



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΡΑΣΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ
ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΔΡΑΣΗ»**

Μαρία Σ. Αγιουργίτη
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2012



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΡΑΣΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ
ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΔΡΑΣΗ»**

Μαρία Σ. Αγιουργίτη
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2012

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

Ημερομηνία αίτησης της κ Αγιοργίτη Μαρίας: 20-6-2007

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 613^α/2-10-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Καλφακάκου Βασιλική Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Βεζυράκη Πατρόνα Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 7-11-2007

«Μελέτη των μηχανισμών δράσης συμπλόκων μετάλλων με κυτταροτοξική δράση»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 725^α/6-12-2011


Ανωγειανάκης Γεώργιος	Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στεφάνου Δημήτριος	Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καλφακάκου Βασιλική	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χατζηκακού Σωτήριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Ανόργανης Χημείας, Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βεζυράκη Πατρόνα	Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καρκαμπούνας Σπυρίδων	Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων


Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 21-12-2011

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Μαργαρίτα Τζαφλίδου

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής

Η Γραμματέας της Σχολής

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ



Αφιερώσεις

*Στους γονείς μου
Στέργιο και Δήμητρα*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η χρήση χημικών ουσιών για τη θεραπεία του καρκίνου ξεκινά πολλούς αιώνες παλαιότερα με τη χρήση δρογών που εμφάνισαν αντικαρκινική δράση όπως είναι η ρητίνη Ποδοφύλλου η οποία περιέχει ποδοφυλλοτοξίνη, το *Solanum dulcamara* το οποίο περιέχει σολαμαρίνη, η *Cetraria*, η *Usnea*, η *Cladonia* που περιέχουν ουσκινικό οξύ. Αργότερα, στην προσπάθεια αυτή επιστρατεύτηκε και η συνθετική χημεία η οποία έχει προσφέρει και συνεχίζει μαζί με τις φυσικές χημικές ουσίες να προσφέρει σημαντική βοήθεια στη θεραπευτική του καρκίνου. Επομένως, δεν μπορεί παρά να νιώθει δέος όποιος συμβάλλει σε αυτή την πολύ σημαντική προσπάθεια για την αντιμετώπιση μιας ασθένειας η οποία εμφανίζει συνεχώς αυξανόμενη επίπτωση στο γενικό πληθυσμό. Επομένως, δεν μου μένει παρά να ευχαριστήσω τους ανθρώπους οι οποίοι συνέβαλλαν στην προσπάθειά μου να συμβάλλω έστω και λίγο σε αυτό το τεράστιο εγχείρημα.

Κατ' αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διατριβής μου, τον Καθηγητή κ. Άγγελο Ευαγγέλου για την ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ με αυτό το δύσκολο ερευνητικό πεδίο αλλά και τη σημαντική βοήθεια και την υποστήριξη που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Βασιλική Καλφακάκου, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις συμβουλές και τις υποδείξεις της όσον αφορά τη συγγραφή του παρόντος συγγράμματος αλλά και για τις υποδείξεις και τις παρατηρήσεις της όσον αφορά τις πειραματικές διαδικασίες.

Ευχαριστώ την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Πάτρα Βεζυράκη, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις πολύτιμες συμβουλές της όσον αφορά τα *in vitro* πειράματα, για την καθοριστική συμβολή της όσον αφορά τη παρουσίαση της διδακτορικής διατριβής αλλά και για την υποστήριξη που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σπυρίδων Καρκαμπούνα για τις υποδείξεις του όσον αφορά τις πειραματικές διαδικασίες, αλλά και τις πολύ χρήσιμες συμβουλές του.

Ευχαριστώ επίσης τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σωτήρη Χατζηκακού για τη σύνθεση των οργανομεταλλικών συμπλόκων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή και για την άψογη συνεργασία μας όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Άννα Μπατιστάτου για τη άψογη συνεργασία μας όσον αφορά τις ιστολογικές

μελέτες, χωρίς τη βοήθεια της οποίας δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί η παρούσα διδακτορική διατριβή.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Χαραλαμπίδου για τη σημαντική συμβολή του όσον αφορά την ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ ακόμη τον Επίκουρο καθηγητή Ευάγγελο Κωλέτα, για τις χρήσιμες παρατηρήσεις του όσον αφορά τις πειραματικές διαδικασίες.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Στεφάνου ο οποίος ήταν πάντοτε πρόθυμος να απαντήσει στις ερωτήσεις μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους υποψήφιους διδάκτορες Παναγιώτη Λέκκα και Μαρία Γκιούλη, τον μεταπτυχιακό φοιτητή του Πανεπιστημίου Αθηνών Ιωάννη Μελισόβα και τον Ιατρό Ιωάννη Τσανακίδη για την σημαντική βοήθεια που μου προσέφεραν όσον αφορά την ολοκλήρωση των πειραμάτων.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον Γεωπόνο Ιωάννη Ζελοβίτη, τον Κλινικό Διαιτολόγο Ιωάννη Σίμο και τον Βιολόγο Στέλιο για τις υποδείξεις τους όσον αφορά τις πειραματικές διαδικασίες.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας, μέλη ΔΕΠ, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές, τις γραμματείς και τα μέλη Ε.Τ.Ε.Π. και Ε.Ε.Δ.Ι.Π. για την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τους γονείς μου για τη βοήθεια, τη συμπαράσταση και την υποστήριξη που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.1 Νεοπλάσματα.....	5
1.1.1 Ταξινόμηση των νεοπλασμάτων	5
1.1.2 Ιδιότητες των κακοήθων κυττάρων	7
1.1.3 Καρκινογένεση	8
1.1.4 Μοριακοί μηχανισμοί καρκινογένεσης.....	9
1.2. Η χημειοθεραπεία του καρκίνου	13
1.2.1 Παρενέργειες των αντικαρκινικών φαρμάκων	15
1.2.2 Κατηγορίες αντικαρκινικών φαρμάκων	16
1.2.2.1 Αλκυλιούντες παράγοντες.....	17
1.2.2.2 Οι αντιμεταβολίτες.....	21
1.2.2.3 Αντινεοπλασματικά φάρμακα φυτικής προέλευσης.....	24
1.2.2.4 Αντιβιοτικά	26
1.2.2.5 Ορμόνες.....	28
1.2.2.6 Άλλες ενώσεις με αντικαρκινική δράση.....	29
1.3. Μεταλλικά σύμπλοκα στη χημειοθεραπεία του καρκίνου.....	31
1.3.1 Η σισπλατίνη	32
1.3.2 Σύμπλοκα του λευκόχρυσου ανάλογα της σιπλατίνης	35
1.3.4 Άλλα μέταλλα στη χημειοθεραπεία του καρκίνου	36
1.3.4.1 Μέταλλα του p-block.....	37
1.3.4.2 early d-block μέταλλα (στοιχεία μετάπτωσης)	42
1.3.4.3 Middle and late d-block μέταλλα	46
1.4. Η τοξικολογία των οργανικών ενώσεων του κασσιτέρου.....	53
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	56
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	57
3.1 Υλικά – αντιδραστήρια :.....	57
3.1.1 Υλικά και αντιδραστήρια.....	57
3.1.2 Σύμπλοκα του κασσιτέρου :.....	57
3.2 In vitro πειράματα:.....	58
3.2.1 Κυτταρικές σειρές :.....	58
3.2.2 Ανακαλλιέργεια κυττάρων	58

3.2.3 Διατήρηση των κυττάρων – Πάγωμα / Ξεπάγωμα	58
3.2.4 Σπορά κυττάρων σε πολυτρυβλία.....	59
3.2.5 Υπολογισμός αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη χρήση MTT	59
3.2.6 Δημιουργία αποικιών – μέτρηση	59
3.2.7 Προσδιορισμός απόπτωσης – νέκρωσης με κυτταρομετρία ροής	60
3.2.8 Προσδιορισμός κατακερματισμού του DNA – Ηλεκτροφόρηση του DNA	61
3.3. In vivo πειράματα.....	63
3.3.1 Τοξικότητα σε επίμυες Wistar	63
3.3.1.1 Οξεία τοξικότητα	63
3.3.1.2 Υποξεία τοξικότητα.....	63
3.3.2 Ενοφθαλμισμός καρκινικών κυττάρων σε επίμυες Wistar – έλεγχος της αντικαρκινικής δράσης του συμπλόκου	64
3.4 Στατιστική ανάλυση.....	66
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	67
4.1 In vitro πειράματα :	67
4.1.1 Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο του MTT:	67
4.1.2 Ικανότητα δημιουργίας αποικιών	68
4.1.3 Προσδιορισμός απόπτωσης – νέκρωσης με κυτταρομετρία ροής :	72
4.1.4 Προσδιορισμός κατακερματισμού του DNA – Ηλεκτροφόρηση DNA.....	74
4.2 In vivo πειράματα.....	75
4.2.1 Οξεία τοξικότητα	75
4.2.2 Υποξεία τοξικότητα.....	85
4.2.3 Αντικαρκινική δράση του συμπλόκου σε καρκινοπαθείς επίμυες wistar	87
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	101
5.1 In vitro πειράματα.....	101
5.2 In vivo πειράματα.....	103
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	106
7. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ.....	107
Περίληψη στην Ελληνική.....	107
Περίληψη στην Αγγλική	109
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	111
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	123

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Νεοπλάσματα

Η ανάπτυξη μιας άναρχης μάζας κυττάρων εν μέσω φυσιολογικών ιστών, κατά τρόπο εντελώς αυθαίρετο και εκτός της οικονομίας του οργανισμού χαρακτηρίζεται ως νεόπλασμα.

Η βασική ανωμαλία η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη του νεοπλάσματος είναι ο συνεχής πολλαπλασιασμός των νεοπλασματικών κυττάρων (Ruddon 2007). Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι κύτταρα τα οποία έχουν ξεφύγει από τη φυσιολογική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και απωθούν τους παρακείμενους υγιείς ιστούς (καλοήθεις όγκοι) ή διηθούν τους γειτονικούς ιστούς και τα αγγεία (κακοήθεις όγκοι). Η απώλεια του ρυθμιστικού ελέγχου την οποία παρουσιάζουν τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι το αποτέλεσμα συσσωρευμένων ανωμαλιών σε διάφορα ρυθμιστικά συστήματα του κυττάρου και απεικονίζεται σε διάφορες σκοπιές της συμπεριφοράς των νεοπλασματικών κυττάρων που τα διακρίνει από τα φυσιολογικά κύτταρα (King 2006). Από άποψη μοριακής γενετικής, η ανάπτυξη νεοπλασμάτων αποδίδεται στους εξής κύριους μηχανισμούς : α) στην ενεργοποίηση γονιδίων που υποκινούν τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων (ογκογονίδια), β) στην απενεργοποίηση γονιδίων που αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (ογκοκατασταλτικά γονίδια), γ) στην ενεργοποίηση γονιδίων που εμποδίζουν το φυσιολογικό κυτταρικό θάνατο (αντιαποπτωτικά γονίδια) και δ) στην ενεργοποίηση γονιδίων που υποκινούν την αγγειογένεση (McKinnell 1998).

1.1.1 Ταξινόμηση των νεοπλασμάτων

Τα νεοπλάσματα μπορεί να προέλθουν από τον ανώμαλο πολλαπλασιασμό οποιουδήποτε κυττάρου του σώματος και επομένως υπάρχουν πάνω από 100 διαφορετικοί τύποι νεοπλάσματος οι οποίοι διαφέρουν τόσο ως προς τη βιολογική τους συμπεριφορά όσο και ως προς την ανταπόκρισή τους στη θεραπεία.

Με βάση την βιολογική τους συμπεριφορά, τα νεοπλάσματα διακρίνονται σε καλοήθη και κακοήθη νεοπλάσματα. Τα καλοήθη νεοπλάσματα είναι νεοπλάσματα που αυξάνονται απωθώντας του γύρω ιστούς, χωρίς να τους διηθούν και χωρίς να μεθίστανται (Cooper 2007). Οι καλοήθεις όγκοι αναπτύσσονται αργά, είναι περιγεγραμμένοι και μπορεί να περιβάλλονται από ινώδη κάψα. Αποτελούνται δε από υψηλά διαφοροποιημένο ιστό που μοιάζει με τον ιστό από τον οποίο προήλθαν. Η πρόγνωση των καλοήθων νεοπλασμάτων είναι άριστη, αν και

ορισμένα από αυτά θα μπορούσαν να απειλήσουν τη ζωή του ατόμου ασκώντας πίεση σε κάποιο ζωτικό όργανο (Bocker 2007).

Τα κακοήθη νεοπλάσματα είναι νεοπλάσματα που αυξάνονται διηθώντας τους γύρω ιστούς (Weinberg 2007). Η διήθηση πραγματοποιείται κατά συνέχεια ιστών, ακολουθώντας τη διαδρομή με τη μικρότερη αντίσταση. Τα κακοήθη κύτταρα έχουν επίσης την τάση να εισβάλουν σε λεμφικά και αιμοφόρα αγγεία (Cooper 2007). Με τον τρόπο αυτό, ομάδες κακοήθων κυττάρων μεταφέρονται από την αρχική τους θέση (πρωτοπαθής εστία) σε απομακρυσμένα όργανα και ιστούς, εγκαθιστώντας μεταστάσεις (δευτεροπαθείς εστίες). Οι κακοήθεις όγκοι αναπτύσσονται γρήγορα, έχουν ασαφή όρια και δεν περιβάλλονται από ινώδη κάψα, ενώ εμφανίζουν περιοχές με αιμορραγίες και νεκρώσεις. Αποτελούνται δε από λιγότερο ή καθόλου διαφοροποιημένο ιστό. Τα κακοήθη νεοπλάσματα αναφέρονται συχνά και με τον όρο «καρκίνος».

Η διάκριση των νεοπλασμάτων σε καλοήθη και κακοήθη δεν είναι πάντα εφικτή. Υπάρχουν και νεοπλάσματα που εμπίπτουν σε ενδιάμεσες κατηγορίες. Τα νεοπλάσματα αυτά αναπτύσσονται διηθώντας τους γύρω ιστούς αλλά σπάνια εμφανίζουν μεταστάσεις (νεοπλάσματα χαμηλής κακοήθειας). Τυπικά παραδείγματα αποτελεί το πολύμορφο αδένωμα της παρωτίδας, οι καρκινοειδείς όγκοι της σκωληκοειδούς απόφυσης και το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος (Σιβρίδης 2007).

Τόσο οι καλοήθεις όσο και οι κακοήθεις όγκοι διακρίνονται ανάλογα με την ιστολογική τους προέλευση σε : α) επιθηλιακά νεοπλάσματα, τα οποία προέρχονται από το καλυπτήριο ή το αδενικό επιθήλιο, β) μεσεγχυματικά νεοπλάσματα, τα οποία προέρχονται από διάφορα μεσεγχυματικά κύτταρα, γ) μεικτούς όγκους οι οποίοι σχηματίζονται από δυο ή περισσότερους τύπους διαφοροποιημένων νεοπλασματικών κυττάρων, δ) εμβρυογενείς όγκους ή βλαστώματα, οι οποίοι προέρχονται από τα πολυδύναμα εμβρυϊκά κύτταρα και ε) νεοπλάσματα από βλαστικά-γεννητικά κύτταρα τα οποία προέρχονται από τα ολοδύναμα βλαστικά-γεννητικά κύτταρα των γονάδων.

Βέβαια υπάρχουν και ορισμένα νεοπλάσματα που δεν εμπίπτουν σε καμία από τις παραπάνω κατηγορίες. Τα νεοπλάσματα αυτά είναι τα εξής : α) τα λεμφώματα, τα οποία προέρχονται από κύτταρα του λεμφικού συστήματος, β) οι λευχαιμίες, οι οποίες προέρχονται από κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος, γ) το κακόηθες μελάνωμα, το οποίο προέρχεται από τα μελανοκύτταρα της επιδερμίδας, δ) τα γλοιώματα, τα οποία προέρχονται από τα νευρογλοιακά κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος και ε) οι νευροενδοκρινικοί όγκοι οι οποίοι προέρχονται από τα ενδοκρινικά κύτταρα του συστήματος APUD.

1.1.2 Ιδιότητες των κακοήθων κυττάρων

Η ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων ως αποτέλεσμα της συσσώρευσης ανωμαλιών οι οποίες επιδρούν στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς του κυττάρου έχει ως αποτέλεσμα μεταβολές στη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων οι οποίες τα διακρίνουν από τα φυσιολογικά κύτταρα. Οι ιδιότητες αυτές των καρκινικών κυττάρων είναι οι εξής :

1. Η μορφολογία των καρκινικών κυττάρων. Τα κακοήθη κύτταρα παρουσιάζουν μεγάλο πολυμορφισμό σε μέγεθος και σχήμα, έχουν εμφανείς πυρηνίσκους, πυκνή χρωματίνη και παρουσιάζουν πολλές και ανώμαλες μιτώσεις (Diaz-Cano SJ 2008).
2. Η συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων : Τα κακοήθη κύτταρα δεν ανταποκρίνονται στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς του οργανισμού (Hanahan, 2000). In vivo έχουν την τάση να διηθούν τους γύρω ιστούς και να μεθίστανται σε απομακρυσμένες θέσεις, ενώ in vitro εμφανίζουν απώλεια του φαινομένου της αναστολής του πολλαπλασιασμού μετά από επαφή (Cooper, 2007).
3. Ο μεταβολισμός των καρκινικών κυττάρων : Τα κακοήθη κύτταρα εμφανίζουν στροφή από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στην αναερόβια γλυκόλυση (Yeluri, 2007).
4. Η αντιγονική δομή των καρκινικών κυττάρων : Τα κακοήθη κύτταρα αναπτύσσουν νέα επιφανειακά αντιγόνα όπως το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο, εμφανίζουν αλλοιώσεις στην ολιγοσακχαριδική δομή του γλυκοκάλυκα οι οποίες αναγνωρίζονται ως μεταβολές στη δέσμευση ορισμένων λεκτινών και παρουσιάζουν αλλοιώσεις στα μόρια προσκόλλησης των κυτταρικών μεμβρανών (καντερίνες, ιντεγκρίνες) οι οποίες οδηγούν σε ελάττωση της συνοχής και αύξηση της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων (Berx G, 2009).
5. Η γενετική δομή των καρκινικών κυττάρων : Τα κακοήθη κύτταρα εμφανίζουν πολύ συχνά ανευπλοειδισμό ή πολυπλοειδισμό (Duensing A, 2010), ενώ άλλοτε οι γενετικές αλλοιώσεις είναι μη ειδικές και αφορούν μια συγκεκριμένη πάθηση. Στη τελευταία αυτή περίπτωση ανήκει η χρόνια μυελογενής λευχαιμία η οποία σχετίζεται με το χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας.
6. Ο κυτταρικός κύκλος : Οι χρόνοι του κυτταρικού κύκλου εμφανίζουν διαφορές στις διάφορες μορφές καρκίνου, αν και οι περισσότερες παρουσιάζουν βράχυνση της φάσης G1, διαταραχή η οποία αντικατοπτρίζεται ως έντονη μιτωτική δραστηριότητα (Hanahan, 2010).
7. Η εκκριτική δράση των καρκινικών κυττάρων : Μερικά νεοπλάσματα διατηρούν την ικανότητα να συνθέτουν ορμόνες ή ένζυμα του ιστού από τον οποίο προέρχονται όπως το καρκίνωμα των νησιδίων του παγκρέατος το

οποίο έχει τη δυνατότητα να παράγει ινσουλίνη. Άλλα νεοπλάσματα μπορεί να παράγουν ουσίες ξένες προς τους ιστούς από τους οποίους προέρχονται όπως τα αδιαφοροποίητα καρκινώματα του πνεύμονα τα οποία παράγουν φλοιοεπινεφριδιοτρόπο ορμόνη ή ακόμα και πρωτεϊνικές ουσίες οι οποίες παράγονται φυσιολογικά κατά την εμβρυϊκή ζωή όπως το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο και η α-εμβρυϊκή σφαιρίνη (Yeung SC, 2011).

1.1.3 Καρκινογένεση

Καρκινογένεση είναι η διαδικασία μετατροπής ενός κυττάρου ή ενός πληθυσμού κυττάρων από φυσιολογικό σε κακοήθες.

Το πρώτο βήμα της καρκινογένεσης είναι η εκκίνηση (initiation) (Nowell, 1986). Ο εκκινήτης είναι ένας μεταλλαξιογόνος παράγοντας που προκαλεί ριζικές αλλοιώσεις στη δομή του γενετικού υλικού του κυττάρου. Τέτοιοι παράγοντες είναι : α) τα χημικά καρκινογόνα όπως είναι οι αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες, οι αρωματικές αμίνες, τα αρωματικά αζωχρώματα, οι νιτροζαμίνες, η αφλατοξίνη, οι ανόργανες καρκινογόνες ουσίες, οι αλκυλιούντες παράγοντες, β) οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες όπως η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (ακτίνες X, γ) ή η σωματιδιακή ακτινοβολία (σωμάτια α, β, πρωτόνια, νετρόνια) και γ) οι DNA και οι RNA ογκογόνοι ιοί όπως ο HTLV-1, ο ιός του έρπητα, ο HPV, ο ιός της ηπατίτιδας Β, ο κυτταρομεγαλοϊός και ο ιός Epstein Barr αλλά και ορισμένα βακτήρια όπως το *Helicobacter pylori* (Colditz, 2006). Η προαγωγή (promotion) αποτελεί το δεύτερο βήμα της καρκινογένεσης και εξαρτάται από την παρουσία ουσιών οι οποίες δεν είναι αρκετές από μόνες τους να προκαλέσουν καρκίνο και ονομάζονται προωθητές (Cooper, 2007). Οι προωθητές δεν μεταβάλλουν την αλληλουχία του DNA αλλά προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προκαλούν καρκίνο μόνο μετά την έκθεση του κυττάρου σε κάποιον εκκινήτη. Οι ορμόνες και ιδιαίτερα τα οιστρογόνα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο ως προωθητές σε κάποιες μορφές καρκίνου όπως είναι ο καρκίνος του μαστού (Russo J, 2006). Το επόμενο βήμα στην πολυσταδιακή διαδικασία της καρκινογένεσης είναι η κλωνική επέκταση, δηλαδή ο πολλαπλασιασμός του εξαλλαγέντος κυττάρου με αποτέλεσμα τη δημιουργία της αρχικής νεοπλασματικής μάζας (Fialkow, 1979). Η εξέλιξη (progression) αποτελεί το επόμενο στάδιο της καρκινογένεσης και περιλαμβάνει μια χρόνια διαδικασία επικράτησης του ισχυρότερου κλώνου, μετά από την αλληλεπίδραση με τις αμυντικές δυνάμεις του οργανισμού (Cooper, 2007). Η εξέλιξη φαίνεται ότι οφείλεται σε πολλαπλές, τυχαίες, ανεξάρτητες μεταλλάξεις που προκαλούνται στα νεοπλασματικά κύτταρα με αποτέλεσμα τη δημιουργία νεοπλασματικών υποκλώνων με διαφορετικούς φαινοτυπικούς χαρακτήρες, οπότε τελικά προκύπτει ένας πληθυσμός κυττάρων που αποτελείται από την επικρατέστερη κυτταρική σειρά. Βέβαια, η ανάπτυξη του καρκίνου μπορεί να επιταχυνθεί και από βλάβες του

ίδιου του κυττάρου όπως είναι η ελαττωμένη επιδιόρθωση, αντιγραφή και ο γενετικός ανασυνδυασμός του DNA (Weinberg, 2007). Τέλος, η επέκταση του όγκου περιλαμβάνει τη διήθηση των παρακείμενων ιστών και οργάνων, την είσοδο των καρκινικών κυττάρων στα αγγεία και τη μετάσταση σε απομακρυσμένα όργανα (Mendelsohn, 2001).

Η διήθηση των παρακείμενων ιστών και οργάνων οφείλεται στην έκφραση ειδικών μορίων προσκόλλησης σε βασικές μεμβράνες αλλά και στην έκκριση ειδικών ενζύμων για τη διάσπαση των βασικών μεμβρανών. Η αγγειογένεση είναι απαραίτητη για την τοπική επέκταση του όγκου (Folkman, 2002) και επιτελείται μέσω της επίδρασης αυξητικών παραγόντων όπως είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας και ο αιμοπεταλιακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, οι οποίοι εκκρίνονται είτε από τον ίδιο τον όγκο (Sporin, 1985), είτε από διάφορα μαστοκύτταρα και μακροφάγα που τον διηθούν, είτε από το εξωκυττάριο στρώμα. Πιο συγκεκριμένα, υπό την επίδραση αυξητικών παραγόντων τα γειτονικά αγγεία διατείνονται, ενώ τα κύτταρα του ενδοθηλίου τους μεταναστεύουν προς το αγγειογενετικό ερέθισμα. Η μετακίνηση διευκολύνεται τόσο από την καταστροφή της βασικής μεμβράνης όσο και από τη λύση του γειτονικού στρώματος από πρωτεολυτικά ένζυμα που παράγονται από τους ινοβλάστες. Ακολουθεί πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων και δημιουργία νέων αγγείων.

Η είσοδος των νεοπλασματικών κυττάρων στα αιμοφόρα αγγεία και τα λεμφαγγεία αποτελεί σημαντικό στάδιο στην επέκταση του νεοπλάσματος και οδηγεί στην εμφάνιση απομακρυσμένων μεταστάσεων (Fidler, 2002). Μετά την είσοδό τους στα αγγεία, τα νεοπλασματικά κύτταρα που θα διαφύγουν τους μηχανισμούς άμυνας προσκολλώνται στον ενδοθήλιο και εξαγγειώνονται. Στη θέση εξαγγείωσης δημιουργούνται οι δευτεροπαθείς εστίες του όγκου. Η δημιουργία μεταστάσεων προϋποθέτει την έκφραση συμπληρωματικών μορίων προσκόλλησης με το όργανο-ξενιστή, την αγγειογένεση (Folkman, 2002) και την αύξηση των καρκινικών κυττάρων στη θέση μετάστασης.

1.1.4 Μοριακοί μηχανισμοί καρκινογένεσης

Η καρκινογένεση είναι το αποτέλεσμα συσσώρευσης αλλοιώσεων στο γενετικό υλικό του κυττάρου, οι οποίες μπορεί να είναι κληρονομικές ή επίκτητες και προκαλούν νεοπλασματική νόσο μόνο εφόσον καταλύσουν την ικανότητα του φυσιολογικού κυττάρου να διατηρεί τη γενετική του σταθερότητα. Η κατάλυση της ικανότητας αυτής επέρχεται όταν οι μεταλλάξεις αφορούν γονίδια που σχετίζονται με την μετάδοση σημάτων που ελέγχουν την κυτταρική αύξηση και την κυτταρική επιβίωση. Τέτοια γονίδια είναι τα ογκογονίδια, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα

γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση και τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (Vogelstein, 2004).

Τα ογκογονίδια προέρχονται από μεταλλάξεις των πρωτο-ογκογονιδίων, τα οποία αποτελούν ρυθμιστικά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μεταγωγείς – σήματος οι οποίες προάγουν την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Cooper, 1995). Τα ογκογονίδια εκφράζονται συνήθως σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα πρωτο-ογκογονίδια με αποτέλεσμα την προαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την ανάπτυξη νεοπλασμάτων. Βέβαια, εκτός από τις μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση, τα ογκογονίδια μπορεί να κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες διαφέρουν δομικά και λειτουργικά από τις φυσιολογικές ομόλογές τους. Τα πρωτεϊνικά παράγωγα των ογκογονιδίων ανήκουν στις εξής κατηγορίες :

1. Αυξητικοί παράγοντες : στην περίπτωση αυτή η ογκογόνος δράση των ογκογονιδίων ασκείται μέσω υπερέκφρασης των αυξητικών παραγόντων με αποτέλεσμα την αυτοκρινή διέγερση των κυττάρων που παράγουν τον αυξητικό παράγοντα, η οποία οδηγεί σε ανώμαλο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και συμβάλει στην ανάπτυξη μιας μεγάλης ποικιλίας νεοπλασμάτων (Aaronsons S, 1991). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η υπερέκφραση του γονιδίου c-ras (Sistonen, 1986), η οποία ενισχύει την έκκριση του αυξητικού παράγοντα TGF- α (transforming growth factor- α). Ο παράγοντας αυτός επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα EGFR (epidermal growth factor receptor).
2. Υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και άλλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες : Οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων έχουν δράση τυροσινικής κινάσης και μετατρέπονται σε ογκοπρωτεΐνες εξαιτίας των μεταβολών στις αμινοτελικές τους περιοχές οι οποίες φυσιολογικά προσδένονται στους αυξητικούς παράγοντες (Blume –Jensen, 2001). Για παράδειγμα, το πρωτο-ογκογονίδιο για τον υποδοχέα του platelet-derived growth factor (PDGF) μετατρέπεται σε ογκογονίδιο μετά από μια χρωμοσωμική μετάθεση κατά την οποία το αμινοτελικό άκρο του PDGFR αντικαθίσταται από την αμινοτελική αλληλουχία του μεταγραφικού παράγοντα Tel. Οι αμινοτελικές αλληλουχίες της χμιαϊκής πρωτεΐνης Tel/PDGFR έχουν την ικανότητα διμερισμού απουσία αυξητικού παράγοντα με αποτέλεσμα τη συνεχή ενεργότητα της ενδοκυττάριας περιοχής με δράση κινάσης και την συνεχή παραγωγή ενός σήματος πολλαπλασιασμού από την ογκοπρωτεΐνη. Βέβαια, η ογκογόνος δράση των ογκογονιδίων μπορεί να ασκείται και μέσω υπερέκφρασης των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η υπερέκφραση των υποδοχέων EGFR1 και 2 για τον EGF, και του υποδοχέα VEGFR2/KKDR για τον VEGF (Perona, 2006).

3. Πρωτεΐνες της οδού μετάδοσης μηνύματος : Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν συστατικά του G-protein-coupled signaling pathway, του NF-κB pathway και των μονοπατιών Hedgehog, Wnt και Notch (Taipale 2001, Vogelstein 2004). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν : α) οι πρωτεΐνες G όπως πχ η πρωτεΐνες της οικογένειας ras η οποίες είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών της οικογένειας Raf (Roskoski, 2010), β) οι ενεργοποιητές των γουανοσινο-5'-τριφωσφορικών όπως η gap, γ) οι κυτταροπλασματικές κινάσες συνδεδεμένες με την κυτταρική μεμβράνη όπως οι πρωτεΐνες scr, yes και fgr (Danielian 1993) και δ) οι κυτταροπλασματικές κινάσες μη συνδεδεμένες με την κυτταρική μεμβράνη όπως η πρωτεΐνη raf η οποία είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της ERK MAP κινάσης με τελικό αποτέλεσμα την μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης του κυττάρου (Niault 2010) και οι πρωτεΐνες mos, rim-1, και fps (Nawijn 2011, Singh 1997).
4. Πυρηνικές πρωτεΐνες υποδοχείς μηνύματος : στην περίπτωση αυτή η ογκογόνος δράση των ογκογονιδίων ασκείται μέσω υπερέκφρασης αυτών των πρωτεϊνών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η υπερέκφραση της πρωτεΐνης myc, η οποία επάγει τη μεταγραφή γονιδίων της μίτωσης τα οποία οδηγούν το κύτταρο στη φάση G1, με αποτέλεσμα τη συνεχή αποστολή μηνυμάτων εισόδου στον κυτταρικό κύκλο (Albiñan 2010).
5. Οι κυκλίνες και οι κινάσες εξαρτώμενες από τις κυκλίνες : στην περίπτωση αυτή η ογκογόνος δράση των ογκογονιδίων ασκείται μέσω υπερέκφρασης ή διαφοροποιημένης έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών με αποτέλεσμα την απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου και τη συνεχή κυτταρική διαίρεση (Laird 1997). Για παράδειγμα η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 οδηγεί στην είσοδο του κυττάρου στον κυτταρικό κύκλο.
6. Η τελομεράση : στην περίπτωση αυτή ενεργοποιείται η σύνθεση τελομεράσης με αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης των κυττάρων που φέρουν τη μετάλλαξη (Donate 2011).

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια δρουν φυσιολογικά εμποδίζοντας της κυτταρική διαίρεση και επομένως την ανάπτυξη νεοπλασμάτων (Pelengaris, 2006). Σε πολλές περιπτώσεις, τα γονίδια αυτά μπορεί να χαθούν ή να απενεργοποιηθούν με αποτέλεσμα να λείπει η αρνητική ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στον συνεχή πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Επομένως, η ογκογόνος δράση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων οφείλεται στην απώλεια σημαντικών πρωτεϊνών οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αναστολή ή τη ρύθμιση της εισόδου του κυττάρου στον κυτταρικό κύκλο (Varmus H, 1993). Αυτά τα πρωτεϊνικά παράγωγα ανήκουν στις εξής κατηγορίες :

1. Παράγοντες αναστολής του πολλαπλασιασμού : οι παράγοντες αυτοί συνδέονται με υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης και εκπέμπουν μηνύματα ανασταλτικά του πολλαπλασιασμού. Τυπικό παράδειγμα

αποτελεί το γονίδιο BRCA-1, μεταλλάξεις του οποίου οδηγούν σε ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (Cornelisse, 1996).

2. Μόρια κυτταρικής προσκόλλησης : οι πρωτεΐνες αυτές είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους και με την εξωκυττάρια ουσία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο DCC το οποίο εντοπίζεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου, του ενδομητρίου, του προστάτη και του παγκρέατος. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση των κυττάρων στην εξωκυττάρια ουσία, η αλλοίωση της οποίας διευκολύνει τον αποχωρισμό των κυττάρων από την πρωτοπαθή νεοπλασματική μάζα με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η διήθηση και η μεταστατική διασπορά (Mehlen, 2004).
3. Μόρια της οδού μετάδοσης μηνύματος : οι πρωτεΐνες αυτές ρυθμίζουν αρνητικά τη μετάδοση μηνυμάτων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη NF-1, μια GAP πρωτεΐνη η οποία ασκεί ανασταλτική δράση στο ογκογονίδιο *ras*. Η απώλεια της NF-1 συνοδεύεται από ενεργοποίηση της πρωτεΐνης *ras* η οποία τίθεται σε κατάσταση συνεχούς διέγερσης με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφόρων τύπων καρκίνων όπως είναι η οξεία μυελογενής λευχαιμία (Mullally, 2010).
4. Μόρια που ρυθμίζουν τη μεταγραφή και τον κυτταρικό κύκλο : τα μόρια αυτά ρυθμίζουν αρνητικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα πιο γνωστά μόρια της ομάδας αυτής είναι η πρωτεΐνες p53, INK4 και Rb. Η απώλεια της πρωτεΐνης Rb, η οποία ρυθμίζει την είσοδο του κυττάρου στη φάση S, έχει ως αποτέλεσμα την τυφλή είσοδο του κυττάρου στη φάση S (Cooper, 2007), ενώ η απώλεια της πρωτεΐνης p53, η οποία σταματά τον κυτταρικό κύκλο πριν την είσοδο στη φάση S σε περίπτωση βλάβης του DNA (προάγοντας την σύνθεση της πρωτεΐνης p21 η οποία αναστέλλει τα σύμπλοκα Cdk/cyclin) και προάγει την απόπτωση του κυττάρου που φέρει τη βλάβη, έχει ως αποτέλεσμα την διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ κυτταρικής επιβίωσης και κυτταρικού θανάτου (Sebastian, 2010). Το γονίδιο INK4 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p16, η οποία αναστέλλει την ενεργότητα του συμπλόκου Cdk4,6/cyclin D που είναι υπεύθυνο για την μετάβαση στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Επομένως, οι μεταλλάξεις του γονιδίου INK4 οδηγούν σε αύξηση της ενεργότητας του συμπλόκου Cdk4,6/cyclin D με αποτέλεσμα την απρόσκοπτη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb και τον απρόσκοπτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Cánera, 2007).

Τα γονίδια τα οποία σχετίζονται με την απόπτωση των κυττάρων περιλαμβάνουν αποπτωτικά γονίδια τα προϊόντα των οποίων προάγουν την απόπτωση και τα αντιαποπτωτικά γονίδια τα προϊόντα των οποίων αναστέλλουν την απόπτωση (Farmer, 1985). Οι μεταλλάξεις των γονιδίων αυτών οι οποίες οδηγούν στην εμφάνιση καρκίνου αφορούν είτε την αλλοίωση των πρωτεϊνικών προϊόντων των

αποπτωτικών γονιδίων είτε την υπερέκφραση των αντιαποπτωτικών γονιδίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα πρωτεϊνών οι οποίες ανήκουν στις κατηγορίες αυτές είναι η πρωτεΐνη Bax, η οποία προάγει τον κυτταρικό θάνατο και οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 οι οποίες τον αναστέλλουν (Cooper, 2007).

Τα γονίδια τα πρωτεϊνικά προϊόντα των οποίων σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA μπορεί να υποστούν βλάβη με αποτέλεσμα την ανεπαρκή επιδιόρθωση του DNA και την εμφάνιση μεταλλάξεων οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση καρκίνου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα γονίδια XPA (Camenisch, 2008), ERCC4, POLH, τα οποία οδηγούν σε ελαττωμένη επιδιόρθωση και στην εκδήλωση μελαγχρωματικού ξηροδέρματος, νόσο που συνδέεται με αυξημένη επίπτωση καρκίνου του δέρματος (Gratchev, 2003). Επίσης, η υπερέκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA είναι υπεύθυνη για την αντοχή των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία (Kirschner, 2010).

1.2. Η χημειοθεραπεία του καρκίνου

Ο κλασικός τρίποδος αντιμετώπισης των νεοπλασιών αποτελείται από την χειρουργική αφαίρεση, την ακτινοβολία και τη χημειοθεραπεία. Η χημειοθεραπεία έχει ως κλινικό στόχο την μακρά πλήρη ύφεση της νόσου και εφαρμόζεται είτε ως αγωγή πρώτης εκλογής, είτε προεγχειρητικά για τη σμίκρυνση του όγκου που πρόκειται να αφαιρεθεί, είτε συμπληρωματικά προς τις άλλες θεραπείες, ή τέλος παρηγορητικά.

Η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων από τα αντικαρκινικά φάρμακα ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης, που σημαίνει ότι για δεδομένη δόση φαρμάκου καταστρέφεται σταθερό ποσοστό κυττάρων (Kadam, 2008). Η τοξικότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων είναι συνάρτηση της χορηγούμενης δόσης, των συγκεντρώσεων που επιτυγχάνονται στο κύτταρο-στόχο και της ευαισθησίας του κυττάρου αυτού. Η τοξικότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων αναχαιτίζεται από την ανάπτυξη ανθεκτικότητας από το αντικαρκινικό κύτταρο. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας μπορεί να γίνει με τους εξής μηχανισμούς (Gottesman, 2002) :

- Με μεταβολή της διαβατότητας της κυτταρικής μεμβράνης προς το φάρμακο, με αποτέλεσμα τη μειωμένη πρόσληψη του φαρμάκου
- Με αύξηση της δραστηριότητας των αντλιών αποβολής του φαρμάκου. Ειδική αναφορά γίνεται στην ανθεκτικότητα σε πολλαπλά φάρμακα (Multiple drug resistance) που οφείλεται σε μια μη ειδική μεμβρανική αντλία αποβολής, μια p-γλυκοπρωτεΐνη, τη MDR πρωτεΐνη, της οποίας το γονίδιο υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα (Gottesman, 2002). Η αντλία αυτή

φαίνεται ότι μπορεί να αναστέλλεται με αναστολείς των διαύλων ασβεστίου και νατρίου.

- Με μείωση της ενεργοποίησης των φαρμάκων
- Με αύξηση της δραστηριότητας των μεταβολικών οδών που προσβάλλονται από το φάρμακο
- Με ανάπτυξη παρακαμπτήριων μεταβολικών οδών
- Με αύξηση της ειδικότητας των υποδοχέων
- Με επιδιόρθωση αλλοιώσεων του DNA
- Με ανάπτυξη ανταγωνιστών του φαρμάκου
- Με ανάπτυξη αναστολέων του φαρμάκου
- Με απενεργοποίηση του φαρμάκου

Τα αντικαρκινικά φάρμακα πρέπει να αντιμετωπίσουν την καρκινική μάζα, το μέγεθος της οποίας εξαρτάται από το ποσοστό των κυττάρων που διαιρούνται, το ρυθμό των κυτταρικών απωλειών και το χρόνο του κυτταρικού κύκλου. Ένα κύτταρο μπορεί είτε να βρίσκεται σε ενεργή μεταβολική κατάσταση χωρίς να βρίσκεται στη διαδικασία πολλαπλασιασμού ή θανάτου ή μπορεί να βρίσκεται στη διαδικασία πολλαπλασιασμού ή σε διαδικασία θανάτου. Όμως όλα τα κύτταρα δεν βρίσκονται σε συγχρονισμό. Η έλλειψη συγχρονισμού και η αναγκαιότητα χρόνου για την αποκατάσταση της τοξικότητας (παρενέργειες) των αντικαρκινικών φαρμάκων υποχρεώνει την εφαρμογή της χημειοθεραπείας σε «κύκλους», συνήθως κάθε 22-28 ημέρες (Skeel RT, 2003). Μια άλλη συνήθης πρακτική είναι η εφαρμογή αγωγής με συνδυασμό φαρμάκων, σύμφωνα με συγκεκριμένα κλινικά πρωτόκολλα. Με το συνδυασμό φαρμάκων επιδιώκεται η μεγαλύτερη καταστροφή καρκινικών κυττάρων με καλύτερη ανοχή της θεραπείας, η εξουδετέρωση καρκινικών κυττάρων που ήταν από την αρχή ανθεκτικά προς το φάρμακο του συνδυασμού και η πρόληψη της ανάπτυξης ανθεκτικών καρκινικών κυττάρων (επίκτητη ανθεκτικότητα). Βέβαια, ο σχεδιασμός και η εφαρμογή του συνδυασμού αντικαρκινικών φαρμάκων διέπεται από συγκεκριμένες αρχές (Σιταράς, 1998):

- Απαρτίζεται από φάρμακα που από μόνα τους είναι δραστικά για το συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό
- Τα φάρμακα του συνδυασμού διαθέτουν διαφορετικές τοξικότητες
- Τα φάρμακα του συνδυασμού χορηγούνται με τον καλύτερο για το καθένα τρόπο χορήγησης (δόση και οδός)
- Με το συνδυασμό αντικαρκινικών φαρμάκων γίνεται προσπάθεια σμίκρυνσης των μεσοδιαστημάτων θεραπείας

Κλασικός συνδυασμός που εφαρμόζεται σε λέμφωμα Hodgkin's είναι το σχήμα MOPP (μουστίνη, βινκριστίνη, προκαρβαζίνη και πρεδνιζόνη). Η εφαρμογή του συνδυασμού προκαλεί ύφεση περίπου 80%, τη διπλάσια από την εφαρμογή καθενός φαρμάκου ξεχωριστά.

1.2.1 Παρενέργειες των αντικαρκινικών φαρμάκων

Οι παρενέργειες των αντικαρκινικών φαρμάκων είναι πολλές και μπορούν να ταξινομηθούν σε ομάδες.

Στην πρώτη ομάδα αναφέρονται παρενέργειες που οφείλονται στο θάνατο των φυσιολογικών κυττάρων που διαιρούνται, δηλαδή στην κυτταροτοξικότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων (Chu E, 2006). Στην ομάδα των παρενεργειών αυτών αναφέρεται η μυελοκαταστολή, η οποία προκαλείται από όλα σχεδόν τα αντικαρκινικά φάρμακα με πιθανή εξαίρεση τη μπλεομυκίνη, την ασπαραγινάση, τη στρεπτοζοσίνη και ίσως και τη βινκριστίνη. Η καταστολή του μυελού έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αναιμίας, αιμορραγιών και ανοσοκαταστολής. Επίσης, η κυτταροτοξική δράση των αντικαρκινικών φαρμάκων μπορεί να προκαλέσει βλάβες των επιθηλίων. Μπορεί λοιπόν να προκληθεί στοματίτιδα (για παράδειγμα από τη μεθοτρεξάτη, την ετοποσίδη και την αραβινοσίδη C), διάρροια και έλκη του γαστρεντερικού βλεννογόνου (για παράδειγμα από τη μεθοτρεξάτη, την ακτινομυκίνη D και τα κορτικοστεροειδή), αιμορραγική κυστίτιδα (για παράδειγμα από την κυκλοφωσφαμίδη και την ιφοσφαμίδη) και αλωπεκία (για παράδειγμα από την δοξορουμπικίνη) η οποία είναι παροδική. Στην κυτταροτοξικότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων οφείλεται και η στειρότητα την οποία προκαλούν οι αλκυλιούντες παράγοντες αναστέλλοντας την σπερματογένεση, αλλά και η τερατογένεση η οποία εμφανίζεται όταν τα αντικαρκινικά φάρμακα χορηγούνται στο 1^ο τρίμηνο της κύησης.

Η δεύτερη ομάδα παρενεργειών περιλαμβάνει αυτές που οφείλονται σε βλάβες του DNA που προκαλούν τα ίδια τα αντικαρκινικά φάρμακα (Fischer DS, 2003). Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να οδηγήσουν σε κληρονομούμενες ανωμαλίες, εφόσον συμβούν στα σπερματοζώαρια ή τα ωάρια, ή σε καρκινογένεση εφόσον συμβούν σε σωματικά κύτταρα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αντικαρκινικών φαρμάκων με τέτοια δράση είναι οι αλκυλιούντες παράγοντες.

Στην τρίτη ομάδα παρενεργειών από τα αντικαρκινικά φάρμακα αναφέρονται είτε γενικές (μη ειδικές) παρενέργειες είτε ειδικές για συγκεκριμένα φάρμακα παρενέργειες. Στις γενικές παρενέργειες αναφέρονται η ανορεξία, η ναυτία και ο έμετος που προκαλούνται από διέγερση της χημειοαισθητικής ζώνης του εμέτου από τη σισπλατίνη, τη μεχλωραιθαμίνη, την ακτινομυκίνη D (Μπαρμπουνάκη, 2004). Μη ειδική παρενέργεια είναι και οι ιστικές καταστροφές που προκαλεί το αντικαρκινικό φάρμακο όταν εκχυθεί εκτός της φλέβας χορήγησης. Στις ειδικές για συγκεκριμένα φάρμακα παρενέργειες αναφέρονται η ηπατοτοξικότητα που προκαλεί η μεθοτρεξάτη, η καρδιοτοξικότητα που προκαλεί η αδριαμυκίνη, η νεφροτοξικότητα που προκαλεί η σισπλατίνη, η πνευμονοτοξικότητα που προκαλούν η μεθοτρεξάτη και η μπλεομυκίνη, η νευροτοξικότητα που προκαλεί η

βινκριστίνη και η φωτοευαισθησία που προκαλεί η 5-φθοριοουρακίλη (Φούντζηλας, 2006).

Στις παρενέργειες των αντικαρκινικών φαρμάκων θα πρέπει να αναφερθεί και το σύνδρομο λύσης όγκου (Skeel RT, 2007). Το σύνδρομο αυτό παρατηρείται σε ασθενείς με ταχέως αναπτυσσόμενους όγκους οι οποίοι είναι ευαίσθητοι στη χρησιμοποιούμενη χημειοθεραπεία και σχετίζεται τυπικά με οξείες λευχαιμίες και λεμφώματα. Οφείλεται στον ταχύ θάνατο μεγάλου αριθμού καρκινικών κυττάρων και την απελευθέρωση ενδοκυττάρων ιόντων και παραπροϊόντων του μεταβολισμού στη συστηματική κυκλοφορία κατά τη χημειοθεραπεία. Το σύνδρομο λύσης όγκου εκδηλώνεται με υπερουριχαιμία, υπερφωσφαταιμία, υπερκαλιαιμία, υποασβεστιαίμια και οξεία νεφρική ανεπάρκεια και είναι απειλητικό για τη ζωή του ασθενούς.

1.2.2 Κατηγορίες αντικαρκινικών φαρμάκων

Γενικά, ως κυτταροτοξική αναφέρεται μια ουσία η οποία εμφανίζει τοξικότητα σε καρκινικά κύτταρα *in vitro*, ως αντινεοπλασματική αναφέρεται μια ουσία η οποία εμφανίζει τοξικότητα σε καρκινικά κύτταρα *in vivo* και ως αντικαρκινική αναφέρεται μια ουσία η οποία παρουσιάζει τοξικότητα σε κλινικές δοκιμές (Σιταράς, 1998).

Τα αντικαρκινικά φάρμακα αναστέλλουν το μηχανισμό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται στη φάση G₀ του κυτταρικού κύκλου επηρεάζονται ελάχιστα.

Τα αντικαρκινικά φάρμακα μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής μεγάλες κατηγορίες (Chu E, 2006):

- Τα κύκλου-ειδικά φάρμακα (cycle-specific, phase-non-specific drugs), τα οποία είναι κυτταροτοξικά καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, σε καρκίνους με υψηλό κλάσμα αύξησης
- Τα φάση ειδικά φάρμακα (phase-specific drugs), τα οποία είναι δραστικά σε μια μόνο φάση του κυτταρικού κύκλου
- Τα κύκλου μη ειδικά φάρμακα (cycle-non-specific drugs), τα οποία δρουν σε συμπαγείς όγκους με χαμηλό κλάσμα αύξησης.

Ανάλογα με τον πιθανό μηχανισμό δράσης τους μέσα στο κύτταρο, τα αντικαρκινικά φάρμακα διακρίνονται στις εξής κατηγορίες :

1. Αλκυλιούντες παράγοντες
2. Αντιμεταβολίτες
3. Αντινεοπλασματικά φυτικής προέλευσης
4. Αντιβιοτικά

5. Ορμόνες
6. Βιολογικοί τροποποιητές της βιολογικής απόκρισης
7. Άλλες ενώσεις

1.2.2.1 Αλκυλιούντες παράγοντες

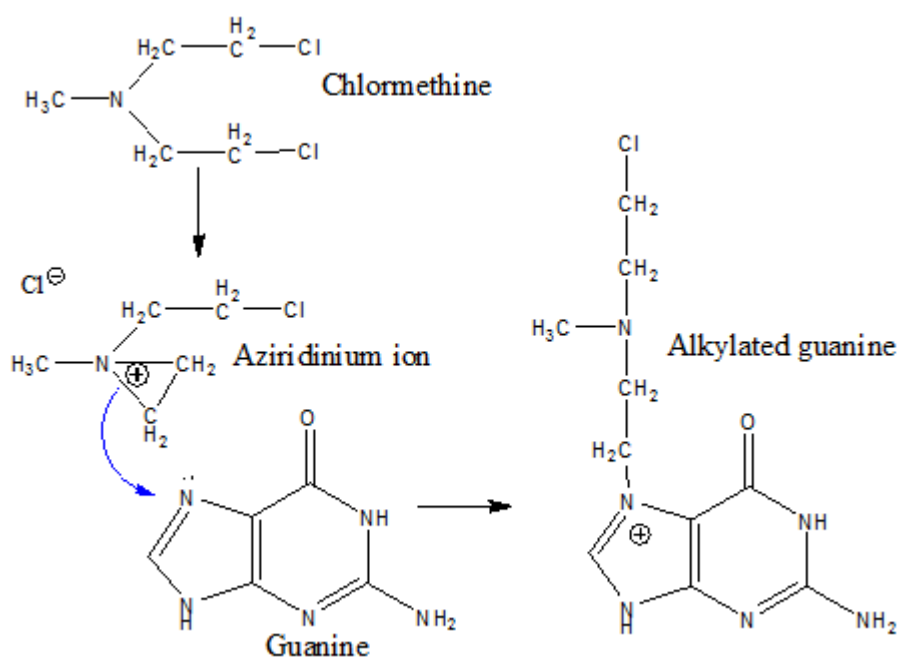
Η χημειοθεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου ξεκίνησε τον Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο από τις μουστάρδες του αζώτου. Οι μουστάρδες του αζώτου αρχικά χρησιμοποιήθηκαν ως όπλα αλλά παρουσίασαν και αντιλευχαιμικές ιδιότητες χάρη στην ικανότητά τους να προκαλούν βιολογική αλκυλίωση.

Τα αλκυλιωτικά αντινεοπλασματικά φάρμακα είναι ενώσεις που δρουν στο DNA, το RNA και σε ορισμένα κυτταρικά ένζυμα (Chabner, 2010). Τα περισσότερα αλκυλιωτικά αντινεοπλασματικά φάρμακα σε κάποιο σημείο της δομής τους περιέχουν την ομάδα $-CH_2CH_2Cl$ συμμετρικά δυο φορές. Τα παράγωγα αυτά είναι ισχυρά ηλεκτρονιόφιλα και παρουσιάζουν την ιδιότητα να αλκυλιώνουν υπό φυσιολογικές συνθήκες ορισμένες πυρηνόφιλες ομάδες των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Πιστεύεται ότι αντιδρούν κυρίως με τη θέση N-7 της γουανίνης στη διπλή αλυσίδα του DNA σχηματίζοντας σταυροδεσμούς και με αυτόν τον τρόπο παρεμποδίζουν το διαχωρισμό του DNA κατά τη μίτωση (Kadam, 2008). Η πυρηνόφιλη προσβολή γίνεται στο N-7 της γουανίνης διότι στη συζυγή της μορφή το άζωτο εμφανίζει αρνητικό φορτίο και συνεπώς η δομή αυτή είναι και πιο σταθερή. Εναλλακτικά, μπορεί το φάρμακο να συνδέσει δυο ομάδες γουανιδίνης στην ίδια αλυσίδα έτσι ώστε το φάρμακο να συνδέεται σαν εξόγκωμα στο πλάι της έλικας του DNA (Avendaño, 2008). Επίσης, είναι δυνατή η λανθασμένη κωδικοποίηση εξαιτίας της αλκυλίωσης των γουανιδομάδων. Η γουανίνη συνήθως βρίσκεται στην κετονική ταυτομερή της μορφή και δημιουργεί ζεύγος με την κυτοσίνη. Όταν όμως αλκυλιώνεται, προτιμά την ενολική ταυτομερή της μορφή που δημιουργεί ζεύγος με τη θυμίνη. Αυτού του είδους η λανθασμένη κωδικοποίηση οδηγεί τελικά σε αλλαγή της αλληλουχίας των αμινοξέων των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να προκαλεί διαταραχή της δομής και της λειτουργίας τους (Chabner, 2010).

Οι αλκυλιωτικές ενώσεις είναι πολύ δραστικές και αντιδρούν με κάθε καλό πυρηνόφιλο (Κουρουνάκη, 2006). Αλκυλιώνουν έτσι πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια εκτός από το DNA. Παρόλα αυτά τα αλκυλιωτικά φάρμακα είναι χρήσιμα στη θεραπεία του καρκίνου επειδή τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ταχύτερα από τα φυσιολογικά και έτσι η διαταραχή της λειτουργίας του DNA θα έχει πιο δραστικές επιπτώσεις στα κύτταρα αυτά από ότι στα καρκινικά.

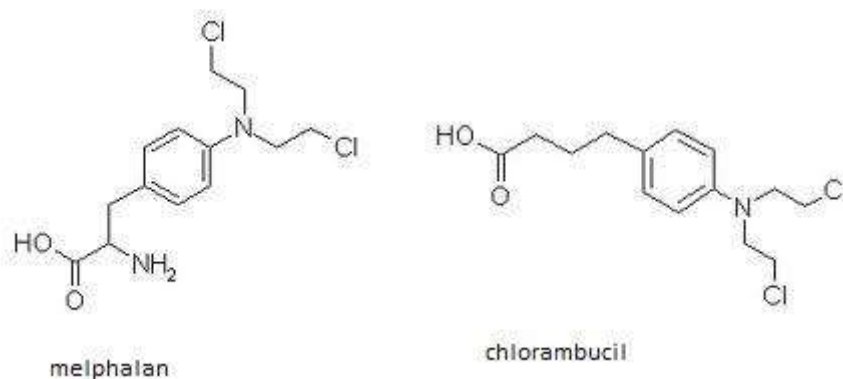
Στην κατηγορία των ακτυλιούντων παραγόντων ανήκουν :

α) η μουστάρδα του αζώτου, μεχλωραιθαμίνη. Η μεχλωραιθαμίνη ήταν το πρώτο αλκυλιωτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε (1942). Στο μόριο της μεχλωραιθαμίνης, το άτομο του αζώτου είναι ικανό να εκτοπίσει ενδομοριακά ένα ιόν χλωρίου σχηματίζοντας το ισχυρά ηλεκτρονιόφιλο ιόν του αζιριδινίου, το οποίο στη συνέχεια αλκυλιώνει το N-7 της γουανίνης. Έτσι, προκύπτει αλκυλίωση του DNA και με επανάληψη της διαδικασίας μπορεί να προκύψει σύνδεση μεταξύ των δυο αλυσίδων του DNA (Κουρουνάκη, 2006). Η μεχλωραιθαμίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της νόσου Hodgkin καθώς και σε μη-Hodgkin λεμφώματα.



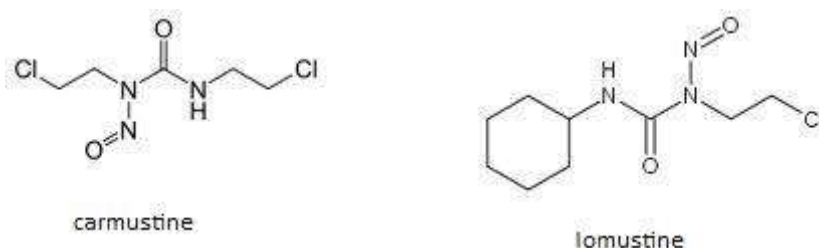
Εικόνα 1.1 : Μηχανισμός δράσης μεχλωραιθαμίνης

β) οι αρυλο-υποκατεστημένες μουστάρδες του αζώτου, μελφαλάνη και χλωραμβουκίλη. Η μελφαλάνη περιέχει στο μόριό της μια ομάδα L-φαινυλαλανίνης, η οποία βοηθά την είσοδο του μορίου στο κύτταρο χρησιμοποιώντας δυο μεταφορείς αμινοξέων, το νάτριο-ανεξάρτητο σύστημα μεταφοράς των L-αμινοξέων και το νάτριο-εξαρτώμενο σύστημα ASC για την αλανίνη, τη σερίνη και την κυστεΐνη (Hosoya K, 2008). Η χλωραμβουκίλη περιέχει μια ομάδα βουτυρικού οξέος η οποία επιτρέπει την κατανομή του μορίου πριν επέλθει η αλκυλίωση και επομένως την χορήγηση per os (Skeel RT, 2003). Επίσης, ένα σημαντικό κλάσμα της χλωραμβουκίλης μετατρέπεται με β-υδροξυλίωση σε ένα πιο ενεργό προϊόν. Η μελφαλάνη χρησιμοποιείται για το πολλαπλούν μυέλωμα και μετεγχειρητικά μετά από αφαίρεση καρκίνου του μαστού, ενώ η χλωραμβουκίλη για τη χρόνια λεμφογενή λευχαιμία, τα μη Hodgkin λεμφώματα, τη νόσο του Hodgkin, τον καρκίνο του μαστού, των ωοθηκών και το χοριοκαρκίνωμα.



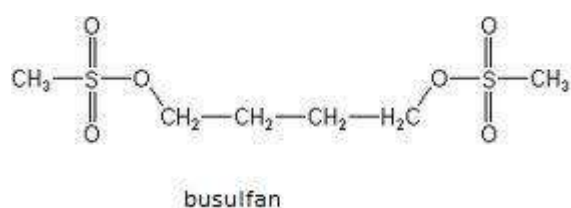
Εικόνα 1.2 : χημική δομή μελφαλάνης και χλωραμβουκίλης

γ) Οι νιτροζουρίες, καρμουστίνη και λομουστίνη. Οι νιτροζουρίες φέρουν την κλασική αντινεοπλασματική φαρμακοφόρο ομάδα των αλκυλιωτικών (-CH₂CH₂Cl) μόνο μια φορά (Fischer, 2003). Οι νιτροζουρίες δημιουργούν καρβανιόντα τα οποία αλκυλιώνουν τα νουκλεϊκά οξέα και ισοκυανικά ιόντα τα οποία καρβουλιώνουν τις αμινομάδες των πρωτεϊνών. Η αλκυλίωση του DNA φαίνεται να πραγματοποιείται στην O-6 ομάδα της γουανίνης. Η υψηλή λιποφιλία των νιτροζουριών επιτρέπει την εύκολη διάβασή τους από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό με αποτέλεσμα να αποτελούν φάρμακα εκλογής για καρκίνους του κεντρικού νευρικού συστήματος (Schellens, 2005). Οι νιτροζουρίες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και σε λεμφώματα, καρκίνο του μαστού, καρκίνο των βρόγχων και του παχέος εντέρου.



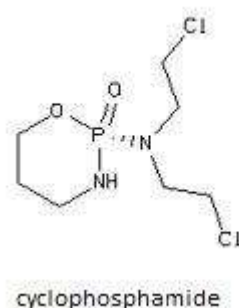
Εικόνα 1.3 : χημική δομή καρμουστίνης και λομουστίνης

δ) Τα παράγωγα των μεθανοσουλφονικών εστέρων όπως είναι η βουσουλφάνη. Τα παράγωγα των μεθανοσουλφονικών εστέρων δρουν αλκυλιώνοντας τις θειολομάδες των πρωτεϊνών (Kadam, 2008). Η δράση τους ασκείται κυρίως στα κοκκιοκύτταρα και χορηγούνται σε χρόνια μυελογενή λευχαιμία.



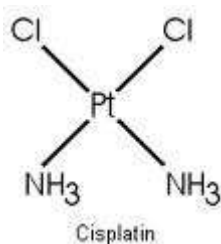
Εικόνα 1.4 : χημική δομή βουσουλφάνης

ε) Το κυκλοφωσφαμίδιο αποτελεί προφάρμακο και δρα μόνο αφού μεταβολιστεί. Η διάσπασή του προς το ενεργό αλκυλιωτικό ιόν γίνεται στο ήπαρ από τα μικροσωμικά ένζυμα και όχι στους ιστούς των όγκων (Avendaño, 2008). Η διάσπαση αυτή ακολουθεί πολλά στάδια και πιστεύεται ότι τελικά προκύπτει το ιόν αζιριδινιίου το οποίο προκαλεί την αλκυλίωση. Το κυκλοφωσφαμίδιο χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά σε μη Hodgkin λεμφώματα, στη νόσο του Hodgkin και σε καρκίνους του μαστού, του ενδομητρίου και των πνευμόνων αλλά και σε σαρκώματα. Με τον ίδιο μηχανισμό δρα και η ιφωσφαμίδη.



Εικόνα 1.5 : χημική δομή κυκλοφωσφαμίδης

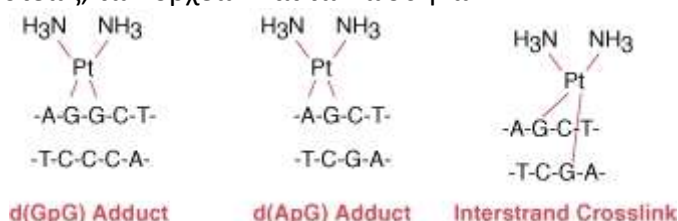
στ) Η σισπλατίνη είναι ένα σύμπλοκο άλας με ένα κεντρικό άτομο Pt που περιβάλλεται από 2 άτομα Cl και 2 μόρια NH₃ σε cis- θέση. Η ανακάλυψή της ήταν τυχαία από μια έρευνα για την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος στην ανάπτυξη των βακτηρίων (Rosenberg, 1965). Κατά τη διάρκεια αυτών των πειραμάτων παρατηρήθηκε ότι η διαίρεση του βακτηριακού κυττάρου αναστέλλονταν εξαιτίας ενός προϊόντος ηλεκτρόλυσης από το ηλεκτρόδιο του λευκόχρυσου. Το προϊόν αυτό ταυτοποιήθηκε ως cis-διαμμώνιο-διχλωρολευκόχρυσος (II) και είναι γνωστό ως σισπλατίνη.



Εικόνα 1.6 : χημική δομή σισπλατίνης

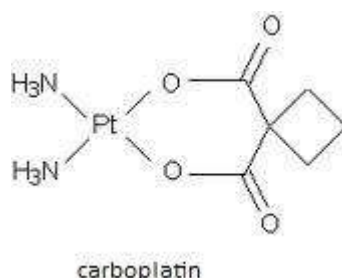
Η σισπλατίνη συνδέεται ισχυρά με το DNA σε περιοχές πλούσιες σε γουανίνη (N-7 αλκυλίωση) με τέτοιο τρόπο ώστε να συνδέεται πολλαπλώς εντός μιας αλυσίδας (Barnes KR, 2007). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το ξετύλιγμα της έλικας του DNA και την παρεμπόδιση της μεταγραφής. Δεσμεύεται επίσης σε μεγάλο βαθμό σε πυρηνικές και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Είναι μη-ειδική του κυτταρικού κύκλου ουσία αλλά τα κύτταρα είναι πιο ευπαθή στη δράση της όταν βρίσκονται

στη φάση G1 και S (Kadam, 2008). Η σισπλατίνη χορηγείται σε καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, των όρχεων και των ωοθηκών.



Εικόνα 1.7 : θέσεις δέσμησης της σισπλατίνης στο DNA

Η καρβοπλατίνη είναι χημικά συγγενής με την σισπλατίνη Όπως και η σισπλατίνη, δημιουργεί σταυροδεσμούς στο DNA μεταξύ των δύο ελίκων, αλλά και μεταξύ διαφορετικών σημείων της ίδιας έλικας (Barnes KR, 2007). Η καρβοπλατίνη χρησιμοποιείται σε ασθενείς που δεν μπορούν να ενυδατωθούν εντατικά, που πάσχουν από νεφρική δυσλειτουργία ή είναι επιρρεπείς σε νευρο- ή ωτοτοξικότητα.



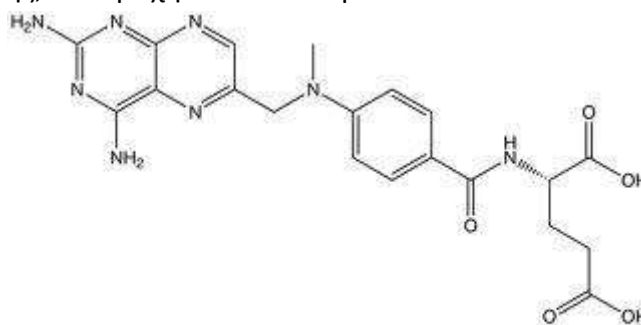
Εικόνα 1.8 : χημική δομή καρβοπλατίνης

1.2.2.2 Οι αντιμεταβολίτες

Οι αντιμεταβολίτες έχουν χημική δομή παρόμοια με αυτή των μεταβολιτών (ενδογενείς μεταβολικές ενώσεις οι οποίες δρουν σε κάποιο μεταβολικό στάδιο, δηλαδή στις διαδικασίες βιοσύνθεσης και βιοαποικοδόμησης) και είναι δυνατό να τους υποκαταστήσουν στη βιοσύνθεση των νουκλεϊκών οξέων. Έτσι, προκύπτουν παραποιημένα προϊόντα και συνεπώς σταματά η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Επίσης, πολλοί από τους αντιμεταβολίτες είναι και αναστολείς ενζύμων. Οι κυριότερες κατηγορίες αντιμεταβολιτών είναι οι εξής :

- Οι αντιμεταβολίτες του φυλλικού οξέος : πρόκειται για ουσίες που έχουν παρεμφερή δομή με το φυλλικό οξύ. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η μεθοτρεξάτη, η οποία συναγωνιστικά αναστέλλει την αναγωγή του διϋδροφυλλικού οξέος, που καταλύει το σχηματισμό τετραϋδροφυλλικού από διϋδροφυλλικό (Schellens, 2005). Φυσιολογικά, το τετραϋδροφυλλικό μετατρέπεται σε διαφορετικά παράγωγα τα οποία λειτουργούν ως συνένζυμα και είναι απαραίτητα για τις αντιδράσεις σύνθεσης πουρινών (της αδενίνης και της γουανίνης), μεθειονίνης και σερίνης. Η κύρια αιτία κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από τη μεθοτρεξάτη είναι η αναστολή

της βιοσύνθεσης των θυμιδυλίων και των πουρινών που απαιτούνται για τη σύνθεση DNA. Έτσι η μεθοτρεξάτη θανατώνει κύτταρα που βρίσκονται στη φάση S. Επίσης, εξαιτίας του γεγονότος ότι η μεθοτρεξάτη αναστέλλει επίσης τη σύνθεση RNA και πρωτεϊνών, το φάρμακο αυτό μειώνει και την ταχύτητα με την οποία εισέρχονται τα κύτταρα στη φάση S. Δηλαδή πρόκειται για ένα αυτορυθμιζόμενο για την φάση S φάρμακο (Kadam, 2008). Η μεθοτρεξάτη χρησιμοποιείται για το χοριοκαρκίνωμα, την οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία, το λέμφωμα Burkitt των παιδιών, το οστεοσάρκωμα, τον καρκίνο της κεφαλής, του τραχήλου και του μαστού.

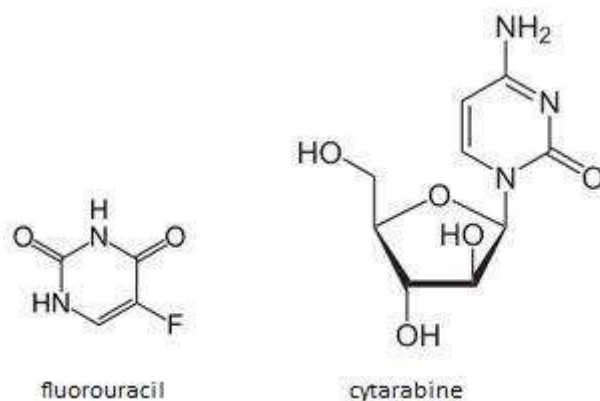


methotrexate

Εικόνα 1.9 : χημική δομή μεθοτρεξάτης

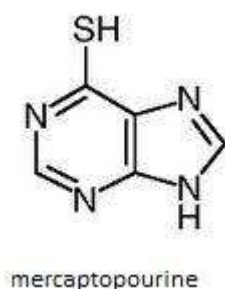
- Οι αντιμεταβολίτες της πυριμιδίνης : πρόκειται για ουσίες οι οποίες δρουν ανταγωνιστικά προς τις πυριμιδίνες. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η 5-φθοριοουρακίλη, η οποία είναι ένα ανάλογο της πυριμιδίνης στην οποία το υδρογόνο στη θέση 5 του ουρακλικού δακτυλίου έχει αντικατασταθεί με ένα άτομο φθορίου (Chabner, 2010). Η 5-φθοριοουρακίλη μετατρέπεται στο αντίστοιχο δεσοξυνουκλεοτίδιο αφού εισέρθει στα κύτταρα στόχους. Το προϊόν αυτό δρα ως ψευδοϋπόστρωμα της θυμιδικής συνθετάσης και εγκλωβίζεται μαζί με το ένζυμο και το συνένζυμό του σε ένα τριμερές σύμπλοκο το οποίο αδυνατεί να δώσει προϊόντα. Έτσι, ελαττώνεται η σύνθεση DNA λόγω έλλειψης θυμιδίνης και το καρκινικό κύτταρο οδηγείται στο θάνατο (M. Schellens, 2005). Η 5-φθοριοουρακίλη χορηγείται σε καρκινώματα του παχέος εντέρου, του μαστού, του παγκρέατος και του στομάχου. Επίσης, είναι αποτελεσματική και στα επιπολής βασικοκυτταρικά καρκινώματα όταν εφαρμόζεται τοπικά.

Η κυταραβίνη είναι μια ουσία ανάλογη της 2'-δεσοξυκυτιδίνης στην οποία η ομάδα της ριβόζης έχει αντικατασταθεί από αραβινόζη (Skeel, 2007). Η κυταραβίνη φωσφορυλιώνεται προς το αντίστοιχο νουκλεοτίδιο, την τριφωσφορική κυταραβινοσίδη η οποία ενσωματώνεται στο DNA και τερματίζει την επιμήκυνση της αλυσίδας. Χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση οξέων λευχαιμιών, λεμφωμάτων και της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας σε οξεία φάση.



Εικόνα 1.10 : χημική δομή φθοριουρακίλης και κυταραβίνης

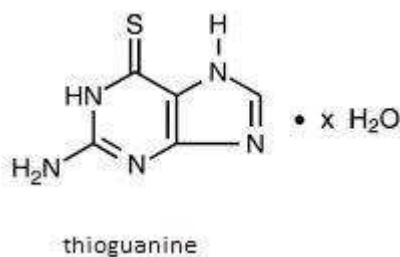
- Οι αντιμεταβολίτες της πουρίνης : πρόκειται για ουσίες οι οποίες δρουν ανταγωνιστικά προς τις πουρίνες που είναι βασικά συστατικά του DNA. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η 6-μερκαπτοπουρίνη η οποία είναι το θειολικό ανάλογο της υποξανθίνης. Η 6-μερκαπτοπουρίνη, αφού διεισδύσει στα κύτταρα-στόχους, μετατρέπεται στο αντίστοιχο νουκλεοτίδιο, την 6-μερκαπτοπουρινική φωσφορική ριβόζη η οποία ενσωματώνεται στο DNA και το RNA και το καθιστά δυσλειτουργικό (Chabner, 2010). Η 6-μερκαπτοπουρίνη χρησιμοποιείται στη διατήρηση της ύφεσης της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας.



Εικόνα 1.11 : χημική δομή 6-μερκαπτοπουρίνης

Η αζαθειοπρίνη είναι ένα ανοσοκατασταλτικό το οποίο ασκεί τη δράση του αφού μετατραπεί σε 6-μερκαπτοπουρίνη.

Η 6-θειογουανίνη είναι ένα ακόμη πουρινικό ανάλογο το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία της οξείας λευχαιμίας.



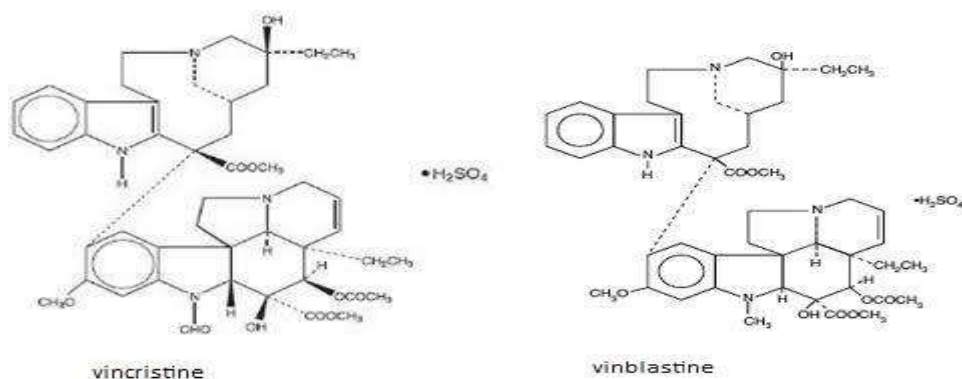
Εικόνα 1.12 : χημική δομή 6-θειογουανίνης

1.2.2.3 Αντινεοπλασματικά φάρμακα φυτικής προέλευσης

Η αντιμετώπιση του καρκίνου με φυτά ανάγεται πολλούς αιώνες παλαιότερα και ο κατάλογος περιλαμβάνει περί τα 1400 φυτικά γένη. Πολλών η αντικαρκινική δράση ήταν γνωστή από παλιά όπως η ρητίνη Ποδοφύλλου η οποία περιέχει ποδοφυλλοτοξίνη, το *Solanum dulcamara* το οποίο περιέχει σολαμαρίνη, η *Cetraria*, η *Usnea*, η *Cladonia* που περιέχουν ουσκινικό οξύ (Χαρβάλα, 1994). Σήμερα, η καλύτερη φυσική πηγή αντικαρκινικών φαρμάκων είναι το φυτό *Catharanthus roseus* ή *Vinca rosea* στο οποίο περιέχεται η βικριστίνη και η βινπλαστίνη. Η ταξόλη είναι ένα νέο κλινικά χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό φάρμακο που απομονώθηκε από το φλοιό του δέντρου *Taxus brevifolia*. Επίσης ενδιαφέρουσα κυτταροτοξική και αντινεοπλασματική δράση παρουσιάζει η ελλιπτισίνη, ένα αλκαλοειδές που συναντάται σε είδη των οικογενειών *Aporcynaceae* και *Loganiaceae*, αλλά και η ακρονουσίνη, ένα αλκαλοειδές που απομονώθηκε από το φυτό *Acronychia baueri* της οικογένειας *Rutaceae*.

Τα αντινεοπλασματικά φυτικής προέλευσης είναι συνήθως M-phase specific drugs, δηλαδή είναι δηλητήρια της μίτωσης. Τα κυριότερα αντινεοπλασματικά φυτικής προέλευσης είναι τα εξής :

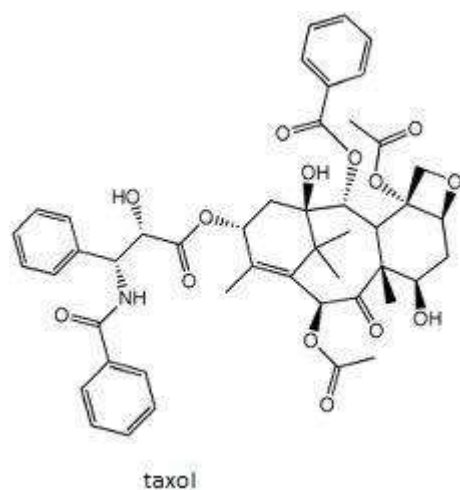
Τα αλκαλοειδή της *vinca* (βικριστίνη και βινπλαστίνη) : λαμβάνονται από το φυτό *Catharanthus roseus* (*Lochnera rosea*, *Vinca rosea*) της οικογένειας *Aporcynaceae*. Τα αλκαλοειδή αυτά δεσμεύονται με την ελεύθερη τουμπουλίνη σχηματίζοντας παρακρυσταλλικές συμπύξεις που αποτελούνται από διμερή τουμπουλίνης και το αλκαλοειδές με αποτέλεσμα τον αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων και την αποτυχία της δημιουργίας μιτωτικής ατράκτου (van Der Heijden, 204). Χορηγούνται σε οξείες λευχαιμίες, λεμφώματα και σε ορισμένους συμπαγείς όγκους.



Εικόνα 1.13 : χημική δομή βικριστίνης και βινπλαστίνης

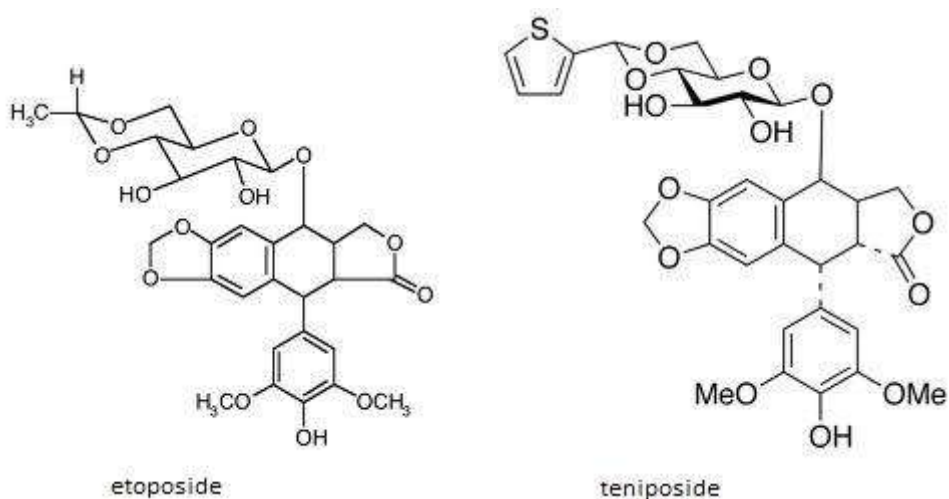
Η πακλιταξέλη (ταξόλη) : είναι ένα διτερπένιο που απομονώθηκε από το φλοιό του δέντρου *Taxus brevifolia* της οικογένειας *Taxaceae* και εν συνεχεία από άλλα είδη του γένους *Taxus*. Δρα με μηχανισμό αντίθετο από εκείνο των αλκαλοειδών της *vinca*, σταθεροποιώντας του μικροσωληνίσκους με αποτέλεσμα την αποτυχία της

κυτταρικής διαίρεσης (Fu Y, 2009). Χορηγείται σε καρκίνο των ωοθηκών και στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού.



Εικόνα 1.14 : χημική δομή ταξόλης

Οι ποδοφυλλοτοξίνες, ετοποσίδη και τενιποσίδη : είναι ημισυνθετικοί γλυκοσίδες της ποδοφυλλοτοξίνης που λαμβάνεται από τα φυτά *Rodophyllum peltatum* και *Rodophyllum hexandrum* της οικογένειας *Berberidaceae* ή *Rodophyllaceae*. Οι ουσίες αυτές είναι δραστικές σε αρκετές νεοπλασίες. Κύριος στόχος τους είναι η τοποϊσομεράση II. Η σύνδεση του φαρμάκου με το σύμπλοκο ενζύμου-DNA καθιστά το DNA ευπαθές σε μη αναστρέψιμες ρήξεις της διπλής έλικας. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπλοκάρουν τα κύτταρα στην φάση S-G₂ (Damayanthi, 1998). Η ετοποσίδη χρησιμοποιείται για καρκίνο όρχεων, και σε συνδυασμό με σισπλατίνη για μικροκυτταρικό καρκίνο πνευμόνων. Είναι δραστική σε αρκετές άλλες μορφές καρκίνου, όπως μη-Hodgkin λέμφωμα, καρκίνο μαστού και σάρκωμα Karosi σε ασθενείς με AIDS.

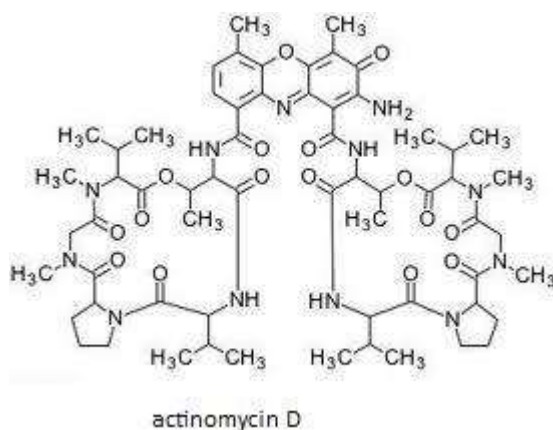


Εικόνα 1.15 : χημική δομή ετοποσίδης και τενιποσίδης

1.2.2.4 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά οφείλουν τη δράση τους στις αλληλεπιδράσεις με το DNA, οι οποίες αποδιοργανώνουν τη λειτουργία του κυττάρου. Πρόκειται για ειδικά του κυτταρικού κύκλου φάρμακα. Τα κυριότερα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ως αντινεοπλασματικά φάρμακα είναι τα εξής :

Η ακτινομυκίνη D, η οποία παράγεται από το *Streptomyces parvullus*. Το αντιβιοτικό αυτό περιέχει δυο κυκλικά πενταπεπτίδια και ένα επίπεδο τρικυκλικό ετεροαρωματικό σύστημα το οποίο μπορεί να εισχωρήσει στη διπλή έλικα του DNA. Το σύστημα αυτό παρεμβάλλεται μεταξύ γειτονικών ζευγών γουανίνης και συγκρατείται στη θέση του με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ βάσεων του DNA και των κυκλικών πενταπεπτιδίων που τοποθετούνται εξωτερικά της έλικας (Κουρουνάκη, 2006). Θεωρείται αναστολέας της τοποϊσομεράσης II και είναι S-phase specific drug. Η ακτινομυκίνη D χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του όγκου του Wilms και σε σαρκώματα των μαλακών μορίων. Τον ίδιο μηχανισμό δράσης έχει και η μιθραμικίνη.



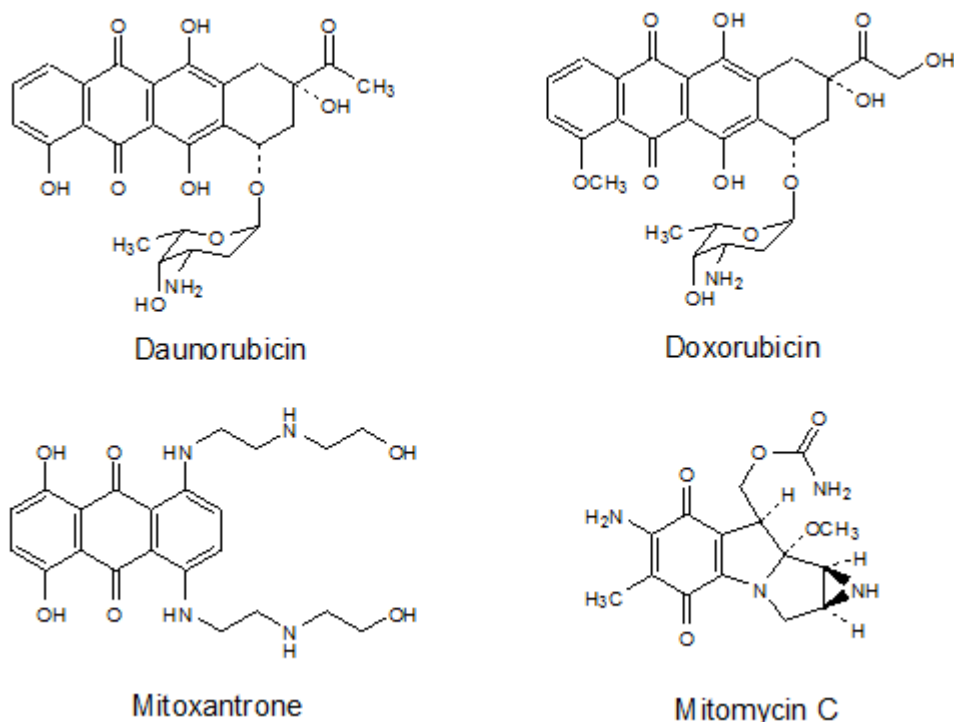
Εικόνα 1.16 : χημική δομή ακτινομυκίνης D

Η δοξορουμπικίνη (αδριαμυκίνη) και η δαουνορουβικίνη παράγονται από τα *Streptomyces coeruleorubidus* και *Streptomyces peucetius* αντίστοιχα και ανήκουν στα αντιβιοτικά του τύπου της ανθρακυκλίνης (Blum, 1974). Τα αντιβιοτικά αυτά παρεμβάλλονται κατά μη ειδικό τρόπο ανάμεσα σε γειτονικά ζεύγη βάσεων του DNA και παρεμποδίζουν τη σύνθεση DNA και RNA. Πιο συγκεκριμένα, η αδριαμυκίνη έχει ένα τετρακυκλικό σύστημα με τρεις επίπεδους δακτυλίους που εισχωρούν στη διπλή έλικα. Η αδριαμυκίνη πλησιάζει και εισχωρεί στο DNA από τη μεγάλη αύλακα της διπλής έλικας, ενώ η αμινομάδα της που είναι συνδεδεμένη στο τμήμα του σακχάρου παίζει σπουδαίο ρόλο στη διατήρηση του αντιβιοτικού στη θέση του, αφού ιονιζόμενη σχηματίζει ιοντικό δεσμό με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του σκελετού του DNA (Κουρουνάκη, 2006). Επίσης, τα αντιβιοτικά αυτά προσδένονται στις κυτταρικές μεμβράνες με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η διαδικασία μεταφοράς που συνδέεται με την ενεργοποίηση της φωσφατυδυλοϊνοσιτόλης. Τέλος, ανάγονται από την αναγωγή του κυτοχρώματος

P-450 προς ελεύθερες ρίζες ημικινόνης με αποτέλεσμα το σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου και την καταστροφή του DNA και την οξείδωση των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών (Kivistö ΚΤ, 1995). Τέλος, η αδριαμυκίνη μπορεί να αναστείλει και τη δράση της τοποϊσομεράσης II (Pommier, 2010).

Η δοξορουβικίνη είναι ένα από τα πιο σημαντικά και ευρέως χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά φάρμακα και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση σαρκωμάτων και πολλών καρκινωμάτων όπως ο καρκίνος του μαστού και του πνεύμονα αλλά και της οξείας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας και λεμφωμάτων. Η δαουνορουβικίνη χρησιμοποιείται στη θεραπεία της οξείας λεμφοκυτταρικής και μυελοκυτταρικής λευχαιμίας.

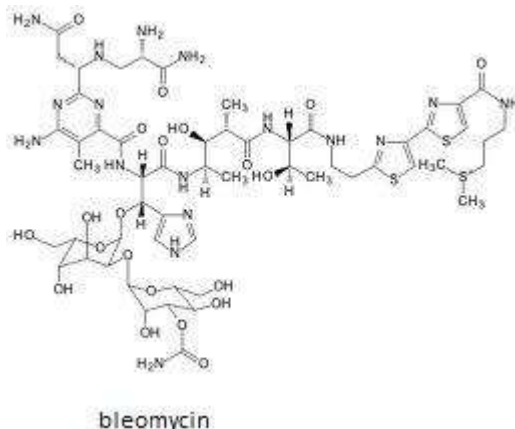
Η μιτομυκίνη C είναι ένα αντικαρκινικό που μετατρέπεται εντός του σώματος σε αλκυλιωτικό παράγοντα. Η μετατροπή αυτή αρχίζει με μια ενζυμικά καταλυόμενη αναγωγή της κινόνης σε υδροκινόνη, αποβολή μεθανόλης και άνοιγμα του τριμελούς δακτυλίου της αζιριδίνης για τη δημιουργία αλκυλιωτικού παράγοντα. Στη συνέχεια, αλκυλιώνονται υπόλοιπα γουανιδίνης σε διαφορετικές αλυσίδες DNA οδηγώντας σε αναστολή της αντιγραφής και τη κυτταρικής διαίρεσης (Κουρουνάκη, 2006). Η μιτομυκίνη χορηγείται κυρίως σε συμπαγείς όγκους.



Εικόνα 1.17: χημική δομή δαουνορουμπικίνης, δοξορουμπικίνης, μιτοξανδρόνης και μιτομυκίνης C

Η μπλεομυκίνη προέρχεται από είδη *Streptomyces* (*Streptomyces verticillus*) και είναι μίγμα διάφορων χηλικών γλυκοπεπτιδίων του χαλκού, τα οποία ανήκουν στις ανθρακυκλίνες και προκαλούν ρήξεις του DNA με οξειδωτικό μηχανισμό. Είναι ειδική για τον κυτταρικό κύκλο και προκαλεί συσσώρευση των κυττάρων στη φάση

G2. Φαίνεται ότι δρα αποσπώντας άτομα υδρογόνου από το DNA, ενώ οι ρίζες που προκύπτουν αντιδρούν με το οξυγόνο σχηματίζοντας υπεροξυλικά στοιχεία, τα οποία κατακερματίζονται (Brahim-Loghmari, 2009). Χορηγείται εναντίον διαφόρων συμπαγών καρκίνων κυρίως σε όγκους των όρχεων.



Εικόνα 1.18 : χημική δομή μπλεομυκίνης

1.2.2.5 Ορμόνες

Οι ορμόνες ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό και τη λειτουργία των καρκινικών κυττάρων ρυθμίζοντας την πρωτεϊνοσύνθεση, και χρησιμοποιούνται κυρίως για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού και του προστάτη, εφόσον βέβαια υπάρχουν ορμονικοί υποδοχείς στα καρκινικά κύτταρα (Schellens, 2005).

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα κορτικοστεροειδή (πρεδνιζολόνη) τα οποία αναστέλλουν την κυτταρική διαίρεση παρεμβαίνοντας στη σύνθεση του DNA. Η πρεδνιζόνη είναι ένα ισχυρό αντιφλεγμονώδες κορτικοστεροειδές με ασθενή αλατοκορτικοειδή δράση. Η πρεδνιζόνη ανάγεται προς πρεδνιζολόνη από την 11-β-υδροξυστεροειδική αναγωγή και στη συνέχεια συνδέεται με έναν υποδοχέα που πυροδοτεί την παραγωγή ειδικών πρωτεϊνών (Chabner,, 2010). Η πρεδνιζολόνη χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με διάφορα αντικαρκινικά φάρμακα για την αντιμετώπιση λευχαιμιών, λεμφωμάτων, καρκίνου του μαστού και του προστάτη.

Η ταμοξιφαίνη είναι ένα συνθετικό αντιοιστρογόνο το οποίο χορηγείται σε καρκίνο του μαστού με παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων (Chu E, 2006). Η ταμοξιφαίνη συνδέεται με τον οιστρογονικό υποδοχέα αλλά το σύμπλεγμα που προκύπτει δεν είναι παραγωγικό με αποτέλεσμα την καταστολή της αυξητικής ενέργειας της φυσιολογικής ορμόνης και άλλων αυξητικών παραγόντων. Η δραστηκή μορφή του φαρμάκου είναι το π-μονοϋδρόξυ παράγωγο το οποίο είναι το προϊόν μεταβολισμού της ταμοξιφαίνης. Σε αντίθεση με την οιστραδιόλη, η οποία σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με κατάλληλες ομάδες στις δυο πλευρές του υποδοχέα της, η ταμοξιφαίνη σχηματίζει δεσμό υδρογόνου από τη μια μόνο μεριά

και έτσι δεν επιτρέπει τη δομική αλλαγή του υποδοχέα της οιστραδιόλης (Κωστάκης, 1994). Χορηγείται για τη θεραπεία του οιστογονοεξαρτώμενου καρκίνου του μαστού κυρίως σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.



Εικόνα 1.19 : χημική δομή ταμοξιφαίνης

Η στιλβεστρόλη είναι ένα μη στεροειδές οιστρογόνο το οποίο χορηγείται στον καρκίνο του προστάτη (Skeel, 2007). Η στιλβεστρόλη περιέχει στο μόριό της το σκελετό του trans-στιλβένιου και έχει επίπεδη διαμόρφωση. Επίσης, περιέχει δυο υδροξύλια στις π-θέσεις των βενζολικών πυρήνων που απέχουν μεταξύ τους απόσταση περίπου 11^Å, δηλαδή όση σχεδόν είναι και η απόσταση μεταξύ των δυο ατόμων οξυγόνου των φυσικών οιστρογόνων (Κωστάκης, 1994). Η στιλβεστρόλη καταστέλλει την ανάπτυξη του προστατικού ιστού αποκλείοντας την παραγωγή ωχρινοποιητικής ορμόνης με αποτέλεσμα την ελάττωση της παραγωγής ανδρογόνων από τους όρχεις προκαλώντας φαρμακευτικό ευνουχισμό. Ανάλογη δράση έχουν και τα ανάλογα της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών λευπρολίδη και γοσερελίνη.

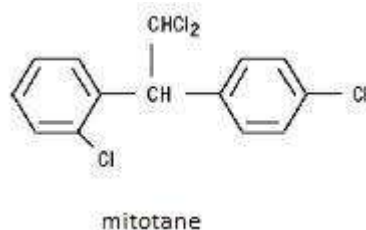


Εικόνα 1.20 : χημική δομή στιλβεστρόλης

1.2.2.6 Άλλες ενώσεις με αντικαρκινική δράση

Οι ενώσεις οι οποίες δεν ανήκουν σε καμία από τις παραπάνω κατηγορίες είναι η μιτοτάνη, η προκαρβαζίνη, η L-ασπαραγινάση και οι βιολογικοί τροποποιητές των βιολογικών αποκρίσεων, ο βάκιλλος Calmette-Guerin και το Rituximab.

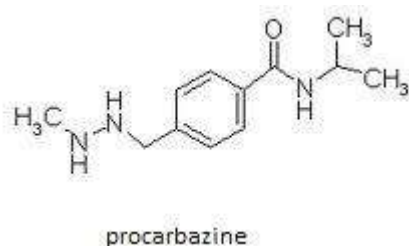
Η μιτοτάνη είναι ένα ισομερές του DTT η οποία εμφανίζει εκλεκτικότητα έναντι του καρκινώματος των επινεφριδίων. Η μιτοτάνη αναστέλλει τη στεροειδογένεση στο φλοιό των επινεφριδίων με άγνωστο μηχανισμό (Fischer, 2003).



Εικόνα 1.21 : χημική δομή μιτοτάνης

Η L-ασπαραγινάση καταλύει την απαμίνωση της L-ασπαραγίνης σε ασπαρτικό οξύ και αμμωνία. Έλλειψη του σημαντικού αμινοξέος της L-ασπαραγίνης στα νεοπλασματικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα καταστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης και κυτταρικό θάνατο (Skeel, 2003). Έχει σημαντική αποτελεσματικότητα στη θεραπεία οξείας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας.

Η προκαρβαζίνη αναστέλλει τη σύνθεση DNA και RNA. Επίσης, μπορεί να προκαλέσει μεθυλίωση του DNA και επομένως άμεση βλάβη. Μετά τη χορήγησή της μετατρέπεται σε αζοπροκαρβαζίνη, μετά από οξείδωση στο P450 ή από το σύστημα MAO (Fischer, 2003). Η προκαρβαζίνη χρησιμοποιείται στη θεραπεία της νόσου του Hodgkin.



Εικόνα 1.22 : χημική δομή προκαρβαζίνης

Βιολογικοί τροποποιητές βιολογικών αποκρίσεων είναι ουσίες που δρουν είτε απευθείας στα καρκινικά κύτταρα είτε αυξάνοντας την ανοσολογική απόκριση σε νεοπλασματικά κύτταρα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η ιντερλευκίνη-2 και οι ιντερφερόνες.

Η ιντερλευκίνη-2 (IL-2), η οποία είναι η κυτταροκίνη που εκκρίνεται από T-κύτταρα και που έχει δοκιμαστεί σε μονοθεραπεία αλλά και σε συνδυασμό με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα για τη θεραπεία μελανώματος και όγκου νεφρών. Η ιντερλευκίνη -2 επάγει τη δημιουργία των Lymphokine activated killer (LAK) κυττάρων, αυξάνει τη δραστηριότητα των NK κυττάρων, προάγει τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και μεσολαβεί στην υποστροφή διαφόρων μορφών καρκίνων σε μοντέλα πειραματοζώων (Andorsky DJ, 2007).

Οι ιντερφερόνες (α, β, γ). Η ιντερφερόνη α φυσιολογικά παράγεται από τα λεμφοκύτταρα. Η αντινεοπλασματική της δράση οφείλεται στο ότι μειώνει τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων και αυξάνει την έκφραση των αντιγόνων του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (MHC) στην επιφάνειά τους, ενώ ταυτόχρονα διεγείρει και την παραγωγή κυττάρων φυσικών φονέων. Επίσης, η ιντερφερόνη α προκαλεί αύξηση των υποδοχέων της IL-2 σε διάφορα κύτταρα

στόχους και κατ' επέκταση βελτιώνει την αντινεοπλασματική δράση της τελευταίας όταν χορηγούνται σε συνδυασμό (Dillman, 2011). Η αντινεοπλασματική δράση των ιντερφερονών φαίνεται ότι είναι πλέον αποτελεσματική σε υποκλινική νόσο ή σε μικρό φορτίο νόσου, διότι τότε ο οργανισμός με την ενίσχυση της άμυνάς του πιθανόν να μπορέσει να αντιμετωπίσει αποτελεσματικότερα τη νεοπλασία.

Οι α-ιντερφερόνες (INF-α) έχουν εγκριθεί για θεραπεία λευχαιμίας εκ τριχωτών κυττάρων, το σάρκωμα Kaposi, τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία, τα μη Hodgkin λεμφώματα και το μεταστατικό καρκίνο του νεφρού.

Η αποτελεσματικότητα των άλλων ιντερφερονών όπως της ιντερφερόνης β και της ιντερφερόνης γ δεν υπερτερεί αυτής της ιντερφερόνης α.

Βάκιλλος Calmette-Guerin : πρόκειται για λυόφιλο παρασκεύασμα του βακίλλου Calmette-Guerin (BCG, στέλεχος Tice) το οποίο χρησιμοποιείται για ενδοκυστική έγχυση σε περιπτώσεις επιφανειακού καρκινώματος της ουροδόχου κύστης (Herr, 2008). Το φάρμακο αυτό βοηθά στην αναστολή της εξέλιξης του καρκινώματος και στη μείωση των υποτροπών.

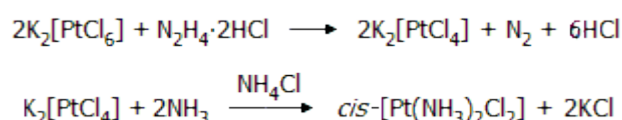
Rituximab : πρόκειται για ένα μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο προσδένεται στις CD20 επιφανειακές πρωτεΐνες των B- λεμφοκυττάρων (Harris, 2004). Το Rituximab χρησιμοποιείται για τη θεραπεία μη-Hodgkin λεμφωμάτων.

1.3. Μεταλλικά σύμπλοκα στη χημειοθεραπεία του καρκίνου

Πολύ πριν από την ανακάλυψη του cisplatinum διάφορα άλλα μέταλλα, εκτός της πλατίνας, είχαν δοκιμαστεί στην θεραπευτική του καρκίνου. Το 19^ο αιώνα, το Fowler's solution, ένα διάλυμα αρσενικούχου μολύβδου σε βενζόλιο, χρησιμοποιήθηκε για την θεραπεία κακοήθων όγκων και ακολούθησαν διάφορα ανάλογα αρσενικούχα διαλύματα (Lissauer, 1865). Στη συνέχεια και για αρκετό καιρό οι επιστήμονες δεν έδειχναν ενδιαφέρον για την χρήση των μετάλλων ως θεραπευτικά μέσα. Η προκατάληψή τους γινόταν ακόμη μεγαλύτερη από το γεγονός ότι μεγάλος αριθμός δηλητηριάσεων οφείλεται σε μέταλλα και μάλιστα στα βαρέα μέταλλα. Οι συστηματικές μελέτες της σχέσης ανάμεσα στη χημική δομή και την αποτελεσματικότητα ή την τοξικότητα των μεταλλικών συμπλόκων ξεκίνησε τη δεκαετία του 30. Το 1931, οι Collier και Krauss ξεκίνησαν τις πρώτες συστηματικές μελέτες στον τομέα των μεταλλικών συμπλόκων με αντινεοπλασματική δράση καταλήγοντας στο εξής συμπέρασμα : «Η δράση των βαρέων μετάλλων στον πειραματικό καρκίνο των τρωκτικών δεν οφείλεται μόνο στο ίδιο το μέταλλο αλλά και στη δομή των υποκαταστατών του και στο είδος του υποκαταστάτη».

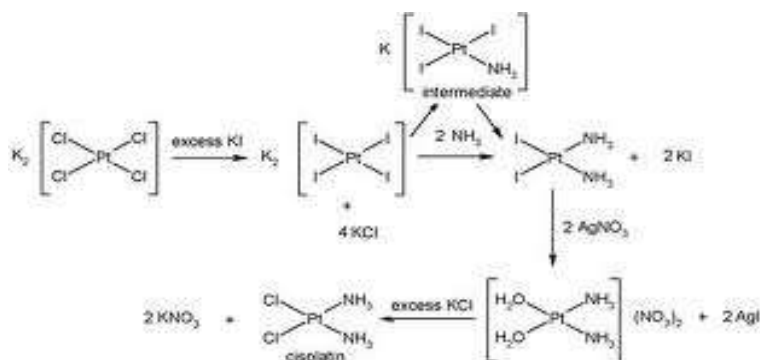
1.3.1 Η σισπλατίνη

Η ένωση *cis*-διάμμινοδιχλωρολευκόχρυσος ή σισπλατίνη συντέθηκε αρχικά από τον Preygone το 1844 και ήταν γνωστή ως άλας του Preygone, ενώ η δομή της μελετήθηκε από τον χημικό Alfred Werner το 1893. Η σύνθεση του συμπλόκου είναι σχετικά απλή και βασίζεται στην ελεγχόμενη αναγωγή του εξαχλωροσυμπλόκου άλατος του Pt(IV) με υδροχλωρική υδραζίνη προς το αντίστοιχο τετραχλωροσύμπλοκο άλας του Pt(II), το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με μίγμα NH₃ - NH₄Cl παρέχοντας το ζητούμενο σύμπλοκο, (Τσιτσά, 2000) σύμφωνα με τις αντιδράσεις:



Εικόνα 1.23 : χημικές αντιδράσεις σύνθεσης σισπλατίνης

Επειδή, αναπόφευκτα σχηματίζεται και ποσότητα *trans*-συμπλόκου, σε μια άλλη μέθοδο παρασκευής προηγείται η μετατροπή του τετραχλωροσυμπλόκου K₂[PtCl₄] σε τετραϊωδοσύμπλοκο, K₂[PtI₄] με επίδραση περίσσειας KI, λόγω της μικρότερης *trans*-επίδρασης των ιωδιούχων σε σχέση με εκείνη των χλωριούχων ιόντων



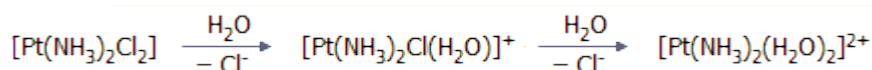
Εικόνα 1.24 : χημικές αντιδράσεις σύνθεσης σισπλατίνης

Η αντινεοπλασματική δράση του συμπλόκου αυτού ανακαλύφθηκε αργότερα από τον Rosenberg και τους συνεργάτες του το 1969. Ο Rosenberg εξέτασε τις επιδράσεις των ηλεκτρικών πεδίων στην ανάπτυξη των βακτηρίων με τη χρήση ηλεκτροδίων πλατίνας τα οποία βυθίστηκαν σε ένα διάλυμα το οποίο περιείχε χλωριούχο αμμώνιο. Αυτές οι πειραματικές συνθήκες ευνοούν τη σύνθεση (NH₄)₂PtCl₆, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται φωτοχημικά στο *cis*-Pt(NH₃)₂Cl₂. Αυτό που παρατηρήθηκε αρχικά ήταν η νηματοειδής ανάπτυξη των βακτηρίων E. coli τα βακτήρια αναπτύχθηκαν πάνω από 300 φορές σε μήκος χωρίς να εμφανίσουν κυτταρική διαίρεση. Αυτή η αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης αποδόθηκε στην παρουσία του συμπλόκου του λευκόχρυσου στο θρεπτικό μέσο (Rosenberg, 1965, 1967). Έτσι, ο Rosenberg σκέφτηκε πως τέτοιου είδους σύμπλοκα θα μπορούσαν να αναχαιτίσουν και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων

κάτι που τον οδήγησε στη σύνθεση απλών συμπλόκων του λευκόχρυσου και στον έλεγχο της αποτελεσματικότητάς τους σε πειραματικά μοντέλα όγκων. Αυτό που παρατήρησε ήταν μείωση στο μέγεθος του όγκου και παράταση του χρόνου επιβίωσης των πειραματόζωνων μετά από χορήγηση σισπλατίνης και άλλων ανάλογων ενώσεων (Rosenberg, 1969, 1973, 1974, 1977, 1985). Το 1971 η σισπλατίνη εισήχθη σε κλινικές δοκιμές και σήμερα χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα στη θεραπευτική του καρκίνου. Η σισπλατίνη είναι δραστική κυρίως έναντι του καρκίνου των όρχεων, των ωοθηκών της ουροδόχου κύστεως, της κεφαλής και του τραχήλου. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες της σισπλατίνης που παρατηρήθηκαν περιλαμβάνουν μυελοκαταστολή, νεφροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα, ναυτία, εμέτους, υπομαγνησιαμία και περιφερική νευροπάθεια (Chu E, 2007).

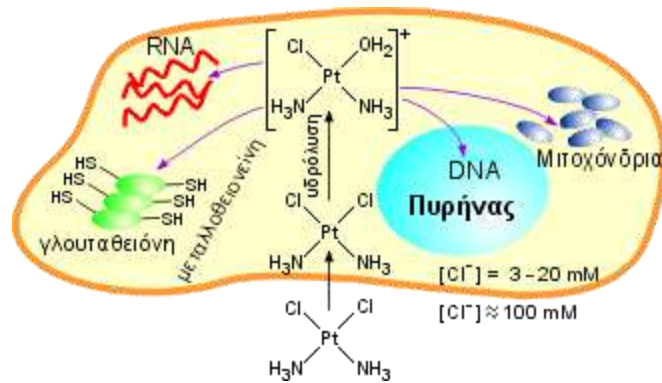
Με την ενέσιμη μορφή (η οποία περιέχει ισοτονικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου) η σισπλατίνη εισέρχεται στο αίμα, όπου παραμένει αναλλοίωτη λόγω της σχετικά υψηλής συγκέντρωσης ιόντων χλωρίου (~100 mM). Ως ηλεκτρικώς ουδέτερη ουσία η σισπλατίνη εισέρχεται στο κύτταρο είτε με παθητική διάχυση μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, είτε με ενεργό μεταφορά μέσω του μεταφορέα του χαλκού Ctr1p (Skeel RT, 2003).

Μέσα στο κύτταρο, λόγω της χαμηλότερης συγκέντρωσης των ιόντων χλωρίου (~3-20 mM) και της υψηλότερης συγκέντρωσης του νερού στο κυτταρόπλασμα, το μόριο υπόκειται σε σταδιακή υδρόλυση, κατά την οποία τα άτομα χλωρίου αντικαθίστανται με μόρια ύδατος (Fuertes, 2003) κατά τις αντιδράσεις:



Ο μηχανισμός της αντικατάστασης ενός υποκαταστάτη των επίπεδων μεταλλικών συμπλόκων της πλατίνας με έναν άλλο σχετίζεται με τη διατήρηση της διαμόρφωσης αυτής και περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός 5-υποκατεστημένου ενδιάμεσου μορίου. Οι παραπάνω αντιδράσεις υδρόλυσης έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μορίου. Ακολούθως, η φορτισμένη θετικά σισπλατίνη προσεγγίζει διάφορους στόχους, όπως το DNA, ένζυμα που περιέχουν θείο, όπως μεταλλοθειονίνες ή η γλουταθειόνη, και τα μιτοχόνδρια. Στις θέσεις αυτές τα μόρια του νερού ανταλλάσσονται με μόρια αζώτου ή θειολομάδες των πρωτεϊνών και του DNA του κυττάρου και προκαλούν ακλυλίωση των παραπάνω μορίων (Jung, Y et al. 2007). Για την σισπλατίνη, η αντικατάσταση του χλωρίου έχει χρόνο ημιζωής 2 ώρες, ενώ η αντικατάσταση της πρώτης ομάδας χλωρίου είναι δυο φορές ταχύτερη από την αντικατάσταση της δεύτερης.

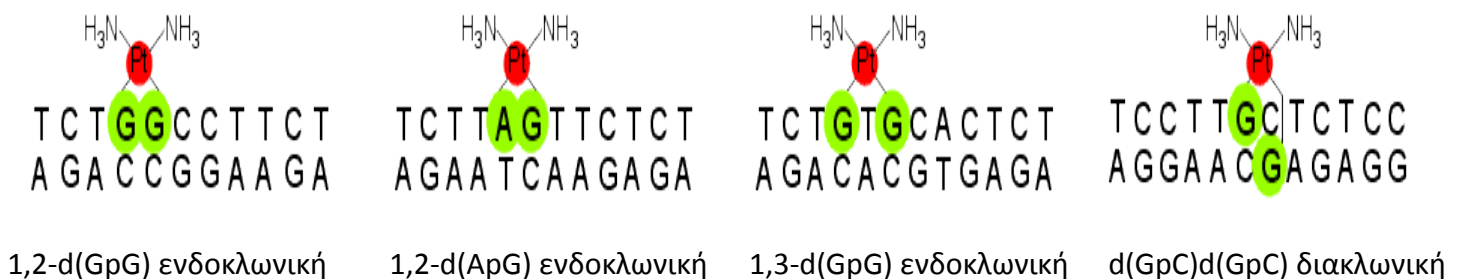
Το ενεργοποιημένο αυτό σύμπλοκο αντιδρά κυρίως με την N-7 θέση της γουανίνης της διπλής έλικας του DNA.



Εικόνα 1.25 : είσοδος σισπλατίνης στο κύτταρο-στόχο, ενεργοποίηση και οργανίδια στα οποία δρα

Το DNA σχηματίζει διάφορες ενώσεις προσθήκης (adducts) με τη σισπλατίνη. Από αυτές τις ενώσεις προσθήκης σταθερότερες είναι εκείνες όπου τα δύο χλώρια υποκαθίστανται από τα άτομα αζώτου N7 που βρίσκονται σε γειτονικές γουανίνες (-G-G-) στον ίδιο κλώνο του DNA (Baik MH, 2003). Οι γειτονικές γουανίνες παρέχουν τα σταθερότερα σύμπλοκα, ωστόσο έχουν διαπιστωθεί και σύμπλοκα με γειτονικές αδενίνες και γουανίνες (-A-G-). Τα σύμπλοκα αυτά καλούνται 1,2-ενδοκλωνικές ενώσεις προσθήκης (1,2-intrastrand adducts) και αποτελούν το 90% των δυνατών ενώσεων προσθήκης. Επιπλέον υφίστανται και 1,3-ενδοκλωνικές, όπως και διακλωνικές ενώσεις προσθήκης (interstrand adducts) (Wozniak K, 2002). Από τις 1,2-ενδοκλωνικές ενώσεις προσθήκης το 65% αφορά γειτονικές γουανίνες (-G-G-) και το 25% γειτονικές αδενίνες-γουανίνες (-A-G-) (Mantri Y, 2007).

Άμεσο αποτέλεσμα της δημιουργίας αυτών των ενώσεων προσθήκης είναι η αποδιοργάνωση στην περιοχή τους της κανονικής στοιβάξης των βάσεων, γεγονός το οποίο θα προκαλεί μια τοπική στρέβλωση (kink) στη δομή του μορίου DNA. Η παραμόρφωση αυτή φαίνεται ότι καθιστά το μόριο του DNA μη λειτουργικό, γεγονός που οδηγεί στο θάνατο του κυττάρου.



Εικόνα 1.26 : ενώσεις προσθήκης σισπλατίνης με το DNA

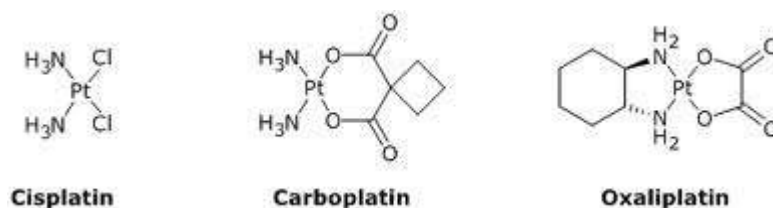
Η επίδραση της σισπλατίνης στα μιτοχόνδρια δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητή, πάντως πιστεύεται ότι προκαλεί σε αυτά βλάβες που μπορεί να οδηγούν στο θάνατο των κυττάρων (Cullen KJ, 2007). Πιο διευκρινισμένες είναι οι αλληλεπιδράσεις της σισπλατίνης με ένζυμα που περιέχουν θείο (Knipp M, 2009). Ορισμένα από αυτά τα ένζυμα είναι μεταγραφικοί παράγοντες, παράγοντες

επιδιόρθωσης και ιστόνες. Πιστεύεται, επίσης, ότι οι αλληλεπιδράσεις αυτές αποτελούν και μέρος της άμυνας του κυτταρικού υποστρώματος στην κυτταροτοξικότητα της σισπλατίνης και σε κάποιο βαθμό συνεισφέρουν στην ανάπτυξη αντίστασης του οργανισμού κατά του φαρμάκου (Brabec V, 2002). Τέλος, όταν το εξωκυττάριο περιβάλλον είναι πτωχό σε χλώριο, τότε η υδρόλυση της σισπλατίνης ξεκινά πριν την είσοδό της στο κύτταρο με αποτέλεσμα να απενεργοποιείται αλκυλιώνοντας τις πρωτεΐνες του πλάσματος.

1.3.2 Σύμπλοκα του λευκόχρυσου ανάλογα της σισπλατίνης

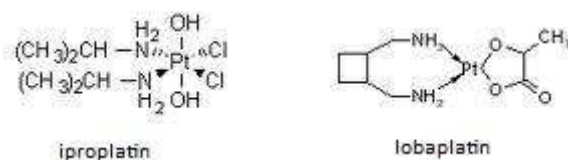
Η τοξικότητα της σισπλατίνης αλλά και η εκλεκτική αποτελεσματικότητά της ενάντια σε μικρό αριθμό καρκίνων οδήγησε στη σύνθεση άλλων μεταλλικών συμπλόκων. Αρχικά, η έρευνα περιορίστηκε στη σύνθεση συμπλόκων του λευκόχρυσου, αναλόγων της σισπλατίνης, και στη συνέχεια επεκτάθηκε και σε σύμπλοκα άλλων μετάλλων.

Η καρβοπλατίνη και η οξαλιπλατίνη είναι οργανομεταλικά σύμπλοκα του λευκόχρυσου δομικά συγγενή με την σισπλατίνη τα οποία χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία του καρκίνου (Skeel RT, 2003). Τα σύμπλοκα αυτά δημιουργήθηκαν με στόχο τη βελτίωση της θεραπευτικής δράσης της σισπλατίνης και τη μείωση της τοξικότητάς της. Η καρβοπλατίνη περιέχει μια δικαρβοξυλική ομάδα ως υποκαταστάτη. Έτσι, επιβραδύνεται η μεταβολική αποδόμηση του μορίου, με αποτέλεσμα να παραμένει στον οργανισμό για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, και μειώνεται η παραγωγή τοξικών παραπροϊόντων, με αποτέλεσμα να μειώνεται και η τοξικότητα του μορίου (Barnes KR, 2004). Ο μηχανισμός ενεργοποίησης του μορίου αυτού είναι παρόμοιος με εκείνο της σισπλατίνης, αλλά η υδρόλυση έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής (30 ώρες). Η καρβοπλατίνη, όπως και η σισπλατίνη, αντιδρά με πυρηνόφιλα κέντρα στο DNA σχηματίζοντας σταυροδεσμούς αλλά και με τις θειολομάδες των πρωτεϊνών. Η κυτταροτοξική δράση της καρβοπλατίνης *in vitro* και *in vivo* είναι παρόμοια με εκείνη της σισπλατίνης, αλλά η καρβοπλατίνη εμφανίζει λιγότερες παρενέργειες από το ΚΝΣ και τους νεφρούς. Η οξαλιπλατίνη περιέχει μια ομάδα 1,2 διαμμινοκυκλοεξανίου και μια δικαρβοξυλική αποχωρούσα ομάδα, η οποία υδρολύεται για την ενεργοποίηση του μορίου (Barnes KR, 2004). Η οξαλιπλατίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα.



Εικόνα 1.27 : χημική δομή σισπλατίνης, καρβοπλατίνης και οξαλιπλατίνης

Η προπλατίνη και η λοβαπλατίνη είναι επίσης σύμπλοκα μόρια, ανάλογα της σισπλατίνης (Fischer DS, 2003). Η προπλατίνη εισήχθη σε κλινικές δοκιμές το 1981. Το σύμπλοκο αυτό δεν εμφανίζει νεφροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα ή νευροτοξικότητα και φαίνεται να είναι δραστικό έναντι του καρκίνου των ωθηκών και του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Η λοβαπλατίνη φαίνεται να είναι δραστική έναντι του μικροκυτταρικού καρκίνου των πνευμόνων, του καρκίνου του μαστού, του στομάχου και των ωθηκών.



Εικόνα 1.28 : χημική δομή προπλατίνης και λοβαπλατίνης

Η πικοπλατίνη, η οποία εισήχθη πρόσφατα σε κλινικές δοκιμές φαίνεται να είναι δραστική ενάντια στο μικροκυτταρικό καρκίνο των πνευμόνων (Kelland L. 2007). Η ένωση αυτή εμφανίζει επίσης μειωμένη τάση να ενώνεται με βιομόρια εκτός του DNA και επομένως δεν υφίσταται απενεργοποίηση από τις πρωτεΐνες του πλάσματος και μπορεί να χορηγηθεί per os. Παρόμοιες ιδιότητες εμφανίζουν και τα οκταεδρικά σύμπλοκα του λευκόχρυσου (IV) όπως για παράδειγμα η σατραπλατίνη, τα οποία πρέπει να αναχθούν σε επίπεδα σύμπλοκα του λευκόχρυσου (II) προκειμένου να καταστούν ενεργά (Kelland, L. 2007).



Εικόνα 1.29 : χημική δομή πικοπλατίνης και σατραπλατίνης

1.3.4 Άλλα μέταλλα στη χημειοθεραπεία του καρκίνου

Διάφορα άλλα μέταλλα όπως ο χρυσός, το ρουθένιο, το ρόδιο, το ιρίδιο, το τιτάνιο και ο κασσίτερος έχουν εμφανίσει δραστικά ανάλογα και κατά καιρούς έχουν δοκιμαστεί ως χημειοθεραπευτικά μέσα ενάντια σε διάφορους τύπους καρκίνου (Ott I, 2007). Αυτά τα μέταλλα μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με την πρόσδεση υποκαταστατών χαλαρά ή σταθερά, ανάλογα με τον τύπο του υποκαταστάτη. Οι χαλαρά προσδεδεμένοι υποκαταστάτες μπορούν να ανταλλαχθούν με ένα πυρηνόφιλο μόριο, συνήθως μια νουκλεοτιδική βάση ή μια θειολομάδα πρωτεϊνών,

ενώ το σύμπλοκο του μεταλλικού ιόντος μπορεί να απαιτεί την ανταλλαγή περισσότερων του ενός υποκαταστατών προκειμένου να καταστεί ενεργό. Οι σταθερά προσδεδεμένοι υποκαταστάτες επηρεάζουν τόσο το μόριο στόχο όσο και την ενεργότητα του ιόντος. Το αν αυτά τα μεταλλικά σύμπλοκα θα μπορέσουν να διαπεράσουν τις υδρόφοβες κυτταρικές μεμβράνες, να πλησιάσουν το φορτισμένο DNA ή να συμπλεχθούν με μια πρωτεΐνη εξαρτάται αποκλειστικά από τη φύση των σταθερά συνδεδεμένων υποκαταστατών (Chen D, 2009).

Εφόσον οι χημικές ιδιότητες του τετραγώνου d του περιοδικού πίνακα καλύπτουν μια ευρεία κλίμακα μετάλλων με διαφορετικές ιδιότητες, υπάρχει η πιθανότητα τα σύμπλοκα αυτών των μετάλλων να εμφανίζουν αντικαρκινική δράση με μηχανισμό αρκετά διαφορετικό από εκείνο της σισπλατίνης. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η οξειδοαναγωγική ενεργότητα που αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό των μετάλλων του d-block αλλά δεν αποτελεί μηχανισμό δράσης της σισπλατίνης (van Rijt SH, 2009). Παράλληλα, η οξειδοαναγωγική ενεργότητα φαίνεται να είναι σημαντική στη δράση ενός άλλου αντικαρκινικού φαρμάκου, της μπλεομυκίνης.

Πράγματι, ορισμένα από τα early d-block μέταλλα που έχει βρεθεί ότι αναχαιτίζουν τους όγκους στα πειραματόζωα φαίνεται ότι δρουν με μηχανισμό πολύ διαφορετικό από εκείνο της σισπλατίνης (Garbutcheon-Singh KB, 2011). Ανάμεσα στα later d-block μέταλλα ορισμένα σύμπλοκα του ρουθενίου, του ριδίου, του χαλκού και του χρυσού φαίνεται να εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση. Επίσης, η χρήση των ραδιονουκλιδίων του d-block όπως το ^{99m}Tc και το ^{186}Re είναι πολύ σημαντική στη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου.

1.3.4.1 Μέταλλα του p-block

Το συγκρότημα των αμετάλλων μαζί με το συγκρότημα των πτωχών μετάλλων σχηματίζουν ένα τριγωνικό συγκρότημα στον Περιοδικό πίνακα που ονομάζεται p-block αφού τα εξωτερικά ηλεκτρόνια των ατόμων των στοιχείων αυτών προστίθενται στις p-υποστοιβάδες των ατόμων του συγκροτήματος.

Τα μέταλλα του p-block έχουν μέχρι στιγμής βρει μικρή χρήση στη θεραπευτική του καρκίνου (Galanski M, 2003). Το γάλλιο είναι πιθανότατα το πιο σημαντικό στοιχείο από αυτήν την άποψη, αν και αντικαρκινική δράση έχουν εμφανίσει και σύμπλοκα άλλων μετάλλων. Τα σύμπλοκα του γερμανίου έχει βρεθεί ότι αναχαιτίζουν τη σύνθεση πρωτεϊνών, RNA, DNA in vitro, έχουν εμφανίσει κυτταροτοξικότητα σε διάφορες κυτταρικές σειρές και κάποια αντικαρκινική δράση σε αρουραίους (Jones, 2007). Επίσης, το τριοξείδιο του αρσενικού έχει βρεθεί αποτελεσματικό έναντι σε μια σπάνια διαταραχή του αίματος, την οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία και φαίνεται να δρα συνεργικά με το trans-ρετινοϊκό οξύ για τη θεραπεία της νόσου. Το παράγωγο του αρσενικού Melarsoprol αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων της

μυελοειδούς λευχαιμίας και ερευνάται η χρήση του ενάντια στη χρόνια και την οξεία μυελογενή και λεμφογενή λευχαιμία (Soignet SL, 1999). Τα σύμπλοκα του αντιμονίου και του βισμούθιου είναι γνωστά για τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες αλλά η εφαρμογή τους τη θεραπευτική του καρκίνου περιορίζεται σε ορισμένες αναφορές σχετικά με ενεργότητα ενάντια σε πειραματικά μοντέλα. Τα σύμπλοκα του βισμούθιου (III) με θειοσεμικαρβαζίδη $[\text{NH}_2\text{NHC}(=\text{S})\text{NH}_2]$ αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών σειρών του παχέος εντέρου (SW707) και του πρωκτού (SW948). Υπάρχουν αναφορές ότι το νιτρικό βισμούθιο, αν χορηγηθεί πριν από τη θεραπεία με σισπλατίνη, μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της τελευταίας ενάντια σε καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

1.3.4.1.1 Το γάλλιο

Ανάμεσα στα μέταλλα της ομάδας p-block, το γάλλιο έχει δείξει κλινική ενεργότητα στη θεραπεία όγκων μαλακών μορίων (Chitambar CR, 2004). Τα σύμπλοκα του γαλλίου φαίνεται να αλληλεπιδρούν με το DNA και να αναστέλλουν τη σύνθεση DNA και πρωτεϊνών και την ενεργότητα διαφόρων ενζύμων, όπως είναι οι ATPάσες και οι DNA πολυμεράσες. Επίσης, φαίνεται να επηρεάζουν και τη μιτοχονδριακή λειτουργία (Jakupec MA, 2004). Οι παρόμοιες ιονικές ακτίνες του γαλλίου(III) με τον σίδηρο(III) έχουν ως αποτέλεσμα ομοιότητες στη συμπεριφορά των δυο ιόντων. Η τρανσφερίνη δεσμεύει το γάλλιο ισχυρά αν και η σταθερά πρόσδεσης είναι 2 με 3 τάξεις μεγέθους μικρότερη από εκείνη του σιδήρου (Chikh Z, 2007). Επομένως οι θεραπευτικές δόσεις του Ga(III) μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση ισομοριακών συγκεντρώσεων Ga(III) και Fe(III) στην τρανσφερίνη του ορού. Αυτό μειώνει τον διαμεσολαβούμενη από την τρανσφερίνη πρόσληψη σιδήρου από τα κύτταρα και αναστέλλει τη σύνθεση του DNA. Επίσης, η εκτόπιση του σιδήρου από την R2 υπομονάδα της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγάσης από το οξειδοαναγωγικά ανενεργό Ga (III) θα μπορούσε να μειώσει την ενεργότητα του ενζύμου αυτού. Το ένζυμο αυτό μετατρέπει τα ριβονουκλεοτίδια σε δεοξυριβονουκλεοτίδια πριν την ενσωμάτωσή τους στο DNA, και επομένως η προκαλούμενη από το γάλλιο μείωση της ενεργότητάς του θα μπορούσε να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στη σύνθεση του DNA.

Στις προκλινικές μελέτες, τα άλατα του γαλλίου εμφανίζουν σημαντική δράση ενάντια σε σαρκώματα. Θετικά αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από τις κλινικές μελέτες της φάσης II στις οποίες σύμπλοκα του γαλλίου χρησιμοποιήθηκαν για τη θεραπεία λεμφωμάτων και καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης και σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά για μεταστατικό καρκίνο του ουροθηλίου ή σε ανθεκτικό στην σισπλατίνη καρκίνο των ωοθηκών (Samson MK, 1980). Στις παραπάνω μελέτες παρατηρήθηκε σημαντική νεφροτοξικότητα και δέσμευση του γαλλίου από τα οστά. Επίσης, η σχετικά υψηλή αναλογία θετικού φορτίου του γαλλίου οδηγεί σε υδρόλυσή του σε ουδέτερο pH, μια διαδικασία η οποία μπορεί να κατασταλεί παρουσία κιτρικών. Η νεφροτοξικότητα φαίνεται να οφείλεται στη

χαμηλή διαλυτότητα του φωσφορικού γαλλίου η οποία οδηγεί σε καθίζησή του στους νεφρούς. Για να αποφευχθεί η εμφάνιση νεφροτοξικότητας, το γάλλιο μπορεί να χορηγηθεί με τη μορφή νιτρικού γαλλίου $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ με συνεχή ενδοφλέβια έγχυση. Είναι σχετικά δύσκολο να επιτευχθούν επαρκή επίπεδα γαλλίου στο πλάσμα με τη χρήση χλωριούχου γαλλίου εξαιτίας της ταχείας απέκκρισής του. Για το λόγο αυτό συντέθηκαν διάφορα σύμπλοκα του γαλλίου τα οποία εμφανίζουν υψηλότερη συσσώρευση στα πλάσμα και στους ιστούς. Οι φαρμακοκινητικές μελέτες έδειξαν ότι το περισσότερο υποσχόμενο από τα σύμπλοκα αυτά είναι το tris(8-chinololato)gallium(III), KP46 το οποίο εμφανίζει τα υψηλότερα επίπεδα στο πλάσμα και τους ιστούς (Collery P, 1996).

Τέλος, τα σύμπλοκα και τα άλατα του γαλλίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα ασβεστίου πλάσματος, όπως συμβαίνει σε άτομα που πάσχουν από καρκίνο των οστών και σε οστικές μεταστάσεις οι οποίες προκαλούν οστεόλυση (Cvitkovic F, 2006). Οι κλινικές μελέτες σταδίου III είναι καθοδόν στο να καθορίσουν το αν τα σύμπλοκα του γαλλίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία οστικών μεταστάσεων του καρκίνου του μαστού.

1.3.4.1.2 Ο κασσίτερος

Όσον αφορά τον κασσίτερο, τα πρώτα πειράματα με οργανοκασσιτερικές ενώσεις εμφάνισαν διφορούμενα αποτελέσματα. Τα περισσότερα από τα σύμπλοκα που συντέθηκαν αρχικά εμφάνισαν σημαντική δράση σε μικρό όμως αριθμό καρκίνων. Βέβαια, η μεγάλη ποικιλία οργανικών υποκαταστατών που μπορεί να συνδεθεί στο μόριο του κασσιτέρου οδήγησε στη σύνθεση διοργανοκασσιτερικών, τριοργανοκασσιτερικών και τετραοργανοκασσιτερικών συμπλόκων τα οποία εμφανίζουν ισχυρή αντικαρκινική δράση *in vitro* τόσο σε συμπαγείς όγκους όσο και σε αιματολογικούς καρκίνους (Gielen 2005, Hadjikakou 2008).

Ο μηχανισμός δράσης των συμπλόκων του κασσιτέρου δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Έχουν προταθεί κατά καιρούς η αναστολή της σύνθεσης μακρομορίων, η παρεμπόδιση της παραγωγής ενέργειας από τα μιτοχόνδρια, η μείωση της σύνθεσης του DNA και η απευθείας επίδραση των συμπλόκων στην κυτταρική μεμβράνη η οποία οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού ασβεστίου (Aw 1990, Viviani 1996). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι τα οργανοκασσιτερικά παράγωγα μπορεί να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη και βλάβη στο DNA του κυττάρου (Liu, 2006). Τόσο η οξειδωτική βλάβη όσο και η αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου, φαίνεται να οδηγούν σε απόπτωση των καρκινικών κυττάρων πολλών κυτταρικών σειρών (Höti N, 2004). Επιπλέον, η αύξηση της ενεργότητας της ιστονικής ακετυλοτρανσφεράσης και η ενεργοποίηση του υποδοχέα του ρετινοϊκού X και του PPAR γ , φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντινεοπλασματική δράση των συμπλόκων του κασσιτέρου (Osada, 2005, Nakanishi, 2008).

Όσον αφορά τη θέση σύνδεσης των οργανοκασσιτερικών συμπλόκων στο DNA, φαίνεται ότι σε pH μικρότερο του 7 τα οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα προσδένονται σε φωσφορικά κατάλοιπα, όπως έχει παρατηρηθεί σε μελέτες με 5'-AMP, 5'-GTP, και DNA από θύμο αγελάδας (Jones, 2007). Πάνω από αυτό το pH, το υδροξύλιο ανταγωνίζεται τα φωσφορικά για την πρόσδεση στο σύμπλοκο με αποτέλεσμα η ικανότητα πρόσδεσης του συμπλόκου στα φωσφορικά κατάλοιπα να μειώνεται. Η πρόσδεση στις υδροξυλικές ομάδες των σακχάρων φαίνεται να συμβαίνει σε pH πάνω από 9 αν και η πρόσδεση σε τέτοιου είδους ομάδες σε χαμηλότερο pH θα μπορούσε να βοηθηθεί με το σχηματισμό δακτυλίων. Επομένως, τα φωσφορικά είναι η πιο πιθανή θέση σύνδεσης στο DNA αλλά το πώς σχετίζεται με την αντικαρκινική τους δράση είναι αβέβαιο.

Η ενεργοποίηση των οργανοκασσιτερικών συμπλόκων φαίνεται να πραγματοποιείται με μερική υδρόλυση και η χρήση υδρόφιλων αποχωρούσων ομάδων μπορεί να είναι η λύση τόσο για την ταχεία ενεργοποίηση όσο και για την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας των συμπλόκων αυτών (Jones 2007). Από την άλλη μεριά, η κυτταροτοξικότητα των οργανοκασσιτερικών συμπλόκων φαίνεται ότι εξαρτάται από τη λιποφιλικότητά των σταθερά συνδεδεμένων ομάδων και έχει παρατηρηθεί ότι γενικά οι βουτυλο- ομάδες είναι οι ομάδες που δίνουν καλύτερα αποτελέσματα από την άποψη αυτή.

Εκτός από αλογόνα και ψεύδοαλογόνα, τα περισσότερα σύμπλοκα του κασιτέρου φέρουν ως αποχωρούσες ομάδες κατάλοιπα καρβοξυλικών οξέων. Οι τριοργανοκασσιτερικές ενώσεις αυτού του είδους μπορεί να βρίσκονται ως μονομερή ή με τη μορφή πολυμερών, κάτι που επηρεάζει τόσο τη διαλυτότητα όσο και τη βιοδιαθεσιμότητά τους (Alama, 2009). Τα σύμπλοκα αυτά εμφανίζουν εξαιρετικά χαμηλή LD σε σχέση με κλινικά καθιερωμένα χημειοθεραπευτικά μέσα.

Μεταξύ άλλων, τα διοργανοκασσιτερικά και τα τριοργανοκασσιτερικά παράγωγα του τερεβικού και του λιθοχολικού οξέως εμφάνισαν σημαντική τοξικότητα ενάντια σε διάφορες καρκινικές σειρές και μάλιστα η δραστηριότητα ήταν μεγαλύτερη στα τριβούτυλο- ανάλογα σε σχέση με τα τριφαίνυλο- και διβούτυλο- ανάλογα (Gielen, 2000). Εντούτοις, αν και τα σύμπλοκα αυτά εμφάνισαν κάποια δραστηριότητα in vivo, αναφέρθηκε και σημαντική τοξικότητα. Τα τετραοργανοκασσιτερικά ανάλογα με οθρο- και παρα-υδροξυβενζοϊκό οξύ εμφανίζουν τοξικότητα της τάξης των nM ενάντια σε κυτταρικές σειρές σαρκωμάτων αρουραίων. Εκτός από την σημαντική κυτταροτοξικότητα, παρατηρήθηκε ότι στα σύμπλοκα αυτά υπάρχει και κάποια σχέση ανάμεσα στην κυτταροτοξικότητα και την αναστολή της οξειδωσης του λινολεϊκού οξέως από την λιποξυγενάση (Abdellah, 2009).

Οργανοκασσιτερικά ανάλογα τα οποία περιέχουν οξυγονούχες αποχωρούσες ομάδες, διάφορες από τα καρβοξυλικά κατάλοιπα, συντέθηκαν από πολυαιθυλενογλυκόλες (Barot 2007), 4-ακυλπυραζολύν-5-όνες και από διάφορες

φαινολικές ομάδες όπως οι Ο-διακυλοκασσιτερικές σιλβεστρόλες (Carragher 2008). Τα παραπάνω σύμπλοκα εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα ανάλογη με εκείνη της σιπλατίνης σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Από την άλλη μεριά έχουν συντεθεί και οργανοκασσιτερικά παράγωγα τα οποία περιέχουν θειούχες ομάδες ως αποχωρούσες ομάδες. Φαίνεται ότι ο υποκαταστάτης αυτός παίζει κάποιο ρόλο στη μεταφορά του μορίου στο στόχο του, καθυστερώντας μια πρόωρη ενεργοποίηση του μορίου. Βέβαια, σε μερικές περιπτώσεις η αποχωρούσα ομάδα μπορεί να απελευθερώνεται με πολύ βραδύ ρυθμό και η ενεργοποίηση του μορίου να πραγματοποιείται πολύ αργά για να παρατηρηθεί σημαντική δράση (Alama, 2009). Εντούτοις, ορισμένα από τα σύμπλοκα αυτά εμφάνισαν σημαντική κυτταροτοξική δράση *in vitro* ενάντια σε διάφορες κυτταρικές σειρές (Chasapis CT 2004, Hadjikakou SK, 2008) αλλά και *in vivo* (Verginadis II et al 2010, Barbieri F 2000).

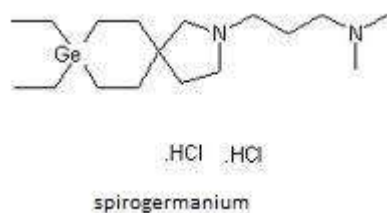
Η χαμηλή διαλυτότητα σε νερό των περισσότερων οργανοκασσιτερικών συμπλόκων παρέχει ένα περιοριστικό παράγοντα στη χρήση τους στη θεραπευτική και η διάλυση σε DMSO ή η δημιουργία κολλοειδών διαλυμάτων είναι συνήθως απαραίτητη για να βελτιώσει τη διαλυτότητά τους (Jones 2007). Σε μορφή διαλύματος, τα τρεις υποκατεστημένα σύμπλοκα του κασσιτέρου (IV) μετατρέπονται τυχαία στα αντίστοιχα δις υποκατεστημένα και τετρα υποκατεστημένα σύμπλοκα. Επίσης, τα τετρα-υποκατεστημένα οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα έχουν την τάση να χάνουν *in vivo* μια ακλυλ- ή μια αρυλ- ομάδα με τη δράση ενζύμων όπως είναι η αρωματάση (Nakanishi, 2006).

1.3.4.1.3 Το γερμάνιο (Germanium)

Το γερμάνιο είναι ένα στοιχείο της ομάδας IVA, ανήκει στα μεταλλοειδή και εμφανίζει συμπεριφορά ανάλογη με εκείνη του πυριτίου και του κασσιτέρου, ενώ εμφανίζει ομοιότητες και με στοιχεία των γειτονικών ομάδων όπως το αρσενικό και το αντιμόνιο. Τα οργανικά σύμπλοκα του γερμανίου εμφανίζουν ομοιότητες με εκείνα του κασσιτέρου, του υδραργύρου και του αρσενικού αλλά είναι λιγότερο τοξικά.

Τα ακλύλ- σύμπλοκα του γερμανίου είναι πολύ λιγότερο τοξικά από εκείνα του κασσιτέρου και του μολύβδου (Mirabelli 1989) και προκαλούν αύξηση των μεταλλάξεων σε πειραματόζωα (Gerber 1997).

Τα σύμπλοκα του γερμανίου germanium-132 και spirogermanium είναι ενεργά ενάντια σε ένα μεγάλο αριθμό καρκινικών μοντέλων προκλινικά αλλά οι κλινικές μελέτες δεν ήταν ικανοποιητικές για την περαιτέρω κλινική έρευνα (1989).



Εικόνα 1.30 : χημική δομή σπιρογερμάνιου

1.3.4.2 early d-block μέταλλα (στοιχεία μετάπτωσης)

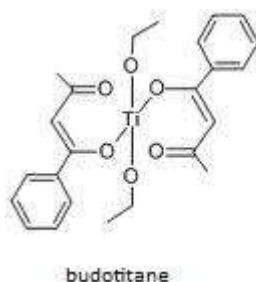
Τα μεταβατικά στοιχεία ή στοιχεία μετάπτωσης σχηματίζουν στον περιοδικό πίνακα ένα ρηχό ορθογώνιο συγκρότημα μεταξύ της υποομάδας IIA και της υποομάδας IIB που ονομάζεται d-block επειδή τα εξωτερικά ηλεκτρόνια προστίθενται στις d-υποστιβάδες των ατόμων του συγκροτήματος. Τα στοιχεία αυτά είναι μέταλλα πολύ λιγότερο δραστικά από τα μέταλλα των υποομάδων IA και IIA.

Τα early d-block μέταλλα τείνουν να βρίσκονται σε υψηλότερες οξειδωτικές καταστάσεις από τα μέταλλα αργότερα στο d-block και συχνά αποκτούν το μέγιστο σθένος τους σε υδατικά μέσα. Σε οξειδωτικές καταστάσεις άνω του 3+ μπορεί να σχηματιστούν μεταλλικά οξειδόνια όπως πχ το ZrO^{2+} , VO^{2+} , MoO_2^{2+} και ReO_3^{3+} (Jones, 2007). Επίσης, έχουν απομονωθεί οργανομεταλλικά παράγωγα των στοιχείων αυτών που περιέχουν δεσμούς άνθρακα-μετάλλου και ορισμένα από αυτά εμφανίζουν αντικαρκινική δράση. Τα περισσότερα από τα μέταλλα του early d-block δείχνουν σημαντική οξειδοαναγωγική δραστηριότητα η οποία μπορεί να περιλαμβάνει την πρόσληψη ή την απώλεια των συνδεδεμένων ατόμων οξυγόνου (Garbutcheon-Singh KB 2011). Σε αυτό το πλαίσιο, το βανάδιο είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον καθώς αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο των ιστών των θηλαστικών στα οποία ανευρίσκεται σε συγκεντρώσεις κάτω από $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες μπορεί να παρατηρηθούν αντιδράσεις αναγωγής του VO^+ στο VO^{2+} . Το βαναδύλιο VO^{2+} προσδένεται στις πρωτεΐνες τόσο σε θέσεις δότες αζώτου όσο και σε θέσεις δότες οξυγόνου. Καθώς περιέχουν τον ίδιο αριθμό ηλεκτρονίων σθένους, τα σύμπλοκα του βαναδίου και του φώσφορου εμφανίζουν ομοιότητες στη στοιχειομετρία. Οι εστέρες του βαναδίου μπορούν να μιμηθούν τους φωσφορικούς εστέρες και επομένως να αναστείλουν κινάσες και νουκλεάσες (Evangelou, 2002). Το υπεροξείδιο μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα με κέντρα βαναδίου και αυτού του τύπου η χημεία φαίνεται να έχει σημαντικές βιολογικές συνέπειες όσον αφορά την αντικαρκινική τους δράση. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι η αυτό-οξείδωση της δεοξυγουανοσίνης φαίνεται να επηρεάζεται από το θειικό βαναδύλιο με ένα μηχανισμό ο οποίος περιλαμβάνει και το υπεροξείδιο. Επίσης, η βαναδυλο-μπλεομυκίνη διασπά το DNA σε G-A 5'-3' θέσεις παρουσία H_2O_2 αλλά ο μηχανισμός της διάσπασης διαφέρει από εκείνον της μπλεομυκίνης με σίδηρο (Jones, 2007). Ορισμένα υπεροξειδιοβαναδικά σύμπλοκα

έχουν δείξει αντικαρκινική δράση *in vitro* και έχει αναφερθεί ότι η υποδερμική έγχυση συμπλόκων του βαναδίου σε ποντίκια τα οποία έφεραν MDAY-D2 όγκους μείωσε την ανάπτυξη των όγκου κατά 85-100%. Φαίνεται ότι η χημεία της οξειδοαναγωγικής συμπεριφοράς και της μεταφοράς οξυγόνου του βαναδίου προσφέρει τη βάση για τη δημιουργία αντικαρκινικών φαρμάκων αλλά δεν βρει ακόμη κλινική εφαρμογή (Chen D, 2009). Ανάμεσα στα άλλα early d-block μέταλλα μόνο τα σύμπλοκα του τιτανίου είναι κοντά στο να βρουν κλινική αποδοχή καθώς τα β-κετονικά και τα μεταλλιούχα παράγωγά του έχουν εισέλθει στη φάση II κλινικών δοκιμών.

1.3.4.2.1 Το τιτάνιο

Αν και το Ti^{3+} μπορεί να παρασκευαστεί σε υδατικά μέσα, η υδατική χημεία του τιτανίου κυριαρχείται από την οξειδωτική κατάσταση (IV) και την τάση του ελεύθερου Ti^{4+} να υδρολύεται και να καθιζάνει σχηματίζοντας κυρίως αδιάλυτο TiO_2 . Τέτοιες αντιδράσεις υδρόλυσης μπορούν να περιορίσουν σημαντικά το χρόνο ζωής των παρασκευασμάτων που περιέχουν σύμπλοκα όχι μόνο του τιτανίου αλλά και με άλλα μέταλλα του early d-block. Εντούτοις, παρουσία κατάλληλων υποκαταστατών αυτές οι υδρολυτικές αντιδράσεις μπορεί να περιοριστούν και το σύμπλοκο β-δικεντονικού τιτανίου, budotitane, ήταν το πρώτο μη λευκοχρυσούχο σύμπλοκο που εισήχθη σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία του καρκίνου (Schilling, 1996). Το budotitane ήταν το πιο ενεργό μιας σειράς συμπλόκων γενικού τύπου $[M\{C_6H_5C(O)CHC(O)CH_3\}_2X_2]$ στα οποία η ενεργότητα μειώνεται με την αύξηση της αστάθειας του X υποκαταστάτη και ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο μέταλλο με την εξής σειρά : $Ti=Zr>Hf>Mo>Sn>Ge$ (Garbutcheon-Singh KB, 2011).



Εικόνα 1.31 : χημική δομή budotitane

Η αντικαρκινική δράση του budotitane εξαρτάται από την παρουσία φαινολικών δακτυλίων στην εξωτερική σφαίρα του μορίου και εξαφανίζεται εντελώς μετά την αντικατάστασή τους από μεθύλια. Στα ζώα το σύμπλοκο αυτό αποδείχτηκε αρκετά αποτελεσματικό ενάντια σε ασκитικούς όγκους και τον ορθοπρωκτικό καρκίνο, ενώ ήταν καλά ανεκτό και από ανθρώπους ασθενείς. Η σημαντικότερη παρενέργεια που παρατηρήθηκε κατά τις κλινικές δοκιμές ήταν η καρδιακή αρρυθμία, ενώ σε μεγάλες δόσεις εμφανίστηκε ηπατοτοξικότητα και νεφροτοξικότητα (Schilling T, 1996). Η μέγιστη ανεκτή δόση ήταν 230mg m^{-2} ανά δυο εβδομάδες. Η κατάσταση όσον αφορά το μηχανισμό δράσης του budotitane μπερδεύεται από την παρουσία 3

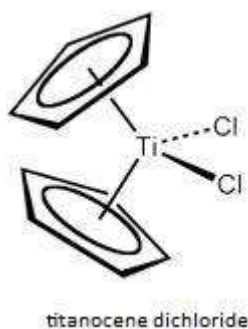
ισομερών τα οποία διαφέρουν στην τοποθέτηση των β-δικετονικών δακτυλίων στο χώρο. Η σχετική αναλογία των ισομερών αυτών σε υδατικά διαλύματα είναι 60% cis, cis, cis, 21% cis, trans, cis, 19% cis, cis, trans. Στο νερό η υδρόλυση των αιθόξυομάδων έχει ημιπερίοδο ζωής 20s, ενώ η υδρόλυση των β-δικετονικών ομάδων κάποιες ώρες (Jones, 2007). Συμπύκνωση των αρχικών προϊόντων υδρόλυσης μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή πολυκυρηνικών όξο- και υδρόξο-γεφυρωμένων συμπλόκων. Το διυδατικό σύμπλοκο έχει την ικανότητα να προσδένεται στο DNA αλλά στοιχεία για την *in vitro* και *in vivo* βλάβη του DNA δεν υπάρχουν. Επομένως ο μηχανισμός δράσης του boudotitane αν και άγνωστος φαίνεται να διαφέρει από εκείνο της σισπλατίνης.

Τα early d-block μέταλλα σχηματίζουν επίσης μια σειρά οργανομεταλλικών συμπλόκων που ονομάζονται metallocene dihalides (διαλογονούχα μεταλλιούχα σύμπλοκα) (Caruso, 2004). Αυτά έχουν γενικό τύπο $[M(n5-C_5H_5)_2X_2]$ όπου X ένα αλογόνο και M ένα μέταλλο του early d-block. Τα σύμπλοκα αυτά περιέχουν δυο κυκλοπενταδιενυλο υποκαταστάτες οι οποίοι ενώνονται μέσω των 5 ατόμων άνθρακα σε ένα σχηματισμό με ένα μέταλλο (IV) στο κέντρο. Μέλη αυτής της ομάδας έδειξαν καλά αποτελέσματα έναντι καρκίνου του μαστού, των πνευμόνων και της γαστρεντερικής οδού. Ορισμένα δρουν και ενάντια σε κύτταρα ασκτικών όγκων Ehrlich. Η φύση του μεταλλικού ιόντος παίζει βασικό ρόλο στην ενεργότητα με τα σύμπλοκα που περιέχουν Ti, V, Nb Mo να δείχνουν καλή δράση ενώ εκείνα που περιέχουν Ta, W, Zr, Hf καθόλου ή μικρή ενεργότητα (Garbutcheon-Singh KB, 2011). Τα φορτισμένα σύμπλοκα $[M(n5-C_5H_5)_2X_2]^+$ (M=Nb, Mo, Re) είναι λιγότερο δραστικά από τα ουδέτερα ανάλογά τους.

Ο μηχανισμός δράσης των metallocenes dihalides παραμένει αβέβαιος αλλά η δράση τους ενάντια σε ανθεκτικές προς τη σισπλατίνη καρκινικές κυτταρικές σειρές υποδηλώνει διαφορετικό μηχανισμό δράσης (Olszewski, 2010). Η υδρόλυσή τους είναι περισσότερο ταχεία από εκείνη της σισπλατίνης και περιλαμβάνει την αντικατάσταση των αλογόνων από νερό η οποία ακολουθείται από αποπρωτονίωση με αποτέλεσμα να παραμένει το υδροξύλιο. Η απώλεια του πρώτου αλογόνου είναι ταχεία αλλά η απώλεια του δεύτερου εμφανίζει χρόνο ημιζωής περίπου 45 λεπτά. Ο ρυθμός αποβολής του κυκλοπενταδιενικού δακτυλίου είναι περισσότερο αργός με χρόνο ημιζωής τις 57h. Το σύμπλοκο του μολυβδενίου είναι λιγότερο όξινο από εκείνο του τιτανίου και υπάρχει με τη μορφή $[Mo(n_5-C_5H_5)_2(H_2O)_2]^{2+}$ στα υδατικά διαλύματα, ενώ το σύμπλοκο του τιτανίου με τη μορφή $[Ti(n_5-C_5H_5)_2(OH)(H_2O)]$ σε pH 7. Το ουδέτερο σύμπλοκο εισέρχεται στα κύτταρα πιο γρήγορα από το κατιόν και πιθανότατα σε αυτό οφείλεται η μεγαλύτερη δράση του συμπλόκου του τιτανίου. Το προϊόν υδρόλυσης του τελευταίου εμφανίζει μεγάλη συγγένεια για τις πρωτεΐνες του ορού και ειδικότερα για την τρανσφερίνη η οποία πιθανότατα αποτελεί και το μέσο μεταφοράς του στον ορό (Sarsam, 2011). Η εκλεκτική πρόσληψη από τους όγκους συμβαίνει σε 2-3 ημέρες και το μέταλλο εντοπίζεται σε περιοχές του

κυττάρου πλούσιες σε νουκλεϊκά οξέα. Η κολλαγενάση τύπου IV και η κινάση C φαίνεται ότι αναχαιτίζονται από τα σύμπλοκα αυτά, καθώς επίσης και η ανάπτυξη νέων αγγείων στον όγκο (Maragoudakis, 1994). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα παραπάνω σύμπλοκα δεν προσδένονται ισχυρά στα νουκλεϊκά οξέα σε ουδέτερο pH και δεν αναστέλλουν ένζυμα τα οποία σχετίζονται με διεργασίες του DNA (Harding, 2000). Επομένως είναι απίθανο η δράση τους να επηρεάζει άμεσα το DNA, αν και έχει βρεθεί ότι το σύμπλοκο του μολυβδενίου μπορεί να σχηματίζει σύνθετα σύμπλοκα με το 5'-AMP μέσω σχηματισμού δεσμού ανάμεσα στην φωσφορική και την αζωτούχο ομάδα. Επίσης, τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται να «μπλοκάρονται» στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα την καταστολή της μίτωσης μετά την κατεργασία καρκινικών κυττάρων με τα σύμπλοκα αυτά. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε αναστολή των κινασών που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά και στην αναστολή της τοποϊσομεράσης II (Caruso, 2004). Εντούτοις, ο μηχανισμός δράσης τους δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος.

Το πιο δραστικό από αυτά τα σύμπλοκα βρέθηκε να είναι το $[Ti(n^5-C_5H_5)_2Cl_2]$.



Εικόνα 1.32 : χημική δομή titanocene dichloride

Στο παραπάνω μόριο, η αντικατάσταση του χλωρίου από άλλο αλογόνο οδήγησε σε διαφορές στην τοξικότητα αλλά όχι και στη δραστικότητα. Αντίθετα, η αντικατάσταση του κυκλοπενταδιενικού δακτυλίου οδήγησε σε απώλεια της δράσης του, ενώ το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε και μετά την πρόσδεση των δακτυλίων μεταξύ τους. Το σύμπλοκο αυτό φαίνεται να αναστέλλει τη σύνθεση DNA και να προάγει την απόπτωση (Abeysinghe, 2007). Η σύνδεση του συμπλόκου $[Ti(n^5-C_5H_5)_2Cl_2]$ με το DNA φαίνεται να γίνεται μέσω των φωσφορικών ομάδων και όχι μέσω των νουκλεοτιδικών βάσεων. Επίσης, το σύμπλοκο αυτό φαίνεται να αναστέλλει και τη δράση της τοποϊσομεράσης. Οι κλινικές μελέτες φάσης I έδωσαν καλά αποτελέσματα (Korfei A, 1998) και το σύμπλοκο προχώρησε και σε κλινικές μελέτες φάσης II (Lümmen, 1998). Η σημαντικότερη παρενέργεια που εμφανίστηκε κατά τις μελέτες αυτές ήταν η νεφροτοξικότητα. Οι υπόλοιπες ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης και κρεατινίνης στον ορό των ασθενών. όσον αφορά τη δράση του συμπλόκου, στις κλινικές μελέτες φάσης II το σύμπλοκο δεν ήταν αποτελεσματικό ενάντια σε μεταστατικό καρκίνο

των νεφρών. Εντούτοις, έδειξε σημαντική δράση σε ανθεκτικούς στη σισπλατίνη καρκίνους και ενδεχομένως θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση ανθεκτικού στη σισπλατίνη καρκίνου των ωοθηκών. Το σημαντικότερο μειονέκτημα του παραπάνω συμπλόκου φαίνεται να είναι η μειωμένη υδατοδιαλυτότητα και η υδρολυτική αστάθεια που εμφανίζει κάτω από κανονικές συνθήκες, αλλά και η τάση του να προσδένεται στις πρωτεΐνες του πλάσματος (Harding MM, 2000).

1.3.4.3 Middle and late d-block μέταλλα

Τα μέταλλα αυτά εμφανίζουν λιγότερο έντονες οξειδοαναγωγικές ιδιότητες από τα early d-block μέταλλα. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται σε οξειδωτική κατάσταση +2 ή +3. Οξυϊόντα δεν σχηματίζονται από τα μέταλλα αυτά με εξαίρεση το $\text{FeO}^{3+/2+}$ στη μπελομυκίνη και στα ένζυμα του συμπλέγματος P450. Είναι επίσης αναμενόμενο από χημική άποψη να σχηματιστούν σύμπλοκα του RuO_2^+ με υποκαταστάτες πολυπυριδίνης οι οποίοι προκαλούν θραύση του DNA. Όσον αφορά τη σύνθεση συμπλόκων με κυτταροτοξική δράση, το ρουθένιο και το ρόδιο έχουν κινήσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, αλλά λίγα είναι γνωστά για το όσμιο και το ιρίδιο από την άποψη αυτή (Chen D, 2009). Από τα late d-block μέταλλα, ιστορικά είναι γνωστό ότι ορισμένα σύμπλοκα του χαλκού με thiosemicarbazones δείχνουν καλύτερη ενεργότητα από τους υποκαταστάτες τους. Όμοια, ορισμένες φωσφίνες εμφανίζουν καλύτερα αποτελέσματα ως σύμπλοκα με χρυσό από ότι στην ελεύθερη κατάστασή τους. Αν και διάφορα σύμπλοκα του χαλκού φαίνεται να εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση σε εργαστηριακές μελέτες, δεν έχουν βρει ακόμη κλινική εφαρμογή. Εξαιτίας της χρήσης τους στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, τα σύμπλοκα του χρυσού προσφέρουν μια ενδιαφέρουσα προοπτική στην αναζήτηση νέων χημειοθεραπευτικών παραγόντων και ορισμένα από αυτά εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση in vitro (Nobili S, 2010).

1.3.4.3.1 Το ρουθένιο

Το ρουθένιο είναι ένα από τα σπανιότερα μέταλλα της ομάδας του λευκόχρυσου. Η συνήθης οξειδωτική του κατάσταση είναι +2, +3 και +4, αλλά μπορεί να βρεθεί και στην +8 όπως στο RuO_4 . Η βιοχημεία και ο μεταβολισμός του ρουθενίου δεν έχουν μελετηθεί διεξοδικά. Οι δακτύλιοι του ρουθενίου απορροφώνται άμεσα και αποβάλλονται ταχέως. Κατακράτηση του ρουθενίου παρατηρείται στα οστά, στους νεφρούς, τους μύες το ήπαρ και πιθανότατα στους πνεύμονες (Sava G, 1990).

Διάφορα στοιχεία που περιλαμβάνουν την μεταλαξιογόνο δράση και την αναστολή της αντιγραφής του DNA υποδηλώνουν ότι το DNA είναι το μόριο στόχος των συμπλόκων του ρουθενίου (Brabec V, 2006). Η συγγένεια των συμπλόκων του ρουθενίου για το άζωτο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ομοιοπολική σύνδεση με τα νουκλεϊκά οξέα είναι σημαντική. Επίσης, η δημιουργία δεσμών συντονισμού ανάμεσα στο κατιόν του ρουθενίου και στα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα

μπορεί να οφείλεται και σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Σε ορισμένες δομές του DNA και του RNA όπως είναι οι θηλιές, οι οποίες συγκεντρώνουν μεγάλο μέρος του αρνητικού φορτίου, η ηλεκτροστατική έλξη του κατιόντος του ρουθενίου μπορεί να είναι πολύ σημαντική είτε για την κατεύθυνση του συμπλόκου στο DNA, είτε για την συγκράτηση του σε αυτή τη θέση ώστε να προσδεθεί σε επόμενο στάδιο (Sava G, 1990).

Η κατανομή των συμπλόκων του ρουθενίου *in vivo* εξαρτάται από το είδος του συμπλόκου (Kostova, 2006). Πολλά από τα σύμπλοκα του ρουθενίου τα οποία δείχνουν αντινεοπλασματική δράση σε *in vivo* συστήματα μπορεί να υφίστανται κάποιο είδος μετατροπής *in vivo* και το σύμπλοκο το οποίο ενώνεται με το DNA να είναι διαφορετικό από αυτό που εισάγεται αρχικά στον οργανισμό. Επομένως τα σύμπλοκα του ρουθενίου θα πρέπει να θεωρούνται ως προφάρμακα τα οποία μεταβάλλονται από τις μεταβολικές διεργασίες του οργανισμού μετά την εισαγωγή τους. Τέτοιες διαδικασίες περιλαμβάνουν την αντικατάσταση υποκαταστατών η οποία μπορεί να συμβεί στην αιματική κυκλοφορία ή στο εξωκυττάριο υγρό αλλά και την αναγωγή η οποία μπορεί να συμβεί ενδοκυττάρια.

Εφόσον το Ru βρίσκεται κάτω από το Fe στον περιοδικό πίνακα, βρίσκεται και αυτό στις οξειδωτικές καταστάσεις M^{+2} και M^{+3} στα υδατικά διαλύματα και μιμείται το Fe σε διάφορες μεταβολικές διεργασίες. Και τα δυο μέταλλα συγκεντρώνονται στις λάχνες του λεπτού εντέρου και στη συνέχεια κατανέμονται ευρέως (Sava G, 1990). Και τα δυο M^{+3} μέταλλα εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για φαινολικούς υποκαταστάτες, κάτι που είναι σημαντικό για τη δέσμευση με την τρανσφερίνη του αίματος και τη μεταφορά του στους ιστούς (Pessoa, 2010). Η απελευθέρωση από την τρασφερίνη μπορεί να υποβοηθηθεί από τα H^+ τα οποία ανταγωνίζονται για τη δέσμευση των φαινολικών οξυγόνων ή την αναγωγή στην κατάσταση M^{+2} η οποία έχει χαμηλή συγγένεια για σύνδεση με φαινολικούς δακτυλίους.

Το ερυθρό του ρουθενίου είναι γνωστός ανταγωνιστής των ιόντων ασβεστίου και αναστέλλει τη μεταφορά και την πρόσδεση των ιόντων αυτών στις μιτοχονδριακές μεμβράνες και στο μυϊκό ιστό (Hajnóczy G, 2006). Το άλας αυτό αναστέλλει επίσης την ενεργότητα της Ca^{+2} -ATPάσης. Επίσης είναι ανταγωνιστής της καταθλιπτικής δράσης της νοραδρεναλίνης και της 5-υδροξυτριπταμίνης στους νευρώνες του φλοιού του εγκεφάλου και φαίνεται να προκαλεί παράλυση και παροξυσμούς σε πειραματόζωα. Το ερυθρό του ρουθενίου χρησιμοποιείται από παλιά ως βιολογική χρώση και εξαιτίας του υψηλού θετικού του φορτίου δείχνει μεγάλη συγγένεια για τα ανιόντα και έχει την τάση να συγκεντρώνεται σε όγκους. Το σύμπλοκο αυτό μπορεί να αναχαιτίσει την ανάπτυξη όγκων, ενώ φαίνεται να εμφανίζει και ανοσοκατασταλτική δράση (Sava, 2000).

Βέβαια, μετά την ανακάλυψη της αναστολής της μιτωτικής δραστηριότητας από τα σύμπλοκα της πλατίνας, το ενδιαφέρον στράφηκε και στα χλωρο-άμινο σύμπλοκα

του ρουθενίου (Jones, 2007). Η θεωρία των κρυσταλικών πεδίων μας κάνει να περιμένουμε ότι, σε αντίθεση με το επίπεδο τετράγωνο σχήμα των συμπλόκων της πλατίνας, τα σύμπλοκα του ρουθενίου (II) και (III) θα λαμβάνουν οκταεδρική δομή στο χώρο. Επομένως, τα απλά χλωρο-άμινο σύμπλοκα του ρουθενίου είναι εξα-υποκατεστημένα. Αν και δομικά διαφορετικά από τα σύμπλοκα της πλατίνας, τα χλωρο-άμινο σύμπλοκα του ρουθενίου δείχνουν αντικαρκινική δράση σε εργαστηριακά μοντέλα όπως η λεμφοκυτταρική λευχαιμία P388 και το σάρκωμα L1210 των τρωκτικών.

Τα δι- τρι- και τετρα- χλωρο σύμπλοκα του Ru^{3+} φαίνεται να μεταφέρονται στην αιματική κυκλοφορία σε μεγάλο ποσοστό μέσω της αλβουμίνης και σε μικρότερο ποσοστό μέσω της τρανσφερίνης. Από τους δυο αυτούς μεταφορείς η τρανσφερίνη είναι σημαντική για τη μεταφορά του συμπλόκου στους όγκους (Pessoa, 2010). Το σύμπλοκο εισέρχεται στο αίμα, σχηματίζει ένα σύμπλοκο με την τρανσφερίνη και μεταφέρεται περισσότερο ή λιγότερο εκλεκτικά στο καρκινικό κύτταρο το οποίο επιδεικνύει μεγάλο αριθμό υποδοχέων της τρανσφερίνης. Το ρουθένιο προσδέεται στις ιστιδίνες της τρανσφερίνης και, καθώς υπάρχουν 17 ιστιδίνες στο μόριο της τρανσφερίνης, κάθε μόριο τρανσφερίνης μπορεί να μεταφέρει αρκετά μόρια συμπλόκου. Μετά την είσοδό του στο κύτταρο, το σύμπλοκο του ρουθενίου απελευθερώνεται και μπορεί να αλληλεπιδράσει είτε άμεσα είτε μετά την αναγωγή του σε ρουθένιο (II) με μακρομόρια όπως το DNA (Kostova, 2006). Η απελευθέρωση αυτή πραγματοποιείται στα ενδοσώματα σε όξινο pH (pH=5). Η απελευθέρωση και η αναγωγή του συμπλόκου είναι ένα σημαντικό βήμα και έχει βρεθεί ότι η πρόσδεση στο DNA και η κυτταροτοξικότητα είναι μεγαλύτερη σε υποξικές αναγωγικές περιοχές κάτι που υποδηλώνει ότι η μετατροπή του Ru^{3+} σε Ru^{2+} είναι σημαντική για αυτή τη διαδικασία. Για το λόγο αυτό πιστεύεται ότι ορισμένα σύμπλοκα του Ru^{3+} είναι προφάρμακα τα οποία μετατρέπονται στα ενεργά σύμπλοκα Ru^{2+} μόνο όταν φτάσουν στο χαμηλό σε οξυγόνο περιβάλλον του όγκου όπου ευνοείται η αναγωγή τους (Sava G, 1990).

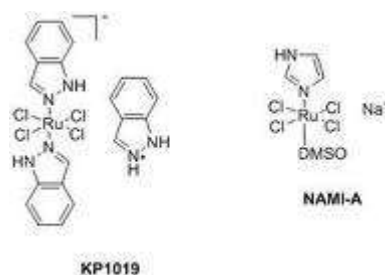
Η διαλυτότητα είναι ένας περιοριστικός παράγοντας που μπορεί να υπερπηδηθεί με το σχηματισμό ανιονικών χλωρο συμπλόκων ή διακλυλο-σουλφοξειδιο συμπλόκων (Tan, 2011). Αυτοί οι παράγοντες είναι ενεργοί ενάντια σε ορθοπρωκτικό καρκίνο αλλά και σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, νεφρικό καρκίνο και καρκίνο του μαστού.

Τα σύμπλοκα με διμεθυλοσοθυλφοξειδίο συμπεριφέρονται διαφορετικά από τα αμινοσύμπλοκα και είναι δραστικά ενάντια σε καρκίνο του πνεύμονα αλλά ανενεργά ενάντια σε λεμφοκυτταρική λευχαιμία P388 ή στο σάρκωμα L1210 των τρωκτικών. Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι τα σύμπλοκα αυτά είναι δραστικά κυρίως ενάντια σε μεταστατικούς όγκους (Levina A, 2009). Επίσης, εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα, της τάξης του 1gr/kgf βάρους σώματος κάτι που αποτελεί

σημαντικό παράγοντα για τις μεγάλες δόσεις που απαιτούνται στη χημειοθεραπεία του καρκίνου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το σύμπλοκο NAMI-A ((imH_2) -trans-[Ru(imH)(dmsO)Cl₄]).

Το σύμπλοκο NAMI εμφανίζει αντιμεταστατικές ιδιότητες προκαλώντας παρεμπόδιση της αγγειογένεσης στην περιοχή της μετάστασης (Alessio, 2004). Επομένως, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μεταγχειρητικά για τη θεραπεία μικρομεταστατικών εστιών. Το NAMI είναι δραστικό έναντι σε καρκίνο του πνεύμονα, B16 μελάνωμα, MCa καρκίνο του μαστού. Το άλας εμφανίζει καλή διαλυτότητα, μπορεί να χορηγηθεί per os και εμφανίζει αντιμεταστατικές ιδιότητες στα ζώα σε δόσεις 22-66 mg kg⁻¹ ανά ημέρα (Bergamo, 1999). Όσον αφορά το μηχανισμό δράσης του, το σύμπλοκο αυτό δεν φαίνεται να επηρεάζει το DNA. Ένα μικρό ποσοστό της χορηγούμενης δόσης φτάνει τελικά στον όγκο και το αποτέλεσμα του φαίνεται να είναι ανεξάρτητο από το ποσοστό αυτό (Levina, 2009). Το NAMI φαίνεται να επηρεάζει τόσο τη σχετική αναλογία mRNAs σε μια μεταλλοπρωτεΐνάση η οποία αποδομεί την εξωκυττάρια ουσία όσο και τον ειδικό αναστολέα αυτού του ενζύμου το TIMP-2. Αυτό οδηγεί σε αύξηση των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας γύρω από τον όγκο αλλά και γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία. Έτσι, από τη μια καθυστερεί η αιματική ροή στον όγκο με αποτέλεσμα να αναπτύσσεται βραδύτερα και από την άλλη μειώνεται η διαπερατότητα των αιμοφόρων αγγείων με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η δημιουργία μεταστάσεων.

Σε αντίθεση με το NAMI, ένα άλλο οκταεδρικό σύμπλοκο του ρουθενίου, το KP1019, εμφανίζει κυτταροτοξική δράση ενάντια σε καρκινικά κύτταρα *in vitro*. Το KP1019 εισέρχεται στα κύτταρα και προάγει την απόπτωση προκαλώντας οξειδωτική βλάβη στο κύτταρο (Hartinger CG, 2009). Η είσοδος του συμπλόκου αυτού στα κύτταρα ακολουθεί δυο πορείες, μια διαμεσολαβούμενη από την τρανσφερίνη και μια ανεξάρτητη από την τρανσφερίνη (Piccioli, 2004). Επίσης, νεότερα πειράματα έδειξαν ότι μπορεί να προσδένεται στο DNA του κυττάρου και να προκαλεί ξετύλιγμα της διπλής έλικας (Kostova, 2006). Μια σημαντική παρατήρηση που προέκυψε ήταν ότι το παραπάνω σύμπλοκο εμφανίζει ισχυρή τάση να συσσωρεύεται στον πυρήνα του κυττάρου (55% του χορηγούμενου συμπλόκου εντοπίζεται στον πυρήνα) σε αντίθεση με άλλα σύμπλοκα όπως είναι η σισπλατίνη (10% της χορηγούμενης σισπλατίνης εντοπίζεται στον πυρήνα). Επιπλέον, το σύμπλοκο αυτό, σε αντίθεση με το NAMI, ασκεί δράση και στην πρωτοπαθή εστία του όγκου.



Εικόνα 1.33 : χημική δομή KP1019 και NAMI-A

Άλλη μια ομάδα με βελτιωμένη διαλυτότητα στο νερό είναι τα σύμπλοκα του ρουθενίου με πολυαμινοκαρβοξυλικούς υποκαταστάτες όπως το 1,2-προπυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ (Levina, 2009). Το σύμπλοκο αυτό φαίνεται ότι αποβάλλει ομάδες χλωρίου και στη συνέχεια προσδέεται στην τρανσφερίνη και την αλβουμίνη. Έχει απομονωθεί και ένα σύμπλοκο της ομάδας αυτής με τη γουανίνη κάτι που υποδηλώνει ότι είναι πιθανή η πρόσδεση στο DNA μέσω της ομάδας της γουανίνης. Το σύμπλοκο αυτό διεγείρει επίσης την οξειδάση του NADPH και την οξειδωτική έκρηξη των ουδετερόφιλων φαγοκυττάρων και επομένως η μείωση των όγκων μπορεί να είναι το αποτέλεσμα απελευθέρωσης τοξικών μεταβολιτών του οξυγόνου από τα φαγοκύτταρα.

Τέλος, τα σύμπλοκα πολυπυριδίνης του ρουθενίου χρησιμοποιήθηκαν παλαιότερα για την εξέταση του DNA και για την επίτευξη τεμαχισμού. Τα σύμπλοκα αυτά σχηματίζουν ενδοελικούς δεσμούς με το DNA και είναι ενεργά ενάντια στον καρκίνο του τραχήλου, HeLa, και σε κυτταρικές σειρές L1210 καρκίνου των τρωκτικών. Η πρόσδεση φαίνεται να είναι ειδική για θέσεις γουανίνης (Gao F, 2008). Η βλάβη που προκαλείται στο DNA από τα πολυπυριδινικά σύμπλοκα του ρουθενίου μπορεί να οφείλεται σε έναν ή περισσότερους μηχανισμούς. Το μεταλλικό ιόν θα μπορούσε να δράσει ως οξύ διεγείροντας το σπάσιμο του N-γλυκοσιδικού δεσμού των αλυσίδων του DNA. Επίσης, κάτω από αερόβιες συνθήκες, το μεταλλικό κέντρο θα μπορούσε να συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις με αποτέλεσμα την οξείδωση καταλοίπων πουρίνης και σακχάρων.

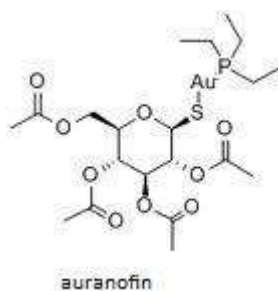
1.3.4.3.2 Το ρόδιο

Τα μονοπυρηνικά σύμπλοκα του ροδίου έχουν δομές παρόμοιες με εκείνες των ενεργών συμπλόκων του ρουθενίου και πολλά από αυτά έχουν εμφανίσει αντινεοπλασματική δράση (Katsaros N, 2002). Η χαμηλή διαλυτότητα είναι ένα σημαντικό πρόβλημα και μπορεί να βελτιωθεί με τη δημιουργία συμπλόκων με διμεθυλοσουλφοξείδιο, ανάλογα με εκείνα του ρουθενίου τα οποία όμως είναι περισσότερο τοξικά (Sliwińska U, 2008). Οι διαφορετικές οξειδοαναγωγικές ιδιότητες των συμπλόκων του ροδίου μπορεί επίσης να συνεισφέρουν στην κυτταροτοξική τους δράση, με το Rh^{3+} να ανάγεται πιο άμεσα σε σχέση με το Ru^{3+} σε υδατικά μέσα. Επίσης τα σύμπλοκα του Rh^{3+} είναι κινητικά πιο αδρανή σε σχέση με εκείνα του Ru^{3+} (Jones, 2007). Τα διπυρηνικά σύμπλοκα του ροδίου εμφανίζουν

αντικαρκινική δράση ενάντια σε P388 λεμφοκυτταρική λευχαιμία, σάρκωμα 180, ενοφθαλμισμένα ενδοπεριτοναϊκά λευχαιμικά κύτταρα P388, και μικρή δράση ενάντια σε L1210 κύτταρα και B16 μελάνωμα. Η ενεργότητα των συμπλόκων του ροδίου αυξάνεται με την αύξηση της λιποφιλικότητας των υποκαταστατών του από R= CH₃ σε R= C₄H₉ αλλά η χρήση αυτών των συμπλόκων περιορίζεται λόγω της τοξικότητάς τους (Katsaros N, 2002). Αντίθετα, το διπυρηνικό σύμπλοκο του ρηνίου (Rhenium) βρέθηκε δραστικό ενάντια σε ενοφθαλμισμένα λευχαιμικά κύτταρα P388, σε σάρκωμα 180 και σε B16 μελάνωμα. Τα διπυρηνικά σύμπλοκα του ροδίου προσδένονται στις πρωτεΐνες μέσω των θειολομάδων της κυστεΐνης ή τις ομάδες ιμιδαζολίου της ιστιδίνης αναστέλλοντας ένζυμα με ενεργό κέντρο που περιέχει ιστιδίνη (Aguirre JD, 2009). Ο διπυρηνικός πυρήνας (Rh)₂⁴⁺ φαίνεται να παραμένει ανέπαφος κατά την πρόσδεση στις θειολομάδες και σε υδατικά διαλύματα η πρόσδεση στο N7 της αδενοσίνης ευνοείται σε σχέση με την πρόσδεση στη γουανοσίνη, την κυτιδίνη ή την ουριδίνη. Τα στοιχεία πρόσδεσης των διροδιο συμπλόκων στο DNA είναι περιορισμένα και φαίνεται να προσδένεται σε μονόκλωνο DNA και poly(dA) περιοχές αλλά όχι σε δίκλωνο DNA και poly(dG) περιοχές (Sorasaene K, 2003).

1.3.4.3.3 Ο χρυσός

Η καθιέρωση της κλινικής χρήσης συμπλόκων του χρυσού όπως το Auranofin για τη θεραπεία της χρόνιας πολυαρθρίτιδας σε συνδυασμό με την κυτταροτοξικότητα που εμφανίζουν τα σύμπλοκα αυτά οδήγησε στην έρευνα για τη χρήση τους ως αντικαρκινικά φάρμακα. Πράγματι, το Auranofin εμφάνισε σημαντική κυτταροτοξική δράση *in vitro* ενάντια σε ένα μεγάλο αριθμό καρκινικών κυτταρικών σειρών (Mirabelli CK, 1985). Δυστυχώς, όμως, τα υποσχόμενα αποτελέσματα *in vitro* δεν μεταφράστηκαν σε συγκεκριμένα *in vivo* αποτελέσματα. Το Auranofin φαίνεται να αναστέλλει τη σύνθεση DNA, RNA και πρωτεϊνών, αλλά δεν αντιδρά άμεσα με το DNA. Η κυτταροτοξική του δράση φαίνεται να είναι δοσοεξαρτώμενη, χρονοεξαρτώμενη και δείχνει να επηρεάζεται και από τη θερμοκρασία.



Εικόνα 1.34 : χημική δομή auranofin

Διάφορα άλλα σύμπλοκα του χρυσού, όπως το σύμπλοκο του χρυσού (I) με το 1,2-δισ(διφαιλυλοφωσφίνο)αιθάνιο (dppf) έδειξαν συγκεκριμένη δραστικότητα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, και μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις μεγαλύτερη από εκείνη

του φωσφινοαιθανίου που αποτελεί γνωστό αντικαρκινικό παράγοντα (Bernes 1986). Το σύμπλοκο $[Au(dprpe)_2]Cl$ εμφανίζει σημαντική κυτταροτοξική δράση και δρα σχηματίζοντας σταυροδεσμούς με το DNA, ενώ έχει την ικανότητα να αναστέλλει και τη σύνθεση DNA, RNA και πρωτεϊνών. Επίσης, φαίνεται να δρα και στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, μεταβάλλοντας το δυναμικό της με αποτέλεσμα την αναστολή της παραγωγής ενέργειας από τα μιτοχόνδρια. Το σύμπλοκο αυτό φαίνεται να αναστέλλει την πρωτεϊνική σύνθεση περισσότερο από ότι τη σύνθεση DNA ή RNA, σχηματίζει δεσμούς ανάμεσα στο DNA και στις πρωτεΐνες και οδηγεί σε κατακερματισμό του DNA. Το παραπάνω σύμπλοκο είναι ενεργό ενάντια σε P388 λευχαιμικά κύτταρα αλλά μόνο όταν χορηγείται απευθείας στον όγκο, ενώ η ενδοπεριτοναϊκή, ενδοφλέβια ή υποδερματική χορήγηση είναι ανενεργός (Mirabelli CK, 1986). Δυστυχώς, το σύμπλοκο αυτό εμφάνισε σημαντική καρδιοτοξικότητα και ηπατοτοξικότητα, πράγμα που εμπόδισε τις κλινικές μελέτες.

Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι το οργανίδιο στόχος των συμπλόκων του χρυσού είναι τα μιτοχόνδρια (Barnard, 2007). Πιο συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα του χρυσού εμφανίζουν μεγάλη τάση να ενώνονται με τις θειολομάδες των πρωτεϊνών και φαίνεται να αναστέλλουν τη δράση της μιτοχονδριακής αναγωγάσης της γλουταθειόνης και της αναγωγάσης της θειορεδοξίνης. Το σύστημα της θειορεδοξίνης φαίνεται να παίζει σπουδαίο ρόλο στην αποτοξίνωση του οργανισμού από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου οι οποίες είναι κατά ένα μέρος υπεύθυνες για την ανάπτυξη καρκίνου. Από την άλλη πλευρά, όγκοι οι οποίοι παράγουν σε υψηλά ποσοστά θειορεδοξίνη είναι συνήθως επιθετικοί και ανθεκτικοί στην αντικαρκινική θεραπεία (Gromer, 2004).

Η ηλεκτρονική ομοιότητα ανάμεσα στην d8 στοιβάδα του Au (III) και την d8 στοιβάδα του Pt(II) έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία συμπλόκων με επίπεδη τετράγωνη διαμόρφωση. Επομένως, θα μπορούσε να δικαιολογήσει τη χρήση συμπλόκων του χρυσού (III) στη χημειοθεραπεία του καρκίνου ως αναλόγων της σισπλατίνης. Σύμπλοκα της μορφής $[AuLCl_3]$ εμφανίζουν σημαντική κυτταροτοξικότητα και αντικαρκινική δράση *in vivo* (Nobili S, 2010). Εντούτοις, η αναγωγή του Au^{3+} σε Au^{2+} *in vivo* αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στην εφαρμογή των συμπλόκων Au^{3+} στη θεραπευτική και απαιτεί την επιλογή κατάλληλων υποκαταστατών οι οποίοι είναι ικανοί να εμποδίσουν αυτή την αναγωγή. Η παρουσία ορθο-μεταλλικού βενζυλαμινο υποκαταστάτη εμποδίζει την αναγωγή του μεταλλικού κέντρου από τις θειόλες και τέτοιου είδους σύμπλοκα φαίνεται να είναι δραστικά ενάντια σε μεγάλο αριθμό καρκινικών κυτταρικών σειρών (Chen D, 2009). Επίσης, τα οξικά και τα μαλονικά σύμπλοκα του χρυσού (III) δείχνουν δράση όμοια με τη σισπλατίνη ενάντια σε όγκους HT1376 *in vivo*. Ο μηχανισμός δράσης τους διαφέρει από εκείνο της σισπλατίνης και είναι πιθανό αυτά τα σύμπλοκα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ενάντια σε ανθεκτικούς στην σισπλατίνη όγκους. Πιο συγκεκριμένα, παρά την παρόμοια δομή του με τα επίπεδα τετράγωνα σύμπλοκα

του λευκόχρυσου (II), αλληλεπιδρούν ασθενώς με το DNA, αλλά αναστέλλουν την δράση της αναγωγάσης της θειορεδοξίνης (Casini, 2008).

1.4.Η τοξικολογία των οργανικών ενώσεων του κασσιτέρου

Οι οργανικές ενώσεις του κασσιτέρου παρουσιάζουν διαφορετική τοξικότητα, ανάλογα με τον τύπο. Τα τριακυλο-παράγωγα θεωρούνται πλέον τοξικά, ενώ για την τοξικότητα των μονοακυλο-παραγώγων ($R\text{SnX}_3$), εκτός του τριχλωριδίου του μονοαιθυλο-κασσιτέρου ($\text{C}_2\text{H}_5\text{SnCl}_3$) η τοξικότητα του οποίου είναι χαμηλή, λίγα είναι γνωστά.

Η τοξικότητα των διαλυτοπαραγώγων του κασσιτέρου ($R_2\text{SnX}_2$) χαρακτηρίζεται από την ερεθιστική εν γένει δράση τους και την τοξική δράση στο ήπαρ και τις χοληφόρους οδούς (Winship KA., 1988). Οι παραπάνω βλάβες είναι δυνατό να οδηγήσουν σε θάνατο από ηπατική ανεπάρκεια ή περιτονίτιδα.

Στους επίμυες έχει βρεθεί ότι όλα τα διαλυτοπαραγωγα είναι τοξικά, ενώ τα συμπτώματα δηλητηρίασης εμφανίζονται μετά από εφάπαξ χορήγηση από τους στόματος δόσης 920mg/kg. Στα ίδια πειραματόζωα βρέθηκε ότι η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση ήταν δέκα φορές τοξικότερη της αντίστοιχης από του στόματος. Μετά από παρεντερική χορήγηση των ενώσεων αυτών ανευρίσκονται υψηλές συγκεντρώσεις στο ήπαρ και μικρότερες στους νεφρούς. Η χρόνια δηλητηρίαση είχε ως αποτέλεσμα την πρόκληση ίδιων βλαβών με αυτές που παρατηρούνται μετά από εφάπαξ λήψη υψηλής δόσης.

Ο μηχανισμός δράσης των παραγώγων αυτών του κασσιτέρου δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί. Πιστεύεται ότι αναστέλλουν τη δράση της α-κετο-οξειδάσης, αποτέλεσμα της οποίας είναι η αυξημένη συγκέντρωση πυροσταφυλικού οξέος (Κουτσελίνης, 1997). Γνωστό είναι ακόμα ότι η χορήγηση διμερκαπρόλης προλαμβάνει αυτές τις βιοχημικές αλλοιώσεις, αλλά όχι όμως και τις βλάβες από τις χοληφόρες οδούς.

Τα τριακυλο-παράγωγα του κασσιτέρου ($R_3\text{SnX}$) διαφέρουν από τα διαλυτοπαραγωγα. Προκαλούν κυρίως βλάβη του εγκεφάλου και σε μικρότερο βαθμό βλάβη του ήπατος και των χοληφόρων οδών (Winship KA, 1988). Αποτέλεσμα, οπωσδήποτε, της επί του νευρικού συστήματος δράσης τους είναι η εγκατάσταση προοδευτικής καταβολής των δυνάμεων και παράλυσης ή σπασμών, συμπτώματα τα οποία παρατηρούνται και μετά από πειραματική χορήγηση των παραγώγων αυτών σε κονίκλους. Στους επίμυες, η χορήγηση των παραγώγων αυτών είναι εξίσου τοξική, τόσο κατά την από τους στόματος, όσο και κατά την παρεντερική χορήγηση, δόσεις δε 10-20ppm χορηγούμενες χρονίως είναι ικανές να προκαλέσουν τα ανωτέρω συμπτώματα (Κουτσελίνης, 1997).

Όσον αφορά τη δράση τους επί του κεντρικού νευρικού συστήματος, ο τριαιθυλοκασιτέρος είναι μια νευροτοξίνη η οποία δρα κυρίως στους νευρώνες του μεταιχμιακού συστήματος και ιδίως στους νευρώνες του ιπποκάμπου. Ο τριαιθυλοκασιτέρος είναι επίσης μια νευροτοξίνη η οποία προκαλεί την εμφάνιση οίδηματος στον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό (Aschner M, 1992). Το οίδημα εμφανίζεται κυρίως στο διάμεσο μεσοκυττάριο ιστό της λευκής ουσίας και η βλάβη δεν είναι μόνιμη αλλά παροδική.

Ως προς το μηχανισμό δράσης, τα τριαλκυλο-παράγωγα του κασιτέρου θεωρούνται δραστικοί αναστολείς της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και της υδρόλυσης του ATP ($10^{-7}M$), αν και ο πλήρης μηχανισμός δράσης δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Πιθανότατα τα σύμπλοκα αυτά δρουν στο F_0 τμήμα της ATP συνθετάσης των μιτοχονδρίων (Matsuno-Yagi A , 1993). Η διμερκαπρόλη δεν επιδρά στα παραπάνω παράγωγα.

Τα τετραλκυλο-παράγωγα του κασιτέρου (R_4Sn) εμφανίζουν την ίδια τοξική δράση με τα τριαλκυλο-παράγωγα, γεγονός το οποίο ερμηνεύεται από το ότι τα τετραλκυλο-παράγωγα αποικοδομούνται στο ήπαρ σε τριαλκυλο-παράγωγα μέσω ενζυμικής δραστηριότητας.

Όλες οι οργανικές ενώσεις του κασιτέρου ασκούν ερεθιστική δράση στο δέρμα, στους οφθαλμούς, στο λάρυγγα και στους βλεννογόνους (Winship KA., 1988). Έτσι, σε επαφή με το δέρμα, όλα τα παράγωγα και κυρίως τα τριβουτυλο- και διβουτυλο-παράγωγα του κασιτέρου ασκούν ερεθιστική δράση μέχρι έντονη καυστική, προκαλώντας σοβαρά χημικά εγκαύματα.

Στους οφθαλμούς προκαλούν δακρύρροια, επιπεφυκίτιδα και οίδημα των επιπεφυκώτων. Τα τριαλκυλο-παράγωγα προκαλούν υπεργλυκαιμία η οποία πιθανόν να οφείλεται στη δράση των ενώσεων αυτών στο ΚΝΣ, δράση η οποία καταλήγει στην έκλυση κατεχολαμινών από τα επινεφρίδια (Mailman RB, 1987). Τέλος, όλα τα οργανικά παράγωγα του κασιτέρου ασκούν σε κάποιο βαθμό ανοσοκασταλτική δράση (Boyer II., 1989).

Η τιμή TLV-TWA για τις οργανικές ενώσεις του κασιτέρου (εκφρασμένες σε Sn) έχει υπολογιστεί σε $0,1mg/m^3$.

Επομένως, η εμφανιζόμενη συμπτωματολογία εξαρτάται από το είδος της χρησιμοποιούμενης οργανικής ένωσης του κασιτέρου. Στην περίπτωση των δηλητηριάσεων με διαλκυλο-παράγωγα προεξάρχουν τα συμπτώματα από το ήπαρ και τις χοληφόρες οδούς, ενώ στην περίπτωση των τριαλκυλο- και τετραλκυλο-παραγώγων τα συμπτώματα από το ΚΝΣ τα οποία περιλαμβάνουν κεφαλαλγία, ίλιγγο, φωτοφοβία, διαταραχές της όρασης, κοιλιακό άλγος και έμετο, κατακράτηση των ούρων, παράλυση και ψυχικές διαταραχές (Κουτσελίνης, 1997). Είναι επίσης

δυνατό να προκληθούν και μόνιμες βλάβες όπως μείωση της οπτικής οξύτητας, εστιακή αναισθησία, χαλαρή παράλυση, ακράτεια, εγκεφαλικό οίδημα.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη των μηχανισμών δράσης συμπλόκων μετάλλων με κυτταροτοξική δράση. Από τα πολυάριθμα οργανομεταλλικά σύμπλοκα που εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση επιλέχθηκε μια σειρά συμπλόκων του κασσιτέρου (IV) τα οποία συντέθηκαν, χαρακτηρίστηκαν και δοκιμάστηκαν ως προς την κυτταροτοξική τους δράση σε προηγούμενες μελέτες. Τα σύμπλοκα αυτά φαίνεται να εμφανίζουν σημαντική κυτταροτοξικότητα, αρκετά υψηλότερη από εκείνη της σιπλατίνης.

Για τα εν λόγω σύμπλοκα θα επιχειρηθεί να απαντηθούν τα εξής ερωτήματα : α) ποιος είναι ο μηχανισμός του θανάτου σε κυτταρικό επίπεδο, β) ποιες τοξικές βλάβες προκαλεί το δραστικότερο από αυτά σε επίπεδο οργανισμού και γ) αν το πιο δραστικό από αυτά εμφανίζει αντικαρκινική δράση in vivo.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά – αντιδραστήρια :

3.1.1 Υλικά και αντιδραστήρια

Τα υλικά και τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής αναφέρονται παρακάτω.

- Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM), PAA
- Trypsin-EDTA, 0,05%/0,02%, PAA
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Riedel-de-Haen
- Phosphate buffer saline (PBS), Sigma
- Fetal bovine serum (FBS), PAA
- Hank's balanced salt solution, Sigma
- Triazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), Sigma
- Annexin V FITC, BD Pharmingen
- Propidium iodide, Sigma
- Penicillin – streptomycin, PAA
- L-glutamine, PAA
- Ketamine, Imalgene
- Midazolame (Dormicum), Roche
- Σύριγγες 1ml, 25G, BD
- Χειρουργικά ράμματα 7-0 mersilk, 45cm, Johnson & Johnson

3.1.2 Σύμπλοκα του κασσιτέρου :

Τα σύμπλοκα του κασσιτέρου που χρησιμοποιήθηκαν για την εν λόγω διδακτορική διατριβή συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν σε προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες και είναι τα εξής :

- Τριφαινυλο-ορθο-υδροξυβενζοϊκός κασσίτερος (IV)
- Τριφαινυλο-παρα-υδροξυβενζοϊκός κασσίτερος (IV)
- Τρι-η-βούτυλο-όρθο-υδροξυβενζοϊκός κασσίτερος (IV)
- Τρι-η-βούτυλο-παρα-υδροξυ-βενζοϊκός κασσίτερος (IV)
- Δι-η-βούτυλο-δι-ορθο-υδροξυ βενζοϊκός κασσίτερος (IV)

3.2 In vitro πειράματα:

3.2.1 Κυτταρικές σειρές :

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν οι ακόλουθες :

- Κύτταρα LMS : λειομυοσαρκωματικά κύτταρα επίμυος wistar
- Κύτταρα MCF-7 : κύτταρα αδenoκαρκινώματος μαστού
- Κύτταρα HeLa : κύτταρα καρκινώματος τραχήλου
- Κύτταρα U2Os : κύτταρα οστεοσαρκώματος
- Κύτταρα MRC-5 : κύτταρα εμβρυϊκών ινοβλαστών πνεύμονα

Τα παραπάνω κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοοειδούς (Fetal Bovine Serum) (FBS), 100 IU/ml πενικιλίνη, 100 μg/ml στρεπτομυκίνη και 1.4 mM L-γλουταμίνη. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε επωαστή στους 37°C με 5% CO₂.

3.2.2 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Η ανακαλλιέργεια των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε σε εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νηματικής ροής (Tissue culture hood). Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία των 90 mm, ενώ τα κύτταρα αφήνονταν να δημιουργήσουν πλήρεις καλλιέργειες πριν από κάθε ανακαλλιέργεια. Για την ανακαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του θρεπτικού υλικού, πλύση με PBS και ακολούθως προσθήκη 1ml θρυψίνης. Στη συνέχεια τα τρυβλία αφέθηκαν για 5 λεπτά ούτως ώστε να δράσει η θρυψίνη. Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με μηχανική βοήθεια, προστέθηκαν 10ml DMEM και ακολούθησε ανάδευση. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε ο κατάλληλος όγκος του εναιωρήματος κυττάρων σε τρυβλία των 90mm. Τέλος, σε κάθε τρυβλίο προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα DMEM, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 10ml.

3.2.3 Διατήρηση των κυττάρων - Πάγωμα / Ξεπάγωμα

Για τη διατήρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε φύλαξή τους σε βαθιά κατάψυξη. Η ψύξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε ως εξής : πραγματοποιήθηκε αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού, πλύση με PBS και προσθήκη 1ml θρυψίνης. Στη συνέχεια τα κύτταρα αφέθηκαν για 5min ούτως ώστε να δράσει η θρυψίνη και ακολούθησε επαναιώρηση των κυττάρων σε 10ml PBS. Ακολούθως, το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon και φυγοκεντρήθηκε για 5min στις 3500rpm. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος, το κυτταρικό ίζημα επαναιώρηθηκε στο διάλυμα συντήρησης που αποτελείται από 10% DMSO και 90% FBS. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε ειδικές αμπούλες (cryovials) του 1ml και τα κύτταρα ψύχθηκαν με ρυθμό 1° C/min μέχρι του -30° C. Τέλος, οι αμπούλες βυθίστηκαν σε υγρό άζωτο.

Για την απόψυξη των κυττάρων, οι αμπούλες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37° C και μεταφέρθηκαν ταχύτατα σε φρέσκο καλλιεργητικό μέσο.

3.2.4 Σπορά κυττάρων σε πολυτρυβλία

Στις πειραματικές μεθόδους που ακολουθούν η σπορά των κυττάρων, όλων των κυτταρικών σειρών, πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία 6x, 24x και 96x (όπου x είναι τα φρεάτια του κάθε πολυτρυβλίου). Η σπορά των κυττάρων πραγματοποιήθηκε ως εξής :

Πραγματοποιήθηκε αναρρόφηση του καλλιεργητικού μέσου, πλύση με PBS και προσθήκη 1ml θρυψίνη σε κάθε τρυβλίο. Στη συνέχεια τα κύτταρα αφέθηκαν 5 min ούτως ώστε να δράσει η θρυψίνη και επαναιωρήθηκαν με προσθήκη 10ml DMEM και συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετήθηκε σε falcon και πραγματοποιήθηκε μέτρηση των κυττάρων του εναιωρήματος με πλάκες NewBauer. Ανάλογα με την εκάστοτε κυτταρική σειρά τοποθετήθηκε συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων σε κάθε τρυβλίο. Τέλος, προστέθηκε ο κατάλληλος όγκος DMEM και τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν στο επωαστή για 24h. Μετά την πάροδο 24 ωρών πραγματοποιήθηκε η προσθήκη των συμπλόκων.

3.2.5 Υπολογισμός αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη χρήση MTT

Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι ένας δείκτης της κυτταροτοξικότητας των μεταλλικών συμπλόκων. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι η εξής :

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σπορά 3.000 κυττάρων LMS, MCF-7, U2Os και HeLa και 5.000 κυττάρων MRC-5, σε πολυτρυβλία 96x και προστέθηκε DMEM έτσι ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε φρεάτιο να είναι 200 μl. Τα πολυτρυβλία αφέθηκαν στον επωαστή 37° C, 5% CO₂ για 24 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκαν τα σύμπλοκα σε διάφορες συγκεντρώσεις. Σε ορισμένα από τα φρεάτια δεν προστέθηκε κανένα σύμπλοκο και χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Μετά το πέρας 24, 48 και 72 ωρών προστέθηκαν 50μl MTT σε κάθε φρεάτιο και τα πολυτρυβλία επώαστηκαν για 3h. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε αναρρόφηση του υπερκείμενου διαλύματος και προσθήκη 200ml DMSO. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάδευση με τη βοήθεια πολυπιπέτας ούτως ώστε να διαλυθεί το ίζημα στο DMSO και τα πολυτρυβλία φωτομετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 540nm. Η αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων εκφράστηκε σε ποσοστό επί τοις εκατό σε σχέση με τα φρεάτια ελέγχου. Με τα πειράματα αυτά προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της ουσίας στην οποία πραγματοποιήθηκε θάνατος των κυττάρων σε ποσοστό 50% (IC50). Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν εις τριπλούν.

3.2.6 Δημιουργία αποικιών – μέτρηση

Για τον προσδιορισμό της ικανότητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων μετά την επίδραση των συμπλόκων σε αυτά πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ικανότητάς τους να σχηματίζουν αποικίες. Το παραπάνω πείραμα πραγματοποιήθηκε ως εξής :

Αρχικά πραγματοποιήθηκε σπορά των κυττάρων LMS, MCF-7, HeLa και U2Os σε πολυτρυβλία 24x και τα κύτταρα αφέθηκαν στον επωαστή για 24h. Μετά την

πάροδο των 24h, προστέθηκαν τα σύμπλοκα σε διάφορες συγκεντρώσεις και αφέθηκαν για άλλες 48h στον επωαστή.

Τα σύμπλοκα προστέθηκαν στις εξής συγκεντρώσεις :

Σύμπλοκο	Συγκέντρωση συμπλόκου στο τελικό δ/μα
1	20, 40, 60, 100 nM
2	20, 40, 60, 100 nM
3	100, 150, 200, 300 nM
4	20, 40, 60, 100 nM
5	100, 150, 200, 300 nM

Σε ορισμένα από τα φρεάτια δεν πραγματοποιήθηκε προσθήκη συμπλόκων ούτως ώστε να χρησιμοποιηθούν ως ομάδα ελέγχου. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του θρεπτικού υλικού με αναρρόφηση και προσθήκη 0,25ml θρυψίνης. Τα κύτταρα αφέθηκαν για 5min ούτως ώστε να δράσει η θρυψίνη και επαναιωρήθηκαν με προσθήκη 0,75ml DMEM και συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετήθηκε σε falcon και πραγματοποιήθηκε μέτρηση των κυττάρων του εναιωρήματος με πλάκες NewBauer. Με τη διαδικασία αυτή υπολογίστηκε ο συνολικός αριθμός κυττάρων σε κάθε φρεάτιο και υπολογίστηκε η ποσότητα εναιωρήματος που θα πρέπει να ληφθεί για την σπορά σε τρυβλία 6x. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 3 ημέρες και πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού υλικού. Μετά από συνολική επώαση 7 ημερών, αναρροφήθηκε το θρεπτικό υλικό, πραγματοποιήθηκε πλύση με PBS και προστέθηκαν 10ml μείγματος μεθαλόλης/οξικού οξέος σε αναλογία 3:1. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε καταψύκτη στους -20° C για 10min για να μονιμοποιηθούν. Ακολούθησε αφαίρεση του διαλύματος και ξήρανση των τρυβλίων σε απαγωγό. Μετά την παραπάνω διαδικασία, προστέθηκαν 10ml χρωστικής Giemsa/H₂O σε αναλογία 1:10 και τα τρυβλία αφέθηκαν για 10min ώστε να πραγματοποιηθεί η χρώση των κυττάρων. Μετά την πάροδο του παραπάνω χρονικού διαστήματος, τα τρυβλία πλύθηκαν και αφέθηκαν να στεγνώσουν. Οι εμφανείς βαμμένες αποικίες καταμετρήθηκαν και υπολογίστηκε σε ποσοστό επί τοις εκατό ο αριθμός των αποικιών που δημιουργήθηκαν από τα κύτταρα που είχαν εκτεθεί στα σύμπλοκα σε σχέση με τις αποικίες που δημιουργήθηκαν από τα κύτταρα των ομάδων ελέγχου.

3.2.7 Προσδιορισμός απόπτωσης - νέκρωσης με κυτταρομετρία ροής

Για τον προσδιορισμό του μηχανισμού με τον οποίο προκαλείται ο κυτταρικός θάνατος των καρκινικών κυττάρων μετά την επίδραση των συμπλόκων πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής με την ακόλουθη διαδικασία :

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σπορά 60.000 κυττάρων, LMS σε πολυτρυβλίο 6x και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες και ακολούθως προστέθηκαν τα σύμπλοκα στις επιθυμητές συγκεντρώσεις.

Πίνακας 3.1 : τα σύμπλοκα που χρησιμοποιήθηκαν και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις για τον προσδιορισμό της απόπτωσης και της νέκρωσης με κυτταρομετρία ροής

Σύμπλοκο	Συγκέντρωση συμπλόκου στο τελικό δ/μα
5-o	50nM, 150nM
5-p	50nM, 100nM
6-p	50nM, 100nM
3-o	200nM, 400nM

Σε ορισμένα από τα φρεάτια δεν προστέθηκε σύμπλοκο ούτως ώστε να χρησιμοποιηθούν ως ομάδα ελέγχου. Μετά την πάροδο 48h, συλλέχθηκε το θρεπτικό υλικό από το κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου σε σωλήνες falcon των 15 ml, πραγματοποιήθηκε πλύση με 3 ml PBS και συλλογή των εκπλυμάτων στα αντίστοιχα falcon. Ακολούθως, προστέθηκαν 0.3 ml θρυψίνης σε κάθε φρεάτιο και τα πολυτρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για περίπου 5 λεπτά έως ότου αποκολληθούν τα κύτταρα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν επιπλέον 3 ml PBS και τα κύτταρα αναδεύτηκαν ήπια με τη χρήση πιπέτας. Αφού αποκολλήθηκαν πλήρως τα κύτταρα, το εναιώρημα συλλέχθηκε στα αντίστοιχα falcon. Ακολούθησε μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων σε κάθε falcon με πλάκες NewBauer, τα falcon φυγοκεντροήθηκαν στις 3.500 rpm για 10min και το υπερκείμενο διάλυμα απορρίφθηκε. Τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρήθηκαν σε 1 ml διαλύματος Calcium Buffer 1x και με τους κατάλληλους υπολογισμούς λήφθηκαν και τοποθετήθηκαν σε erpendorf 100.000 κύτταρα σε 100μL Calcium Buffer 1x. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο όπου σε κάθε erpendorf προστέθηκαν 5 μl Annexin και 4 μl Propidium Iodide. Όλα τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Μετά το πέρας των 15 λεπτών, προστέθηκε επιπλέον 1 ml Calcium Buffer 1x (τελικός όγκος 1.1 ml) και τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε κυτταρόμετρο ροής (CyFlow ML, Partec, Munster, Germany) όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση και προσδιορισμός % του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται σε αποπτωτική ή νεκρωτική φάση.

3.2.8 Προσδιορισμός κατακερματισμού του DNA – Ηλεκτροφόρηση του DNA

Πραγματοποιήθηκε σπορά 160.000 κυττάρων σε τρυβλία 90 mm. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 48 ώρες σε επωαστικό θάλαμο σε σταθερές συνθήκες (37° C, 5% CO₂, 95% O₂). Με την πάροδο 48 ωρών πραγματοποιήθηκε η προσθήκη των συμπλόκων στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Ακολούθησε νέα επώαση 48 ωρών σε επωαστικό θάλαμο. Μετά το 48ωρο, το θρεπτικό υλικό από τα τρυβλία συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε στους αντίστοιχους σωλήνες falcon των 15ml. Πραγματοποιήθηκε διπλή πλύση με PBS-EDTA (5 ml η καθεμία), το οποίο συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε στα αντίστοιχα falcon. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2 ml PBS-EDTA στα τρυβλία ενώ ακολούθησε φυγοκέντρηση των falcon στις 2000 rpm για 5 λεπτά. Όλες οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν στον ψυκτικό θάλαμο στους 4° C. Μετά τις

φυγοκεντρήσεις το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Με ένα κομμάτι σιλικόνης αποκολλήθηκαν τα κύτταρα που βρίσκονταν στον πυθμένα των τρυβλίων και μεταφέρθηκαν στα αντίστοιχα falcon. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες (2000 rpm για 5 λεπτά) και απόρριψη του υπερκειμένου. Προστέθηκε 1 ml PBS/EDTA σε κάθε falcon και με ήπια ανάδευση με την πιπέττα αποκολλήθηκε το ίζημα και μεταφέρθηκε στα αντίστοιχα erpendorfs. Τα erpendorfs φυγοκεντρήθηκαν στις 6000 rpm για 5 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίφθηκε ξανά. Προστέθηκαν 100 µl DNA Lysis Buffer σε κάθε erpendorf και ανακινήθηκαν απαλά με το δάχτυλο (tapping) για να επιτευχθεί λύση και ομογενοποίηση των κυττάρων. Μετά από επώαση 10 λεπτών στον πάγο, τα erpendorfs φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 rpm για 30 λεπτά, μέσα στον ψυκτικό θάλαμο στους 4° C. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα erpendorfs όπου και προστέθηκαν 2 µl RNAse A σε καθένα από αυτά. Ακολούθησε επώαση στους 37° C σε υδατόλουτρο για περίπου 2 ώρες. Έπειτα προστέθηκαν 2.5 µl Proteinase K σε κάθε erpendorf και τα δείγματα επώαστηκαν ξανά στους 37°C σε υδατόλουτρο για περίπου 2 ώρες. Τέλος, προστέθηκαν 20 µl 5M NaCl και 120 µl Isopropanol και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -20° C για ολόκληρη τη νύχτα (overnight). Την επόμενη μέρα, αφού ξεπάγωσαν τα δείγματα, φυγοκεντρήθηκαν στους 4° C, στις 13000 rpm για 30 λεπτά. Με το τέλος της φυγοκέντρησης, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και τα erpendorfs αφέθηκαν ανάποδα για να στεγνώσουν, πάνω σε απορροφητικό χαρτί. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 20 µl 1xTE pH 7.4 και τα δείγματα επώαστηκαν για 3 ώρες στους 37°C, ενώ πραγματοποιούταν ανάδευση με το δάχτυλο κάθε 20 λεπτά. Τα δείγματα έπειτα μπορούν να διατηρηθούν στους -20° C για μέρες. Για την παρασκευή του gel ηλεκτροφόρησης διαλύθηκαν 0,84 γραμμάρια αγαρόζης σε 70 ml διαλύματος TBE 0.5x (1.2%). Το διάλυμα ζεστάθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για την πλήρη διαλυτοποίηση της αγαρόζης. Το ζεστό διάλυμα της αγαρόζης αφέθηκε να κρυώσει, προστέθηκαν 2.7 µl Ethidium Bromide και τοποθετήθηκε στην ειδική φόρμα με χτενάκι ώστε να σχηματιστούν τα φρεάτια στα οποία θα τοποθετηθούν τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση. Το διάλυμα αγαρόζης αφέθηκε να κρυώσει ώστε να σχηματιστεί το πήγμα αγαρόζης. Παράλληλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για να πραγματοποιηθεί η σταδιακή απόψυξή τους. Προστέθηκαν 2 µl Loading Buffer σε όλα τα erpendorf και φυγοκεντρήθηκαν για να συλλέξουμε πλήρως όλο το δείγμα. Όταν σχηματίστηκε πλήρως η πηκτή αγαρόζης, μεταφέρθηκε στην αντίστοιχη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τα δείγματα (20 µl το καθένα) φορτώθηκαν με τη βοήθεια της 20άρας πιπέττας στα αντίστοιχα φρεάτια. Στη συσκευή προστέθηκαν 430 ml διαλύματος TBE 0,5x και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση (40V για 10 λεπτά και 60V για 1.5 ώρες). Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης φωτογραφήθηκε το πήγμα αγαρόζης με κάμερα UV.

3.3. In vivo πειράματα

Για τα in vivo πειράματα επιλέχθηκε το σύμπλοκο που εμφάνισε καλύτερη συμπεριφορά στα πειράματα in vitro, αλλά και την καλύτερη σταθερότητα και μεγαλύτερη ευκολία στη σύνθεσή του. Το σύμπλοκο αυτό είναι ο τρι-φαινυλο-ορθο-υδροξυβενζοϊκός κασσίτερος (IV).

3.3.1 Τοξικότητα σε επίμυες Wistar

3.3.1.1 Οξεία τοξικότητα

Για τα πειράματα οξείας τοξικότητας χρησιμοποιήθηκαν 40 θηλυκοί επίμυες Wistar, ηλικίας 3-4 μηνών και βάρους 242,5±13,2gr. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 4 επιμέρους ομάδες.

Πίνακας 3.2 : ομάδες πειραματόζωων, αριθμός πειραματοζώων ανά ομάδα και ποσότητα συμπλόκου που χορηγήθηκε σε κάθε ομάδα κατά τη μελέτη της οξείας τοξικότητας του συμπλόκου 1

Ομάδα	Αριθμός πειραματόζωων	Ποσότητα συμπλόκου
A	10	1mg/kg
B	10	10mg/kg
Γ	10	100mg/kg
Δ	10	0mg/kg

Τα πειραματόζωα δεν τράφηκαν για 4-5 ώρες πριν την πειραματική διαδικασία. Η παραπάνω αναγραφόμενη ποσότητα συμπλόκου χορηγήθηκε εφάπαξ ενδοπεριτοναϊκώς διαλυμένη σε 1ml διαλύματος PBS/DMSO σε αναλογία 7:1. Στα πειραματόζωα της ομάδας Δ χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκώς 1ml διαλύματος PBS/DMSO και χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα αναφοράς.

Μισή ώρα μετά τη χορήγηση του συμπλόκου τα ζώα αφέθηκαν ελεύθερα για να τραφούν σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας και με περιοδικό φωτισμό. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος των πειραματοζώων δις ημερησίως και έλεγχος του σωματικού τους βάρους κάθε 48h. Επίσης, ορισμένα από τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν σε μεταβολικούς κλωβούς για τη μέτρηση της πρόσληψης τροφής και ύδατος και της αποβολής ούρων και κοπράνων.

Η ποσοστιαία αλλαγή του ΣΒ υπολογίστηκε ως η ΔΣΒ% και η οποία δίνεται από τον εξής τύπο:

$$\Delta\Sigma B\% = [(Μέσο \Sigma B \text{ της ημέρας } \Pi - Μέσο \Sigma B \text{ ημέρας } 0) / (Μέσο \Sigma B \text{ ημέρας } 0)] * 100$$

Όπου Π= ημέρα πειράματος

Όσα από τα πειραματόζωα δεν κατέληξαν θυσιάστηκαν την 15^η ημέρα του πειράματος με αιθέρα. Τα εσωτερικά όργανα αφαιρέθηκαν en block και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία που περιείχαν φορμαλδεΰδη 5%. Ακολούθησε παθολογοανατομικός έλεγχος με χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης.

3.3.1.2 Υποξεία τοξικότητα

Για να μελετήσουμε την υποξεία τοξικότητα του συμπλόκου χρησιμοποιήθηκαν 30 επίμυες Wistar 3-4 μηνών και 242,5±13,2gr. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες (A, B και Γ).

Πίνακας 3.3 : ομάδες πειραματόζων, αριθμός πειραματόζων ανά ομάδα και ποσότητα συμπλόκου που χορηγήθηκε σε κάθε ομάδα κατά τη μελέτη της υποξείας τοξικότητας του συμπλόκου 1

Ομάδα	Αριθμός πειραματόζων	Ποσότητα συμπλόκου
A	10	0,5mg/kg/day
B	10	1mg/kg/day
Γ	10	0mg/kg/day

Η παραπάνω αναγραφόμενη ποσότητα συμπλόκου χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκώς διαλυμένη σε 0,5ml διαλύματος PBS/DMSO σε αναλογία 7:1. Στα πειραματόζωα της ομάδας Γ χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκώς 0,5ml διαλύματος PBS/DMSO και χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα αναφοράς.

Τα ζώα αφέθηκαν ελεύθερα για να τραφούν σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας και με περιοδικό φωτισμό. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος των πειραματόζων δις ημερησίως και έλεγχος του σωματικού τους βάρους κάθε 48h. Επίσης, ορισμένα από τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν σε μεταβολικούς κλωβούς για τη μέτρηση της πρόσληψης τροφής και ύδατος και της αποβολής ούρων και κοπράνων.

Τα ζώα θυσιάστηκαν μετά την πάροδο 30 ημερών με αιθέρα. Τα εσωτερικά όργανα αφαιρέθηκαν en block και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία που περιείχαν φορμαλδεΰδη 5%. Ακολούθησε παθολογοανατομικός έλεγχος με χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης.

3.3.2 Ενοφθαλμισμός καρκινικών κυττάρων σε επίμυες Wistar – έλεγχος της αντικαρκινικής δράσης του συμπλόκου

Για τον έλεγχο της αντικαρκινικής δράσης του συμπλόκου πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός καρκινικών κυττάρων LMS σε επίμυες Wistar. Χρησιμοποιήθηκαν 30 επίμυες wistar ηλικίας 3-4 μηνών. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής :

Τα καρκινικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν όπως αναφέρεται παραπάνω μέχρι να σχηματιστούν πλήρεις καλλιέργειες. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό, προστέθηκε 1ml θρυψίνης και τα κύτταρα αφέθηκαν για 5min ούτως ώστε να δράσει η θρυψίνη. Ακολούθησε αναιώρηση των κυττάρων σε DMEM και τοποθέτησή του σε falcon. Τα κύτταρα μετρήθηκαν με τη βοήθεια πλάκας NewBauer και υπολογίστηκε ο ακριβής αριθμός τους. Στη συνέχεια τα falcon φυγοκεντρήθηκαν, αναρροφήθηκε το υπερκείμενο διάλυμα και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε Hank's balanced solution ούτως ώστε να προκύψει διάλυμα το οποίο περιέχει 3×10^6 κύτταρα/ml διαλύματος. Το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένη σύριγγα των 5ml.

Τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με 0,5ml διαλύματος κεταμίνης – ιμιδαζόλης – φυσιολογικού ορού σε αναλογία 1:4:5. Μετά την αναισθητοποίηση, τα πειραματόζωα ακινητοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε μικρή τομή στο άνω δεξιό τμήμα της ωμικής ζώνης. Κατόπιν, τραυματίστηκαν ελαφρά οι μύες κάτωθεν της τομής και πραγματοποιήθηκε έγχυση του εναιωρήματος των καρκινικών κυττάρων. Ακολούθησε προσεκτική συρραφή της τομής και τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν

σε περιβάλλον με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασία και με περιοδικό φωτισμό.

Τα ζώα αφέθηκαν ελεύθερα για να τραφούν σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας και με περιοδικό φωτισμό. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος των πειραματόζων δις ημερησίως και έλεγχος του σωματικού τους βάρους κάθε 48h.

Από τους επίμυες που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία, εκείνοι που ανέπτυξαν όγκους χωρίστηκαν τυχαία σε δυο ομάδες (D και C).

Πίνακας 3.4 : ομάδες πειραματόζων, αριθμός πειραματόζων ανά ομάδα και ποσότητα συμπλόκου που χορηγήθηκε σε κάθε ομάδα κατά τη μελέτη της αντικαρκινικής δράσης του συμπλόκου 1

Ομάδα	Αριθμός πειραματόζων	Ποσότητα συμπλόκου
D	14	1mg/kg/day
C	15	0mg/kg/day

Η παραπάνω αναγραφόμενη ποσότητα συμπλόκου χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκώς διαλυμένη σε 0,5ml διαλύματος PBS/DMSO σε αναλογία 7:1. Στα πειραματόζωα της ομάδας C χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκώς 0,5ml διαλύματος PBS/DMSO και χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα αναφοράς.

Τα ζώα αφέθηκαν ελεύθερα για να τραφούν σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας και με περιοδικό φωτισμό. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος των πειραματόζων δις ημερησίως και έλεγχος του σωματικού τους βάρους κάθε 48h. Επίσης, πραγματοποιήθηκε μέτρηση του μεγέθους του όγκου με παχύμετρο κάθε 7 ημέρες.

Μετά το θάνατο των πειραματόζων, τα εσωτερικά όργανα και ο όγκος αφαιρέθηκαν en block και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία που περιείχαν φορμαλδεΐδη 5%. Ακολούθησε παθολογοανατομικός έλεγχος με χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης.

Τέλος, υπολογίστηκε ο μέσος χρόνος ζωής των πειραματόζων στις δυο ομάδες, η παράταση του χρόνου ζωής των επίμυων T/C% (median survival time of treated mice/median survival time of control%), η επί τοις εκατό αναστολή της αύξησης του βάρους του όγκου, TWI% (tumor weight inhibition%), το μέσο βάρος του όγκου (MTW) και ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης του όγκου (MTGR), $TGR (g/d) = \text{Βάρος όγκου (g)} / \text{ημέρες επιβίωσης (d)}$.

3.4 Στατιστική ανάλυση

Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση. Για το προσδιορισμό της στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των ομάδων-πειραματικών διαδικασιών χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test και η ανάλυση two-way analysis of variance (ANOVA) για τη ανίχνευση στατιστικών σημαντικά διαφορών ανάμεσα στις ομάδες στα διαφορετικά χρονικά σημεία. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS 16.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Οι τιμές με $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 In vitro πειράματα :

4.1.1 Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο του MTT:

Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού υπολογίστηκε μετά από επώαση με τα σύμπλοκα 1-5 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις για 24, 48 και 72h για όλες τις κυτταρικές σειρές. Πιο συγκεκριμένα, υπολογίστηκαν οι τιμές IC50 για κάθε ένα από τα σύμπλοκα σε κάθε μία από τις κυτταρικές σειρές.

Όσον αφορά τα κύτταρα LMS, οι τιμές IC50 που προέκυψαν αναφέρονται στον πίνακα.

Πίνακας 4.1: τιμές IC50 μετά από επώαση LMS κυττάρων για 24, 48 και 72h με τα σύμπλοκα 1-5

	Είδος συμπλόκου				
Χρόνος επώασης (h)	1	2	3	4	5
24	164±2,3nM	116±2,5nM	234±1,16nM	215±2,45nM	386±3,58nM
48	30,8±1,6nM	43±1,5nM	738±2,37nM	45±1,76nM	134±2,77nM
72	55±1,3nM	45±2,15nM	924±3,26nM	89±2,32nM	219±1,86nM

Όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα, η βέλτιστη δράση των συμπλόκων 1,2,4 και 5 σε κύτταρα LMS παρατηρείται μετά από επώαση 48h. Αντίθετα, η βέλτιστη δράση του συμπλόκου 3 παρατηρείται μετά από επώαση 24h. Η σειρά δραστηριότητας των συμπλόκων είναι η εξής : 1>2>4>5>3.

Όσον αφορά τα κύτταρα MCF-7, οι τιμές IC50 που προέκυψαν αναφέρονται στον πίνακα.

Πίνακας 4.2: τιμές IC50 μετά από επώαση MCF-7 κυττάρων για 24, 48 και 72h με τα σύμπλοκα 1-5

	Είδος συμπλόκου				
Χρόνος επώασης (h)	1	2	3	4	5
24	294±3,26nM	156±2,1nM	915±5,34nM	393±3,29nM	1138±7,9nM
48	142±4,25nM	108±2,6nM	724±5,37nM	121±3,7nM	325±2,34nM
72	53±1,24nM	20±1,5nM	582±2,76nM	87±2,91nM	280±4,25nM

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, η βέλτιστη δράση των συμπλόκων 1-5 στα κύτταρα MCF-7 παρατηρείται μετά από επώαση 72h. Η σειρά δραστηριότητας των συμπλόκων είναι η εξής : 2>1>4>5>3.

Όσον αφορά τα κύτταρα HeLa, οι τιμές IC50 που προέκυψαν αναφέρονται στον πίνακα.

Πίνακας 4.3: τιμές IC50 μετά από επώαση HeLa κυττάρων για 24, 48 και 72h με τα σύμπλοκα 1-5

Χρόνος επώασης (h)	Είδος συμπλόκου				
	1	2	3	4	5
24	145±3,26nM	64±2,22nM	324±3,45nM	58±1,32nM	156±2,88nM
48	84±3,15nM	37±1,2nM	295±3,76nM	21±1,12nM	120±2,9nM
72	63±1,76nM	32±2,05nM	264±3,12nM	19±0,32nM	175±2,16nM

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, η βέλτιστη δράση των συμπλόκων 1-4 στα κύτταρα HeLa παρατηρείται μετά από επώαση 72h. Αντίθετα, η βέλτιστη δράση του συμπλόκου 5 παρατηρείται μετά από επώαση 48h. Η σειρά δραστηριότητας των συμπλόκων είναι η εξής : 4>2>1>5>3.

Όσον αφορά τα κύτταρα U2Os, οι τιμές IC50 που προέκυψαν αναφέρονται στον πίνακα.

Πίνακας 4.4: τιμές IC50 μετά από επώαση U2Os κυττάρων για 24, 48 και 72h με τα σύμπλοκα 1-5

Χρόνος επώασης (h)	Είδος συμπλόκου				
	1	2	3	4	5
24	187±2,53nM	124±1,5nM	736±4,1nM	323±2,53nM	456±3,28nM
48	130±2,26nM	97±2,1nM	820±5,65nM	258±3,24nM	535±4,6nM
72	94±2,3nM	73±2,45nM	924±3,16nM	196±2,57nM	624±5,82nM

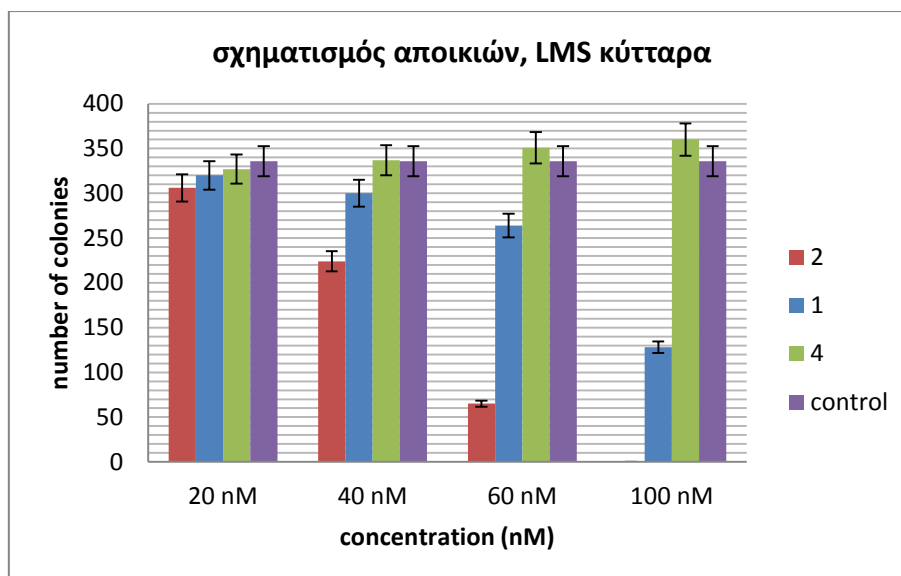
Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, η βέλτιστη δράση των συμπλόκων 1,2 και 4 παρατηρείται μετά από επώαση 72h. Αντίθετα, η βέλτιστη δράση των συμπλόκων 3 και 5 παρατηρείται μετά από επώαση 24h. Η σειρά δραστηριότητας των συμπλόκων είναι η εξής : 2>1>4>5>3.

Όσον αφορά τα κύτταρα MRC-5, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση μετά από επώαση 48h με τα σύμπλοκα 1-5 σε τιμές αντίστοιχες με τις IC50 που προέκυψαν κατά τη μελέτη της δράσης τους στα καρκινικά κύτταρα.

4.1.2 Ικανότητα δημιουργίας αποικιών

Τα σύμπλοκα 1,2,3 και 4 παρουσίασαν σημαντική δραστηριότητα όσον αφορά την αναστολή της ικανότητας σχηματισμού αποικιών σε όλες τις κυτταρικές σειρές και μάλιστα η ικανότητα αυτή ήταν δόσοεξαρτώμενη. Αντίθετα, το σύμπλοκο 5 δεν εμφάνισε τέτοια δράση.

Όσον αφορά τα κύτταρα LMS, ο αριθμός των αποικιών που σχηματίστηκε μετά από επώαση με τα σύμπλοκα 1,2 και 4 φαίνεται στο παρακάτω γράφημα.

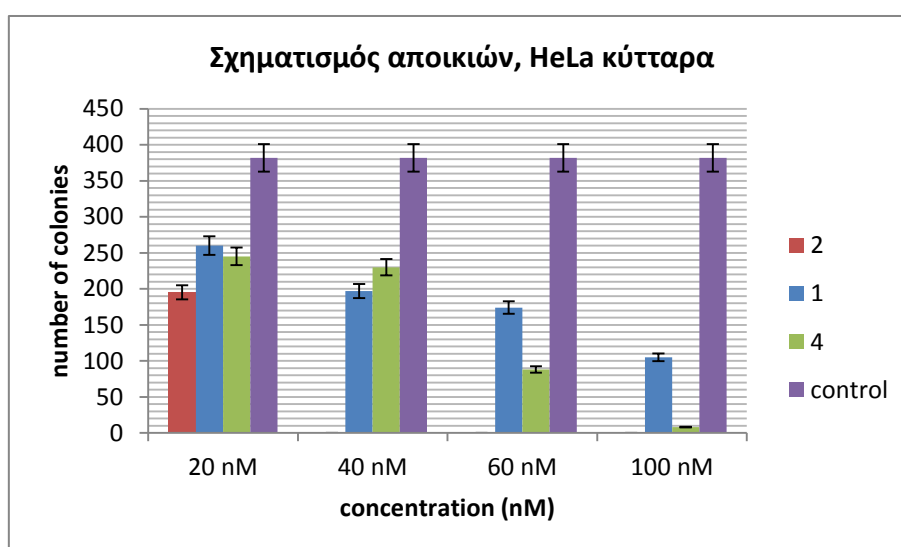


Εικόνα 4.1 : αριθμός αποικιών κυττάρων LMS μετά από επώαση με τα σύμπλοκα 1, 2 και 4 ($p < 0,05$)

Όπως φαίνεται και στο παραπάνω γράφημα, τα σύμπλοκα 1 και 2 εμφανίζουν σημαντική δράση με το σύμπλοκο 2 αν αναστέλλει εντελώς την ικανότητα σχηματισμού αποικιών από τα κύτταρα. Αντίθετα, το σύμπλοκο 4 δεν εμφανίζει καμία επίδραση στα κύτταρα LMS.

Το σύμπλοκο 3 δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού των αποικιών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ακόμη και μετά από επώαση σε συγκέντρωση της τάξης των 300nM του συμπλόκου.

Όσον αφορά τα κύτταρα HeLa, ο αριθμός των αποικιών που σχηματίστηκε μετά από επώαση με τα σύμπλοκα 1,2 και 4 φαίνεται στο παρακάτω γράφημα :



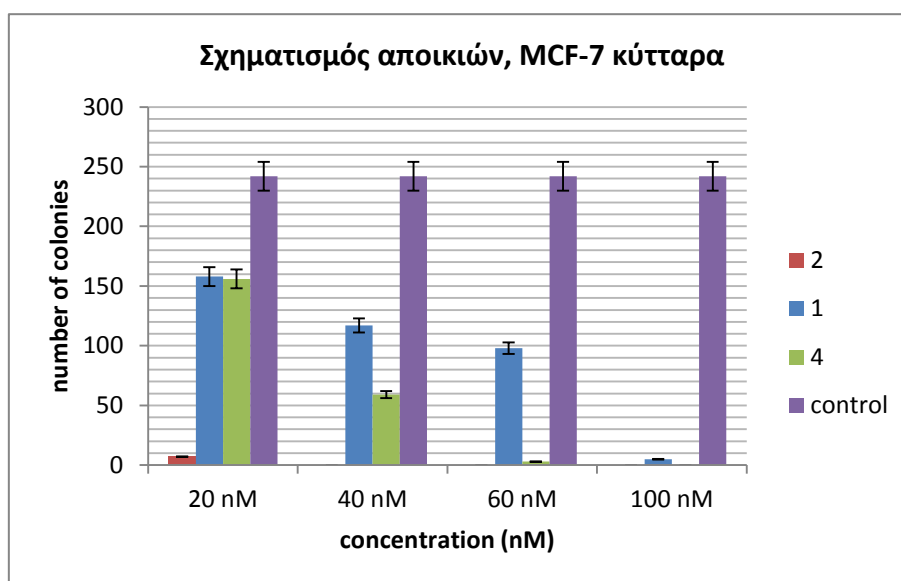
Εικόνα 4.2 : αριθμός αποικιών κυττάρων HeLa μετά από επώαση με τα σύμπλοκα 1, 2 και 4 ($p < 0,05$)

Όπως φαίνεται στο παραπάνω γράφημα, τα σύμπλοκα 1, 2 και 4 εμφανίζουν σημαντική δράση όσον αφορά την ικανότητα σχηματισμού αποικιών και μάλιστα η δράση αυτή είναι δοσοεξαρτώμενη. Η σειρά δραστηριότητας των συμπλόκων είναι η εξής : 2>4>1

Πίνακας 4.5: αριθμός αποικιών κυττάρων HeLa μετά την επίδραση του συμπλόκου 3 και % αριθμός αποικιών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p<0,05$)

C(nM)	αριθμός αποικιών	% αριθμός αποικιών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p<0,05$)
100	285±12	74,5%
150	254±5	66,4%
200	210±4	54,4%
300	93±2	24,4%

Όσον αφορά τα κύτταρα MCF-7, ο αριθμός των αποικιών που σχηματίστηκε μετά από επώαση με τα σύμπλοκα 1,2 και 4 φαίνεται στο παρακάτω γράφημα.

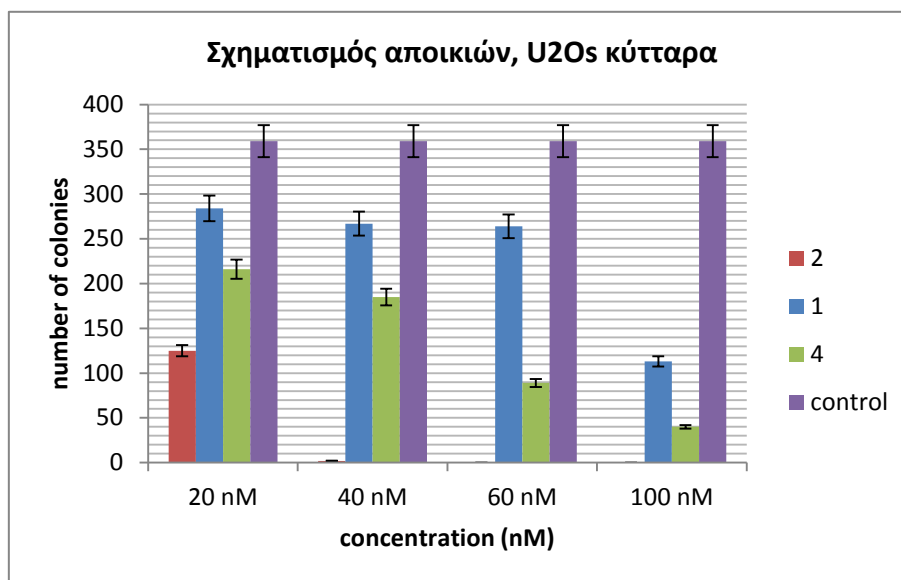


Εικόνα 4.3 : αριθμός αποικιών κυττάρων MCF-7 μετά από επώαση με τα σύμπλοκα 1, 2 και 4 ($p<0,05$)

Όπως φαίνεται και στο παραπάνω γράφημα, τα σύμπλοκα 1, 2 και 4 εμφανίζουν σημαντική δράση όσον αφορά την ικανότητα σχηματισμού αποικιών και μάλιστα η δράση αυτή είναι δοσοεξαρτώμενη. Η σειρά δραστηριότητας των συμπλόκων είναι η εξής : 2>4>1

Το σύμπλοκο 3 εμφάνισε δράση σε συγκεντρώσεις 200 και 300nM προκαλώντας αναστολή του σχηματισμού αποικιών στο 73% και 70% αντίστοιχα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p<0,05$).

Όσον αφορά τα κύτταρα U2Os, ο αριθμός των αποικιών που σχηματίστηκε μετά από επώαση με τα σύμπλοκα 1,2 και 4 φαίνεται στο παρακάτω γράφημα.



Εικόνα 4.4 : αριθμός αποικιών κυττάρων U2Os μετά από επώαση με τα σύμπλοκα 1, 2 και 4 ($p<0,05$)

Όπως φαίνεται και στο παραπάνω γράφημα, τα σύμπλοκα 1, 2 και 4 εμφανίζουν σημαντική δράση όσον αφορά την ικανότητα σχηματισμού αποικιών και μάλιστα η δράση αυτή είναι δοσοεξαρτώμενη. Η σειρά δραστηριότητας των συμπλόκων είναι η εξής : 2>4>1

Το σύμπλοκο 3 εμφάνισε σημαντική μείωση του αριθμού των αποικιών όπως φαίνεται παρακάτω :

Πίνακας 4.6 : αριθμός αποικιών κυττάρων U2Os μετά την επίδραση του συμπλόκου 3 και % αριθμός αποικιών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p<0,05$)

C(nM)	αριθμός αποικιών	% αριθμός αποικιών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p<0,05$)
100	356±21	99,1%
150	264±8	73,5%
200	263±6	73,4%
300	87±3	24,2%

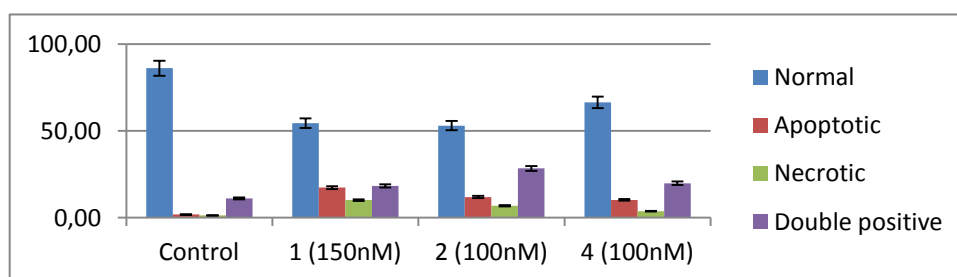
4.1.3 Προσδιορισμός απόπτωσης - νέκρωσης με κυτταρομετρία ροής :

Για να ανευρεθεί ο μηχανισμός με τον οποίο προκαλούν κυτταρικό θάνατο τα σύμπλοκα του κασσιτέρου πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής. Τα σύμπλοκα 1,2,4 και 5 προκαλούν κυτταρικό θάνατο των LMS κυττάρων μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης.

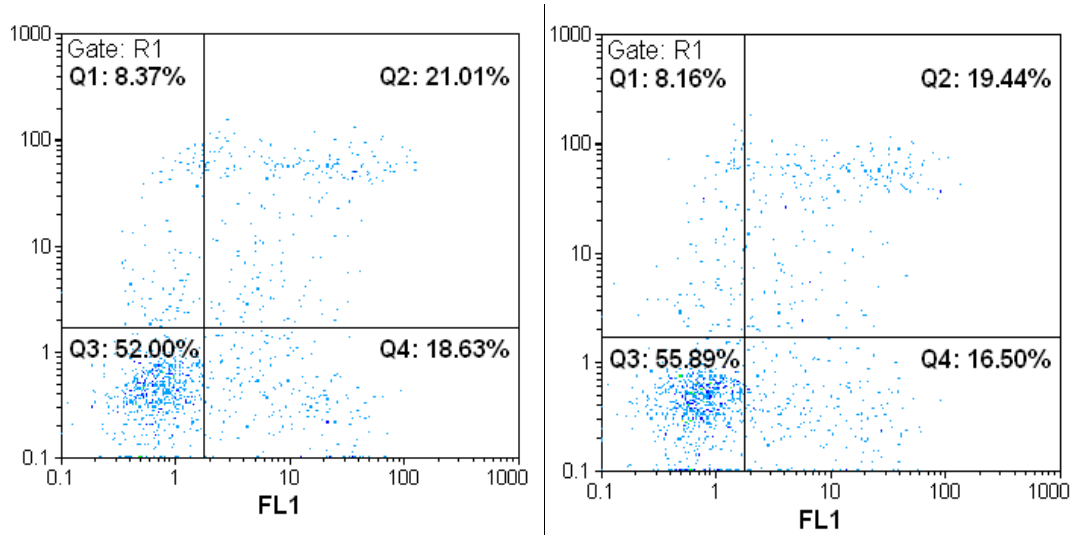
Πίνακας 4.7: ποσοστά απόπτωση και νέκρωσης που προέκυψαν κατά την κυτταρομετρία ροής μετά από την επίδραση των συμπλόκων 1,2,4 και 5 σε LMS κύτταρα και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις

	Normal	Apoptotic	Necrotic	Double positive
Control 1	80,10	1,93	1,09	16,88
Control 2	91,98	1,58	1,36	5,09
Control (MO)	86,04	1,76	1,23	10,99
1 (50nM)	76,83	8,93	1,96	12,27
1 (150nM)	54,38	17,24	10,08	18,30
2 (50nM)	62,82	7,06	1,75	28,38
2 (100nM)	52,97	11,87	6,85	28,31
4 (50nM)	83,30	3,39	1,17	12,14
4 (100nM)	66,42	10,19	3,62	19,77
5 (200nM)	75,82	6,57	2,16	15,45
5 (400nM)	19,11	50,20	2,03	28,66

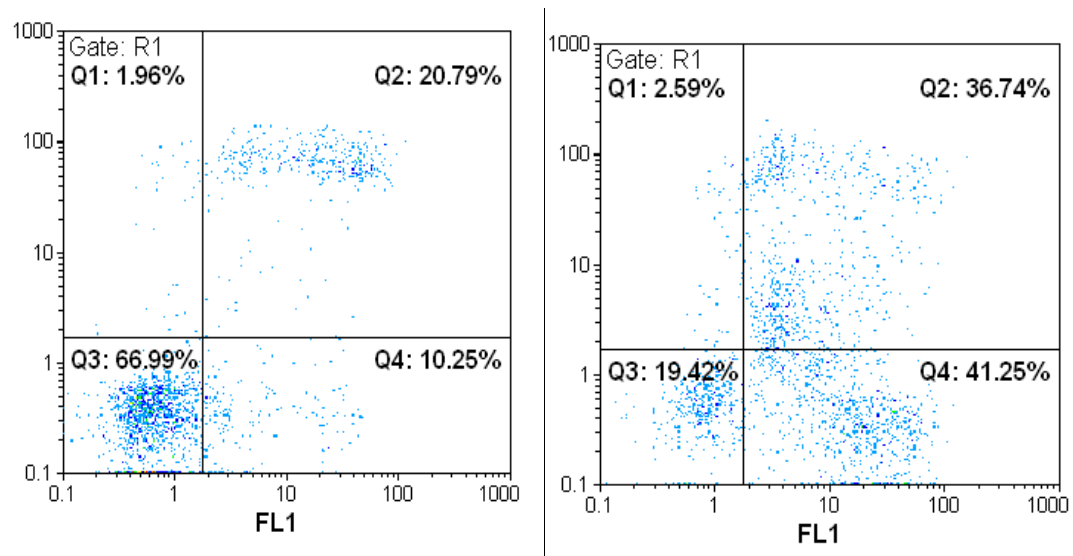
Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι ο κύριος μηχανισμός δράσης και των 4 συμπλόκων είναι η απόπτωση. Επίσης, η δράση όλων των συμπλόκων είναι δοσοεξαρτώμενη, με το μεγαλύτερο ποσοστό απόπτωσης να εμφανίζεται στις μεγαλύτερες από τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις του εκάστοτε συμπλόκου. Η δράση των συμπλόκων 1, 2 και 4 φαίνεται και στο παρακάτω γράφημα.



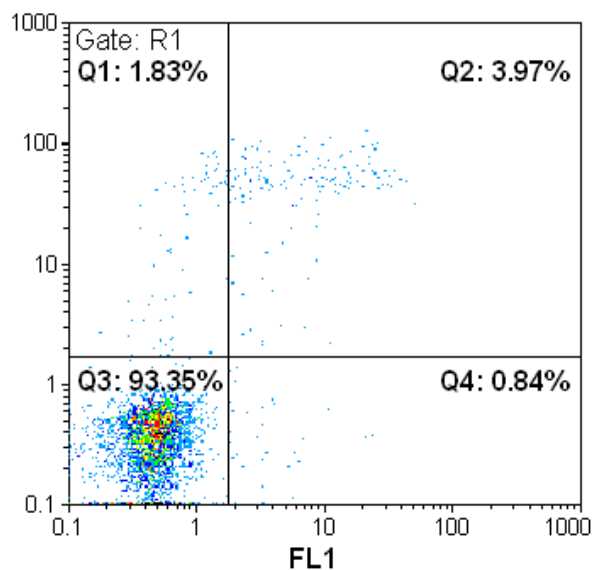
Εικόνα 4.5 : ποσοστό φυσιολογικών κυττάρων και κυττάρων που βρίσκονται σε διαδικασία απόπτωσης ή νέκρωσης μετά από κατεργασία με τα σύμπλοκα 1, 2 και 4 καθώς επίσης και στην ομάδα ελέγχου ($p < 0,05$)



Εικόνα 4.6 : ποσοστά φυσιολογικών κυττάρων και κυττάρων που βρίσκονται σε διαδικασία απόπτωσης και νέκρωσης μετά από κατεργασία με τα σύμπλοκα 1 και 2 σε συγκεντρώσεις 150nM και 100nM αντίστοιχα



Εικόνα 4.7 : ποσοστά φυσιολογικών κυττάρων και κυττάρων που βρίσκονται σε διαδικασία απόπτωσης και νέκρωσης μετά από την κατεργασία με τα σύμπλοκα 4 και 5 σε συγκεντρώσεις 100nM και 400nM αντίστοιχα



Εικόνα 4.8 : ποσοστά φυσιολογικών κυττάρων και κυττάρων που βρίσκονται σε διαδικασία απόπτωσης και νέκρωσης ομάδας ελέγχου

4.1.4 Προσδιορισμός κατακερματισμού του DNA – Ηλεκτροφόρηση DNA

Για να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής, ότι δηλαδή τα σύμπλοκα προκαλούν απόπτωση στις κυτταρικές σειρές και το ποσοστό της οποίας αυξάνεται όσο αυξάνεται και η συγκέντρωση των συμπλόκων, προχωρήσαμε στην ανάλυση του κατακερματισμού του DNA. Η Εικόνα 4.9 αποτελεί μια τυπική ηλεκτροφόρηση DNA. Το πρώτο φρεάτιο συνιστά την ομάδα ελέγχου στο οποίο έχει προστεθεί ποσότητα διαλύτη (DMSO) αντίστοιχη με τα φρεάτια στα οποία έχουν προστεθεί τα σύμπλοκα 1, 2 και 4. Στα 3 τελευταία φρεάτια έχει προστεθεί το σύμπλοκα 1, 2, 4 και 5 σε συγκεντρώσεις 150, 100, 100 και 400 nM αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι υπάρχει εμφανής κατακερματισμός «σπάσιμο» του DNA με την παρουσία μοτίβου σκάλας (τυπικό μοτίβο κατακερματισμένων ή συμπυκνωμένων πυρήνων). Τα δεδομένα αυτά συμπίπτουν με αυτά της κυτταρομετρίας ροής όπου σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις έχουμε αυξημένο ποσοστό απόπτωσης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.



Εικόνα 4.9 : εικόνα κατακερματισμού του DNA ενδεικτική απόπτωσης των κυττάρων

4.2 In vivo πειράματα

4.2.1 Οξεία τοξικότητα

Κατά την μελέτη της οξείας τοξικότητας πραγματοποιήθηκε εφάπαξ χορήγηση του συμπλόκου 1 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις.

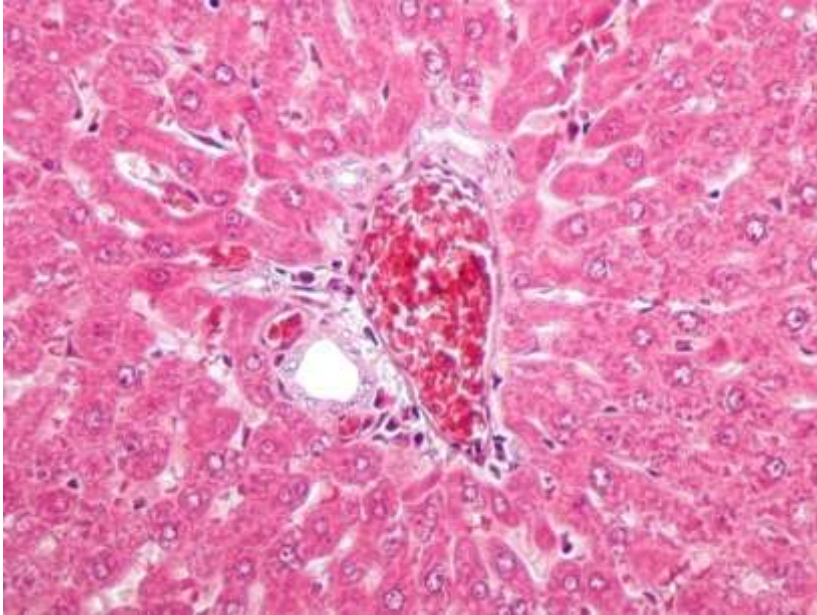
Πίνακας 4.8: ομάδες πειραματόζων, συνολικός αριθμός πειραματόζων ανά ομάδα, αριθμός θανάτων ανά ομάδα και μεταβολή του σωματικού βάρους ($p < 0,05$)

Ομάδα	Συνολικός αριθμός ζώων	Αριθμός θανάτων που προκλήθηκαν	ΔΣΒ%
A	10	0	+1,37±0,32%
B	10	4	-2,4±0,23%
Γ	10	9	-0,1%
Δ	10	0	+2,01±0,09%

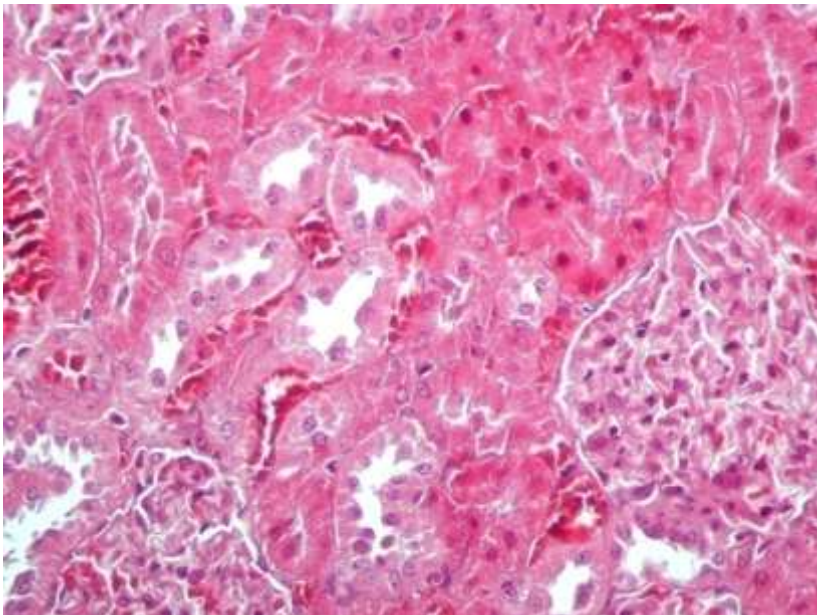
Όπου $\Delta\Sigma\text{B}\% = [(\text{Μέσο } \Sigma\text{B της ημέρας } \Pi - \text{Μέσο } \Sigma\text{B ημέρας } 0)/(\text{Μέσο } \Sigma\text{B ημέρας } 0)] * 100$

Τα ζώα της ομάδας A επέζησαν σε όλη της διάρκεια του πειράματος. Τα ζώα αυτά δεν παρουσίασαν καμία μεταβολή όσον αφορά τη συμπεριφορά και την κινητικότητά τους. Παρατηρήθηκε μικρή απώλεια βάρους ($2 \pm 0,36\%$) τις πρώτες 3-4 ημέρες και στη συνέχεια επάνοδος στο φυσιολογικό περί την 10^η ημέρα και αύξηση ($1,37 \pm 0,32\%$) μετά τη 10^η ημέρα.

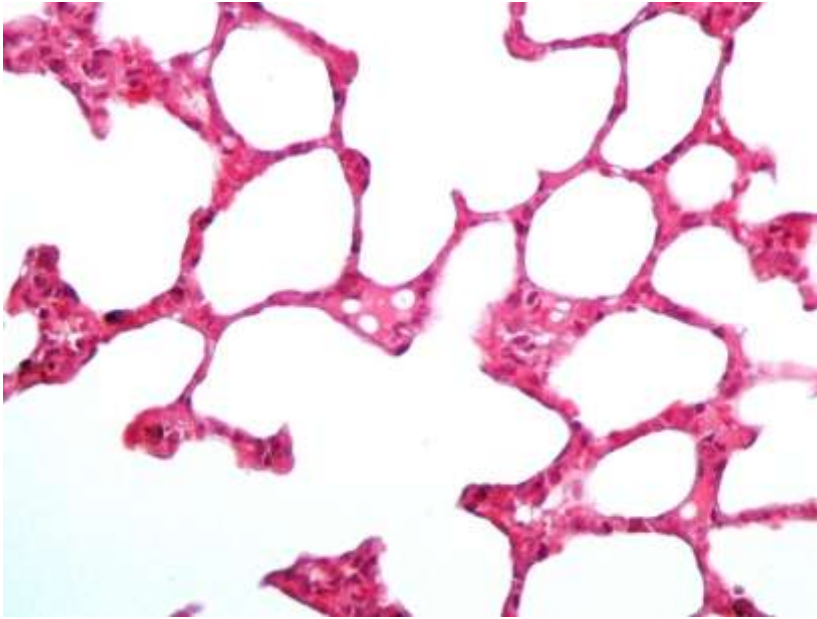
Επίσης, κατά την παθολογοανατομική μελέτη που ακολούθησε δεν ανευρέθηκαν παθολογικά ευρήματα (εικόνα).



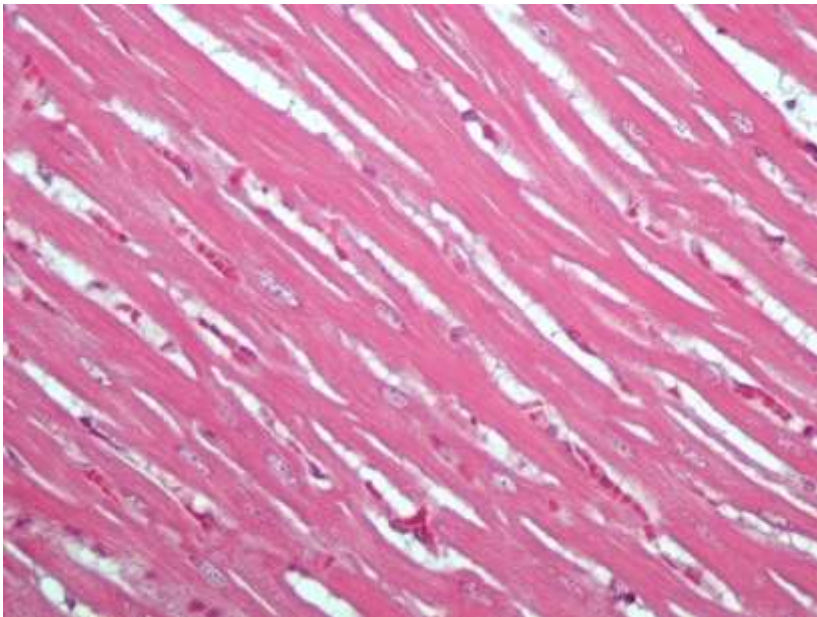
Εικόνα 4.10 : ήπαρ, πυλαίο διάστημα κ.φ. (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.11 : νεφρός κ.φ. (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.12 : πνεύμονας κ.φ. (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



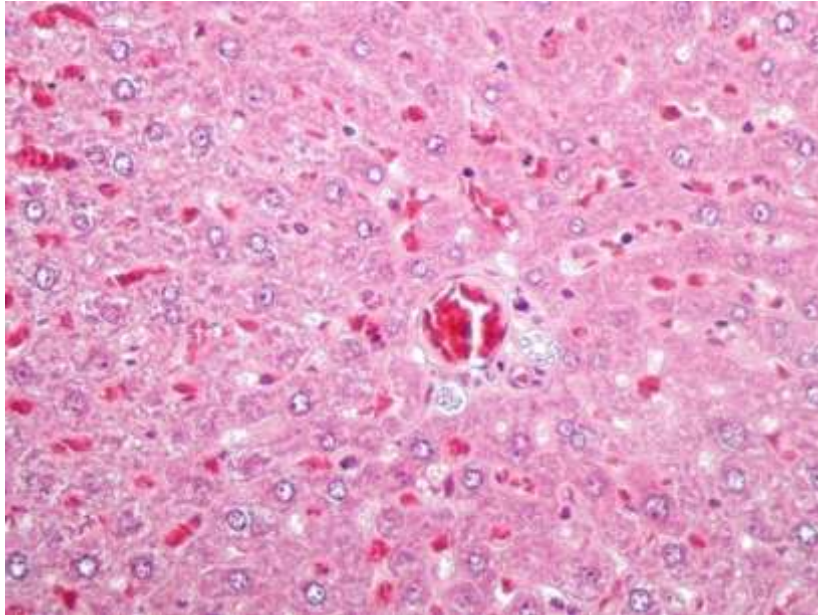
Εικόνα 4.13 : καρδιά κ.φ. (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης

Τέσσερα από τα ζώα της ομάδας Β κατέληξαν μια ημέρα μετά από την εφάπαξ χορήγηση του συμπλόκου. Όλα τα ζώα της ομάδας αυτής εμφάνισαν καταστολή, μειωμένη κινητικότητα και ελαφριά δύσπνοια τις πρώτες 2 ημέρες του πειράματος. Η δύσπνοια ήταν εντονότερη στα ζώα που κατέληξαν. Επίσης, παρατηρήθηκε μικρή απώλεια βάρους ($2,4 \pm 0,23\%$) τις πρώτες 3-4 ημέρες και στη συνέχεια στασιμότητα βάρους.

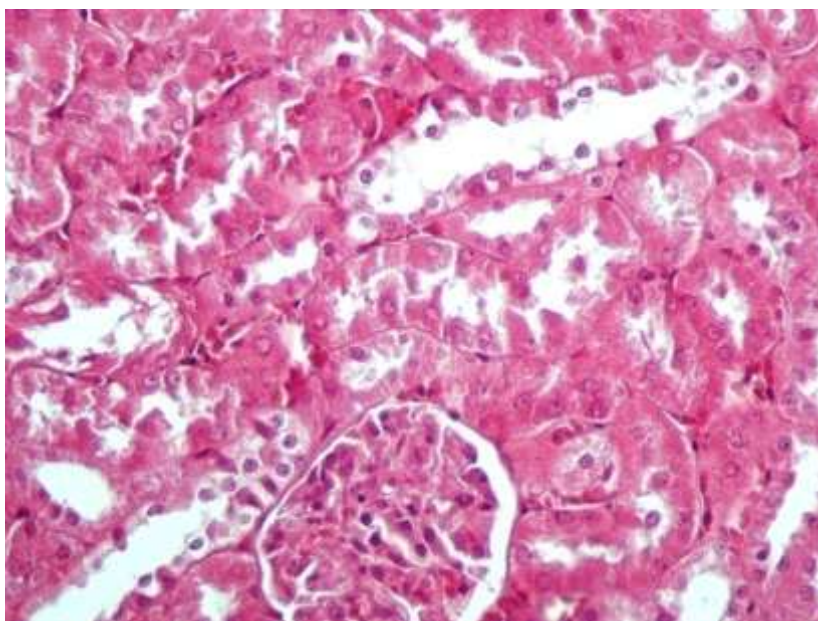
Κατά τον παθολογοανατομικό έλεγχο ανευρέθηκαν τα εξής :

- Διάταση ηπατικών κολποειδών και ήπιο εστιακό οίδημα ηπατοκυττάρων
- Ήπιο οίδημα των ουροφόρων σωληναρίων
- Ήπια σύμπτυξη των πνευμονικών κυψελίδων
- Στα ζώα που κατέληξαν : εντονότερο οίδημα των ουροφόρων σωληναρίων, ήπιο εγκεφαλικό οίδημα

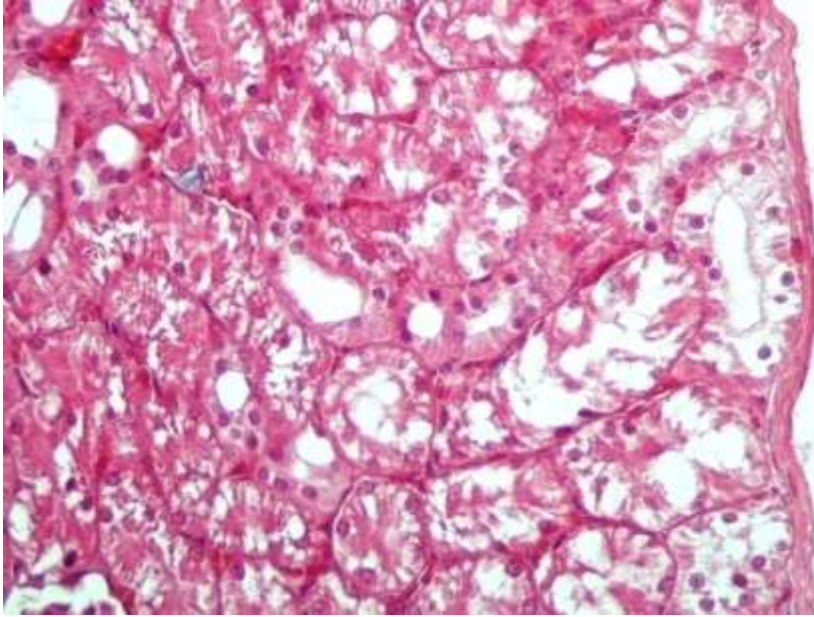
Οι παραπάνω αλλοιώσεις φαίνονται και στις εικόνες



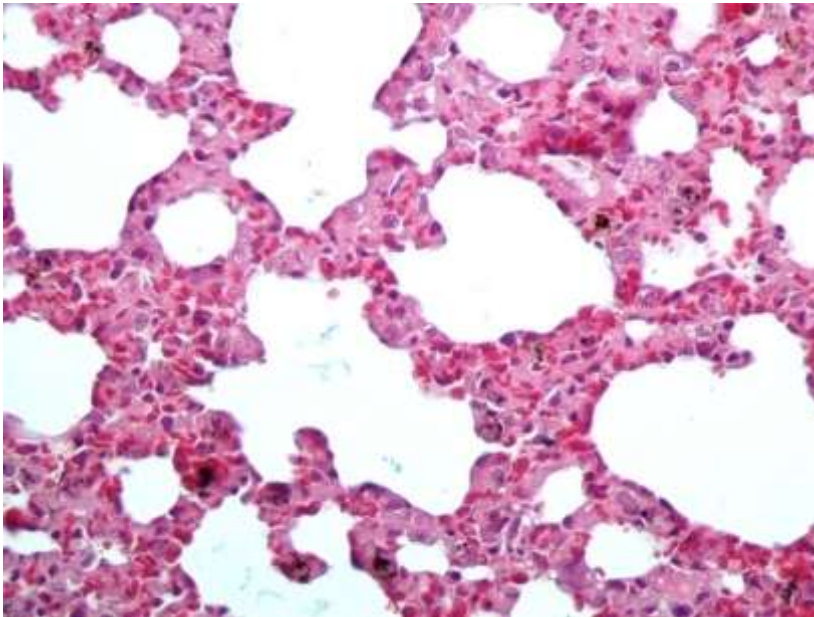
Εικόνα 4.14 : πυλαίο διάστημα, ήπια διάταση κολποειδώ, ελάχιστο οίδημα ηπατοκυττάρων (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



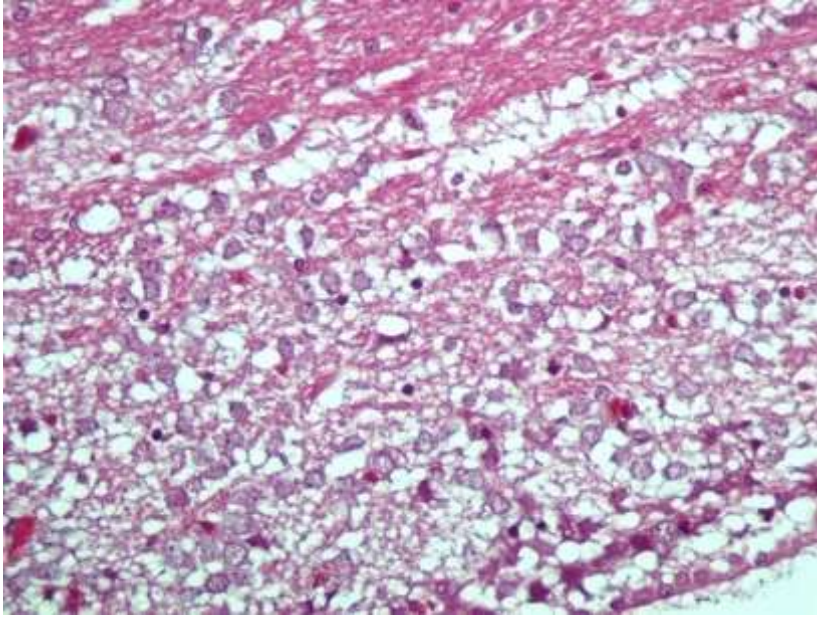
Εικόνα 4.15 : νεφρός, ήπιο οίδημα ουροφόρων σωληναρίων (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



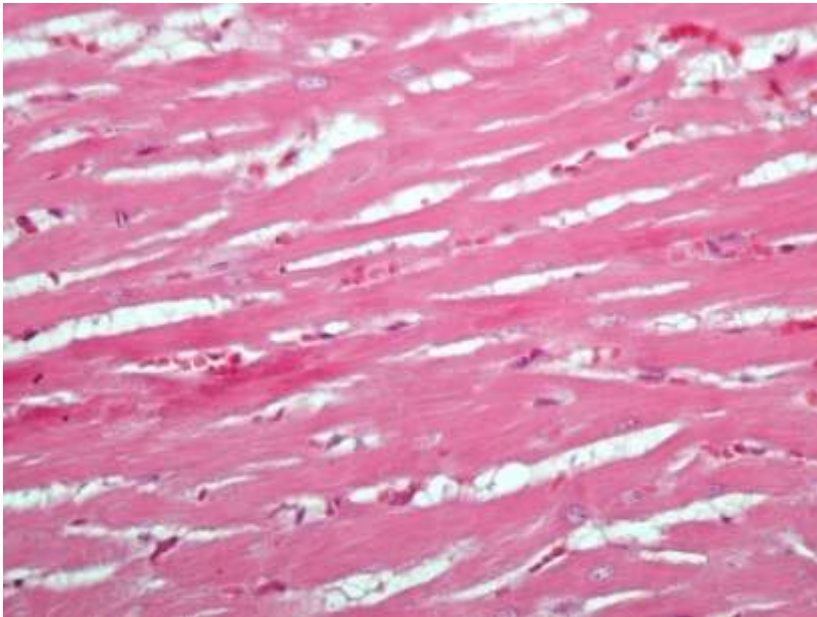
Εικόνα 4.16 : νεφρός, εντονότερο οίδημα κυττάρων ουροφόρων σωληναρίων κάτωθεν της κάψας (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.17 : πνεύμονες, ήπια σύμπτυξη των κυψελίδων, απουσία οιδήματος (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.18 : εγκεφαλικά ημισφαίρια γύρω από κοιλία, ήπιο εγκεφαλικό οίδημα (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.19 : καρδιά κ.φ. (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης

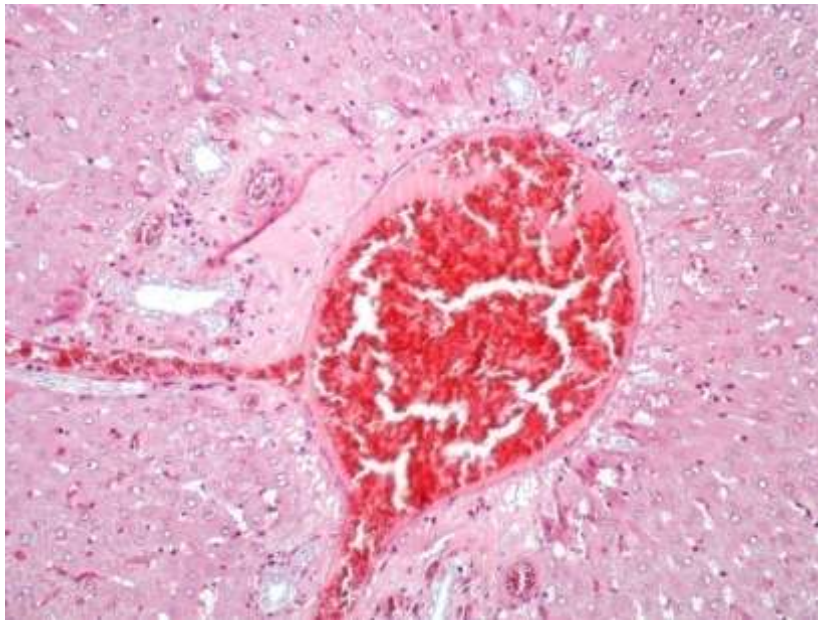
Εννέα από τα ζώα της ομάδας Γ κατέληξαν μια ώρα μετά την εφάπαξ χορήγηση του συμπλόκου. Πριν από την επέλευση του θανάτου τα ζώα εμφάνισαν έντονους σπασμούς, δύσπνοια, κοπιώδη αναπνοή, βραδυφυγμία και έντονη καταστολή και μειωμένη κινητικότητα. Επίσης, τα ζώα εμφάνισαν εικόνα παραλυτικού ειλεού. Το ζώο που επέζησε παρουσίασε μειωμένη κινητικότητα και δύσπνοια τις πρώτες 4-5 ημέρες του πειράματος. Επίσης, παρατηρήθηκε μικρή απώλεια βάρους (2,7%) τις

πρώτες 8-9 ημέρες το οποίο επανήλθε σταδιακά στο αρχικό την 14 ημέρα του πειράματος

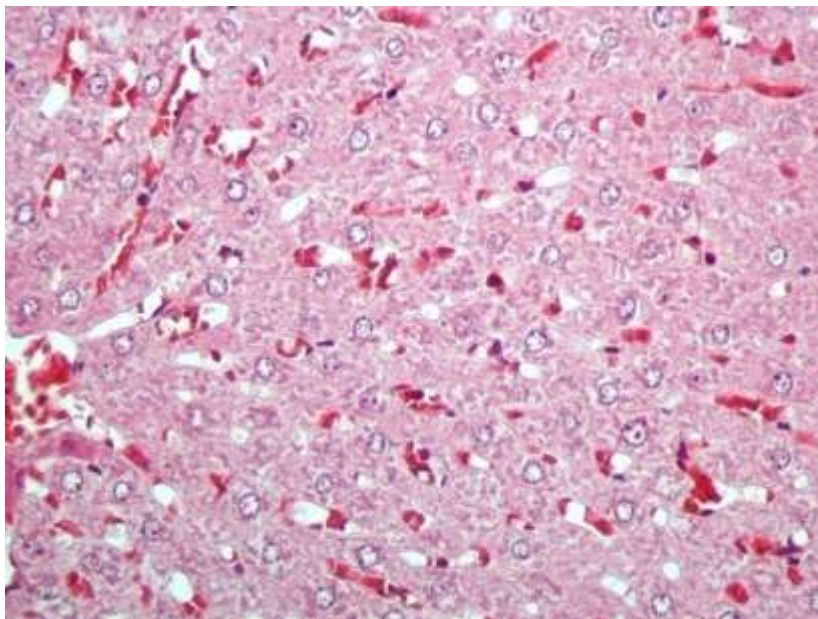
Κατά τον παθολογοανατομικό έλεγχο ανευρέθησαν τα εξής :

- Διάταση ηπατικών κολποειδών, εκφύλιση ηπατοκυττάρων
- Αρχόμενη σωληναριακή νέκρωση
- Ήπιο εγκεφαλικό οίδημα
- Ήπια σύμπτυξη πνευμονικών κυψελίδων

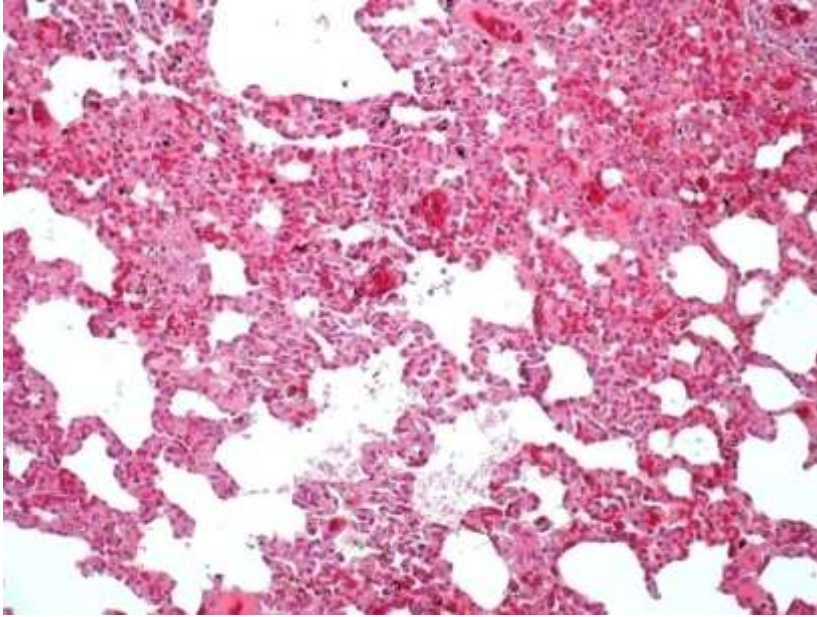
Οι παραπάνω παθολογοανατομικές αλλοιώσεις φαίνονται στην εικόνα :



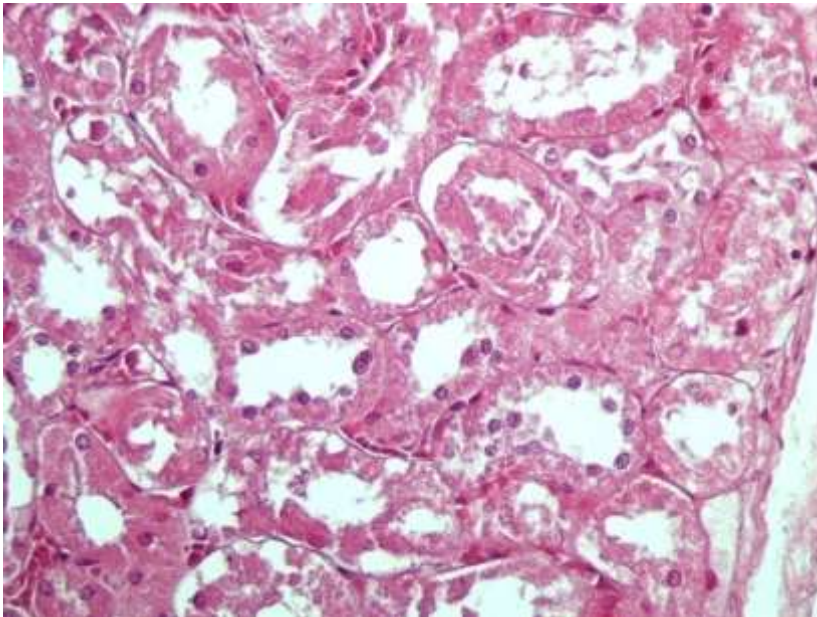
Εικόνα 4.20 : ήπαρ, διάταση κολποειδών και εκφύλιση ηπατοκυττάρων γύρω από πυλαίο διάστημα (x200), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



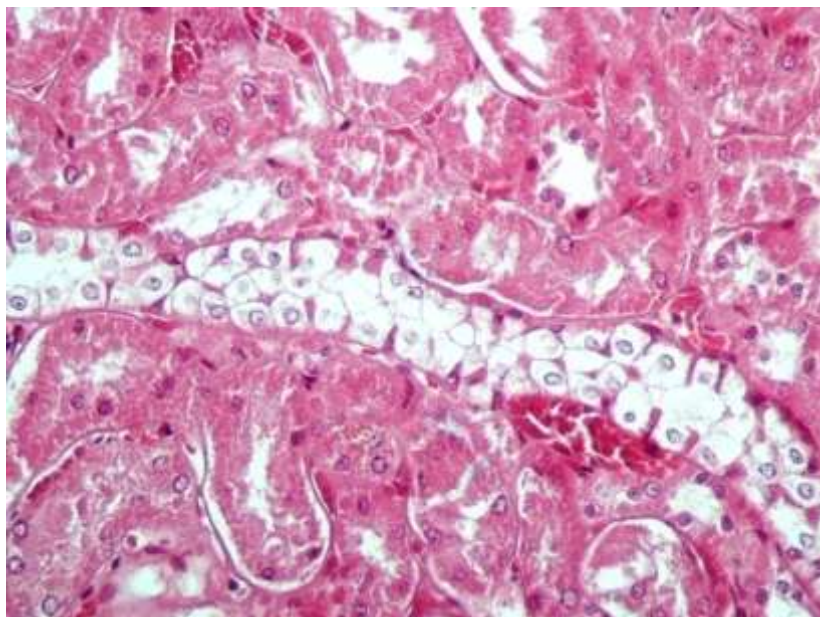
Εικόνα 4.21 : ήπαρ, υδρωπική εκφύλιση ηπατοκυττάρων (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



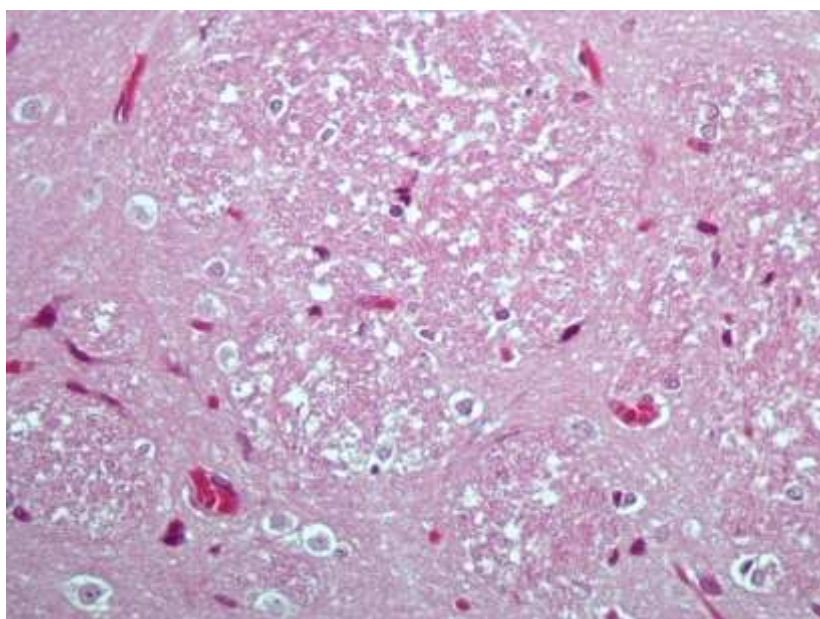
Εικόνα 4.22 : πνεύμονες, σύμπτυξη κυψελίδων και ήπιο πνευμονικό οίδημα (x200), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



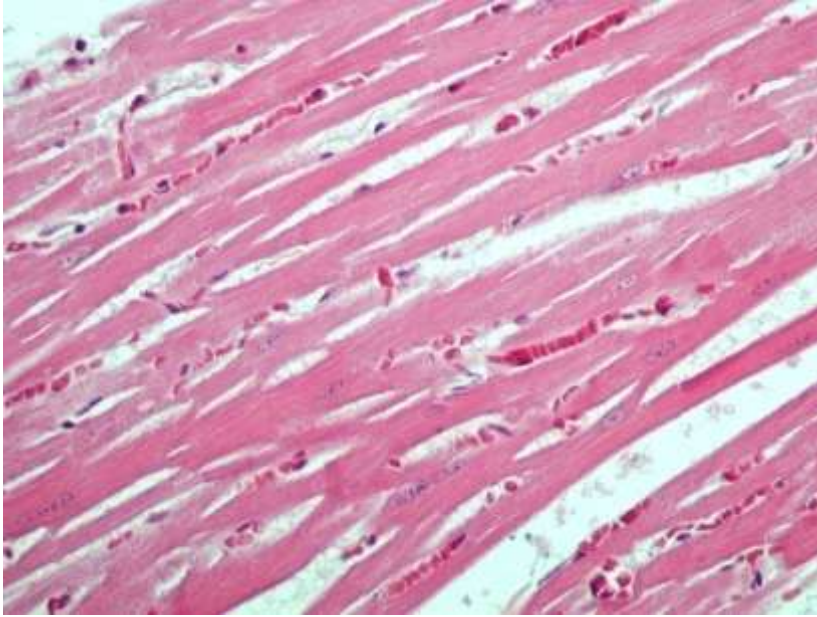
Εικόνα 4.23 : νεφρός, αρχόμενη σωληναριακή νέκρωση (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.24 : νεφρός, οίδημα ουροφόρων σωληναρίων (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.25 : εγκέφαλος, ήπιο εγκεφαλικό οίδημα (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.26 : καρδιά κ.φ. (x200), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης

Τα ζώα της ομάδας Δ επέζησαν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Τα ζώα αυτά δεν παρουσίασαν καμία μεταβολή στην συμπεριφορά ή την κινητικότητά τους. Επίσης, παρατηρήθηκε μικρή απώλεια βάρους ($1,7 \pm 0,4\%$) τις πρώτες 3-4 ημέρες και στη συνέχεια επάνοδος στο φυσιολογικό περί την 10^η ημέρα και αύξηση ($2,01 \pm 0,09\%$) μετά τη 10^η ημέρα.

Κατά την παθολογοανατομική μελέτη που ακολούθησε δεν υπήρξαν παθολογικά ευρήματα.

Οι παρατηρήσεις από τους μεταβολικούς κλωβούς μπορούν να συνοψισθούν στα παρακάτω :

Ομάδα Α :

- Φυσιολογική λήψη ύδατος και αποβολή ούρων
- Μείωση της προσλαμβανόμενης τροφής ($10,5 \pm 1,2\%$) και της αποβολής κοπράνων ($7,6 \pm 0,2\%$) τις πρώτες 1-2 ημέρες του πειράματος. Στη συνέχεια τόσο η πρόσληψη τροφής όσο και η αποβολή κοπράνων επανήλθαν στο φυσιολογικό.

Ομάδα Β :

- Αυξημένη λήψη ύδατος ($12,8 \pm 1,2\%$) και αποβολή ούρων ($44,1 \pm 0,26\%$) τις πρώτες 4-5 ημέρες
- Μειωμένη πρόσληψη τροφής ($12,1 \pm 0,25\%$) και αποβολή κοπράνων ($8,3 \pm 1,2\%$) τις πρώτες 1-2 ημέρες του πειράματος

Ομάδα Γ :

- Μειωμένη αποβολή ούρων (71,5%) τις πρώτες 4-5 ημέρες, λύση της ολιγουρίας περί την 5^η ημέρα
- Μειωμένη πρόσληψη τροφής (41,7%) και αποβολή κοπράνων (68%) τις πρώτες 5-7 ημέρες του πειράματος

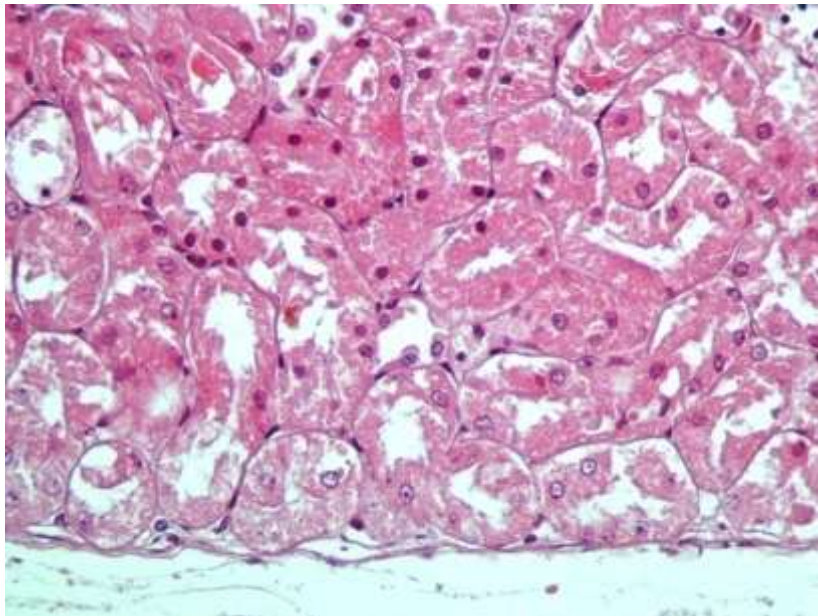
Ομάδα Δ :

- Φυσιολογική λήψη ύδατος και αποβολή ούρων
- Μειωμένη πρόσληψη τροφής ($10,8 \pm 0,36\%$) και αποβολή κοπράνων ($7,79 \pm 0,71\%$) τις πρώτες 1-2 ημέρες του πειράματος

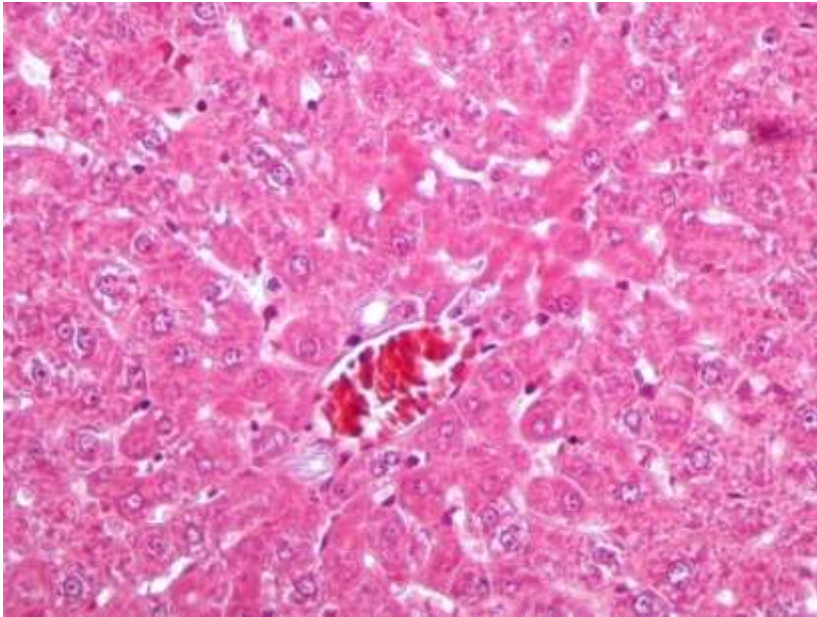
4.2.2 Υποξεία τοξικότητα

Κατά τη μελέτη της υποξείας τοξικότητας δεν παρατηρήθηκε θάνατος πειραματόζων σε καμία από τις ομάδες του πειράματος. Τα ζώα των ομάδων Α και Β τα οποία λάμβαναν ποσότητα του συμπλόκου ημερησίως δεν παρουσίασαν καμία μεταβολή ως προς την συμπεριφορά και την κινητικότητα. Επίσης, εμφάνισαν στατιστικά μη σημαντική μεταβολή του βάρους τους σε σχέση με την ομάδα Γ που αποτέλεσε και την ομάδα ελέγχου. Τα ίδια προέκυψαν και από τις παρατηρήσεις από τους μεταβολικούς κλωβούς όσον αφορά την πρόσληψη τροφής και ύδατος και την αποβολή ούρων και κοπράνων. Επίσης, κατά τον παθολογοανατομικό έλεγχο στις ομάδες Α και Γ δεν παρατηρήθηκαν παθολογικές αλλοιώσεις των οργάνων τους. Στην ομάδα Β παρατηρήθηκε ελάχιστο οίδημα των ουροφόρων σωληναρίων.

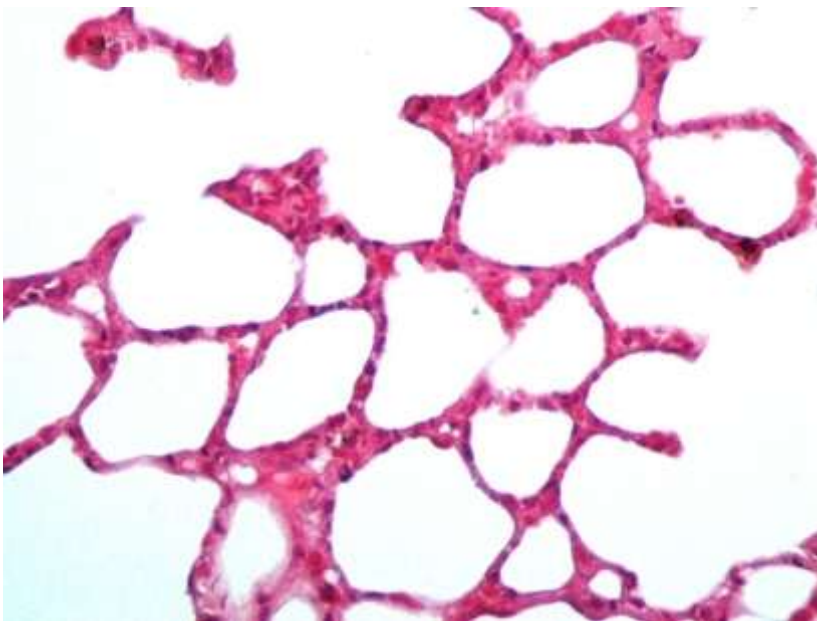
Στις εικόνες απεικονίζονται ορισμένα από τα όργανα των πειραματόζων της ομάδας Β που έλαβαν και τη μεγαλύτερη δόση συμπλόκου ημερησίως.



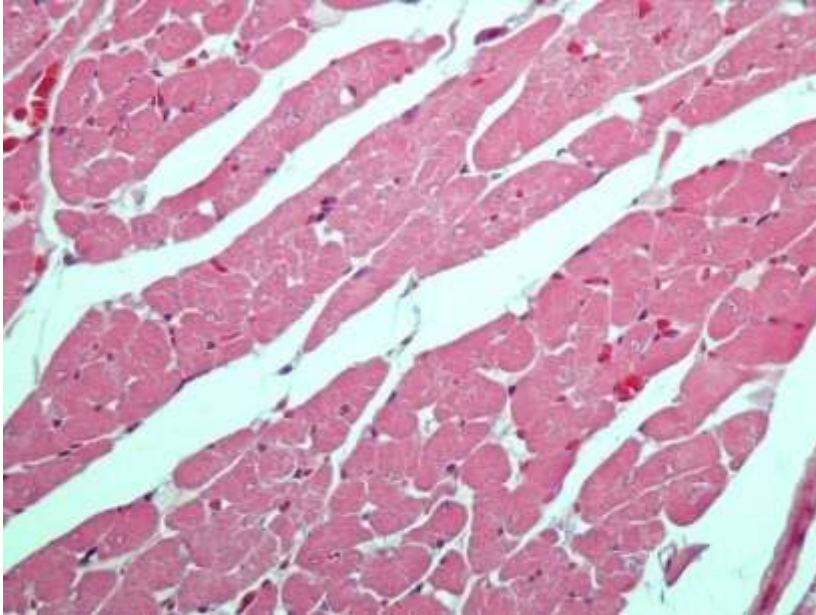
Εικόνα 4.27 : νεφρός, ελάχιστο οίδημα (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.28 : ήπαρ, κεντρική φλέβα κ.φ. (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.29 : πνεύμονας κ.φ. (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.30 : καρδιά κ.φ. (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης

4.2.3 Αντικαρκινική δράση του συμπλόκου σε καρκινοπαθείς επίμυες wistar

Κατά τη μελέτη της αντικαρκινικής δράσης του συμπλόκου στις δυο ομάδες των πειραματόζων υπολογίστηκε ο μέσος χρόνος ζωής των επίμυων.

Πίνακας 4.9: μέσος χρόνος ζωής, SD, SE στην ομάδα D και στην ομάδα ελέγχου ($p < 0,001$)

	Ομάδα C (N=15)	Ομάδα D (N=14)
Μέσος χρόνος ζωής	20,7 days	45,07 days
SD	5,52	5,92
SE	1,425	1,584

Η παράταση του χρόνου ζωής των πειραματόζων της ομάδας D, η οποία έλαβε το σύμπλοκο σε δόση 0,1mg/kg/day σε σχέση με την ομάδα C η οποία αποτελεί την ομάδα ελέγχου είναι $T/C\% = 217,72\%$ (median survival time of treated mice/median survival time of control%) ($p < 0,01$).

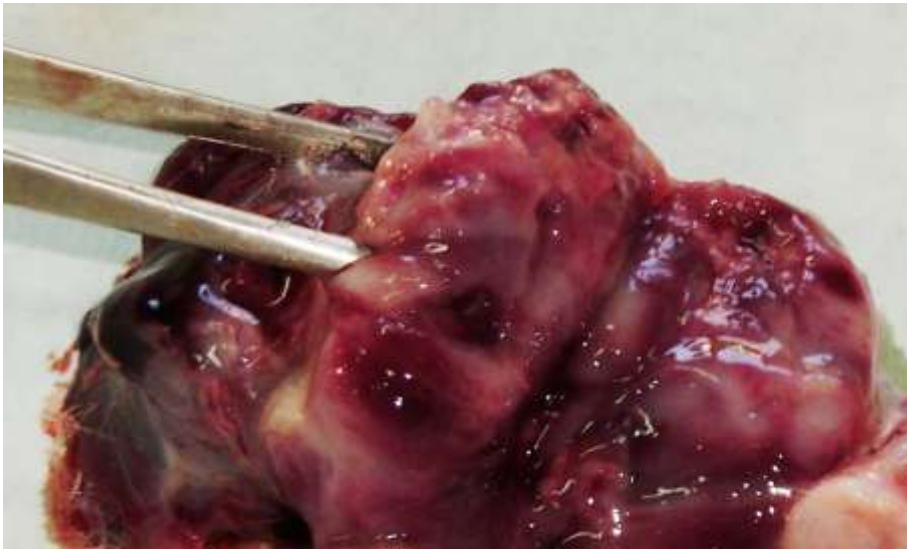
Η επί τοις εκατό αναστολή της ανάπτυξης της μάζας του όγκου για την ομάδα D σε σχέση με την ομάδα C είναι $TWI\% = 60,16\%$ (tumor weight inhibition%). Επίσης, ο ρυθμός ανάπτυξης του όγκου MTGR βρέθηκε $1,6 \pm 0,12 \text{ mg/day}$ για την ομάδα D και $5,2 \pm 0,21 \text{ mg/day}$ για την ομάδα ελέγχου.

Επίσης, παρατηρήθηκε και $LTS=1/15$ (long terms survival). Το πειραματόζωο αυτό ανήκε στην ομάδα C, επέζησε για 71 ημέρες και δεν λαμβάνεται υπόψη για τους παραπάνω υπολογισμούς.

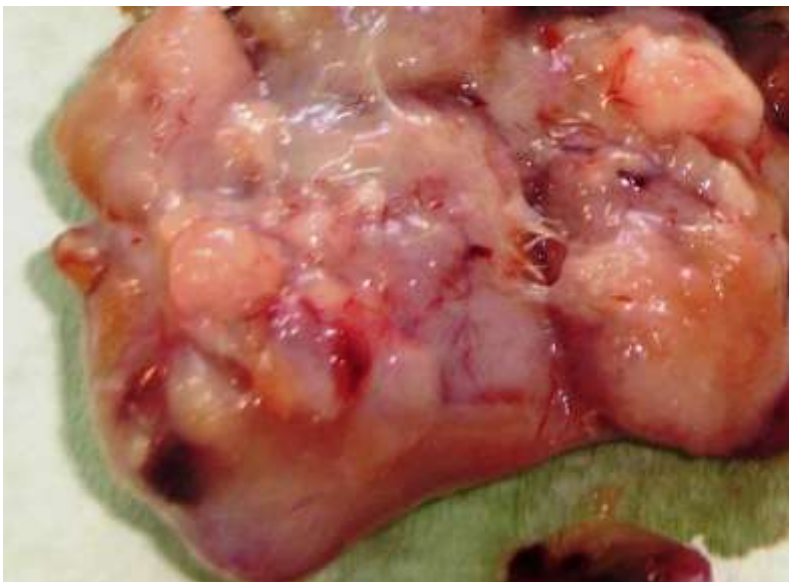
Μακροσκοπικά, οι όγκοι των πειραματόζων της ομάδας C ήταν συμπαγείς με κεντρική νέκρωση, δηλαδή εμφάνισαν τη χαρακτηριστική εικόνα των λειομυοσάρκωμάτων.

Αντίθετα, οι όγκοι που απομονώθηκαν από τα πειραματόζωα της ομάδας D ήταν αιμορραγικοί, με νεκρώσεις και συλλογές αιμορραγικού υγρού.

Τα παραπάνω φαίνονται στις εικόνες που ακολουθούν.



Εικόνα 4.31 : χαρακτηριστική μακροσκοπική εικόνα όγκου πειραματόζωου της ομάδας D



Εικόνα 4.32 : χαρακτηριστική μακροσκοπική εικόνα όγκου πειραματόζωου της ομάδας ελέγχου



Εικόνα 4.33 : μακροσκοπική εικόνα όγκου ομάδας D



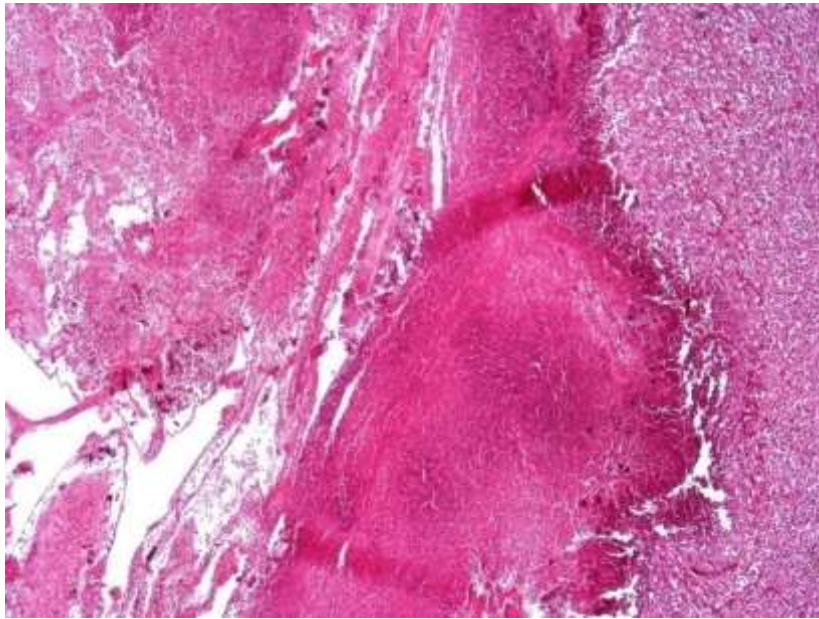
Εικόνα 4.34 : μακροσκοπική εικόνα όγκου ομάδας ελέγχου

Όσον αφορά τα παθολογοανατομικά ευρήματα της ομάδας D αυτά συνοψίζονται παρακάτω :

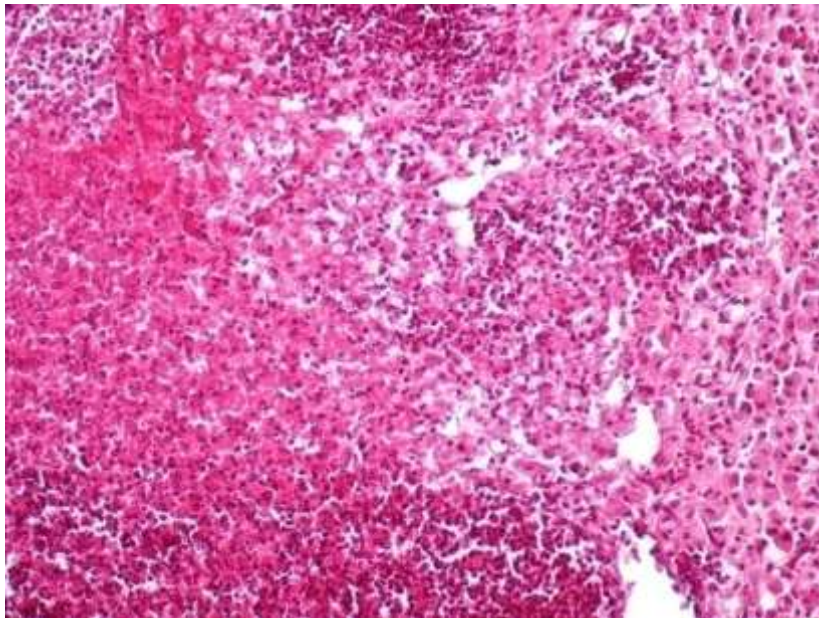
- Όγκος με νέκρωση σε ποσοστό 70-80%
- Ήπια διάταση ηπατικών κολποειδών
- Ήπιο οίδημα πνευμονικών κυψελίδων
- Ήπιο οίδημα ουροφόρων σωληναρίων
- Καρδιά φυσιολογική

- Σπλήνας φυσιολογικός

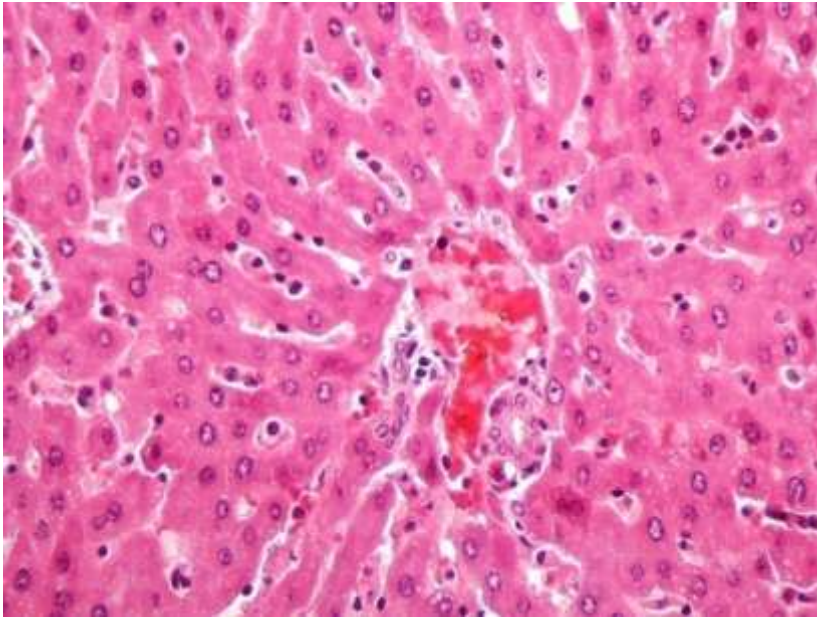
Τα παραπάνω φαίνονται και στις εικόνες που ακολουθούν.



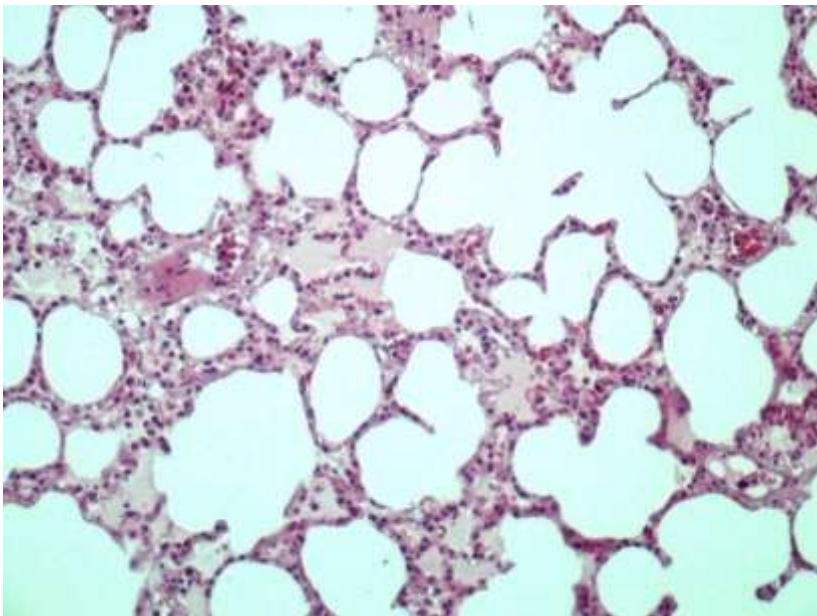
Εικόνα 4.35 : όγκος με νέκρωση σε ποσοστό 80% (x40), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



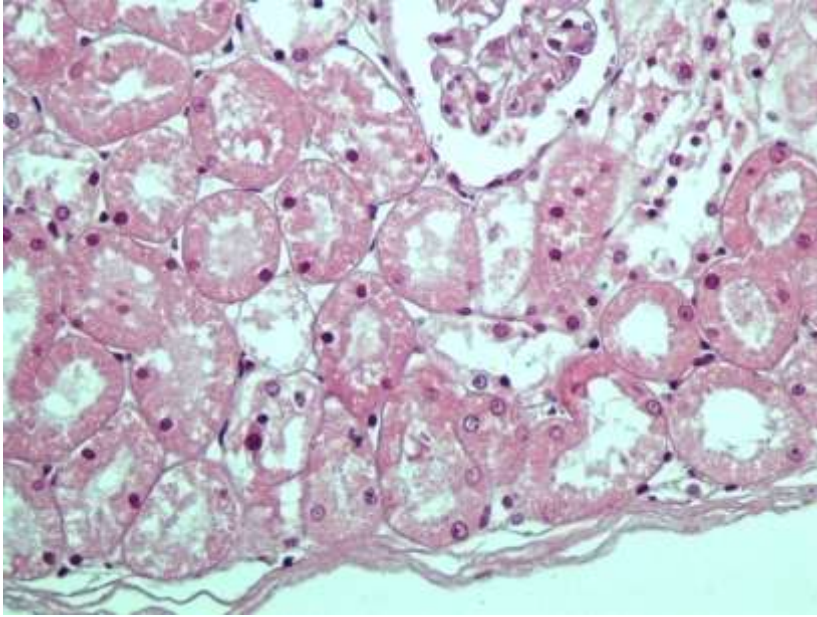
Εικόνα 4.36 : όγκος με νέκρωση (x200), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



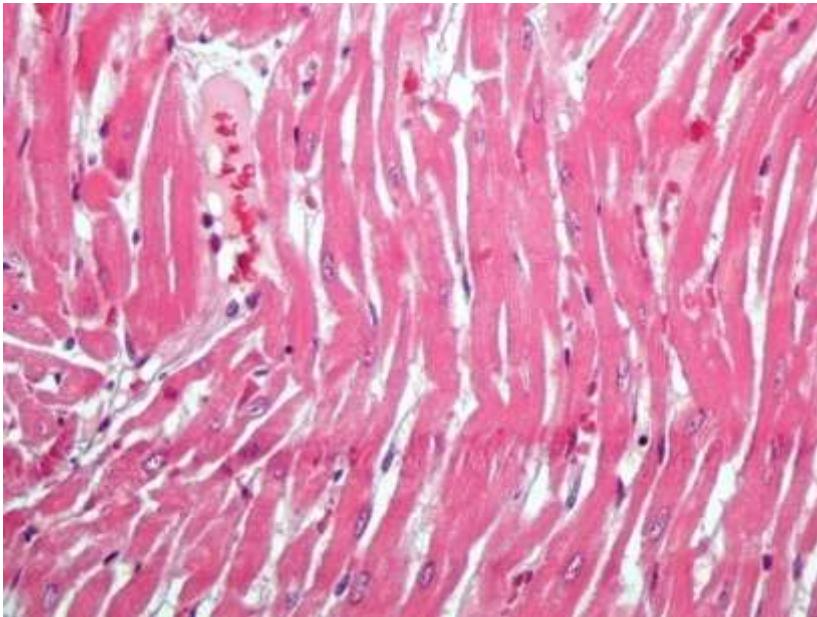
Εικόνα 4.37 : ήπαρ, πυλαίο διάστημα, ήπια διάταση κολποειδών (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



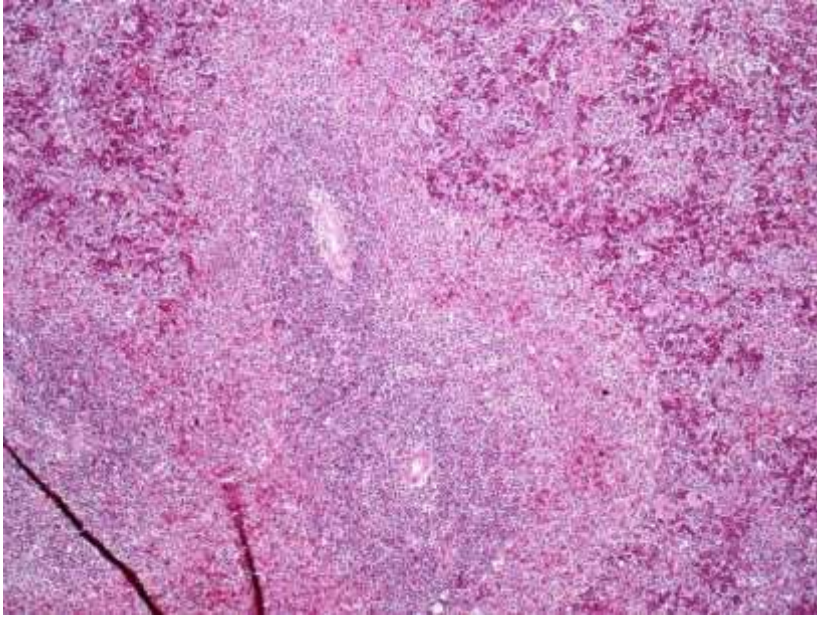
Εικόνα 4.38 : πνεύμονες, εστιακό οίδημα (x200), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.39 : νεφρός, ήπιο οίδημα ουροφόρων σωληναρίων (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.40 : καρδιά κ.φ. (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης

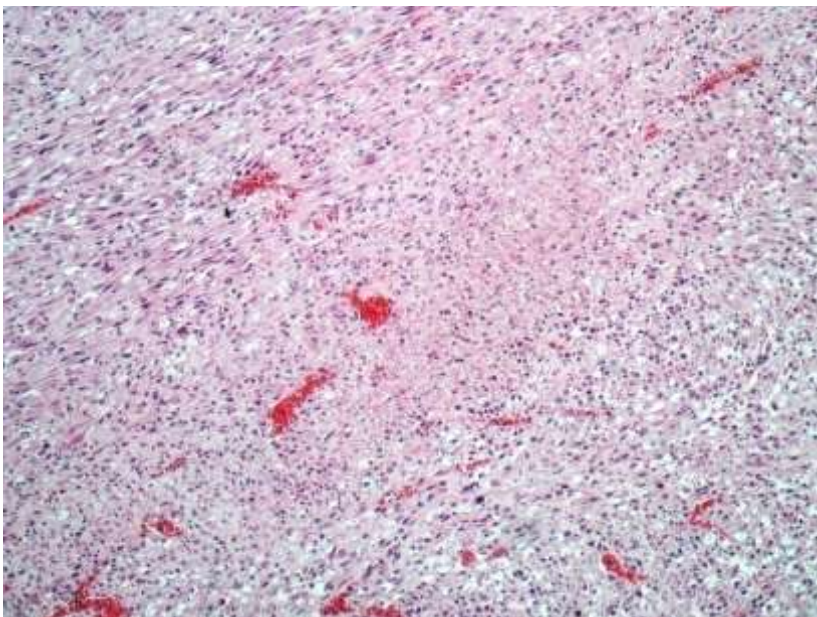


Εικόνα 4.41 : σπλήνας κ.φ. (x200), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης

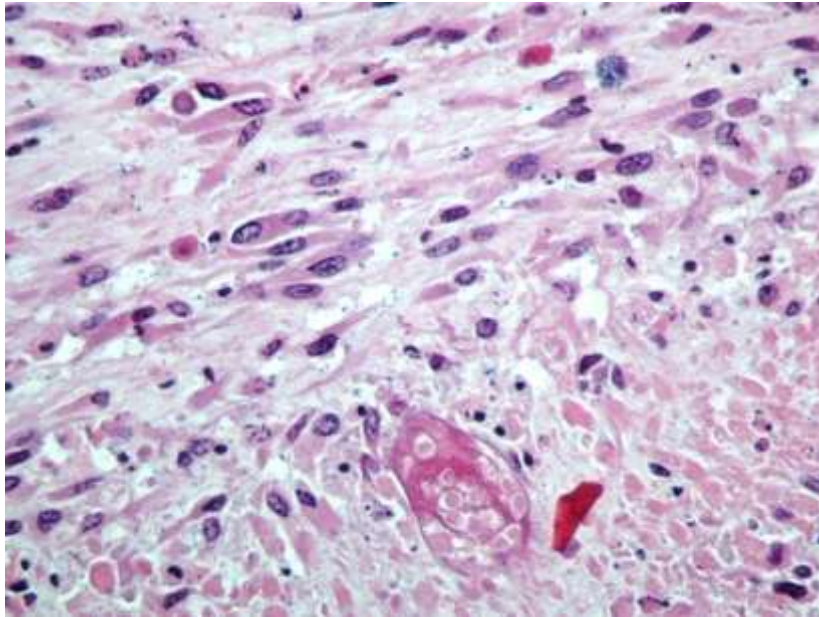
Όσον αφορά τα παθολογοανατομικά ευρήματα από την ομάδα ελέγχου, αυτά συνοψίζονται στα εξής :

- Όγκος με νέκρωση σε ποσοστό 10-20%
- Ήπια διάταση ηπατικών κολλοειδών
- Ήπιο οίδημα πνευμονικών κυψελίδων
- Νεφροί φυσιολογικοί
- Καρδιά φυσιολογική
- Σπλήνας φυσιολογικός

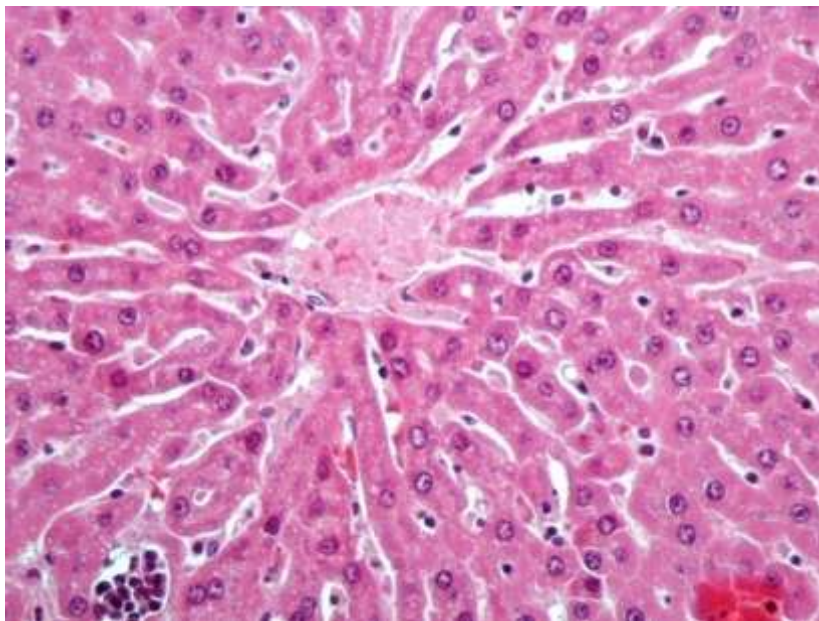
Τα παραπάνω φαίνονται στις εικόνες που ακολουθούν.



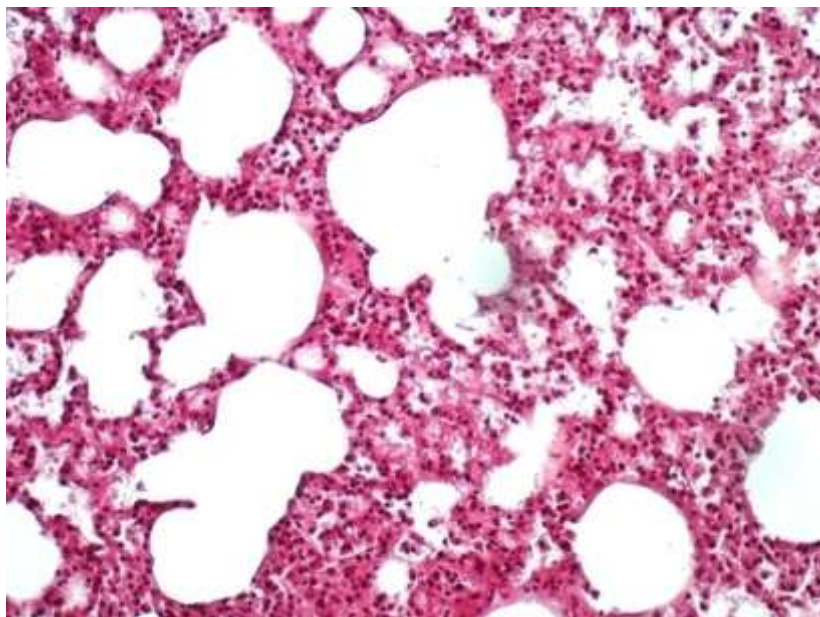
Εικόνα 4.42 : όγκος με νέκρωση 20%, γεωγραφική νέκρωση ενδεικτική σαρκώματος υψηλής κακοήθειας (x200), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



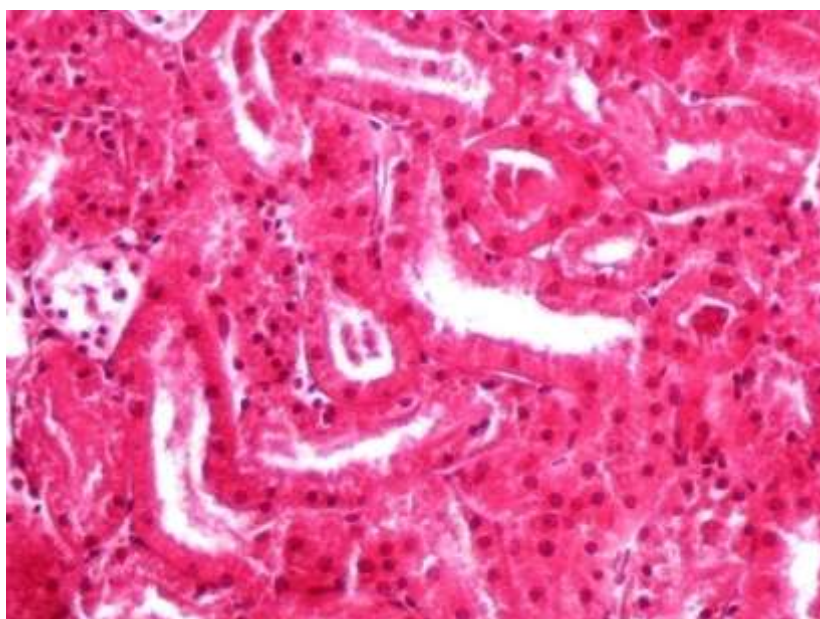
Εικόνα 4.43 : όγκος με μικρή περιοχή νέκρωσης (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



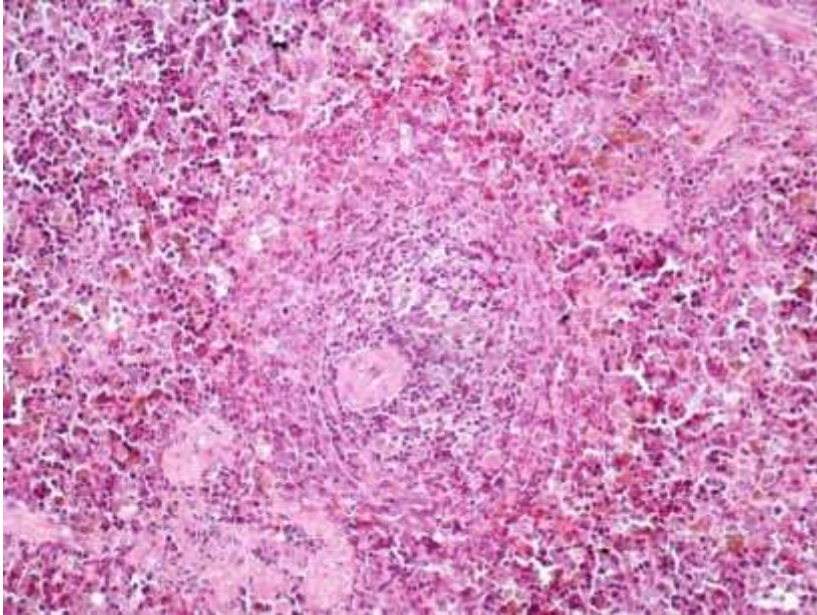
Εικόνα 4.44 : ήπιο οίδημα ηπατικών κολποειδών (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.45 : πνεύμονες, ήπιο οίδημα στις κυψελίδες και ήπια σύμπτωση των πνευμονικών κυψελίδων (x200), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.46 : νεφρός κ.φ. (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



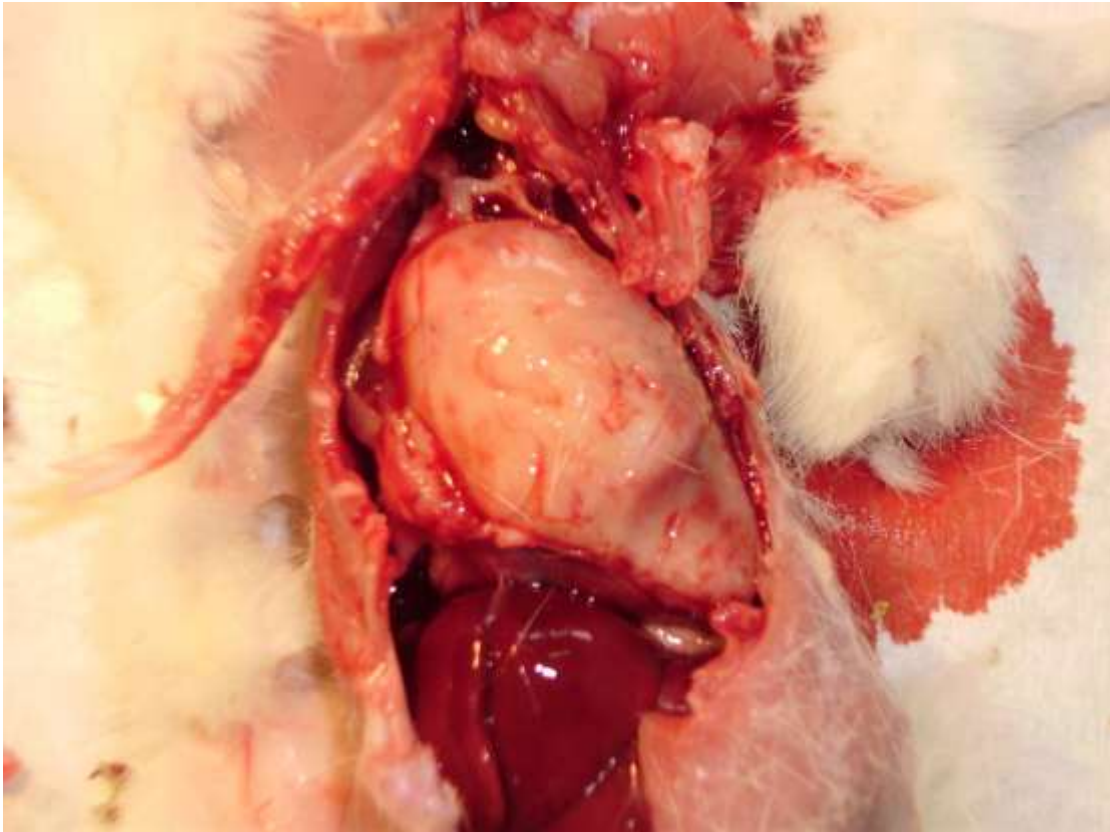
Εικόνα 4.47 : σπλήνας κ.φ. (x200), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης

Σε ένα από τα πειραματόζωα της ομάδας D, ο όγκος υποχώρησε εντελώς από την πρωτοπαθή εστία και στη θέση του δημιουργήθηκε μικρή αποστηματική κοιλότητα. Δυστυχώς, το εν λόγω πειραματόζωο ανέπτυξε μετάσταση στους πνεύμονες η οποία ήταν ανθεκτική στη θεραπεία.

Η μακροσκοπική εικόνα της περιοχής της πρωτοπαθούς εστίας του όγκου και οι πνευμονική μετάσταση φαίνεται στις εικόνες.



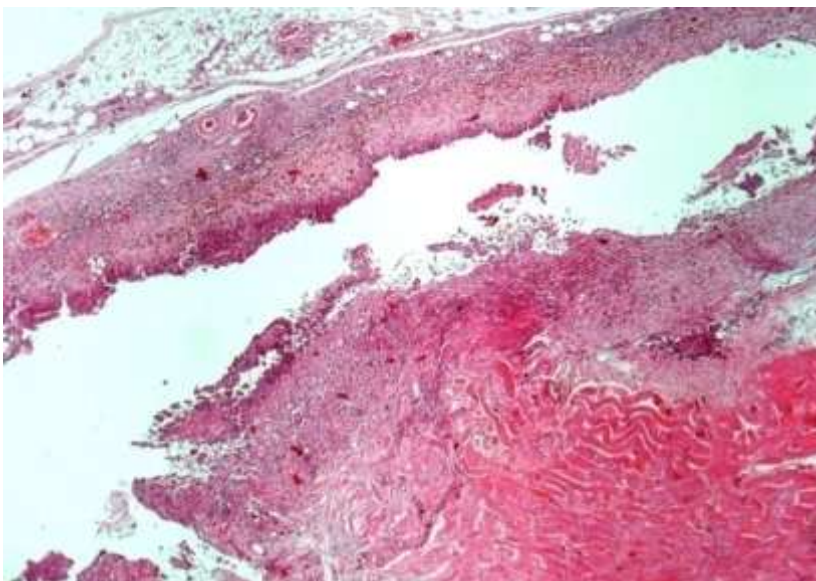
Εικόνα 4.48 : μακροσκοπική εικόνα πρωτοπαθούς εστίας όγκου πειραματόζωου ομάδας D. Ο όγκος έχει αντικατασταθεί από αποστηματική κοιλότητα



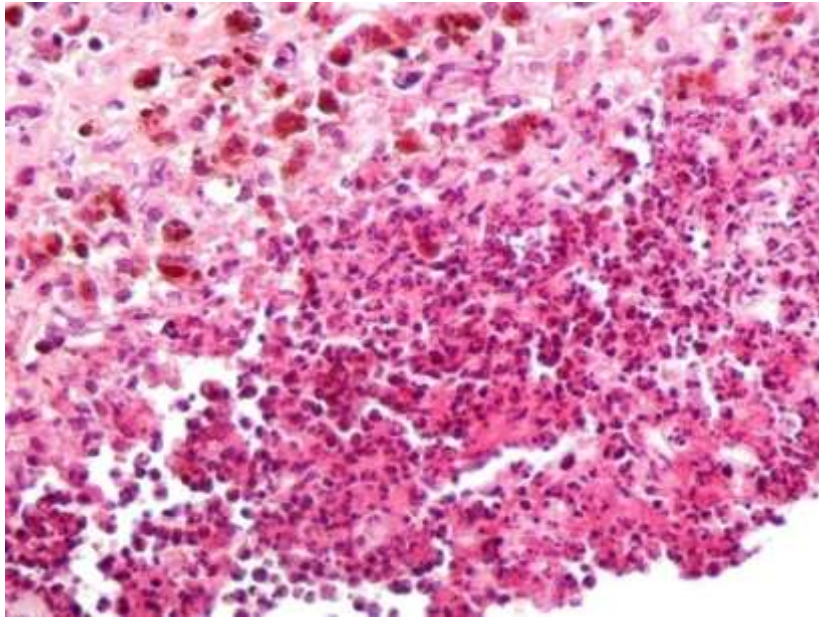
Εικόνα 4.49 : μακροσκοπική εικόνα πνευμονικής μετάστασης πειραματοζώου ομάδας D

Ο παθολογοανατομικός έλεγχος της περιοχής της πρωτοπαθούς εστίας του όγκου ανέδειξε κυστική περιοχή με απόστημα κάτωθεν των μυών του δέρματος και πλήρως νεκρωθέν περιεχόμενο της κύστεως χωρίς την παρουσία καρκινικών κυττάρων. Επίσης, η μεταστατική εστία στους πνεύμονες δεν εμφάνισε περιοχή νέκρωσης.

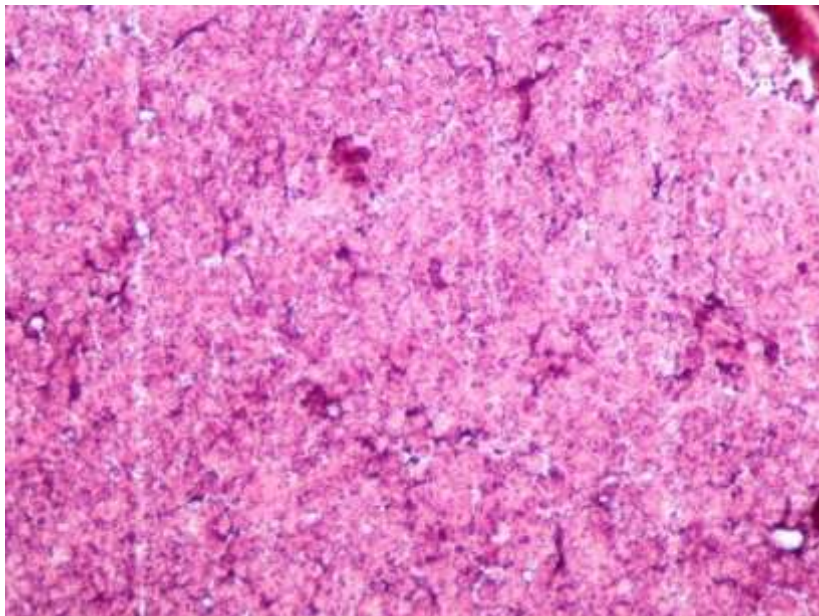
Τα παραπάνω ευρήματα απεικονίζονται στις εικόνες που ακολουθούν.



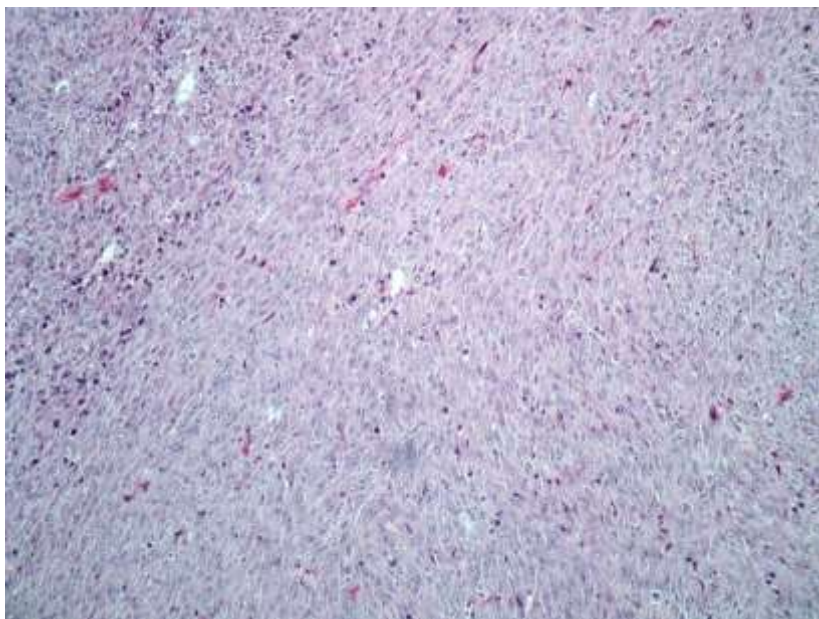
Εικόνα 4.50 : κυστική περιοχή με απόστημα, κάτωθεν μυός δέρματος (x40), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



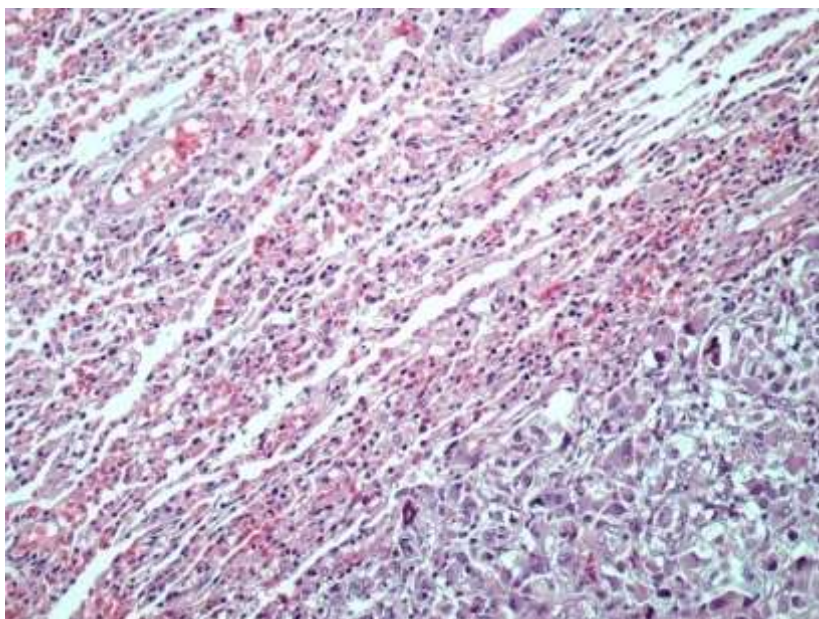
Εικόνα 4.51 : ταίχωμα κύστης : μακροφάγα με αιμοσιδηρίνη, πολυμορφοπύρρηνα, απουσία όγκου (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



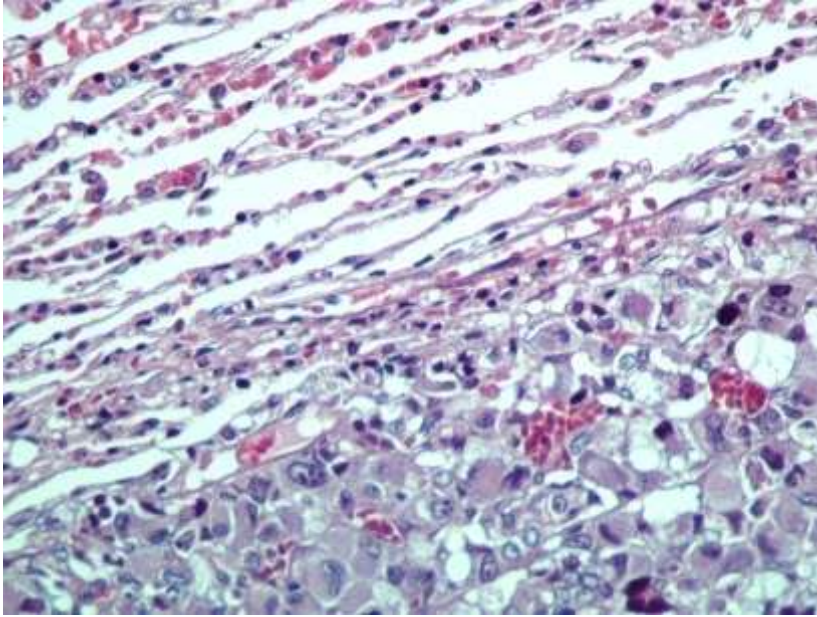
Εικόνα 4.52 : πλήρως νεκρωθέν περιεχόμενο κυστικού σχηματισμού (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.53 : μεταστατική εστία σε πνεύμονες, απουσία νέκρωσης (x100), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.54 : μετάσταση σε πνεύμονες (x200), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Εικόνα 4.55 : μετάσταση σε πνεύμονα, απουσία νέκρωσης (x400), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 In vitro πειράματα

Όλα τα σύμπλοκα του κασσιτέρου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή εμφάνισαν σημαντική κυτταροτοξική δράση, της τάξης των nM. Η δράση τους αυτή είναι ισχυρότερη από εκείνη της σισπλατίνης και μάλιστα τα σύμπλοκα είναι δραστικά τόσο έναντι ευαίσθητων όσο και έναντι ανθεκτικών στη σισπλατίνη κυτταρικών σειρών. Παρόμοια δράση έχει αναφερθεί και με τη χρήση άλλων συμπλόκων του κασσιτέρου τόσο στις ίδιες όσο και σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν εδώ (Barbieri F 2000, Hadjikakou SK 2008). Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι τα οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα του κασσιτέρου εμφανίζουν εν γένει κυτταροτοξική δράση σημαντικά μεγαλύτερη ή ανάλογη εκείνης της σισπλατίνης. Επίσης, η δράση αυτή των συμπλόκων φαίνεται να εμφανίζει και κάποια σχέση με την αναστολή της οξειδωσης του λινολεϊκού οξέως από τη λιποξυγενάση (Abdellah 2009).

Σημαντικό πρόβλημα των περισσότερων οργανοκασσιτερικών συμπλόκων είναι η χαμηλή διαλυτότητα σε νερό η οποία παρέχει ένα περιοριστικό παράγοντα στη χρήση τους στη θεραπευτική (Jones 2007). Στην παρούσα μελέτη για να αντιμετωπίσουμε το παραπάνω πρόβλημα στα in vitro πειράματα πραγματοποιήθηκε διάλυση των συμπλόκων σε DMSO και στη συνέχεια αραιώση με DMEM.

Φαίνεται ότι το είδος του υποκαταστάτη παίζει κάποιο ρόλο όσον αφορά την κυτταροτοξική δράση των συμπλόκων, κάτι το οποίο είναι ιδιαίτερα εμφανές αν συγκρίνουμε τις τιμές IC₅₀ ανάλογων συμπλόκων. Πιο συγκεκριμένα, το σύμπλοκο 3 και το σύμπλοκο 4 διαφέρουν μόνο ως προς το είδος ενός από τους 3 υποκαταστάτες και μάλιστα ο τέταρτος αυτός υποκαταστάτης διαφέρει ως προς τη θέση μιας υδροξυλικής ομάδας (ορθο-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ και πάρα-υδρόξυ βενζοϊκό οξύ). Βλέπουμε λοιπόν πως το σύμπλοκο 3 εμφανίζει γενικά μεγαλύτερες τιμές IC₅₀, σε όλες τις κυτταρικές σειρές πιθανότατα εξαιτίας της απομάκρυνσης της υδροξυλομάδας από τις πολικές θέσεις των κυτταρικών υποδοχέων. Βέβαια, κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στα σύμπλοκα 1 και 2 τα οποία επίσης διαφέρουν ως προς τη θέση της υδροξυλομάδας του τέταρτου υποκαταστάτη (ορθο-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ και πάρα-υδροξυ βενζοϊκό οξύ) πιθανότατα εξαιτίας της καλύτερης πρόσδεσης των τριών φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν τα μόρια αυτά σε σχέση με τις n-βούτυλο ομάδες των συμπλόκων 3 και 4. Η σημασία των υποκαταστατών στη δραστηριότητα των συμπλόκων είναι εμφανής και από τις διαφορές όσον αφορά την κυτταροτοξικότητα που εμφανίζονται στις διάφορες μελέτες με διαφορετικά οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα. Τα οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα με καρβοξυλικούς υποκαταστάτες εμφανίζουν εν γένει ισχυρή

κυτταροτοξική δράση (Gielen 2000) και μάλιστα η δράση αυτή είναι ισχυρότερη από εκείνη της σισπλατίνης. Το ίδιο συμβαίνει και με τα σύμπλοκα που φέρουν οξυγονούχες αποχωρούσες ομάδες διάφορες από τα κατάλοιπα των καρβοξυλικών οξέων (Barot 2007, Carraher 2008) σε αντίθεση με τα οργανοκασιτερικά σύμπλοκα με θειούχους υποκαταστάτες ορισμένα από τα οποία μπορεί να υδρολύονται με πολύ βραδείς ρυθμούς για να γίνει η δράση τους εμφανής (Alama 2009).

Τα σύμπλοκα 1-4 προκάλεσαν αναστολή της ικανότητας σχηματισμού αποικιών σε όλες σχεδόν τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν. Γίνεται λοιπόν εμφανές ότι τα σύμπλοκα αυτά προκαλούν μόνιμες βλάβες στο DNA των κυττάρων με αποτέλεσμα να μην μπορούν να πολλαπλασιαστούν ακόμη και μετά από την απομάκρυνση του συμπλόκου από το θεραπευτικό μέσο. Μάλιστα, ορισμένα από τα σύμπλοκα σε υψηλές συγκεντρώσεις προκάλεσαν όχι μόνο πλήρη αναστολή της ανάπτυξης αλλά και θάνατο των κυττάρων με αποτέλεσμα να μην ανευρεθούν κύτταρα στα τρυβλία που αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις αυτές. Ιδιαίτερα, θα πρέπει να αναφερθεί η δράση του συμπλόκου 2 το οποίο σε δόση 100nM προκαλεί πτώση του ποσοστού των σχηματιζόμενων αποικιών στο 0% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε όλες τις κυτταρικές σειρές και το σύμπλοκο 1 το οποίο σε δόση 100nM προκαλεί πτώση του ποσοστού των σχηματιζόμενων αποικιών στο 0% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στα κύτταρα MCF-7. Ο θάνατος των κυττάρων στην περίπτωση αυτή μπορεί να οφείλεται σε απόπτωση η οποία μπορεί να προκληθεί από την παρουσία μόνιμων βλαβών του DNA των κυττάρων. Κάτι τέτοιο καθίσταται αρκετά πιθανό, αφού τα οργανοκασιτερικά παράγωγα έχουν την ικανότητα να προκαλούν οξειδωτικές βλάβες στο DNA του κυττάρου (Liu, 2006). Αντίθετα, το σύμπλοκο 5 δεν εμφάνισε τέτοια δράση εμφανίζοντας στατιστικά μη σημαντική μείωση του αριθμού των αποικιών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε όλες τις χρησιμοποιούμενες δόσεις. Η δράση αυτή του συμπλόκου σχετίζεται και με την εμφάνιση της μέγιστης κυτταροτοξικής του δράσης μετά από 24h επώασης. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό το φαινόμενο είναι ότι το σύμπλοκο 5 δεν προκαλεί μόνιμες βλάβες στο DNA των κυττάρων αλλά προκαλεί κυτταρικό θάνατο με διαφορετικό μηχανισμό. Στην περίπτωση αυτή ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να οφείλεται στην αναστολή της σύνθεσης μακρομορίων, την παρεμπόδιση της παραγωγής ενέργειας από τα μιτοχόνδρια, τη μείωση της σύνθεσης του DNA ή στην απευθείας επίδραση των συμπλόκων στην κυτταρική μεμβράνη η οποία οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού ασβεστίου (Aw 1990, Viviani 1996). Βέβαια, ακόμη και για τα σύμπλοκα 1-4 δεν μπορεί να αποκλειστεί και η συνύπαρξη κάποιου άλλου μηχανισμού από αυτούς που αναφέρθηκαν παραπάνω που θα μπορούσε να οδηγήσει σε θάνατο των καρκινικών κυττάρων.

Ο κύριος μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου που προκαλούν τα σύμπλοκα 1,2,4 και 5 είναι η απόπτωση και μάλιστα η δράση τους είναι δόσοεξαρτώμενη με μεγαλύτερο ποσοστό απόπτωσης να εμφανίζεται στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις

των συμπλόκων. Η απόπτωση μπορεί να οφείλεται σε βλάβη του DNA για τα σύμπλοκα 1,2 και 4 όπως φαίνεται και από την ικανότητά τους να προκαλούν αναστολή της ικανότητας σχηματισμού αποικιών. Αντίθετα, για το σύμπλοκο 5 η απόπτωση δε φαίνεται να οφείλεται σε βλάβη του DNA αλλά θα μπορούσε να εμπλέκεται άλλος μηχανισμός. Ένας πιθανός μηχανισμός δράσης του συμπλόκου αυτού είναι η αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου η οποία έχει βρεθεί ότι μπορεί να αποτελεί μηχανισμό δράσης των οργανοκασσιτερικών συμπλόκων (Aw 1990, Viviani 1996) και η οποία οδηγεί τελικά σε απόπτωση του κυττάρου. Η δράση αυτή σχετίζεται με την παρουσία του συμπλόκου στο θρεπτικό μέσο και αναστέλλεται μετά την απομάκρυνσή του από αυτό. Φαίνεται ότι η διαφορά στη δομή του συμπλόκου αυτού σε σχέση με τα σύμπλοκα 1-4 δεν του επιτρέπει να προκαλέσει βλάβη του DNA του κυττάρου.

5.2 In vivo πειράματα

Το σύμπλοκο τρι-φαίνυλο-όρθο-υδρόξυβενζοϊκός κασσίτερος (σύμπλοκο 1), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τα in vivo πειράματα της εν λόγω διδακτορικής διατριβής εμφάνισε σημαντική τοξικότητα μετά από εφάπαξ χορήγηση σε επίμυες wistar. Πιο συγκεκριμένα, το 90% των πειραματοζώων κατέληξαν μια ώρα μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του συμπλόκου σε δόση 100mg/kg και το 40% των πειραματοζώων κατέληξαν μια ημέρα μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του συμπλόκου σε δόση 10mg/kg. Τα ζώα αυτά παρουσίασαν έκδηλη συμπτωματολογία από το ΚΝΣ (σπασμοί, καταστολή) η οποία επιβεβαιώνεται και από την ανεύρεση ήπιου εγκεφαλικού οιδήματος κατά την παθολογοανατομική μελέτη των οργάνων των πειραματοζώων. Από τα υπόλοιπα παθολογοανατομικά ευρήματα προέχουν από το ήπαρ η διάταση των ηπατικών κολποειδών, από τους νεφρούς η αρχόμενη σωληναριακή νέκρωση και από τους πνεύμονες η ήπια σύμπτυξη των πνευμονικών κυψελίδων. Τα παραπάνω ευρήματα είναι χαρακτηριστικά οξείας δηλητηρίασης με τριαλκυλο- και τετραλκυλο παράγωγα του κασσιτέρου (Winship KA. 1988, Κουτσελίνης 1997). Βέβαια κανένα από τα ευρήματα αυτά δεν είναι από μόνο του ικανό να προκαλέσει θάνατο των επίμυων ο οποίος πιθανότατα οφείλεται σε μεταβολικές επιδράσεις του συμπλόκου. Μια τέτοια επίδραση θα μπορούσε να είναι η αναστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και της υδρόλυσης του ATP που προκαλείται από τα τριαλκυλο- και τετραλκυλο παράγωγα του κασσιτέρου η οποία οδηγεί τελικά σε μεταβολική οξέωση (Matsuno-Yagi A , 1993). Η μεταβολική οξέωση μπορεί να είναι υπεύθυνη και για την αναπνοή τύπου Kussmaul την οποία εμφάνισαν τα πειραματοζώα πριν επέλθει ο θάνατος. Επίσης, η εικόνα παραλυτικού ειλεού που εμφάνισαν τα πειραματοζώα μπορεί να οφείλεται σε χημική περιτονίτιδα από την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του συμπλόκου.

Σημαντικό πρόβλημα από τη χορήγηση του συμπλόκου αυτού είναι η τάση που έχουν τα τετρα-υποκατεστημένα σύμπλοκα του κασσιτέρου να χάνουν *in vivo* μια αρυλ- ομάδα με τη δράση ενζύμων όπως είναι η αρωματάση (Nakanishi, 2006). Επομένως, είναι πιθανό να έχει προκύψει το αντίστοιχο τρις-υποκατεστημένο μόριο το οποίο θα μπορούσε να αποτελεί και τη δραστική μορφή του συμπλόκου *in vivo*. Η ενεργοποίηση του μορίου αυτού πιθανότατα γίνεται με υδρόλυση της υδρόφιλης ομάδας του όρθο-υδρόξυ βενζοϊκού οξέως, οπότε το σύμπλοκο καθίσταται ικανό να προσβάλλει μοριακούς στόχους στο κύτταρο όπως είναι το DNA και διάφορες πρωτεΐνες (Jones 2007).

Τα πειραματόζωα τα οποία έλαβαν ποσότητα συμπλόκου 1mg/kgr καθώς επίσης και τα πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου δεν εμφάνισαν αλλοιώσεις κατά τον παθολογοανατομικό έλεγχο. Επομένως, η δόση αυτή του συμπλόκου δεν μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα δηλητηρίασης και παθολογοανατομικές αλλοιώσεις στους επίμυες.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων υποξείας τοξικότητας τα πειραματόζωα τα οποία έλαβαν ενδοπεριτοναϊκώς τη μεγαλύτερη δόση (1mg/kg/day) για χρονικό διάστημα 30 ημερών εμφάνισαν ελάχιστο οίδημα των ουροφόρων σωληναρίων χωρίς να υπάρχουν παθολογικές αλλοιώσεις στα υπόλοιπα όργανα. Αυτό καθιστά τη χορήγηση του συμπλόκου στο παραπάνω δοσολογικό σχήμα ασφαλή και για το λόγω αυτό επιλέχτηκε ως θεραπευτικό σχήμα για τον έλεγχο της αντικαρκινικής δράσης του συμπλόκου.

Κατά τη μελέτη της αντικαρκινικής δράσης του συμπλόκου 1 παρατηρήθηκε σημαντική παράταση του χρόνου ζωής των πειραματόζωων $T/C\% = 217,72\%$ αλλά και αναστολή της ανάπτυξης του όγκου κατά $TWI\% = 60,16\%$. Δηλαδή, το σύμπλοκο 1 θα μπορούσε ενδεχομένως να συμβάλει στην παράταση ζωής των ασθενών με όγκους μαλακών μορίων. Πειράματα με ανάλογα σύμπλοκα του κασσιτέρου έχουν δείξει μικρότερες τιμές $T/C\%$ (Syng-Ai C 2001) και ανάλογες τιμές $TWI\%$ (Verginadis II et al 2010, Barbieri F 2000). Η δράση του συμπλόκου επί του όγκου γίνεται εμφανής τόσο στη μακροσκοπική όσο και στην μικροσκοπική εικόνα του όγκου. Υπάρχουν εμφανείς αιμορραγικές περιοχές ενδεικτικές νέκρωσης του όγκου η οποία επιβεβαιώθηκε και κατά τον παθολογοανατομικό έλεγχο. Η επιλογή της χορήγησης ελάχιστης ποσότητας συμπλόκου ημερησίως φαίνεται να είναι επιτυχής εφόσον επιτεύχθηκε σημαντική παράταση του χρόνου ζωής σε συνδυασμό με ελάχιστες παθολογικές αλλοιώσεις από τα διάφορα όργανα. Πιο συγκεκριμένα, οι επίμυες της ομάδας D εμφάνισαν ήπια διάταση των ηπατικών κολποειδών και ήπιο οίδημα των πνευμονικών κυψελίδων, αλλοιώσεις οι οποίες εμφανίστηκαν και στην ομάδα ελέγχου και θα μπορούσαν να αποδοθούν σε μεταβολικές διαταραχές και την υποπρωτεϊναιμία την οποία προκαλούν οι ταχέως αναπτυσσόμενοι όγκοι. Αντίθετα, το ήπιο οίδημα των ουροφόρων σωληναρίων που εμφανίστηκε στην

ομάδα D θα πρέπει να αποδοθεί στη τοξική δράση του συμπλόκου αφού τέτοιες αλλοιώσεις απουσιάζουν από την ομάδα ελέγχου. Επίσης, αντίστοιχες αλλοιώσεις στους νεφρούς εμφανίστηκαν και στα πειράματα υποξείας τοξικότητας και επομένως μπορούμε να επιβεβαιώσουμε την παραπάνω υπόθεση. Βέβαια, οι αλλοιώσεις αυτές είναι ελάχιστες και θα μπορούσαν ενδεχομένως να προληφθούν με την καλή ενυδάτωση και τη χορήγηση ενός διουρητικού φαρμάκου, ενώ δεν αποτελούν κίνδυνο για τη ζωή του ασθενούς.

Όσον αφορά την πνευμονική μετάσταση που εμφανίστηκε σε ένα από τα πειραματόζωα της ομάδας D που έλαβε το σύμπλοκο, φαίνεται ότι ο μεταστατικός όγκος εμφανίζει διαφορετικούς χαρακτήρες από την πρωτοπαθή εστία και φαίνεται να είναι ανθεκτικός στη δράση του συμπλόκου. Αυτό γίνεται εμφανές τόσο από τη μακροσκοπική εικόνα όσο και από τον παθολογοανατομικό έλεγχο κατά τον οποίο δεν ανευρέθηκαν στοιχεία νέκρωσης στη μεταστατική εστία. Το χαρακτηριστικό αυτό μπορεί να οφείλεται σε έναν από τους μηχανισμούς ανάπτυξης αντίστασης των καρκινικών κυττάρων ενάντια στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα όπως είναι η μεταβολή της διαβατότητας της κυτταρικής μεμβράνης προς το φάρμακο, η αύξηση της δραστηριότητας των αντλιών αποβολής του φαρμάκου, η αύξηση της δραστηριότητας των μεταβολικών οδών που προσβάλλονται από το φάρμακο, η ανάπτυξη παρακαμπτήριων μεταβολικών οδών, η αύξηση της ειδικότητας των υποδοχέων, η επιδιόρθωση αλλοιώσεων του DNA, η ανάπτυξη ανταγωνιστών του φαρμάκου, η ανάπτυξη αναστολέων του φαρμάκου, η απενεργοποίηση του φαρμάκου (Gottesman, 2002).

Στο πειραματόζωο αυτό παρατηρήθηκε και πλήρης εξαφάνιση του όγκου από την πρωτοπαθή εστία και αντικατάστασή του από μια μικρή αποστηματική κοιλότητα. Απουσία της μετάστασης θα μπορούσαμε να αναφερθούμε σε πλήρη ίαση χωρίς να υπάρχει ανάγκη χειρουργικής αφαίρεσης του όγκου.

Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι το σύμπλοκο 1 θα μπορούσα να χρησιμοποιηθεί ως χημειοθεραπευτικό για την αντιμετώπιση όγκων μαλακών μορίων καθώς εμφανίζει σημαντική παράταση του χρόνου επιβίωσης, σημαντική ελάττωση του ρυθμού ανάπτυξης του όγκου και ελάχιστες αλλοιώσεις στα όργανα-στόχους των οργανοκασσιτερικών παραγώγων.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα διδακτορική διατριβή μπορούν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα :

- Τα οργανομεταλλικά σύμπλοκα του που ελέγχθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή εμφανίζουν σημαντική κυτταροτοξική δράση ενάντια σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές (σαρκώματα και ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους).
- Κανένα από τα σύμπλοκα δεν εμφανίζει σημαντική κυτταροτοξική δράση στις χρησιμοποιούμενες δόσεις ενάντια στα κύτταρα MRC-5 (φυσιολογικοί ινοβλάστες πνεύμονα)
- Τα σύμπλοκα αυτά προκαλούν κυτταρικό θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης και μάλιστα ο βαθμός του αποπτωτικού θανάτου που προκαλείται εξαρτάται από τη χορηγούμενη δόση του εκάστοτε συμπλόκου
- Τέσσερα από τα πέντε σύμπλοκα που δοκιμάστηκαν φαίνεται να προκαλούν μόνιμες βλάβες στο DNA του κυττάρου
- Ένα από τα πέντε σύμπλοκα που δοκιμάστηκαν φαίνεται να προκαλεί απόπτωση με διαφορετικό μηχανισμό, ενδεχομένως μέσω της αύξησης του κυτταροπλασματικού ασβεστίου
- Το σύμπλοκο το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τα in vivo πειράματα προκάλεσε βλάβες στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο ήπαρ, τους νεφρούς και τους πνεύμονες κατά την μελέτη της οξείας τοξικότητας του συμπλόκου
- Κατά τη μελέτη της υποξείας τοξικότητας παρουσιάστηκε ήπια νεφρική βλάβη με το χρησιμοποιούμενο δοσολογικό σχήμα
- Το σύμπλοκο 1 εμφάνισε σημαντική αντικαρκινική δράση με παράταση του χρόνου επιβίωσης των επίμυων της τάξης του 200%, αλλά και σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του όγκου
- Κατά τον παθολογοανατομικό έλεγχο φαίνεται να προκαλείται σε σημαντικό βαθμό νέκρωση του όγκου
- Οι μεταστατικές εστίες είναι ανθεκτικές στη δράση του συμπλόκου

7. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

Περίληψη στην Ελληνική

«Μελέτη των μηχανισμών δράσης συμπλόκων μετάλλων με κυτταροτοξική δράση»

Η χημειοθεραπεία αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της θεραπευτικής του καρκίνου. Τα χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά φάρμακα εμφανίζουν περιορισμένο φάσμα δράσης και σημαντικές παρενέργειες. Για το λόγω αυτό η έρευνα για την ανεύρεση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων είναι αρκετά εκτεταμένη. Μετά την εισαγωγή της σισπλατίνης στην χημειοθεραπεία του καρκίνου, η έρευνα αυτή έχει στραφεί στον έλεγχο της πιθανής αντικαρκινική δράσης συμπλόκων του λευκόχρυσου αλλά και άλλων μετάλλων. Μεταξύ αυτών, τα οργανομεταλλικά σύμπλοκα του κασσιτέρου εμφανίζουν σημαντική δράση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή ερευνήθηκε η δράση ορισμένων συμπλόκων του κασσιτέρου με όρθο- και πάρα-υδροξυβενζοϊκό οξύ όσον αφορά την κυτταροτοξικότητα που εμφανίζουν ενάντια σε διάφορες καρκινικές σειρές, τον μηχανισμό με τον οποίο προκαλούν κυτταρικό θάνατο, τις τοξικές τους επιδράσεις σε επίπεδο οργανισμού και την αντικαρκινική τους δράση σε πειραματικά μοντέλα όγκων σε πειραματόζωα. Τα σύμπλοκα του κασσιτέρου που ελέγχθηκαν ήταν της μορφής $[R_3Sn(HL)]$, (όπου $HL = o\text{-}H_2BZA$ και $R = Ph-$ (1) ή $R = n\text{-}Bu-$ (3), ή $HL = p\text{-}H_2BZA$ και $R = Ph-$ (2) ή $R = n\text{-}Bu-$ (4)) και της μορφής $[R_2Sn(HL)_2]$ (όπου $HL = o\text{-}H_2BZA$ και $R = n\text{-}Bu-$ (5)).

Για την απάντηση των ανωτέρω ερωτημάτων πραγματοποιήθηκε υπολογισμός της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη χρήση MTT, μελέτη της ικανότητας των συμπλόκων να προκαλούν αναστολή του σχηματισμού αποικιών και προσδιορισμός της απόπτωσης και της νέκρωσης με κυτταρομετρία ροής. Επίσης πραγματοποιήθηκε έλεγχος της οξείας και της υποξείας τοξικότητας σε επίμυες *wistar* καθώς επίσης και έλεγχος της αντικαρκινικής δράσης του συμπλόκου μετά από ενοφθαλμισμό λειομυοσαρκωματικών κυττάρων σε επίμυες *wistar*.

Τα *in vitro* πειράματα έδειξαν ότι όλα τα σύμπλοκα του κασσιτέρου που εξετάστηκαν εμφάνισαν σημαντική κυτταροτοξική (δράση της τάξης των nM) σε διάφορες καρκινικές σειρές (LMS, HeLa, MCF-7, U2Os) με μικρή επίδραση ενάντια σε κύτταρα MRC-5 (φυσιολογικοί ινοβλάστες πνεύμονα). Επίσης, τα σύμπλοκα 1-4 αναστέλλουν την ικανότητα σχηματισμού αποικιών, ενώ όλα τα σύμπλοκα φαίνεται να προκαλούν κυτταρικό θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης. Τα *in vivo* πειράματα έδειξαν ότι το σύμπλοκο 1 το οποίο δοκιμάστηκε εμφανίζει σημαντική

τοξική δράση μετά από εφάπαξ χορήγηση στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο ήπαρ, τους νεφρούς και τους πνεύμονες. Από τις δράσεις αυτές μόνο μια ήπια νεφρική βλάβη εμφανίζεται κατά τη μελέτη της υποξείας τοξικότητας. Επίσης, το σύμπλοκο αυτό χορηγούμενο σε δόση 1mg/kg/day αυξάνει το χρόνο επιβίωσης κατά T/C% = 217,72% αλλά και το ρυθμό ανάπτυξης του όγκου κατά TWI% = 60,16% σε καρκινοπαθείς επίμυες wistar. Η δράση του συμπλόκου είναι εμφανής και κατά τον παθολογοανατομικό έλεγχο στον οποίο εμφανίζεται νέκρωση του όγκου μετά από τη χορήγηση του συμπλόκου σε ποσοστό 70-80%. Τέλος, οι μεταστατικές εστίες φαίνεται να είναι ανθεκτικές στη δράση του συμπλόκου.

Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεκπεραίωση της εν λόγω διδακτορικής διατριβής εμφάνισαν σημαντική κυτταροτοξική δράση *in vitro* αλλά και αντικαρκινική δράση *in vivo* με ελάχιστες παρενέργειες και για το λόγω αυτό θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως χημειοθεραπευτικοί παράγοντες.

Περίληψη στην Αγγλική

“Study of the mechanism of action of metal complexes with cytotoxic action”

Chemotherapy is a major field of cancer therapy, although the drugs used as chemotherapeutic agents show great selectivity and important side effects. Therefore, the research for new anticancer drugs is urgent. Ever since cisplatin was introduced in oncology, many non conventional platinum compounds and non platinum metal complexes were designed and tested. Among them, organotin derivatives have shown high cytotoxicity and were found to be active against a large variety of tumors *in vivo* and *in vitro*.

In this PhD thesis we examined the cytotoxic effects of novel organotin compounds (IV) with ortho- and para-hydroxybenzoic acid against several cancer cell lines, the mechanism of cellular death caused by these complexes and the *in vivo* effects of these complexes in regard of their toxicity and anticancer activity in tumor bearing wistar rats. The organotin complexes that were tested were of formulae $[R_3Sn(HL)]$, (where HL= o-H₂BZA and R = Ph- (**1**) or R= *n*-Bu- (**3**), or HL= p-H₂BZA and R = Ph- (**2**) or R= *n*-Bu- (**4**)) and $[R_2Sn(HL)_2]$ (where HL= o-H₂BZA and R= *n*-Bu- (**5**)).

In order to answer to these questions we used MTT assay, colony efficiency assay and flow cytometry. Furthermore, we tested the acute and subacute toxicity and the antitumor activity of complex 1 in tumor bearing wistar rats.

In vitro experiments showed that all the tested organotin (IV) complexes show important cytotoxic activity (in the range of nM) in several cancer cell lines (LMS, HeLa, MCF-7, U2Os) with minor effects against MRC-5 cells (normal lung fibroblasts). Complexes 1-4 seem to inhibit the formation of colonies whereas all complexes cause apoptotic cellular death. *In vivo* experiments showed neurotoxicity, hepatotoxicity, kidney and lung toxicity after a single intraperitoneal injection of the complex 1, but only mild kidney damage during the study of subacute toxicity of this complex. Moreover, complex 1 at doses 1mg/kg/day managed to prolong median survival time (T/C% = 217,72%) and reduce tumor weight (TWI% = 60,16%) when given in tumor bearing wistar rats. This action was confirmed during the pathologic-anatomic analysis with the tumor appearing necrosis of about 70-80%. Metastatic sites seem to be resistant to the complex.

Therefore, we could come to the conclusion that all the complexes that were tested showed important cytotoxic effect *in vitro*, while complex 1 showed important anticancer effect *in vivo* with mild side effects and therefore it could be used as a chemotherapeutic agent.

8.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aaronsons S. A. (1991), Growth factors and cancer, *Science* 254: 1146-1153
2. Abdellah MA, Hadjikakou SK, Hadjiliadis N, Kubicki M, Bakas T, Kourkoumelis N, Simos YV, Karkabounas S, Barsan MM, Butler IS. (2009) Synthesis, characterization, and biological studies of organotin(IV) derivatives with o- or p-hydroxybenzoic acids. *Bioinorg Chem Appl.* 2009:542979. Epub 2009 Apr 15.
3. Abeysinghe PM, Harding MM. (2007) Antitumour bis(cyclopentadienyl) metal complexes: titanocene and molybdocene dichloride and derivatives. *Dalton Trans.* 2007 Aug 28;(32):3474-82. Epub 2007 Jul 20.
4. Aguirre JD, Angeles-Boza AM, Chouai A, Turro C, Pellois JP, Dunbar KR. (2009) Anticancer activity of heteroleptic diimine complexes of dirhodium: a study of intercalating properties, hydrophobicity and in cellulo activity. *Dalton Trans.* 2009 Dec 28;(48):10806-12. Epub 2009 Oct 30.
5. Alama A, Tasso B, Novelli F, Sparatore F. (2009) Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotins as antitumor agents. *Drug Discov Today.* 2009 May;14(9-10):500-8. Epub 2009 Feb 11. Review.
6. Albiñ A, Johnsen JI, Henriksson MA. 2010, MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. *Adv Cancer Res.* 107:163-224.
7. Alessio E, Mestroni G, Bergamo A, Sava G. (2004) Ruthenium antimetastatic agents. *Curr Top Med Chem.* 2004;4(15):1525-35. Review.
8. Andorsky DJ, Timmerman JM. (2008) Interleukin-21: biology and application to cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2008 Sep;8(9):1295-307. Review.
9. Aschner M, Aschner JL. (1992) Cellular and molecular effects of trimethyltin and triethyltin: relevance to organotin neurotoxicity. *Neurosci Biobehav Rev.* 1992 Winter;16(4):427-35.
10. Carmen Avendaño, J. Carlos Menéndez, (2008) *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, Elsevier, 2008
11. Aw, T.Y. Nicotera P, Manzo L, Orrenius S.. (1990) Tributyltin stimulates apoptosis in rats thymocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 283, 46-50
12. Baik MH, Friesner RA, Lippard SJ (2003), "Theoretical study of Cisplatin binding to purine bases: Why does Cisplatin prefers guanine over adenine?", *J Am Chem Soc* 125: 14082-1492, 2003
13. Barbieri F, Viale M, Sparatore F, Favre A, Cagnoli M, Bruzzo C, Novelli F, Alama A. (2000) Cytotoxicity in vitro and preliminary antitumor activity in vivo of a novel organotin compound. *Anticancer Res.* 2000 Mar-Apr;20(2A):977-80.
14. Barnard, P.J. and Bernes-Price, S.J. (2007) Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. *Coord. Chem. Rev.* 251, 1889-1902
15. Barnes KR, Lippard SJ: "Cisplatin and related anticancer drugs: Recent advances and insights", *Met Ions Biol Syst* 42: 143-177, 2004.

16. Barot G, Kimberly R. Shahi, Michael R. Roner and Charles E. Carraher (2007) Synthesis, structural characterization and ability to inhibit cancer growth of organotin poly(ethyleneglycols). *J. inorg. Organomet. Polym.* 17, 595-602
17. Bergamo A, Gagliardi R, Scarcia V, Furlani A, Alessio E, Mestroni G, Sava G. (1999) In vitro cell cycle arrest, in vivo action on solid metastasizing tumors, and host toxicity of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 Apr;289(1):559-64.
18. Berx G, van Roy F. (2009), Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1(6):a003129.
19. Blume –Jensen P. and T. Hunter, (2001), Oncogenic kinase signaling, *Nature* 411: 355-365
20. Blum RH, Carter SK. (1974) Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann Intern Med.* 1974 Feb;80(2):249-59. Review. No abstract available.
21. Boyer IJ. (1989) Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology.* 1989 May 15;55(3):253-98.
22. Brabec V, Nováková O. (2006) DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resist Updat.* 2006 Jun;9(3):111-22. Epub 2006 Jun 21. Review.
23. Brabec V, Kasparkova J. (2002) Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs. *Drug Resist Updat.* 2002 Jul-Aug;5(3-4):147-61. Review.
24. Brahim-Loghmari S, Kenani A. (2009) [Apoptosis induced by bleomycin: influence of cellular models]. *Arch Inst Pasteur Tunis.* 2009;86(1-4):15-25. Review. French.
25. Camenisch U, Nägeli H. 2008, XPA gene, its product and biological roles. *Adv Exp Med Biol.* 637:28-38.
26. Cánepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marazita MC, Carcagno AL, Sirkin PF, Ogara MF. 2007, INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life.* 59(7):419-26.
27. Carraher C.E., Michael R. Roner, Kimberly Shahi, Yuki Ashida and Girish Barot (2008) Synthesis and initial cell lines result of organotin polyethers containing diethylstilbestrol. *J. inorg. Organomet. Polym.* 18, 180-188
28. Caruso F, Rossi M. (2004) Antitumor titanium compounds and related metallocenes. *Met Ions Biol Syst.* 2004;42:353-84.
29. Casini A, Hartinger C, Gabbiani C, Mini E, Dyson PJ, Keppler BK, Messori L. (2008) Gold (III) compounds as anticancer agents : relevance of gold-protein interactions for their mechanism of action. *J. Inorg. Biochem.* 102, 564-575
30. Chen D, Milacic V, Frezza M, Dou QP. (2009) Metal complexes, their cellular targets and potential for cancer therapy. *Curr Pharm Des.* 2009;15(7):777-91. Review.

31. Bruce A. Chabner, Dan L. Longo, (2010) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*, Lippincott Williams & Wilkins, 2010
32. Chasapis CT, Hadjidakou SK, Garoufis A, Hadjiliads N, Bakas T, Kubicki M, Ming Y. (2004) Organotin(IV) derivatives of L-cysteine and their in vitro anti-tumor properties. *Bioinorg Chem Appl.* 2004;43-54.
33. Chikh Z, Ha-Duong NT, Miquel G, El Hage Chahine JM. (2007) Gallium uptake by transferrin and interaction with receptor 1. *J Biol Inorg Chem.* 2007 Jan;12(1):90-100. Epub 2006 Sep 19.
34. Chitambar CR. (2004) Gallium compounds as antineoplastic agents. *Curr Opin Oncol.* 2004 Nov;16(6):547-52. Review.
35. Chu E, DeVita VT, Jr: "Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual. 2006", Jones & Barlett, New York, 2007.
36. Colditz, G. A., T. A. Sellers and E. Trapido. (2006). Epidemiology – Identifying the causes and preventability of cancer? *Nature Rev. Cancer* 6:75-83
37. Collery P, Domingo JL, Keppler BK. (1996) Preclinical toxicology and tissue gallium distribution of a novel antitumour gallium compound: tris (8-quinolinolato) gallium (III). *Anticancer Res.* 1996 Mar-Apr;16(2):687-91.
38. Collier, W. A., and Krauss, F., *Zeitschrift fur Krebsforschung* 1931, 34, 527-530
39. Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman (2007), *The cell, A molecular approach*, 4th edition, 2007, ASM Press, Washington D.C.
40. Cooper G. M. (1995) *Oncogenes 2nd edition* Boston : Jones and Barlett, 1995
41. Cornelisse CJ, Cornelis RS, Devilee P. (1996), Genes responsible for familial breast cancer. *Pathol Res Pract.* 192(7):684-93.
42. Cullen KJ, Yang Z, Schumaker L, Guo Z. (2007) Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *J Bioenerg Biomembr.* 2007 Feb;39(1):43-50. Review.
43. Cvitkovic F, Armand JP, Tubiana-Hulin M, Rossi JF, Warrell RP Jr. (2006) Randomized, double-blind, phase II trial of gallium nitrate compared with pamidronate for acute control of cancer-related hypercalcemia. *Cancer J.* 2006 Jan-Feb;12(1):47-53.
44. Damayanthi Y, Lown JW. (1998) Podophyllotoxins: current status and recent developments. *Curr Med Chem.* 1998 Jun;5(3):205-52. Review.
45. Danielian S. (1993), The tyrosine kinases of the Src family: properties and roles in cells]. *Pathol Biol.* 41(7):619-35.
46. Diaz-Cano SJ. (2008), General morphological and biological features of neoplasms: integration of molecular findings. *Histopathology.* 53(1):1-19.
47. Dillman RO. (2011) *Cancer immunotherapy. Cancer Biother Radiopharm.* 2011 Feb;26(1):1-64.
48. Donate LE, Blasco MA. (2011), Telomeres in cancer and ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 366(1561):76-84.

49. Duensing A, Duensing S. (2010) Centrosomes, polyploidy and cancer. *Adv Exp Med Biol.* 676:93-103.
50. Ευθυμίου Σιβρίδη, Παθολογική Ανατομική, (2007), Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδη, Αθήνα 2007, τόμος 1^{ος}, 149-150
51. Evangelou AM. (2002) Vanadium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002 Jun;42(3):249-65. Review.
52. Peter B. Farmer, John M. Walker (1985), *The Molecular basis of cancer*, Routledge, 1985
53. Fialkow, P. J. (1979). Clonal origin of human tumors. *Ann. Rev. Med.* 30:135-143
54. Fidler, I. J. (2002), The pathogenesis of cancer metastasis : the “seed and soil” hypothesis revised. *Nature Rev. Cancer* 3:1-6
55. Fischer DS, Durivage HJ, Knobf MT, Beaulieu NJ (2003), “The Cancer Chemotherapy Handbook, 6th edition”, Elsevier Health Sciences, New York, 2003.
56. Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.* 29:15-18
57. Fu Y, Li S, Zu Y, Yang G, Yang Z, Luo M, Jiang S, Wink M, Efferth T. (2009) Medicinal chemistry of paclitaxel and its analogues. *Curr Med Chem.* 2009;16(30):3966-85.
58. Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. (2003), Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action : enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem. Rev.* 103, 645-662
59. Φούντζηλας Γ: "Βασικές Αρχές Θεραπείας του Καρκίνου", Εκδόσεις University Studio, Θεσσαλονίκη, 2006.
60. Galanski M, Arion VB, Jakupec MA, Keppler BK. (2003), Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes. *Curr Pharm Des.* 2003;9(25):2078-89. Review.
61. Garbutcheon-Singh KB, Grant MP, Harper BW, Krause-Heuer AM, Manohar M, Orkey N, Aldrich-Wright JR. (2011) Transition metal based anticancer drugs. *Curr Top Med Chem.* 2011;11(5):521-42. Review.
62. Gao F, Chao H, Ji LN. (2008) DNA binding, photocleavage, and topoisomerase inhibition of functionalized ruthenium(II)-polypyridine complexes. *Chem Biodivers.* 2008 Oct;5(10):1962-79. Review.
63. Gerber GB, Léonard A. (1997) Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of germanium compounds. *Mutat Res.* 1997 Dec;387(3):141-6. Review.
64. Gielen, M. and Tiekink, E.R.T. (2005) Tin compounds and their therapeutic potential. In *metallotherapeutic drugs and metal based diagnostic agents. The use of metals in medicine* (Gielen, M. and Tiekink, E.R.T., eds), pp421-439, J. Wiley & Sons

65. Gielen, M. Biesemans M, de Vos D, Willem R. (2000) Synthesis, characterization and in vitro antitumor activity of di- and triorganotin derivatives of polyoxa- and biologically relevant carboxylic acids. *J. inorg. Biochem.* 79, 139-145
66. Michael M. Gottesman, (2002), Mechanisms of cancer drug resistance, *Annual Review of Medicine*, Vol. 53: 615-627 (Volume publication date February 2002)
67. Michael M. Gottesman, Tito Fojo & Susan E. Bates, (2002), Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters, *Nature Reviews Cancer* 2, 48-58 (January 2002)
68. Gratchev A, Strein P, Utikal J, Sergij G., (2003), Molecular genetics of Xeroderma pigmentosum variant. *Exp Dermatol.* 12(5):529-36.
69. Gromer S. et al. (2004) The thioredoxin system-From science to clinic. *Med. Res. Rev.* 24, 40-80
70. Hadjikakou SK, Ozturk II, Xanthopoulou MN, Zachariadis PC, Zartilas S, Karkabounas S, Hadjiliadis N. (2008) Synthesis, structural characterization and biological study of new organotin(IV), silver(I) and antimony(III) complexes with thioamides. *J Inorg Biochem.* 2008 May-Jun;102(5-6):1007-15. Epub 2008 Jan 8.
71. Hadjikakou, S.K. and Hadjiliadis, N. (2008) Antiproliferative and anti-tumor activity of organotin compounds. *Coord. Chem. Rev.* 253, 235-249
72. Hajnóczky G, Csordás G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Sinha Roy S, Yi M. (2006), Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium.* 2006 Nov-Dec;40(5-6):553-60. Epub 2006 Oct 30. Review.
73. Hanahan, D. and R. A. Weinberg, (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70
74. Harding MM, Mokdsi G. (2000) Antitumour metallocenes: structure-activity studies and interactions with biomolecules. *Curr Med Chem.* 2000 Dec;7(12):1289-303.
75. Hartinger CG, Jakupec MA, Zorbas-Seifried S, Groessl M, Egger A, Berger W, Zorbas H, Dyson PJ, Keppler BK. (2008) KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. *Chem Biodivers.* 2008 Oct;5(10):2140-55. Review.
76. Harris M. (2004) Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol.* 2004 May;5(5):292-302. Review.
77. Herr HW, Morales A. (2008) History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *J Urol.* 2008 Jan;179(1):53-6. Epub 2007 Nov 13.
78. Hosoya K, Kyoko H, Toyooka N, Kato A, Orihashi M, Tomi M, Tachikawa M. (2008) Evaluation of amino acid-mustard transport as L-type amino acid

- transporter 1 (LAT1)-mediated alkylating agents. *Biol Pharm Bull.* 2008 Nov;31(11):2126-30.
79. Höti N, Zhu DE, Song Z, Wu Z, Tabassum S, Wu M. (2004) p53-dependent apoptotic mechanism of a new designer bimetallic compound tri-phenyl tin benzimidazolethiol copper chloride (TPT-CuCl₂): in vivo studies in Wistar rats as well as in vitro studies in human cervical cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Oct;311(1):22-33. Epub 2004 Jun 1. Erratum in: *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Dec;311(3):1281.
80. Jakupec MA, Keppler BK. (2004) Gallium in cancer treatment. *Curr Top Med Chem.* 2004;4(15):1575-83. Review.
81. Chris J Jones and John R Thornback (2007) in *Medicinal applications of coordination chemistry*, RSC Publishing, 2007, p 272-273
82. Jung Y., Lippard SJ. (2007) Direct cellular responses to platinum induced DNA damage. *Chem. Rev.* 107, 1387-1407
83. Dr. S. S. Kadam,(2008), *Principles of Medicinal Chemistry* , Volume 1, Pragati Books Pvt. Ltd., 2008
84. Katsaros N, Anagnostopoulou A. (2002) Rhodium and its compounds as potential agents in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002 Jun;42(3):297-308.
85. Kelland L. (2007) Broadening the clinical use of platinum drug-based chemotherapy with new analogues, satraplatin and picoplatin. *Expert Opin. Investing. Drugs* 16, 1009-1021
86. Roger John Benjamin King, Mike W. Robins (2006), *Cancer biology*, Pearson Education, 2006
87. Kirschner K, Melton DW., (2010), Multiple roles of the ERCC1-XPF endonuclease in DNA repair and resistance to anticancer drugs. *Anticancer Res.* 30(9):3223-32.
88. Kivistö KT, Kroemer HK, Eichelbaum M. (1995) The role of human cytochrome P450 enzymes in the metabolism of anticancer agents: implications for drug interactions. *Br J Clin Pharmacol.* 1995 Dec;40(6):523-30. Review.
89. Knipp M. (2009) Metallothioneins and platinum(II) anti-tumor compounds. *Curr Med Chem.* 2009;16(5):522-37. Review.
90. Korfel A, Scheulen ME, Schmoll HJ, Gründel O, Harstrick A, Knoche M, Fels LM, Skorzec M, Bach F, Baumgart J, Sass G, Seeber S, Thiel E, Berdel WE. (1998), Phase I clinical and pharmacokinetic study of titanocene dichloride in adults with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 1998 Nov;4(11):2701-8.
91. Kostova I. (2006) Ruthenium complexes as anticancer agents. *Curr Med Chem.* 2006;13(9):1085-107.
92. Αγγελική Κουρουνάκη, Σημειώσεις μοριακής φαρμακολογίας, Αθήνα, 2006
93. Αντ. Κουτσελίνη, Τοξικολογία, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα, 1997

94. Ε. Κωστάκη, Γ. Φυτά, Π. Μαράκου, Σημειώσεις φαρμακευτική χημείας με στοιχεία Medicinal chemistry, Αθήνα, 1994
95. Laird AD, Shalloway D. (1997), Oncoprotein signalling and mitosis. *Cell Signal.* 9(3-4):249-55.
96. Levina A, Mitra A, Lay PA. (2009) Recent developments in ruthenium anticancer drugs. *Metallomics.* 2009 Nov;1(6):458-70. Epub 2009 Aug 13. Review.
97. Lissauer, Berliner Klin. (1865), *Wochenschrift* 1865, vol.2, 403-404
98. Liu, HG, Wang Y, Lian L, Xu LH. (2006) Tributiltin induces DNA damage as well as oxidative damage in rats. *Environ. Toxicol.* 21, 166-171
99. Lümmen G, Sperling H, Luboldt H, Otto T, Rübber H. (1998) Phase II trial of titanocene dichloride in advanced renal-cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1998;42(5):415-7.
100. Mailman RB, Lewis MH. (1987), Neurotoxicants and central catecholamine systems. *Neurotoxicology.* 1987 Spring;8(1):123-39. Review.
101. Mantri Y, Lippard SJ, Baik MH, (2007), Bifunctional binding of Cisplatin to DNA: Why does Cisplatin form 1,2-intrastrand cross-links with AG but not with GA?, *J Am Chem Soc* 129: 5023-5030, 2007.
102. Maragoudakis ME, Peristeris P, Missirlis E, Aletras A, Andriopoulou P, Haralabopoulos G. (1994) Inhibition of angiogenesis by anthracyclines and titanocene dichloride. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Sep 6;732:280-93.
103. Matsuno-Yagi A, Hatefi Y. (1993) Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation. ATP synthesis by submitochondrial particles inhibited at F₀ by venturicidin and organotin compounds. *J Biol Chem.* 1993 Mar 25;268(9):6168-73.
104. Robert Gilmore McKinnell (1998), *The biological basis of cancer*, Cambridge University Press, 1998
105. John Mendelsohn (2001), *The molecular basis of cancer*, Saunders, 2001
106. Mehlen P, Fearon ER. (2004), Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol.* 15;22(16):3420-8.
107. Mirabelli CK, Badger AM, Sung CP, Hillegass L, Sung CM, Johnson RK, Picker D, Schwartz D, Dorman J, Martellucci S. (1989) Pharmacological activities of spirogermanium and other structurally related azaspiranes: effects on tumor cell and macrophage functions. *Anticancer Drug Des.* 1989 Mar;3(4):231-42.
108. Mirabelli CK, Johnson RK, Hill DT, Faucette LF, Girard GR, Kuo GY, Sung CM, Crooke ST. (1986) Correlation of the in vitro cytotoxic and in vivo antitumor activities of gold(I) coordination complexes. *J Med Chem.* 1986 Feb;29(2):218-23.

109. Mirabelli CK, Johnson RK, Sung CM, Faucette L, Muirhead K, Crooke ST. (1985) Evaluation of the in vivo antitumor activity and in vitro cytotoxic properties of auranofin, a coordinated gold compound, in murine tumor models. *Cancer Res.* 1985 Jan;45(1):32-9.
110. Μπαρμπουνάκη-Κωνσταντάκου Ε: "Χημειοθεραπεία", Εκδ. ΒΗΤΑ Ιατρικές εκδόσεις, Αθήνα, 2004.
111. Mullally A., Ebert BL. (2010), NF1 inactivation revs up Ras in adult acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* 16(16):4074-6.
112. Nakanishi T. (2008) Endocrine disruption by organotin compounds; organotins function as a powerful agonist for nuclear receptors rather than an aromatase inhibitor. *J. toxicol. Sci.* 33, 269-276
113. Nakanishi T, Nishikawa J, Tanaka K. (2006) Molecular targets of organotin compounds in endocrine disruption: do organotin compounds function as aromatase inhibitors in mammals? *Environ Sci.* 2006;13(2):89-100. Review.
114. Nawijn MC, Alendar A, Berns A. (2011), For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 11(1):23-34.
115. S. Nesnow, (1987), Chemical carcinogens a review and analysis of the literature of selected chemicals and the establishment of the Gene-Tox carcinogen data base : A report of the U.S. environmental protection agency Gene-Tox program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 185 1-195
116. Niault TS, Baccarini M. (2010), Targets of Raf in tumorigenesis. *Carcinogenesis.* 31(7):1165-74
117. Nobili S, Mini E, Landini I, Gabbiani C, Casini A, Messori L. (2010) Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies. *Med Res Rev.* 2010 May;30(3):550-80. Review.
118. Nowell, P. C. (1986). Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* 46:2203-2207
119. Olszewski U, Hamilton G. (2010), Mechanisms of cytotoxicity of anticancer titanocenes. *Anticancer Agents Med Chem.* 2010 May;10(4):302-11. Review.
120. Osada, S. et al. (2005), Some organotin compounds enhance histone acetyltransferase activity. *Toxicol. Lett.* 155, 329-335
121. Ott I, Gust R. (2007) Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs. *Arch Pharm (Weinheim).* 2007 Mar;340(3):117-26. Review.
122. Παταριάς Θ. Α., Κομητοπούλου Κ., Κουγιανού Σ. Εισαγωγή στη βιολογία, Αθήνα, 1996
123. Stella Pelengaris, Michael Khan (2006), The molecular biology of cancer, Wiley-Blackwell, 2006

124. Perona R. (2006), Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin Transl Oncol.* 8(2):77-82.
125. Pessoa JC, Tomaz I. (2010) Transport of therapeutic vanadium and ruthenium complexes by blood plasma components. *Curr Med Chem.* 2010;17(31):3701-38.
126. Peyrone M. (1844), Ueber die Einwirkung des Ammonia auf Platin chlorur, *Annals Chem Pharmacol* 51: 1-29, 1844.
127. Piccioli F, Sabatini S, Messori L, Orioli P, Hartinger ChG, Keppler BK. (2004), A comparative study of adduct formation between the anticancer ruthenium(III) compound HInd trans-[RuCl₄(Ind)₂] and serum proteins. *J Inorg Biochem.* 2004 Jun;98(6):1135-42.
128. Burners Price, SJ. Et al (1986), In vivo antitumor activity and in vitro cytotoxic properties of bis[1,2-bis(diphenylphosphino)ethane]gold chloride. *Cancer Res.* 46, 5486-5493
129. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. (2010), DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol.* 2010 May 28;17(5):421-33. Review.
130. Raymond W. Ruddon, (2007), *Cancer biology*, Oxford University Press, 2007
131. Robbins and Cotran, (2010), *Pathologic basis of disease*, 8th edition, 2010
132. Rosenberg B, (1985), Fundamental studies with Cisplatin, *Cancer* 55: 2303-2316, 1985.
133. Rosenberg B, (1977), Noble metal complexes in cancer chemotherapy (Review), *Adv Exp Med Biol* 91: 129-150, 1977
134. Rosenberg B, (1987), *Noble Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, Inorganic and Nutritional Aspects of Cancer Series. Plenum, New York, 1978.
135. Rosenberg B, (1974), *Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy*, Springer-Verlag, Heidelberg, 1974.
136. Rosenberg B, (1973), Platinum coordination complexes in cancer chemotherapy. Review, *Naturwissenschaften* 60: 399-406, 1973.
137. Rosenberg B, Van Camp L, Trosko JE, Mansour VH, (1969), Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents, *Nature* 222: 385-386, 1969.
138. Rosenberg B, Van Camp L, Grimley EB, Thomson AJ, (1967), The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum(IV) complexes, *J Biol Chem.* 242(6): 1347-1352, 1967

139. Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T, (1965), Inhibition of cell division in *Escherichia Coli* by electrolysis products from a platinum electrode, *Nature* 205: 698-699, 1965
140. Roskoski R Jr. (2010), RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 399(3):313-7
141. Russo J, Russo IH. (2006) The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 102(1-5):89-96.
142. Samson MK, Fraile RJ, Baker LH, O'Bryan R. (1980) Phase I-II clinical trial of gallium nitrate (NSC-15200). *Cancer Clin Trials.* 1980 Summer;3(2):131-6.
143. Sarsam SW, Nutt DR, Strohfeldt K, Watson KA. (2011) Titanocene anticancer complexes and their binding mode of action to human serum albumin: a computational study. *Metallomics.* 2011 Feb;3(2):152-61. Epub 2011 Jan 5.
144. Sava G, Bergamo A. (2000) Ruthenium-based compounds and tumour growth control (review). *Int J Oncol.* 2000 Aug;17(2):353-65. Review.
145. Sava G, Pacor S, Bregant F, Ceschia V, Mestroni G. (1990) Metal complexes of ruthenium: antineoplastic properties and perspectives. *Anticancer Drugs.* 1990 Dec;1(2):99-108. Review.
146. Jan H. M. Schellens, Howard L. McLeod, David R. Newell, (2005) *Cancer clinical pharmacology*, Oxford University Press, 2005
147. Schilling T, Keppler KB, Heim ME, Niebch G, Dietzfelbinger H, Rastetter J, Hanauske AR. (1996) Clinical phase I and pharmacokinetic trial of the new titanium complex budotitane. *Invest New Drugs.* 1996;13(4):327-32.
148. Sebastian S, Azzariti A, Silvestris N, Porcelli L, Russo A, Paradiso A. (2010), p53 as the main traffic controller of the cell signaling network. *Front Biosci.* 15:1172-90.
149. Sessa C, ten Bokkel Huinik W, Clavel M, Lev LM, Joss RA, Renard J, Cavalli F. (1989) A phase II study of spirogermanium in patients with advanced malignant lymphoma. *Invest New Drugs.* 1989 Jul;7(2-3):219-22.
150. Singh B, Arlinghaus RB. (1997), Mos and the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res.* 3:251-9.
151. Νικολάου Μ. Σιταρά, *Φαρμακολογία από αμφιθεάτρου*, εκδόσεις cn&n, Αθήνα, 1998
152. Sistonen L, Alitalo K. (1986) Activation of c-ras oncogenes by mutations and amplification. *Ann Clin Res.* 18(5-6):297-303.
153. Skeel RT: "Handbook of Cancer Chemotherapy", Lippincott Williams & Wilkin, New York, 7th ed. 2007.
154. Sporn, M. B. and A. B. Roberts. (1985). Autocrine growth factors and cancer. *Science* 313:745-747

155. Sliwińska U, Pruchnik FP, Pelińska I, Ułaszewski S, Wilczok A, Zajdel A. (2008) Synthesis, structure and antitumor activity of [RhCl₃(N-N)(DMSO)] polypyridyl complexes. *J Inorg Biochem.* 2008 Oct;102(10):1947-51. Epub 2008 Jul 26.
156. Soignet SL, Tong WP, Hirschfeld S, Warrell RP Jr. (1999) Clinical study of an organic arsenical, melarsoprol, in patients with advanced leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999;44(5):417-21.
157. Sorasaene K, Fu PK, Angeles-Boza AM, Dunbar KR, Turro C. (2003) Inhibition of transcription in vitro by anticancer active dirhodium(II) complexes. *Inorg Chem.* 2003 Feb 24;42(4):1267-71.
158. Syng-Ai C, Basu Baul TS, Chatterjee A. (2001) Inhibition of cell proliferation and antitumor activity of a novel organotin compound. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2001;20(4):333-42.
159. Taipale J. and P. A. Beachy (2001), The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer *Nature* 411: 349-354
160. Tan C, Hu S, Liu J, Ji L. (2011) Synthesis, characterization, antiproliferative and anti-metastatic properties of two ruthenium-DMSO complexes containing 2,2'-biimidazole. *Eur J Med Chem.* 2011 May;46(5):1555-63. Epub 2011 Feb 26.
161. van Der Heijden R, Jacobs DI, Snoeijer W, Hallard D, Verpoorte R. (2004), The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Curr Med Chem.* 2004 Mar;11(5):607-28. Review.
162. van Rijt SH, Sadler PJ. (2009), Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discov Today.* 2009 Dec;14(23-24):1089-97. Epub 2009 Sep 24. Review.
163. Varmus H. and R. A. Weinberg, (1993), Genes and the biology of cancer. New York : Scientific American library
164. Verginadis II, Karkabounas S, Simos Y, Kontargiris E, Hadjidakou SK, Batistatou A, Evangelou A, Charalabopoulos K. (2010), Anticancer and cytotoxic effects of a triorganotin compound with 2-mercapto-nicotinic acid in malignant cell lines and tumor bearing Wistar rats. *Eur J Pharm Sci.* 2011 Feb 14;42(3):253-61. Epub 2010 Dec 3.
165. Viviani B, Rossi AD, Chow SC, Nicotera P, (1996), Triethyltin interferes with Ca²⁺ signaling and potentiates norepinephrine release in PC12 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140, 289-295
166. Vogelstein, B. and K. W. Kinzler, (2004), Cancer genes and the pathways the control. *Nature Med.* 10:789-799
167. Robert Allan Weinberg (2007), The biology of cancer, Garland Science, 2007
168. Winship KA. (1988) Toxicity of tin and its compounds. *Adverse Drug React Acute Poisoning Rev.* 1988 Spring;7(1):19-38.

169. Wozniak K, Blasiak J, (2002), Review: Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts, *Acta Biochimica Pol.* 49(3): 583-596, 2002
170. Αικατερίνη Χαρβάλα, Αλκαλοειδή και μη μορφοποιημένες δρόγες, Αθήνα, 1994
171. Yeluri S, Madhok B, Prasad KR, Quirke P, Jayne DG. (2009), Cancer's craving for sugar: an opportunity for clinical exploitation. *J Cancer Res Clin Oncol.* 135(7):867-77.
172. Yeung SC, Habra MA, Thosani SN. (2011) Lung cancer-induced paraneoplastic syndromes. *Curr Opin Pulm Med.* 2011 Jul;17(4):260-8.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχει κατατεθεί προς δημοσίευση σε διεθνές περιοδικό.

Maria S. Agiorgiti, Parta Vezyraki, Sotiris K. Hadjikakou, Vasiliki Kalfakakou, Ioannis K. Tsanaktsidis, Anna Batistatou, John Zelovitis, Spyridon Karkabounas, Angelos Evangelou. **Cytotoxic effect and anticancer activity of novel organotin derivatives with ortho- or para-hydroxy-benzoic acids**. Journal of Biological Inorganic Chemistry (Submitted for publication).

