στο τέλος, το συρρικνωμένο νεκρό κύτταρο απορροφάται από τα γειτονικά κύτταρα του ιστού και εξαφανίζεται εντός 24 ωρών (13).

Ο μηχανισμός της απόπτωσης μπορεί γενικά να διαχωριστεί σε δύο κατηγορίες συστατικών: τους αισθητήρες και τους τελεστές. Οι αισθητήρες είναι υπεύθυνοι για την παρακολούθηση του εξωκυτταρικού και του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος ψάχνοντας για συνθήκες κανονικότητας ή ανωμαλίας, οι οποίες καθορίζουν το μέλλον του κυττάρου. Αυτά τα σήματα ρυθμίζουν τη δεύτερη κατηγορία συστατικών, που δρουν ως τελεστές του αποπτωτικού θανάτου. Οι τελεστές περιέχουν υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας στους οποίους προσκολλώνται παράγοντες επιβίωσης ή θανάτου. Παραδείγματα

ζευγών προσδέτη/υποδοχέα που μεταφέρουν σήματα επιβίωσης είναι το IGF-1/IGF-2 μέσω του υποδοχέα τους IGF-1R και το IL-3 και τον συγγενή υποδοχέα του, IL-3R (14,15). Τα σήματα θανάτου μεταφέρονται από τον προσδέτη FAS που συνδέεται στον υποδοχέα FAS και μέσω του TNFa συνδέεται στον υποδοχέα TNF-R1 (16).

Η πιθανότητα η απόπτωση να παίζει το ρόλο του εμποδίου στην ανάπτυξη καρκινικών όγκων επιβεβαιώθηκε για πρώτη φορά το 1972, όταν οι Kerr, Wyllie και Currie (17) περιέγραψαν μαζικές περιπτώσεις απόπτωσης σε πληθυσμούς κυττάρων ταχέως αναπτυσσόμενων.

Η αντίσταση στην απόπτωση αναπτύσσεται από τα καρκινικά κύτταρα μέσω μιας ποικιλίας στρατηγικών. Ασφαλώς, η πιο συνηθισμένη απώλεια ενός προαπτωτικού ρυθμιστή μέσω της μετάλλαξης εμπλέκει το γονίδιο καταστολής όγκου p53. Το αποτέλεσμα της λειτουργικής αδρανοποίησης του προϊόντος του, η p53 πρωτεΐνη, έχει βρεθεί σε ποσοστό άνω του 50% των ανθρώπινων καρκίνων και έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός βασικού συστατικού του αισθητήρα καταστροφής του DNA, το οποίο μπορεί να προκαλέσει την έναρξη της απόπτωσης (18).

1.4 Απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού

Ο Hayflick το 1997 (19), ανακοίνωσε ότι κυτταρικές καλλιέργειες έχουν πεπερασμένο δυναμικό πολλαπλασιασμού. Όταν οι κυτταρικοί πληθυσμοί αναπτυχθούν μετά από έναν ορισμένο αριθμό διπλασιασμών, σταματούν να αναπτύσσονται, μία διαδικασία που ονομάζεται γήρανση.

Η γήρανση των ανθρώπινων ινοβλαστών μπορεί να αποφευχθεί απενεργοποιώντας τις πρωτεΐνες καταστολής όγκου pRb και p53, επιτρέποντας στα κύτταρα αυτά να συνεχίσουν τον πολλαπλασιασμό τους μέχρι ότου μεταβούν σε μία δεύτερη κατάσταση που ονομάζεται κρίση.

Η κατάσταση κρίσης χαρακτηρίζεται από μαζικό θάνατο κυττάρων, καρυοτυπικές ανωμαλίες που σχετίζονται με τη συγχώνευση των άκρων των χρωμοσωμάτων και την τυχαία εμφάνιση ενός κυττάρου (1 στα 10⁷) που έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται χωρίς όριο, ένα χαρακτηριστικό που ονομάζεται αθανατοποίηση (20).

Τα περισσότερα είδη των καρκινικών κυττάρων που πολλαπλασιάζονται σε καλλιέργειες φαίνονται να είναι αθανατοποιημένα σύμφωνα με την αναφορά του Hayflick (19) ότι το απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού θεωρείται φαινότυπος που αποκτάται *in vivo* κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του όγκου και είναι απαραίτητος για την εμφάνιση της κακοήθους κατάστασης. Εργαστηριακές μετρήσεις σε καλλιέργειες κυττάρων έχουν δείξει ότι τα περισσότερα είδη ανθρωπίνων κυττάρων έχουν τη δυνατότητα για 60-70 διπλασιασμούς, αριθμός που φαίνεται να έχει μικρή σημασία σε σχέση με τον αριθμό των καρκινικών κυττάρων που είναι πολύ μεγαλύτερος από τον αριθμό των κυττάρων του ανθρώπινου σώματος.

Στα άκρα των χρωμοσωμάτων είναι τα τελομερή που αποτελούνται από αρκετές χιλιάδες επαναλήψεις ενός γονιδιακού στοιχείου 6 bp. Σε κάθε κυτταρικό κύκλο έχει βρεθεί ότι υπάρχει απώλεια περίπου 50-100 bp τελομερικού DNA από τα άκρα κάθε χρωματοσώματος. Η προοδευτική μείωση αποδίδεται στην μη δυνατότητα των DNA πολυμερασών να αναπαράγουν πλήρως τα 3΄ άκρα του χρωμοσωμικού DNA κατά τη

διάρκεια της φάσης S. Έτσι χάνεται η ικανότητα προστασίας άκρων του χρωμοσωμικού DNA με αποτέλεσμα τη σύντηξη των άκρων των χρωμοσωμάτων που οδηγεί αναπόφευκτα σε θάνατο του κυττάρου (21).

Η μη καταστροφή των τελομερών είναι εμφανής σχεδόν σε όλους τους τύπους καρκινικών κυττάρων (22). Σύμφωνα με τους Bryan and Cech (23), το 85-90% των καρκινικών κυττάρων επιτυγχάνουν με την αυξημένη έκφραση δράσης του ενζύμου τελομεράση, να προσθέσουν εξανουκλεοτιδικές επαναλήψεις στα άκρα του τελομερικού DNA.

Επομένως, η διατήρηση των τελομερών στα καρκινικά κύτταρα επιτρέπει την έκφραση απεριόριστου πολλαπλασιασμού αυτών.

1.5 Συνεχής αγγειογένεση

Το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται για την επιβίωση και τη λειτουργία των κυττάρων μεταφέρονται από το αγγειακό σύστημα, υποχρεώνοντας το σύνολο των κυττάρων ενός ιστού να βρίσκονται σε ακτίνα 100 μm από κάποιο τριχοειδές αιμοφόρο αγγείο. Κατά τη διάρκεια της δημιουργίας κάποιου ανθρώπινου οργάνου, αυτό εξασφαλίζεται από τη συντονισμένη ανάπτυξη των αγγείων και του παρεγχύματος. Όταν δημιουργείται ένας ανθρώπινος ιστός, η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων- η διαδικασία της αγγειογένεσης- είναι παροδική και προσεκτικά ελεγχόμενη. Λόγω της εξάρτησης από τα γειτονικά τριχοειδή αγγεία, είναι εύλογο ότι τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα εντός του ιστού θα έχουν μια ενδογενή ικανότητα να δημιουργούν νέα αιμοφόρα αγγεία. Οι έρευνες έχουν αποδείξει ότι αρχικά τα κύτταρα που εμφανίζουν μη ομαλό

πολλαπλασιασμό δεν έχουν την ικανότητα για αγγειογένεση. Επομένως για να αναπτυχθεί ο όγκος σε μεγαλύτερες διαστάσεις, οι αρχικές νεοπλασίες πρέπει να αναπτύξουν ικανότητα αγγειογένεσης (24-26).

Αλληλοεξισορροπούμενα θετικά και αρνητικά σήματα αναπτύσσουν ή σταματούν την αγγειογένεση. Μία κατηγορία αυτών των σημάτων μεταφέρονται μέσω διαλυτοποιημένων παραγόντων και των υποδοχέων τους, οι οποίοι εμφανίζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι ιντεγκρίνες και τα μόρια προσκόλλησης που μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων παίζουν επίσης κρίσιμο ρόλο.

Τα σήματα έναρξης της αγγειογένεσης διαβιβάζονται από τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) και τους όξινους και βασικούς αυξητικούς παράγοντες των ινοβλαστών (FGF 1/2). Καθένας από αυτούς συνδέεται με διαμεμβρανικούς υποδοχείς κινάσης τυροσίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα (27,28). Γενικά υπάρχουν περισσότερες από δύο δωδεκάδες ενδογενείς παράγοντες αναχαίτισης της αγγειογένεσης και ένας παρόμοιος αριθμός παραγόντων που προκαλούν τη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων. Ο ουσιώδης ρόλος της αγγειογένεσης υποστηρίζεται επιπλέον από την ικανότητα ενός αυξανόμενου καταλόγου ανασταλτικών στην αγγειογένεση ουσιών που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων που έχουν ενοφθαλμιστεί υποδόρια σε ποντίκια (26).

Όπως είναι ήδη φανερό, η αγγειογένεση των όγκων προσφέρει ένα μοναδικό ελκυστικό θεραπευτικό στόχο, ο οποίος είναι κοινός στους περισσότερους και πιθανώς σε όλους τους τύπους του ανθρώπινου καρκίνου.

1.6 Εισβολή και μετάσταση στους ιστούς

Κατά την ανάπτυξη των περισσοτέρων τύπων ανθρώπινου καρκίνου αργά ή γρήγορα οι πρωτογενείς μάζες των όγκων παράγουν κύτταρα που κινούνται έξω από τον όγκο, εισβάλλουν σε γειτονικούς ιστούς και κατόπιν μετακινούνται σε απομακρυσμένες θέσεις εντός του ανθρώπινου οργανισμού, όπου μπορεί να επιτύχουν τη δημιουργία νέων αποικιών. Σύμφωνα με τον Sporn (29) αυτές οι απομακρυσμένες συγκεντρώσεις καρκινικών κυττάρων -μεταστάσεις- είναι η αιτία του 90% των θανάτων από καρκίνο στον ανθρώπινο πληθυσμό. Οι νέες δημιουργηθείσες μεταστάσεις αποτελούν μίγμα καρκινικών κυττάρων και φυσιολογικών κυττάρων που τα υποστηρίζουν και προέρχονται από το φορέα ιστό. Όπως και ο σχηματισμός των αρχικών καρκινικών όγκων, η επιτυχημένη εισβολή και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων εξαρτάται και από τις άλλες πέντε χαρακτηριστικές ικανότητές τους.

Για την εισβολή και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιούνται παρόμοιες στρατηγικές δράσης που περιλαμβάνουν αλλαγές στην αλληλεπίδραση των κυττάρων με το μικροπεριβάλλον τους και την ενεργοποίηση των εξωκυτταρικών πρωτεασών.

Πολλές κατηγορίες πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση των κυττάρων με το περιβάλλον τους εντός των ιστών, αδρανοποιούνται (altered) σε κύτταρα που εμφανίζουν δυνατότητες εισβολής και μετάστασης σε διαφορετικούς ιστούς. Οι πρωτεΐνες που επηρεάζονται περιλαμβάνουν μόρια προσκόλλησης κυττάρου/κυττάρου (CAMs), όπως της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών και των εξαρτώμενων από

ασβέστιο κατεχινών, που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις κυττάρου/κυττάρου, αλλά και των ιντεγκρινών, οι οποίες συνδέουν κύτταρα σε εξωκυτταρικά υποστρώματα.

Η σημαντικότερη παρατηρούμενη αλλαγή στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρου και του περιβάλλοντός του στον καρκίνο εμπλέκει την πρωτεΐνη Ε-καδερίνη, ένα ομοτυπικό μόριο που εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση κυττάρου/κυττάρου, το οποίο υπάρχει και εκφράζεται σε όλα τα επιθηλιακά κύτταρα.

Η εξαναγκασμένη δράση της επιθηλιακής πρωτεΐνης Ε-καδερίνης σε κυτταρικές καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων και σε διαγονιδιακά μοντέλα καρκινογένεσης ποντικιών φαίνεται να αδρανοποιεί τη μεταστατική δράση, ενώ η μη σωστή λειτουργία της ενισχύει τις ικανότητες διείσδυσης και μετάστασης (30). Έτσι η Ε-καδερίνη δρα ως καταστολέας ευρείας δράσης ενάντια στην εισβολή και μετάσταση στους επιθηλιακούς καρκίνους και η εξάλειψη της λειτουργίας της αντιπροσωπεύει ένα σημείο – κλειδί για

Οι διαφοροποιήσεις στην έκφραση των CAMs, που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών, εμφανίζονται επίσης να παίζουν κρίσιμους ρόλους στις διαδικασίες εισβολής και μετάστασης (31).

Η δεύτερη γενική παράμετρος της δυνατότητας εισβολής και μετάστασης των καρκινικών κυττάρων εμπλέκει τις εξωκυτταρικές πρωτεάσες (32,33). Τα γονίδια των πρωτεασών αυξάνουν τη δράση τους, τα γονίδια αναστολής της δράσης των πρωτεασών μειώνουν τη δράση τους και οι αδρανείς ζυμογόνες μορφές των πρωτεασών μετατρέπονται σε ενεργά ένζυμα.

Η σύνδεση των ενεργών πρωτεασών στην επιφάνεια του κυττάρου μπορεί να διευκολύνει την εισβολή των καρκινικών κυττάρων στο επιφανειακό στρώμα του κυττάρου, δια μέσου των τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων και των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων.

Η εέναρξη δράσης των εξωκυτταρικών πρωτεασών και οι αλλαγές στην ικανότητα δέσμευσης των καδερινών, των CAMs και των ιντεγκρινών είναι πολύ σημαντικές για την εμφάνιση της ικανότητας εισβολής και μετάστασης των καρκινικών κυττάρων σε γειτονικούς αλλά και απομακρυσμένους ιστούς.

Οι Hanahan και Weinberg το 2011 (34) πρόσθεσαν δύο ακόμη χαρακτηριστικά: τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού της ενέργειας και την αποφυγή καταστροφής τους από το ανοσοποιητικό σύστημα.

1.7 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο καρκίνος του μαστού είναι το πιο συνηθισμένο είδος καρκίνου στις γυναίκες και μία από τις πιο σημαντικές αιτίες θανάτου των γυναικών (35). Σύμφωνα με τις ανακοινώσει του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (36), ο καρκίνος του μαστού αντιπροσωπεύει το 24,2% των νέων περιπτώσεων καρκίνου στις γυναίκες και το 15,0% των θανάτων από καρκίνο. Για το έτος 2022 ο καρκίνος του μαστού εμφάνισε 2.296.840 νέες περιπτώσεις (11,7% του συνολικού αριθμού) και 684.996 θανάτους (6,9% του συνολικού αριθμού θανάτων), σύμφωνα με τον ΠΟΥ (37). Ο καρκίνος του μαστού είναι μία πολυπαραγοντική ασθένεια και διάφοροι παράγοντες συνεισφέρουν στην εμφάνισή της.

Σύμφωνα με το Εθνικό Αντικαρκινικό Ινστιτούτο (NCI) των ΗΠΑ, ο καρκίνος του μαστού αναπτύσσεται στους ιστούς του μαστού, στους πόρους που μεταφέρουν γάλα στη θηλή ή στους λοβούς (αδένες που παράγουν γάλα). Ο πιο συνηθισμένος τύπος καρκίνου του μαστού αναπτύσσεται στους πόρους. Ο καρκίνος που εμφανίζεται στους λοβούς πιο συχνά ανιχνεύεται και στους δύο μαστούς. Τέλος, ο καρκίνος του μαστού ΤΝΒC είναι ένας σπάνιος τύπος καρκίνου, στον οποίο ο μαστός είναι ζεστός, κόκκινος και πρησμένος (38).

Ο καρκίνος του μαστού είναι ένας ετερογενής κακοήθης όγκος που συνδέεται με πολύπλοκο τρόπο με το μικροπεριβάλλον του (TME) (Σχήμα 8). Το TME αποτελείται από επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα και μη καρκινικά, όπως είναι τα αιμοφόρα αγγεία, διάφορα στρωματικά κύτταρα, όπως είναι οι ινοβλάστες (CAF_s), τα μεσεγχυματικά κύτταρα (MSC_s), ανοσοκύτταρα και μη στρωματικά κύτταρα, όπως το εξωκυτταρικό υπόστρωμα (ECM). Το ECM αποτελείται από διάφορα συστατικά όπως ινώδεις πρωτεΐνες (κολλαγόνα, ελαστίνες, φιμπρονεκτίνες και λαμινίνες) και πρωτεογλυκάνες (θειϊκή χονδροιτίνη, θειϊκή ηπαράνη, θειϊκή κερατάνη και υαλουρονικό οξύ). Αυξημένος αριθμός εργαστηριακών αποτελεσμάτων ενισχύει την άποψη ότι πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες που αποτελούν το ECM του μικροπεριβάλλοντος του καρκινικού όγκου του μαστού, παίζουν ζωτικό ρόλο στην ανάπτυξη, τη μετάσταση και την ανθεκτικότητα αυτού στη χημειοθεραπεία.



Σχήμα 2. Μικροπεριβάλλον του όγκου του μαστού (38).

1.8 ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Οι όγκοι του καρκίνου του μαστού κατατάσσονται σε τρεις κύριους τύπους με βάση ανοσοϊστοχημικές μελέτες, το βαθμό εκδήλωσης και την ορμονική ανταπόκριση (39). Ειδικότερα είναι:

α. Οι καρκίνοι του μαστού που είναι θετικοί σε υποδοχείς οιστρογόνων (ER+) και προγεστερονών (PR+)

β. Οι καρκίνοι του μαστού που είναι θετικοί στον υποδοχέα ανθρώπινου αυξητικού παράγοντα 2 (HER2⁺)

γ. Οι τριπλά αρνητικοί καρκίνοι του μαστού (TNBCs).

Οι καρκίνοι του μαστού που εκφράζουν τους υποδοχείς ER και PR αντιπροσωπεύουν σχεδόν το 85% του συνολικού αριθμού των καρκίνων του μαστού και χωρίζονται περαιτέρω σε δύο υποτύπους (Σχήμα 3):

- τον υποτύπο luminal A, ο οποίος περιέχει τους υποδοχείς ER⁺ και/ή PR⁺ και
 HER2⁺ και χαρακτηρίζεται από τη χαμηλή έκφραση του δείκτη πολλαπλασιασμού
 Ki-67 και
- τον υποτύπο luminal B, που περιέχει τους υποδοχείς ER⁺ και/ή PR⁺, HER2⁺ (ή HER2⁻), παρουσιάζει υψηλή έκφραση του δείκτη Ki-67 και χειρότερη πρόγνωση εξέλιξης της ασθένειας από τον luminal A.

Οι καρκίνοι των τύπων HER2⁺ και TNBCs αντιπροσωπεύουν περίπου το 15% των καρκίνων του μαστού. Οι τύποι καρκίνου που είναι θετικοί στους υποδοχείς έχουν καλύτερη πρόγνωση εξέλιξης, ενώ ο τύπος TNBCs, που είναι ο πιο ετερογενής τύπος καρκίνου του μαστού, έχει υψηλό κίνδυνο επανεμφάνισης και μικρότερο ποσοστό επιβίωσης σε σύγκριση με τους δύο άλλους τύπους.



Σχήμα 3: Υποτύποι καρκίνου του μαστού και πρόγνωση (39)

Όπως ειπώθηκε προηγουμένως, ο καρκίνος του μαστού αποτελείται από ετερογενείς ιστούς που περιέχουν επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα και ένα ανώμαλο μικροπεριβάλλον του όγκου. Τα καρκινικά κύτταρα και το μικροπεριβάλλον τους συνθέτουν έναν ιστό που συμπεριφέρεται παρόμοια με ένα πολύπλοκο και ετερογενές μεταβολικό οικοσύστημα, όπου τα καρκινικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να επαναπρογραμματίσουν το μεταβολισμό τους ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με τα συστατικά του μικροπεριβάλλοντος του όγκου.

Για παράδειγμα, τα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 ανήκουν σε έναν πληθυσμό κυττάρων που περιλαμβάνει άμορφα (bulk) καρκινικά κύτταρα (περίπου το 85-95% του πλήθους), προγονικά (progenitor) κύτταρα (<5%) και καρκινικά βλαστοκύτταρα (CSCs) (<1%). Συγκεκριμένα, τα προγονικά κύτταρα και τα CSCs είναι πολύ επικίνδυνα, γιατί συμπεριφέρονται ως κύτταρα έναρξης σχηματισμού όγκου (TICs) εντός του μαστού και μπορούν να δημιουργήσουν μεταστάσεις. Αντίθετα, τα άμορφα (bulk) καρκινικά κύτταρα αποτελούν ένα κυτταρικό πληθυσμό που χαρακτηρίζεται από χαμηλό δυναμικό δημιουργίας όγκων. Τα MCF-7 καρκινικά κύτταρα, που ανήκουν στον υποτύπο luminal, εξαρτώνται περισσότερο από τη μιτοχονδριακή αναπνοή και μειώνουν τη δράση της γαλακτικής δεϋδρογονάσης (LDH) που έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή γαλακτικού οξέος.

Αντίθετα, τα βασικά (basal) κύτταρα MDA-MB-231 εμφανίζουν έναν πιο γλυκολυτικό φαινότυπο. Ο χαμηλότερος ρυθμός αναπνοής στα κύτταρα MDA-MB-231 σχετίζεται με μία ισχυρή μείωση στα σύμπλοκα Ι, ΙΙ και V της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC). Τα κύτταρα MDA-MB-231 εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα της NADH. Ως αποτέλεσμα, το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ από τη δράση της LDH, η οποία εκφράζεται έντονα στα κύτταρα MDA-MB-231.
1.9 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Επειδή ο καρκίνος του μαστού είναι ο δεύτερος πιο συνηθισμένος καρκίνος στον ανθρώπινο πληθυσμό και ο πιο συχνά εμφανιζόμενος στις γυναίκες, η έγκαιρη αναγνώριση των γυναικών υψηλού κινδύνου είναι πολύ σημαντική για την επιλογή των κατάλληλων φαρμακευτικών και ιατρικών θεραπειών (40).

Πολλοί παράγοντες (δημογραφικοί, αναπαραγωγικοί, ορμονικοί, κληρονομικοί, περιβαλλοντικοί, τρόπος ζωής κ.α.) έχουν βρεθεί με την πάροδο του χρόνου ότι μεταβάλλουν (αυξάνουν ή μειώνουν) τον κίνδυνο εμφάνισης και ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 1:

Παράγοντες κινδύνου		Προστατευτικοί	Επιβαρυντικοί	Αμφιλεγόμενοι
Δημογραφικοί	Γυναικείο φύλο		\checkmark	
	Ηλικία		\checkmark	
	Ομάδα αίματος			\checkmark
Αναπαραγωγικοί	Ηλικία πρώτης έμμηνου ρήσης			\checkmark
	Ηλικία εμμηνόπαυσης		\checkmark	
	Ηλικία πρώτης πλήρους εγκυμοσύνης	\checkmark		
	Άμβλωση			\checkmark
	Κύκλος εμμήνου ρήσης	\checkmark		
	Χαρακτηριστικά εγκυμοσύνης	\checkmark	\checkmark	
Ορμονικοί	Ορμονικές μέθοδοι αντισύλληψης		\checkmark	
	Φάρμακα που διεγείρουν την ωορρηξία			\checkmark
	Ορμονική θεραπεία μετά την εμμηνόπαυση		\checkmark	
Κληρονομικοί	Γενετικοί παράγοντες		\checkmark	
	Θετικό οικογενειακό ιστορικό στον καρκίνο του μαστού		\checkmark	
Σχετικοί με το στήθος	Διάρκεια θηλασμού	\checkmark		
	Πυκνότητα στήθους			\checkmark
	Καλοήθεις διαταραχές στήθους		\checkmark	
Τρόπος ζωής	Παχυσαρκία και αυξημένο σωματικό βάρος		\checkmark	

Πίνακας 1: Παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού (35).

	Κατανάλωση αλκοόλ		\checkmark	
	Κάπνισμα		\checkmark	
	Καφές			\checkmark
	Διατροφή		\checkmark	
	Φυσική δραστηριότητα	\checkmark		
	Βιταμίνη D	\checkmark		
	Διάρκεια ύπνου			\checkmark
Άλλοι	Ατμοσφαιρική ρύπανση		\checkmark	
	Νυχτερινή εργασία		\checkmark	
	Κοινωνικοοικονομικές συνθήκες		\checkmark	
	Διαβήτης		\checkmark	
	Ιονίζουσες ακτινοβολίες		\checkmark	

1.9α. Δημογραφικοί παράγοντες

- **Φύλο**:

Ο καρκίνος του μαστού εμφανίζεται σχεδόν αποκλειστικά στις γυναίκες, ενώ στους άνδρες τα περιστατικά καρκίνου του μαστού αναλογούν σε λιγότερο από 1% του συνολικού αριθμού καρκίνων.

- Ηλικία:

Μετά το φύλο, η ηλικία είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου. Η συχνότητα εμφάνισης αυξάνει σημαντικά με την αύξηση της ηλικίας της γυναίκας και πλησιάζει τη μέγιστη τιμή κατά την εμμηνόπαυση.

1.9β. Αναπαραγωγικοί παράγοντες

Η συσχέτιση μεταξύ των αναπαραγωγικών παραγόντων και του καρκίνου του μαστού οφείλεται στην επίδραση των ορμονών των ωοθηκών που αρχίζει στην εφηβική ηλικία, συνεχίζεται κατά τη διάρκεια των μηνιαίων κύκλων και επηρεάζεται επίσης από τον αριθμό των εγκυμοσυνών της γυναίκας ενώ μειώνεται δραστικά στην εμμηνόπαυση.

Ηλικία πρώτης έμμηνου ρήσης:

Τα ευρήματα μιας έρευνας (41) δείχνουν ότι η έναρξη της έμμηνου ρήσης σε νεαρή ηλικία διπλασιάζει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου.

Ηλικία εμμηνόπαυσης:

Όταν η ηλικία εμμηνόπαυσης της γυναίκας υπερβαίνει τα 50 έτη, αυξάνει ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού.

Ηλικία πρώτης πλήρους εγκυμοσύνης:

Παρατηρήθηκε ότι όταν η γυναίκα μένει έγκυος για πρώτη φορά σε μεγάλη ηλικία, ο κίνδυνος για εμφάνιση καρκίνου του μαστού εξαπλασιάζεται. Επίσης παρατηρήθηκε ότι για κάθε γέννηση παιδιού, ο κίνδυνος μειώνεται κατά 10% για τους PR⁺ και ER⁺ καρκίνους.

Χαρακτηριστικά εγκυμοσύνης :

Ειδικά η πρώτη εγκυμοσύνη της γυναίκας, παίζει σημαντικό ρόλο στον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Τα αποτελέσματα μελετών έδειξαν ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου σχεδόν διπλασιάζεται στις γυναίκες που γέννησαν το πρώτο παιδί τους πριν συμπληρωθούν 33 εβδομάδες εγκυμοσύνης (42).

1.9γ. Ορμονικοί παράγοντες

Μέθοδοι αντισύλληψης:

Η χρήση αντισυλληπτικών χαπιών έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, σύμφωνα με επιστημονικές μελέτες. Πάντως ο κίνδυνος αυτός μειώνεται μετά από 5-10 χρόνια διακοπής της χρήσης των αντισυλληπτικών χαπιών.

Ορμονική θεραπεία μετά την εμμηνόπαυση:

Η ανάλυση 51 επιδημιολογικών μελετών έδειξε την αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού κατά τη χρήση της θεραπείας αντικατάστασης ορμονών (HRT) και μειώνεται αισθητά μετά από 5 χρόνια διακοπής της θεραπείας (43,44). Επίσης, μετά από εξέταση 1 εκατομμυρίου γυναικών βρέθηκε ότι η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου αυξάνει όταν χρησιμοποιούνται μέθοδοι θεραπείας με συνδυασμό οιστρογόνων και προγεστερόνης σε σχέση με άλλες μεθόδους θεραπείας.

1.9δ. Κληρονομικοί παράγοντες

Γενετικοί παράγοντες:

Αν και αρκετοί γενετικοί παράγοντες συνεισφέρουν στην εμφάνιση του καρκίνου του μαστού, σχεδόν το 40% των περιπτώσεων κληρονομικού καρκίνου του μαστού αποδίδονται σε μεταλλάξεις των γονιδίων BRCA1 και BRCA2. Τα αποτελέσματα μελετών έδειξαν ότι το 55-65% των φορέων της BRCA1 μετάλλαξης και το 45% των φορέων της BRCA2 μετάλλαξης αναπτύσσουν καρκίνο του μαστού στην ηλικία των 70 χρόνων (45,46).

Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού:

Το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου, όπως έχει αναφερθεί σε πολλές επιστημονικές μελέτες (47). Οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, οι οποίες είναι αρνητικές σε μεταλλάξεις των γονιδίων BRCA, έχουν 11 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού.

- Θηλασμός:

Ο θηλασμός είναι ένας προστατευτικός παράγοντας έναντι του καρκίνου του μαστού και πολλοί ερευνητές έχουν αναδείξει το ρόλο του θηλασμού στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού. Ο προστατευτικός ρόλος του θηλασμού αυξάνει όσο αυξάνει η διάρκεια του θηλασμού. Τα αποτελέσματα έρευνας έδειξαν ότι ο συνδυασμός δύο προστατευτικών παραγόντων (δύο ή περισσότερες γεννήσεις και θηλασμός για περισσότερους από 13 μήνες) μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού περισσότερο από 50%.

- Μαστική πυκνότητα:

Η πυκνότητα του μαστού είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Η πυκνότητα του μαστού συσχετίζεται με την αύξηση του κινδύνου για εμφάνιση του ΕR-θετικού και ER-αρνητικού καρκίνου του μαστού (48).

1.9ε. Παράγοντες τρόπου ζωής

Παχυσαρκία και αυξημένο σωματικό βάρος:

Η παχυσαρκία σχετίζεται με τον καρκίνο του μαστού λόγω της μετατροπής των ανδρογόνων πρόδρομων ουσιών σε οιστρογόνα. Επίσης, τα υψηλά επίπεδα ινσουλίνης που οφείλονται στην παχυσαρκία μπορούν να βοηθήσουν στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Αποτελέσματα μελέτης (49) έδειξαν ότι γυναίκες σε εμμηνόπαυση, οι οποίες ήταν υπέρβαρες (BMI ≥30 Kg/m²) είχαν μικρότερες πιθανότητες επιβίωσης σε σύγκριση με τις γυναίκες κανονικού βάρους. Ο Tretli (50) έδειξε ότι το μεγάλο ύψος των γυναικών συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο της νόσου.

Κατανάλωση οινοπνευματωδών ποτών:

Η κατανάλωση οινοπνευματωδών ποτών, σύμφωνα με αποτελέσματα έρευνας του EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition), έδειξε τη σχέση μεταξύ της κατανάλωσης αλκοόλ και του θετικού υποδοχέα και του αρνητικού υποδοχέα ορμονών καρκίνου του μαστού ενώ ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού είναι υψηλότερος στις γυναίκες που καταναλώνουν αλκοόλ πριν την πρώτη εγκυμοσύνη.

- Κάπνισμα:

Το ενεργό κάπνισμα, ιδιαίτερα στις γυναίκες σε εμμηνόπαυση και το κάπνισμα πριν την εγκυμοσύνη σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού.

- Διατροφή:

Τα αποτελέσματα της έρευνας του ΕΡΙC έδειξαν ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης κορεσμένων λιπαρών και του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Ομοίως, η αυξημένη κατανάλωση κρέατος αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου.

- Φυσική δραστηριότητα:

Τα αποτελέσματα μελέτης σε 74.171 γυναίκες που βρίσκονταν σε εμμηνόπαυση ηλικίας 50-79 ετών, έδειξαν ότι η αυξημένη φυσική δραστηριότητα (περπάτημα, γυμναστική κ.α.) σχετίζεται με μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Επίσης, η φυσική δραστηριότητα μετά από τη διάγνωση της νόσου, μειώνει τον κίνδυνο θανάτου εξαιτίας της νόσου, ειδικότερα σε άτομα που περπατούν 3-5 ώρες την εβδομάδα.

Βιταμίνη D:

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μελέτης, η έλλειψη βιταμίνης D είναι συνηθισμένη στις νεοπλασίες του μαστού και ο κίνδυνος ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού αυξάνει με τη μείωση του επιπέδου συγκέντρωσης της βιταμίνης D.

1.9στ. Άλλοι παράγοντες κινδύνου

Ατμοσφαιρική ρύπανση:

Η ατμοσφαιρική ρύπανση συνδέεται με την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Τα αποτελέσματα 15 ερευνών από εννέα Ευρωπαϊκές χώρες έδειξαν τη σχέση ατμοσφαιρικής ρύπανσης και ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε γυναίκες σε εμμηνόπαυση, ιδιαίτερα σε αστικές περιοχές και περιοχές με υψηλά επίπεδα ατμοσφαιρικής ρύπανσης.

Νυχτερινή εργασία:

Μελέτες έδειξαν ότι η νυχτερινή εργασία σχετίζεται με μέτρια αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και ιδιαίτερα σε γυναίκες που έχουν εργαστεί για περισσότερα από 20 έτη. Η έκθεση στο τεχνητό φως τη νύχτα μειώνει κατακόρυφα τα επίπεδα μελατονίνης και έτσι θεωρείται ότι αυξάνει ο κίνδυνος ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού.

- Κοινωνικοοικονομικές συνθήκες:

Οι κοινωνικοοικονομικές συνθήκες σχετίζονται άμεσα με τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Ειδικότερα, οι γυναίκες με ανώτερο επίπεδο μόρφωσης και καλύτερες συνθήκες εργασίας εμφανίζουν μεγαλύτερες πιθανότητες να νοσήσουν. Όμως οι γυναίκες αυτές

λόγω μεγαλύτερου εισοδήματος είναι πιθανότερο να είναι κάτοχοι ασφαλιστικού προγράμματος υγείας και να έχουν τη δυνατότητα να διαθέσουν χρήματα για ιατρική περίθαλψη, αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες επιβίωσης. Αντίθετα, στις κατώτερες κοινωνικές τάξεις, τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης C, ρετινόλης και β-καροτένιου και η διατροφή με μεγάλη ποσότητα λιπαρών τροφών σχετίζεται με αλλαγές στα επίπεδα των οιστρογόνων και της προλακτίνης. Σε αυτές τις περιπτώσεις η προοπτική εξέλιξης της ασθενούς σε περίπτωση υποτροπής της νόσου δεν είναι καλή.

- Διαβήτης:

Οι έρευνες έδειξαν ότι γυναίκες σε εμμηνόπαυση που εμφανίζουν διαβήτη (ιδιαίτερα αυτές με διαβήτη τύπου ΙΙ) εμφανίζουν αυξημένο κατά 20% κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού.

- Ιονίζουσες Ακτινοβολίες:

Μελέτη σε μεγάλο αριθμό ανθρώπων έδειξε ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε γυναίκες που έχουν εκτεθεί σε ακτινοβολίες λόγω της ύπαρξης προηγούμενης θεραπείας καρκίνου είναι δύο ή τρεις φορές μεγαλύτερος. Επίσης, οι γυναίκες που ακολούθησαν θεραπευτική αγωγή με ακτινοβολίες επειδή εμφάνισαν την ασθένεια του Hodgkin, έπειτα από 15 έτη από τη θεραπεία έχουν αυξημένες πιθανότητες να αναπτύξουν τη νόσο (51).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι θεραπείας του καρκίνου του μαστού, όπως:

- Χειρουργική επέμβαση (μαστεκτομή ή επέμβαση διατήρησης του μαστού, BCS).

- Ακτινοθεραπεία
- Χημειοθεραπεία
- Ορμονοθεραπεία
- Ανοσοθεραπεία

Οι παραπάνω μέθοδοι έχουν ως αποτέλεσμα την τοπική ή τη συστηματική θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Στην τοπική θεραπεία περιλαμβάνεται η χειρουργική επέμβαση και η ακτινοθεραπεία, ενώ η συστηματική θεραπεία περιλαμβάνει τη χημειοθεραπεία, την ορμονοθεραπεία και την ανοσοθεραπεία. Η κατάλληλη μέθοδος θεραπείας επιλέγεται ανάλογα με το στάδιο του καρκίνου του μαστού (Στάδια Ι, ΙΙ, ΙΙΙ). Όταν ο καρκίνος βρίσκεται σε αρχικό στάδιο, συνιστάται η τοπική θεραπεία, ενώ όταν η ασθενής διατρέχει υψηλό κίνδυνο υποβάλλεται σε συστηματική θεραπεία. (52).

2.1 ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η χημειοθεραπεία είναι μία συστηματική φαρμακευτική θεραπεία κατά την οποία χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες (φάρμακα), που δρουν στα καρκινικά κύτταρα με σκοπό να καταστρέψουν ή να μειώσουν την ανάπτυξή τους. Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα χορηγούνται στις ασθενείς ενδοφλεβίως, από το στόμα ή σε ορισμένες περιπτώσεις στο νωτιαίο υγρό του εγκεφάλου και το νωτιαίο μυελό (53).

Η χημειοθεραπεία στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού εφαρμόζεται στις ακόλουθες περιπτώσεις:

 Μετά από χειρουργική επέμβαση σε καρκίνο πρωίμου σταδίου (ανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία). Η χημειοθεραπεία στοχεύει στην καταστροφή των καρκινικών

κυττάρων που έχουν παραμείνει μετά την επέμβαση ή μπορεί να έχουν μεταφερθεί σε άλλους ιστούς. Αυτά τα μοναδιαία κύτταρα -ή ομάδες των δύο ή τριών κυττάρων- είναι πολύ μικρά και δεν ανιχνεύονται στις απεικονιστικές εξετάσεις.

- Πριν από χειρουργική επέμβαση σε καρκίνο πρωίμου σταδίου (νεοανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία). Η νεοανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία χορηγείται ώστε να γίνει λιγότερο εκτεταμένη χειρουργική επέμβαση (αφαίρεση όγκου μικρής μάζας αντί μαστεκτομή), να συρρικνωθεί δραστικά ο όγκος έτσι ώστε ο χειρουργός να τον αφαιρέσει ολοκληρωτικά και να έχει μία εικόνα ο θεράποντας ιατρός στο πως ανταποκρίνονται τα καρκινικά κύτταρα στη συγκεκριμένη χημειοθεραπεία. Γενικά, η νεοανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία προτείνεται για ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με:
- φλεγμονώδη καρκίνο του μαστού
- HER2+ καρκίνο του μαστού
- τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού
- μεγάλου μεγέθους καρκίνο του μαστού
- προχωρημένο καρκίνο του μαστού
- καρκίνο του μαστού που έχει κάνει μετάσταση στους λεμφαδένες
 - Για την αντιμετώπιση προχωρημένου και μεταστατικού καρκίνου του μαστού.

Η χημειοθεραπεία χορηγείται ως κύρια θεραπεία σε γυναίκες των οποίων ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στους γειτονικούς ιστούς, όπως το δέρμα και το θωρακικό

τοίχωμα και σε απομακρυσμένα όργανα του σώματος, όπως το συκώτι ή οι πνεύμονες.

2.2 ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΑΓΩΓΕΣ

Υπάρχουν πολλά χημειοθεραπευτικά φάρμακα που χορηγούνται στον καρκίνο του μαστού. Στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου πρωίμου σταδίου, οι ιατροί συνιστούν συνδυασμό δύο ή τριών φαρμάκων, που εξαρτώνται από τα χαρακτηριστικά του καρκίνου. Αυτοί οι συνδυασμοί ονομάζονται χημειοθεραπευτικές αγωγές.

Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες, σύμφωνα με τη δράση τους (54):

Πλατινικά σύμπλοκα (Πίνακας 2)

Το cisplatin αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο στη μοντέρνα χημειοθεραπεία διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη θεραπεία κακοήθων όγκων επιθηλιακής προέλευσης. Είναι ένα από τα ελάχιστα αντικαρκινικά φάρμακα της δεκαετίας του '70 που δεν έχει αντικατασταθεί μέχρι σήμερα. Όμως το cisplatin προκαλεί βλάβες αδιακρίτως στα καρκινικά και στα φυσιολογικά κύτταρα. Οι παρενέργειες προκαλούνται κυρίως στα περιφερειακά νεύρα, στα νεφρικά σωληνάρια, στο μυελό των οστών και στο γαστρεντερικό σωλήνα με συνέπεια την πρόκληση κυρίως νεφρικής ανεπάρκειας, ωτοτοξικότητας, μυελοτοξικότητας, ναυτίας, εμετών και γενικής κακουχίας.

Η κλινική επιτυχία του cisplatin έδωσε το έναυσμα για μια διεθνή προσπάθεια ανακάλυψης νέων φαρμάκων με λευκόχρυσο με λιγότερες παρενέργειες.

Συγκεκριμένα από τα 3000 πλατινούχα σκευάσματα που έχουν συντεθεί, μόνο 35 έχουν δείξει επαρκή φαρμακολογικά χαρακτηριστικά, σε σχέση με το cisplatin, ώστε να περάσουν στο στάδιο των κλινικών δοκιμών (55). Από αυτά το carboplatin και το oxaliplatin έχουν εγκριθεί παγκοσμίως και χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου.



Πίνακας 2: Πλατινικά σύμπλοκα

- Αλκυλιωτικοί παράγοντες (Πίνακας 3)

Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες προσθέτοντας μια άλκυλο ομάδα (C_nH_{2n+1}), που συνδέεται με το άτομο N7 της γουανίνης του DNA, δεν επιτρέπουν στο κύτταρο να αναπαραχθεί καταστρέφοντας το DNA του. Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες δρουν σε όλες

τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου και χορηγούνται σε πολλούς διαφορετικούς τύπους καρκίνου εκτός του καρκίνου του μαστού.

Επειδή αυτά τα φάρμακα καταστρέφουν το DNA, υπάρχει πιθανότητα να επιδράσουν στα κύτταρα του μυελού των οστών και σε σπάνιες περιπτώσεις να προκαλέσουν λευχαιμία, η οποία μπορεί να εμφανιστεί 5 έως 10 χρόνια μετά τη θεραπεία. Έγιναν ιδιαίτερα γνωστοί κατά τη διάρκεια του 1^{ου} Παγκοσμίου Πολέμου με τα «αέρια μουστάρδας».

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα φάρμακα: Altretamine, Bendamustine, Busulfan, Carboplatin, Carmustine, Chlorambucil, Cisplatin, Cyclophosphamide, Dacarbazine, Ifosfamide, Lomustine, Mechlorethamine, Melphalan, Oxaliplatin, Temozolomide, Thiotepa, Trabectedin.

- Νιτροζουρίες (Πίνακας 3)

Οι νιτροζουρίες ανήκουν στην ομάδα των αλκυλιωτικών παραγόντων, έχουν όμως τη δυνατότητα να διαπερνούν το φράγμα αίματος-εγκεφάλου και να δρουν σε ορισμένους τύπους καρκίνου του εγκεφάλου.

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα φάρμακα: Carmustine, Lomustine, Streptozocin.



Πίνακας 3 (Αλκυλιωτικοί Παράγοντες-Νιτροζουρίες)

Πίνακας 3 (συνέχεια)



Πίνακας 3 (συνέχεια)



- Αντιμεταβολίτες (Πίνακας 4)

Οι αντιμεταβολίτες λόγω παρόμοιας δομής, παρεμβαίνουν στο DNA και στο RNA δρώντας ως αντικαταστάτες κατά τη φυσιολογική δόμηση των αλυσίδων του RNA και

DNA. Η βλάβη του DNA επιτυγχάνεται ή με την απ' ευθείας αναστολή των απαραίτητων ενζύμων για την αντιγραφή ή με την επιδιόρθωση ή με την ενσωμάτωση του αντιμεταβολίτη ή προϊόντος του στο DNA. Όταν συμβαίνει αυτό το DNA δε μπορεί να αντιγράψει τον εαυτό του, επομένως δε μπορεί να αναπαραχθεί. Οι αντιμεταβολίτες θεωρούνται γενικά φάρμακα μη μιτογόνα και πολλοί εξ' αυτών χρησιμοποιούνται με σχετική ασφάλεια ακόμη και στη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους ταξινομούνται σε ανταγωνιστές του φολικού οξέος, ανταγωνιστές της πυριμιδίνης και ανταγωνιστές των πουρινών (56). Συνήθως χορηγούνται για την αντιμετώπιση της λευχαιμίας, του καρκίνου του μαστού, των ωοθηκών καθώς και άλλων τύπων καρκίνου.

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα φάρμακα: Azacitidine, 5-fluorouracil (5-FU), 6mercaptopurine (6-MP), Capecitabine (Xeloda), Cladribine, Clofarabine, Cytarabine (Ara-C), Decitabine, Floxuridine, Hydroxyurea, Pentostatin, Thioguanine.

Πίνακας 4 (Αντιμεταβολίτες)

Azacitidine (Αζακιτιδίνη)	HO OH OH
5-fluorouracil (5-Φθόρο-1Η,3Η-πυριμιδινο-2,4- διόνη)	
6-mercaptopurine (3,7-Διυδροπουρίνο-6-θειόνη)	
Capecitabine (Καρβαμιδική Φθοριοπυριμιδίνη)	
Cladribine (2-Χλώρο-2΄-δεοξυαδενοσίνη)	

Πίνακας 4 (συνέχεια)



Πίνακας 4 (συνέχεια)



- Αντικαρκινικά αντιβιοτικά (Πίνακας 5)

Τα φάρμακα αυτά δεν δρουν σαν τα γνωστά αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία μολύνσεων. Δρουν αλλάζοντας το DNA εντός των καρκινικών κυττάρων μη επιτρέποντας σε αυτά να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν. Η κύρια κατηγορία αυτών είναι οι **Ανθρακυκλίνες**. Οι ανθρακυκλίνες παρεμποδίζουν τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την αντιγραφή του DNA κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Χρησιμοποιούνται ευρέως σε πολλούς τύπους καρκίνου. Στις ανθρακυκλίνες ανήκουν τα φάρμακα: Daunorubicin, Doxorubicin (Adriamycin), Doxorubicin liposomal, Epirubicin, Idarubicin, Valrubicin.

Λόγω της μόνιμης βλάβης που μπορούν να προκαλέσουν στην καρδιά του ασθενούς, οι ανθρακυκλίνες χορηγούνται σύμφωνα με τη σωρευτική δόση, δηλαδή η χορήγηση του φαρμάκου δε μπορεί να υπερβεί μία συγκεκριμένη ποσότητα καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ασθενούς.

Αντικαρκινικά αντιβιοτικά εκτός των ανθρακυκλινών είναι τα: Bleomycin, Dactinomycin, Mitomycin-C και Mitoxantrone.



Πίνακας 5 (Αντικαρκινικά Αντιβιοτικά)



- Αναστολείς Τοποϊσομεράσης (Πίνακας 6)

Τα φάρμακα αυτά ονομάζονται επίσης φυτικά αλκαλοειδή. Δρουν παρεμποδίζοντας τις τοποϊσομεράσες, τα οποία συνεισφέρουν στο χωρισμό των κλώνων του DNA και έτσι αυτό δε μπορεί να αντιγραφεί. Οι αναστολείς τοποϊσομεράσης χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία αρκετών λευχαιμιών, όπως επίσης του καρκίνου των πνευμόνων, των ωοθηκών και του παγκρέατος. Οι αναστολείς τοποϊσομεράσης κατατάσσονται σύμφωνα με το είδος του ενζύμου στο οποίο επιδρούν.

Οι αναστολείς τοποϊσομεράσης Ι (ή καμπτοθεκίνες) περιέχουν τα φάρμακα: Irinotecan, Irinotecan liposomal, Topotecan.

Οι αναστολείς τοποϊσομεράσης ΙΙ (ή επιπεδοφυλλοτοξίνες) περιέχουν τα φάρμακα: Etoposide (VP-16), Teniposide. Οι αναστολείς τοποϊσομεράσης ΙΙ μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης και δεύτερου τύπου καρκίνου.

Αναστολείς μίτωσης (Πίνακας 6)

Οι αναστολείς μίτωσης επίσης ονομάζονται **φυτικά αλκαλοειδή**. Είναι ουσίες που παράγονται από φυσικά προϊόντα, όπως είναι τα φυτά. Δρουν μη επιτρέποντας στα κύτταρα να διαιρεθούν, έτσι ώστε να σχηματίσουν νέα κύτταρα, όμως μπορεί να καταστρέψουν κύτταρα σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου μη επιτρέποντας στα ένζυμα να σχηματίσουν πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή των κυττάρων.

Οι αναστολείς μίτωσης περιλαμβάνουν τις ταξάνες και τα αλκαλοειδή μυρτιάς Μαγαδασκάρης (*Catharanthus roseus*, vinca).

Ενδιαφέρον για τις ταξάνες εκδηλώθηκε το 1963, όταν το ακατέργαστο εκχύλισμα του φλοιού του φυτού Taxus Brevifolia εμφάνισε εντυπωσιακή δραστηριότητα σε καρκινικά μοντέλα. Το 1971 η πακλιταξέλη αναγνωρίστηκε ως το ενεργό συστατικό του εκχυλίσματος του φυτού. Οι ταξάνες είναι τα φάρμακα: Cabazitaxel, Decetaxel, Nabpaclitaxel, Paclitaxel.

Στα vinca αλκαλοειδή ανήκουν τα φάρμακα: Vinblastine, Vincristine, Vincristine liposomal, Vinorelbine.

Αυτά χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία πολλών διαφορετικών τύπων καρκίνου, όπως του μαστού, των πνευμόνων, του μυελώματος, του λεμφώματος και της λευχαιμίας. Τα αλκαλοειδή vinca είναι δυνατό να προκαλέσουν βλάβες στο νευρικό σύστημα, γι' αυτό και οι δόσεις που χορηγούνται στον ασθενή θα πρέπει να είναι ελεγχόμενες.

- **Κορτικοστεροειδή** (Πίνακας 6)

Τα κορτικοστεροειδή είναι φυσικές ορμόνες και φάρμακα που δρουν σαν ορμόνες και χρησιμοποιούνται στη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου, όπως επίσης και σε άλλες ασθένειες.

Τα κορτικοστεροειδή περιλαμβάνουν τα φάρμακα: Prednisone, Methyl-prednisolone, Dexamethasone.

Τα κορτικοστεροειδή χρησιμοποιούνται επίσης στην αντιμετώπιση της ναυτίας και του εμετού που προκαλούνται από τη χημειοθεραπεία. Ακόμη χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση έντονων αλλεργικών αντιδράσεων πριν τη χημειοθεραπεία.

- Άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα (Πίνακας 6)

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν φάρμακα που δρουν με ελαφρώς διαφορετικούς τρόπους και δε μπορούν να ενταχθούν σε κάποια από τις προηγούμενες κατηγορίες.

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα φάρμακα: All-trans-retinoic acid, Arsenic trioxide, Asparaginase, Eribulin, Hydroxyurea, Ixabepilone, Mitotane, Omacetaxine, Pegaspargase, Procarbazine, Romidespin, Vorinostat.



Πίνακας 6 (Άλλες κατηγορίες αντικαρκινικών φαρμάκων)

Πίνακας 6 (συνέχεια)



Πίνακας 6 (συνέχεια)



Πίνακας 6 (συνέχεια)



Πίνακας 6 (συνέχεια)



Στο Σχήμα 4 περιγράφονται οι κυριότεροι τρόποι δράσης των αντικαρκινικών φαρμάκων.



Σχήμα 4: Τρόποι δράσης των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων.

2.3 ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η στοχευμένη χημειοθεραπεία είναι είδος φαρμακευτικής θεραπείας στην οποία χρησιμοποιούνται φάρμακα σχεδιασμένα να «στοχεύουν» καρκινικά κύτταρα, χωρίς να επιδρούν στα φυσιολογικά κύτταρα.

Οι ερευνητές στο σχεδιασμό και στην ανάπτυξη των συγκεκριμένων φαρμάκων λαμβάνουν υπόψη τους, τις μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στα γονίδια και τις πρωτεΐνες των καρκινικών κυττάρων, έτσι ώστε η δράση αυτών να μπλοκάρει την αποστολή μηνυμάτων για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ή να αναγκάσουν τα καρκινικά κύτταρα να αυτοκαταστραφούν (57).

Η στοχευμένη χημειοθεραπεία ανιχνεύει και προσβάλλει συγκεκριμένες περιοχές ή ουσίες στα καρκινικά κύτταρα, ή μπορεί να ανιχνεύσει και να μπλοκάρει συγκεκριμένα είδη μηνυμάτων που στέλνονται εντός του καρκινικού κυττάρου και δίνουν την εντολή για ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό. Κάποιες από τις ουσίες εντός των καρκινικών κυττάρων που γίνονται «στόχοι» της στοχευμένης χημειοθεραπείας είναι:

- Μεγάλη ποσότητα μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης του καρκινικού κυττάρου
- Η ύπαρξη μιας πρωτεΐνης στο καρκινικό κύτταρο που δεν υπάρχει στο φυσιολογικό κύτταρο
- Μία πρωτεΐνη που έχει υποστεί μετάλλαξη με κάποιο τρόπο στο καρκινικό κύτταρο
- Μεταβολές γονιδίων του DNA που δεν υπάρχουν σε ένα φυσιολογικό κύτταρο
 Η δράση των στοχευμένων φαρμάκων χημειοθεραπείας μπορεί να είναι:
- Το μπλοκάρισμα ή "εξαφάνιση" των χημικών σημάτων που δίνουν εντολή στα
 καρκινικά κύτταρα να αναπτυχθούν και να διαιρεθούν

- Η αλλαγή της σύστασης των πρωτεϊνών εντός του καρκινικού κυττάρου με αποτέλεσμα το θάνατο του κυττάρου
- Σταματούν τη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων στα καρκινικά κύτταρα
- Ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού με σκοπό το θάνατο των καρκινικών κυττάρων
- Μεταφέρουν τοξίνες που προκαλούν το θάνατο των καρκινικών κυττάρων, αλλά όχι
 των φυσιολογικών κυττάρων

Η στοχευμένη χημειοθεραπεία μερικές φορές ονομάζεται και "προσωποποιημένη χημειοθεραπεία". Ο λόγος είναι ότι στοχεύει ακριβώς σε συγκεκριμένες αλλαγές ή ουσίες εντός των καρκινικών κυττάρων και αυτοί οι στόχοι μπορεί να είναι διαφορετικοί ακόμη και σε ασθενείς με τον ίδιο τύπο καρκίνου. Ορισμένοι τύποι καρκίνου διερευνώνται με βιοψία ή εγχείρηση, έτσι ώστε να εντοπιστούν οι "πιθανοί" στόχοι και η στοχευμένη χημειοθεραπεία να είναι περισσότερο "ακριβής" ή "προσωποποιημένη" για τον ασθενή.

Η στοχευμένη χημειοθεραπεία κατατάσσεται σε χημειοθεραπεία φαρμάκων μικρών μορίων (molecules) και φαρμάκων μεγάλων μορίων.

- Τα φάρμακα μικρών μορίων είναι τόσο μικρά έτσι ώστε να εισέλθουν στο καρκινικό κύτταρο μόλις το εντοπίσουν. Δρουν στοχοποιώντας μια συγκεκριμένη ουσία εντός του κυττάρου και την αδρανοποιούν.
- Τα φάρμακα μεγάλων μορίων λόγω του μεγέθους τους δεν εισέρχονται μέσα στο κύτταρο, δρουν όμως επιτιθέμενα με σκοπό την εξασθένηση ή την καταστροφή των πρωτεϊνών ή των ενζύμων που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου.

Τα φάρμακα αυτά συχνά περιγράφονται με τον όρο "κλειδαριά-κλειδί" γιατί το μόριο λειτουργεί ως το "κλειδί" που ανοίγει το ένζυμο ή την πρωτεΐνη στην επιφάνεια του κυττάρου ("κλειδαριά"), επιτρέποντας έτσι τη δράση του φαρμάκου.

2.4 ΕΙΔΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗΣ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Πολλά είδη καρκίνου μπορούν να αντιμετωπιστούν με στοχευμένες χημειοθεραπείες. Μερικά παραδείγματα στοχευμένης χημειοθεραπείας αναφέρονται παρακάτω:

 Αναστολείς αγγειογένεσης : Τα φάρμακα αυτά εμποδίζουν τη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων που τροφοδοτούν με θρεπτικές ουσίες τα καρκινικά κύτταρα.
 Παράδειγμα: το φάρμακο bevacizumab (58).



Εικόνα 1: Bevacizumab

 Αναστολείς πρωτεασώματος: Τα φάρμακα αυτά διακόπτουν τις λειτουργίες του φυσιολογικού κυττάρου και έτσι τα καρκινικά κύτταρα πεθαίνουν. Παράδειγμα: το φάρμακο bortezomib (πολλαπλό μυέλωμα).



Εικόνα 2: Bortezomib

 Αναστολείς μεταγωγής σημάτων: Τα φάρμακα αυτά διακόπτουν τα σήματα των κυττάρων και έτσι αλλάζουν οι λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων. Παράδειγμα: το φάρμακο imatinib (χρόνιες λευχαιμίες).



Εικόνα 3: Imatinib

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΩΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Η σχέση μεταξύ των μετάλλων και καρκίνου αποτελεί ορόσημο στην ιατρική και τη βιολογία. Από τη μία πλευρά τα μέταλλα έχουν ταυτοποιηθεί ως παράγοντες δημιουργίας καρκίνων αν και θεωρούνται ασθενείς μεταλλαξιογόνες ουσίες, όπως συμβαίνει για το νικέλιο, χρώμιο, αρσενικό, κάδμιο και βυρήλλιο. Από την άλλη, οι αντικαρκινικές ιδιότητες των μετάλλων έχουν περιγραφεί από τους Livingstone (Ni, Pd και Pt) (59), Williams (Ni και Pd) (60) και Rosenberg (Pt) (61). Η ανακάλυψη του Rosenberg [cis-διαμινοδιχλωρολευκόχρυσος ή cis-platin, cis-[PtCl₂(NH₃)₂], cis-DDP] είναι πιθανόν το πιο γνωστό παράδειγμα μικρομοριακού φαρμάκου που περιέχει μέταλλο και ένα από τα τρία πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φάρμακα στην Ογκολογία.

Αργότερα, αναπτύχθηκαν νέες ενώσεις με βάση τη δομή του cis-DDP με σκοπό τη μείωση της τοξικότητας και/ή την επέκταση του φάσματος αντικαρκινικής δράσης. Ειδικότερα, το 1989 εισήλθε σε κλινική χρήση το carboplatin με σκοπό τη μείωση των τοξικών παρενεργειών στους νεφρούς.



Εικόνα 4: Carboplatin

Μετά την κυκλοφορία του στην Ευρώπη το 1996, το oxaliplatin έλαβε τελικά έγκριση για χρήση στις ΗΠΑ το 2002 για τον καρκίνο του ορθού. Άλλα σύμπλοκα έλαβαν τοπικές εγκρίσεις στη Νότια Κορέα (heptaplatin), Κίνα (lobaplatin) και Ιαπωνία (nedaplatin).



Εικόνα 5: Heptaplatin



Εικόνα 6: Lobaplatin



Εικόνα 7: Nodaplatin

Η δράση του cisplatin αποδίδεται στην προσθήκη H₂O στους δεσμούς Pt-Cl. Τα κύρια προϊόντα της ενυδάτωσης του cisplatin είναι τα μονο- και δις-ενυδατωμένα cis-[Pt(NH₃)₂(H₂O)Cl]⁺ και cis-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺. Αν και οι ενυδατωμένες μορφές του cisplatin μπορούν να αλληλεπιδράσουν και με άλλα βιομόρια, η αντικαρκινική δράση
τους προέρχεται από την ικανότητά τους να σχηματίζουν σταυροειδείς συνδέσεις στο DNA, οι οποίες προκαλούν κάμψη του DNA. Η ένωση και τα ενυδατωμένα παράγωγά της σχηματίζουν ενώσεις προσθήκης μέσω δεσμών Pt-N με τα N(7) άτομα δύο γειτονικών νουκλεοτιδίων γουανοσίνης του ιδίου κλώνου του DNA, με απώλεια 2 ιόντων χλωρίου (62). Η προκαλούμενη από το cisplatin κάμψη του DNA θεωρείται ότι είναι η κρίσιμη βλάβη που οδηγεί στην απόπτωση του κυττάρου (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση των διασταυρούμενων συνδέσεων από την cis- platin

Οι σοβαρές παρενέργειες της θεραπείας με το cis-DDP, η εμφανιζόμενη κλινική ανθεκτικότητα μετά την αγωγή με το φάρμακο και η ανάγκη για επέκταση του φάσματος δράσης των αντικαρκινικών φαρμάκων δημιουργούν την ανάγκη για ανάπτυξη νέων φαρμάκων με αντικαρκινική δράση.

3.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

Η κατάταξη των συμπλόκων των μετάλλων σύμφωνα με τις αντικαρκινικές ιδιότητες που σχετίζονται με το μηχανισμό δράσης τους (**Mechanism of Action**, **MOA**) βρίσκεται σε αρχικό στάδιο, στηριζόμενη κυρίως σε εργαστηριακές ή υπολογιστικές μεθόδους (63).

Οι Huang και η ομάδα του (64), χρησιμοποίησαν ανάλυση ομαδοποίησης των στοιχείων της βάσης δεδομένων του NCI (National Cancer Institute) των ΗΠΑ για να κατατάξουν τα αντικαρκινικά σύμπλοκα μετάλλων. Οι ερευνητές απέδωσαν στα σύμπλοκα των μετάλλων τους ακόλουθους προτεινόμενους MOA : δημιουργία δεσμών με θειόλες, παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και ικανότητα παραγωγής λιπόφιλων ιόντων. Η τελευταία ιδιότητα συνδέεται ιδιαίτερα με τη συσσώρευση αυτών στα μιτοχόνδρια και τη δημιουργία δεσμών με τα νουκλεϊνικά οξέα (NA), ειδικά με θετικά φορτία, ένα κοινό χαρακτηριστικό των συμπλόκων των μετάλλων. Επίσης, ανέφεραν συσχετίσεις μεταξύ των μετάλλων και της έκφρασης των γονιδίων στα καρκινικά κύτταρα.

Σε μία πιο πρόσφατη ανασκόπηση ο Gianferrara και η ομάδα του(65), στηριζόμενοι στη βιβλιογραφία, κατέταξαν τους διαφορετικούς MOAs σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια: δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών, μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, είδος ligand (το μέταλλο είναι ο απλός μεταφορέας του βιοενεργού ligand), καταλυτική δυνατότητα και φωτοενεργά σύμπλοκα.

Βεβαίως ανασταλτικός παράγοντας για τη χρήση ορισμένων μετάλλων στην ιατρική είναι οι καρκινογόνες ιδιότητες που έχουν (Cr, Ni, Cd) που σε αρκετές περιπτώσεις είναι ισχυρότερες από τη θεραπευτική δράση τους.

Επίσης, σημαντική είναι η χημική δραστικότητα των μετάλλων. Ο αριθμός οξείδωσης των μετάλλων, που μπορεί να ποικίλει από +1 έως +8, κάνει δύσκολη τη δημιουργία αντικαρκινικών μετάλλων γιατί οι ισχυρά οξειδωτικές καταστάσεις αυτών παρεμβαίνουν στα οξειδοαναγωγικά βιολογικά συστήματα, δημιουργώντας προβλήματα στην ερμηνεία των βιολογικών αποτελεσμάτων. Επίσης, τα σύμπλοκα των μετάλλων θα πρέπει να παραμένουν σταθερά για εύλογο χρόνο, ειδικά στη φαρμακευτική μορφή τους όταν προορίζονται για κλινικές μελέτες.

Σημαντικό ρόλο στη χημική δραστικότητα των μετάλλων παίζει και η δράση τους ως οξέα. Είναι γνωστό ότι τα περισσότερα μεταλλικά ιόντα συμπεριφέρονται ως οξέα σε υδατικά διαλύματα και αυτό εξαρτάται από τη δραστικότητά τους με τα μόρια του νερού. Το στάδιο αυτό καλείται «ενυδάτωση» και παράγει πλήθος διαφορετικών ειδών:

 $MX_n + H_2O \rightarrow M(OH_2)_n^{n+} + nX^{-}$

 \rightarrow M(OH)₂ⁿ⁻ + nX⁺

όπου Χ⁻ : ιόντα αλογόνων, θειικά, νιτρικά, κ.α.

Ενώ το υδροξυλιωμένο ανιόν του μετάλλου [M(OH)₂ⁿ⁻] και η μορφή M⁻ O⁻ M είναι αδρανή και αδιάλυτα στο νερό, σε αρκετά μέταλλα τα ενυδατωμένα ιόντα τους M(OH₂)_nⁿ⁺ είναι πραγματικά δραστικά. Αυτά είναι συνήθως ισχυρά ηλεκτρονιόφιλα και έχουν την τάση να αντιδρούν με βιομόρια όπως τα νουκλεϊνικά οξέα ή με άλλες πυρηνόφιλες ομάδες, όπως είναι οι θειόλες.

Οι ΜΟΑ των μετάλλων και των συμπλόκων τους μπορούν να καταταγούν σε γενικές γραμμές λαμβάνοντας υπόψη τα μόρια ή τα μακρομόρια στόχους: Νουκλεϊνικά οξέα

(κυρίως το DNA αλλά και το RNA), αμινοξέα και πρωτεΐνες (κυρίως ένζυμα και κυτταροσκελετός, μιτοχόνδρια και τις πρωτεΐνες της μεμβράνης αυτών (Εικόνα 9).

Επίσης, είναι γενικά παραδεκτό ότι ως στόχοι μπορεί να είναι πολλά γενικά συστήματα ή ανεξάρτητα οργανίδια: ο κυτταρικός κύκλος ζωής και οι συνεισφέρουσες σε αυτόν (π.χ. κασπάσες, κυκλίνες, κινάσες πρωτεϊνών) εκφραστές γονιδίων, κυτταρική κατάσταση οξειδοαναγωγής, ο μεταβολισμός (ειδικότερα η μεταβολική μετατόπιση σε υψηλού ρυθμού γλυκόλυση στα καρκινικά κύτταρα) και οι μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου (απόπτωση, παράπτωση, νέκρωση).



Εικόνα 9: Περιληπτική αναφορά των κύριων στόχων των μετάλλων όταν οι ΜΟΑ περιγράφονται αναλυτικά ή σχετικά καλά. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα νουκλεϊνικά οξέα έχουν ταυτοποιηθεί πολύ νωρίς ως κύριοι στόχοι του Pt και μερικών άλλων μετάλλων. Αυτά τα συστατικά των κυττάρων θεωρούνται αντιδρώντα πρώτης επιλογής, επειδή έχουν φορτισμένες επιφάνειες, με ισχυρό αρνητικό φορτίο και τα σύμπλοκα των μετάλλων μπορούν να φέρουν θετικό φορτίο, ειδικά στις ενυδατωμένες μορφές τους.

Οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συμπλόκων των μετάλλων και του DNA μπορεί να είναι είτε μη ομοιοπολικές, είτε ομοιοπολικές (Εικόνα 10) (66).



Εικόνα 10: Διάφοροι τρόποι αλληλεπίδρασης μεταξύ μετάλλων και DNA.

Οι μη ομοιοπολικές αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις ταξινομούνται σε:

 Ηλεκτροστατικής φύσεως που συμβαίνουν μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου φωσφοδιεστερικού δεσμού και των θετικά φορτισμένων ιόντων μετάλλων των συμπλόκων.

- Δέσμευση στη μικρή ή τη μεγάλη αύλακα του DNA. Γίνεται μέσω δεσμών υδρογόνου και δυνάμεων Van der Waals με τα ετεροάτομα των νουκλεϊνικών βάσεων.
- 3. Παρεμβολή. Το υδρόφοβο περιβάλλον που δημιουργείται από τις νουκλεϊνικές βάσεις επιτρέπει την ένωση των μετάλλων με μη ομοιοπολικές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις όπως π→ π^{*} αλληλεπιδράσεις σώρευσης μεταξύ των βάσεων που παρέχονται από επίπεδα αρωματικά ligands.

Τα μέταλλα ενώνονται με τη γουανίνη και σε μικρότερη έκταση, με τις βάσεις αδενίνης μέσω του Ν7 ατόμου αζώτου του μορίου.

Ανάλογα το είδος του μετάλλου μονο- ή διλειτουργικά παράγωγα παράγονται, οδηγώντας σε δομικές μεταβολές του DNA (κάμψη). Η συνέπεια αυτών είναι γενικά η έναρξη των μηχανισμών θανάτου του κυττάρου (κυρίως η απόπτωση) μετά από αναγνώριση των κατεστραμμένων ζωνών του DNA από εξειδικευμένες πρωτεΐνες.

Η δεύτερη τάξη των MOAs περιλαμβάνει αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και συναρμογή με μόρια που περιέχουν θειόλες. Είναι γνωστό ότι το περιβάλλον του κυτοπλάσματος είναι ισχυρά αναγωγικό με το συνολικό δυναμικό να είναι μεταξύ -200 και -400mV. Τα μόρια που συνεισφέρουν τις ενώσεις που περιέχουν θειόλες, προέρχονται από την κυστεΐνη. Μεταξύ αυτών είναι η γλουταθειόνη (GSH), μεταλλοθειονίνες και άλλες θειοπρωτείνες που συνεισφέρουν στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου.

Τα μέταλλα μπορούν να παίξουν ένα διπλό ρόλο διαταράσσοντας αυτή την ισορροπία, γιατί τα περισσότερα εξ' αυτών είναι προοξειδωτικά. Ως τέτοια, τα μέταλλα

είναι ικανά να αυξήσουν το μέσο κανονικό δυναμικό του κυττάρου, παράγοντας έτσι ROS και οξειδώνοντας βιομόρια προκαλώντας την παραγωγή σημάτων που οδηγούν στη γήρανση και την απόπτωση του κυττάρου. Επειδή τα υπεροξείδια είναι παρόντα και εξουδετερώνονται από αντιοξειδωτικά μέσα στο ανθρώπινο σώμα, γίνονται περαιτέρω αντιδράσεις που οδηγούν σε σχηματισμό ριζών υδροξυλίου (HO[•]). Οι αντιδράσεις αυτές ονομάζονται αντιδράσεις Fenton συμμετέχουν δε και στη καρκινογένεση και στους MOA διάφορων συμπλόκων μετάλλων (π.χ. Fe^{II}, Cu^{II} ή Ni^{II}).

$$M^{n+} + H_2O_2 \rightarrow M^{n+1} + HO^- + HO^-$$

Η ρίζα ελεύθερου υδροξυλίου είναι από τις πιο δραστικές οξειδωτικές μορφές που υπάρχουν στα βιολογικά συστήματα και έχουν τη δυνατότητα να αντιδρούν με πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα και συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης, οδηγώντας τελικά το κύτταρο στο θάνατο. Συστατικά των μιτοχονδρίων και του DNA προσβάλλονται εύκολα από τη ρίζα υδροξυλίου και η συσσώρευση των οξειδωμένων βιομορίων δίνει το έναυσμα για την έναρξη μηχανισμών που σχετίζονται με την απόπτωση.

Ένας ακόμη σημαντικός στόχος των μετάλλων είναι τα μιτοχόνδρια. Τα οργανίδια αυτά συχνά ονομάζονται κυτταρικά εργοστάσια παραγωγής ενέργειας και φιλοξενούν ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στον κύκλο του Krebs και επίσης πρωτεΐνες που δρουν ως συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων οδηγώντας στην παραγωγή ΑΤΡ.

Στα καρκινικά κύτταρα τα μιτοχόνδρια έχουν υψηλότερο δυναμικό μιτοχονδριακής μεμβράνης σε σχέση με τα μιτοχόνδρια των φυσιολογικών κυττάρων καθιστώντας αυτά ευαίσθητα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Τα σύμπλοκα των μετάλλων προκαλούν ξαφνική αύξηση στη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Αυτή προκαλεί την

απώλεια του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού δυναμικού (ΜΜΡ, Δψ_m), τη διόγκωση του υποστρώματος, τη διαρρήξη της εξωτερικής μεμβράνης και την απελευθέρωση των προαποπτικών πρωτεϊνών που προκαλούν την έναρξη της αλληλουχίας σημάτων θανάτωσης που οδηγούν στη συμπύκνωση της χρωματίνης και στο θρυμματισμό του DNA (Εικόνα 12) (67).

Επίσης, η ιδιότητα των λιπόφιλων κατιόντων τριφαινυλοφωσφίνης (TPP) να διαπερνούν την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και να συσσωρεύονται εντός του μιτοχονδρίου οδήγησε τους ερευνητές στη σύνθεση συμπλόκων μετάλλων με συναρμοσμένα κατιόντα TPP, διευκολύνοντας έτσι τη δράση του συμπλόκου ως αντικαρκινικό φάρμακο (Εικόνα 11) (68).



Εικόνα 11: Τριφαίνυλοφωσφίνη (TPP).



Εικόνα 12: Απελευθέρωση φαρμάκου Χ από ένωση που αποτελείται από την TPP και το φάρμακο Χ και εισέρχεται μέσα στο μιτοχόνδριο μέσω της μιτοχονδριακής μεμβράνης.

3.2 ΧΗΜΕΙΑ ΤΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ

3.2.1 Γενικά στοιχεία

Ο άργυρος (Ag) είναι από τα πρώτα μέταλλα που χρησιμοποίησε ο άνθρωπος και ήταν ήδη γνωστός από την προϊστορική εποχή στους λαούς που κατοικούσαν στη Μεσοποταμία, στην Ελλάδα, στη Μέση Ανατολή και στην Αίγυπτο. Ο Ιπποκράτης (Κως, 460-370 π.Χ.) αναγνώρισε τις θεραπευτικές ιδιότητες του αργύρου (69).

2000 χρόνια αργότερα ο χειρούργος Ambroise Pare (1517-1590) για να εκμεταλλευτεί τον αντισηπτικό χαρακτήρα του αργύρου, τον χρησιμοποίησε σε εγχείρηση επανόρθωσης προσώπου. Ο νιτρικός άργυρος (AgNO₃) χρησιμοποιείται ήδη από τον 19° αιώνα ως αντιβιοτικό και χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα για τη θεραπεία τραυμάτων και εγκαυμάτων (70).

3.2.2 Αντιμικροβιακές ιδιότητες και μηχανισμός δράσης

Στην αρχή του 20^{ου} αιώνα ο κολλοειδής άργυρος χρησιμοποιήθηκε ως μικροβιοκτόνο και απολυμαντικό γιατί δεν εμφάνιζε τις ερεθιστικές παρενέργειες του AgNO₃. Κατόπιν, η σουλφαδιαζίνη του αργύρου (Εικόνα 13) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των μολύνσεων σε τραύματα (71).



Εικόνα 13: Σουλφαδιαζίνη του Αργύρου

Επίσης, ο άργυρος εμφάνισε αποτελεσματική αντιμικροβιακή δράση σε ευρύ φάσμα gram-θετικών και gram-αρνητικών στελεχών βακτηρίων, αν και το ιόν αργύρου (Ι) είναι πιθανώς υπεύθυνο για την αντιβιοτική δράση του αργύρου. Η αντιμικροβιακή δράση του ιόντος αργύρου οφείλεται στη διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης, στην αλληλεπίδραση με το DNA και στη συναρμογή του ιόντος αργύρου με ομάδες θειολών (κυστείνη, μεθειονίνη) των ενζύμων οδηγώντας σε διακοπή των αναπνευστικών διαδικασιών και την παρεμπόδιση της αντιγραφής RNA και του DNA (Σχήμα 5) (73).



Σχήμα 5: Η επίδραση του ιόντος Ag στο κύτταρο του βακτηρίου.

3.2.3 Αντικαρκινικές ιδιότητες συμπλόκων αργύρου

Η χρήση του cisplatin στη θεραπεία του καρκίνου αύξησε το ενδιαφέρον για την ανακάλυψη ανόργανων φαρμάκων με πιθανή αντικαρκινική δράση (73). Μεταξύ αυτών, τα σύμπλοκα αργύρου είναι μάλλον λίγα, συγκρινόμενα με τα άλλα μεταλλοφάρμακα (π.χ. σύμπλοκα χρυσού). Παρ' όλα αυτά, πολλές μελέτες έχουν εστιάσει στην ανάπτυξη νέων συμπλόκων αργύρου με αντικαρκινικές ιδιότητες. Τα σύμπλοκα του αργύρου, έχοντας ως δότες άτομα αζώτου, φωσφόρου, θείου και οξυγόνου, παρουσιάζουν δραστικότητα σε μεγάλο αριθμό καρκινικών σειρών. Η πλειοψηφία των ligands σε αυτά τα σύμπλοκα αργύρου αποτελείται από παράγωγα των Ν-ετεροκυκλικών καρβενίων (NHC) ή των φωσφινών.

3.2.4 Σύμπλοκα αργύρου με ligands καρβοξυλικά οξέα.

Μικτά σύμπλοκα του αργύρου (Ι) με ligands του τύπου {[Ag(tpp)₃ - (asp)](dmf)} (5a) (aspH=o-ακέτυλοσαλυκιλικό οξύ και tpp=τριφαινυλοφωσφίνη) και [Ag(tpp)₂(o-Hbza)] (5b) (o-HbzaH=o-υδροξυβενζοϊκό οξύ) παρασκευάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν με στοιχειακή ανάλυση, φασματοσκοπικές τεχνικές και κρυσταλλογραφία ακτίνων X (74).



Εικόνα 14: Σύμπλοκα {[Ag(tpp)3(asp)](dmf)} (5a), [Ag(tpp)2(o-Hbza)] (5b) και [Ag(tpp)2(p-Hbza)] (6).

Τα σύμπλοκα 5a και 5b καθώς και το άλας του AgNO₃ εξετάσθηκαν για την *in vitro* κυτταροτοξική δράση τους σε κύτταρα λειομυοσαρκώματος (LMS), αδενοκαρκινώματος ανθρώπινου μαστού (MCF-7) και σε φυσιολογικά ανθρώπινα εμβρυακά κύτταρα ινοβλαστών πνεύμονα (MRC-5). Για τις καρκινικές κυτταρικές σειρές LMS και MCF-7 οι ενώσεις 5a και 5b βρέθηκαν να είναι πιο δραστικές από το cisplatin. Επιπρόσθετα, τα σύμπλοκα 5a και 5b επέδειξαν χαμηλότερη δραστικότητα στον πολλαπλασιασμό των

κυττάρων MRC-5 έναντι των κυττάρων του σαρκώματος. Το άλας του AgNO₃ είναι λιγότερο δραστικό από τα σύμπλοκα 5a και 5b έναντι των κυττάρων LMS και MRC-5.

Ο θάνατος των κυττάρων LMS λόγω απόπτωσης επιβεβαιώθηκε μέσω μετρήσεων με την κυτταρομετρία ροής. Αφού η αναστολή δράσης της λιποξυγενάσης (LOX) προκαλεί απόπτωση των κυττάρων, μελετήθηκε η επίδραση των συμπλόκων 5a και 5b στην καταλυτική υπεροξείδωση του λινολεϊκού οξέος σε υδροπεροξυ-λινολεϊκό οξύ από τη δράση της LOX. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα σύμπλοκα 5a και 5b αναστέλλουν ισχυρότερα την LOX από το cisplatin.

Το σύμπλοκο του αργύρου (Ι) με τα ligands [Ag(tpp)₂(p-Hbza)] (6) παρασκευάστηκε και χαρακτηρίστηκε με στοιχειακή ανάλυση, σ.τ., φασματοσκοπία (mid- και far FT-IR), ¹H-NMR, Υπεριώδες-Ορατό (UV-Vis), ESI-MS και κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ (75).

Το σύμπλοκο 6 εμφάνισε τετραεδρική γεωμετρία και μελετήθηκε η κυτταροτοξική δράση του *in vitro* έναντι των κυττάρων LMS και MCF-7. Το σύμπλοκο 6 εμφανίζει σημαντικά υψηλότερη κυτταροτοξική δράση από το cisplatin, έναντι των κυττάρων LMS και MCF-7. Λόγω της μορφολογίας των κυττάρων LMS μετά από επώαση με τα σύμπλοκα 6, 5a και 5b η απόπτωση των κυττάρων είναι αυτονόητη. Η κυτταρομετρία ροής και η θραυσματοποίηση του DNA δείχνουν ότι τα κύτταρα LMS υφίστανται προγραμματισμένο θάνατο. Τα πειράματα σύνδεσης με το DNA δείχνουν την ικανότητα των συμπλόκων 6, 5a και 5b να τροποποιούν τη δραστικότητα των κυττάρων και με αυτόν τον τρόπο μπορεί να εξηγηθεί πως πεθαίνουν τα κύτταρα LMS.

Οι τιμές των σταθερών σύνδεσης DNA-συμπλόκου, k_b, των συμπλόκων 6, 5a και 5b με το DNA θύμου αδένα μόσχου (CT-DNA) [(27.7 ± 7.9) x 10⁴ (6), (13.3 ± 6.5) x 10⁴ (5b)

και (11.0 ± 2.8) x 10⁴ (5a) M⁻¹] δείχνουν ότι υπάρχουν ισχυρές αλληλεπιδράσεις. Η τιμή της σταθεράς k_b του cisplatin (k_b=5.73 ± 0.45 x 10⁻³ M⁻¹) είναι μικρότερη 2 έως 5 φορές από τις αντίστοιχες τιμές της k_b των συμπλόκων.

Η υψηλότερη τιμή k_b που βρέθηκε για το σύμπλοκο 6 σε αντίθεση με τις αντίστοιχες τιμές του 5b (2 φορές) ή 5a (3 φορές), πιθανώς να οφείλεται στην ικανότητα της υδροξυλο-ομάδας του ligand p-HbzaH να συμμετέχει σε διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου με τις βάσεις του DNA, που σταθεροποιούν επιπλέον τη σύνδεση συμπλόκου-DNA. Θεωρητικές μελέτες, έδειξαν ότι τα σύμπλοκα 6 και 5b αλληλεπιδρούν με την πλούσια αλληλουχία σε βάσεις GC μικρή αύλακα του CT-DNA, ενώ το σύμπλοκο 5a αλληλεπιδρά με τη μεγάλη αύλακα του DNA.

3.2.5 Σύμπλοκα αργύρου (I) με ligands δότες άτομα αζώτου, δότες αζώτουοξυγόνου, δότες άτομα αζώτου-θείου και δότες θείου.

Το σύμπλοκο με τύπο [Ag(phendione)₂]ClO₄ (11) (phendione=1,10 φαινανθρολίνο-5,6-διόνη) παρασκευάστηκε και χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπικές τεχνικές (IR, ¹H-NMR) και στοιχειακή ανάλυση (76).



Εικόνα 15: Σύμπλοκο [Ag(phendion)2]ClO4 (11)

Η κρυσταλλική δομή (ακτίνες Χ) του συμπλόκου έδειξε την ύπαρξη ψευδο-τετραεδρικής δομής γύρω από το ιόν του μετάλλου. Το σύμπλοκο 11 εξετάσθηκε ως προς τη δραστικότητά του σε νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές : A-498, Hep-G2, του καρκίνου των πνευμόνων (DLKP) και σε μη νεοπλασματικές σειρές : CHANG και HK-2. Το σύμπλοκο 11 έδειξε τη μεγαλύτερη δραστικότητα στα κύτταρα CHANG και DLKP, η οποία ενδεχομένως είναι μικρότερη από τη δραστικότητα του ελεύθερου ligand. Το σύμπλοκο 11 δεν εμφάνισε κυτταρο-εκλεκτικότητα, καθώς μειώθηκε η βιωσιμότητα και των νεοπλασματικών και των φυσιολογικών κυττάρων (77). Ωστόσο, οι μελέτες σύνδεσης με το DNA έδειξαν ότι το ligand και το σύμπλοκο 11 αναστέλλουν τη σύνθεση του DNA με τη δράση μηχανισμού χωρίς την εμφάνιση παρεμβολής στην έλικα του DNA.

Τα σύμπλοκα [Ag₆(μ₂-Br)₆(μ₂-StpmH₂)₂]_n (19a) και [{Ag₄(μ₂-StpmH₂)₆}(NO₃)₄]_n (19b) παρασκευάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν με στοιχειακή ανάλυση FT-IR, far-IR, UV-Vis, ¹Η & ¹³C-NMR και κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ (78).



 $[{Ag_4(i_2-StpmH_2)_6}(NO_3)_4]_n$

 $[Ag_{6}(i_{2}-Br)_{6}(i_{2}-StpmH_{2})_{4}(i_{3}-StpmH_{2})_{2}]_{n}$

Εικόνα 16: Σύμπλοκα $[Ag_6(\mu_2-Br)_6(\mu_2-StpmH_2)_4(\mu_3-StpmH_2)_2]_n$ (19a) και $[{Ag_4(\mu_2-StpmH_2)_6}(NO_3)_4]_n$ (19b).

Τα σύμπλοκα 19a και 19b εξετάσθηκαν για την κυτταροτοξική δράση τους στα κύτταρα τρωκτικών με λευχαιμία (L1210) και ανθρώπινα Τ-λεμφοκύτταρα (Molt4/C8 και CEM). Και τα δύο σύμπλοκα επέδειξαν εκλεκτική δράση στην κυτταρική σειρά L1210. Οι τιμές IC₅₀ είναι 3.4±0.1 (19α) και 3.5±0.1 (19b) μg mL⁻¹.Τα σύμπλοκα 19 α-b είναι λιγότερο δραστικά απέναντι στην κυτταρική σειρά CEM (τιμές IC₅₀ : 14±3 για το 19 α και 17±0 για το 19 b, μg mL⁻¹ αντίστοιχα). Τελικά το ligand StpmH₂ δεν εμφάνισε αντικαρκινική δράση, η σύνθεση του υδατοδιαλυτού συμπλόκου [Ag(bpy)(Hdahmp)]NO₃ (20) (Hdahmp= 4,6-διάμινο-5-ύδροξυ-2-μέρκαπτοπυριμιδίνη) δημοσιεύτηκε και το σύμπλοκο χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπικές τεχνικές (I.R.,¹H-NMR, φασματοσκοπία μαζών), αγωγιμότητα και θερμικές μετρήσεις. Το σύμπλοκο (20) εξετάστηκε *in vivo* για την αντικαρκινική δράση του στα καρκινικά κύτταρα ποντικιών *Ehrlich ascites* (EACs) . Η in vivo αντικαρκινική δράση του συμπλόκου έδειξε μείωση του μεγέθους του όγκου. Εξάλλου το σύμπλοκο [Ag(bpy)(Hdahmp)]⁺ προκάλεσε παρενέργειες στα τρωκτικά που χρησιμοποιήθηκε, όπως αλωπεκίαση.



Εικόνα 17: Σύμπλοκο [Ag(bpy)(Hdahmp)]NO₃ (20).

3.2.6 Σύμπλοκα αργύρου (Ι) με ligands δότες άτομα φωσφόρου.

Το χλωριούχο σύμπλοκο του αργύρου (Ι) με τύπο {[AgCI(CNBZT) (TPTP)2] * (MeOH) }

(27a) (CMBZT=5-χλώρο-2-μέρκαπτο-βενζοθειαζόλιο) παρασκευάστηκε και χαρακτηρίστηκε (79).



Εικόνα 18: Σύμπλοκα 27α-е.

Τα σύμπλοκα 27a-d εξετάστηκαν για την αντικαρκινική δράση τους στα κύτταρα LMS και MRC-5. Η αντικαρκινική δράση του υδατοδιαλυτού συμπλόκου αργύρου (Ι) {[(Et₃NH)⁺]₂·[Ag₆(μ₃-Hmna)₄ (μ₃-mna)₂]²· (DMSO)₂· H₂O]} (27e) (Hmna= 2-μερκαπτονικοτινικό οξύ) μελετήθηκε (80). Το σύμπλοκο 27b εμφάνισε την ισχυρότερη δράση και αυτό μπορεί να οφείλεται στην παρουσία του ιόντος χλωρίου, το οποίο επηρεάζει τη δραστικότητα. Τα σύμπλοκα 27b και 27c είναι περισσότερο δραστικά απο το cisplatin στα κύτταρα LMS. Τα σύμπλοκα 27a-e δεν έδειξαν δραστικότητα στην κυτταρική σειρά MRC-5. Τα κύτταρα LMS που επωάστηκαν με το σύμπλοκο 27a οδηγήθηκαν στη διαδικασία της απόπτωσης.

3.3 ΟΞΑΔΙΑΖΟΛΙΑ

Οι ετεροκυκλικές ενώσεις έχουν ερευνηθεί συστηματικά στην πάροδο του χρόνου και συνεχίζουν να έλκουν ιδιαίτερη προσοχή λόγω της μεγάλης συνεισφοράς τους στην ανάπτυξη της Φαρμακευτικής Χημείας και της βιομηχανικής ανάπτυξης.

Οι ετεροκυκλικές ενώσεις χρησιμοποιούνται στην Φαρμακευτική Χημεία καθώς βρίσκονται συνήθως σε μεγάλες ποσότητες σε βιομόρια όπως οι βιταμίνες, τα ένζυμα, φυσικά προϊόντα και βιολογικά ενεργές ουσίες που χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων όπως η ελονοσία, ο σπασμός, οι φλεγμονές, το ΗΙV και ακόμη στην αντιμετώπιση παρασίτων και εντόμων που μολύνουν τα τρόφιμα.

Ειδικά οι ετεροκυκλικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο έχουν παίξει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της συνθετικής Χημείας και στο σχεδιασμό συνθετικών φαρμάκων.

3.3.1 ΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΟΞΑΔΙΑΖΟΛΙΩΝ

Τα Οξαδιαζόλια είναι μία κατηγορία αρωματικών ετεροκυκλικών ενώσεων με μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον, που οφείλεται στη χρήση των παράγωγων ενώσεων του οξαδιαζολίου στη σύνθεση φαρμάκων καθώς και σε άλλες μη φαρμακευτικές εφαρμογές (81).

Τα οξαδιαζόλια είναι μια σημαντική κατηγορία ετεροκυκλικών αρωματικών ενώσεων με ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων όπως αντιβακτηριακή (82), αντιμυκοβακτηριακή (83), αντιμυκητιακή (84), αντι-ΗΙV (85), αντιφλεγμονώδη και αναλγητική (86,87,88), υπογλυκαιμική (89), αντισπασμωδική (90), αντικαρκινικές ιδιότητες (91,92), γονιδιοτοξική (93) και ιδιότητες αναστολής της δράσης της υπεροξειδάσης λιπιδίων (94).

Τα οξαδιαζόλια περιέχουν 2 άτομα αζώτου και ένα άτομο οξυγόνου σε ένα πενταμελή δακτύλιο και βρίσκονται σε τέσσερεις διαφορετικές ισομερείς δομές (Εικόνα 19):



1,2,5-Οξαδιαζόλιο 1,3,4-Οξαδιαζόλιο 1,2,4-Οξαδιαζόλιο 1,2,3-Οξαδιαζόλιο και το ταυτομερές του

Εικόνα 19: Ισομερείς μορφές των οξαδιαζολίων

Το 1,3,4-Οξαδιαζόλιο συχνά χρησιμοποιείται ως ενδιάμεση ένωση για τη σύνθεση νέων μορίων που εμφανίζουν φαρμακευτική ή βιολογική δράση και έχουν ερευνηθεί διεξοδικά λόγω του καλού μεταβολικού προφίλ τους και της ικανότητας τους να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τις ενώσεις δέκτες.

Τα 1,3,4-Οξαδιαζόλια είναι εξαιρετικά καλοί βιοισοεστέρες των εστέρων και των αμιδίων και η παρουσία της ομάδας του αζολίου (-N=C-O) αυξάνει την λιποφιλία , η οποία διευκολύνει την μεταφορά του 1,3,4-Οξαδιαζολίου μέσω των μεμβρανών του κυττάρου για να πλησιάσει την θέση–στόχο και να παρουσιάσει διάφορες βιολογικές δράσεις (96). Εκτός των προαναφερόμενων δράσεων, τα οξαδιαζόλια έχουν επίσης παρουσιάσει εξαιρετικές αντικαρκινικές δράσεις σε ποικίλα *in vitro* και *in vivo* πειραματικά μοντέλα (96).

Ο μηχανισμός δράσης των οξαδιαζολίων που συνεισφέρει στην καταστολή του καρκίνου μπορεί να είναι:

α. Η δράση αναστολής των ενζύμων μονοαμινικής οξειδάσης και της κινάσης της τυροσίνης,

β. Η αναστολή της συνθετάσης κινάσης γλυκογόνου 3 (GSK-3), η οποία ρυθμίζει ταυτόχρονα την διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου,

γ. Η αναστολή της δράσης διαφόρων παραγόντων ανάπτυξης και ενζύμων όπως η τελομεράση,

δ. Η αναστολή των διεργασιών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του καρκίνου, π.χ. της αγγειογένεσης.

Ορισμένα παράγωγα των οξαδιαζολίων, τα οποία μπορούν να αναστείλουν την αγγειογένεση είναι ανταγωνιστές του δέκτη ιντεγκρίνης ανβ3, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια αρκετών καρκινικών κυττάρων και συνεισφέρει στην αναγνώριση της αλληλουχίας αργινίνης-γλυκίνης-ασπαρτικού οξέος (97).

Για παράδειγμα, τα παράγωγα του 2,3-διύδρο-2-θείονο-1,3,4-οξαδιαζολίου έχοντας τον πυρήνα του θείονο-οξαδιαζολίου ενωμένο με βενζολικό δακτύλιο, παρουσιάζουν 73,9% αναστολή του όγκου σύμφωνα με το σχήμα EAC (animal model) (98).



Εικόνα 20: 5-(4-(τριτ-βούτυλο)φαινυλο)-3-(4-τολυλαμινο)μεθυλο-2(3Η)-θειόνο -1,3,4οξαδιαζόλιο.

Άλλο παράγωγο του 1,3,4-οξαδιαζολίου επέδειξε ισχυρή αντικαρκινική δράση σε 4 καλλιέργειες κυττάρων HepG2 (12.4 μg/ml), WI-38 (17.3 μg/ml),VERO (15.8 μg/ml) και MCF-7 (25.8 μg/ml) (99).



Εικόνα 21: 5-(4-(τριτ-βουτυλο)φαίνυλο)-3-(((3,4-διμέθυλο)άμινο)μέθυλο)- 2(3Η)-

θειόνο-1,3,4-οξαδιαζόλιο.

Παράγωγα του 3,5-διυποκατεστημένου θείονο-1,3,4-οξαδιαζόλιου βρέθηκαν να είναι περισσότερο δραστικά από την 5-φθοροουρακίλη σύμφωνα με το πρωτόκολλο EAC (bearing mice)(98).

3.3.2 ΣΥΜΠΛΟΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΤΩΝ 2-ΘΕΙΟΝΟ-1,3,4-ΟΞΑΔΙΑΖΟΛΙΩΝ

Ο Du και οι συνεργάτες του συνέθεσαν σύμπλοκες ενώσεις διαφόρων μετάλλων με υποκατεστημένα 1,3,4-οξαδιαζόλια με σκοπό την σύνθεση πολυδιάστατων δομών με πιθανό ενδιαφέρον για την παραγωγή νέων υλικών (100).



Εικόνα 22: Σύμπλοκο του Cu(II) με το 2,5-δι(4-πυρίδυλ)-1,3,4-οξαδιαζόλιο.

To 2012 ο Terenzi και οι συνεργάτες του συνέθεσαν σύμπλοκες ενώσεις του Cu (II) και του Zn (II) με υποκαταστάτη το 1,3,4-οξαδιαζόλιο και τις εξέτασαν για την κυτοτοξική δράση τους σε σχέση με καρκινικά κύτταρα ανθρωπίνου μαστού και την αλληλεπίδρασή τους με το CT-DNA σε διάλυμα (101).



M= Cu(II), X= CIO₄ **17a** CIO₄⁻ M= Zn(II), X= Br **17b** Br⁻

Εικόνα 23: Σύμπλοκα των Cu(II),Zn(II) με ligands το 1,3,4-οξαδιαζόλιο.

Το 2014 η Chaves και οι συνεργάτες της συνέθεσαν σύμπλοκες ενώσεις του Au (Ι) με υποκαταστάτη το 5-φαινυλο-2-θείονο-1,3,4-οξαδιαζόλιο και φωσφίνες και εξετάστηκε η αντικαρκινική δράση τους σε δύο διαφορετικά είδη κυττάρων καρκίνου: τον καρκίνο του εντέρου (CT26WT) και το μεταστατικό μελάνωμα του δέρματος (B16F10), (102).



Εικόνα 24: Σύμπλοκο του Au(I) με φωσφίνες και 5-φαίνυλο-2-θείονο-1,3,4οξαδιαζόλιο.

Το 2018 η Chaves και οι συνεργάτες της συνέθεσαν σύμπλοκες ενώσεις του Au (Ι) με υποκαταστάτες το 5-(4-X-φαίνυλο)-2-θείονο-1,3,4-οξαδιαζόλιο ,(X=H,CI, F, NO₂, OCH₃)

και φωσφίνες και μελετήθηκε η αντιλεϊσμανιανική και η αντικαρκινική δράση τους στον καρκίνο του εντέρου (CT26WT) και το μεταστατικό μελάνωμα του δέρματος (B16F10). Από την σύγκριση των τιμών IC₅₀ προκύπτει ότι τα σύμπλοκα με X=Cl και X=F επέδειξαν καλύτερη αντικαρκινική δράση (103).



Εικόνα 25:Σύμπλοκα του Au(I) με φωσφίνες και υποκατεστημένο (X=H,CI,F,NO₂,OCH₃) 5-(4-X-φαίνυλο)-2-θείονο-1,3,4-οξαδιαζόλιο.

Ο Zhao και οι συνεργάτες του συνέθεσαν σύμπλοκες ενώσεις του Au (Ι) με υποκαταστάτες το 5-φαίνυλο-2-θείονο-1,3,4-οξαδιαζόλιο και την τριφαίνυλοφωσφίνη που εμφάνισαν πολλές δυνατότητες σαν πολυλειτουργικά υλικά για να χρησιμοποιηθούν στις OLEDs (Organic Light Emitting Diodes) ως επιστρώματα μεταφοράς ηλεκτρονίων (104) Ο S.A.O. Ahmed συνέθεσε και μελέτησε σύμπλοκες ενώσεις του Hg (I) με υποκαταστάτες το 5-φαίνυλο-2-θείονο-1,3,4-οξαδιαζόλιο και διφαίνυλο- και τριφαίνυλοφωσφίνες. Τα σύμπλοκα που σχηματίστηκαν εμφάνισαν τετραεδρική δομή (105).



Εικόνα 26: Σύμπλοκο του Hg(I) με τριφαίνυλοφωσφίνη και 5-φαίνυλο-3-θείονο-1,3,4οξαδιαζόλιο.

Ο S.A. Καzi συνέθεσε και μελέτησε σύμπλοκες ενώσεις διαφόρων μετάλλων [Fe(II),Hg (I), Zn (II), Sn (II), Ag (I), Cu(II)] με το 5-υποκατεστημένο-2-θείονο-1,3,4-οξαδιαζόλιο ως προς την αντιμικροβιακή δράση τους ως προς την Escherihia coli και Salmonella paratyphi A με την τεχνική διασποράς δίσκου (106,107).



Εικόνα 27: Σύμπλοκα των Fe(III),Hg(II),Sn(II),Zn(II) με το 5-(2-μέθυλο-5-νίτροιμιδαζόλο)-2-θείονο-1,3,4-οξαδιαζόλιο.



Εικόνα 28: Σύμπλοκο του Ag(I) με το 5-(2-μέθυλο-5-νίτρο-ιμιδαζόλο)-2-θείονο-1,3,4οξαδιαζόλιο.

Τέλος η Pirimova και οι συνεργάτες της συνέθεσαν και μελέτησαν σύμπλοκες ενώσεις των μετάλλων Co (II), Ni(II),Cu(II) & Mn(II) με το 5-φαίνυλο-2(3H)-θείονο-1,3,4οξαδιαζόλιο και το βαναδικό αμμώνιο οι οποίες εμφάνισαν τετραεδρική δομή (108).



ere, Me = Co2+, Ni2+, Cu2+, Mn2+

Εικόνα 29: Σύμπλοκα των Co(II),Ni(II),Cu(II),Mn(II) με το βαναδικό αμμώνιο και το 5φαίνυλο-2(3H)-θείονο-1,3,4-οξαδιαζόλιο.

Β. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η σύνθεση και μελέτη νέων μεταλλικών συμπλόκων και συγκεκριμένα των υποκατεστημένων θειονο-1,3,4οξαδιαζολίων με ιόντα Ag και της τριφαινυλοφωσφίνης (tpp) για τη στοχευμένη χημειοθεραπεία του καρκίνου του μαστού.

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο διαδεδομένος στις γυναίκες με μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας. Η χρήση γνωστών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων όπως το cisplatin και τα υπόλοιπα φάρμακα του λευκοχρύσου, εμφάνισε σοβαρές παρενέργειες, με αποτέλεσμα την προσπάθεια ανάπτυξης νέων αντικαρκινικών μεταλλο-φαρμάκων που στοχεύουν εκλεκτικά σε βασικά οργανίδια των καρκινικών κυττάρων, όπως το DNA και το μιτοχόνδριο, με σκοπό να επιτύχουν την ενεργοποίηση του μηχανισμού απόπτωσης του κυττάρου.

Οι ενώσεις του Αργύρου εμφανίζουν ισχυρή αντικαρκινική δράση έναντι του καρκίνου του μαστού, καθώς δρουν στους οιστρογονικούς υποδοχείς (ERs) (173,174,175).

Επίσης οι φωσφίνες εμφανίζουν μιτοχονδριοτροπικές ιδιότητες. Εξάλλου η λιποφιλία των ενώσεων αυτών συμβάλλει στην ασφαλή μεταφορά των εξεταζόμενων ενώσεων στο εσωτερικό των κυττάρων.

Επιπροσθέτως, τα υποκατεστημένα θειονο-1,3,4-οξαδιαζόλια εμφανίζουν ισχυρή αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση (176,81,177,178). Η σύζευξη των θειονο-1,3,4-

οξαδιαζολίων με τα ιόντα αργύρου και το μόριο της τριφαινυλοφωσφίνης σε μία ενιαία οντότητα μπορεί να οδηγήσει σε νέα αντικαρκινική δράση με συνεργιστικό αποτέλεσμα.

Οι νέες ενώσεις χαρακτηρίστηκαν με τη χρήση διαφόρων μεθόδων (σημείο τήξης, φασματοσκοπία FT-IR, φασματοσκοπία UV-Vis, φασματοσκοπία 1H-NMR, κρυοσκοπία, ιξωδομετρία, κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ).

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η εκλεκτική αντικαρκινική δράση τους σε καρκινικά κύτταρα μαστού απουσία οιστρογονικών υποδοχέων (MDA-MB-231) και παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων (MCF-7). Η τοξικότητα των νέων ενώσεων που συντέθηκαν, μελετήθηκε *in vitro* έναντι μιας κυτταρικής σειράς φυσιολογικών κυττάρων (MRC-5, φυσιολογικοί ινοβλάστες πνεύμονα), ενώ η γονοτοξικότητα ελέγχθηκε *in vitro* με μελέτη του πειράματος των μικροπυρηνίσκων. Η ικανότητα των νέων ενώσεων να προκαλούν κυτταρικό θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης εξετάστηκε *in vitro* μελετώντας την κυτταρική μορφολογία, τον κατακερματισμό του πυρηνικού DNA και τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Χημικά Αντιδραστήρια

Όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν χημικώς καθαρά. Ο AgNO₃, το NaOH, το KOH και η TPP αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich, τα βενζυδραζίδια (ArCONHNH₂) από την Sigma-Aldrich και την Fisher Scientific, ο CS₂ από την Panreac, ενώ το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) από τη Riedel-de Haen. Επίσης το CT-DNA και το βρωμιούχο αιθίδιο (EB) αγοράστηκαν από τη Sigma-Aldrich, καθώς και οι κυτταρικές σειρές MDA-MB-231, MCF-7 και MRC-5 από το American Type Culture Collection και από το Imperial Cancer Research Fund.

Για τις βιολογικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω θρεπτικά υλικά και αντιδραστήρια:

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 εταιρεία 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 Triton X-100, η αγαρόζη (agarose), το EDTA και τα ένζυμα RNase A και Proteinase K, αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich. Η χρωστική sulforodamine B sodium salt (SRB) είναι της εταιρείας Alfa Aesar.

4.2 Σύνθεση 5-υποκατεστημένων-2-θειονο-1,3,4-οξαδιαζολίων (ligands) (X=H, o-Cl, m-Cl, o-F, p-F)

Τα ligands παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη μεθοδολογία που αναφέρεται από τους J. Sandstrom και I. Wennerbeck (109).

Σε διάλυμα KOH (50 mmoles) σε απόλυτη EtOH (200 ml), προστίθεται ποσότητα 50 mmoles του αντίστοιχου βενζυδραζιδίου ArCONHNH₂ (1) υπό συνεχή ανάδευση. Έπειτα από μερικά λεπτά προστίθεται διθειάνθρακας (CS₂), σε ελαφριά περίσσεια (70 mmoles) και το μίγμα αποστάζει για 2-3 ώρες, μέχρις ότου απομακρυνθεί η μεγαλύτερη ποσότητα του παραγόμενου υδρόθειου (H₂S). Η εξάτμιση των διαλυτών μετά από απόσταξη υπό κενό αφήνει ένα στερεό υπόλειμμα, το οποίο αφού διαλυτοποιήθηκε με νερό, ψύχθηκε με πάγο και οξινίστηκε με υδροχλωρικό οξύ (HCl), έδωσε στερεό 5-φαίνυλο-2-θειονο-1,3,4-οξαδιαζόλιο (2). Το προϊόν διηθήθηκε, ξηράνθηκε και επανακρυσταλλώθηκε από μίγμα αιθανόλης-νερού (50/50).



Σχήμα 6: Αντίδραση σύνθεσης X-PODT.

X-PODT	Απόδοση,%	Σημείο τήξης,	Χρώμα	M.T.	Μοριακό
		°C			βάρος. g/mol
2a	83	218-220	Λευκό	C ₈ H ₆ N ₂ OS	178
2b	40	143-145	Λευκό	C ₈ H ₅ N ₂ OSF	196
2c	75	172-174	Κίτρινο	C ₈ H ₅ N ₂ OSF	196
2d	35	168-170	Λευκό	C ₈ H ₅ N ₂ OSCI	212,5
2e	52	181-183	Λευκό	C ₈ H ₅ N ₂ OSCI	212,5

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Αποδόσεις σύνθεσης ,σ.τ.,χρώμα ,Μ.Τ. και Μ.Β. των Χ-ΡΟDΤ.

Παρακάτω παρατίθενται οι τιμές των δονήσεων υπερύθρου (IR) των ligands X-PODT.

4.2.1 C₆H₅-1,3,4-oxadiazole-2-thione (2a):

IR(cm⁻¹): 3052 (m,br), 3005 (w), 2752 (m), 1611 (s), 1570 (m), 1505 (vs), 1446 (s), 1340 (s), 1275 (s), 1180 (m), 1090 (s), 1060 (m), 1020 (m), 967 (vs), 940 (s), 769 (m), 746 (m), 696 (vs), 552 (s), 496 (m), 481 (m), 414 (m).

4.2.2 o-CI- C₆H₄-1,3,4-oxadiazole-2-thione (2b):

IR(cm⁻¹): 3752 (vw), 3279 (m), 3067 (w), 2920 (w), 2108 (w), 1605 (m), 1564 (w), 1481 (m), 1458 (vs), 1331 (s), 1280 (m), 1264 (m), 1240 (m), 1175 (s), 1155 (s), 1128 (m), 1093 (w), 1070 (vs), 1028 (vs), 964 (vs), 949 (vs), 869 (m), 764 (vs), 719 (vs), 699 (s), 684 (vs), 652 (m), 628 (s), 561 (s), 511 (s), 455 (m), 414 (m).

4.2.3 m-Cl- C₆H₄-1,3,4-oxadiazole-2-thione (2c):

IR(cm-1): 3750 (vw), 3277 (w), 3055 (m,br), 2923 (m), 2753 (m), 1610 (m), 1589 (m), 1563 (m), 1499 (s), 1472 (s), 1420 (w), 1408 (m), 1344 (s), 1282 (s), 1177 (s), 1107 (m), 1063 (s), 969 (s), 949 (s), 884 (m), 797 (s), 770 (m), 747 (s), 709 (s), 674 (m), 650 (m), 557 (m), 536 (m), 497 (m), 437 (m), 416(m).

4.2.4 o-F- C₆H₄-1,3,4-oxadiazole-2-thione (2d):

IR(cm-1): 3749 (w), 3109 (m, br), 2943 (m, br), 2760 (w), 1614 (m), 1599 (m), 1499 (s), 1487 (s), 1423 (m), 1405 (m), 1340 (s), 1284 (m), 1228 (w), 1173 (m), 1152 (m), 1094 (m), 1072 (s), 1031 (m), 1011 (m), 961 (s), 937 (s), 834 (m), 822 (m), 770 (m), 722 (s), 687 (s), 620 (w), 569 (w), 552 (m), 499 (s), 469 (m), 422 (m).

4.2.5 p-F- C₆H₄-1,3,4-oxadiazole-2-thione (2e):

IR(cm-1): 3749 (w), 3070 (m, br), 2932 (m, br), 1602 (w), 1554 (m), 1530 (m), 1508 (s), 1423 (m), 1405 (m), 1340 (m), 1281 (s), 1228 (m), 1184 (m), 1158 (s), 1093 (s), 1067 (s), 1031 (w), 1010 (m), 964 (s), 943 (s), 834 (s), 764 (m), 710 (s), 687 (s), 611 (m), 540 (m), 499 (s), 469 (s), 416 (vs), 403 (s).

4.3 Σύνθεση συμπλόκων ενώσεων

Διαλύουμε ποσότητα 0.25 mmoles ligand X-PODT (X=H,o-Cl,m-Cl,o-F,p-F) σε 8 ml δισαπεσταγμένου H₂O υπό συνεχή ανάδευση. Προσθέτουμε στο διάλυμα του ligand 250 μl υδατικού διαλύματος KOH 1M.

Στη συνέχεια προσθέτουμε στο διάλυμα ligand-KOH 0.25 mmoles AgNO₃ που έχουν διαλυθεί σε 3 ml δισαπεσταγμένου H₂O. Το διάλυμα αναδεύεται τουλάχιστον για 1 ώρα υπό θέρμανση. Το σχηματιζόμενο ίζημα διηθείται με διπλό διηθητικό χαρτί και αφήνεται προς ξήρανση.

Ζυγίζεται ποσότητα του σχηματισμένου ιζήματος και αναμιγνύεται με διάλυμα τριφαινυλοφωσφίνης (TPP) σε DMSO (όγκος διαλύτη 5-10 ml) με αναλογία 1:2 (mmoles) υπό συνεχή ανάδευση. Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο παραμένει σε ηρεμία μέχρι να κρυσταλλωθεί, συλλέγεται αφού διηθηθεί με διπλό διηθητικό χαρτί, ξηραίνεται και αναλύεται. Τα σχηματισθέντα σύμπλοκα (1)-(5) είναι διαλυτά σε DMSO.



Σχήμα 7: Αντίδραση σχηματισμού συμπλόκων ενώσεων (1)-(5)

Παρακάτω παρατίθενται οι τιμές των δονήσεων υπέρυθρου (IR) των συμπλόκων ενώσεων (1)-(5).

4.3.1 Σύμπλοκο Ag-tpp-H-PODT (1)

IR(cm⁻¹): 3399 (m,br), 3052 (w), 3005 (w), 2920 (w), 1652 (m), 1611 (m), 1550 (w), 1508 (m), 1478 (m), 1434 (s), 1411 (s), 1311 (m), 1150 (m), 1125 (m), 1081 (m), 1014 (vs), 952 (s), 843 (m), 780 (m), 740 (s), 690 (vs), 550 (w), 499 (vs), 487 (vs), 440 (w), 420 (w).
4.3.2 Σύμπλοκο Ag-tpp- o-CI-PODT (2)

IR(cm⁻¹): 3752 (w), 3067 (w), 2925 (w), 1650 (m), 1605 (m), 1543 (w), 1508 (m), 1470 (m), 1420 (m), 1405 (m), 1340 (m), 1315 (m), 1280 (m), 1185 (w), 1158 (m), 1093 (m), 1070 (m), 1011 (w), 964 (m), 941 (m), 834 (m), 746 (m), 720 (m), 687 (s), 608 (m), 530 (w), 502 (vs), 475 (m), 419 (s).

4.3.3 Σύμπλοκο Ag-tpp- m-CI-PODT (3)

IR(cm⁻¹): 3750 (w), 3055 (w, br), 2985 (vw), 2920 (vw), 1651 (w), 1543 (w), 1478 (m), 1431 (s), 1408 (s), 1373 (m), 1309 (w), 1285 (vw), 1165 (m), 1133 (m), 1092 (s), 1069 (m), 1025 (m), 998 (m), 975 (w), 917 (w), 849 (w), 770 (w), 741 (s), 688 (vs), 608 (w), 502 (s), 490 (s), 440 (m), 419 (m).

4.3.4 Σύμπλοκο Ag-tpp- o-F-PODT (4)

IR(cm⁻¹): 3762 (w), 3055 (w), 1577 (w), 1558 (w), 1476 (m), 1431 (s), 1408 (s), 1370 (m), 1308 (m), 1226 (w), 1181 (m), 1120 (m), 1087 (s), 1025 (m), 993 (m), 970 (w), 922 (m), 852 (w), 743 (s), 690 (vs), 540 (s), 502 (vs), 484 (vs), 465 (s, br), 422 (s).

4.3.5 Σύμπλοκο Ag-tpp- p-F-PODT (5)

IR(cm-1): 3749 (w), 3400 (w, br), 3055 (m), 2996 (w), 2908 (w), 1605 (m), 1499 (m), 1478 (s), 1431 (s), 1420 (s), 1308 (m), 1220 (m), 1181 (w), 1158 (m), 1128 (m), 1093 (s), 1052 (s), 1025 (s), 996 (s), 949 (m), 926 (m), 843 (s), 811 (w), 743 (vs), 719 (w), 690 (vs), 622 (m), 511 (s), 493 (vs), 434 (m), 422 (m).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ

5.1 Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR

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

5.2 Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Τα φάσματα UV-Vis των ενώσεων λήφθηκαν με το φασματοφωτόμετρο UV-1600 PC series της VWR. Επίσης, με φασματοσκοπία UV-Vis ελέγχθηκε και η σταθερότητα των ενώσεων για χρονικό διάστημα 2 ημερών (48 ώρες).

5.3 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹H-NMR)

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (¹Η-ΝΜR) των υπό μελέτη ενώσεων ελήφθησαν σε δευτεριωμένο DMSO (DMSO-d₆) χρησιμοποιώντας το όργανο Bruker AC 250, 400 MHFT-NMR. Με το ίδιο όργανο ελέγχθηκε και η σταθερότητα των ενώσεων σε διάλυμα για 2 ημέρες, ενώ η επεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Mestrec 23.

5.4 Φασματοσκοπία φθορισμού

Τα φάσματα φθορισμού λήφθηκαν χρησιμοποιώντας το φθορισμόμετρο FP-8200 της εταιρείας Jasco.

5.5 Κρυοσκοπία

Η ωσμωτικότητα των διαλυμάτων των υπό μελέτη ενώσεων λήφθηκαν με τη συσκευή OSMOMAT 3000 Freezing Point Osmometer της Gonotec.

5.6 Σημεία τήξης

Τα σημεία τήξης των ενώσεων μετρήθηκαν με τη συσκευή Stuart Scientific με ανοιχτούς σωλήνες.

5.7 Ιξωδομετρία

Η μέτρηση του ιξώδους των υπό μελέτη ενώσεων έγινε με γυάλινο τριχοειδές ιξωδόμετρο τύπου Ostwald.

5.8 Λιποφιλικότητα

Η λιποφιλικότητα (logP) των νέων συμπλόκων υπόλογίστηκε με την χρήση του προγράμματος ALOGPS version 2.1.

5.9 Περίθλαση ακτίνων X (X-ray Diffraction – XRD)

Τα πειραματικά αποτελέσματα της κρυσταλλικής δομής των υπό μελέτη ενώσεων, συλλέχθηκαν με τη χρήση περιθλασίμετρου RIGAKU R-AXIS SPIDER και με μονοχρωματική ακτινοβολία Μο (λ=0.71073 Å). Οι παράμετροι κυψελίδας προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων των δεδομένων περίθλασης από 25 αντανακλάσεις. Όλα τα δεδομένα διορθώθηκαν ως προς τα αποτελέσματα και την

απορρόφηση του φαινομένου πόλωσης Lorentz. Οι δομές λύθηκαν με άμεσες μεθόδους με το πρόγραμμα SHELXS-2013/1(110) και αποσαφηνίστηκαν με full-matrix διαδικασίες ελαχίστων τετραγώνων στο F2 με το πρόγραμμα SHELXL 2014/6(111). Τα άτομα υδρογόνου τοποθετήθηκαν σε υπολογισμένες θέσεις.

Στους Πίνακες 8 –18 αναγράφονται τα δεδομένα υπολογισμού των κρυσταλλικών δομών των υπό μελέτη ενώσεων και της τριφαινυλοφωσφίνης.

Crystal Data		
Formula	C62 H50 Ag N2 O P 3S	
Formula Weight	1071.88	
Crystal System	Monoclinic	
Space Group	P 2 1/n	
a, b, c [Angstrom]	11.7903(2) 26.9548(5) 16.4586(3)	
alpha, beta, gamma (deg)	90 91.585(1) 90	
V [Ang ³]	5228.63(16)	
Z	4	
D (calc) [g/cm ³]	1.362	
Mu (MoKa) [/nm]	0.561	
F (000)	2208	
Crystal Size (nm)	0.00 x 0.00 x 0.00	
Data Collection		
Temperature (K)	293	
Radiation {Angstrom]	MoKa 0.71073	
Theta Min-Max [Deg]	3.0 27.0	
Dataset	-14:15; -34:32; -21:21	
Tot., Uniq. Data, R (int)	59806, 11393, 0.042	
Observed Data [I>2.0 sigma(I)]		
Refinement		
Nref, Npar	11393, 831	
R, wR2, S	0.0309, 0.0762, 1.02	
Max. and Av. Shift/Error	0.02, 0.00	
Min. and Max. Resd. Dens. [e/Ang ³]	-0.27, 0.38	

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Δεδομένα υπολογισμού κρυσταλλικής δομής συμπλόκου

			-	
Λat	nn	ы	DO	DT
AU-I	υD	- 11-	гΟ	$\mathbf{D}\mathbf{I}$
	r r	• •	· ·	

Crystal Data		
Formula	C62 H56 Ag CI N2 O P 3S	
Formula Weight	1056.93	
Crystal System	Monoclinic	
Space Group	P 21/c	
a, b, c [Angstrom]	14.0954(3) 13.7480(3) 27.2903(7)	
alpha, beta, gamma (deg)	90 99.661(1) 90	
V [Ang ³]	5213.4(2)	
Z	4	
D (calc) [g/cm ³]	1.347	
Mu (MoKa) [/nm]	0.613	
F (000)	2076	
Crystal Size (nm)	0.00 x 0.00 x 0.00	
Data Collection		
Temperature (K)	293	
Radiation (Angstrom]	MoKa 0.71073	
Theta Min-Max [Deg]	3.0 , 27.0	
Dataset	-17:18 ; -17:17 ; -34:34	
Tot., Uniq. Data, R (int)	62906 , 11131 , 0.033	
Observed Data [I>2.0 sigma(I)]	8928	
Refinement		
Nref, Npar	11131 , 285	
R, wR2, S	0.0920 , 0.3000 , 2.33	
Max. and Av. Shift/Error	3.02 , 0.16	
Min. and Max. Resd. Dens. [e/Ang ³]	-2.65 , 4.15	

ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Δεδομένα υπολογισμού κρυσταλλικής δομής συμπλόκου Ag-tpp-o-CI-PODT

Crystal Data		
Formula	C62 H49 Ag CI N2 O P 3S,	
	2(C2H6OS)	
Formula Weight	1262.58	
Crystal System	Triclinic	
Space Group	P-1	
a, b, c [Angstrom]	13.4415(3) 14.4916(3) 16.9666(3)	
alpha, beta, gamma (deg)	109.938(1) 100.322(1) 92.903(1)	
V [Ang ³]	3034.14(11)	
Z	2	
D (calc) [g/cm ³]	1.382	
Mu (MoKa) [/nm]	0.606	
F (000)	1.304	
Crystal Size (nm)	0.00 x 0.00 x 0.00	
Data Collection		
Temperature (K)	160	
Radiation {Angstrom]	MoKa 0.71073	
Theta Min-Max [Deg]	3.0 , 27.0	
Dataset	-17:17 ; -18:18 ; -21:20	
Tot., Uniq. Data, R (int)	56569 , 13222 , 0.030	
Observed Data [I>2.0 sigma(I)]	11361	
Refinement		
Nref, Npar	13222 , 914	
R, wR2, S	0.0326 , 0.0812 , 1.05	
Max. and Av. Shift/Error	0.00 , 0.00	
Min. and Max. Resd. Dens. [e/Ang ³]	-0,78 , 0.79	

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Δεδομένα υπολογισμού κρυσταλλικής δομής συμπλόκου Ag-tpp-m-CI-PODT

Crystal Data		
Formula	C62 H49 Ag F N2 O P 3S	
Formula Weight	1089.88	
Crystal System	Monoclinic	
Space Group	P2 1/c	
a, b, c [Angstrom]	14.1567(3) 13.6903(3) 27.3472(6)	
alpha, beta, gamma (deg)	90 99.822(1) 90	
V [Ang³]	5222.5(2)	
Z	4	
D (calc) [g/cm ³]	1.386	
Mu (MoKa) [/nm]	0.566	
F (000)	2240	
Crystal Size (nm)	0.00 x 0.00 x 0.00	
Data Collection		
Temperature (K)	160	
Radiation {Angstrom]	MoKa 0.71073	
Theta Min-Max [Deg]	3.0 , 27.0	
Dataset	-18:18 ; -17:17 ; -27:34	
Tot., Uniq. Data, R (int)	49996 , 11378 , 0.058	
Observed Data [I>2.0 sigma(I)]	8350	
Refinement		
Nref, Npar	11378 , 640	
R, wR2, S	0.044 , 0.1151 , 1.03	
Max. and Av. Shift/Error	0.00 , 0.00	
Min. and Max. Resd. Dens. [e/Ang ³]	-0.47 , 1.34	

ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Δεδομένα υπολογισμού κρυσταλλικής δομής συμπλόκου Ag-tpp-o-F-PODT

Crystal Data		
Formula	C62 H47 Ag F N2 O P 3S,	
	2(C2H6OS)	
Formula Weight	1244.12	
Crystal System	Triclinic	
Space Group	P-1	
a, b, c [Angstrom]	13.3904(3) 14.4372(3) 16.8200(4)	
alpha, beta, gamma (deg)	108.073(1) 101.546(1) 92.851(1)	
V [Ang ³]	3006.75(12)	
Z	2	
D (calc) [g/cm ³]	1.374	
Mu (MoKa) [/nm]	0.570	
F (000)	1284	
Crystal Size (nm)	0.00 x 0.00 x 0.00	
Data Collection		
Temperature (K)	160	
Radiation {Angstrom]	MoKa 0.71073	
Theta Min-Max [Deg]	3.0 , 27.0	
Dataset	-17:17 ; -18:18 ; -21:21	
Tot., Uniq. Data, R (int)	55868 , 13100 , 0.039	
Observed Data [I>2.0 sigma(I)]	11453	
Refinement		
Nref, Npar	13100 , 868	
R, wR2, S	0.0588 , 0.1606 ,1.03	
Max. and Av. Shift/Error	0.02 , 0.00	
Min. and Max. Resd. Dens. [e/Ang ³]	-1.61 , 3.36	

ΠΙΝΑΚΑΣ 12: Δεδομένα υπολογισμού κρυσταλλικής δομής συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT

Crystal Data		
Formula	C8 H6 N2 O S, C2H6OS	
Formula Weight	256.34	
Crystal System	Orthorhombic	
Space Group	P 212121	
a, b, c [Angstrom]	4.759(2) 9.819(5) 26.782(13)	
alpha, beta, gamma (deg)	90 90 90	
V [Ang ³]	1251.5(10)	
Z	4	
D (calc) [g/cm ³]	1.360	
Mu (Mo Ka) [/nm]	0.413	
F (000)	536	
Crystal Size (nm)	0.02 x 0.02 x 0.50	
Data Collection		
Temperature (K)	296	
Radiation {Angstrom]	Mo Ka 0.71073	
Theta Min-Max [Deg]	0.0 , 0.0	
Dataset	999:-99 ; 999:-99 ; 999:-99	
Tot., Uniq. Data, R (int)	0 , 0 , 0.000	
Observed Data [I>2.0 sigma(I)]	0	
Refinement		
Nref, Npar	0.0	
R, wR2, S	0.0000 , 0.0000 , 0.00	
Max. and Av. Shift/Error	0.00 , 0.00	
Min. and Max. Resd. Dens. [e/Ang ³]	0.00 , 0.00	

ΠΙΝΑΚΑΣ 13: Δεδομένα υπολογισμού κρυσταλλικής δομής ligand H-PODT

Crystal Data		
Formula	C8 H5 N2 O CI	
Formula Weight	212,5	
Crystal System	Monoclinic	
Space Group	P 2 1/c	
a, b, c [Angstrom]	4.7431(4) 16.1632(15) 11.4938(10)	
alpha, beta, gamma (deg)	90 94.621(2) 90	
V [Ang ³]	878.293	
Z	4	
D (calc) [g/cm³]	1.608	
Mu (MoKa) [/nm]	0.627	
F (000)	432	
Crystal Size (nm)	0.00 x 0.00 x 0.00	
Data Collection		
Temperature (K)	293	
Radiation {Angstrom]	MoKa 0.71073	
Theta Min-Max [Deg]	3.1 , 27.0	
Dataset	-6:6 , -20:20 , -14:14	
Tot., Uniq. Data, R (int)	9128 ,1912 , 0.059	
Observed Data [I>2.0 sigma(I)]	1417	
Refinement		
Nref, Npar	1912 , 138	
R, wR2, S	0.0421 , 0.971 ,1.07	
Max. and Av. Shift/Error	0.00 , 0.00	
Min. and Max. Resd. Dens. [e/Ang ³]	-0,28 , 0.32	

ΠΙΝΑΚΑΣ 14: Δεδομένα υπολογισμού κρυσταλλικής δομής ligand o-CI-PODT

Crystal Data		
Formula	C8H5CIN2OS	
Formula Weight	212.65	
Crystal System	Monoclinic	
Space Group	P2 ₁ /n	
a, b, c [Angstrom]	4.7297(5) 15.1382(14) 12.7060(13)	
alpha, beta, gamma (deg)	90 97.354(4) 90	
V [Ang ³]	902.26(16)	
Z	4	
D (calc) [g/cm ³]	1.566	
Mu (MoKa) [/nm]	0.610	
F (000)	432	
Crystal Size (nm)	0.00 x 0.00 x 0.00	
Data Collection		
Temperature (K)	293	
Radiation (Angstrom]	MoKa 0.71073	
Theta Min-Max [Deg]	3.1 , 27.0	
Dataset	-6:6 ; -19:19 ; -14:16	
Tot., Uniq. Data, R (int)	7908 , 1954 , 0.108	
Observed Data [I>2.0 sigma(I)]	1078	
Refinement		
Nref, Npar	1954 , 138	
R, wR2, S	0,0587 , 0.1521 , 1.06	
Max. and Av. Shift/Error	0.04 , 0.00	
Min. and Max. Resd. Dens. [e/Ang ³]	-0.39 , 0.37	

ΠΙΝΑΚΑΣ 15: Δεδομένα υπολογισμού κρυσταλλικής δομής ligand m-CI-PODT

Crystal Data		
Formula	C8 H5 F N2 O S	
Formula Weight	196.20	
Crystal System	Monoclinic	
Space Group	P2 1/c	
a, b, c [Angstrom]	11.3499(8) 4.6851(3) 16.3599(4)	
alpha, beta, gamma (deg)	90 94.492(3) 90	
V [Ang ³]	867.27(11)	
Z	4	
D (calc) [g/cm ³]	1.503	
Mu (MoKa) [/nm]	0.346	
F (000)	400	
Crystal Size (nm)	0.00 x 0.00 x 0.00	
Data Collection		
Temperature (K)	170	
Radiation {Angstrom]	МоКа 0.71073	
Theta Min-Max [Deg]	3.2 , 27.0	
Dataset	-14:14 ; -5:5 ; -20:20	
Tot., Uniq. Data, R (int)	7942 , 1870 , 0.052	
Observed Data [I>2.0 sigma(I)]	1317	
Refinement		
Nref, Npar	1870 , 130	
R, wR2, S	0.0741 , 0.2482 , 1.08	
Max. and Av. Shift/Error	0.00 , 0.00	
Min. and Max. Resd. Dens. [e/Ang ³]	-0.32 , 1.49	

ΠΙΝΑΚΑΣ 16: Δεδομένα υπολογισμού κρυσταλλικής δομής ligand o-F-PODT

Crystal Data		
Formula	C8 H5 F N2 O S , C2 H6 O S	
Formula Weight	274.33	
Crystal System	Monoclinic	
Space Group	C 2/C	
a, b, c [Angstrom]	25.888(3) 4.7350(5) 23.606(3)	
alpha, beta, gamma (deg)	90 117.910(4) 90	
V [Ang ³]	2557.0(5)	
Z	8	
D (calc) [g/cm ³]	1.425	
Mu (MoKa) [/nm]	0.420	
F (000)	1136	
Crystal Size (nm)	0.01 x 0.01 x 1.00	
Data Collection		
Temperature (K)	296	
Radiation {Angstrom]	MoKa 0.71073	
Theta Min-Max [Deg]	3.2 , 25.0	
Dataset	-30:30 ; -5:4 ; -28:28	
Tot., Uniq. Data, R (int)	18863 , 2221 , 0.140	
Observed Data [I>2.0 sigma(I)]	1628	
Refinement		
Nref, Npar	2221 , 160	
R, wR2, S	0.0906 , 0.1605 , 1.11	
Max. and Av. Shift/Error	0.00 , 0.00	
Min. and Max. Resd. Dens. [e/Ang ³]	0.41 , 0.30	

ΠΙΝΑΚΑΣ 17: Δεδομένα υπολογισμού κρυσταλλικής δομής ligand p-F-PODT

Crystal Data		
Formula	C18H15P	
Formula Weight	262,27	
Crystal System	Monoclinic	
Space Group	P 2 ₁ /c	
a, b, c [Angstrom]	8.4531(3) 14.9010(5) 11.3855(4)	
alpha, beta, gamma (deg)	90 92.2450(10) 90	
V [Ang ³]	1433.01	
Z	4	
D (calc) [g/cm ³]	1.216	
Mu (MoKa) [/nm]	0.175	
F (000)	552	
Crystal Size (nm)	0.00 x 0.00 x 0.00	
Data Collection		
Temperature (K)	160	
Radiation {Angstrom]	MoKa 0.71073	
Theta Min-Max [Deg]	3.2 , 27.0	
Dataset	-10:10 ; -19:19 ; -14:14	
Tot., Uniq. Data, R (int)	17400 , 3122 , 0.047	
Observed Data [I>2.0 sigma(I)]	2371	
Refinement		
Nref, Npar	3122 , 232	
R, wR2, S	0.0449 , 0.1208 , 1.07	
Max. and Av. Shift/Error	0.00 , 0.00	
Min. and Max. Resd. Dens. [e/Ang ³]	-0.19 , 0.00	

ΠΙΝΑΚΑΣ 18: Δεδομένα υπολογισμού κρυσταλλικής δομής τριφαινυλοφωσφίνης

5.10 Μελέτη σταθερότητας ενώσεων

Η μελέτη σταθερότητας πραγματοποιήθηκε προκειμένου να διαπιστωθεί ότι τα σύμπλοκα 1-5 παραμένουν σταθερά και δεν διασπώνται. Η σταθερότητα αυτών ελέγχθηκε με τη χρήση φασματοσκοπίας UV-Vis σε διάλυμα DMSO και με φασματοσκοπία ¹Η NMR σε διάλυμα DMSO-d₆ για χρονικό διάστημα 0 και 48 ώρες. Οι χρόνοι αυτοί επιλέχθηκαν γιατί τα βιολογικά πειράματα απαιτούν 24 ή 48 ώρες επώασης με τις μελετώμενες ενώσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

6.1 Κρυοσυντήρηση κυτταρικών σειρών

Στη διατριβή αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο εμπορικά διαθέσιμες καρκινικές σειρές του μαστού με απουσία οιστρογονικών υποδοχέων (MDA-MB-231) και με παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων (MCF-7), αλλά και μία σειρά από φυσιολογικούς εμβρυϊκούς ινοβλάστες πνεύμονα (MRC-5). Οι κυτταρικές σειρές διατηρήθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα κατεψυγμένες σε ειδικά δοχεία με υγρό άζωτο σε θερμοκρασία -196 °C. Η διαδικασία της κατάψυξης έγινε ως εξής:

 Τα κύτταρα όταν βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξής συλλέγονται και φυγοκεντρούνται μέσα σε σωληνάρια falcon των 15 ml στις 3000 στροφές για χρόνο 7 λεπτών.

Απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό και το κυτταρικό ίζημα προστίθεται σε 950 μl
(90%) εμβρυϊκού ορού μόσχου (FBS).

 Το κυτταρικό αυτό διάλυμα μεταφέρεται σε σωληνάρια κατάψυξης (cryotubes) που περιέχουν 50 μl (10%) διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), το οποίο λειτουργεί ως κρυοπροστατευτικό και εμποδίζει τον σχηματισμό κρυστάλλων πάγου που μπορούν να διαπεράσουν και να καταστρέψουν την κυτταρική μεμβράνη.

 Τα σωληνάρια κατάψυξης τοποθετούνται αρχικά στους -80 °C για 48 ώρες και στη συνέχεια μεταφέρονται σε δοχεία υγρού αζώτου, όπου μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Όταν χρειαστεί να γίνει επανακαλλιέργεια της κυτταρικής σειράς, μεταφέρονται τα κύτταρα από το υγρό άζωτο σε θερμοκρασία 37 °C. Μεταφέρεται δηλαδή το περιεχόμενο του σωληναρίου της κατάψυξης σε τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας και προστίθεται θρεπτικό υλικό, με τελικό όγκο τρυβλίου τα 10 ml. Μετά από πάροδο 24 ωρών πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού υγρού, με σκοπό να απομακρυνθεί το DMSO από την καλλιέργεια.

6.2 Κυτταρικές καλλιέργειες

Για την ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκε επωαστικός κλίβανος σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, με σταθερές συνθήκες υγρασίας και εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂. Ως θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε το Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), το οποίο εμπλουτίζεται πριν από τη χρήση του με ορό εμβρύου βοός (fetal bovine serum,FBS) σε αναλογία 10% του όγκου (50 ml) του θρεπτικού υλικού, το οποίο παρέχει τους απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς επίσης με 1% (5 ml) από τα αντιβιοτικά πενικιλίνη

(100 IU/ml) και στρεπτομυκίνη (100 μg/ml) καθώς και με το αμινοξύ L-γλουταμίνη (Lglutamine) (2,5 ml). Το πλήρες θρεπτικό υλικό διατηρείται στους 4 °C.

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων (όταν αυτά έχουν αυξήσει τον πληθυσμό τους και έχουν καλύψει όλη σχεδόν την επιφάνεια του τρυβλίου) γίνεται αρχικά η αποκόλλησή τους από το τρυβλίο. Μετά την απομάκρυνση του καλλιεργητικού υλικού, γίνεται έκπλυση με 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος Phosphate Buffer Saline (PBS) και στη συνέχεια προστίθεται θρυψίνη (1 ml). Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο, το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων με την επιφάνεια προσκόλλησής τους, με αποτέλεσμα αυτά να μπορούν να αποκολληθούν και να συλλεχθούν. Τα τρυβλία στη συνέχεια τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο για 5 λεπτά μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα (μέγιστος χρόνος 8 λεπτά). Για την επιβεβαίωση της αποκόλλησης χρησιμοποιείται μικροσκόπιο. Για την διακοπή της δράσης της θρυψίνης προστίθεται άμεσα πλήρες θρεπτικό υλικό σε πενταπλάσια ποσότητα από αυτή της θρυψίνης (5 ml). Στο τέλος, μεταφέρεται η επιθυμητή ποσότητα των κυττάρων σε ένα νέο τρυβλίο και προστίθεται η ανάλογη ποσότητα καλλιεργητικού υλικού (τελικός όγκος 7 ml).

6.3 In vitro μελέτη κυτταροτοξικότητας (SRB assay)

Για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας των ουσιών *in vitro* χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Sulforhodamine B (SRB assay). Η μέθοδος έχει την ικανότητα να προσδιορίζει την πυκνότητα των κυττάρων μετρώντας την περιεκτικότητά τους σε κυτταρικές πρωτεΐνες. Η χρωστική SRB δεσμεύεται από τα κυτταρικά πρωτεΐνικά συστατικά που έχουν σταθεροποιηθεί με προσθήκη τριχλωροξικού οξέος (TCA). Το πλεονέκτημα της

μεθόδου είναι ότι επιτρέπει τον έλεγχο κυτταροτοξικότητας ενός μεγάλου αριθμού ενώσεων σε μικρό χρονικό διάστημα και με χαμηλό κόστος (112). Η μέθοδος SRB χρησιμοποιείται ευρέως για τον έλεγχο της τοξικότητας των φαρμάκων σε καρκινικές και μη κυτταρικές σειρές (113).

Για το σκοπό αυτό, ακολουθείται ο ίδιος τρόπος με αυτόν της ανακαλλιέργειας των κυττάρων μέχρι το σημείο της αποκόλλησης των κυττάρων και της απενεργοποίησης της θρυψίνης. Ακολούθως, μετριέται ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκονται στο τρυβλίο μέσω της πλάκας Neubauer και γίνεται επίστρωση των κυττάρων (100 μl/κελί) σε τρυβλίο των 96 κελιών με διαφορετικές πυκνότητες εμβολιασμού κυττάρων, έτσι ώστε να υπάρχει ο απαιτούμενος αριθμός κυττάρων ανάλογα με την κυτταρική σειρά που έχουμε να μελετήσουμε (MCF-7 και MDA-MB-231: 6000 κύτταρα / κελί, MRC-5: 2000 κύτταρα / κελί).

Τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37° C, με εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα 5% CO₂. Για να μελετήσουμε τις ενώσεις που εξετάστηκαν, παρασκευάζονται διαλύματα 0,01M σε DMSO. Στη συνέχεια αραιώνονται με θρεπτικό υλικό μέχρι τελικού όγκου 200 μl. Τα κύτταρα επωάζονται με τις υπό εξέταση ουσίες για 48 ώρες και μετά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, προστίθεται κρύο διάλυμα TCA 10% (50 μl /κελί) και το τρυβλίο επωάζεται ξανά για 30 λεπτά στους 4 °C. Στη συνέχεια γίνονται εκπλύσεις (5 φορές) με απιονισμένο νερό και το τρυβλίο αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τουλάχιστον 24 ώρες.

Όταν στεγνώσει το τρυβλίο γίνεται προσθήκη 70 μΙ SRB 0,4% w/v (σε διάλυμα 1% οξικού οξέος) σε κάθε κελί και το τρυβλίο επωάζεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία

περιβάλλοντος. Η χρωστική αφαιρείται προσεκτικά με εκπλύσεις (5 φορές) με οξικό οξύ 1% και ακολουθεί η προσθήκη 200 μl 10 mM unbuffered Tris-base σε κάθε κελί με ανάδευση ώστε να διαλυτοποιηθεί η προσδεδεμένη χρωστική. Η μέτρηση της απορρόφησης του τρυβλίου 96 κελιών γίνεται με χρήση συσκευής ELISA (MMP-96 Hipo, Biosan) σε μήκος κύματος 540 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε τιμές IC₅₀, που είναι η συγκέντρωση του συμπλόκου που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων κατά 50% συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου (control), μετά από 48 ώρες επώασης των συμπλόκων.

6.4 In vitro μελέτη γονοτοξικότητας (Micronucleus assay)

Για τη *in vitro* μελέτη της γονοτοξικότητας των συμπλόκων ως υποψήφιων φαρμακευτικών παραγόντων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του σχηματισμού μικροπυρηνίσκων, που δημιουργούνται όταν προκαλούνται γενετικές βλάβες σε φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα. Η μέθοδος θεωρείται αρκετά ευαίσθητη για τον έλεγχο της τοξικότητας και έτσι μπορεί να μειωθεί η χρήση πειραματόζωων στις τοξικολογικές δοκιμές (114). Για τη μελέτη των μικροπυρηνίσκων χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικοί εμβρυικοί ινοβλάστες (MRC-5), που προετοιμάστηκαν σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία:

 Γίνεται σπορά 40.000 κυττάρων σε κάθε κελί (τελικός όγκος 3 ml), η οποία πραγματοποιείται σε τρυβλίο 6 κελιών επάνω σε καλυπτρίδα.

Επωάζεται το τρυβλίο με τα κύτταρα για 24 ώρες στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα 5%
CO₂.

Προστίθεται η ένωση σε συγκέντρωση ίση με την τιμή IC₅₀ για 48 ώρες.

Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και ξεπλένεται κάθε κελί με 1 ml PBS (3 φορές).

Απομακρύνεται το ρυθμιστικό διάλυμα PBS, προστίθεται 1 ml KCl 75 mM σε κάθε
κελί και επωάζεται το τρυβλίο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 min.

Απομακρύνεται το KCI και πλένεται κάθε κελί 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.

Προστίθενται 3 ml διαλύματος χρωστικής acridine orange (5 μg/ml) που είναι
διαλυμένη σε θρεπτικό υλικό και επωάζεται για 15 min στους 37 °C.

 Ξεπλένονται όλα τα κελιά με 1 ml PBS (3 φορές) για την απομάκρυνση της περίσσειας χρωστικής.

 Μεταφορά της καλυπτρίδας του τρυβλίου με τα κελιά ανάποδα πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και παρατήρηση με σκοπό τη μέτρηση των μικροπυρηνίσκων με μικροσκόπιο φθορισμού.

Το ποσοστό εμφάνισης των μικροπυρηνίσκων υπολογίζεται ανά 1000 κύτταρα για κάθε δείγμα. Οι μικροπυρηνίσκοι υπολογίζονται στο τελικό άθροισμα εάν πληρούν τα παρακάτω κριτήρια:

(1) Η περιοχή εμφάνισης του μικροπυρηνίσκου 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 το όριο του μικροπυρηνίσκου θα πρέπει να διακρίνεται από το πυρηνικό του όριο και (6) ο μικροπυρηνίσκος πρέπει να έχει την ίδια ένταση φθορισμού με τους κύριους πυρήνες.

6.5 Μελέτη κυτταρικής μορφολογίας

Για τη μελέτη της κυτταρικής μορφολογίας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα MCF-7 και ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο. Η μελέτη των αλλαγών στη μορφολογία γίνεται μετά από καλλιέργεια των κυττάρων MCF-7, απουσία και παρουσία των ουσιών που μελετήθηκαν, σε συγκέντρωση ίση με τις τιμές IC₅₀. Οι ουσίες επωάζονται για 48 ώρες και οι αλλαγές που γίνονται στη μορφολογία των κυττάρων μπορούν να προτείνουν τον κυτταρικό θάνατο μέσω της απόπτωσης.

6.6 Μελέτη κατακερματισμού του πυρηνικού DNA

Για τη μελέτη του κατακερματισμού του DNA από τις υπό μελέτη ουσίες χρησιμοποιούνται κύτταρα MCF-7. Τα MCF-7 κύτταρα καλλιεργούνται (300.000 κύτταρα/τρυβλίο των 10 ml) και στη συνέχεια επωάζονται με τις υπό μελέτη ουσίες για 48 ώρες στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Μεταφέρεται σε falcons το θρεπτικό υλικό και τα προσκολλημένα κύτταρα από τον τάπητα των τρυβλίων, τα οποία είχαν εκπλυθεί δύο φορές με 5 ml PBS και αποκολλήθηκαν με τη βοήθεια σιλικονούχας σπάτουλας. Τα falcons φυγοκεντρούνται στις 4.000 στροφές για 15 λεπτά και απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 1 ml PBS και μεταφέρθηκαν σε μικροφιαλίδια eppendorf.

Ακολούθως φυγοκεντρούνται σε 10.000 στροφές για 10 λεπτά, απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό, γίνεται προσθήκη 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (lysis buffer) (100 mM Tris pH=7,4, 50 mM EDTA pH=8, w/v SDS) και επωάζονται στον πάγο για 30 λεπτά με συνεχή ανακίνηση. Το υδρολυμένο προϊόν φυγοκεντρείται στις 10.000 στροφές για 20 λεπτά και το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε αποστειρωμένο φιαλίδιο eppendorf και επωάζεται με 2 μl RNase A (10 mg/ml) για 2 ώρες στους 37 °C και στη συνέχεια με 2.5 μl πρωτεϊνάσης K (20 mg/ml) για 2 ώρες στους 37 °C σε υδατόλουτρο. Στα δείγματα DNA προστίθενται 20 μl NaCl 5M και 120 μl ισοπροπανόλης και μεταφέρονται σε καταψύκτη θερμοκρασίας -20 °C.

Την επόμενη ημέρα τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13.000 στροφές για 15 λεπτά και αφού στεγνώσει το ίζημα, επαναιωρούνται σε 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE (0.01 M Tris-HCl / 0.001 M EDTA, pH=7.4). Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται για 3 ώρες στους 37 °C σε υδατόλουτρο και αποθηκεύονται στους -20 °C μέχρι την ηλεκτροφόρηση. Πριν από την ηλεκτροφόρηση σε κάθε φιαλίδιο eppendorf προστίθενται 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (loading buffer), το οποίο περιέχει 50% γλυκερόλη, 0.1% χρωστική bromophenol blue και 0.001 M EDTA, pH=8. Η ηλεκτροφόρηση του DNA πραγματοποιείται σε γέλη αγαρόζης (1,6%) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 x TBE (από 5 x TBE μητρικό ρυθμιστικό διάλυμα 4 M Tris, 0.02 M EDTA pH=8 και 0.4 M βορικό οξύ), η οποία περιέχει επίσης 0.5 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο. Τα δείγματα DNA ηλεκτροφορούνται για 100 λεπτά στα 40 V και ο κατακερματισμός του DNA εμφανίζεται κάτω από το υπεριώδες φως.

6.7 Μελέτη διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης

Για τη μελέτη της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης χρησιμοποιήθηκε το kit "Mitochondria Membrane Potential Kit for Microplate Readers" (Mak 147) της εταιρίας Sigma Aldrich. Στην αρχή γίνεται σπορά των κυττάρων σε ειδικό plate (8.000 κύτταρα/κελί) και τα κύτταρα επωάζονται για 48 ώρες με τις υπό μελέτη ουσίες σε συγκέντρωση ίση με τις τιμές IC₅₀. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό.
- Προστίθενται 100 μl / κελί διαλύματος χρωστικής (προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα της χρωστικής 200 x Mitochondrial Potential Dye σε assay buffer A).
- Επωάζονται τα κύτταρα στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για 30 λεπτά.
- Προστίθενται 50 μl assay buffer B.
- Επωάζεται το plate για 30 min.
- Μετρείται η ένταση του φθορισμού για μήκη κύματος λ_{ex} = 540 nm και λ_{ex} = 590 nm.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ *ex vivo*

7.1 Αλληλεπίδραση των ενώσεων με το DNA:

Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

Για τη μελέτη της συναρμογής των υπό μελέτη συμπλόκων ενώσεων στο DNA παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

α) Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει άλας κιτρικού τρινατρίου σε συγκέντρωση 15 mM και άλας χλωριούχου νατρίου σε συγκέντρωση 150 mM, τελικού όγκου 500 ml με

δισαπεσταγμένο νερό. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος ρυθμίζεται σε τιμή pH=7 με τη βοήθεια διαλύματος NaOH 1M.

β) Μητρικό διάλυμα CT-DNA (calf thymus DNA). Παρασκευάστηκε με την ανάμιξη CT-DNA / δισ. H₂O / Ρυθμιστικού διαλύματος (α) σε αναλογία 1:1:19. Η συγκέντρωση του διαλύματος CT-DNA υπολογίστηκε από την απορρόφηση στο υπεριώδες (UV, 260 nm) μετά από αραίωση 1:20, κάνοντας την παραδοχή ότι η τιμή της ε ισούται με 6600 M⁻¹cm⁻¹ (115).

Γίνεται έλεγχος της καθαρότητας του διαλύματος CT-DNA ως προς την παρουσία πρωτεϊνών με μέτρηση των απορροφήσεων του διαλύματος στα 260 και 280 nm και υπολογισμό του λόγου A₂₆₀ / A₂₈₀, γιατί στα 260 nm απορροφά το DNA, ενώ στα 280 nm απορροφούν οι πρωτεΐνες. Εφόσον η τιμή του λόγου A₂₆₀ / A₂₈₀ υπερβαίνει την τιμή 1,8, τότε θεωρείται ότι το διάλυμα CT-DNA δεν έχει επιμολυνθεί από πρωτεΐνες.

Ελήφθησαν φάσματα UV του διαλύματος CT-DNA (υπό σταθερή συγκέντρωση), με μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις των συμπλόκων ενώσεων r=0-0.02-0.05-0.07-0.10-0.12 (όπου r=[complex] / [DNA] και [DNA]=5x10⁻⁵ M).

Οι εξεταζόμενες σύμπλοκες ενώσεις διαλύθηκαν στο DMSO με αρχική συγκέντρωση 10⁻³ Μ. Για να υπολογιστεί η τιμή της σταθεράς πρόσδεσης k_b των μελετούμενων συμπλόκων ενώσεων, παρασκευάστηκαν διαλύματα των συμπλόκων με μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις του μητρικού διαλύματος CT-DNA r=1-0.5-0.25-0.17-0.125 και 0.1 (όπου r=[complex] / [DNA] και [complex]=10 μM).

7.2 Αλληλεπίδραση των ενώσεων με το DNA: Πείραμα φθορισμομετρίας

Για τη μελέτη της δράσης παρασκευάστηκαν διαλύματα των συμπλόκων 1-5 με τελικές συγκεντρώσεις C = 0.1 – 0.2 – 0.3 – 0.4 – 0.5 – 0.6 μM σε DMSO, ενώ οι συγκεντρώσεις του EB και του CT-DNA παρέμειναν σταθερές ([EB] = 2.3 μM και [CT-DNA] = 26 μM). Για τη λήψη των φασμάτων εκπομπής (550-750 nm) έγινε διέγερση σε μήκος κύματος $\lambda_{max}(exc)$ = 527 nm (μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης του EB-DNA), ενώ η απόσβεση του φθορισμού παρατηρήθηκε σε $\lambda_{max}(em)$ = 588 nm (μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής του EB-DNA).

7.3 Αλληλεπίδραση των ενώσεων με το DNA: Πείραμα ιξωδομετρίας

Το κινηματικό ιξώδες του DNA παρουσία ή απουσία της προς μελέτη ένωσης μετρήθηκε σε ένα γυάλινο τριχοειδές ιξωδόμετρο τύπου Ostwald. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ίδια με το πείραμα της φασματοσκοπίας UV-Vis. Η αρχική συγκέντρωση του CT-DNA υπολογίστηκε με UV-Vis για να ελεγχθεί η καθαρότητα του από πρωτεΐνες. Η τιμή του κινηματικού ιξώδους υπολογίστηκε ως ο μέσος όρος μετρήσεων σε τριπλή επανάληψη σε σταθερή θερμοκρασία (25 °C) (116). Το διάλυμα του CT-DNA (0,1 mM) επωάστηκε με τις ενώσεις ώστε η αναλογία [complex]/[DNA] να είναι r = 0.0-0.04-0.08-0.12-0.16-0.20-0.24-0.28-0.32. Το σχετικό ιξώδες του DNA (η/η₀) σχετίζεται με το μήκος του DNA (L/L₀) μέσω της εξίσωσης: L/L₀ = (η/η₀)^{1/3}, όπου η = ιξώδες DNA παρουσία της ένωσης, η₀ = ιξώδες DNA χωρίς την ένωση, L₀ = μήκος του DNA χωρίς την ένωση . Το ιξώδες η υπολογίζεται ως εξής: η = (t – t₀)/(t₀), όπου t = ο

χρόνος ροής του CT-DNA παρουσία ή απουσία της ένωσης, και t₀ = ο χρόνος ροής του ρυθμιστικού διαλύματος μόνο (117).

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΧΗΜΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

8.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ-Μελέτη περίθλασης ακτίνων Χ (XRD).

Στην παρούσα εργασία προσδιορίστηκαν οι κρυσταλλικές δομές των ligands X-PODT (X- = -H, o-Cl, m-Cl, o-F και p-F) και των νέων συμπλόκων Ag-tpp-X-PODT με την βοήθεια της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ.

Ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής των ligands δείχνει την επικράτηση της θείονο μορφής (-NH-C=S). Αυτό επιβεβαιώνεται από την παρουσία του ατόμου Η στο άτομο N1 και την απόσταση του δεσμού S-C1 που κυμαίνεται από 1.664(3) Å έως 1.641(4) Å και είναι παρόμοια με αυτή που υπολογίστηκε από τους J.D.S. Chaves et al.(103). Στις Εικόνες 28-32 απεικονίζονται τα μοριακά διαγράμματα των ligands, ενώ στους Πίνακες 19 και 20 παρουσιάζονται ορισμένα μήκη δεσμών και γωνίες από την επίλυση των κρυσταλλικών δομών των ligands.



Εικόνα 28: Μοριακό Διάγραμμα ligand H-PODT.



Εικόνα 29: Μοριακό Διάγραμμα ligand o-CI-PODT



Εικόνα 30: Μοριακό Διάγραμμα ligand m-CI-PODT.



Εικόνα 31: Μοριακό Διάγραμμα ligand o-F-PODT.



Εικόνες 32: Μοριακό Διάγραμμα ligand p-F-PODT.

Ένωση	N1-N2	N1-C1	N2-C2	0-C1	O-C2	S-C1	N1-H1
H-PODT	1.383(4)	1.350(4)	1.321(5)	1.312(3)	1.319(2)	1.660(3)	0.860(2)
o-CI-PODT	1.378(3)	1.326(3)	1.286(3)	1.376(3)	1.375(3)	1.664(3)	0.840(3)
m-CI-PODT	1.387(5)	1.335(5)	1.290(6)	1.374(5)	1.377(5)	1.647(5)	0.840(5)
o-F-PODT	1.386(5)	1.329(6)	1.299(5)	1.386(5)	1.375(4)	1.641(4)	0.940(6)
p-F-PODT	1.377(7)	1.322(7)	1.291(6)	1.369(5)	1.376(7)	1.647(6)	0.860(5)

Πίνακας 19: Επιλεγμένα μήκη δεσμών (Å) των ligands

Πίνακας 20: Επιλεγμένες γωνίες δεσμών (°) των ligands.

Ένωση	N-C-S	O-C-S	N2-N1-C	N1-N2-C	C-O-C	N1-C-O	N2-C-O
H-PODT	124.0(3)	128.8(3)	109.6(3)	102.6(3)	107.5(2)	107.3(4)	113.1(3)
o-CI-PODT	130.6(2)	125.2(2)	113.5(2)	103.4(2)	106.5(2)	104.2(2)	112.5(2)
m-CI-PODT	132.0(3)	123.7(3)	113.5(3)	102.5(3)	106.2(3)	104.3(3)	113.4(4)
o-F-PODT	130.9(3)	124.8(3)	113.2(3)	103.5(3)	106.6(3)	104.3(3)	112.3(3)
p-F-PODT	132.1(4)	123.6(4)	113.9(5)	102.7(4)	106.4(4)	104.3(4)	112.6(4)

Επίσης προσδιορίστηκαν οι κρυσταλλικές δομές των νέων συμπλόκων ενώσεων του αργύρου με τα υποκατεστημένα θειονο-οξαδιαζόλια (X-PODT) και την τριφαινυλοφωσφίνη (tpp).

Σε αυτές τις σύμπλοκες ενώσεις το άτομο του Ag συναρμόζεται με το άτομο του S των υποκατεστημένων θειονο-οξαδιαζολίων και με τρία άτομα P των τριών μορίων τριφαινυλοφωσφίνης σχηματίζοντας μια παραμορφωμένη τετραεδρική δομή γύρω από το άτομο του Ag, που οφείλεται κυρίως στα ογκώδη μόρια των τριφαινυλοφωσφινών (118).

Η απόσταση του δεσμού Ag-S στα παρασκευασθέντα σύμπλοκα (1) έως (5) κυμαίνεται από τα 2.573(1) Å έως τα 2.626(2) Å και είναι μικρότερη από τις αντίστοιχες τιμές που έχουν υπολογιστεί σε ανάλογα σύμπλοκα (119,120,121,118) καθώς και από την αναμενόμενη τιμή της απόστασης του απλού δεσμού Ag-S (2.78 Å) (122). Οι αποστάσεις των δεσμών Ag-P κυμαίνονται από τα 2.520(1) Å έως τα 2.611(5) Å και είναι αντίστοιχες με τις τιμές που υπολογίστηκαν σε παρόμοιες κρυσταλλικές δομές συμπλόκων (119,120,121,118).

Η απόσταση του δεσμού C-S στα σύμπλοκα (1) – (5) κυμαίνεται από 1.692(3) Å έως 1.711(2) Å και είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την απόσταση του διπλού δεσμού C=S (1.62 Å) (123) μικρότερη όμως από την απόσταση του απλού δεσμού C-S (1.75 Å) (123), θεωρώντας ότι ο δεσμός C-S στα σύμπλοκα έχει χαρακτήρα μερικού διπλού δεσμού (119).

Παρόμοια απόσταση του δεσμού C-S [1.709(7) Å] υπολογίστηκε και στα σύμπλοκα που παρασκεύασε η J.D.S. Chaves και οι συνεργάτες της (102,103).

Αντίθετα η απόσταση του δεσμού C-S των συμπλόκων (1) – (5) είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την απόσταση του δεσμού C-S [1.666(4) Å] που υπολογίστηκε στην κρυσταλλική δομή του συμπλόκου {[AgCl(CMBZT)(TPTP)₂] (MeOH)} (121).

Οι γωνίες των δεσμών των ατόμων Ρ των τριφαινυλοφωσφινών με το άτομο του Ag κυμαίνονται από 107.3(2)° έως 118.6(3)°, τιμές που είναι σημαντικά μικρότερες από τις αντίστοιχες τιμές σε παρόμοια σύμπλοκα του αργύρου με τριφαινυλοφωσφίνες [121.3(1)°] (119), [129.05(5)°] (121), [123.12(3)°] (118).

Οι γωνίες των δεσμών S-Ag-P των συμπλόκων (1) – (5) εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση: από 114.2(2)° έως 86.4(5)°. Η μέγιστη τιμή της γωνίας S-Ag-P εμφανίζεται στο σύμπλοκο (3) (Ag-tpp-m-Cl-PODT), ενώ οι ελάχιστες τιμές εμφανίζονται στα σύμπλοκα (2) (Ag-tpp-o-Cl-PODT) και (4) (Ag-tpp-o-F-PODT).

Ταυτόχρονα οι τιμές της γωνίας Ag-S-C των συμπλόκων (1) – (5) κυμαίνονται από 106.9(7)° στο σύμπλοκο (3) (Ag-tpp-m-Cl-PODT) έως 116.7(1)° στο σύμπλοκο (4) (Ag-tpp-o-F-PODT) και 117.2 (2)° στο σύμπλοκο (2) (Ag-tpp-o-Cl-PODT). Παρατηρούμε ότι στα σύμπλοκα (2) και (4) οι μεγαλύτερες τιμές της γωνίας Ag-S-C συνδυάζονται με τις μικρότερες τιμές των γωνιών S-Ag-P, ενώ αντίθετα στο σύμπλοκο (3) η ελάχιστη τιμή της γωνίας Ag-S-C συνδυάζεται με τη μέγιστη τιμή των γωνιών S-Ag-P.

Επίσης, οι τιμές της γωνίας Ag-S-C των συμπλόκων (2) (Ag-tpp-o-CI-PODT) και (4) (Ag-tpp-o-F-PODT) είναι σημαντικά μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές της γωνίας Ag-S-C συμπλόκων που εμφανίζουν συναρμογή μέσω ατόμου S με θειονοετεροκυκλικά ligands (126,127,119,128).

Τέλος παρατηρείται ότι η συναρμογή των ligands X-PDOT με τον Ag και την tpp οδηγεί σε μεταβολές σε ορισμένες γωνίες δεσμών των ατόμων του οξαδιαζολίου. Συγκεκριμένα παρατηρείται αύξηση των γωνιών N1-N2-C και N1-C-O και μείωση των γωνιών O-C-S, N2-N1-C και C-O-C.

Συμπερασματικά μπορούμε να αναφέρουμε ότι η γεωμετρία των συμπλόκων (1) – (5) αντιστοιχεί σε παραμορφωμένη τετραεδρική διάταξη γύρω από το κεντρικό άτομο του Ag και οι διακυμάνσεις στις τιμές των γωνιών S-Ag-P και της γωνίας Ag-S-C οφείλονται στη διαφορετική ηλεκτρονική επίδραση των ο- και m- υποκαταστατών του X-PODT(118) καθώς και στο στερικό φαινόμενο των τριφαινυλοφωσφινών (118).

Στους Πίνακες 21α,β &22α,β, παρουσιάζονται επιλεγμένα μήκη δεσμών και γωνίες από την επίλυση των κρυσταλλικών δομών αυτών.

	Ag-S	Ag-P1	Ag-P2	Ag-P3	N1-N2	N1-C1
Ag-tpp-H-PODT	2.612(5)	2.570(7)	2.560(7)	2.533(6)	1.411(3)	1.297(3)
Ag-tpp-o-Cl-PODT	2.622(2)	2.542(2)	2.549(2)	2.520(1)	1.400(1)	1.310(1)
Ag-tpp-m-CI-PODT	2.581(6)	2.611(5)	2.562(7)	2.537(6)	1.416(3)	1.298(3)
Ag-tpp-o-F-PODT	2.626(1)	2.542(9)	2.550(8)	2.525(8)	1.415(6)	1.304(5)
Ag-tpp-p-F-PODT	2.573(1)	2.545(9)	2.567(1)	2.587(8)	1.412(6)	1.309(7)

Πίνακας 21α: Επιλεγμένα μήκη δεσμών (Å) των συμπλόκων.

	N2-C2	0-C1	O-C2	S-C1	CI-C	F-C
Ag-tpp-H-PODT	1.278(3)	1.392(3)	1.361(3)	1.708(2)	-	-
Ag-tpp-o-CI-PODT	1.292(9)	1.372(8)	1.352(8)	1.708(7)	1.739(7)	-
Ag-tpp-m-Cl-	1.290(3)	1.388(2)	1.362(3)	1.711(2)	1.750(3)	-
PODT						
Ag-tpp-o-F-PODT	1.283(5)	1.384(4)	1.361(4)	1.692(3)	-	1.655(4)
Ag-tpp-p-F-PODT	1.285(7)	1.383(6)	1.363(6)	1.708(5)	-	1.380(1)

Πίνακας 21β: Επιλεγμένα μήκη δεσμών (Å) των συμπλόκων.

Πίνακας 22α: Επιλεγμένες γωνίες δεσμών (°) των συμπλόκων.

	S1-Ag-P1	S1-Ag-P2	S1-Ag-P3	Ag-S1-C	P1-Ag-P2	P1-Ag-P3	P2-Ag-P3
Ag-tpp-H-PODT	110.5(2)	97.6(2)	112.4(2)	109.1(7)	107.3(2)	112.4(2)	112.4(2)
Ag-tpp-o-CI-PODT	113.6(6)	86.4(5)	112.1(6)	117.2(2)	112.8(5)	111.9(5)	111.9(5)
Ag-tpp-m-Cl-PODT	101.1(2)	101.0(2)	114.2(2)	106.9(7)	109.9(2)	113.4(2)	113.4(2)
Ag-tpp-o-F-PODT	113.9(3)	86.6(3)	111.4(3)	116.7(1)	122.3(3)	111.9(3)	111.9(3)
Ag-tpp-p-F-PODT	110.2(4)	101.3(4)	105.6(4)	108.0(2)	114.6(3)	113.8(3)	113.8(3)

	N1-C-S	O-C-S	N2-N1-C	N1-N2-C	C-O-C	N1-C-O	N2-C-O
Ag-tpp-H-PODT	129.4(2)	120.4(1)	107.3(2)	106.6(2)	103.5(2)	110.1(2)	112.5(2)
Ag-tpp-o-Cl-PODT	128.2(5)	120.7(5)	107.0(7)	106.2(6)	103.5(5)	111.1(6)	112.2(5)
Ag-tpp-m-Cl-PODT	129.5(2)	119.4(1)	106.9(2)	106.0(2)	102.9(2)	113.0(2)	111.1(2)
Ag-tpp-o-F-PODT	129.0(3)	120.5(3)	106.7(4)	106.8(4)	103.8(3)	110.4(3)	112.3(3)
Ag-tpp-p-F-PODT	129.1(4)	120.1(3)	106.4(4)	106.4(4)	103.4(3)	110.8(4)	112.6(4)

Πίνακας 22β: Επιλεγμένες γωνίες δεσμών (ο) των συμπλόκων.

Στις Εικόνες 33-37 απεικονίζονται τα μοριακά διαγράμματα των συμπλόκων (1) -

(5).



Εικόνα 33: Μοριακό Διάγραμμα του συμπλόκου Ag-tpp-H-PODT.


Εικόνα 34: Μοριακό Διάγραμμα του συμπλόκου Ag-tpp-o-CI-PODT.



Εικόνα 35: Μοριακό Διάγραμμα του συμπλόκου Ag-tpp-m-Cl-PODT.



Εικόνα 36: Μοριακό Διάγραμμα του συμπλόκου Ag-tpp-o-F-PODT



Εικόνα 37: Μοριακό Διάγραμμα του συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT.

8.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ- ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ FT-IR

Τα νέα σύμπλοκα χαρακτηρίστηκαν σε στερεά κατάσταση και με φασματοσκοπία υπερύθρου.

Τα φάσματα FT-IR των συμπλόκων ενώσεων και των ligands αυτών καταγράφηκαν στην περιοχή 4000-400 cm⁻¹ και σε αυτά κυριαρχούν οι χαρακτηριστικές κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις των δεσμών των θειοαμιδίων, οι οποίες εμφανίζονται μετατοπισμένες σε κάθε σύμπολοκη ένωση υποδεικνύοντας έτσι τη συναρμογή του ligand με τον άργυρο μέσω της αντίστοιχης θειόνης. Επίσης, υπάρχουν οι ισχυρές δονητικές κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις του δεσμού P-C της τριφαινυλοφωσφίνης που εμφανίζονται στα φάσματα FT-IR των συμπλόκων και υποδηλώνουν την ύπαρξη της τριφαινυλο-φωσφίνης στο μόριο του συμπλόκου ένωσης.

Σύμφωνα με τους B. Singh et al (126) οι θειοαμιδικές ζώνες, που οφείλονται στις δομές συντονισμού που παρουσιάζουν τα θειοαμίδια (HNCS) λόγω της ταυτομέρειας θειόνης-θειόλης (HN=C=S ↔ N=C-SH), είναι οι εξής:

 Η θειοαμιδική ζώνη Ι αποτελείται από τις απορροφήσεις που οφείλονται στη δόνηση κάμψης του δεσμού Ν-Η, τη δόνηση κάμψης του δεσμού C-Η και τη δόνηση τάσης του δεσμού C=N (δ CH + δ NH + v C=N).

 Η θειοαμιδική ζώνη ΙΙ αποτελείται από τις απορροφήσεις που οφείλονται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-N, τη δόνηση κάμψης του δεσμού N-H, τη δόνηση

κάμψης του δεσμού C-H και τη δόνηση τάσης του δεσμού C=S (v C-N + δ NH + δ CH + v C=S).

 Η θειοαμιδική ζώνη ΙΙΙ αποτελείται από τις απορροφήσεις που οφείλονται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-N και τη δόνηση τάσης του δεσμού C=S (v C-N + v C=S) (127).

 Η θειοαμιδική ζώνη ΙV αποτελείται από την απορρόφηση που αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C=S (v C=S).

Το φάσμα IR του συμπλόκου Ag-tpp-H-PODT (1) παρουσιάζει απορροφήσεις στα 1550 cm⁻¹ και 1311 cm⁻¹, οι οποίες αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-N του θειοαμιδίου (θειοαμιδικές I και II), ενώ οι κορυφές στα 952 cm⁻¹ και 690 cm⁻¹ αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης του δεσμού C=S του θειοαμιδίου (θειοαμιδικές III και IV).

Οι αντίστοιχες θειοαμιδικές ζώνες Ι και ΙΙ για τον ελεύθερο υποκαταστάτη (ligand) Η-ΡΟDΤ εμφανίζονται στα 1570 cm⁻¹ και 1275 cm⁻¹, ενώ οι θειοαμιδικές ζώνες ΙΙΙ και ΙV εμφανίζονται στα 967 cm⁻¹ και 746 cm⁻¹ (118,128).

Επίσης, τόσο στο φάσμα ΙR του συμπλόκου Ag-tpp-H-PODT, όσο και στο φάσμα του ligand HPODT δεν υπάρχουν απορροφήσεις που να αντιστοιχούν στη δόνηση τάσης του δεσμού S-H, γεγονός που υποδηλώνει ότι τόσο στο ligand όσο και στο σύμπλοκο επικρατεί σχεδόν αποκλειστικά η δομή της θειόνης (-NC=S) (107).

Άλλο ένα χαρακτηριστικό του φάσματος του συμπλόκου Ag-tpp-H-PODT είναι οι έντονες απορροφήσεις στα 1014 cm⁻¹ (ασύμμετρη) και 499 cm⁻¹ (συμμετρική), οι οποίες οφείλονται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-P και δείχνουν την παρουσία της

τριφαινυλοφωσφίνης (tpp) στο μόριο του συμπλόκου Ag-tpp-H-PODT, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την κρυσταλλική δομή αυτού (121,128).

Τέλος, η απορρόφηση που εμφανίζει το σύμπλοκο Ag-tpp-H-PODT στα 440 cm⁻¹ αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του δεσμού μετάλλου-θείου (v M-S) και επιβεβαιώνει τη συναρμογή του ligand HPODT με το μέταλλο (Ag) μέσω του ατόμου του θείου (108).



Εικόνα 38:Φάσμα IR ligand H-PODT.



Εικόνα 39: Φάσμα ΙR συμπλόκου Ag-tpp-H-PODT (1).

Το φάσμα IR του συμπλόκου Ag-tpp-o-CI-PODT(2) παρουσιάζει απορροφήσεις στα 1543 cm⁻¹ και 1315 cm⁻¹, οι οποίες αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-N του θειοαμιδίου (θειοαμιδικές I και II), ενώ οι κορυφές στα 941 cm⁻¹ και 691 cm⁻¹ αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης του δεσμού C=S του θειοαμιδίου (θειοαμιδικές III και IV) (118,128).

Οι αντίστοιχες θειοαμιδικές ζώνες Ι και ΙΙ για τον ελεύθερο υποκαταστάτη (ligand) ο-CI-PODT εμφανίζονται στα 1564 cm⁻¹ και 1280 cm⁻¹, ενώ οι θειοαμιδικές ζώνες ΙΙΙ και ΙV εμφανίζονται στα 949 cm⁻¹ και 747 cm⁻¹ αντίστοιχα.

Επίσης, τόσο στο φάσμα ΙR του συμπλόκου Ag-tpp-o-CI-PODT, όσο και στο φάσμα IR του ligand o-CI-PODT δεν υπάρχουν απορροφήσεις που να αντιστοιχούν στη δόνηση τάσης του δεσμού S-H (vS-H), επιβεβαιώνοντας ότι τόσο στο σύμπλοκο όσο και στο ligand επικρατεί σχεδόν αποκλειστικά η δομή της θειόνης (-NC=S) έναντι της θειόλης (-C-SH)(107).

Άλλο ένα χαρακτηριστικό του φάσματος IR του συμπλόκου Ag-tpp-o-Cl-PODT είναι οι ισχυρές απορροφήσεις στα 1028 cm⁻¹ (ασύμμετρη) και 502 cm⁻¹ (συμμετρική), οι οποίες οφείλονται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-P και δείχνουν την παρουσία της τριφαινυλοφωσφίνης (tpp) στο μόριο του συμπλόκου Ag-tpp-o-Cl-PODT, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου (121,128). Τέλος, η απορρόφηση που εμφανίζει το σύμπλοκο Ag-tpp-o-Cl-PODT (2) στα 475 cm⁻¹ αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του δεσμού μετάλλου-θείου (v M-S) και επιβεβαιώνει τη συναρμογή του ligand o-Cl-PODT με το μέταλλο (Ag) μέσω του ατόμου του θείου (108).







Εικόνα 41: Φάσμα ΙR συμπλόκου Ag-tpp-o-CI-PODT (2).

Το φάσμα IR του συμπλόκου Ag-tpp-m-CI-PODT (3) εμφανίζει απορροφήσεις στα 1543 cm⁻¹ και 1344 cm⁻¹, που αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-N του θειοαμιδίου (θειοαμιδικές I και II), ενώ οι κορυφές στα 947 cm⁻¹ και 689 cm⁻¹ αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης του δεσμού C=S του θειοαμιδίου (θειοαμιδικές III και IV). Οι αντίστοιχες θειοαμιδικές ζώνες I και II για τον ελεύθερο υποκαταστάτη (ligand) m-CI-PODT εμφανίζονται μετατοπισμένες στα 1563 cm⁻¹ και 1309 cm⁻¹, ενώ οι θειοαμιδικές ζώνες III και IV εμφανίζονται στα 969 cm⁻¹ και 747 cm⁻¹ αντίστοιχα (118,128).

Επίσης, τόσο στο φάσμα ΙR του συμπλόκου Ag-tpp-m-Cl-PODT, όσο και στο φάσμα IR του ligand m-Cl-PODT δεν υπάρχουν απορροφήσεις που να αντι-στοιχούν στη δόνηση τάσης του δεσμού S-H (vS-H), επιβεβαιώνοντας ότι τόσο στο σύμπλοκο όσο και στο ligand επικρατεί σχεδόν αποκλειστικά η δομή της θειόνης (-NC=S) (107).

Άλλο ένα χαρακτηριστικό του φάσματος ΙR του συμπλόκου Ag-tpp-m-Cl-PODT είναι οι ισχυρές απορροφήσεις στα 1025 cm⁻¹ (ασύμμετρη) και 502 cm⁻¹ (συμμετρική), οι οποίες οφείλονται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-P (vC-P) και δείχνουν την παρουσία της τριφαινυλοφωσφίνης (tpp) στο μόριο του συμπλόκου Ag-tpp-m-Cl-PODT, όπως επιβεβαιώνεται και από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου (121,128).Τέλος, η απορρόφηση που εμφανίζει το σύμπλοκο Ag-tpp-m-Cl-PODT (3) στα 440 cm⁻¹ αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του δεσμού μετάλλου-θείου (vM-S) και επιβεβαιώνει τη συναρμογή του ligand m-Cl-PODT με το μέταλλο (Ag) μέσω του ατόμου του θείου (108).



Εικόνα 42: Φάσμα IR ligand m-CI-PODT.



Εικόνα 43: Φάσμα ΙR συμπλόκου Ag-tpp-m-CI-PODT (3).

Το φάσμα IR του συμπλόκου Ag-tpp-o-F-PODT (4) εμφανίζει απορροφήσεις στα 1558 cm⁻¹ και 1308 cm⁻¹, οι οποίες αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-N (v C=N) του θειοαμιδίου (θειοαμιδικές I και II), ενώ οι απορροφήσεις στα 923 cm⁻¹ και 689 cm⁻¹ αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης του δεσμού C=S του θειοαμιδίου (θειοαμιδικές III και IV). Οι αντίστοιχες θειοαμιδικές ζώνες I και II για τον ελεύθερο υποκαταστάτη (ligand) ο-F-PODT εμφανίζονται μετατοπισμένες στα 1599 cm⁻¹ και 1284 cm⁻¹, ενώ οι θειοαμιδικές ζώνες III και IV εμφανίζονται στα 961 cm⁻¹ και 760 cm⁻¹ αντίστοιχα (118,128).

Επίσης, τόσο στο φάσμα ΙR του συμπλόκου Ag-tpp-o-F-PODT, όσο και στο φάσμα IR του ligand o-F-PODT δεν υπάρχουν απορροφήσεις που να αντιστοι-χούν στη δόνηση τάσης του δεσμού S-H (v S-H), γεγονός που επιβεβαιώνει ότι τόσο στο σύμπλοκο όσο και στο ligand επικρατεί σχεδόν αποκλειστικά η δομή της θειόνης (-NC=S) (107).

Άλλο ένα χαρακτηριστικό του φάσματος ΙR του συμπλόκου Ag-tpp-o-F-PODT είναι οι ισχυρές απορροφήσεις στα 1025 cm⁻¹ (ασύμμετρη) και 502 cm⁻¹ (συμμε-τρική), οι οποίες οφείλονται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-P (vC-P) και δείχνουν την παρουσία της τριφαινυλοφωσφίνης (tpp) στο μόριο του συμπλόκου Ag-tpp-o-F-PODT, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου (121,128).Τέλος, η απορρόφηση που εμφανίζει το σύμπλοκο Ag-tpp-o-F-PODT(4) στα 422 cm⁻¹ αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του δεσμού μετάλλου-θείου (vM-S) και επιβεβαιώνει τη συναρμογή του ligand o-F-PODT με το μέταλλο (Ag) μέσω του ατόμου του θείου (108).



Εικόνα 44: Φάσμα IR ligand o-F-PODT.



Εικόνα 45: Φάσμα IR συμπλόκου Ag-tpp-o-F-PODT (4).

Το φάσμα ΙR του συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT (5) εμφανίζει απορροφήσεις στα 1580 cm⁻¹ και 1308 cm⁻¹, που αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-N (v C=N) του θειοαμιδίου (θειοαμιδικές Ι και ΙΙ), ενώ οι απορροφήσεις στα 949 cm⁻¹ και 691 cm⁻¹ αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης του δεσμού C=S του θειοαμιδίου (θειοαμιδικές III και IV). Οι αντίστοιχες θειοαμιδικές ζώνες Ι και ΙΙ για τον ελεύθερο υποκαταστάτη (ligand) p-F-PODT εμφανίζονται μετατοπισμένες στα 1602 cm⁻¹ και 1281 cm⁻¹, ενώ οι θειοαμιδικές ζώνες ΙΙΙ και IV εμφανίζονται στα 964 cm⁻¹ και 764 cm⁻¹ αντίστοιχα (118,128).

Επίσης, τόσο στο φάσμα ΙR του συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT, όσο και στο φάσμα IR του ligand p-F-PODT δεν υπάρχουν απορροφήσεις που να αντιστοιχούν στη δόνηση τάσης του δεσμού S-H (vS-H), γεγονός που επιβεβαιώνει ότι τόσο στο σύμπλοκο όσο και στο ligand επικρατεί σχεδόν αποκλειστικά η δομή της θειόνης (-NC=S) (107).

Άλλο ένα χαρακτηριστικό του φάσματος ΙR του συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT είναι οι ισχυρές απορροφήσεις στα 1025 cm⁻¹ (ασύμμετρη) και 511 cm⁻¹ (συμμετρική), οι οποίες οφείλονται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-P (v C-P) και δείχνουν την παρουσία της τριφαινυλοφωσφίνης (tpp) στο μόριο του συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου (121,128). Τέλος, η απορρόφηση που εμφανίζει το σύμπλοκο Ag-tpp-p-F-PODT(5) στα 422 cm⁻¹ αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του δεσμού μετάλλου-θείου (v M-S) και επιβεβαιώνει τη συναρμογή του ligand p-F-PODT με το μέταλλο (Ag) μέσω του ατόμου του θείου (108).



Εικόνα 46: Φάσμα IR ligand p-F-PODT.



Εικόνα 47: Φάσμα ΙR συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT (5).



Εικόνα 48: Φάσμα IR Triphenylphosphine (tpp).

8.3. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ- ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ¹Η NMR

Τα φάσματα NMR πρωτονίου (¹Η NMR) για τα σύμπλοκα 1-5, τα ligands a-e και την τριφαινυλοφωσφίνη (tpp) λήφθηκαν σε διαλύτη DMSO-d₆.

Για το σύμπλοκο (1) (Ag-tpp-H-PODT) (Εικόνα 49) καταγράφεται η ύπαρξη σημάτων συντονισμού των αρωματικών πρωτονίων της φαινυλοομάδας του Η-PODT στην περιοχή 7.466-7.388 ppm, είναι δηλαδή μετατοπισμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα πρωτόνια του ligand H-PODT που συντονίζονται στην περιοχή 7.900-7.579 ppm (132,133).

Επιπλέον, τα σήματα συντονισμού των αρωματικών πρωτονίων των φαινυλομάδων της tpp εμφανίζουν μικρή μετατόπιση από την περιοχή 7.378-7.171 ppm, στην περιοχή 7.352-7.242 ppm, υποδηλώνοντας την παρουσία των φαινυλομάδων της τριφαινυλοφωσφίνης στο μόριο του συμπλόκου (1) (134).



Εικόνα 49: Φάσματα ¹Η-NMR συμπλόκου (1) –ligand – tpp σε DMSO-d₆.

Για το σύμπλοκο (2) (Ag-tpp-o-CI-PODT) (Εικόνα 50) παρατηρούμε ότι τα σήματα συντονισμού των αρωματικών πρωτονίων της φαινυλομάδας του συμπλόκου (2) (7.572-7.423 ppm), είναι μετατοπισμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα πρωτόνια του ligand (o-CI-PODT) (7.932-7.548 ppm) (132,133).

Επίσης, τα σήματα συντονισμού των αρωματικών πρωτονίων των φαινυλομάδων της tpp εμφανίζουν μικρή μετατόπιση από την περιοχή 7.378-7.171 ppm, στην περιοχή 7.387-7.321 ppm, επιβεβαιώνοντας την παρουσία των φαινυλομάδων της τριφαινυλοφωσφίνης στο μόριο του συμπλόκου (2) (134).



Εικόνα 50: Φάσματα ¹H-NMR συμπλόκου (2) – ligand – tpp σε DMSO-d₆.

Στο σύμπλοκο (3) (Ag-tpp-m-CI-PODT) (Εικόνα 51) παρατηρούμε ότι τα σήματα συντονισμού των αρωματικών πρωτονίων της φαινυλομάδας του ligand (m-CI-PODT) (7.852-7.607 ppm), είναι μετατοπισμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα πρωτόνια του συμπλόκου (3) (7.651-7.356 ppm) (132,133).

Επιπλέον, τα σήματα συντονισμού των αρωματικών πρωτονίων των φαινυλομάδων της tpp εμφανίζουν μικρή μετατόπιση από την περιοχή 7.378-7.171 ppm, στην περιοχή 7.333-7.240 ppm, επιβεβαιώνοντας την παρουσία των φαινυλομάδων της τριφαινυλοφωσφίνης στο μόριο του συμπλόκου (3) (134).



Εικόνα 51: Φάσματα ¹Η-NMR συμπλόκου (3) – ligand – tpp σε DMSO-d₆.

Το σύμπλοκο (4) (Ag-tpp-o-F-PODT) (Εικόνα 52) εμφανίζει σήματα συντονισμού των αρωματικών πρωτονίων της φαινυλομάδας του συμπλόκου στην περιοχή 7.652-7.386 ppm, εμφανώς μετατοπισμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα σήματα συντονισμού των πρωτονίων του ligand (o-F-PODT) (7.928-7.408 ppm) (132,133).

Τα σήματα συντονισμού των αρωματικών πρωτονίων των φαινυλομάδων της tpp εμφανίζουν μικρή μετατόπιση από την περιοχή 7.378-7.171 ppm, στην περιοχή 7.325-7.121 ppm, που σημαίνει την παρουσία των φαινυλομάδων της τριφαινυλοφωσφίνης στο μόριο του συμπλόκου (4) (134).



Εικόνα 52: Φάσματα ¹H-NMR συμπλόκου (4) – ligand – tpp σε DMSO-d₆.

Στο σύμπλοκο (5) (Ag-tpp-p-F-PODT) (Εικόνα 53) εμφανίζεται μετατόπιση των σημάτων συντονισμού των αρωματικών πρωτονίων της φαινυλομάδας του συμπλόκου στην περιοχή 7.507-7.393 ppm, σε σχέση με τα αντίστοιχα σήματα συντονισμού των πρωτονίων του ligand (p-F-PODT) (7.969-7.418 ppm) (132,133).

Τέλος, τα σήματα συντονισμού των αρωματικών πρωτονίων των φαινυλομάδων της tpp εμφανίζουν μικρή μετατόπιση από την περιοχή 7.378-7.171 ppm, στην περιοχή 7.349-7.156 ppm, πράγμα που επιβεβαιώνει την παρουσία των φαινυλομάδων της τριφαινυλοφωσφίνης στο μόριο του συμπλόκου (5) (134).



Συμπερασματικά, από τα δεδομένα των μετρήσεων ¹Η NMR και τη μετατόπιση των σημάτων συντονισμού των αρωματικών πρωτονίων σε μικρότερες τιμές, προκύπτει ότι η συναρμογή των ligands και του Ag γίνεται μέσω του ατόμου S της θειονοομάδας, ενώ το N-H πρωτόνιο του 1,3,4-οξαδιαζολίου δεν εμφανίζεται στο φάσμα ¹H NMR, γιατί δεν μπορεί να μετρηθεί λόγω ταχείας αντικατάστασης από το δευτέριο του διαλύτη DMSO-d₆ (φαινόμενο fast exchange). Στις εικόνες 54-58 παρουσιάζεται η απόδοση των σημάτων συντονισμού ¹H-NMR των νέων συμπλόκων (1)-(5).



Εικόνα 54: Απόδοση σημάτων συντονισμού ¹Η-ΝΜR του συμπλόκου Ag-tpp-Η-PODT. Με τα γράμματα a,b,c,a',b' σημειώνονται τα πρωτόνια που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή.



Εικόνα 55: Απόδοση σημάτων συντονισμού ¹Η-ΝΜR του συμπλόκου Ag-tpp-o-Cl-PODT. Με τα γράμματα a,b,c,d,a',b' σημειώνονται τα πρωτόνια που αντιστοι-χούν σε κάθε κορυφή.



Εικόνα 56: Απόδοση σημάτων συντονισμού ¹Η-ΝΜR του συμπλόκου Ag-tpp-m-Cl-PODT. Με τα γράμματα a,b,c,d,a',b' σημειώνονται τα πρωτόνια που αντιστοι-χούν σε κάθε κορυφή.



Εικόνα 57: Απόδοση σημάτων συντονισμού ¹Η-ΝΜR του συμπλόκου Ag-tpp-o-F-PODT. Με τα γράμματα a,b,c,d,a',b' σημειώνονται τα πρωτόνια που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή.



Εικόνα 58: Απόδοση σημάτων συντονισμού ¹Η-ΝΜR του συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT. Με τα γράμματα a,b,a',b' σημειώνονται τα πρωτόνια που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή.

8.4. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ- UV-Vis ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης ε (cm-¹M⁻¹) είναι χαρακτηριστικός για κάθε ένωση σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος και υπολογίζεται από την εξίσωση του νόμου Lambert-Beer για αραιά διαλύματα: A = ε x b x Cόπου A = απορρόφηση, C = συγκέντρωση του διαλύματος (M), b = μήκος κυψελίδας (1cm). Στον πίνακα 23 αναγράφονται οι τιμές του συντελεστή μοριακής απορρόφησης επου υπολογίστηκαν στα μέγιστα μήκη κύματος λ_{max} των συμπλόκων και των ligands.Πίνακας 23: Υπολογισμός των ε (cm⁻¹·M⁻¹) των συμπλόκων ενώσεων και των ligands.

ΕΝΩΣΗ	λ_{max}	Απορρόφηση	Συγκέντρωση	ε (cm⁻¹⋅M⁻¹)
	(nm)	(A)	(M)	
Ag-tpp- H-PODT	260	0,7984	10 ⁻⁵	79840
	307	0,3030	10 ⁻⁵	30300
Ag-tpp- o-CI-PODT	263	0,7897	10 ⁻⁵	78970
	303	0,2901	10 ⁻⁵	29010
Ag-tpp- m-CI-PODT	261	1,1290	10 ⁻⁵	112900
	309	0,4133	10 ⁻⁵	41330
Ag-tpp- o-F-PODT	261	0,8868	10 ⁻⁵	88680
	301	0,3205	10 ⁻⁵	32050
Ag-tpp- p-F-PODT	261	0,7735	10 ⁻⁵	77350
	301	0,3481	10 ⁻⁵	34810
H-PODT	307	1,6643	10-4	16643
o-CI-PODT	302	1,3980	10-4	13980
m-CI-PODT	309	1,7245	10-4	17245
o-F-PODT	301	1,3533	10-4	13533
p-F-PODT	301	1,2459	10-4	12459
tpp	262	1,4032	10-4	14032

Στις Εικόνες 59-63 απεικονίζονται τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis των συμπλόκων

ενώσεων (1-5), των αντίστοιχων ligands και της τριφαινυλο-φωσφίνης (tpp) σε διάλυμα DMSO.



Εικόνα 59: Φάσμα UV-Vis των Ag-tpp-H-PODT (1), Η-PODT και tpp σε διάλυμα





Εικόνα 60: Φάσμα UV-Vis των Ag-tpp-o-CI-PODT(2), o-CI-PODT και tpp σε διάλυμα DMSO.



Εικόνα 61: Φάσμα UV-Vis των Ag-tpp-m-CI-PODT(3), m-CI-PODT και tpp σε διάλυμα DMSO.



Εικόνα 62: Φάσμα UV-Vis των Ag-tpp-o-F-PODT(4), o-F-PODT και tpp σε διάλυμα DMSO.





Η τριφαινυλοφωσφίνη εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης σε μήκος κύματος λmax = 262 nm που οφείλεται σε μεταπτώσεις (π* \leftarrow π) με ε = 14032 cm⁻¹·M⁻¹. Αυτή η ζώνη απορρόφησης παρατηρείται και στα φάσματα των συμπλόκων (Ag-tpp-H-PODT, λ_{max} = 260 nm, Ag-tpp-o-Cl-PODT, λ_{max} = 263 nm, Ag-tpp-m-Cl-PODT, λ_{max} = 260 nm, Ag-tpp-o-F-PODT, λ_{max} = 261 nm, Ag-tpp-p-F-PODT, λ_{max} = 261 nm) με τιμές ε από 77350-112900 cm⁻¹·M⁻¹, οι οποίες αποδίδονται σε μεταπτώσεις (π* \leftarrow π) του μορίου της τριφαινυλοφωσφίνης εντός του σχηματιζόμενου μορίου των συμπλόκων ενώσεων (129,131).

Τα φάσματα UV-Vis των ligands εμφανίζουν μέγιστο απορρόφησης από τα 301 nm έως τα 309 nm με τιμές ε = 12459-17245 cm^{-1.}M⁻¹ λόγω της διέγερσης των π ηλεκτρονίων του βενζολικού δακτυλίου του μορίου των ligands. Όπως προκύπτει από τον πίνακα 23, οι τιμές των συντελεστών μοριακής απορρόφησης των συμπλόκων (1-5) είναι πολύ μεγαλύτερες σε σχέση με αυτές των ελευθέρων ligands, επιβεβαιώνοντας έτσι το σχηματισμό των συμπλόκων.

8.5. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ

Η μελέτη σταθερότητας πραγματοποιήθηκε προκειμένου να διαπιστωθεί ότι τα σύμπλοκα 1-5 παραμένουν σταθερά και δεν διασπώνται. Η σταθερότητα αυτών ελέγχθηκε με τη χρήση φασματοσκοπίας UV-Vis σε διάλυμα DMSO και με φασματοσκοπία ¹Η NMR σε διάλυμα DMSO-d₆ για χρονικό διάστημα 0 και 48 ώρες. Οι χρόνοι αυτοί επιλέχθηκαν γιατί τα βιολογικά πειράματα απαιτούν 24 ή 48 ώρες επώασης με τις μελετούμενες ενώσεις. Τα αποτελέσματα του ελέγχου σταθερότητας με UV-Vis φασματοσκοπία παρουσιάζονται στις Εικόνες 64-68.



Εικόνα 64: Φάσμα σταθερότητας UV-Vis του συμπλόκου Ag-tpp-H-PODT σε 0 & 48 ώρες.


Εικόνα 65: Φάσμα σταθερότητας UV-Vis του συμπλόκου Ag-tpp-o-CI-PODT σε 0 και

48 ώρες.



Εικόνα 66: Φάσμα σταθερότητας UV-Vis του συμπλόκου Ag-tpp-m-CI-PODT σε 0 και 48 ώρες.



Εικόνα 67: Φάσμα σταθερότητας UV-Vis του συμπλόκου Ag-tpp-o-F-PODT σε 0 και 48 ώρες.



Εικόνα 68: Φάσμα σταθερότητας UV-Vis του συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT σε 0 και 48 ώρες.

Τα σύμπλοκα 1-5 βρέθηκαν να είναι σταθερά σε διάλυμα DMSO μέχρι και 48 ώρες μετά τη λήψη του πρώτου φάσματος, χωρίς σημαντική μεταβολή της απορρόφησης στο μήκος κύματος λ_{max}=262 nm.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου σταθερότητας με φασματοσκοπία ¹Η NMR παρουσιάζονται στις Εικόνες 69-73.



Εικόνα 69: Φάσμα σταθερότητας ¹Η-ΝΜR του συμπλόκου Ag-tpp-Η-PODT σε 0 και 48 ώρες.



Εικόνα 70: Φάσμα σταθερότητας ¹Η-ΝΜR του συμπλόκου Ag-tpp-o-Cl-PODT σε 0 και 48 ώρες.



Εικόνα 71: Φάσμα σταθερότητας ¹Η-ΝΜR του συμπλόκου Ag-tpp-m-Cl-PODT σε 0 και 48 ώρες.



Εικόνα 72: Φάσμα σταθερότητας ¹Η-ΝΜR του συμπλόκου Ag-tpp-o-F-PODT σε 0 και 48 ώρες.



Εικόνα 73: Φάσμα σταθερότητας ¹Η-ΝΜR του συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT σε 0 και 48 ώρες.

Στα φάσματα ¹Η-ΝΜR των συμπλόκων 1-5 δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στις μετατοπίσεις (δ, ppm), ούτε στα σήματα συντονισμού πρωτονίων, γεγονός που αποδεικνύει την σταθερότητα των συμπλόκων σε διάλυμα DMSO-d₆ μέχρι και 48 ώρες μετά τη λήψη του πρώτου φάσματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

9.1. ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ (SRB)

Η αντιπολλαπλασιαστική δράση των νέων συμπλόκων 1-5 ελέγχθηκε έναντι 2 καρκινικών σειρών του μαστού. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7 (κύτταρα που είναι θετικά στους υποδοχείς ορμονών ERs+ και η καρκινική κυτταρική σειρά MDA-MB-231 (κύτταρα που δεν φέρουν υποδοχείς ορμονών ERs-) (135,136,137,146).

Η εύρεση των τιμών IC₅₀ (τιμή της συγκέντρωσης της εξεταζόμενης ουσίας που μειώνει την ανάπτυξη των κυττάρων στο 50%) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου της Sulforodamine B (SRB assay), μετά από επώαση των καρκινικών κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των εξεταζόμενων συμπλόκων για χρονικό διάστημα 48 ωρών (139,162,163).

Οι τιμές ΙC₅₀ των συμπλόκων 1-5, που υπολογίστηκαν έναντι των δύο καρκινικών σειρών περιέχονται στον Πίνακα 24.

	IC ₅₀ (µM)		Cisplatin/ Σύμπλοκο	
ΣΥΜΠΛΟΚΟ/Ligand	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231
Ag-tpp-H-PODT	2.03±0.09	4.09±0.17	2.5	6.5
Ag-tpp-o-CI-PODT	3.00±1.15	4.27±0.15	1.8	6.3
Ag-tpp-m-CI-PODT	1.69±0.08	3.55±0.19	3.3	7.5
Ag-tpp-o-F-PODT	2.50±0.19	3.90±0.14	2.2	6.8
Ag-tpp-p-F-PODT	2.15±0.16	2.52±0.07	2.6	10.6
H-PODT	>30	>30	-	-
o-CI-PODT	>30	>30	-	-
m-CI-PODT	>30	>30	-	-
o-F-PODT	>30	>30	-	-
p-F-PODT	>30	>30	-	-
Cisplatin	5.5 ± 0.40	26.7 ± 1.1	-	-

Πίνακας 24: Τιμές IC₅₀ των συμπλόκων έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών του μαστού.

Από τα αποτελέσματα, αποδεικνύεται ότι τα σύμπλοκα 1-5 παρουσιάζουν ισχυρή αντικαρκινική δράση έναντι των δύο καρκινικών σειρών του μαστού που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα τα σύμπλοκα εμφανίζουν ισχυρή αντικαρκινική δράση έναντι των καρκινικών σειρών του μαστού, με τιμές IC₅₀ 3.00±1.15 μM έως 1.69±0.08 μM έναντι των κυττάρων MCF-7 και 4.27±0.15 μM έως 2.52±0.07 μM έναντι των κυττάρων MDA- MB-231. Τα υποκατεστημένα θείονο-οξαδιαζόλια (ligands) δεν εμφανίζουν αντικαρκινική δράση στις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν (IC₅₀> 30 μM).

Από τα σύμπλοκα που συντέθηκαν, το Ag-tpp-m-Cl-PODT παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση έναντι των κυττάρων MCF-7 (1.69±0.08 μM), ενώ το Ag-tpp-p-F-PODT παρουσιάζει την εντονότερη αντικαρκινική δράση έναντι των κυττάρων MDA-MB-231 (2.52±0.07 μM).

Συγκριτικά με τη δράση του cisplatin έναντι των ελεγχόμενων κυτταρικών σειρών τα σύμπλοκα 1-5 έχουν ισχυρότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση. Συγκεκριμένα για τη σειρά των κυττάρων MCF-7 τα σύμπλοκα 1-5 έχουν κατά 3.2 -1.8 φορές ισχυρότερη δράση από το cisplatin. Για τα κύτταρα MDA-MB-231 τα σύμπλοκα 1-5 εμφανίζουν ισχυρότερη δράση από το cisplatin κατά 10.6- 6.3 φορές (Πίνακας 24).

9.2. In vitro ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ

Η τοξικότητα των νέων συμπλόκων μελετήθηκε *in vitro* σε φυσιολογικούς ανθρώπινους εμβρυϊκούς ινοβλάστες πνευμόνων (MRC-5) με χρήση της μεθόδου της Sulforodamine B (SRB)(139).

Οι τιμές IC₅₀ των νέων συμπλόκων, που υπολογίστηκαν μετά από επώαση 48 ωρών των κυττάρων MRC-5 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των ενώσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 25. Όπως προκύπτει, οι τιμές IC₅₀ των συμπλόκων 1-5 είναι 3.77±0.16 μM (Ag-tpp-H-PODT), 4.07±0.24 μM (Ag-tpp-o-CI-PODT), 2.89±0.08 μM (Ag-tpp-m-CI-PODT), 3.12±0.11 μM (Ag-tpp-o-F-PODT) και 2.72±0.19 μM (Ag-tppp-F-PODT). Ως TPI (therapeutic potency index-TPI) ορίζεται η τιμή IC₅₀ έναντι των φυσιολογικών κυττάρων ως προς την αντίστοιχη τιμή IC₅₀ έναντι καρκινικών κυττάρων παρόμοιου ιστού (139,164,165). Ο θεραπευτικός δείκτης TPI χρησιμοποιείται για να μελετηθεί η εκλεκτικότητα μιας νέας ένωσης έναντι των καρκινικών κυττάρων. Όσο μεγαλύτερη της μονάδας (>1) είναι η τιμή του βιοδείκτη TPI, τόσο μεγαλύτερη είναι η εκλεκτικότητα της δράσης μιας μελετούμενης ένωσης σε καρκινικά κύτταρα σε σχέση με υγιή φυσιολογικά κύτταρα παρόμοιου ιστού (139,164,165). Οι τιμές TPI που προκύπτουν για τα σύμπλοκα 1-5 αναφέρονται στον Πίνακα 25.

Πίνακας 25: Τιμές ΙC₅₀ των συμπλόκων 1-5 έναντι της σειράς MRC-5. Τιμές ΤΡΙ έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών MCF-7 και MDA-MB-231.

	IC ₅₀ (μΜ)		TPI
ΣΥΜΠΛΟΚΟ	MRC-5	MCF-7	MDA-MB-231
Ag-tpp-H-PODT	3.77±0.16	1.86	0.92
Ag-tpp-o-CI-PODT	4.07±0.24	1.36	0.95
Ag-tpp-m-CI-PODT	2.89±0.08	1.71	0.81
Ag-tpp-o-F-PODT	3.12±0.11	1.25	0.80
Ag-tpp-p-F-PODT	2.72±0.19	1.27	1.08
Cisplatin	1.1 ± 0.20	0.20	0.04

Οι τιμές ΤΡΙ για τα κύτταρα MCF-7 που προκύπτουν από την δράση των συμπλόκων 1-5 κυμαίνονται από 1.25 έως 1.86, ενώ για τα κύτταρα MDA-MB-231 οι τιμές ΤΡΙ των συμπλόκων κυμαίνονται από 0.80 έως 1.08.

Παρατηρούμε ότι οι τιμές TPI των συμπλόκων 1-5 έναντι των κυττάρων MCF-7 είναι αισθητά μεγαλύτερες από την μονάδα (>1), αποδεικνύοντας ότι τα νέα σύμπλοκα 1-5 εμφανίζουν εκλεκτικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων MCF-7.

Ο Levy (166) αναφέρει ότι φαρμακευτικές ουσίες με μικρή τιμή TPI συχνά χαρακτηρίζονται και ως περιορισμένου εύρους (narrow) TPI. Σύμφωνα με τον Code of Federal Regulations (CFR) § 20.33 του FDA (Federal and Drug Administration) ως «φάρμακα περιορισμένου TPI ορίζονται αυτά που παρουσιάζουν διαφορά μικρότερη από 2 φορές μεταξύ της διάμεσης θανάσιμης δόσης (LD₅₀) και της διάμεσης δραστικής δόσης (ED₅₀)» (164).

Η τιμή του δείκτη TPI του cisplatin είναι 0.20 για τα κύτταρα MCF-7 και 0.04 για τα κύτταρα MDA-MB-231. Οι τιμές TPI των συμπλόκων που συντέθηκαν είναι πολύ μεγαλύτερες από τις τιμές TPI του cisplatin έως και 9.3 φορές (Ag-tpp-H-PODT) έναντι της κυτταρικής σειράς MCF-7 και έως 27 φορές (Ag-tpp-p-F-PODT) έναντι της κυτταρικής σειράς MDA-MB-231. Επομένως τα νέα σύμπλοκα που συντέθηκαν μπορούν να θεωρηθούν εκλεκτικότεροι παράγοντες από το cisplatin έναντι των καρκινικών κυττάρων του μαστού.

9.3. *In vitro* ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ.

Η γονοτοξικότητα των συμπλόκων 1-5 μελετήθηκε με τη μέθοδο των μικροπυρήνων (Micronucleus assay) σε φυσιολογικούς εμβρυϊκούς ινοβλάστες (MRC- 5). Ο αριθμός των μικροπυρήνων στα κύτταρα χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης μεταλλαξιογόνου, γονοτοξικής ή τερατογόνου δράσης μιας ουσίας (140). Οι μικροπυρήνες σχηματίζονται στη μίτωση κατά τη μετάβαση από τη μετάφαση προς την ανάφαση και εμφανίζονται στο κυτταρόπλασμα των μεσοφασικών κυττάρων ως μικρά θραύσματα DNA, τα οποία αδυνατούν να ενσωματωθούν στα θυγατρικά κύτταρα μετά το πέρας της μίτωσης (147).

Για να εξετασθεί η γονοτοξικότητα των νέων συμπλόκων και η πιθανή δημιουργία μικροπυρήνων σε φυσιολογικά υγιή κύτταρα MRC-5, αυτά επωάστηκαν παρουσία των συμπλόκων σε συγκεντρώσεις ίσες με το IC₅₀.

Στη συνέχεια, έγινε υπολογισμός των συχνοτήτων εμφάνισης μικροπυρήνων για κάθε νέο σύμπλοκο, ενώ η συχνότητα εμφάνισης μικροπυρήνων στα κύτταρα που δεν επωάστηκαν με κάποιο σύμπλοκο (control) είναι 2.91%.

Στον Πίνακα 26 παρουσιάζονται τα ποσοστά εμφάνισης μικροπυρήνων στα κύτταρα MRC-5 μετά από επώασή τους με τα σύμπλοκα.

Πίνακας 26: Ποσοστό (%) εμφάνισης μικροπυρήνων στα κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση σε συγκέντρωση ίση με το IC₅₀. Σχέση εμφάνισης (R) μικροπυρήνων στα κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση σε συγκέντρωση ίση με το IC₅₀ ως προς τα μη επωασμένα.

ΕΝΩΣΗ	Ποσοστό μικροπυρήνων	Σχέση εμφάνισης ΜΝ
	(%)	(R)
Control	2.91±0.11	1.0
Ag-tpp-H-PODT	3.03±0.09	1.04
Ag-tpp-o-Cl-PODT	2.52±0.90	0.87
Ag-tpp-m-CI-PODT	3.32±0.82	1.14
Ag-tpp-o-F-PODT	1.37±0.31	0.47
Ag-tpp-p-F-PODT	1.76±0.36	0.87
Cisplatin	1.6	2.0

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, τα ποσοστά των μικροπυρήνων που προκαλούνται από την επώαση με τα σύμπλοκα 1-5 είναι παρόμοια με αυτά που εμφανίζονται μετά από επώαση των κυττάρων MRC-5 με το cisplatin (συχνότητα μικροπυρήνων 1.6%), αποδεικνύοντας τη χαμηλή γονοτοξικότητα των συμπλόκων 1-5. Στις εικόνες 74-85 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από τα πειράματα που έγιναν με μικροσκόπιο φθορισμού σε κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών με τα υπό μελέτη σύμπλοκα 1-5.



Εικόνα 74: Αντιπροσωπευτική εικόνα με μικροπυρήνες που σχηματίστηκαν στα κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-H-PODT. Με τα βέλη δηλώνονται οι μικροπυρήνες.



Εικόνα 75: Αντιπροσωπευτική εικόνα με μικροπυρήνες που σχηματίστηκαν στα κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-H-PODT. Με τα βέλη δηλώνονται οι μικροπυρήνες.



Εικόνα 76: Αντιπροσωπευτική εικόνα με μικροπυρήνες που σχηματίστηκαν στα κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-o-Cl-PODT. Με τα βέλη δηλώνται οι μικροπυρήνες.



Εικόνα 77: Αντιπροσωπευτική εικόνα με μικροπυρήνες που σχηματίστηκαν στα κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-o-Cl-PODT. Με τα βέλη δηλώνονται οι μικροπυρήνες.



Εικόνα 78: Αντιπροσωπευτική εικόνα με μικροπυρήνες που σχηματίστηκαν στα κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-m-Cl-PODT. Με τα βέλη δηλώνονται οι μικροπυρήνες.



Εικόνα 79: Αντιπροσωπευτική εικόνα με μικροπυρήνες που σχηματίστηκαν στα κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-m-Cl-PODT. Με τα βέλη δηλώνονται οι μικροπυρήνες.



Εικόνα 80: Αντιπροσωπευτική εικόνα με μικροπυρήνες που σχηματίστηκαν στα κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-o-F-PODT. Με τα βέλη δηλώνονται οι μικροπυρήνες.



Εικόνα 81: Αντιπροσωπευτική εικόνα με μικροπυρήνες που σχηματίστηκαν στα κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-o-F-PODT. Με τα βέλη δηλώνονται οι μικροπυρήνες.



Εικόνα 82: Αντιπροσωπευτική εικόνα με μικροπυρήνες που σχηματίστηκαν στα κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT. Με τα βέλη δηλώνονται οι μικροπυρήνες.



Εικόνα 83: Αντιπροσωπευτική εικόνα με μικροπυρήνες που σχηματίστηκαν στα κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT. Με τα βέλη δηλώνονται οι μικροπυρήνες.



Εικόνα 84: Αντιπροσωπευτική εικόνα με μικροπυρήνες που σχηματίστηκαν στα κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών απουσία των συμπλόκων. Με τα βέλη δηλώνονται οι μικροπυρήνες.



Εικόνα 85: Αντιπροσωπευτική εικόνα με μικροπυρήνες που σχηματίστηκαν στα κύτταρα MRC-5 μετά από επώαση 48 ωρών απουσία των συμπλόκων. Με τα βέλη δηλώνονται οι μικροπυρήνες.

9.4. ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ

Με την επώαση των κυττάρων MCF-7 με τις υπό μελέτη σύμπλοκες ενώσεις 1-5 σε συγκεντρώσεις ίσες με τιμές IC₅₀, επιχειρήθηκε να προσδιοριστεί η μορφολογία των κυττάρων. Συγκεκριμένα, να προσδιοριστούν πιθανές μορφολογικές αλλαγές που είναι χαρακτηριστικές για τα αποπτωτικά ή τα νεκρωτικά κύτταρα και έτσι να αποκαλυφθεί ο τύπος κυτταρικού θανάτου.

Για τη μελέτη των αλλαγών της μορφολογίας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε οπτικό μικροσκόπιο, έπειτα από επώαση κυττάρων MCF-7 για 48 ώρες παρουσία των συμπλόκων 1-5 σε συγκεντρώσεις ίσες με τις τιμές IC₅₀, καθώς και με απουσία αυτών (control). Στις Εικόνες 86-91 εμφανίζονται οι αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων MCF-7 απουσία και παρουσία των συμπλόκων 1-5. Η μορφολογία των κυττάρων MCF-7 μετά από επώαση 48 ωρών σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου είναι χαρακτηριστική των κυττάρων που έχουν υποστεί απόπτωση (στρογγυλά κλπ).



Εικόνα 86: Μορφολογία των κυττάρων MCF-7 απουσία των υπό μελέτη ενώσεων (control).



Εικόνα 87: Αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων MCF-7 παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-H-PODT με συγκέντρωση ίση με την τιμή IC₅₀ για 48 ώρες.



Εικόνα 88: Αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων MCF-7 παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-o-CI-PODT με συγκέντρωση ίση με την τιμή IC₅₀ για 48 ώρες.



Εικόνα 89: Αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων MCF-7 παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-m-CI-PODT με συγκέντρωση ίση με την τιμή IC₅₀ για 48 ώρες.



Εικόνα 90: Αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων MCF-7 παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-o-F-PODT με συγκέντρωση ίση με την τιμή IC₅₀ για 48 ώρες.



Εικόνα 91: Αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων MCF-7 παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT με συγκέντρωση ίση με την τιμή IC₅₀ για 48 ώρες.

Από τη μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων αποδεικνύεται ότι ο τύπος κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από τις υπό μελέτη σύμπλοκες ενώσεις (1)-(5) 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 τον τάπητα του τρυβλίου (Εικόνα 87 – Εικόνα 91). Αντίθετα όπως φαίνεται και στην Εικόνα 86, τα κύτταρα που δεν καλλιεργήθηκαν παρουσία των υπό μελέτη παρασκευασμένων συμπλόκων (control), εμφανίζουν φυσιολογική μορφολογία. Όπως προκύπτει από την βιβλιογραφία (139),το μεταλλοφάρμακο cisplatin προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω αποπτωτικών μονοπατιών και τα κύτταρα που επωάζονται με το cisplatin εμφανίζουν παρόμοια μορφολογία.

9.5. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ ΑΟ/ΕΒ (Acridine Orange/Ethidium Bromide).

Η πορεία της απόπτωσης στα κύτταρα MCF-7, που επωάστηκαν απουσία και παρουσία των νέων συμπλόκων, μελετήθηκε με την χρήση των χρωστικών ΑΟ/ΕΒ και στη συνέχεια έγινε μορφολογική μελέτη των πυρήνων των κυττάρων μετά την επώασή τους επί 48 ώρες σε συγκεντρώσεις ίσες με τις τιμές ΙC₅₀ των νέων συμπλόκων (1) -(5). Από τα αποτελέσματα της μελέτης, προκύπτουν αλλαγές στον πυρήνα των κυττάρων που αποδίδονται στην διαφοροποίηση της επιφάνειας της μεμβράνης μεταξύ των φυσιολογικών και αποπτωτικών κυττάρων. Η φθορίζουσα χρωστική ΑΟ έχει την ικανότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και να χρωματίζει το DNA του πυρήνα στα ζωντανά και στα νεκρά κύτταρα. Αντίθετα η φθορίζουσα χρωστική ΕΒ δεν έχει την ικανότητα αυτή, γιατί χρωματίζει το DNA του πυρήνα των κυττάρων των οποίων έχει διαρραγεί η κυτταρική μεμβράνη. Τα κύτταρα MCF-7 που δεν έχουν επωαστεί με τα υπό μελέτη σύμπλοκα, εμφανίζουν πυρήνα χρωματισμένο με έντονο πράσινο χρώμα και χωρίς αλλαγές στην εσωτερική δομή του. Το ποσοστό των αποπτωτικών και των νεκρωτικών κυττάρων (control) υπολογίστηκε στο 24.3±2.3% και 0% αντίστοιχα. Αντίθετα , στα επωασμένα κύτταρα με τα υπό μελέτη σύμπλοκα (1) – (5) παρατηρήθηκε συρρίκνωση της κυτταρικής μεμβράνης και συμπύκνωση της χρωματίνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα περισσότερα των κυττάρων έχουν υποστεί απόπτωση. Γενικά ο πληθυσμός των αποπτωτικών κυττάρων κυμαίνεται από 41.6% (σύμπλοκο Ag-tpp-o-CI-PODT) έως 52.8% (σύμπλοκο Ag-tpp-m-CI-PODT). Τα νεκρωτικά κύτταρα απουσιάζουν εντελώς στην περίπτωση των κυττάρων MCF-7 που

207

επωάστηκαν με τα σύμπλοκα (1) – (5). Συγκριτικά, όταν τα κύτταρα MCF-7 επωάζονται με το cisplatin, το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων φτάνει το 96.5%. Συμπερασματικά, στην περίπτωση των κυττάρων MCF-7 που επωάζονται με τα σύμπλοκα (1) – (5), προτείνεται η **απόπτωση** ως αιτία θανάτου των κυττάρων.

Στις Εικόνες 92-97 εμφανίζονται οι αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων MCF-7 απουσία και παρουσία των συμπλόκων 1-5. Με **πράσινο** χρώμα είναι τα ζωντανά κύτταρα , με **κόκκινο** χρώμα είναι τα όψιμα αποπτωτικά κύτταρα και με **πορτοκαλί** χρώμα τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα. Στον Πίνακα 27 εμφανίζονται τα ποσοστά των αποπτωτικών και των ζωντανών κυττά-ρων που προέκυψαν από την επώαση των κυττάρων.

ΕΝΩΣΗ	Ποσοστό αποπτωτικών
	κυττάρων (%)
Control	27.6
Ag-tpp-H-PODT	46.3
Ag-tpp-o-CI-PODT	41,6
Ag-tpp-m-CI-PODT	52.8
Ag-tpp-o-F-PODT	44.8
Ag-tpp-p-F-PODT	47.7
Cisplatin ⁽¹⁴⁴⁾	96.5

ΠΙΝΑΚΑΣ 27: Ποσοστό αποπτωτικών και ζωντανών κυττάρων



Εικόνα 92: Αντιπροσωπευτική εικόνα των κυττάρων MCF-7 μετά από 48 ώρες επώαση

με το σύμπλοκο Ag-tpp-H-PODT με συγκέντρωση ίση με το IC₅₀.



Εικόνα 93: Αντιπροσωπευτική εικόνα των κυττάρων MCF-7 μετά από 48 ώρες επώαση με το σύμπλοκο Ag-tpp-o-CI-PODT με συγκέντρωση ίση με το IC₅₀.



Εικόνα 94: Αντιπροσωπευτική εικόνα των κυττάρων MCF-7 μετά από 48 ώρες επώαση με το σύμπλοκο Ag-tpp-m-CI-PODT με συγκέντρωση ίση με το IC₅₀.



Εικόνα 95: Αντιπροσωπευτική εικόνα των κυττάρων MCF-7 μετά από 48 ώρες επώαση με το σύμπλοκο Ag-tpp-o-F-PODT με συγκέντρωση ίση με το IC₅₀.



Εικόνα 96: Αντιπροσωπευτική εικόνα των κυττάρων MCF-7 μετά από 48 ώρες επώαση

με το σύμπλοκο Ag-tpp-p-F-PODT με συγκέντρωση ίση με το IC₅₀.



Εικόνα 97: Αντιπροσωπευτική εικόνα των κυττάρων MCF-7 μετά από 48 ώρες επώαση χωρίς την παρουσία συμπλόκου ένωσης.

9.6. ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA.

Για να επιβεβαιωθεί ο μηχανισμός του θανάτου των κυττάρων (αποπτωτικός ή νεκρωτικός μηχανισμός), επωάστηκαν κύτταρα MCF-7 για 48 ώρες με τα σύμπλοκα 1-5 με συγκεντρώσεις ίσες με τις τιμές IC₅₀. Εν συνεχεία ελέγχθηκε η ικανότητα των υπό μελέτη ενώσεων να προκαλούν κατάκερματισμό του DNA με εφαρμογή της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 98).

Σύμφωνα με τους Bandi et al. (139), το αντικαρκινικό φάρμακο cisplatin προκαλεί κατακερματισμό του πυρηνικού DNA που είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα του αποπτωτικού θανάτου των κυττάρων. Τα νέα σύμπλοκα 1-5 επιβεβαιώθηκε ότι προκαλούν κατακερματισμό του πυρηνικού DNA των κυττάρων MCF-7. Αντίθετα στα κύτταρα που δεν επωάστηκαν με τα νέα σύμπλοκα (ουσία control), δεν παρατηρήθηκε κατακερματισμός του πυρηνικού DNA, επιβεβαιώνοντας έτσι την αποπτωτική δράση των νέων συμπλόκων.

Επομένως η μελέτη του κατακερματισμού του πυρηνικού DNA από της νέες ενώσεις έρχεται σε επιβεβαίωση της μελέτης της κυτταρικής μορφολογίας, η οποία προτείνει τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο λόγω της επίδρασης των νέων συμπλόκων.

212

1= DNA ladder, 2=Control, 3=Ag-tpp-H-PODT, 4=Ag-tpp-o-F-PODT,
5=Ag-tpp-p-F-PODT, 6=Ag-tpp-o-Cl-PODT, 7=Ag-tpp-m-Cl-PODT.



Εικόνα 98: Ηλεκτροφόρηση DNA κυττάρων MCF-7 μετά από επώαση 48 ωρών με τα σύμπλοκα 1-5 σε συγκεντρώσεις ίσες με το IC₅₀ αυτών.

9.7. ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΙΑΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ.

Η απόπτωση των κυττάρων των θηλαστικών μέσω της εγγενούς οδού του μηχανισμού απόπτωσης και μέσω της καθοριστικής συμμετοχής των μιτοχονδρίων (μιτοχονδριακό μονοπάτι) είναι από τις σημαντικότερες αποπτωτικές διεργασίες (142).

Σύμφωνα με τους Kroemer et al. (143), τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των κασπασών απελευθερώνοντας αποπτωτικούς παράγοντες που κανονικά βρίσκονται στο εσωτερικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα του πόρου μετάπτωσης της διαπερατότητας του μιτοχονδρίου (mitochondrial permeability transition pore), την αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου και την απελευθέρωση διαλυτών πρωτεϊνών όπως του κυτοχρώματος C. Είναι γνωστό ότι η επαγωγή του πόρου μετάπτωσης του μιτοχονδρίου στα καρκινικά κύτταρα είναι μία από τις πιθανές δράσεις που βοηθούν στη θεραπεία του καρκίνου (143).

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, κύτταρα MCF-7 επωάστηκαν για 48 ώρες με τις υπό μελέτη ενώσεις σε συγκέντρωση ίση με τις τιμές IC₅₀, με σκοπό να γίνει ανίχνευση της απώλειας της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης (mitochondrial membrane permeabilization).

Η χρησιμοποιούμενη τεχνική βασίζεται στη μείωση των επιπέδων φθορισμού της κατιονικής υδρόφοβης χρωστικής. Η χρωστική φυσιολογικά συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια, ενώ στα επωασμένα κύτταρα προκαλείται διάρρηξη του πόρου

214

μετάπτωσης του μιτοχονδρίου με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα και μείωση της ποσότητας της χρωστικής, αποδεικνύοντας την επαγωγή της απόπτωσης (139).

Στον Πίνακα 28 παρουσιάζονται τα ποσοστά μείωσης των επιπέδων φθορισμού που μετρήθηκαν μετά την επώαση των κυττάρων MCF-7 με τα σύμπλοκα 1-5. Πίνακας 28: Ποσοστά μείωσης του φθορισμού σε κύτταρα MCF-7 μετά από επώασή τους με τα σύμπλοκα 1-5.

ΕΝΩΣΗ	Ποσοστό μείωσης φθορισμού
	(%)
Ag-tpp-H-PODT	20.0
Ag-tpp-o-CI-PODT	5.1
Ag-tpp-m-CI-PODT	9.6
Ag-tpp-o-F-PODT	20.7
Ag-tpp-p-F-PODT	2.9
Cisplatin ⁽¹⁴⁴⁾	54.9

Μεταξύ των υπό μελέτη ενώσεων, το σύμπλοκο Ag-tpp-o-F-PODT εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης φθορισμού 20.7 % (Εικόνα 99).



Εικόνα 99: Ποσοστά μείωσης φθορισμού μετά από επώαση 48 ωρών με τα σύμπλοκα 1-5 σε συγκεντρώσεις ίσες με το IC₅₀ αυτών.

Από τις παραπάνω μελέτες προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα νέα σύμπλοκα προκαλούν απόπτωση των κυττάρων μέσω των μιτοχονδριακών μονοπατιών, γεγονός που αποδεικνύεται από την μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων, του κατακερματισμού του πυρηνικού DNA, της χρώσης των πυρήνων με τις χρωστικές ΑΟ/ΕΒ αλλά και από την μελέτη επίδρασης στην μιτοχονδριακή μεμβράνη.
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

10.1. *Εχ vivo* ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕ ΤΟ DNA-ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ UV-Vis.

Η εφαρμογή της φασματοσκοπίας ηλεκτρονικής απορρόφησης στη μελέτη αλληλεπίδρασης μορίων με το DNA προσφέρει πολλά χρήσιμα συμπεράσματα. Οποιαδήποτε μεταβολή στην απορρόφηση και στο μέγιστο μήκος κύματος αποτελεί ένδειξη αλληλεπίδρασης. Η μεγάλη και η μικρή αύλακα της διπλής έλικας του DNA παρέχουν σημαντικές πληροφορίες που είναι απαραίτητες για την κατανόηση του είδους της αλληλεπίδρασης του DNA με άλλα μόρια, λαμβάνοντας υπόψη πως οι δεσμοί υδρογόνου των βάσεων του DNA βρίσκονται μέσα στις αύλακες (145).

Ένα σύμπλοκο μπορεί να συναρμόζεται στο DNA είτε μέσω ομοιοπολικών ή μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων (144,146,138,147,148). Συγκεκριμένα: α) μέσω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του σκελετού του DNA, οι οποίες εμφανίζονται στην εξωτερική πλευρά της διπλής έλικας του DNA και δεν εμφανίζουν εκλεκτικότητα, β) μέσω της πρόσδεσης στις αύλακες της διπλής έλικας του DNA και γ) μέσω παρεμβολής ανάμεσα στις βάσεις του DNA (139,144,146,138,147,148). Ειδικότερα, μείωση της απορρόφησης (υποχρωμία), προκαλείται εξαιτίας της ισχυρής αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός αρωματικού χρωμοφόρου υποκαταστάτη και τα ζεύγη βάσεων του DNA. Επίσης, η μετατόπιση του λmax προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (βαθυχρωμία ή ερυθρή μετατόπιση, red shift), σημαίνει σταθεροποίηση της διπλής έλικας. Αντίθετα, μετατόπιση προς μικρότερα μήκη κύματος (υψιχρωμία ή κυανή μετατόπιση, blue shift), σημαίνει αποσταθεροποίηση της έλικας του DNA. Η ερυθρή μετατόπιση σε συνδυασμό με υποχρωμία υποδηλώνει παρεμβολή του συμπλόκου στα ζεύγη βάσεων του DNA, ενώ υπερχρωμία υποδηλώνει ισχυρή πιθανότητα εξωτερικής συναρμογής ή δέσμευσης στην αύλακα του DNA (149).

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων ενώσεων με το DNA με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας UV γίνεται σε δύο στάδια.

Αρχικά εξετάζονται οι μεταβολές των φασμάτων UV του διαλύματος CT-DNA, στην περιοχή λ=200-400 nm με την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων των υπό μελέτη συμπλόκων ενώσεων σε διάφορες αναλογίες συγκεντρώσεων (r = [σύμπλοκο] / [DNA]).

Ειδικότερα, εξετάζεται η μεταβολή του μεγίστου του μήκους κύματος (βαθυχρωμία ή υψιχρωμία), καθώς και η μεταβολή της απορρόφησης (υποχρωμία ή υπερχρωμία) στο μέγιστο του μήκους κύματος.

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το calf-thymous DNA (CT-DNA), επειδή η διπλή έλικά του υιοθετεί τη Β μορφή στη διαμόρφωση της και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικό του κυτταρικού DNA, το οποίο υιοθετεί την ίδια διαμόρφωση σε διάλυμα σε φυσιολογικές συνθήκες (pH=7, θερμοκρασία δωματίου, ≈200 mM NaCl) (150).

Τα φάσματα απορρόφησης που λήφθηκαν για να προσδιοριστεί ο τρόπος αλληλεπίδρασης των συμπλόκων ενώσεων 1-5 παρουσιάζονται στις Εικόνες 100-104 ενώ τα ποσοστά υπερχρωϊσμού αναφέρονται στον Πίνακα 29.



(A)

Εικόνα 100Α: Φάσμα UV του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία complex Ag-tpp-H-PODT για r= 0-0,02-0,05-0,07-0,1-0,12 (r=[complex]/[DNA] =5x10⁻⁵ M).



(B)

Εικόνα 100Β: Διάγραμμα Α/A₀ του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-H-PODT για r= 0-0.02-0.05-0.07-0.1-0.12 $(r=[complex]/[DNA]=5x10^{-5} \text{ M})$ στο λ_{max}= 257nm.



Εικόνα 101Α: Φάσμα UV του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-o-CI-PODT για r= 0-0.02-0.05-0.07-0.1-0.12 $(r=[complex]/[DNA]=5x10^{-5}M).$



(B)

Εικόνα 101Β: Διάγραμμα Α/A₀ του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-o-CI-PODT για r= 0-0.02-0.05-0.07-0.1-0.12 (r=[complex]/[DNA] =5x10⁻⁵M) στο λ_{max} = 257nm.



Eικόνα 102A: Φάσμα UV του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία complex Ag-tpp-m-CI-PODT για r= 0-0.02-0.05-0.07-0.1-0.12 (r=[complex]/[DNA] = $5x10^{-5}$ M).



(B)

Εικόνα 102Β: Διάγραμμα Α/Α₀ του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-m-CI-PODT για r= 0-0.02-0.05-0.07-0.1-0.12 (r=[complex]/[DNA]=5x10⁻⁵M) στο λ_{max} = 257nm.



Εικόνα 103Α: Φάσμα UV του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-o-F-PODT για r= 0-0.02-0.05-0.07-0.1-0.12 (r=[complex]/[DNA]=5x10⁻⁵M).



(B)

Εικόνα 103Β: Διάγραμμα Α/Α₀ του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-o-F-PODT για r= 0-0.02-0.05-0.07-0.1-0.12 (r=[complex]/[DNA]=5x10⁻⁵M) στο λ_{max} = 257nm.



Εικόνα 104Α: Φάσμα UV του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT για r= 0-0.02-0.05-0.07-0.1-0.12 (r=[complex]/[DNA]=5x10⁻⁵M).



(B)

Εικόνα 104Β: Διάγραμμα Α/Α₀ του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT για r= 0-0.02-0.05-0.07-0.1-0.12 (r=[complex]/[DNA]=5x10⁻⁵M) στο λ_{max} = 257nm.

A/A	ΣΥΜΠΛΟΚΟ	Δλ	Μετατόπιση	Υποχρωϊσμός/	Н%
		(nm)	(Shift)	Υπερχρωϊσμός	
1	Ag-tpp-H-PODT	2	Βαθυχρωμία	Υπερχρωϊσμός	4.0%
2	Ag-tpp-o-CI-PODT	4	Βαθυχρωμία	Υπερχρωϊσμός	8.5%
3	Ag-tpp-m-CI-PODT	5	Βαθυχρωμία	Υπερχρωϊσμός	1.2%
4	Ag-tpp-o-F-PODT	1	Βαθυχρωμία	Υπερχρωϊσμός	39.0%
5	Ag-tpp-p-F-PODT	4	Βαθυχρωμία	Υπερχρωϊσμός	58.1%

Πίνακας 29: Τιμές υπερχρωϊσμού ή υποχρωϊσμού του CT-DNA για τα σύμπλοκα 1-5.

Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι μεταβολές που πραγματοποιούνται στα φάσματα UV διαλυμάτων των συμπλόκων 1-5 με την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων του διαλύματος CT-DNA σε διάφορες αναλογίες συγκεντρώσεων (r = [σύμπλοκο] / [DNA]).

Οι μεταβολές που καταγράφονται μας βοηθούν να βγάλουμε συμπεράσματα σχετικά με το είδος της αλληλεπίδρασης συμπλόκου CT-DNA. Η σταθερά σύνδεσης k_b του συμπλόκου με το CT-DNA, υπολογίζεται από το λόγο της τεταγμένης επί της αρχής προς την κλίση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων που προσδιορίζεται σε διαγράμματα του λόγου r σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του CT-DNA, [DNA] με βάση την εξίσωση:

[DNA] [DNA] 1 ($E_A - E_f$) ($E_b - E_f$) $k_b (E_b - E_f$)

όπου [DNA] = συγκέντρωση του DNA, E_A = λόγος της απορρόφησης προς τη συγκέντρωση του συμπλόκου σε κάθε μέτρηση ([A] / [σύμπλοκο]), E_f = ο συντελεστής

μοριακής απορρόφησης του ελεύθερου συμπλόκου, Ε_b = ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του πλήρως δεσμευμένου συμπλόκου στο DNA και k_b = σταθερά ισχύος σύνδεσης του συμπλόκου με το DNA.

Τα φάσματα απορρόφησης που λήφθηκαν για να βρεθεί το είδος της αλληλεπίδρασης συμπλόκων - CT-DNA παρουσιάζονται στις Εικόνες 105-114, ενώ στον Πίνακα 30 αναφέρονται οι ευρεθείσες τιμές της σταθεράς σύνδεσης k_b.



Εικόνα 105: Φάσμα UV του συμπλόκου Ag-tpp-H-PODT σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία CT-DNA για r= 0.1-0.125 -0.17-0.25-0.5-1 (r=[complex]/[DNA]).



Εικόνα 106: Γραφική παράσταση [DNA]/(ε_A-ε_f)συναρτήσει της [DNA] για το Ag-tpp-H-PODT.



Εικόνα 107: Φάσμα UV του συμπλόκου Ag-tpp-o-CI-PODT σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία CT-DNA για r= 0.1-0.125-0.17-0.25-0.5-1 (r=[complex]/[DNA]).



[DNA] x 10⁶ (M)

Εικόνα 108: Γραφική παράσταση [DNA]/(ε_A-ε_f) συναρτήσει της [DNA] για το Ag-tpp-o-CI-PODT.



Εικόνα 109: Φάσμα UV του συμπλόκου Ag-tpp-m-CI-PODT σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία CT-DNA για r= 0.1-0.125-0.17-0.25-0.5-1 (r=[complex]/[DNA]).







Εικόνα 111: Φάσμα UV του συμπλόκου Ag-tpp-o-F-PODT σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία CT-DNA για r= 0.1-0.125-0.17-0.25-0.5-1 (r=[complex]/[DNA]).



Σχήμα 112: Γραφική παράσταση [DNA]/(ε_A-ε_f) συναρτήσει της [DNA] για το Ag-tppo-F-PODT.



Εικόνα 113: Φάσμα UV του συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία CT-DNA για r= 0.1-0.125-0.17-0.25-0.5-1 (r=[complex]/[DNA]).



Εικόνα 114: Γραφική παράσταση [DNA]/(ε_Α-ε_f) συναρτήσει της [DNA] για το Ag-tppp-F-PODT.

A/A	ΣΥΜΠΛΟΚΟ	ΣΤΑΘΕΡΑ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ k _b (1x10 ⁴) M ⁻¹
1	Ag-tpp-H-PODT	10.6 ±1.5
2	Ag-tpp-o-CI-PODT	9.8 ± 2.2
3	Ag-tpp-m-CI-PODT	16.6 ± 5.1
4	Ag-tpp-o-F-PODT	4.3 ± 1.7
5	Ag-tpp-p-F-PODT	50.2 ± 7.7

Πίνακας 30: Ευρεθείσες τιμές kb συμπλόκων 1-5.

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων 1-5 με το CT-DNA αποκάλυψε ότι αυξάνονται οι απορροφήσεις σε ποσοστά που κυμαίνονται από 1.2 έως και 58.1% (υπερχρωϊσμός) και ταυτόχρονα μετατοπίζεται το μήκος κύματος της απορρόφησης προς μεγαλύτερες τιμές (βαθυχρωμία – red shift). Ο συνδυασμός υπερχρωϊσμού και βαθυχρωμίας υποδηλώνει την δέσμευση των συμπλόκων στο DNA με συναρμογή στην αύλακα του DNA (groove binding). Όπως προκύπτει από τις τιμές k_b των συμπλόκων 1-5, υπάρχει ισχυρή δέσμευση των συμπλόκων 1-5 με το CT-DNA ,όπως επιβεβαιώνεται από τις τιμές k_b παρομοίων συμπλόκων με τον Ag (2-mercaptothiazole)(118), [Ag(tpp)₂(p-Hbza)] (75), [AgBr(μ_2 -S-MMI)(TPP))]₂ (128), ενώ η αντίστοιχη τιμή k_b για το cisplatin είναι (5.73 ± 0.45)x10⁴ M⁻¹ (167).

10.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕ ΤΟ ΕΒ-ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ.

Η φασματοσκοπία φθορισμού χρησιμοποιείται για την πληρέστερη κατανόηση του τρόπου δέσμευσης των συμπλόκων με το DNA (139,151,170).

Το φθορίζον μόριο EB (Ethidium Bromide) έχει την ιδιότητα να εκπέμπει ακτινοβολία παρουσία του DNA λόγω της ισχυρής παρεμβολής του επιπέδου δακτυλίου της φαινανθριδίνης μεταξύ γειτονικών ζευγών αζωτούχων βάσεων του DNA (152). Επειδή το EB παρεμβάλλεται στη μικρή αύλακα του DNA, η αντικατάσταση του EB από μία ένωση που αλληλοεπιδρά με το DNA, η οποία δεν φθορίζει, οδηγεί στη μείωση της ακτινοβολίας φθορισμού και υποδηλώνει παρεμβολή ή δέσμευση στη μικρή αύλακα της προστιθέμενης ένωσης (153,154).

Για τη μελέτη της δράσης παρασκευάστηκαν διαλύματα των συμπλόκων 1-5 με τελικές συγκεντρώσεις C = 0.1 – 0.2 – 0.3 – 0.4 – 0.5 – 0.6 μM σε DMSO, ενώ οι συγκεντρώσεις του EB και του CT-DNA παρέμειναν σταθερές ([EB] = 2.3 μM και [CT-DNA] = 26 μM). Για τη λήψη των φασμάτων εκπομπής (550-750 nm) έγινε διέγερση σε μήκος κύματος λ_{max}(exc) = 527 nm (μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης του EB- DNA), ενώ η απόσβεση του φθορισμού παρατηρήθηκε σε λ_{max}(em) = 588 nm (μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής του EB-DNA).

Στις Εικόνες 115-119 παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού των διαλυμάτων των συμπλόκων 1-5.



Εικόνα 115: Φάσμα εκπομπής CT-DNA-EB παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-H-

PODT.





PODT.



Εικόνα 117: Φάσμα εκπομπής CT-DNA-EB παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-m-Cl-PODT.





PODT.



Εικόνα 119: Φάσμα εκπομπής CT-DNA-EB παρουσία του συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT.

Στον Πίνακα 31 εμφανίζεται η μείωση της έντασης φθορισμού των διαλυμάτων ΕΒ-DNA στα 588 nm σε σύγκριση με την αρχική, κατά τη διαδοχική αύξηση συγκεντρώσεων των συμπλόκων (0 – 0.6 μΜ). Γενικά παρατηρείται ότι εμφανίζεται το φαινόμενο του υποχρωϊσμού σε ποσοστά 52.4 – 58.9 %.

A/A	Σύμπλοκο	Μείωση φθορισμού	
1	Ag-tpp-H-PODT	53.9 %	
2	Ag-tpp-o-CI-PODT	57.7 %	
3	Ag-tpp-m-Cl-PODT	52.4 %	
4	Ag-tpp-o-F-PODT	55.3 %	
5 Ag-tpp-p-F-PODT		58.8 %	

Πίνακας 31: Μείωση φθορισμού συμπλόκων

Για την αξιολόγηση του τρόπου αλληλεπίδρασης του CT-DNA με τα σύμπλοκα 1-5 υπολογίστηκε η σταθερά σχηματισμού Κ_{app}από την εξίσωση:

 $K_{app} = K_{EB} \times [EB] / [Q_{50}]$

όπου: [Q₅₀] είναι η συγκέντρωση του κάθε συμπλόκου όταν ο φθορισμός του συμπλόκου EB-DNA μειώνεται κατά 50%, η σταθερά σύνδεσης EB-DNA, K_{EB} = 10⁷ M⁻¹ και η συγκέντρωση του EB, [EB] = 23 μM.

Η [Q₅₀] του κάθε συμπλόκου προκύπτει από το διάγραμμα (I_x / I_o) συναρτήσει της συγκέντρωσης του συμπλόκου, όπου I_o και I_x είναι οι εντάσεις εκπομπής του CT-DNA-ΕΒ απουσία και παρουσία του κάθε συμπλόκου, αντίστοιχα. (Εικόνες 120-124).



Εικόνα 120: Διάγραμμα της έντασης εκπομπής Ι₀/Ι_x συναρτήσει της [Ag-tpp-H-PODT].



Εικόνα 121: Διάγραμμα της έντασης εκπομπής Ι₀/Ι_x συναρτήσει της [Ag-tpp-o-Cl-PODT].











Εικόνα 124: Διάγραμμα της έντασης εκπομπής Ι₀/Ι_x συναρτήσει της [Ag-tpp-p-F-PODT].

Επιπλέον, υπολογίστηκε η σταθερά απόσβεσης k από την κλίση της

τροποποιημένης εξίσωσης Stern-Volmer (179):

 $I_o / I_o - I_x = 1 / (f k [Q]) + 1 / f$

όπου [Q] η ολική συγκέντρωση του κάθε συμπλόκου.

Στον Πίνακα 32 παρουσιάζονται οι υπολογισθείσες τιμές των Κ_{аpp} και k του κάθε συμπλόκου.

Από τις τιμές των σταθερών Κ_{app} των συμπλόκων 1-5, προκύπτει ότι τα σύμπλοκα συνδέονται στην αύλακα του DNA, γιατί όταν συμβαίνει παρεμβολή, τότε η τιμή της σταθεράς Κ_{app} παίρνει τιμές της τάξης των 10⁶ – 10⁷ M⁻¹ (155,156).

A/A	Σύμπλοκο	Kapp	К
1	Ag-tpp-H-PODT	55868.74	2.78x10 ⁴
2	Ag-tpp-o-CI-PODT	60169.92	3.49x10 ⁴
3	Ag-tpp-m-CI-PODT	56637.64	5.04x10 ⁴
4	Ag-tpp-o-F-PODT	58557.56	8.45x10 ⁴
5	Ag-tpp-p-F-PODT	63525.12	4.89x10 ⁴

Πίνακας 32: Τιμές σταθερών Kapp, Κτων συμπλόκων 1-5.

10.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕ ΤΟ CT-DNA: ΙΞΩΔΟΜΕΤΡΙΑ.

Η ιξωδομετρία είναι μία κινητική υδροδυναμική μέθοδος που συμβάλλει στην κατανόηση του τρόπου αλληλεπίδρασης των συμπλόκων που συντέθηκαν με το CT-DNA, μέσω της μέτρησης του ιξώδους (157,172). Το ιξώδες του CT-DNA βρίσκεται σε ευθεία αναλογία με το μήκος του, με αποτέλεσμα η συναρμογή ενός συμπλόκου με το CT-DNA να επιφέρει ουσιώδεις ή μη μεταβολές στη δομή του (αλλαγή του μήκους της διπλής έλικας του CT-DNA) και έτσι να εμφανίζεται αύξηση, μείωση ή σταθερότητα του κινηματικού ιξώδους αυτού (158).

Αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα του κάθε συμπλόκου συγκέντρωσης 10⁻³ Μ σε DMSO. Έγιναν μετρήσεις του κινηματικού ιξώδους του διαλύματος CT-DNA συγκέντρωσης 10 mM απουσία και παρουσία των συμπλόκων ενώσεων 1-5. Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε 3 φορές με τη βοήθεια γυάλινου τριχοειδούς ιξωδόμετρου Ostwald. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του διαλύματος CT-DNA και στη συνέχεια προστέθηκαν διαδοχικά συγκεντρώσεις των συμπλόκων 1-5 σε αναλογία συγκεντρώσεων r = 0 – 0.37, όπου r = [complex] / [CT-DNA].

Η εξίσωση που συνδέει το μήκος του DNA με το ιξώδες των διαλυμάτων DNA είναι: $L / L_0 = (n / n_0)^{1/3}$, όπου n και n₀ είναι το ιξώδες του CT-DNA παρουσία και απουσία των συμπλόκων ενώσεων αντίστοιχα, ενώ L είναι το μήκος του CT-DNA παρουσία των συμπλόκων και L₀ είναι το αρχικό μήκος του CT-DNA. Το n ισούται με το λόγο (t – t₀) / t₀, όπου t = ο χρόνος ροής του CT-DNA παρουσία των συμπλόκων, ενώ t₀ = ο χρόνος ροής του διαλύματος CT-DNA (168).

Στις Εικόνες 125-129 εμφανίζεται το σχετικό ειδικό ιξώδες (n / n_o)^{1/3} των διαλυμάτων CT-DNA – συμπλόκων συναρτήσει της αναλογίας συγκεντρώσεων r = [complex] / [DNA] με εύρος r = 0 – 0.37.



Εικόνα 125: Επίδραση του συμπλόκου Ag-tpp-H-PODT στο ιξώδες διαλύματος CT-DNA ([DNA]=10 mM) σε διάφορες αναλογίες r= [σύμπλοκο]/[DNA].



Εικόνα 126: Επίδραση του συμπλόκου Ag-tpp-o-Cl-PODT στο ιξώδες διαλύματος CT-DNA ([DNA]= 10 mM) σε διάφορες αναλογίες r= [σύμπλοκο]/[DNA].



Εικόνα 127:Επίδραση του συμπλόκου Ag-tpp-m-Cl-PODT στο ιξώδες διαλύματος CT-DNA ([DNA]=10 mM) σε διάφορες αναλογίες r= [σύμπλοκο]/[DNA].



Εικόνα 128: Επίδραση του συμπλόκου Ag-tpp-o-F-PODT στο ιξώδες διαλύματος CT-DNA ([DNA]= 10 mM) σε διάφορες αναλογίες r= [σύμπλοκο]/[DNA].



Εικόνα 129: Επίδραση του συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT στο ιξώδες διαλύματος CT-DNA ([DNA]= 10 mM) σε διάφορες αναλογίες r= [σύμπλοκο]/[DNA].

Το σχετικό ιξώδες του διαλύματος CT-DNA παρουσία των συμπλόκων 1-5 αυξάνεται ελαφρώς σε σχέση με το ιξώδες του αρχικού διαλύματος CT-DNA. Η αύξηση αυτή υποδηλώνει ότι τα σύμπλοκα 1-5 δεσμεύονται στην αύλακα του CT-DNA (groove binding) (159,160,161).

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τη μελέτη των μετρήσεων της περίθλασης ακτίνων Χ αποδεικνύεται ότι :

- στα υποκατεστημένα θειονο-1,3,4-οξαδιαζόλια επικρατεί η θειονο-μορφή (-NH-C=S) λόγω της παρουσίας του ατόμου Η στο άτομο αζώτου Ν1 και του μήκους του δεσμού S-C1 που υπολογίστηκε από 1.660(3) Å έως 1.641(4) Å.
- Τα παρασκευασθέντα σύμπλοκα του αργύρου αποτελούνται από ένα μόριο υποκατεστημένου θειονο-1,3,4-οξαδιαζολίου και τρία μόρια τριφαινυλοφωσφίνης.
 Ο Ag συναρμόζεται με τα υποκατεστημένα θειονο-1,3,4-οξαδιαζόλια μέσω του ατόμου του S και με τα τρία άτομα P των μορίων τριφαινυλοφωσφίνης σχηματίζοντας μία παραμορφωμένη τετραεδρική δομή, που οφείλεται κυρίως στα τρία ογκώδη μόρια των τριφαινυλοφωσφινών.
- οι ενώσεις του αργύρου με p-F και m-Cl PDOT εμφανίζουν τη μεγαλύτερη
 σταθερότητα λόγω μικρότερου μήκους δεσμού αργύρου-θείου.

Από τη μελέτη των φασματοσκοπικών δεδομένων προκύπτει ότι:

- Από τα φασματοσκοπικά δεδομένα της φασματοσκοπίας υπέρυθρου σε στερεά κατάσταση, υπεριώδους-ορατού και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹Η σε διάλυμα επιβεβαιώνουν την διατήρηση της κρυσταλλικής δομής σε όλη τη μάζα του δείγματος τόσο σε στερεά κατάσταση όσο και σε διάλυμα.
- Η σταθερότητα των συμπλόκων που συντέθηκαν επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και με φασματοσκοπία ¹H-NMR,

προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι *in vitro* βιολογικές μελέτες, οι οποίες απαιτούν έως και 48 ώρες επώαση με τα υπό μελέτη σύμπλοκα Ag-tpp-X-PODT. Από τη μελέτη της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης των νέων συμπλόκων Ag-tpp-X-PODT σε δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού, των κυττάρων MCF-7 και των κυττάρων MDA-MB-231 αποδεικνύεται ότι:

- Από τη μελέτη της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης των νέων συμπλόκων Ag-tpp-X-PODT σε δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού, των κυττάρων MCF-7 (θετικών στην έκφραση υποδοχέων ορμονών, ERs⁺) και των κυττάρων MDA-MB-231 (αρνητικών στην έκφραση υποδοχέων ορμονών, ERs⁻) αποδεικνύεται ότι:
- Μεταξύ των συμπλόκων Ag-tpp-X-PODT, το σύμπλοκο Ag-tpp-m-CI-PODT εμφάνισε την καλύτερη αντικαρκινική δράση έναντι των κυττάρων MCF-7. Στην περίπτωση των κυττάρων MDA-MB-231 το σύμπλοκο Ag-tpp-p-F-PODT εμφάνισε την καλύτερη αντικαρκινική δράση.
- Τα νέα σύμπλοκα επέδειξαν εκλεκτική δράση έναντι της κυτταρικής σειράς MCF 7 σε σχέση με την κυτταρική σειρά MDA-MB-231.
- Η δράση των συμπλόκων Ag-tpp-X-PODT κυμαίνεται από 1.8 έως 3.3 φορές ισχυρότερη έναντι των καρκινικών κυττάρων MCF-7 και από 6.3 έως 10.6 φορές ισχυρότερη έναντι των κυττάρων MDA-MB-231 σε σχέση με τη δράση που έχει το cisplatin σε αυτά.
- Οι τιμές για το θεραπευτικό δείκτη TPI (δείκτης εκλεκτικότητας) που υπολογίστηκαν για τα σύμπλοκα Ag-tpp-X-PODT είναι μεγαλύτερες της μονάδας

(από 1.25 έως 1.86) για τα κύτταρα MCF-7, ενώ για τα κύτταρα MDA-MB-231 κυμαίνονται από 0.80 έως 1.08.

- Οι ενώσεις εμφανίζουν εκλεκτικότητα σε καρκινικά κύτταρα MCF-7 έναντι υγιών κυττάρων MRC-5 (TPI >>1). Όμως λόγω TPI (<2) τα σύμπλοκα Ag-tpp-X-PODT
 θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως "φάρμακα περιορισμένου TPI " σύμφωνα με τον Code of Federal Regulations (CFR) παρ. 20.33 του FDA.
- Τα ποσοστά εμφάνισης των μικροπυρήνων στα κύτταρα MRC-5, που επωάστηκαν με σύμπλοκα Ag-tpp-X-PODT στις τιμές IC₅₀ είναι παρόμοια με αυτό των κυττάρων ελέγχου και του cisplatin, αποδεικνύοντας τη χαμηλή γονοτοξικότητα των νέων συμπλόκων.

Η μελέτη του μηχανισμού δράσης in vitro των νέων ενώσεων έδειξε ότι:

 Η μελέτη του μηχανισμού δράσης in vitro των ενώσεων σε κύτταρα MCF-7 με μορφολογική οπτική εξέταση, με κατακερματισμό του πυρηνικού DNA, τη χρώση τους με τις χρωστικές AO/EB καθώς και της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα νέα σύμπλοκα Ag-tpp-X-PODT προκαλούν απόπτωση μέσω του κατακερματισμού του DNA είτε δρώντας απευθείας στο DNA είτε με ενεργοποίηση των μονοπατιών που οδηγούν σε κατακερματισμό του κυτταρικού DNA στην περίπτωση των Ag-tpp-H-PODT και Ag-tpp-o-F-PODT.

Η μελέτη του μηχανισμού δράσης ex vivo των ενώσεων σε CT-DNA έδειξε ότι:

- Η μελέτη του μηχανισμού δράσης *ex vivo* των ενώσεων σε CT-DNA έδειξε ότι τα σύμπλοκα Ag-tpp-X-PODT αλληλοεπιδρούν με το DNA μέσω συναρμογής στην μικρή αύλακα.
- Το σύμπλοκο Ag-tpp-p-F-PODT έχει τις μεγαλύτερες τιμές σταθεράς δέσμευσης
 k_b καθώς k_{app} για το DNA.
- Οι τιμές σταθεράς δέσμευσης k_b και k_{app} επιβεβαιώνουν την αλληλεπίδραση του συμπλόκου Ag-tpp-p-F-PODT με το CT-DNA στην μικρή αύλακα.

ΣΤ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή συντέθηκαν, χαρακτηρίστηκαν και μελετήθηκαν πέντε νέες σύμπλοκες ενώσεις από την αντίδραση των υποκατεστημένων θειονοοξαδιαζολίων-1,3,4 (X-PODT) με το άλας του AgNO₃ και την μιτοχονδριοτροπική τριφαινυλοφωσφίνη. Επίσης μελετήθηκε η κρυσταλλική δομή των υποκατεστημένων θειονο-οξαδιαζολίων-1,3,4.

Τα νέα σύμπλοκα 1-5 χαρακτηρίστηκαν σε στερεή κατάσταση με μελέτη της περίθλασης ακτίνων X (XRD), φασματοσκοπία υπέρυθρου (FT-IR), μελέτη του σημείου τήξεως και σε υγρή κατάσταση με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (1^H-NMR).

Οι μοριακοί τύποι τους είναι οι: Ag(PPh₃)₃H-PODT (1), Ag(PPh₃)₃o-Cl-PODT (2), Ag(PPh₃)₃m-Cl-PODT (3), Ag(PPh₃)₃o-F-PODT (4), Ag(PPh₃)₃p-F-PODT (5).

Επίσης ελέγχθηκε η σταθερότητα τους σε διάλυμα DMSO-d₆ με φασματοσκοπία UV-Vis και ¹H-NMR για χρονικό διάστημα 48 ωρών.

Το X-PODT συναρμόζεται στον άργυρο μέσω του ατόμου του θείου του διπλού δεσμού άνθρακα-θείου και με τα τρία άτομα φωσφόρου των μορίων τριφαινυλοφωσφίνης, σχηματίζοντας μια παραμορφωμένη τετραεδρική δομή.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η αντιπολλαπλασιαστική δράση των νέων συμπλόκων έναντι δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών του μαστού: την MCF-7, η οποία εκφράζει υποδοχείς ορμονών και την MDA-MB-231, όπου απουσιάζουν οι υποδοχείς ορμονών. Όλα τα σύμπλοκα έδειξαν αντικαρκινική δράση. Επιπλέον τα νέα σύμπλοκα έδειξαν εκλεκτική δράση έναντι της κυτταρικής σειράς MCF-7 σε σχέση με τη κυτταρική σειρά MDA-MB-

231. Όλα τα σύμπλοκα είναι 1.8-10.6 φορές πιο δραστικά από το cisplatin έναντι των δύο καρκινικών σειρών. Εξ' αυτών τα σύμπλοκα Ag(PPh₃)₃m-Cl-PODT και Ag(PPh₃)₃p-F-PODT εμφάνισαν την ισχυρότερη αντικαρκινική δράση.

Η τοξικότητα τους ελέγχθηκε *in vitro* στους φυσιολογικούς ινοβλάστες MRC-5, ενώ η πιθανή γονοτοξικότητα ελέγχθηκε *in vitro* με μελέτη μικροπυρηνίσκων, όπου τα νέα σύμπλοκα έδειξαν χαμηλή γονοτοξικότητα.

Οι μελέτες της μορφολογίας των κυττάρων, του κατακερματισμού του πυρηνικού DNA, της χρώσης με τις χρωστικές AO/EB καθώς και της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα νέα σύμπλοκα Ag(PPh₃)₃X-PODT προκαλούν απόπτωση μέσω του κατακερματισμού του DNA, είτε δρώντας απευθείας σε αυτό, είτε με ενεργοποίηση των μονοπατιών που οδηγούν σε κατακερματισμό του κυτταρικού DNA.

Τέλος ελέγχθηκε ο μηχανισμός δράσης *ex vivo* των συμπλόκων στο CT-DNA και αποκαλύφθηκε ότι αυτά έχουν την ικανότητα να αλληλοεπιδρούν με τα μόρια DNA μέσω συναρμογής στη μικρή αύλακα της διπλής έλικας, ενώ το σύμπλοκο Ag(PPh₃)₃p-F-PODT εμφανίζει την μεγαλύτερη συγγένεια (μεγαλύτερη σταθερά δέσμευσης,k_b) με το CT-DNA.

Z. ABSTRACT

Five new complexes of silver (I) with substituted 1,3,4-oxadiazole-2-thiones (X-PODTs) and pnictogen triphenylphosphine, were synthesized and fully characterized. The crystal structure of the substituted-1,3,4-oxadiazole-2-thiones was also characterized.

The new complexes 1-5 were characterized in the solid state by X-ray crystallography, Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), melting point and in solution by UV-Vis spectroscopy, ¹H-NMR spectroscopy.

The formulae of the complexes are: Ag(PPh₃)₃H-PODT (1), Ag(PPh₃)₃o-CI-PODT (2), Ag(PPh₃)₃m-CI-PODT (3), Ag(PPh₃)₃o-F-PODT (4) and Ag(PPh₃)₃p-F-PODT (5). Furthermore, their stability in solution was examined with UV-Vis and ¹H-NMR spectroscopies for 48 hours.

The silver (I) atom coordinates with the X-PODT ligands via the sulphur atom of its sulphur-carbon double bond and with the three phosphorous atoms of triphenyl-phosphines. The geometry around silver (I) atom found to be distorted tetrahedral.

The antiproliferative activity of new complexes was evaluated against human breast adenocarcinoma cancer cells, MCF-7 (hormone-dependent (HD)) and MDA-MB-231 (hormone-independent (HI)). All complexes exhibit antiproliferative activity. Furthermore, the new synthesized compounds exhibit selective inhibition of MCF-7 cells against MDA-MB-231 cells. All complexes exhibit stronger antiproliferative activity, 1.8-10.6 fold higher than cisplatin shows, against the two breast cancer cells lines. Generally, Ag(PPh₃)₃m-CI-PODT and Ag(PPh₃)₃p-F-PODT complexes have better activity compared to other new complexes.

The toxicity was examined *in vitro* against normal fetal lung fibroblast cells (MRC-5 cells). The genotoxicity was tested *in vitro* by micronucleus (MN) assay against MRC-5 cells. The synthesized complexes exhibit lower genotoxicity in comparison with cisplatin.

The determination of the apoptotic cell death caused by new complexes, was confirmed by cell morphology study, DNA fragmentation study and acridine orange/ ethidium bromide (AO/EB) staining. The permeabilization of the mitochondrial membrane test revealed that tested new complexes induce apoptosis via mitochondrial pathways.

Moreover, DNA binding studies demonstrated that the new compounds interact with CT-DNA molecules by small groove binding. Ag(PPh₃)₃p-F-PODT complex has the highest affinity (binding constant, k_b) towards CT-DNA.

Η. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 65(1), 5–29. https://doi.org/10.3322/caac.21254

https://gco.iarc.fr/data/300-greece-fact-sheets.pdf.

3. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin,

D.M., Forman, D., Bay, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources,

methods and majors patterns in GLOBOCAN 2012.

4. Renan, M. J. How many mutations are required for tumor genesis? Implications from human cancer data. Mol. Carcinogenesis, (1993), 7, 139-146.

5. Foulds, L. (1954). CANCER RESEARCH The Experimental Study of Tumor Progression: A Review. Cancer Research, 1954, 14, 5, 327-339.

http://aacrjournals.org/cancerres/articlepdf/14/5/327/2371091/cr0140050327.pdf

6. Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbgern, R.T., Brooks, M.W. and Weinberg, R. A. Creation of human tumor cells with defined genetic elements. Nature, (1999), 400, 464-468.

7. Nowell P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. Science, (1976), 194, 23-28.

8. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. In Cell (Vol. 100), 57-70.

9. Fedi, P., Tronick, S.R., and Aaronson, S.A. (1997). Growth factors in Cancer medicine, J.F. Holland, R.C. Bast, D.I. Martin, E. Frei, D.W. Kufe, and R.R. Weichtselbaum, eds. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins), pp 41-64.
10. Slamon D. J., Clark G. M., Wong S. G., Levin W. L., Ullrich A., McGuire W. L., Human Breast Cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, Science, 1987 Jan 9; 235 (4785) :177-82.

 Yarden, Y., and Ullrich, A. (1988). EGF and erbB2 receptor overexpression in human tumors. Growth factor receptor tyrosine kinases. Annu. Rev. Biochem. 57,443-478.

12. Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell, 81, 323-330.

13. Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol. 68,251-306.

14. Loten, J., and Sachs, L. (1996). Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. Leukemia 10, 925-931.
15. Butt, A. J., Firth S. M., and Baxter, R.C. (1999). The IGF axis and programmed cell death. Immunol. Cell Biol. 77, 256-262.

16. Ashkenazi and Dixit, V. M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. Curr. Opin. Cell Biol. 11,255-260.

17. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer 26, 239-257.

18. Harris, C.C. (1996). p53 tumor suppressor gene from the basic research laboratory to the clinic- an abridged historical perspective. Carcinogenesis 17, 1187- 1198.

19. Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. Biochemistry, 62, 1180-1190.

20. Wright, W.E., Pereira-Smith, O. M., and Shay, J.W. (1989). Reversible cellular senescence implications for immortalization of normal human diploid fibroplasts. Mol. Cell Biol. 9,3088-3092.

21. Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N. G., Greider, C.W., Harley, C.B., and Bacchetti, S. (1992). Telomerase shortening associated with

chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity.

EMBO J. 11,1921-1929.

22. Shay, J. W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer, Eur. J. Cancer 33, 787-791.

23. Bryan, T. M., and Cech, T. R. (1999). Telomerase and the maintenance of chromosome ends. Curr. Opin. Cell Biol.11, 318-324.

24. Bouck, N., Stellmach, V., and Hsu, S.C. (1996). How tumors become angiogenic. Adv. Cancer Res.69, 135-174.

25. Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 86, 353-364.

26. Folkman J. (1997). Tumor angiogenesis. In cancer medicine, J.F. Holland, R.C.

Best, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum, eds. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins), pp. 181-204.

27. Fedi P., Pierce J. H., Di Fiore P.P., and Kraus M.H. Efficient Coupling with Phosphatidylinositol 3-Kinase, but Not Phospholipase Cγ or GTPase-Activating Protein, Distinguishes ErbB-3 Signaling from That of Other ErbB/EGFR Family

Members. Mol. And Cellular Biology, Jan. 1994, Vol 14, No 1, pp. 492-500.

28. Veikkola, T., and Alitalo, K. (1999). VEGFs, reseptors and angiogenesis. Semin. Cancer Biol. 9, 211-220.

29. Sporn M.B. (1996): The war on cancer. Lancet 347,1377-1381.

30. Christofori, G., and Semb, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule Ecadherin as a tumor-suppressor gene. Trends Biochem. Sci. 24, 73-76.

31. Johnson, J.P. (1991). Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. Cancer metastasis Rev. 10, 11-22.

32. Coussens, L.M., and Werb, Z. (1996). Matrix metalloproteinases and the development of cancer. Chem. Biol. 3, 895-904.

33. Chambers, A.F., and Matrisian, L.M. (1997). Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. J. Natl. Cancer Inst. 89, 1260-1270.

34. Hanahan D., and Weinberg R.A. (2011). The Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144, Issue 5, pages 646-674.

35. Momenimovahed Z., Salehinyia H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. Breast Cancer-Targets and Therapy 11,151-164.

36. Ferlay, J.,Colombet, M., Soerjomataram, I., Modhers, C., Parkin, D.M., Pineros, 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. 37. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, CA: Cancer Journal of Clinics, 2021, 71, 209-249.

38. U. Mehraj, A.H. Dor, N.A. Wani, M.A. Mir. (2021) Tumor microenviroment promotes breast cancer chemoresistance, Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 87, 147-158.

39. A. Avagliano, M.R. Ruocco, F. Aliotta, I. Belviso, A. Accurso, S. Masone, S. Montagnani, A. Arcucci. (2019) Mitochondrial Flexibility of Breast Cancers: A Growth Advantage and a Therapeutic Opportunity, Cells ,8 (5),401.

40. K. Visvanathan, R.T. Chlebowski, P. Hurley, N.F. Col,M. Ropka, D. Collyar, M. Morrow, C. Runowitz, K.I. Pritchard, K.Hagerty, B. Arun, J. Garber, V.G. Vogel, J.L. Wade, P. Brown, J.Cuzick, B.S. Kramer, and S.M. Lippman. 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. J. Clin. Oncol., 2009, Vol. 27, No 19,3235-3258. 41. E. Petridou, E. Syrigou, N. Toupadaki, X. Zavitsanos, W. Willett and D.

Trichopoulos. Determinants of Age at Menarche as Early Life Predictors of Breast Cancer Risk. Int. J. Cancer: 68,193-198 (1996).

42. M. Lambe, C.C. Hsieh, H.W. Chan, A. Ekbom, D. Trichopoulos & H.O.Adami. Parity, age at first and last birth, and risk of breast cancer: A population-based study in Sweden. Breast Cancer Research and Treatment, (1996), Vol. 38, pages 305-311. 43. R.T. Chlebowski, S.L. Hendrix, R.D. Langer, M.L. Stefanick, M. Gass, D. Lane, R.J. Rodabough, M.A. Gilligan, M.G. Gyr, C.A. Thomson, J. Khandekar, H. Petrovitch, A.Mc Tiernan. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: The Women's Health Initiative Randomized Trial. JAMA,2003, 289 (24),3243-3253.

44. N.C. Onland-Moret, R. Kaaks, P.A.H. van Noord, S. Rinaldi, T. Key, D.E. Grobbee and P.H.M. Peeters. Urinary endogenous sex hormone levels and the risk of postmenopausal breast cancer. British Journal of Cancer (2003) 88, 1394-1399.
45. M.H Greene, Genetics of Breast Cancer. Mayo Clin. Proc., 1997;72: 54-65.
46. L.W. Ellisen, and D.A. Haber. Hereditary Breast Cancer. Annu. Rev. Medicine

1998. 49; 425-36.

47. D.F. Easton, D.T. Bishop, D.Ford, G.P. Crockford, and the Breast Cancer Linkage Consortium. Genetic Linkage Analysis in Familial Breast and Ovarian Cancer: Results from 214 Families. Am. J. Hum. Genet. 52:678-701, 1993.

48. N.F. Boyd, G.A. Lockwood, J.W. Byng, D.L. Tritchler, M.J. Yaffe. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 1998 Dec; 7 (12): 1133-44.

49. M.D. Holmes and W.C. Willett. Does diet affect breast cancer risk? Breast Cancer Res. 2004, 6:170-178.

50. S. Tretli. Height and weight in relation to breast cancer morbidity and mortality. A prospective study of 570,000 women in Norway. Int. J. of Cancer, 1989, Vol. 44, Iss. 1, pages 23-30.

51.S.L. Hancock, M.A. Tucker, R.T. Hopps. Breast cancer after treatment of Hodgkin's disease. J. of the Nat. Cancer Inst., 1993, Vol. 85, Iss.1, pages 25-31.

52. http://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/treatment-of-breast-cancer-

by-stage/treatment-of-breast-cancer-stages-i-iii.html

53. http://www.breastcancer.org/treatment/chemotherapy

54. http://www.cancer.org/treatment/treatment-and-side-effects/treatment-

types/chemotherapy/how-chemotherapy-drugs-work.html

55. Boulikas T., Pantos A., Bellis E., Christofis P. Designing platinum compounds in

cancer: structures and mechanisms (review). Cancer Therapy 2007; 5:537-583.

56. Messerman R.A., Allegra C.J. Antifolates. In Chabner B.A., Longo D.L., eds Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice, 3rd Philadelphia: Lippincott-Raven,2001:139.

57. http://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-

types/targeted-therapy/what-is.html

58. Von Minckwitz G., Huang C.S., Mano M.S., S. Loibl, E.P. Mamounas, M. Untch, N. Wolmark, P. Rastogi, A. Schneeweiss, A. Redondo, H.H. Fischer, W. Jacot, et al., for the KATHERINE investigators. Trastuzumab emtansine for residual invasive HER2-positive breast cancer. N.Engl. Med. 2019, 380 (7): 617-628.

59. Livingstone S.E., Mihkelson A.E. Metal chelates of biologically important compounds. II. Nickel complexes of dialkyldithiophosphates and their adducts with nitrogen heterocycles. Inorg. Chem. 9(11) 2545-2551 (1970).

60. Williams D.R., Metals, ligands, and cancer. Chem. Rev. 72(3),203-213, (1972).

61. Rosenberg B., VanCamp L., Trosko J.E., Mansour V.H. Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents. Nature 222(5191),385-386 (1969).

62. Sherman S.E., Gibson D., A.H. Wang, S.J. Lippard. X-tray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA: cis-[Pt(NH3)2(d(pGpG))]. Science, 1985 Oct 25:230(4724):412-7.

63. Marloye M., Berger G., Gelbcke M. & Dufrasne F. A survey of the mechanisms of action of anticancer transition metal complexes. Future Med. Chem. 10.4155/fmc-2016-0153, pp 1-24.

64. Huang R., Wallqvist A., Covell D.G. Anticancer metal compounds in NCI's tumorscreening database: putative mode of action. Biochemical Pharmacology, Vol. 69, Iss. 7,2005, pages 1009-1039.

65. Gianferrara T., Bratsos I. and Alessio E. A categorization of metal anticancer compounds based on their mode of action. Dalton Transactions, 2009(37), 7588-7598.
66. Fantoni N.Z., El-Sagheer A.H. and Brown T. A Hitchhiker' Guide to Click-Chemistry with Nucleic Acids. Chemical Reviews, 2021, 121(12), 7122-7154.

67. Erxleben A. Mitochondria-Targeting Anticancer metal Complexes. Curr. Med. Chem., 2019, 26, 697-728.

68. Smith R.A.J., Hartley R.C. and Murphy M.P. Mitochondria-Targeted Small Molecule Therapeutics and Probes. Antioxidants & Redox Signaling, 2011, Vol. 15, No. 15, 3021-3038. 69. Grammaticos P.C, Diamantis A (2008). "Useful known and unknown views of the father of modern medicine, Hippocrates and his teacher Democritus". Hellenic Journal of Nuclear Medicine. 11 (1): 2–4.

70. Lansdown A.B. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. Curr. Probl. Dermatol., 2006, 33, 17-34.

71. Fox, C. I. Silver sulfadiazine-a new topical therapy for Pseudomonas in burns. Arch. Surg., 1968, 96, 184-188.

72. B. Biersack et al., Coinage Metal Complexes Against Breast Cancer, Current Medicinal Chemistry, 2012, 19, 3949-3956.

73. Hecel A., Kolkowska P., Krzywoszynska K., Szebesczyk A., Rowinska-Zyrek M. and Kozlowski H. Ag+ Complexes as Potential Therapeutic Agents in Medicine and Pharmacy. Curr. Med. Chemistry, 2019, 26, 624-647.

74. M. Poyraz , C.N. Banti , N. Kourkoumelis , V. Dokorou , M.J. Manos , M. Simcic , S. Golic-Grdadolnik ,T. Mavromoustakos , A.D. Giannoulis , I.I. Verginadis , K. Charalabopoulos , S.K. Hadjikakou . Synthesis, structural characterization and biological studies of novel mixed ligand Ag (I) complexes with triphenylphosphine and aspirin or salicylic acid. Inorganica Chimica Acta 375, (2011), 114-121.

75. C.N. Banti, A.D. Giannoulis, N Kourkoumelis, A M Owczarzak, M Poyraz, M Kubicki, K Charalabopoulos, S.K. Hadjikakou. Mixed ligand-silver (I) complexes with anti-inflammatory agents which can bind to lipoxygenase and calf-thymus DNA modulating their function and inducing apoptosis. Metallomics, Vol. 4, Iss. 6, 2012, pages 545-560.

76. McCann M., Coyle B., McKay S., McCormack P., Kavanagh K., Devereux M. McKee V., Kinsella P., O' Connor R. & Clynes M. Synthesis and X-ray crystal structure of [Ag(phendio)₂]ClO₄ (phendio= 1,10-phenanthroline-5,6-dione) and its effects on fungal and mammalian cells. Biometals 17, 635-646 (2004).

77. Deegan C., Coyle B., McCann M., Devereux M., Egan D.A. In vitro anti-tumor effect of 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendione), [Cu(phendione)₃](ClO4)₂. 4H₂O and [Ag(phendione)₂]ClO₄ using human epithelian cell lines. Chemico-Biological Interactions, Vol.164, Iss.1-2, 2006, pages 115-125.

78. P.C. Zachariadis, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, S. Skoulika, A. Michaelides, J. Balzarini, E.De Clercq. Synthesis, Characterization and in Vitro study of the Cytostatic and Antiviral Activity of New Polymeric Silver (I) Complexes with Ribbon Structures Derived from the Conjugated heterocyclic Thioamide 2-Mercapto-3,4,5,6-tetra-hydropyrimidine. Eur. J. Inorg. Chem.,2004,1420-1426.

79. S.K. Hadjikakou, I.I. Ozturk, M.N. Xanthopoulou, P.C. Zachariadis, S. Zartilas, S. Karkabounas, N. Hadjiliadis. Synthesis, structural characterization and biological study of new organotin (IV), silver (I) and antimony (III) complexes with thioamides. J.Inorg. Biochem., 2008; 102(5-6): 1007-15.

80. P.C Zachariadis, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, A. Michaelides, S. Skoulika, Y. Ming, Y. Xiaolin. Synthesis, study and structural characterization of a new water soluble hexanuclear silver (I) cluster with the 2-mercapto-nicotinic acid with possible antiviral activity. Inorg. Chim. Acta, 2003, Vol. 343, pp. 361-365.

81. N, Yadav, P. Kumar, A.Chhikara, M. Chapra. Development of 1,3,4-oxadiazole
thione based novel anticancer agents: Design, synthesis and in-vitro studies.
Biomedicine & Pharmacotherapy 95 (2017) 721-730.

82. O.O. Ajani and K.T. Iyaye. Recent advances on oxadiazole motifs: Synthesis, reactions and biological activities. Mediterranean Journal of Chemistry 2020, 10(5), 418-452.

83. B.S Holla, R. Gonsalves, S. Shenoy. Synthesis and antibacterial studies of a new series of 1,2-bis(1,3,4-oxadiazol-2-yl) ethanes and 1,2-bis(4-amino-1,2,4-triazol-3-yl) ethanes, Eur. J. Med.Chem. 35(2) (2000) 267-271.

84. F. Macaev, G. Rusu, S. Pogrebnol, A. Gudima, E. Stingaci, L. Vlad, et al.,

Synthesis of novel 5-aryl-2-thio-1,3,4-oxadiazoles and the study of their structure-antimycobacterial activities. Bioorg. Med. Chem. 13(16) (2005) 4842-4850.

85. F. Liu, X.-Q.Luo, B.-A. Song, P.S. Bhadury, S. Yang, L.-H. Jin, et al., Synthesis and antifungal activity of novel sulfoxide derivatives containing trimethoxyphenyl substituted 1,3,4-oxadiazole moiety, Bioorg. Med. Chem. 16 (7) (2008) 3632-3640.

86. A.A. EI-Emam, O.A. AI-Deeb, M. AI-Omar, J. Lehmann, Synthesis, antimicrobial, and anti-HIV-1 activity of certain 5-(1-adamantyl)-2-substituted thio-1,3,4-oxadiazoles and 5-(1-adamantyl)-3-substituted aminomethyl-1,3,4-oxadiazole-2-thiones. Bioorg. Med. Chem. 12 (19) (2004) 5107-5113.

87. M.M. Burbuliene, V. Jakubkiene, G. Mekuskiene, E. Udrenaite, R. Smicius, P. Vainalavicius, Synthesis, anti-inflammatory activity of derivatives of 5-(2-

disubstitutedamino-6-methyl-pyrimidin-4-yl)-sulfanylmethyl-3H-1,3,4-oxadiazole-2thiones, II Farmaco 59 (10) (2004) 767-774.

88. E. Palaska, G. Sabin, P. Kelicen, N.T. Durlu, G. Altinok, Synthesis and antiinflammatory activity of 1-acylthiosemicarbazides, 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiazoles and 1,2,4-triazole-3-thiones, II Farmaco 57 (2) (2002) 101-107.

89. M. Akhter, A. Husain, B. Azad, M. Ajmal, Azoylpropionic acid based 2,5disubstituted-1,3,4-oxadiazoles: synthesis and their anti-inflammatory and analgesic activities, Eur. J. Med. Chem. 44 (6) (2009) 2372-2378.

90. K.G. Liu, J.S, Smith, A.H. Ayscue, B.R. Henke, M.H. Lambert, L.M. Leesnitzer, et al., Identification of a series of oxadiazole-substituted α -isopropoxy phenylpropanoic acids with activity on PPAR α , PPAR γ , PPAR δ , Bioorg. Med. Chem. Lett. 11 (17) (2001) 2385-2388.

91. A. Zarghi, S.A. Tabatabai, M. Faitzi, A. Ahadian, P. Navabi, V. Zanganeh et al.,

Synthesis and anticonvulsant activity of new 2-substituted-5-(2-benzyloxyphenyl)-

1,3,4-oxadiazoles. Bioorg. Med. Chem. Lett. 15 (7) (2005) 1863-1865.

92. D. Kumar, S. Sundaree, E.O. Johnson, K. Shah, An efficient synthesis and
biological study of novel indolyl-1.3.4-oxadiazoles as potent anticancer agents, Bioorg.
Med. Chem. Lett. 19 (15) (2009) 4492-4494.

93. M.A. Abdel-Aziz, K. Merwally, A.M. Gamal-Eldeen, O.M. Aly, 1,3,4-oxadiazole-2thione derivatives; novel approach for anticancer and tubulin polymerization inhibitory activities, Anti-Cancer Agents Med. Chem. (Formerly Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents) 16 (2) (2016) 269-277. 94. A.O. Maslat, M. Abussaud H. Tashtoush, M. Al-Talib, Synthesis, antibacterial, antifungal and genotoxic activity of bis-1,3,4-oxadiazole derivatives, Pol. J. Pharmacol. 54 (1) (2002) 55-60.

95. A.A. Farghaly, A.A. Bekhit, J. Young Park, Design and synthesis of some oxadiazolyl, thiadiazolyl, thiazolidinyl, and thiazolyl derivatives of 1 H-Pyrazole as antiinflammatory antimicrobial agents, Arch. Pharm. 333 (2-3) (2000) 53-57.

96. A. Andreani, M. Granaiola, A. Leoni, A. Locatelli, R. Morigi, M. Rambaldi,

Synthesis and antitubercular activity of imidazo 2,1-b thiazoles, Eur. J. Med. Chem. 36 (9) (2001) 743-746.

97. A. Arora, A. Kumari, Dr. A. K. Arora, Dr. C. Nithish, Y. Singh. Recent Advances
Made on Anticancer Drugs-The Therapeutic Potential of the Aromatic Heterocyclic
Compounds. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 58(1), September-October 2019; Article No.
17, Pages: 104-113.

98. S. Dash, B. A. Kumar, J. Singh, B. Maiti, T. Mairy, Synthesis of some novel 3,5disubstituted 1,3,4-oxadiazole derivatives and anticancer activity on EAC animal model, Med. Chem. Res. 20 (8) (2011) 1206-1213.

99. S. Bondock, S. Adel, H.A. Etman, F.A. Badria, Synthesis and antitumor evaluation of some new 1,3,4-oxadiazole-based heterocycles, Eur. J. Med. Chem. 48 (2012) 192-199.

100. Du, M.; Bu, X.H.; Guo, Y.M.; Liu, H.; Batten, S.R.; Ribas, J.; Mak, T.C.W. First Cull diamandoid net with 2-fold interpenetrating frameworks. The role of anions in the construction of the supramolecular arrays. Inorg. Chem. 2002, 41, 4904-4908.

101. Terenzi, A.; Fanelli, M.; Ambrosi, G,; Amatori, S.; Fusi, V.; Giorgi, L.; Turco Liveri, V.; Barone, G. DNA binding and antiproliferative activity toward human carcinoma cells of copper (II) and zinc (II) complexes of a 2,5-diphenyl [1,3,4] oxadiazole derivatives. Dalton Trans. 2012, 41, 4389.

J.D.S. Chaves, F. Neumann, T.M. Francisco, C.C. Correa, M.T. Paz Lopes, H.
Silva, A.P.S. Fontes, M.V. de Almeida. Synthesis and cytotoxic activity of gold (I)
complexes containing phosphines and 3-benzyl-1,3-thiazolidine-2-thione or 5-phenyl1,3,4-oxadiazole-2-thione as ligands, Inorganica Chimica Acta 414 (2014) 85-90.
J.D.S. Chaves, L. Guimaraes Tunes, C.H. de J. Franco, T.M. Francisco, C.C.
Correa, S.M.F. Murta, R.L. Monte-Neto, H. Silva, A.P.S. Fontes, M.V. de Almeida.
Novel gold (I) complexes with 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione and phosphine as
potential anticancer and antileishmanial agents. Eur. J. of Med. Chem., Vol 127, 2017, 727-739.

104. Y.Q. Zhao, J. Zhou, R. He, G. Ke Wang, L.X. Miao, X. G. Xie, Y. Zhou. New gold (I) complexes with 5-aromatic ring-1,3,4-oxadiazole-2-thione and triphenylphosphine as potential multifunctional materials. Tetrahedron Letters, 61(52), Dec. 2020: 152668.

105. S.A.O. Ahmed. New mercury (II) complexes containing the mixed ligands 5phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione, and diphosphines Ph₂P(CH₂)nPPh₂, n=1-4 or triphenyl phosphine. Tikrit of Pure Science 18(3) 2013, 122-126. 106. S.A. Kazi. Synthesis and characterization of 5-substituted-(2-

methylbenzimidazol-1-yl)-1,3,4-oxadiazole-2-thione and Its Metal Complexes of Fe

(III), Hg (II), Zn (II) and Sn (II). Chem. Sci. Transactions 2014,3(2),796-804.

107. S.A. Kazi. Synthesis and characterization of a New Bidentate Ligand 5Substituted-(2-methyl-5-nitro-1-imidazomethyl)-1,3,4-oxadiazole-2-thione and its Metal
Complexes of Ag (I), Cu (II) and Zn (II). E-Journal of Chemistry 2011,8(51), 5127-5136.
108. M. Pirimova, S. Kadirova, A. Ziyayev, N. Parpiyev. Synthesis and research of
new mixed metal complexes Co(II), Ni(II), Cu(II) and Mn(II) based on ammonium
vanadate and 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thione. Journal of Critical Rewiews, vol
7, Issue 11, 464-471.

109. J. Sandstrom & I. Wennerbeck. Tautomeric Cyclic Thiones, Part II. Acta Chem. Scandinavica 20 (1996), 57-71.

110. G.M. Sheldrick, A short history of SHELX, Acta Crystallographica, A64 (2008) 112-22.

111. G.M. Sheldrick, Crystal refinement with SHELX, Acta Crystallographica, C71 (2015) 3-8.

112. V. Vichai, K. Kirtikara, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, Nat. Protoc. 2006; 1(3): 1112-6.

113. C.N. Banti, C. Papatriantafyllopoulou, M. Manoli, A.J. Tasiopoulos, and S.K. Hadjikakou. Nimesulide Silver Metallodrugs, Containing the Mitochondriotropic, Triaryl Derivatives of Pnictogen; Anticancer Activity against Human Breast Cancer Cells. Inorg. Chem. 2016, 55, 17, 8681-8696.

114. C.N. Banti and S.K. Hadjikakou. Evaluation of Genotoxicity by Micronucleus
Assay in vitro and by Allium Cepa Test in vivo. Bio. Protoc. 2019 Jul 20; 9(14): e3311.
115. C.N. Banti, A.D. Giannoulis, N. Kourkoumelis, A.M. Owczarzak, M. Poyraz, M.
Kubicki, K. Charalabopoulos, S.K. Hadjikakou. Mixed ligand-silver (I) complexes with
anti-inflammatory agents which can bind to lipoxygenase and apoptosis, 2012,
Metallomics, 4, 545-560.

116. G.K. Latsis, C.N. Banti, N. Kourkoumelis, C. Papatriantafyllopoulou, N. Panagiotou, A. Tasiopoulos, A. Douvalis, A.G. Kalampounias, T. Bakas, S.K. Hadjikakou, Poly Organotin Acetates against DNA with Possible Implementation on Human Breast Cancer, 2018, Int. J. Mol. Sci., 19, 2055.

117. L. Tabrizi, H. Chiniforoshan, P. Mc Ardle, M. Ebrahimi, T. Khayamian. A novel bioactive Cd (II) polymeric complex with mefenamic acid: Synthesis, crystal structure and biological evaluations. Inorganica Chimica Acta 432 (2015) 176-184.

118. L. Kyros, C.N. Banti, N, Kourkoumelis, M. Kubicki, I. Sainis & S.K. Hadjikakou, Synthesis, characterization, and binding properties towards CT-DNA and lipoxygenase of mixed-ligands silver (I) complexes with 2-mercaptothiazole and its derivatives and triphenylphosphine. J. Biol. Inorg. Chem. (2014) 19:449-464.

119. T.S. Lobana, R. Sultana, R.J. Butcher, J.P. Jasinski, J.A. Golen, A. Castineiras, K. Propper, F.J. Fernandez, M.C. Vega. Heterocyclic-2-thione derivatives of silver(I): synthesis, spectroscopy and structures of mono- and di-nuclear silver (I) halides complexes Jour. of Organometallic Chemistry, 745-746 (2013), 460-9.

120. J.K. Aulakh, T.S. Lobana, H. Sood, D.S. Arora, R. Kaur, J. Singh, I. Garcia-Santos, M. Kaur and J.P. Jasinski. Silver derivatives of multi-donor heterocyclic thioamides as antimicrobial/anticancer agents: unusual bio-activity against methicillin resistant S. aureus, S. epidermidis, and E. Faecalis and human bone cancer MG63 cell line. RSC Advances, 2019, 9, 15470-15487.

121. L. Kyros, N. Kourkoumelis, M. Kubicki, L. Male, M.B. Hursthouse, I.I. Verginadis, E. Gouma, S. Karkabounas, K. Charalabopoulos, and S.K. Hadjikakou. Structural Properties, Cytotoxicity, and Anti-inflammatory Activity of Silver (I) Complexes with tris (p-tolyl)Phosphine and 5-Chloro-2-Mercaptobenzothiazole. Bioinorganic Chemistry and Applications, Volume 2010, Article ID 986860,12 pages.

122. J.E. Huheey, E.A. Keiter, R.L. Keiter. Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity, 4th ed., Harper Collins, N.Y. 1993.

123. L. Pauling, The Nature of the Chemical Bond, third ed., Comell University Press,N.Y., 1960.

124. E.S.Raper. Complexes of Heterocyclic thione donors, Coord. Chem. Reviews,61 (1985), 115-184.

125. P.D.Akrivos. Recent studies in the coordination chemistry of heterocyclic thiones and thiolates, Coord. Chem. Reviews, 213 (2001), 181-210.

126. B.Singh and K.P.Thakur. Thioamide Bonds and Nature of Bonding – II. J. Inorg.Nucl. Chem., 1974, Vol. 36, pp. 1735-1737.

127. C.N.R. Rao and R. Venkataraghavan. Contribution to the Infrared spectra of
Five-membered N- and N,S-Heterocyclic compounds. Canadian Journal of Chemistry,
42, 1964, 43-49.

128. I. Sainis, C.N. Banti, A.M. Owczarzak, L. Kyros, N. Kourkoumelis, M. Kubicki, S.K. Hadjikakou. New antibacterial, non-genotoxic materials, derived from the functionalization of the anti-thyroid drug methimazole with silver ions. Journal of Inorganic Biochemistry 160 (2016) 114-124.

129. Y.Q. Zhao, J. Zhou, R. He, G.K. Wang, L.X. Miao, X. G. Xie, Y. Zhou. New gold (I) complexes with 5-aromatic ring-1,3,4-oxadiazole-2-thione and triphenylphosphine as potential multifunctional materials. Tetrahedron Letters 61, (2020), 152668.

130. M. Forward, D. Bohmann, J.P. Fackler, R.J. Staples. Luminescence studies of gold (I) thiolate complexes. Inorg. Chem., 34, (1995), 6330-6336.

131. J. Sherine, A. Upadhyay, A. Mishra, D. Kumar, S. Pal & S. Harinipriya. Ag (I) and Au (III) Mercaptobenzothiazole complexes induced apoptotic cell death. Scientific Reports, (2019) 9:621.

N.R.F.M. Sofyan, F.J. Nordin, M.R.M.A. Razak, S.N.A.A. Halim, N.A.F.M. Khir,
 A. Muhammad, N.F. Rajab, and R. Sarip. New Silver Complexes with Mixed
 Thiazolidine and Phosphine Ligands as Highly Potent Antimalarial and Anticancer
 Agents. Hindawi Journal of Chemistry, Volume 2018, Article ID 8395374, 10 pages.
 N.M. Polychronis, C.N. Banti, C.P. Raptopoulou, V. Psycharis, N. Kourkoumelis,
 S.K. Hadjikakou. Non steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) in breast cancer

chemotherapy; antimony (V) salicytate a DNA binder. Inorganica Chimica Acta, 489 (2019) 39-47.

T.S. Lobana and R. Sultana. Metal derivatives of heterocyclic-2-thiones:
Variable donor ability, C-S rupture and new structural motifs. J. Chem. Sci. Vol. 124,
No 6, November 2012, pp. 1261-1268.

135. C.E. Carraher Jr., M.R. Roner, K. Shachi, A. Moric-Jonhson, L. Miller, G. Barrot, A. Battin, N.T. Trang, N. Scokdeo, Z. Islam. Control of Breast Using Organotin Polymers, 2015, Int. J. Polym. Mater., 64, 800-814.

136. D.B. Shpakovsky, C.N. Banti, G. Beaulieu-Houle, N. Kourkoumelis, M. Manoli, M.J. Manos, A.J. Tasiopoulos, S.K. Hadjikakou, E.R. Milaeva, K. Charalabopoulos, T. Bakas, I.S. Butler, N. Hadjiliadis. Synthesis, structural characterization and in vitro inhibitory studies against human breast cancer of the bis-(2,6-di-tert-butylphenol) tin(IV) dichloride and its complexes, 2012, Dalton Trans., 41, 14568-14582.

137. V. Tsiatouras, C.N. Banti, A.M. Grzeskiewicz, G. Rossos, N. Kourkoumelis, M. Kubicki, S.K. Hadjikakou. Structural, photolysis and biological studies of novel mixed metal Cu (I) – Sb (III) mixed ligand complexes., 2016, J. Photochem., 163, 261-268.

138. C.N. Banti, V. Tsiatouras, K. Karanicolas, N. Panagiotou, A.J. Tasiopoulos, N. Kourkoumelis, S.K. Hadjikakou. Mixed ligand-silver (I) complexes with anti-

inflammatory agents which can bind to lipoxygenase and calf-thymus DNA modulating their function and inducing apoptosis, 2012, Mettalomics, 4, 545-560.

139. C.N. Banti, C. Papatriantafyllopoulou, M. Manoli, A.J. Tasiopoulos, S.K.

Hadjikakou. Nimesulide Silver Metallodrugs, Containing the Mitochondriotropic, Triaryl

Derivatives of Pnictogen; Anticancer Activity against Human Breast Cancer Cells. 2016, Inorg. Chem., 55, 8681-8696.

140. O. Torres-Bugarin, M.G. Zavala-Cerna, A. Nava, A. Flores-Garcia, M.L. Ramos-Ibarra. Potential uses, limitations and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. Disease Markers, 2014, 1-13.

141. C.N. Banti, C. Papatriantafyllopoulou, C. Papachristodoulou, A.G. Hatzidimitriou, and S.K. Hadjikakou. New Apoptosis Inducers Containing Anti-inflammatory Drugs and Pnictogen Derivatives: A New Strategy in the Development of Mitochondrial Targeting Chemotherapeutics. J. Medicinal Chemistry, 2023, 66, 6,4131-4149.

142. C. Wang, R.J.Youle. The role of mitochondria in apoptosis. Annu. Rev. Genet. 2009:43:95-118.

143. G. Kroemer, L. Galluzzi, C. Brenner. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiol. Rev., 2007, Jan; 87(1):99-163.

144. M.P. Chrysouli, C.N. Banti, N. Kourkoumelis, N. Panayiotou, G.S. Markopoulos, A.J. Tasiopoulos, S.K. Hadjikakou. Chloro(triphenylphosphine) gold (I) a forefront reagent in gold chemistry as apoptotic agent for cancer cells. Journal of Inorganic Biochemistry, Volume 179, 2018, pp 107-120.

145. X. Wu, H. Li, S. Song, R.Zang, W. Hou. Facile synthesis of camptothecin intercalated layered double hydroxide nanohybrids via a coassembly route.International Journal of Pharmaceutics, Volume 454, Issue 1, 2013, 453-461.

146. C.N. Banti, V. Tsiatouras, K. Karanicolas, N. Panagiotou, A.J. Tasiopoulos, N. Kourkoumelis, S.K. Hadjikakou. Antiproliferative activity and apoptosis induction of

organo-antimony(III)-copper(I) conjugates, against human breast cancer cells. 2019, Molecular Diversity, https://doi.org/10.1007/s11030-019-10014-z.

147. C.N. Banti, A.G. Hatzidimitriou, N. Kourkoumelis, S.K. Hadjikakou. Diclofenac conjugates with biocides through silver (I) ions (CoMeD's); Development of a reliable model for the prediction of anti-proliferation of NSAID's-silver formulations. 2019, Journal of Inorganic Biochemistry 194, (2019),7-18.

148. F. Dimiza, A.N. Papadopoulos, V. Tangoulis, V. Psycharis, C.P. Raptopoulou, D.P. Kessissoglou and G. Psomas. Biological evaluation of non-steroidal antiinflammatory drugs-cobalt (II) complexes. Dalton Trans., 2010, 39, 4517-4528.

149. D.A. Lutterman, A. Chouai, Y. Liu, Y. Sun, C.D. Stewart, K.R. Dunbar and C. Turro. Intercalation is not required for DNA Light Switch Behavior, J. Am. Chem. Soc., (2008),130, 1163-1170.

150. C.N. Banti, L. Kyros, G.D. Geromichalos, N. Kourkoumelis, M. Kubicki, S.K. Hadjikakou. A novel silver iodide metalo-drug: experimental and computational modeling assessment of its interaction with intracellular DNA, lipoxygenase and glutathione. Eur. J. Med. Chem., 2014, 77, 388-399.

151. C.N. Banti, A.D. Giannoulis, N. Kourkoumelis, A. M. Owszarzak, M. Kubicki and S.K. Hadjikakou. Novel metallo-therapeutics of the NSAID naproxen. Interaction with intracellular components that leads the cells to apoptosis. Dalton Trans., 43, (2014), 6848-6863.

152. R. Palchaudhuri and P.J. Hergenrother. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. Current Opinion of Biotechnology, 18, (2007), 497-503.

153. J. Qian, W. Gu., H. Liu, F. Gao, L. Feng, S. Yan, D. Liao and P. Cheng. The first dinuclear copper (II) and zinc (II) complexes containing novel Bis-TACN: syntheses, structures, and DNA cleavage activities. Dalton Trans., (2007), 1060-1066.

154. T. Afrati, A.A. Pantazaki, C. Dendrinou-Samara, C. Raptopoulou, A. Terzis and D.P. Kessissoglou. Copper inverse-9-mettallacrown-3 compounds interacting with DNA. Dalton Trans., 39, (2010), 765-775.

155. R. Khan, M. Usman, R. Dhivya, P. Balaji, A. Alsalme, H. Al Lohedan, F. Arjmand, K. Al Farhan, M.A. Akbarsha, F. Marchetti, C. Pettinari, S. Tabassum. Heteroleptic Copper (I) Complexes of "Scorpionate" Bis-pyrazolyl Carboxylate Ligand with Auxiliary Phosphine as Potential Anticancer Agents: An Insight into Cytotoxic Mode, Scientific Reports, 2017, 1-17.

156. X. Sheng, X.-M. Lu, Y.-T. Chen, G.Y. Lu, J.-J. Zhang, Y. Shao, F. Liu, and Q. Xu. Synthesis, DNA-Binding, Cleavage, and Cytotoxic Activity of New 1,7-Dioxa-4,10diazacyclododecane Artificial Receptors Containing Bisguanidinoethyl or Diaminoethyl Double Side Arms. Chemistry – A European Journal, 2007, 13, 9703-9712.

157. G.K. Latsis, C.N. Banti, N. Kourkoumelis, C. Papatriantafyllopoulou, N. Panagiotou, A. J. Tasiopoulos, A. Douvalis, A.G. Kalampounias, T. Bakas and S.K. Hadjikakou. Poly Organotin Acetates against DNA with Possible Implementation on Human Breast Cancer. Int. J. Molecular Science, 2018, 19, 2055.

158. L. Tabrizi, H. Chiniforoshan, P. Mc Ardle, M. Ebrahimi, T. Khayamian. A novel bioactive Cd (II) polymeric complex with mefenamic acid: Synthesis, crystal structure and biological evaluations. Inorganica Chimica Acta, 432 (2015), 176-184.

159. A. Kellett, Z. Molphy, C. Slator, V. Mckee and N.P. Farrell. Molecular methods for assessment of non-covalent metallodrug-DNA interactions. Chem. Soc. Rev., Tutorial Review, 2019.

160. G. Zhang, X. Hu, N. Zhao, W. Li, L. He. Studies on the interaction of aminocarb with calf thymus DNA by spectroscopic methods. Pesticide Biochemistry and Physiology, 98, (2010), 206-212.

161. S. Satyanarayna, J.C. Dabrowiak and J.B. Chaires. Neither Δ-nor Λ-Tris
(phenanthroline) ruthenium (II) Binds to DNA by Classical Intercalation. Biochemistry,
Volume 31, No 39 (1992), 9319-9324.

162. T. Afsar, J.H. Trembley, C.E. Salomon, S. Razak, M. R. Khan & K. Ahmed. Growth inhibition and apoptosis in cancer cells induced by polyphenolic compounds of Acacia hydaspica: Involvement of multiple signal transduction pathways. Scientific Reports, (2016) 6:23077.

163. N. A. Razak, N. Abu, W.Y. Ho, N. R. Zamberi, S.W. Tan, N.B. Alitheen, K. Long
& S. K. Yeap. Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast
cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis.
Scientific Reports, (2019) 9:1514.

164. R.D. Abughazaleh and T.S. Tracy, Wiley StatsRef: Statistics Reference Online,2007, Wiley Encyclopedia of Clinical Trials).

165. J.Tamargo, J.-Y. Le Heuzey, P. Mabo. Narrow therapeutic index drugs: a clinical pharmacological consideration to flecainide, Eur. J. Clin., Pharmacol. (2015) 71:549-567.

166. G. Levy. What are narrow therapeutic index drugs? Clinical Pharmacology & Therapeutics, Vol. 63, No 5, may 1998,501-505.

167. C. N N' soukpoe-Kossi, C. Descoteaux, E. Asselin, H.-A. Tajmir-Riahi, G. Berube. DNA interaction with novel antitumor estradiol-platinum (II) hybrid molecule: a comparative study with cisplatin drug. DNA Cell Biol. 2008 Feb; 27(2):101-7.

168. C.N. Banti, C.P. Raptopoulou, V. Psycharis, S.K. Hadjikakou. Novel silver glycinate conjugate with 3D polymeric intermolecular self-assembly architecture; an antiproliferative agent which induces apoptosis on human breast cancer cells. J. Inorg. Biochem. 2021 Mar:216:111351.

N.Z. Fantoni, T. Brown, and A. Kellett. DNA-Targeted Metallodrugs: An
 Untapped Source of Artificial gene editing technology. ChemBioChem 2021,22,1-23.
 M. Alagesan, N.S.R Bhuvanesh and N. Djiarmaraj. Potentially cytotoxic new
 copper (II) hydrazine complexes: synthesis, crystal structure and biological properties.
 Dalton Trans., 2013, 42,7210-7223.

171. K. Lazarou, B. Bednarz, M. Kubicki, I.I. Verginadis, K. Charalabopoulos, N. Kourkoumelis, S.K. Hadjikakou. Structural, photolysis and biological studies of the bis(µ2-chloro)-tris(triphenylphosphine)-di-copper(II) and chloro-tris(triphenylphosphine)-copper(I) complexes. Study of copper(I)-copper(I) interactions.

Inorg. Chim. Acta 2010, 363, 763-772.

172. M. Kyropoulou, C.P. Raptopoulou, V. Psyharis, G. Psomas. Ni (II) complexes with non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Structure and interaction with DNA and albumins. Polyhedron, 2013, 61, 126-136.

M. B. Martin, R. Reiter, T. Pham, Y.R. Avellanet, J. Camara, M. Lahm, E.
Pentecost, K. Pratar, B.A. Gilmore, S. Divekar, R.S. Dagata, J.L. Bull, and A. Stoica.
Estrogen-Like Activity of Metals in MCF-7 Breast cancer cells. Endocrinology 144(6):
2425-2436.

174. C.E. Carraher Jr., M.R. Rener, K. Shahi and G. Barot. Structural Consideration in designing Organotin Polyethers to Arrest the growth of Breast Cancer Cells In Vitro. Materials 2011, 4, 801-815.

175. V.I. Balas, I.I. Verginadis, G.D. Geromichalos, N. Kourkoumelis, L. Male, M.B. Hursthouse, K.H. Repana, E. Yiannaki, K. Charalabopoulos, T. Bakas, S.K. Hadjikakou.Synthesis, structural characterization and biological studies of the triphenyltin (IV) complex with 2-thiobarbituric acid. European Journal of medicinal Chemistry 46 (2011) 2835-2844.

176. I. Rasool, M. Ahmad, Z.A. Khan, A. Mansha, T. Maqbool, A.F. Zahoor and S. Aslam. Recent advancements in oxadiazole-based anticancer agents. Tropical Journal of Pharmaceutical research march 2017; 16 (3); 723-733.

177. A. Benassi, F. Doria and V. Pinota. Groundbreaking Anticancer Activity of Highly Diversified Oxadiazole Scaffolds. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 8692.

178. B. Rubina, P. Dharam P, K. Garima, K. Ravi, D. Manni. Recent Developments on Pharmacological Potential of 1,3,4-Oxadiazole Scaffold. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, Vol 53, Issue 2(Suppl), Apr-Jun 2019.
179. F.A. Beckford, J. Thessing, A. Stott, A.A. Holder, O.G. Poluektov, L. Li, N.P. Seeram. Anticancer activity and biophysical reactivity of copper complexes of 2-(benzo [d] [1,3] dioxol-5-ylmethylene)-N-alkylhydrazinecarbothioamides. Inorganic Chemistry Communications, 15(2012),225-229.