







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

*«Μελέτη των επιδράσεων εκπομπής κυματομορφών συχνοτήτων  
πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και  
ενός συμπλόκου  $Ag(I)$  με οργανικούς υποκαταστάτες, σε *in vivo* μοντέλο  
λειομυοσαρκώματος»*

**Αναστασία Π. Βελαλοπούλου  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013**



«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. Βελαλοπούλου Αναστασίας:** 21-11-2008

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 653<sup>α</sup>/3-2-2009

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Καρκαμπούνας Σπυρίδων Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
Χατζηκακού Σωτήριος Αναπληρωτής Καθηγητής Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 18-2-2009

*«Μελέτη των επιδράσεων εκπομπής κυματομορφών συχνότητας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και ενός συμπλόκου Ag(I) με οργανικούς υποκαταστάτες σε in vivo μοντέλο λειομυοσαρκώματος»*

**Ημερομηνία ανασυγκρότησης της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 658<sup>α</sup>/7-4-2009

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Καρκαμπούνας Σπυρίδων Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
Χατζηκακού Σωτήριος Αναπληρωτής Καθηγητής Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ :** 753<sup>α</sup>/18-6-2013

<b>Ανωγειανάκης Γεώργιος</b>	Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
<b>Ευαγγέλου Άγγελος</b>	Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Χατζηκακού Σωτήριος</b>	Καθηγητής Ανόργανης Χημείας, Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Βεζυράκη Πατρόνα</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Καλφακάκου Βασιλική</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Καρκαμπούνας Σπυρίδων</b>	Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων





**Πέσχος Δημήτριος**

Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην κυτταρική  
Φυσιολογία, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 15-10-2013

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Ανδρέας Φωτόπουλος**

Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής





Αυτή η διατριβή αφιερώνεται  
στους γονείς μου,  
Παναγιώτη και Μαρία  
& στην αδερφή μου Ευρυδίκη,  
για την απεριόριστη αγάπη  
και υποστήριξη τους.

Και στην γιαγιά Κατίνα,  
για τις αξέχαστες απογευματινές ώρες μελέτης  
στην τραπεζαρία της



*“If you want to find the Secrets of the universe, think in terms of energy, frequency, and vibration.”*

*«Αν θέλετε να μάθετε τα μυστικά του Σύμπαντος, σκεφτείτε με τους όρους της ενέργειας, της συχνότητας και των δονήσεων...»*

*Nikola Tesla, Φυσικός & Εφευρέτης*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι ηλεκτρομαγνητικές δυνάμεις διαμορφώνουν την εικόνα του κόσμου που μας περιβάλλει. Ευθύνονται τόσο για την διάταξη του μορίου που ευθύνεται για την ύπαρξη ζωής στο πλανήτη μας, του νερού, έως σχεδόν για οποιοδήποτε φυσικό ή χημικό φαινόμενο με το οποίο έρχεται σε επαφή ο άνθρωπος, εκτός από την βαρύτητα. Ακόμα και εμάς τους ίδιους, μας διέπουν ηλεκτρομαγνητικά φαινόμενα. Είναι λοιπόν πασιφανές πως σίγουρα επηρεαζόμαστε από την παρουσία ηλεκτρομαγνητικών πεδίων στο περιβάλλον μας, είτε αυτά είναι φυσικής προέλευσης, είτε τεχνητής.

Οι νόσοι αποτελούν κατ' ουσίαν μεταβολή ισορροπιών, σε πολλαπλά επίπεδα, από το μοριακό έως αυτό του οργάνου. Το ίδιο ισχύει και για την επάρατη νόσο, από την οποία πεθαίνουν εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως, τον καρκίνο. Ίσως η εισαγωγή «ξένων» ουσιών για τον οργανισμό, όπως είναι τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, ταλαιπωρώντας τον άνθρωπο με ανεπιθύμητες ενέργειες, πολλές φορές θανάσιμες, να πάψει στο μέλλον, να αποτελεί πρώτη επιλογή, και η Ιατρική να στραφεί στην αποκατάσταση των ίδιων των μηχανισμών που υφίσταται βλάβη και ευθύνονται για την εμφάνιση καρκίνου. Ίσως προσεγγίζοντας τους μηχανισμούς αυτούς από φυσικοχημικής πλευράς, διερευνώντας τα ηλεκτρομαγνητικά φαινόμενα που τους διέπουν, να καταφέρουν να κινητοποιήσουν έναν οργανισμό, χρησιμοποιώντας τα δικά του «όπλα».

Τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία αποτελούν μέρος της φύσης μας και της φύσης στην οποία αναπτυσσόμαστε, αναπαραγόμαστε και τελικά πεθαίνουμε. Αποτέλεσε λοιπόν για μένα ένα ιδιαίτερο ελκυστικό πεδίο έρευνας, και προσπάθησα να ακούσω αυτό που είπε και ο George Wald:

*«κάθε πείραμα αποτελεί ένα μέσον για να αναγκάσουμε τη φύση να μιλήσει-αν αυτό σχεδιαστεί σωστά, τότε το μόνο πράγμα που έχει να κάνει ο ερευνητής είναι να ακούσει».*

*George Wald*

*Βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας, 1967*

Ο άνθρωπος που θα ήθελα φυσικά να ευχαριστήσω πρώτο για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής αλλά και γενικότερα για την συμμετοχή μου στην εργαστηριακή του ομάδα, για την εμπιστοσύνη του, για την ευκαιρία ενασχόλησης με ένα τόσο σύνθετο και απαιτητικό ερευνητικό θέμα αλλά και για την παροχή της πολύτιμης καθοδήγησης και των λύσεων σε κάθε προκύπτον πρόβλημα είναι ο επιβλέπων Καθηγητής, κ. Ευαγγέλου Άγγελος, καθηγητής Φυσιολογίας και διευθυντής του Εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Καρκαμπούνα Σπυρίδωνα, για την ενεργή συμμετοχή του στην κατασκευή και εφαρμογή των εργαστηριακών πρωτοκόλλων, για τις συνεχείς και τόσο παραγωγικές παρατηρήσεις του, όσον αφορά στον χειρισμό των πειραματοζώων καθώς και την έκθεση κυττάρων και επιμύων στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο αλλά και την άριστη συζήτηση των συμπερασμάτων.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή Ανόργανης & Αναλυτικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και επίσης μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Χατζηκακού Σωτήριο, για το σύνολο των συμπλόκων μετάλλων που συνέθεσε κατά την διεξαγωγή της παρούσας διατριβής και οδήγησε στην επιλογή του συμπλόκου αργύρου (Ag), για την παροχή γνώσεων Ανόργανης Χημείας, σχετικής με τις ιδιότητες των συμπλόκων μετάλλων καθώς και για την υποστήριξη και επιτυχή δημοσίευση των πειραματικών δεδομένων. Ακολούθως ευχαριστώ πολύ, την μεταπτυχιακή φοιτήτρια του Εργαστηρίου Ανόργανης Χημείας και συνεργάτιδα του κ. Χατζηκακού, κ. Μπάτσαλα Γεωργία, για την σύνθεση του συμπλόκου αργύρου αλλά και την άψογη συνεργασία μας.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις θερμές ευχαριστίες μου προς τον Καθηγητή Ηλεκτρονικής-Τηλεπικοινωνιών και διευθυντή του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής, Τηλεπικοινωνιών και Εφαρμογών, του Τομέα Στερεάς Κατάστασης & Φυσικής Υλικών & Επιφανειών, του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Κωσταράκη Παναγιώτη, καθώς και προς τον συνεργάτη του, κ. Τάτση Γεώργιο Φυσικό, MSc, PhD, και μεταδιδακτορικό ερευνητή του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Τηλεπικοινωνιών και Εφαρμογών, για την ιδέα του τρόπου σχεδιασμού της πειραματικής διάταξης εκπομπής των



κυματομορφών και για την υλοποίησή της, καθώς και για την πολύμηνη, αμέριστη παροχή θεωρητικής και τεχνολογικής υποστήριξης.

Επίσης θερμές ευχαριστίες οφείλω και στον κ. Κωσταράκη Κώστα, μουσικό και καθηγητή μουσικής, για την πολύ ευγενική προσφορά του προγράμματος εγγραφής και αναπαραγωγής ήχου (λογισμικό παραγωγής κυματομορφών συγκεκριμένων συχνοτήτων) καθώς και την καθοδήγησή του στην χρήση του.

Ευχαριστώ τον επίκουρο καθηγητή Φυσιολογίας, κ. Πέσχο Δημήτριο, για την πραγματοποίηση των ιστοπαθολογικών μελετών των όγκων και των οργάνων των επιμύων καθώς και για το σύνολο των παρατηρήσεων επί των πειραμάτων βιοψίας των όγκων αλλά και της μονιμοποίησης των ιστών, που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την έρευνα.

Για τη λήψη των φασμάτων NMR της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης, οφείλω να ευχαριστήσω τον κ. Τζάκο Ανδρέα, Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, του Τμήματος Χημείας καθώς και τον κ. Τσιαφούλη Κωνσταντίνο, μέλος του Δικτύου Οριζοντίων Εργαστηρίων.

Για το σχεδιασμό των πειραματικών πρωτοκόλλων, την υλοποίησή τους, την κατασκευή μέρους των εικόνων του παρόντος εντύπου, την συζήτηση νέων ιδεών, την επίλυση προβλημάτων, την βελτιστοποίηση του πειραματικού εξοπλισμού της εκπομπής, τις συζητήσεις λόγω της πρωθύστερης εμπειρίας του στο ερευνητικό θέμα της παρούσας διατριβής, αλλά και την ηθική υποστήριξή του, ευχαριστώ πολύ, τον κ. Βεργινάδη Ιωάννη, Βιολόγο, PhD και μεταδιδακτορικό ερευνητή του Department of Radiation Oncology, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Pennsylvania, των Η.Π.Α.

Για την ευγενική παραχώρηση του φορητού υπολογιστή, ο οποίος αποτέλεσε μέρος της διάταξης εκπομπής των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, για την αρωγή του στην διεξαγωγή των ενοφθαλμισμών των καρκινικών κυττάρων στους επίμυες, για την επίβλεψη κυτταροκαλλιιεργειών και πειραματοζώων κατά την διάρκεια διακοπών, αλλά και για την βοήθειά του στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της διατριβής, ευχαριστώ τον κ. Σίμο Γιάννη, MSc, PhD, Κλινικό Διαιτολόγο-Διατροφολόγο και μεταδιδακτορικό ερευνητή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Για την εκμάθηση της δοκιμασίας ελέγχου της κυτταροτοξικότητας μέσω της χρήσης MTT, καθώς και την αδιάκοπη ανταλλαγή επιστημονικών ιδεών, σχετικών με τα

εργαστηριακά πρωτόκολλα, ευχαριστώ τον κ. Καραγκούνη Ηλία, Μοριακό Βιολόγο, MSc, PhD και μεταδιδακτορικό ερευνητή του Εργαστηρίου Ακτινοδιαγνωστικής της Ιατρικής Σχολής, του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου της Θράκης.

Για την πολύτιμη αρωγή του στην διεξαγωγή των ενοφθαλμισμών στους επίμυες, ευχαριστώ επίσης πολύ τον κ. Ζελοβίτη Ιωάννη, Γεωπόνο, PhD και μεταδιδακτορικό ερευνητή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Για την παροχή επιστημονικής γνώσης και την κατασκευή των αρχείων του λευκού θορύβου, που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια των πειραμάτων εκπομπής, ευχαριστώ πολύ τον κ. Παναγιώτη Γιωτάκο, Ηλεκτρολόγο Μηχανικό και Μηχανικό Υπολογιστών, MSc και υποψήφιο διδάκτορα του Ινστιτούτου Επιστημών Χημικής Μηχανικής (ΙΕΧΜΗ) του ΙΤΕ και του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών.

Η χειροποίητη κατασκευή των σωληνοειδών που αποτελούν μέρος της πειραματικής διάταξης εκπομπής του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου αποτελεί ανιδιοτελές έργο του κ. Βεργινάδη Ηλία, Μηχανικού Τηλεπικοινωνιών, και τον ευχαριστώ ιδιαίτερος.

Για την εποικοδομητική συζήτηση, την ανταλλαγή επιστημονικών ιδεών και γνώσης και την αλληλοϋποστήριξη, οφείλω να ευχαριστήσω τον κ. Μέτσιο Απόστολο, Βιολόγο, PhD και μεταδιδακτορικό ερευνητή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας για την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος αλλά στο μέγιστο βαθμό οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, για την αγάπη, την εμπιστοσύνη, την ηθική και υλική υποστήριξή τους, καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	9
1.1. Καρκίνος .....	9
1.2 Λειομυοσάρκωμα .....	12
1.2.1. Περιοχές εντοπισμού.....	12
1.2.2. Επιδημιολογία .....	13
1.2.3. Αιτιολογία .....	14
1.2.4. Μακροσκοπική εικόνα .....	14
1.2.5. Ιστοπαθολογία.....	14
1.2.6. Αντιμετώπιση του λειομυοσαρκώματος .....	16
1.3. Δοξορουβικίνη, υδροχλωρική (doxorubicin hydrochloride).....	16
1.3.1 Ανακάλυψη .....	17
1.3.2. Μηχανισμός δράσης.....	18
1.3.3. Φαρμακοκινητική.....	19
1.3.4. Παρενέργειες.....	20
1.4. Φαρμακευτική χημεία .....	21
1.4.1. Ανακάλυψη νέων φαρμάκων .....	21
1.4.2. Τα σύμπλοκα των μετάλλων στην Ιατρική .....	22
1.4.3. Το cis-diamminedichloroplatinum (cisplatin).....	23
1.5. Τα σύμπλοκα του αργύρου στην Ιατρική.....	25
1.5.1. Το χημικό στοιχείο του αργύρου.....	25
1.5.2. Χρήσεις των συμπλόκων μετάλλων του αργύρου στην Ιατρική.....	26
1.5.3. Τα σύμπλοκα του αργύρου στην αντιμετώπιση του καρκίνου .....	26
1.6. Το σύμπλοκο αργύρου [AgCl(tp <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (pmtH)] .....	27
1.7. Επίμυες (rats) ως πειραματόζωα στην έρευνα .....	29
1.7.1. Επίμυες Wistar .....	30
1.7.2. Στοιχεία ανατομίας και φυσιολογίας.....	31
1.7.3. Συμπεριφορά .....	32
1.7.4. Αναπαραγωγή.....	32
1.8. Ηλεκτρομαγνητισμός .....	34
1.8.1. Η διττή φύση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας .....	35
1.8.2. Ιδιότητες ηλεκτρομαγνητικού κύματος.....	36
1.8.3. Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα .....	37
1.8.4. Ιστορική αναδρομή .....	38
1.8.5. Ηλεκτρομαγνητικά κύματα .....	40
1.8.6. Περιβαλλοντική έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία και επιδημιολογικές έρευνες .....	40
1.8.7. Χρήσεις ηλεκτρομαγνητικών πεδίων στην Ιατρική .....	42
1.9. Ηλεκτρομαγνητικό πεδίο σωληνοειδούς.....	43
1.9.1. Μαγνητικό πεδίο – Δυναμικές γραμμές.....	43
1.9.2. Ιδιότητες μαγνητικών γραμμών .....	44
1.9.3. Ομογενές μαγνητικό πεδίο .....	44
1.9.4. Μαγνητικό πεδίο στο εσωτερικό ρευματοφόρου σωληνοειδούς.....	44
1.10. Φασματοσκοπία NMR και ηλεκτρομαγνητικό φάσμα .....	46

<b>2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....</b>	<b>49</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>51</b>
3.1. Υλικά και εξοπλισμός .....	51
3.1.1. Αντιδραστήρια .....	51
3.1.2. Όργανα και συσκευές.....	52
3.1.3. Αναλώσιμα υλικά .....	53
3.1.4. Λοιπός εργαστηριακός εξοπλισμός.....	54
3.1.5. Εξοπλισμός εκτροφείου πειραματοζώων .....	54
3.1.6. Εξοπλισμός πειραματικής διάταξης εκπομπής EMF .....	54
3.2. Κυτταρική σειρά λειμυοσαρκώματος .....	55
3.2.1. Κυτταροκαλλιέργεια .....	55
3.2.2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων .....	56
3.2.3. Κρυοπροστασία και φύλαξη σε βαθειά κατάψυξη & υγρό άζωτο.....	57
3.2.4. Σπορά κυττάρων σε τρυβλία .....	57
3.3. Παρασκευή διαλυμάτων υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και συμπλόκου αργύρου .....	58
3.4. Συχνότητες μελετούμενων ηλεκτρομαγνητικών πεδίων EMF.....	59
3.4.1. Λήψη συχνοτήτων από το <sup>1</sup> H-NMR φάσμα υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και του συμπλόκου του αργύρου [AgCl(tp <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (pmtH)] .....	59
3.4.2. Φάσματα <sup>1</sup> H-NMR .....	61
3.4.3. Λευκός θόρυβος .....	62
3.5. Πειραματική διάταξη δημιουργίας ηλεκτρομαγνητικών πεδίων .....	64
3.5.1. Ψηφιακό αρχείο κυματομορφών – Αναπαραγωγή μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή .....	64
3.5.2. Περιγραφή πειραματικής διάταξης εκπομπής EMF .....	64
3.5.3. Χαρακτηριστικά σωληνοειδών .....	67
3.5.4. Χαρακτηριστικά συνδεσμολογίας πειραματικής διάταξης εκπομπής EMF ...	67
3.5.5. Κλωβός Faraday-Ηλεκτρομαγνητική θωράκιση.....	69
3.5.6. Μέτρηση μαγνητικού πεδίου .....	70
3.6. Μελέτες κυτταροτοξικότητας με τη χρήση MTT .....	70
3.6.1. Μελέτη κυτταροτοξικότητας υδροχλωρικής δοξορουβικίνης .....	73
3.6.2. Μελέτη κυτταροτοξικότητας του συμπλόκου [AgCl(tp <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (pmtH)].....	73
3.6.3. Μελέτη κυτταροτοξικότητας κατόπιν εκπομπής κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης .....	73
3.6.4. Μελέτη κυτταροτοξικότητας κατόπιν εκπομπής κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού του συμπλόκου [AgCl(tp <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (pmtH)].....	74
3.6.5. Μελέτη κυτταροτοξικότητας κατόπιν εκπομπής λευκού θορύβου .....	74
3.7. Μελέτες εκτίμησης απόπτωσης & νέκρωσης μέσω κυτταρομετρίας ροής.....	74
3.7.1. Εκτίμηση απόπτωσης & νέκρωσης μετά την προσθήκη της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης.....	76
3.7.2. Εκτίμηση απόπτωσης & νέκρωσης μετά την προσθήκη του [AgCl(tp <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (pmtH)].....	76
3.7.3. Εκτίμηση απόπτωσης & νέκρωσης, κατόπιν εκπομπής κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης .....	77

3.7.4. Εκτίμηση απόπτωσης & νέκρωσης, κατόπιν εκπομπής κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού του $[AgCl(tpp)_2(pmtH)]$ .....	77
3.8. Μελέτες αναστολής του κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής .....	78
3.8.1. Εκτίμηση της αναστολής του κυτταρικού κύκλου, μετά την προσθήκη της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης.....	78
3.8.2. Εκτίμηση αναστολής του κυτταρικού κύκλου, μετά την προσθήκη του $[AgCl(tpp)_2(pmtH)]$ .....	78
3.8.3. Εκτίμηση αναστολής του κυτταρικού κύκλου, κατόπιν εκπομπής κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης.....	79
3.8.4. Εκτίμηση αναστολής του κυτταρικού κύκλου, κατόπιν εκπομπής κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού του $[AgCl(tpp)_2(pmtH)]$ .....	79
3.9. Επίμυες Wistar .....	79
3.9.1. Μονάδα συντήρησης πειραματοζώων .....	79
3.10. Μελέτες τοξικότητας.....	80
3.10.1. Οξεία τοξικότητα υδροχλωρικής δοξορουβικίνης .....	80
3.10.2. Οξεία τοξικότητα συμπλόκου αργύρου .....	81
3.10.3. Χρόνια τοξικότητα υδροχλωρικής δοξορουβικίνης.....	82
3.10.4. Χρόνια τοξικότητα συμπλόκου αργύρου .....	82
3.11. Ενοφθαλμισμός κυττάρων LMS .....	83
3.12. Μελέτες αντικαρκινικής δράσης.....	85
3.12.1. Χορήγηση υδροχλωρικής δοξορουβικίνης σε επίμυες, φέροντες όγκο. ....	86
3.12.2. Χορήγηση συμπλόκου αργύρου σε επίμυες φέροντες όγκο .....	86
3.12.3. Έκθεση επιμύων που φέρουν όγκο σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης .....	87
3.12.4. Έκθεση επιμύων που φέρουν όγκο, σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού του συμπλόκου αργύρου .....	87
3.12.5. Έκθεση επιμύων που φέρουν όγκο, σε λευκό θόρυβο .....	88
3.12.6. Εικονική έκθεση επιμύων που φέρουν όγκο .....	88
3.12.7. Μέτρηση σωματικού βάρους και όγκων των επιμύων .....	88
3.12.8. Θανάτωση επιμύων .....	88
3.12.9. Ιστοπαθολογικός έλεγχος.....	90
3.12.10. Λήψη κυττάρων από όγκους επιμύων με βιοψία δια λεπτής βελόνης (Fine needle aspiration biopsy-FNA) .....	90
3.12.11. Κυτταρομετρία ροής των κυτταρικών δειγμάτων των όγκων από την βιοψία λεπτής βελόνης.....	93
3.13. Στατιστική ανάλυση.....	94
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	95
4.1. Κυτταρική βιωσιμότητα των LMS με τη χρήση MTT.....	95
4.1.1. Κυτταροτοξική δράση της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και του συμπλόκου αργύρου .....	95
4.1.2. Κυτταροτοξική βιωσιμότητα των LMS κυττάρων κατόπιν εκπομπής αυτών σε κυματομορφές συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.....	95
4.2. Μελέτη της απόπτωσης - νέκρωσης μέσω κυτταρομετρίας ροής.....	97

4.2.1. Απόπτωση-νέκρωση μετά από προσθήκη υδροχλωρικής δοξορουβικίνης σε LMS κύτταρα .....	97
4.2.2. Απόπτωση-νέκρωση μετά από προσθήκη συμπλόκου αργύρου σε LMS κύτταρα .....	98
4.2.3. Απόπτωση-νέκρωση μετά από έκθεση LMS κυττάρων σε κυματομορφές συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού .....	99
4.3. Μελέτη αναστολής κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής.....	101
4.3.1. Αναστολή κυτταρικού κύκλου μετά από προσθήκη υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού αυτής.....	101
4.3.2. Αναστολή κυτταρικού κύκλου μετά από προσθήκη συμπλόκου αργύρου και των κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αυτού.....	103
4.4. Μελέτη οξείας και χρόνιας τοξικότητας της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης σε υγιείς επίμυες Wistar.....	105
4.5. Μελέτη οξείας και χρόνιας τοξικότητας του συμπλόκου αργύρου σε υγιείς επίμυες Wistar .....	107
4.5.1. Οξεία τοξικότητα συμπλόκου αργύρου .....	107
4.5.2. Χρόνια τοξικότητα συμπλόκου αργύρου .....	109
4.6. Μελέτη αντικαρκινικής δράσης σε επίμυες Wistar, που φέρουν όγκο.....	112
4.6.1. Δράση υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και των κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αυτής .....	112
4.6.2. Δράση συμπλόκου αργύρου και των κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αυτού.....	115
4.7. Ιστοπαθολογικός έλεγχος οργάνων-όγκων .....	118
4.8. Υπολογισμός μεγέθους όγκου με calliper.....	124
4.9. Ανάλυση απόπτωσης δειγμάτων όγκου μέσω κυτταρομετρίας ροής .....	125
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>127</b>
<b>6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>135</b>
<b>7. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ .....</b>	<b>139</b>
7.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ.....	139
7.2 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ .....	141
<b>8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>143</b>
<b>9. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ - ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ.....</b>	<b>156</b>

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

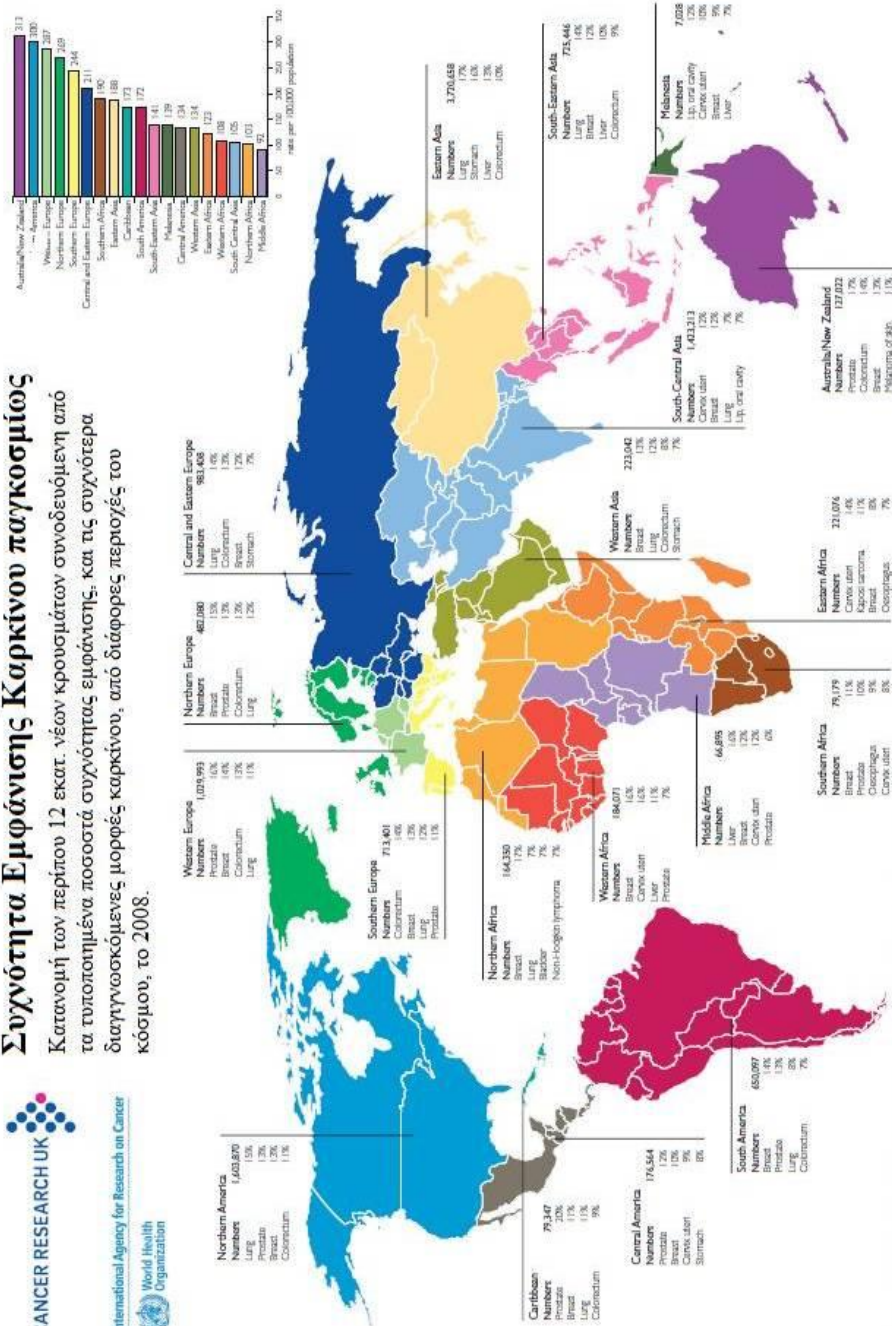
## 1.1. Καρκίνος

Ο καρκίνος ορίζεται ως ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός μη φυσιολογικών κυττάρων στο σώμα. Υπάρχουν περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι καρκίνου. Οι περισσότεροι λαμβάνουν την ονομασία τους, βάσει του οργάνου ή του τύπου του κυττάρου, το οποίο προσβάλλουν αρχικά. Μπορούν να ταξινομηθούν σε ευρείες κατηγορίες όπως είναι το καρκίνωμα, το σάρκωμα, η λευχαιμία, το λέμφωμα και το μυέλωμα, και οι καρκίνοι του κεντρικού νευρικού συστήματος. Το καρκίνωμα εμφανίζεται στο δέρμα ή σε ιστούς που επενδύουν εσωτερικά όργανα ενώ υπάρχει μία γκάμα υποτύπων καρκινώματος, συμπεριλαμβανομένων του αδenoκαρκινώματος, του βασικοκυτταρικού καρκινώματος, του πλακώδους καρκινώματος και του μεταβατικού καρκινώματος. Το σάρκωμα εμφανίζεται στα οστά, στους χόνδρους, στο λίπος, στους μύες, στα αιμοφόρα αγγεία, ή σε άλλο είδος συνεκτικού ή υποστηρικτικού ιστού. Η λευχαιμία είναι καρκίνος του αιμοποιητικού ιστού, όπως είναι ο μυελός των οστών και αυξάνει τον αριθμό μη φυσιολογικών κυττάρων του αίματος, τα οποία εισέρχονται στην κυκλοφορία. Το λέμφωμα και το μυέλωμα είναι καρκίνοι του ανοσοποιητικού συστήματος ενώ οι καρκίνοι του κεντρικού νευρικού συστήματος εκκινούν στους ιστούς του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού.

Το 2008, καταγράφηκαν περίπου 12.7 εκατομμύρια περιπτώσεις καρκίνου σε όλο τον κόσμο, εκ των οποίων τα 6.6 εκατομμύρια περιπτώσεις αφορούν άνδρες και τα 6 εκατομμύρια, γυναίκες ενώ ο αριθμός αυτός αναμένεται να αυξηθεί σε 21 εκατομμύρια έως το 2030. Στην Ευρώπη και στην Β. Αμερική, ένας στους τέσσερις ανθρώπους πεθαίνει από καρκίνο.

# Συχνότητα Εμφάνισης Καρκίνου Παγκοσμίως

Κατανομή των περίπου 12 εκατ. νέων κρουσμάτων συνοδευόμενη από τα τυποποιημένα ποσοστά συχνότητας εμφάνισης, και τις συχνότερα διαγνωσώσιμες μορφές καρκίνου, από διάφορες περιοχές του κόσμου, το 2008.



Source: GLOBOCAN 2008, v. 1.2. Cancer Incidence and Mortality Worldwide. IARC, 2010 (<http://globocan.iarc.fr>) Map updated February 2011

<http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/>

© Cancer Research UK  
Approved by the UK Department of Health

Εικόνα 1. Παγκόσμιος χάρτης κατανομής των κρουσμάτων καρκίνου, το 2008.



Η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων, ένα σύνολο εξελικτικών μεταβολών από μία προκαρκινική βλάβη έως το σχηματισμό κακοήθων όγκων. Αυτές οι μεταβολές είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης γενετικών παραγόντων και τριών κατηγοριών εξωτερικών παραγόντων, που είναι οι φυσικοί καρκινογόνοι παράγοντες, όπως η υπεριώδης και η ιονίζουσα ακτινοβολία, τα χημικά καρκινογόνα, όπως ο αμίαντος, τα συστατικά του καπνού του τσιγάρου, η αφλατοξίνη (μια πρόσμειξη τροφίμων) και το αρσενικό (ρύπος του πόσιμου νερού) καθώς και οι βιολογικοί καρκινογόνοι παράγοντες, όπως οι λοιμώξεις από ορισμένους ιούς, βακτήρια ή παράσιτα. Στους παραπάνω παράγοντες πρόκλησης καρκίνου συγκαταλέγονται επίσης η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ και η παχυσαρκία.

Τα καρκινικά κύτταρα που αναπαράγονται, αψηφώντας τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς αλλά δεν διεισδύουν και δεν αποικίζουν περιοχές άλλων ιστών αλλά παραμένουν σε μία ενιαία μάζα, σχηματίζουν έναν καλοήθη όγκο ή νεόπλασμα (tumor). Στην αντίθετη περίπτωση, όταν δηλαδή τα κύτταρα του όγκου έχουν την ικανότητα να διεισδύουν σε περιβάλλοντες ιστούς, τότε ο όγκος χαρακτηρίζεται ως κακοήθης. Η αντιμετώπιση του καρκίνου εξαρτάται από το βαθμό διασποράς του στο σώμα, δηλαδή από τον βαθμό στον οποίο τα κακοήθη καρκινικά κύτταρα έχουν εγκαταλείψει τον πρωτοπαθή όγκο, έχουν εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος ή στα λεμφαγγεία και έχουν σχηματίσει δευτεροπαθείς όγκους ή αλλιώς μεταστάσεις, σε άλλες περιοχές του σώματος.

Τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν μία ευρεία γκάμα χαρακτηριστικών που τους προσδίδουν ένα συναγωνιστικό πλεονέκτημα σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Εκτός από τον ήδη αναφερθέντα ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους, τα κακοήθη κύτταρα δεν βασίζονται τόσο στην κυτταρική σηματοδότηση από γειτονικά κύτταρα για την αύξηση, την επιβίωση και την διαίρεση τους, λόγω μεταλλάξεων σε συμμετέχοντα μόρια στις οδούς κυτταρικής σηματοδότησης. Επίσης, δεν υπόκεινται σε αποπτωτικό θάνατο στον βαθμό που αφορά στα φυσιολογικά κύτταρα και αυτό οφείλεται σε μεταλλάξεις γονιδίων που ρυθμίζουν τον ενδοκυτταρικό μηχανισμό «προγραμματισμένου» θανάτου. Το προφίλ τους έρχεται να συμπληρώσει η γενετική αστάθεια, η πολύ αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων καθώς και η παθολογική διεισδυτικότητα, γεγονός που οφείλεται εν μέρει στην έλλειψη ειδικών μορίων κυτταρικής προσκόλλησης (ιντεγκρίνες) που συγκρατούν τα κύτταρα στην φυσιολογική τους

θήση. Τέλος, τα καρκινικά κύτταρα επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται σε ξένους ιστούς, δημιουργώντας μεταλλάξεις, κάτι που δεν συμβαίνει με τα φυσιολογικά κύτταρα.

Η σύγχρονη «φαρέτρα» αντιμετώπισης του καρκίνου περιλαμβάνει την χειρουργική επέμβαση, την χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία. Η χειρουργική επέμβαση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση, τη θεραπεία, ή ακόμη σε ορισμένες περιπτώσεις, για να βοηθήσει στην πρόληψη του καρκίνου. Οι περισσότεροι καρκινοπαθείς ασθενείς θα υποβληθούν κάποια στιγμή, σε κάποιο είδος χειρουργικής επέμβασης, μιας και προσφέρει τη σημαντικότερη ευκαιρία για θεραπεία, ειδικά εάν ο καρκίνος δεν έχει σημειώσει μεταστάσεις. Η χημειοθεραπεία επιστρατεύει τη χρήση φαρμάκων για την αντιμετώπιση της νόσου ενώ η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιεί ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία υψηλής ενέργειας ώστε να καταστρέψει ή να βλάψει τα καρκινικά κύτταρα, ενώ χρησιμοποιείται από μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλες μορφές θεραπείας [Alberts B. *et al.*, 2006].

## 1.2 Λειομυοσάρκωμα

Το λειομυοσάρκωμα είναι ένας κακοήθης όγκος αποτελούμενος από κύτταρα, φέροντα διακριτά χαρακτηριστικά λείων μυϊκών κυττάρων.

### 1.2.1. Περιοχές εντοπισμού

Η συνηθέστερη περιοχή εντοπισμού του λειομυοσαρκώματος μαλακών μορίων είναι το οπισθοπεριτόναιο, συμπεριλαμβανομένης και της πυέλου. Μία άλλη διακριτή υποομάδα αποτελείται από λειομυοσαρκώματα, τα οποία προκύπτουν σε μεγάλα αιμοφόρα αγγεία, συνήθως στην κάτω κοίλη φλέβα και στις μεγάλες φλέβες των κάτω άκρων. Υπάρχει και η περίπτωση της αρτηριακής προέλευσης αλλά σπανίζει – γενικά, τα σαρκώματα της



**Εικόνα 2.** Λειομυοσάρκωμα. Πρόκειται για βλάβη υψηλού βαθμού (19 cm) από τον τετρακέφαλο μυ ασθενούς, με εικόνα εκτενούς νέκρωσης και αιμορραγίας [Fletcher C.D.M. *et al.*, 2002].

στεφανιαίας αρτηρίας και άλλων μεγάλων αρτηριών δεν φέρουν τα χαρακτηριστικά του λειομυοσαρκώματος και ταξινομούνται καλύτερα ως σάρκωμα έσω χιτώνα. Τα λειομυοσαρκώματα που περιλαμβάνουν περιοχές μη οπισθοπεριτοναϊκών μαλακών μορίων συνιστούν μία τρίτη ομάδα [Dahl I. and Angervall L., 1974; Farshid G. *et al.*, 2002; Suneyoshi Hashimoto H. *et al.*, 1986; Stout A.P. and Hill W.T., 1958]. Συναντώνται συνήθως στα κάτω άκρα, αλλά μπορεί να αναπτυχθούν και αλλού. Εντοπίζονται ενδομυϊκά και υποδόρια, στο ίδιο περίπου ποσοστό, και μερικοί εξ' αυτών φέρουν στοιχεία προέλευσης από μία μικρού ή μεσαίου μεγέθους (δεν φέρει ονομασία) φλέβα. Το λειομυοσάρκωμα αναπτύσσεται επίσης στο χόριο [Fletcher C.D.M. *et al.*, 2002].

### **1.2.2. Επιδημιολογία**

Το λειομυοσάρκωμα μαλακών μορίων εμφανίζεται συνήθως σε άτομα μέσης ηλικίας ή και γηραιότερα, αλλά μπορεί να διαγνωστεί και σε νεαρούς ενήλικες, ακόμα και σε παιδιά [Saint Aubain S.N. and Fletcher C.D., 1999; Swanson P.E. *et al.*, 1991]. Το λειομυοσάρκωμα σχηματίζει ένα σημαντικό ποσοστό οπισθοπεριτοναϊκών (συμπεριλαμβανομένης και της πυέλου) σαρκωμάτων [Hashimoto H. *et al.*, 1985; Rajani B. *et al.*, 1999; Ranchod M. and Kempson R.L., 1977; Shmookler B.M. and Erzinger F.M., 1983; Swarts S.J. *et al.*, 1998] και είναι το κυριότερο σάρκωμα που προκύπτει από τα μεγαλύτερα αιμοφόρα αγγεία [Berlin O. *et al.*, 1984; Kevorkian J. and Cento DP, 1973; Leu H.J. and Makek M., 1986; Varela-Duran J. and Enzinger F.M., 1982]. Πέρα από αυτές τις περιοχές, είναι συγκριτικά σπανιότερο σάρκωμα, αντιπροσωπεύοντας το 10-15% των σαρκωμάτων των άκρων. Η συχνότητα εμφάνισης όσο αφορά στο φύλο, εξαρτάται από την περιοχή εντοπισμού του όγκου, με τις γυναίκες να αποτελούν σαφή πλειοψηφία των ασθενών με οπισθοπεριτοναϊκά και κάτω κοίλης φλέβας λειομυοσαρκώματα αλλά όχι εκείνων που φέρουν λειομυοσαρκώματα σε άλλες περιοχές μαλακών μορίων [Fletcher C.D.M. *et al.*, 2002].

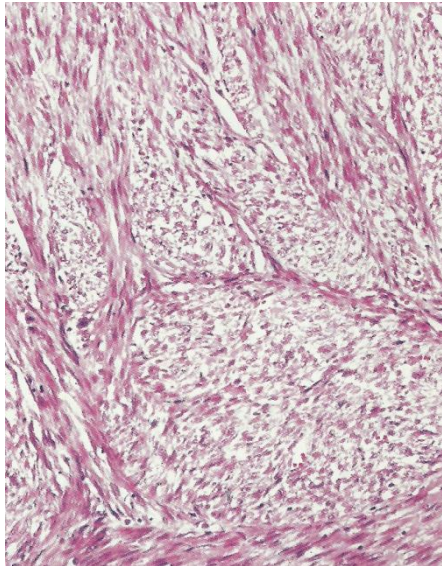
### 1.2.3. Αιτιολογία

Τα αίτια εμφάνισης του λειομυοσαρκώματος στον άνθρωπο είναι άγνωστα. Η επικρατής εμφάνιση λειομυοσαρκωμάτων στο οπισθοπεριτόναιο και στην κάτω κοίλη φλέβα, στις γυναίκες, εγείρει το ερώτημα της ορμονικής επίδρασης αλλά δεν υπάρχουν ακόμα σαφείς αποδείξεις [Fletcher C.D.M. *et al.*, 2002].

### 1.2.4. Μακροσκοπική εικόνα

Το λειομυοσάρκωμα των μαλακών μορίων τυπικά σχηματίζει μία σαρκώδη μάζα, χρώματος γκρι, λευκού έως και μαύρου. Μπορεί να παρουσιάσει σπειροειδή χαρακτήρα, έως ένα βαθμό. Οι μεγαλύτεροι όγκοι συχνά εμφανίζουν αιμορραγία, νέκρωση ή κυστική αλλαγή. Τα όρια του όγκου είναι συχνά σαφώς περιγεγραμμένα, παρόλο που μπορεί να παρατηρηθεί εμφανής μη διηθητικότητα [Fletcher C.D.M. *et al.*, 2002].

### 1.2.5. Ιστοπαθολογία



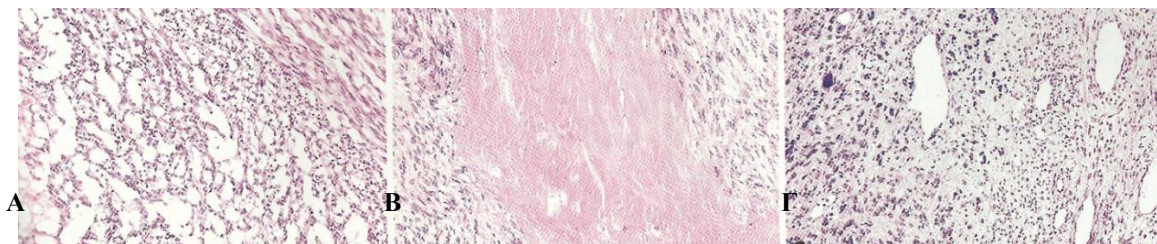
**Εικόνα 3.** Λειομυοσάρκωμα ανθρώπου με τυπική εικόνα ομάδων τεμνόμενων ατρακτοειδών κυττάρων. [Fletcher C.D.M. and Unni K.K., 2002]

Το τυπικό ιστολογικό πρότυπο του λειομυοσαρκώματος είναι αυτό των απότομα οριοθετημένων ομάδων, τεμνόμενων, ατρακτοειδών, κυττάρων. Αυτό το πρότυπο μπορεί να μην συναντάται ακριβώς όπως περιγράφηκε παραπάνω, σε περιοχές μερικών όγκων και περιστασιακά, να εντοπίζεται μία στροβιλώδης εικόνα ή εικόνα ομοιάζουσα με αυτήν του αιμαγγειοπερικυτώματος. Οι όγκοι είναι συνήθως συμπαγώς κυτταρικοί, αλλά μπορεί να παρατηρηθεί επίσης ίνωση και μυξοειδής αλλαγή· στην τελευταία περίπτωση, μπορεί να παρατηρηθεί μικροκυστική εικόνα. Σε μεγαλύτερα λειομυοσαρκώματα, συχνές είναι οι υαλώδεις, υποκυτταρικές ζώνες και η πηκτική νέκρωση του όγκου. Σπανίως, συνυπάρχει

επικρατής χρόνια ή οξεία φλεγμονή [Merchant W. *et al.*, 1995].

Ο πυρήνας του καρκινικού κυττάρου είναι χαρακτηριστικά επιμηκυμένος και πιθανόν λοβώδης. Ο πυρηνικός υπερχρωματισμός και ο πλειομορφισμός είναι γενικά αξιοσημείωτοι παράλο που μπορεί να εμφανίζονται εστιασμένοι, σε ήπια μορφή ή περιστασιακά να απουσιάζουν. Εικόνες μίτωσης μπορεί να αναγνωριστούν άμεσα, παράλο που μπορεί να είναι λίγες ή αποσπασματικές· συχνά παρατηρούνται άτυπες μτώσεις. Το κυτταρόπλασμα ποικίλλει από τυπικά ηωσινοφιλικό έως ύπαρχο. Στην πρώτη περίπτωση είναι συχνά ευδιάκριτα ινιδικό.

Η κυτταροπλασματική κενοτοπίωση είναι συχνά εμφανής, συνήθως σε κύτταρα που κόπηκαν εγκαρσίως. Η Μορφολογία επιθηλιοειδούς τύπου, τα πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα σαν οστεοκλάστες [Mentzel T. *et al.*, 1994], κύτταρα χρόνιας φλεγμονής [Merchant W. *et al.*, 1995] και η κοκκώδης κυτταροπλασματική αλλαγή [Nistal M. *et al.*, 1980] αποτελούν ασυνήθη ευρήματα, τα οποία αφορούν σε ένα μέρος μόνο ενός όγκου, όταν αυτός εντοπίζεται. Μερικά λειομυοσαρκώματα μαλακών μορίων περιλαμβάνουν περιοχές με μη ειδική, μη διαφοροποιημένη, πλειομορφική εμφάνιση, εκτός των περιοχών τυπικής εικόνας [Oda Y. *et al.*, 2001]. Τέτοιου είδους λειομυοσαρκώματα θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως «αποδιαφοροποιημένα λειομυοσαρκώματα» παράλο που αυτός ο όρος δεν χρησιμοποιείται ευρέως. Σπανίως, ένα λειομυοσάρκωμα φέρει ένα μέρος ομοιάζον με οστεοσάρκωμα ή με ραβδομυοσαρκωματική μορφή.



**Εικόνα 4.** Λειομυοσάρκωμα με (A) με μυξοειδή, δικτυωτή εμφάνιση, (B) νέκρωση και εναπόθεση υαλίνης, και (Γ) απότομη μετάβαση σε πιο πλειόμορφο όγκο, ένδειξη αποδιαφοροποίησης. [Fletcher C.D.M. and Unni K.K., 2002]

### Υπομικροσκοπική εικόνα

Τα λειομυοσαρκώματα μαλακών μορίων παρουσιάζουν συνήθως τουλάχιστον μερικά εκ των μικροσκοπικών χαρακτηριστικών των κυττάρων των λείων μυϊκών ινών και συγκεκριμένα, τα πυκνά κυτταροπλασματικά μυϊκά ινίδια, τους κυτταρικούς συνδέσμους, τα πινοκυττωτικά κυστίδια, και τη βασική μεμβράνη. Παρόλα αυτά, κανένα ή και όλα αυτά τα χαρακτηριστικά μέρη μπορεί να εμφανίζονται εστιασμένα ή να εκλείπουν και τα ευρήματα να μην είναι συγκεκριμένα. Είναι ιδιαίτερος σημαντικό να σημειωθεί ότι πυκνά διαμορφωμένα μυϊκά ινίδια παρουσιάζονται στους μυοϊνοβλάστες αλλά και σε άλλα κύτταρα. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία γενικά δεν χρειάζεται για την διάγνωση του λειομυοσαρκώματος μαλακών μορίων και οι υπομικροσκοπικές παρατηρήσεις θα πρέπει να σχετίζονται με τα ευρήματα της οπτικής μικροσκοπίας [Fletcher C.D.M. *et al.*, 2002].

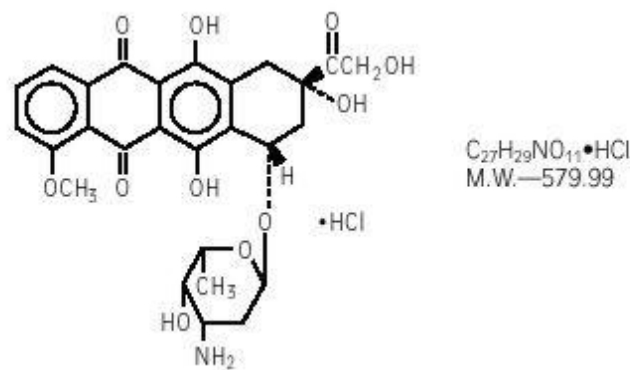
### **1.2.6. Αντιμετώπιση του λειομυοσαρκώματος**

Λόγω της σπανιότητας αυτών των όγκων και της ανάγκης ύπαρξης ομάδας θεραπευτών πολλών ειδικοτήτων, η θεραπεία εφαρμόζεται καλύτερα σε ένα εξειδικευμένο κέντρο, με εμπειρία στην αντιμετώπιση των σαρκωμάτων μαλακών μορίων. Οι τρόποι αντιμετώπισης του λειομυοσαρκώματος περιλαμβάνουν την χειρουργική επέμβαση, την ακτινοθεραπεία και την χημειοθεραπεία. Η χημειοθεραπεία περιλαμβάνει παράγοντες όπως η δοξορουβικίνη και η ισοφωσφαμίδη, η ταξοτέρη (δοσεταξέρη), η δακαρβαζίνη και η εκτευνασιδίνη.

### **1.3. Δοξορουβικίνη, υδροχλωρική (*doxorubicin hydrochloride*)**

Η υδροχλωρική δοξορουβικίνη (αδριαμυκίνη) ανήκει σε μία κατηγορία φαρμάκων, γνωστή ως ανθρακυκλίνες και έχει απομονωθεί από τον μικροοργανισμό *Streptomyces peucetius var. caesius*. Η ακριβής χημική της ονομασία είναι 5,12-Naphthacenedione, 10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- $\alpha$ -L-lyxo-hexopyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxylacetyl)-1-methoxy-, hydrochloride (8S-cis)- και η δομή της είναι ως εξής:





**Εικόνα 5.** Η δομή της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης (Doxorubicin hydrochloride)

Πρόκειται για ένα διαυγές, κόκκινο υγρό, ένα χαρακτηριστικό στο οποίο μαζί με την υψηλή δραστηριότητά του, οφείλεται και η ονομασία «κόκκινος θάνατος» ή «κόκκινος διάβολος». Χορηγείται ενδοφλεβίως, με μεγάλη προσοχή, λόγω της σοβαρής βλάβης που προκαλείται στους ιστούς, εάν διαρρεύσει εκτός της φλέβας. Αποτελεί ένα εκ των πιο δραστικών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων ενάντια σε πολλούς τύπους σαρκωμάτων, όπως το μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (SCLC), τον καρκίνο του μαστού, τον υποτροπιάζοντα καρκίνο ωοθηκών, το τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως. Χορηγείται επίσης για την ενδοκυστική προφύλαξη από υποτροπές του επιφανειακού καρκινώματος της ουροδόχου κύστης, μετά από διουρηθρική εκτομή, για την αντιμετώπιση του οστεοσαρκώματος, του προχωρημένου σταδίου σαρκώματος μαλακών μορίων σε ενήλικες, του σαρκώματος Ewing, της ασθένειας Hodgkin, του λεμφώματος Non-Hodgkin, της οξείας λεμφικής λευχαιμία και άλλων νοσημάτων.



### **1.3.1 Ανακάλυψη**

Η σημερινή μορφή και δομή της δοξορουβικίνης βασίζεται στην ανακάλυψη ενός αντιβιοτικού, από την ιταλική εταιρεία Farmitalia Research Laboratories, την δεκαετία του

1950, το οποίο δεν ήταν άλλο από μία κόκκινη χρωστική που παράγονταν από ένα στέλεχος του *Streptomyces peucetius*, το οποίο απομονώθηκε από δείγμα εδάφους της περιοχής του Castel del Monte, ενός κάστρου του 13<sup>ου</sup> αιώνα. Το εν λόγω αντιβιοτικό παρουσίασε σημαντική θεραπευτική δράση σε όγκους μυών. Σε συνεργασία με μία ομάδα Γάλλων ερευνητών, η ένωση έλαβε το όνομα δαουνορουβικίνη (daunorubicin), συνδυάζοντας το όνομα Dauni, μιας προρωμαϊκής φυλής, που κατέλαβαν την περιοχή της Ιταλίας, όπου και απομονώθηκε η ένωση, με τη γαλλική λέξη Rubis, που σημαίνει ρουμπίνι, εξαιτίας του κόκκινου χρώματος της ένωσης. Οι πρώτες κλινικές δοκιμές της δεκαετίας του 1960, απέδειξαν την επιτυχία του φαρμάκου, στη θεραπεία της οξείας λευχαιμίας και του λεμφώματος. Ωστόσο, από το 1967, αναγνωρίστηκε η κυριότερη παρενέργειά της έως σήμερα, ότι προκαλούσε δηλαδή θανατηφόρα καρδιακή τοξικότητα [Chlebowski R. T., 1979]. Ακολούθησαν οι προσπάθειες τροποποιήσεις της δομής της ένωσης, οι οποίες συμπεριέλαβαν την μετάλλαξη ενός στελέχους του *Streptomyces* χρησιμοποιώντας N-νιτροζο-N-μεθυλοουρεθάνη, απόρροια της οποίας ήταν η παραγωγή μίας νέας ένωσης, η οποία έλαβε την ονομασία αδριαμυκίνη (Adriamycin), από την Αδριατική Θάλασσα. Η μετέπειτα ονομασία δοξορουβικίνη αποτελεί καθιερωμένη σύμβαση ονομασίας. Η δοξορουβικίνη επέδειξε τελικά μεγαλύτερη δραστηριότητα από την δαουνορουβικίνη σε όγκους μυών, και ιδιαίτερα σε συμπαγείς όγκους, σε συνδυασμό με υψηλότερο θεραπευτικό δείκτη, με την καρδιοτοξικότητα όμως να παραμένει ως κυριότερη παρενέργεια. Η δοξορουβικίνη και η δαουνορουβικίνη πρότυπες ανθρακυκλικές ενώσεις, η ανακάλυψη των οποίων άνοιξε το δρόμο για την παραγωγή πολλών άλλων ανθρακυκλικών αντιβιοτικών, ή αναλόγων, με αποτέλεσμα να υπάρχουν σήμερα περισσότερες από 2.000 γνωστές ανάλογες ενώσεις της δοξορουβικίνης [Weiss RB., 1992; Tan C. *et al.*, 1967; Arcamone F. *et al.*, 2000; Di Marco A. *et al.*, 1969].

### **1.3.2. Μηχανισμός δράσης**

Αν και είναι γνωστό ότι οι ανθρακυκλίνες μπορούν να παρεμβαίνουν, μέσω ποικίλων οδών, στις βιοχημικές και βιολογικές λειτουργίες των ευκαρυωτικών κυττάρων, ο ακριβής μηχανισμός της δοξορουβικίνης που ευθύνεται για την κυτταροτοξική και/ή



αντιπολλαπλασιαστική της ιδιότητα, δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Το φάρμακο, αφού διεισδύσει σε ένα κύτταρο, συνδέεται ως επί το πλείστον στην χρωματίνη. Τα πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι η δοξορουβικίνη σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το DNA, μέσω παρεμβολής των επίπεδων δακτυλίων της μεταξύ των νουκλεοτιδικών ζευγών βάσεων [Mompalmer R.L. *et al.*, 1976]. Οι συνέπειες αυτής της παρεμβολής είναι σοβαρές διαταραχές της σύνθεσης του DNA, της DNA-εξαρτώμενη σύνθεσης του RNA καθώς και της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Ωστόσο, η συγκέντρωση δοξορουβικίνης που απαιτείται για να παρατηρηθεί αντιπολλαπλασιαστική δράση, μέσω αυτού του μηχανισμού είναι μεγαλύτερη από εκείνη που είναι επιτεύξιμη στο σημείο του όγκου, στο κλινικό περιβάλλον. Πιο πρόσφατα πειραματικά στοιχεία δείχνουν ότι η παρεμβολή στην αλυσίδα του DNA πυροδοτεί την διάσπαση του DNA από την τοποϊσομεράση-II, επιφέροντας σοβαρές μεταβολές, στην τριτοταγή δομή του DNA [Azarova A. M. *et al.*, 2007]. Η επίδραση αυτή παρατηρείται σε συγκέντρωση φαρμάκου που ανήκει εντός του κλινικά θεραπευτικού εύρους συγκεντρώσεων του φαρμάκου. Η δοξορουβικίνη είναι επίσης γνωστό ότι εμπλέκεται σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής: μια σειρά αναγωγασών, εξαρτώμενες από NADPH, ανάγουν την δοξορουβικίνη σε ελεύθερες ρίζες ημικιμόνης, οι οποίες μπορούν στη συνέχεια να αντιδράσουν με μοριακό οξυγόνο, με αποτέλεσμα την δημιουργία ιδιαίτερα δραστικών ενώσεων όπως οι ρίζες υδροξυλίου και το υπεροξείδιο του υδρογόνου [Mizutani H., 2007]. Ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών έχει ενοχοποιηθεί για την καρδιοτοξικότητα που εμφανίζει αυτό το φάρμακο. Περαιτέρω περιοχή δράσης για τη δοξορουβικίνη αποτελεί η κυτταρική μεμβράνη: το φάρμακο μπορεί να συνδεθεί με τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης και να επηρεάσει μια ποικιλία λειτουργιών. Η κυτταροτοξικότητα ή/και αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα της δοξορουβικίνης οφείλονται είτε στους παραπάνω μηχανισμούς, είτε και σε άλλους, οι οποίοι δεν έχουν διερευνηθεί ακόμη [Frederick CA *et al.*, 1990; Fornari FA *et al.*, 1994; Mompalmer RL *et al.*, 1976; Pigram WJ *et al.*, 1972; Pang B *et al.*, 2013].

### **1.3.3. Φαρμακοκινητική**

Η απορρόφηση της δοξορουβικίνης δεν πραγματοποιείται από το γαστρεντερικό σωλήνα. Δεδομένου ότι το φάρμακο είναι εξαιρετικά ερεθιστικό για τους ιστούς, χορηγείται μέσω ενδαγγειακών οδών (ενδοφλεβίως ή ενδοαρτηριακά). Η χορήγηση του φαρμάκου μέσω

αυτών των οδών έχει ως αποτέλεσμα την ελάχιστη διέλευση του φαρμάκου στην συστηματική κυκλοφορία. Κατανέμεται ευρέως και σε σύντομο χρόνο, στον εξωαγγειακό χώρο, όπως υποδεικνύεται από τον μικρό αρχικό χρόνο ημιζωής στο πλάσμα (5-10 λεπτά) και από τον όγκο κατανομής σε σταθερή κατάσταση, που είναι άνω των 20-30 L/kg βάρους σώματος. Ωστόσο, δεν διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, σε ανιχνεύσιμη ποσότητα. Η δέσμευση της δοξορουβικίνης στις πρωτεΐνες του πλάσματος είναι περίπου 75%, και δεν εξαρτάται από την συγκέντρωσή της στο πλάσμα, έως και την τιμή 2μM. Το φάρμακο μεταβολίζεται σε σημαντικό βαθμό, κυρίως στο ήπαρ. Ο κύριος μεταβολίτης είναι 13-OH-δοξορουβικινόλη, που παράγεται από τις αλδο-κετοαναγωγάσες, η οποία παρουσιάζει αντικαρκινική δραστηριότητα κάποιου βαθμού. Η δοξορουβικίνη και η 13-OH-δοξορουβικινόλη ανιχνεύονται επίσης στα ούρα και στην χολή. Άλλοι μεταβολίτες οι οποίοι συναντώνται σε ανιχνεύσιμες ποσότητες στο πλάσμα είναι οι αγλυκόνες δοξορουβικίνης και η 13-OH-δοξορουβικινόλη. Μετά την ενδοφλέβια χορήγηση, τα επίπεδα της δοξορουβικίνης στο πλάσμα ακολουθούν πτώση πολλαπλών φάσεων, με τελικό χρόνο ημιζωής από 20-48 ώρες. Ο τελικός χρόνος ημιζωής της 13-OH-δοξορουβικινόλης είναι ίσος με αυτόν της δοξορουβικίνης. Η πλασματική κάθαρση κυμαίνεται από 8-20 ml/min/kg, και οφείλεται κυρίως στο μεταβολισμό και την χολική απέκκριση. Αυτή η αργή αποβολή από το πλάσμα μπορεί να παραταθεί περαιτέρω σε ασθενείς με διαταραχή της ηπατικής λειτουργίας. Η κάθαρση της δοξορουβικίνης λαμβάνει χώρα, σε σημαντικό βαθμό, λόγω της μεταβολικής μετατροπής σε μια σειρά λιγότερο ενεργών ή ανενεργών προϊόντων. Το 40-50% της χορηγούμενης δόσης ανακτάται από την χολή ή τα κόπρανα, σε επτά ημέρες. Η νεφρική απέκκριση είναι μέτρια, αντιπροσωπεύοντας το 5-10% της χορηγηθείσας δόσης, σε 5 ημέρες [Speth P. A. J. *et al.*, 1988].

#### **1.3.4. Παρενέργειες**

Η χορήγηση δοξορουβικίνης συνοδεύεται από μέτρια έως υψηλή συχνότητα εμφάνισης ναυτίας καθώς επίσης επιφέρει απώλεια μαλλιών, κοκκινωπό αποχρωματισμό των ούρων, και σκούρο χρώμα δέρματος και ονύχων. Επίσης προκαλείται καταστολή του αριθμού των κυττάρων του αίματος: ο χαμηλός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων καθιστά το ανοσοποιητικό σύστημα αδύναμο, ο χαμηλός αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων (αναιμία) προκαλεί κόπωση και δύσπνοια, ενώ ο χαμηλός αριθμός αιμοπεταλίων ενδέχεται να προκαλέσει μώλωπες και

αιμορραγία. Η δοξορουβικίνη προκαλεί επίσης βλεννογονίτιδα, η οποία είναι φλεγμονή και εξέλκωση του βλεννογόνου του στόματος, του φάρυγγα και του ορθού. Εάν η βλεννογονίτιδα είναι σοβαρής μορφής μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα λήψης τροφής του ασθενούς, και προδιαθέτει σε λοιμώξεις του ορθού.

Η πιο σημαντική όμως ανεπιθύμητη δράση της δοξορουβικίνης είναι η καρδιοτοξικότητα που επιφέρει, συνήθως με την μορφή της συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας [Zhang S. *et al.*, 2012]. Πρόκειται για μία κατάσταση αποδυνάμωσης του καρδιακού μυός, με αποτέλεσμα την δυσκολία στην αναπνοή, το οίδημα στα κάτω άκρα, ταχυκαρδία ή αρρυθμία.

## **1.4. Φαρμακευτική χημεία**

### **1.4.1. Ανακάλυψη νέων φαρμάκων**

Η ανακάλυψη νέων φαρμάκων αποτελεί μία χρονοβόρα και δαπανηρή διαδικασία. Ο μέσος χρόνος που απαιτείται για να εισέλθει ένα φάρμακο στην αγορά κυμαίνεται από 12-15 χρόνια, και με μέσο κόστος περίπου 800 εκατομμύρια δολάρια. Για κάθε 10000 περίπου ενώσεις, οι οποίες συμμετέχουν σε μελέτες επί πειραματοζώων, οι δέκα θα εισέλθουν σε κλινικές δοκιμές, και τελικά μία θα εισέλθει στην αγορά. Οι κλινικές δοκιμές απαρτίζονται από τρεις φάσεις, πριν την έγκριση του φαρμάκου.

Γενικώς, νέα φάρμακα δεν ανακαλύπτονται.

Εκείνο που είναι πιθανότερο να ανακαλυφθεί είναι μία ένωση, γνωστή ως *οδηγός* (lead compound). Η ένωση-οδηγός είναι μία πρωτότυπη ένωση, η οποία φέρει έναν αριθμό ελκυστικών χαρακτηριστικών,



όπως η επιθυμητή βιολογική ή φαρμακολογική δραστηριότητα, αλλά μπορεί να φέρει άλλα ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά, όπως για παράδειγμα, υψηλή τοξικότητα, άλλες βιολογικές δράσεις, αδυναμία απορρόφησης, αδιαλυτότητα, ή προβλήματα στον μεταβολισμό. Η δομή της ένωσης-οδηγού τροποποιείται μέσω σύνθεσης ώστε να πολλαπλασιαστεί η δραστηριότητά

του και να ελαχιστοποιηθούν οι ανεπιθύμητες ιδιότητες έως ένα βαθμό, ώστε να αναπτυχθεί ένα υποψήφιο φάρμακο δηλαδή μία ένωση, η οποία να αξίζει να εισέλθει σε εκτενείς βιολογικές, φαρμακολογικές και *in vivo* μελέτες. Τέλος, αναπτύσσεται ένα κλινικό φάρμακο, δηλαδή μία ένωση έτοιμη να εισαχθεί σε κλινικές δοκιμές [Silverman R. B., 2004].

#### **1.4.2. Τα σύμπλοκα των μετάλλων στην Ιατρική**

Τα μέταλλα παίζουν κρίσιμο ρόλο στα βιολογικά συστήματα μιας και ένα από τα χαρακτηριστικά τους είναι ότι εύκολα χάνουν ηλεκτρόνια, σχηματίζοντας θετικά φορτισμένα ιόντα, τα οποία τείνουν να είναι διαλυτά σε βιολογικά υγρά. Αυτή η κατιονική μορφή είναι υπεύθυνη για την σημαντικότητα των μετάλλων στην Βιολογία, διότι ενώ τα μεταλλικά ιόντα στερούνται ηλεκτρονίων, τα περισσότερα βιολογικά μόρια όπως οι πρωτεΐνες και το DNA, είναι πλούσια σε ηλεκτρόνια, και ως εκ τούτου, η έλξη αυτών των αντίθετων φορτίων οδηγεί σε μια γενική τάση δέσμευσης και αλληλεπίδρασης των μεταλλικών ιόντων με τα βιολογικά μόρια [Orvig C. and Abrams M. J., 1999].

Η χρήση των μετάλλων για την προαγωγή της υγείας ανάγεται χιλιάδες χρόνια πριν, όταν ο χαλκός, ο σίδηρος και ο ψευδάργυρος αξιοποιούνταν σε εφαρμογές όπως η αποστείρωση του νερού. Χρήση μετάλλων σημειώνεται και κατά την εποχή της Αναγέννησης, με το χλωριούχο υδράργυρο να επιστρατεύεται ως διουρητικό, ενώ από το 1900 άρχισε να χρησιμοποιείται το  $K[Au(CN)_2]$  για την αντιμετώπιση της φυματίωσης, κάποιες ενώσεις του αντιμονίου για την λειψμανίαση, και διάφορα άλατα χρυσού, για την καταπολέμηση των βακτηρίων, σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις [Howard-Lock H. E. and Lock C. J. L., 1987; Sadler P.J., 1991]. Οι χρήσεις των συμπλόκων μετάλλων συνεχίζονται έως σήμερα, σε διαγνωστικές εφαρμογές όπως η απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (magnetic resonance imaging – MRI) [Scott L.E. and Orvig C., 2009; Hambley T.W., 2007; Thompson K.H. and C. Orvig, 2003; Hermann P. *et al.*, 2008; Terreno E. *et al.*, 2010] αλλά και στην θεραπεία. Οι ενώσεις συντονισμού χρησιμοποιούνται στην θεραπεία διαφόρων ασθενειών (π.χ. το αντιβιοτικό Salvarsan του Ehrlich, για την θεραπεία της σύφιλης, [Lloyd N.C. *et al.*, 2005], κάποιες ενώσεις του βισμούθιου για την θεραπεία του έλκους, [Sun H.Z. *et al.*, 2004], σύμπλοκα του βαναδίου για την θεραπεία του διαβήτη [Thompson K.H. and Orvig C., 2000] κ.τ.λ.

Τα σύμπλοκα μετάλλων ενισχύουν την δυνατότητα κατασκευής μορίων, τα οποία θα είναι καταλληλότερα για την πρόσδεση σε συγκεκριμένους βιολογικούς στόχους. Πράγματι, τα ιόντα των μετάλλων παρουσιάζουν ένα μεγάλο εύρος αριθμών σύνταξης (ή ένταξης) και γεωμετριών, γεγονός το οποίο επιτρέπει την οργάνωση διαφόρων ανιόντων και οργανικών υποκαταστατών (συνοδευόμενων από τις χημικές και βιολογικές ικανότητές τους) σε κατάλληλες κατανομές στο χώρο, παρέχοντας καλύτερη τροπικότητα της «επίθεσης» στα μόρια-στόχους [Alama A. *et al.*, 2009]. Η βελτίωση των βιολογικών ιδιοτήτων των συμπλόκων μετάλλων υπόσχεται να προσφέρει ακόμα περισσότερους θεραπευτικούς και διαγνωστικούς παράγοντες τα επόμενα χρόνια και θα κατευθύνει την φαρμακευτική χημεία σε μια ερευνητική κατεύθυνση μεγίστης σημασίας για την ιατρική [Orvig C. and Abrams J. Michael, 1999].

#### 1.4.3. Το *cis-diamminedichloroplatinum (cisplatin)*



Michele Peyrone (1813-1883)

Το πρώτο σύμπλοκο μετάλλου που χρησιμοποιήθηκε στην μάχη κατά του καρκίνου ήταν αυτό της πλατίνας, με την ονομασία *cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin)*, το οποίο και συντέθηκε για πρώτη φορά, το 1844, από τον Michele Peyrone, [Peyrone M., 1844], καθηγητή Χημείας, στον Πανεπιστήμιο της Γένοβα. Αυτή η ένωση, αρχικά γνωστή με την ονομασία «άλας του Peyrone», ήταν θεμελιώδους

σημασίας για την ανάπτυξη της «θεωρίας της σύνταξης (ή ένταξης) των ενώσεων» για την οποία ο Ελβετός Alfred Werner κέρδισε το Νόμπελ Χημείας, το 1913. Εκατόν είκοσι χρόνια μετά την πρώτη σύνθεση, το 1965, ο βιοχημικός Barnett Rosenberg, δημοσίευσε σχετικά με



Barnett Rosenberg (1926-2009)

την ανασταλτική του δράση, ως προς την διαίρεση της *Escherichia coli* [Rosenberg B. *et al.*, 1965]. Η επιτυχής εισαγωγή του στην θεραπεία του καρκίνου των όρχεων, το 1978, ήταν ένα γεγονός, το οποίο ενίσχυσε το νέο και ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον, όσον αφορά στα φάρμακα που βασίζονται στα

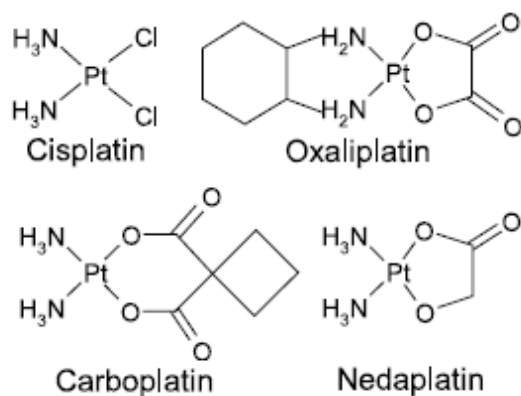


Alfred Werner (1866-1919)

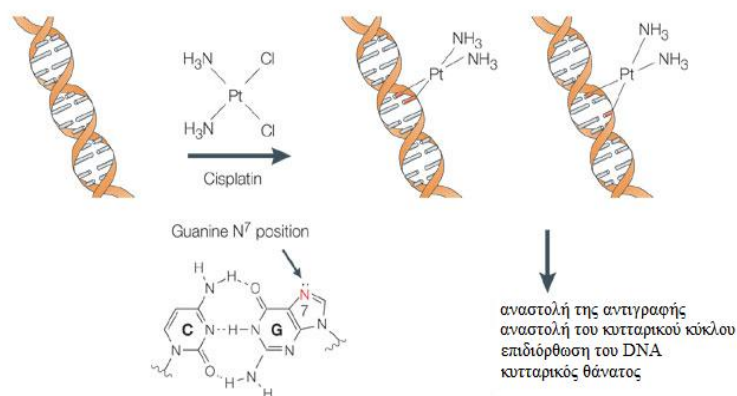
μέταλλα. Παρόλο που το μοριακό πρότυπο του *cisplatin* έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη

επιτυχών φαρμάκων όπως τα carboplatin, oxaliplatin και nedaplatin, είναι δυνατή η ανάπτυξη αντικαρκινικής θεραπείας που βασίζεται σε σύμπλοκα πλατίνας με νέες δομές, αλλά και σε σύμπλοκα με άλλα μέταλλα, με στόχο την μεγαλύτερη δραστηριότητα αλλά και την μικρότερη δυνατή ανάπτυξη ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων σε αυτά.

Έτσι, μετά τον Β' παγκόσμιο πόλεμο, η χημεία των ενώσεων σύνταξης και η διαθεσιμότητα των σταθερών οργανομετάλλων προέτρεψε την διερεύνηση ενός μεγάλου αριθμού ενώσεων μετάλλων με δυνητική κυτταροτοξικότητα. Έκτοτε, έχουν παρασκευαστεί και ελεγχθεί, μερικές χιλιάδες ενώσεις, οι οποίες πρόεκυψαν από τριάντα περίπου μέταλλα, ενώ και μερικές από αυτές βρίσκονται σήμερα στην φάση II και III των κλινικών δοκιμών. [Alama A. *et al.*, 2009].



Εικόνα 6. Δομή των τεσσάρων σημαντικότερων συμπλόκων της πλατίνας



**Εικόνα 7.** Το cisplatin ενυδατώνεται για να σχηματιστούν τα  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$  και  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$  μία φορά, στο εσωτερικό του κυττάρου. Το άτομο λευκόχρυσου του cisplatin συνδέεται ομοιοπολικά με τη θέση N7 των πουρινών προς σχηματισμό 1,2- ή 1,3-ενδοκλωνικών διασταυρωμένων συνδέσεων, και διακλωνικά διασταυρούμενων συνδέσεων. Οι ενώσεις προσθήκης του DNA με το cisplatin προκαλούν διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις, όπως αναστολή της αντιγραφής, αναστολή της μεταγραφής, αναστολή του κυτταρικού κύκλου, επιδιόρθωση του DNA και απόπτωση [Wang D. and Lippard S. J., 2005].

## 1.5. Τα σύμπλοκα του αργύρου στην Ιατρική

### 1.5.1. Το χημικό στοιχείο του αργύρου

Ο άργυρος ή ασήμι (silver) είναι πολύτιμο μέταλλο, λευκό, πολύ μαλακό, ελατό και όλκιμο. Έχει λάμψη και την μεγαλύτερη αγωγιμότητα (ηλεκτρική και θερμική) από όλα τα μέταλλα. Ως χημικό στοιχείο φέρει το σύμβολο Ag (argentum), έχει ατομικό βάρος 107.868, ατομικό αριθμό 47, αριθμό οξείδωσης +1, ειδικό βάρος 10.43, σημείο τήξης στους 962°C και σημείο βρασμού, στους 2163°C. Δεν προσβάλλεται από τα διάφορα αραιά οξέα, διαλύεται όμως στα πυκνά και θερμά οξέα και στο βασιλικό ύδωρ. Στην φύση βρίσκεται ελεύθερος σε μικρά ποσά, κυρίως όμως ενωμένος σε διάφορα ορυκτά, όπως ο αργυρίτης, ο κεραργυρίτης, ο πυραργυρίτης, ο προυσίτης κ.ά. Ο βρωμιούχος άργυρος και ο ιωδιούχος άργυρος χρησιμοποιούνται στην φωτογραφική τέχνη. Ενώσεις του αργύρου χρησιμοποιούνται στην Ιατρική, για διάφορες επαργυρώσεις και στην παρασκευή μελάνης. Ο νιτρικός άργυρος χρησιμοποιείται για την κατασκευή καθρεφτών.

### **1.5.2. Χρήσεις των συμπλόκων μετάλλων του αργύρου στην Ιατρική**

Η ιατρική χρήση του αργύρου στην αντιμετώπιση των τραυμάτων ανάγεται στον 18<sup>ο</sup> αιώνα, κατά τη διάρκεια του οποίου ο νιτρικός άργυρος (AgNO<sub>3</sub>) χρησιμοποιούνταν στη θεραπεία του έλκους [Klasen H. J., 2000]. Η αντιμικροβιακή δράση των ιόντων αργύρου ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά, τον 19<sup>ο</sup> αιώνα, και ο κolloειδής άργυρος έγινε δεκτός από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (US Food and Drug Administration - FDA) για την αντιμετώπιση τραυμάτων, το 1920 [Hugo W. B. and Russell A. D., 1982; Demling R. H. and De Santi L., 2001]. Παρόλα αυτά, μετά την εισαγωγή της πενικιλίνης, το 1940, τα αντιβιοτικά κατέστησαν η κύρια θεραπεία για τις βακτηριακές λοιμώξεις και η χρήση του αργύρου ελαττώθηκε. Τις τελευταίες δεκαετίες, άρχισε και πάλι η ενσωμάτωσή του, τόσο σε φαρμακευτικά όσο και σε εμπορικά προϊόντα, λόγω της γνωστής υψηλής αντιμικροβιακής του δράσης [Marambio-Jones C., and Hoek E. M. V., 2010; Klasen H. J., 2000(a); Klasen H. J., 2000(b)]. Τα προϊόντα αυτά περιλαμβάνουν έμπλαστρα, επιδέσμους, οφθαλμικά σκευάσματα, αντιμολυσματικές επιστρώσεις ιατρικών συσκευών ακόμα και ρούχα, κινητά τηλέφωνα, πλυντήρια, χρώματα. (π.χ. σε οδοντιατρικά εργαλεία και καθετήρες). Επίσης χρησιμοποιείται στον καθαρισμό υδάτων, στην αντιμετώπιση τραυμάτων, και στην επούλωση εγκαυμάτων [Farrell N., 2004; Clement J. L. and Jarret P. S., 1994; Tambe S. M. *et al.*, 2001; Jakupec M. A. *et al.*, 2005; Nomiya K. *et al.*, 2000; Kasuga N. C. *et al.*, 2004; Chung J. Y. and Herbert M. E., 2001; Fuller F. W. *et al.*, 1994].

### **1.5.3. Τα σύμπλοκα του αργύρου στην αντιμετώπιση του καρκίνου**

Η μελέτη της δράσης των συμπλόκων αργύρου έναντι καρκινικών μοντέλων είναι ένα σχετικά νέο πεδίο, το οποίο δεν είχε διερευνηθεί έως σήμερα, σε μεγάλο βαθμό. Παρόλα αυτά, οι πολύ ενδιαφέρουσες ιδιότητες των συμπλόκων του αργύρου προκάλεσαν αρκετές ερευνητικές ομάδες να στρέψουν το ενδιαφέρον τους, στην εξέταση της συμπεριφοράς διαφόρων συμπλόκων του αργύρου, απέναντι στον καρκίνο, *in vitro* [Gautier A. and Cisnetti F., 2012; Hadjikakou S. K. *et al.*, 2008; Zartilas S. *et al.*, 2009].



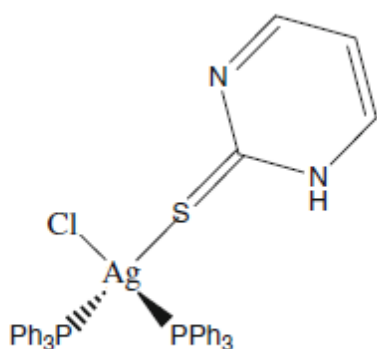
Τα σύμπλοκα αυτά περιλαμβάνουν ενώσεις αργύρου με οργανικά οξέα, με δότες οξυγόνου, με αμινοξέα, με δότες αζώτου, αζώτου-οξυγόνου, θείου, αζώτου-θείου καθώς και με δότες φωσφόρου. Τις παραπάνω κατηγορίες συμπληρώνουν τα διμεταλλικά σύμπλοκα αργύρου-μετάλλου, τα σύμπλοκα καρβενίου-αργύρου, αλλά και σύμπλοκα αργύρου με ακετυλοσαλικυλικό οξύ. Τα παραπάνω σύμπλοκα παρουσιάζουν στο σύνολό τους, κυτταροτοξική δράση, μερικές φορές μεγαλύτερη και από αυτήν της cisplatin, έναντι πλειάδας σειρών καρκινικών κυττάρων, όπως το αδenoκαρκίνωμα τραχήλου (HeLa), το αδenoκαρκίνωμα ωοθηκών (OVCAR-3), το αδenoκαρκίνωμα μαστού (MCF-7), το αδenoκαρκίνωμα νεφρού (A-498), του αδenoκαρκινώματος του παχέος εντέρου (HT-29), αδenoκαρκίνωμα του παχέος εντέρου (DLD1), το ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HepG2), το καρκίνωμα μαστού (MB-157), το καρκίνωμα νεφρικών (Caki-1), το καρκίνωμα πνεύμονα (H460), το γλοιοβλάστωμα (U-87 MG), τα κύτταρα ηπατικού όγκου (HuH7) και το ανθρώπινο κακόηθες μελάνωμα (A-375) [Banti C. N. and Hadjidakou S. K., 2013].

Ο Deegan και οι συνεργάτες του αναφέρουν ότι το σύμπλοκο του αργύρου (I)  $[Ag_2(phen)_3(mal)] \cdot H_2O$  (phen = 1,10-φαινανθρολίνη, malH<sub>2</sub> = μηλονικό οξύ), είναι 3,5 φορές πιο δραστικό από την cisplatin, έναντι νεφρικών και ηπατικών καρκινικών κυττάρων *in vitro* [Deegan C. *et al.*, 2007], ενώ σύμπλοκα αργύρου-κουμαρίνης εμφανίζονται ως 2.5-5.5 φορές πιο κυτταροτοξικά από την cisplatin [Thati B *et al.*, 2009]. Τα *in vitro* δεδομένα όσον αφορά στην κυτταροτοξική δράση των συμπλόκων αργύρου, έρχεται να συμπληρώσει η μελέτη της Banti και των συνεργατών της, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της οποίας, σύμπλοκα αργύρου με μεικτούς υποκαταστάτες και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες, δύνανται να συνδεθούν με την λιποξυγενάση καθώς και με το DNA θύμου αδένος μόσχου, επιφέροντας μεταβολές στην λειτουργία τους και αποπτωτικά φαινόμενα [Banti C. N. *et al.*, 2012].

### **1.6. Το σύμπλοκο αργύρου $[AgCl(tpp)_2(pmtH)]$**

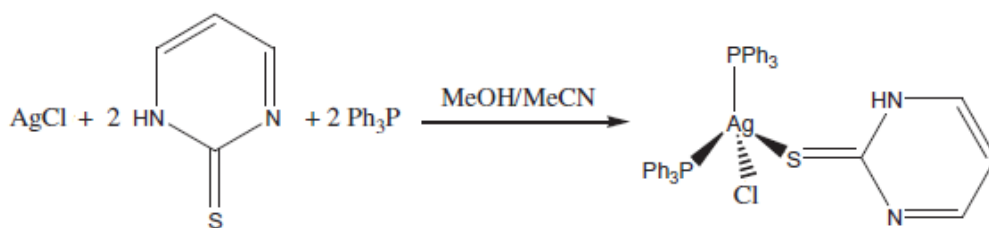
Το σύμπλοκο του αργύρου  $[AgCl(tpp)_2(pmtH)]$  είναι μία χημική ένωση του αργύρου, με οργανικούς υποκαταστάτες, την 2-μερκαπτοπυριμιδίνη [2-mercaptopyrimidine (pmtH)] και την τριφαινυλοφωσφίνη [triphenylphosphine (tp)]. Πρόκειται για ένα μονομερές, με

κρυσταλλογραφικά «άτακτη» τετραεδρική γεωμετρία, γύρω από ένα ιόν Ag(I). Δύο άτομα φωσφόρου από τις δύο τριφαινυλοφωσφίνες και ένα άτομο χλωρίου από την 2-μερκαπτοπυριμιδίνη συντονίζονται στο κέντρο του μετάλλου [Batsala G.K. *et al.*, 2012]. Το σύμπλοκο αυτό παρουσιάζει σημαντική κυτταροτοξική δράση ενάντια στην κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος μαστού (MCF-7), χωρίς να συμβαίνει το ίδιο με την φυσιολογική σειρά εμβρυϊκών ινοβλαστών (MRC-5) ανθρώπου, ενάντια στην οποία παρουσιάζει μικρότερη κυτταροτοξικότητα. [Velalopoulou A. *et al.*, 2013].

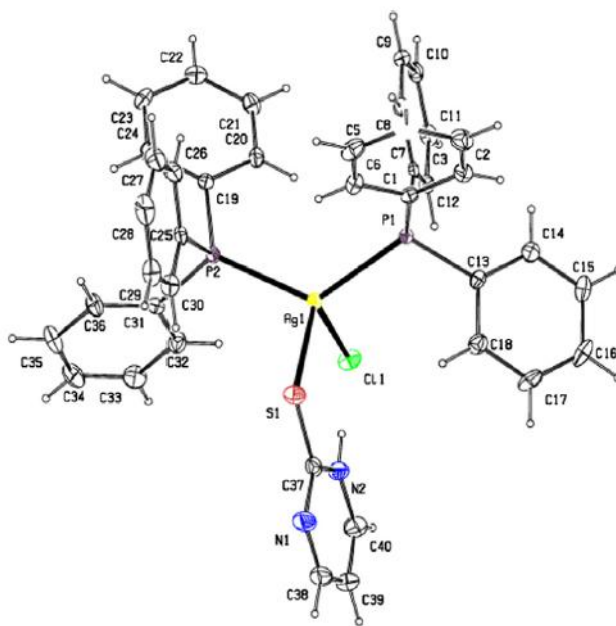


**Εικόνα 8.** Μοριακό απεικόνιση του συμπλόκου [AgCl(tpp)2(pmtH)]

[Velalopoulou A. *et al.*, 2013].



**Εικόνα 9.** Αντίδραση παρασκευής του συμπλόκου [AgCl(tpp)2(pmtH)] [Batsala G.K. *et al.*, 2012]



**Εικόνα 10.** Διάγραμμα ORTEP του συμπλόκου  $[AgCl(trp)_2(pmtH)]$ , όπου αριθμούνται τα στοιχεία της ένωσης. Τα θερμικά ελλειψοειδή είναι σχεδιασμένα στο 50% του επιπέδου πιθανότητας [Batsala G.K. *et al.*, 2012].

### 1.7. Επίμυες (rats) ως πειραματόζωα στην έρευνα

Οι επίμυες (rats) έχουν θεωρηθεί «άθλια», «ύπουλα» και γεμάτα παράσιτα ζώα, λόγω του ρόλου που διαδραμάτισαν στην εξάπλωση της μαύρης πανώλης, κατά τα μεσαιωνικά χρόνια, καθώς και για τους τραυματισμούς και τις καταστροφές που έχουν επιφέρει στους ανθρώπους, σε όλες τις εποχές. Παρόλα αυτά, ένα από τα είδη των επιμύων, το *Rattus norvegicus*, χρησιμοποιήθηκε στην έρευνα από τα μέσα του 1800, οδηγώντας σε αυτό που σε ελεύθερη μετάφραση περιέγραψε ο Lindsey [Lindsey



*Rattus norvegicus*

J.R.,] ως την «μετάβαση από τους υπονόμους σε μία θέση ευγενείας, μέσω της συμβολής τους στην προαγωγή της ανθρώπινης υγείας και ευεξίας». Ο επίμυς (rat) και συγκεκριμένα το *Rattus norvegicus* (καφέ επίμυς) αποτελεί το δεύτερο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο είδος

ζώου στην βιοϊατρική έρευνα. Οι επίμυες αποτελούν το 21% του συνόλου των ζώων που χρησιμοποιούνται, μία κάπως απατηλή εικόνα χαμηλού ποσοστού, αλλά εάν το ποσοστό αυτό προστεθεί στο ποσοστό των ποντικών (mice), αυτά τα δύο είδη αποτελούν το 88% του συνόλου των πειραματοζώων που χρησιμοποιούνται στην έρευνα [National Research Council, 1998]. Οι επίμυες χαρακτηρίζονται από μία πληθώρα πλεονεκτημάτων, που τους καθιστούν ιδανικά ζωικά μοντέλα. Είναι άμεσα διαθέσιμοι από πολλές εμπορικές και ιδιωτικές πηγές, χαρακτηρίζονται από γενετική ομοιομορφία, το κόστος αγοράς και συντήρησης δεν είναι



μεγάλο, ο χειρισμός τους είναι σχετικά εύκολος, προσαρμόζονται σε νέα περιβάλλοντα και συνθήκες, οι φυσιολογικές τους παράμετροι είναι γνωστές όπως και η μικροχλωρίδα τους ενώ κάποια άτομα του είδους εμφανίζουν διαταραχές, χρήσιμες στην μοντελοποίηση [Van Hoosier G. L., 1975]. Τέλος, ο μικρός χρόνος ζωής προσδίδει την ευκαιρία μελέτης μακροχρόνιων επιδράσεων πειραματικών θεραπειών για την βελτίωση της υγείας και της καλής ζωής.

Οι επίμυες χρησιμοποιούνται στην οδοντιατρική έρευνα, στην εμβρυολογία-τερατολογία [Beaudoin A.R., 1980], στην τοξικολογία [Briggs G.B. and Oehme F.W., 1980], στην ογκολογία, [Peckham J.C., 1980], στην γεροντολογία [Burek J.D. and Hollander C.F., 1980], στην έρευνα των καρδιαγγειακών παθήσεων [Bishop S.P., 1980], στην ανοσολογία [Carter B.P. and Bazin H., 1980] και στην έρευνα των λοιμωδών νοσημάτων [Despommier D. D., 1980], ενώ υπάρχουν περίπου 50 φυλές, οι επικρατέστερες εκ των οποίων είναι οι Wistar, Sprague-Dawley και Long-Evans.

### **1.7.1. Επίμυες Wistar**

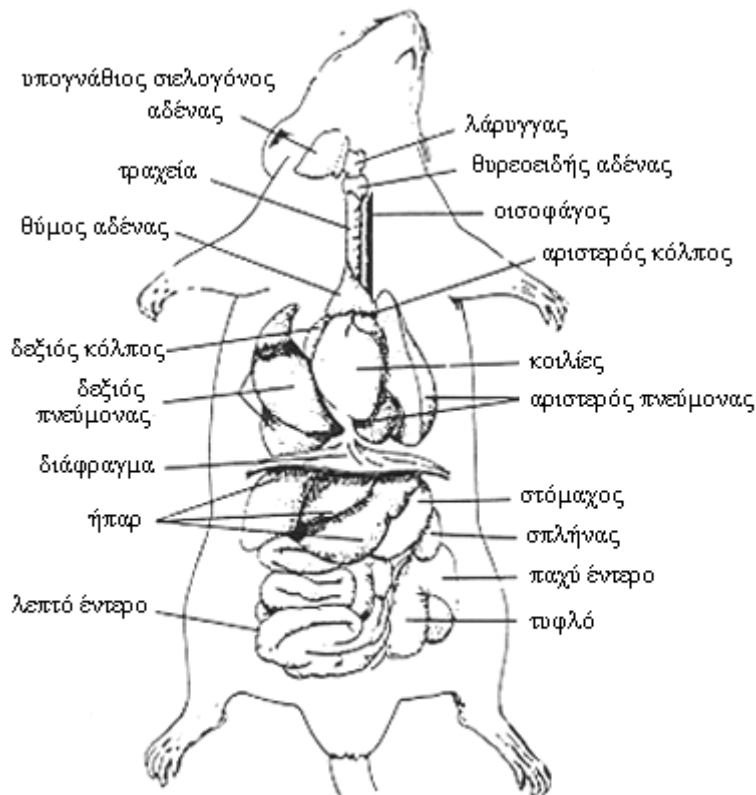
Οι επίμυες Wistar, οι οποίοι ανήκουν στο *Rattus norvegicus*, αποτελούν μικρού σωματικού μεγέθους φυλή αλφικών επιμύων, με λευκό τρίχωμα και δέρμα, καθώς και κόκκινα μάτια. Είναι ανθεκτικοί στις ασθένειες και δεν αναπτύσσουν αυτόματα νεοπλάσματα. Η φυλή αναπτύχθηκε στο Ινστιτούτο Wistar, το 1906, και αποτελεί το πρώτο στέλεχος που

εξυπνήρησε ως πειραματικό μοντέλο, όταν τα εργαστήρια χρησιμοποιούσαν πρωτίστως το οικιακό ποντίκι (*Mus musculus*).



### **1.7.2. Στοιχεία ανατομίας και φυσιολογίας**

Οι επίμυες δεν φέρουν χοληδόχο κύστη, φέρουν όμως χοληδόχο πόρο. Τα επινεφρίδιά τους βρίσκονται μακριά από τα κεντρικά αιμοφόρα αγγεία, γεγονός που κάνει την επινεφριδεκτομή λιγότερο επικίνδυνη στο είδος αυτό. Στον έσω κανθό του οφθαλμού τους, υπάρχει ο αδένας του Harder. Πρόκειται για τροποποιημένο δακρυϊκό αδένα, ο οποίος παράγει εκκρίσεις πλούσιες σε πορφυρίνη, οι οποίες λιπαίνουν τον οφθαλμό. Σε καταστάσεις στρες, παρατηρείται αύξηση της παραγωγής του εκκρίματός του, με αποτέλεσμα την εμφάνιση χαρακτηριστικής κόκκινης κηλίδας κάτω από τα μάτια. Το σωματικό βάρος των ενήλικων αρσενικών είναι 300-500 g και των θηλυκών 250-300 g. Ζουν για 2-3 χρόνια. Η θερμοκρασία του σώματός τους είναι 37.5-38.5°C και ρυθμίζεται με τη βοήθεια ιδρωτοποιών αδένων που βρίσκονται στην πελματιαία επιφάνεια του άκρου ποδός, καθώς και με διαστολή των αγγείων της ουράς. Ο καρδιακός ρυθμός είναι 300-500 καρδιακοί παλμοί/λεπτό και ο αναπνευστικός 70-110 αναπνοές/λεπτό [Rollin B. E., Kesel M. L.]



**Εικόνα 11.** Γραφική απεικόνιση της ανατομίας του επίμους

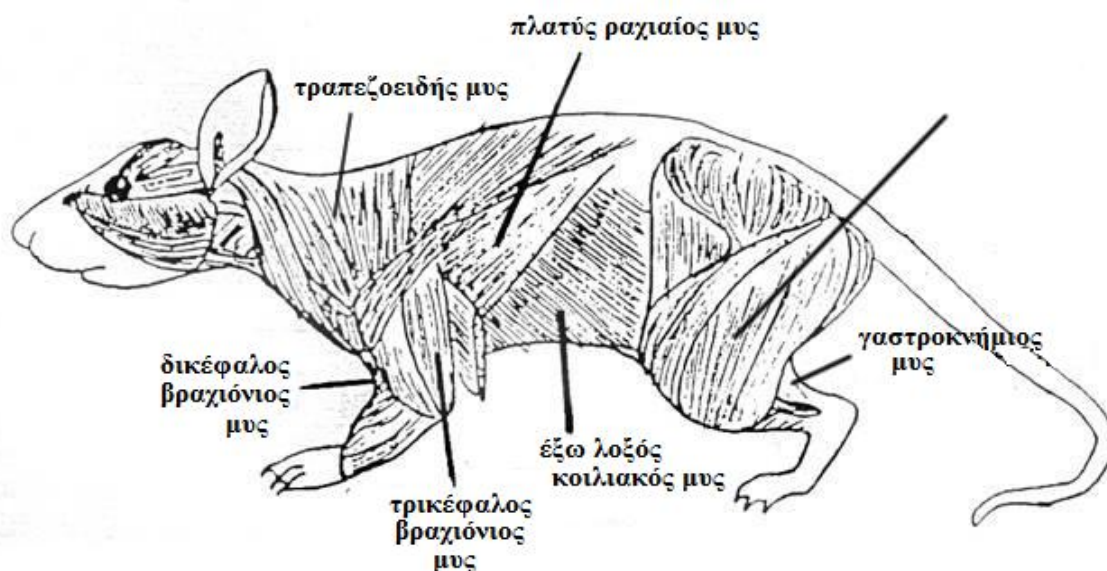
### **1.7.3. Συμπεριφορά**

Οι επίμους είναι φιλικά ζώα όταν δέχονται ήπιους χειρισμούς. Οι τακτικοί χειρισμοί τα καθιστούν ακόμη πιο φιλικά προς τον άνθρωπο. Έχουν συνήθως περιέργεια και τάση προς εξερεύνηση του γύρω χώρου. Θεωρούνται νυκτόβια ζώα δεδομένου ότι αναπτύσσουν δραστηριότητα κατά τις νυκτερινές κυρίως ώρες. Ωστόσο, η όρασή τους δεν είναι καλή.

### **1.7.4. Αναπαραγωγή**

Ο επίμους ενηβώνεται σε ηλικία 6-8 εβδομάδων, αλλά οδηγείται σε σύζευξη σε ηλικία 12-16 εβδομάδων (ή όταν το θηλυκό φτάσει να ζυγίζει 250 g και το αρσενικό, 300 g). Η διάρκεια

της αναπαραγωγικής δραστηριότητας των επιμύων είναι 12-18 μήνες. Οι ωοθηκικοί κύκλοι εκδηλώνονται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (πολυοιστρικό ζώο) και διαρκούν 4-5 ημέρες, ενώ το στάδιο του οίστρου 14 ώρες. Χαρακτηριστικά συμπτώματα του οίστρου είναι η υπερβολική κινητικότητα του ζώου, το τρεμούλιασμα των αυτιών του και η λήψη στάσης ζευγαρώματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι για τη φυσιολογική εκδήλωση της αναπαραγωγικής δραστηριότητας η φωτοπερίοδος θα πρέπει να διαρκεί 12-16 ώρες. Η εγκυμοσύνη διαρκεί 21-23 ημέρες, εκτός εάν κατά τη διάρκεια της η μητέρα γαλουχεί, γεγονός που παρατείνει την εγκυμοσύνη κατά 3-7 ημέρες. Σε κάθε τοκετό γεννιούνται 6-12 νεογέννητα βάρους 5 g το καθένα. Η γαλουχία διαρκεί 21 ημέρες. [Baker D. E. J., 1980].



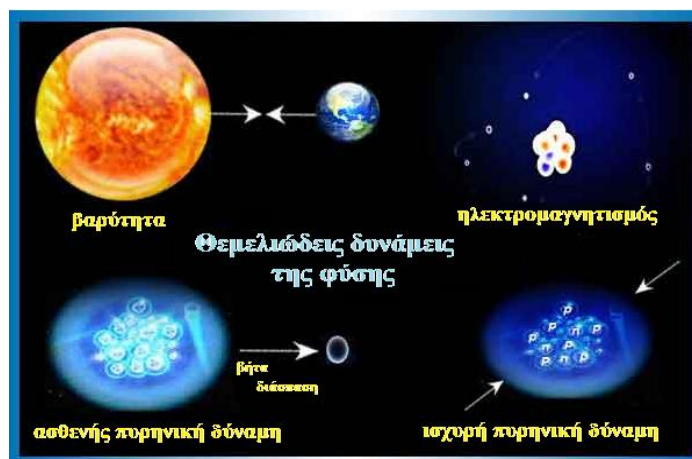
Εικόνα 12. Μυϊκό σύστημα επίμωος Wistar.

### ***1.8. Ηλεκτρομαγνητισμός***

Ηλεκτρομαγνητισμός είναι το σύνολο των φαινομένων που απορρέουν από το ηλεκτρικό φορτίο των σωματιδίων και από την αλληλεπίδραση των ηλεκτρικών με τα μαγνητικά πεδία. Η ηλεκτρομαγνητική δύναμη είναι μία εκ των τεσσάρων θεμελιωδών δυνάμεων της φύσης, (οι υπόλοιπες είναι η βαρύτητα, η ασθενής αλληλεπίδραση, και η ισχυρή αλληλεπίδραση). Η σημασία αυτής της δύναμης για το σύμπαν έγκειται στο γεγονός ότι τα ηλεκτρομαγνητικά φαινόμενα, εξαιρούμενης της βαρύτητας, αντιπροσωπεύουν σχεδόν όλα τα φυσικά φαινόμενα που είναι αντιληπτά από τις ανθρώπινες αισθήσεις, συμπεριλαμβανομένου του φωτός και άλλων ηλεκτρομαγνητικών ακτινοβολιών, το σύνολο των χημικών φαινομένων, τα περισσότερα εκ των μηχανικών φαινομένων (εκτός της βαρύτητας), και φυσικά, του μαγνητισμού και του ηλεκτρισμού.

Η ύλη, με την οποία έρχεται σε καθημερινή επαφή ο άνθρωπος λαμβάνει την μορφή της, εξαιτίας των διαμοριακών δυνάμεων, μεταξύ των μεμονωμένων μορίων, από τα οποία αποτελείται, οι οποίες δεν είναι τίποτα άλλο από ηλεκτρομαγνητικές δυνάμεις. Τα ηλεκτρόνια δεσμεύονται, λόγω των ηλεκτρομαγνητικών επιδράσεων, σε τροχιές γύρω από τους πυρήνες των ατόμων, για να σχηματίσουν τα άτομα, τα οποία είναι τα δομικά στοιχεία των μορίων. Το φαινόμενο αυτό διέπει όλες τις χημικές αντιδράσεις στη χημεία, οι οποίες προκύπτουν από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ηλεκτρονίων των γειτονικών ατόμων, οι οποίες με τη σειρά τους καθορίζονται από την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής δύναμης και της ορμής των ηλεκτρονίων (momentum) [Young H. D., 1992].





**Εικόνα 13.** Οι τέσσερις θεμελιώδεις δυνάμεις της φύσης, η ηλεκτρομαγνητική, η βαρυτική, η ασθενής πυρηνική και η ισχυρή πυρηνική δύναμη.

Ισχυρή	Μικρής εμβέλειας (1-2 fm)	Υπεύθυνη για το σχηματισμό των πυρήνων
Ηλεκτρομαγνητική	Μεγάλης εμβέλειας ( $\sim 1/r^2$ ), ισχύς: ισχυρή/100	Υπεύθυνη για το σχηματισμό ατόμων και μορίων
Ασθενής	Μικρής εμβέλειας (1-2 fm), ισχύς: ισχυρή/ $10^9$	Υπεύθυνη για τη διάσπαση πυρήνων (ραδιενέργεια)
Βαρυτική	Μεγάλης εμβέλειας ( $\sim 1/r^2$ ), ισχύς: ισχυρή/ $10^{38}$	Υπεύθυνη για την κίνηση πλανητών

### 1.8.1. Η διττή φύση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας

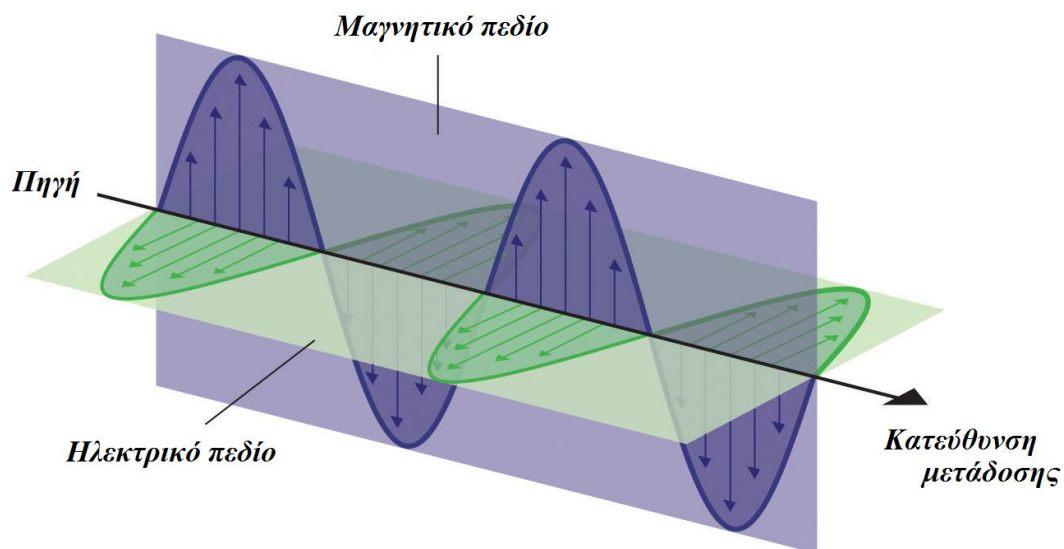
Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συμπεριφέρεται και ως κύμα και ως σωματίδιο. Με την μορφή κύματος, χαρακτηρίζεται από μία ταχύτητα (την ταχύτητα του φωτός), ένα μήκος κύματος και μία συχνότητα, ενώ όταν αντιμετωπίζεται με την μορφή σωματιδίων, αναφερόμαστε στα φωτόνια, καθένα εκ των οποίων φέρει ενέργεια που σχετίζεται με τη συχνότητα του κύματος, και δίνεται από τη σχέση του Planck:

$$E = h \nu$$

όπου  $E$  είναι η ενέργεια του φωτονίου,  $h$ , σταθερά του Planck, ίση με  $6.626 \times 10^{-34}$  J·s και  $\nu$ , η συχνότητα του κύματος [Young H. D., 1992].

### 1.8.2. Ιδιότητες ηλεκτρομαγνητικού κύματος

Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα που συνθέτουν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία περιγράφονται ως μεταδιδόμενα εγκάρσια κύματα ταλάντωσης του ηλεκτρικού και του μαγνητικού πεδίου. Το χαρακτηριστικό αυτό σημαίνει ότι οι ταλαντώσεις του ηλεκτρικού και του μαγνητικού πεδίου είναι κάθετες προς την κατεύθυνση της μεταφοράς της ενέργειας και της διάδοσης του κύματος.



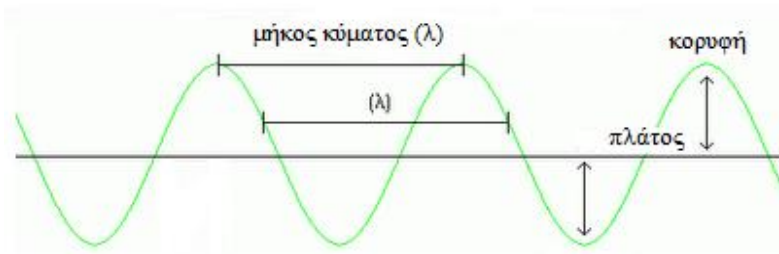
Εικόνα 14. Διάδοση του ηλεκτρομαγνητικού κύματος στο χώρο.

Το μήκος κύματος  $\lambda$ , είναι η απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών κορυφών του κύματος. Η συχνότητα  $\nu$ , είναι ο αριθμός που εκφράζει τα πόσα μέγιστα κυμάτων διέρχονται από

ορισμένο σημείο, στη μονάδα του χρόνου και είναι αντιστρόφως ανάλογη του μήκους κύματος, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$v = f\lambda$$

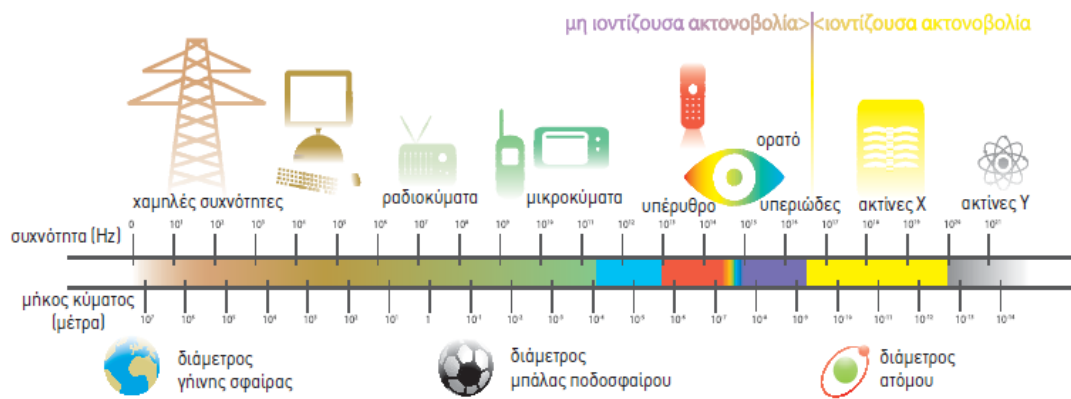
Η μονάδα μέτρησης της συχνότητας είναι  $s^{-1}$  ή Hz (hertz) ( $1\text{Hz} = 1 s^{-1}$ ). Πλάτος είναι το ύψος του κύματος, μετρούμενο από το μέσο σημείο έως το μέγιστο [Young H. D., 1992].



**Εικόνα 15.** Το μήκος κύματος ( $\lambda$ ) είναι η απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών μέγιστων του κύματος. Πλάτος είναι το ύψος του κύματος, μετρούμενο από το κέντρο.

### 1.8.3. Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα βάσει του μήκους τους ταξινομούνται ως ραδιοκύματα, μικροκύματα, υπέρυθρη ακτινοβολία, ορατό φως, υπεριώδης ακτινοβολία, ακτίνες X, ακτίνες  $\gamma$  και κοσμική ακτινοβολία, συμπληρώνοντας το ονομαζόμενο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 16 και καλύπτοντας μήκη κύματος χιλιάδων χιλιομέτρων έως και ίσα με το μέγεθος ενός ατόμου. Θεωρητικά, το μέγιστο μήκος κύματος αντιστοιχεί στο ίδιο το σύμπαν, ενώ το ελάχιστο μήκος κύματος έως το μήκος Planck, αν και θεωρείται άπειρο και συνεχές [Bakshi U. A. and Godse A. P., 2009].



Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

#### 1.8.4. Ιστορική αναδρομή

Κατά το μεγαλύτερο μέρος της ιστορίας του ηλεκτρομαγνητισμού, το φως αποτέλεσε το μόνο γνωστό ηλεκτρομαγνητικό φαινόμενο. Οι αρχαίοι Έλληνες αναγνώρισαν ότι το φως μεταδίδεται σε ευθείες γραμμές και μελέτησαν κάποιες από τις ιδιότητές του, συμπεριλαμβανομένων των φαινομένων της ανάκλασης και της διάθλασης. Η μελέτη του φωτός συνεχίστηκε και κατά τη διάρκεια του 16<sup>ου</sup> και 17<sup>ου</sup> αιώνα, όπου υπήρξαν αντικρουόμενες θεωρίες για την ακριβή φύση του φωτός, αναγνωριζόμενη είτε ως κύμα, ή ως σωματίδιο. Η πρώτη ανακάλυψη των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων εκτός από το φως ήρθε το 1800, όταν ο William Herschel ανακάλυψε την υπέρυθη ακτινοβολία, ενώ το επόμενο έτος, ο Johann Ritter, ο οποίος ασχολούνταν με την αντίθετη άκρη του φάσματος, παρατήρησε αυτό που ονόμασε «χημικές ακτίνες», αόρατες δηλαδή ακτίνες φωτός που προκαλούσαν ορισμένες χημικές αντιδράσεις, οι οποίες συμπεριφέρονταν με παρόμοιο τρόπο με αυτόν των ακτίνων του ορατού φάσματος, αλλά χωρίς να ανήκουν σε αυτό το φάσμα. Έλαβαν λοιπόν την ονομασία, υπεριώδης ακτινοβολία.

Η πρώτη σύνδεση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τον ηλεκτρομαγνητισμό, έγινε το 1845, από τον Maxwell, ο οποίος και κατά τη δεκαετία του 1860, παρέδωσε τέσσερις σπουδαίες διαφορικές εξισώσεις, για το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο. Δύο από αυτές τις εξισώσεις προβλέπουν την πιθανότητα, και την συμπεριφορά των κυμάτων στον χώρο. Αναλύοντας την

ταχύτητα των θεωρητικών αυτών κυμάτων, ο Maxwell συνειδητοποίησε ότι θα πρέπει να κινούνται με ταχύτητα, ίση με την ταχύτητα του φωτός. Αυτή η εκπληκτική σύμπτωση των δύο τιμών οδήγησε τον Maxwell να εξαγάγει το συμπέρασμα, ότι το ίδιο το φως είναι ένα είδος ηλεκτρομαγνητικού κύματος. Οι εξισώσεις του Maxwell, προβλέποντας άπειρο αριθμό συχνοτήτων για τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα, καθώς και την ιδιότητά τους να ταξιδεύουν με την ταχύτητα του φωτός, αποτέλεσαν την πρώτη ένδειξη για την ύπαρξη ολόκληρου του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

Οι προσπάθειες απόδειξης των εξισώσεων του Maxwell οδήγησαν, το 1886, τον φυσικό Heinrich Hertz να παράξει και προσδιορίσει αυτό που σήμερα ονομάζουμε ραδιοκύματα. Αργότερα, ο ίδιος ο Hertz κατάφερε να παράξει και μελετήσει τις ιδιότητες και των μικροκυμάτων. Αυτά τα νέα είδη κυμάτων άνοιξαν το δρόμο των εφευρέσεων όπως ο ασύρματος τηλεγράφος και το ραδιόφωνο.

Το 1895, ο Wilhelm Röntgen παρατήρησε ένα άλλο είδος ακτινοβολίας, τις ακτίνες X, διαπιστώνοντας ότι διαπερνούσαν τα μέρη του ανθρώπινου σώματος, αλλά ανακλώνταν ή διακόπτονταν από πυκνότερη ύλη, όπως τα οστά. Οι ακτίνες X χρησιμοποιήθηκαν πολλάκις, στην ιατρική επιστήμη.

Το τελευταίο ανεξερευνήτο τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος πληρώθηκε με την ανακάλυψη των ακτίνων γάμμα. Το 1900, ο Paul Villard, μελετώντας την ραδιενεργή εκπομπή του ραδίου, εντόπισε ένα νέο είδος ακτινοβολίας, για την οποία αρχικά συμπέρανε ότι αποτελούνταν από σωματίδια παρόμοια με τα γνωστά άλφα και βήτα σωματίδια, αλλά με πολύ πιο διεισδυτική ισχύ. Ακριβή εκτίμηση της ακτινοβολίας έγινε από τον Βρετανό φυσικό William Henry Bragg, το 1910, ο οποίος απέδειξε ότι οι ακτίνες αυτές ήταν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, και όχι σωματίδια, ενώ το 1904, ο Ernest Rutherford τους έδωσε την ονομασία, ακτίνες γάμμα, όταν συνειδητοποίησε ότι ήταν θεμελιωδώς διαφορετικές από τις άλφα και βήτα ακτίνες. Μαζί με τον Edward Andrade, μέτρησαν τα μήκη κύματος αυτών των ακτίνων, και διαπίστωσαν ότι πρόκειται για παρόμοια ακτινοβολία με τις ακτίνες X, αλλά με μικρότερα μήκη κύματος και υψηλότερες συχνότητες.

### **1.8.5. Ηλεκτρομαγνητικά κύματα**

Σε ένα ημιτονοειδές ηλεκτρομαγνητικό κύμα, τα πεδία  $E$  και  $B$  είναι σε κάθε σημείο του χώρου, ημιτονοειδείς συναρτήσεις του χρόνου. Επίσης σε κάθε χρονική στιγμή, η χωρική τους μεταβολή είναι ημιτονοειδής. Μπορούμε να περιγράψουμε τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα με κυματοσυναρτήσεις, οι οποίες θα είναι της μορφής:

$$y = A \sin (\omega t - kx),$$

όπου  $y$  είναι η εγκάρσια μετατόπιση από τη θέση ισορροπίας, την χρονική στιγμή  $t$ , ενός σημείου με συντεταγμένη  $x$ , πάνω στον άξονα μετάδοσης του κύματος. Το  $A$  είναι η μέγιστη μετατόπιση ή πλάτος του κύματος. Το  $\omega$  είναι η γωνιακή του συχνότητα, ίση με το γινόμενο  $2\pi$  επί την συχνότητα  $f$ ,  $k$  είναι ο κυματαριθμός ή σταθερά διάδοσης ίση με  $2\pi/\lambda$ , όπου  $\lambda$  είναι το μήκος κύματος [Young H. D., 1992].

Στην περίπτωση μας, τα  $E$  και  $B$  αντιπροσωπεύουν τις στιγμιαίες στιγμές και τα  $E_{\max}$  και  $B_{\max}$ , αντιπροσωπεύουν τις μέγιστες στιγμές ή πλάτη, των ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων. Οι συναρτήσεις λαμβάνουν τότε την μορφή:

$$E = E_{\max} \sin (\omega t - kx)$$

$$B = B_{\max} \sin (\omega t - kx)$$

### **1.8.6. Περιβαλλοντική έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία και επιδημιολογικές έρευνες**

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, η έκθεση του ανθρώπου σε τεχνητά ηλεκτρομαγνητικά πεδία (EMF) από τις γραμμές παροχής ηλεκτρικού ρεύματος, τις οικιακές συσκευές, τις ιατρικές ηλεκτρονικές συσκευές και κυρίως τα κινητά τηλέφωνα έχει αυξηθεί [Feychting M., *et al.* 2005]. Η ανησυχία τόσο των επιστημόνων όσο και της κοινωνίας για τις πιθανές αρνητικές συνέπειες των τεχνητών ηλεκτρομαγνητικών πεδίων στο ανθρώπινο σώμα έχει αυξηθεί δραματικά, τα τελευταία χρόνια. [Blackman C., 2009; Maslanyj M. *et al.*, 2010; Kwon M. S. and Hamalainen H., 2011] Μεταξύ των μη ιονιζουσών ηλεκτρομαγνητικών

ακτινοβολιών, οι ερευνητές έχουν εστιάσει την προσοχή τους κυρίως στα ηλεκτρομαγνητικά πεδία εξαιρετικά χαμηλών συχνοτήτων (ELF-EMF, 1-3000 Hz) και στα EMF του κινητού τηλεφώνου, εξαιτίας των πιθανών επιπτώσεών τους στον άνθρωπο. Ο Διεθνής Οργανισμός Ερευνών για τον καρκίνο έχει ταξινομήσει το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο των γραμμών παροχής ηλεκτρικού ρεύματος, ως καρκινογόνο τάξης 2B, ή ενδεχομένως καρκινογόνο (IARC 2002). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) και η Διεθνής Επιτροπή για την Προστασία από Μη-Ιονίζουσες Ακτινοβολίες (ICNIRP) έχουν συμπεράνει ότι, βάσει επιδημιολογικών μελετών υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των PF EMF και της οξείας παιδικής λευχαιμίας [Feychting M., *et al.* 2005; Maslanyj M. *et al.*, 2010; Kwon M. S. and Hamalainen H., 2011]. Ωστόσο, δεν προτείνεται κάποιος μηχανισμός της σχέσης αιτίου-αποτελέσματος μεταξύ PF EMF και της λευχαιμίας παιδικής ηλικίας, αντικρούοντας έτσι τα συμπεράσματα του WHO και της ICNIRP [Otto M., and von Muhlendahl K. E., 2007].

Ως πιθανός μηχανισμός για την επαγωγή της λευχαιμίας της παιδικής ηλικίας από τα PF EMF προτάθηκε η καταστολή της έκκρισης μελατονίνης από την επίφυση, η οποία έχει αντικαρκινικές ιδιότητες, μετά από οξεία έκθεση σε PF EMF. Η θεωρία αυτή βασίστηκε σε πειραματικές ενδείξεις, από *in vitro* μελέτες και μελέτες σε ανθρώπους [Lerchl A. *et al.*, 1991; Henshaw D. L. and Reiter R. J., 2005]. Αντίθετα, τα περισσότερα πειράματα χρόνιας έκθεσης κυττάρων σε PF EMF δεν μείωσαν την έκκριση μελατονίνης [Teepen J. C. and van Dijck J. A., 2012] και έτσι οι μελέτες αυτές δεν επιβεβαιώνουν την θεωρία ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού (ion cyclotron resonance-ICR). Επιπλέον, τα PF EMF έχουν ενοχοποιηθεί για αυξημένο κίνδυνο του προστάτη, του εγκεφάλου και για την υψηλή θνησιμότητα του καρκίνου του μαστού, αν και επιδημιολογικές αλλά και μελέτες σχετικά με τον μηχανισμό δράσης των PF EMF, δεν έχουν καταφέρει να προτείνουν ικανοποιητική εξήγηση της συσχέτισης αυτής [Thériault G. *et al.*, 1994; Charles L. E. *et al.*, 2003; Kliukiene J., *et al.*, 2003; Berg H. *et al.*, 2010; Kheifets L. *et al.*, 2010; Baldi I. *et al.*, 2011]. Η IARC ανακοίνωσε πρόσφατα ότι το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο του κινητού τηλεφώνου δύναται να οδηγήσει σε ανάπτυξη όγκων στον εγκέφαλο, παρόλο που επιδημιολογικές και πειραματικές μελέτες έως σήμερα, αμφισβητούν αυτόν τον ισχυρισμό. Παρ' όλα αυτά, παρά τις προσπάθειες επιστημονικής διερεύνησης του θέματος, το μακροχρόνιο πρόβλημα επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων όσον αφορά στις επιδράσεις του μεταβαλλόμενου ηλεκτρομαγνητικού πεδίου

στην ανθρώπινη υγεία, παραμένει άλυτο [Koh E.K. *et al.*, 2008; Kheifets L. *et al.*, 2010]. Εάν αυτά τα φαινόμενα διερευνηθούν με ορθό επιστημονικό τρόπο, τα αποτελέσματα είναι κατανοητά και αποδεκτά, όταν είναι επαναλήψιμα, υπό ελεγχόμενες πειραματικές συνθήκες [Pike E.W., 1933].

### **1.8.7. Χρήσεις ηλεκτρομαγνητικών πεδίων στην Ιατρική**

Τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολύ σημαντικές τεχνολογικές εφαρμογές που αφορούν στη διάγνωση, με την τομογραφία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, τις ακτινογραφίες μέσω ακτίνων X, και την αξονική τομογραφία να αποτελούν μερικά μόνο παραδείγματα. Εκτός όμως από τις τεχνολογικές αυτές εφαρμογές, ένα μέρος της επιστημονικής κοινότητας έστρεψε το ενδιαφέρον της στην εφαρμογή των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων, στη θεραπεία διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, κυρίως σε πειραματικό επίπεδο, όπως η οστεοπόρωση, τα οστικά κατάγματα, η αναγέννηση του μυϊκού συστήματος, ο διαβήτης, η αρθρίτιδα και οι νευρολογικές διαταραχές [Barker A. T. *et al.*, 1984; Bassett C. A. *et al.*, 1974; Dortch A. T. and Johnson M. T., 2006; Fischer G. *et al.*, 2005; László J. *et al.*, 2011; Otter M. W. *et al.*, 1998; Tabrah F. *et al.*, 1990; Wang Z. *et al.*, 2010], ενώ τις τελευταίες δεκαετίες, τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία, σε συχνότητες πέραν αυτών της ιοντίζουσας ακτινοβολίας, σταδιακά εισήχθησαν και στην πεδίο της αντικαρκινικής έρευνας, για την ενδεχόμενη κυτταροτοξική τους δράση, χρησιμοποιούμενα ακόμα και σε κλινικές μελέτες.

Στο σύνολο των μελετών αυτών, περιγράφονται διαφορετικές πειραματικές παράμετροι έκθεσης σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία, όπως οι συχνότητες των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, η διάρκεια και ο τρόπος έκθεσης (συνεχής ή διακοπτόμενη), το είδος του κύματος (παλμικό ή ημιτονοειδές), όπως επίσης, η ένταση και το είδος του μαγνητικού πεδίου (στατικό ή μεταβαλλόμενο). Αλλά και τα μοντέλα του καρκίνου που μελετώνται ποικίλλουν σε εξίσου μεγάλο βαθμό.

Οι *in vitro* μελέτες των επιδράσεων των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων χαμηλών συχνοτήτων έναντι μεγάλου εύρους σειρών καρκινικών κυττάρων έχουν εστιάσει μέχρι σήμερα στο κατά πόσο επηρεάζεται ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων, μετά από

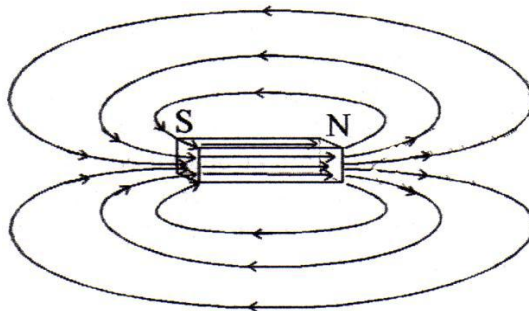


έκθεση τους σε ηλεκτρομαγνητικό πεδίο όπως επίσης και ο τύπος κυτταρικού θανάτου που προκαλείται, εάν δηλαδή το καρκινικό κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση, ή αποδομείται μέσω νεκρωτικών φαινομένων.

## **1.9. Ηλεκτρομαγνητικό πεδίο σωληνοειδούς**

### **1.9.1. Μαγνητικό πεδίο – Δυναμικές γραμμές**

Μαγνητικό πεδίο ονομάζεται ο χώρος μέσα στον οποίο εμφανίζονται μαγνητικές δυνάμεις, τις οποίες διαπιστώνουμε με τη βοήθεια μιας μαγνητικής βελόνας. Όπως στο ηλεκτρικό πεδίο, το μαγνητικό πεδίο περιγράφεται με ένα διανυσματικό μέγεθος που ονομάζεται ένταση του μαγνητικού πεδίου ή μαγνητική επαγωγή. Μονάδα μέτρησης της έντασης του μαγνητικού πεδίου στο S.I. είναι το 1 Tesla (1T).



**Εικόνα 17.** Μαγνητικές δυναμικές γραμμές ραβδόμορφου μαγνήτη.

Μαγνητική δυναμική γραμμή ονομάζεται η γραμμή εκείνη σε κάθε σημείο της οποίας το διάνυσμα της έντασης του πεδίου είναι εφαπτόμενο. Στο εξωτερικό ενός ραβδόμορφου μαγνήτη οι δυναμικές γραμμές κατευθύνονται από το βόρειο στο νότιο πόλο, ενώ στο εσωτερικό του κατευθύνονται από τον νότιο στο βόρειο πόλο.

### **1.9.2. Ιδιότητες μαγνητικών γραμμών**

α) Είναι πάντοτε κλειστές γραμμές, δηλαδή δεν έχουν αρχή και τέλος. Αυτή είναι και η σημαντικότερη διαφορά από τις δυναμικές γραμμές του ηλεκτρικού πεδίου.

β) Δεν τέμνονται.

γ) Η πυκνότητά τους αποτελεί ένδειξη για το μέτρο της έντασης  $B$  του μαγνητικού πεδίου. Όσο πιο πυκνές είναι, τόσο πιο μεγάλη είναι η ένταση του πεδίου και αντιστρόφως.

### **1.9.3. Ομογενές μαγνητικό πεδίο**

Ομογενές μαγνητικό πεδίο ονομάζεται το πεδίο σε κάθε σημείο του οποίου το διάνυσμα της έντασης είναι σταθερό. Ομογενές μαγνητικό πεδίο δημιουργείται στο χώρο ανάμεσα στους ετερόνυμους πόλους δύο μαγνητών. Οι δυναμικές γραμμές είναι παράλληλες και ισαπέχουσες.

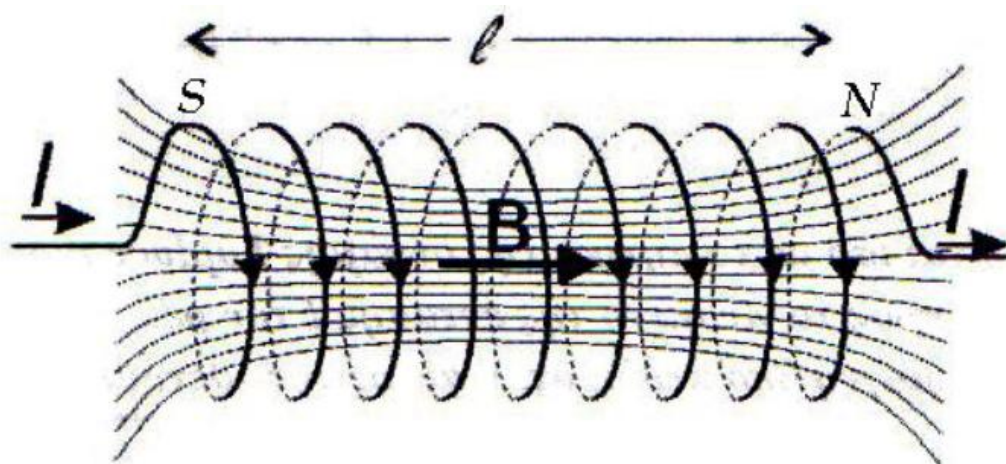
### **1.9.4. Μαγνητικό πεδίο στο εσωτερικό ρευματοφόρου σωληνοειδούς**

Σωληνοειδές ή πηνίο ονομάζεται ένα σύστημα παράλληλων κυκλικών αγωγών οι οποίοι έχουν τα κέντρα τους πάνω στην ίδια ευθεία και διαρρέονται από ρεύματα της ίδιας φοράς. Κάθε κυκλικός αγωγός αποτελεί μια σπείρα. Η ευθεία που διέρχεται από τα κέντρα των σπειρών λέγεται άξονας του σωληνοειδούς. Το σωληνοειδές όταν διαρρέεται από ρεύμα δημιουργεί μαγνητικό πεδίο:

A) Το μαγνητικό πεδίο του σωληνοειδούς μοιάζει με το πεδίο ενός ραβδόμορφου μαγνήτη.

B) Στο εσωτερικό του σωληνοειδούς το μαγνητικό πεδίο είναι ομογενές και παριστάνεται με παράλληλες ισαπέχουσες δυναμικές γραμμές.

Γ) Οι δυναμικές γραμμές είναι κλειστές. Το άκρο από το οποίο εξέρχονται συμπεριφέρεται σαν βόρειος πόλος, ενώ το άλλο σαν νότιος. Στον εξωτερικό χώρο του σωληνοειδούς το μαγνητικό πεδίο είναι ανομοιογενές και αρκετά πιο ασθενές του εσωτερικού, γι' αυτό και δεν μας ενδιαφέρει.

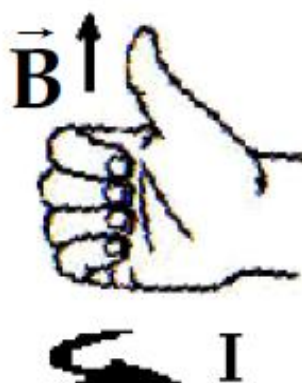


**Εικόνα 18.** Γραφική απεικόνιση σωληνοειδούς που διαρρέεται από ρεύμα. Δίνονται οι φορές του μαγνητικού πεδίου  $B$  και του ηλεκτρικού πεδίου  $I$ .

Το μέτρο της έντασης του ομογενούς πεδίου του σωληνοειδούς σε ένα σημείο του άξονα του, κοντά στο κέντρο του, αποδεικνύεται ότι είναι:

$$\mathbf{B} = \mathbf{K}_\mu 4\pi \mathbf{I} \frac{N}{l}$$

όπου  $N$  ο αριθμός των σπειρών,  $l$  το μήκος του σωληνοειδούς και  $I$  η ένταση του ρεύματος που το διαρρέει.



Η διεύθυνση της έντασης  $B$  συμπίπτει με τη διεύθυνση του άξονα του σωληνοειδούς. Η φορά προσδιορίζεται με τον κανόνα της δεξιάς παλάμης για μια σπείρα. Κλείνουμε τα δάχτυλα της δεξιάς παλάμης γύρω από μια σπείρα, κατά τη φορά που την διαρρέει το ρεύμα, τότε ο αντίχειρας δείχνει τη φορά της έντασης  $B$ , δηλαδή δείχνει το άκρο του σωληνοειδούς που σχηματίζεται βόρειος μαγνητικός πόλος.

**Εικόνα 19.** Κανόνας της δεξιάς παλάμης. Βάσει αυτού εκτιμάται η φορά της έντασης του μαγνητικού πεδίου.

Το πηλίκο  $n = N/l$  εκφράζει τον αριθμό σπειρών ανά μονάδα μήκους (σπείρες/m). Έτσι το μέτρο της έντασης  $B$  δίνεται και από τη σχέση:

$$B = K_{\mu} 4\pi I n$$

### **1.10. Φασματοσκοπία NMR και ηλεκτρομαγνητικό φάσμα**

Οι φασματοσκοπίες υπερύθρου, υπεριώδους και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αποτελούν τεχνικές που καταγράφουν την αλληλεπίδραση μορίων με ηλεκτρομαγνητική ενέργεια.

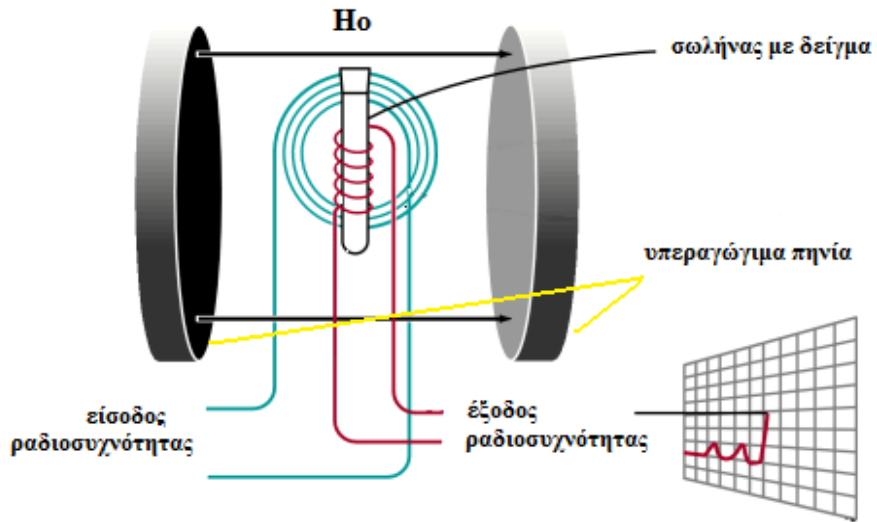
Όταν κάποια οργανική ένωση προσβληθεί από μία δέσμη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, απορροφά ενέργεια σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, αλλά αφήνει να διέλθει ενέργεια σε διαφορετικά μήκη κύματος. Αν ακτινοβοληθεί μία ένωση με ενέργεια πολλών διαφορετικών μηκών κύματος και εντοπιστεί ποια απορροφώνται και ποια διέρχονται, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί το φάσμα της ένωσης αυτής.

Υπάρχουν πολλά είδη φασματοσκοπίας, ανάλογα με την περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που χρησιμοποιείται. Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι η χρησιμότερη φασματοσκοπική μέθοδος, μιας και αποτελεί την πρώτη μέθοδο προσδιορισμού της δομής μορίων, προς την οποία στρέφονται οι χημικοί για την άντληση πληροφοριών, παρέχοντας έναν «χάρτη» του όλου ανθρακικού σκελετού με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο. Βασίζεται στην ιδιότητα μερικών πυρήνων να περιστρέφονται γύρω από κάποιον άξονα (spin) και όντας θετικά φορτισμένοι, να συμπεριφέρονται ως μικροσκοπικοί πυρήνες. Ενώ λοιπόν απουσία μαγνητικού πεδίου τα πυρηνικά spin των μαγνητικών πυρήνων φέρουν τυχαίο προσανατολισμό, όταν βρεθούν υπό την επίδραση ισχυρού μαγνητικού πεδίου, οι πυρήνες αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς, ώστε το δικό τους εξαιρετικά μικρό μαγνητικό πεδίο να διαταχθεί είτε παράλληλα, είτε αντιπαράλληλα προς το εξωτερικό πεδίο. Εν συνεχεία, εάν αυτοί οι πυρήνες δεχθούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κατάλληλης συχνότητας, λαμβάνει χώρα απορρόφηση ενέργειας και η κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας αλλάζει φορά προς την κατάσταση υψηλότερης ενέργειας (αναστροφή spin). Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, τότε οι πυρήνες έχουν συντονιστεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία, δικαιολογώντας τον όρο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός.

Οι πυρήνες που εκδηλώνουν το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού είναι όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων (π.χ.  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) και όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό νετρονίων όπως ο  $^{13}\text{C}$ . Μόνο οι πυρήνες με άρτιο αριθμό πρωτονίων και νετρονίων ( $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$ ) δεν προξενούν μαγνητικά φαινόμενα.

Τα φάσματα NMR αποτυπώνονται σε γραφήματα, στα οποία εμφανίζονται οι ονομαζόμενες χημικές μετατοπίσεις, οι θέσεις δηλαδή στο γράφημα όπου ένας πυρήνας απορροφά. Τα γραφήματα NMR βαθμολογούνται βάσει μιας αυθαίρετης κλίμακας, που ονομάζεται κλίμακα δέλτα ( $\delta$ ). Μία μονάδα δέλτα ( $\delta$ ) ισούται με ένα μέρος στο εκατομμύριο (ppm, part per million) της συχνότητας λειτουργίας του φασματοφωτομέτρου. Η παρακάτω εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για οποιαδήποτε απορρόφηση:

$$\delta = \frac{\text{παρατηρούμενη χημική μετατόπιση (Hz)}}{\text{συχνότητα φασματοφωτομέτρου σε MHz}}$$



**Εικόνα 20.** Απλοποιημένη γραφική απεικόνιση της διάταξης ενός φασματομέτρου πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR spectrometer).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη των επιδράσεων εκπομπής ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, σε συχνότητες πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, δύο χημικών ενώσεων, ενός ευρέως χρησιμοποιούμενου αντικαρκινικού φαρμάκου, της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης (doxorubicin hydrochloride) και ενός νέου συμπλόκου αργύρου Ag(I), με υποκαταστάτες, την τριφαινυλοσφωσφίνη και την 2-μερκαπτοπυριμιδίνη, επί του λειομυοσαρκώματος. Επιπλέον η διατριβή αυτή στοχεύει στην συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων των παραπάνω επιδράσεων με τα αποτελέσματα α) της *in vitro* προσθήκης και της *in vivo* χορήγησης υδροχλωρικής δοξορουβικίνης β) της *in vitro* προσθήκης και της *in vivo* χορήγησης του συμπλόκου αργύρου Ag(I). Στις πειραματικές διαδικασίες, χρησιμοποιήθηκε τόσο η κυτταρική σειρά του λειομυοσαρκώματος, όσο και ένα ορθοτοπικό μοντέλο επαγωγής λειομυοσαρκώματος, σε επίμυες Wistar.





## 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1. Υλικά και εξοπλισμός

Τα αντιδραστήρια και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή έχουν καταχωρηθεί στην λίστα παρακάτω:

#### 3.1.1. Αντιδραστήρια

- ☞ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with low glucose (1g/L), sterile, Gibco® by Life technologies™, 31885-023
- ☞ Fetal Bovine Serum (FBS) (ορός από έμβryo βοός), sterile, Biochrom AG, S0115
- ☞ L-Glutamine 200mM (100X) (L-γλουταμίνη), sterile, Gibco® by Life technologies™, 25030-024
- ☞ Penicillin-Streptomycin (10000Units/ml Penicilin, 10000μg/ml streptomycin) (πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη), sterile, Gibco® by Life technologies™, 15140-122
- ☞ Trypsin/EDTA Solution (0.05%/0.02% w/v) in PBS w/o Ca<sup>2+</sup>, w/o Mg<sup>2+</sup> (διάλυμα θρυψίνης), sterile, Biochrom AG, L2143
- ☞ Phosphate Buffered Saline (PBS) (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων), Sigma-Aldrich®
- ☞ Ethanol absolute (απόλυτη αιθανόλη), Sigma-Aldrich®, 24194
- ☞ Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), Sigma-Aldrich®, M5655
- ☞ Dimethyl sulfoxide (διμέθυλο σουλφοξείδιο), Fisher Chemical, Fisher Scientific, UK, D/4121/PB15
- ☞ Calcium Buffer 20x (διάλυμα ασβεστίου)
- ☞ Annexin V-FITC, BD Pharmingen™, 556420
- ☞ Διάλυμα αιθανόλης 70%
- ☞ RNase A, Sigma-Aldrich®
- ☞ Trisodium citrate dehydrate, (δύδρο κίτρικό τρινάτριο), Sigma-Aldrich, 51804
- ☞ Nonidet P40 substitute, Fluka, 74385

- ☞ Spermine tetrahydrochloride, (τετραϋδροχλωρική σπερμίνη), Sigma, S2876
- ☞ TRIS ultrapure, Applichem, A1086
- ☞ Trypsin, from bovine pancreas, (θρυψίνη) Sigma T1426
- ☞ Trypsin inhibitor, from chicken-egg white (αναστολέας θρυψίνης), Sigma T9253
- ☞ Propidium Iodide (ιωδιούχο προπίδιο), Sigma-Aldrich, P4864
- ☞ Propidium Iodide (ιωδιούχο προπίδιο), Fluka, 81845
- ☞ Glyceryl trioctanoate (τρικαπριλίνη), Sigma-Aldrich®, T9126
- ☞ Formaldehyde solution (φορμαλδεϋδη), min 37%, Merck
- ☞ Diethyl Ether (αιθέρας), Sigma-Aldrich, 32203
- ☞ NaCl (χλωριούχο νάτριο), διάλυμα για ενδοφλέβια έγχυση 0.9% w/v, Fresenius, KabiPac
- ☞ Damizol® (5mg/ml) (μιδαζολάμη - ενέσιμο διάλυμα), SPECIFAR Pharmaceuticals
- ☞ Dormicum® (5mg/ml), (μιδαζολάμη - ενέσιμο διάλυμα), Roche
- ☞ IMALGENE® 1000 (ketamine hydrochloride 100mg/ml), (κεταμίνη - ενέσιμο διάλυμα), Merial
- ☞ Doxorubicin hydrochloride, (υδροχλωρική δοξορουβικίνη - σκόνη), Sigma, D1515
- ☞ Doxorubicin hydrochloride, (υδροχλωρική δοξορουβικίνη - ενέσιμο διάλυμα), Pharmachemie BV
- ☞ Water for injection, (αποστειρωμένο ύδωρ για ενέσιμα διαλύματα, απυρετογόνο) Fresenius Kabi
- ☞ Formalin 10%, (φορμαλίνη), Sigma, HT501128

### **3.1.2. Όργανα και συσκευές**

- ☞ Οπτικό μικροσκόπιο (σκοτεινού πεδίου), Olympus CH20
- ☞ Υδατόλουτρο, Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach FRG, Germany
- ☞ Αυτόκαυστο, Prestige Medical Autoclave 2100 Series, Camlab
- ☞ Φασματοφωτόμετρο, Multiscan® Specrum και Skanlt® Software v.2.4.2, Thermo Scientific

- ☞ Οπτικό ανεστραμμένο μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσεως), Olympus CK2 με λάμπα αλογόνου (6V, 20W)
- ☞ Επωαστής (επωαστικός κλίβανος), Galaxy B, RS Biotech CO2 Incubator, CMB Scientific, USA
- ☞ Κυτταρόμετρο, CyFlow® ML, Partec και software FloMax v.3, Munster, Germany
- ☞ Καταψύκτης βαθιάς κατάψυξης (-80<sup>0</sup> C)
- ☞ Αιμοκυτταρόμετρο newbauer (newbauer haemocytometer)
- ☞ Εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νηματικής ροής, (cell/tissue culture hood) Faster BHA 48, Italy
- ☞ Ηλεκτρονική αντλία, pipetus®-akku, Hirschmann Laborgeräte
- ☞ Ηλεκτρονική οκτακάναλη πιπέττα (1-20μl και 20-300μl)

### 3.1.3. Αναλώσιμα υλικά

- ☞ Φιαλίδια κρυοσυντήρησης, Cryogenic vials, Cryo.S™, sterile, greiner bio-one
- ☞ Πολυτροβλία 6 φρεατίων, Orange Scientific, sterile, 5330500
- ☞ Πολυτροβλία 24 φρεατίων, Cellstar®, sterile, greiner bio-one, 662 160
- ☞ Πολυτροβλία 96 φρεατίων, nunc, sterile, Thermo-scientific, 167008
- ☞ Σιφώνια Pasteur (Pasteur pipettes) γυάλινα-225mm, ISOLAB Laborgeräte GmbH, 084.01.002
- ☞ Σιφώνια (Pipettes) των 25, 10 και 5ml, Costar®, Corning Incorporated, 4250, 4101, 4051
- ☞ Πλαστικοί σωλήνες, falcon (15 ή 50ml), Cellstar® Tubes, sterile, 118 271 και 227 261
- ☞ Σωλήνες Eppendorf
- ☞ Ρύγχη πιπετών διαφόρων μεγεθών
- ☞ Τροβλία καλλιέργειας κυττάρων και ιστών Petri (100x20mm και 60x15mm), Cellstar®, greiner bio-one, 664 160 και 628 160
- ☞ Πιπέττες μηχανικής άντλησης και έγχυσης (0.5-2, 2-20, 20-200, 100-1000μl), Orange Scientific
- ☞ Σύριγγες 1ml, BD 324827

- ☞ Βελόνες 22, 23, 27G
- ☞ Δοχεία συλλογής ούρων, αποστειρωμένα, U-TEST, Latex A.B.E.E., Ελλάδα
- ☞ Νυστέρια, Xinda, No 22 και 10
- ☞ Κολλητική ταινία συγκράτησης, 3M, Transpore™
- ☞ Ράμματα, 4-0, 5-0, Coated Vicryl, sterile, ETHICON, W9501T
- ☞ Ράμματα 4-0, POLYSORB, sterile, Syneture, SL-607

#### **3.1.4. Λοιπός εργαστηριακός εξοπλισμός**

- ☞ Πλαστικά πλατιά φρεάτια διαλυμάτων
- ☞ Aluminium Cryocanes, Nalgene 5015-0001
- ☞ Λαβίδες Mosquito
- ☞ Στελέχη νυστεριών N°3 και 4
- ☞ Ψαλίδια

#### **3.1.5. Εξοπλισμός εκτροφείου πειραματοζώων**

- ☞ Πλαστικοί κλωβοί (πολυανθρακικοί)
- ☞ Στρωμνή
- ☞ Τροφή σε μορφή συμπύκτων, με συγκέντρωση πρωτεϊνών 20-27%
- ☞ Ποτίστρες

#### **3.1.6. Εξοπλισμός πειραματικής διάταξης εκπομπής EMF**

- ☞ Πλαστικοί κυλινδρικοί κλωβοί
- ☞ Χάλκινο σύρμα
- ☞ Χαρτοσωλήνας
- ☞ Μπανάνες, καλώδια

- ☞ Ξύλινη βάση
- ☞ Πλαστικές βίδες
- ☞ Πυκνωτές
- ☞ Σταθεροποιητές
- ☞ Μετασχηματιστές
- ☞ Ψήκτρες
- ☞ Φορητός ηλεκτρονικός υπολογιστής
- ☞ Λογισμικό αναπαραγωγής ήχου
- ☞ Μονωτικά για γέφυρες
- ☞ Αντιστάσεις
- ☞ Ανορθωτές

### **3.2. Κυτταρική σειρά λειομυοσαρκώματος**

#### **3.2.1. Κυτταροκαλλιέργεια**

Κυτταροκαλλιέργεια ονομάζεται η διατήρηση και ανάπτυξη μεμονωμένων κυττάρων *in vitro*, για περισσότερες από 4 ώρες. Συνήθως, τα καλλιεργούμενα κύτταρα αναπτύσσονται πάνω σε κατάλληλη επιφάνεια και σχηματίζουν ένα «μονοκυτταρικό ταπήτιο». Λίγες κυτταρικές σειρές έχουν την δυνατότητα να διαβιούν και να πολλαπλασιάζονται σε εναιώρημα (π.χ. λεμφοκύτταρα, κάποιες σειρές καρκινικών κυττάρων).

Τα θρεπτικά μέσα, στα οποία αναπτύσσεται μία κυτταροκαλλιέργεια ποικίλλουν σε πολυπλοκότητα από πλευράς σύστασης, από τα πολύ απλά, όπως είναι το MEM (Eagle's minimal essential medium), που περιέχει τα απαραίτητα αμινοξέα, βιταμίνες και άλατα, μέχρι τα πιο πολύπλοκα, όπως το CMRL 1969 ή το F12.

Ο ορός αποτελεί το υγρό μέσο που προκύπτει μετά την πήξη του αίματος και συνήθως λαμβάνεται από έμβρυα βοός, μόσχου, από άλογο ή άνθρωπο. Είναι ζωτικής σημασίας υλικό που προστίθεται πολύ συχνά στο καλλιεργητικό μέσο κυττάρων θηλαστικών, σε τελική συγκέντρωση έως 10% κατ' όγκον και χρησιμοποιείται διότι αυξάνει το δυναμικό ανάπτυξης

των κυττάρων. Περιέχει πλήθος αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι δρουν διεγερτικά (μιτογόνα) και ωθούν τα κύτταρα σε αλληπάλληλες κυτταρικές διαιρέσεις.

Η κυτταρική σειρά του λειομυοσαρκώματος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, καλλιεργήθηκε 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 στους 37°C με 5% CO<sub>2</sub>. Όλα τα απαιτούμενα υλικά για την κυτταροκαλλιέργεια αγοράστηκαν από τις εταιρείες Costar και PAA.

Το πλήρες καλλιεργητικό υγρό (DMEM) που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από: 500 ml DMEM που περιείχε 3.7g/l NaHCO<sub>3</sub> και 1.0g/l D-γλυκόζης, όπου προστέθηκαν 55 ml ορός από έμβryo βοοειδούς, 5.0 ml 10000IU/ml πενικιλίνης, 10000µg/ml στρεπτομυκίνης και 5.0 ml 200 mM L-γλουταμίνης. Οι τελικές συγκεντρώσεις που προέκυψαν ήταν: 10% ορός από έμβryo βοοειδούς, 100 µg/ml στρεπτομυκίνης, 100 U/ml πενικιλίνης και 2 mM L-γλουταμίνης.

### **3.2.2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων**

Ύστερα από ορισμένες ημέρες καλλιέργειας και πολλαπλασιασμού, τα κύτταρα στο μονοκυτταρικό ταπήτιο γίνονται τόσα πολλά και αποκτούν τέτοιο βαθμό επαφής μεταξύ τους, ώστε διακόπτεται ο πολλαπλασιασμός τους. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «αναστολή της αύξησης λόγω επαφής» (contact inhibition of growth). Όταν σταματήσει λοιπόν ο πολλαπλασιασμός, τότε η καλλιέργεια είναι «πλήρης» (confluent). Προκειμένου να επιβιώσει η καλλιέργεια, η διαδικασία έχει ως εξής: το τρυβλίο παρατηρείται σε οπτικό μικροσκόπιο, ώστε να ελεγχθεί ο βαθμός πληρότητας της καλλιέργειας, και να επιβεβαιωθεί η απουσία βακτηριακής ή μυκητιασικής μόλυνσης. Κατόπιν αναρροφάται το θρεπτικό υλικό DMEM, πραγματοποιείται έκπλυση των κυττάρων με PBS, και προστίθεται θρυψίνη στην κυτταρική μονοστοιβάδα (1ml). Το τρυβλίο επιστρέφεται στον επωαστή όπου και παραμένει για 2-3 λεπτά, ώστε να δράσει η θρυψίνη και να αποκολληθούν τα κύτταρα. Στη συνέχεια, επαναωρούνται σε μικρό όγκο φρέσκου DMEM, ώστε να εξουδετερωθεί η δραστηριότητα της θρυψίνης και από τον υπάρχοντα όγκο εναιωρήματος κυττάρων στο τρυβλίο, αφήνεται

κατάλληλος όγκος, ώστε να συνεχιστεί η ανάπτυξη της καλλιέργειας. Επίσης προστίθεται επιπλέον DMEM έως ότου ο τελικός όγκος στο τρυβλίο να ισούται με 10 ml.

Η ανακαλλιέργεια των κυτταρικών σειρών πραγματοποιούνται στην εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νηματικής ροής (tissue culture hood), σε τρυβλία Petri των 90mm, ενώ τα κύτταρα αφήνονται να δημιουργήσουν πλήρες ταπήτιο.

### **3.2.3. Κρυοπροστασία και φύλαξη σε βαθιά κατάψυξη & υγρό άζωτο**

Τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν σε άριστη κατάσταση, αν καταψυχθούν με τον κατάλληλο τρόπο, και να χρησιμοποιηθούν ύστερα από πολύ καιρό αφού πρώτα αποψυχθούν.

Ως κρυοπροστατευτικό μέσο χρησιμοποιείται ευρέως το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), σε συγκέντρωση περίπου 5-10%, μέσα στο θρεπτικό υλικό ή σε ορό βοειδούς. Οι κυτταροκαλλιέργειες βυθίζονται σε υγρό άζωτο και φυλάσσονται σε θερμοκρασίες από  $-150^{\circ}$  C (ατμοί αζώτου) μέχρι  $-196^{\circ}$  C (υγρό άζωτο), θεωρητικά «επ' άπειρον».

Η διαδικασία φύλαξης έχει ως εξής: αναρροφάται το DMEM από το τρυβλίο, ακολουθεί πλύση με PBS και κατόπιν προστίθεται 1ml θρυψίνης. Τα κύτταρα που έχουν αποκολληθεί, επαναιωρούνται σε 10ml PBS και μεταφέρονται σε πλαστικούς αποστειρωμένους σωλήνες (falcon) ώστε να φυγοκεντρηθούν, για 5 λεπτά, στις 3500 rpm. Μετά την λήψη της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται στο διάλυμα συντήρησης, το οποίο περιλαμβάνει 90% FBS και 10% διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Τέλος, το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε ειδικά φιαλίδια κρυοσυντήρησης (cryovials) του 1 ml. Τα κύτταρα αυτά αποψύχονται ταχύτατα με τοποθέτησή τους σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας  $37^{\circ}$  C και κατόπιν μεταφέρονται σε φρέσκο καλλιεργητικό υλικό.

### **3.2.4. Σπορά κυττάρων σε τρυβλία**

Η κυτταρική καλλιέργεια θα πρέπει να ανακαλλιεργείται μόλις καταστεί πλήρης (confluent) και προτού καταναλωθούν όλα τα θρεπτικά συστατικά στο καλλιεργητικό μέσο, ούτως ώστε να αποφευχθεί ο κυτταρικός θάνατος.

Στις πειραματικές διαδικασίες των οποίων ακολουθεί η περιγραφή, χρησιμοποιούνται τρυβλία Petri και πολυτρυβλία 6x και 96x, όπου x είναι τα φρεάτια (wells) του κάθε πολυτρυβλίου. Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτήν της ανακαλλιέργειας που περιγράφηκε παραπάνω, έως το στάδιο προσθήκης της θρυψίνης. Από την στιγμή που αποκολλούνται τα κύτταρα, προστίθενται 10 ml φρέσκου DMEM για την εξουδετέρωση της δράσης της θρυψίνης και την επαναιώρηση των κυττάρων. Το εναιώρημα τοποθετείται σε πλαστικό σωλήνα (falcon) και με την βοήθεια του αιμοκυτταρομέτρου, υπολογίζεται ο όγκος εναιωρήματος που θα πρέπει να ληφθεί από το falcon, ώστε να έχουμε τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων ανά τρυβλίο ή ανά φρεάτιο πολυτρυβλίου και συμπληρώνεται κατάλληλος όγκος θρεπτικού μέσου, ώστε ο τελικός όγκος στα μεν τρυβλία Petri να είναι 10 ml, στα πολυτρυβλία 6x να είναι 3ml/φρεάτιο και στα 96x, 100μl/φρεάτιο.

Μετά την διαδικασία της σποράς, κάθε τρυβλίο και πολυτρυβλίο επιστρέφεται στον επωαστή, σε συνθήκες 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, για 24 ώρες ώστε τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν και να δημιουργήσουν ταπήτιο. Μετά τις 24 ώρες επώασης, θα ακολουθήσει το απαιτούμενο πρωτόκολλο της εκάστοτε πειραματικής διαδικασίας.

### **3.3. Παρασκευή διαλυμάτων υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και συμπλόκου αργύρου**

Η υδροχλωρική δοξορουβικίνη σε σκόνη, για τα *in vitro* πειράματα, διαλύονταν σε κατάλληλο όγκο δισαπεσταγμένου αποστειρωμένου ύδατος (ddH<sub>2</sub>O), ούτως ώστε να παρασκευάζεται ένα αποθεματικό διάλυμα συγκέντρωσης 10<sup>-2</sup>M, από το οποίο πραγματοποιούνταν οι κατάλληλες αραιώσεις, για όλες τις πειραματικές διαδικασίες.

Η υδροχλωρική δοξορουβικίνη σε ενέσιμο διάλυμα (2mg/ml), που χρησιμοποιήθηκε για τα *in vivo* πειράματα, διαλύονταν περαιτέρω σε κατάλληλο όγκο ειδικού αποστειρωμένου ύδατος για ενέσιμα διαλύματα (water for injection), ούτως ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη δοσολογία.

Το σύμπλοκο του αργύρου, που ευρίσκετο σε μορφή σκόνης, όσον αφορά στα *in vitro* πειράματα, διαλύονταν σε κατάλληλο όγκο DMSO, για να παρασκευαστεί και πάλι ένα



αποθεματικό διάλυμα συγκέντρωσης  $10^{-2}\text{M}$ , από όπου προέκυπταν και οι υπόλοιπες απαραίτητες αραιώσεις για τα πειράματα.

Όσον αφορά στα *in vivo* πειράματα, το σύμπλοκο διαλύονταν σε κατάλληλο όγκο τρικαπριλίνης, ώστε να επιτευχθούν οι απαραίτητες συγκεντρώσεις της δοσολογίας των χορηγούμενων ενέσεων στους επίμυες, για όλες τις πειραματικές διαδικασίες.

### 3.4. Συχνότητες μελετούμενων ηλεκτρομαγνητικών πεδίων EMF

#### 3.4.1. Λήψη συχνοτήτων από το $^1\text{H-NMR}$ φάσμα υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και του συμπλόκου του αργύρου $[\text{AgCl}(\text{tpp})_2(\text{pmtH})]$

Τα φάσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το  $^1\text{H-NMR}$  της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και του συμπλόκου του αργύρου  $[\text{AgCl}(\text{tpp})_2(\text{pmtH})]$ . Από τα φάσματα αυτά, λαμβάνοντας τις τιμές των χημικών μετατοπίσεων των πυρήνων σε ppm, καθεμίας από τις δύο ενώσεις, εκτιμάται το σύνολο των συχνοτήτων συντονισμού των πυρήνων υδρογόνου ( $^1\text{H}$ ), και των δύο ενώσεων. Αυτές είναι και οι συχνότητες, στις οποίες θα εκπέμπονται το σύνολο των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, στην *in vitro* και στην *in vivo* πειραματική διάταξη εκπομπής. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για την μετατροπή των χημικών μετατοπίσεων σε συχνότητες συντονισμού είναι η εξής:

$$\delta = \frac{\text{παρατηρούμενη χημική μετατόπιση (Hz)}}{\text{συχνότητα φασματοφωτομέτρου σε MHz}}$$

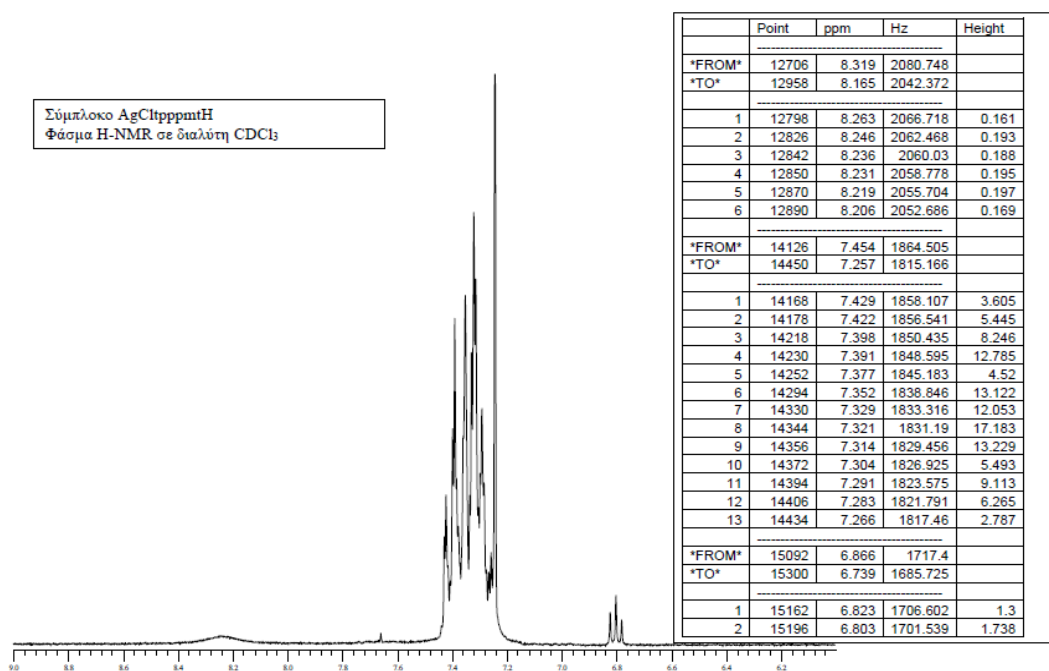
Υδροχλωρική δοξορουβικίνη $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NO}_{11} \cdot \text{HCl}$			Σύμπλοκο αργύρου $[\text{AgCl}(\text{tpp})_2(\text{pmtH})]$		
Χημική μετατόπιση των πυρήνων $^1\text{H}$ (σε ppm)	Συχνότητα φασματομέτρου NMR	Συχνότητες συντονισμού των πυρήνων $^1\text{H}$ (Hz)	Χημική μετατόπιση των πυρήνων $^1\text{H}$ (σε ppm)	Συχνότητα φασματομέτρου NMR	Συχνότητες συντονισμού των πυρήνων $^1\text{H}$ (Hz)

1.160	250 MHz	290.000	7.429	250 MHz	1858.107
1.189		297.250	7.422		1856.541
1.217		304.250	7.398		1850.435
1.255		313.750	7.391		1848.595
1.310		327.500	7.377		1845.183
1.336		334.000	7.352		1838.846
2.004		501.000	7.329		1833.316
2.033		508.250	7.321		1831.190
2.047		511.750	7.314		1829.456
2.237		559.250	7.304		1826.925
2.248		562.000	7.291		1823.575
2.305		576.250	7.283		1821.791
2.565		641.250	7.266		1817.460
2.639		659.750			
2.890		722.500			
2.965		741.250			
3.646		911.500			
3.675		918.750			
3.708		927.000			
3.716		929.000			
3.740	935.000				
3.749	937.250				
3.849	962.250				
3.859	964.750				
3.880	970.000				

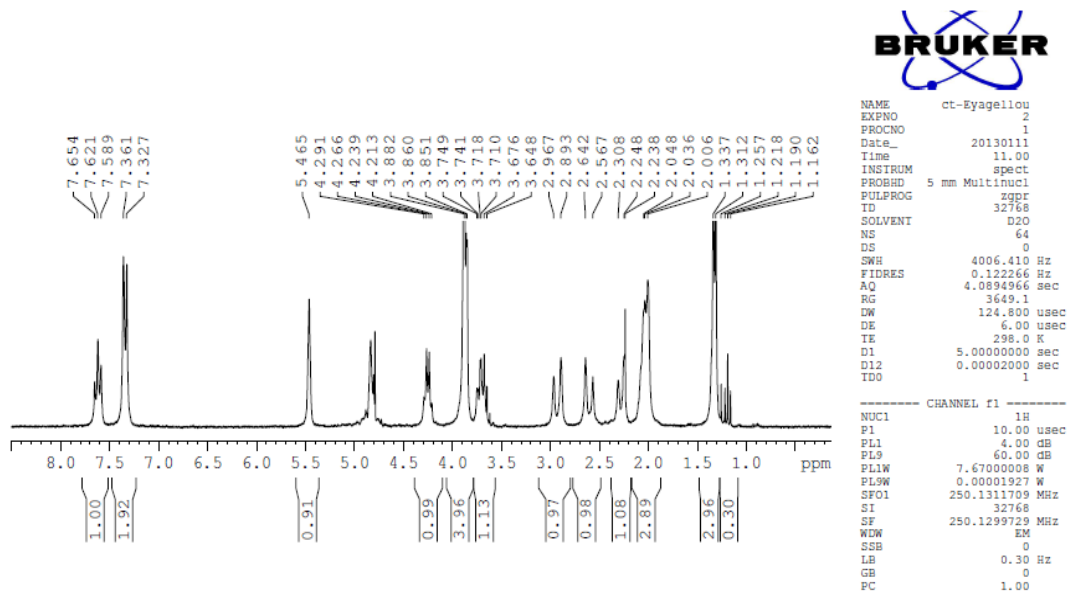
4.211		105.750			
4.237		1059.250			
4.264		1066.000			
4.290		1072.500			
5.464		1366.000			

**Πίνακας 1.** Το σύνολο των συχνοτήτων συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και του συμπλόκου αργύρου.

### 3.4.2. Φάσματα $^1\text{H-NMR}$



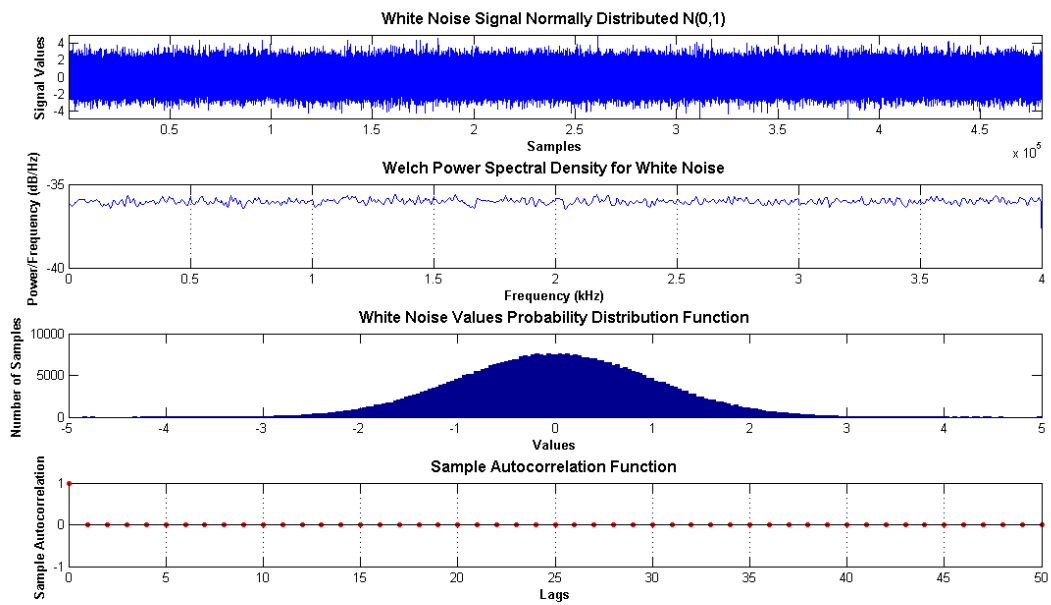
**Εικόνα 21.**  $^1\text{H-NMR}$  φάσμα του συμπλόκου αργύρου  $[\text{AgCl}(\text{trp})_2(\text{pmtH})]$



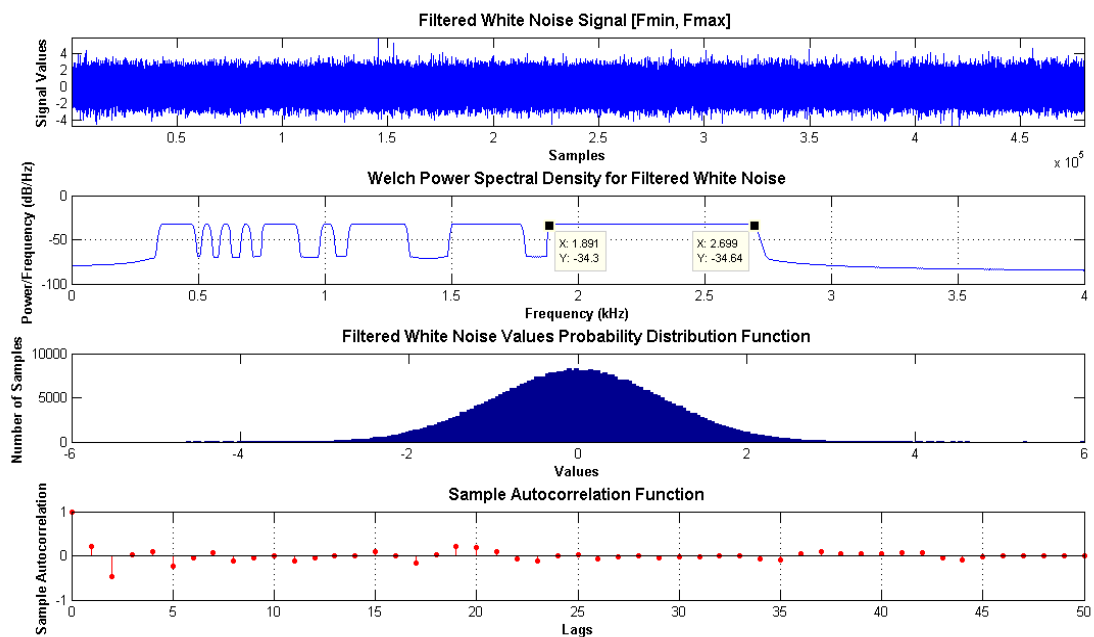
Εικόνα 22. <sup>1</sup>H-NMR φάσμα της υδροχλωρικής δοξορουβικής, C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>11</sub>·HCl

### 3.4.3. Λευκός θόρυβος

Τα ημιτονοειδή ηλεκτρομαγνητικά κύματα που χρησιμοποιούνται κατά τις πειραματικές διαδικασίες εκπομπής αυτής της διατριβής αποτελούν παράδειγμα απλών και περιοδικών ηχητικών κυμάτων. Κατά τη μελέτη των επιδράσεων αυτών των κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού, χρησιμοποιήσαμε συγκριτικά και την εκπομπή λευκού θορύβου, δηλαδή ένα τυχαίο σήμα με μια επίπεδη (σταθερή) φασματική πυκνότητα ισχύος. Με άλλα λόγια, ένα σήμα που να περιέχει ίση ισχύ σε οποιαδήποτε ζώνη συχνοτήτων, με σταθερό πλάτος. Το αρχικό σήμα λευκού θορύβου, που κάλυπτε περιοχή συχνοτήτων από 0-4500 Hz φιλτραρίστηκε, αφαιρώντας τις περιοχές που αντιστοιχούν στις ζώνες των συχνοτήτων συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικής και του συμπλόκου αργύρου. Το σήμα του λευκού θορύβου, χρησιμοποιήθηκε βάσει των ιδίων πρωτοκόλλων εκπομπής όπως και τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού.



**Εικόνα 23.** Το σήμα του λευκού θορύβου, όπως καταγράφεται μέσω του λογισμικού MATLAB καλύπτοντας την περιοχή 0-4500 Hz.



**Εικόνα 24.** Το σήμα του λευκού θορύβου φιλτραρισμένο, δηλαδή χωρίς τις περιοχές των συχνοτήτων συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και του συμπλόκου αργύρου.

### **3.5. Πειραματική διάταξη δημιουργίας ηλεκτρομαγνητικών πεδίων**

#### **3.5.1. Ψηφιακό αρχείο κυματομορφών – Αναπαραγωγή μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή**

Οι συχνότητες συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και του συμπλόκου του αργύρου, όπως προκύπτουν από τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  ανήκουν στο εύρος των συχνοτήτων που γίνονται αντιληπτές από το ανθρώπινο αυτί, πρόκειται δηλαδή για ηχητικές συχνότητες. Με την βοήθεια του λογισμικού MATLAB, το οποίο προσφέρει ένα διαδραστικό περιβάλλον για αριθμητικούς υπολογισμούς, οπτικοποίηση, και προγραμματισμό, δημιουργήθηκαν ψηφιακά ηχητικά αρχεία, με τις επιθυμητές κυματομορφές, και στις επιλεγμένες συχνότητες συντονισμού, και για τις δύο χημικές ενώσεις που μελετώνται στην παρούσα διατριβή. Για την αναπαραγωγή των αρχείων αυτών και την μετάδοση του σήματος στην υπόλοιπη πειραματική διάταξη, μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό *Steinberg Nuendo* 3.1.1.944. Πρόκειται για ένα πρόγραμμα εγγραφής και αναπαραγωγής ήχου, το οποίο αναπαρήγαγε, για την χρονική διάρκεια του πειράματος, τα ψηφιακά αρχεία των ηχητικών κυματομορφών.

#### **3.5.2. Περιγραφή πειραματικής διάταξης εκπομπής EMF**

Η πειραματική διάταξη εκπομπής των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων αποτελείται από δύο τροφοδοτικά ενισχυτών, δύο ενισχυτές σήματος, δύο σωληνοειδή, δύο ειδικές κατασκευές plexiglass, και έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή, μέσω του παραπάνω αναφερόμενου λογισμικού (υποενότητα 3.5.1.) και χρήση των ειδικών ψηφιακών αρχείων, ελέγχονταν ο χρόνος και η ποιότητα εκπομπής των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων. Κατόπιν το σήμα από τον υπολογιστή μεταφέρονταν στους ειδικά κατασκευασμένους ενισχυτές, για την ενίσχυση του σήματος και τέλος στο σωληνοειδές, που ήταν και ο τελικός αποδέκτης του σήματος στην συνδεσμολογία. Αποτέλεσμα της μετάδοσης του σήματος στο σωληνοειδές ήταν η δημιουργία ομογενούς μαγνητικού πεδίου εντός του σωληνοειδούς, στο οποίο και εκτίθονταν το μελετούμενο βιολογικό σύστημα (κύτταρα και επίμυες).

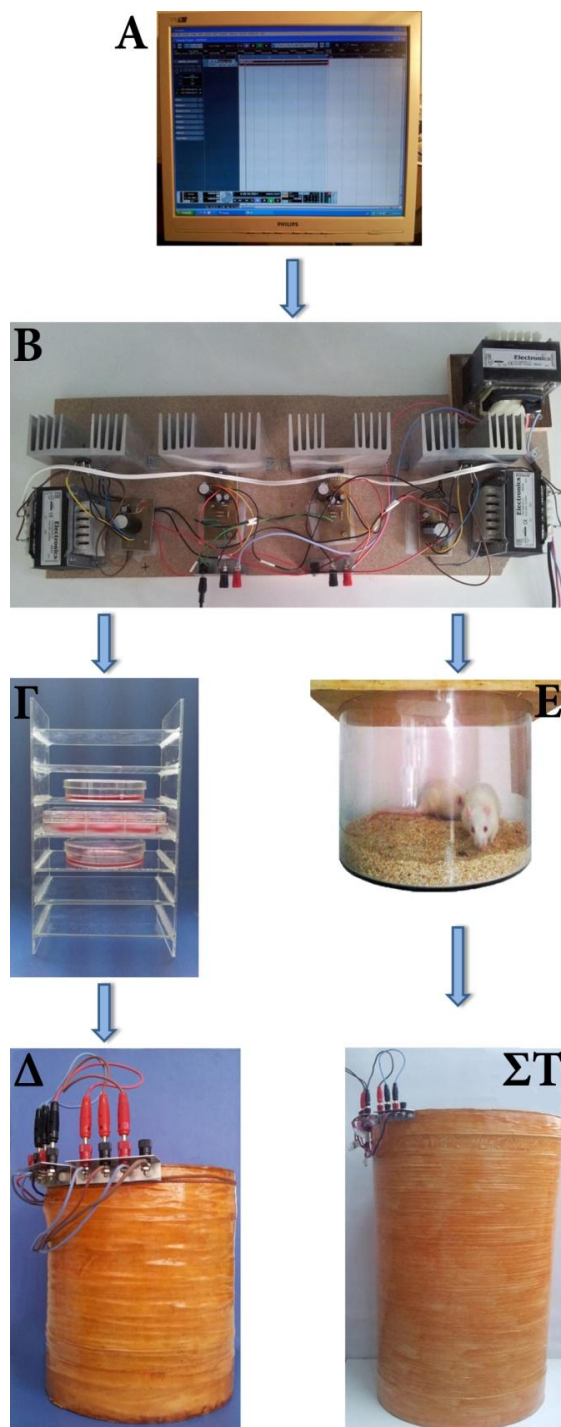
Η έκθεση κυττάρων και επιμύων στα ηλεκτρομαγνητικά κύματα απαιτούσε μεν, την προσαρμογή των συνθηκών έκθεσης στις ανάγκες διατήρησης των παραμέτρων για την

φυσιολογική λειτουργία και του *in vitro* και του *in vivo* συστήματος, αλλά παράλληλα και την διατήρηση των αρχών της φυσικής που διέπουν παρόμοια ηλεκτρομαγνητικά φαινόμενα, ούτως ώστε να διασφαλιστεί όσον το δυνατόν καλύτερα, η αποφυγή σφαλμάτων στην διαμόρφωση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου.

Όσον αφορά στην έκθεση των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων, στα ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού, η πειραματική διάταξη τοποθετούνταν στην αίθουσα των κυτταροκαλλιέργειών. Τα πολυτρυβλία της καλλιέργειας των LMS κυττάρων τοποθετούνταν σε ειδική κατασκευή plexiglass. Ολόκληρη η κατασκευή τοποθετούνταν στο εσωτερικό του σωληνοειδούς και το σωληνοειδές με την σειρά του στον επωαστικό κλίβανο, έτσι ώστε να διατηρούνται σε συνθήκες 37° C, 5% CO<sub>2</sub>. Κατόπιν το σωληνοειδές συνδέονταν με τον υπολογιστή και τον ενισχυτή, και εκκινούσε η εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού της δοξουροβικίνης και του συμπλόκου αργύρου καθώς και του λευκού θορύβου.

Όσον αφορά στην έκθεση των επιμύων που έφεραν όγκο, αυτοί τοποθετούνταν ανά τρία ή τέσσερα ζώα, στον ειδικά διαμορφωμένο κυλινδρικό κλωβό από plexiglass, ο οποίος επιστρώνονταν με στρωμνή, μαζί με μία ποσότητα τροφής. Τρεις τέτοιοι κλωβοί τοποθετούνταν με την σειρά τους, μέσα στο μεγάλο σωληνοειδές, στοιβαγμένοι ο ένας πάνω από τον άλλον. Κατόπιν το σωληνοειδές συνδέονταν με τον ηλεκτρονικό υπολογιστή και τον ενισχυτή και εκκινούσε η εκπομπή. Ολόκληρη η διάταξη για την εκπομπή των επιμύων βρίσκονταν σε ειδικό χώρο του εργαστηρίου, περικλειόμενη από κλωβό Faraday.

Σημειωτέον πως όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, δεν επηρέαζαν την διαμόρφωση των μαγνητικών γραμμών του μαγνητικού πεδίου, στο εσωτερικό των σωληνοειδών, όπου εκτείθονταν οι κυτταρικές καλλιέργειες και οι επίμυες.



**Εικόνα 24.** Φωτογραφική απεικόνιση των τμημάτων της διάταξης εκπομπής ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων *in vitro* και *in vivo*. **A.** Ηλεκτρονικός υπολογιστής και λογισμικό αναπαραγωγής ήχου, **B.** Ενισχυτής σήματος, **Γ.** Κατασκευή plexiglass για την έκθεση των τρυβλίων, **Δ.** Μικρό σωληνοειδές για την *in vitro* έκθεση, **Ε.** Κλωβός από plexiglass, για την έκθεση επιμύων, **ΣΤ.** Μεγάλο σωληνοειδές, για την *in vivo* έκθεση.



### 3.5.3. Χαρακτηριστικά σωληνοειδών

Το μικρό σωληνοειδές που χρησιμοποιήθηκε για την έκθεση των κυτταροκαλλιιεργειών στα ηλεκτρομαγνητικά κύματα αποτελείται από 560 περιελίξεις χάλκινου σύρματος διαμέτρου 0.75 mm, γύρω από πλαστικό σωλήνα, και είναι μήκους 20 cm.

Το μεγάλο σωληνοειδές που χρησιμοποιήθηκε για την έκθεση των επιμύων στα ηλεκτρομαγνητικά κύματα, αποτελείται από 2000 περιελίξεις χάλκινου σύρματος διαμέτρου 0.75 mm, γύρω από χαρτοσωλήνα, που προορίζεται για οικοδομικές εργασίες και είναι μήκους 75 cm. Επίσης, και τα δύο πηνία εξωτερικά έχουν επικάλυψη από μονωτικό βερνίκι.

### 3.5.4. Χαρακτηριστικά συνδεσμολογίας πειραματικής διάταξης εκπομπής EMF

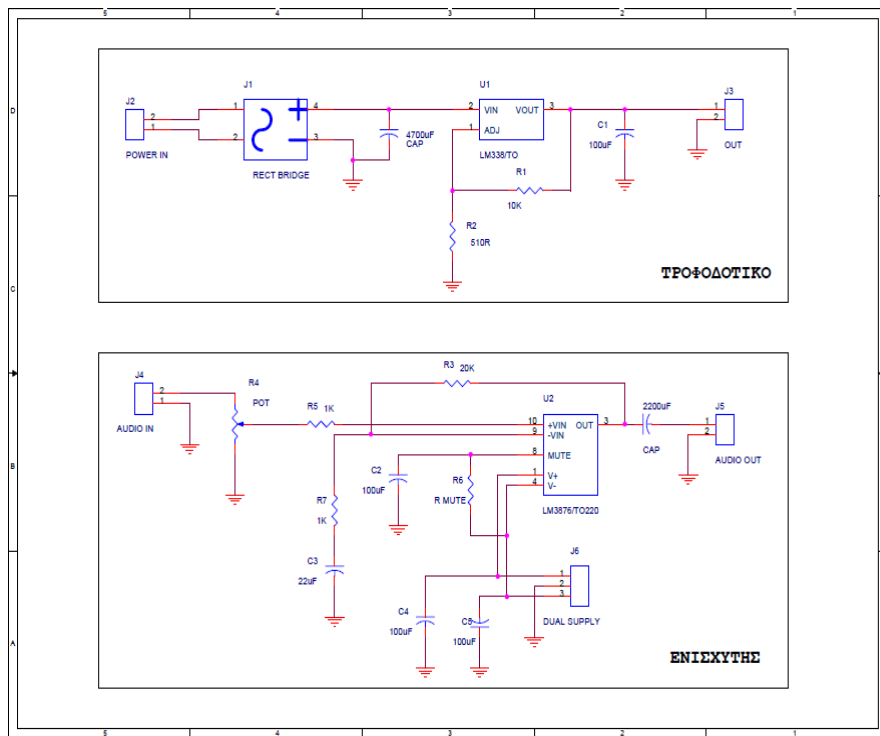
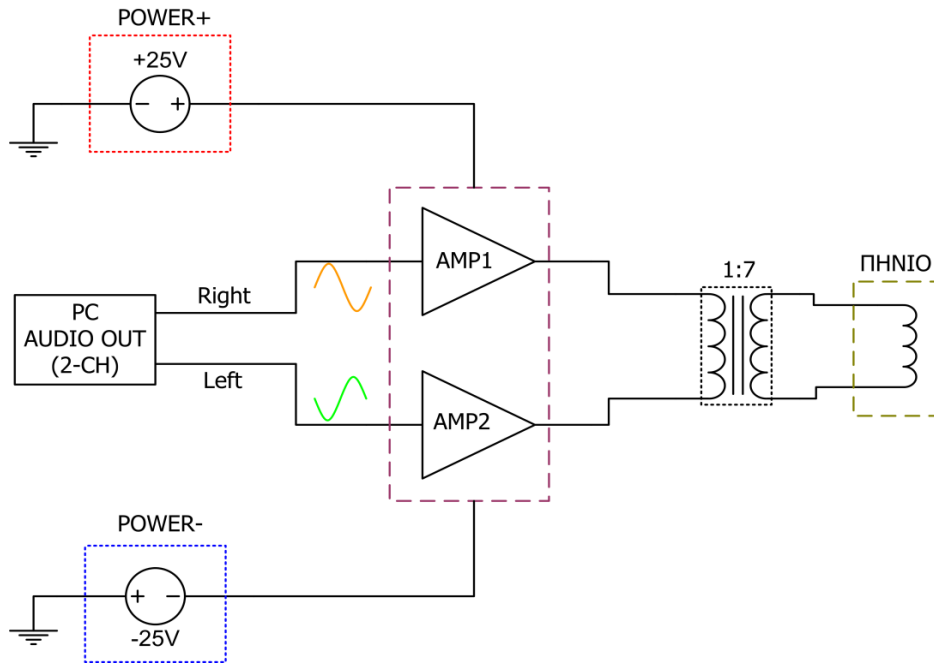
Για τη διάταξη χρησιμοποιήθηκαν δύο τροφοδοτικά (power+, power-) και δύο ενισχυτές (amp1, amp2) σε συμπληρωματική διάταξη, ώστε να έχουν διαφορετική είσοδο. Τα δύο κανάλια εξόδου ήχου από το pc έχουν αντίθετα σήματα γι' αυτό το σκοπό. Οι έξοδοι των ενισχυτών οδηγούνται σε μετασχηματιστή, με ενίσχυση τάσης περίπου 7 φορές, ο οποίος ακολουθείται από το πηνίο. Τα δύο τροφοδοτικά όπως και οι δύο ενισχυτές είναι πανομοιότυπα κυκλώματα μεταξύ τους και τα σχηματικά διαγράμματα παρουσιάζονται παρακάτω. Τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά των ολοκληρωμένων είναι τα εξής:

Για το τροφοδοτικό (power+ ή power-):

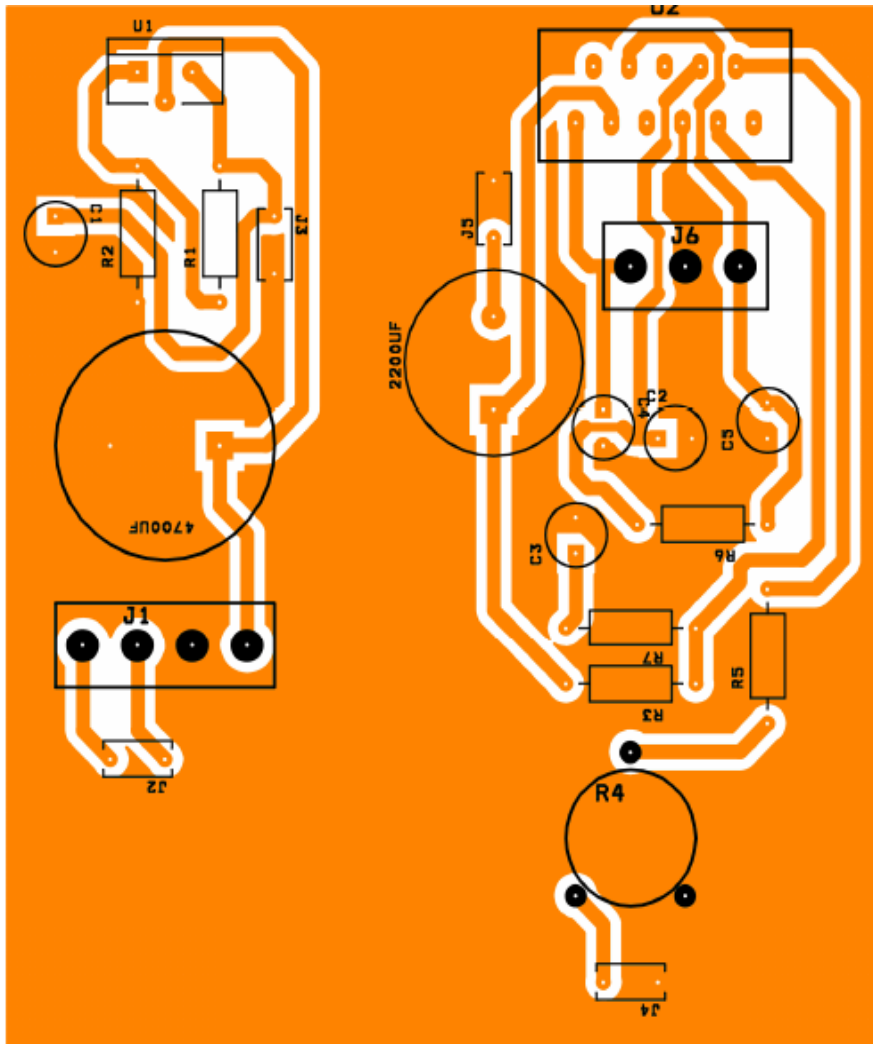
Ολοκληρωμένο (IC)	LM338
Τάση εξόδου ( $V_{out}$ )	25V
Μέγιστη ένταση εξόδου ( $I_{out}$ )	5A

Για τον ενισχυτή (amp1 και amp2):

Ολοκληρωμένο (IC)	LM3876
Ισχύς εξόδου ( $P_{out}$ )	56W
Αντίσταση φορτίου ( $R_{load}$ )	8Ω
Λόγος σήματος προς θόρυβο (SNR)	95dB
Εύρος ζώνης συχνοτήτων (BW)	20Hz-20KHz



**Εικόνα 25.** Σχηματική αναπαράσταση του τροφοδοτικού και του ενισχυτή της πειραματικής διάταξης εκπομπής EMF.



**Εικόνα 26.** Το σχέδιο της συνδεσμολογίας για την εκτύπωση σε πλακέτα (Layout). Οι ονομασίες των εξαρτημάτων (U1, J1 κ.τ.λ.) είναι σε συμφωνία με τα προηγούμενα σχήματα. Αριστερά: Τροφοδοτικό, Δεξιά: Ενισχυτής  
Πλακέτα: FR4, 1.5mm.

### 3.5.5. Κλωβός Faraday-Ηλεκτρομαγνητική θωράκιση

Ο κλωβός Faraday είναι ένα περίβλημα που κατασκευάζεται από αγώγιμο υλικό ή από ένα πλέγμα του υλικού αυτού, γύρω από κάποιο σημείο ή αντικείμενο στο χώρο, ώστε να παρεμποδίζει τα εξωτερικά στατικά και μη στατικά ηλεκτρικά πεδία. Ο κλωβός Faraday έλαβε το όνομά του από τον Άγγλο επιστήμονα Michael Faraday, που τον επινόησε το 1836. Το

εξωτερικό στατικό ηλεκτρικό πεδίο αναγκάζει τα ηλεκτρικά φορτία του αγωγίμου υλικού του κλωβού να διανεμηθούν έτσι ώστε να εξουδετερώσει την επίδραση του πεδίου στο εσωτερικό του κλωβού.

Ο κλωβός Faraday που κατασκευάστηκε στα πλαίσια των πειραματικών διαδικασιών της παρούσας διατριβής κάλυπτε ολόκληρο τον χώρο έκθεσης των επιμύων στα ηλεκτρομαγνητικά κύματα ενώ συνδέθηκε με την γείωση του ηλεκτρικού κυκλώματος του εργαστηρίου.

### **3.5.6. Μέτρηση μαγνητικού πεδίου**

Ο υπολογισμός του μαγνητικού πεδίου βασίζεται στην σχέση:

$$\mathbf{B} = \mathbf{K}_\mu 4\pi \mathbf{I} \frac{\mathbf{N}}{l}$$

όπου N ο αριθμός των σπειρών, l το μήκος του σωληνοειδούς και I η ένταση του ρεύματος που το διαρρέει.

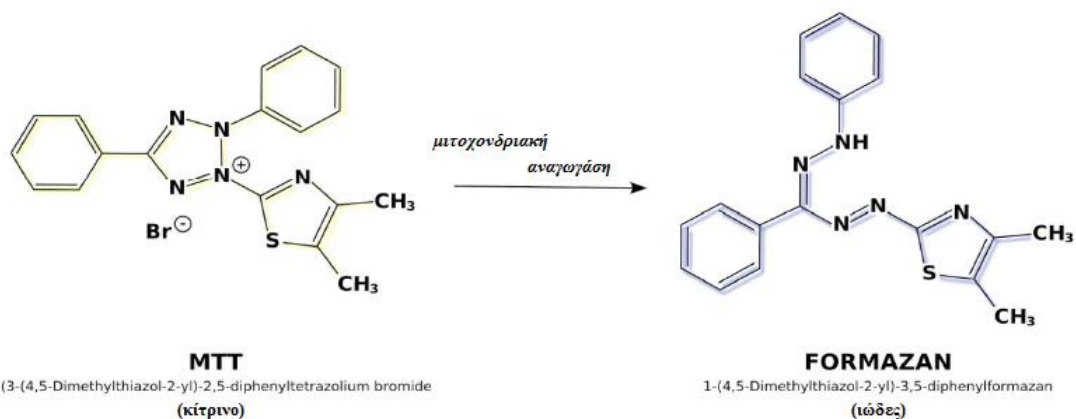
Το μικρό σωληνοειδές έχει ένταση μαγνητικού πεδίου 7.75 mTesla, ενώ το μεγάλο σωληνοειδές 9.9 μTesla.

### **3.6. Μελέτες κυτταροτοξικότητας με τη χρήση MTT**

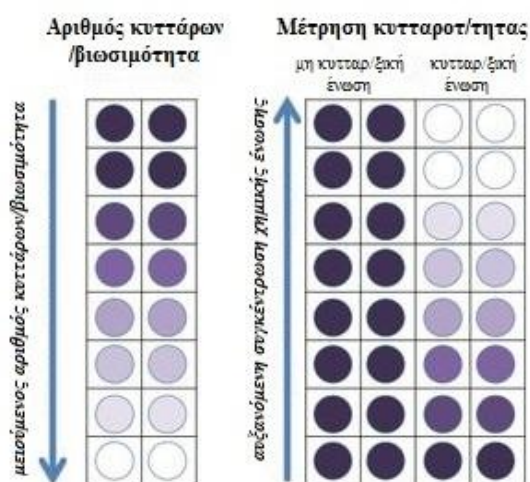
Γενικά, οι ενζυμικές μέθοδοι εκτίμησης της κυτταρικής βιωσιμότητας, οι οποίες περιλαμβάνουν την μέθοδο της χρήσης MTT, βασίζονται στην αναγωγή ενός χρωμοφόρου παράγοντα και σε μια αφυδρογονάση των ζωντανών κυττάρων ώστε να προσδιοριστεί η κυτταρική βιωσιμότητα με την βοήθεια μιας χρωματομετρικής μεθόδου. Εν προκειμένω, προσδιορίζεται η δραστηριότητα της μιτοχονδριακής αφυδρογονάσης στα ζωντανά κύτταρα, ανάγοντας το MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, ένα

κίτρινο τετραζόλιο) με τη βοήθεια του NADH, σε μία μη διαλυτή στο νερό φορμαζάνη ιώδους χρώματος. Ακολούθως προστίθεται κατάλληλος όγκος DMSO (μη πολικός διαλύτης), ώστε να διαλυτοποιηθούν οι κρύσταλλοι της φορμαζάνης και να ληφθεί τελικά ένα χρωμοφόρο διάλυμα, του οποίου η απορρόφηση μπορεί να μετρηθεί σε κατάλληλο μήκος κύματος με τη βοήθεια ενός φασματοφωτομέτρου.

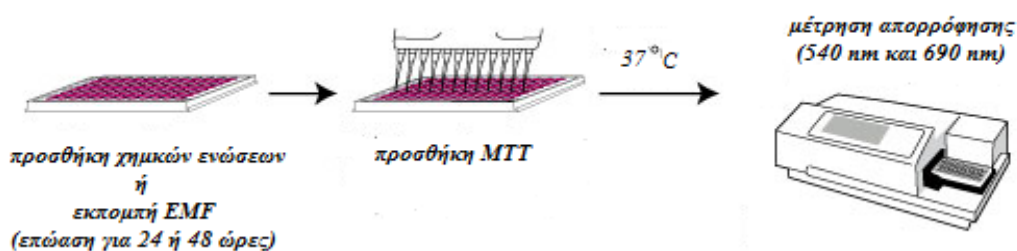
Πιο συγκεκριμένα, για όλες τις πειραματικές διαδικασίες όπου πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κυτταρικής βιωσιμότητας, έγινε σπορά λειομυοσαρκωματικών κυττάρων και από καθεμία, προστέθηκε ο επιθυμητός πληθυσμός κυττάρων, σε κάθε ένα φρεάτιο των πολυτρυβλίων 96x. Ο τελικός όγκος 200μl που έπρεπε να φέρει κάθε φρεάτιο, συμπληρώθηκε με DMEM. Τα πολυτρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστή, σε συνθήκες 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, για 24 ώρες, και στην συνέχεια, ακολούθησε η μεταχείριση των κυττάρων, όπως απαιτούσε το εκάστοτε πρωτόκολλο. Μετά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου, τα πολυτρυβλία επιστρέφονταν στον επωαστή. Μετά το πέρας ενός επιπλέον 24ώρου, προστίθονταν 50μl διαλύματος MTT (3mg MTT/ml PBS) και τα πολυτρυβλία επανατοποθετούνταν στον επωαστή, για τρεις ώρες. Κατόπιν, το DMEM αναρροφούνταν από κάθε φρεάτιο, με προσοχή, ώστε να αναρροφηθούν όσο το δυνατόν λιγότεροι κρύσταλλοι φορμαζάνης (που δημιουργήθηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω). Ακολουθούσε η διαλυτοποίηση των κρυστάλλων με την προσθήκη 200ml DMSO και με την βοήθεια πολυπιπέτας οκτώ καναλιών. Τέλος, τα πολυτρυβλία τοποθετούνταν σε φασματοφωτόμετρο, ενώ λαμβάνονταν οι τιμές της απορρόφησης, στα 540 nm (background 690 nm). Προσδιορίζεται λοιπόν η βιωσιμότητα των κυττάρων στα φρεάτια πειράματος σε ποσοστό επί τοις εκατό σε σχέση με τα φρεάτια ελέγχου (control). Εκτιμάται δηλαδή η κυτταροτοξική δράση του παράγοντα που μελετάται, προσδιορίζοντας την ανασταλτική κατά 50% συγκέντρωση του παράγοντα (IC<sub>50</sub>), δηλαδή την συγκέντρωση του παράγοντα που απαιτείται για το θάνατο του 50% του κυτταρικού πληθυσμού. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον εις τριπλούν.



**Εικόνα 27.** Μεταβολισμός του MTT σε φορμαζάνη με την βοήθεια μιτοχονδριακής αναγωγάσης, στα μεταβολικώς ενεργά κύτταρα.



**Εικόνα 28.** Σχηματική αναπαράσταση της εικόνας του πολυτρυβλίου, κατόπιν προσθήκης διαλύματος κυτταροτοξικού και μη κυτταροτοξικού παράγοντα και MTT.



**Εικόνα 29.** Γραφική περίληψη της πειραματικής διαδικασίας μελέτης της κυτταροτοξικότητας

### **3.6.1. Μελέτη κυτταροτοξικότητας υδροχλωρικής δοξορουβικίνης**

Πραγματοποιήθηκε σπορά LMS κυττάρων όπως περιγράφεται στην υποενότητα 3.2.4. Μετά το πέρας του 24ώρου, προστέθηκε στα φρεάτια διάλυμα υδροχλωρικής δοξορουβικίνης, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις από 0.2μM έως 140μM. Μία σειρά φρεατίων αντιστοιχούσαν στην ομάδα ελέγχου (control) του πειράματος. Μετά το πέρας 48 ωρών, ακολούθησε η διαδικασία όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.6, όπου σε κάθε φρεάτιο προστίθεται διάλυμα MTT και εν συνεχεία λαμβάνονται οι τιμές των απορροφήσεων του φασματοφωτομέτρου, ώστε να εκτιμηθεί η IC<sub>50</sub> της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης.

### **3.6.2. Μελέτη κυτταροτοξικότητας του συμπλόκου [AgCl(tpp)2(pmtH)]**

Η διαδικασία σποράς των κυττάρων, της προσθήκης του διαλύματος του συμπλόκου [AgCl(tpp)2(pmtH)] καθώς και της μέτρησης της κυτταροτοξικότητας είναι όμοια με την παραπάνω περιγραφείσα διαδικασία, καθώς και με αυτές των ενοτήτων 1.3.4 και 1.7. Το εύρος των συγκεντρώσεων του διαλύματος του συμπλόκου που προστέθηκε στα φρεάτια είναι 0.2 έως 40 μM.

### **3.6.3. Μελέτη κυτταροτοξικότητας κατόπιν εκπομπής κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης**

Η σπορά των κυττάρων σε δύο πολυτρυβλία 96x πραγματοποιήθηκε όπως στην υποενότητα 3.2.4, με την διαφορά πως ο τελικός όγκος του θρεπτικού μέσου σε κάθε φρεάτιο είναι 200 μl. Μετά το πέρας του πρώτου 24ώρου, το ένα πολυτρυβλίο τοποθετούνταν εντός του σωληνοειδούς και κατόπιν στον επωαστή (κυτταρικά δείγματα πειράματος) ενώ το άλλο τοποθετούνταν σε άλλον επωαστή (κυτταρικά δείγματα ελέγχου-control), όπου διατηρούνταν οι ίδιες συνθήκες αλλά δεν εκτίθονταν σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα. Η εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων σε συχνότητες συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης, διαρκούσε 48 ώρες. Το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων στα δείγματα πειράματος μετά την εκπομπή, μετρήθηκε βάσει της μεθόδου MTT που περιγράφηκε στην ενότητα 3.6 ως προς το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων στα δείγματα ελέγχου.

Εκτός από την 48ώρη εκπομπή δοκιμάστηκε και η 72ωρη εκπομπή ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, δηλαδή η εκπομπή εκκινούσε από το χρονικό σημείο της σποράς έως και πριν την μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας, με την μέθοδο χρήσης MTT.

#### **3.6.4. Μελέτη κυτταροτοξικότητας κατόπιν εκπομπής κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού του συμπλόκου [AgCl(tpp)<sub>2</sub>(pmtH)]**

Η διαδικασία είναι καθ' όλα όμοια με αυτήν που περιγράφεται και στην υποενότητα 3.6.3, με την διαφορά πως εδώ τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία εκπέμπονταν στις συχνοότητες συντονισμού του συμπλόκου αργύρου.

#### **3.6.5. Μελέτη κυτταροτοξικότητας κατόπιν εκπομπής λευκού θορύβου**

Η διαδικασία είναι η ίδια ακριβώς με αυτές των υποενότητων 1.7.3. και 1.7.4., με την διαφορά πως σε αυτήν την μελέτη, στην θέση των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού των δύο χημικών ενώσεων, εκπέμπεται ένα ηλεκτρομαγνητικό σήμα λευκού θορύβου, το οποίο καταλαμβάνει την περιοχή συχνοτήτων από 0-4000 Hz, χωρίς τις περιοχές συχνοτήτων συντονισμού, που χρησιμοποιήθηκαν στις προηγούμενες μελέτες.

Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν συνεχίστηκε η περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης του λευκού θορύβου σε *in vitro* μοντέλα (απόπτωση-νέκρωση, ανάλυση κυτταρικού κύκλου) λόγω απουσίας δράσης.

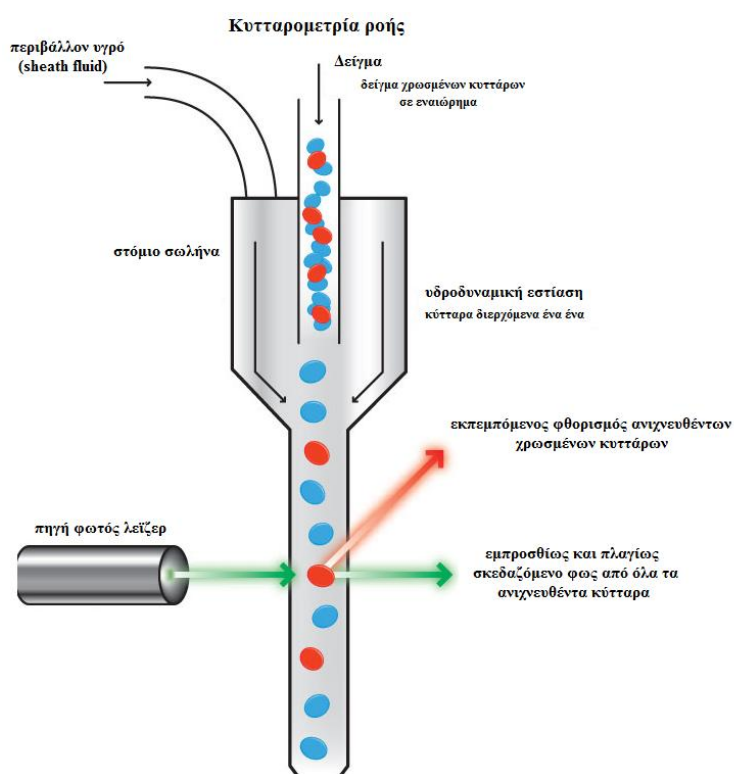
### **3.7. Μελέτες εκτίμησης απόπτωσης & νέκρωσης μέσω κυτταρομετρίας ροής**

Η κυτταρομετρία ροής (flow cytometry) αποτελεί μία αυτοματοποιημένη μέθοδο ανάλυσης φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, κατάλληλα προετοιμασμένων κυττάρων ή μικροσκοπικών σωματιδίων, καθώς αυτά περνούν μέσω ενός ρέοντος υγρού, από μία δέσμη φωτός λέιζερ. Η ανάλυση αυτή γίνεται βάσει του εκπεμπόμενου φθορισμού και της σκέδασης του φωτός. Το προς ανάλυση δείγμα θα πρέπει να είναι υπό την μορφή εναιωρήματος, γιατί έτσι προσφέρεται η δυνατότητα προσδιορισμού των σκεδαστικών χαρακτηριστικών των κυττάρων και των αντιγόνων επιφανείας, αλλά και των αντιγόνων του κυτταροπλάσματος και του



πυρήνα, σε οποιοδήποτε κυτταρικό πληθυσμό, βάσει του οποίου προκύπτει χαρακτηρισμός του τελευταίου. Παράλληλα επιτρέπει τον προσδιορισμό των φάσεων του κυτταρικού κύκλου στις οποίες βρίσκεται το υπό διερεύνηση δείγμα καθώς και της ανευπλοειδίας-πολυπλοειδίας. Με την βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής, μελετάται η λειτουργική ικανότητα των κυττάρων, όπως η ανοσολογική απόκριση σε αντιγόνα και μιτογόνα, η φαγοκυττάρωση, η χημειοταξία και το οξειδωτικό στρες.

Οι σημαντικότερες εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής είναι η ανάλυση του κυτταρικού θανάτου (απόπτωση ή νέκρωση), η διάγνωση ασθενειών όπως λευχαιμίες, κ.ά. Στην παρούσα μελέτη η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των ποσοστών απόπτωσης και νέκρωσης καθώς και για διερεύνηση της αναστολής του κυτταρικού κύκλου των LMS κυττάρων, μετά από προσθήκη της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και του συμπλόκου αργύρου καθώς και κατόπιν εκπομπής των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού των δύο μορίων.



**Εικόνα 30.** Γραφική απεικόνιση της ροής του δείγματος των κυττάρων στη κυτταρομετρία.

### **3.7.1. Εκτίμηση απόπτωσης & νέκρωσης μετά την προσθήκη της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης**

Πραγματοποιήθηκε σπορά 100.000 κυττάρων LMS, σε πολυτρυβλίο 6x, όπως περιγράφεται στην υποενότητα 3.2.4. Τα πολυτρυβλία επεστράφησαν στον επωαστή, μέχρι την πάροδο 24 ωρών. Κατόπιν προστέθηκαν διαλύματα αυξανόμενων συγκεντρώσεων υδροχλωρικής δοξορουβικίνης 0.5, 0.7 και 1μM. Μετά το πέρας ενός επιπλέον 48ώρου, το θρεπτικό μέσο των φρεατίων συλλέχθηκε σε σωλήνες falcon, έναν ανά φρεάτιο. Έγινε πλύση των κυττάρων με 1 ml PBS/φρεάτιο, όπου και συλλέχθηκε στους αντίστοιχους σωλήνες falcon και προστέθηκαν 0.3 ml θρυψίνης/φρεάτιο και τα πολυτρυβλία επεστράφησαν στον επωαστή, για 5 λεπτά. Αφού αποκολλήθηκαν τα κύτταρα, προστέθηκε 1ml DMEM/φρεάτιο, ώστε να εξουδετερωθεί η δράση της θρυψίνης, να επαναιωρηθούν τα κύτταρα, και να προστεθούν με τη σειρά τους στους σωλήνες falcon. Με τη βοήθεια του αιμοκυτταρομέτρου, μετρήθηκε ο πληθυσμός των κυττάρων και χρησιμοποιείται για την περαιτέρω διαδικασία, τέτοιος όγκος κυτταρικού εναιωρήματος, ώστε να αριθμούνται 100.000 κύτταρα. Στη συνέχεια, το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 3000 rpm, για 5 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρήθηκαν σε 100 μl Calcium Buffer 1x (από αποθεματικό διάλυμα Calcium Buffer 20x). Κατόπιν σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 5 μl Annexin και 4 μl Propidium Iodide (PI). Όλα τα δείγματα αφέθηκαν σε σκοτεινό χώρο, σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού, προστέθηκαν επιπλέον 900 μl Calcium Buffer 1x (τελικός όγκος 1 ml/δείγμα). Τα δείγματα μετρήθηκαν σε κυτταρόμετρο ροής (CyFlow<sup>®</sup>ML, Partec, Munster, Germany) όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση και προσδιορισμός % του ποσοστού των κυττάρων, σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου, που βρίσκονται σε αποπτωτική ή νεκρωτική φάση.

### **3.7.2. Εκτίμηση απόπτωσης & νέκρωσης μετά την προσθήκη του $[AgCl(tpp)_2(pmtH)]$**

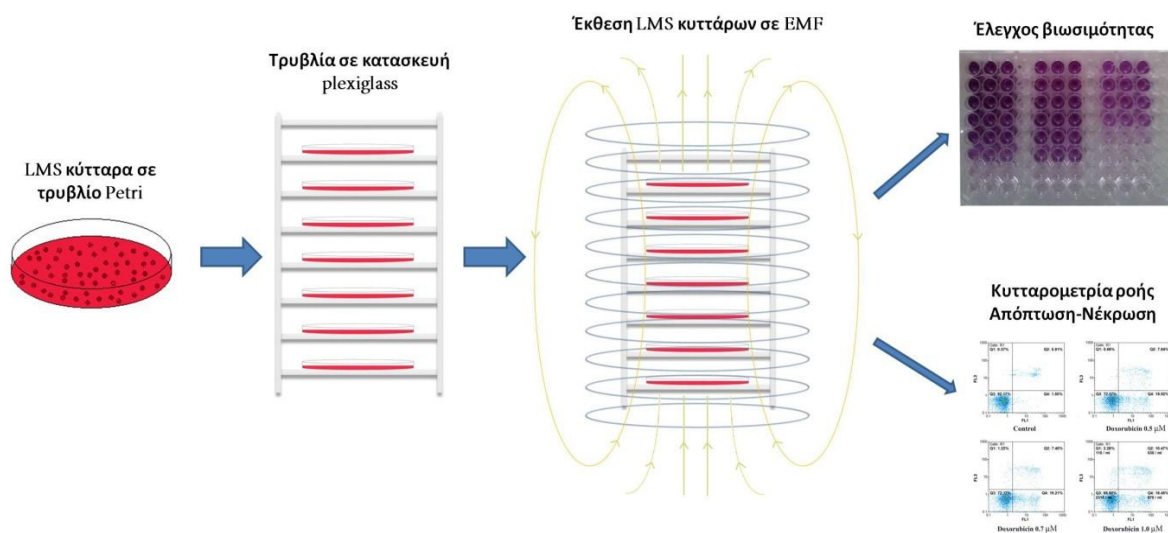
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με την περιγραφείσα, στην υποενότητα 3.7.1. ενώ οι συγκεντρώσεις του συμπλόκου του αργύρου που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την μελέτη ήταν 0.5, 0.7 και 1.2μM, ενώ στο τέλος προσδιορίστηκαν τα ποσοστά των κυττάρων που βρίσκονταν σε φάση αποπτωτικού ή νεκρωτικού θανάτου.

### 3.7.3. Εκτίμηση απόπτωσης & νέκρωσης, κατόπιν εκπομπής κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης

Η σπορά των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε ως έχει στην υποενότητα 3.2.4, σε δύο πολυτρυβλία 6x. Μετά το πέρας των 24 ωρών, το ένα πολυτρυβλίο εκτέθηκε στα ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης για 48 ώρες, ενώ το άλλο πολυτρυβλίο (δείγματα ελέγχου-control) τοποθετήθηκε σε άλλον επωαστή. Τέλος, τα δείγματα συλλέχθησαν κατά τρόπο όμοιο με αυτόν που περιγράφεται στην υποενότητα 3.7.1. και προσδιορίστηκαν τα ποσοστά των κυττάρων σε φάση αποπτωτικού ή νεκρωτικού θανάτου, σε σχέση με τα ποσοστά των άθικτων κυττάρων.

### 3.7.4. Εκτίμηση απόπτωσης & νέκρωσης, κατόπιν εκπομπής κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού του $[AgCl(tpp)_2(pmtH)]$

Η διαδικασία είναι καθ' ολοκληρίαν όμοια με αυτήν της υποενότητας 3.7.2. με τη διαφορά ότι σε αυτήν την μελέτη, οι καλλιέργειες των πολυτρυβλίων εκτέθηκαν στα ηλεκτρομαγνητικά πεδία συχνοτήτων συντονισμού του συμπλόκου του αργύρου.



**Εικόνα 31.** Γραφική περίληψη της πειραματικής διαδικασίας εκτίμησης της κυτταρικής βιωσιμότητας και του αποπτωτικού θανάτου μετά την εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων *in vitro*.

### **3.8. Μελέτες αναστολής του κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής**

#### **3.8.1. Εκτίμηση της αναστολής του κυτταρικού κύκλου, μετά την προσθήκη της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης.**

Πραγματοποιήθηκε σπορά 150000 κυττάρων σε πολυτρυβλία 6x, όπως περιγράφεται στην υποενότητα 3.2.4. Ακολούθησε η προσθήκη της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης σε συγκεντρώσεις 0.7 και 1μM και τα πολυτρυβλία επεστράφησαν στον επωαστή, για 48 ώρες. Κατόπιν, η διαδικασία είναι όμοια με αυτήν της υποενότητας 3.7.1. μέχρι το στάδιο της μέτρησης του αριθμού των κυττάρων ανά φρεάτιο. Λαμβάνεται κατάλληλος όγκος εναιωρήματος ούτως ώστε να αριθμούνται 500000 κύτταρα ενώ ο όγκος αυτός φυγοκεντρείται στις 3000 rpm, για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και σε κάθε δείγμα προστίθενται 0.5 ml παγωμένου διαλύματος αιθανόλης 70% (ice cold ethanol) (σε ddH<sub>2</sub>O), ενώ τα δείγματα τοποθετούνται σε παγόλουτρο, για 10 λεπτά. Εν συνεχεία φυγοκεντρούνται στις 3000 rpm, για 5 λεπτά. Ακολούθως, προστίθενται 0.5 ml PBS, και τα δείγματα φυγοκεντρούνται ξανά στις 3000 rpm, για 5 λεπτά. Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου, προστίθενται 50 μl RNase, 100μg/ml PBS (αρχική συγκέντρωση 10mg/ml) και τα δείγματα αφήνονται για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Αμέσως μετά προστίθενται 300 μl PI, 50μg/ml PBS (αρχική συγκέντρωση 1mg/ml) ενώ τα δείγματα αφήνονται και πάλι σε θερμοκρασία δωματίου για 15-30 λεπτά. Τέλος, ακολουθεί η προσθήκη 800 μl PBS, η μέτρηση των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο και η εκτίμηση της αναστολής του κυτταρικού κύκλου, σε κάθε δείγμα.

#### **3.8.2. Εκτίμηση αναστολής του κυτταρικού κύκλου, μετά την προσθήκη του [AgCl(tp<sub>p</sub>)<sub>2</sub>(pmtH)]**

Η διαδικασία είναι όμοια με αυτήν της ενότητας 3.8.1. Οι συγκεντρώσεις του συμπλόκου του αργύρου που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της αναστολής του κυτταρικού κύκλου ήταν 0.7 και 1.2μM.

### **3.8.3. Εκτίμηση αναστολής του κυτταρικού κύκλου, κατόπιν εκπομπής κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης.**

Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτήν της ενότητας 3.8.1. με την διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν δύο πολυτροβλία 6x, εκ των οποίων το ένα τοποθετήθηκε στο σωληνοειδές για έκθεση στα ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης για 48 ώρες ενώ το άλλο σε άλλο επωαστή (δείγματα ελέγχου-control). Μετά το πέρας του 48ώρου, εκτιμήθηκαν μέσω της κυτταρομετρίας ροής οι φάσεις αναστολής του κυτταρικού κύκλου.

### **3.8.4. Εκτίμηση αναστολής του κυτταρικού κύκλου, κατόπιν εκπομπής κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού του $[AgCl(tpp)_2(pmtH)]$ .**

Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτήν της ενότητας 3.8.1. και της ενότητας 3.8.2. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού του συμπλόκου αργύρου. Μετά το πέρας του 48ώρου, εκτιμήθηκε η αναστολή του κυτταρικού κύκλου σε κάθε δείγμα.

## **3.9. Επίμυες Wistar**

### **3.9.1. Μονάδα συντήρησης πειραματοζώων**

Η φροντίδα των πειραματοζώων συμμορφώθηκε απόλυτα με τους εθνικούς και ευρωπαϊκούς κανονισμούς που αφορούν στα ζώα που χρησιμοποιούνται για ερευνητικούς σκοπούς και τις συστάσεις της FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations).

Οι επίμυες διατηρούνται σε κλωβούς ανά δύο ζώα, εκτός εάν το πειραματικό πρωτόκολλο απαιτεί την ατομική τους στέγαση. Οι κλωβοί είναι κατά κανόνα πλαστικοί (πολυανθρακικοί). Το δάπεδό τους καλύπτονται από αποστειρωμένη στρωμένη πριονιδίου, η οποία αλλάζονται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Η θερμοκρασία ελέγχεται συνεχώς, ιδιαίτερα στην περίπτωση της ομαδικής στέγασης, δεδομένου ότι είναι πολύ εύκολο να προκληθεί

υπερθερμία, διατηρούμενη στα ιδανικά επίπεδα, στους 20-24°C. Η σχετική υγρασία ήταν 60% ενώ ο αέρας ανανεώνονταν 10-15 φορές την ώρα. Η φωτοπερίοδος, διαρκούσε 12 ώρες (12 ώρες φως-12 ώρες σκοτάδι). Η τροφή παρέχονταν από ανοξείδωτους τροφοδότες από χαλύβδινο σύρμα, σε μορφή συμπήκτων, με συγκέντρωση πρωτεϊνών 20-27% και το νερό παρέχονταν από ποτίστρες δηλαδή πλαστικές φιάλες, με μεταλλική απόληξη. Και το νερό και η τροφή προσφέρονταν για κατά βούληση κατανάλωση.

### **3.10. Μελέτες τοξικότητας**

Τοξικότητα είναι η δυνατότητα μιας χημικής ένωσης να προκαλέσει βλάβη σε έναν οργανισμό ή σε μέρος αυτού, μέσω απορρόφησης από το πεπτικό σύστημα, μέσω της αναπνοής ή μέσω του δέρματος. Η τοξικότητα μετράται από την δόση που απαιτείται ώστε να προκληθεί οξεία αντίδραση από τον οργανισμό, όπως καταστροφή βασικών οργάνων, κώμα ή και θάνατος. Η τοξική δόση ενός παράγοντα μετριέται ως mg/kg σωματικού βάρους του οργανισμού που μελετάται και εκφράζεται μέσω της καμπύλης δόσης – επίπτωσης στον οργανισμό, ενώ από αυτήν την καμπύλη προκύπτει και η LD<sub>50</sub>, (lethal dose 50%) που ορίζεται ως η δόση που συνεπάγεται το θάνατο του 50% των πειραματοζώων.

#### **3.10.1. Οξεία τοξικότητα υδροχλωρικής δοξορουβικίνης**

Λόγω της ευρείας χρήσης της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και τον πλήρη φαρμακολογικό έλεγχο στον οποίο έχει υποβληθεί, η τοξικότητά της στους επίμυες θεωρείται παγιωμένη γνώση, οπότε δεν χρησιμοποιήθηκαν πειραματόζωα για την πραγματοποίηση μελέτης τοξικότητας, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, για ηθικούς λόγους.

Τα φαρμακολογικά δεδομένα σχετικά με την οξεία τοξικότητα της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης στους επίμυες αναφέρουν ότι η LD<sub>50</sub>, κατόπιν ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης είναι 16.03 mg/kg, κατόπιν ενδοφλέβιας, 12.51 mg/kg και κατόπιν υποδόριας, 21.84 mg/kg.

### 3.10.2. Οξεία τοξικότητα συμπλόκου αργύρου

Για τις ανάγκες μελέτης της οξείας τοξικότητας, το σύμπλοκο του αργύρου  $[AgCl(trp)_2(pmtH)]$  διαλύθηκε σε 1 ml τρικαπριλίνης/δόση και χορηγήθηκε στους επίμυες ενδοπεριτοναϊκά και εφ' άπαξ. Οι δόσεις που δοκιμάστηκαν είναι 0.8, 8, και 80 mg/kg βάρους σώματος των επιμύων. Χρησιμοποιήθηκαν 40 θηλυκοί επίμυες Wistar, ηλικίας 3 μηνών και βάρους  $193 \pm 7.76$  g. Οι επίμυες χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες, μία ομάδα ελέγχου οξείας τοξικότητας (ΟΕΟΤ) και τρεις ομάδες πειράματος οξείας τοξικότητας (ΟΠΟΤ1, ΟΠΟΤ2 και ΟΠΟΤ3 αντίστοιχα), μία για κάθε δόση που θα χορηγούνταν. Τα πειραματόζωα της ομάδας ΟΠΟΤ1 έλαβαν μια δόση 0.8 mg/kg σωματικού βάρους, τα άτομα της ομάδας ΟΠΟΤ2 μια δόση 8 mg/kg, ενώ τα άτομα της ομάδας ΟΠΟΤ3, μία δόση 80 mg/kg, ώστε να επιτευχθεί λογαριθμική αύξηση της δόσης. Οι επίμυες της ομάδας ελέγχου (ΟΕΟΤ) έλαβαν 1 ml τρικαπριλίνης. Πριν την χορήγηση των ενέσεων, τα ζώα δεν τράφηκαν για 4-5 ώρες ενώ μετά την χορήγηση του συμπλόκου, αφήθηκαν ελεύθερα να τραφούν. Ο έλεγχος της κατάστασής τους γινόταν δύο φορές ημερησίως και όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονταν. Ανά δύο ημέρες, λαμβάνονταν μετρήσεις του σωματικού τους βάρους (ΣΒ), οι οποίες ελήφθησαν ως δείκτης τοξικότητας του συμπλόκου του αργύρου. Η ποσοστιαία μεταβολή του σωματικού βάρους ( $\Delta\Sigma\%$ ) δίνεται από τον εξής τύπο:

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

Όπου  $\Sigma Β$  = σωματικό βάρος πειραματοζώου και  $\Pi$  = ημέρα πειράματος

Όσα από τα πειραματόζωα δεν κατέληξαν, θυσιάστηκαν την 5<sup>η</sup> μέρα, μέσω εισπνοής αιθέρα, σε γυάλινο κώδωνα αναισθητοποίησης. Ακολούθησε νεκροψία, αφαίρεση των εσωτερικών οργάνων *en bloc* και εμβάπτισή τους σε αποστειρωμένα δοχεία (ουροδοχεία) που περιείχαν φορμαλίνη 10%, ώστε να μονιμοποιηθούν. Κατόπιν λήφθηκαν αντιπροσωπευτικά τεμάχια από κάθε όργανο, εγκλωβίστηκαν σε παραφίνη, και κόπηκαν σε λεπτές τομές. Οι τομές αυτές, αφού υποβλήθηκαν στις χρώσεις αιματοξυλίνης και ηωσίνης, παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο, για την εξαγωγή τοξικολογικών συμπερασμάτων.

### **3.10.3. Χρόνια τοξικότητα υδροχλωρικής δοξορουβικίνης**

Οι τοξικολογικές μελέτες κατόπιν επαναλαμβανόμενης χορήγησης σε επίμυες αναφέρουν πως οι κύριοι στόχοι της δοξορουβικίνης ήταν το αιμολεμφοποιητικό σύστημα, ο γαστρεντερικός σωλήνας, οι νεφροί, το ήπαρ και τα αναπαραγωγικά όργανα, τόσο των αρρένων όσον και των θηλέων ατόμων του είδους. Όσον αφορά στην καρδιά, μελέτες οξείας και υποξείας τοξικότητας καθώς μελέτες καρδιοτοξικότητας έχουν δείξει ότι δοξορουβικίνη ήταν καρδιοτοξική σε όλα τα ελεγχθέντα πειραματόζωα. Η δοξορουβικίνη ήταν γενετοξική στις περισσότερες από τις *in vitro* ή *in vivo* δοκιμασίες μεταλλαξιγένεσης, εμβρυοτοξική και τερατογόνος. Δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τη χορήγηση της δοξορουβικίνης σε ζώα, κατά τη διάρκεια της περι- και μεταγεννητικής περιόδου. Επίσης, όπως και άλλες ανθρακυκλίνες και πολλά κυτταροτοξικά φάρμακα, και η δοξορουβικίνη έχει αποδειχθεί καρκινογόνος στους επίμυες.

### **3.10.4. Χρόνια τοξικότητα συμπλόκου αργύρου**

Για τις ανάγκες μελέτης της χρόνιας τοξικότητας, η δοσολογία του συμπλόκου που ακολουθήθηκε ήταν 3 και 6 mg/kg βάρους σώματος των επιμύων (διάλυση σε 1 ml τρικαπριλίνης). Η επιλογή των δόσεων βασίστηκε στα πορίσματα της μελέτης οξείας τοξικότητας. Χρησιμοποιήθηκαν 30 θηλυκοί επίμυες Wistar (10 άτομα ανά ομάδα), ηλικίας 3 μηνών και βάρους 190±9.4 g. Οι επίμυες χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες, μία ομάδα ελέγχου χρόνιας τοξικότητας (OEXT) και δύο ομάδες πειράματος χρόνιας τοξικότητας (OΠΧΤ1 και OΠΧΤ2 αντίστοιχα), μία για κάθε δόση που θα χορηγούνταν. Οι επίμυες της OΠΧΤ1 λάμβαναν μία δόση 3mg/kg βάρους σώματος, μία φορά την εβδομάδα, για 4 εβδομάδες ενώ αντίστοιχα οι επίμυες της OΠΧΤ2 λάμβαναν 6mg/kg βάρους σώματος. Οι επίμυες της ομάδας ελέγχου (OEXT) έλαβαν 1 ml τρικαπριλίνης, μία φορά εβδομαδιαίως, για τέσσερις εβδομάδες επίσης. Όλα τα ζώα παρακολουθούνταν καθημερινά και λαμβάνονταν μετρήσεις βάρους, κατανάλωσης τροφής και νερού. Ο χειρισμός των πειραματόζωων και ο ιστολογικός έλεγχος μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.10.2. όπως επίσης υπολογίστηκε η ποσοστιαία μεταβολή του βάρους τους.

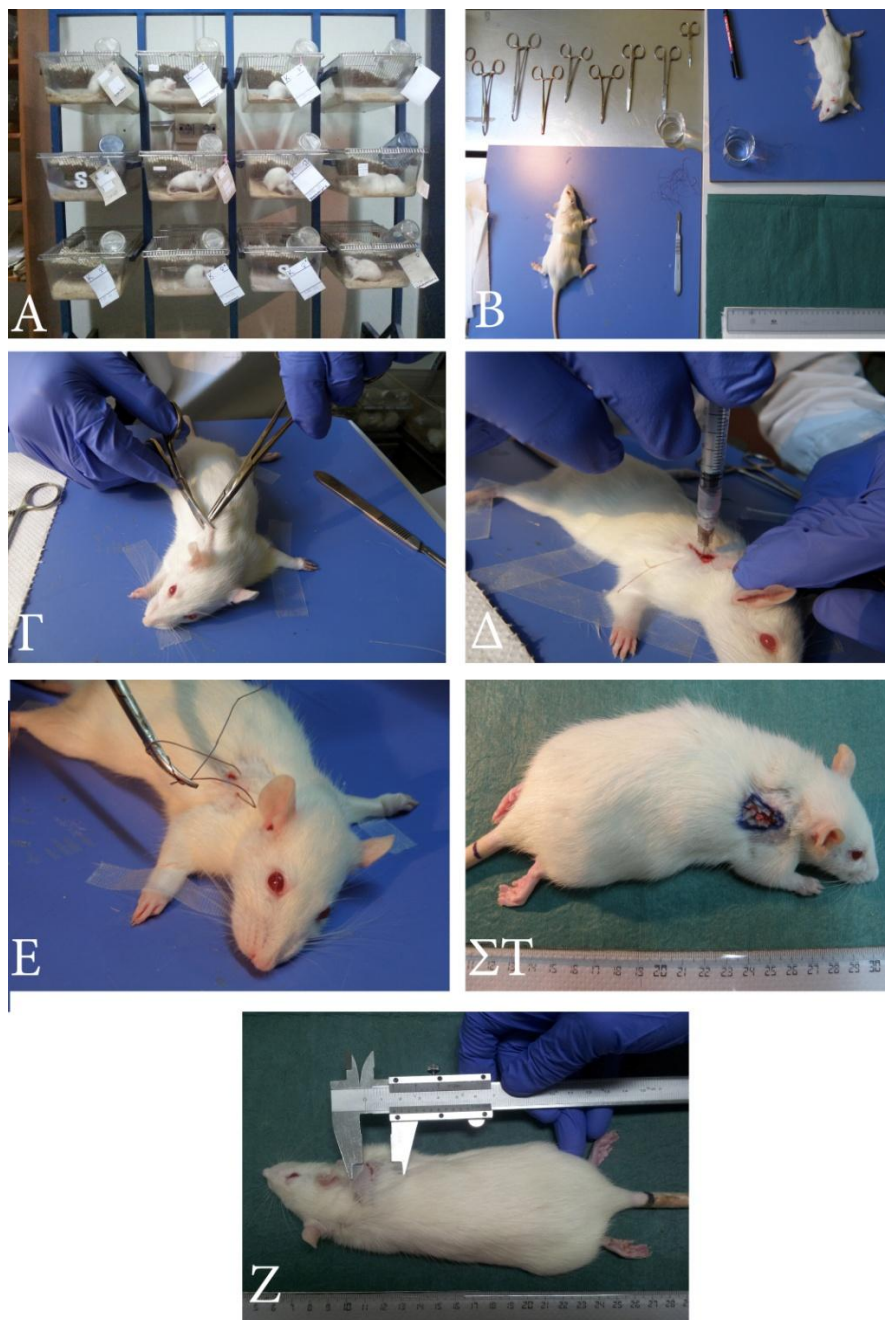


### **3.11. Ενοφθαλμισμός κυττάρων LMS**

Ο ενοφθαλμισμός καρκινικών κυττάρων σε επίμυες αποτελεί μέθοδο ταχείας ανάπτυξης ενός ζωϊκού μοντέλου καρκίνου, σχετικά εύκολη και χωρίς μεγάλο οικονομικό κόστος, με αποτέλεσμα την επαγωγή όγκων σε πειραματόζωα, σε σύντομο χρονικό διάστημα, και την άμεση υποβολή τους στο μελετούμενο θεραπευτικό σχήμα.

Η καλλιέργεια των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε βάσει των συνθηκών που περιγράφονται στην ενότητα 3.2.2. Εφόσον τα κύτταρα έφτασαν σε πλήρη ανάπτυξη στα τρυβλία Petri, αποκολλήθηκαν με την βοήθεια της θρυψίνης, και προστέθηκαν σε σωλήνες falcon, ενώ προσδιορίστηκε ο ακριβής αριθμός τους, με την βοήθεια αιμοκυτταρομέτρου. Κατόπιν, το κυτταρικό ελαιώρημα φυγοκεντρήθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού διαλύματος DMEM ώστε να υπάρχουν  $5 \times 10^6$  κύτταρα/ ml DMEM. Το ελαιώρημα των κυττάρων αναρροφήθηκε με αποστειρωμένες σύριγγες του 1 ml (22G).

Χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί επίμυες ηλικίας 3 μηνών,  $182 \pm 10.9$  g οι οποίοι συντηρούνταν υπό τυπικές συνθήκες που περιγράφονται στην παράγραφο 3.9.1. Πριν την διαδικασία του ενοφθαλμισμού, τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με 0.5-1ml διαλύματος αναισθητικού (περιεκτικότητας: 10% ketamine, 40% midazolame και 50% φυσιολογικός ορός 0.9%). Μετά την αναισθητοποίηση, τα ζώα ακινητοποιήθηκαν στο χειρουργικό τραπέζι, πραγματοποιήθηκε τομή στην δεξιά τους ωμοπλάτη, στον τραπεζοειδή μυ, (βλέπε Εικόνα 32) όπου με μικρό τραυματισμό προκλήθηκε και αιμορραγία. Την ίδια στιγμή, έγινε και η έγχυση 1ml εναιωρήματος καρκινικών κυττάρων, με την βοήθεια της ένεσης. Μετά το πέρας της διαδικασίας, τα τραύματα συρράφτηκαν με ράμματα V7 και τα ζώα αφήθηκαν να ανανήψουν στους κλωβούς τους. Έλεγχος της κατάστασης της υγείας τους πραγματοποιούνταν κάθε ημέρα, ενώ μετά από 10-15 ημέρες εμφανίστηκαν ψηλαφητοί όγκοι.



Εικόνα 32. Φωτογραφική απεικόνιση των σταδίων του ενοφθαλμισμού LMS κυττάρων σε επίμνες Wistar. Α. Χώρος διατήρησης κλωβών πειραματοζώων, Β. Χειρουργικό τραπέζι-εργαλεία, επίμνες υπό αναισθησία, Γ. Πραγματοποίηση τομής στη δεξιά ωμοπλάτη, στον τραπεζοειδή μυ, Δ. Έγχυση LMS κυττάρων στο σημείο τραυματισμού, Ε. Συρραφή τραύματος με ράμματα, ΣΤ. Σήμανση της περιοχής, Ζ. Μέτρηση του όγκου με παχύμετρο (calliper).

### 3.12. Μελέτες αντικαρκινικής δράσης

Όλοι οι επίμυες που χρησιμοποιήθηκαν στις αντικαρκινικές μελέτες έφεραν ψηλαφητό όγκο 3-5 cm<sup>3</sup>, ο οποίος μετρούνταν με παχύμετρο (calliper). Οι μελέτες αντικαρκινικής δράσης χωρίστηκαν σε δύο φάσεις. Συνοπτικά, κατά την πρώτη φάση, πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός σε σύνολο 70 πειραματοζώων (7 ομάδες, 10 ζώα/ομάδα) για να εκτιμηθεί ο μέσος όρος επιβίωσης (mean survival time-MST), το μέσο βάρος του όγκου (mean tumor weight-MTW), ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης του όγκου (mean tumor growth rate-MTGR) και ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του όγκου (special growth rate-SGR), σε όλες τις ομάδες πειράματος. Τα ζώα είτε κατέληξαν, είτε αφέθηκαν να ζήσουν μέχρι σήμερα. Ο ρυθμός ανάπτυξης του όγκου για κάθε πειραματοζώο υπολογίστηκε από την παρακάτω σχέση:

$$TGR (g/d) = \text{Βάρος όγκου (g)} / \text{ημέρες επιβίωσης (d)}$$

ενώ ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του όγκου για κάθε πειραματοζώο υπολογίστηκε από την παρακάτω σχέση:

$$SGR = \frac{\text{Ln}\left(\frac{TW_f}{TW_i}\right)}{T_d - T_0}$$

όπου,  $TW_f$ ,  $TW_i$ , το βάρος του όγκου στο τέλος και στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας και  $T_d - T_0$ , ο χρόνος επιβίωσης των πειραματοζώων (τυπικά  $T_0 = 0$ , ως έναρξη της πειραματικής διαδικασίας) [Mehrra E. *et al.*, 2007].

Οι ομάδες πειράματος ήταν οι εξής: ομάδα χορήγησης υδροχλωρικής δοξορουβικίνης (DOX), ομάδα χορήγησης συμπλόκου αργύρου (silver complex-SC), ομάδα έκθεσης σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού υδροχλωρικής δοξορουβικίνης (EMF-DOX) και ομάδα έκθεσης σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού συμπλόκου αργύρου (EMF-SC). Τα ζώα μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας αφέθηκαν στους κλωβούς μέχρι να καταλήξουν.

Την δεύτερη φορά που πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός, χρησιμοποιήθηκαν 63 πειραματόζωα (9 ζώα ανά ομάδα) και αφότου αναπτύχθηκαν οι όγκοι, τα ζώα χωρίστηκαν στις ίδιες ομάδες με αυτές της πρώτης φάσης των αντικαρκινικών μελετών. Η συγκεκριμένη φάση πειράματος διήρκεσε 30 ημέρες, και κάθε 10 ημέρες θυσιάζονταν 3 ζώα. Το πρωτόκολλο αυτό σχεδιάστηκε ούτως ώστε ο ιστοπαθολογικός έλεγχος των όγκων και των οργάνων των ζώων που θυσιάζονταν κατά την πορεία του πειράματος, να μας δώσουν λεπτομερέστερες πληροφορίες για την ιστολογική εξέλιξη του όγκου και της εικόνας των οργάνων, καθώς και την πιθανή διασπορά του όγκου.

### ***3.12.1. Χορήγηση υδροχλωρικής δοξορουβικίνης σε επίμυες, φέροντες όγκο.***

Οι επίμυες της ομάδας υδροχλωρικής δοξορουβικίνης (DOX) λάμβαναν 2mg/kg βάρους σώματος, μία δόση κάθε 5 ημέρες, για 30 ημέρες και στις δύο φάσεις. Η χορήγηση πραγματοποιούνταν ενδοπεριτοναϊκώς και ήταν όγκου 1ml. Η υδροχλωρική δοξορουβικίνη, η οποία βρίσκονταν σε ενέσιμη μορφή, διαλύονταν περαιτέρω, σε αποστειρωμένο ύδωρ για ενέσιμα διαλύματα (water for injection), για την επίτευξη της επιθυμητής δόσης. Η κατάσταση της υγείας των επιμύων παρακολουθούνταν καθημερινά ενώ μετρήσεις του βάρους και των όγκων όπως και φωτογραφίες των επιμύων λαμβάνονταν κάθε πέντε ημέρες.

### ***3.12.2. Χορήγηση συμπλόκου αργύρου σε επίμυες φέροντες όγκο***

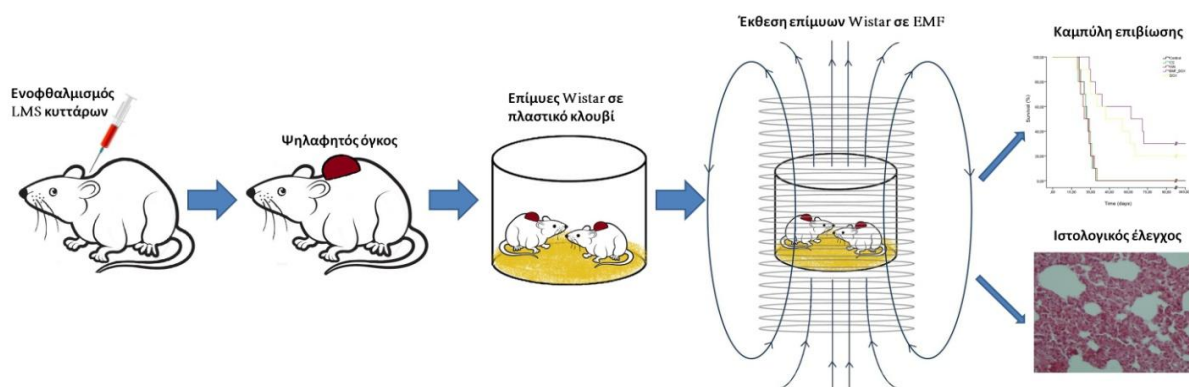
Οι επίμυες της ομάδας χορήγησης συμπλόκου αργύρου (SC) λάμβαναν 6mg/kg βάρους σώματος, μία δόση κάθε 5 ημέρες, για 30 ημέρες και στις δύο φάσεις. Η χορήγηση πραγματοποιούνταν ενδοπεριτοναϊκώς και ήταν όγκου 1ml. Το σύμπλοκο του αργύρου διαλύονταν σε τρικαπριλίνη, για την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης της δόσης. Η παρακολούθηση της κατάστασης της υγείας των επιμύων όπως και οι μετρήσεις που λήφθηκαν περιγράφονται στην ενότητα 3.12.1.

### 3.12.3. Έκθεση επιμύων που φέρουν όγκο σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης

Η ομάδα έκθεσης των επιμύων, σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης (EMF-DOX), τοποθετήθηκε στους ειδικά διαμορφωμένους κλωβούς, κατά τρόπο που περιγράφεται στην υποενότητα 3.5.2. Η εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων διαρκούσε 4 συνεχείς ώρες ημερησίως. Μετά την έκθεση τους, οι επίμυες επιστρέφονταν στους κανονικούς κλωβούς τους.

### 3.12.4. Έκθεση επιμύων που φέρουν όγκο, σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού του συμπλόκου αργύρου

Ισχύει η ίδια διαδικασία για την ομάδα έκθεσης των επιμύων, σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού του συμπλόκου αργύρου (EMF-SC) με αυτήν που περιγράφεται στην υποενότητα 3.12.3.



**Εικόνα 33.** Γραφική περίληψη της πειραματικής διαδικασίας του ιστοπαθολογικού ελέγχου και της κατασκευής καμπύλης επιβίωσης μετά την εκπομπή ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων *in vivo*.

### **3.12.5. Έκθεση επιμύων που φέρουν όγκο, σε λευκό θόρυβο**

Όπως και πριν, ισχύει η ίδια διαδικασία για την ομάδα έκθεσης των επιμύων σε λευκό θόρυβο (WN) με αυτήν που περιγράφεται στην υποενότητα 3.12.3.

### **3.12.6. Εικονική έκθεση επιμύων που φέρουν όγκο**

Τα πειραματόζωα αυτής της ομάδας τοποθετούνταν στους ειδικά διαμορφωμένους κλωβούς και έπειτα παρέμειναν στην διάταξη για 4 ώρες αλλά χωρίς κανένα είδος εκπομπής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Τα πειραματόζωα αυτά αποτελούν την ομάδα εικονικής έκθεσης (sham exposure-SE).

### **3.12.7. Μέτρηση σωματικού βάρους και όγκων των επιμύων**

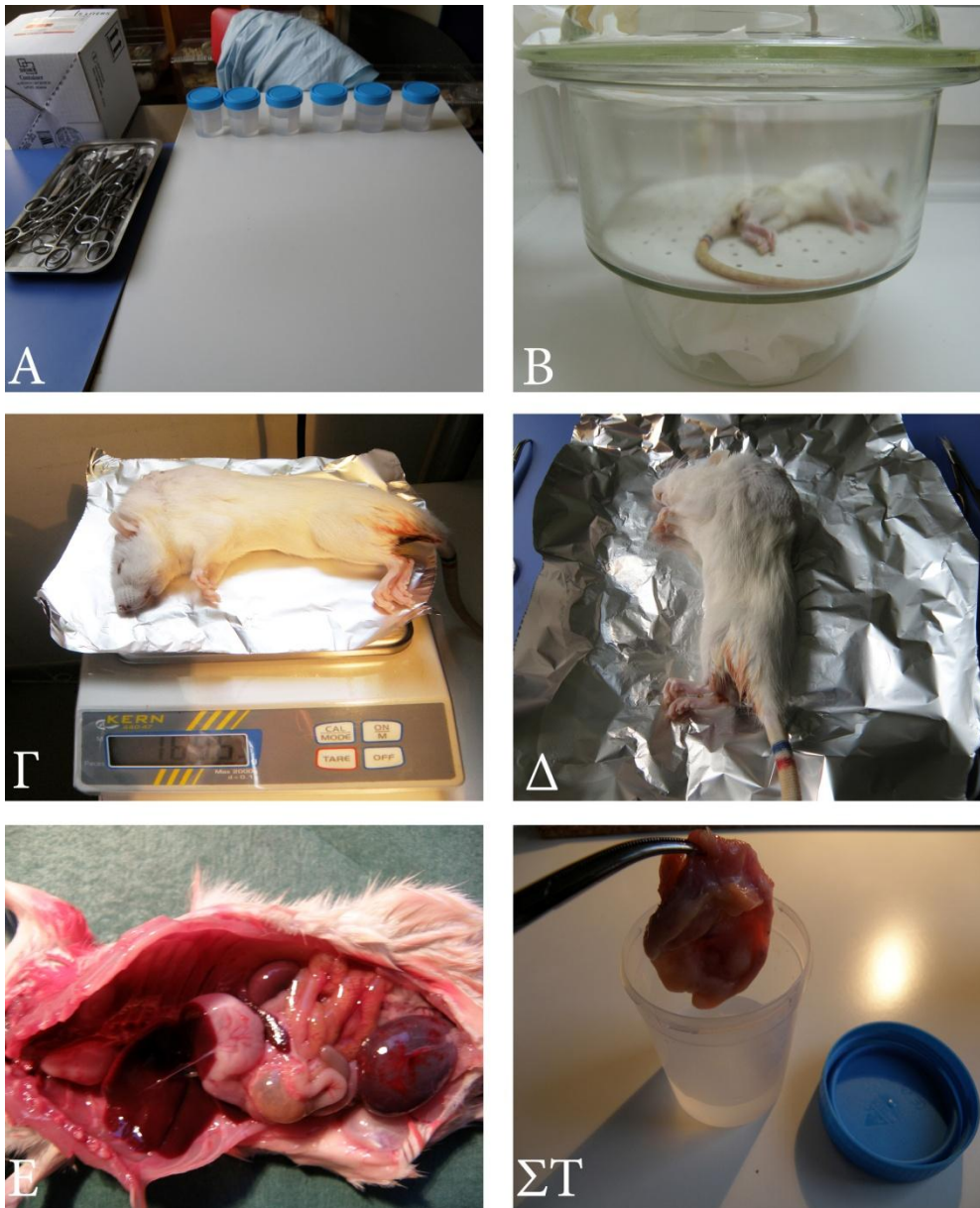
Το σωματικό βάρος και οι όγκοι των επιμύων μετρούνταν κάθε 5 ημέρες. Το μέγεθος του όγκου (V) μετρούνταν, με τη βοήθεια παχυμέτρου (caliper), και βάσει του τύπου του Carlsson [Carlsson G. *et al.*, 1983]:

$$V = (ab^2) / 2$$

Στον οποίο, a: η μεγαλύτερη διάμετρος του όγκου και b: η μικρότερη διάμετρος του όγκου

### **3.12.8. Θανάτωση επιμύων**

Η θανάτωση των πειραματοζώων στην δεύτερη φάση των αντικαρκινικών μελετών πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια αιθέρα, σε γυάλινο κώδωνα, στις 10, 20 και 30 ημέρες από την ημέρα 1η (ημέρα μέτρησης όγκου 3-5 cm<sup>3</sup>), ενώ θανατώθηκαν 3 επίμυες κάθε φορά, από κάθε ομάδα.



Εικόνα 34. Φωτογραφική απεικόνιση των σταδίων της νεκροψίας και μονιμοποίηση των ιστών σε διάλυμα φορμαλίνης 10%. Α. Χειρουργικό τραπέζι-εργαλεία, Β. Γυάλινος κώδωνας αναισθησίας, Γ. Ζύγιση θανατωμένου επίμους, Δ. Τοποθέτηση θανατωμένου επίμους στο χειρουργικό τραπέζι, Ε. Εκτομή επίμους, αφαίρεση οργάνων, ΣΤ. Τοποθέτηση απομονωθέντος όγκου σε διάλυμα φορμαλίνης.



### **3.12.9. Ιστοπαθολογικός έλεγχος**

Ο ιστοπαθολογικός έλεγχος περιλαμβάνει την μικροσκοπική εξέταση ιστών με σκοπό την μελέτη παθολογικών χαρακτηριστικών, και συμβάλλει στην διάγνωση νόσων. Τα κλινικά ιστοπαθολογικά δείγματα προέρχονται από βιοψία ή χειρουργική επέμβαση, ενώ εκτιμώνται από παθολόγο, αφού το δείγμα έχει υποστεί κατάλληλη επεξεργασία και τομές, οι οποίες εναποτίθενται σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής εικόνας τόσο των επαγόμενων όγκων όσο και των οργάνων, όλοι οι επίμυες υποβλήθηκαν σε νεκροψία και εν πρώτοις, εξετάστηκαν με γυμνό οφθαλμό, για την παρουσία αλλοιώσεων στα όργανα. Στη συνέχεια, το ήπαρ, οι νεφροί, η καρδιά, οι πνεύμονες με την τραχεία, το πάγκρεας καθώς και οι όγκοι απομακρύνθηκαν, και εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 10% φορμαλίνης. Τεμάχια εξ' αυτών εγκλωβίστηκαν σε παραφίνη, απ' όπου ελήφθησαν τομές πάχους 4μm. Τέλος, ακολούθησε η χρώση των τομών, με τις χρωστικές αιμοτοξυλίνη και ηωσίνη (hematoxylin-eosin, H&E), και η παρατήρησή τους σε οπτικό μικροσκόπιο.

### **3.12.10. Λήψη κυττάρων από όγκους επιμύων με βιοψία δια λεπτής βελόνης (Fine needle aspiration biopsy-FNA)**

Η βιοψία δια λεπτής βελόνης είναι μια διαγνωστική διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση επιφανειακών (ακριβώς κάτω από το δέρμα) αλλοιώσεων ή μαζών. Στην τεχνική αυτή, μία λεπτή βελόνα εισάγεται εντός της μάζας, για τη δειγματοληψία των κυττάρων που, αφού βάφονται, θα πρέπει να εξετάζονται σε μικροσκόπιο. Το 1981, η πρώτη βιοψία δια λεπτής βελόνης πραγματοποιήθηκε στις Η.Π.Α. στο Maimonides Medical Center, εξαλείφοντας την ανάγκη για χειρουργική επέμβαση και νοσηλεία. Σήμερα, η διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται ευρέως στη διάγνωση του καρκίνου και φλεγμονωδών καταστάσεων.

Η διαδικασία της αναρρόφησης εκκινά μόνο όταν η μύτη της βελόνας εισάγεται εντός του ιστού. Η βελόνα κινείται εμπρός και πίσω, σε διαφορετικές κατευθύνσεις, εντός του όγκου. Το αναρροφηθέν υλικό πρέπει να παραμείνει εντός της βελόνας, κατά την αναρρόφηση. Η βελόνα κατόπιν εκπλένεται σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών και ακολουθεί



μέτρηση του αριθμού των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο. Η αναρρόφηση επαναλαμβάνεται έως ότου ληφθούν  $10^6$  κύτταρα σε 200  $\mu$ l ρυθμιστικού διαλύματος. Το κυτταρικό αιώρημα καταψύχθηκε ταχέως σε σωλήνες πολυπροπυλενίου ( $-80^{\circ}\text{C}$ ), έως ότου χρησιμοποιηθεί για ανάλυση.

Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών

sucrose, 85.50 g (250 mM)

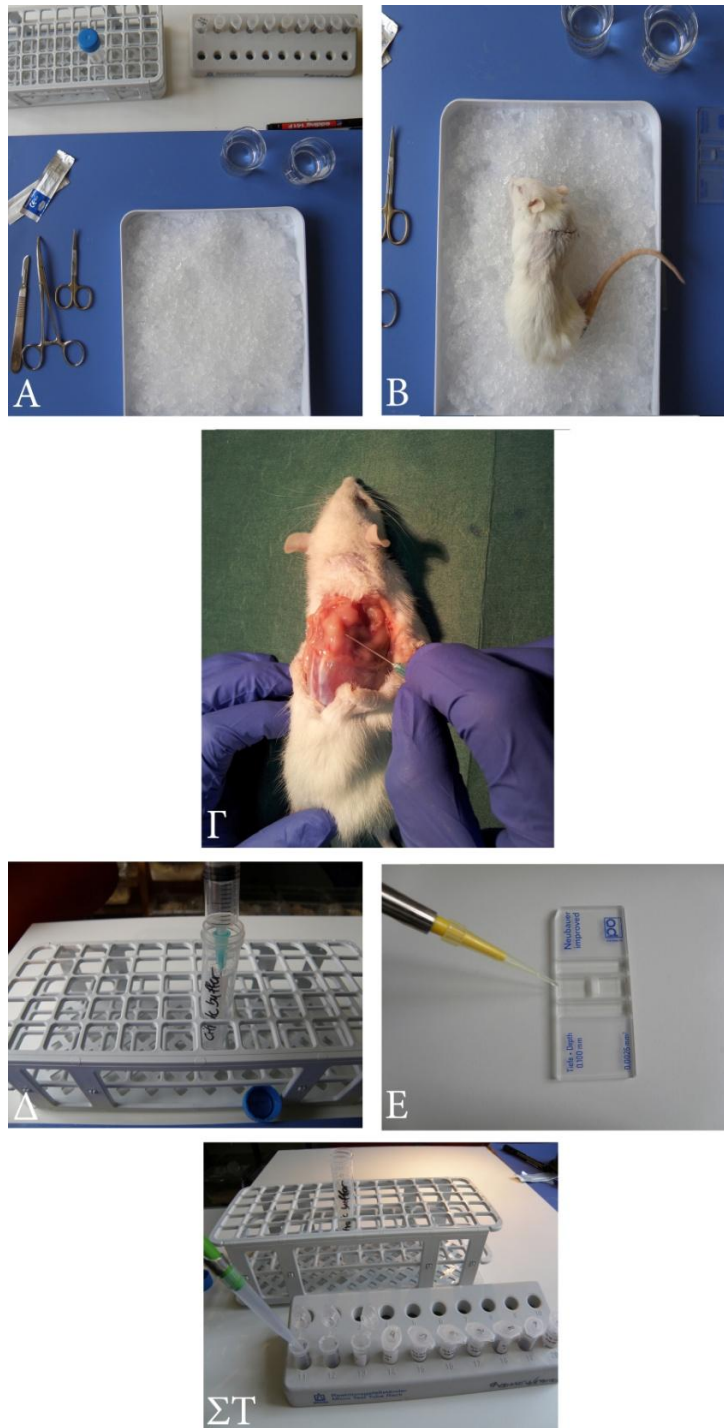
trisodium citrate, 11.76 g (40 mM)

800 ml δις-απεσταγμένου ύδατος

Dimethylsulfoxide (DMSO) 50 ml

1000 ml δις-απεσταγμένου ύδατος

pH 7.60



Εικόνα 35. Φωτογραφική απεικόνιση των σταδίων της βιοψίας δια λεπτής βελόνης (FNA). Α. Χειρουργικό τραπέζι-εργαλεία, Β. Θανατωμένος επίμυς τοποθετημένος στον πάγο για τη διατήρηση των οργάνων, Γ. Εισαγωγή της βελόνας εντός του ιστού, Δ. Έκπλυση της βελόνας σε ρυθμιστικό διάλυμα, Ε. Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο, ΣΤ. Διαχωρισμός των κυττάρων σε erpendorfs και κατάξυση αυτών.

### *3.12.11. Κυτταρομετρία ροής των κυτταρικών δειγμάτων των όγκων από την βιοψία λεπτής βελόνης*

Στην παρούσα μελέτη, τα κυτταρικά δείγματα που ελήφθησαν μέσω της βιοψίας λεπτής βελόνης, από τους όγκους των επιμύων, χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του φαινομένου της απόπτωσης. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πρωτόκολλο ήταν:

#### Αποθεματικό διάλυμα (stock solution)

Trisodium citrate, 2000 mg (3.4 mM),

Nonidet P 40, 2000  $\mu$ l (0.1% v/v)

Spermine tetrahydrochloride, 1044 mg (1.5 mM)

Tris (hydroxymethyl)-aminomethane, 121 mg (0.5mM)

Δις-απεσταγμένο ύδωρ έως 2 lt

pH 7.6

#### Διάλυμα Α

Trypsin (15 mg)

500 ml αποθεματικού διαλύματος

pH 7.6

#### Διάλυμα Β

Trypsin inhibitor (250 mg)

Ribonuclease A (50 mg)

500 ml αποθεματικού διαλύματος

pH 7.6

#### Διάλυμα Γ

Propidium iodide (PI) (208 mg)

spermine tetrahydrochloride (580 mg)

500 ml αποθεματικού διαλύματος

pH 7.6

Τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν σε κλάσματα των 5 ml σε πλαστικούς σωλήνες falcon στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Προτού χρησιμοποιηθούν, τα διαλύματα αποψύχθηκαν σε υδατόλουτρο στους  $37^{\circ}\text{C}$  (αλλά χωρίς να θερμανθούν έως τους  $37^{\circ}\text{C}$ ). Τα διαλύματα Α και Β διατηρούνταν κατόπιν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρήση, ενώ το διάλυμα Γ τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο.

Για την διαδικασία χρώσης των κυττάρων, 1800  $\mu\text{l}$  από το διάλυμα Α προστέθηκαν σε 200  $\mu\text{l}$  του κυτταρικού εναιωρήματος (ανά δείγμα) σε πλαστικό σωλήνα falcon και ο σωλήνας αναδεύτηκε ήπια. Μετά από 10 λεπτά παραμονής σε θερμοκρασία δωματίου, κατά την οποία ο σωλήνας αναστράφηκε περίπου πέντε ή έξι φορές, προστέθηκαν 1500  $\mu\text{l}$  διαλύματος Β. Τα διαλύματα αναμίχθηκαν και πάλι με αναστροφή του σωλήνα και μετά από 10 λεπτά παραμονής σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 1500  $\mu\text{l}$  παγωμένου διαλύματος Γ. Κατόπιν το δείγμα διηθήθηκε μέσω ενός ειδικού φίλτρου νάιλον 30  $\mu\text{m}$  (nylon mesh), σε σωλήνες τυλιγμένους σε αλουμινόχαρτο για προστασία του ΡΙ από το φως. Τα δείγματα διατηρήθηκαν σε παγόλουτρο ενώ ήταν έτοιμα για ανάλυση στο κυτταρόμετρο ροής, μετά το πέρας 15 λεπτών έως 3 ωρών, μετά την προσθήκη του διαλύματος Γ.

### **3.13. 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 στατιστικά 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. Κυτταρική βιωσιμότητα των LMS με τη χρήση MTT

#### 4.1.1. Κυτταροτοξική δράση της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και του συμπλόκου αργύρου

Με τη μέθοδο του MTT προσδιορίστηκαν οι IC<sub>50</sub> τιμές τόσο της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης (Dox) όσο και του συμπλόκου του αργύρου (SC) έναντι των LMS κυττάρων. Παρακάτω ακολουθεί ο Πίνακας 2 με τις IC<sub>50</sub> τιμές.

	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>100</sub> (μM)
[Ag(tpp) <sub>2</sub> (pmtH)Cl] - (SC)	1.13 ± 0.13	5.1 ± 0.82
Doxorubicin - (DOX)	0.7 ± 0.12	>100

Πίνακας 2. Συνοπτικός πίνακας με τις IC<sub>50</sub> τιμές της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης (Dox) και του συμπλόκου του αργύρου (SC). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

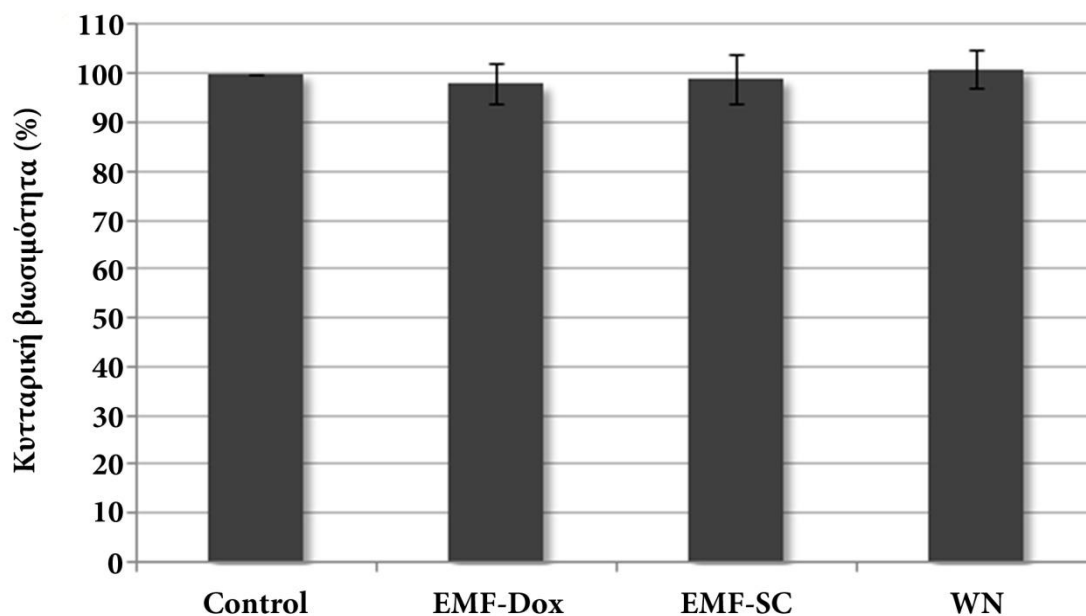
Η IC<sub>50</sub> τιμή της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης αντιστοιχεί σε 0.7μM, ενώ παρατηρείται ότι μετά τη συγκέντρωση των 3μM έως και σχεδόν τα 20μM δεν υπάρχει περαιτέρω μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Η μέγιστη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε είναι η 140μM, όπου η κυτταρική βιωσιμότητα ανέρχεται σε 3%.

Επίσης η IC<sub>50</sub> τιμή του συμπλόκου αργύρου αντιστοιχεί σε 1.13μM, ενώ η κυτταρική βιωσιμότητα στη μέγιστη συγκέντρωση των 5.1μM ανέρχεται σε 2%.

#### 4.1.2. Κυτταροτοξική βιωσιμότητα των LMS κυττάρων κατόπιν εκπομπής αυτών σε κυματομορφές συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

Παράλληλα με τη μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας των LMS κυττάρων στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις τόσο της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης όσο και του συμπλόκου του αργύρου, μελετήθηκε και η δράση των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων πυρηνικού

μαγνητικού συντονισμού, και των δύο ενώσεων, στα LMS, με τη χρήση του MTT. Παράλληλα, τα LMS εκτέθηκαν και σε ένα ηλεκτρομαγνητικό σήμα λευκού θορύβου (WN).

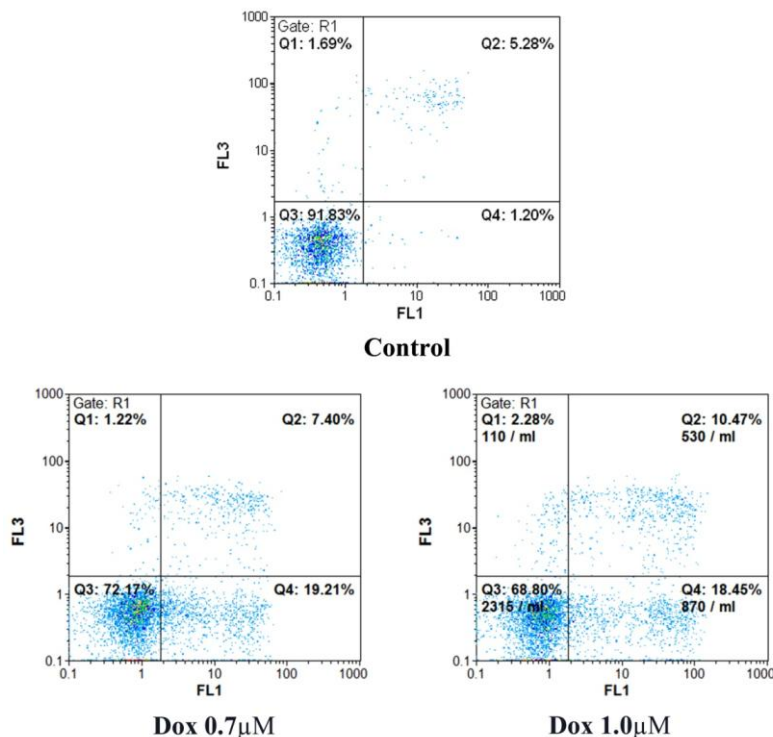


Γράφημα 1. Κυτταρική βιωσιμότητα των LMS κυττάρων μετά από 48 ώρες επώασης, κατόπιν έκθεσης αυτών σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης (EMF-Dox) και του συμπλόκου του αργύρου (EMF-SC), καθώς και σε ηλεκτρομαγνητικό σήμα λευκού θορύβου (WN). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τ.α.

Από το παραπάνω γράφημα παρατηρείται ότι τα LMS κύτταρα τα οποία εκτέθηκαν στα ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού τόσο της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης όσο και του συμπλόκου του αργύρου, παρουσίασαν τα ίδιο σχεδόν (ελάχιστα μειωμένο) ποσοστά κυτταρικής βιωσιμότητας με το κυτταρικό δείγμα ελέγχου (control). Επίσης το κυτταρικό δείγμα πειράματος WN, εμφάνισε το ίδιο σχεδόν ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας με όλες τις παραπάνω ομάδες. Δεν παρατηρήθηκε δηλαδή, καμία σημαντική μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας μεταξύ όλων των ομάδων.

## 4.2. Μελέτη της απόπτωσης - νέκρωσης μέσω κυτταρομετρίας ροής

### 4.2.1. Απόπτωση-νέκρωση μετά από προσθήκη υδροχλωρικής δοξορουβικίνης σε LMS κύτταρα

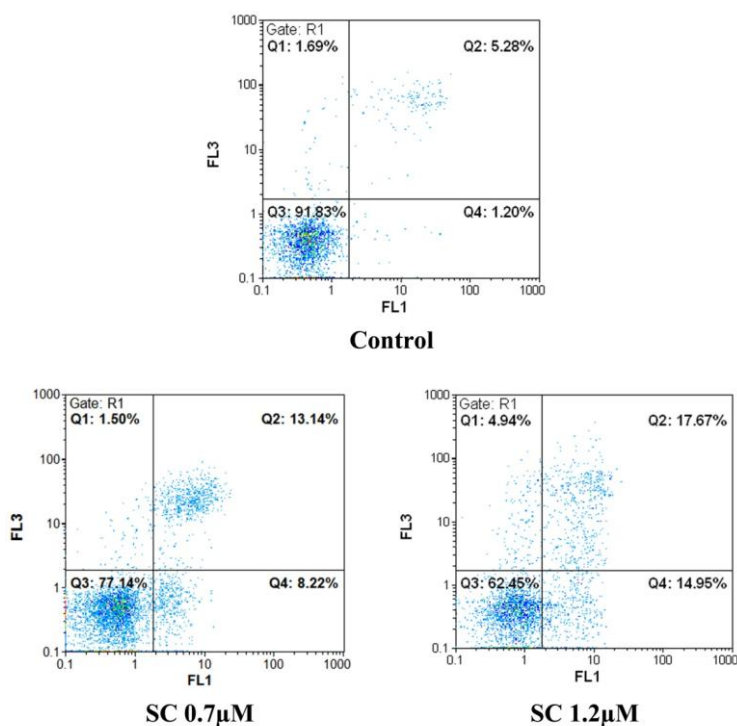


Εικόνα 36. Ανίχνευση της απόπτωσης-νέκρωσης μέσω κυτταρομετρίας ροής. Χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI, μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης.

Η Εικόνα 36 παρουσιάζει τα αποτελέσματα από την κυτταρομετρία ροής για τον έλεγχο της απόπτωσης - νέκρωσης μετά από προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης. Το 91.83% των κυττάρων της ομάδας ελέγχου (control) ήταν ζώντα, το 6.48% αυτών παρουσίασαν πρώιμη και όψιμη απόπτωση (early and late apoptosis), ενώ το 1.69% παρουσίασε νέκρωση. Αντίθετα, τα κύτταρα στα οποία προστέθηκε υδροχλωρική δοξορουβικίνη σε συγκέντρωση 0.7 μM, παρουσίασαν σημαντική αύξηση στην απόπτωση ( $p < 0.05$ ), με ποσοστό 26.61%, ενώ εμφάνισαν ελάχιστο ποσοστό νεκρωτικού θανάτου (1.22%). Όταν η συγκέντρωση της δοξορουβικίνης αυξήθηκε στα 1.0 μM, αυξήθηκε

και το ποσοστό του αποπτωτικού θανάτου σε 28.92%, ενώ το ποσοστό των νεκρωτικών κυττάρων παρέμεινε στο 2.28%. Παρατηρήθηκε, ότι, όπως και κατά τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας με το MTT, οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης δεν είχαν την αντίστοιχη μείωση στο ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας, έτσι και κατά τον υπολογισμό της απόπτωσης - νέκρωσης δεν παρατηρήθηκε ανάλογη αύξηση του αποπτωτικού θανάτου σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης.

#### 4.2.2. Απόπτωση-νέκρωση μετά από προσθήκη συμπλόκου αργύρου σε LMS κύτταρα



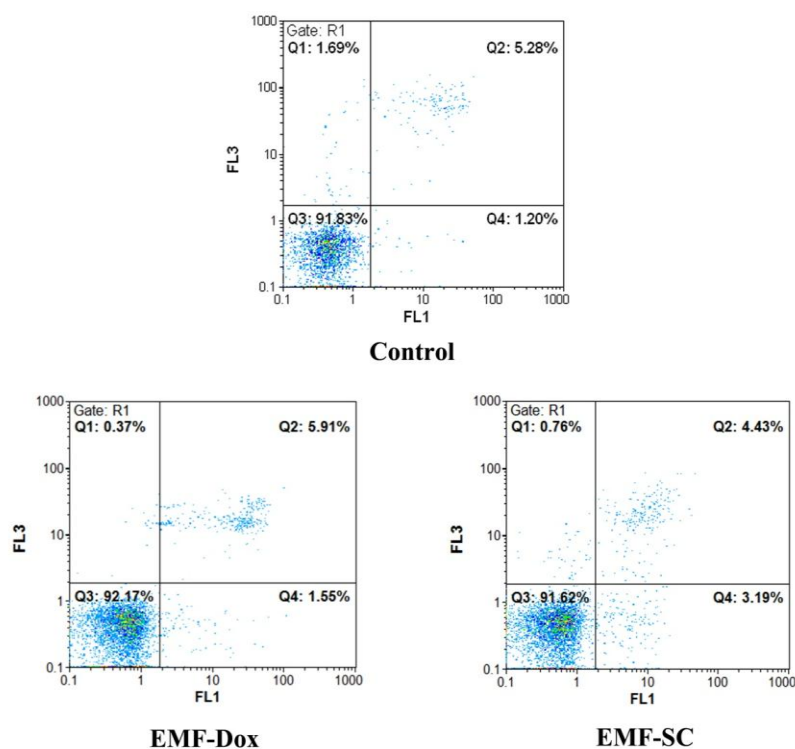
Εικόνα 37. Ανίχνευση της απόπτωσης-νέκρωσης μέσω κυτταρομετρίας ροής. Χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI, μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του συμπλόκου αργύρου (SC).

Το παραπάνω γράφημα παρουσιάζει αντιπροσωπευτικά κυτταρογραφήματα όσον αφορά τη μελέτη της απόπτωσης - νέκρωσης, μετά από προσθήκη του συμπλόκου αργύρου σε LMS κύτταρα. Στην ομάδα ελέγχου (control) το ποσοστό των ζώντων κυττάρων ανήλθε σε



91.83%, το ποσοστό του αποπτωτικού θανάτου σε 6.48% (early and late apoptosis), ενώ το ποσοστό του νεκρωτικού θανάτου σε 1.69%. Μετά την προσθήκη του συμπλόκου αργύρου στα LMS κύτταρα, σε συγκέντρωση 0.7 $\mu$ M, το ποσοστό του αποπτωτικού θανάτου ανήλθε σε 21.36% (early and late apoptosis) ( $p < 0.05$ ), ενώ το ποσοστό του νεκρωτικού θανάτου σε 1.5%. Όταν χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση του συμπλόκου αργύρου (1.2 $\mu$ M), το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκεται σε απόπτωση αυξήθηκε σημαντικά και ανήλθε σε 32.62% ( $p < 0.05$ ), ενώ το ποσοστό των κυττάρων που υπόκεινται σε νέκρωση σε 4.94%.

#### 4.2.3. Απόπτωση-νέκρωση μετά από έκθεση LMS κυττάρων σε κυματομορφές συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού



Εικόνα 38. Ανίχνευση της απόπτωσης-νέκρωσης μέσω κυτταρομετρίας ροής. Χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI, μετά από 48ώρη έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης (EMF-Dox) και του συμπλόκου του αργύρου (EMF-SC).

Η Εικόνα 38 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της μελέτης της απόπτωσης-νέκρωσης, κατόπιν έκθεσης των LMS κυττάρων στα ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης (EMF-Dox) και του συμπλόκου του αργύρου (EMF-SC). Παρατηρούμε, ότι τόσο τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε EMF της δοξορουβικίνης όσο και αυτά που εκτέθηκαν σε EMF του συμπλόκου αργύρου δεν παρουσίασαν κάποια αξιόλογη μεταβολή σε όλους τους επιμέρους κυτταρικούς πληθυσμούς (ζώντα κύτταρα, αποπτωτικά, νεκρωτικά), σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα από την πειραματική διαδικασία υπολογισμού της κυτταρικής βιωσιμότητας (MTT).

	Ζώντα κύτταρα	Αποπτωτικά	Νεκρωτικά
Ομάδα ελέγχου (control)	91.83±2.9	6.48±0.3	1.69±0.5
Dox 0.7μM	72.17±2.6*	26.61±1.2 <sup>†</sup>	1.22±0.8
Dox 1μM	68.8±2.8*	28.92±1.1 <sup>†</sup>	2.28±0.4
EMF-Dox	92.17±3.1	7.46±0.8	0.37±0.7
SC 0.7μM	77.14±1.9*	21.36±1.4 <sup>†</sup>	1.5±0.4
SC 1.2μM	62.45±2.2*	32.62±2.1 <sup>†</sup>	4.94±0.8
EMF-SC	91.62±3.6	7.62±1.3	0.76±0.6

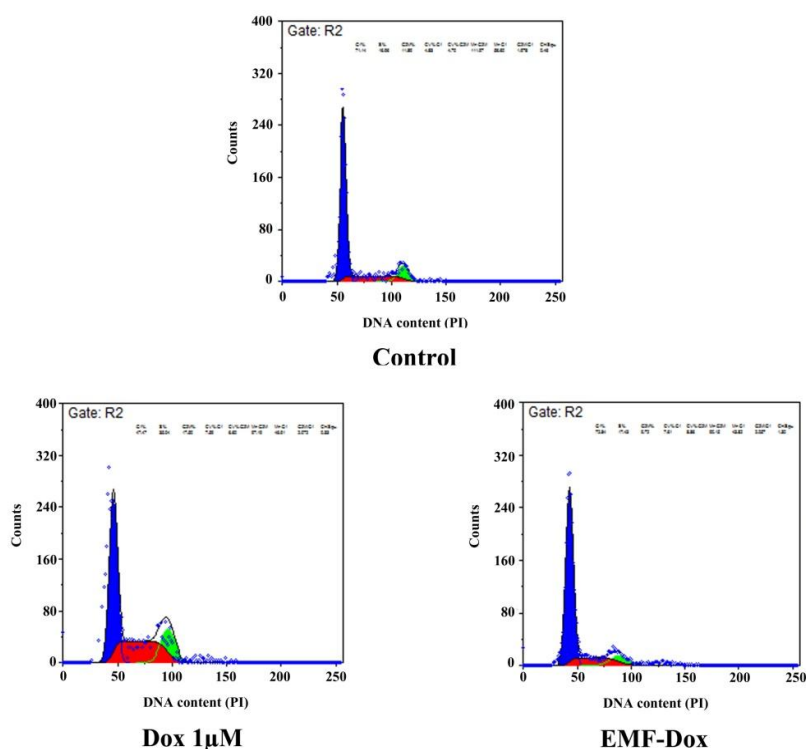
Πίνακας 3. Συνοπτικός πίνακας παρουσίασης των αποτελεσμάτων της απόπτωσης - νέκρωσης, μετά την προσθήκη υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και συμπλόκου αργύρου σε LMS κύτταρα, καθώς και έκθεση των LMS στα ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού των δύο ενώσεων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α., \*Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control),  $p < 0.05$ , <sup>†</sup> Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με την ελέγχου (control),  $p < 0.05$ .

Ο παραπάνω πίνακας συνοψίζει τα αποτελέσματα της μελέτης απόπτωσης - νέκρωσης, μέσω κυτταρομετρίας ροής, όλων των παραπάνω περιγραφέντων κυτταρογραφημάτων. Φαίνεται ξεκάθαρα, η στατιστικά σημαντική μεταβολή του ποσοστού του αποπτωτικού θανάτου μετά από προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης και συμπλόκου αργύρου.

### 4.3. Μελέτη αναστολής κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής

#### 4.3.1. Αναστολή κυτταρικού κύκλου μετά από προσθήκη υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού αυτής

Παράλληλα με την μελέτη της απόπτωσης - νέκρωσης, προχωρήσαμε και στην ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, για να διαπιστώσουμε σε ποια φάση του κυτταρικού κύκλου επέρχεται ενδεχόμενη αναστολή. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα όσον αφορά στην υδροχλωρική δοξορουβικίνη και την εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού αυτής.



Εικόνα 39. Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των LMS κυττάρων (χρώση με PI) μέσω κυτταρομετρίας ροής, μετά από προσθήκη της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης, καθώς και έκθεση των LMS κυττάρων σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αυτής.

Η παραπάνω εικόνα παρουσιάζει μια ανάλυση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου των LMS κυττάρων, μετά από την προσθήκη υδροχλωρικής δοξορουβικίνης ή την έκθεση των

LMS σε EMF αυτής. Παρατηρήσαμε, ότι κατά την προσθήκη της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης σε συγκέντρωση 1 $\mu$ M, αυξήθηκε σημαντικά ( $p<0.05$ ) το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου, ενώ αντίστοιχα μειώθηκε το ποσοστό αυτών που βρίσκονται στην G0/G1-φάση (cell cycle arrest at S-phase), σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε καμία αξιόλογη μεταβολή στην κατανομή των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, κατόπιν εκπομπής αυτών στα ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της δοξορουβικίνης (EMF-Dox). Παρακάτω, ο Πίνακας 4 παρουσιάζει αναλυτικά τα αποτελέσματα από την κατανομή των LMS κυττάρων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

	G0/G1	S	G2/M
Ομάδα ελέγχου (control)	71.50 $\pm$ 1.59	12.91 $\pm$ 2.85	15.58 $\pm$ 2.61
Dox 0.7 $\mu$ M	58.35 $\pm$ 1.73*	25.02 $\pm$ 2.03 <sup>†</sup>	16.63 $\pm$ 1.99
Dox 1 $\mu$ M	47.47 $\pm$ 1.82*	35.04 $\pm$ 1.96 <sup>†</sup>	17.5 $\pm$ 2.13
EMF-Dox	72.85 $\pm$ 1.65	13.89 $\pm$ 2.1	13.26 $\pm$ 1.89

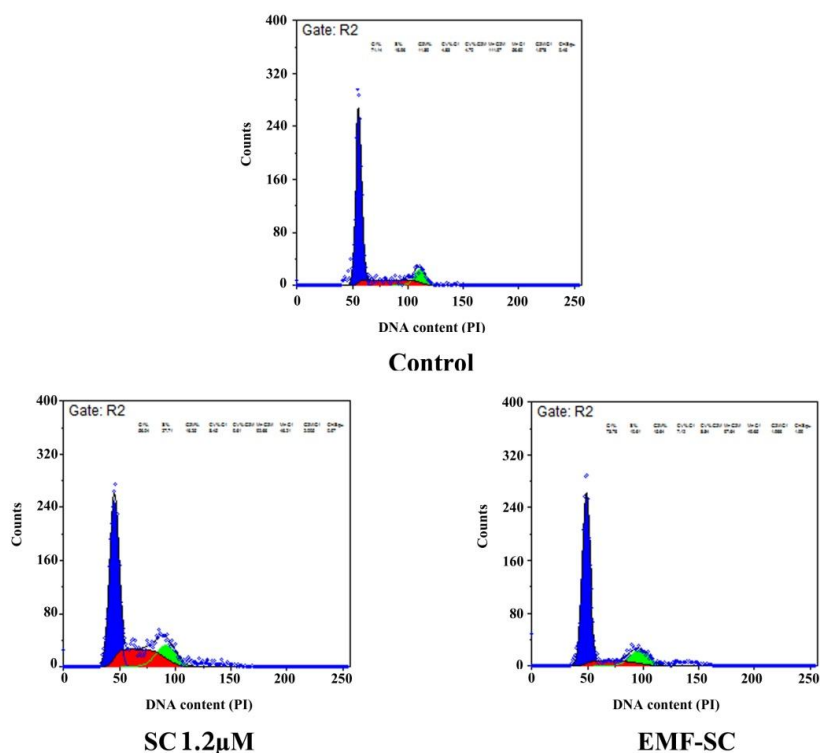
Πίνακας 4. Αναλυτικός πίνακας παρουσίασης των αποτελεσμάτων της κατανομής των LMS κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου μετά από προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων υδροχλωρικής δοξορουβικίνης, καθώς και έκθεση αυτών σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της δοξορουβικίνης (EMF-Dox). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τ.α., \*Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control),  $p<0.05$ , <sup>†</sup> Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control),  $p<0.05$ .

Από τον Πίνακα 4 φαίνεται καθαρά ότι η προσθήκη της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης σε LMS κύτταρα, αλλάζει το προφίλ κατανομής αυτών των κυττάρων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Παρατηρείται σημαντική αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στην S-φάση ( $p<0.01$ ) και αντίστοιχη μείωση του ποσοστού στη G0/G1 φάση ( $p<0.01$ ), ενώ δεν υπάρχει σχεδόν καμία μεταβολή στο ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στη G2/M-φάση. Επίσης, παρατηρούμε ότι σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις της δοξορουβικίνης υπάρχει αύξηση της αναστολής του κυτταρικού κύκλου στην S-φάση.

Αντιθέτως, τα LMS κύτταρα τα οποία έχουν εκτεθεί σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της δοξορουβικίνης (EMF-Dox), δεν παρουσίασαν καμία αξιόλογη μεταβολή στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου σε σχέση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου.

#### 4.3.2. Αναστολή κυτταρικού κύκλου μετά από προσθήκη συμπλόκου αργύρου και των κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αυτού

το σύμπλοκο του αργύρου, καθώς και για την δράση των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων αυτών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω ως εικόνες και ως πίνακες.



Εικόνα 40. Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των LMS κυττάρων (χρώση με PI) μέσω κυτταρομετρίας ροής, μετά από προσθήκη του συμπλόκου αργύρου, καθώς και έκθεση των LMS κυττάρων σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αυτού.

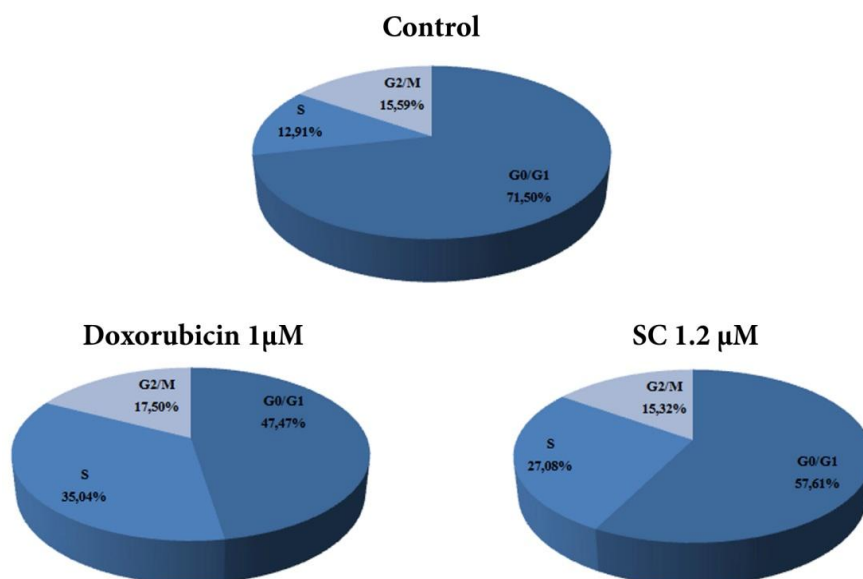
Στην Εικόνα 40 παρουσιάζεται η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των LMS, μετά από προσθήκη συμπλόκου αργύρου ή έκθεση των LMS σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων

πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού του συμπλόκου. Μετά την προσθήκη του συμπλόκου αργύρου, σε συγκέντρωση 1.2μM, στα LMS κύτταρα, παρουσιάστηκε σημαντική αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην S-φάση ( $p<0.05$ ), με αντίστοιχη μείωση του ποσοστού στην G0/G1-φάση, ενώ δεν υπήρξε μεταβολή στη G2/M-φάση. Αντιθέτως, τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε EMF του συμπλόκου αργύρου παρουσίασαν παρόμοιο προφίλ κατανομής στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου.

	G0/G1	S	G2/M
Ομάδα ελέγχου (control)	71.50±1.59	12.91±2.85	15.58±2.61
SC 0.7μM	63.39±1.25*	19.17±2.79 <sup>†</sup>	17.43±1.56
SC 1.2μM	57.60±2.21*	27.08±0.89 <sup>†</sup>	15.315±1.32
EMF-SC	71.56±1.89	12.55±1.75	15.89±2.23

Πίνακας 5. Αναλυτικός πίνακας παρουσίασης των αποτελεσμάτων της κατανομής των LMS κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου μετά από προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων συμπλόκου αργύρου, καθώς και έκθεση αυτών σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού του συμπλόκου αργύρου (EMF-SC). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τ.α., \*Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control),  $p<0.05$ , <sup>†</sup> Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control),  $p<0.05$ .

Ο Πίνακας 5 παρουσιάζει αναλυτικά τα ποσοστά κατανομής των κυττάρων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Φαίνεται ξεκάθαρα ότι σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του συμπλόκου αργύρου έχουμε σημαντική αύξηση της αναστολής του κυτταρικού κύκλου στην S-φάση ( $p<0.05$ ), 27.08±0.89 στη συγκέντρωση 1.2 μM σε σχέση με 19.17±2.79 στη συγκέντρωση 0.7 μM. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε EMF του συμπλόκου αργύρου δεν έχουν καμία σχεδόν διαφορά σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.



Γράφημα 2. Παρουσίαση του κυτταρικού κύκλου των LMS κυττάρων σε μορφή πίτας, μετά από την προσθήκη υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και του συμπλόκου αργύρου.

Στο παραπάνω γράφημα παρουσιάζεται η ανάλυση της κατανομής των LMS κυττάρων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου μετά από προσθήκη υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και συμπλόκου του αργύρου. Οι δύο ενώσεις παρουσιάζουν παρόμοιο προφίλ δράσης, αναστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο των LMS κυττάρων στην S-φάση.

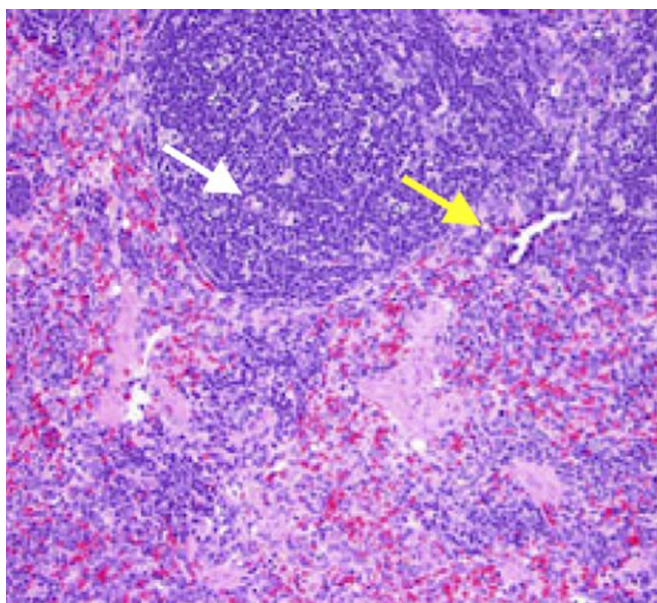
#### ***4.4. Μελέτη οξείας και χρόνιας τοξικότητας της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης σε υγιείς επίμυες Wistar***

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της οξείας και χρόνιας τοξικότητας της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και του συμπλόκου αργύρου. Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 3.10.1, δεν χρησιμοποιήθηκαν πειραματόζωα για την πραγματοποίηση μελέτης τοξικότητας της δοξορουβικίνης, για ηθικούς λόγους.

Βάσει της επιστημονικής βιβλιογραφίας καθώς επίσης και σύμφωνα με τα δεδομένα των φαρμακευτικών εταιρειών προκύπτει ότι η LD<sub>50</sub> της δοξορουβικίνης, όσον αφορά την

οξεία τοξικότητα, είναι 16.03 mg/kg μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση, 12.51 mg/kg μετά από ενδοφλέβια χορήγηση, ενώ κατά την υποδόρια χορήγησή της η LD<sub>50</sub> αντιστοιχεί 21.84 mg/kg.

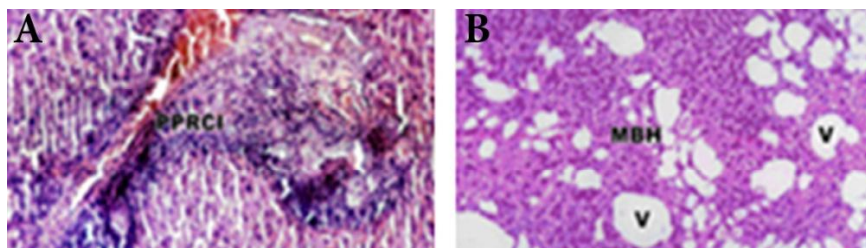
Σε μελέτες χρόνιας τοξικότητας κατά τη χορήγηση δοξορουβικίνης σε επίμους παρατηρήθηκαν ήπιες αλλοιώσεις έως και εκτεταμένες βλάβες σε όργανα όπως ήπαρ, σπλήνας, καρδιά και νεφροί. Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένα αντιπροσωπευτικά ιστοπαθολογικά ευρήματα όσον αφορά την τοξικότητα της δοξορουβικίνης σε επίμους Wistar.



**Εικόνα 41.** Μικροσκοπική εικόνα σπλήνα επίμους. Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις του σπλήνα επίμους μετά από ενδοφλέβια χορήγηση δοξορουβικίνης (8mg/kg). Χρώση: Haematoxylin-eosin. Μεγέθυνση: 100X (από Blomme EA *et al*, 2008).

Ο Blomme E. A. και οι συνεργάτες του αναφέρουν ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί ήπια διάχυτη ατροφία λεμφοειδούς στο λευκό πολφό (λευκό βέλος) καθώς και στην οριακή ζώνη (κίτρινο βέλος), σε τομή σπληνός επίμους [Blomme EA. *et al.*, 2007].





**Εικόνα 42.** Μικροσκοπική εικόνα ήπατος επίμυος. Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις του ήπατος επίμυος μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση δοξορουβικίνης (0.2 και 1mg/kg). Χρώση: Haematoxylin-eosin. Μεγέθυνση: A. 100X και B. 400X (από El-Sayyad HI *et al*, 2009).

Ο Hassan I El-Sayyad και οι συνεργάτες του αναφέρουν ότι, μετά από χορήγηση 0.2 και 1mg/kg (ειδικότερα στη δόση 1mg/kg) δοξορουβικίνης σε επίμυες, για 20 ημέρες, προκαλείται εκτεταμένη ηπατοτοξικότητα. Επίσης οι επίμυες που έλαβαν δοξορουβικίνη παρουσίασαν μεγαλύτερη τάση για εμφάνιση ηπατικής ίνωσης που προκλήθηκε από την παρουσία πολυάριθμων σημείων υποκειμένων κοκκιωματωδών αλλοιώσεων, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (καμία θεραπεία) [El-Sayyad HI *et al.*, 2009].

#### **4.5. Μελέτη οξείας και χρόνιας τοξικότητας του συμπλόκου αργύρου σε υγιείς επίμυες Wistar**

Οι μελέτες της οξείας και της χρόνιας τοξικότητας είναι σημαντικές γιατί μπορούμε να διαπιστώσουμε τις τυχόν παρενέργειες που έχει ένας παράγοντας σε ένα βιολογικό σύστημα και μας βοηθάει στην εξαγωγή συμπερασμάτων για την δράση του, κατά την διάρκεια της αντικαρκινικής μελέτης που ακολουθεί.

##### **4.5.1. Οξεία τοξικότητα συμπλόκου αργύρου**

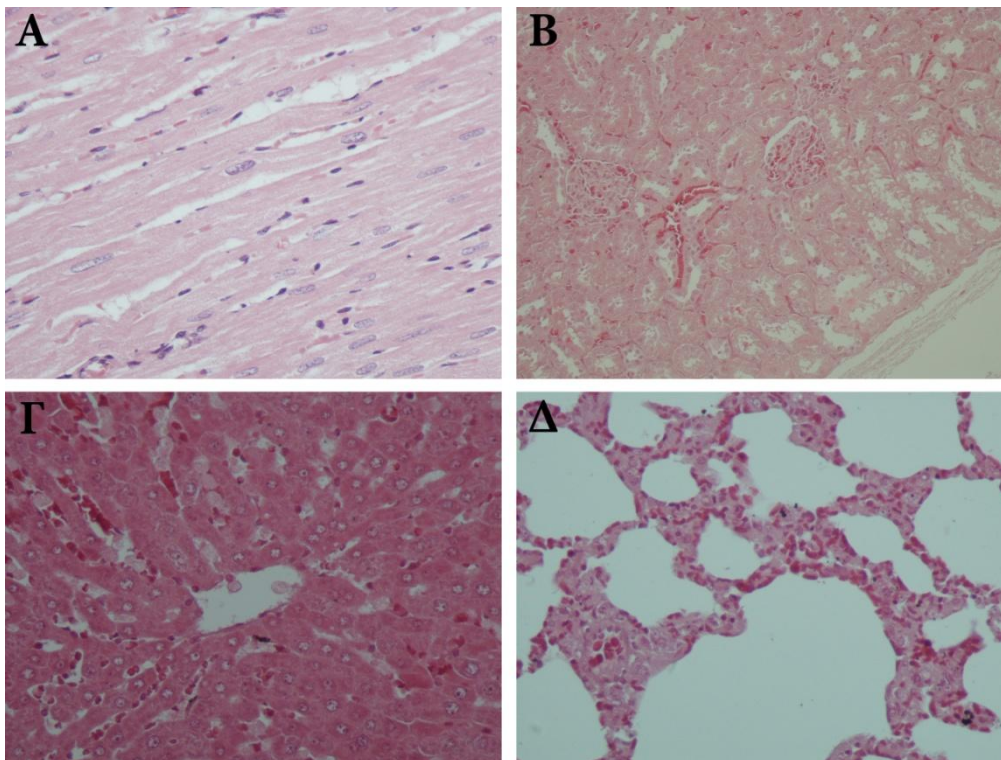
Η οξεία τοξικότητα του συμπλόκου του αργύρου προσδιορίστηκε από την κλινική εικόνα των επιμύων, τη μεταβολή του σωματικού βάρους καθώς επίσης και από ιστολογικά ευρήματα σε

διάφορα όργανα. Όπως αναφέρεται και στην υποενότητα 3.10.2 το σύμπλοκο του αργύρου χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε υγιείς επίμυες Wistar, σε λογαριθμικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις 0.8, 8 και 80 mg/kg σωματικού βάρους. Τα κύρια όργανα τα οποία επηρεάστηκαν κατά τη μελέτη της οξείας τοξικότητας είναι πνεύμονας και ήπαρ, ενώ στα υπόλοιπα όργανα δεν παρατηρήθηκε κάποια ιστολογική αλλοίωση.

Στις πρώτες δύο συγκεντρώσεις του συμπλόκου του αργύρου δεν παρατηρήθηκε θάνατος λόγω τοξικότητας, ενώ στην τελευταία (80mg/kg) απεβίωσε το 70% των πειραματοζώων. Έτσι η LD<sub>50</sub>, η δόση που συνεπάγεται το θάνατο του 50% των πειραματοζώων, είναι ίση περίπου με 55mg/kg ΣΒ. Κατά την ιστολογική εξέταση των δειγμάτων των ομάδων ΟΠΟΤ1 και ΟΠΟΤ2 δεν παρατηρήθηκε κάποια ιστολογική αλλοίωση, ενώ πολύ μικρή ήταν και η μεταβολή του σωματικού βάρους σε σχέση με την ομάδα ΟΕΟΤ (Πίνακας 5). Στην ομάδα ΟΠΟΤ3, παρουσιάστηκε ήπια πάχυνση των διαφραγμάτων, καθώς και ελάχιστη διόγκωση των πνευμονοκυττάρων (Εικόνα 43).

Δόση (mg/kg ΣΒ)	Πνεύμονας	Ήπαρ	ΔΣΒ%	Θάνατος
ΟΕΟΤ (Control)	(-)	(-)	+3.1	0%
ΟΠΟΤ1 (0.8)	(-)	(-)	+1.9	0%
ΟΠΟΤ2 (8)	(-)	(-)	-0.7	0%
ΟΠΟΤ3 (80)	(+)	(-)	-6.8	70%

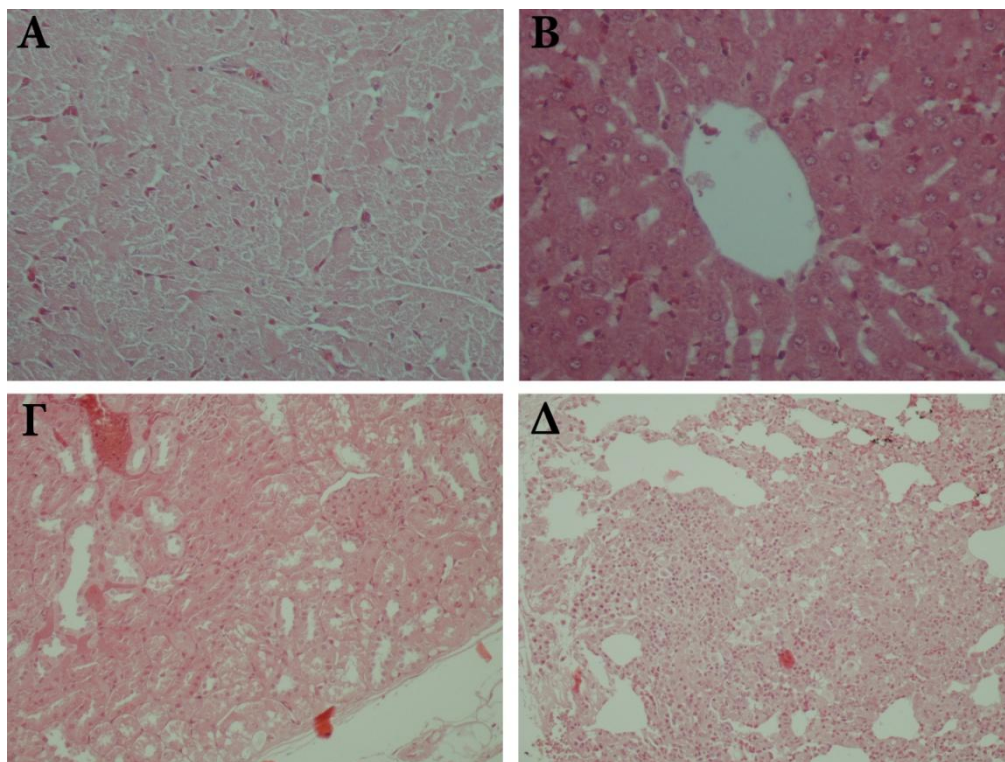
Πίνακας 5. ΔΣΒ% = ποσοστιαία μεταβολή του σωματικού βάρους, (-) = απουσία ιστολογικών αλλοιώσεων, (+) = ήπιες ιστολογικές αλλοιώσεις, ΟΕΟΤ = ομάδα ελέγχου, ΟΠΟΤ1 = πειραματόζωα που έλαβαν μια εφάπαξ ενδοπεριτοναϊκή δόση 0.8mg/kg ΣΒ δόση του συμπλόκου του αργύρου, ΟΠΟΤ2 = πειραματόζωα που έλαβαν 8mg/kg ΣΒ, ΟΠΟΤ3 = πειραματόζωα που έλαβαν 80mg/kg ΣΒ



Εικόνα 43. Αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες που απεικονίζουν την οξεία τοξικότητα από τις ομάδες ΟΠΟΤ1-ΟΠΟΤ3. Χρώση: Haematoxylin-eosin. (Α): Βιοψία από την καρδιά των πειραματόζωων που ανήκαν στην ΟΠΟΤ2 (8 mg/kg ΣΒ); (Β), (Γ) και (Δ): Βιοψίες από το νεφρό, ήπαρ και πνεύμονα, αντίστοιχα, από πειραματόζωα που ανήκαν στην ΟΠΟΤ3 (80 mg/kg ΣΒ). Μεγέθυνση: Α: X400, Β: X200, Γ: X400, Δ: X200.

#### 4.5.2. Χρόνια τοξικότητα συμπλόκου αργύρου

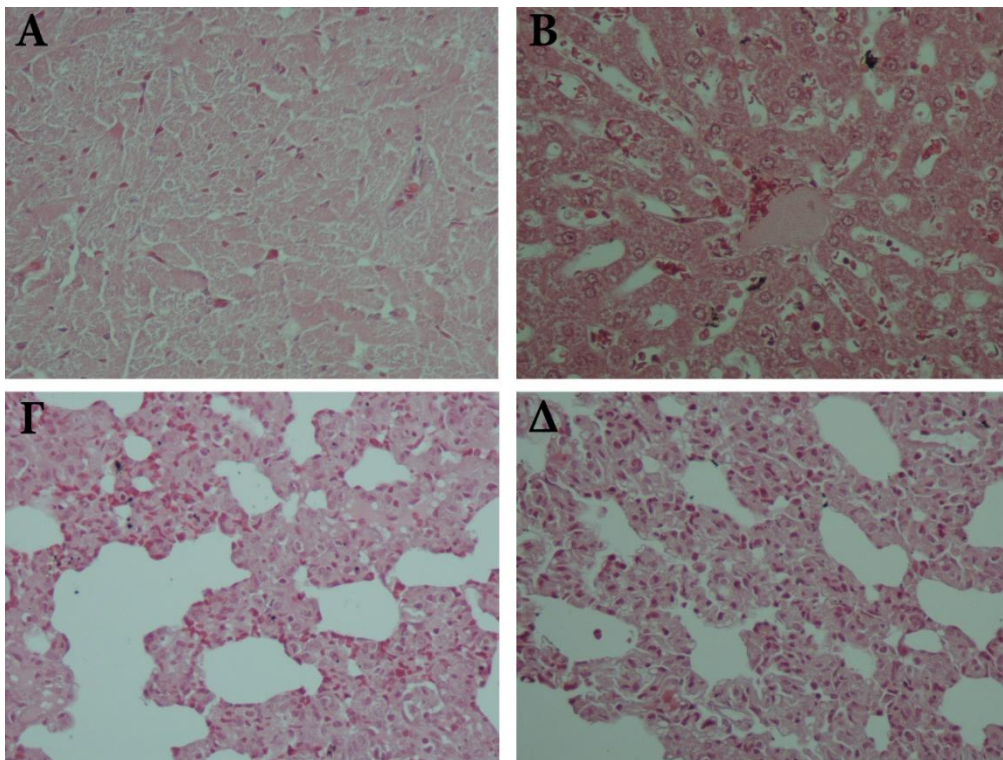
Όπως και στη μελέτη της οξείας τοξικότητας, έτσι και εδώ προσδιορίστηκε η χρόνια τοξικότητα του συμπλόκου αργύρου σε υγιείς επίμυες Wistar. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες, ομάδα ελέγχου (ΟΕΧΤ), ομάδα πειραματόζωων που λάμβανε 3mg/kg μία φορά την εβδομάδα, για 4 εβδομάδες (ΟΠΧΤ1) και ομάδα πειραματόζωων που λάμβανε 6mg/kg μία φορά, την εβδομάδα για 4 εβδομάδες (ΟΠΧΤ2). Η χρόνια τοξικότητα υπολογίστηκε τόσο από τη μεταβολή του σωματικού βάρους όσο και από τον ιστοπαθολογικό έλεγχο. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζεται ο ιστοπαθολογικός έλεγχος των οργάνων.



Εικόνα 44. Αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες που απεικονίζουν τη χρόνια τοξικότητα από την ομάδα ΟΠΧΤ1 (3mg/kg). Χρώση: Haematoxylin-eosin. (Α): Βιοψία από την καρδιά των πειραματόζωων; (Β): Βιοψία ήπατος και (Γ) και (Δ): Βιοψίες νεφρό και πνεύμονα, αντίστοιχα. Μεγέθυνση: Α: X400, Β: X400, Γ: X200, Δ: X200.

Στα πειραματόζωα της ομάδας ΟΠΧΤ1, παρατηρήθηκαν ήπιες ιστολογικές αλλοιώσεις μόνο στον πνεύμονα, ενώ στα υπόλοιπα όργανα όπως νεφρός, καρδιά και ήπαρ δεν παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις (Πίνακας 6). Στην Εικόνα 45 ο πνεύμονας παρουσιάζει διεγερμένα πνευμονοκύτταρα, αφρώδη μακροφάγα στις κυψελίδες καθώς και ενδοκυψελιδικό οίδημα.





Εικόνα 45. Αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες που απεικονίζουν τη χρόνια τοξικότητα από την ομάδα ΟΠΧΤ2 (6mg/kg). Χρώση: Haematoxylin-eosin. (Α): Βιοψία από την καρδιά των πειραματόζωων; (Β): Βιοψία ήπατος και (Γ) και (Δ): Βιοψίες νεφρό και πνεύμονα, αντίστοιχα. Μεγέθυνση: Α: X400, Β: X400, Γ: X200, Δ: X400.

Στα πειραματόζωα της ομάδας ΟΠΧΤ2, όπου έλαβαν 6mg/kg κάθε εβδομάδα, για 4 εβδομάδες, παρουσιάστηκαν περισσότερες ιστολογικές αλλοιώσεις σε σχέση με αυτές της ομάδας ΟΠΧΤ1, ενώ η καρδιά ήταν φυσιολογική. Συγκεκριμένα, το ήπαρ παρουσιάζει ήπια διαύγαση κολποειδών γύρω από κεντρικές φλέβες, ο νεφρός ήπια κενοτοπίωση του επιθηλίου των νεφρικών σωληναρίων και ο πνεύμονας διόγκωση των πνευμονοκυττάρων με πάχυνση των κυψελιδικών διαφραγμάτων και ενδοκυψελιδικό οίδημα (Εικόνα 45). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στο σωματικό βάρος, ούτε και κάποιος θάνατος πειραματοζώου.

Δόση (mg/kg ΣΒ)	Πνεύμονας	Νεφρός	Ήπαρ	ΔΣΒ%	Θάνατος
ΟΕΧΤ (Control)	(-)	(-)	(-)	+2.9	0%
ΟΠΧΤ1 (3)	(+)	(-)	(-)	+2.1	0%
ΟΠΧΤ2 (6)	Οίδημα	(+)	(+)	-1.9	0%

Πίνακας 6. ΔΣΒ% = ποσοστιαία μεταβολή του σωματικού βάρους, (-) = απουσία ιστολογικών αλλοιώσεων, (+) = ήπιες ιστολογικές αλλοιώσεις, ΟΕΧΤ = ομάδα ελέγχου, ΟΠΧΤ1 = πειραματόζωα που έλαβαν 4x3mg/kg ΣΒ, ΟΠΧΤ2 = πειραματόζωα που έλαβαν 4x6mg/kg ΣΒ

Πρέπει να σημειωθεί ότι κατόπιν έκθεσης υγιών επιμύων Wistar σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού τόσο της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης όσο και του συμπλόκου του αργύρου δεν παρουσίασαν καμία ιστολογική αλλοίωση σε κάποιο από τα όργανα. Επίσης, το σωματικό βάρος αυτών των επιμύων αυξήθηκε φυσιολογικά.

#### **4.6. Μελέτη αντικαρκινικής δράσης σε επίμυες Wistar, που φέρουν όγκο**

##### **4.6.1. Δράση υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και των κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αυτής**

Παράλληλα με τις μελέτες τοξικότητας τόσο των ενώσεων (δοξορουβικίνη και σύμπλοκο αργύρου), όσο και των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού, μελετήθηκε και η αντικαρκινική δράση όλων των προαναφερόμενων σε επίμυες Wistar μετά από ενοφθαλμισμό.

Ο μέσος χρόνος επιβίωσης (MST) της ομάδας ελέγχου (Control) ήταν 27.5±4.3 ημέρες και ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης όγκου (MTGR) ήταν 3.30±0.16 g/d. Επίσης ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (SGR) της ίδιας ομάδας ήταν 0.101±0.008 %/d. Το πρώτο πειραματόζωο από την ομάδα ελέγχου απεβίωσε την 21η ημέρα, ενώ το τελευταίο την 35η (Πίνακας 7). Οι επίμυες

που ανήκαν στην ομάδα της εικονικής έκθεσης (SE) δεν παρουσίασαν καμία αξιολογη διαφορά σε όλους τους παραπάνω προαναφερθέντες δείκτες. Οι επίμυες της ομάδας του λευκού θορύβου (WN), είχαν μέσο όρο επιβίωσης 26.7±4.9 ημέρες, όπου το πρώτο και το τελευταίο πειραματόζωο της ομάδας αυτής κατέληξαν στις 20 και 34 ημέρες αντίστοιχα. Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 7 όλοι οι δείκτες της ομάδας WN δεν παρουσιάζουν κάποια διαφορά σε σχέση με την ομάδα Control.

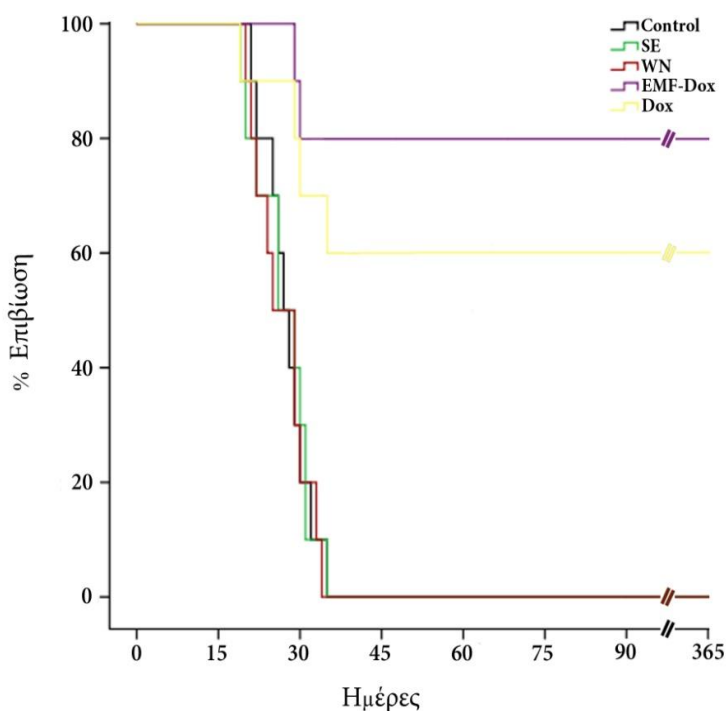
Ομάδα	MST (d)	MTW (g)	MTGR (g/d)	SGR (%/d)
Control	27.5±4.3	90.7±17.9	3.30±0.16	0.101±0.008
SE	26.9±5.3	86.5±14.3	3.25±0.32	0.109±0.019
WN	26.7±4.9	88.9±21.4	3.3±0.23	0.106±0.010
Dox	28.3±6.7	60.8±11.9*	1.87±0.24†	0.085±0.017 <sup>‡</sup>
EMF-Dox	29.5±0.5	57.2±11.3*	1.59±0.06†	0.064±0.003 <sup>‡</sup>

Πίνακας 7. Αποτελέσματα αντικαρκινικής δράσης. MST (d) = Μέσος χρόνος επιβίωσης σε ημέρες, MTW (g) = Μέσο βάρος όγκου σε γραμμάρια, MTGR (g/d) = Μέσος ρυθμός ανάπτυξης όγκου (γραμμάρια/ημέρες), SGR (%) = Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης όγκου (%/ημέρα), Control = ομάδα ελέγχου, SE = ομάδα επιμύων εικονικής έκθεσης (sham exposure), WN = ομάδα επιμύων εκτιθέμενη σε λευκό θόρυβο, Dox = επίμυες που έχουν λάβει δοξορουβικίνη 2mg/kg σωματικού βάρους, EMF-Dox = επίμυες που έχουν εκτεθεί σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού της δοξορουβικίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α., \*Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control), p<0.05, †Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control), p<0.05, <sup>‡</sup>Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control), p<0.05.

Αντίθετα με τις άλλες δυο ομάδες, οι επίμυες της ομάδας Dox, όπου έλαβαν 2mg/kg σωματικού βάρους, παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση στους δείκτες, μέσο βάρος όγκου (MTW), MTGR και SGR. Πριν γίνει ανάλυση στις τιμές των δεικτών θα πρέπει να αναφερθεί ότι στην ομάδα Dox το 60% των πειραματοζώων (6 σε αριθμό) παρουσίασαν πλήρη υποχώρηση του όγκου, θεραπεύτηκαν πλήρως και ζουν μέχρι και σήμερα (Γράφημα 3). Επομένως γίνεται αντιληπτό ότι οι τιμές των δεικτών MTW, MTGR και SGR προκύπτουν από τα υπόλοιπα 4 πειραματόζωα της ομάδας. Συγκεκριμένα, το μέσο βάρος όγκου στην ομάδα Dox ήταν 60.8±11.9 γραμμάρια, σημαντικά μειωμένο σε σχέση με την ομάδα Control

αλλά και με τις άλλες δύο ομάδες SE και WN ( $p < 0.05$ ). Σημαντική μείωση εμφάνισαν και οι MTGR και SGR σε σύγκριση με τις ομάδες Control, SE, WN, με τιμές  $1.87 \pm 0.24$  g/d και  $0.085 \pm 0.017$  %/d, αντίστοιχα ( $p < 0.05$ ).

Ωστόσο, το πιο σημαντικό σημείο σε ολόκληρη αυτή την πειραματική διαδικασία βρίσκεται στο γεγονός ότι το 80% των επιμύων της ομάδας EMF-Dox, δηλαδή επίμυες που εκτέθηκαν σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού της δοξορουβικίνης, παρουσίασαν πλήρη υποχώρηση του όγκου και επιβιώνουν μέχρι και σήμερα. Από το εναπομείναν 20% της ομάδας EMF-Dox, συμπληρώνονται οι τιμές σε όλους τους δείκτες για τον Πίνακα 7. Έτσι οι τιμές της ομάδας EMF-Dox τόσο στο MTGR ( $1.59 \pm 0.06$  g/d) όσο και στο SGR ( $0.064 \pm 0.003$  %/d) είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερες σε σύγκριση τόσο με την ομάδα control όσο και με τις ομάδες SE και WN.



Γράφημα 3. Καμπύλη θανάτου των επιμύων Wistar που ανήκουν στις ομάδες ελέγχου (Control), ομάδα εικονικής έκθεσης (sham exposure-SE), ομάδα λευκού θορύβου (WN), επίμυες που τους χορηγήθηκε δοξορουβικίνη 2mg/kg (Dox) και επίμυες που εκτέθηκαν σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού της δοξορουβικίνης (EMF-Dox).



Το Γράφημα 3 παρουσιάζει την καμπύλη επιβίωσης όλων των πειραματόζωων των ομάδων Control, SE, WN, Dox και EMF-Dox. Παρατηρούμε την τεράστια διαφορά στην επιβίωση των πειραματοζώων των ομάδων Dox και EMF-Dox. Στα πειραματόζωα τα οποία θεραπεύτηκαν τόσο στην ομάδα Dox (60%) όσο και στην ομάδα EMF-Dox (80%), πριν το στάδιο της πλήρους εξαφάνισης του όγκου, για να διαπιστωθεί περαιτέρω εάν οι τηγμένοι όγκοι ήταν ικανοί να δώσουν ξανά μια εστία ανάπτυξης όγκου ή μια μετάσταση στα πειραματόζωα, πάρθηκε ένας μικρός όγκος από το νεκρωτικό υλικό με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης σύριγγας και τοποθετήθηκε σε τρυβλίο που περιείχε 10ml DMEM. Πραγματοποιήθηκαν συνεχόμενες ανακαλλιέργειες του νεκρωτικού υλικού, στις οποίες διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχαν ζωντανά LMS κύτταρα, ικανά να πολλαπλασιαστούν και κατά συνέπεια να δώσουν μια μετάσταση στα πειραματόζωα.

#### ***4.6.2. Δράση συμπλόκου αργύρου και των κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αυτού***

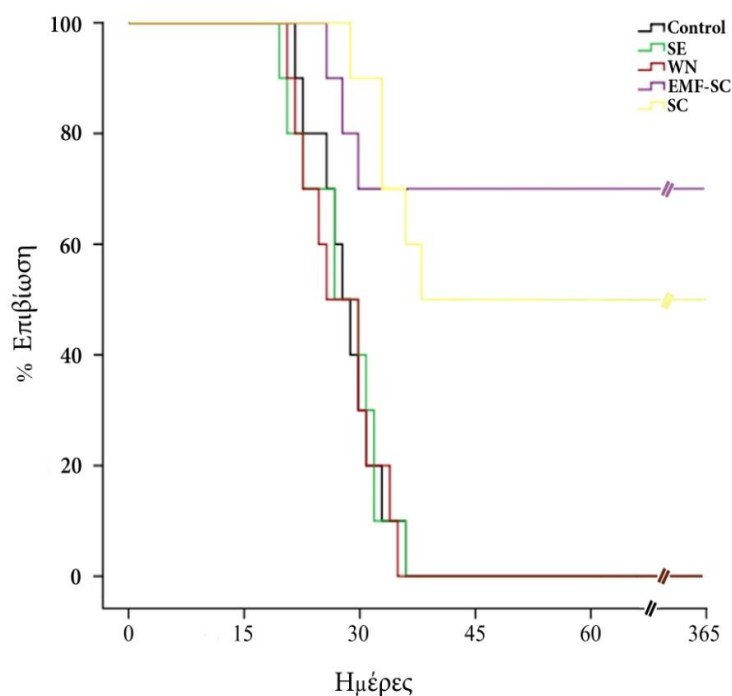
Όπως και στην ενότητα 4.6.1. έτσι και εδώ συγκρίνονται οι τιμές των δεικτών MST, MTW, MTGR και SGR μεταξύ των ομάδων control, SE, WN, SC και EMF-SC. Οι τιμές των ομάδων control, SE, WN για όλους τους δείκτες έχουν ήδη αναλυθεί στην προηγούμενη ενότητα και εμφανίζονται αναλυτικά πάλι στον Πίνακα 8. Το μέσο βάρος όγκου (MTW) για την ομάδα SC είναι  $70.2 \pm 15.6$  g, ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης όγκου (MTGR) είναι  $1.80 \pm 0.11$  g/d και ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (SGR) είναι  $0.071 \pm 0.008$  %/d, και όλα είναι στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με την ομάδα control ( $p < 0.05$ ). Στατιστικά σημαντική διαφορά υπάρχει και μεταξύ της ομάδας SC και των ομάδων SE και WN. Δεν υπάρχει κάποια διαφορά στο μέσο χρόνος επιβίωσης (MST) μεταξύ όλων των ομάδων. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως έτσι και εδώ είναι σημαντικό να αναφερθεί το γεγονός ότι το 50% των πειραματοζώων της ομάδας SC επέζησε και δεν φέρει ποια κανένα όγκο (Γράφημα 4).

Το ίδιο σχεδόν μοτίβο με την ομάδα SC ακολουθεί και η ομάδα EMF-SC, όπου εκτός από το MST, σε όλους τους υπόλοιπους δείκτες παρουσιάζει σημαντική μείωση σε σύγκριση τόσο με την ομάδα control όσο και με τις ομάδες SE και WN ( $p < 0.05$ ). Πρέπει να τονιστεί ότι στην ομάδα των πειραματοζώων, η οποία εκτέθηκε στην ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

συχνοτήτων συντονισμού του συμπλόκου αργύρου (EMF-SC) το 70% των πειραματοζώων επέζησε, χωρίς πλέον την παρουσία όγκου ή κάποιας άλλης αλλοίωσης/μετάστασης (Γράφημα 4).

Ομάδα	MST (d)	MTW (g)	MTGR (g/d)	SGR (%/d)
Control	27.5±4.3	90.7±17.9	3.30±0.16	0.101±0.008
SE	26.9±5.3	86.5±14.3	3.25±0.32	0.109±0.019
WN	26.7±4.9	88.9±21.4	3.3±0.23	0.106±0.010
SC	32.8±3.4	70.2±15.6 <sup>*</sup>	1.80±0.11†	0.071±0.008 <sup>‡</sup>
EMF-SC	27.0±2.0	63.9±10.1 <sup>*</sup>	2.05±0.03†	0.082±0.005 <sup>‡</sup>

Πίνακας 8. Αποτελέσματα αντικαρκινικής δράσης. MST (d) = Μέσος χρόνος επιβίωσης σε ημέρες, MTW (g) = Μέσο βάρος όγκου σε γραμμάρια, MTGR (g/d) = Μέσος ρυθμός ανάπτυξης όγκου (γραμμάρια/ημέρες), SGR (%) = Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης όγκου (%/ημέρα), Control = ομάδα ελέγχου, SE = ομάδα επιμύων εικονικής έκθεσης (sham exposure), WN = ομάδα επιμύων εκτιθέμενη σε λευκό θόρυβο, SC = επίμυες που έχουν λάβει σύμπλοκο αργύρου 6mg/kg, EMF-SC = επίμυες που έχουν εκτεθεί σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού του συμπλόκου αργύρου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α., <sup>\*</sup>Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control), p<0.05, <sup>†</sup>Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control), p<0.05, <sup>‡</sup>Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control), p<0.05.



Γράφημα 4. Καμπύλη θανάτου των επιμύων Wistar που ανήκουν στις ομάδες ελέγχου (Control), ομάδα εικονικής έκθεσης (sham exposure-SE), ομάδα λευκού θορύβου (WN), επίμυες που τους χορηγήθηκε σύμπλοκο αργύρου 6mg/kg (SC) και επίμυες που εκτέθηκαν σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων συντονισμού του συμπλόκου αργύρου (EMF-SC).

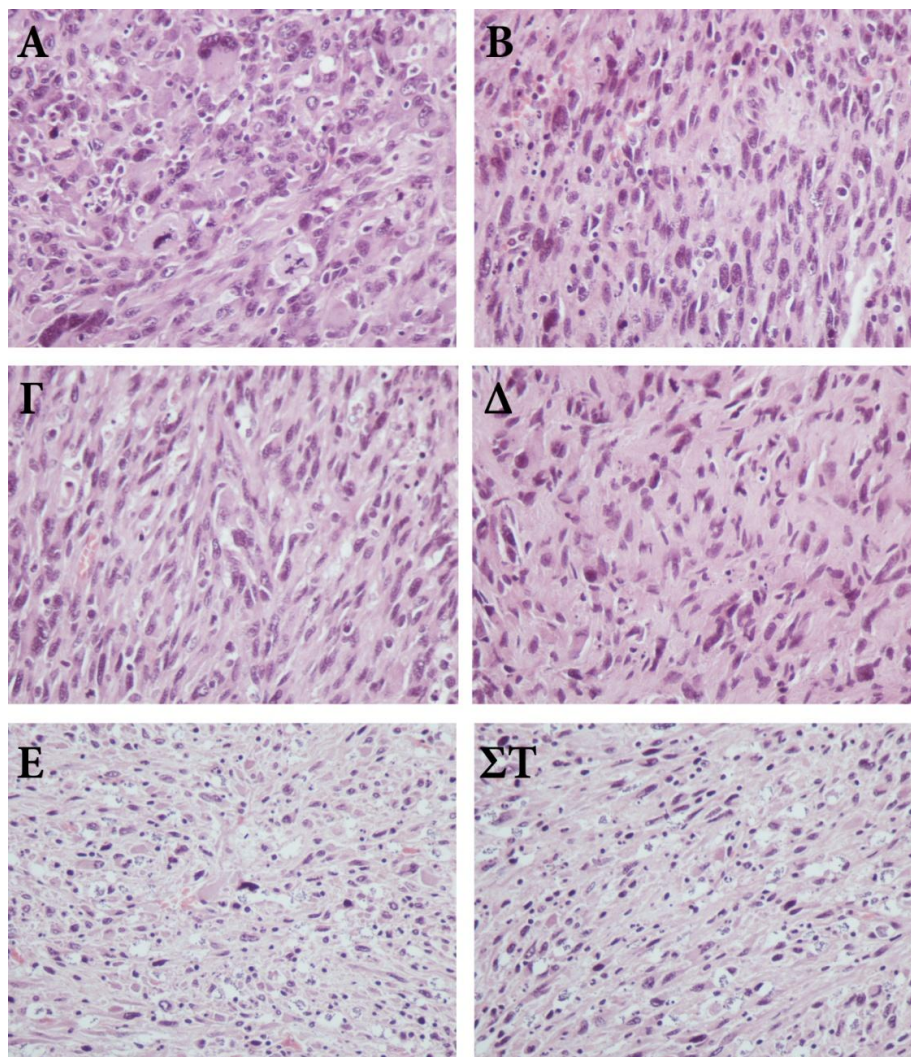
Το Γράφημα 4 παρουσιάζει την καμπύλη επιβίωσης όλων των πειραματόζων των ομάδων Control, SE, WN, SC και EMF-SC. Φαίνεται καθαρά η διαφορά στο ποσοστό επιβίωσης των πειραματοζών μεταξύ όλων των ομάδων.

Όπως και προηγουμένως έτσι και εδώ στα πειραματόζωα των ομάδων SC και EMF-SC τα οποία έχουν επιβιώσει, λήφθηκε νεκρωτικό υλικό, πριν την πλήρη τήξη του όγκου, και ελέγχθηκε για την παρουσία ενεργών/φυσιολογικών LMS κυττάρων. Διαπιστώθηκε ότι σε κανένα από τα πειραματόζωα που επιβίωσαν δεν βρέθηκαν βιώσιμα LMS, ικανά να πολλαπλασιαστούν.

Επίσης, πρέπει να αναφερθεί ότι τα πειραματόζωα των ομάδων SE και WN δεν εμφάνισαν καμία σημαντική διαφορά σε σύγκριση με αυτά της ομάδας control. Αυτό έχει δύο σημαντικά σημεία που πρέπει να τονιστούν. Το ότι τα πειραματόζωα της ομάδας της εικονικής έκθεσης (SE) δεν παρουσιάζουν διαφορές σε σχέση με αυτά της ομάδας control, σημαίνει ότι τα πειραματόζωα δεν επηρεάζονται από τη συνολική πειραματική διάταξη/διαδικασία. Δεύτερον, τα πειραματόζωα της ομάδας WN, τα οποία εκτέθηκαν σε λευκό θόρυβο, δεν παρουσίασαν καμία αξιολογη μεταβολή σε όλες τις *in vivo* πειραματικές διαδικασίες, σε σχέση με τα πειραματόζωα της ομάδας control. Επομένως, τα αξιόλογα αποτελέσματα που παρουσίασαν τα πειραματόζωα των ομάδων EMF-Dox και EMF-SC, οφείλονται αποκλειστικά στα ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της δοξορουβικίνης και του συμπλόκου αργύρου, αντίστοιχα.

#### **4.7. Ιστοπαθολογικός έλεγχος οργάνων-όγκων**

Στην ενότητα αυτή προσδιορίστηκε ο βαθμός διεισδυτικότητας των όγκων σε όλους τους επίμυες Wistar, καθώς επίσης εξετάστηκαν όλοι οι επίμυες για πιθανές ιστολογικές ανωμαλίες. Κανένα πειραματόζωο δεν παρουσίασε ιστολογικές αλλοιώσεις στα όργανα και μεταστάσεις. Παρακάτω παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες των όγκων και οργάνων του συνόλου των πειραματοζώων.

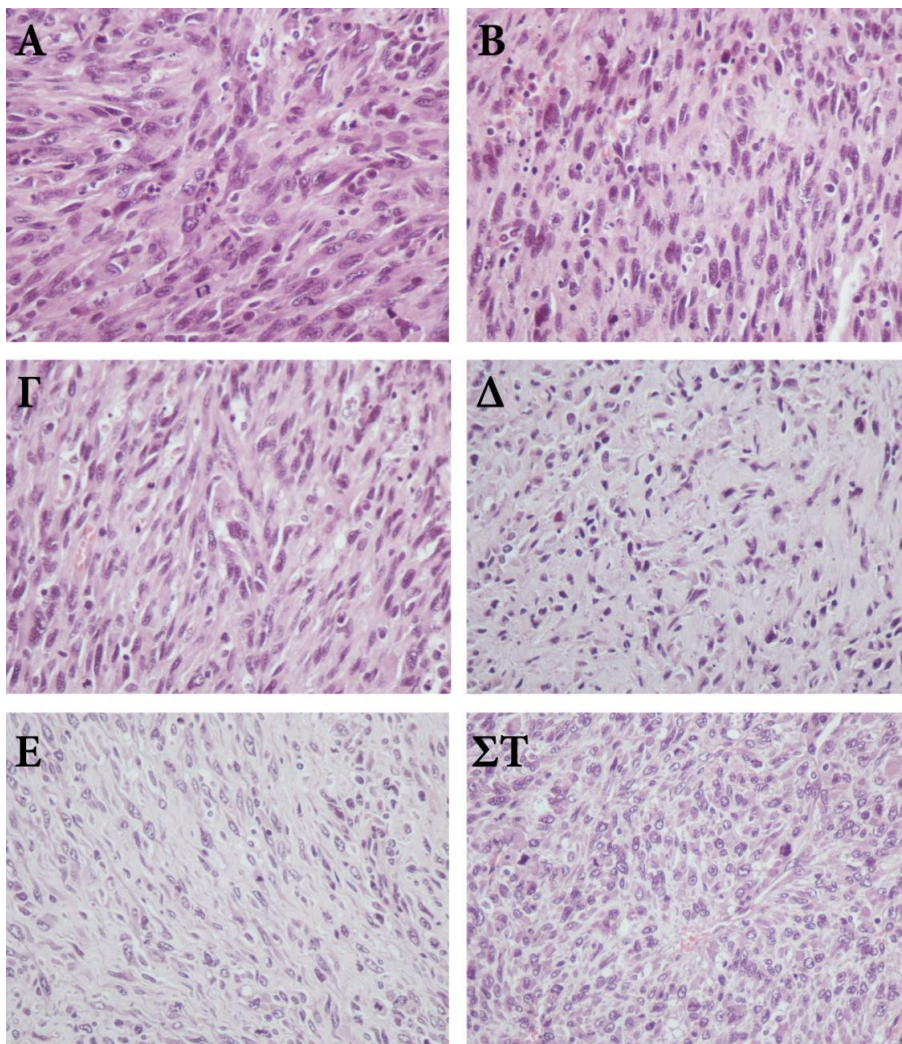


Εικόνα 46. Αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες όγκων από όλες τις πειραματικές ομάδες. Χρώση: Haematoxylin-eosin. (Α): Ομάδα Control, (Β): Ομάδα WN (λευκός θόρυβος), (Γ): Ομάδα SE (εικονική έκθεση), (Δ): Ομάδα Dox (2mg/kg) και (Ε), (ΣΤ): Ομάδα EMF-Dox. Μεγέθυνση: Α-ΣΤ 400X.

Στην παραπάνω εικόνα, παρουσιάζονται μικροσκοπικές εικόνες όγκων, κατόπιν ιστοπαθολογικού ελέγχου και χρώσης με H&E, από τις ομάδες control, WN, SE, Dox και EMF-Dox. Ο όγκος της ομάδας control παρουσιάζουν ήπιες τάσεις απόπτωσης (Α), ενώ την ίδια εικόνα παρουσιάζουν και οι όγκοι των ομάδων WN (Β) και SE (Γ). Δεν βρέθηκε δηλαδή καμία διαφορά στο σύνολο των πειραματοζώων αυτών των τριών ομάδων, υποδεικνύοντας ακόμη μια φορά, ότι ούτε ο λευκός θόρυβος ούτε και η εικονική έκθεση προκαλούν κάποια επίπτωση στους όγκους των πειραματοζώων. Αντίθετα, οι όγκοι της ομάδας των

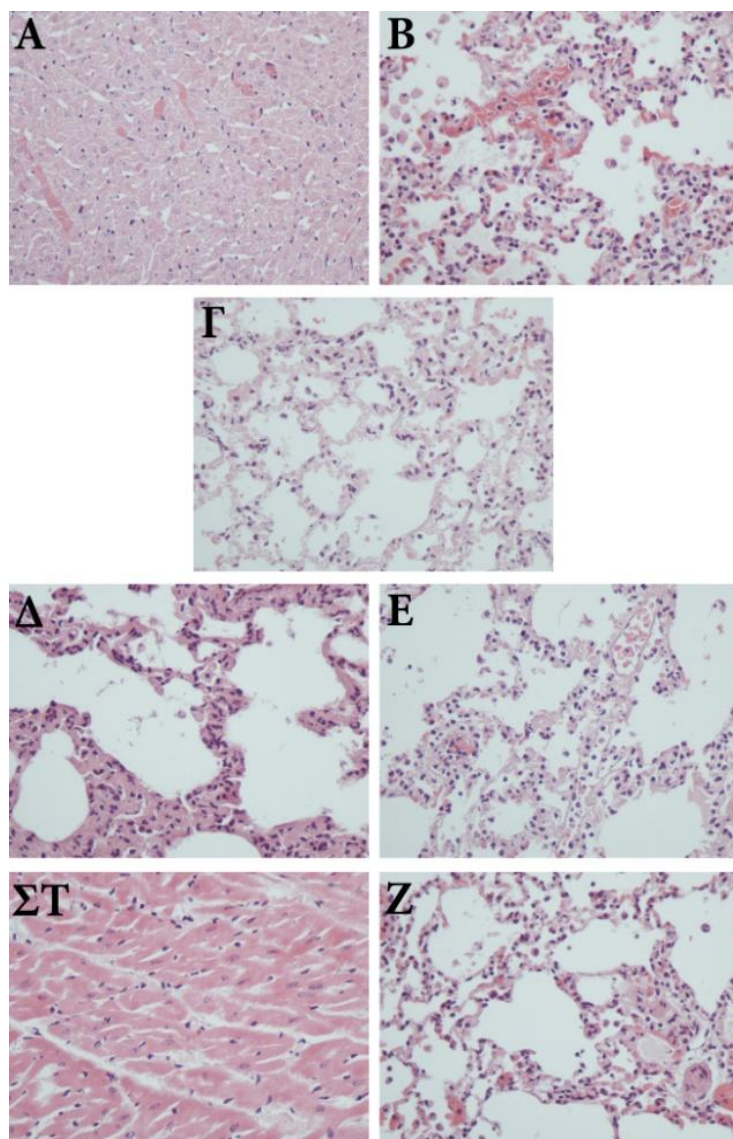


πειραματοζώων που έλαβαν Dox ( $\Delta$ ) παρουσίασαν ίωση και μικρή κυτταροβρίθεια. Επίσης οι όγκοι παρουσίασαν, αυξημένη απόπτωση σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός, ότι οι όγκοι στην ομάδα EMF-Dox (E,  $\Sigma\Gamma$ ), είχαν πολύ μικρότερο ποσοστό ίωσης τόσο ως προς τις ομάδες control, WN και SE, αλλά και ως προς την ομάδα Dox. Επίσης, η απόπτωση στην ομάδα EMF-Dox (αλλά και νέκρωση) ήταν έντονα αυξημένη και σε ορισμένα πειραματόζωα μεγαλύτερη και σε σύγκριση με την ομάδα Dox.



Εικόνα 47. Αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες όγκων από όλες τις πειραματικές ομάδες. Χρώση: Haematoxylin-eosin. (A): Ομάδα Control, (B): Ομάδα WN (λευκός θόρυβος), (Γ): Ομάδα SE (εικονική έκθεση), ( $\Delta$ ): Ομάδα SC (6mg/kg) και (E), ( $\Sigma\Gamma$ ): Ομάδα EMF-SC. Μεγέθυνση: A- $\Sigma\Gamma$  400X.

Στην Εικόνα 47, παρουσιάζονται μικροσκοπικές εικόνες όγκων από τις ομάδες control, WN, SE, SC και EMF-SC. Ο όγκοι της ομάδας control (Α) παρουσιάζουν τάσεις απόπτωσης σε περιορισμένο βαθμό, ενώ το ίδιο μοτίβο ακολουθούν και οι όγκοι των ομάδων WN (Β) και SE (Γ). Οι όγκοι της ομάδας SC (Δ) παρουσιάζουν μεγαλύτερη ίνωση, οίδημα και ελαττωμένη κυτταροβρίθεια, ενώ παράλληλα εμφάνισαν αυξημένη απόπτωση και μικρότερο αριθμό μιτώσεων σε σχέση με την ομάδα control. Η ομάδα πειραματοζώων που εκτέθηκε στο ηλεκτρομαγνητικό κύμα συχνοτήτων συντονισμού του συμπλόκου αργύρου (EMF-SC) (Ε, ΣΤ), παρουσίασε επίσης ελάχιστη ίνωση, οίδημα και ελαττωμένη κυτταροβρίθεια, με ταυτόχρονα υψηλά επίπεδα απόπτωσης.

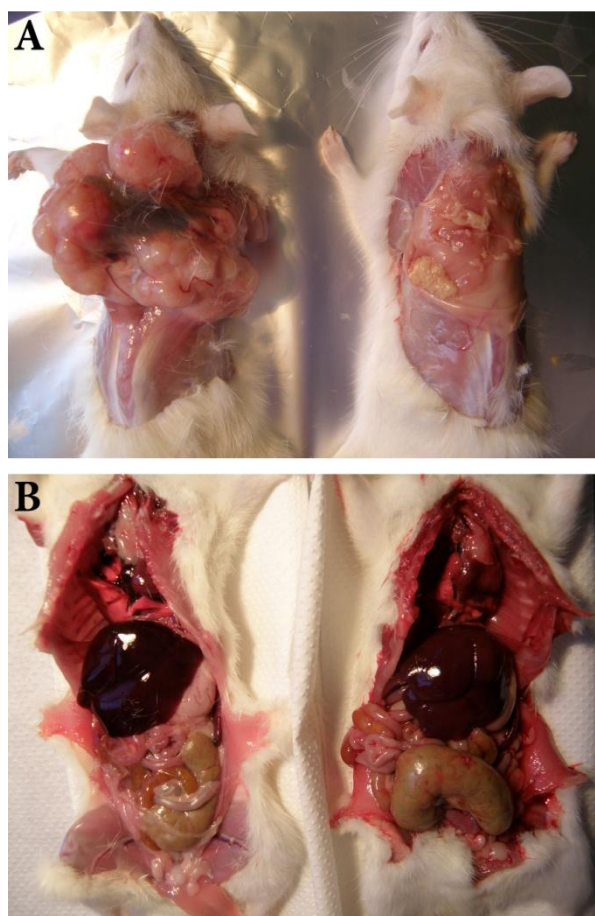


Εικόνα 48. Αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες οργάνων από όλες τις πειραματικές ομάδες. Χρώση: Haematoxylin-eosin. (A): Ομάδα Control - καρδιά, (B): Ομάδα WN (λευκός θόρυβος) - πνεύμονας, (Γ): Ομάδα SE (εικονική έκθεση) - πνεύμονας, (Δ): Ομάδα Dox (2mg/kg) - πνεύμονας, (E): Ομάδα EMF-Dox - πνεύμονας, (ΣΤ): Ομάδα SC - καρδιά, και (Z): Ομάδα EMF-SC - πνεύμονας. Μεγέθυνση: A-Z 400X.

Στην Εικόνα 48, παρουσιάζονται μικροσκοπικές εικόνες οργάνων από όλες τις ομάδες του πειράματος. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, κανένα πειραματόζωο δεν εμφάνισε έντονες ιστολογικές αλλοιώσεις, ενώ κάποια δεν εμφάνισαν καθόλου αλλοιώσεις.

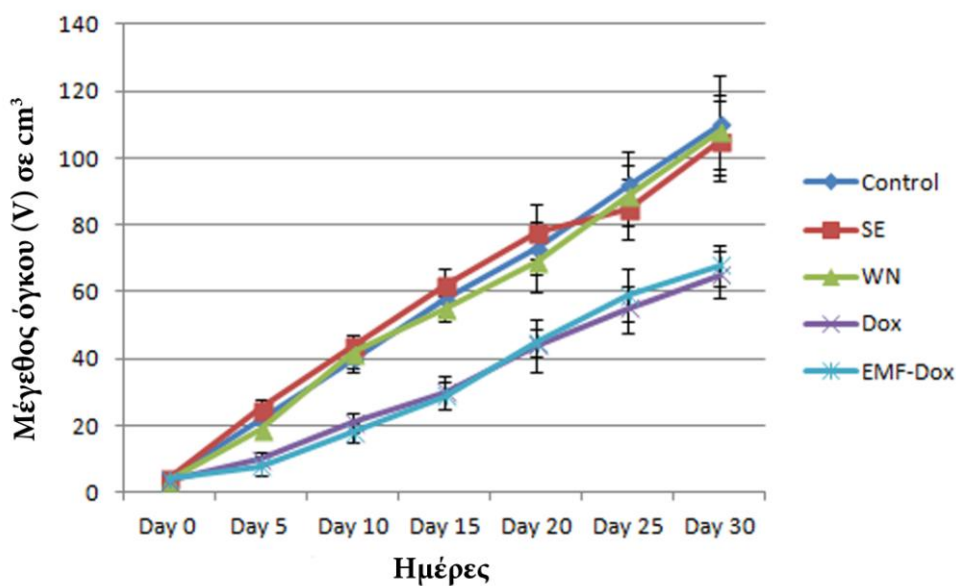


Παρακάτω ακολουθεί μια αντιπροσωπευτική εικόνα από δύο επίμυες που ανήκουν στην ομάδα control (αριστερός επίμυς) και στην ομάδα EMF-Dox (δεξιός επίμυς). Τα πειραματόζωα αυτά θανατώθηκαν την 30η ημέρα του πειράματος σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε κατά τη δεύτερη φάση των ενοφθαλμισμών. Φαίνεται καθαρά η διαφορά στην ανάπτυξη του όγκου, όπου ο επίμυς της ομάδας control έχει κανονική ανάπτυξη του όγκου, ενώ ο επίμυς της ομάδας EMF-Dox δεν έχει πλέον όγκο (πιθανόν κάποιες αλλοιώσεις στην περιοχή-ίνωση) (A). Στο δεύτερο μέρος της Εικόνας 49 (B) παρουσιάζεται η εκτομή των πειραματοζώων. Εκ πρώτης όψεως, παρατηρούμε ότι τα εσωτερικά όργανα και των δύο επιμύων δεν εμφανίζουν κάποια ιστολογική αλλοίωση ή κάποια μετάσταση. Αυτό βέβαια επιβεβαιώνεται και μέσω του λεπτομερούς ιστοπαθολογικού ελέγχου (Εικόνα 48).



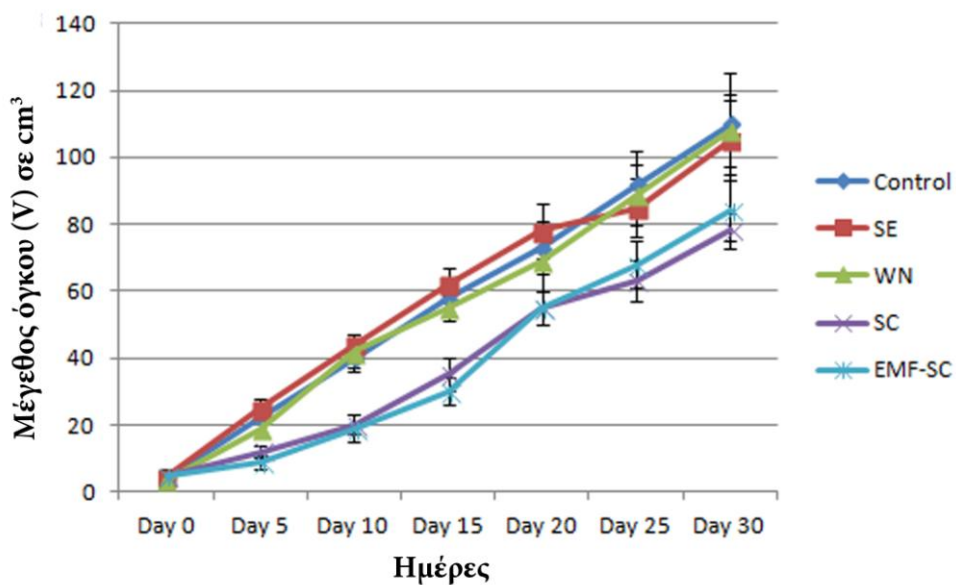
Εικόνα 49. Νεκροψία επιμύων Wistar. (A) Ραχιαία εκτομή, (B) Κοιλιακή εκτομή. Αριστερός επίμυς: ομάδα control, Δεξιός επίμυς: ομάδα EMF-Dox.

#### 4.8. Υπολογισμός μεγέθους όγκου με calliper



Γράφημα 5. Μέτρηση μεγέθους όγκου ανά 5 ημέρες στις ομάδες Control, SE, WN, Dox και EMF-DOx.

Παρατηρούμε ότι το μέγεθος του όγκου σε  $\text{cm}^3$  αυξάνεται ταχύτατα στις ομάδες control, SE και WN, ενώ παρατηρείται μικρότερος ρυθμός αύξησης στις ομάδες Dox και EMF-Dox.



Γράφημα 6. Μέτρηση μεγέθους όγκου ανά 5 ημέρες στις ομάδες Control, SE, WN, Dox και EMF-DOX.

Παραπλήσιο μοτίβο ανάπτυξης όγκου ακολουθείται και για τις ομάδες SC και EMF-SC, όπως φαίνεται στο Γράφημα 6.

#### **4.9. Ανάλυση απόπτωσης δειγμάτων όγκου μέσω κυτταρομετρίας ροής**

Σε αυτή την ενότητα δεν υπάρχει ξεκάθαρη εικόνα των αποτελεσμάτων για διάφορους λόγους που θα πρέπει να επισημανθούν.

Σε αυτό το πειραματικό πρωτόκολλο, το ιδανικότερο θα ήταν να γίνεται η μέτρηση της κυτταρομετρίας ροής του απομονωθέντος κυτταρικού πληθυσμού άμεσα, από τα δείγματα των όγκων που προέκυψαν, μέσω της βιοψίας λεπτής βελόνης. Αυτό όμως ήταν πρακτικά αδύνατον, λόγω του μεγάλου αριθμού των ζώων ανά ομάδα που θανατώνονταν ανά δέκα ημέρες, στην β' φάση των αντικαρκινικών μελετών. Έτσι, τα δείγματα από όλα τα πειραματόζωα, επιλέχθηκε να καταψυχθούν υπό κατάλληλες συνθήκες, ώστε να μετρηθούν αργότερα. Κατά την απόψυξή τους όμως παρατηρήσαμε ότι πολλά από τα κύτταρα του όγκου είχαν καταστραφεί.

Επιπλέον ορισμένα εκ των πειραματοζώων απεβίωσαν τις βραδινές ή τις πρώτες πρωινές ώρες, προτού την προκαθορισμένη ημερομηνία θανάτωσής τους, και έτσι τα κύτταρα του όγκου που ελήφθησαν, όταν πραγματοποιήθηκε η νεκροψία δεν ήταν λειτουργικά.

Όσα όμως εκ των δειγμάτων βρίσκονταν σε καλή κατάσταση, υποβλήθηκαν σε μετρήσεις, με συνέπεια να παρατηρήσουμε ότι στις ομάδες WN και SE, δεν υπήρχαν διαφορές με την ομάδα control, ενώ σημαντικές διαφορές στο ποσοστό της απόπτωσης (αύξηση) παρατηρήθηκαν στις ομάδες Dox, EMF-Dox, SC και EMF-SC σε σύγκριση με τις προηγούμενες τρεις ομάδες. Αυτός ο μικρός αριθμός δειγμάτων που μετρήθηκε, παρουσίασε μία ενδεικτική εικόνα, συναφή με τα ιστοπαθολογικά ευρήματα, τα οποία ήταν η αύξηση της απόπτωσης και εν μέρει τη νέκρωσης, στις προαναφερθείσες ομάδες. Κυτταρογραφήματα δεν παρατίθενται λόγω μη επάρκειας των αποτελεσμάτων.



## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με την χρήση τεράστιου αριθμού ηλεκτρικών συσκευών και την κινητή τηλεφωνία να έχει εισαχθεί για τα καλά στην ζωή μας, το φαινόμενο του ηλεκτρομαγνητισμού δεν άργησε να θορυβήσει την επιστημονική κοινότητα για τις δυνητικές επιδράσεις του στον ανθρώπινο οργανισμό. Η ανησυχία αυτή όμως δεν είναι νέα, αλλά έχει προκύψει από το 1970, όταν πρώτοι οι Wertheimer και Leeper, δημοσίευσαν μία μελέτη, που παρουσίασε συσχέτιση μεταξύ της οικιακής έκθεσης σε εξαιρετικά χαμηλής συχνότητας, ηλεκτρομαγνητικά πεδία (EMF) και του καρκίνου της παιδικής ηλικίας [Wertheimer N. and Leeper E., 1979]. Τα δεδομένα αυτά άνοιξαν τον ασκό του Αιόλου, με συνέπεια οι επιδράσεις των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων εξαιρετικά χαμηλών συχνοτήτων να αποτελούν έκτοτε ένα αμφιλεγόμενο θέμα, μιας και τα ευρήματα κάποιων μεταγενέστερων επιδημιολογικών μελετών, όχι όλων, συνάδουν με τα πρώτα ευρήματα συσχέτισης του παιδικού καρκίνου με την έκθεση στα EMF [Portier C. J. and Wolfe M. S., 1998]. Ωστόσο, πολλές από τις μελέτες βασίζονται σε μικρό αριθμό εκτιθέμενων περιπτώσεων, και παρά την εντατική πειραματική έρευνα, δεν κατέστη σαφής κανένας βιοφυσικός μηχανισμός για να εξηγήσει κάποια επίδραση.

Η διερεύνηση των επιδράσεων των EMF σε ένα βιολογικό σύστημα, επεκτάθηκε και στην μελέτη της συμπεριφοράς του καρκινικού κυττάρου, όταν εκτίθεται σε ένα ηλεκτρομαγνητικό πεδίο εξαιρετικά χαμηλών συχνοτήτων, σε τέτοιο βαθμό, ούτως ώστε σήμερα να έχουν προκύψει συμπεράσματα για την αντικαρκινική δράση ανάλογων πεδίων, σε *in vitro*, *in vivo* και σε επίπεδο κλινικών ερευνών [Tofani S. *et al.*, 2001; Yamaguchi S. *et al.*, 2006]. Έχει επίσης αναφερθεί ότι τα EMF δύνανται να δράσουν συνεργιστικά με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες [Gray J. R. *et al.*, 2000; Ruiz Gómez M. J. *et al.*, 1999] και να αντιστρέψουν την ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων, στην χημειοθεραπεία [Hirata M. *et al.*, 2001; Janigro D. *et al.*, 2006]. Ελπιδοφόρα είναι τα ευρήματα των μελετών του Barbault, του Ronchetto και των συνεργατών τους, σύμφωνα με τα οποία, η έκθεση καρκινοπαθών ασθενών σε EMF δεν παρουσιάζει ανεπιθύμητες ενέργειες ή τοξικότητα, [Barbault A. *et al.*, 2009; Ronchetto F. *et al.*, 2004] καθώς επίσης ότι παρατείνεται ο χρόνος επιβίωσης των ασθενών, αναστέλλοντας ταυτόχρονα και την εξέλιξη της νόσου [Barbault A. *et al.*, 2009; Kirson E. D. *et al.*, 2007].

Το εργαστήριο Φυσιολογίας έχει ασχοληθεί πολλά χρόνια με την μελέτη των επιπτώσεων της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας χαμηλών συχνοτήτων, σε διάφορες κυτταρικές σειρές καρκίνου, καθώς σε καρκινικά μοντέλα επιμύων Wistar, αποδίδοντας μεγάλο όγκο πειραματικών αποτελεσμάτων [Karkabounas S. *et al.*, 2006; Evangelou A. *et al.*, 2008]. Η κυτταροτοξικότητα έναντι του λειομυοσαρκωματικών κυττάρων που αποδόθηκε στην εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών αυτών πεδίων, έθεσαν τις βάσεις για τις μελέτες της παρούσας διατριβής, το ερευνητικό της αντικείμενο όμως στηρίχτηκε κατά μεγαλύτερο μέρος στην μελέτη του Verginadis και των συνεργατών του, [Verginadis I. I. *et al.*, 2012] καθώς και στην υπόθεση που διατυπώνεται σε αυτήν, αν δηλαδή θα μπορούσε η εκπομπή ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, σε συχνότητες, που προκύπτουν από το πρωτονιακό φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( $^1\text{H-NMR}$  spectrum) σημαντικών κυτταροτοξικών μορίων, να επιδράσει επί *in vitro* και *in vivo* βιολογικών συστημάτων, και επιπλέον να επιφέρει παρόμοια αποτελέσματα, με τα ίδια τα μόρια.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν δύο χημικές ενώσεις, η υδροχλωρική δοξορουβικίνη και ένα σύμπλοκο του αργύρου. Η υδροχλωρική δοξορουβικίνη χρησιμοποιούμενη ως πρώτη γραμμής αντικαρκινικό φάρμακο, για την αντιμετώπιση λευχαιμιών, του λεμφώματος Hodgkin, καθώς και των καρκίνων της ουροδόχου κύστης, του μαστού, του στομάχου, του πνεύμονα, των ωοθηκών, του θυρεοειδούς, του πολλαπλού μυελώματος καθώς και του σαρκώματος των μαλακών ιστών [Arcamone F. *et al.*, 2000]. Το Εργαστήριο Φυσιολογίας έχει απομονώσει τόσο μία κυτταρική σειρά λειομυοσαρκώματος (LMS), όσο και αναπτύξει ένα ορθοτοπικό μοντέλο ανάπτυξης όγκου σε επίμυες, βασιζόμενο στον ενοφθαλμισμό αυτών των κυττάρων. Το λειομυοσάρκωμα αποτελεί σάρκωμα μαλακών μορίων, έτσι η δοξορουβικίνη κατέστη πρώτη επιλογή ως χημική ένωση ελέγχου, στις αντικαρκινικές μελέτες. Η δεύτερη ένωση που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα σύμπλοκο του αργύρου,  $\text{Ag(I)}$ , το  $[\text{Ag}(\text{trp})_2(\text{pmtH})\text{Cl}]$  με υποκαταστάτες, την τριφαινυλοφωσφίνη και την 2-μερκαπτοπυριμιδίνη, το οποίο παρουσιάζει αξιόλογη δράση έναντι των LMS κυττάρων, επιφέροντας αποπτωτικό θάνατο κατά 21.36%, σε συγκέντρωση 0.7 $\mu\text{M}$ , ενώ κατά 32.62%, σε συγκέντρωση 1.2 $\mu\text{M}$ , σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, αποκαλύπτοντας έτσι δόσοεξαρτώμενη αποπτωτική δράση [Velalopoulou A. *et al.*, 2012]. Συγκριτικά, η δοξορουβικίνη επέδειξε 26.61%, στην συγκέντρωση 0.7 $\mu\text{M}$  ενώ στην συγκέντρωση 1.0 $\mu\text{M}$ , το ποσοστό αποπτωτικού

θανάτου ανήλθε στο 28.92%. Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου των LMS, στην S φάση, δηλαδή στην φάση αντιγραφής του γενετικού υλικού (σύνθεσης του DNA), ήταν ένα φαινόμενο, το οποίο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της δοξορουβικίνης αλλά και του συμπλόκου του αργύρου. Φαίνεται ξεκάθαρα ότι σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του συμπλόκου αργύρου έχουμε σημαντική αύξηση του ποσοστού των κυττάρων, των οποίων ο κυτταρικός κύκλος αναστέλλεται στην S-φάση ( $p < 0.05$ ), κατά  $27.08 \pm 0.89$ , στη συγκέντρωση  $1.2 \mu\text{M}$  σε σχέση με  $19.17 \pm 2.79$  στη συγκέντρωση  $0.7 \mu\text{M}$ , όπως και στην υδροχλωρική δοξορουβικίνη, όπου στη συγκέντρωση  $1 \mu\text{M}$ , το αντίστοιχο ποσοστό ανέρχεται  $35.04 \pm 1.96$ , σε σχέση με την συγκέντρωση  $0.7 \mu\text{M}$ , όπου εκτιμάται ποσοστό κυττάρων  $25.02 \pm 2.03$ .

Η κυτταροτοξικότητα που επιδεικνύεται από το νέο αυτό σύμπλοκο του αργύρου συμπληρώνει το προφίλ των συμπλόκων αργύρου, τα οποία εκτός από τις πασίγνωστες αντιμικροβιακές και αντιεγκυματικές τους ιδιότητες, [Kyros L. *et al.*, 2010], μελετώνται πλέον για την αντικαρκινική και την αποπτωτική τους δράση [Banti N. C. *et al.*, 2012; Banti N. C. and Hadjikakou K. Sotiris, 2013]. Οι γνώσεις μας όμως σχετικά με την τοξικότητα αυτών των συμπλόκων και την αντικαρκινική τους δράση τους *in vivo* περιορίζονται σημαντικά λόγω της έλλειψης βιβλιογραφικών δεδομένων. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, το  $[\text{Ag}(\text{trp})_2(\text{pmtH})\text{Cl}]$  χορηγήθηκε σε επίμυες Wistar, ακολουθώντας ένα σχήμα μελέτης οξείας και ένα σχήμα μελέτης χρόνιας τοξικότητας. Όσον αφορά στην πρώτη μελέτη, χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκώς, σε υγιείς επίμυες Wistar, σε λογαριθμικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις 0.8, 8 και 80 mg/kg σωματικού βάρους επηρεάζοντας σε μικρό βαθμό τον πνεύμονα και το ήπαρ, αλλά αφήνοντας ανεπηρέαστα τα υπόλοιπα όργανα. Το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας παρατηρήθηκε στην δόση 80 mg/kg, όπου ανήλθε στο 70% των πειραματοζώων, με αποτέλεσμα να προκύπτει η  $\text{LD}_{50}$ , η δόση που συνεπάγεται το θάνατο του 50% των πειραματοζώων, ίση περίπου με 55mg/kg ΣΒ, όταν της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης, κατόπιν ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης, είναι 12.51 mg/kg, επιφέροντας ήπιες αλλοιώσεις έως και εκτεταμένες βλάβες σε όργανα όπως ήπαρ, σπλήνας, καρδιά και νεφροί. Το σχήμα της χρόνιας τοξικότητας συμπεριέλαβε τις δόσεις 3mg/kg και 6mg/kg. Στην πρώτη δόση παρουσιάστηκαν ελάχιστες ιστολογικές αλλοιώσεις μόνο στον πνεύμονα, ενώ στη δεύτερη στο ήπαρ, στο νεφρό και στο πνεύμονα.

Ακολούθησαν οι αντικαρκινικές μελέτες στους επίμυες Wistar, με τα πορίσματα των οποίων ολοκληρώνεται το τόξο πειραμάτων των δύο χημικών ενώσεων, οι δράσεις των οποίων θα συγκριθούν με την δράση των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού τους (όπως προκύπτουν από το  $^1\text{H-NMR}$  φάσμα τους).

Οι αντικαρκινικές μελέτες της δοξορουβικίνης και του συμπλόκου αργύρου, περιέλαβαν το θεραπευτικό σχήμα χορήγησης μίας δόσης ανά πενθήμερο, για 30 ημέρες, σε δύο ομάδες πειραματοζώων, η μία εκ των οποίων θα λάμβανε δοξορουβικίνη (ομάδα DOX) και η άλλη, το σύμπλοκο του αργύρου (ομάδα SC). Στην ομάδα Dox, παρατηρείται πως το 60% των πειραματοζώων της ομάδας παρουσίασαν πλήρη υποχώρηση του όγκου, θεραπεύτηκαν πλήρως και ζουν μέχρι και σήμερα, ενώ το υπόλοιπο 40% παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση στους δείκτες, MTW, MTGR και SGR ( $p < 0.05$ ). Για την ομάδα SC, το αντίστοιχο ποσοστό πλήρους απομάκρυνσης του όγκου αντιστοιχεί στο 50% των πειραματοζώων.

Εκ παραλλήλου με τις *in vitro* και τις *in vivo* μελέτες του  $[\text{Ag}(\text{trp})_2(\text{pmtH})\text{Cl}]$  και της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα οι ίδιες *in vitro* και *in vivo* δοκιμασίες κατόπιν εκπομπής των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και του συμπλόκου αργύρου, στα LMS κύτταρα.

Για τις ανάγκες αυτής της έκθεσης, κατασκευάστηκε μία όσο το δυνατόν απλουστευμένη, διάταξη εκπομπής EMF, *in vitro* και *in vivo*, για την εξασφάλιση της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων που θα προέκυπταν, από άλλες ερευνητικές ομάδες, ελέγχοντας όμως παράγοντες, που επηρεάζουν την έκθεση του βιολογικού συστήματος, όπως οι χρησιμοποιούμενες συχνότητες, η διάρκεια και το πρωτόκολλο της έκθεσης (συνεχής ή διακοπτόμενη), το σχήμα του ηλεκτρομαγνητικού κύματος (παλμικά ή ημιτονοειδή κύματα) καθώς και την ένταση του μαγνητικού πεδίου.

Τα πορίσματα της *in vitro* εκπομπής των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, δεν καθιστούν εμφανή καμία μεταβολή, στον πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων, ούτε ακολούθως η κυτταρομετρία ροής παρουσίασε κάποιο ποσοστό αποπτωτικού θανάτου ή αναστολή του κυτταρικού κύκλου.

Η έλλειψη κυτταροτοξικής επίδρασης των EMF *in vitro* δεν συνοδεύεται από ανάλογα αποτελέσματα στις *in vivo* μελέτες. Και εδώ συμβαίνει το παράδοξο. Ενώ θα περίμενε κανείς



μειωμένη θεραπευτική αποτελεσματικότητα των EMF στους επίμυες που έφεραν όγκο, απεναντίας, παρατηρούνται μεγάλα ποσοστά επιβίωσης των επιμύων, συνοδευόμενα από στατιστικά σημαντική μείωση στους δείκτες, MTW, MTGR και SGR ( $p < 0.05$ ).

Αναλυτικότερα, το πρωτόκολλο έκθεσης των επιμύων που έφεραν όγκο, αντιστοιχούσε σε τετράωρη ημερήσια έκθεση στα ηλεκτρομαγνητικά πεδία συχνοτήτων συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης (ομάδα EMF-Dox) και του συμπλόκου αργύρου (ομάδα EMF-SC), για 30 συνεχείς ημέρες. Η έκθεση αυτή οδήγησε το 80% των επιμύων της EMF-Dox, σε πλήρη ίαση, μέχρι σήμερα, σε σχέση με το 60% της ομάδας Dox. Αντιστοίχως, το 70% των επιμύων της EMF-SC ανέκαμψε πλήρως, σε σύγκριση με το 50% της ομάδας SC. Αξίζει επίσης να σημειωθεί, ότι τα ποσοστά επιβίωσης των πειραματοζώων των ομάδων εικονικής έκθεσης (SE) και της εκπομπής λευκού θορύβου (WN), δεν διέφεραν σημαντικά, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control), αποδεικνύοντας την ειδική δράση των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού των δύο χημικών ενώσεων. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζουν συνάφεια με τα αποτελέσματα της μελέτης του Verginadis και των συνεργατών του, βάσει των δεδομένων της οποίας, η εκπομπή ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού της μορφίνης, επιφέρει αναλγησία σε υγιείς επίμυες Wistar, σε παραπλήσιο βαθμό με εκείνη της μορφίνης [Verginadis I.I. *et al.*, 2012].

Ο ιστοπαθολογικός έλεγχος των όγκων αποκαλύπτει ήπια φαινόμενα απόπτωσης στην ομάδα ελέγχου όπως επίσης και στις ομάδες WN και SE, ενώ η συνολική εικόνα των τριών αυτών ομάδων δε διέφερε σημαντικά, γεγονός που μας βοηθά να καταλήξουμε στο συμπέρασμα πως ο λευκός θόρυβος και η εικονική έκθεση δεν δύνανται να επιφέρουν κανένα βιολογικό αποτέλεσμα, στους όγκους των πειραματοζώων. Στην ομάδα της Dox, η εικόνα του όγκου περιλαμβάνει ίωση και μικρή κυτταροβρίθεια, ενώ παρουσιάζεται αυξημένη απόπτωση, σε σχέση με την ομάδα SE, και του WN. Οι όγκοι της ομάδας EMF-Dox εμφανίζουν μικρότερο ποσοστό ίωσης, τόσο ως προς τις ομάδες control, WN και SE, αλλά και ως προς την ομάδα Dox αλλά εντονότερα φαινόμενα απόπτωσης (συνοδευόμενα από νέκρωση) σε σύγκριση με την ομάδα Dox. Ίωση, οίδημα και ελαττωμένη κυτταροβρίθεια συναντώνται και στους όγκους της ομάδας SC, ενώ διακρίνεται εικόνα απόπτωσης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ η ομάδα EMF-SC, παρουσιάζοντας ελάχιστη ίωση, οίδημα και

ελαττωμένη κυτταροβρίθεια, με ταυτόχρονα υψηλά επίπεδα απόπτωσης, συμπληρώνει το ιστοπαθολογικό προφίλ των όγκων των επιμύων.

Ακριβής και κοινά αποδεκτός μηχανισμός δράσης μέσω του οποίου να επιδρούν τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα επί των βιολογικών συστημάτων δεν υπάρχει έως τώρα. Τα μεγάλα ποσοστά επιβίωσης των επιμύων και της τήξης των όγκων εξηγούνται βάσει των ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών τους, τα οποία συνθέτουν μία γενικότερη εικόνα απόπτωσης, μεγαλύτερου βαθμού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, του λευκού θορύβου, της εικονικής έκθεσης, ακόμα και αυτών, της δοξορουβικίνης και του συμπλόκου του αργύρου. Το δυσκολότερο μέρος της προσπάθειας αποσαφήνισης ενός μηχανισμού δράσης, σχετικά με αντινεοπλασματική ιδιότητα των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού είναι η σύνδεση της παρεχόμενης ενέργειας από τα EMF στο κυτταρικό σύστημα και της πρωταρχικής απόκρισης των καρκινικών κυττάρων, με τις οδούς μεταγωγής σήματος που επιφέρει τον κυτταρικό θάνατο. Έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες αλληλεπίδρασης μεταξύ των μαγνητικών πεδίων και των ιόντων  $Ca^{2+}$ , από την σκοπιά της φυσικής, όπως το μοντέλο παραμετρικού συντονισμού ιόντων (ion parametric resonance model), που προτάθηκε από τον Lednev [Lednev V. V., 1991], καθώς και το μοντέλο παρεμβολής ιόντων (ion interference model), από τον Binhi [Binhi V. N., 1997], αλλά κανένα δεν καλύπτει το κενό της γνώσης σχετικά με την περιοχή φυσικοχημικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των μαγνητικών πεδίων και του κυττάρου.

Η έλλειψη κυτταροτοξικής επίδρασης των EMF *in vitro*, η οποία αντιφάσκει με την ισχυρή αποπτωτική δράση που εμφάνισαν *in vivo*, μπορεί εν μέρει να αποδοθεί στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων, στις συνθήκες της κυτταροκαλλιέργειας. Καλύπτονται από μία ποσότητα υγρού θρεπτικού υλικού, μέσω του οποίου προσλαμβάνουν θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους, όπως αμινοξέα, άλατα, γλυκόζη και βιταμίνες. Πρόκειται δηλαδή για ένα ιοντικό διάλυμα με υψηλή αγωγιμότητα  $\sim 0.015 \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$  [Siddiquei R.H. *et al.*, 2010]. Οι μαγνητικές γραμμές ενός μαγνητικού πεδίου πολύ χαμηλών συχνοτήτων δεν επηρεάζονται από την παρουσία βιολογικού υλικού, όπως ένα εναιώρημα ή η μονοστιβάδα των καλλιεργημένων κυττάρων, σε ένα υγρό μέσο καλλιέργειας. Το ομογενές μαγνητικό πεδίο όμως, το οποίο είναι ομοιόμορφο στο σύνολο του όγκου που καταλαμβάνει το υγρό, επάγει ένα ηλεκτρικό πεδίο μέσα στο υγρό θρεπτικό μέσο που είναι εξαιρετικά

ανομοιόμορφο [Bassen H. *et al.*, 1992]. Σε ένα τέτοιο περιβάλλον, όπου η συμπεριφορά του πολυσύνθετου θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας υπό την επίδραση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, είναι άγνωστη, τα αποτελέσματα των επιδράσεων δύνανται να ποικίλλουν κατά πολύ, με αποτέλεσμα την μεγάλη διασπορά των αποτελεσμάτων της βιβλιογραφίας, όσον αφορά στις *in vitro* μελέτες των αλληλεπιδράσεων των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων με την βιολογική ύλη. Σε αντίθεση με το κύτταρο, στο «στείρο» περιβάλλον του καλλιεργητικού υλικού, ο επίμυς εκτός του ότι έρχεται σε άμεση επαφή με το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο, στο οποίο εκτίθεται, χωρίς να παρεμβάλλεται αγώγιμο μέσο, αποτελεί επίσης ένα σύνολο καλά οργανωμένων συστημάτων, με συμπεριφορά υπό την επίδραση ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, ανάλογης αυτής του ανθρώπινου σώματος, άρα και πιο προσεγγίσιμης από βιολογικής και ερευνητικής σκοπιάς.



## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, εξάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα.

- ☞ Το σύμπλοκο του αργύρου  $[Ag(tpp)_2(pmtH)Cl]$ , με υποκαταστάτες, την 2-μερκαπτοπυριμιδίνη και την τριφαινυλοφωσφίνη, καθώς και η υδροχλωρική δοξορουβικίνη παρουσιάζουν ισχυρή κυτταροτοξική δράση, έναντι των λειομυοσαρκωματικών (LMS) κυττάρων.
- ☞ Το σύμπλοκο του  $Ag(I)$  επάγει αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, στα λειομυοσαρκωματικά (LMS) κύτταρα, κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο, όπως και η υδροχλωρική δοξορουβικίνη.
- ☞ Το σύμπλοκο του  $Ag(I)$  αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο των λειομυοσαρκωματικών (LMS) κυττάρων, στην S φάση, κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο, όπως και η υδροχλωρική δοξορουβικίνη.
- ☞ Η *in vivo* χορήγηση του συμπλόκου του  $Ag(I)$ , στη μελέτη οξείας τοξικότητας (OT) προκάλεσε το θάνατο στο μεγαλύτερο ποσοστό των επιμύων, και επέφερε ιστολογικές αλλοιώσεις, μόνο στην υψηλότερη δόση, στον πνεύμονα και στο ήπαρ, αλλά δεν επηρέασε τα υπόλοιπα όργανα.
- ☞ Η *in vivo* χορήγηση του συμπλόκου του  $Ag(I)$ , στη μελέτη χρόνιας τοξικότητας (XT) δεν επέφερε κανένα θάνατο στους επίμυες και στην μεν χαμηλότερη δόση, επέφερε ελάχιστες ιστολογικές αλλοιώσεις στον πνεύμονα, ενώ στην υψηλότερη δόση, ελάχιστες έως ήπιες στο ήπαρ, στο νεφρό και στον πνεύμονα.
- ☞ Η *in vivo* χορήγηση υδροχλωρικής δοξορουβικίνης, στα πλαίσια της αντικαρκινικής μελέτης σε επίμυες Wistar, φέροντες όγκο, παρουσίασε ισχυρή αντικαρκινική δράση και στατιστικά σημαντική μείωση των αντικαρκινικών δεικτών (MTW, MTGR και SGR).
- ☞ Η ιστοπαθολογική μελέτη των όγκων μετά από την *in vivo* χορήγηση υδροχλωρικής δοξορουβικίνης, παρουσίασε αύξηση της απόπτωσης των κυττάρων των όγκων.
- ☞ Η *in vivo* χορήγηση του συμπλόκου  $Ag(I)$ , παρουσίασε ισχυρή αντικαρκινική δράση και στατιστικά σημαντική μείωση στους αντικαρκινικούς δείκτες (MTW, MTGR και

SGR), σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ σημειώθηκε παράταση του χρόνου επιβίωσης των πειραματοζώων.

- ☞ Η ιστοπαθολογική μελέτη των όγκων μετά από *in vivo* χορήγηση συμπλόκου Ag(I), παρουσίασε αύξηση του αποπτωτικού θανάτου των κυττάρων των όγκων, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.
- ☞ Η εκπομπή ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, συχνοτήτων συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και του συμπλόκου Ag(I), (συχνότητες προερχόμενες από το <sup>1</sup>H-NMR φάσμα των χημικών αυτών ενώσεων) δεν επιφέρει κυτταρικό θάνατο, στα λειομυοσαρκοματικά (LMS) κύτταρα, όπως επίσης και η εκπομπή λευκού θορύβου.
- ☞ Η εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, συχνοτήτων συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και του συμπλόκου Ag(I), (συχνότητες προερχόμενες από το <sup>1</sup>H-NMR φάσμα των χημικών αυτών ενώσεων) δεν παρουσιάζει τοξικότητα, σε υγιείς επίμυες Wistar, όπως επίσης και η εκπομπή λευκού θορύβου.
- ☞ Η *in vivo* εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, συχνοτήτων συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης, στα πλαίσια της αντικαρκινικής μελέτης σε επίμυες Wistar, παρουσίασε ισχυρότερη αντικαρκινική δράση, σε σχέση με αυτήν της δοξορουβικίνης και της ομάδας ελέγχου.
- ☞ Η ιστοπαθολογική μελέτη των όγκων μετά από την *in vivo* εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, συχνοτήτων συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης, παρουσίασε αυξημένο αποπτωτικό θάνατο και νέκρωση του όγκου, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα χορήγησης της δοξορουβικίνης.
- ☞ Η *in vivo* εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, συχνοτήτων συντονισμού, του συμπλόκου Ag(I), στα πλαίσια της αντικαρκινικής μελέτης σε επίμυες Wistar, παρουσίασε ισχυρότερη αντικαρκινική δράση, σε σχέση με αυτήν του συμπλόκου Ag(I).
- ☞ Η ιστοπαθολογική μελέτη των όγκων μετά από την *in vivo* εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, συχνοτήτων συντονισμού του συμπλόκου Ag(I), παρουσίασε αυξημένο αποπτωτικό θάνατο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα χορήγησης του συμπλόκου.
- ☞ Οι ομάδες των πειραματοζώων της εικονικής έκθεσης στα ηλεκτρομαγνητικά κύματα και της εκπομπής λευκού θορύβου δεν παρουσιάζουν καμιά διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες.

- Η εκπομπή ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού της δοξορουβικίνης και του συμπλόκου Ag(I), επιφέρει παραπλήσια ή και μεγαλύτερη αντικαρκινική δράση *in vivo*, σε σχέση με την χορήγηση των ίδιων χημικών ενώσεων. Αυτό ίσως να οφείλεται εν μέρει, στην απουσία τοξικολογικών επιδράσεων από την εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, σε σχέση με τις χημικές ενώσεις.
- Η υδροχλωρική δοξορουβικίνη είναι ισχυρότερη κυτταροτοξική ένωση από το σύμπλοκο του Ag(I). Αντιστοίχως, η εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού της πρώτης ένωσης έχει ισχυρότερη αντικαρκινική δράση σε σχέση με την εκπομπή των κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού της δεύτερης.





## 7. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

### 7.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

*«Μελέτη των επιδράσεων εκπομπής κυματομορφών συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και ενός συμπλόκου Ag(I) με οργανικούς υποκαταστάτες, σε in vivo μοντέλο λειομυοσαρκώματος»*

Οι επιδράσεις των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων σε ένα βιολογικό σύστημα έχουν οδηγήσει την έρευνα στην μελέτη της απόκρισης του καρκίνου, κατόπιν της *in vitro*, *in vivo* και κλινικού επιπέδου έκθεσής του, σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία χαμηλών συχνοτήτων (EMF), με συνέπεια την εξαγωγή πολύ ενθαρρυντικών συμπερασμάτων όσον αφορά στην αντικαρκινική τους δράση.

Στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκαν οι επιδράσεις εκπομπής ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της υδροχλωρικής δοξορουβικίνης και ενός συμπλόκου αργύρου Ag(I) με τριφαινυλοφωσφίνη και 2-μερκαπτοπυριμιδίνη, σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα λειομυοσαρκώματος. Οι συχνότητες συντονισμού προέρχονται από το <sup>1</sup>H-NMR φάσμα των δύο χημικών μορίων. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη των επιδράσεων της εκπομπής των EMF συχνοτήτων συντονισμού και των δύο χημικών ενώσεων, με αυτές των ίδιων των χημικών ενώσεων, σε όλες τις ακόλουθες πειραματικές διαδικασίες. Επίσης για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε εικονική έκθεση, και εκπομπή λευκού θορύβου. Η εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας έγινε μέσω της μεθόδου MTT (MTT assay) ενώ η εκτίμηση των ποσοστών απόπτωσης-νέκρωσης καθώς και της αναστολής του κυτταρικού κύκλου, έγινε μέσω της κυτταρομετρίας ροής. Για την διασφάλιση των αντικαρκινικών μελετών, προηγήθηκαν οι μελέτες τοξικότητας σε υγιείς επίμυες, και η ιστοπαθολογική ανάλυση των οργάνων, με χρώσεις αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Ακολούθησαν οι αντικαρκινικές μελέτες, κατά τις οποίες εκτιμήθηκαν οι μεταβολές των

όγκων των επιμύων, μέσω ειδικών δεικτών, οι ημέρες επιβίωσης, καθώς το ιστοπαθολογικό προφίλ.

Το σύμπλοκο του Ag(I) επάγει αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, στα λειομυοσαρκωματικά (LMS) κύτταρα, κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο, και αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο των LMS κυττάρων, στην S φάση, όπως και η υδροχλωρική δοξορουβικίνη ενώ η εκπομπή των EMF δεν επιφέρει κυτταρικό θάνατο, όπως επίσης και η εκπομπή λευκού θορύβου. Η υψηλότερη δόση του συμπλόκου Ag(I) προκάλεσε το θάνατο στο μεγαλύτερο ποσοστό των επιμύων, και επέφερε ιστολογικές αλλοιώσεις, στον πνεύμονα και στο ήπαρ, αλλά δεν επηρέασε τα υπόλοιπα όργανα, εν αντιθέσει με την εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, που δεν επηρέασαν κανένα σύστημα. Η εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού της δοξορουβικίνης, επέφερε πλήρη ίαση στο 80% των πειραματοζώων ενώ η δοξορουβικίνη στο 60%, με ταυτόχρονη πτώση των δεικτών μεταβολής των όγκων. Επίσης η εκπομπή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού του συμπλόκου Ag(I), επέφερε ίαση στο 70% των ζώων, ενώ το σύμπλοκο Ag(I), στο 50%. Η ιστοπαθολογική εικόνα παρουσίασε αυξημένη απόπτωση στους όγκους που υποβλήθηκαν στα EMF, σε σχέση με τα θεραπευτικά σχήματα χορήγησης της δοξορουβικίνης και του συμπλόκου του Ag(I). Οι ομάδες των πειραματοζώων της εικονικής έκθεσης στα ηλεκτρομαγνητικά κύματα και της εκπομπής λευκού θορύβου δεν παρουσίασαν καμία διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες.

Η εκπομπή ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συχνοτήτων συντονισμού της δοξορουβικίνης και του συμπλόκου Ag(I), επιφέρει καλύτερη *in vivo* αντικαρκινική δράση σε συνδυασμό με τα υψηλά ποσοστά επιβίωσης, σε σχέση με τις δύο κυτταροτοξικές ουσίες, ίσως λόγω της απουσίας τοξικολογικών επιδράσεων από την εκπομπή των EMF. Επίσης είναι αναγκαίο να διερευνηθεί ο μηχανισμός δράσης, ο οποίος να εξηγεί μεν, την έλλειψη κυτταροτοξικής δράσης των EMF *in vitro*, αλλά και την ισχυρή αποπτωτική τους επίδραση *in vivo*.

## 7.2 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ

*«Effects of emitted radio waveforms of frequencies, derived from the nuclear magnetic resonance spectrum of doxorubicin and a complex of Ag(I) with organic ligands, on an in vivo model of leiomyosarcoma»*

The effects of electromagnetic waves on a biological system have guided the research to investigate the cancer response as a result of *in vitro*, *in vivo* and at a clinical level exposure to electromagnetic fields at low frequencies (EMF), resulting in very encouraging findings regarding their antitumor activity.

In this PhD thesis, we investigated the effects of emitted electromagnetic waveforms of frequencies, derived from the nuclear magnetic resonance spectrum ( $^1\text{H-NMR}$ ) of both doxorubicin hydrochloride, as well as, a complex of Ag(I) with triphenylphosphine and 2-mercaptopyrimidine, *in vitro* and *in vivo* model of leiomyosarcoma.

Specifically, we have conducted a comparative study of the effects of emitted EMF resonant frequencies of both compounds, with that of the compounds themselves, in various experimental procedures. Also, as internal control groups, we used the sham exposure and exposure to white noise. The evaluation of the cytotoxicity was conducted via MTT assay, whilst the percentage of the apoptosis-necrosis, as well as the cell cycle analysis (cell cycle arrest), were determined by flow cytometry analysis. Toxicological studies on healthy Wistar rats were conducted prior the anticancer studies. Haemotoxylin-eosin stain used for histopathological analysis. Tumor weight changes, survival days and histopathological profile, were used as indexes, in order to evaluate the anticancer properties in all groups of animals.

The Ag(I) complex induces apoptosis on leiomyosarcoma (LMS) cells, in a dose-dependent manner, and causes cell cycle arrest at S-phase, as also doxorubicin hydrochloride do, while the emitted EMF or white noise do not cause any cell death. The higher concentration of Ag(I) used in toxicological studies, caused cell death in most of the animals and histological lesions on lungs and liver. In contrast, the emission of EMF of resonant frequencies of the complex did not affect any of the organs.

It has to be stated, that the 80% of the animals which were exposed to the electromagnetic waves of resonant frequencies of doxorubicin and 60% of the animals treated with the doxorubicin hydrochloride alone were totally cured and are still alive, with subsequent improvement of all anticancer indexes. A similar pattern of anticancer activity was followed by animals exposed to EMF resonant frequencies of silver complex (70%) or treated with the complex itself (50%). Also, the groups of animals exposed to EMF of both compounds manifested increased apoptotic phenomena on their tumors compared to those of animals treated with both compounds, while animals exposed to white noise or sham exposed animals did not present any difference at all *in vivo* procedures, compared to control group of animals.

The emission of EMF resonant frequencies of both doxorubicin and silver complex induce higher anticancer activity in accordance to the increased survival levels, compared to that of animals treated with both compounds, probably due to the absence of side effects of the EMFs. Thus, it is necessary to investigate a possible mechanism of action, able to clarify the absence of side effects and simultaneously the high apoptotic levels on animal tumors, indicating strong anticancer effects.

## 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alama A., Tasso B., Novelli F., Sparatore F., 2009. Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotin as antitumor agents. *Drug Discov Today* 14(9-10): 500-508.
2. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2006 (Eds.). *Essential cell biology*. 2nd Edition. Garland Science, New York, USA, ISBN: 0-8153-3481-8.
3. Arcamone F., Cassinelli G., Fantini G., Grein A., Orezzi P., Pol C., Spalla C., 2000. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XI, Issue 6, Pages 1101-1110 (1969). *Biotechnol Bioeng* 67(6): 704-713.
4. Azarova A. M., Lyu Y. L., Lin C. P., Tsai Y. C., Lau J. Y., Wang J. C., Liu L. F., 2007. From the Cover: Roles of DNA topoisomerase II isozymes in chemotherapy and secondary malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(26):11014-11019.
5. Baker D. E. J., 1980. Reproduction and Breeding. In: Baker H. J., Lindsey J. R., Weisbroth S. H., (Eds.) *The Laboratory Rat*. Vol. II. Academic Press, New York.
6. Bakshi U. A., Godse A. P., 2009. *Basic Electronics Engineering*. Technical Publications. pp. 8–10. ISBN 978-81-8431-580-6.
7. Baldi I., Coureau G., Jaffré A., Gruber A., Ducamp S., Provost D., Lebailly P., Vital A., Loiseau H., Salamon R., 2011. Occupational and residential exposure to electromagnetic fields and risk of brain tumors in adults: A case control study in Gironde, France. *International Journal of Cancer* 129: 1477–1484.
8. Banti C. N., Giannoulis A. D., Kourkoumelis N., Owczarzak A. M., Poyraz M., Kubicki M., Charalabopoulos K., Hadjidakou S. K., 2012. Mixed ligand–silver(I) complexes with anti-inflammatory agents which can bind to lipoxygenase and calf-thymus DNA, modulating their function and inducing apoptosis. *Metallomics* 4(6): 545-560.
9. Banti C. N., Hadjidakou S. K., 2013. Anti-proliferative and anti-tumor activity of silver(I) compounds. *Metallomics* 5(6): 569-596.

10. Barbault A., Costa F. P., Bottger B., Munden R. F., Bomholt F., Kuster N., Pasche B., 2009. Amplitude-modulated electromagnetic fields for the treatment of cancer: discovery of tumor-specific frequencies and assessment of a novel therapeutic approach. *J Exp Clin Cancer Res* 28(1): 51.
11. Barker A. T., Dixon R. A., Sharrard W. J., Sutcliffe M. L., 1984. Pulsed magnetic field therapy for tibial non-union. Interim results of a double-blind trial. *Lancet* 1(8384): 994-996.
12. Bassen H., Litovitz T., Penafiel M., Meister R., 1992. ELF In Vitro Exposure Systems for Inducing Uniform Electric and Magnetic - Fields in Cell Culture Media, *Bioelectromagnetics* 13(3): 183-198.
13. Bassett C. A., Pawluk R. J., Pilla A. A., 1974. Augmentation of bone repair by inductively coupled electromagnetic fields. *Science* 184(4136): 575-577.
14. Batsala G.K, Dokorou V., Kourkoumelis N., Manos M.J., Tasiopoulos A.J., Mavromoustakos T., Simcic M., Golic-Grdadolnik S., Hadjidakou S.K., 2012. Copper(I)/(II) or silver(I) ions towards 2-mercaptopyrimidine: An exploration of a chemical variability with possible biological implication. *Inorganica Chimica Acta* 382(1): 146–157.
15. Beaudoin A.R, 1980. Embryology and Teratology. In: Baker H. J., Lindsey J. R., Weisbroth S. H., (Eds.) *The Laboratory Rat. Vol. II.* Academic Press, New York.
16. Berg H., Günther B., Hilger I., Radeva M., Traitcheva N., Wollweber L., 2010. Bioelectromagnetic field effects on cancer cells and mice tumors. *Electromagnetic Biology and Medicine* 29: 132–143.
17. Berlin O., Stener B., Kindblom L.G., Angervall L., 1984. Leiomyosarcomas of venous origin in the extremities. A correlated clinical, roentgenologic and morphologic study with diagnostic and surgical applications. *Cancer* 54(10): 2147-2159.
18. Binhi V. N., 1997. Interference ion quantum states within a protein explains weak magnetic field's effects in biosystems. *Electromagn Biol Med* 16(3): 203–214.
19. Bishop S.P., 1980. Cardiovascular Research. In: Baker H. J., Lindsey J. R., Weisbroth S. H., (Eds.) *The Laboratory Rat. Vol. II.* Academic Press, New York.

20. Blackman C., 2009. Cell phone radiation: Evidence from ELF and RF studies supporting more inclusive risk identification and assessment. *Pathophysiology* 16: 205 – 216.
21. Blomme E.A., Ciurlionis R., Marsh K.C., Waring J.F., Yang Y., 2008. Evaluation of the effects of serial phlebotomy on the transcriptome of major tissues and on the response to toxicants in rats. *Toxicol Lett* 176(2): 138-148.
22. Briggs G.B., Oehme F.W., 1980. Toxicology In: Baker H. J., Lindsey J. R., Weisbroth S. H., (Eds.) *The Laboratory Rat. Vol. II.* Academic Press, New York.
23. Burek J.D., Hollander C.F., 1980. Experimental Gerontology. In: Baker H. J., Lindsey J. R., Weisbroth S. H., (Eds.) *The Laboratory Rat. Vol. II.* Academic Press, New York.
24. Carlsson G., Gullberg B., Hafstrom L., 1983. Estimation of liver tumor volume using different formulas-an experimental study in rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 105(1): 20–23.
25. Carter B.P., Bazin H., 1980. Immunology. In: Baker H. J., Lindsey J. R., Weisbroth S. H., (Eds.) *The Laboratory Rat. Vol. II.* Academic Press, New York.
26. Charles L. E., Loomis D., Shy C. M., Newman B., Millikan R., Nylander- French L. A., Couper D., 2003. Electromagnetic fields, polychlorinated biphenyls, and prostate cancer mortality in electric utility workers. *American Journal of Epidemiology* 157: 683–691.
27. Chlebowski R. T., 1979. Adriamycin (doxorubicin) cardiotoxicity: a review. *West J Med* 131(5): 364–368.
28. Chung J. Y., Herbert M. E., 2001. Myth: Silver sulfadiazine is the best treatment for minor burns. *West J Med* 175(3): 205–206.
29. Clement J. L., Jarret P. S, 1994. Antibacterial Silver. *Met. Based Drugs* 1: 467–482.
30. Dahl I., Angervall L, 1974. Cutaneous and subcutaneous leiomyosarcoma. A clinicopathologic study of 47 patients. *Pathol Eur* 9(7): 307-315.
31. de Saint Aubain S.N., Fletcher C.D., 1999. Leiomyosarcoma of soft tissue in children: clinicopathologic analysis of 20 cases. *Am J Surg Pathol* 23(7): 755-763.
32. Deegan C., McCann M., Devereux M., Coyle B., Egan D.A., 2007. In vitro cancer chemotherapeutic potential and mechanism of action of 1,10-phenanthroline (phen), [Ag2(phen)3(mal)]×2H2O, [Cu(phen)2(mal)]×2H2O and [Mn(phen)2(mal)]

- ×2H<sub>2</sub>O (malH<sub>2</sub>=malonic acid), using human cancer cells. *Cancer Letters* 247(2): 224-233.
33. Demling R.H., De Santi L., 2001. Effects of silver on wound management. *Wounds* 13(1 Suppl A): 5-14.
  34. Despommier D. D., 1980. Experimental parasitology. In: Baker H. J., Lindsey J. R., Weisbroth S. H., (Eds.) *The Laboratory Rat. Vol. II.* Academic Press, New York.
  35. Di Marco A., Gaetani M., Scarpinato B., 1969. Adriamycin (NSC-123,127): a new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemother Rep* 53(1): 33–37.
  36. Dortch A. B., Johnson M. T., 2006. Characterization of pulsed magnetic field therapy in a rat model for rheumatoid arthritis. *Biomed Sci Instrum* 42: 302-307.
  37. El-Sayyad H. I., Ismail M. F., Shalaby F. M., Abou-El-Magd R. F., Gaur R. L., Fernando A., Raj M. H., Ouhtit A., 2009. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. *Int J Biol Sci.* 5(5):466-473.
  38. Evangelou A., Verginadis I., Avdikos A., Simos I., Havelas K., Zouridakis A., Karkabounas S., 2008. Comparison of the cytotoxic effects of a Sn-mercaptocotinic acid complex to the coherent electromagnetic resonant radiofrequency spectra of the same complex, on a rat leiomyosarcoma cell line. *Proceedings of 10th International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine*, ISBN 978-2-7420-0714-1, Corsica, France.
  39. Farrell N., 2004. Inorganic Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents. In: McCleverty J.A., Meyer T.J., (Eds.), *Comprehensive Coordination Chemistry.* 2nd ed., Elsevier Pergamon: Oxford, UK, 9: 809–840.
  40. Farshid G., Pradhan M., Goldblum J., Weiss S.W., 2002. Leiomyosarcoma of somatic soft tissues: a tumor of vascular origin with multivariate analysis of outcome in 42 cases. *Am J Surg Pathol* 26(1): 14-24.
  41. Feychting M., Ahlbom A., Kheifets L., 2005. EMF and health. *Annual Review of Public Health* 26: 165–189.



42. Fischer G., Pelka R. B., Barovic J., 2005. Adjuvant treatment of knee osteoarthritis with weak pulsing magnetic fields. Results of a placebo-controlled trial prospective clinical trial. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 143(5): 544-550.
43. Fletcher C.D.M., Unni K.K., Mertens F. (Eds.), 2002. Pathology and Genetics of tumors of Soft Tissue and Bone. World Health Organization, Classification of Tumors, IARC Press: Lyon, France.
44. Fornari F.A., Randolph J.K., Yalowich J.C., Ritke M.K., Gewirtz D.A., 1994. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol Pharmacol* 45(4): 649–656.
45. Frederick C.A., Williams L.D., Ughetto G., van der Marel G.A., van Boom J.H., Rich A., Wang A.H., 1990. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochemistry* 29(10): 2538–2549.
46. Fuller F. W., Parrish M., Nance F. C. J., 1994. A review of the dosimetry of 1% silver sulfadiazine cream in burn wound treatment. *Burn Care Rehabil* 15(3): 213–223.
47. Gautier A., Cisnetti F., 2012. Advances in metal–carbene complexes as potent anti-cancer agents. *Metallomics* 4(1):23–32.
48. Gray J. R., Frith C. H., Parker J. D., 2000. In vivo enhancement of chemotherapy with static electric or magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 21(8): 575-583.
49. Hadjikakou S. K., Ozturk I. I., Xanthopoulou M. N., Zachariadis P. C., Zartilas S., Karkabounas S., Hadjiliadis N., 2008. Synthesis, structural characterization and biological study of new organotin(IV), silver(I) and antimony(III) complexes with thioamides. *J Inorg Biochem* 102(5-6):1007-1015.
50. Hambley T.W., 2007. Chemistry: Metal-based therapeutics. *Science* 318(5855): 1392–1393.
51. Hashimoto H., Daimaru Y., Tsuneyoshi M., Enjoji M., 1986. Leiomyosarcoma of the external soft tissues. A clinicopathologic, immunohistochemical, and electron microscopy study. *Cancer* 57(10): 2077-2088.
52. Hashimoto H., Tsuneyoshi M., Enjoji M., 1985. Malignant smooth muscle tumors of the retroperitoneum and mesentery: a clinicopathologic analysis of 44 cases. *J Surg Oncol* 28(3): 177-186.

53. Henshaw D. L., Reiter R. J., 2005. Do magnetic fields cause increased risk of childhood leukemia via melatonin disruption? *Bioelectromagnetics (Suppl.7)*: S86– 97.
54. Hermann P., Kotek J., Kubíček V., Lukeš I., 2008. Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: Ligand design and properties of the complexes. *Dalton Trans (23)*: 3027–3047.
55. Hirata M., Kuzuzaki K., Takeshita H., Hashiguchi S., Hirasawa Y., Ashihara & T., 2001. Drug resistance modification using pulsing electromagnetic field stimulation for multidrug resistant mouse osteosarcoma cell line. *Anticancer Res* 21(1A): 317-320.
56. Howard-Lock H. E., Lock C. J. L., 1987. In *Comprehensive Coordination Chemistry*, Wilkinson G., Gillard R. D., McCleverty J. A. (Eds.); Pergamon: Oxford, 1987. Chapter 62.2, 6: 755-778.
57. Hugo W.B., Russell A.D., 1982. Types of antimicrobial agents. In: Russell A.D., Hugo W.B., Ayliffe G.A.J., (Eds.), *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilisation*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications, pp. 8–106.
58. Jakupec M. A., Unfried P., Keppler B. K., 2005. Pharmacological properties of cerium compounds. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 153: 101–111.
59. Janigro D., Perju C., Fazio V., Hallene K., Dini G., Agarwal M.K, Cucullo L., 2006. Alternating current electrical stimulation enhanced chemotherapy: a novel strategy to bypass multidrug resistance in tumor cells. *BMC Cancer* 6:72.
60. Karkabounas S., Havelas K., Kostoula O. K., Vezyraki P., Avdikos A., Binolis J., Hatziavazis G., Metsios A., Verginadis I., Evangelou A., 2006. Effects of low intensity static electromagnetic radiofrequency fields on leiomyosarcoma and smooth muscle cell lines. *Hell J Nucl Med* 9(3): 167-172.
61. Kasuga N. C., Sugie A., Nomiya K., 2004. Syntheses, structures and antimicrobial activities of water-soluble silver(I)-oxygen bonding complexes with chiral and racemic camphanic acid (Hca) ligands. *Dalton Trans (21)*: 3732–3740.
62. Kevorkian J., Cento DP, 1973. Leiomyosarcoma of large arteries and veins. *Surgery* 73(3): 390-400.
63. Kheifets L., Ahlbom A., Crespi C.M., Feychting M., Johansen C., Monroe J., Murphy M.F., Oksuzyan S., Preston-Martin S., Roman E., Saito T., Savitz D., Schurz J.,

- Simpson J., Swanson J., Tynes T., Verkasalo P., Mezei G., 2010. A pooled analysis of extremely low-frequency magnetic fields and childhood brain tumors. *American Journal of Epidemiology* 172: 752–761.
64. Kirson E. D., Dbaly V., Tovarys F., Vymazal J., Soustiel J. F., Itzhaki A., Mordechovich D., Steinberg-Shapira S., Gurvich Z., Schneiderman R., Wasserman Y., Salzberg M., Ryffel B., Goldsher D., Dekel E., Palti Y., 2007. Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(24): 10152-10157.
  65. Klasen H.J., 2000(a). Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns* 26(2): 117–130.
  66. Klasen H.J., 2000(b). A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* 26(2): 131–138.
  67. Kliukiene J., Tynes T., Andersen A., 2003. Follow-up of radio and telegraph operators with exposure to electromagnetic fields and risk of breast cancer. *European Journal of Cancer Prevention* 12: 301–307.
  68. Koh E.K., Ryu B.K., Jeong D.Y., Bang I.S., Nam M.H., Chae K.S., 2008. A 60-Hz sinusoidal magnetic field induces apoptosis of prostate cancer cells through reactive oxygen species. *International Journal of Radiation Biology* 84: 945–955.
  69. Kwon M. S., Hamalainen H., 2011. Effects of mobile phone electromagnetic fields: Critical evaluation of behavioral and neurophysiological studies. *Bioelectromagnetics* 32: 253–272.
  70. Kyros L., Kourkoumelis N., Kubicki M., Male L., Hursthouse B. M., Verginadis I. I., Gouma E., Karkabounas S., Charalabopoulos K., Hadjikakou S. K., 2010. Structural Properties, Cytotoxicity, and Anti-Inflammatory Activity of Silver(I) Complexes with tris(p-tolyl)Phosphine and 5-Chloro-2-Mercaptobenzothiazole. *Bioinorg Chem and Appl* Article ID 386860.
  71. László J. F., Szilvási J., Fényi A., Szalai A., Gyires K., Pórszász R., 2011. Daily exposure to inhomogeneous static magnetic field significantly reduces blood glucose level in diabetic mice. *Int J Radiat Biol* 87(1): 36-45.

72. Lednev V. V., 1991. Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems. *Bioelectromagnetics* 12(2): 71–75.
73. Lerchl A., Reiter R. J., Howes K. A., Nonaka K. O., Stokkan K. A., 1991. Evidence that extremely low frequency  $\text{Ca}^{2+}$ -cyclotron resonance depresses pineal melatonin synthesis in vitro. *Neuroscience Letters* 124: 213–215.
74. Leu H.J., Makek M., 1986. Intramural venous leiomyosarcomas. *Cancer* 57(7): 1395-1400.
75. Lindsey J.R., 1979. Historical foundations. In: Baker H. J., Lindsey J. R., Weisbroth S. H., (Eds.) *The Laboratory Rat. Vol. I.* Academic Press, New York.
76. Lloyd N.C., Morgan H.W., Nicholson B.K., Ronimus R.S., 2005. The composition of Ehrlich's Salvarsan: Resolution of a century-old debate. *Angew Chem Int Ed* 44(6): 941–944.
77. Marambio-Jones C., Hoek E. M. V., 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J Nanopart Res* 12(5): 1531–1551.
78. Maslanyj M., Lightfoot T., Schuz J., Sienkiewicz Z., McKinlay A., 2010. A Precautionary public health protection strategy for the possible risk of childhood leukemia from exposure to power frequency magnetic fields. *BMC Public Health* 10: 673–682.
79. Mehrara E., Forssell-Aronsson E., Ahlman H., Bernhardt P., 2007. Specific growth rate versus doubling time for quantitative characterization of tumor growth rate. *Cancer Res* 67(8):3970-3975.
80. Mentzel T., Calonje E., Fletcher C.D., 1994. Leiomyosarcoma with prominent osteoclast-like giant cells. Analysis of eight cases closely mimicking the so-called giant cell variant of malignant fibrous histiocytoma. *Am J Surg Pathol* 18(3): 258-265.
81. Merchant W., Calonje E., Fletcher C.D., 1995. Inflammatory leiomyosarcoma: a morphological subgroup within the heterogeneous family of so-called inflammatory malignant fibrous histiocytoma. *Histopathology* 27(6): 525-532.

82. Mizutani H., 2007. Mechanism of DNA damage and apoptosis induced by anticancer drugs through generation of reactive oxygen species. [Article in Japanese] *Yakugaku Zasshi* 127(11):1837-1842.
83. Momparler R. L., Karon M., Siegel S. E., Avila F., 1976. Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Res* 36(8):2891-2895.
84. National Research Council, *Use of Laboratory Animals in biomedical and Behavioral research*, National Academy Press, Washington, D.C. 1998.
85. Nistal M., Paniagua R., Picazo M.L, Cermeño de G.F., Ramos Guerreira J.L., 1980. Granular changes in vascular leiomyosarcoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 386(2): 239-248.
86. Nomiya K., Takahashi S., Noguchi R., Nemoto S., Takayama T., Oda M., 2000. Synthesis and characterization of water-soluble silver(I) complexes with L-histidine (H<sub>2</sub>his) and (S)-(-)-2-pyrrolidone-5-carboxylic acid (H<sub>2</sub>pyrrld) showing a wide spectrum of effective antibacterial and antifungal activities. Crystal structures of chiral helical polymers [Ag(Hhis)](n) and {[Ag(Hpyrrld)]<sub>2</sub>}(n) in the solid state. *Inorg Chem* 39(15): 3301–3311.
87. Oda Y., Miyajima K., Kawaguchi K., Tamiya S., Oshiro Y., Hachitanda Y., Oya M., Iwamoto Y., Tsuneyoshi M., 2001. Pleiomorphic leiomyosarcoma: clinicopathologic and immunohistochemical study with special emphasis on its distinction from ordinary leiomyosarcoma and malignant fibrous histiocytoma. *Am J Surg Pathol* 25(8): 1030-1038.
88. Orvig C., Abrams M. J., 1999. *Chem Rev* 99(9): 2201-2204.
89. Otter M. W., McLeod K.J., Rubin C.T., 1998. Effects of electromagnetic fields in experimental fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 355(suppl.): S90-S104.
90. Otto M., von Muhlendahl K. E., 2007. Electromagnetic fields (EMF): Do they play a role in children's environmental health (CEH)? *Inter J Hygiene Env Health* 210: 635–644.
91. Pang B., Qiao X., Janssen L., Velds A., Groothuis T., Kerkhoven R., Nieuwland M., Ovaa H., Rottenberg S., van Tellingen O., Janssen J., Huijgens P., Zwart W., Neefjes J.,

2013. Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin. *Nat Commun* 4: 1908.
92. Peckham J.C., 1980. Experimental oncology. In: Baker H. J., Lindsey J. R., Weisbroth S. H., (Eds.) *The Laboratory Rat. Vol. II.* Academic Press, New York.
  93. Peyrone M., 1844. Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür. *Ann Chem Pharm* 51(1): 1-29.
  94. Pigram W.J., Fuller W., Hamilton L.D., 1972. Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA. *Nature New Biol* 235(53): 17–19.
  95. Pike E.W., 1933. Biology and the principle of reproducibility. *Science* 78: 265–266.
  96. Portier C.J., Wolfe M.S., (Eds.) 1998. Assessment of health effects from exposure to power-line frequency electric and magnetic fields. NIEHS Working Group Report, National Institute of Environmental Health Sciences/National Institutes of Health, Research Triangle Park: NIH publication No. 98–3981.
  97. Rajani B., Smith T.A., Reith J.D., Goldblum JR, 1999. Retroperitoneal leiomyosarcomas unassociated with the gastrointestinal tract: a clinicopathologic analysis of 17 cases. *Mod Pathol* 12(1): 21-28.
  98. Ranchod M., Kempson R.L., 1977. Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract and retroperitoneum: a pathologic analysis of 100 cases. *Cancer* 39(1): 255-262.
  99. Rollin B. E., Kesel M. L. *The Experimental Animal in Biomedical Research, Vol II, Carem Husbandry, and Well-Being, An overview by species.* CRC Press, London.
  100. Ronchetto F., Barone D., Cintorino M., Berardelli M., Lissolo S., Orlassino R., Ossola P., Tofani S., 2004. Extremely low frequency-modulated static magnetic fields to treat cancer: A pilot study on patients with advanced neoplasm to assess safety and acute toxicity. *Bioelectromagnetics* 25(8): 563-571.
  101. Rosenberg B., Van Camp L., Krigas T., 1965. Inhibition of cell division in *Escherichia coli*, by electrolysis products from platinum electrode. *Nature* 205:698-699.
  102. Ruiz Gómez M. J., Pastor Vega J. M., de la Peña L., Gil Carmona L., Martínez Morillo M., 1999. Growth modification of human colon adenocarcinoma cells exposed to a low-frequency electromagnetic field. *J Physiol Biochem* 55(2): 79-83.
  103. Sadler P.J., 1991. Inorganic Chemistry and Drug Design. *Adv Inorg Chem* 36(c): 1-48.

104. Scott L.E., Orvig C., 2009. Medicinal inorganic chemistry approaches to passivation and removal of aberrant metal ions in disease. *Chem Rev* 109(10): 4885–4910.
105. Shmookler B.M., Erzinger F.M., 1983. Retroperitoneal leiomyosarcoma. A clinicopathologic analysis of 36 cases. *Am J Surg Pathol* 7(3): 269-280.
106. Siddiquei R. H., Nordin N. A., Ibrahimy I. M., Arifin A. M., Sulong H. N., Mel M., Voiculescu I., 2010. Electrical Cell-substrate Impedance Sensing (ECIS) based Biosensor for Characterization of DF-1 Cells. International Conference on Computer and Communication Engineering (ICCCE 2010), 11-13 May, Kuala Lumpur, Malaysia, ISBN: 978-1-4244-6233-9.
107. Silverman R. B. (Ed.), 2004. The organic chemistry of drug design and drug action. Second Edition, Elsevier Academic Press, ISBN-13: 978-0-12-643732-4.
108. Speth P. A. J., van Hoesel Q. G. C. M., Haanen C., 1988. Clinical Pharmacokinetics of Doxorubicin. *Clinical Pharmacokinetics* 15: 15-31.
109. Stout A.P., Hill W.T., 1958. Leiomyosarcoma of the superficial soft tissue. *Cancer* 11(4): 844-854.
110. Sun H.Z., Zhang L., Szeto K.Y., 2004. Bismuth in medicine. In: Sigel H., Sigel R., (Eds), *Metal Ions in Biological Systems: Metal Ions and Their Complexes in Medication*. Dekker Press, New York, 41: 333-378.
111. Swanson P.E., Wick M.R., Dehner L.P., 1991. Leiomyosarcoma of somatic soft tissues in childhood: an immunohistochemical analysis of six cases with ultrastructural correlation. *Hum Pathol* 22(6): 569-577.
112. Swarts S.J., Neff J.R., Johnsson S.L., Nelson M., Bridge J.A., 1998. Significance of abnormalities of chromosomes 5 and 8 in chondroblastoma. *Clin Orthop Relat Res* (349)189-193.
113. Tabrah F., Hoffmeier M., Gilbert F. Jr., Batkin S., Bassett C. A., 1990. Bone density changes in osteoporosis-prone women exposed to pulsed electromagnetic fields (PEMFs). *J Bone Miner Res* 5(5): 437-442.
114. Tambe S. M., Sampath L., Modak S. M., 2001. In vitro evaluation of the risk of developing bacterial resistance to antiseptics and antibiotics used in medical devices. *J Antimicrob Chemother* 47(5): 589–598.

115. Tan C., Tasaka H., Yu K.P., Murphy M.L., Karnofsky D.A., 1967. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer* 20(3): 333–353.
116. Teepen J. C., van Dijck J. A., 2012. Impact of high electromagnetic field levels on childhood leukemia incidence. *International Journal of Cancer* 131: 769–778.
117. Terreno E., Castelli D.D., Viale A., Aime S., 2010. Challenges for molecular magnetic resonance imaging. *Chem Rev* 110(5): 3019–3042.
118. Thati B., Noble A., Creaven B. S., Walsh M., McCann M., Devereux M., Kavanagh K., Egan D. A., 2009. Role of cell cycle events and apoptosis in mediating the anti-cancer activity of a silver(I) complex of 4-hydroxy-3-nitro-coumarin-bis(phenanthroline) in human malignant cancer cells *Eur J Pharmacol* 602(2-3): 203-214.
119. Thériault G., Goldberg M., Miller A. B., Armstrong B., Guénel P., Deadman J., Imbernon E., To T., Chevalier A., Cyr D., Wall C., 1994. Cancer risks associated with occupational exposure to magnetic fields among electric utility workers in Ontario and Quebec, Canada, and France: 1970– 1989. *American Journal of Epidemiology* 139: 550–572.
120. Thompson K.H., Orvig C., 2000. Design of vanadium compounds as insulin enhancing agents. *J Chem Soc Dalton* (17): 2885–2892.
121. Thompson K.H., Orvig C., 2003. Boon and bane of metal ions in medicine. *Science* 300(5621): 936–939.
122. Tofani S., Barone D., Cintorino M., de Santi M. M, Ferrara A., Orlassino R., Ossola P., Peroglio F., Rolfo K., & Ronchetto F., 2001. Static and elf magnetic fields induce tumor growth inhibition and apoptosis. *Bioelectromagnetics* 22(6): 419-428.
123. Van Hoosier G. L., 1975 (Ed.). *The Rat (Slide-Tape Program)*. American College of Laboratory Animal Medicine, Pullman, WA, V-6079-21.
124. Varela-Duran J. and Enzinger F.M, 1982. Calcifying synovial sarcoma. *Cancer* 50(2): 345-352.
125. Velalopoulou A., Batsala G. K., Kourkoumelis N., Karkabounas S., Evangelou A., Hadjikakou S.K., 2013. Photo activated metallotherapeutics: copper(I) or silver(I) mixed



- ligand complexes with 2-mercaptopyrimidine and triphenylphosphine. *Med Chem Res* 22(5): 2260–2265.
126. Verginadis I. I., Simos Y. V., Velalopoulou A. P., Vadalouca A. N., Kalfakakou V. P., Karkabounas S. Ch., Evangelou A. M, 2012. Analgesic effect of the electromagnetic resonant frequencies derived from the NMR spectrum of morphine. *Electromagn Biol Med* 31(4): 275-284.
  127. Wang D., Lippard S.J., 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4(4): 307-320.
  128. Wang Z., Che P. L., Du J., Ha B., Yarema K. J., 2010. Static magnetic field exposure reproduces cellular effects of the Parkinson's disease drug candidate ZM241385. *PLoS One*, 5(11): e13883.
  129. Weiss R.B., 1992. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol* 19(6): 670-686.
  130. Wertheimer N., Leeper E., 1979. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am J Epidemiol* 109(3): 273–284.
  131. Yamaguchi S., Ogiue-Ikeda M., Sekino M., Ueno S., 2006. Effects of pulsed magnetic stimulation on tumor development and immune functions in mice *Bioelectromagnetics* 27(1):64-72.
  132. Young H. D., 1992. *University Physics*. 8th edition. Vol 2. Addison-Wesley Publishing Company, USA. ISBN:960-02-1088-8.
  133. Zartilas S., Hadjikakou S.K, Hadjiliadis N., Kourkoumelis N., Kyros L., Kubicki M., Baril M., Butler I.S., Karkabounas S., Balzarini J., 2009. Tetrameric 1:1 and monomeric 1:3 complexes of silver(I) halides with tri(p-tolyl)-phosphine: A structural and biological study. *Inorganica Chimica Acta* 362(3): 1003-1010.
  134. Zhang S., Liu X., Bawa-Khalfe T., Lu L. S., Lyu Y. L., Liu L. F., Yeh E. T., 2012. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* 18(11): 1639-1642.



## 9. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ - ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχει δημοσιευτεί σε διεθνές περιοδικό και έχει παρουσιαστεί σε εθνικά συνέδρια.

### Δημοσίευση:

- ∞ **Velalopoulou, A.**, Batsala, G.K., Kourkoumelis, N., Karkabounas, S., Evangelou, A., Hadjikakou, S.K. *Photo-activated metallotherapeutics: copper(I) or silver(I) mixed ligand complexes with 2-mercaptopyrimidine and triphenylphosphine*. Med Chem Res 2013, 22(5): 2260-2265.

### Ανακοινώσεις σε συνέδρια:

- ∞ **Anastasia Velalopoulou**, Georgia Batsala, Angelos Evangelou, Spyridon Karkabounas, Sotiris Hadjikakou “*In vitro cytotoxic study of photo-activated metallotherapeutics*”. 8th Tumor Markers Targeting Therapy Congress, 2010, Athens, Greece.
- ∞ **Anastasia Velalopoulou**, Ioannis Verginadis, Yannis Simos, Efthalis Gkouma, Sotiris Hadjikakou, Angelos Evangelou, Spyridon Karkabounas. “*Anticancer and anti-burn effects of silver complexes*”. 7th Tumor Markers Targeting Therapy Congress, 2008; Athens, Greece.

Επίσης, από την ενασχόλησή μου με τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία εκτός διδακτορικής διατριβής έχουν προκύψει δημοσιεύσεις και ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια, καθώς και συγγραφή κεφαλαίου σε βιβλίο:

#### Δημοσίευση:

- ☞ Ioannis I. Verginadis, Yannis V. Simos, **Anastasia P. Velalopoulou**, Athina N. Vadalouca, Vicky P. Kalfakakou, Spyridon Ch. Karkabounas and Angelos M. Evangelou. *Analgesic effect of the electromagnetic resonant frequencies derived from the NMR spectrum of morphine*. Electromagnetic Biology and Medicine 2012, 31(4):275-284.

#### Ανακοινώσεις σε συνέδρια:

- ☞ Verginadis Ioannis, **Velalopoulou Anastasia**, Simos Yannis, Peschos Dimitrios, Kalfakakou Vicky, Karkabounas Spyridon, Havelas Konstantinos and Evangelou Angelos. “*Emission of the resonant electromagnetic frequencies derived from <sup>1</sup>H-NMR spectra of biological active substances induces similar effects with the substances themselves. A new approach in investigation-treatment?*” 9th International Froehlich’s Symposium, Electrodynamical activity of living cells, 2011, Prague, Czech Republic.
- ☞ Verginadis I., Simos Y., **Velalopoulou A.**, Vadalouca A., Giotis Ch., Kalfakakou V., Karkabounas S. and Evangelou A. “*Analgesic effect exerted by exposure of Wistar rats to the NMR spectrum of morphine*”. International Symposium of WIP – ALGOS, 2009; Mykonos, Greece Ioannis Verginadis.

**Η παραπάνω ανακοίνωση έχει βραβευτεί με το πρώτο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.**

Συγγραφή κεφαλαίου σε βιβλίο:

- ☞ Verginadis I, **Velalopoulou A**, Karagounis I, Simos Y, Peschos D, Karkabounas S, Evangelou A. Chapter title: *Beneficial Effects of Electromagnetic Radiation in Cancer*. Edited Book Title: Electromagnetic radiation. InTech Open Access Publisher, (2011) pp. 249-268. ISBN: 979-953-307-332-2.