



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΟΨΕΙΣ ΤΟΥ ΕΝΔΙΑΜΕΣΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ  
ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΚΑΙ ΔΡΑΣΕΙΣ ΕΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΕΠΙ  
ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΤΡ**

**ΜΑΡΙΑ Ι. ΓΚΙΟΥΛΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014**











**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΟΨΕΙΣ ΤΟΥ ΕΝΔΙΑΜΕΣΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ  
ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΚΑΙ ΔΡΑΣΕΙΣ ΕΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΕΠΙ  
ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΤΡ**

**ΜΑΡΙΑ Ι. ΓΚΙΟΥΛΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014**



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



**Ημερομηνία αίτησης της κ. Γκιούλη Μαρίας:** 1-9-2008

**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 του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καραμούζης Μιχαήλ Αναπληρωτής Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 9-2-2009

*«Όψεις του ενδιάμεσου μεταβολισμού καρκινικών κυτταρικών σειρών και δράσεις ειδικών αναστολέων επί ενζύμων σχετιζόμενων με την παραγωγή ATP»*

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

<b>Ευαγγέλου Άγγελος</b>	Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Καραμούζης Μιχαήλ</b>	Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
<b>Περλεπές Σπυρίδων</b>	Καθηγητής Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών
<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
<b>Τσάγκαρης Γεώργιος</b>	Ερευνητής Α', Ίδρυμα Βιοϊατρικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 11-7-2014

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Η Γραμματέας του Τμήματος**

**Ανδρέας Φωτόπουλος**

**Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής**



**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ**



***Στους γονείς μου,***

***Γιάννη και Βασιλική...***





## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το πειραματικό μέρος της παρούσας διατριβής έλαβε χώρα στο εργαστήριο Φυσιολογίας, του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

*«Το τρίτο φτερό είναι η μόνη ουτοπία» (Θ. Αγγελόπουλος)*

Η ιδέα αδυνατεί να υλοποιηθεί δίχως την υποστήριξη της ψύχραιμης ματιάς, την έμπνευση, το διάλογο.

Η συμβολή της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής...

Ευχαριστώ από καρδιάς τον Επίκουρο Καθηγητή Σπυρίδων Καρκαμπούνα, γιατί αποτέλεσε έμπνευση, γιατί υπήρξε πολύτιμος καθοδηγητής και ταυτόχρονα πιστός «συνοδοιπόρος». Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη, για την πίστη, για την επίβλεψη του πειραματικού μέρους της παρούσας διατριβής και πρωτίστως την υλοποίηση της ιδέας.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Άγγελο Ευαγγέλου, τον Δάσκαλο, τον φωτεινό άνθρωπο που πίστεψε σε μένα από τα φοιτητικά μου χρόνια και μου έδωσε τη δυνατότητα να ξεκινήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Φυσιολογίας. Από τα χρόνια εκείνα έως και σήμερα, ήταν δίπλα μου όποτε τον χρειάστηκα, τόσο σε ερευνητικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Ευχαριστώ τον Ομότιμο Καθηγητή Μιχαήλ Καραμούζη για την αποδοχή του να αποτελέσει μέρος της εν λόγω ερευνητικής προσέγγισης. Τον ευχαριστώ για τον χρόνο του, τις συμβουλές του, το ήθος του.

Η συμβολή της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής...

Απευθύνω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Σπυρίδων Περλεπέ, ο οποίος συνέθεσε και χαρακτήρισε δομικά μέρος των συμπλόκων μετάλλων που

μελετήθηκαν στην διατριβή αυτή. Τον ευχαριστώ για την πλήρη και άμεση ανταπόκριση του όποτε ανέκυπταν προβλήματα. Η βοήθεια του ήταν πάντοτε καθοριστική και πολύτιμη.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια Βασιλική Καλφακάκου, για την επιστημονική καθοδήγηση, κυρίως σε ό,τι αφορά τις ενώσεις ψευδαργύρου, με τις οποίες ασχολείται ερευνητικά για πολλά χρόνια, και έχει συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών δράσης του μετάλλου αυτού από τη διεθνή επιστημονική κοινότητα. Την ευχαριστώ και σε προσωπικό επίπεδο για την ανεκτίμητη βοήθεια και συμπαράσταση.

Ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πατρώνα Βεζυράκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε επιλέγοντάς με για να συμβάλλω στη σωστή διεξαγωγή των εργαστηριακών ασκήσεων των πρωτοετών φοιτητών της Ιατρικής Σχολής, για την επιστημονική της καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές της και συμπαράσταση και σε προσωπικό επίπεδο. Θα την έχω πάντα στην καρδιά μου.

Ευχαριστώ τον Ερευνητή Α' βαθμίδας Γεώργιο Τσάγκαρη για την αποδοχή του να χαρίσει την επιστημονική του επάρκεια στην αξιολόγηση του εν λόγω ερευνητικού εγχειρήματος. Η διακριτή του παρουσία αποτελεί τη μέγιστη τιμή.

Ευχαριστώ ολόψυχα, τους έτερους ταξιδευτές...

Τον Ομότιμο Καθηγητή Παναγιώτη Βελτσίστα για την σύνθεση των περισσότερων σύμπλοκων ενώσεων του βαναδίου και τις συμβουλές του για τον σωστό χειρισμό των ενώσεων αυτών.

Τον Επίκουρο Καθηγητή Θεοχάρη Σταματάτο και την Ομότιμη Καθηγήτρια Εύη Μάνεση-Ζούπα, για τη σύνθεση και τον δομικό χαρακτηρισμό των συμπλόκων του ψευδαργύρου. Η συνεργασία που είχαμε ήταν άψογη και απέφερε αρκετούς καρπούς.

Την Επίκουρη Καθηγήτρια Αμαλία Αφένδρα για την αποδοχή της στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, έτσι ώστε να διεξαχθούν τα πειράματα της αντιμικροβιακής δράσης των συμπλόκων μετάλλων.

Τον Καθηγητή Χαράλαμπο Αγγελίδη για την πολύτιμη συμβολή του στην εκπόνηση της διατριβής αυτής. Τον ευχαριστώ που με δέχτηκε στο εργαστήριο Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής για την διεξαγωγή των πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών και για την επιστημονική του καθοδήγηση και την παροχή τεχνογνωσίας.

Ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Δημήτρη Πέσχο για την αγαστή συνεργασία καθ'όλη την παραμονή μου στο εργαστήριο Φυσιολογίας, αλλά και για την προετοιμασία και ιστοπαθολογική εξέταση των δειγμάτων ενδιαφέροντος από τους επίμυες.

Ευχαριστώ τους φίλους, συνοδοιπόρους...

Την Ίριδα Δήμα για την άψογη συνεργασία που είχαμε όλα τα χρόνια αυτά. Η έρευνα δεν είναι μόνο για τους μοναχικούς ανθρώπους. Η ενότητα και η σύμπνοια σε μια ερευνητική ομάδα αποφέρει πολλά οφέλη τόσο σε ερευνητικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Την ευχαριστώ και για το πολύτιμο της φιλίας της, για το χαμόγελο.

Τον Παναγιώτη Λέκκα για την επικοινωνιακή συνεργασία που είχαμε και την θεμελιώδους αξίας βοήθειας του στην διεξαγωγή των *in vivo* πειραμάτων. Χάρηκα ιδιαίτερος για την συνεργασία μας, καθότι αγαπάει και σέβεται τα ζώα όσο εγώ.

Την Εύη Βραζέλη για την πολύτιμη συμβολή της στην εκπόνηση των πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών, για τις συμβουλές της και γιατί ήταν πάντοτε εκεί για μένα, με ή χωρίς εμένα!

[4]

Την Έλενα Γεωργίου για την συνεργασία που είχαμε, για τις συμβουλές, τις συζητήσεις, την παρέα.

Τους Ιωάννη Σίμο και Ιωάννη Βεργινάδη για την πολύτιμη καθοδήγησή και βοήθειά τους από τα φοιτητικά μου χρόνια έως και σήμερα. Η συνεργασία μας ήταν κάτι περισσότερο από επικοινωνιακή.

Τη Χρύσα Αναστασιάδου, τον Στέλιο Ζερικιώτη, τον Αποστόλη Μέτσιο, τον Ιωάννη Ζελοβίτη, την Μαρία Αγιουργίτη, τον Λεωνίδα Ρουμπάτη, τον Βαγγέλη Κονταργύρη, την Χαρά Σαρντζή...Τους ευχαριστώ για την υπομονή, την επιμονή και την προσμονή έναντι στο ψυχοφθόρο.

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

Απευθύνω το μέγιστο της ευγνωμοσύνης μου στην οικογένεια μου. Τους οφείλω, λιτά και απέρριπτα, τα πάντα...

## Περιεχόμενα

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....	11
<i>Η ΓΛΥΚΟΛΥΤΙΚΗ ΟΔΟΣ</i> .....	11
1.1. Γενικά .....	11
1.2. Οξειδωτικός έναντι μη οξειδωτικού μεταβολισμού .....	15
1.3. Η γλυκολυτική οδός - Δομή και λειτουργία .....	17
1.4. Το παρακύκλωμα(shunt) των Rapoport – Lubering στην γλυκόλυση .....	30
1.5. Ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός ως πλεονέκτημα των καρκινικών κυττάρων .....	33
1.6. Μηχανισμοί του μεταβολικού επαναπρογραμματισμού .....	36
1.7. Χαρακτηριστικά της καρκινικής νόσου που συνδέονται με αλλαγές στον μεταβολισμό .....	38
1.8. Η αναστολή της γλυκόλυσης ως αντικαρκινική θεραπεία .....	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 .....	53
ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ .....	53
2.1. Cis-πλατίνα (cis-Diamminedichloroplatinum) .....	55
2.2. Σύμπλοκα βαναδίου .....	59
2.2.1. Γενικά .....	59
2.2.2. Βανάδιο: Παρασκευές και ιδιότητες .....	60
2.2.3. Βιοκινητική, κατανομή και μεταβολισμός του βαναδίου .....	61
2.2.4. Επιδράσεις του βαναδίου στην ανάπτυξη και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων .....	63
2.2.5. Αποπτωτικές και τοξικές επιδράσεις των συμπλόκων βαναδίου .....	63
2.2.6. Πιθανές αντιμεταστατικές επιδράσεις των συμπλόκων βαναδίου .....	67
2.2.7. Αντίσταση των κυττάρων σε φάρμακα και σύμπλοκα βαναδίου .....	69
2.3. Σύμπλοκα ψευδαργύρου .....	70
2.3.1. Γενικά .....	70
2.3.2. Μεταφορείς ψευδαργύρου .....	72

2.3.3. Βιολογία και φυσιολογία του ψευδαργύρου .....	73
2.3.4. Επιδράσεις του ψευδαργύρου στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ....	74
2.3.5. Αποπτωτικές και τοξικές επιδράσεις του ψευδαργύρου .....	74
2.3.6. Ψευδάργυρος και νεοπλασματική νόσος .....	76
ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....	79
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	81
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 .....	83
ΥΛΙΚΑ, ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ, ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ, ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ .....	83
3.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ .....	83
3.2. ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ .....	85
3.3.ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ .....	90
3.4. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ.....	95
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 .....	97
ΜΕΘΟΔΟΙ .....	97
4.1. <i>IN VITRO</i> ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ .....	97
4.2. <i>IN VIVO</i> ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ.....	114
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	117
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 .....	119
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	119
5.1. <i>IN VITRO</i> ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ.....	119
5.1.1 . Έλεγχος της βιωσιμότητας κυττάρων με την μέθοδο του ΜΤΤ .....	119
5.1.2. Ικανότητα των κυττάρων δημιουργίας αποικιών σε χαμηλή πυκνότητα σποράς.....	126
5.1.3. Προσδιορισμός μηχανισμού πρόκλησης κυτταρικού θανάτου.....	127
5.1.4. Έλεγχος αντιβακτηριακής δράσης.....	135
5.1.5. . Φασματοσκοπικός προσδιορισμός κατανάλωσης γλυκόζης.....	137
5.1.6. Φασματοσκοπικός προσδιορισμός παραγωγής ενδοκυττάρου ATP ....	139
5.1.7. Φασματοσκοπικός προσδιορισμός παραγωγής γαλακτικού οξέος .....	142
5.1.8. Έλεγχος πρόκλησης μιτοχονδριακής βλάβης.....	144

5.1.9. Προσδιορισμός υπερέκφρασης-υποέκφρασης ενζύμων της γλυκολυτικής πορείας .....	147
5.2. <i>IN VIVO</i> ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ .....	148
5.2.1. Οξεία τοξικότητα σε επίμυες Wistar .....	148
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	161
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	175
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	181
ABSTRACT.....	189
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ .....	197
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	201





## **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## *Η ΓΛΥΚΟΛΥΤΙΚΗ ΟΔΟΣ*

### **1.1. Γενικά**

Ο πιο σημαντικός παράγοντας για τη χημειοθεραπεία του καρκίνου είναι η επίτευξη επιλεκτικής θνησιμότητας των καρκινικών κυττάρων, χωρίς σημαντική τοξικότητα στα υγιή κύτταρα και ιστούς. Η κατανόηση των βιολογικών διαφορών ανάμεσα στα υγιή και τα καρκινικά κύτταρα είναι λοιπόν απαραίτητη για τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων. Τα τελευταία χρόνια, έχει σημειωθεί μια αλματώδης πρόοδος στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεια του καρκίνου, στην εξακρίβωση συγκεκριμένων γονιδίων και σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην καρκινογένεση και την ανάπτυξη του όγκου, καθώς και στη δημιουργία χημικών σκευασμάτων ή ειδικών αντισωμάτων που επιλεκτικά στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα. Αυτά τα στοχευμένα φάρμακα έχουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα παραδοσιακά φάρμακα γιατί έχουν μειωμένη τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα. Σε αυτά τα «νέας γενιάς» φάρμακα συγκαταλέγονται τα: Gleevec (imatinib), Iressa (gefitinib), Herceptin (trastuzumab) και rituximab (Pelicano et al, 2006). Μολαταύτα, ο μηχανισμός της ανάπτυξης του όγκου είναι εξαιρετικά πολύπλοκος και αναγνωρίζεται ότι σε διάφορους τύπους νεοπλασμάτων συνυπάρχουν πολλές γενετικές μεταλλάξεις και επιγενετικές μεταβολές. Ακόμα και σε έναν συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, οι κακοήθεις κυτταρικοί πληθυσμοί είναι ετερογενείς και φέρουν ποικίλες γονιδιακές διαφορές που τροποποιούνται περαιτέρω λόγω γενετικής αστάθειας κατά την πρόοδο της νόσου. Για τον λόγο αυτό είναι εξαιρετικά δύσκολο να φονευθούν τα κακοήθη κύτταρα εν γένει με την στόχευση ενός μόνο γονιδίου, καθώς και των πρωτεϊνών, που προέρχονται από την έκφρασή του. Ο σωστός συνδυασμός πολλών

τέτοιων στοχευμένων φαρμάκων είναι απαραίτητος για τον επιτυχή περιορισμό και κυτταρικό θάνατο ενός τέτοιου πληθυσμού.

Μία εναλλακτική στρατηγική για να επιτευχθεί και η εκλεκτικότητα και η αποτελεσματικότητα στην εξάλειψη της νεοπλασματικής νόσου είναι η αξιοποίηση της βασικής διαφοροποίησης των φυσιολογικών και των κακοήθων κυττάρων στον βιοχημικό τύπο μεταβολισμού τους. Η περισσότερα υποσχόμενη μεταβολική διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων στην αντικαρκινική θεραπεία είναι η αύξηση του ποσοστού αερόβιας γλυκόλυσης και η μεγάλη εξάρτησή τους από την γλυκολυτική οδό για την παραγωγή ATP, ένα φαινόμενο γνωστό ως το «φαινόμενο Warburg». Φυσικά εκείνη την εποχή υπήρχε ελάχιστη γνώση της δομής και της λειτουργίας του ενεργειακού μεταβολισμού και ο Otto Warburg απέτέλεσε έναν από τους σημαντικότερους πioniέρους αυτού του βιοφυσικού και βιοχημικού πεδίου, μαζί με τον Krebs και τον Svent Györgyi. Ο Otto Warburg έκανε την ανακάλυψη αυτή στις αρχές τις δεκαετίας του 1920, για την οποία τιμήθηκε με βραβείο Nobel το 1931. Παρατήρησε λοιπόν, πως ακόμα και παρουσία οξυγόνου, τα καρκινικά κύτταρα επιλέγουν να μεταβολίζουν τη γλυκόζη μέσω της γλυκόλυσης, κάτι φαινομενικά παράδοξο καθώς η γλυκόλυση, συγκρινόμενη με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, είναι μία λιγότερο αποτελεσματική πορεία παραγωγής ATP. Ο ίδιος απέδωσε αυτή τη μεταβολική τροποποίηση σε μιτοχονδριακές βλάβες των καρκινικών κυττάρων. (Warburg et al., 1924; Warburg, 1930, 1956). Παρόλο που το φαινόμενο Warburg δεν είναι καθολικά αποδεκτό για όλους τους τύπους νεοπλασιών (Funes et al., 2007), αποτελεί σήμερα την βάση για την Τομογραφία Εκπομπής Ποζιτρονίων (PET) η οποία χρησιμοποιείται για την διάγνωση του καρκίνου καθώς και για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία που ακολουθούν (Gambhir, 2002). Στην τομογραφία αυτή χρησιμοποιείται ένα ανάλογο της γλυκόζης, η 18F-FDG (2-(<sup>18</sup>F)-fluoro-2-deoxy-D-glucose). Η FDG-PET συνδυαζόμενη με αξονική (υπολογιστική) τομογραφία (PET/CT) έχει >90% ακρίβεια για τους περισσότερους τύπους επιθηλιακών νεοπλασμάτων (Mankoff, et al., 2007).

Τις τελευταίες δεκαετίες, το φαινόμενο Warburg έχει παρατηρηθεί σε πολλά είδη κακοήθων όγκων, όμως οι ακριβείς μοριακοί και βιοχημικοί μηχανισμοί στους οποίους οφείλεται παραμένουν άγνωστοι σε μεγάλο βαθμό. Από όλους τους πιθανούς αιτιολογικούς μηχανισμούς, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και οι υποξικές συνθήκες που επικρατούν στο μικροπεριβάλλον του όγκου είναι οι επικρατέστεροι (Zu et al., 2004). Επίσης, σημαντικός φαίνεται να είναι και ο ρόλος των ογκογονιδίων στη δημιουργία του φαινομένου Warburg, και θα αναλυθεί παρακάτω. Πολλά ογκογονίδια, όπως τα Ras, Src, και Myc έχει βρεθεί ότι προάγουν την αερόβια γλυκόλυση μέσω της παγίωσης του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1a (HIF-1a) (Blum, 2005; Dang, 1999; Elstrom, 2004).

Παρόλα αυτά η ανακάλυψη των ογκογονιδίων και άλλες ανακαλύψεις για τους μοριακούς μηχανισμούς δημιουργίας των νεοπλασιών, έστρεψαν ιεραρχικά το ενδιαφέρον της έρευνας σε πεδία εκτός του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων. Τα τελευταία χρόνια όμως όλο και επιτακτικότερα επανεμφανίζεται μια κατασταλαγμένη αναγέννηση των επισημάνσεων που έκανε ο Warburg καθώς και μια σοβαρή αναβάθμιση της σχετικής μεταβολικής προσέγγισης του καρκίνου. Μελέτες κατά την τελευταία δεκαετία έριξαν φως στις ιδιαιτερότητες της μιτοχονδριακής λειτουργίας των καρκινικών κυττάρων και προτείνουν πως το φαινόμενο Warburg σχετίζεται περισσότερο με τις μεταβολές των σηματοδοτικών μονοπατιών παρά με τις μιτοχονδριακές βλάβες καθαυτές (Gogvadze, 2008).

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η παραγωγή του ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια είναι, από την θερμοδυναμική πλευρά, μια υψηλής απόδοσης διαδικασία, η οποία παράγει πολύ περισσότερα μόρια ATP από ένα μόριο γλυκόζης σε σύγκριση με την αντίστοιχη απόδοση της γλυκόλυσης. Συγκεκριμένα η μιτοχονδριακή παραγωγή χημικής ενέργειας ανέρχεται σε 36 μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης προερχόμενα από την οξείδωση ενός μορίου γλυκόζης. Η αντίστοιχη παραγωγή χημικής ενέργειας της γλυκολυτικής οδού από την αναερόβια μετατροπή ενός μορίου γλυκόζης ανέρχεται σε δύο μόρια ATP καθώς και δύο μόρια  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Όμως, η μιτοχονδριακή αναπνευστική λειτουργία μπορεί να

επηρεαστεί από πολλαπλούς παράγοντες, όπως π.χ από προβλήματα ανεπαρκούς λειτουργίας του κύκλου του Krebs, από μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA), δυσλειτουργία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (electron transport chain), μη φυσιολογική έκφραση ενζύμων που εμπλέκονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, ηλεκτρολυτικές διαταραχές, διαταραχές του δυναμικού στις μιτοχονδριακές μεμβράνες, όπως επίσης και την απλή ανεπάρκεια της απαραίτητης ποσότητας οξυγόνου στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον, λόγω παροδικών φαινομένων υποξυγόνωσης ή ισχαιμίας (Mitchell P, 1961; Bruce A et al., 2002; Carew et al., 2002; Penta et al., 2001; Divakaruni and Martin, 2011; Dumas et al., 2012). Άλλωστε, τα μιτοχόνδρια των νεοπλασματικών κυττάρων είναι σχετικά μικρά και παρουσιάζουν ανεπάρκεια της β-F1 υπομονάδας της ATP-συνθάσης (Lopez-Rios et al., 2007). Η διαρκής παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου στα μιτοχόνδρια και το οξειδωτικό στρες των νεοπλασματικών κυττάρων μπορεί να προκαλούν επιπλέον βλάβες και στο μιτοχονδριακό DNA, αλλά και στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ενισχύοντας με τον τρόπο αυτό τις αναπνευστικές δυσλειτουργίες και την εξάρτηση τους από την γλυκολυτική οδό για παραγωγή ενέργειας (Pelicano et al., 2004; Dumas et al., 2012).

Η εμφάνιση κακοήθων εξαλλαγών (μεταλλάξεων) αυξάνει με την ηλικία, ενώ η μεταβολική δραστηριότητα και η κατανάλωση ενέργειας μειώνεται με τη γεροντική παρακμή του οργανισμού. Η αύξηση των κακοήθων εξαλλαγών τείνει να λάβει μια εκθετική πορεία με την πάροδο του χρόνου (Cross et al., 1987)

Υπάρχει δηλαδή μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση της μιτοχονδριακής λειτουργίας και της ανάπτυξης νεοπλασιών και ίσως είναι αιτιολογικής σημασίας (Ristow, 2006). Ο μεταβολισμός λοιπόν των κακοήθων κυττάρων είναι απαραίτητο να διερευνηθεί με πληρότητα προκειμένου η γνώση των φαινομένων του να κεφαλαιοποιηθεί τόσο προς όφελος της θεραπευτικής όσο και για την ενίσχυση της πρόληψης του καρκίνου.

## 1.2. Οξειδωτικός έναντι μη οξειδωτικού μεταβολισμού

Στην εποχή μας, η γλυκόζη είναι ένα πολύ βασικό συστατικό της διατροφής μας και η κύρια θρεπτική ζάχαρη, η σουκρόζη, περιέχει 50% γλυκόζη και 50% φρουκτόζη. Η γλυκόζη μεταφέρεται ενεργητικά στα κύτταρα των θηλαστικών και μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ υπό φυσιολογικές συνθήκες. Το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ ή μεταβολίζεται στα μιτοχόνδρια. Η ενδοκυττάρια ενζυματική οδός που πραγματοποιεί την μετατροπή της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ ονομάζεται γλυκόλυση και λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων είτε παρουσία είτε απουσία οξυγόνου. Για τον λόγο αυτό, πολλοί προκαρυωτικοί, αλλά και κάποιοι κατώτεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, όπως ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae* μπορούν να επιβιώσουν σε συνθήκες πλήρους απουσίας οξυγόνου μέσω της εκτέλεσης αποκλειστικά αναερόβιας γλυκόλυσης (Pasteur, 1861). Οι ανώτεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί και κυρίως τα θηλαστικά έχουν την ανάγκη μιας σταθερής παροχής οξυγόνου προκειμένου να παράγουν την απαραίτητη ποσότητα ενέργειας υπό μορφή ATP για την διεξαγωγή των λειτουργιών της ομοιοστασίας τους και την παραγωγή, επιδιόρθωση και αναπαραγωγή των σωματικών τους δομών.

Η γλυκόλυση παρέχει μικρά ποσά ενέργειας από τη διάσπαση ενός μορίου γλυκόζης. Τα θηλαστικά λοιπόν και γενικότερα οι ανώτεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί μέσω της εξέλιξης έχουν επιτύχει έναν πολύ πιο αποδοτικό τρόπο για την άμεση παραγωγή ενέργειας. Μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης λοιπόν μπορούν να παράγουν 18 φορές περισσότερη ενέργεια σε ό,τι αφορά την γλυκόζη ως καταβολιζόμενο μόριο (και τους εν γένει υδατάνθρακες).

Φυσικά ο κύκλος του Krebs που αποτελεί ένα είδος ενεργειακής «συλλεκτικής λεκάνης απορροής» των μεταβολισμών των υδατανθράκων, των αμινοξέων και των λιπών, είναι ο αποδέκτης των μορίων που τελικά παράγουν τα αναγωγικά ισοδύναμα τα οποία θα οξειδωθούν κατόπιν στην αναπνευστική αλυσίδα και θα οδηγήσουν στην δημιουργία του ATP (Lehninger, 2008). Η εξελικτική έλευση του

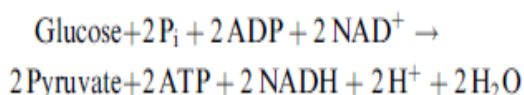
οξειδωτικού μηχανισμού ενεργειακής παραγωγής των εμβίων όντων από την φυλογενετική σκοπιά προέκυψε πιο αργά και μετά την έναρξη της μετατροπής της ατμόσφαιρας του πλανήτη από αναγωγική σε οξειδωτική, μέσω της γενίκευσης της φωτοσύνθεσης (Roodyn and Wilkie, 1968; Hemp and Pace, 2010; Castresana and Saraste, 1995; Schäfer et al., 1996). Η γλυκόλυση ως μεταβολική οδός παραγωγής ενέργειας είναι, κατά τα φαινόμενα, η πλέον αρχαϊκή, που αναδύθηκε στα εναρκτήρια στάδια της δημιουργίας της ζωής στον πλανήτη μας και σε περιβάλλοντα όπου επικρατούσαν αναγωγικές συνθήκες, ενώ το οξυγόνο είχε ήδη δεσμευτεί στα ύδατα των αρχέγονων ωκεανών και στα οξείδια του γήινου φλοιού. Ως εκ τούτου, το βασικό πλεονέκτημα της γλυκόλυσης είναι η μη εξάρτηση από την παρουσία οξυγόνου, ενώ το βασικό μειονέκτημα είναι τα συγκριτικά μικρότερα παραγόμενα ποσά ενέργειας (Stryer, 1995; Lehninger 2008).

Είναι φανερό ότι η γλυκολυτική αλυσίδα επέτρεπε την ζωή υπό μικροσκοπική μορφή, δηλαδή ως προκαρυωτικά είδη μονοκύτταρων οργανισμών, ενώ τα μιτοχόνδρια φαίνεται ότι ήταν βακτήρια που ενσωματώθηκαν μέσα στο πρωτόπλασμα μεγαλύτερων αρχαϊκών κυττάρων, υπό ένα καθεστώς συμβίωσης ή κομενσαλισμού, για να δημιουργηθούν τελικά τα ισχυρά και ευμεγέθη ευκαρυωτικά κύτταρα τα οποία έδωσαν γένεση και στους πολυκύτταρους οργανισμούς, φυτικούς και ζωικούς, μέσω των φαινομένων της εξελικτικής προσαρμοστικής επέκτασης. Χωρίς την πολλαπλάσια παραγωγή ενέργειας η έλευση τόσο των ευκαρυωτικών μονοκύτταρων όσο και των πολυκύτταρων οργανισμών δεν θα ήταν δυνατή (Margulis, 1979, 1991, 1992, 1998, 2002). Από την άλλη πλευρά όταν κάποιο ευκαρυωτικό κύτταρο απωλύει εν όλω ή εν μέρει την αναπνευστική του λειτουργία, στην πρώτη περίπτωση πεθαίνει, ενώ στην δεύτερη περίπτωση χάνει την ικανότητά του να διαφοροποιείται και παραμένει διαρκώς με εμβρυικά χαρακτηριστικά πράγμα το οποίο λαμβάνει συχνά την εικόνα της κυτταρικής κακοήθειας και τον φαινότυπο της νεοπλασματικής νόσου.

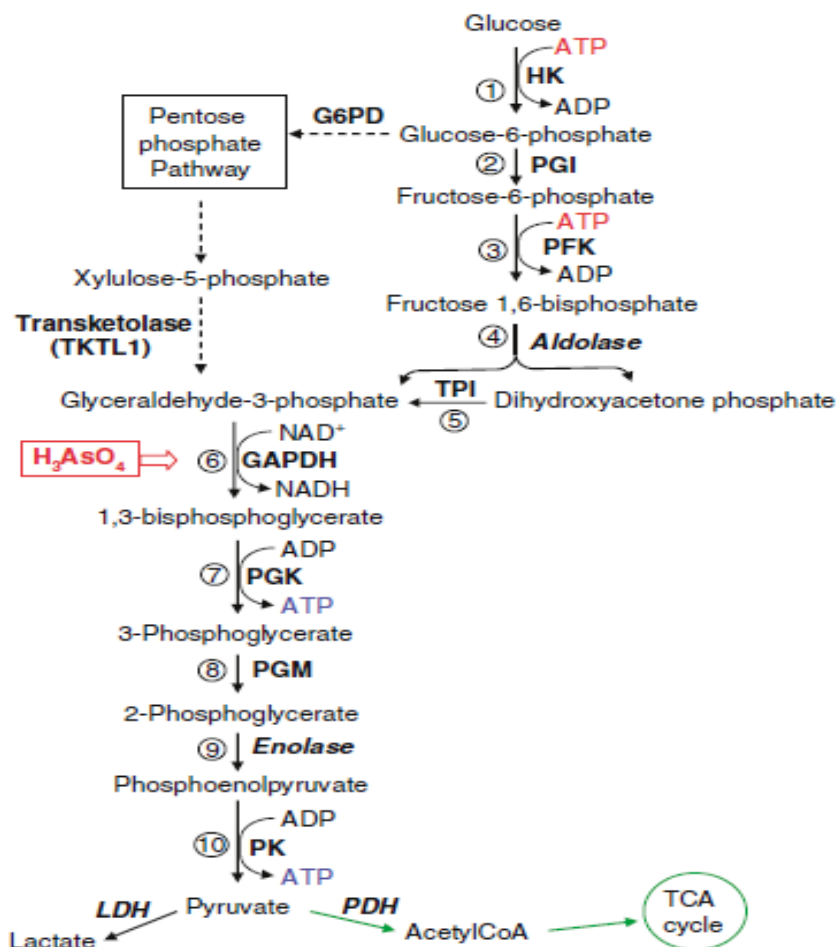


### 1.3. Η γλυκολυτική οδός - Δομή και λειτουργία

Η γλυκόλυση, όπως είδαμε και παραπάνω, είναι εκείνη η αλληλουχία αντιδράσεων η οποία μετατρέπει τη γλυκόζη σε πυροσταφυλικό με την ταυτόχρονη παραγωγή δύο μορίων ATP. Η συνολική γλυκολυτική αντίδραση είναι:



Το γλυκολυτικό μονοπάτι έχει δύο κύρια στάδια. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1, στο πρώτο στάδιο καταναλώνονται δύο μόρια ATP (**Πίνακας 1**) για την μετατροπή της γλυκόζης σε 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη, μέσω διαδοχικών αντιδράσεων που καταλύονται από την εξοκινάση, την ισομεράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης και την φωσφοφρουκτοκινάση. Στο δεύτερο στάδιο, η 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη μετατρέπεται μέσω διαδοχικών αντιδράσεων σε πυροσταφυλικό και παράγονται τέσσερα μόρια ATP και δύο μόρια NADH (**Πίνακας 1**). Κατά τη διάρκεια αυτών των αντιδράσεων καταναλώνονται δύο μόρια ADP και δύο NAD<sup>+</sup>. Σε συνθήκες απουσίας οξυγόνου, το NAD<sup>+</sup> αναγεννιέται από το NADH με τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό οξύ, μια αντίδραση που καταλύεται από την γαλακτική αφυδρογονάση. Παρουσία οξυγόνου, το πυροσταφυλικό οξειδώνεται περαιτέρω εντός των μιτοχονδρίων σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος (TCA) και της αναπνευστικής αλυσίδας, αποδίδοντας μεγάλα ποσά ATP (Stryer, 1995).



**Εικόνα 1:** Το γλυκολυτικό μονοπάτι και η σύνδεση του με την πορεία των φωσφορικών πεντοζών. Τα ενιαία βέλη δείχνουν τις αντιδράσεις της γλυκόλυσης, ενώ τα διακεκομμένα αυτές της πορείας των φωσφορικών πεντοζών. Τα πράσινα βέλη υποδεικνύουν τον περαιτέρω μεταβολισμό του πυροσταφυλικού.

HK: εξοκινάση, PGI: ισομεράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, PFK: φωσφοφρουκτοκινάση, TPI: ισομεράση της φωσφορικής τριόζης, GAPDH: αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης, PGK: κινάση του φωσφογλυκερικού, PGM: μουτάση του φωσφογλυκερικού, PK: Κινάση του πυροσταφυλικού, PDH: πυροσταφυλική αφυδρογονάση, LDH: γαλακτική αφυδρογονάση.

Όπως παρατηρείται και στην **Εικόνα 1**, κάθε αντίδραση καταλύεται από ένα ειδικό ένζυμο. Επιπρόσθετα, πρόσφατες δημοσιεύσεις προτείνουν τα γλυκολυτικά ένζυμα ως πρωτεΐνες με πολλαπλές λειτουργίες. Για παράδειγμα, η εξοκινάση, η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) και η ενολάση

εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγραφής (Niederacher and Entian, 1991; Herrero et al., 1995; Feo et al., 2000; Rodriguez et al., 2001; Zheng et al., 2003). Η εξοκίνηση και η GAPDH εμπλέκονται στη ρύθμιση του αποπτωτικού μηχανισμού (Ishitani and Chuang, 1996; Shashidharan et al., 1999; Tajima et al., 1999; Dastoor and Dreyer, 2001; Gottlob et al., 2001; Pastorino et al., 2002; Rathmell et al., 2003; Majewski et al., 2004) και η ισομεράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα κίνησης του κυττάρου (Liotta et al., 1986; Nabi et al., 1990; Watanabe et al., 1996; Niinaka et al., 1998; Sun et al., 1999).

Επιπλέον, παρόλο που η γλυκόλυση είναι το κλασικό μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής πυροσταφυλικού οξέος, άλλες μεταβολικές αντιδράσεις, όπως η μετατροπή της 5-φωσφορικής ξυλουλόζης σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη από την τρανσετολάση μέσω της πορείας των φωσφορικών πεντοζών, παράγουν τα μεταβολικά ενδιάμεσα που οδηγούν στο δεύτερο στάδιο της γλυκόλυσης, αποδίδοντας πυροσταφυλικό και ATP. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η υπερέκφραση του ενζύμου της τρανσκετολάσης (TKTL1) στα νεοπλασματικά κύτταρα (Coy et al., 2005). Οι συγγραφείς υποστηρίζουν πως αφού η τρανσκετολάση ρυθμίζει τον μεταβολισμό της γλυκόζης στην πορεία των φωσφορικών πεντοζών, η υπερέκφραση της μπορεί να προκαλεί αύξηση του ρυθμού της πορείας αυτής και κατά συνέπεια αυξημένη παραγωγή της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης που στη συνέχεια χρησιμοποιείται στο δεύτερο στάδιο της γλυκολυτικής πορείας (Coy et al., 2005).

Αντίδραση	Ανάλωση (-) ή παραγωγή (+) ATP ανά μόριο γλυκόζης
Γλυκόζη → 6 - Φωσφορική γλυκόζη	-1
6 - Φωσφορική φρουκτόζη → 1,6 - Διφωσφορική φρουκτόζη	-1
2x1,3 διφωσφογλυκερινικό → 2x3 φωσφογλυκερινικό	+2
2 x Φωσφοενολοπυροσταφυλικό → 2 x πυροσταφυλικό	+2
	Καθαρή παραγωγή +2

**Πίνακας 1:** Παραγωγή και κατανάλωση του ATP κατά τη γλυκόλυση.

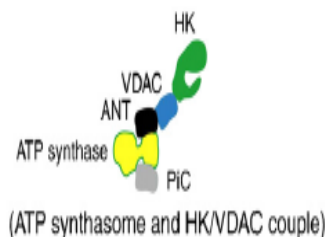
### Εξοκινάση

Η πρώτη αντίδραση της γλυκολυτικής οδού είναι η μετατροπή της γλυκόζης σε 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη, και καταλύεται από ισοένζυμα που έχουν εκλεκτικότητα στο υπόστρωμα, γνωστά ως εξοκινάσες. Η φωσφορυλίωση της γλυκόζης από το ATP και η μετατροπή της σε 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη οδηγεί στην παγίδευσή της στο εσωτερικό του κυττάρου. Η 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη είναι το σημείο εκκίνησης είτε της γλυκολυτικής οδού είτε της πορείας των φωσφορικών πεντοζών (**Εικόνα 1**). Στα θηλαστικά έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερα ισοένζυμα της εξοκινάσης (Τύποι I–IV). Το ισοένζυμο τύπου IV αναφέρεται και ως γλυκοκινάση και υπάρχει στα ηπατικά κύτταρα. Η γλυκοκινάση έχει υψηλότερη  $K_m$  για τη γλυκόζη, σε σχέση με τα υπόλοιπα ισοένζυμα. Η ρύθμιση της παραγωγής της είναι επίσης διαφορετική. Οι εξοκινάσες I, II και III αναστέλλονται αλλοστερικά από την ποσότητα του προϊόντος (G-6-P), ενώ οι γλυκοκινάσες όχι. Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν στην αποθήκευση της γλυκόζης στο ήπαρ όταν υπάρχει περίσσεια αυτής. Οι εξοκινάσες είναι μόρια με μήκος 100 kDa και υποστηρίζεται ότι εξελίχθηκαν μέσω του διπλασιασμού του γονιδίου που κωδικοποιούσε την αρχέγονη μορφή της εξοκινάσης μήκους 50 kDa. Έτσι, τα ισοένζυμα αυτά έχουν επαναλαμβανόμενες ακολουθίες βάσεων και τα αμινοτελικά (N-terminal) και καρβοξυτελικά (C-terminal) άκρα τους έχουν πολύ μεγάλη ομοιότητα ως προς την ακολουθία βάσεων (Bork et al., 1993; Wilson, 1995; Cardenas et al, 1998). Αυτό υποδεικνύει ότι η εξοκινάση έφτασε σχετικά πρώιμα σε μια μορφή μεγάλης

απόδοσης, η οποία έκτοτε παρουσιάζει μικρές οριακές μεταβολές κατά την εξέλιξη της ζωής, όπως συμβαίνει π.χ και με το κυτόχρωμα c.

Πολλές μελέτες υποδεικνύουν πως η εξοκινάση, και κυρίως η εξοκινάση II (HK II), παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην έναρξη και την διατήρηση του υψηλού ρυθμού της γλυκόλυσης στα ταχέως αναπτυσσόμενα νεοπλάσματα. Οι περισσότεροι τύποι κακοήθων κυττάρων υπερεκφράζουν την HK II και ίσως για τον λόγο αυτό ίσως έχουν αυξημένους γλυκολυτικούς ρυθμούς (Bustamante and Pedersen, 1977; Arora et al., 1990; Rempel et al., 1996; Mathupala et al., 2009).

Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, οι εξοκινάσες είναι είτε ελεύθερες στο κυτοσόλιο είτε προσδεδεμένες στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Wilson, 2003). Η εξοκινάση που είναι προσδεδεμένη στα μιτοχόνδρια φαίνεται να έχει ένα πλεονέκτημα στην χρήση του ATP, που παράγεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση, ως υπόστρωμα για να φωσφορυλιώσει τα μόρια της γλυκόζης (Golshani-Hebroni and Bessman, 1997; Pastorino and Hoek, 2003). Υπολογίζεται πως, υπό φυσιολογικές συνθήκες το 70% της κυτταρικής εξοκινάσης είναι συνδεμένο με τα μιτοχόνδρια (Lynch et al., 1991). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν πως η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι άμεσα συζευγμένη με την γλυκολυτική οδό μέσω της προσδεδεμένης στα μιτοχόνδρια εξοκινάσης. Επιπρόσθετα, η εξοκινάση προσδέεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων στις θέσεις που εντοπίζεται ο τασεοεξαρτόμενος διάυλος ανιόντων (VDAC) (Wilson, 2003). Το γεγονός αυτό τοποθετεί το σύμπλεγμα σε στενή σύνδεση με τον ANT, ο οποίος εκτείνεται σε όλη την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και διευκολύνει την ανταλλαγή κυτταροπλασματικού ADP με ATP από τα μιτοχόνδρια.



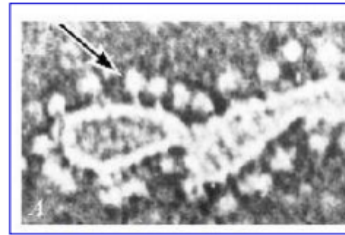
**Εικόνα2:** Σύζευξη της εξοκινάσης με το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα της μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν πως ο VDAC/ANT παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης και στην απελευθέρωση των αποπτωτικών παραγόντων, όπως το κυτόχρωμα c. Άρα η εξοκινάση ίσως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό της απόπτωσης. Για παράδειγμα, η δραστηριότητα της μιτοχονδριακής εξοκινάσης φαίνεται να είναι απαραίτητη για την κυτταρική επιβίωση και η σηματοδότηση της Akt (πρωτεϊνική κινάση Β) ενισχύει την σύνδεση μεταξύ εξοκινάσης και VDAC στην μιτοχονδριακή μεμβράνη και την δραστηριότητα της με αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης (Gottlob et al., 2001; Bryson et al., 2002). Όμως ο ακριβής μηχανισμός για την αντιαποπτωτική δράση της παραμένει ασαφής. Η ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής εξοκινάσης από την Akt φαίνεται ότι αναστέλλει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και την απόπτωση μέσω ανταγωνισμού με την προαποπτωτική λειτουργία του tBid, έναν ενεργοποιητή των αποπτωτικών μορίων Bax και Bak (Pastorino et al., 2002; Rathmell et al., 2003; Majewski et al., 2004). Έτσι, η εξοκινάση και η σύνδεσή της με το σύμπλεγμα των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό της γλυκόζης και στον μηχανισμό της απόπτωσης. Η αναστολή του ενζύμου αυτού είναι πιθανό να δημιουργεί σοβαρές επιπτώσεις στον μεταβολισμό και την κυτταρική επιβίωση. Αντιπροσωπεύει συνεπώς έναν ελκυστικό στόχο για νέα αντικαρκινικά φάρμακα.

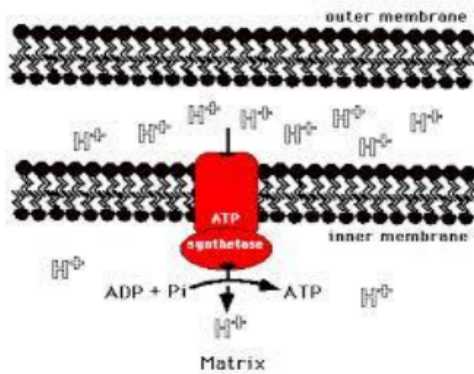
[23]



Εικόνα 3: Εξωτερική μεμβράνη μιτοχονδρίου.



Αρνητική χρώση. Μισχωτά σφαιρίδια  
διαμέτρου 90Å (βέλος) X300.000



Εικόνα 4: Εσωτερική μεμβράνη μιτοχονδρίου και ανταλλαγή ιόντων ανάμεσα στην εξωτερική και εσωτερική μεμβράνη.

### Ισομεράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης

Η μετατροπή της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική φρουκτόζη καταλύεται από την ισομεράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (PGI), η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην γλυκολυτική πορεία, όσο και στην γλυκονεογένεση (Harrison, 1974). Σύμφωνα με έρευνες, η GPI λειτουργεί επίσης και ως AMF, ο οποίος αποσιωπάται από τα καρκινικά κύτταρα έτσι ώστε να προάγουν τον κυτταρικό τους πολλαπλασιασμό (Niinaka et al., 1998; Sun et al., 1999). Ο AMF και ο υποδοχέας του, AMFR, έχουν ταυτοποιηθεί στο μελάνωμα και σε άλλα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα και έχει αποδειχθεί ότι η αλληλεπίδραση AMF/ AMFR διεγείρει *in vitro* την μεταστατική ικανότητα των κυττάρων και ενισχύει την μετάσταση και την αγγειογένεση *in vivo* (Liotta et al., 1986; Nabi et al., 1990; Watanabe et al., 1996; Funasaka et al., 2001, 2002). Ο AMF υπερεκφράζεται σε πολλά μεταστατικά νεοπλάσματα και συνδέεται με φτωχή πρόγνωση (Hirono et al., 1996). Η παρουσία της GPI στον ορό και στα ούρα σχετίζεται την ανάπτυξη του όγκου και σχετίζεται επίσης με φτωχή πρόγνωση (Baumann and Brand, 1988; Baumann et al., 1990; Filella et al., 1991). Η PGI εκφράζεται περισσότερο σε συνθήκες υποξίας (Yoon et al., 2001; Niizeki et al., 2002). Με τον τρόπο αυτό, η GPI λειτουργεί και ως κυτοκίνη εξωκυττάρια και συνδέεται με την επιθετικότητα των νεοπλασιών.

### Φωσφοφρουκτοκινάση

Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μετατροπή της 6-φωσφορικής φρουκτόζης σε 1,6-Διφωσφορική φρουκτόζη, καταναλώνοντας ATP. Η φωσφοφρουκτοκινάση ρυθμίζεται αλλοστερικά από το 2,3- Διφωσφογλυκερικό (DPG) (Layzer et al., 1969). Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί τρεις τύποι φωσφοφρουκτοκινάσης (I,II,III) , στους μυς(M), το ήπαρ(L) και στα αιμοπετάλια(P) (Vora, 1983). Στον εγκέφαλο έχουν βρεθεί και οι τρεις τύποι της φωσφοφρουκτοκινάσης (Sanchez-Martinez & Aragon , 1997; Wood & Trayhurn, 2003). Σε διαφορετικούς τύπους νεοπλασιών στον άνθρωπο και στον αρουραίο, και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, οι υπομονάδες P, L ή και οι δύο, υπερισχύουν της υπομονάδας M (Vora et al., 1985; Sanchez-Martinez



& Aragon , 1997; Oskam et al., 1985). Από την άλλη μεριά, η έκφραση των ισομορφών M και L αυξάνεται στο γλοίωμα (Staal et al., 1987), ενώ στις λευχαιμίες και στο αδενοκαρκίνωμα τραχήλου μήτρας κυριαρχεί η H ισομορφή (Vora et al., 1985). Είναι επίσης γνωστό πως η PFK-1 σε κάποιες καρκινικές κυτταρικές σειρές είναι λιγότερο ευαίσθητη στην αναστολή από το ATP και το κιτρικό σε σχέση με την PFK-1 που εκφράζεται στα φυσιολογικά κύτταρα (Meldolesi et al., 1976; Oskam et al., 1985; Staal et al., 1987). Έχει επίσης αναφερθεί η αυξημένη ενεργοποίηση από τον AMP της PFK-1 στα καρκινικά κύτταρα, αλλά δεν έχει εκτιμηθεί περαιτέρω (Meldolesi et al., 1976; Marin-Hernandez et al., 2006). Τέλος, η PFK-1 έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται σε κάποιες καρκινικές κυτταρικές σειρές από 17-300 φορές (Marin-Hernandez et al., 2006; Nakashima et al., 1988; Stubbs et al., 2003), ενώ σε κάποιες άλλες υποεκφράζεται (1,3- 2,5 φορές) ή εκφράζεται στα ίδια επίπεδα με τα φυσιολογικά κύτταρα (Lowry et al., 1983; Vora et al., 1985; Meldolesi et al., 1976; Staal et al., 1987).

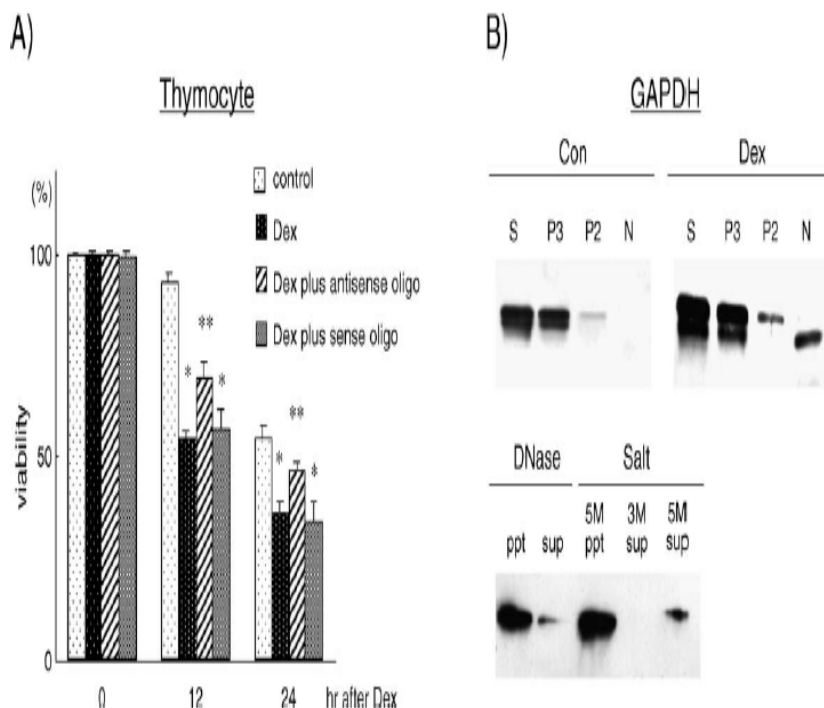
### Αλδολάση

Η αλδολάση καταλύει την αντιστρεπτή μετατροπή της 1,6-Διφωσφορικής φρουκτόζης σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και φωσφορική διυδροξυακετόνη. Η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη παίρνει μέρος στη μεταβολική πορεία της γλυκόλυσης, όχι όμως και η φωσφορική διυδροξυακετόνη η οποία μετατρέπεται εύκολα σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη. Οι ενώσεις αυτές είναι ισομερείς (Stryer, 1995). Είναι ένα τετραμερές από πανομοιότυπες υπομονάδες, 40 kDa η καθεμία. Έχουν ταυτοποιηθεί τρία διακριτά ισοένζυμα (A-C). Το ένζυμο αυτό έχει βρεθεί σε υψηλά επίπεδα στον ορό ασθενών με νεοπλασίες (Taguchi and Takagi, 2001). Έρευνα μέσω πρωτεωμικής ανάλυσης υποδεικνύει πως υπερεκφράζεται στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Li et al., 2006).

### Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης

Η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης είναι ένα καλά μελετημένο ένζυμο της γλυκολυτικής οδού που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που εκφράζεται στα περισσότερα κύτταρα. Το ένζυμο αυτό καταλύει μια βασική αντίδραση οξειδοαναγωγής από την οποία παράγεται μια φωσφορική ένωση υψηλής ενέργειας: τη μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης σε 1,3-Διφωσφογλυκερικό, με ταυτόχρονη μετατροπή του  $\text{NAD}^+$  σε  $\text{NADH}$  (Stryer, 1995). Η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης είναι ένα μοναδικό ένζυμο σε σχέση με τα υπόλοιπα ένζυμα της γλυκολυτικής αλυσίδας λόγω της ικανότητας του να δεσμεύει  $\text{NAD}^+$  ή  $\text{NADH}$  και επίσης της δυνατότητας πρόσδεσης στο DNA και στο RNA (Perucho et al., 1980; Grosse et al., 1986; Nagy et al., 2000). Αυτή η μοναδική ικανότητα του εν λόγω ενζύμου του επιτρέπει να εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως η ενδοκυττάρωση, η αναδίπλωση της κυτταρικής μεμβράνης, η μεταφορά του πυρηνικού tRNA και η αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA (Sirover, 2005). Στον πυρήνα του κυττάρου βρίσκεται ανάλογα με την φάση του κυτταρικού κύκλου (Mansur et al., 1993). Έχει επίσης ανακαλυφθεί πως η πυρηνική GAPDH παίζει έναν ουσιώδη ρόλο στη διατήρηση των τελομερών (Sundararaj et al., 2004).

Η GAPDH εμπλέκεται και στον αποπτωτικό μηχανισμό όταν μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου (Chuang et al., 2005), παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει ως τώρα προσδιοριστεί. Επιπρόσθετα, προσδέεται στον υποδοχέα ινοσιτόλης (IP3R) ρυθμίζοντας τα επίπεδα ασβεστίου (Patterson et al., 2005). Πρόσφατες μελέτες την εμπλέκουν και στη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από οξειδωτικό στρες (Chen et al., 1999; Dastoor et al., 2001; Maruyama et al., 2001).



**Εικόνα 5:** Πυρηνική μετατόπιση της GAPDH στην απόπτωση (Sawa et al., 1997)

### Κινάση του φωσφογλυκερικού

Στο επόμενο στάδιο της γλυκολυτικής οδού, το υψηλό δυναμικό μεταφοράς φωσφορικής ομάδας του 1,3-διφωσφογλυκερικού χρησιμοποιείται για την παραγωγή ATP. Πραγματικά, αυτή είναι η πρώτη αντίδραση παραγωγής ATP στη γλυκόλυση. Η κινάση του φωσφογλυκερικού καταλύει τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας από το ακετυλοφωσφορικό του 1,3-διφωσφογλυκερικού προς το ADP. Τα προϊόντα είναι το ATP και το 3-φωσφογλυκερικό (Stryer, 1995). Δύο ισοένζυμα της PGK έχουν βρεθεί. Η PGK-1 εκφράζεται σε όλα τα σωματικά κύτταρα, ενώ η PGK-2 φαίνεται να εκφράζεται μόνο στα σπερματοζωάρια (VandeBerg, 1985). Η κινάση του φωσφογλυκερικού αποτελείται από δύο τμήματα που συνδέονται με έναν εύκαμπτο σύνδεσμο και το σημείο πρόσδεσης του ADP/ATP βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο, ενώ η θέση πρόσδεσης του φωσφογλυκερικού βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο.

### Μουτάση του φωσφογλυκερικού

Το γλυκολυτικό ένζυμο μουτάση του φωσφογλυκερικού καταλύει τη μετατροπή του 3-φωσφογλυκερικού σε 2-φωσφογλυκερικό. Μία πρόσφατη έρευνα, μέσω της πρωτεωμικής ανάλυσης, υποδεικνύει πως το ένζυμο αυτό υπερεκφράζεται στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Li et al., 2006).

### Ενολάση

Η ενολάση καταλύει τη μετατροπή του 2-φωσφογλυκερικού σε φωσφοενολοπυροσταφυλικό. Το ένζυμο αυτό είναι υψηλά διατηρημένο, και τα ισοένζυμα του έχουν ελάχιστες διαφορές στην κινητική τους (Marangos et al., 1978). Τρία κύρια ισοένζυμα έχουν ταυτοποιηθεί στα θηλαστικά. Το  $\alpha$ -ισοένζυμο εκφράζεται σε εμβρυϊκά κύτταρα και σε άλλους τύπους κυττάρων, το  $\beta$ -ισοένζυμο εκφράζεται στους γραμμωτούς μύες, ενώ το  $\gamma$ -ισοένζυμο είναι ειδικό προς τους νευρώνες. Μια πρόσφατη πρωτεωμική ανάλυση έδειξε πως υπερεκφράζεται στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Li et al., 2006).

### Κινάση του πυροσταφυλικού

Στο επόμενο στάδιο, το πυροσταφυλικό παράγεται ταυτόχρονα με το ATP. Η σχεδόν μη αντιστρεπτή μεταφορά της φωσφορικής ομάδας από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό προς το ADP καταλύεται από την κινάση του πυροσταφυλικού. Το πυροσταφυλικό είναι ένα πολύ σημαντικό μεταβολικό ενδιάμεσο που διοχετεύεται σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια. Η κινάση του πυροσταφυλικού είναι ένα τετραμερές που ενεργοποιείται αλλοστερικά από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό και υφίσταται αρνητική ρύθμιση από το ATP. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν κυρίως το ισοένζυμο της PK τύπου M2 (M2-PK), το οποίο ρυθμίζει την αναλογία των ανθράκων της γλυκόζης που θα χρησιμοποιηθούν για τις διεργασίες σύνθεσης ή για την παραγωγή ενέργειας. Η M2-PK φαίνεται να αλληλεπιδρά άμεσα με κάποιες

ογκοπρωτεΐνες. Αυτός ο μηχανισμός ρύθμισης ίσως επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να επιβιώνουν σε περιβάλλοντα με ευρύ φάσμα οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών (Mazurek et al., 2005).

### Γαλακτική αφυδρογονάση

Η γαλακτική αφυδρογονάση είναι ένα τετραμερές δύο υπομονάδων (A, B) και κωδικοποιείται από δύο διαφορετικά γονίδια. Το ένζυμο αυτό καταλύει την μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό οξύ που συνοδεύεται από την οξείδωση του NADH σε NAD<sup>+</sup>, η οποία είναι απαραίτητη για το γλυκολυτικό μονοπάτι. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι το LDH-A γονίδιο ελέγχεται από τον (HIF)-1α (Παράγοντας 1α επαγόμενος από υποξία), ενώ το LDH-B γονίδιο δεν ρυθμίζεται από τις συνθήκες μειωμένου οξυγόνου. Εκτός από τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει στον μεταβολισμό της γλυκόζης, το ισόένζυμο LDH-A είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται σε μονές αλυσίδες του DNA (Cattaneo et al., 1985; Grosse et al., 1986). Επίσης η LDH-5, εμπλέκεται στην μεταγραφή του DNA (Williams et al., 1985). Η πρόσδεση της LDH-A στις μονές αλυσίδες του DNA αναστέλλεται από το NADH, το οποίο προκαλεί αλλαγή της στερεοδιάταξης της και μειώνει την ικανότητα της να προσδεθεί στο DNA (Cattaneo et al., 1985; Williams et al., 1985). Πιο πρόσφατες έρευνες αναφέρουν πως οι γαλακτικές αφυδρογονάσες A και B είναι συστατικά ενός μεταγραφικού ενεργοποιητή που εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο (Zheng et al, 2003). Αυτές οι παρατηρήσεις μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι κλάσματα της LDH έχουν σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA και στη μεταγραφή του RNA.

#### 1.4. Το παρακύκλωμα(shunt) των Rapoport – Luebering στην γλυκόλυση

Σε κάποιο σημείο της διαδρομής της γλυκόλυσης παρατηρείται η ύπαρξη μιας μικρής διακλάδωσης η οποία συγκλίνει κατόπιν ξανά στο κύριο ρεύμα των γλυκολυτικών αντιδράσεων, αφού προηγουμένως δημιουργήσει έναν αξιόλογο μεταβολίτη, το 2,3-διφωσφογλυκερικό οξύ (2,3 – diphosphoglyceric acid ή συντομογραφικώς 2,3-DPG). Η μικρή αυτή διακλάδωση που οδηγεί στην παραγωγή του 2,3-DPG είναι επίσης γνωστή ως παρακύκλωμα (shunt) των Rapoport – Luebering, από τα ονόματα των ερευνητών που εντόπισαν την ύπαρξή της (Rapoport and Guest, 1939; Rapoport and Wing, 1947; Rapoport and Luebering, 1950, 1951, 1952). Η διακλάδωση αυτή της γλυκόλυσης περιλαμβάνει το ένζυμο 2,3-διφωσφογλυκερική μούτάση, η οποία χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το 1,3-διφωσφογλυκερικό οξύ που μετασχηματίζει σε 2,3-διφωσφογλυκερικό οξύ (2,3-DPG). Ο νέος αυτός μεταβολίτης διασπάται από το ένζυμο 2,3-διφωσφογλυκερική φωσφατάση η οποία του αποσπά μια φωσφορική ρίζα και το μετατρέπει σε 3-φωσφογλυκερικό οξύ. Η ενεργοποίηση του παρακυκλώματος Rapoport – Luebering προκαλεί απώλεια σχηματισμού ενός μορίου ATP (φωσφορυλίωση του ADP από το 1,3-διφωσφογλυκερικό οξύ μέσω της φωσφογλυκερικής κινάσης) οπότε ο ρόλος του αρχικά θεωρήθηκε ως ένας τρόπος μάταιας αχρήστευσης χημικής ενέργειας, αλλά αργότερα έγινε κατανοητό ότι το 2,3-DPG εντείνει την αερόβια παραγωγή ATP καθόσον αναγκάζει την αιμοσφαιρίνη να απελευθερώσει όλο της το οξυγόνο (Benesch, 1967; Chanutin and Curnish, 1967). Η απώλεια ενέργειας μέσω του παρακυκλώματος Rapoport – Luebering είναι ίση προς 14 kcal. Τις δεκαετίες του 70, 80, 90 ανεξάρτητοι ερευνητές έδειξαν ότι ο ρόλος του 2,3- DPG εκτείνεται και πέραν της απελευθέρωσης οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη καθόσον ο μεταβολίτης αυτός είναι σε θέση να αναστείλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Iatridis et al., 1975; Iatridis et al, 1986; Evangelou et al., 1990; Karkabounas et al., 1972; Daskalou et al., 2005). Η ανακάλυψη του 2,3-DPG γίνεται μεταξύ του 1920 και 1930 στα ερυθροκύτταρα χωρίς ωστόσο να είναι γνωστός ο φυσιολογικός του ρόλος (Greenwald, 1925). Η ουσιαστική λειτουργική σημασία του παρακυκλώματος

Rapport – Luebering αρχίζει να αποσαφηνίζεται τα τέλη της δεκαετίας του 1960 (Benesch, 1967; Chanutin and Curnish, 1967). Έτσι το 1967 από ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες διαπιστώνεται ότι το 2,3-DPG επιδρά επί του μορίου της αιμοσφαιρίνης προκαλώντας μια δοσοεξαρτώμενη αύξηση της απελευθέρωσης οξυγόνου από αυτήν. Κατόπιν γίνεται γνωστό ότι η δράση του 2,3-DPG έχει μοριακή σχέση προς την αιμοσφαιρίνη(Hb) 1 : 1, δηλαδή ένα μόριο 2,3-DPG επιφέρει την αποδέσμευση του O<sub>2</sub> του σνδεδεμένου σε ένα μόριο αιμοσφαιρίνης, αλλά η πρόσδεση του εν λόγω οργανικού εστέρα διευκολύνει την περαιτέρω αποδέσμευση του οξυγόνου από τις άλλες αιμοσφαιρινικές αλυσίδες, υποδεικνύοντας ότι η μεταξύ τους αλληλεπίδραση έχει το χαρακτήρα ενζυμικής αντίδρασης και ότι το συγκεκριμένο οργανοφωσφορικό βιομόριο λειτουργεί ως αλλοστερικός ρυθμιστής των αιμοσφαιρινικών αλυσίδων καθιστώντας σαφές ότι η αιμοσφαιρίνη έχει τον χαρακτήρα αλλοστερικού ενζύμου (Benesch, 1967; Chanutin and Curnish, 1967). Το 2,3-DPG εισέρχεται στο κέντρο της κοιλότητας του εκπτυχθέντος μορίου της αιμοσφαιρίνης και αντιδρά με τις β-αλυσίδες αυτής, ειδικότερα στην αναχθείσα της μορφή ελαττώνοντας την χημική της συγγένεια με το οξυγόνο. Το μέγεθος της κεντρικής κοιλότητας της Hb είναι μικρό και επιτρέπει την πρόσδεση ενός και μόνον μορίου 2,3-DPG υπό την προϋπόθεση ότι το μόριο της Hb ευρίσκεται στην κατάσταση T (τεταμένη ή Taut). Η μετάβαση της αιμοσφαιρίνης στην τεταμένη της διαμόρφωση σημαίνει γεωμετρικά ότι το διάστημα μεταξύ των ελίκων H και των αλυσίδων β είναι επαρκές για την προσέγγιση του εν λόγω διφωσφογλυκερικού εστέρα. Το 2,3-DPG συζευγνύεται μέσω αλατούχων δεσμών με τα άτομα του O<sub>2</sub> και μέσω αμινοτελικών ομάδων με συγκεκριμένα αμινοξέα (ValNA<sub>1</sub>, LysEF<sub>6</sub> και HisH<sub>21</sub>) του πρωτεϊνικού μορίου. Με τον τρόπο αυτό το 2,3-DPG σταθεροποιεί την αναχθείσα μορφή της αιμοσφαιρίνης δημιουργώντας δεσμούς με τις β-αλυσίδες καθώς και άλλους δεσμούς άλατος (ιοντικούς) οι οποίοι σπάζουν προκειμένου να προκληθεί η μετάπτωση της εν λόγω πρωτεΐνης προς την μορφή R (relaxed). Με τον τρόπο αυτό το 2,3-DPG αναγκάζει την αιμοσφαιρίνη να αποδώσει το οξυγόνο της και η συνολική δράση του είναι μια μετατόπιση της καμπύλης απόδοσης οξυγόνου

προς τα δεξιά, δηλαδή αύξηση του αποδιδόμενου οξυγόνου ανάλογα με τις συγκεντρώσεις του 2,3-DPG στα ερυθροκύτταρα.

Το παρακύκλωμα των Rapoport – Luebering έχει μελετηθεί κατά κύριο λόγο στα ερυθροκύτταρα και αφορά την γενικότερη λειτουργία της απελευθέρωσης οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη μέσω των διακυμάνσεων του 2,3-DPG οι οποίες παρακολουθούν την μεταβολή της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου στο αίμα. Όταν οι συγκεντρώσεις του οξυγόνου ελαττώνονται η παραγωγή του 2,3-DPG αυξάνεται και αντιστρόφως ούτως ώστε να υπάρξει μια σχετική σταθεροποίηση της μέσης συγκέντρωσης του οξυγόνου στα υγρά του αίματος και κατ' επέκταση στους ιστούς.



### **1.5. Ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός ως πλεονέκτημα των καρκινικών κυττάρων**

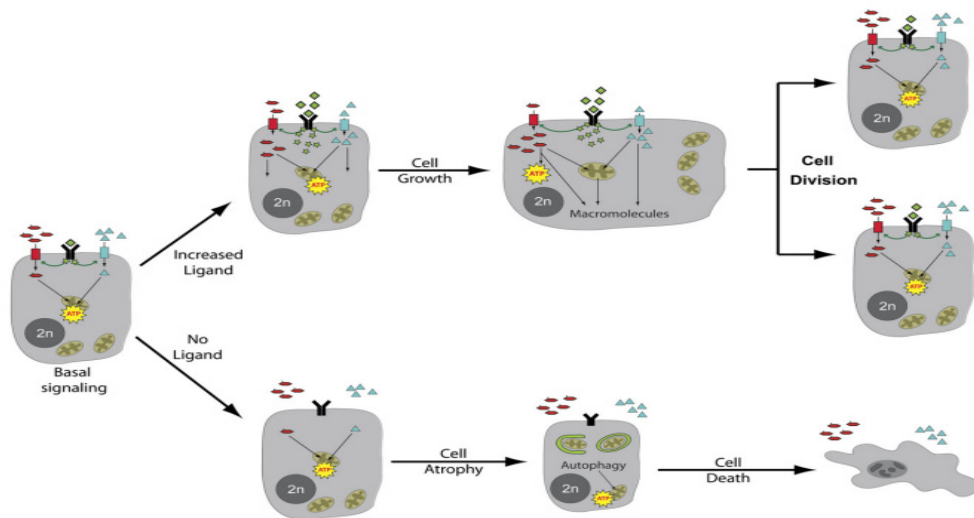
Ο υψηλός γλυκολυτικός ρυθμός δίνει αρκετά πλεονεκτήματα στα καρκινικά κύτταρα. Καταρχήν, μέσω της αερόβιας γλυκόλυσης, τα κύτταρα μπορούν να επιβιώσουν στις μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις οξυγόνου (λόγω ασταθούς αιμοδυναμικής των απομακρυσμένων αιμοφόρων αγγείων) που θα ήταν θανατηφόρες για τα κύτταρα αν βασίζονταν αποκλειστικά στην οξειδωτική φωσφορυλίωση για την παραγωγή του ATP (Pouyssegur et al., 2006).

Κατά δεύτερον, το παραγόμενο από την αερόβια γλυκόλυση γαλακτικό οξύ, έχει βρεθεί πως ευνοεί την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Swietach et al., 2007), και καταστέλλει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Fischer et al., 2007).

Τρίτον, οι όγκοι μπορούν να μεταβολίσουν την γλυκόζη μέσω της πορείας των φωσφορικών πεντοζών για τη δημιουργία NADPH που εξασφαλίζει την αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου σε ένα εχθρικό περιβάλλον δημιουργούμενο από τα αντικαρκινικά φάρμακα (Gatenby and Gillies, 2004).

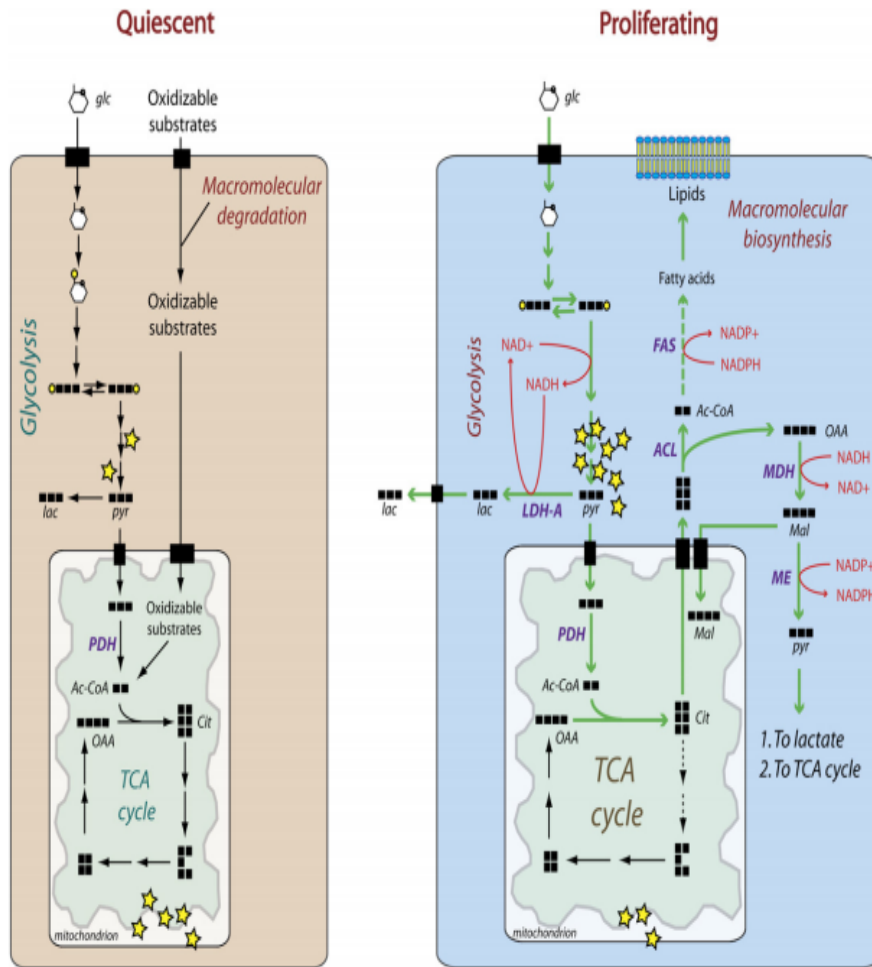
Τέταρτον, η διάσπαση της γλυκόζης παρέχει στα κύτταρα τα ενδιάμεσα μόρια που είναι απαραίτητα για τα βιοσυνθετικά μονοπάτια, όπως τα σάκχαρα της ριβόζης για τα νουκλεοτίδια, η γλυκερόλη και το κιτρικό για τα λιπίδια, και το NADPH για την πορεία των φωσφορικών πεντοζών. Άρα, το φαινόμενο Warburg ωφελεί και την βιοενεργητική και την βιοσύνθεση (DeBarardinis, et al, 2008).

Αυτό που παραμένει αμφιλεγόμενο για το φαινόμενο Warburg, είναι γιατί ο ρυθμός της παραγωγής γαλακτικού οξέος είναι τόσο υψηλός τη στιγμή που περισσότερο πυροσταφυλικό οξύ θα μπορούσε να οξειδωθεί για να παραχθεί ATP. Μία εξήγηση είναι πως απλά η γλυκόλυση υπερβαίνει την μέγιστη ταχύτητα της οξείδωσης του πυροσταφυλικού, και τα κύτταρα πρέπει να περιορίσουν την συσσώρευση του πυροσταφυλικού οξέος. Η έκφραση της γαλακτικής αφυδρογονάσης λύνει το πρόβλημα αυτό μέσω της ταχείας κατανάλωσης του, αναγεννώντας  $\text{NAD}^+$ , ενώ το προϊόν (γαλακτικό οξύ) μπορεί εύκολα να εκκριθεί (Fantin et al., 2006). **(Εικόνα 6)**.



**Εικόνα 6:** Η σηματοδότηση από τους αυξητικούς παράγοντες ρυθμίζει την πρόσληψη και τον μεταβολισμό των εξωκυττάρων θρεπτικών συστατικών.

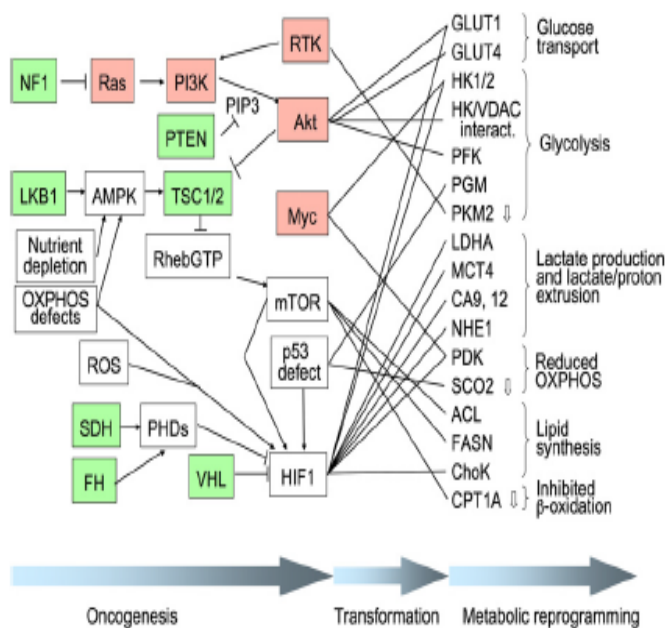
Ένα επιπλέον πλεονέκτημα του υψηλού γλυκολυτικού ρυθμού είναι ότι επιτρέπει στα κύτταρα να τελειοποιήσουν τον έλεγχο των βιοσυνθετικών μονοπατιών που χρησιμοποιούν τα ενδιάμεσα προϊόντα του γλυκολυτικού μεταβολισμού. Όταν ένα υψηλής ροής μεταβολικό μονοπάτι διακλαδώνεται με ένα μονοπάτι χαμηλής ροής, η ικανότητα να διατηρηθεί η δραστηριότητα του τελευταίου μεγιστοποιείται όταν η ροή μέσω του προηγούμενου είναι υψηλότερη. Στα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται, αυτό έχει προταθεί ως ένας τρόπος να επιλυθεί το προφανές παράδοξο μεταξύ της ανάγκης ατόμων άνθρακα, προερχόμενων από τη γλυκόζη, για την σύνθεση των μακρομορίων και του υψηλού ρυθμού παραγωγής γαλακτικού οξέος (Newsholme et al, 1985)(**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7: Η ροή του άνθρακα σε φυσιολογικά και νεοπλασματικά κύτταρα.

## 1.6. Μηχανισμοί του μεταβολικού επαναπρογραμματισμού

Οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό των καρκινικών κυττάρων είναι ιδιαίτερα πολύπλοκοι (**Εικόνα 8**). Οι μεταλλάξεις του μιτοχondριακού DNA μπορεί να είναι αποτέλεσμα της ανάπτυξης του νεοπλασματος (Brandon et al., 2006), όμως κάποιες mtDNA μεταλλάξεις στην πραγματικότητα συνεισφέρουν στην ανάπτυξη του. Η έκφραση της υπομονάδας 2 της NADH αφυδρογονάσης που κωδικοποιείται από ένα mtDNA με μεταλλάξεις (σχετίζεται με το πλακώδες νεόπλασμα λάρυγγα) έχει βρεθεί πως διεγείρει την αερόβια γλυκόλυση, την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου και την ανάπτυξη του όγκου (Zhou et al., 2007).

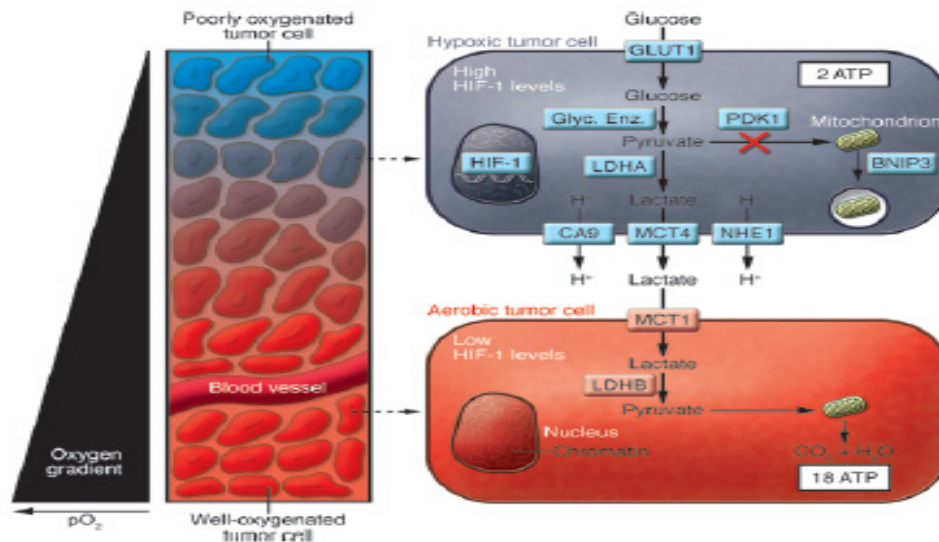


**Εικόνα 8:** Μοριακοί μηχανισμοί του μεταβολικού επαναπρογραμματισμού των νεοπλασματικών κυττάρων.

Ένας από τους βασικότερους μηχανισμούς της αερόβιας γλυκόλυσης είναι η ενεργοποίηση του HIF-1 (Hypoxia-inducible factor), ενός μεταγραφικού παράγοντα που ενεργοποιείται από το υποξικό στρες, αλλά και από ογκογενετικό, φλεγμονώδες, μεταβολικό και οξειδωτικό στρες (Harris, 2002; Semenza, 2007; Taylor and Rouyssegur, 2007). Ο HIF-1 είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από

σταθερές β-υπομονάδες και ασταθείς α-υπομονάδες, οι οποίες συντίθενται ακόμη και υπό κανονικές συνθήκες οξυγόνου, και διεγείρει τη μετατροπή της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό και γαλακτικό οξύ μέσω αύξησης της έκφρασης του GLUT1, της εξοκινάσης και της γαλακτικής αφυδρογονάσης A, αλλά και του μεταφορέα MCT4 (Pouyssegur et al., 2006; Semenza, 2007).

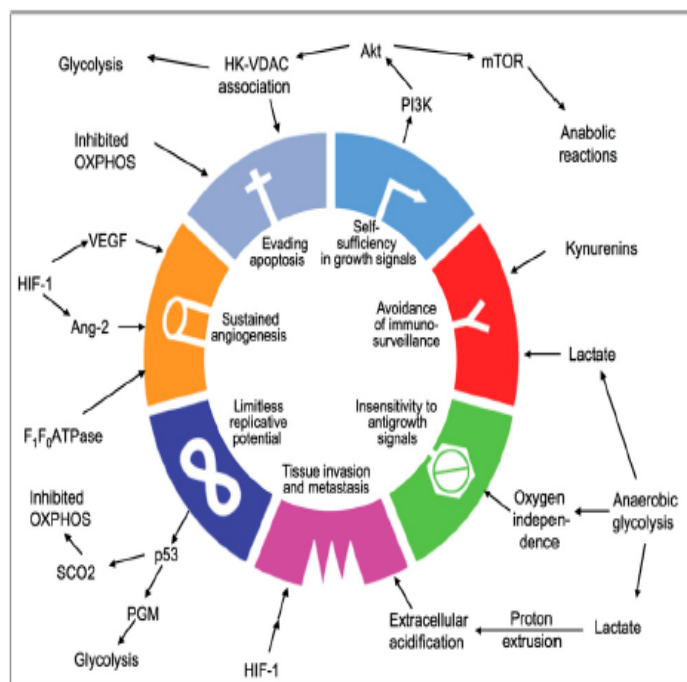
Επιπρόσθετα, ο HIF-1 μειώνει την μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλοσυνένζυμο-A (ακετυλο-CoA) από την πυροσταφυλική αφυδρογονάση (PDH) (Kim et al., 2006; Papandreou et al, 2006).



**Εικόνα 9:** Συνθήκες έλλειψης οξυγόνου στο εσωτερικό του όγκου.

### 1.7. Χαρακτηριστικά της καρκινικής νόσου που συνδέονται με αλλαγές στον μεταβολισμό

Τα νεοπλασματικά κύτταρα διαφέρουν από τα φυσιολογικά εξαιτίας μιας πληθώρας γενετικών αλλαγών, αρκετές από τις οποίες μπορούν να συνδεθούν με τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό (Hanahan and Weinberg, 2000; Zitvogel et al., 2006) (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10:** Τα επτά χαρακτηριστικά των νεοπλασματικών κυττάρων και η σύνδεση τους με τον μεταβολισμό.

- **Αυτό-επάρκεια σε αυξητικά σήματα (Self-Sufficiency in Growth Signals)**

Οι αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν τους υποδοχείς τυροσίνης κινάσης (RTKs), οι οποίοι εν συνεχεία ελέγχουν δύο σημαντικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος: Το κυτταρικό μονοπάτι Ras→Raf→Map κινάση (ERK pathway) και το μονοπάτι φωσφατιδυλοϊνισιτόλη 3 –κινάση (PI3K). Τα ERK και PI3K συγκλίνουν για να ενεργοποιήσουν τον mTOR που ελέγχει την κυτταρική ανάπτυξη. Οι περισσότεροι νεοπλασματικοί όγκοι φέρουν μεταλλάξεις στους κύριους ρυθμιστές (K-Ras, H-Ras, N-Ras, B-Raf, PRKs) (Shaw and Cantley, 2006). Υπάρχουν πολλαπλοί μηχανισμοί μέσω των οποίων η ενεργοποίηση της μεταγωγής των σημάτων των αυξητικών παραγόντων προκαλούν τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό των καρκινικών κυττάρων.

Η ενεργοποίηση των κινασών τυροσίνης, συμπεριλαμβανομένων των κινασών της οικογένειας Src και RTK, έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση των ενζύμων στα κατάλοιπα τυροσίνης. Αυτό έμμεσα ρυθμίζει την ενεργότητα της ειδικής για τα καρκινικά κύτταρα ισομορφής της πυροσταφυλικής κινάσης (PKM2), η οποία προσδέεται στα πεπτιδία που περιέχουν φωσφοτυροσίνη (Christofk et al., 2008). Κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ της PKM2 και των πεπτιδίων αυτών, η PKM2 απελευθερώνει τον αλλοστερικό της ενεργοποιητή. Αυτό οδηγεί στην αναστολή της ενεργότητας της, αφού μετατρέπεται δομικά από ενεργό τετραμερές σε ανενεργό διμερές (Christofk et al., 2008). Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να συμβάλλει στην διέγερση των αναβολικών αντιδράσεων από τις ογκογενετικές τυροσινικές κινάσες. Η μερική αναστολή της PKM2 (που καταλύει το τελευταίο στάδιο της γλυκόλυσης) επιτρέπει στα ενδιάμεσα της γλυκόλυσης να «παρεκκλίνουν» και να αποφεύγουν την υπερβολική παραγωγή του πυροσταφυλικού οξέος. Όμως, η αναστολή της PKM2 από μόνη της δεν είναι ικανή να προκαλέσει τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό των καρκινικών κυττάρων, που βασίζεται σε επιπλέον μεταβολές που συμπεριλαμβάνουν μια γενικότερη αύξηση της γλυκολυτικής ροής.

Η αυτονομία των καρκινικών κυττάρων στην υπερενεργοποίηση του συστήματος PI3K/Akt προκαλεί αύξηση της ροής της γλυκόζης και των αμινοξέων μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που εν μέρει οδηγεί στην ενεργοποίηση του HIF-1a (Pouyssegur et al., 2006). Το γονίδιο Akt ρυθμίζει την έκφραση ενός μεταφορέα της γλυκόζης (GLUT1) και προκαλεί την μετατόπιση του GLUT4 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το γονίδιο Akt ρυθμίζει επίσης τον μηχανισμό της γλυκόλυσης μέσω της ενεργοποίησης της φωσφορυλίωσης της 6-φωσφοφρουκτο-2-κινάσης (PFK2) (Manning and Cantley, 2007). Μέσω μηχανισμών που δεν έχουν πλήρως διερευνηθεί, το γονίδιο αυτό ρυθμίζει την πρόσδεση της εξοκινάσης 1 και 2 (HK1, HK2) στα μιτοχόνδρια (Pastorino et al, 2005).

Επιπρόσθετα, ο mTOR, μία κινάση σερίνης/θρεονίνης, ενεργοποιείται από το αυτόνομο σύστημα P13K/Akt και ενισχύει την κυτταρική ανάπτυξη αναστέλλοντας τις καταβολικές αντιδράσεις που προκαλούνται από την αυτοφαγία. Αρκετές κλινικές μελέτες εξετάζουν την πιθανή θεραπευτική δραστηριότητα των αναστολέων του mTOR (Faivre et al., 2006).

- **Αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης) (Evading Apoptosis)**

Η αποφυγή της απόπτωσης δεν είναι κρίσιμη μόνο για την έναρξη της ογκογένεσης, αλλά συνεισφέρει επίσης στην αντίσταση των νεοπλασματικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία. Ένας σύνδεσμος ανάμεσα σε αυτό το φαινόμενο και στον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό προέρχεται από την σύνδεση της εξοκινάσης (HK) με τον τασεοεξαρτούμενο δίαυλο ανιόντων (VDAC). Η εξοκινάση έχει αποδειχτεί πως συνδέεται σε μεγαλύτερο βαθμό με την εξωτερική μιτοχονδριακή πρωτεΐνη VDAC στα νεοπλασματικά κύτταρα σε αντίθεση με τα φυσιολογικά (Pedersen, 2007). Η αυξημένη αλληλεπίδραση HK-VDAC μπορεί να οφείλεται στην ενεργοποίηση του γονιδίου Akt. Το Akt προκαλεί τη μετατόπιση της εξοκινάσης στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, όπου προσδένεται στον VDAC, πιθανώς λόγω του ότι το Akt φωσφορυλιώνει την HK (Miyamoto et al., 2008). Σε



θεωρητικό επίπεδο λοιπόν, φάρμακα που θα εμπόδιζαν την σύνδεση μεταξύ HK και VDAC θα μείωναν τους υψηλούς γλυκολυτικούς ρυθμούς και θα προκαλούσαν την επαγωγή της απόπτωσης.

Ολικές ή μερικές βλάβες στην οξειδωτική φωσφορυλίωση προκαλούν επίσης την αποφυγή της απόπτωσης στα νεοπλασματικά κύτταρα. Η ολική αναστολή της αναπνευστικής αλυσίδας καταστέλλει την ενεργοποίηση των προαποπτωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών, Bax και Bak (Tomiyama et al., 2006). Βλάβες στην οξειδωτική φωσφορυλίωση μειώνουν επίσης την ικανότητα κάποιων ξеноβιοτικών να προκαλούν την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου καταργώντας έτσι την προαποπτωτική τους δραστηριότητα. Ο μηχανισμός αυτός ίσως εξηγεί το γεγονός ότι κύτταρα τα οποία δεν έχουν μιτοχονδριακό DNA και ως εκ τούτου δεν πραγματοποιούν οξειδωτική φωσφορυλίωση, εμφανίζουν αντίσταση σε διάφορες ουσίες που προκαλούν απόπτωση μέσω πρόκλησης οξειδοαναγωγικών κύκλων στα μιτοχόνδρια (Galluzzi et al., 2006; Kroemer et al., 2007).

- **Απεριόριστη ικανότητα αντιγραφής (Limitless replicative potential)**

Τα νεοπλασματικά κύτταρα, για να διασφαλίσουν την ικανότητα αντιγραφής, μεταλλάσσονται ή χάνουν πρωτεΐνες που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο, όπως η p53. Η απώλεια του p53 προκαλείται και από την Δαρβινική επιλογή σε υποξικές συνθήκες, διότι η ενεργοποίηση του από την έλλειψη οξυγόνου προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο (Culmsee and Mattson, 2005). Η μη ενεργοποίηση του p53 προκαλεί άμεσα το φαινόμενο Warburg μέσω διάφορων μηχανισμών. Έτσι, το p53 ρυθμίζει θετικά την έκφραση της οξειδάσης 2 του κυτοχρώματος c (SCO2) (Matoba et al., 2006) και αρνητικά την έκφραση της μουτάσης του φωσφογλυκερικού (PGM), του ενζύμου που μετατρέπει το 3-φωσφογλυκερικό (3PG) σε 2-φωσφογλυκερικό (2PG) στην γλυκολυτική οδό (Kondoh et al., 2005). Επιπλέον, το p53 ενεργοποιεί μεταγραφικά τον TIGAR (ρυθμιστή της TP53- προκαλούμενη γλυκόλυσης και απόπτωσης), μία ισομορφή της φωσφοφρουκτοκινάσης 2 (PFK2), που αναστέλλει

την ολική δραστηριότητα της φωσφοφρουκτοκινάσης και με τον τρόπο αυτό μειώνει τον ρυθμό της γλυκόλυσης (Bensaad et al., 2006).

- **Διατήρηση της αγγειογένεσης (Sustained angiogenesis)**

Σε αρκετά νεοπλάσματα παρατηρείται αυξημένη έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών (ERK, PI3K), ένα φαινόμενο που ενισχύεται στην κατάσταση έλλειψης οξυγόνου. Ένας επιπλέον σύνδεσμος μεταξύ μη φυσιολογικού μεταβολισμού και της αγγειογένεσης στα νεοπλασματικά κύτταρα παρέχεται από την F1F0 ATPάση. Τα ενδοθηλιακά, αλλά και τα νεοπλασματικά κύτταρα εκφράζουν την F1F0 ATPάση (φυσιολογικά είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης) στην επιφάνεια του κυττάρου, όπου μπορεί να μεταφέρει πρωτόνια από το κυτοσόλιο στο εξωτερικό περιβάλλον και με τον τρόπο αυτό συνεισφέρει στην εξασφάλιση των απαραίτητων πρωτονίων για την γλυκόλυση. Η αγγειοστατίνη, ένας ενδογενής αναστολέας της αγγειογένεσης, προσδέεται και αναστέλλει την F1F0 ATPάση που βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου, προκαλώντας την ενδοκυττάρια μείωση του pH. Όμοια, ένα αντίσωμα που στοχεύει την β-υπομονάδα της F1F0 ATPάσης θα έχει αντιαγγειογενετική δράση (Chi et al., 2007).

- **Προσβολή του ιστού και μετάσταση (Tissue invasion and metastasis)**

Ένας μηχανιστικός σύνδεσμος μεταξύ του μεταβολισμού των νεοπλασματικών κυττάρων και της προσβολής των ιστών/μετάστασης δίνεται από τον HIF-1. Η ενεργοποίηση του HIF-1α οδηγεί στην απώλεια της E-καντερίνης (Esteban et al., 2006; Rouyssegur et al., 2006), μία ισομορφή της καντερίνης που απαιτείται για τη διατήρηση των ενδοκυττάρων συνδέσμων στο επιθήλιο, η οποία χάνεται κατά τη μετάβαση επιθηλίου-μεσεγχύματος (EMT). Η ενεργοποίηση του HIF-1α προκαλεί επίσης την έκφραση του *met* πρωτο-ογκογονιδίου που ευνοεί την EMT (Pennacchiotti et al., 2003; Yang et al., 2008) και επάγει δύο πρωτεΐνες που

διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο στην μετάσταση, τον υποδοχέα χημοκίνης CXCR4 (Igney and Krammer, 2002) και την λιποξυγονάση (LOX) (Erler et al., 2006). Έτσι, μία μοναδική αιτία, η ενεργοποίηση του HIF-1, συνεπάγεται και τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό και την ενίσχυση της προσβολής των ιστών/μετάσταση. Ανάλογα, οι μεταλλάξεις του mtDNA ενισχύουν το μεταστατικό δυναμικό των νεοπλασματικών κυττάρων, πιθανώς επειδή η αυξημένη παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια οδηγεί στην ενεργοποίηση του HIF-1α (Ishikawa et al., 2008).

Επιπλέον, η αερόβια γλυκόλυση (και ως εκ τούτου η αυξημένη παραγωγή πρωτονίων) προκαλεί τη μείωση του pH στο εξωκυττάριο περιβάλλον εξαιτίας της δραστηριότητας πολλαπλών ενζύμων που μεταφέρουν πρωτόνια. Η υψηλή οξύτητα είναι ευνοϊκή για την προσβολή του ιστού και τη μετάσταση λόγω της εξαρτώμενης από το pH ενεργοποίησης των καθεψινών και των μεταλλοπρωτεϊνών που αποδομούν τις βασικές μεμβράνες (Swietach et al., 2007).

#### ▪ **Αποφυγή της ανοσοαπόκρισης (Avoidance of immunosurveillance)**

Το μεταβολικό μικροπεριβάλλον των νεοπλασματικών κυττάρων μπορεί να αναστείλει την λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που τα καταπολεμούν (T-λεμφοκύτταρα και κύτταρα φυσικών φονέων), ενώ προσελκύονται κύτταρα της φλεγμονής που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του όγκου. Τα συνδεδεμένα με τον όγκο μακροφάγα (TAMs) είναι αυξημένα σε υποξικές και νεκρωτικές περιοχές του όγκου και αποτελούν κακό προγνωστικό δείκτη για την έκβαση της νεοπλασματικής νόσου (Cramer et al., 2003). Τα TAMs διευκολύνουν την αγγειογένεση, προάγουν την μετανάστευση των νεοπλασματικών κυττάρων και προκαλούν τοπική ανοσοκαταστολή (Condeelis and Pollard, 2006).

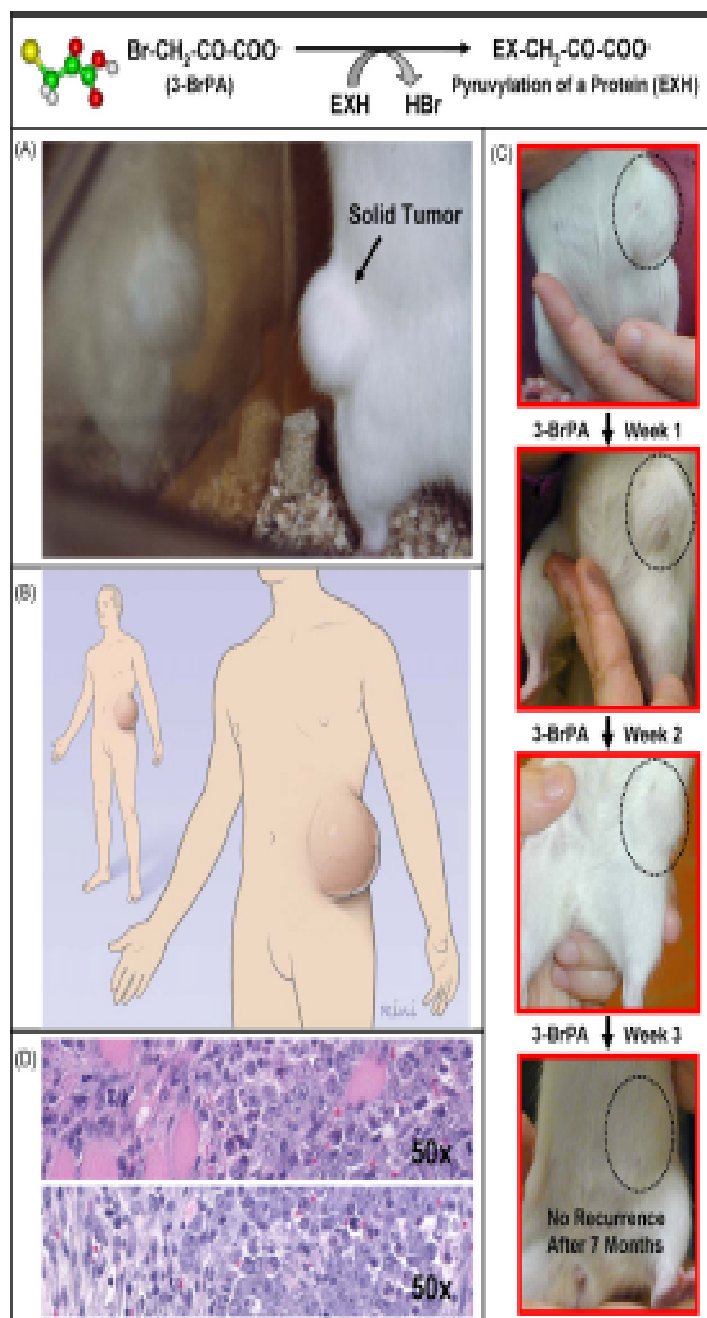
Η υψηλή οξύτητα στο μικροπεριβάλλον του όγκου αναστέλλει τη δραστηριότητα των NK κυττάρων (Lardner, 2001). Ασθενείς με προχωρημένη νεοπλασματική νόσο έχουν αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος στον αίμα. Το γαλακτικό οξύ καταστέλλει την παραγωγή κυτοκινών και την κυτταροτοξική δράση των T-λεμφοκυττάρων (Fischer et al., 2007).

### **1.8. Η αναστολή της γλυκόλυσης ως αντικαρκινική θεραπεία**

Παρά το ότι οι βιοχημικοί και μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν στην αυξημένη αερόβια γλυκόλυση των νεοπλασματικών κυττάρων είναι αρκετά σύνθετοι και μπορούν να αποδοθούν σε αρκετούς παράγοντες, όπως η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, η υποξία και τα ογκογενετικά σήματα, οι μεταβολικές επιπτώσεις είναι παρόμοιες: τα νεοπλασματικά κύτταρα βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στην γλυκολυτική πορεία για την παραγωγή ATP. Λόγω του ότι η παραγωγή ATP μέσω της γλυκόλυσης είναι λιγότερο αποδοτική όπως ειπώθηκε και παραπάνω (2 μόρια ATP σε σχέση με τα 36 μόρια ATP που παράγονται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση), τα νεοπλασματικά κύτταρα καταναλώνουν μεγαλύτερη ποσότητα γλυκόζης σε σχέση με τα φυσιολογικά για να διατηρήσουν την απαραίτητη ενέργεια για τον ενεργό μεταβολισμό και τον κυτταρικό τους πολλαπλασιασμό (Formentini et al., 2010; Vander Heiden et al., 2009, 2012). Έτσι, η διατήρηση της υψηλής γλυκολυτικής δραστηριότητας είναι βασική προϋπόθεση για την επιβίωση και την ανάπτυξή τους. Αυτή η μεταβολική «ιδιαιτερότητα» οδηγεί στην υπόθεση πως η αναστολή της γλυκολυτικής πορείας μπορεί να αποδειχτεί ικανή για τον επιλεκτικό θάνατο των νεοπλασματικών κυττάρων (Munoz-Pinedo et al., 2003; Izyumov et al., 2004; Xu et al., 2005). Εάν ανασταλεί η γλυκολυτική οδός, τα ακέραια μιτοχόνδρια των φυσιολογικών κυττάρων τους παρέχουν εναλλακτικές πηγές ενέργειας, όπως τα λιπαρά οξέα και τα αμινοξέα, για να παράγουν τα μεταβολικά ενδιάμεσα που απαιτούνται για τον κύκλο του κιτρικού οξέος και την παραγωγή ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τα φυσιολογικά κύτταρα λοιπόν, αναμένεται να είναι λιγότερο ευαίσθητα σε ουσίες που αναστέλλουν την γλυκόλυση.

Πρόσφατες έρευνες παρέχουν επαρκή στοιχεία για την θεώρηση πως η αναστολή της γλυκόλυσης έχει εκλεκτική δράση σε κύτταρα με μιτοχονδριακές βλάβες εξαιτίας γενετικών μεταλλάξεων ή συνθηκών έλλειψης οξυγόνου. Για παράδειγμα, η αναστολή της εξοκινάσης από το 3-BrPA προκαλεί μείωση του παραγόμενου ATP στα νεοπλασματικά κύτταρα, οδηγώντας τα σε μαζικό κυτταρικό θάνατο (Ko et al., 2001, 2004; Xu et al., 2005). Επιπλέον, έχει δειχθεί πως η αναστολή της γλυκόλυσης επιφέρει τον θάνατο σε κύτταρα νεοπλάσματος εντέρου (HCT116) και σε κύτταρα

λεμφώματος (Raji) σε περιβάλλον υποξίας, όπου τα κύτταρα εμφανίζουν υψηλούς γλυκολυτικούς ρυθμούς και μειωμένη ευαισθησία σε άλλα αντικαρκινικά φάρμακα, όπως η ταξόλη και η δοξορουβικίνη (Xu et al., 2005). Ένας άλλος αναστολέας της γλυκόλυσης, η δεοξυ-γλυκόζη (2-DG), προκαλεί εκλεκτικό θάνατο στα νεοπλασματικά κύτταρα με μιτοχονδριακές βλάβες ή σε περιβάλλον υποξίας (Liu et al., 2001, 2002). Και το 3-BrPA και η 2-DG εμφανίσουν αντικαρκινική δράση και σε μοντέλα ζώων που φέρουν όγκους (Geschwind et al., 2002; Co et al., 2004; Maschek et al., 2004; Mathurata et al., 2009), γεγονός που υποδηλώνει πως η αναστολή της γλυκόλυσης είναι μία πολλά υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική με ευρεία κλινική σπουδαιότητα (Εικόνα 11).



**Εικόνα 11:** Πιθανή αντικαρκινική δράση του 3-BrPA.

Επιπρόσθετα, το ένζυμο της τρανσκετολάσης (TKTL1) υπερεκφράζεται στα νεοπλασματικά κύτταρα και αυξάνει τον ρυθμό της πορείας των φωσφορικών πεντοζών, οδηγώντας στην παραγωγή του 3-GAPDH και κατά συνέπεια στην παραγωγή ATP και γαλακτικού οξέος (Coy et al., 2005). Έτσι, η αναστολή της

τρανσετολάσης παρέχει έναν επιπλέον μηχανισμό για τον επιλεκτικό θάνατο των νεοπλασματικών κυττάρων. Η οξυθειαμίνη, ένας αναστολέας της τρανσετολάσης, παρουσιάζει αντικαρκινική σε ζωικά μοντέλα (Rais et al., 1999).

Ο πίνακας 1, παρουσιάζει κάποιες ενώσεις που αναστέλλουν την γλυκολυτική οδό ή καταστέλλουν την πορεία φωσφορικών πεντοζών. Ο μηχανισμός δράσης τους, καθώς και η πιθανή θεραπευτική τους δράση συζητούνται παρακάτω.

<i>Compound status</i>	<i>Mechanisms of action</i>	<i>Drug development</i>
2-Deoxyglucose	Inhibits phosphorylation of glucose by hexokinase	Clinical trials (I/II)
Lonidamine	Inhibits glycolysis and mitochondrial respiration Inhibits HK; disassociating HK from mitochondria	Clinical trials (II/III)
3-Bromopyruvate	Inhibits HK; acts as an alkylating agent	Pre-clinical
Imatinib	Inhibit Bcr-Abl tyrosine kinase; causes a decrease in HK and G6PD activity	Approved for clinical use
Oxythiamine	Suppresses PPP by inhibiting transketolase; inhibits pyruvate dehydrogenase	Pre-clinical

Abbreviations: HK, hexokinase; G6PG, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PPP, pentose phosphate pathway.

**Πίνακας 1:** Αναστολείς της γλυκόλυσης και ενώσεις που ρυθμίζουν τον γλυκολυτικό μεταβολισμό.

## 2- Δεοξυ-γλυκόζη (2-DG)

Η ένωση αυτή είναι ένα χημικό ανάλογο της γλυκόζης και η δράση της στην αναστολή του γλυκολυτικού μεταβολισμού είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια (Brown, 1962). Μετά τη μεταφορά της στο εσωτερικό των κυττάρων, η 2-DG φωσφορυλιώνεται σε 2-DG-P από την εξοκινάση. Όμως, σε αντίθεση με την G-6-P, η 2-DG-P δεν μπορεί να μεταβολιστεί περαιτέρω από την ισομεράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης που μετατρέπει την G-6-P σε 6-φωσφορική γλυκόζη (Weindruch et al., 2001). Η 2-DG-P εγκλωβίζεται εντός των κυττάρων και συσσωρεύεται με αποτέλεσμα την αναστολή της γλυκόλυσης κυρίως στο στάδιο της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης από την εξοκινάση. Η αναστολή του σταδίου αυτού προκαλεί μείωση του παραγόμενου ATP που οδηγεί στο σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου και στον κυτταρικό θάνατο *in vitro* (Maher et al., 2004). Παρόλα αυτά, η αποτελεσματικότητα της 2-DG επηρεάζεται από της παρουσία του φυσικού αναλόγου της, της γλυκόζης, και φαίνεται πως μειώνει μόνο μερικώς τη διαθεσιμότητα της γλυκόζης για την γλυκολυτική οδό. Η δεοξυ-γλυκόζη επηρεάζει επίσης την γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών και επάγει την συσσώρευση των αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Little et al., 1994; Kang and Hwang, 2005). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η επώαση των κυττάρων με την 2-DG προκαλεί την μείωση των μορίων της εξοκινάσης που συνδέονται με τα μιτοχόνδρια, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως η ένωση αυτή μπορεί επίσης να επηρεάσει το μιτοχονδριακό γλυκολυτικό μεταβολισμό (Lynch et al., 1991). *In vitro* μελέτες δείχνουν πως η 2-DG έχει κυτταροτοξική δράση σε κύτταρα με αναπνευστικές βλάβες των μιτοχονδρίων ή σε κύτταρα που βρίσκονται σε περιβάλλον υποξίας (Liu et al., 2001, 2002; Maher et al., 2004). *In vivo*, η 2-DG ενισχύει την αντικαρκινική δράση της αδριαμυκίνης και της πακλιταξέλης σε επίμυες με οστεοσάρκωμα ή μη μικροκυτταρικό νεόπλασμα πνεύμονα (Marchek et al., 2004). Η κλινική μελέτη προτείνει πως η χορήγηση της 2-DG σε δόσεις μέχρι 250 mg/kg βάρους σώματος είναι ασφαλής σε συνδυασμό με ακτινοβολίες σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα (Singh et al., 2005).



**Λονιδαμίνη (Lonidamine, LDN)**

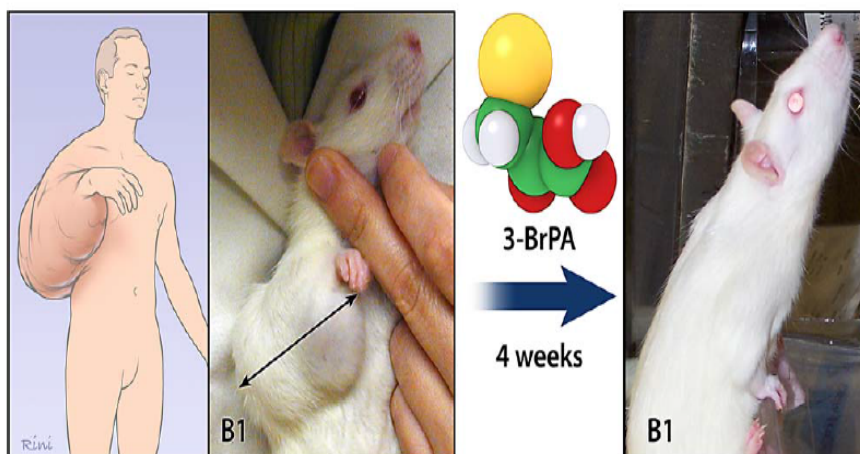
Η ουσία αυτή είναι ένα παράγωγο του ινδαζολικού-3-καρβοξυλικού οξέος, και η δράση της στην αναστολή της αερόβιας γλυκόλυσης στα νεοπλασματικά κύτταρα είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια (Floridi et al., 1981). Σε *in vitro* πειράματα, η LDN μειώνει την κατανάλωση οξυγόνου στα φυσιολογικά και στα νεοπλασματικά κύτταρα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ενώ η ουσία αυτή αναστέλλει την γλυκόλυση στα νεοπλασματικά κύτταρα, μέσω της αναστολής της εξοκινάσης, στα φυσιολογικά κύτταρα την ενισχύει (Floridi et al., 1981). Η *in vivo* χορήγηση της σε ασθενή με χρόνια λευχαιμία είχε ως αποτέλεσμα μια μείωση στην παραγωγή γαλακτικού οξέος παρόμοια με αυτή που έχει παρατηρηθεί *in vitro* (Natali et al. 1984). Παρόμοιες έρευνες σε νεοπλασματικά κύτταρα Ehrlich ασκίτη απέδειξαν πως η LDN αναστέλλει και την κυτταρική αναπνοή και τη γλυκολυτική οδό με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, προκαλώντας μείωση της παραγωγής ATP (Floridi et al., 1998). Σε κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος μαστού (MCF-7) η LDN ενισχύει τη δραστικότητα διάφορων αντικαρκινικών φαρμάκων, όπως η *cis*-πλατίνα (Rosbe et al., 1989). Τέλος, έχει αποδειχτεί η θεραπευτική δράση της συνδυαστικής θεραπείας με LDN και τεμοζολομίδη σε χαμηλές συγκεντώσεις κάποιες ώρες μετά την ακτινοθεραπεία σε κύτταρα ανθρώπινου γλοιώματος (Prabhakara and Kalia, 2008)

Η αποδεδειγμένη ικανότητα της LDN να αναστέλλει τον ενεργό μεταβολισμό και να ενισχύει την δραστικότητα άλλων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων είχε ως αποτέλεσμα την ένταξή της σε κλινικές μελέτες (Φάση II/III) για τη θεραπεία νεοπλασμάτων μαστού, ωθηκών, πνεύμονα, γλοιοβλαστώματος, καθώς επίσης και για την υπερπλασία προστάτη μέσω χορήγησης εκ του στόματος (De Lena et al., 2001; Di Cosimo et al., 2003; Qudard et al., 2003, Papaldo et al., 2003).

### 3-Βρωμοπυροσταφυλλικό οξύ (3-Bromopyruvic acid, 3-BrPA)

Το 3-BrPA είναι ένα ανάλογο του γαλακτικού οξέος που αναστέλλει το ένζυμο της εξοκινάσης και έχει αποδειχτεί πως μειώνει την παραγωγή ATP και προκαλεί με τον τρόπο αυτό σοβαρή μείωση της ποσότητας του ATP εντός των κυττάρων (Ko et al., 2001; Geshwind et al., 2004; Xu et al., 2005b). Μετά την ανακάλυψη από τον Ko και τους συνεργάτες του το 2001 ότι το 3-BrPA αναστέλλει την ικανότητα πολλαπλασιασμού κυττάρων ηπατοκυτταρικού καρκινώματος *in vitro*, προχωρημένες νεοπλασίες (ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων) εξαλείφθηκαν εντελώς σε 19 από τα 19 επίμυες μετά από τοπική χορήγηση του σκευάσματος αυτού, χωρίς να προκληθεί καμία βλάβη σε αυτά (Ko et al., 2004) (εικόνα 12). Επιπλέον όλα τα ζώα δεν παρουσίασαν επανεμφάνιση της νόσου. Παρόμοια δράση του 3-BrPA είχε αναφερθεί και σε άλλες μελέτες, όπως αυτή του Xu και των συνεργατών του το 2005 (εικόνα 11).

#### B. THERAPY FOR CANCER TARGETED AT POWER PLANTS



Εικόνα 12: Θεραπεία του καρκίνου που στοχεύει την γλυκολυτική πορεία.

Η αντικαρκινική αυτή ουσία έχει ονομαστεί και «energy blocker» (Foubister, 2002) για πολύ διαφοροποιημένα νεοπλασματικά κύτταρα γιατί αναστέλλει και την γλυκολυτική πορεία αλλά και την μιτοχονδριακή αναπνοή, ενώ δεν επηρεάζει τα φυσιολογικά κύτταρα. Το 3-BrPA δρα σαν «δούρειος ίππος», αφού πιθανώς

εισέρχεται στα νεοπλασματικά κύτταρα από χρησιμοποιώντας τους ίδιους μεταφορείς με το γαλακτικό οξύ. Τα φυσιολογικά κύτταρα δεν επηρεάζονται καθώς διαθέτουν πολύ λιγότερους τέτοιους μεταφορείς (Pedersen, 2007). Ο συνδυασμός του 3-BrPA με αναστολείς του mTOR φαίνεται να έχει συνεργιστική δράση στη θεραπεία της λευχαιμίας και σε κύτταρα λεμφώματος (Xu et al., 2005).

Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί πως το 3-BrPA είναι ένας αλκυλιωτικός παράγοντας και για τον λόγο αυτό είναι πιθανή η αλληλεπίδρασή του και με άλλα μόρια στα κύτταρα. Έτσι, η κυταροτοξική του δράση ίσως δεν οφείλεται αποκλειστικά στην αναστολή του ενζύμου της εξοκινάσης.

#### **Ιματιβίνη (Imatinib, , ιδιοσκεύασμα Gleevec)**

Η αντικαρκινική ουσία ιματινίβη (imatinib) έχει εξελιχθεί τα τελευταία χρόνια σε ένα νέο θεραπευτικό εργαλείο με μεγάλες προοπτικές για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας, αλλά και άλλων τύπων καρκίνου. Η ανακάλυψη της ιματινίβης δεν ήταν τυχαία, αλλά υπήρξε αποτέλεσμα συστηματικής έρευνας στον τομέα αναστολέων της τυροσινικής κινάσης. Η θεραπεία με την ιματιβίνη αναστέλλει το ένζυμο της εξοκινάσης, αλλά και την ισομεράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (PGI) στα κύτταρα της λευχαιμίας, προκαλώντας την μείωση του ρυθμού της αερόβιας γλυκόλυσης (Boren et al., 2001; Gottschalk et al., 2004; Serkova and Boros, 2005). Η μείωση της δραστηριότητας της PGI οδηγεί στη μείωση της ροής της γλυκόζης στην πορεία φωσφορικών πεντοζών και κατά συνέπεια στερεί από τα νεοπλασματικά κύτταρα τα υποστρώματα για την σύνθεση των μακρομορίων. Παρόλο που η ιματινίβη είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο που χρησιμοποιείται στην καταπολέμηση της λευχαιμίας από το 2001, ίσως αποδειχθεί θεραπευτική και για άλλα είδη νεοπλασιών, όπως οι κακοήθεις γαστρεντερικοί στρωματικοί όγκοι κ.α. (Pelicano et al., 2006).

**Οξυθειαμίνη (Oxythiamine)**

Η ουσία αυτή δρα ως ανταγωνιστής της θειαμίνης και αναστέλλει τα ένζυμα της τρανσκετολάσης και της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, που απαιτούν την πυροφωσφορική θειαμίνη ως συνένζυμο για την λειτουργία τους. Η τρανσκετολάση είναι ένα βασικό ένζυμο της πορείας των φωσφορικών πεντοζών και κατά συνέπεια η αναστολή της στερεί από τα κύτταρα το απαραίτητο μεταβολικό ενδιάμεσο για την παραγωγή του ATP (3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη), αλλά και τα υποστρώματα για την μακρομοριακή σύνθεση (NADPH, 5 φωσφορική-ριβόζη). Αυτή η αναστολή φαίνεται να είναι υπεύθυνη, τουλάχιστον μερικώς, για την σημαντική αντικαρκινική δράση της οξυθειαμίνης που έχει παρατηρηθεί *in vitro* και *in vivo* (Rais et al., 1999; Comin-Anduix et al., 2001). Ένα ισόένζυμο της τρανσκετολάσης, η TKTL1, έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται στα νεοπλασματικά κύτταρα και θεωρείται ένας σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στο φαινόμενο Warburg (Coy et al., 2005). Η αναστολή της TKTL1 λοιπόν ίσως αποδειχτεί αποτελεσματική για την θεραπεία των νεοπλασιών.

**Ιωδιοξικό οξύ (Iodoacetic acid, IAA)**

Το ιωδιοξικό οξύ είναι ένα παράγωγο του οξικού οξέος που αναστέλλει την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH). Η *in vitro* επώαση με IAA προκαλεί μια δόσοεξαρτώμενη αναστολή της γλυκολυτικής πορείας και κατά συνέπεια της παραγωγής ATP και μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού σε αρκετές νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές (Wu et al., 2006).

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

## ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

Για πολύ καιρό υπήρχε γενικά λίγη προθυμία εκ μέρους των επιστημόνων να ερευνήσουν για τον χαρακτηρισμό ανόργανων χημικών ουσιών ως αντικαρκινικών παραγόντων. Υπήρχε προκατάληψη κυρίως λόγω των πολλών δηλητηριάσεων από βαρέα μέταλλα και για το λόγο αυτό δεν μπορούσαν να δεχθούν πως αυτά τα μέταλλα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για θεραπεία, υπό την μορφή συμπλόκων και οργανομεταλλικών ενώσεων. Το περιβάλλον των υποκαταστατών συντονισμού που εγκαθίσταται στα σύμπλοκα των μετάλλων, προκαλεί ταυτοχρόνως και αξιόλογες μεταβολές της χημείας τους ενισχύοντας την καταλυτική τους δράση, πράγμα το οποίο έγινε φανερό σε βιοχημικό επίπεδο από την διαπίστωση ότι πολύ συχνά τα ενεργά κέντρα ενός μεγάλου αριθμού ενζυμικών πρωτεϊνών έχουν το χαρακτήρα μεταλλικών συμπλόκων. Π.χ. η δομή της βιταμίνης B12, όπως επίσης και της αίμης έχουν τον χαρακτήρα συμπλόκων. Ο τετραπυρρολικός δακτύλιος αποδείχθηκε μια ισχυρή καταλυτική δομή για έναν τεράστιο αριθμό ενζυμικών πρωτεϊνών σε όλο το φάσμα των έμβιων όντων, από τους μικροοργανισμούς, έως τους πολύπλοκους πολυκύτταρους οργανισμούς τόσο του φυτικού όσο και του ζωικού βασιλείου. Μέταλλα όπως το μαγνήσιο, το κοβάλτιο, ο χαλκός, ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, ο κασσίτερος κ.α. εντάχθηκαν με απόλυτα ωφέλιμο τρόπο στην φυσιολογική χημεία όλου του βιολογικού γίνεσθαι, καθιστώντας δυνατές αντιδράσεις που δεν θα μπορούσαν διαφορετικά να πραγματοποιηθούν. Μέσα στο ευρύτατο αυτό πλαίσιο της μεταλλοχημείας των οργανισμών εντάσσεται και η στρατηγική αναζήτησης ουσιών με φαρμακολογικές δράσεις για την θεραπεία νόσων όπως τα κακοήθη νεοπλάσματα στο πλαίσιο της ερευνητικής δραστηριότητας του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ήδη από την ίδρυσή του το 1977 σε συνεργασία με το Τμήμα Χημείας του ίδιου ιδρύματος, αλλά και άλλων ερευνητικών ομάδων τόσο Ελληνικών όσο και χωρών του

εξωτερικού (Kallistratos et al., 1988, 1994; Kalprouzos et al., 1997; Evangelou et al., 1997; Charalambopoulos et al., 2002, 2006; Papaioanou et al., 2004; Liasko et al., 1998; Xanthopoulou et al., 2003, 2006, 2007, 2008; Hadzikakou et al., 2005, 2008; Zartilas et al., 2007, Balas et al., 2008; Zartilas et al., 2009; Abdellah et al., 2009; Kyros et al., 2010; Verginadis et al., 2011; Georgiou et al., 2011; Metsios et al., 2012; Sartzi et al. 2012; Ozturk et al., 2012; Konidaris et al 2012).

Συστηματικές μελέτες της σχέσης μεταξύ χημικής δομής και αποτελεσματικότητας ή τοξικότητας συμπλόκων μετάλλων ξεκίνησαν μόλις πριν 50 χρόνια (Kerpler, 1993). Η επιλεκτική τοξικότητα μπορεί να επιτευχθεί μέσω διαφορών στη συσσώρευση ή τη συγκριτική βιοχημεία ή μέσω συγκριτικής κυτταρολογίας. Πίσω από κάθε κλινική χρήση ή βιολογική δράση των συμπλόκων μετάλλων είναι ένας βιοανόργανος μηχανισμός, ο οποίος ποικίλλει ανάλογα με τον τρόπο χρήσης και τη δομή του συμπλόκου. Τα σύμπλοκα μετάλλων μπορούν να χρησιμοποιηθούν όπως τα οργανικά σύμπλοκα στην εκλεκτική συσσώρευση και τη συγκριτική βιοχημεία τους (Farrell, 1989). Κύριος στόχος των περισσότερων συμπλόκων είναι το DNA. Ένας άλλος στόχος είναι η κυτταρική μεμβράνη, η οποία συμβάλλει στην κυτταρική επικοινωνία και φέρει τους κατάλληλους υποδοχείς για την προσκόλληση μορίων.

Βαρέα μέταλλα, όπως η πλατίνα, ο χρυσός, το ρουθίνιο, το ρόδιο, το ιρίδιο, το τιτάνιο και άλλα, είναι πηγές βιολογικά ενεργών παραγώγων και χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία ενάντια διαφορετικών ειδών ανθρώπινων όγκων. Υπάρχουν 2 βασικές στρατηγικές για το σχεδιασμό φαρμάκων ενάντια του καρκίνου με βάση την αλληλεπίδραση συμπλόκων μετάλλων/ πρωτεϊνών:

- 1) Η ανάπτυξη συμπλόκων μετάλλων που δρουν ενάντια των όγκων, τα οποία δεν είναι ικανά να αντιδράσουν με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, αλλά δομικά και κινητικά μπορούν να εισαχθούν στα νεοπλασματικά κύτταρα πριν από την αδρανοποίησή τους από τις πρωτεΐνες του ορού.
- 2) Σύνδεση των συμπλόκων μετάλλων που δρουν ενάντια των όγκων με πρωτεΐνες που μεταφέρουν μέταλλα, με στόχο την χρήση των πρωτεϊνών αυτών ως εξειδικευμένους μεταφορείς των φαρμάκων αυτών.

### 2.1. Cis-πλατίνα (cis-Diamminedichloroplatinum)

Η χρήση των συμπλόκων μετάλλων για τη θεραπεία του καρκίνου ξεκίνησε μετά την ανακάλυψη της cis- πλατίνας στις αρχές της δεκαετίας του 1960. Οι κλινικές δοκιμές της cis- πλατίνας ξεκίνησαν το 1971 και από τότε έχει καθιερωθεί ως ένα πολύ αποτελεσματικό φάρμακο για τη θεραπεία πολλών ειδών νεοπλασιών.

Η cis- πλατίνα ανακαλύφθηκε τυχαία όταν μελετούνταν τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης του βακτηρίου *Escherichia coli* (Rosenberg et al., 1965). Αρχικά, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι τα σύμπλοκα της πλατίνας είχαν αντιβακτηριακές ιδιότητες και στη συνέχεια ότι είχαν αντινεοπλασματικές ιδιότητες (Rosenberg et al., 1965, 1969). Η μοριακή δομή της cis- πλατίνας περιλαμβάνει ένα κεντρικό άτομο πλατίνας περιβαλλόμενο από δύο άτομα χλωρίου και δύο ομάδες αμμωνίας σε cis διάταξη (Page et al., 1985) (εικόνα 13).

Η cis- πλατίνα ενεργοποιείται μέσω μιας υδρολυτικής αντίδρασης που περιλαμβάνει την ανταλλαγή των δύο χλωρίων με το μόριο του νερού ή με υδροξυλικά μόρια και προκαλείται βλάβη στο DNA (Rosenberg, 1979). Η συγκέντρωση χλωρίου στο αίμα είναι 100mM, αρκετή δηλαδή για να καταστείλει την υδρόλυση της cis- πλατίνας και έτσι μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη σαν ουδέτερο μόριο (Sedletska et al., 2005). Η cis- πλατίνα έχει αναφερθεί ότι μπορεί να δεσμευθεί σε όλες τις βάσεις του DNA, αλλά έχει προτίμηση στις N-7 θέσεις της αδενίνης και της γουανίνης εξαιτίας της υψηλής νουκλεϊνικής συγγένειας των N-7 θέσεων των πουρινικών βάσεων (Reed E, 1998; Rosenberg, 1979; Eckhardt, 2002).

Ένας πιθανός στόχος της cis- πλατίνας είναι τα τελομερή, τα οποία είναι περιοχές πλούσιες σε γουανίνη που βρίσκονται στα άκρα των χρωμοσωμάτων (Abrams et al., 1993) (Εικόνα 14). Ουσιαστικά οι πλούσιες σε γουανίνη περιοχές αυτές αποτελούνται από επαναλήψεις της αλληλουχίας 5'-TTAGGG-3' και προστατεύουν τα χρωμοσώματα από την υδρόλυση. Τα τελομερή, στα περισσότερα σωματικά κύτταρα σταδιακά βραχύνονται με την πάροδο της ηλικίας, γίνονται μη λειτουργικά και προκαλείται κυτταρικός θάνατος μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης. Τα

νεοπλασματικά κύτταρα όμως έχει διαπιστωθεί ότι παρακάμπτουν την βράχυνση των τελομερών μέσω της ενεργοποίησης των τελομερασών και της εναλλακτικής επιμήκυνσης των τελομερών. Από αυτή την οπτική γωνία η στόχευση των τελομερών και των τελομερασών αποτελεί μια θεραπευτική προσέγγιση (Sedletska et al., 2005). Η δυνατότητα παρεμπόδισης της σύνθεσης DNA εμφανίζεται σε πολύ πιο χαμηλές δόσεις από αυτές που χρειάζονται για να παρεμποδιστεί η σύνθεση πρωτεϊνών ή RNA (Harder and Rosenberg, 1970). *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο μόριο της cis- πλατίνας και του DNA μπορεί να συμβάλλει στην παραγωγή ριζών ανιόντος υπεροξειδίου του οξυγόνου προκαλώντας επιπρόσθετη τοξικότητα στα νεοπλασματικά κύτταρα (Masuda et al., 1994).

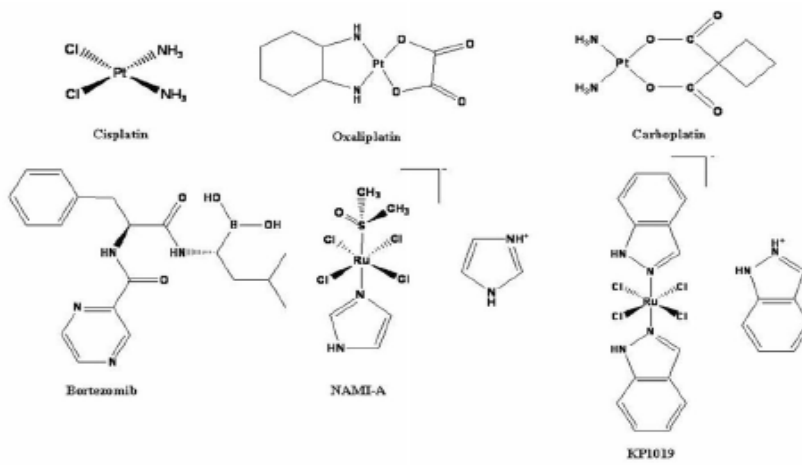
Ο τρόπος δράσης της cis- πλατίνας και η επιτυχία της ως αντικαρκινικό φάρμακο σε καμία περίπτωση δεν εμποδίζει την έρευνα των δράσεων συμπλόκων άλλων μετάλλων. Αντίθετα, χρησιμεύει ως πρωτόκολλο για το σχεδιασμό των κατάλληλων πειραμάτων. Άλλωστε, η cis- πλατίνα είναι πολύ αποτελεσματική σε συγκεκριμένους όγκους (ορχικό καρκίνωμα, ωθηκικό καρκίνωμα, όγκους στο κεφάλι και το λαιμό, όγκος στον πνεύμονα, μελάνωμα, οστεοσάρκωμα) (Wong et al., 1999), αλλά αναποτελεσματική σε άλλους, πολύ συνηθισμένους όγκους (νεοπλασίες του μαστού, αδενοκαρκινώματα του γαστρεντερικού σωλήνα) (Kim et al., 2008). Οι παράπλευρες επιδράσεις που έχουν διαπιστωθεί στη θεραπεία με cis- πλατίνα περιλαμβάνουν νεφροτοξικότητα, μυελοτοξικότητα, περιφερειακές και κεντρικές νευροπάθειες, ναυτία και εμετούς.

Η συχνή εμφάνιση αντίστασης των νεοπλασματικών κυττάρων στη cis- πλατίνα είναι ένας μεγάλος περιορισμός στην κλινική χρήση του φαρμάκου αυτού (Galanski et al., 2003, 2005). Τέσσερα γενικά μονοπάτια έχουν ανακαλυφθεί όσον αφορά τον μηχανισμό της αντίστασης της cis- πλατίνας και περιλαμβάνουν την εναλλακτική κυτταρική συσσώρευση, την απενεργοποίηση της από το κυτταρόπλασμα, την επιδιόρθωση του DNA και την τροποποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης (Reed, 1998).

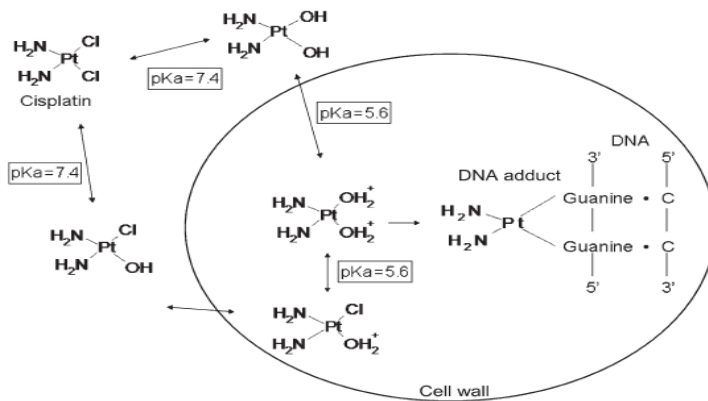


Οι περιορισμοί στη χρήση της cis-πλατίνας έδωσαν το έναυσμα για την έρευνα νέων, λιγότερο τοξικών συμπλόκων με πλατίνα. Τα δεύτερης και τρίτης γενιάς σύμπλοκα της πλατίνας, στα οποία συγκαταλέγεται η καρβοπλατίνη και η οξαλιπλατίνη (εικόνα 13), συντέθηκαν για να αυξήσουν την δράση και να μειώσουν την τοξικότητα της cis-πλατίνας (Alama et al., 2009). Η καρβοπλατίνη αποτελεί αποτελεσματική θεραπεία για νεοπλάσματα μήτρας και ωθηκών, καθώς και εγκεφάλου (Harrap, 1985), και η οξαλιπλατίνη είναι κλινικά εγκεκριμένη για τη θεραπεία νεοπλασιών παχέως εντέρου που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στη δράση της cis-πλατίνας (De Gramont et al., 2000).

Η έρευνα για άλλα αντικαρκινικά φάρμακα τα οποία θα είχαν ως βάση τα μέταλλα είχε ξεκινήσει με τον σχεδιασμό συμπλόκων που δομικά ήταν ίδια με την cis-πλατίνα, με βάση δηλαδή τη θεωρία ότι η όμοια δομή οδηγεί σε όμοια δράση (Εικόνα 13) (Calamai et al., 1998). Παρόλα αυτά, η δράση των συμπλόκων αυτών δεν εξαρτάται μόνο από την παρουσία του μετάλλου καθεαυτού, αλλά και από τον αριθμό και τον τύπο των υποκαταστατών του και τη συνδυαστική γεωμετρία του συμπλόκου. Άλλες ιδιότητες που παίζουν επίσης καθοριστικό ρόλο στη βιολογική δραστηριότητα των συμπλόκων μετάλλων είναι η κινητική αστάθεια, η οξειδοαναγωγική τους δράση και το ηλεκτρικό τους φορτίο. Αυτές οι ιδιαίτερες ιδιότητες ώθησαν τις έρευνες για την ανακάλυψη συμπλόκων μετάλλων με αντικαρκινική δράση που έχουν ποικίλους μηχανισμούς δράσης (Schmitt et al., 2013).



Εικόνα 13: Χημικές δομές συμπλόκων με πλατίνα και ρουθένιο.



Εικόνα 14: Στόχος τη cis-πλατίνας είναι τα τελομερή.

## 2.2. Σύμπλοκα βαναδίου

### 2.2.1. Γενικά

Το χημικό στοιχείο Βανάδιο (V) είναι μέταλλο με ατομικό αριθμό 23 και ατομικό βάρος 50,9414. Ανήκει στην ομάδα της 1ης κύριας σειράς των στοιχείων μετάπτωσης (4η περίοδος και VB σειρά του περιοδικού πίνακα).

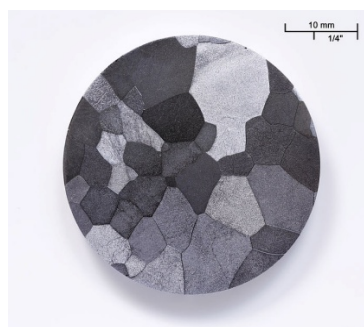
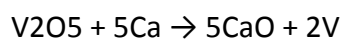
Στις χημικές ενώσεις, το βανάδιο εμφανίζεται με διαφορετικούς αριθμούς οξείδωσης (-III, -I, και 0, + I, + V). Σύμφωνα με τους Aureliano και Gandara (2005) και τους Soares et al. (2006), στο εσωτερικό των διαφόρων τύπων κυττάρων, το 98% του βαναδίου εμφανίζεται σε ιοντική μορφή [V (IV)], ενώ το ίδιο το στοιχείο δεν σχηματίζει απλώς μονομερή αλλά επίσης διμερή, τετραμερή, πενταμερή και δεκαμερή που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες. Η πλειονότητα των ιστών των θηλαστικών περιέχουν περίπου 20 nM του βαναδίου. Η ποσότητα (αναλογία) του ιστού μειώνεται με την ακόλουθη φθίνουσα σειρά: οστά > ήπαρ = νεφροί = σπλήνας > αίμα > μύες > εγκέφαλος.

Στους ζώντες οργανισμούς, το βανάδιο επηρεάζει την αύξηση, την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση ορισμένων ειδών, και όπως έχει ήδη γίνει γνωστό από το 1899 (Ban et al., 2000), δρα ως ινσουλινο – μιμητικό και αντιδιαβητικό στοιχείο, ενώ από το 1950 κι έπειτα, το βανάδιο έχει αναγνωριστεί σαν φαρμακολογικός παράγοντας, που επιδρά σε κυτταρικές αποκρίσεις, όπως η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός και ο νεοπλασματικός μετασχηματισμός (Evangelou et al., 1997). Ενώσεις βαναδίου είναι ικανές να λειτουργούν ως προ-ή αντινεοπλασματικοί παράγοντες, δηλαδή να επάγουν την ανάπτυξη ή την αναστολή του πολλαπλασιασμού όπως επίσης και την επιβίωση των νεοπλασματικών κυττάρων. Τα συμπλέγματα βαναδίου επιδρούν εξίσου σε ζωικά και ανθρώπινα κύτταρα, επηρεάζοντας όχι μόνο τα νεοπλασματικά κύτταρα, αλλά επίσης και τα φυσιολογικά. Πολλοί ερευνητές έχουν αναφέρει αντικαρκινική δράση στα αποτελέσματα των πειραμάτων με σύμπλοκα του βαναδίου (Ban et al., 2000; Evangelou et al., 1997; Molinuevo et al., 2004; Scrivens et al., 2003; Zhang et al., 2001; Wozniak and Blasiak, 2004; Holkoet al., 2008 ;Kordowiak et al., 2007; Klein et al., 2008).

Οι έρευνες πάνω στο βανάδιο ενθαρρύνθηκαν από τα ευρήματα του English et al. (1983), για το ρόλο του μετάλλου ως αναστολέα της διαφοροποίησης των νεοπλασματικών κυττάρων ερυθρολευχαιμίας σε ποντίκια, όπως επίσης και από τους Thompson et al., σχετικά με την αναστολή, από το διατροφικό θεικό βανάδιο, της δημιουργίας όγκου του μαστού. Η τελευταία ανακάλυψη μάλιστα, απέδειξε ότι το συγκεκριμένο ιχνοστοιχείο, το οποίο εμπεριέχεται κυρίως στη δυτικού τύπου διατροφή, μπορεί να αποτελεί έναν αποτελεσματικό χημειοπροληπτικό παράγοντα. Επιπλέον, οι βιολογικές επιδράσεις των σύμπλοκων βαναδίου, όπως η ινσουλινο-μιμητική δράση (Tsiani et al., 1997; Goldwasser et al., 2000) και η μείωση της υπερλιπιδαιμίας και της υπέρτασης, σε συνδυασμό με τις λίγες αρνητικές επιπτώσεις τους (Brichard et al., 1995), υποδεικνύουν τις πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές αυτών των συμπλόκων.

### 2.2.2. Βανάδιο: Παρασκευές και ιδιότητες

Στις περισσότερες περιπτώσεις το βανάδιο αποτελεί παραπροϊόν παρασκευής άλλων μετάλλων: τα βαναδιούχα υπολείμματα συνθερμαίνονται με χλωριούχο νάτριο ή ανθρακικό νάτριο στους 900° C, οπότε προκύπτει βαναδικό νάτριο (NaVO<sub>3</sub>). Αυτό εκπλένεται με νερό και ύστερα τήκεται, δίνοντας πεντοξείδιο του βαναδίου (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Στη συνέχεια γίνεται αναγωγή του οξειδίου με ασβέστιο (μέθοδος McKechnie - Seybair):



**Εικόνα 15.:** Βανάδιο (μικροσκοπική εικόνα)

Το βανάδιο είναι αργυρόγκριζο μέταλλο ελαφρώς κυανίζον, με ισχυρή λάμψη σε πρόσφατες τομές του, μαλακό και εύθρυπτο. Παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα στη διάβρωση, καθώς δεν προσβάλλεται από καυστικά αλκάλια, υδροχλωρικό οξύ και θειικό οξύ, αντιδρά δύσκολα με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας, και προσβάλλεται εύκολα από το θαλασσινό ύδωρ. Ωστόσο, σε σχετικά μέσες θερμοκρασίες (660° C) αντιδρά άμεσα με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο (Degani et al., 1981). Γι' αυτό το λόγο δεν χρησιμοποιείται αυτούσιο, αλλά υπό μορφή κραμάτων, ιδιαίτερα με σίδηρο δίνοντας βαναδιούχους χάλυβες, οι οποίοι παρασκευάζονται όχι από καθαρό μέταλλο αλλά με πρόσμιξη πεντοξειδίου του βαναδίου με χάλυβα.

### **2.2.3. Βιοκινητική, κατανομή και μεταβολισμός του βαναδίου**

Η είσοδος του βαναδίου στον οργανισμό εξαρτάται από την οδό χορήγησής του. Από τη στιγμή που θα εισέλθει στον οργανισμό, το βαναδικό (V) ανάγεται σε βαναδύλιο (IV) από τη γλουταθειόνη των ερυθροκυττάρων ή από το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C, ενζυμική δράση) ή από άλλα αναγωγικά στο πλάσμα. Στη συνέχεια μεταφέρεται από την αλβουμίνη και την τρανσφερίνη (πρωτεΐνες που περιέχουν σίδηρο) στις οποίες, πιθανώς δεσμεύεται εκλεκτικά (Sabbioni et al., 1981 ;Degani et al., 1981).

Σε κυτταρικό επίπεδο, ωστόσο, το βαναδικό (V) επικρατεί εξαιτίας του ουδέτερου pH. Βανάδιο (V), εισέρχεται στο κύτταρο μέσω της αντλίας μεταφοράς ιόντων (Cantley et al., 1978; Heinz 1982). Στη συνέχεια το βαναδικό (V) ανάγεται σε βαναδύλιο (IV) από την ενδοκυττάρια γλουταθειόνη (Evangelou et al., 1997; Sabbioni et al., 1993) και εν συνεχεία δεσμεύεται στις πρωτεΐνες. Το αναγωγικό αυτό φαινόμενο ρυθμίζεται από το μηχανισμό κυτταρικής οξειδοαναγωγής, ο οποίος ελέγχει τις μεταβολές του αριθμού οξείδωσης του βαναδίου (Ban et al., 2000; Evangelou et al., 1997; Sakurai et al., 1980).

Μελέτες σε ερυθροκύτταρα υποδεικνύουν έναν διφασικό μηχανισμό εισόδου του βαναδίου στα κύτταρα αυτά. Στη πρώιμη φάση, το βαναδικό (V) προσδένεται στα κύτταρα και στη συνέχεια, εισέρχεται σ' αυτά μέσω των διαύλων μεταφοράς

ιόντων. Η επόμενη, αργή φάση, εξαρτάται από την αναγωγή του (V) σε (IV). Η είσοδος του βαναδίου σε ερυθρά αιμοσφαίρια του *Ascidia nigra*, μέσω αντλίας μεταφοράς ιόντων, απέδειξε ότι το βανάδιο αποθηκεύεται στα κενοτόπια των κυττάρων, και στη συνέχεια ανάγεται σε (IV) ή (III) (τα οποία αποτελούν κατιόντα) και έτσι παρεμποδίζεται απ' το να διαφύγει απ' το κυτταρικό οργανίδιο (Macara et al., 1979 ).

Προσλήψεις βαναδίου (V) από νεφρικά κύτταρα βοδιού (MDBK), αποκάλυψαν πως υπάρχει γραμμική συσσώρευση στα κύτταρα, συγκέντρωσης από 20 έως 200M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (βαναδικό νάτριο) αναλόγως της συγκέντρωσης του μέσου. Το βανάδιο εντός των κυττάρων, διανέμεται κυρίως στον πυρήνα και τα διαλυτά κλάσματα υπερκειμένου (Ban et al., 2000; Sakurai et al., 1980; Sabbioni et al., 1978; Sharma et al., 1980; Edel et al., 1988). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι το βαναδύλιο και το βαναδικό του κυτοσολίου προσδέονται εκλεκτικά σε φωσφορικά, καρβοξυλικά και αμινικά κατάλοιπα. Οι Neckay et al., υπολόγισαν ότι σε κύτταρα που περιέχουν φωσφοκρεατίνη(CP), όπως τα μυϊκά κύτταρα, το 61% του συνολικού V (IV) είναι συνδεδεμένο με φωσφορικά και το 29% με πρωτεΐνες. Σε κύτταρα με υψηλή συγκέντρωση ασκορβικού οξέος, όπως τα κύτταρα του εγκεφάλου, το ασκορβικό δεσμεύει έως και 3% V (IV). Το υπόλοιπο δεσμεύεται πιθανώς σε καρβοξυλικά κατάλοιπα και σε σουλφυδρυλικές ενώσεις, ενώ περίπου το 1% παραμένει αδέσμευτο. Οι Braken et al. αναφέρουν πως το βανάδιο σε MDBK κύτταρα διανέμεται στο κλάσμα του υπερκειμένου σε ποσοστό σχεδόν 90%, και το υπόλοιπο 10% βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, σε πυρηνικά και κυτταρικά θραύσματα και στα μικροσώματα.

Διάφορες μελέτες σε ζωικά μοντέλα έδειξαν ότι το βανάδιο συσσωρεύεται κυρίως στους νεφρούς, στο σπλήνα, στα οστά και στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό συσσωρεύεται στους πνεύμονες και στους όρχεις, ως βαναδύλιο (IV) (Evangelou et al., 1997; Hamel et al., 1995; Domingo et al., 1995) με τα οστά να αποτελούν τον κυρίαρχο ιστό αποθήκευσης και συσσώρευσης βαναδίου (Merritt et al., 1995;

Setyawati et al., 1998). Το βανάδιο απεκκρίνεται ταχέως από τα νεφρά με τα ούρα, με χρόνο ημιζωής 20-40 ώρες.

Η χορήγηση βαναδικού διχλωριδίου σε επίμυες με αναπτυσσόμενη νεοπλασία καθώς και σε νεοπλασματικά ασκητικά κύτταρα Ehrlich, αποκαλύπτει πως το βανάδιο, συσσωρεύεται κυρίως στην ετεροχρωματίνη του πυρήνα και σε μικρότερο βαθμό στον πυρήνα και στα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα των νεοπλασματικών κυττάρων (Korf-Maier et al., 1983).

#### **2.2.4. Επιδράσεις του βαναδίου στην ανάπτυξη και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων**

Η ιδανική αντικαρκινική θεραπεία με οποιοδήποτε σύμπλοκο πρέπει να πληρεί ορισμένες προϋποθέσεις και να ασκεί τις ακόλουθες εκλεκτικές επιδράσεις στα κακοήθη κύτταρα: (α) μείωση του ρυθμού κυτταρικής ανάπτυξης (φαινόμενο υποπολλαπλασιασμού), (β) κυτταροτοξικές ή/και κυτταροστατικές δράσεις που να εκφράζονται είτε με νέκρωση είτε με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση), (γ) μείωση ή/και αναστολή της διηθητικής ή μεταστατικής ικανότητας των κυττάρων, και (δ) μειωμένη ή απύουσα δραστηριότητα επαγωγής της κυτταρικής αντίστασης.

Τα σύμπλοκα βαναδίου έχουν όλες αυτές τις ιδιότητες, που ασκούνται είτε σε συνεργασία είτε ανεξάρτητα, μέσω ποικίλων κυτταρικών μηχανισμών. Οι αντικαρκινικές δράσεις και οι μηχανισμοί των συμπλόκων βαναδίου έχουν εξεταστεί σε ένα εύρος κακοήθων κυτταρικών σειρών (Sartzi et al., 2012; Cortizo et al., 2000; Harding et al., 2000; D’Cruz et al., 2000; Liasko et al., 2000; Tawa et al., 1999; Sakurai et al., 1995; Bosch et al., 1990; Itkes et al., 1990; Montero et al., 1981).

#### **2.2.5. Αποπτωτικές και τοξικές επιδράσεις των συμπλόκων βαναδίου**

Ορισμένες ενδοκυττάρειες σηματοδοτικές οδοί, στις οποίες εμπλέκεται η ύπαρξη συμπλόκων βαναδίου, μπορεί να επηρεάσουν έναν αριθμό κυτταρικών λειτουργιών

μεταξύ των οποίων είναι ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων, η κυτταρική διαφοροποίηση, ο μετασχηματισμός, η μειωμένη κυτταρική προσκόλληση και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση).

Συγκεντρωτικά στοιχεία δείχνουν ότι οι ενώσεις βαναδίου παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση του βαθμού και της διάρκειας της φωσφορυλίωσης ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών, όπως οι AP-1, MEK-1, ERK-1, JNK-1, PI-3K και ο παράγοντας NF-κB (Huang et al., 1998; Ding et al., 1999; Pandey et al., 1995), πρωτεΐνες-κλειδιά των οδών μεταγωγής σήματος, που αφορούν την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου και την καταστροφή του DNA.

Στην ενεργοποίηση των κυτταρικών οδών σηματοδότησης μεσολαβούν φωσφορυλιωμένες τυροσίνες. Η φωσφορυλίωση των τυροσινών έγκειται στη δραστηριότητα των φωσφατασών και φωσφοκινασών της κυτοσολικής τυροσίνης, οι οποίες ρυθμίζουν τη φωσφορυλίωση και την αποφωσφορυλίωση πρωτεϊνών, που είναι κρίσιμες για τη μεταγωγή σήματος.

Τόσο η απενεργοποίηση των φωσφατασών όσο και η ενεργοποίηση των φωσφοκινασών, μπορούν να οδηγήσουν στη συσσώρευση φωσφορυλιωμένης τυροσίνης εντός διαφόρων κυττάρων, στην ενεργοποίηση δεύτερων αγγελιοφόρων μηνυμάτων, στην ενεργοποίηση down - stream κινασών, και στην ενεργοποίηση διαφόρων παραγόντων μεταξύ των οποίων, ο παράγοντας NF-κB, που είναι και ο πιο σημαντικός.

Υπάρχουν επίσης ισχυρές ενδείξεις ότι τα ανόργανα άλατα του βαναδίου ενεργοποιούν φωσφορυλάσες της φωσφοτυροσίνης, και συγκεκριμένα τις MAPKs (Huang et al., 1998; Jaspers et al., 2000; Samet et al., 1998). Οι MAPKs, οι οποίες περιλαμβάνουν την εξωκυττάρια πρωτεϊνική κινάση (ERK), την τερματική κινάση (JNK/SARK) και τις p38 πρωτεϊνικές υποοικογένειες, αποτελούν σημαντικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες, μέσω των οποίων εξωκυττάρια σήματα μετατρέπονται σε ενδοκυττάρια γεγονότα. Είναι υπεύθυνες για την φωσφορυλίωση μιας ποικιλίας πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων και των down-stream κινασών, όπως και



μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ενεργοποιούνται από ένα πλήθος ερεθισμάτων και κυτταρικών αποκρίσεων, κυρίως όμως από το οξειδωτικό στρες.

Τόσο οι ERK όσο και η JNK / SARK σηματοδοτικές οδοί, εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κΒ, μέσω της φωσφορυλίωσης της ανασταλτικής του υπομονάδας ΙκΒ (Wang et al., 1998). Η φωσφορυλίωση του ΙκΒ διαμεσολαβείται κυρίως από ένα μεγάλο σύμπλεγμα πολλαπλών ΙκΒ-κινασών (IKK), το οποίο ενεργοποιείται από μια «ανοδικής οδού» κινάση, η οποία με τη σειρά της αποτελεί μια ενεργοποιημένη μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση (MAPK), κινάση κινάσης (MAPKKK) (Malinin et al., 1997). Παρόλα αυτά οι JNKs και η ERK κινάσες μπορεί να έχουν αντίθετες επιδράσεις στην απόπτωση (Xia et al., 1995).

Υπάρχουν επίσης και άλλες οδοί σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από το βανάδιο και μπορεί να οδηγήσουν σε απόπτωση. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου, για την οποία ευθύνονται τα σύμπλοκα βαναδίου μέσα στο κυτοσόλιο ή στα μιτοχόνδρια, έχει ως αποτέλεσμα σοβαρές βλάβες στα μιτοχόνδρια και απελευθέρωση του κυτοχρώματος C, με συνακόλουθη ενεργοποίηση των κασπασών. Οι ενεργοποιημένες κασπάσες, όπως η κασπάση-3 και η -8, προκαλούν περαιτέρω βλάβη των μιτοχονδρίων και ενεργοποιούν κυτταρικά υποστρώματα όπως η πολυ(ADP-ριβόζη) -πολυμεράση (PARP), οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση (Burkle, 2000).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση αλάτων του βαναδίου σε επιδερμικά κύτταρα επίμοος επάγει την απόπτωση μέσω της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου και άλλων ROS που με τη σειρά τους ενεργοποιούν το p53, ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, που εμπλέκεται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στην επιδιόρθωση του DNA και στην απόπτωση (Assimakopoulos et al., 2000). Κυτταροτοξικά βαναδιούχα παράγωγα επάγουν την απόπτωση σε ανθρώπινα νεοπλασματικά κύτταρα, προκαλώντας αποπτωτικά σήματα, όχι όμως από πρωτογενή βλάβη του DNA ή απαιτώντας την ενεργοποίηση του p53, διαψεύδοντας την υπόθεση ότι η δράση τους μοιάζει μηχανιστικά με την κυτταροτοξική δράση της cis-πλατίνας (Korf-Majer, 1994).

Χορήγηση των συμπλόκων βαναδίου σε ανθρώπους και ζώα αποκάλυψε ότι το βανάδιο μπορεί να ασκήσει διάφορες τοξικές επιδράσεις. Μελέτες σε ζώα (κυρίως σε ποντίκια και αρουραίους) έδειξαν ότι οι τοξικές επιδράσεις των συμπλόκων αυτών σχετίζονται με το είδος του ζώου, τη χορηγούμενη δόση, την οδό χορήγησης και τη χρονική διάρκεια της χορήγησης, καθώς επίσης και με τη φύση του συμπλόκου. Μελέτες που ασχολούνται με τη χορήγηση αλάτων βαναδίου σε ανθρώπους, που πάσχουν είτε από σακχαρώδη διαβήτη είτε από στεφανιαία νόσο υποδεικνύουν ότι με βραχυπρόθεσμη θεραπεία (ανώτατο όριο 4 εβδομάδες), οι πιο συχνές παρενέργειες είναι ήπιες γαστρεντερικές διαταραχές (Goldfine et al., 1995; Boden et al., 1996). Σε μακροχρόνιες θεραπείες (για περίπου πέντε μήνες, 125 mg / ημέρα αλάτων βαναδίου), προκαλείται σχεδόν στο ήμισυ των ασθενών που την έλαβαν (ασθενείς με στεφανιαία νόσο), ανορεξία, απώλεια βάρους και κοιλιακοί πόνοι. Οι Fawcett et al. επεσήμαναν ότι η από του στόματος χορήγηση θειικού βαναδίου σε ανθρώπους δεν έχει καμία επίδραση στα κύτταρα του αίματος σε βιοχημικό επίπεδο. Μελέτες σε ζώα έδειξαν πως ένα μεγάλο εύρος τοξικών επιδράσεων προκαλείται από ενώσεις βαναδίου. Λειτουργικές διαταραχές και ιστοπαθολογικές μεταβολές του ήπατος και των νεφρών είναι οι πιο διαδεδομένες τοξικές επιδράσεις. Η από του στόματος χορήγηση της  $\text{NaVO}_3$  (συγκέντρωσης μεταξύ 5 με 10M, στο πόσιμο νερό) επί 3 μήνες, προκαλεί ήπια και δοσο-εξαρτώμενη ιστοπαθολογική αλλοίωση των νεφρών και του σπλήνα, συνοδευόμενη από αυξημένες συγκεντρώσεις ουρίας και ουρικού οξέος στο πλάσμα, στις περισσότερες εκτεθειμένες ομάδες (Ding et al., 1999). Βανάδιο-εξαρτώμενες χρωμοσωμικές ανωμαλίες και ανευπλοειδία στα χρωμοσωμικά άκρα των γονιδίων που εκφράζουν το μυελό των οστών επίμυων, που προκαλούνται από την ενδογαστρική χορήγηση θειικού βαναδίου, ορθοβαναδικού νατρίου και θειικού αμμωνίου, έχουν επίσης αναφερθεί (Ciranni et al., 1995).

Τοξικές επιδράσεις στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη των αρουραίων και των επίμυων, όπως είναι η μείωση του ρυθμού σύλληψης και η υπανάπτυξη του εμβρύου, εξαιτίας των συμπλόκων βαναδίου, έχουν επίσης εδραιωθεί. Ωστόσο,

μελέτες σε υγιείς και διαβητικούς αρουραίους, δεν δείχνουν καμία σημαντική διαφορά σε αιματολογικές παραμέτρους, στην ηπατική και νεφρική λειτουργία ή χαρακτηριστικές μορφολογικές ανωμαλίες σε διάφορα όργανα (Dai et al., 1995) .

#### **2.2.6. Πιθανές αντιμεταστατικές επιδράσεις των συμπλόκων βαναδίου**

Η φωσφορυλίωση της πρωτεϊνικής τυροσίνης, η οποία επάγεται από σύμπλοκα βαναδίου, μπορεί επίσης να επηρεάσει την επεμβατική και μεταστατική δραστηριότητα των νεοπλασματικών κυττάρων, ρυθμίζοντας την προσκόλληση κυττάρου-υποστρώματος (Takenaga, 1996), ή τη διακυτταρική επικοινωνία και τις μεταβολές της ακτίνης του κυτταροσκελετού (Matsuyoshi et al., 1992; Dharwan et al., 1997; Lubber et al., 2000). Πρωτεΐνες συγκόλλησης εμπλέκονται σε νεοπλασματικές μεταστάσεις και διηθήσεις (Zhou et al., 2000; Cavenagh et al., 1998). Τα σύμπλοκα βαναδίου μπορεί επίσης να αποτρέπουν την αιματογενή εξάπλωση του καρκίνου, με ενεργοποίηση της ενδογενούς ινωδόλυσης-επαγόμενη από καρκινογένεση και με αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Και οι δυο αυτοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην αιματογενή μετάσταση του καρκίνου (Zhou et al., 2000; Biggerstaff et al., 1999; Ghiso et al., 1998).

Το υπερβαναδικό, έχει βρεθεί να αναστέλλει την επαγωγή των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών προσκόλλησης ICAM-1, V-CAM-1 και ELAM-1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτή η αναστολή είναι πιθανόν να συμβαίνει λόγω της αδρανοποίησης των PTPs και της επακόλουθης μείωσης της έκφρασης του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF), ο οποίος αποτελεί, μάλιστα, ένα από τα βασικότερα μόρια προσκόλλησης στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αναστολή των PTPs από υπερβαναδικό εμποδίζει, επίσης, την προσκόλληση των μονοκυττάρων σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Dharwan et al., 1997). Επιπλέον, η ενισχυόμενη φωσφορυλίωση της τυροσίνης από βανάδιο, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της κυτταρικής συσσώρευσης που οφείλεται στην καντχερίνη, σε κύτταρα 3Y1 αρουραίου, μετασχηματισμένα με v-src και διπλά μετασχηματισμένα με v-src και v-fos (Matsuyoshi et al., 1992). Επανελημμένες επεξεργασίες κυττάρων που εκφράζουν παράγωγα της

μεταλλαγμένης E-καντχερίνης με υπερβαναδικό, κλωνοποιημένα από κύτταρα διάχυτου γαστρικού καρκινώματος, που οδήγησαν σε απώλεια διακυτταρικής επαφής και σε αυξημένες μεταβολές της ακτίνης του κυτταροσκελετού, φάνηκε να οφείλονται στην φωσφορυλίωση τυροσινικών καταλοίπων του συμπλέγματος προσκόλλησης (Luber et al., 2000).

Θεραπεία με ορθοβαναδικό νάτριο των νεοπλασματικών κυττάρων A11 του μεταστατικού πνευμονικού καρκινώματος Lewis, είχε ως αποτέλεσμα την δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενη καταστολή διάφορων μορίων συγκόλλησης που απελευθερώνονται στο πλάσμα, όπως η φιβρονεκτίνη, η λαμινίνη και το κολλαγόνο IV (Takenaga, 1996), αλλά ταυτόχρονα, δεν αναστέλλεται σημαντικά η προσκόλληση των κυττάρων σε αυτά τα υποστρώματα. Η καταστολή της κυτταρικής εξάπλωσης, ωστόσο, δεν οφειλόταν άμεσα στην αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης που προκάλεσε το ορθοβαναδικό. Διαπιστώθηκε επίσης πως το βανάδιο, ως αναστολέας φωσφατάσης μπορεί να διεγείρει τον ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης σε LM3 νεοπλασματικά κύτταρα μαστού επίμυος (Ghiso et al., 1998) ρυθμίζοντας έτσι την πήξη του αίματος. Επιπλέον, το ορθοβαναδικό, μπορεί να μειώσει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που συμβαίνει εξαιτίας της ενεργοποίησης του υποδοχέα θρομβίνης, εμποδίζοντας την αποφωσφορυλίωση των τυροσινών P38 και P140 (εξαρτώμενη από ιντεγκρίνες), και την σύνδεση των αιμοπεταλίων στο ινωδογόνο (Luber et al., 1994). Η αποφωσφορυλίωση των παραπάνω τυροσινών και η σύνδεση των αιμοπεταλίων στο ινωδογόνο εμπλέκονται στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση και στη μετάσταση όγκων (Doige et al., 1992). Το βανάδιο αποτελεί επίσης αναστολέα της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων της προκαλούμενης με αγωνιστή το κολλαγόνο καθώς και της αντίδρασης απελευθέρωσης του περιεχομένου των αιμοπεταλιακών κοκκίων, η οποία εξαρτάται από τη συγκέντρωση του (Martin et al., 2000) και μετατρέπει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση από αντιστρεπτή σε μη αντιστρεπτή. Η δραστηριότητα των αιμοπεταλιακών και ενδοθηλιακών μορίων προσκόλλησης, φαίνεται, επίσης να ρυθμίζεται από την αναστολή της δραστηριότητας των φωσφατασών, που επάγεται από το ορθοβαναδικό (Kanik-Ennulat et al., 1990).

### 2.2.7. Αντίσταση των κυττάρων σε φάρμακα και σύμπλοκα βαναδίου

Η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη (Ρ-gr), μέλος της οικογένειας των ABC πρωτεϊνών μεταφοράς, προσδίδει αντοχή σε πολλαπλά φάρμακα δρώντας ως πρωτεΐνη της πλασματικής μεμβράνης, η οποία συγκεντρώνει την ποσότητα του φαρμάκου που έχει εισέλθει στο κύτταρο και χρησιμοποιώντας την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP την διοχετεύει μέσω της αντλίας εκροής της μεμβράνης, προς τα έξω (εκροή φαρμάκου) (Doige et al., 1992; Martin et al., 2000). Η εναλλακτική κυτταρική συσσώρευση αντικαρκινικών παραγόντων θεωρείται, συνεπώς, ένας σημαντικός παράγοντας στην εγγενή αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία.

Σε ορισμένους μικροοργανισμούς (όπως ο σακχαρομύκητας και ο μύκητας *candidas*) έχει διαπιστωθεί ανοχή σε βανάδιο, οι οποίοι είτε όντας μεταλλαγμένοι έχουν εκδηλώσει μεταβολές στην πρωτεϊνική φωσφορυλίωση (έλεγχος ανάπτυξης) ή έχουν εκδηλώσει ελαττωματική διαμεμβρανική ΑΤΡάση (Kanik-Ennulat et al., 1990).

Υπάρχουν, ωστόσο, ενδείξεις ότι οι ενώσεις βαναδίου μπορεί να επαναφέρουν την ευαισθησία σε νεοπλασματικά κύτταρα που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε πολλά φάρμακα, έτσι ώστε η κυτταροτοξική δράση διάφορων αντινεοπλασματικών παραγόντων να αναστέλλει τη δραστηριότητα της ΑΤΡάσης. Η αναστολή της ΑΤΡάσης μειώνει την εκροή ενός τοξικού φαρμάκου εξαιτίας της Ρ-gr, πιθανώς μειώνοντας την ικανότητα σύνδεσης του μεταφερόμενου υποστρώματος (Martin et al., 2000; Shepard et al., 1998, Al-Shawi et al., 1993). Επιπλέον, το βανάδιο μπορεί να καταστρέφει τις ίνες ακτίνης του κυτταροσκελετού των ανθεκτικών σε πολλά φάρμακα νεοπλασματικών κυττάρων, καθιστάμενο έτσι κυτταροτοξικό και ενδεχομένως αποτελεσματικό στην χημειοθεραπεία έναντι στερεών όγκων (Capella et al., 2000, Colin et al., 1994). Η ενεργοποίηση ορισμένων πρωτεϊνικών κινασών από ενώσεις βαναδίου, αντίθετα, αυξάνει την αντίσταση στην βινμπλαστίνη, κυττάρων πολλαπλής αντοχής σε χημειοφάρμακα, αυξάνοντας τη φωσφορυλίωση της Ρ-gr στις μεμβρανικές κυψελίδες του πλάσματος, κατά πάσα πιθανότητα από μια GTP-ρυθμιζόμενη φωσφορυλίωση (Lelong et al., 1994).

## 2.3. Σύμπλοκα ψευδαργύρου

### 2.3.1. Γενικά

Ο ψευδάργυρος είναι το εικοστό τέταρτο πιο άφθονο στοιχείο στη γη, σε ποσοστό 0.004%. Μαζί με τον σίδηρο, τον χαλκό, το μαγγάνιο και το νικέλιο μεταξύ άλλων, ο ψευδάργυρος ανήκει στην ομάδα των στοιχείων μετάπτωσης του περιοδικού πίνακα. Με ατομικό αριθμό 30 και ατομικό βάρος 65.38, ο ψευδάργυρος είναι μοναδικός ανάμεσα στα στοιχεία μετάπτωσης λόγω της υψηλής σταθερότητας της δισθενούς του μορφής ως κατιόν ( $Zn^{++}$ ). Από την άποψη αυτή, δεν είναι ούτε οξειδωτικός ούτε αναγωγικός παράγοντας και δεν συμμετέχει στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής.

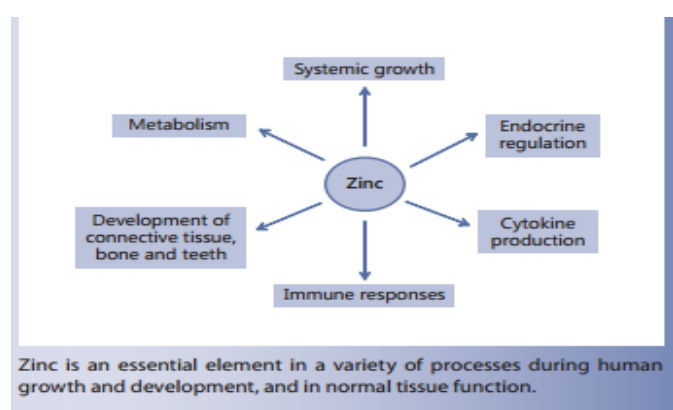
Ο ψευδάργυρος σχηματίζει άλατα και σύμπλοκες ενώσεις. Το οξείδιο του ψευδαργύρου είναι μια υπόλευκη σκόνη, που δεν διαλύεται εύκολα στο νερό σε ουδέτερο pH. Το θειικό του άλας σχηματίζει μπλε κόκκους, διαλύεται στο νερό και έχει έντονη μεταλλική γεύση.

Αποτελεί ένα από τα βασικότερα ιχνοστοιχεία στο σώμα και είναι απαραίτητος για την αύξηση και την ανάπτυξη μικροοργανισμών, φυτών και ζώων. Εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς του σώματος σε υψηλές συγκεντρώσεις, με το 85% της ολικής του ποσότητας να κατανέμεται στους μύες και τα κόκαλα, το 11% στο δέρμα και στο ήπαρ και το υπόλοιπο σε άλλους ιστούς και κυρίως στον προστάτη και σε διάφορα μέρη του οφθαλμού. Η μέση ποσότητα ψευδαργύρου στο σώμα ενός ενήλικα είναι 1,4-2,3 g (Calesnick and Dilan, 1988; Stefanidou et al., 2006; Prasad 2009; Browmik et al., 2010).

Αποτελεί δομικό συστατικό πολλών πρωτεϊνών και περισσότερων από 200 ενζύμων, μεταγραφικό ρυθμιστή σε ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών και βιοχημικών μηχανισμών, αλληλεπιδρά με τα αμινοξέα και είναι ο κύριος ρυθμιστής του μεταβολισμού του σιδήρου στα κύτταρα (Solomons 2013; Walkup et al., 2000).

Ο ψευδάργυρος είναι λοιπόν απαραίτητος για την ανάπτυξη των κυττάρων, για την συνολική σωματική ανάπτυξη, τις ομοιοστατικές διεργασίες, την ανάπτυξη και

διατήρηση του συνδετικού ιστού, την σύνθεση του DNA, τη μεταγραφή του RNA, την κυτταρική διαίρεση και την κυτταρική ενεργοποίηση. Συμμετέχει επίσης στην επούλωση των τραυμάτων, στην οξύτητα της γεύσης, στη σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, στην παραγωγή προσταγλανδινών, στην καλή λειτουργία του θυροειδούς αδένου, στην αιμοστατική λειτουργία, στις γνωστικές λειτουργίες, στην ανάπτυξη των εμβρύων και στην παραγωγή του σπέρματος. Ρυθμίζει το pH του σώματος, προωθεί την δημιουργία του απαραίτητου κολλαγόνου για τα μαλλιά, τα νύχια και το δέρμα και είναι σημαντικός για τις μνημονικές λειτουργίες και την διανοητική ανάπτυξη. Επιπλέον, διατηρεί τη φυσιολογική λειτουργία του προστάτη και έχει υπεισέρχεται στην έκκριση τεστοστερόνης (Bhowmik et al., 2010). Ο ψευδάργυρος εμπλέκεται στις αποκρίσεις του ανοσοποιητικού συστήματος, στο οξειδωτικό στρες, στον μηχανισμό της απόπτωσης και στη γήρανση (Stefanidou et al., 2006; Murakami and Hirano, 2008; Prasad 2009; Plum et al., 2010) και τέλος εμφανίζει αντιμικροβιακές ιδιότητες (Zelenak et al., 2002; Barnett et al., 1977; Erer et al., 2009; Chohan et al., 2007), όπως επίσης αντιδιαβητικές και ινσουλινομιμητικές δράσεις (Matsumoto et al., 2005; Nakayama et al., 2008).



**Εικόνα 16:** Ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη του οργανισμού και την φυσιολογική λειτουργία των ιστών.

### 2.3.2. Μεταφορείς ψευδαργύρου

Δύο διακριτές κλάσεις μεταφορέων ψευδαργύρου, που όμως αλληλεπιδρούν, έχουν ταυτοποιηθεί και μελετηθεί εκτενώς την προηγούμενη δεκαετία όσον αφορά τη θέση των γονιδίων τους, τη δομή και την αλληλουχία τους και την αλληλεπίδρασή τους με άλλους μεταφορείς. Ταυτοποιήθηκαν συνολικά 24 διακριτοί μεταφορείς (Lichten and Cousins, 2009). Η πρώτη κλάση μεταφορέων ψευδαργύρου (ZnT) είναι αυτή οποία ανήκουν οι μεταφορείς 1-10 (ZnT1- ZnT10). Εμπλέκονται στη μεταφορά ιόντων ψευδαργύρου από το κυτοσόλιο στα κυτταρικά οργανίδια ή εκτός του κυττάρου και περιέχουν κατάλοιπα κυστεΐνης. Η δεύτερη κλάση είναι των ZrT, Irt-like protein (ZIP). Η κλάση αυτή έχει την αντίθετη λειτουργία: μεταφέρει το μέταλλο είτε από τον εξωκυττάριο χώρο είτε από τα οργανίδια του κυττάρου στο κυτοσόλιο . Για περίπου τους μισούς ZnT μεταφορείς και ZIP πρωτεΐνες έχουν αναφερθεί φυσιολογικοί και παθοφυσιολογικοί ρόλοι στους οποίους εμπλέκονται (Lichten and Cousins, 2009).

**Table 2.** Established functions of members of the zinc transport protein families

<i>Zinc transporter (ZnT)</i>	
ZIP4	intestinal zinc transport
ZIP5	intestinal zinc transport
ZIP6	pancreatic release of endogenous zinc
ZIP7	metastatic breast cancer
ZIP10	metastatic breast cancer
	renal zinc reabsorption
ZIP14	hypozincemia of inflammation
<i>Zrt-, Irt-like protein (ZIP)</i>	
ZnT1	intestinal zinc transport
	pancreatic release of endogenous zinc
	renal zinc reabsorption
ZnT2	pancreatic release of endogenous zinc
	breast milk zinc in lactation
ZnT8	insulin processing

As compiled from Lichten and Cousins [15].

### Πίνακας 2: Μεταφορείς ψευδαργύρου



### 2.3.3. Βιολογία και φυσιολογία του ψευδαργύρου

Ο ψευδάργυρος διαδραματίζει τρεις κυρίαρχους βιολογικούς ρόλους στον ανθρώπινο οργανισμό: έναν καταλυτικό, έναν δομικό και έναν ρυθμιστικό (Chasapis et al., 2011).

**Καταλυτικός ρόλος:** Ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος και άμεσα εμπλεκόμενος στην κατάλυση ή την συν-κατάλυση ενζύμων που ελέγχουν πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως η σύνθεση του DNA, η φυσιολογική ανάπτυξη, η ανάπτυξη του εγκεφάλου, η συμπεριφορική απόκριση, η αναπαραγωγή, η ανάπτυξη του εμβρύου, η δημιουργία των οστών και η επούλωση των τραυμάτων (Barceloux 1999; Mocchegiani et al., 2000).

**Δομικός ρόλος:** Ο ψευδάργυρος λόγω των φυσικοχημικών του ιδιοτήτων έχει δομικούς και λειτουργικούς ρόλους σε διάφορες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA και είναι υψίστης σημασίας για την λειτουργία πολλών μεταλλοπρωτεϊνών (Mocchegiani et al., 2000; Tariero and Tew, 2003). Σε οποιαδήποτε ομάδα ενζύμων, το σημείο πρόσδεσης του μετάλλου είναι συγκεκριμένο (Vallee, 1995). Τα ιόντα ψευδαργύρου είναι υδρόφιλα και δεν διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες με παθητική διάχυση. Η διάχυση εξαρτάται από την συγκέντρωση του μετάλλου. Τα ιόντα ψευδαργύρου είναι παρόντα στην έκφραση των γενετικών πληροφοριών, στην αποθήκευση, σύνθεση και δράση πεπτιδικών ορμονών και στη διατήρηση της δομής της χρωματίνης και των βιολογικών μεμβρανών (Tariero and Tew, 2003)

**Ρυθμιστικός ρόλος:** Η βιολογική σπουδαιότητα του ψευδαργύρου έγκειται στην παρουσία μηχανισμών ομοιόστασης που ρυθμίζουν την απορρόφηση, την κατανομή, την κυτταρική πρόσληψη και την απέκκριση του. Ο ψευδάργυρος ρυθμίζει και τη δραστηριότητα των ενζύμων και την σταθερότητα των πρωτεϊνών είτε ως ενεργοποιητής είτε ως αναστολέας (Mocchegiani et al., 2000). Έχει επίσης βρεθεί πως ρυθμίζει τις διαδικασίες μεταγωγής σήματος των κυττάρων και ακόμα πως λειτουργεί ως σημαντικός ρυθμιστής της συναπτικής νευροδιαβίβασης στην περίπτωση των νευρώνων που περιέχουν ψευδάργυρο του προσθεγκέφαλου (Beyersmann, 2002).

#### **2.3.4. Επιδράσεις του ψευδαργύρου στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων**

Ο ψευδάργυρος παίζει έναν βασικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό διαφόρων ιστών και κυτταρικών τύπων (Wong et al., 2007; Corniola et al., 2008). Η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τον ψευδάργυρο συμβαίνει σε διάφορα επίπεδα αν λάβουμε υπόψη την ανάγκη για ψευδάργυρο για την δράση των ενζύμων που εμπλέκονται στη σύνθεση του DNA και τον ρόλο του στη ρύθμιση της έκφρασης των ενζύμων αυτών, αλλά επίσης και τις επιδράσεις που ασκεί στην ορμονική ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης (Chasapis et al., 2011).

#### **2.3.5. Αποπτωτικές και τοξικές επιδράσεις του ψευδαργύρου**

Ο ψευδάργυρος έχει βρεθεί πως εμπλέκεται στον μηχανισμό της απόπτωσης των κυττάρων (Truong-Tran et al., 2003; Clegg et al., 2005). Η απόπτωση είναι ο κύριος μηχανισμός προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, απαραίτητος για την απομάκρυνση κυττάρων που φέρουν μεταλλάξεις ή μέτρια κατεστραμμένων ή περιπτών κυττάρων (Nath et al., 2000). Η περιοχή της θέσης πρόσδεσης του γονιδίου p53 στο DNA έχει μια σύνθετη τριτοταγή δομή που σταθεροποιείται από τον ψευδάργυρο (Dhawan and Chadha, 2010). Η εξάρτηση της πρόσδεσης του p53 στο DNA από τα επίπεδα συγκέντρωσης του ψευδαργύρου αναπαριστά ένα μονοπάτι που ρυθμίζει την δραστηριότητα του γονιδίου p53 *in vivo* (Palecek et al., 1999). Αύξηση του ρυθμού της απόπτωσης παρατηρείται ως άμεση ή έμμεση συνέπεια της μείωσης των ενδοκυττάρων συγκεντρώσεων ψευδαργύρου. Ως εκ τούτου, ο ψευδάργυρος που υπάρχει εντός των κυττάρων έχει περιγραφεί ως ένας αναστολέας του μηχανισμού της απόπτωσης, ενώ η μείωση της συγκέντρωσής του επάγει τον θάνατο σε πολλές κυτταρικές σειρές (Seve et al., 2002).

Πιο συγκεκριμένα, τα χαμηλά επίπεδα ψευδαργύρου πυροδοτούν την απόπτωση σε φυσιολογικές ινοβλάστες, σε ηπατοκύτταρα, σε κύτταρα γλοιώματος και σε κύτταρα όρχεως. Ο ψευδάργυρος δρα ως αναστολέας των κασπασών 3, 8 και 9 (Thornberry and Lazebnik, 1998; Truong-Tran et al., 2001). Η έλλειψη ψευδαργύρου μπορεί επίσης να επάγει την απόπτωση μέσω της διακοπής των μονοπατιών

μετάδοσης σημάτων των αυξητικών παραγόντων που διαμεσολαβούνται από υποδοχείς των τυροσινικών κινασών (Clegg et al., 2005).

Τα άλατα και οι ατμοί του ψευδαργύρου ασκούν έντονη τοπική ερεθιστική ενέργεια τόσο στο δέρμα όσο και στους βλεννογόνους, αποτέλεσμα δε της τοπικής αυτής ερεθιστικής δράσης (μετά την λήψη των αλάτων του εκ του στόματος) είναι η πρόκληση εμετού, συνέπεια η οποία περιορίζει αρκετά την τοξικότητα του μετάλλου, λόγω αποβολής του (Evans 1945; Johnson and Stonehill 1961; Schenker et al. 1981). Εφόσον όμως ληφθούν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες είναι δυνατό να προκληθούν αντανακλαστικώς, από την έντονη ερεθιστική επενέργεια, περιφερική κυκλοφορική ανεπάρκεια ή θάνατος (Evans 1945).

Έχει ακόμη βρεθεί ότι ο ψευδάργυρος, εκτός από το γαστρεντερικό, ασκεί τοξική επίδραση και σε άλλα όργανα. Έτσι, η επίδρασή του στο πάγκρεας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων γλυκόζης και αμυλάσης, καθώς και μείωση των συγκεντρώσεων του ασβεστίου, ενώ στους νεφρούς προκαλείται οξεία σωληναριακή νέκρωση. Στους πνεύμονες, η εισπνοή  $ZnCl_2$  προκαλεί χημική πνευμονίτιδα (Malo et al. 1990; Vogelmeier et al. 1987, Κουτσελίνης 1997). Τέλος, σε ινδικά χοιρίδια έχει βρεθεί, πως οι υψηλές συγκεντρώσεις ψευδαργύρου έχουν τοξικές επιδράσεις στην καρδιά μέσω ταχείας μείωσης της δύναμης συστολής και μεταβολών του καρδιακού ρυθμού (Kalfakakou et al., 1993).

Οι ενώσεις του ψευδαργύρου χορηγούμενες παρεντερικώς προκαλούν καταστολή του ΚΝΣ, τρόμο και παραλύσεις, ενώ σε πειραματόζωα η υποδόρια χορήγηση γαλακτικού ψευδαργύρου σε δόση ισοδύναμη προς 57 mg/kg βάρους σώματος επιφέρει το θάνατό τους σε τρεις ημέρες. Η ελάχιστη, εξάλλου θανατηφόρος δόση σε επίμυες, μετά λήψη ψευδαργύρου εκ του στόματος, έχει βρεθεί ίση προς 57 mg/kg (Κουτσελίνης 1997). Ο  $ZnCl_2$  θεωρείται η πιο τοξική ένωση του ψευδαργύρου (Schenker et al. 1981; Zerahn et al. 1999).

Υπερβολική λήψη ψευδαργύρου χρονίως, προκαλεί διαταραχές στην απορρόφηση του χαλκού, οι οποίες μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα και την πρόκληση αναιμίας, διαταραχές στη λειτουργία των λεμφοκυττάρων και των ουδετερόφιλων

πολυμορφοπύρηνων και μείωση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης του ορού και παροδική αύξηση της LDL χοληστερόλης (Vogelmeier et al. 1987; Κουτσελίνης 1997).

Όσον αφορά την καρκινογόνο δράση του ψευδαργύρου, έχουν παρατηρηθεί σε πειραματόζωα τερατώματα και σεμινώματα των όρχεων, καθώς και δικτυοσάρκωμα των πνευμόνων μετά από έγχυση μεγάλων δόσεων αδιάλυτων αλάτων του ψευδαργύρου στους αντίστοιχους ιστούς. Στοιχεία που να αποδεικνύουν πως ο ψευδάργυρος ασκεί καρκινογόνο δράση στον άνθρωπο δεν υπάρχουν (Elinder 1986).

Τέλος, ο ψευδάργυρος δεν φαίνεται να έχει τερατογόνο δράση, ενώ αντίθετα, σε περίπτωση ανεπάρκειας του μετάλλου, είναι δυνατό να προκληθεί τερατογένεση (Cotran et al. 1989; Elinder 1986; Sandstead 1981; Κουτσελίνης 1997).

### **2.3.6. Ψευδάργυρος και νεοπλασματική νόσος**

Πολλά στοιχεία της διατροφής θεωρείται πως συμβάλουν στην πρόληψη της νεοπλασματικής νόσου. Ο ψευδάργυρος έχει κυρίαρχο ρόλο στην άμυνα του οργανισμού ενάντια στη δημιουργία και την πρόοδο αρκετών νεοπλασιών (Dhawan and Chadha, 2010).

Μη φυσιολογικά επίπεδα ψευδαργύρου σχετίζονται με συστημικές βλάβες, όπως η ανάπτυξη νεοπλασιών (Gurta et al., 2005). Παρόλο που τα επίπεδα ψευδαργύρου είναι μειωμένα σε ασθενείς με νεοπλασίες, μία ξεκάθαρη σχέση μεταξύ ψευδαργύρου και ανάπτυξης νεοπλασιών δεν έχει αποδειχθεί, και φαίνεται να εξαρτάται από τον είδος της νεοπλασίας (Chakravarty et al., 1986; Margalioth et al., 1983; Schwartz et al., 1974). Χαμηλά επίπεδα ψευδαργύρου έχουν βρεθεί σε διάφορους τύπους κακοηθειών, όπως του ήπατος, της γαστρεντερικής οδού και του προστάτη (Zhao and Eide, 1996; Li et al., 2007; Costello and Franklin, 2006). Αντίθετα, και υψηλά και χαμηλά επίπεδα ψευδαργύρου έχουν βρεθεί σε νεοπλάσματα μαστού (Zhao and Eide, 1996; Manning et al., 1994; Taylor et al., 2007).

Επομένως, δεν αποτελεί έκπληξη πως έχει προταθεί μια σύνδεση μεταξύ των επιπέδων των μεταφορέων ψευδαργύρου και της ανάπτυξης νεοπλασιών (Gupta et al., 2005; Christiansen and Rajasekaran, 2006). Πολλαπλοί μεταφορείς ψευδαργύρου, όπως οι ZIP4, ZIP6, ZIP10 και ZIP1, έχουν ταυτοποιηθεί κατά την πρόοδο της νεοπλασματικής νόσου. Ο ZIP4 έχει αναφερθεί ότι αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της μεταφοράς του ψευδαργύρου, προκαλώντας την ανάπτυξη του όγκου, κυρίως στο νεόπλασμα του παγκρέατος (Franklin and Costello, 2009; Li et al., 2007). Οι μεταφορείς ψευδαργύρου ZIP6 και ZIP10 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην μεταστατική ικανότητα της νεοπλασίας του μαστού (Murakami and Hirano, 2008; Manning et al., 1994; Taylor et al., 2007) και ο ZIP1 έχει προταθεί ως καταστολέας της νεοπλασίας του προστάτη (Costello and Franklin, 2006). Έτσι, με βάση την διακοπή της μεταφοράς του ψευδαργύρου στους ιστούς θα μπορούσαν να αναπτυχθούν θεραπείες για την καταπολέμηση των νεοπλασματικών κυττάρων. Εναλλακτικά, εκμεταλλευόμενοι την αυξημένη πρόσληψη ψευδαργύρου από τους όγκους, η δημιουργία συμπλόκων με ψευδάργυρο και υποκαταστάτες μόρια που έχουν κυτταροτοξική δράση θα μπορούσε να είναι μια πιο στοχευμένη θεραπεία, εκλεκτική δηλαδή για τα νεοπλασματικά κύτταρα. Αρκετά σύμπλοκα με ψευδάργυρο έχουν ερευνηθεί και έχει αποδειχθεί πως αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό νεοπλασματικών κυττάρων (Konidaris et al., 2012; Kovala-Demertzi et al., 2006; Stanojkovic et al., 2010; Gao et al., 2010; Buczkowska et al., 2011; Liguori et al., 2010).



## ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο Αρεταίος σημειώνει «Ολέθρια τα καρκινώδεα...» (Κούζης, 2004)

Από τους αρχαίους χρόνους έως και σήμερα, η μάχη κατά του καρκίνου έχει πολλούς νικητές, αλλά και ηττημένους.

Ιστορικά, τα ευρήματα του Otto Warburg έριξαν φως στη μεταβολική διαφοροποίηση των νεοπλασματικών κυττάρων και υπέδειξαν έναν πιθανό στόχο για την εκλεκτική θανάτωση τους και τη θεραπεία του καρκίνου. Το φαινόμενο Warburg παρόλο που χρησιμοποιείται με εξαιρετική επιτυχία στη διάγνωση του καρκίνου, μέσω της PET, δεν είναι καθολικά αποδεκτό για όλους τους τύπους νεοπλασιών.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποσκοπεί στην *in vitro* διερεύνηση του τρόπου μεταβολισμού τεσσάρων νεοπλασματικών κυτταρικών σειρών-λειομυοσαρκωματικά κύτταρα επίμυος Wistar (LMS), κύτταρα αδenoκαρκινώματος μαστού ανθρώπου (MCF-7), κύτταρα αδenoκαρκινώματος τραχήλου μήτρας ανθρώπου (HeLa) και κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκίνου ανθρώπου (HepG2)- και την επιβεβαίωση ή μη του φαινομένου του Warburg. Ιδιαίτερα τα κύτταρα λειομυοσαρκώματος που απομονώθηκαν στο εργαστήριο Φυσιολογίας έχουν μελετηθεί ελάχιστα ως προς τη βιολογία τους με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία. Εν συνεχεία, χρησιμοποιώντας νεοσυντεθιμένα σύμπλοκα με ψευδάργυρο και βανάδιο, μέταλλα με αποδεδειγμένη ινσουλινο-μιμητική δράση, ερευνήθηκε το κατά πόσο προκαλούν κυτταροτοξική δράση, ο μηχανισμός με τον οποίο πυροδοτούν τον κυτταρικό θάνατο, αν τα κύτταρα αποκτούν ανθεκτικότητα στη δράση τους και η επίπτωση τους στον μεταβολισμό και την παραγωγή ενέργειας των κυττάρων. Τέλος πραγματοποιήθηκε μελέτη της οξείας τοξικότητας του ισχυρότερου συμπλόκου με στόχο την πρόταση του για περαιτέρω φαρμακοκινητικές μελέτες και διερεύνηση της αντικαρκινικής του δράσης.

Η διατριβή αυτή λοιπόν θέτει ως υπόθεση εργασίας πως καινοτόμα σύμπλοκα μετάλλων που θα στοχεύουν την γλυκολυτική πορεία, σε συνδυασμό πιθανώς με ήδη χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα, θα συμβάλλει στην καλή πρόγνωση της νεοπλασματικής νόσου, με λιγότερες παρενέργειες σε φυσιολογικά κύτταρα και ιστούς και κατά συνέπεια σε μια καλή ποιότητα ζωής για τους ασθενείς- φέροντες την νεοπλασματική νόσο.



## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

## ΥΛΙΚΑ, ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ, ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ, ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής δίχως τα ακόλουθως αναφερόμενα υλικά δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί:

### 3.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Τρυβλία ιστοκαλλιέργειας 100 mm ,πολυτρυβλία 6, 24 θέσεων & 96 θέσεων
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) – Low glucose (1g/L) with L-glutamine, της εταιρείας PAA
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) – High glucose (4,5g/L) with L-glutamine, της εταιρείας PAA
- FBS (Fetal bovine serum), της εταιρείας BIOCHROM AG
- Penicillin/streptomycin, της εταιρείας PAA
- L-Glutamine, 200 nM (100x), της εταιρείας PAA
- PBS (Phosphate Buffered Saline), της εταιρείας Sigma-Aldrich
- DMSO (Dimethylsulfoxid Methyl Sulfoxide), της εταιρείας Sigma-Aldrich
- Trypsin- EDTA, της εταιρείας PAA
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, της εταιρείας Sigma-Aldrich
- Methanol και Acetic Acid, της εταιρείας Fluka
- Πλάκες Neubauer
- Πιπέτες Pauster
- Ορολογικές πιπέτες (5,10,25 ml)
- Πιπέτες Gillson (2-20, 10-200, 100- 1000 μl)

- Πολυπιπέτα
- Falcon (15 και 50 ml)
- Giemsa Stain Modified Solution και NaCl, της εταιρίας Riedel-de Haen
- Annexin V-FITV, της εταιρίας BD Pharmingen TM
- Propidium Iodide solution, της εταιρίας Sigma-Aldrich
- Ketamine, της εταιρίας Imalgene
- Σύριγγες 1ml, 25G, της εταιρίας BD
- 10K Spin Column, της εταιρίας BioVision
- Iodoacetic acid, της εταιρίας Sigma-Aldrich
- 2-deoxy-D-glucose, της εταιρίας Sigma-Aldrich
- Oligomycin, της εταιρίας Sigma-Aldrich
- Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit, της εταιρίας Invitrogen, A22189
- Deproteinating Sample Preparation Kit, της εταιρίας BioVision, K808-200
- ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit, της εταιρίας BioVision, K354-100
- Lactate Colorimetric Assay Kit II, της εταιρίας BioVision, K627-100
- Mitochondrial Viability Stain, της εταιρίας abcam, ab129732
- GAPDH (G-9) Antibody, της εταιρίας Santa-Cruz, sc365062
- Monoclonal Anti- $\alpha$ -Tubulin Antibody, (clone B-5-1-2) της εταιρίας Sigma-Aldrich
- Goat Anti-Mouse IgG, της εταιρίας THERMO SCIENTIFIC (31430)
- μεμβράνη νιτροκυταρίνης Hybond C, της εταιρίας AMERSHAM,
- Microplate Spectrophotometer (DigiScan Reader 400, ASYS Hitech GmbH, Austria)
- Flow Cytometer (Partec ML, Partec GmbH, Germany)

### 3.2. ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

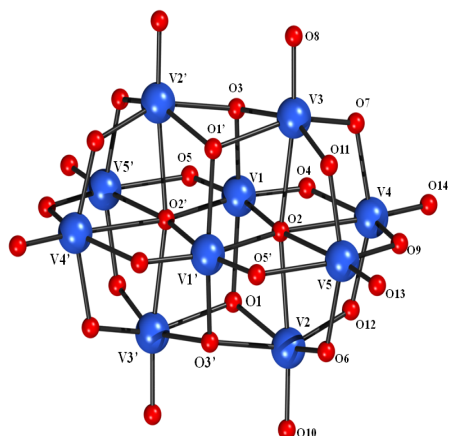
Για την παρούσα διδακτορική διατριβή συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν σε προηγούμενες εργασίες τα ακόλουθα σύμπλοκα μετάλλων με μοριακούς τύπους:

#### 3.1.1. Σύμπλοκα Βαναδίου

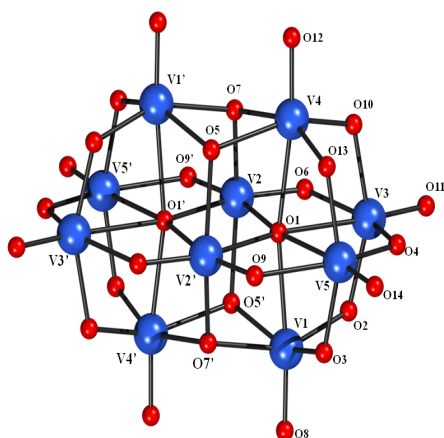
- $[(\rho\gamma\text{H})_6(\text{V}_{10}\text{O}_{28})\cdot 2\text{H}_2\text{O}]$  **(1)**
- $(\text{LH})_4\{\text{V}_{10}\text{O}_{26}(\text{OH})_2\}\cdot 2\text{L}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  **(2)**
- $\{(\text{L}'\text{H}_2)(\text{VO}_3)_2\}_n$  **(3)**
- $(\text{L}''\text{H}_2)_3[\text{V}^{\text{IV}}_9\text{V}^{\text{V}}_6\text{O}_{36}]\cdot 14\text{H}_2\text{O}$  **(4)**
- $\{[\text{V}^{\text{IV}}_{11}\text{V}^{\text{V}}_7\text{Na}_{10}\text{O}_{44}(\text{N}_3)(\text{H}_2\text{O})_{32}]\cdot 14\text{H}_2\text{O}\}_n$  **(5)**
- $[\text{V}^{\text{IV}}_2\text{O}_2(\text{SO}_4)\{(\rho\gamma)_2\text{C}(\text{OMe})(\text{O})\}_2]$  **(6)**

Οι υποκαταστάτες των συμπλόκων **1-6** είναι η πυριδίνη, το νικοτιναμίδιο, η πιπεραζίνη, η καδαβερίνη, το αζίδιο του νατρίου και η  $(\rho\gamma)_2\text{CO}$  (di-2-pyridyl ketone), αντίστοιχα.

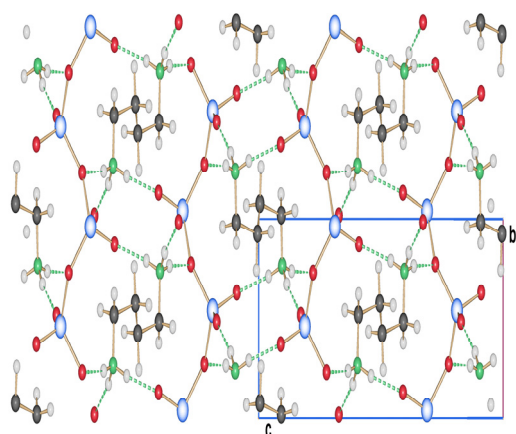
Στις ακόλουθες εικόνες παρουσιάζονται οι δομές των ανωτέρω συμπλόκων:



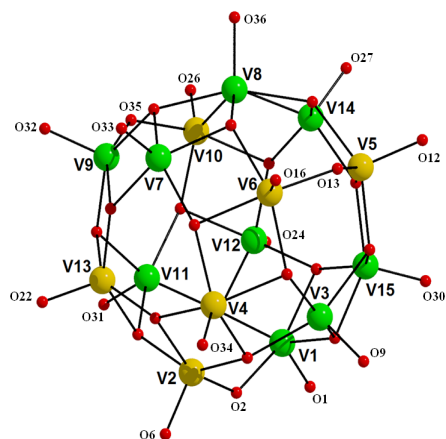
Εικόνα 17: Η δομή του ανιόντος  $[V_{10}O_{28}]^{6-}$  στο σύμπλοκο 1.



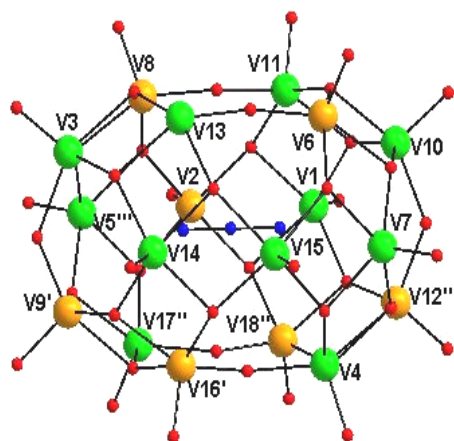
Εικόνα 18: Η δομή του ανιόντος  $[V_{10}O_{26}(OH)_2]^{4-}$  στο σύμπλοκο 2.



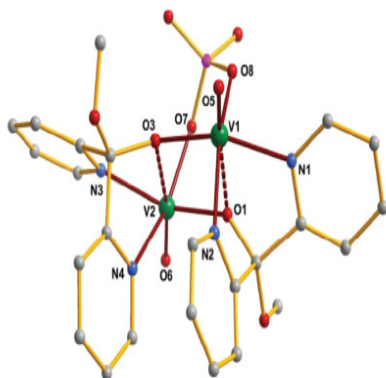
Εικόνα 19: Το δίκτυο δεσμών H που σταθεροποιεί την κρυσταλλική δομή του πολυμερούς συμπλόκου 3.



**Εικόνα 20:** Η σφαιρική δομή του ανιόντος  $[V_{15}O_{36}]^{6-}$  που υπάρχει στο ιοντικό σύμπλοκο **4**.



**Εικόνα 21:** Η σφαιρική δομή του ανιόντος  $[V_{18}O_{44}(N_3)]^{10-}$  που υπάρχει στο 3D σύμπλοκο **5**.



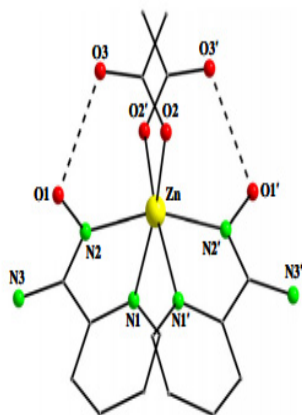
**Εικόνα 22:** Η μοριακή δομή του συμπλόκου **6**.

### 3.1.2.Σύμπλοκα Ψευδαργύρου

- $[\text{Zn}(\text{O}_2\text{CMe})_2(\text{ampaoH})_2]$  (**7**)
- $[\text{Zn}(\text{O}_2\text{CPh})_2(\text{ampaoH})_2]$  (**8**)
- $[\text{Zn}(\text{dapdoH}_2)_2](\text{NO}_3)_2$  (**9**)
- $[\text{Zn}(\text{dampdoH}_2)_2](\text{NO}_3)_2$  (**10**)

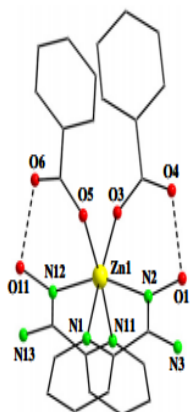
Τα τέσσερα σύμπλοκα του ψευδαργύρου έχουν ως υποκαταστάτες πυριδυλο-οξιμες και διοξιμες και συγκεκριμένα τα σύμπλοκα **7** και **8** έχουν υποκαταστάτη το ampaoH, το σύμπλοκο **9** το dapdoH<sub>2</sub> και το σύμπλοκο **10** το dampdoH<sub>2</sub>.

Στις ακόλουθες εικόνες παρουσιάζονται οι δομές των ανωτέρω συμπλόκων:

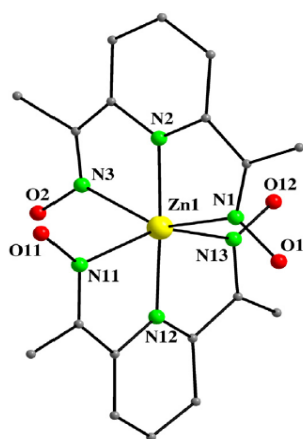


**Εικόνα 23:** Μέρος της μοριακής δομής του συμπλόκου **7**.

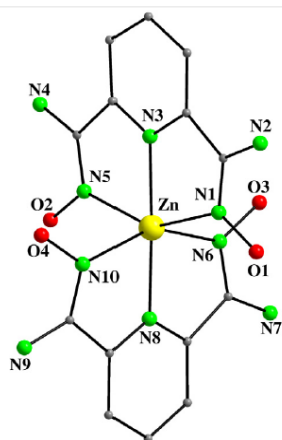




**Εικόνα 24:** Μέρος της δομής του ενός εκ των δύο κρυσταλλογραφικά ανεξάρτητων μορίων του συμπλόκου **8**.



**Εικόνα 25:** Μέρος της δομής του κατιόντος του συμπλόκου **9**.



**Εικόνα 26:** Μέρος της δομής του κατιόντος του συμπλόκου **10**.

### **3.3.ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ**

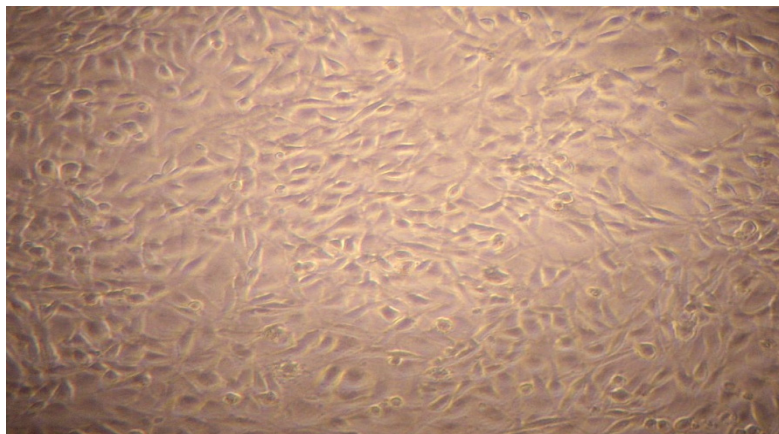
Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι οι εξής: λειομυοσάρκωματικά κύτταρα επίμιος Wistar (LMS), κύτταρα αδενοκαρκινώματος μαστού ανθρώπου (MCF-7), κύτταρα αδενοκαρκινώματος τραχήλου μήτρας ανθρώπου (HeLa), κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκίνου ανθρώπου (HepG2) και σε φυσιολογικές ινοβλάστες (MRC-5).

#### **3.1.1. ΛΕΙΟΜΥΟΣΑΡΚΩΜΑ (LMS)**

Το λειομυοσάρκωμα είναι ένας σπάνιος όγκος του μαλακού ιστού συνήθως προερχόμενος από τα τοιχώματα των φλεβών ή από μυϊκά κύτταρα. Το δερματικό και υποδερματικό λειομυοσάρκωμα παρατηρείται σε ανθρώπους 40-70 ετών και δεν εξαρτάται από το φύλο. Το βαθύτερο λειομυοσάρκωμα βρίσκεται στο οπισθοπεριτοναϊκό χώρο ή στους βαθύτερους μαλακούς ιστούς των άκρων.

#### **ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ**

Ιστολογικά, ο όγκος έχει ευρέως διασκορπισμένα αξονικά κύτταρα και κολλαγόνο στις δέσμες. Τα αξονικά κύτταρα είναι μεγάλα, με επιμήκεις πυρήνες και άφθονα ηωσινοφιλικά κυτοπλάσματα. Το κολλαγόνο είναι παρόν σε διάφορες συγκεντρώσεις και οι δικτυωτές ίνες του προεξέχουν γύρω από μεμονωμένα κύτταρα ή από ομάδες κυττάρων. Η χημειοθεραπεία σπάνια βοηθά στη θεραπεία του λειομυοσάρκωματος. Η χειρουργική αφαίρεση του όγκου συχνά ενδείκνυται. Η θεραπεία του λειομυοσάρκωματος περιλαμβάνει την χημειοθεραπεία, την ακτινοθεραπεία και τη χειρουργική (Campanacci, 2003).

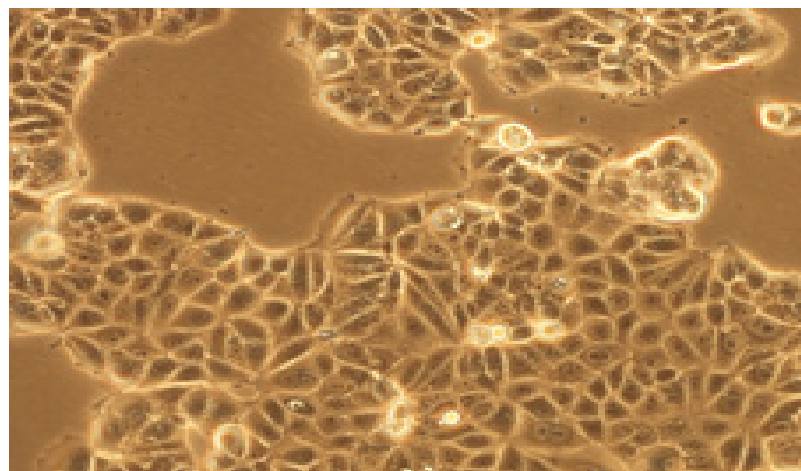


**Εικόνα 27:** Φωτογραφία από μικροσκόπιο λειομυοσαρκωματικών κυττάρων.

### **3.1.2. ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΜΑΣΤΟΥ (MCF-7)**

Η MCF 7 είναι μια κυτταρική σειρά που αποτέλεσε πηγή γνώσης για την νεοπλασία του μαστού. Απομονώθηκε από νεοπλασματικά κύτταρα μαστού μιας 69χρονης ασθενούς, της Frances Mallon, το 1971. Το όνομα της σειράς προέρχεται από τα αρχικά Michigan Cancer Foundation 7. (Soule et al., 1973; Levenson and Jordan, 1997).

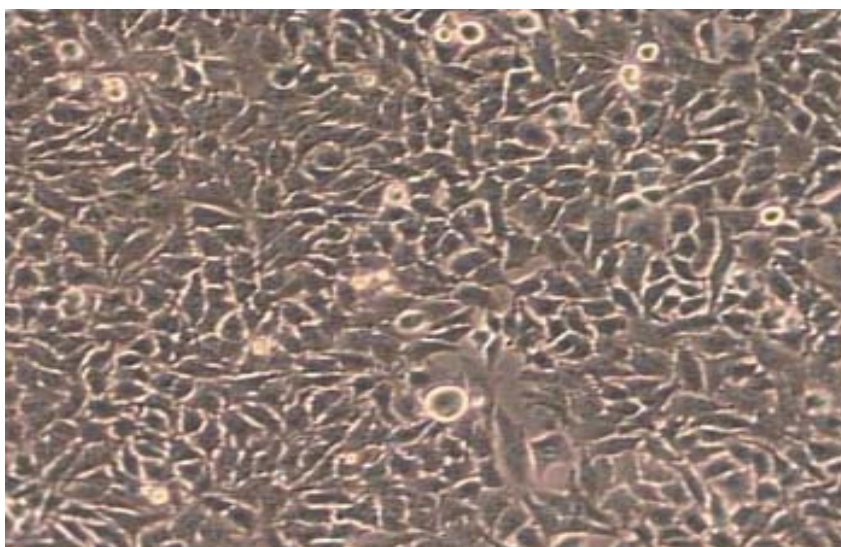
Πριν απομονωθεί η MCF 7, δεν ήταν δυνατό για τους ερευνητές που ασχολούνται με την έρευνα για τον καρκίνο, να επιτύχουν μια μαστική κυτταρική σειρά η οποία θα μπορούσε να επιβιώσει για περισσότερο από μερικούς μήνες. (Glodek, 1990)



**Εικόνα 28:** Φωτογραφία από μικροσκόπιο κυττάρων MCF-7.

### 3.1.3. ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ (HeLa)

Η κυτταρική σειρά HeLa είναι μια από τις πιο γνωστές και καλά χαρακτηρισμένες κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται σήμερα στην έρευνα (Rahbari, 2009). Απομονώθηκε από καρκινικά κύτταρα τραχήλου μήτρας το 1951 από την ασθενή Henrietta Lacks (He.La). Τα κύτταρα αναπαράχθηκαν από τον George Otto Gey μετά το θάνατό της. Αυτή η κυτταρική σειρά ήταν η πρώτη που χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς σε *in vitro* έρευνες (Rusu, 2011). Από τη δεκαετία του '50 και έπειτα αυτή η κυτταρική σειρά έχει χρησιμοποιηθεί τόσο για την έρευνα του καρκίνου όσο και του AIDS, αλλά και για την μελέτη των βλαβών που προκαλούνται από την ραδιενέργεια κι από τοξικές ουσίες κ.α. Υπάρχουν πολλά στελέχη της κυτταρικής σειράς HeLa, αλλά όλα προέρχονται από τα ίδια καρκινικά κύτταρα που απομονώθηκαν από την Henrietta Lacks (Lucey, 2009).



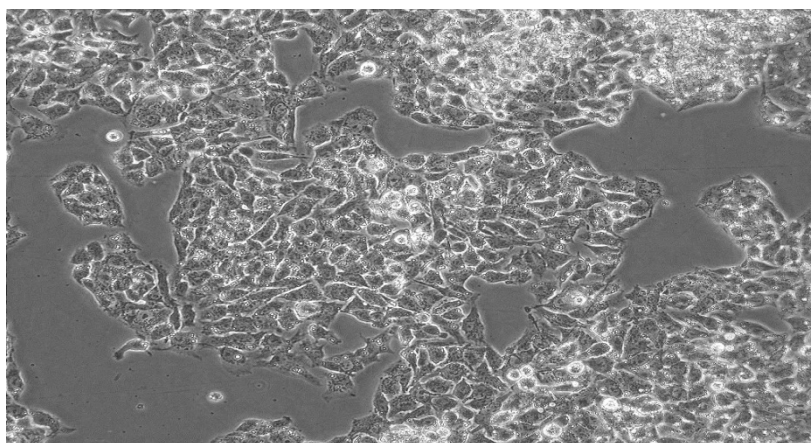
Εικόνα 29: Φωτογραφία από μικροσκόπιο κυττάρων HeLa.

### 3.1.4. ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ (HepG2)

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα είναι ένα από τα συχνότερα νεοπλάσματα που σχετίζονται με ιογενείς λοιμώξεις και προκαλεί υψηλά ποσοστά θνησιμότητας παγκοσμίως (El-Serag, 2007). Ο πρωτοπαθής όγκος του ήπατος είναι ο πέμπτος συχνότερος και η τρίτη πιο κοινή αιτία θανάτου από νεοπλασία. Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα αποτελεί το 85% με 90% των πρωτοπαθών νεοπλασιών του ήπατος.

Εμφανίζει ενδιαφέροντα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά που συμπεριλαμβάνουν εποχικές διακυμάνσεις, διαφορές ανάμεσα στις γεωγραφικές περιοχές και τις εθνικές ομάδες, αλλά και ανάμεσα στους άντρες και τις γυναίκες (Parkin, 2001). Παρά το ότι υπάρχει μια αυξανόμενη γνώση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, σχεδόν ποτέ δεν παρουσιάζεται σε υγιές ήπαρ, αλλά αντίθετα σχετίζεται άμεσα με χρόνιες βλάβες και κίρρωση του ήπατος.

Η θεραπεία εκλογής είναι η χειρουργική αφαίρεση της νεοπλασίας. Στους ασθενείς που δεν είναι εφικτή η χειρουργική εκτομή του όγκου, η μόνη θεραπεία είναι η χημειοθεραπεία. Όμως, η εμφάνιση ανθεκτικότητας των νεοπλασματικών αυτών κυττάρων σε πολλά χημειοθεραπευτικά σκευάσματα είναι η αιτία μη ανταπόκρισης στη θεραπεία και η εμφάνιση του τόσο υψηλού ποσοστού θανάτου από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (McGlynn, 2001).

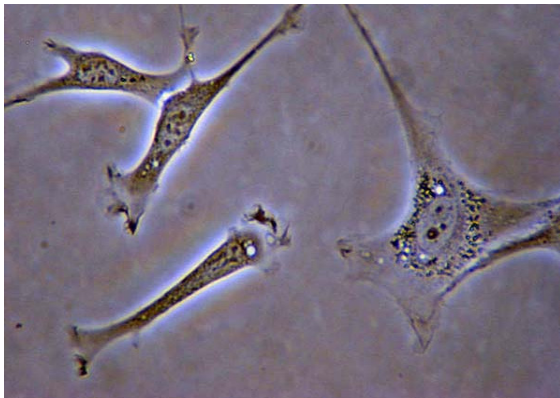


**Εικόνα 30:** Φωτογραφία από μικροσκόπιο κυττάρων HepG2.

### 3.1.5. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ (MRC-5)

Η ινοβλάστη αποτελεί τον μόνο κυτταρικό τύπο που απαντάται, ανεξαιρέτως, σε όλα τα είδη συνδετικού ιστού. Έχει σχήμα ατρακτοειδές ή αστεροειδές και από το κυτταρικό σώμα προεκβάλλουν κοντές, διακλαδιζόμενες αποφυάδες. Στο ενήλικο άτομο οι ινοβλάστες εκκρίνουν ενεργά κολλαγόνο. Περιέχουν μεγάλο ωοειδή πυρήνα, του οποίου η χρωματίνη συγκεντρώνεται σε περιφερικά αθροίσματα κάτω από την πυρηνική μεμβράνη. Σε κεντρικότερη θέση του πυρήνα διακρίνεται ένα ευμέγεθες πυρήνιο.

Το κυτταρόπλασμα είναι βασεόφιλο και περιέχει τα οργανίδια που συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση. Οι ινοβλάστες συνθέτουν τις πρωτεΐνες των ινών του συνδετικού ιστού (κολλαγόνων δικτυωτών, ελαστικών), τις δομικές γλυκοπρωτεΐνες και τις πρωτεογλυκάνες της θεμέλιας ουσίας. Έτσι, ελέγχουν τη σύσταση αλλά και τη διατήρηση της ακεραιότητας αυτής (Jacobs, 1970).



**Εικόνες 31, 32:** Φωτογραφία από μικροσκόπιο κυττάρων MRC-5.

### 3.4. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι τα εξής: *Escherichia coli* DH5a, *Zygomonas mobilis* NCIB 11163, *Streptococcus thermophilus* LMG 18311 και *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253.

Τα στελέχη της *E. coli* και του *C. glutamicum* αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα LB (1%% tryptone, 1% sodium chloride, 0.5% yeast extract) με ανακίνηση στους 37 °C και 30 °C, αντιστοίχως. Το στέλεχος *Z. mobilis* αναπτύχθηκε στους 30 °C χωρίς ανακίνηση σε ένα πλήρες καλλιεργητικό μέσο που περιείχε 2% glucose, 0.1% potassium dihydrogen phosphate, 0.1% ammonium sulfate, 0.05% magnesium sulfate και 0.5% yeast extract. Τέλος, το στέλεχος *S. thermophilus* αναπτύχθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα M17 (0.25% tryptic digest of casein, 0.25% peptone, 0.5% soy peptone, 0.25% yeast extract, 0.5% beef extract, 1.9% sodium glycerophosphate, 0.025% magnesium sulphate, 0.05% ascorbic acid, 0.5% lactose) στους 37 °C με ανακίνηση.

Η καλλιέργεια των βακτηριακών αυτών στελεχών, καθώς και τα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν, πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών.





# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

## ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.1. *IN VITRO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

Η καλλιέργεια των διαφόρων κυτταρικών σειρών έγινε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο (cell culture room), ο οποίος διατηρείται στείρος με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Προκειμένου να αποφευχθούν οι μολύνσεις, όλοι οι σχετικοί με τα κύτταρα χειρισμοί, πραγματοποιήθηκαν μέσα σε εστία νηματικής ροής. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub> για τη διατήρηση του pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης, ενώ η μακρόχρονη συντήρησή τους πραγματοποιήθηκε σε δοχείο υγρού αζώτου (-192 °C).

#### 4.1.1. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα αφήνονται να δημιουργήσουν πλήρεις καλλιέργειες πριν από κάθε ανακαλλιέργεια. Για την ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται αφαίρεση του θρεπτικού υλικού, πλύση με 10 ml PBS και ακολούθως προσθήκη 1ml θρυψίνης. Στη συνέχεια τα τρυβλία αφήνονται για 3 λεπτά εντός του επωαστικού θαλάμου, ούτως ώστε να δράσει η θρυψίνη. Μετά την πάροδο των 3 λεπτών, τα κύτταρα αποκολλούνται από το ταπήτιο και τα τοιχώματα του τρυβλίου με μηχανική βοήθεια και προστίθενται 10ml DMEM. Ακολούθως πραγματοποιείται καλή ανάδευση και τοποθετείται ο επιθυμητός όγκος του εναιωρήματος κυττάρων στα τρυβλία των 90mm. Τέλος, σε κάθε τρυβλίο προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα DMEM, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι πάντα 10ml.

#### **4.1.2. Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων**

Η κατάψυξη των κυττάρων σε υγρό άζωτο (-196°C) αποτελεί τον καλύτερο τρόπο διατήρησης αυτών για χρονικό διάστημα 6-12 μηνών το λιγότερο. Εν γένει, κατά τη διαδικασία της κατάψυξης των κυττάρων, πραγματοποιείται αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού, πλύση με 10 ml PBS και προσθήκη 1 ml θρυψίνης. Αφού παρθεί το εναιώρημα των κυττάρων, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση (3000 rpm, 5 min) σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν απόχυσης του υπερκειμένου, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε διάλυμα 90% εμβρυϊκού μόσχου (FBS, fetal bovine serum) και 10% διμεσουλφοξείδιο (DMSO, dimethyl sulfoxide). Παρενθετικά, αξ σημειωθεί πως το DMSO περιβάλλει την κυτταρική μεμβράνη και τη σταθεροποιεί έναντι της θραύσης αυτής από τη χαμηλή θερμοκρασία. Ακολούθως, το κυτταρικό εναιώρημα διαμοιράζεται σε ειδικά φιαλίδια κατάψυξης, όπου και καταψύχεται σταδιακά (πτώση 1°C) μεταβαίνοντας από τους -20°C, στους -80°C και τέλος στους -196°C.

Η απόψυξη των κυττάρων έλαβε χώρα με ταχεία μεταφορά των φιαλιδίων κατάψυξης σε υδατόλουτρο των 37°C. Εκεί τα φιαλίδια διατηρήθηκαν μέχρι αποψύξεως, με ήπια ανακίνηση. Το εναιώρημα των κυττάρων υπέστη αραίωση σε 50 ml εξισορροπημένου αλατούχου διαλύματος (hank's balanced salt solution, HBSS) και εν συνεχεία φυγοκεντρήθηκε (3000 rpm, 5 min) σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό, όντας έτοιμο προς περαιτέρω καλλιέργεια.

#### **4.1.3. Έλεγχος της βιωσιμότητας κυττάρων με την μέθοδο του MTT (MTT assay)**

Ο έλεγχος βιωσιμότητας όλων των τύπων κυττάρων με τα σύμπλοκα μετάλλων, καθώς και με αναστολείς της γλυκολυτικής πορείας, αλλά και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, πραγματοποιήθηκε σε πολυτρυβλία των 96 φρεατίων. Από ένα αρχικό τρυβλίο στο διατηρούνται τα κύτταρα, αναρροφάται το θρεπτικό και προστίθενται 10 ml PBS<sup>1</sup> για πλύση των κυττάρων. Στη συνέχεια αναρροφάται το

---

<sup>1</sup>Για την παρασκευή 1L PBS διαλύουμε 5 ταμπλέτες PBS σε 1L ddH<sub>2</sub>O και αποστειρώνουμε

PBS και προστίθεται 1 ml θρυψίνη για να αποκολληθούν τα κύτταρα. Για να επιταχυνθεί η αποκόλληση το τρυβλίο τοποθετείται για περίπου τρία λεπτά στον επωαστή (37°C). Για τον τερματισμό της αντίδρασης με την θρυψίνη προστίθενται 10 ml DMEM<sup>2</sup>, γίνεται ανάδευση με την πιπέτα και τα κύτταρα μεταφέρονται σε falcon. Λαμβάνονται 11 μl και γίνεται μέτρηση των κυττάρων σε πλάκα Newbauer στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων καθώς και η ποσότητα που απαιτείται για την προσθήκη του επιθυμητού αριθμού κυττάρων (5000 κύτταρα για τις κυτταρικές σειρές των LMS, MCF-7, HeLa και HepG2, και 7000 κύτταρα για την κυτταρική σειρά MRC-5) σε κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου. Ο τελικός όγκος του κάθε φρεατίου πρέπει να είναι 100 μl και συμπληρώνεται με DMEM. Η συνολική ποσότητα κυττάρων και DMEM που απαιτούνται, τοποθετούνται μαζί και γίνεται σπορά 100 μl σε κάθε φρεάτιο με χρήση πολυπιπέτας. Το πολυτρυβλίο τοποθετείται για 24 ώρες στον επωαστή.

Μετά την πάροδο των 24 ωρών γίνεται η προσθήκη της εκάστοτε ουσίας στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Ο τελικός όγκος σε κάθε φρεάτιο είναι 200 μl. Το πολυτρυβλίο τοποθετείται στον επωαστή και πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων στο κατάλληλο για την πειραματική διαδικασία χρονικό διάστημα.

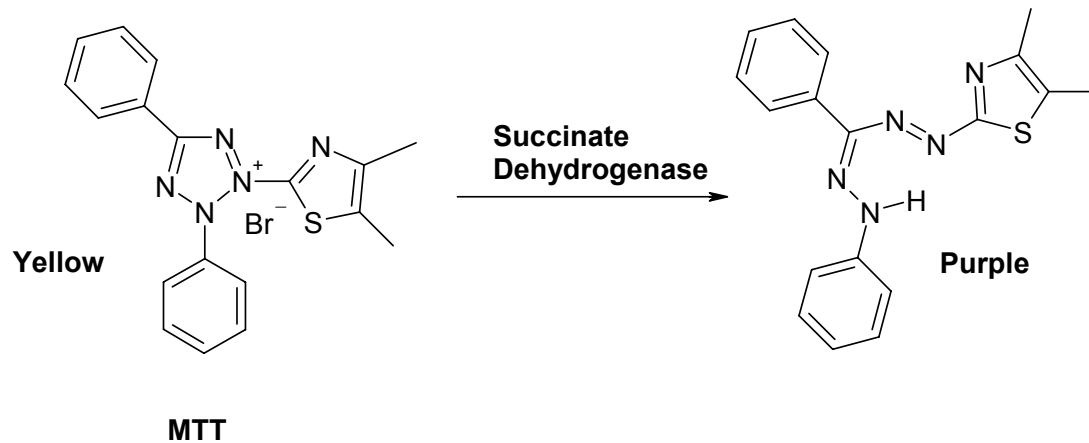
Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται με την μέθοδο του MTT<sup>3</sup>. Το MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) έχει κίτρινο χρώμα (απορρόφηση στα 690 nm) και ανάγεται από το μιτοχονδιακό συνένζυμο Q (ουβικινόνη), με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ιζήματος χρώματος μωβ (απορρόφηση στα 540 nm) στα ζωντανά κύτταρα (εικόνα **17**). Με τον τρόπο αυτό, σε αυξανόμενα ποσοστά βιωσιμότητας το μωβ χρώμα είναι και πιο έντονο στα φρεάτια (εικόνα **18**). Σε κάθε φρεάτιο τοποθετούνται 50 μl MTT και τα πολυτρυβλία παραμένουν για 3 ώρες στον επωαστή. Μετά την πάροδο των 3 ωρών αναρροφάται

---

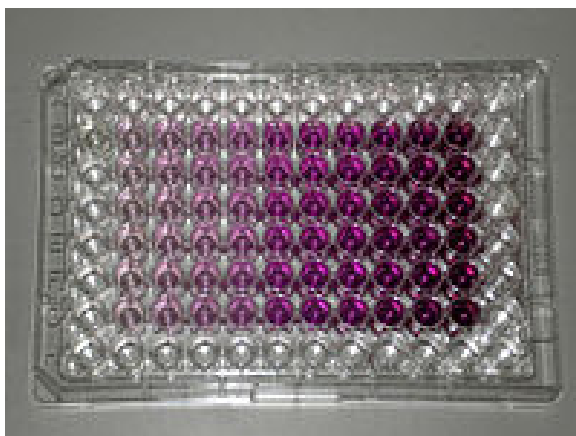
<sup>2</sup>Για την παρασκευή θρεπτικού μέσου: σε 500 ml DMEM προσθέτουμε 56 ml FBS, 5ml penicillin/streptomycin & 2.5 ml L – glutamine. Για τους ινοβλάστες στο DMEM προσθέτουμε 56 ml FBS, 5ml penicillin/streptomycin & 5 ml L – glutamine.

<sup>3</sup>Το MTT παρασκευάζεται με διάλυση 0,2 g Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide σε 100 ml PBS.

το υπερκείμενο προσεκτικά, γίνεται προσθήκη 200 µl DMSO σε κάθε φρεάτιο, καλή ανάδευση και ακολουθεί μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο (μήκος κύματος 540 – 570 nm και φίλτρο αναφοράς 690nm). Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον 3 επαναλήψεις από τρεις ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες με τις ίδιες συνθήκες.



**Εικόνα 33:** Το μιτοχονδριακό συνένζυμο Q (ουβικινόνη) είναι ο βασικός καταλύτης για τον σχηματισμό ιζήματος χρώματος μωβ στα ζωντανά κύτταρα.



**Εικόνα 34:** Κύτταρα σε πολυτρυβλίο 96 θέσεων μετά από 3 ώρες επώαση με το MTT.

#### **4.1.4. Ικανότητα των κυττάρων δημιουργίας αποικιών σε χαμηλή πυκνότητα σποράς (Colony efficiency)**

Στόχος είναι να μελετηθεί η ικανότητα των κυττάρων να αναπτύσσουν μεγάλες, αυτοσυντηρούμενες αποικίες στις διάφορες συγκεντρώσεις των συμπλόκων μετάλλων, σε σύγκριση με την ικανότητα αυτή των κύτταρων στα οποία δεν έχει προστεθεί καμία ουσία (control).

Από ένα αρχικό τρυβλίο που διατηρούνται τα κύτταρα, αναρροφάται το θρεπτικό και προστίθενται 10 ml PBS για πλύση των κυττάρων. Στη συνέχεια αναρροφάται το PBS και προστίθεται 1 ml θρυψίνη για να αποκολληθούν τα κύτταρα. Για να επιταχυνθεί η αποκόλληση τοποθετείται το τρυβλίο για περίπου τρία λεπτά στον επωαστή. Προστίθενται 10 ml DMEM, τα κύτταρα αναδεύονται καλά και συλλέγονται σε falcon. Λαμβάνονται 11 μl και τοποθετούνται σε πλάκα NeuBauer και πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Γίνεται υπολογισμός του συνολικού αριθμού των κυττάρων, καθώς και της ποσότητας που απαιτείται για την προσθήκη 20000 κυττάρων σε κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου. Ο τελικός όγκος του κάθε φρεατίου συμπληρώνεται με θρεπτικό υλικό στο 1 ml. Το πολυτρυβλίο τοποθετείται για 24 ώρες στον επωαστή.

Μετά την πάροδο των 24 ωρών γίνεται η προσθήκη των συμπλόκων μετάλλων. Από ένα αρχικό διάλυμα υπολογίζονται οι ποσότητες που πρέπει να προστεθούν σε κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση συμπλόκου σε τελικό όγκο 1 ml. Σε κάθε φρεάτιο με μια δεδομένη συγκέντρωση ουσίας αντιστοιχεί φρεάτιο με ανάλογη συγκέντρωση διαλύτη του συμπλόκου. Το πολυτρυβλίο τοποθετείται στον επωαστή για 48 ώρες.

Μετά την πάροδο του επιθυμητού χρονικού διαστήματος πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων σε κάθε φρεάτιο (χωρίς τη χρήση χρωστικής) και μεταφορά 5000 κυττάρων στα αντίστοιχα τρυβλία με την προσθήκη 10ml θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν για χρονικό διάστημα περίπου 7 ημερών με καθημερινή οπτική παρακολούθηση ενώ πραγματοποιείται και μια αλλαγή

θρεπτικού υλικού την 3-4 ημέρα. Μετά την πάροδο και των 7ημερών, ακολουθεί η διαδικασία χρώσης των αποικιών. Πραγματοποιείται πλύση των τρυβλίων και προσθήκη 10ml μίγματος μεθανόλης- οξικού οξέος 3:1. Τα τρυβλία τοποθετούνται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 10 λεπτά, έτσι ώστε να μονιμοποιηθούν τα κύτταρα. Στη συνέχεια, απορρίπτεται το μίγμα μεθανόλης - οξικού και τα τρυβλία αφήνονται στον απαγωγό για να στεγνώσουν. Στη συνέχεια προστίθενται 10ml χρωστικής Giemsa/νερό βρύσης 1:10 και τα τρυβλία τοποθετούνται σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα περίπου, μέχρι οι αποικίες να βαφτούν. Απορρίπτεται η χρωστική και τα τρυβλία ξεπλένονται με νερό βρύσης πολύ καλά. Όταν στεγνώσουν πραγματοποιείται η μέτρηση των αποικιών. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον 2 επαναλήψεις από τρεις ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες με τις ίδιες συνθήκες.

#### ***4.1.5. Προσδιορισμός μηχανισμού πρόκλησης κυτταρικού θανάτου (Απόπτωση-Νέκρωση)***

Πραγματοποιείται σπορά 60.000 κυττάρων σε κάθε φρεάτιο ενός 6x πολυτρυβλίου, ο αριθμός των οποίων είναι ανάλογος με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των συμπλόκων που θα ελεγχθούν. Τα τρυβλία επωάζονται στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Μετά την πάροδο 24 ωρών, πραγματοποιείται προσθήκη ουσιών σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ακολουθεί επώαση για άλλες 48 ώρες και ξεκινά η διαδικασία προετοιμασίας για την κυτταρομετρία.

Το θρεπτικό υλικό συλλέγεται από το κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου σε αντίστοιχα falcon. Πραγματοποιείται πλύση με 1 ml PBS, το οποίο συλλέγεται και αυτό στα falcon. Προστίθενται 0,3 ml Trypsin και τα πολυτρυβλία επωάζονται στους  $37^{\circ}\text{C}$  για περίπου 5 λεπτά, έως ότου ξεκολλήσουν τα κύτταρα. Προστίθεται 1 ml θρεπτικό υλικό, ακολουθεί καλή ανάδευση και συλλέγονται συνολικά τα 1,3 ml στα αντίστοιχα falcon. Πραγματοποιείται μέτρηση για υπολογιστεί ο ακριβής κυτταρικός πληθυσμός. Τα falcon φυγοκεντρούνται στις 2500 rpm για 5 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρούνται στην

κατάλληλη ποσότητα Calcium Buffer 1x και 100 μl από κάθε δείγμα, που περιέχουν 100.000 κύτταρα, μεταφέρονται σε αντίστοιχα erpendorfs.

Σε κάθε erpendorf προστίθενται 5 μl Annexin και 4 μl Propidium Iodide. Όλα τα δείγματα επάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Μετά το πέρας των 30 λεπτών προστίθεται επιπλέον 1 ml Calcium Buffer 1x. Όλη η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται σε σκοτεινό θάλαμο, καθότι η Annexin είναι φωτοευαίσθητη. Τέλος, τα δείγματα μεταφέρονται στο κυτταρόμετρο ροής (CyFlow ML, Partec, Munster, Germany), όπου και πραγματοποιείται ανάλυση και προσδιορισμός του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται σε αποπτωτική ή νεκρωτική φάση. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον 3 επαναλήψεις από τρεις ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες με τις ίδιες συνθήκες.

#### **4.1.6. Έλεγχος αντιβακτηριακής δράσης**

Η αντιβακτηριακή δράση των συμπλόκων μετάλλων ελέγχθηκε έναντι των στελεχών: *Escherichia coli* DH5a, *Zymomonas mobilis* NCIB 11163, *Streptococcus thermophilus* LMG 18311 και *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253, μέσω της μέτρησης της ελάχιστης συγκέντρωσης των συμπλόκων στην οποία παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (Katsoulakou et al., 2008).

Τα σύμπλοκα διαλυτοποιήθηκαν σε DMSO και δοκιμάστηκαν σε τελικές συγκεντρώσεις από 3 μM έως 200 μM. Ελέγχτηκαν επίσης οι καλλιέργειες απουσία των συμπλόκων, καθώς και παρουσία του διαλύτη DMSO. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στις ίδιες συνθήκες τουλάχιστον δύο φορές.

Οι καλλιέργειες από κάθε βακτηριακό στέλεχος προετοιμάζονται με ενοφθαλμισμό βακτηρίων από ένα πλήρες τρυβλίο σε αραιώση 1:20. Τα σύμπλοκα προστίθενται στις επιθυμητές συγκεντρώσεις και η βακτηριακή ανάπτυξη ελέγχεται μέσω μέτρησης της απορρόφησης της καλλιέργειας στα 600nm μετά από 12 και 24 ώρες.

Στην περίπτωση που κάποια συγκέντρωση του συμπλόκου δεν επιτρέπει την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών, η διαδικασία επαναλαμβάνεται μειώνοντας στο μισό την συγκέντρωση του συμπλόκου μέχρις ότου επιτευχθεί φυσιολογική ανάπτυξη του στελέχους. Η συγκέντρωση στην οποία τα βακτηριακά κύτταρα δεν αναπτύσσονται αναπαριστά την τιμή MIC.

#### **4.1.7. Φασματοσκοπικός προσδιορισμός κατανάλωσης γλυκόζης**

Για το προσδιορισμό της κατανάλωσης γλυκόζης από τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το kit Amplex Red Glucose/ Glucose Oxidase Assay Kit (Invitrogen), το οποίο παρέχει μια ευαίσθητη μέθοδο ανίχνευσης της γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων. Το αντιδραστήριο στο οποίο βασίζεται η μέθοδος αυτή (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) είναι άχρωμο και σταθερό υπόστρωμα της υπεροξειδάσης. Λόγω του ότι οι αντιδράσεις που καταλύονται από την υπεροξειδάση και την οξειδάση της γλυκόζης μπορούν να συζευχθούν, καθίσταται εφικτή η μέτρηση της απελευθέρωσης της γλυκόζης από οποιοδήποτε ένζυμο γλυκοσιδάσης (π.χ. β-γλυκοσιδάση ή γλυκοσερεβροσιδάση). Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να ανιχνευτεί οξειδάση της γλυκόζης σε συγκέντρωση 0,05 mU/ml και D-γλυκόζη σε συγκέντρωση 3 μM.

Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία, αρχικά πραγματοποιείται σπορά 60.000 κυττάρων σε πολυτρυβλία των 6 θέσεων. Την επόμενη ημέρα προστέθηκαν τα σύμπλοκα μετάλλων σε συγκεντρώσεις ίσες και μεγαλύτερες της IC50 τιμής, καθώς και δεοξυγλυκόζη, η οποία αποτελεί γνωστό αναστολέα της γλυκολυτικής πορείας, όπως αναφέρθηκε στο πειραματικό μέρος. Μετά από 24ωρη επώαση με τις ουσίες, συλλέγεται θρεπτικό υλικό από τα δείγματα σε ποσότητα ίση με 5 μl και τοποθετείται σε erpendorfs στα οποία προστίθενται επιπλέον 495 μl assay buffer (Αραίωση 1/100). Από τα φρεάτια στα οποία αναπτύσσονται τα κύτταρα HEPG2, που καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό με παραπάνω ποσότητα γλυκόζης (high glucose), συλλέγεται θρεπτικό υλικό σε ποσότητα ίσης με 5 μl και τοποθετείται σε erpendorfs στα οποία προστίθενται όμως επιπλέον 995 μl assay buffer (αραίωση 1/200).



Μετά από ανάδευση των *erpendorfs* για σύντομη χρονική διάρκεια στο vortex, 50 μl από κάθε δείγμα προστίθενται στα φρεάτια πολυτρυβλίου 96 θέσεων. Μετά την προσθήκη των κατάλληλων αντιδραστηρίων που παρέχει η μέθοδος (τελικός όγκος 100 μl) και επώαση για μισή ώρα απουσία φωτός, τα δείγματα μετρώνται στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος ίσο με 590 nm.

Παράλληλα, στα αρχικά πολυτρυβλία των 6 θέσεων προστίθεται MTT, με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, έτσι ώστε να μπορούμε να βγάλουμε συμπέρασμα για την κατανάλωση της γλυκόζης ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον 3 επαναλήψεις από τρεις ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες με τις ίδιες συνθήκες.

#### **4.1.8. Φασματοσκοπικός προσδιορισμός παραγωγής ενδοκυττάρου ATP**

Για τον προσδιορισμό του ενδοκυττάρου ποσοστού ATP χρησιμοποιήθηκε το ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (BioVision). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ανίχνευση ελάχιστης ποσότητας ATP, ακόμη και μικρότερης από 50 picomol (1μM).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σπορά 1.000.000 κυττάρων σε τρυβλία διαμέτρου 90mm, και μετά από 24 ώρες προσθήκη των συμπλόκων μετάλλων, καθώς και της δεοξυγλυκόζης, του γνωστού αναστολέα της γλυκολυτικής πορείας, σε συγκέντρωση ίση και μεγαλύτερη από την τιμή IC<sub>50</sub> καθεμίας εκ των ουσιών. Μετά από 24ωρη επώαση με τις ουσίες, συλλέγεται το θρεπτικό υλικό σε falcon, ακολουθεί πλύση με 5 ml PBS και συλλέγεται και αυτό στα falcon. Στη συνέχεια προστίθεται 1 ml θρυψίνη για τρία περίπου λεπτά. Μετά την προσθήκη 10 ml φρέσκου καλλιεργητικού υλικού και καλή ανάδευση, τα κύτταρα συλλέγονται και αυτά στα falcon (τελικός όγκος 21 ml) και μετρώνται στο μικροσκόπιο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 min και επαναιώρηση 1.000.000 κυττάρων από κάθε δείγμα σε 100 μl ATP assay buffer.

Για να επιτευχθεί η διάσπαση του κυττάρου και η απελευθέρωση του ATP τα εναιωρήματα οδηγούνται σε συσκευή υπερήχων, όπου και εφαρμόζονται σε αυτά διαδοχικοί παλμοί των 10 sec στα 50 Watt, οι οποίοι εναλλάσσονται με 20 sec εναπόθεση στον πάγο (για να αποφευχθεί η υπερθέρμανση). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές, με συνολικό χρόνο 1,5 min.

Στην συνέχεια, ακολουθεί η απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το κυτταρικό εκχύλισμα. Η παρουσία πρωτεϊνών και αρκετών ενζύμων συχνά παρεμβαίνει στην ανάλυση μικρών μορίων στα βιολογικά δείγματα. Πολλά πρωτόκολλα απαιτούν την απομάκρυνσή των πρωτεϊνών από τα δείγματα πριν την ανάλυσή τους. Σε αυτή την διδακτορική διατριβή ο φασματοσκοπικός προσδιορισμός της παραγωγής ενδοκυττάρου ATP δε θα μπορούσε να προσδιοριστεί με ακρίβεια αν δεν απομακρύνονταν οι πρωτεΐνες από το κυτταρικό εκχύλισμα.

Ανάμεσα σε αρκετά πρωτόκολλα που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία 50 χρόνια, η κατακρήμνιση με περχλωρικό οξύ (perchloric acid, PCA) έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς διότι, εκτός του ότι απομακρύνει τις πρωτεΐνες σε μεγάλο ποσοστό, λειτουργεί επίσης και προστατευτικά για τα υπό μελέτη μικρά μόρια.

Με τη χρησιμοποίηση του Deproteinizing Sample Preparation kit (BioVison) που βασίζεται στη μέθοδο του PCA, επιτεύχθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων για την συνέχιση της πειραματικής διαδικασίας.

Το κυτταρικό εναιώρημα περιέχει συγκέντρωση πρωτεϊνών μικρότερη από 20 mg/ml. Σύμφωνα λοιπόν με τις οδηγίες του kit, σε 100 μl δείγματος στο οποίο εμπεριέχεται το κυτταρικό εναιώρημα, είτε μετά από επώαση με τα σύμπλοκα είτε χωρίς (control), προστίθενται 20 μl PCA, το οποίο ήταν τοποθετημένο σε πάγο μισή ώρα πριν και καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Μετά από σύντομη ανάδευση στο vortex, τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για 5 λεπτά. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση τους σε 13,000 x g για δύο λεπτά και μεταφορά 96 μl από το υπερκείμενο σε νέα eppendorfs στο οποίο προστίθενται 4 μl

Neutralization Solution για να απομακρυνθεί η περίσσεια του PCA. Τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για άλλα πέντε λεπτά και μετά από ένα σύντομο spin στην φυγόκεντρο (1-2 λεπτά) είναι έτοιμα προς χρήση.

Μετά την διαδικασία που περιγράφηκε, και μετά την προσθήκη των κατάλληλων ουσιών σύμφωνα με τις οδηγίες του kit, και την επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνθήκες έλλειψης φωτός, τα δείγματα μετρώνται στο φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος ίσο με 570 nm. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον 3 επαναλήψεις από τρεις ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες.

#### **4.1.9. Φασματοσκοπικός προσδιορισμός παραγωγής γαλακτικού οξέος**

Για τον προσδιορισμό της παραγωγής γαλακτικού οξέος από τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το Lactate Colorimetric Assay Kit II (BioVision). Το L(+)-γαλακτικό οξύ είναι το κύριο στερεο-ισομερές που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια του ανθρώπινου ενδιάμεσου μεταβολισμού. Το D(-)-γαλακτικό οξύ ανιχνεύεται μεν, αλλά σε συγκεντρώσεις που αποτελούν το 1-5% της συγκέντρωσης του L(+)-γαλακτικού οξέος. Σε αυτό το kit, το γαλακτικό που οξειδώνεται από την γαλακτική αφυδρογονάση παράγει ένα προϊόν που αλληλεπιδρά με έναν ιχνηλάτη και παράγει χρώμα που μετράται στα 450 nm. Η μέθοδος αυτή είναι ικανή να ανιχνεύσει 0,02 έως 10 mM γαλακτικού οξέος.

Για την μέθοδο αυτή πραγματοποιήθηκε σπορά 5000 κυττάρων σε κάθε θέση ενός πολυτρυβλίου 96 θέσεων. Μετά την πάροδο 24 ωρών, προστίθενται οι επιθυμητές συγκεντρώσεις των συμπλόκων, καθώς και δεοξυγλυκόζης, που χρησιμοποιήθηκε ως control με βάση την αποδεδειγμένη αναστολή που προκαλεί στην γλυκολυτική πορεία. Ακολουθεί επώαση με τις ουσίες στους 37 °C για επιπλέον 24 ώρες. Κατόπιν, το θρεπτικό υλικό από κάθε δείγμα στο πολυτρυβλίο (200 μl) μεταφέρεται σε ειδικά 10Kd spin columns, με σκοπό την αφαίρεση όλων των πρωτεϊνών πριν τον έλεγχο της παραγωγής του γαλακτικού οξέος. Το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας

των κυττάρων περιέχει LDH και θα μπορούσε να επηρεάσει το αποτέλεσμα της μέτρησής. Τα spin columns φυγοκεντρώνονται σε 7000 rpm για δέκα λεπτά και 10μl από το καθαρό από πρωτεΐνες δείγμα προστίθενται σε καινούργιο πολυτρυβλίο 96 θέσεων. Ο όγκος του δείγματος σε κάθε θέση του πολυτρυβλίου προσαρμόζεται στα 50 μl με την προσθήκη 40 μl από το ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα της μεθόδου. Μετά την προσθήκη επιπλέον 50 μl ειδικών αντιδραστηρίων της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε επώαση για μισή ώρα και μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο στα 450 nm. Για κάθε δείγμα υπήρχε ένα αντίστοιχο στο οποίο δεν έγινε προσθήκη του ενζύμου, με σκοπό να αφαιρεθούν αυτές οι τιμές απορρόφησης από εκείνες των δειγμάτων του πειραματικού ελέγχου. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον 2 επαναλήψεις από δύο ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες με τις ίδιες συνθήκες.

#### **4.1.10. Έλεγχος πρόκλησης μιτοχονδριακής βλάβης**

Για την μελέτη της πραγματοποίησης ή μη των αντιδράσεων οξείδωσης-αναγωγής στα μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων, μετά την επώαση των κυττάρων με τα σύμπλοκα μετάλλων, χρησιμοποιήθηκε το kit Mitochondrial Viability Stain (abcam), το οποίο βασίζεται στη χρήση της χρωστικής (7-Hydroxy-3H-rhenoazin-3-one 10-oxide). Η χρωστική αυτή έχει μπλε χρώμα το οποίο δεν φθορίζει και όταν η ποσότητά της μειώνεται από τα μεταβολικώς ενεργά κύτταρα μετατρέπεται σε φθορίζουσα, χρώματος μωβ, με απορρόφηση στα 570nm.

Μετά την πάροδο 24 ωρών από τη σπορά 5.000 κυττάρων σε πολυτρυβλία 96 θέσεων ακολουθεί η προσθήκη των συμπλόκων μετάλλων, καθώς και ολιγομυκίνης, ενός αναστολέα της μιτοχονδριακής λειτουργίας που χρησιμοποιήθηκε ως control, σε συγκεντρώσεις μικρότερες, ίσες και μεγαλύτερες από την τιμή IC<sub>50</sub>. Ο τελικός όγκος σε κάθε θέση του πολυτρυβλίου είναι τα 105 μl (100 μl DMEM και 5 μl ουσίας). Μετά από επώαση επιπλέον 24 ωρών, προστίθεται η χρωστική (7-Hydroxy-3H-rhenoazin-3-one 10-oxide) σε αραιώση 1:20 και σε ίση ποσότητα με αυτή που υπάρχει ήδη σε κάθε θέση, δηλαδή 105 μl, και ο τελικός όγκος είναι τα 210 μl. Σε

κάποιες θέσεις προστέθηκε μόνο η χρωστική, ενώ υπήρχαν και οι αντίστοιχες θέσεις δειγμάτων στα οποία δεν προστέθηκε καθόλου χρωστική. Μετά από 4 ώρες επώασης στους 37 °C, τα δείγματα μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 570 nm. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον 3 επαναλήψεις από τρεις ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες με τις ίδιες συνθήκες.

#### **4.1.11. Προσδιορισμός υπερέκφρασης-υποέκφρασης ενζύμων της γλυκολυτικής πορείας**

Ένας εκ των στόχων της παρούσας διδακτορικής διατριβής, και ίσως ο σημαντικότερος, είναι η μελέτη της υπερέκφρασης ή μη των ενζύμων της γλυκολυτικής πορείας στα νεοπλασματικά κύτταρα, και συγκεκριμένα της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH), ενζύμου που καταλύει ένα κρίσιμο στάδιο της γλυκόλυσης, και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και σε άλλους κυτταρικούς μηχανισμούς, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 1 της εισαγωγής. Αρχικά, μελετήθηκε η έκφραση του ενζύμου στις 4 νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές και στην κυτταρική σειρά των φυσιολογικών ινοβλαστών. Έπειτα, μετά από προσθήκη των συμπλόκων με την ισχυρότερη δράση, με βάση τις προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες, και επώαση των κυττάρων με αυτά στις  $IC_{50}$  τιμές τους για 24 ώρες, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολουθήθηκαν οι παρακάτω αναγραφόμενες πειραματικές διαδικασίες, για να μελετηθεί αν τα σύμπλοκα αυτά αναστέλλουν την έκφραση των ενζύμων και σταματούν την γλυκολυτική πορεία. Πρέπει επίσης να αναφερθεί πως τα κύτταρα επώαστηκαν και με ιωδιοξεικό οξύ, το οποίο αποτελεί αναστολέα της GAPDH, αλλά και χρησιμοποιήθηκαν ως control.

##### **4.1.11.1. Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα θηλαστικών**

Προκειμένου να απομονωθεί το συνολικό κυτταρικό εκχύλισμα πρωτεϊνών, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Πραγματοποιείται σπορά 1.000.000 κυττάρων σε τρυβλίο διαμέτρου 90mm. Μετά από 24 ώρες προστίθενται τα σύμπλοκα μετάλλων στις IC<sub>50</sub> τιμές τους, ενώ στα τρυβλία ελέγχου (control) έγινε μόνο αλλαγή θρεπτικού. Μετά από 24ωρη επώαση με τα σύμπλοκα μετάλλων, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται από όλα τα τρυβλία και ακολουθεί διπλή έκπλυση των κυττάρων με 10 ml (ανά έκπλυση) διαλύματος PBS (1x).

Με ένα φύλλο σιλκόνης, τα κύτταρα αποκολλούνται από το ταπήτιο του τρυβλίου, συλλέγονται σε 10 ml PBS (1x), μεταφέρονται σε αποστειρωμένα φυγοκεντρικά σωληνάκια και φυγοκεντρούνται στις 3000 rpm για 3 λεπτά στους 4°C.

Μετά τη φυγοκέντρηση αφαιρείται το υπερκείμενο, τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρούνται σε 1 ml PBS (1x) και μεταφέρονται σε μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια. Τα δείγματα διατηρούνται στον πάγο. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 5-7 δευτερόλεπτα (short spin) στις 11000 rpm στη φυγόκεντρο Eppendorf centrifuge 5417C, σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρείται το υπερκείμενο πλήρως με αναρρόφηση υπό κενό και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 300 μl διαλύματος RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton-X-100, 1% (w/v) Sodium deoxycolate, 0.1% (w/v) SDS ] παρουσία 1 mM PMSF, 1 μg/ml leupeptin και 1 μg/ml pepstatin).

Το εναιώρημα επωάζεται για 20 λεπτά στον πάγο. Στα πρώτα 10 λεπτά διευκολύνεται η κυτταρική λύση περνώντας το εκχύλισμα από συρριγγα 1ml μέσα από βελόνα 21G και ανάδευση σε Vortex. Για την τελική διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών, το εναιώρημα οδηγείται σε συσκευή υπερήχων όπου και εφαρμόζονται σε αυτό διαδοχικοί παλμοί των 10 sec σε 30% της ισχύος της κεφαλής, οι οποίοι εναλλάσσονται σε ισόχρονα διαστήματα εναπόθεσης στον πάγο (για να αποφευχθεί η υπερθέρμανσή) και για συνολικό χρόνο 2 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 20 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο το οποίο αποτελεί και το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα των πρωτεϊνών, συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα όπου προστίθεται διάλυμα φόρτωσης 5x.

#### **4.1.11.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)**

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση μίας διάστασης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS σύμφωνα με τη μέθοδο Laemmli (Laemmli U.K., 1970). Χρησιμοποιήθηκε σύστημα δύο κάθετων γυάλινων πλακών, μεταξύ των οποίων στοιβάζεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου η οποία χωρίζεται σε δύο μέρη, την πηκτή επιστοιβάξης [H<sub>2</sub>O, 30% Acrylamide mix, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED] με μεγάλο μέγεθος πόρων και την πηκτή διαχωρισμού (τελικής συγκέντρωσης 10%) [ddH<sub>2</sub>O, 30% Acrylamide mix, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED] με μικρότερο μέγεθος πόρων.

Τα μίγματα των δύο πηκτών, μετά την παρασκευή τους, πολυμερίζονται με προσθήκη TEMED (SIGMA). Ο πολυμερισμός της πηκτής έγινε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά. Πριν την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα των πρωτεϊνών θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 100° C. Ακολούθως, φορτώνονται στην πηκτή και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100V για δύο ώρες σε κατάλληλο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (25 mM Tris- HCl, 192 mM Glycine, 0.1% SDS). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες γίνονται ορατές με χρώση της πηκτής για 30 λεπτά περίπου, υπό ανάδευση, σε διάλυμα χρωστικής Coomassie [0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue, 9.2% (v/v) acetic acid, 45.5% methanol]. Ο αποχρωματισμός γίνεται, υπό ολονύκτια ανάδευση, σε διάλυμα αποχρωματισμού [25% (v/v) methanol, 7% (v/v) acetic acid].

#### **4.1.11.3. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran BA 85, Whatman GE Healthcare), με τον εξής τρόπο:

Η πηκτή καταβυθίζεται σε διάλυμα μεταφοράς [0.58% (w/v) Tris-HCl, 0.292% Glycine, 20% (v/v) Methanol] για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Στο ίδιο διάλυμα μεταφέρονται και 4 κομμάτια απορροφητικού χαρτιού Whatmann 3mm, διαστάσεων 8,4cm x 5,5cm, καθώς και ένα κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης ιδίων διαστάσεων, για 10 min προκειμένου να ενυδατωθούν επαρκώς .

Στη συνέχεια τα κομμάτια, τα εμποτισμένα με το διάλυμα μεταφοράς, τοποθετούνται στην επιφάνεια του ακίνητου ηλεκτροδίου (κάθοδος) συσκευής ημι-ξηρής πρωτεϊνικής ηλεκτρομεταφοράς (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BIORAD) με την ακόλουθη σειρά: 2 κομμάτια χαρτιού Whatmann - μεμβράνη νιτροκυτταρίνης - πηκτή πολυακρυλαμιδίου - 2 κομμάτια χαρτιού Whatmann. Με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur, απομακρύνουμε τυχόν φυσαλίδες, που ενδέχεται να παρεμποδίσουν την μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή προς τη μεμβράνη. Διαβρέχουμε και τα δύο ηλεκτρόδια με το διάλυμα μεταφοράς και στη συνέχεια εφαρμόζουμε στην επιφάνειά τους το δεύτερο ηλεκτρόδιο της συσκευής (άνοδος). Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε σταθερή τάση 15 Volt για 30 λεπτά σε τροφοδοτικό PowerPac HC BIO-RAD.

#### **4.1.11.4. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)**

Μετά το τέλος της μεταφοράς της πηκτής στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η μεμβράνη μεταφέρεται σε διάλυμα 10% w/v φρέσκου διαλύματος μη λιπαρού γάλακτος σε σκόνη (Regilait, REGILAIT U.C.A.) διαλυμένο σε PBS (1x) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση, για 1h προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές συνδέσεις της μεμβράνης.

Ακολούθως η μεμβράνη υφίσταται 2 διαδοχικές εκπλύσεις, διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μία, σε διάλυμα PBS (1X). Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το ειδικό πρωτεύων αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη που θέλουμε να ανιχνεύσουμε στην κατάλληλη αραίωση διαλύματος 3% w/v BSA/PBS (1x), στους 40C υπο ολονύκτια ανάδευση.

Μετά το τέλος της επώασης, η μεμβράνη υφίσταται 2 διαδοχικές εκπλύσεις, διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μία, σε διάλυμα PBS (1x), παρουσία Tween-20 [0.05% (w/v)], προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος. Κατόπιν η μεμβράνη επωάζεται με δευτερογενές αντίσωμα ειδικό για τις ανοσοσφαιρίνες του είδους προέλευσης του πρωτοταγούς αντισώματος. Η επώαση γίνεται σε διάλυμα 2,5 w/v μη λιπαρού γάλακτος σε σκόνη σε PBS (1x) και διαρκεί για 60 λεπτά σε



[113]

θερμοκρασία δωματίου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτογενή αντισώματα: GAPDH (G-9) Santa Cruz (365062): αραίωση 1: 200,

Monoclonal Anti- $\alpha$ -Tubulin SIGMA-ALDRICH (clone B-5-1-2): αραίωση 1: 5000, καθώς και το δευτερογενές αντίσωμα: Goat Anti-Mouse IgG, THERMO SCIENTIFIC (31430): αραίωση 1: 5000

Μετά το τέλος και της δεύτερης επώασης, η μεμβράνη υφίσταται 2 εκπλύσεις με τις ίδιες συνθήκες, όπως περιγράφηκαν παραπάνω, και ακολουθεί η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL) και η ανίχνευση της πρωτεΐνης με τη βοήθεια του Molecular Imager ChemiDoc XRS (Imaging System BIO-RAD).

## 4.2. *IN VIVO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

### 4.2.1. Οξεία τοξικότητα σε επίμυες *Wistar*

Για τα πειράματα οξείας τοξικότητας χρησιμοποιήθηκαν 20 θηλυκοί και 20 αρσενικοί ενήλικες επίμυες *Wistar*, βάρους  $220 \pm 11,4$  g και  $330 \pm 9,8$  g, αντίστοιχα. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 4 επιμέρους ομάδες.

ΟΜΑΔΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ
<b>A</b>	10 (5 ΘΗΛΥΚΟΙ ΚΑΙ 5 ΑΡΣΕΝΙΚΟΙ ΕΠΙΜΥΕΣ)	1 mg/kg
<b>B</b>	10 (5 ΘΗΛΥΚΟΙ ΚΑΙ 5 ΑΡΣΕΝΙΚΟΙ ΕΠΙΜΥΕΣ)	10 mg/kg
<b>Γ</b>	10 (5 ΘΗΛΥΚΟΙ ΚΑΙ 5 ΑΡΣΕΝΙΚΟΙ ΕΠΙΜΥΕΣ)	100 mg/kg
<b>Δ</b>	10 (5 ΘΗΛΥΚΟΙ ΚΑΙ 5 ΑΡΣΕΝΙΚΟΙ ΕΠΙΜΥΕΣ)	0 mg/kg

**Πίνακας 3** : Ομάδες πειραματόζωων, αριθμός πειραματόζωων ανά ομάδα και ποσότητα συμπλόκου που χορηγήθηκε σε κάθε ομάδα κατά τη μελέτη της οξείας τοξικότητας του συμπλόκου **7**.

Τα πειραματόζωα δεν τράφηκαν για 4-5 ώρες πριν την πειραματική διαδικασία. Η ως άνω αναγραφόμενη ποσότητα συμπλόκου χορηγήθηκε εφάπαξ ενδοπεριτοναϊκώς διαλυμένη σε 1 ml φυσιολογικού ορού. Στα πειραματόζωα της ομάδας Δ χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκώς 1ml διαλύματος φυσιολογικού ορού και χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα αναφοράς.

Μισή ώρα μετά τη χορήγηση του συμπλόκου τα ζώα αφέθηκαν ελεύθερα για να τραφούν σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας και με περιοδικό φωτισμό. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος των πειραματόζων 3-4 φορές ημερησίως. Επιπρόσθετα, ορισμένα από τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν εναλλάξ για 24 ώρες σε μεταβολικούς κλωβούς για τη μέτρηση της πρόσληψης τροφής και ύδατος και της αποβολής ούρων και κοπράνων.

Όσα από τα πειραματόζωα δεν κατέληξαν θυσιάστηκαν την 15η ημέρα του πειράματος βάσει του πρωτοκόλλου ευθανασίας (προνάρκωση με κεταμίνη και ευθανασία με ένεση πεντοθάλης), αφού πρώτα λήφθηκε δείγμα αίματος για την διεξαγωγή αιματολογικών και βιοχημικών εξετάσεων. Τα εσωτερικά όργανα αφαιρέθηκαν en block και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία που περιείχαν φορμαλδεΰδη 5%.

Ακολούθησε παθολογοανατομικός έλεγχος με χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης



## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**



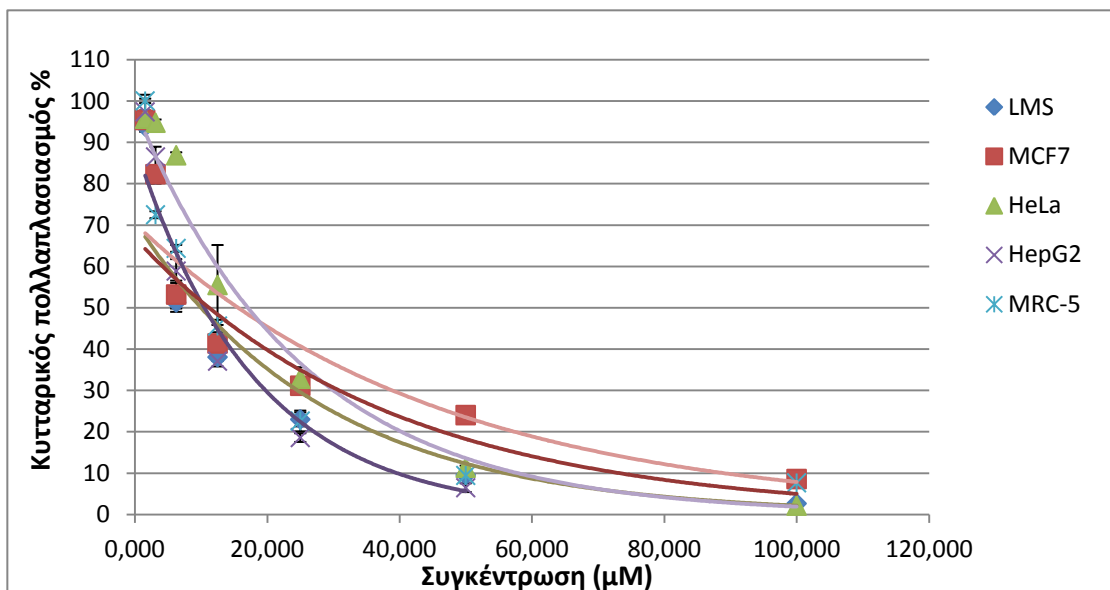
# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

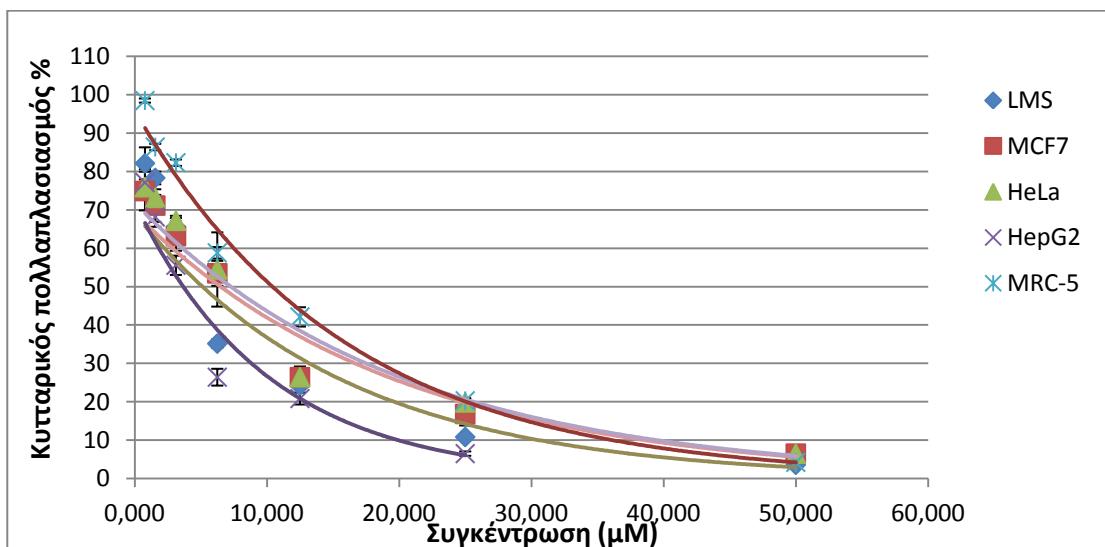
### 5.1. *IN VITRO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

#### 5.1.1. Έλεγχος της βιωσιμότητας κυττάρων με την μέθοδο του MTT

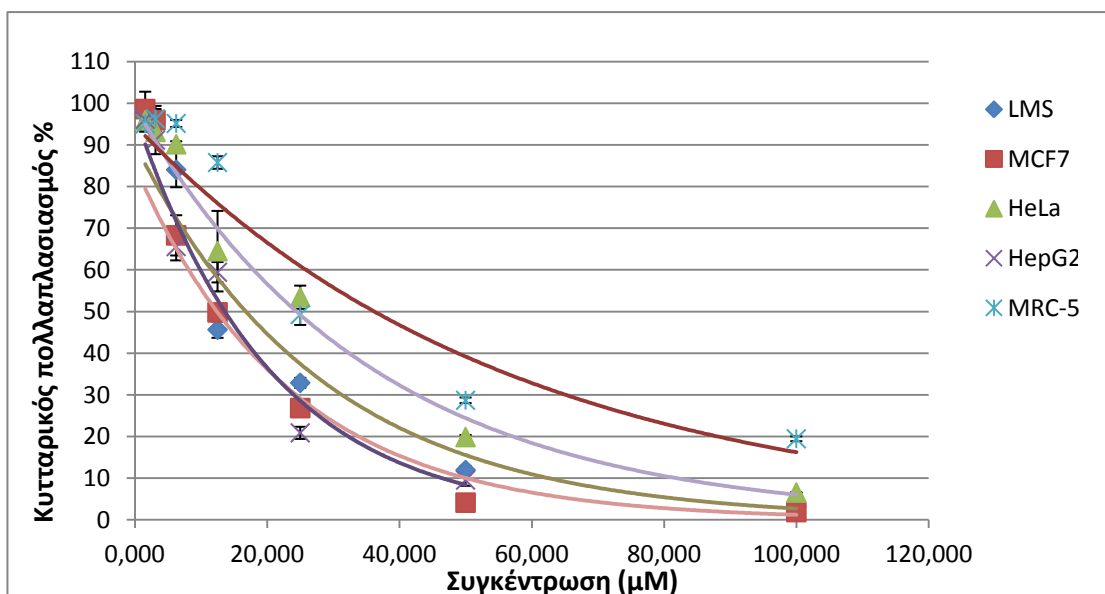
Η % αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού υπολογίστηκε μετά από επώαση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των υπό μελέτη ουσιών για 48h.



**Διάγραμμα 1:** Αναστολή του κυτταρικού πολ/σμού μετά από χορήγηση του συμπλόκου **1**.

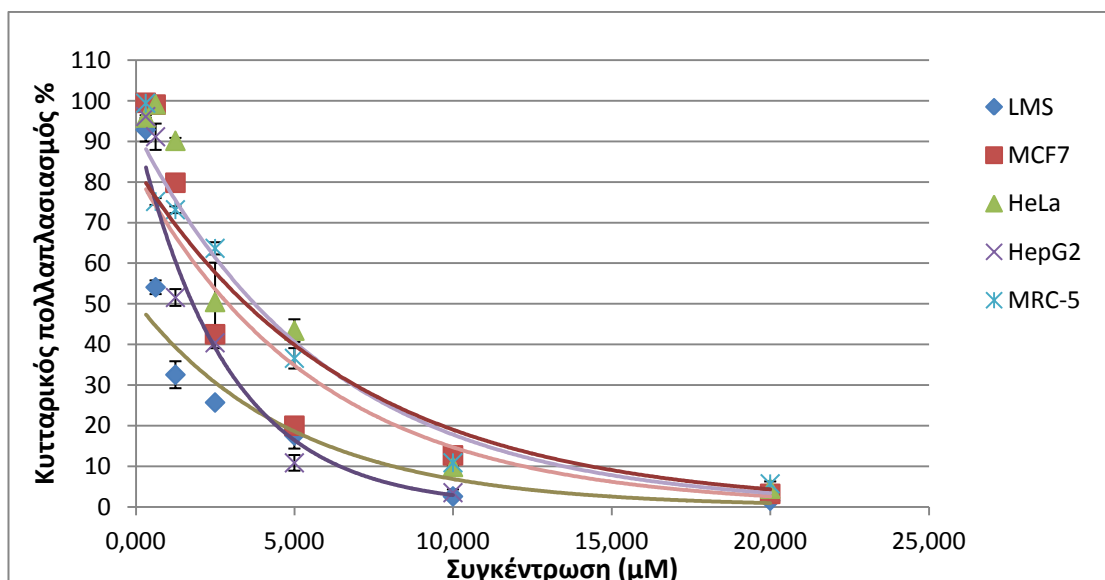


**Διάγραμμα 2:** Αναστολή του κυτταρικού πολ/σμού μετά από χορήγηση του συμπλόκου 2.

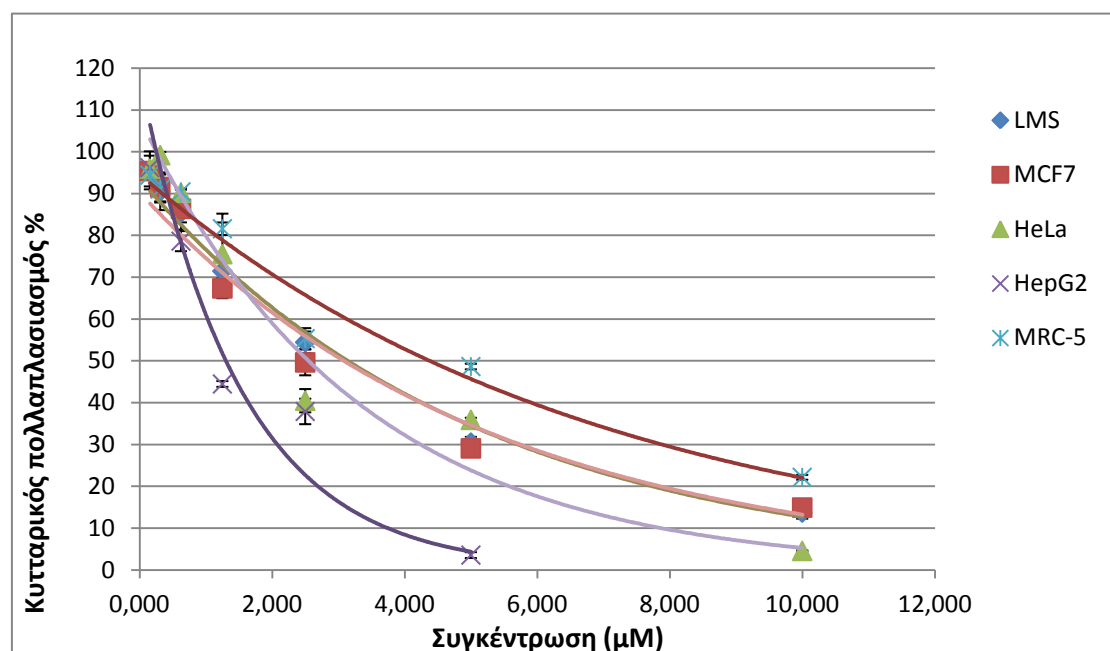


**Διάγραμμα 3:** Αναστολή του κυτταρικού πολ/σμού μετά από χορήγηση του συμπλόκου 3.

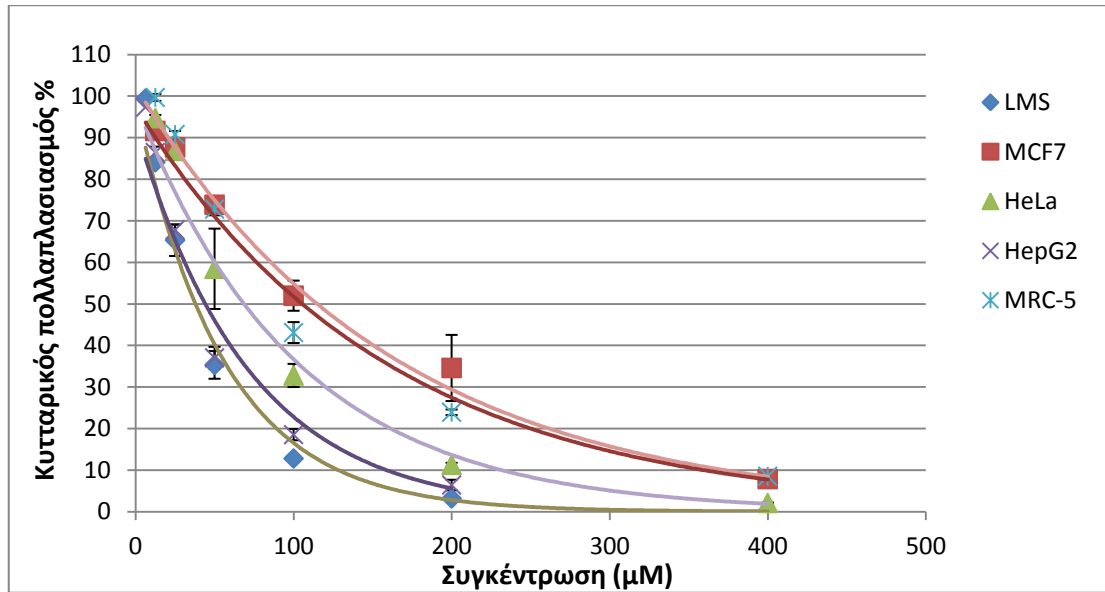




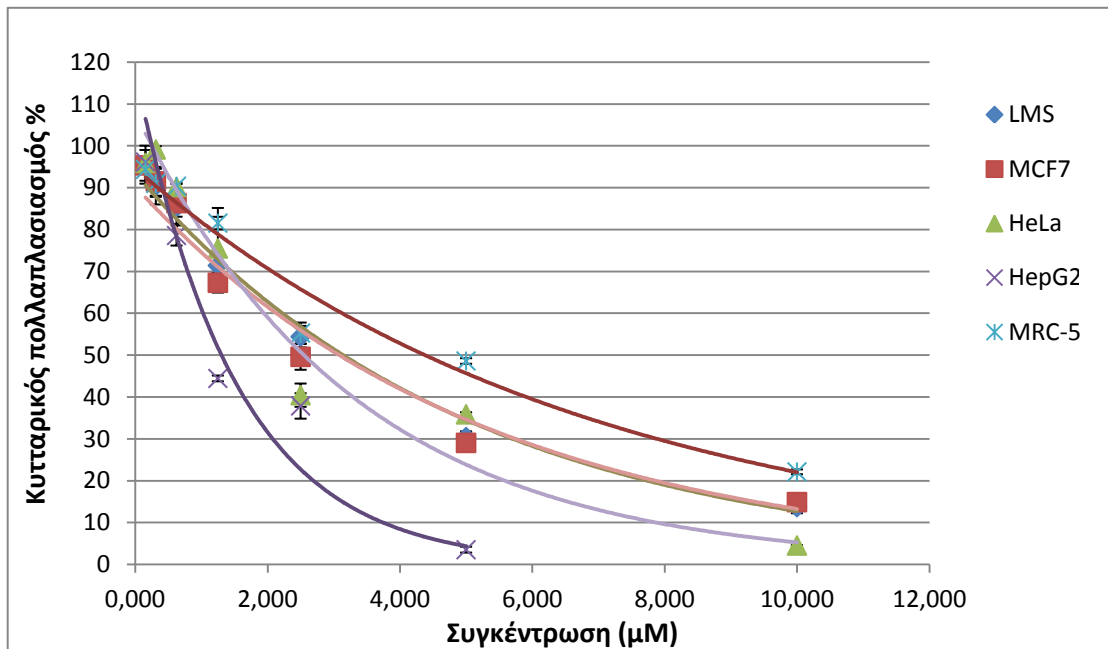
**Διάγραμμα 4:** Αναστολή του κυτταρικού πολ/σμού μετά από χορήγηση του συμπλόκου 4.



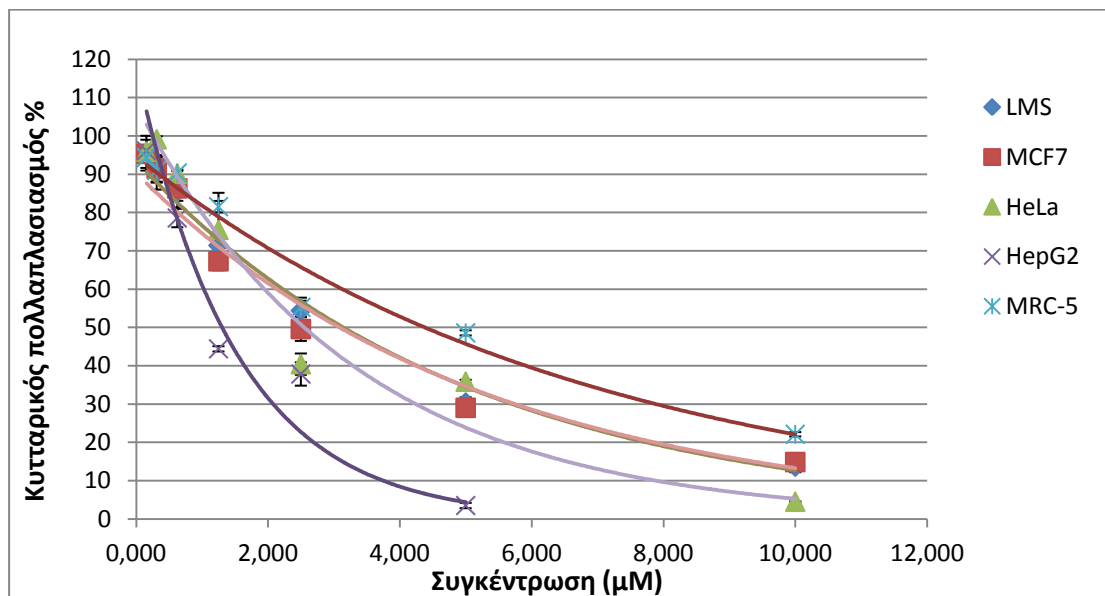
**Διάγραμμα 5:** Αναστολή του κυτταρικού πολ/σμού μετά από χορήγηση του συμπλόκου 5.



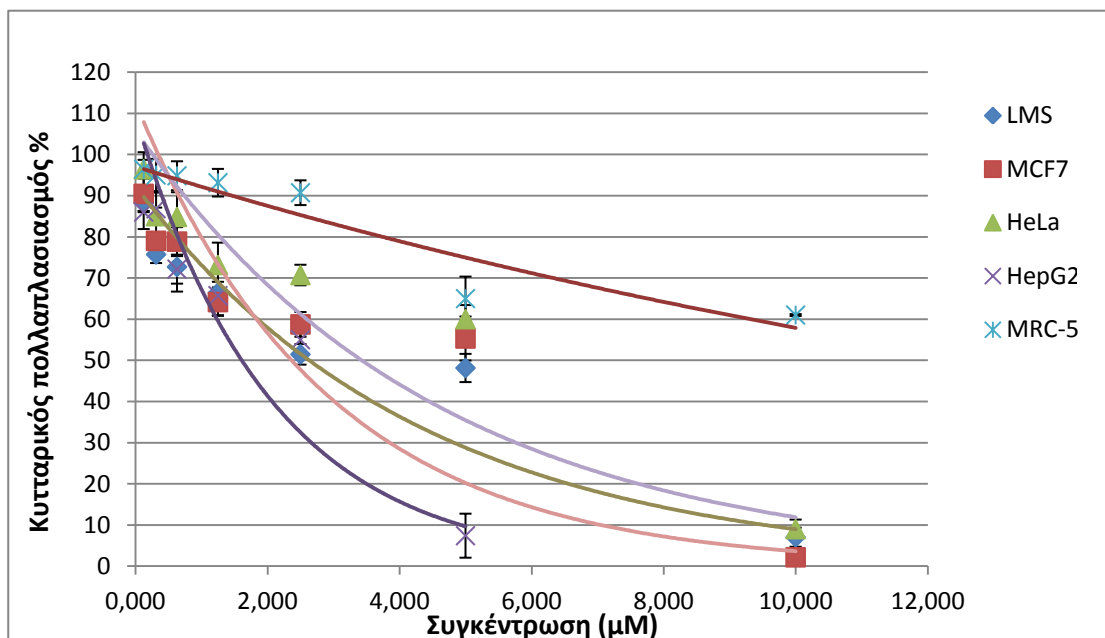
**Διάγραμμα 6:** Αναστολή του κυτταρικού πολ/σμού μετά από χορήγηση του συμπλόκου 6.



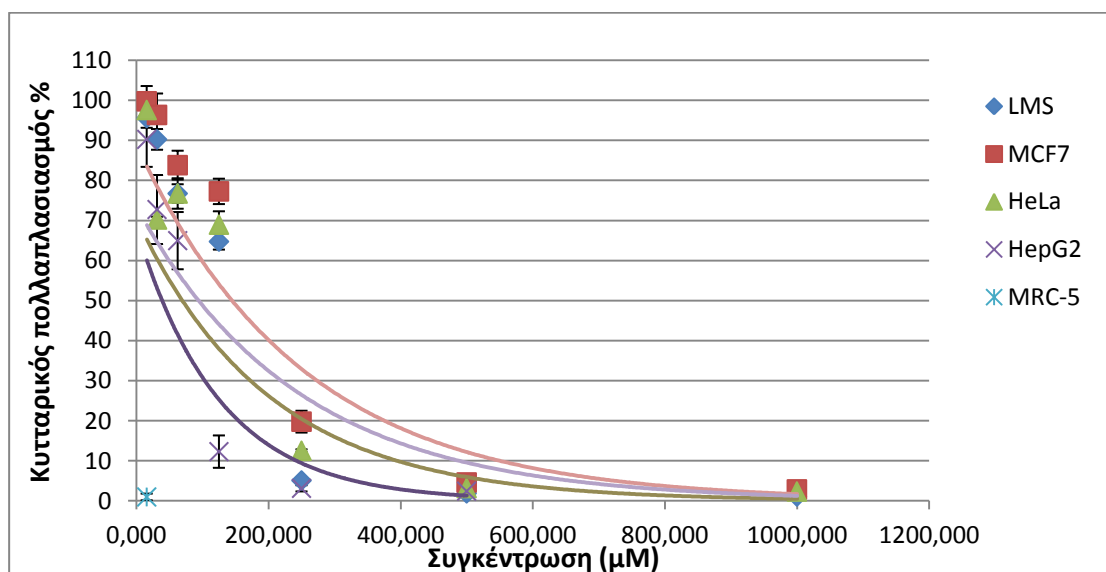
**Διάγραμμα 7:** Αναστολή του κυτταρικού πολ/σμού μετά από χορήγηση του συμπλόκου 7.



**Διάγραμμα 8:** Αναστολή του κυτταρικού πολ/σμού μετά από χορήγηση του συμπλόκου 8.



**Διάγραμμα 9:** Αναστολή του κυτταρικού πολ/σμού μετά από χορήγηση του συμπλόκου 9.



**Διάγραμμα 10:** Αναστολή του κυτταρικού πολ/σμού μετά από χορήγηση του συμπλόκου 10.

Οι IC<sub>50</sub> τιμές των συμπλόκων του βαναδίου και των υποκαταστατών τους συνοψίζονται στους πίνακες 4,5:

	LMS	MCF-7	HeLa	HepG2	MRC-5
<b>Σύμπλοκο 1</b>	10,6 ±0,883	16,7±0,23	16,2±0,41	18,4±0,32	12,1±0,15
<b>Σύμπλοκο 2</b>	4,77±0,525	6,9±0,125	7,1±0,12	7,5±0,33	9,83±0,34
<b>Σύμπλοκο 3</b>	15,9±0,455	16±0,741	26,1±0,22	28,4±0,24	34,2±1,347
<b>Σύμπλοκο 4</b>	1,2±0,238	2,36±0,36	4,8±0,67	5,9±0,54	7±0,125
<b>Σύμπλοκο 5</b>	3,1±0,125	3,4±0,294	10,1±0,78	7,3±0,45	13±1,327
<b>Σύμπλοκο 6</b>	35.9 ± 3,2	113,3 ± 7.4	68,8 ±4.0	80,04±0,23	89,16±0,33
<b>Σύμπλοκο 7</b>	116±1,5	137,6±7,1	201,8 ±4.2	195,7 ±5,32	248,4±6,2

<b>Σύμπλοκο 8</b>	124±1,5	128,5±3,8	234,3 ±6,3	206,338±2.3	245,9±3,6
<b>Σύμπλοκο 9</b>	5±3,5	7±3,2	9,4±1,5	12,8±5,4	31±5,2
<b>Σύμπλοκο 10</b>	129,1±6,2	105,5±2,7	134,7±3,6	130,8±2,11	151,5±4,4

**Πίνακας 4:** Τιμές IC<sub>50</sub> των συμπλόκων 1-10 (μM).

Αντίστοιχα, οι IC<sub>50</sub> τιμές των υποκαταστατών τους συνοψίζονται στον πίνακα 4:

	<b>LMS</b>
<b>Πυριδίνη (1)</b>	107,6 ±3,2
<b>Νικοτιναμίδιο (2)</b>	47,4±1,3
<b>Πιπεραζίνη (3)</b>	126,6±1,6
<b>Καδαβερίνη (4)</b>	10,8±0,4
<b>Αζίδιο του Νατρίου (5)</b>	2,3±0,7
<b>(py)<sub>2</sub>CO (6)</b>	48,4 ± 1.1
<b>ampraOH (7,8)</b>	259,9±5,9
<b>το darpdoH<sub>2</sub> (9)</b>	220,9±5,5
<b>dampdoH<sub>2</sub> (10)</b>	255,9±8,5

**Πίνακας 5:** Τιμές IC<sub>50</sub> των υποκαταστατών των συμπλόκων 1-10 (μM).

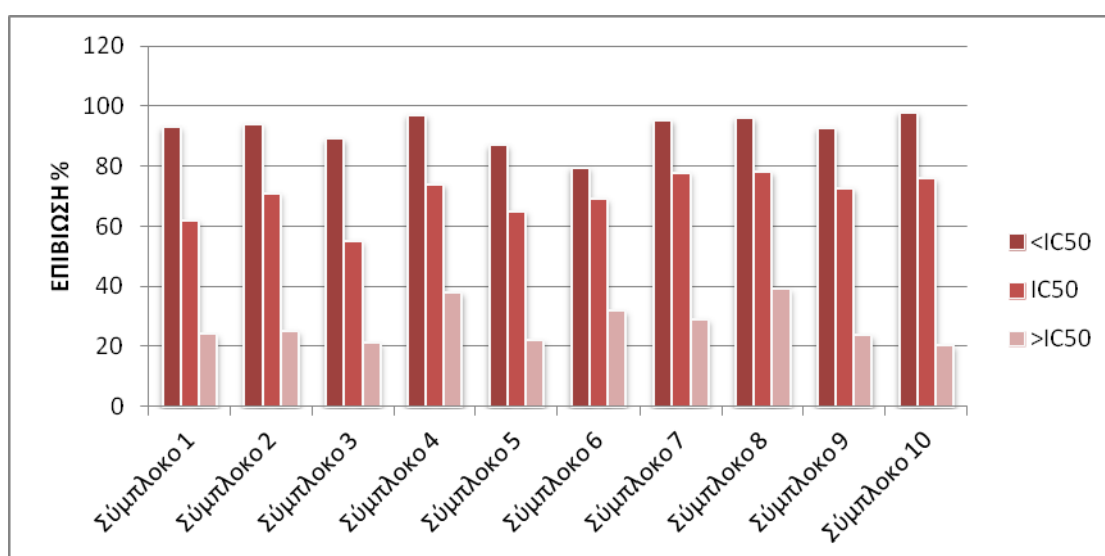
Και τα δέκα σύμπλοκα μετάλλων έχουν δόσοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση έναντι των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων επίμοσ Wistar (LMS), των κυττάρων

αδενοκαρκινώματος μαστού ανθρώπου (MCF-7) και αδενοκαρκινώματος τραχήλου μήτρας ανθρώπου (HeLa) και τέλος των κυττάρων ηπατοκυτταρικού καρκίνου ανθρώπου (HepG2). Η σειρά κυτταροτοξικότητας έχει ως εξής: σύμπλοκο 5> σύμπλοκο 4> σύμπλοκο 2> σύμπλοκο 9> σύμπλοκο 1> σύμπλοκο 3> σύμπλοκο 6> σύμπλοκο 7> σύμπλοκο 8> σύμπλοκο 10. Η κυτταροτοξικότητα των συμπλόκων 5 και 6 οφείλεται στην παρουσία των υποκαταστατών τους, οι οποίοι έχουν την ίδια περίπου  $IC_{50}$  τιμή ή και υψηλότερη από αυτά. Οι υπόλοιποι υποκαταστάτες εμφανίζουν αρκετά υψηλότερες  $IC_{50}$  τιμές από τις αντίστοιχες σύμπλοκες ενώσεις τους.

### 5.1.2. Ικανότητα των κυττάρων δημιουργίας αποικιών σε χαμηλή πυκνότητα σποράς

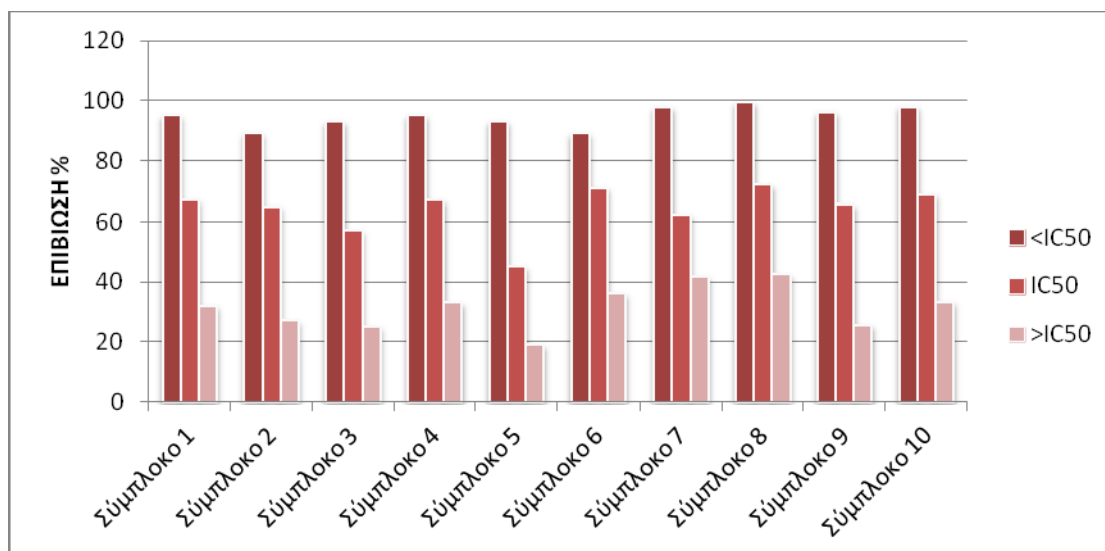
Όλα τα σύμπλοκα παρουσίασαν σημαντική δραστικότητα όσον αφορά την αναστολή της ικανότητας σχηματισμού αποικιών στις κυτταρικές σειρές LMS και MCF-7 και η αναστολή αυτή ήταν δόσοεξαρτώμενη.

Όσον αφορά τα κύτταρα LMS, ο αριθμός των αποικιών που σχηματίστηκε μετά από 48ωρη επώαση με τα σύμπλοκα φαίνεται στο παρακάτω γράφημα.



**Γράφημα 1:** % επιβίωση των LMS κυττάρων μετά από 48ωρη επώαση με τα σύμπλοκα 1-10, σε σύγκριση με τα κύτταρα του control.

Τα κύτταρα MCF-7, απώλεσαν επίσης την ικανότητά τους να σχηματίζουν αποικίες μετά από την επώαση με τα σύμπλοκα 1-10 (γράφημα..)

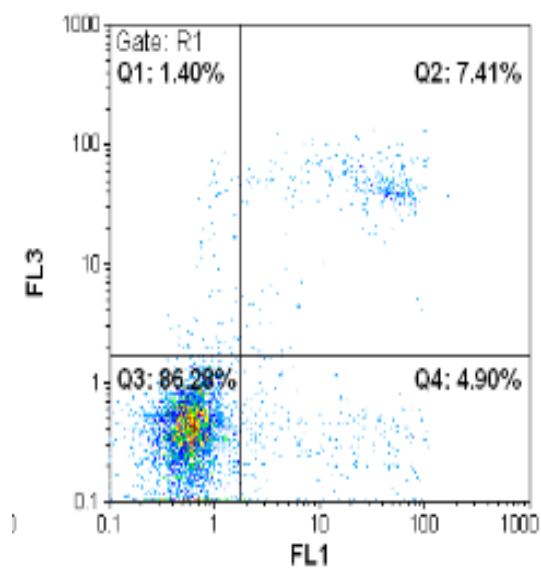


**Γράφημα 2:** % επιβίωση των MCF-7 κυττάρων μετά από 48ωρη επώαση με τα σύμπλοκα 1-10, σε σύγκριση με τα κύτταρα του control.

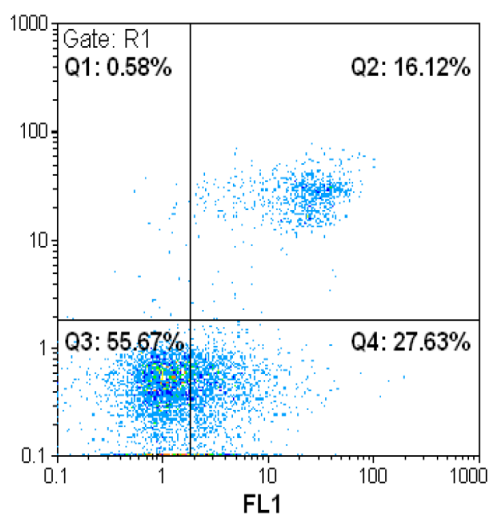
### 5.1.3. Προσδιορισμός μηχανισμού πρόκλησης κυτταρικού θανάτου

Για να ανευρεθεί ο μηχανισμός με τον οποίο τα σύμπλοκα του βαναδίου και του ψευδαργύρου επάγουν τον κυτταρικό θάνατο πραγματοποιήθηκε μέτρηση στο κυτταρόμετρο ροής.

Στις εικόνες που ακολουθούν, παρατηρούνται τα ποσοστά των βιώσιμων LMS κυττάρων (Q3), των κυττάρων που βρίσκονται σε πρώιμη αποπτωτική φάση (Q4), αυτών που βρίσκονται σε όψιμη αποπτωτική φάση (Q2) και τέλος των κυττάρων που βρίσκονται στο στάδιο της νέκρωσης (Q1), μετά από 48ωρη επώαση με τις  $IC_{50}$  τιμές των συμπλόκων **1-10**.

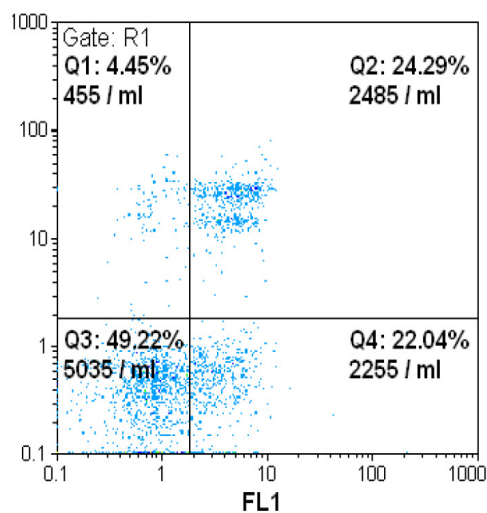


**Εικόνα 35:** Ποσοστά αποπτωτικού και νεκρωτικού θανάτου LMS κυττάρων στα οποία δεν έχει προστεθεί κανένα σύμπλοκο και χρησιμοποιήθηκαν ως control.

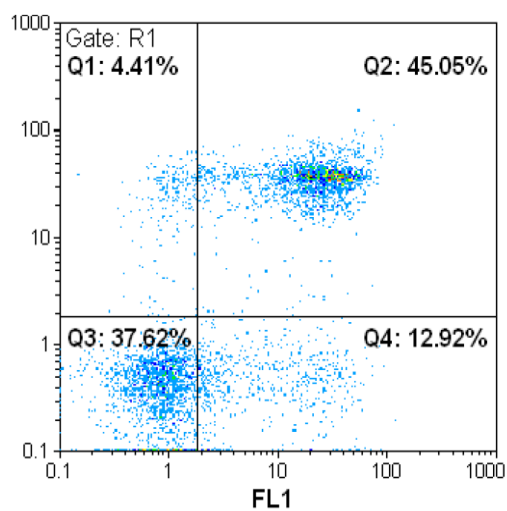


**Εικόνα 36:** Ποσοστά αποπτωτικού και νεκρωτικού θανάτου των LMS κυττάρων μετά από 48ωρη επώαση με την IC<sub>50</sub> τιμή του συμπλόκου **1**.



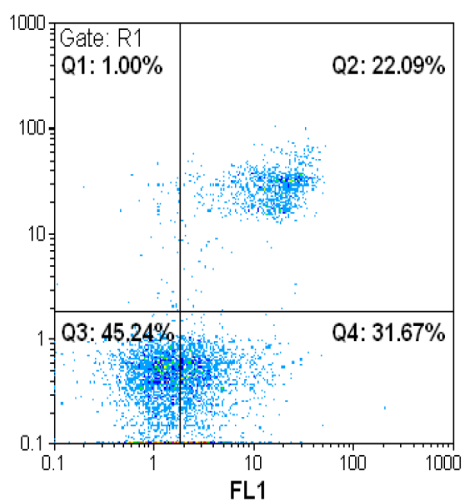


**Εικόνα 37:** Ποσοστά αποπτωτικού και νεκρωτικού θανάτου των LMS κυττάρων μετά από 48ωρη επώαση με την  $IC_{50}$  τιμή του συμπλόκου **2**.

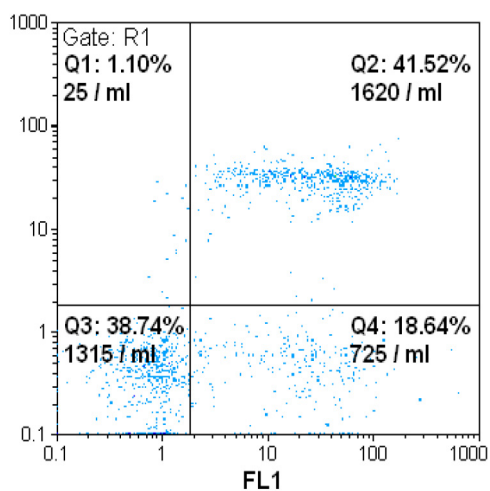


**Εικόνα 38:** Ποσοστά αποπτωτικού και νεκρωτικού θανάτου των LMS κυττάρων μετά από 48ωρη επώαση με την  $IC_{50}$  τιμή του συμπλόκου **3**.

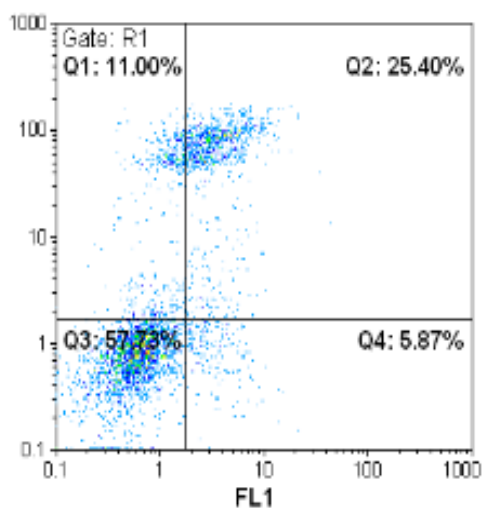
[130]



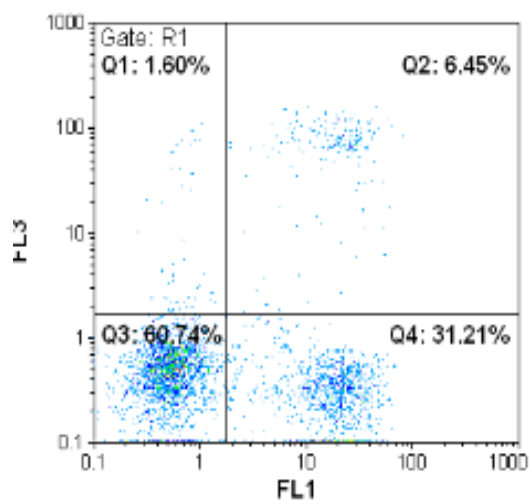
**Εικόνα 39:** Ποσοστά αποπτωτικού και νεκρωτικού θανάτου των LMS κυττάρων μετά από 48ωρη επώαση με την  $IC_{50}$  τιμή του συμπλόκου 4.



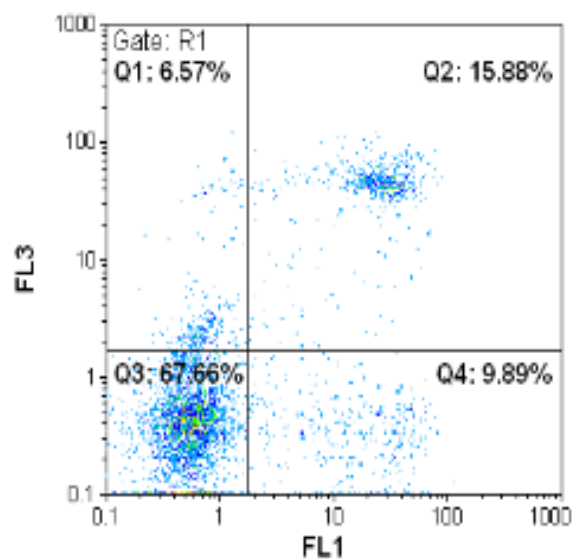
**Εικόνα 40:** Ποσοστά αποπτωτικού και νεκρωτικού θανάτου των LMS κυττάρων μετά από 48ωρη επώαση με την  $IC_{50}$  τιμή του συμπλόκου 5.



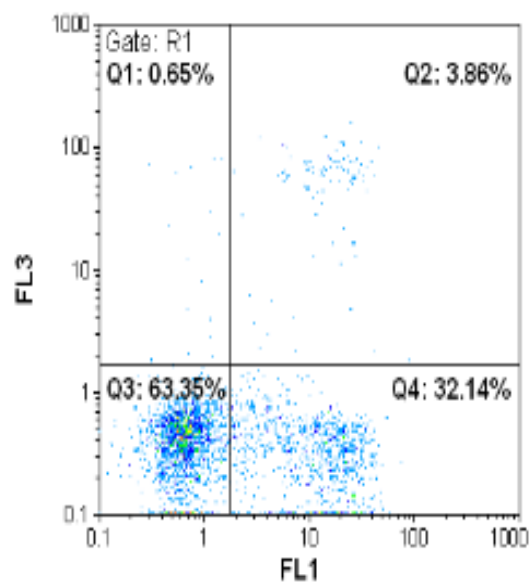
**Εικόνα 41:** Ποσοστά αποπτωτικού και νεκρωτικού θανάτου των LMS κυττάρων μετά από 48ωρη επώαση με την  $IC_{50}$  τιμή του συμπλόκου 6.



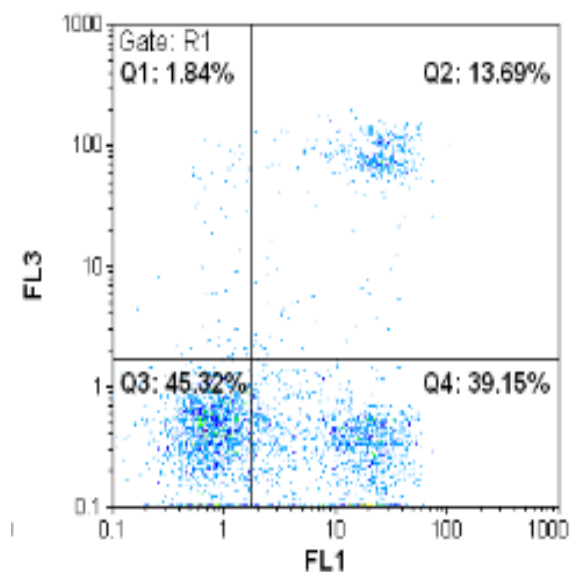
**Εικόνα 42:** Ποσοστά αποπτωτικού και νεκρωτικού θανάτου των LMS κυττάρων μετά από 48ωρη επώαση με την  $IC_{50}$  τιμή του συμπλόκου 7.



**Εικόνα 43:** Ποσοστά αποπτωτικού και νεκρωτικού θανάτου των LMS κυττάρων μετά από 48ωρη επώαση με την  $IC_{50}$  τιμή του συμπλόκου **8**.



**Εικόνα 44:** Ποσοστά αποπτωτικού και νεκρωτικού θανάτου των LMS κυττάρων μετά από 48ωρη επώαση με την  $IC_{50}$  τιμή του συμπλόκου **9**.



**Εικόνα 45:** Ποσοστά αποπτωτικού και νεκρωτικού θανάτου των LMS κυττάρων μετά από 48ωρη επώαση με την IC<sub>50</sub> τιμή του συμπλόκου **10**.

	<b>Βιώσιμα</b>	<b>Πρώιμα αποπτωτικά</b>	<b>Όψιμα αποπτωτικά</b>	<b>Σύνολο αποπτωτικών</b>	<b>Νεκρωτικά</b>
<b>Control</b>	95,88%	0,46%	2,76%	3,22%	0,9%
<b>Σύμπλοκο 1</b>	56,67%	27,63%	16,12%	43,75%	0,58%
<b>Σύμπλοκο 2</b>	49,22%	22,04%	24,29%	46,33%	4,45%
<b>Σύμπλοκο 3</b>	37,62%	12,92%	45,05%	57,97%	4,41%
<b>Σύμπλοκο 4</b>	45,24%	31,67%	22,09%	53,76%	1%
<b>Σύμπλοκο 5</b>	38,74%	18,64%	41,52%	60,16%	1,1%

<b>Σύμπλοκο 6</b>	57,73%	5,87%	25,40%	31,27%	11%
<b>Σύμπλοκο 7</b>	60,74%	31,21%	6,45%	37,66%	1,6%
<b>Σύμπλοκο 8</b>	67,66%	9,89%	15,88%	25,77%	6,57%
<b>Σύμπλοκο 9</b>	63,35	32,14	3,86	36%	0,65%
<b>Σύμπλοκο 10</b>	45,32%	39,15%	13,69%	52,84%	1,84%

**Πίνακας 6:** Τα κύτταρα LMS επωάστηκαν για 48 ώρες με τις IC<sub>50</sub> τιμές των συμπλόκων **1-10**. Μετά από χρώση με Annexin V-FITC και PI, και μέτρηση στο κυτταρόμετρο ροής, ανιχνεύθηκαν τα ποσοστά του επαγόμενου αποπτωτικού και νεκρωτικού θανάτου.

Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα, παρατηρείται πως ο τρόπος κυτταρικού θανάτου που επάγεται μετά τη χορήγηση και των έξι συμπλόκων του βαναδίου, αλλά και των τεσσάρων συμπλόκων του ψευδαργύρου είναι ο αποπτωτικός.

#### 5.1.4. Έλεγχος αντιβακτηριακής δράσης

Η αντιβακτηριακή δράση των συμπλόκων 1-6 έναντι των στελεχών *E. coli*, *Z. mobilis*, *C. glutamicum* και *S. thermophilus* παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.

Σύμπλοκο	gram-		gram+	
	<i>E. coli</i>	<i>Z. mobilis</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>S. thermophilus</i>
1	>20	>20	>20	>20
2	>100	>100	>100	>100
3	>20	>20	>20	>20
4	>20	>20*	>20*	>20*
5	>20	>20*	>20*	>20*
6	>30	>30	>30	>30

\* μικρή μείωση της ανάπτυξης στη συγκέντρωση των 20 μΜ

Πίνακας 7: Αντιβακτηριακή δράση των υπό δοκιμή συμπλόκων του βαναδίου στην τιμή MIC.

Σύμφωνα με τις MIC τιμές, κανένα από τα σύμπλοκα του βαναδίου δεν ανέστειλε την ανάπτυξη των υπό δοκιμή βακτηρίων. Τα στελέχη των *Z. mobilis*, *S. thermophilus* και *C. glutamicum* παρουσίασαν μικρή μείωση της ανάπτυξής του παρουσία των συμπλόκων 4 και 5 στη συγκέντρωση των 20 μΜ. Οι υποκαταστάτες των συμπλόκων δεν είχαν καμία επίδραση στην ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών και για τον λόγο αυτό δεν παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

Η αντιβακτηριακή δράση των συμπλόκων **7-10** και των υποκαταστατών τους έναντι των στελεχών *E. coli*, *Z. Mobilis* και *C. glutamicum* παρουσιάζεται στον Πίνακα 8.

Σύμπλοκο	gram-		gram+
	<i>E. coli</i>	<i>Z. mobilis</i>	<i>C. glutamicum</i>
<b>dapdoH<sub>2</sub></b>	>200*	25	>200*
<b>dampdoH<sub>2</sub></b>	>200	>200	>200
<b>ampaoH<sub>2</sub></b>	>200	>200	>200
<b>7</b>	>200	>200	>200*
<b>8</b>	>200	>200	>200*
<b>9</b>	>200*	25	>200*
<b>10</b>	>200	>200	>200

\* μικρή μείωση της ανάπτυξης στη συγκέντρωση των 20 μM

**Πίνακας 8 :** Αντιβακτηριακή δράση των υπό δοκιμή συμπλόκων του ψευδαργύρου και των υποκαταστατών τους στην τιμή MIC.

Με βάση τις τιμές MIC, οι υποκαταστάτες dampdoH<sub>2</sub> και ampaoH<sub>2</sub>, καθώς και τα σύμπλοκα **7**, **8** και **10** δεν ανέστειλαν την βακτηριακή ανάπτυξη. Το στέλεχος *C. glutamicum* παρουσίασε μικρή μείωση στην ανάπτυξη του παρουσία των συμπλόκων **7** και **8**, στη συγκέντρωση των 200 μM.

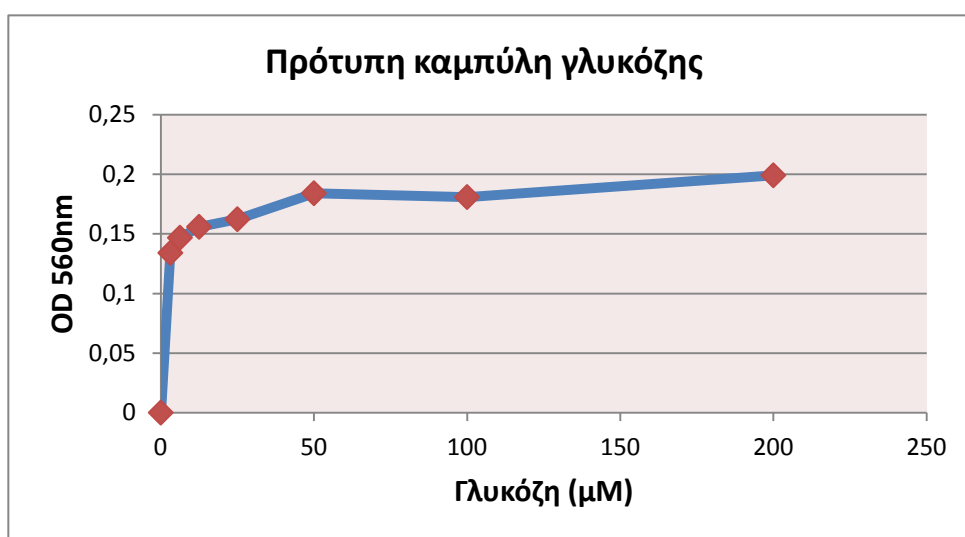


Όσον αφορά το σύμπλοκο **9** και τον υποκαταστάτη του, η παρουσία τους στο καλλιεργητικό μέσο προκάλεσε ισχυρή αναστολή της ανάπτυξης του βακτηρίου *Z. mobilis* (MIC 25  $\mu\text{M}$ ), ενώ στην περίπτωση των βακτηρίων *E. coli* και *C. glutamicum*, προκάλεσε μόνο μια μικρή καθυστέρηση στην ανάπτυξή τους.

Η ανάπτυξη του βακτηρίου *S. thermophilus* παρουσίαζε μείωση παρουσία του διαλύτη *DMSO*, στην ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε για την διαλυτοποίηση των συμπλόκων και για το λόγο αυτό δεν έχει συμπεριληφθεί στον πίνακα 8.

#### 5.1.5. Φασματοσκοπικός προσδιορισμός κατανάλωσης γλυκόζης

Για τον προσδιορισμό της τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης ( $\mu\text{M}$ ) στα υπό μελέτη δείγματα, δημιουργήθηκε καταρχήν η πρότυπη καμπύλη σύμφωνα με τις οδηγίες της μεθόδου (Διάγραμμα ).



**Διάγραμμα 11:** Πρότυπη καμπύλη γλυκόζης.

Ο υπολογισμός της κατανάλωσης γλυκόζης προσδιορίστηκε με βάση την διαθέσιμη ποσότητα γλυκόζης του καλλιεργητικού μέσου. Μετρήθηκε καταρχήν κατανάλωση της γλυκόζης από τις μελετούμενες κυτταρικές σειρές και εν συνεχεία η ποσότητα της γλυκόζης που καταλάωναν παρουσία των συμπλόκων (Πίνακας 9).

	control	2-DG		ΣΥΜΠΛΟΚΟ 1		ΣΥΜΠΛΟΚΟ 2	
		IC <sub>50</sub>	IC <sub>70</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>70</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>70</sub>
<b>LMS</b>	0,017	0,014	0	0,017	0,006	0,012	0
<b>MCF7</b>	0,011	0,005	0	0,011	0,009	0,006	0
<b>HELA</b>	0,006	0,007	0,005	0,005	0,003	0,004	0,002
<b>HEPG2</b>	0,201	0,063	0,009	0,158	0,098	0,105	0
<b>MRC5</b>	0,004	0,003	0,002	0,003	0,002	0,002	0,001

	ΣΥΜΠΛΟΚΟ 3		ΣΥΜΠΛΟΚΟ 4		ΣΥΜΠΛΟΚΟ 5	
	IC <sub>50</sub>	IC <sub>70</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>70</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>70</sub>
<b>LMS</b>	0,018	0,004	0,017	0,010	0,004	0,005
<b>MCF7</b>	0,012	0,007	0,010	0,009	0,013	0,003
<b>HELA</b>	0,004	0,002	0,006	0,004	0,005	0,003
<b>HEPG2</b>	0,108	0,062	0,090	0,033	0,198	0,068
<b>MRC5</b>	0,004	0,003	0,003	0,002	0,004	0,002

	ΣΥΜΠΛΟΚΟ 7		ΣΥΜΠΛΟΚΟ 8	
	IC <sub>50</sub>	IC <sub>70</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>70</sub>
<b>LMS</b>	0,014	0	0,017	0,006
<b>MCF7</b>	0,005	0	0,011	0,009

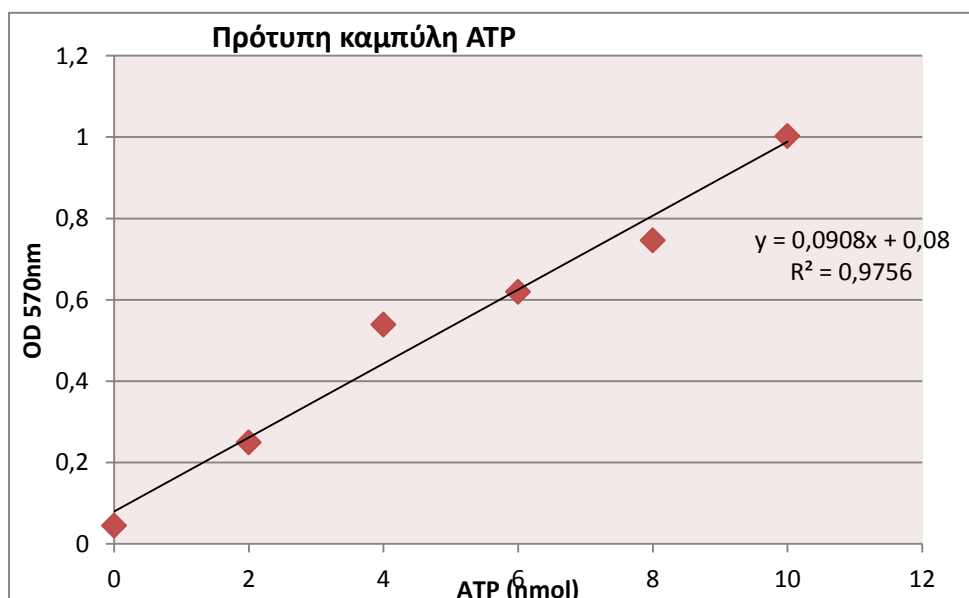
<b>HELA</b>	0,007	0,005	0,005	0,003
<b>HEPG2</b>	0,063	0,009	0,158	0,098
<b>MRC5</b>	0,003	0,002	0,003	0,002

**Πίνακας 9:** Κατανάλωση γλυκόζης μετά την 24ωρη επώαση των κυττάρων με τα σύμπλοκα 1-5 και 7-8, και με την 2-DG.

Παρατηρείται πως όλα τα σύμπλοκα προκαλούν μείωση της κατανάλωσης γλυκόζης στα κύτταρα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο.

#### 5.1.6. Φασματοσκοπικός προσδιορισμός παραγωγής ενδοκυττάριου ATP

Για τον προσδιορισμό της τελικής συγκέντρωσης ATP ( $\mu\text{M}$ ) στα υπό μελέτη δείγματα, δημιουργήθηκε καταρχήν η πρότυπη καμπύλη σύμφωνα με τις οδηγίες της μεθόδου (διάγραμμα 12).



**Διάγραμμα 12:** Πρότυπη καμπύλη ATP.

Εν συνεχεία, μετά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων από το φασματοφωτόμετρο, την αφαίρεση δηλαδή της απορρόφησης του δείγματος στο οποίο δεν υπήρχε καθόλου ATP από όλα τα υπόλοιπα δείγματα, και την διόρθωση όλων των απορροφήσεων λόγω της απώλειας του 20% της αρχικής ποσότητας ATP των δειγμάτων μετά τη διαδικασία αφαίρεσης των πρωτεϊνών, οι τιμές που προέκυψαν τοποθετήθηκαν στην εξίσωση της καμπύλης αναφοράς και διαιρέθηκαν με τον τελικό όγκο που είχε κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου (50 μl).

Τα αποτελέσματα για τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, χωρίς την προσθήκη κανενός εκ των συμπλόκων, παρουσιάζονται στον κάτωθι πίνακα.

MRC-5	LMS	HeLa	HepG2	MCF-7
0,041±0,0012	0,031±0,0042	0,043±0,0011	0,056±0,0003	0,037±0,0015

**Πίνακας 10:** Συγκεντρώσεις ATP στην κυτταρική σειρά των φυσιολογικών ινοβλαστών και στις υπό μελέτη νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές (σε mM).

Παρατηρείται πως τα κύτταρα HepG2 παράγουν το περισσότερο ATP σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές. Ακολουθούν τα κύτταρα HeLa που παράγουν περίπου την ίδια ποσότητα ATP με τα κύτταρα MRC-5, ενώ τα κύτταρα LMS και MCF-7 παράγουν τις λιγότερες ποσότητες ATP από όλες τις κυτταρικές σειρές.

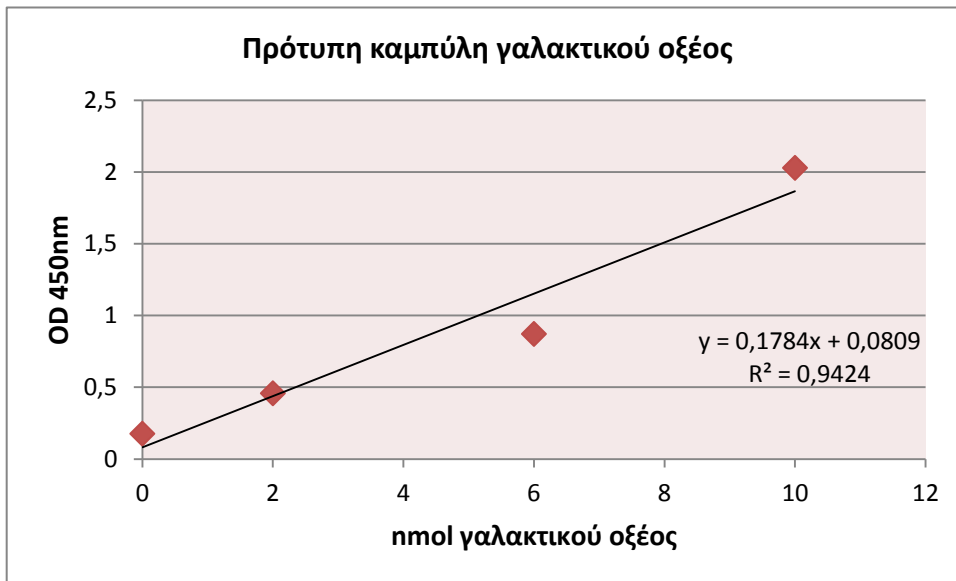
Μετά την προσθήκη των συμπλόκων **1, 2, 7, 8**, καθώς και της 2-δεοξυγλυκόζης στην τιμή IC<sub>50</sub> τους και σε μία μεγαλύτερη συγκέντρωση (IC<sub>70</sub>), η παραγωγή ATP μειώθηκε με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, συγκρινόμενη με την αντίστοιχη των κυττάρων που δεν επωάστηκαν με καμία ουσία (Πίνακας 11).

	Συγκέντρωση ATP (mM)				
	MRC-5	LMS	HeLa	HepG2	MCF-7
<b>Σύμπλοκο 1</b> <b>(IC<sub>50</sub>)</b>	0,022± 0,001	0,026± 0,005	0,038± 0,002	0,038± 0,004	0,032± 0,001
<b>Σύμπλοκο 1</b> <b>(IC<sub>30</sub>)</b>	0,001± 0,0001	0,001± 0,0001	0	0,031± 0,003	0,026± 0,002
<b>Σύμπλοκο 2</b> <b>(IC<sub>50</sub>)</b>	0,013± 0,002	0,012± 0,001	0,010± 0,001	0,020± 0,001	0,028± 0,001
<b>Σύμπλοκο 2</b> <b>(IC<sub>30</sub>)</b>	0,007± 0,001	0,001± 0,0001	0	0,017± 0,001	0,023± 0,003
<b>Σύμπλοκο 7</b> <b>(IC<sub>50</sub>)</b>	0,026± 0,003	0	0,017± 0,003	0,017± 0,0001	0,025± 0,001
<b>Σύμπλοκο 7</b> <b>(IC<sub>30</sub>)</b>	0,008± 0,001	0	0	0,007± 0,0001	0,020± 0,002
<b>Σύμπλοκο 8</b> <b>(IC<sub>50</sub>)</b>	0,025± 0,001	0,002± 0,0003	0,019± 0,005	0,018± 0,001	0,027± 0,005
<b>Σύμπλοκο 8</b> <b>(IC<sub>30</sub>)</b>	0,018± 0,002	0	0,001± 0,0001	0,013± 0,002	0,019± 0,003
<b>2-DG (IC<sub>50</sub>)</b>	0,019± 0,001	0,014± 0,005	0,017± 0,001	0,014± 0,001	0,018± 0,001
<b>2-DG (IC<sub>30</sub>)</b>	0,007± 0,0001	0,009± 0,001	0	0,004± 0,0002	0,014± 0,002

**Πίνακας 11:** Συγκεντρώσεις ATP στην κυτταρική σειρά των φυσιολογικών ινοβλαστών και στις υπό μελέτη νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές μετά από 24ωρη επώαση με τα σύμπλοκα 1, 2, 7, 8 και με 2-DG στις τιμές IC<sub>50</sub> και IC<sub>30</sub> (σε mM).

### 5.1.7. Φασματοσκοπικός προσδιορισμός παραγωγής γαλακτικού οξέος

Για τον προσδιορισμό της τελικής συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος (μM) στα υπό μελέτη δείγματα, δημιουργήθηκε καταρχήν η πρότυπη καμπύλη σύμφωνα με τις οδηγίες της μεθόδου (Διάγραμμα 13).



**Διάγραμμα 13:** Πρότυπη καμπύλη γαλακτικού οξέος.

Εν συνεχεία, μετά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων από το φασματοφωτόμετρο, την αφαίρεση δηλαδή της απορρόφησης του δείγματος στο οποίο δεν υπήρχε καθόλου γαλακτικό οξύ από όλα τα υπόλοιπα δείγματα, οι τιμές που προέκυψαν τοποθετήθηκαν στην εξίσωση της καμπύλης αναφοράς και διαιρέθηκαν με τον τελικό όγκο που είχε κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου (10 μl).

Τα αποτελέσματα για τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, με (στην τιμή  $IC_{50}$ ) και χωρίς την προσθήκη κανενός εκ των συμπλόκων, παρουσιάζονται στον κάτωθι πίνακα.

	control	Σύμπλοκο 1	Σύμπλοκο 2	Σύμπλοκο 5	Σύμπλοκο 7
<b>MRC-5</b>	0,18±0,008	0,02±0,004	0,2±0,001	0,08±0,046	0,07±0,003
<b>LMS</b>	0,77±0,005	0,42±0,009	0,08±0,002	0,58±0,006	0
<b>HeLa</b>	0,10±0,119	0,09±0,019	0,12±0,015	0,11±0,002	0,09±0,001
<b>HepG2</b>	0,58±0,005	0,3±0,008	0,38±0,009	0,17±0,016	0,14±0,022
<b>MCF-7</b>	0,25±0,011	0,24±0,012	0,18±0,004	0,19±0,013	0,13±0,003

**Πίνακας 12:** Συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος στο καλλιεργητικό μέσο της κυτταρικής σειράς των φυσιολογικών ινοβλαστών και των υπό μελέτη νεοπλασματικών κυτταρικών σειρών με ή χωρίς επώαση με τα σύμπλοκα **1, 2, 5, 7** (σε mM).

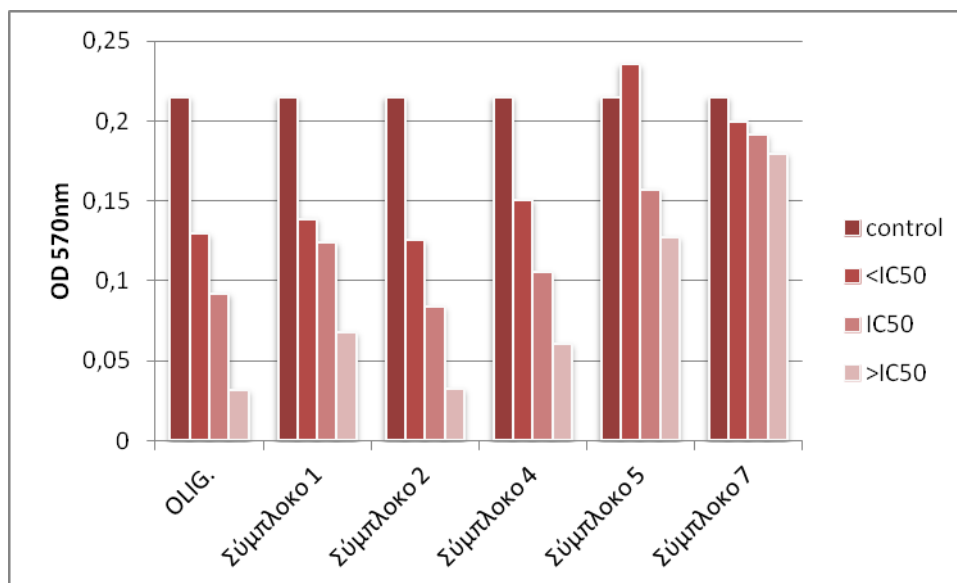
Παρατηρείται πως τα κύτταρα LMS παράγουν το περισσότερο γαλακτικό οξύ, σε ποσότητες κατά πολύ μεγαλύτερες σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές. Ακολουθούν τα κύτταρα HepG2 που παράγουν και αυτά αρκετό γαλακτικό οξύ, σε ποσότητες όμως μικρότερες από τα κύτταρα LMS. Τα κύτταρα MCF-7 παράγουν, με μικρή διαφορά, περισσότερο γαλακτικό οξύ σε σύγκριση με τα κύτταρα MRC-5, ενώ η κυτταρική σειρά HeLa παράγει την λιγότερη ποσότητα γαλακτικού οξέος σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές.

Μετά την προσθήκη των συμπλόκων **1, 2, 5, 7** στην τιμή IC<sub>50</sub> τους, η παραγωγή γαλακτικού οξέος μειώθηκε με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, συγκρινόμενη με την αντίστοιχη των κυττάρων που δεν επώαστηκαν με καμία ουσία. Το σύμπλοκο **7**

προκάλεσε την μεγαλύτερη αναστολή στην παραγωγή γαλακτικού οξέος σε όλες τις κυτταρικές σειρές εκτός των κυττάρων HeLa. Η αναστολή αυτή είναι πιο ισχυρή στην κυτταρική σειρά του λειομυοσαρκώματος.

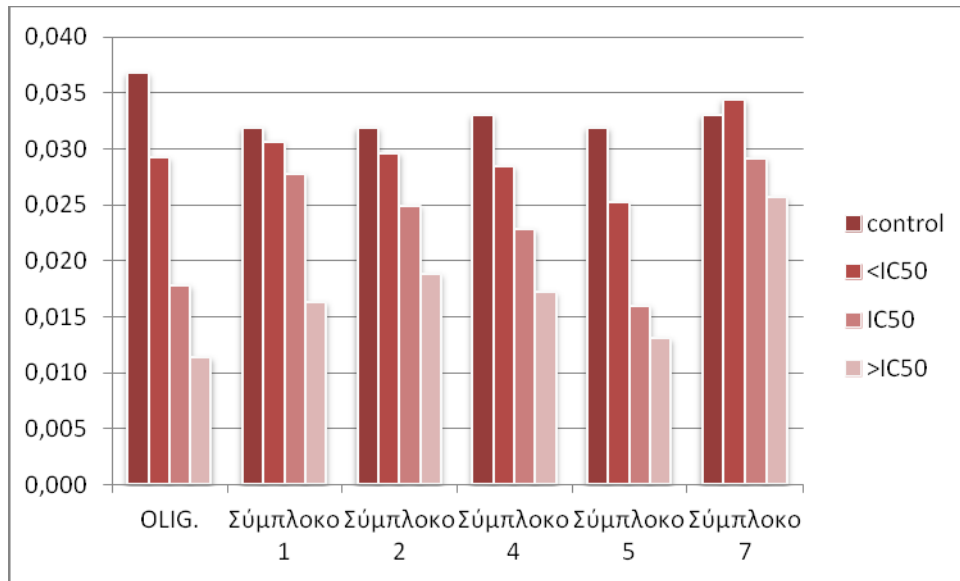
### 5.1.8. Έλεγχος πρόκλησης μιτοχονδριακής βλάβης

Μετά την επώαση για 24 ώρες των κυτταρικών σειρών LMS, HeLa, HepG2, MCF-7 και MRC-5 με τα σύμπλοκα 1,2,4,5,7 και με ολιγομυκίνη σε συγκεντρώσεις μικρότερες, ίσες και μεγαλύτερες από την τιμή  $IC_{50}$  μετρήθηκε η αναστολή των οξειοαναγωγικών αντιδράσεων των μιτοχονδρίων.

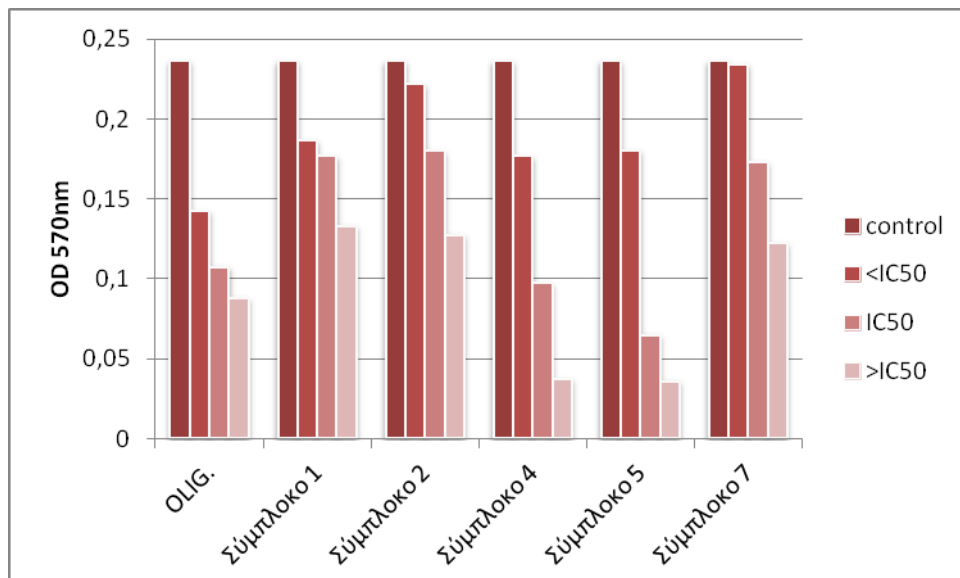


**Διάγραμμα 14:** Αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας μετά από επώαση των κυττάρων LMS με τα σύμπλοκα 1,2,4,5 και 7, καθώς και ολιγομυκίνης.

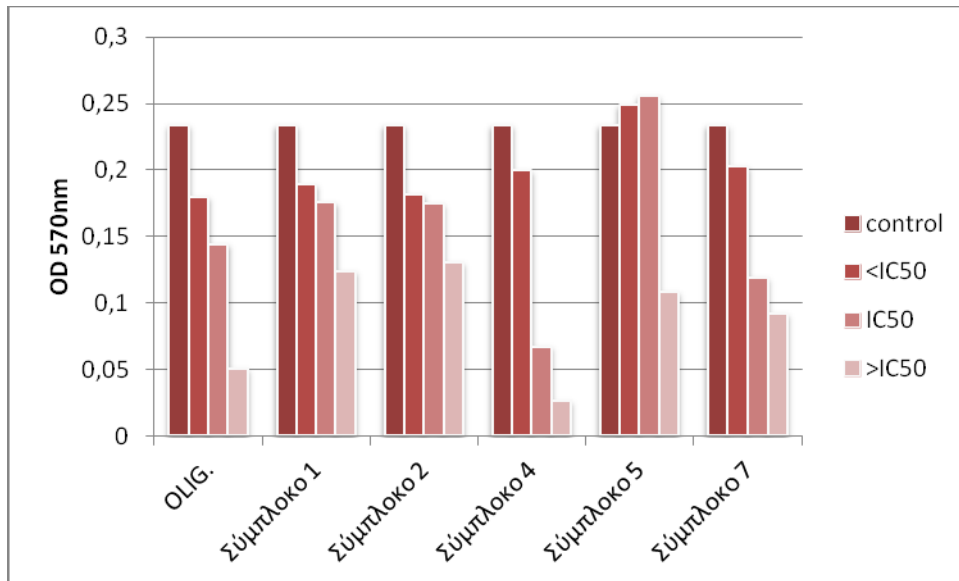




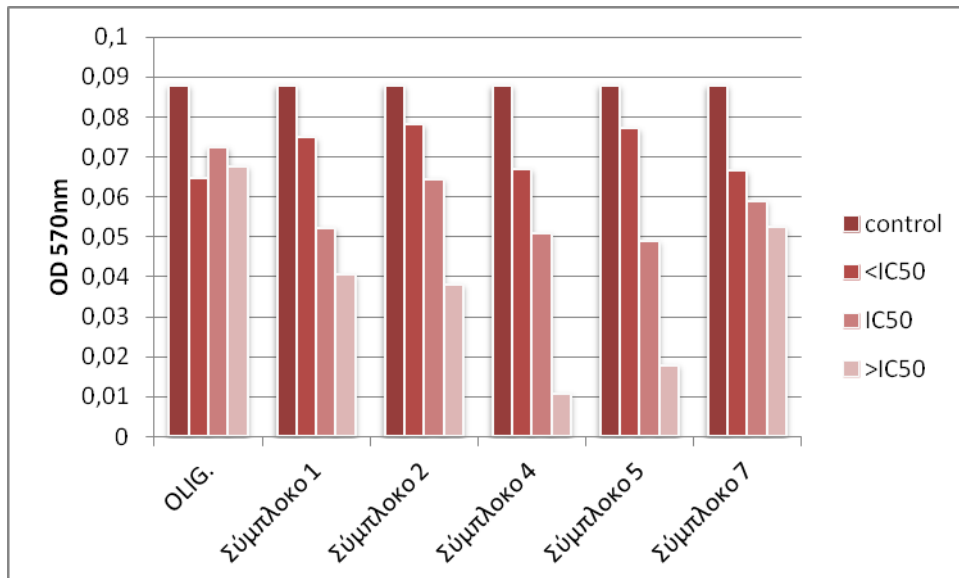
**Διάγραμμα 15:** Αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας μετά από επώαση των κυττάρων MCF-7 με τα σύμπλοκα 1,2,4,5 και 7, καθώς και ολιγομυκίνης.



**Διάγραμμα 16:** Αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας μετά από επώαση των κυττάρων HeLa με τα σύμπλοκα 1,2,4,5 και 7, καθώς και ολιγομυκίνης.



**Διάγραμμα 17:** Αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας μετά από επώαση των κυττάρων HepG2 με τα σύμπλοκα 1,2,4,5 και 7, καθώς και ολιγομυκίνης.

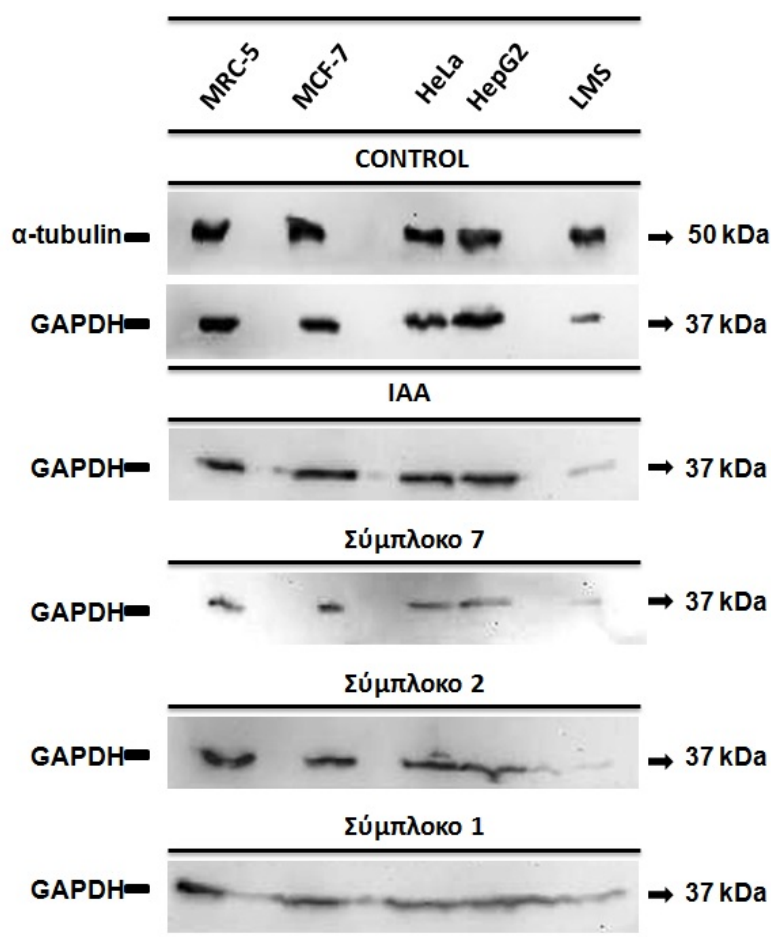


**Διάγραμμα 18:** Αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας μετά από επώαση των κυττάρων MRC-5 με τα σύμπλοκα 1,2,4,5 και 7, καθώς και ολιγομυκίνης.

Τα σύμπλοκα προκαλούν βλάβες στη μιτοχονδριακή λειτουργία όλων των κυτταρικών σειρών. Το σύμπλοκο 7 όμως εμφανίζει την ηπιότερη δράση.

### 5.1.9. Προσδιορισμός υπερέκφρασης-υποέκφρασης ενζύμων της γλυκολυτικής πορείας

Για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης του ενζύμου της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) στις 4 νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές και στην κυτταρική σειρά των φυσιολογικών ινοβλαστών έγινε χρήση της τεχνικής ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western. Με βάση τα αποτελέσματά μας, παρατηρείται υποέκφραση του ενζύμου GAPDH στην κυτταρική σειρά LMS, ενώ υπερέκφραση παρατηρείται στην κυτταρική σειρά HepG2, σε σχέση με την έκφραση του ενζύμου στην φυσιολογική κυτταρική σειρά. Μετά την επώαση των κυττάρων με τις IC<sub>50</sub> τιμές των συμπλόκων 1,2 και 7, παρατηρείται υποέκφραση του ενζύμου σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Το σύμπλοκο 7 έχει την ισχυρότερη δράση, ιδιαιτέρως στην κυτταρική σειρά των LMS (εικόνα 46).



**Εικόνα 46:** Μείωση των επιπέδων έκφρασης του ενζύμου GAPDH στις κυτταρικές σειρές MRC-5, MCF-7, HeLa, HepG2 και LMS, μετά από 24ωρη επώαση με τα σύμπλοκα 1,2 και 7, καθώς και IAA.

## 5.2. *IN VIVO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

### 5.2.1. Οξεία τοξικότητα σε επίμυες Wistar

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

Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 13, στην ομάδα Γ τέσσερις από τους δέκα επίμυες κατέληξαν την 4<sup>η</sup> (δύο επίμυες-ένας αρσενικός και ένας θηλυκός) και 5<sup>η</sup> μέρα (δύο επίμυες-ένας αρσενικός και ένας θηλυκός) του πειράματος, ενώ στις υπόλοιπες ομάδες όλοι οι επίμυες επέζησαν και τις 14 μέρες της πειραματικής διαδικασίας.

ΟΜΑΔΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΘΑΝΑΤΩΝ
A	10 (5 ΘΗΛΥΚΟΙ ΚΑΙ 5 ΑΡΣΕΝΙΚΟΙ ΕΠΙΜΥΕΣ)	1 mg/kg	0
B	10 (5 ΘΗΛΥΚΟΙ ΚΑΙ 5 ΑΡΣΕΝΙΚΟΙ ΕΠΙΜΥΕΣ)	10 mg/kg	0
Γ	10 (5 ΘΗΛΥΚΟΙ ΚΑΙ 5 ΑΡΣΕΝΙΚΟΙ ΕΠΙΜΥΕΣ)	100 mg/kg	4
Δ	10 (5 ΘΗΛΥΚΟΙ ΚΑΙ 5 ΑΡΣΕΝΙΚΟΙ ΕΠΙΜΥΕΣ)	0 mg/kg	0

**Πίνακας 13:** Ομάδες πειραματόζων, συνολικός αριθμός πειραματόζων ανά ομάδα, ποσότητα συμπλόκου 7 και αριθμός θανάτων ανά ομάδα.

Τα ζώα της ομάδας Α και Δ δεν παρουσίασαν καμία μεταβολή όσον αφορά τη συμπεριφορά και την κινητικότητά τους. Η ποσότητα του φαγητού που καταλάωναν ήταν κανονική. Επίσης είχαν φυσιολογική παραγωγή ούρων και κοπράνων.

Οι αιματολογικές και βιοχημικές τους εξετάσεις είχαν ως εξής:

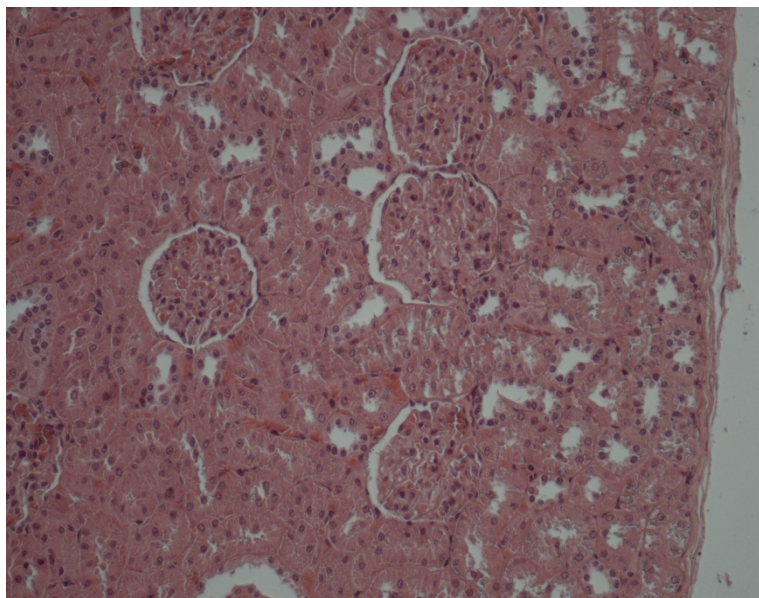
	<b>ΟΜΑΔΑ Α</b>	<b>ΟΜΑΔΑ Δ</b>
<b>Αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων (Μ/μl)</b>	8,46±0,68	7,62±0,21
<b>Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων</b>	5,9±0,49	4,3±0,85
<b>Αιμοσφαιρίνη (g/dl)</b>	14,33±0,92	13,1±0,59
<b>Αιματοκρίτης (%)</b>	42,83±2,71	39,07±1,27
<b>Αιμοπετάλια (μL)</b>	979,33±57,62	868,33±87,96
<b>Μέσος όγκος ερυθρών (fL)</b>	51,63±1,11	51,97±0,52

<b>Σάκχαρο (mg/dl)</b>	<b>44,67±6,13</b>	<b>66,67±1,7</b>
<b>Ουρία (mg/dl)</b>	30,77±1,88	33,4±4,77
<b>Κρεατινίνη (mg/dl)</b>	0,43±0,03	0,5±0,09
<b>Χοληστερίνη (mg/dl)</b>	64±9,2	67±10,2
<b>H.D.L. Χοληστερίνη (mg%)</b>	48,07±11,19	55,4±3,81
<b>L.D.L. Χοληστερίνη (mg/dl)</b>	4,47±3,17	4,17±0,34
<b>Τρανσαμινάση (S-GOT) (U/l)</b>	78,86±1,87	84,5±17,12
<b>Τρανσαμινάση (S-GPT) (U/l)</b>	49,4±12,66	49,2±17,5
<b>Σίδηρος (μg/dl)</b>	<b>215,33±40,87</b>	<b>199,67±25,17</b>

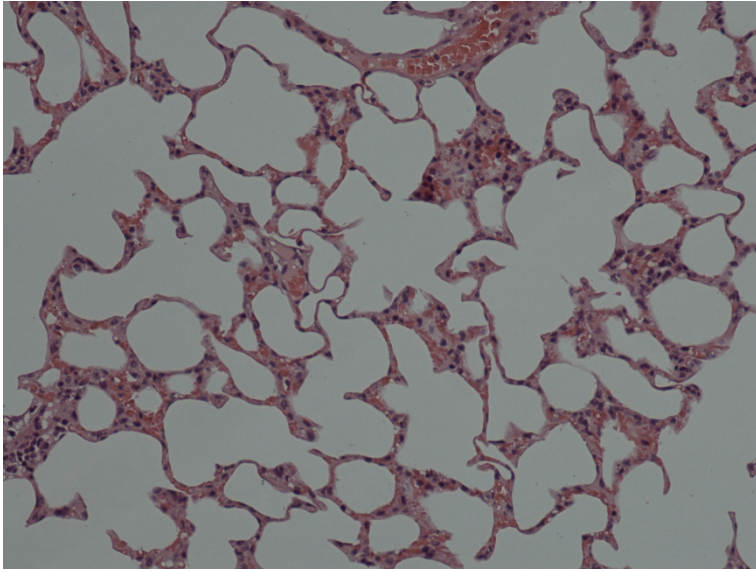
**Πίνακας 14:** Αιματολογικές και Βιοχημικές εξετάσεις επίμυων Α και Δ ομάδας, την 15<sup>η</sup> ημέρα της πειραματικής διαδικασίας.

Με βάση τα αποτελέσματα των εξετάσεων, παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του σακχάρου στους επίμυες της ομάδας Α και αρκετή διακύμανση των επιπέδων σιδήρου στο αίμα τους, σε σχέση με τους επίμυες της ομάδας αναφοράς. Επίσης, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων παρουσιάζει μικρή αύξηση. Οι τιμές των υπόλοιπων εξετάσεων δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά.

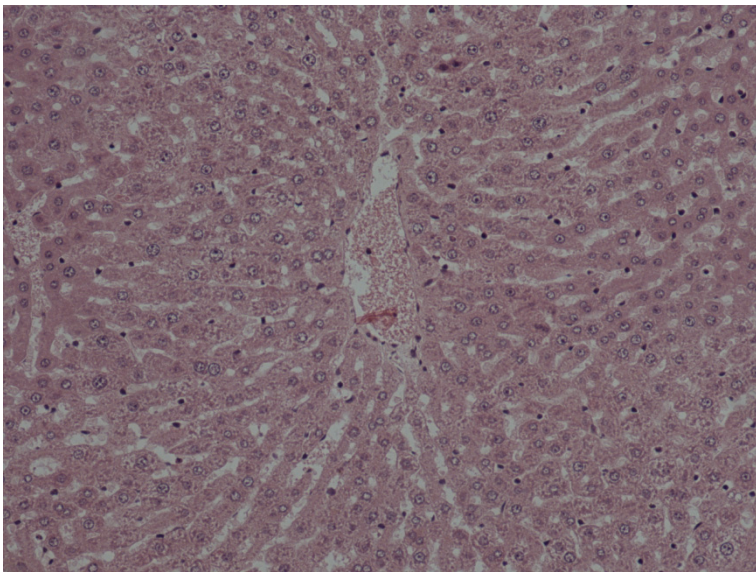
Επίσης, κατά την παθολογοανατομική μελέτη που ακολούθησε δεν ανευρέθηκαν παθολογικά ευρήματα (εικόνες 47, 48, 49).



**Εικόνα 47:** νεφρός κ.φ. (x200), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



**Εικόνα 48:** πνεύμονας κ.φ. (x200), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



**Εικόνα 49:** ήπαρ κ.φ. (x200), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης



Τα ζώα της ομάδας Β παρουσίασαν έντονη μείωση της κινητικότητάς τους, η οποία μερικώς επανήλθε τρεις ώρες μετά την έγχυση του συμπλόκου. Η ποσότητα του φαγητού και νερού που καταλάωναν ήταν μειωμένη σε κάποια από τα ζώα τις δύο πρώτες μέρες και αντίστοιχα η παραγωγή ούρων και κοπράνων. Τις επόμενες μέρες όλα τα ζώα είχαν επανέλθει στα φυσιολογικά επίπεδα.

Οι αιματολογικές και βιοχημικές τους εξετάσεις είχαν ως εξής:

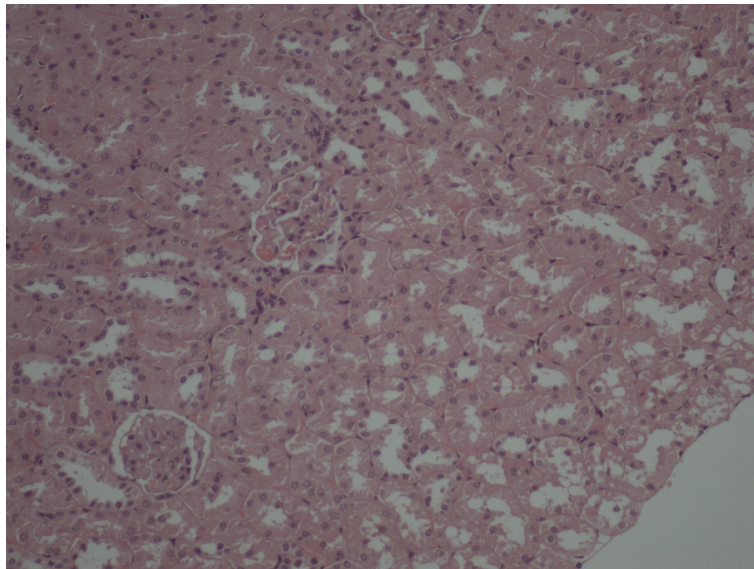
	<b>ΟΜΑΔΑ Β</b>
<b>Αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων (Μ/μl)</b>	7,99±0,44
<b>Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων</b>	5,6±0,78
<b>Αιμοσφαιρίνη (g/dl)</b>	13,5±0,49
<b>Αιματοκρίτης (%)</b>	40,53±1,47
<b>Αιμοπετάλια (μL)</b>	784±60,02
<b>Μέσος όγκος ερυθρών (fL)</b>	51,43±1,55

<b>Σάκχαρο</b> <b>(mg/dl)</b>	<b>52±2,16</b>
<b>Ουρία</b> <b>(mg/dl)</b>	31,73±1,75
<b>Κρεατινίνη</b> <b>(mg/dl)</b>	0,44±0,04
<b>Χοληστερίνη</b> <b>(mg/dl)</b>	<b>42,67±4,71</b>
<b>H.D.L.</b> <b>Χοληστερίνη</b> <b>(mg%)</b>	<b>35,4±4,54</b>
<b>L.D.L.</b> <b>Χοληστερίνη</b> <b>(mg/dl)</b>	<b>2,5±1,28</b>
<b>Τρανσαμινάση</b> <b>(S-GOT)</b> <b>(U/l)</b>	74,8±3,81
<b>Τρανσαμινάση</b> <b>(S-GPT)</b> <b>(U/l)</b>	39,17±5,2
<b>Σίδηρος</b> <b>(μg/dl)</b>	<b>144±25,35</b>

**Πίνακας 15:** Αιματολογικές και Βιοχημικές εξετάσεις επίμυων της Β ομάδας, την 15<sup>η</sup> ημέρα της πειραματικής διαδικασίας.

Με βάση τα αποτελέσματα των εξετάσεων, παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του σακχάρου και μικρή αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων στους επίμυες της ομάδας Β, στα επίπεδα της ομάδας Α, και διακύμανση των επιπέδων σιδήρου στο αίμα τους. Παρατηρείται επίσης σχετική μείωση της ολικής, της Η.Δ.Λ. και της Λ.Δ.Λ. χοληστερίνης σε σχέση με τους επίμυες της ομάδας αναφοράς. Οι τιμές των υπόλοιπων εξετάσεων δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά.

Επίσης, κατά την παθολογοανατομική μελέτη που ακολούθησε δεν ανευρέθηκαν παθολογικά ευρήματα στο ήπαρ, αλλά προκλήθηκε ήπιο οίδημα στα ουροφόρα σωληνάκια (εικόνα 50).



**Εικόνα 50:** Νεφρός. Ήπιο οίδημα ουροφόρων σωληναρίων (x200), χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης.

Τέσσερα εκ των ζώων της ομάδας Γ κατέληξαν την 4<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Όλα τα ζώα της ομάδας παρουσίασαν έντονη μείωση της κινητικότητάς τους, η οποία μερικώς επανήλθε πέντε ώρες μετά την έγχυση του συμπλόκου. Η ποσότητα του φαγητού και νερού που καταλάωναν ήταν μειωμένη τις πρώτες 5-7 ημέρες του πειράματος και αντίστοιχα η παραγωγή ούρων και κοπράνων. Δύο εκ των ζώων δεν απέβαλλαν καθόλου ούρα το πρώτο 24ωρο, ενώ

τις επόμενες δύο ημέρες, μέχρι να καταλήξουν, η αποβολή ούρων ήταν μειωμένη. Στα άλλα δύο ζώα που κατέληξαν παρατηρήθηκε ολιγουρία (73%) και κατέληξαν την 5<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος. Τα ζώα που επέζησαν και τις 14 ημέρες της πειραματικής διαδικασίας επανήλθαν μετά την 5<sup>η</sup> ημέρα σχεδόν στα φυσιολογικά επίπεδα. Η κινητικότητα τους όμως παρέμεινε μειωμένη και τις 14 ημέρες.

Οι αιματολογικές και βιοχημικές τους εξετάσεις είχαν ως εξής:

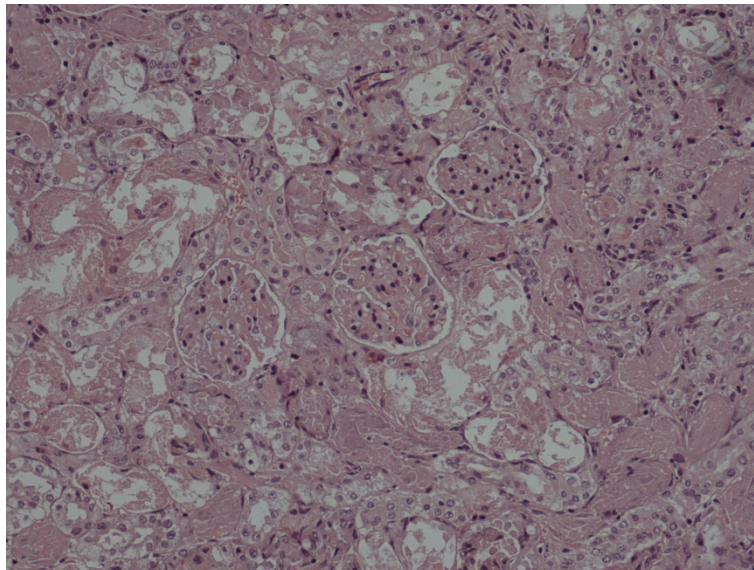
	<b>ΟΜΑΔΑ Β</b>
<b>Αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων (Μ/μl)</b>	6,69±0,88
<b>Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων</b>	<b>3,83±2,17</b>
<b>Αιμοσφαιρίνη (g/dl)</b>	11,23±1,26
<b>Αιματοκρίτης (%)</b>	34±3,74
<b>Αιμοπετάλια (μL)</b>	838,67±52,13
<b>Μέσος όγκος ερυθρών (fL)</b>	54,47±3,66

<b>Σάκχαρο (mg/dl)</b>	<b>56±2,16</b>
<b>Ουρία (mg/dl)</b>	35,97±5,21
<b>Κρεατινίνη (mg/dl)</b>	0,52±0,006
<b>Χοληστερίνη (mg/dl)</b>	<b>48±9,63</b>
<b>H.D.L. Χοληστερίνη (mg%)</b>	<b>41,07±7,62</b>
<b>L.D.L. Χοληστερίνη (mg/dl)</b>	<b>3,87±1,09</b>
<b>Τρανσαμινάση (S-GOT) (U/l)</b>	73,3±21,33
<b>Τρανσαμινάση (S-GPT) (U/l)</b>	37,2±15,56
<b>Σίδηρος (μg/dl)</b>	<b>153,67±23,8</b>

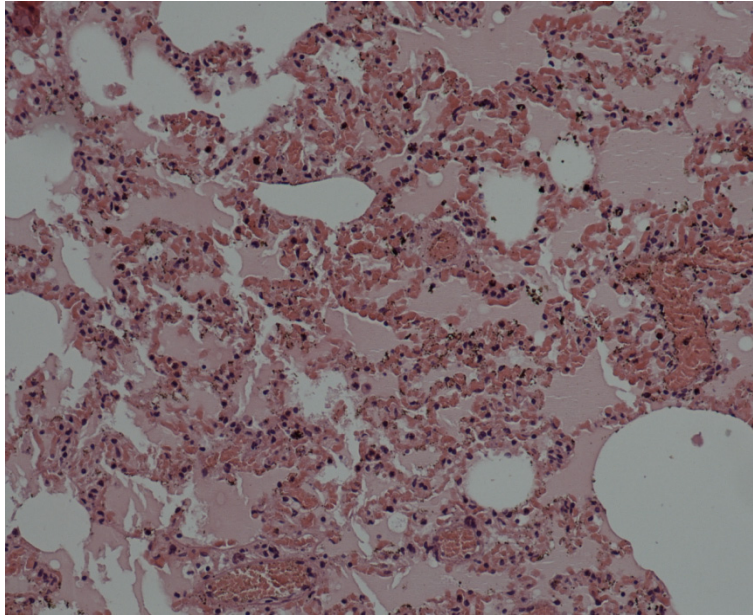
**Πίνακας 16:** Αιματολογικές και Βιοχημικές εξετάσεις επίμυων της Γ ομάδας, την 15<sup>η</sup> ημέρα της πειραματικής διαδικασίας.

Με βάση τα αποτελέσματα των εξετάσεων, παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του σακχάρου στους επίμυες της ομάδας Γ, όμοια όμως με αυτή των ομάδων Α και Β, και μείωση των επιπέδων σιδήρου στο αίμα τους, σε σχέση με τους επίμυες της ομάδας αναφοράς. Όσον αφορά τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων, με βάση των Μ.Ο, φαίνεται ίδιος με αυτόν των ζώων της ομάδας αναφοράς. Πρέπει όμως να αναφερθεί πως δύο θηλυκοί επίμυες είχαν αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων κατά πολύ μειωμένο, και συγκεκριμένα ο αριθμός ήταν 2,3 και για τα δύο ζώα. Οι τιμές των υπόλοιπων εξετάσεων δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά.

Επίσης, κατά την παθολογοανατομική μελέτη που ακολούθησε, στους επίμυες που κατέληξαν ανευρέθηκε σωληναριακή νέκρωση που εν συνεχεία προκάλεσε πνευμονικό οίδημα (εικόνες 51,52), ενώ στο ήπαρ δεν ανιχνεύθηκαν βλάβες.



**Εικόνα 51:** Νεφρός (x200), σωληναριακή νέκρωση, χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης.



**Εικόνα 52:** Πνεύμονας (x200), πνευμονικό οίδημα, χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης.

Στα ζώα της ομάδας Γ που δεν κατέληξαν ανευρέθηκε ήπιο ενδοκυττάριο οίδημα ουροφόρων σωληναρίων.





# ΣΥΖΗΤΗΣΗ



«Σα βγεις στον πηγαιμό για την Ιθάκη, να εύχεται να 'ναι μακρύς ο δρόμος, γεμάτος περιπέτειες, γεμάτος γνώσεις» (Κ.Π. Καβάφης).

Η κλινική χρήση φαρμάκων βασιζόμενων στην πλατίνα για τη θεραπεία διαφόρων τύπων νεοπλασιών αποτελεί επίτευγμα στη χημειοθεραπεία με σύμπλοκα μετάλλων. Οι προσπάθειες για την σύνθεση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων με διαφορετικά μέταλλα και υποκαταστάτες έχουν ενισχυθεί από τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα προκλινικών και κλινικών ερευνών. Τα τελευταία χρόνια, σύμπλοκα με ρουθένιο έχουν ερευνηθεί ως πιθανά αντικαρκινικά και αντιμεταστατικά φάρμακα και είναι αυτή τη στιγμή στο στάδιο των κλινικών δοκιμών (Schmitt et al., 2012).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν δέκα σύμπλοκα μετάλλων, έξι με βανάδιο και υποκαταστάτες την πυριδίνη, το νικοτιναμίδιο, την πιπεραζίνη, την καδαβερίνη και το αζίδιο του νατρίου, και τέσσερα με ψευδάργυρο και υποκαταστάτες πυριδυλο οξίμες και διοξίμες.

Τα *in vitro* πειράματα απέδειξαν πως και τα δέκα σύμπλοκα μετάλλων έχουν δοσοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση έναντι των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων επίμυος Wistar (LMS), των κυττάρων αδενοκαρκινώματος μαστού ανθρώπου (MCF-7) και αδενοκαρκινώματος τραχήλου μήτρας ανθρώπου (HeLa) και τέλος των κυττάρων ηπατοκυτταρικού καρκίνου ανθρώπου (HepG2). Η σειρά κυτταροτοξικότητας έχει ως εξής: σύμπλοκο 5> σύμπλοκο 4> σύμπλοκο 2> σύμπλοκο 9> σύμπλοκο 1> σύμπλοκο 3> σύμπλοκο 6> σύμπλοκο 7> σύμπλοκο 8> σύμπλοκο 10. Η κυτταροτοξικότητα του συμπλόκου 5 οφείλεται στην παρουσία του υποκαταστάτη του (αζίδιο του νατρίου), ο οποίος έχει την ίδια περίπου  $IC_{50}$  τιμή με αυτό. Οι υπόλοιποι υποκαταστάτες εμφανίζουν αρκετά υψηλότερες  $IC_{50}$  τιμές από τις αντίστοιχες σύμπλοκες ενώσεις τους. Βέβαια, η κυτταροτοξική δράση των συμπλόκων είναι ανάλογη με αυτή των υποκαταστατών τους. Στα κύτταρα LMS παρουσιάστηκε το μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μετά από την επώαση με τα όλα τα σύμπλοκα, ενώ τα κύτταρα HeLa και HepG2 επέδειξαν την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη δράση τους. Αξίζει να

σημειωθεί πως η κυτταρική σειρά των φυσιολογικών ινοβλαστών επηρεάστηκε λιγότερο όσον αφορά την ικανότητα πολλαπλασιασμού παρουσία των συμπλόκων, σε σχέση με τις νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές. Μάλιστα, η  $IC_{50}$  τιμή των συμπλόκων **7** και **8** στα κύτταρα MRC-5, είναι σχεδόν διπλάσια σε σχέση με αυτή των κυττάρων LMS.

Τα κύτταρα LMS και MCF-7 έχασαν την ικανότητά τους για ανάπτυξη μεγάλων, αυτοσυντηρούμενων αποικιών μετά από επώαση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των συμπλόκων **1-10**. Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού λοιπόν, που προκαλούν τα εν λόγω σύμπλοκα είναι μη αναστρέψιμη.

Ο θάνατος που επάγεται μετά από επώαση των LMS κυττάρων με τα σύμπλοκα βαναδίου και ψευδαργύρου είναι ξεκάθαρα ο αποπτωτικός. Τα ποσοστά της νέκρωσης είναι πολύ μικρά, για όλα τα σύμπλοκα. Αξίζει να σημειωθεί πως τα σύμπλοκα μετάλλων, συμπεριλαμβανομένων αυτών με ψευδάργυρο, αναστέλλουν την τοποϊσομεράση 1, η οποία υπερεκφάζεται σε αρκετές νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές (Von et al., 2012; Chashoo et al., 2011). Είναι λοιπόν πιθανό τα σύμπλοκα 1-10 να προκαλούν τον αποπτωτικό θάνατο, μέσω του ίδιου μονοπατιού.

Άλλωστε, τα σύμπλοκα βαναδίου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης (Huang et al., 1998; Jaspers et al., 2000; Samet et al., 1998), και έχει επίσης διαπιστωθεί ο σημαντικός ρόλος του ψευδαργύρου στη διαδικασία της απόπτωσης (Federico et al., 2001; Prasad et al., 1998; Chakravarty et al., 1986), ο οποίος όμως δεν έχει αποσαφηνιστεί και φαίνεται να είναι ιδιαίτερα πολύπλοκος. Για παράδειγμα, στα επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη και των ωθηκών, ο ψευδάργυρος έχει προ-αποπτωτική δράση, ενώ σε κερατινοκύτταρα, στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού, των νεοπλασματικών κυττάρων τραχήλου μήτρας, του εντέρου και του πνεύμονα, όπως επίσης και στα μακροφάγα, ο ψευδάργυρος έχει αντι-αποπτωτική δράση (Kontargiris et al., 2012; Chakravarty et al., 1986; Franklin and Costello, 2007).

Τα σύμπλοκα **1-10**, καθώς και οι υποκαταστάτες τους μελετήθηκαν επίσης ως προς την αντιβακτηριακή τους δράση έναντι των στελεχών *E. coli*, *Z. mobilis*, *C.*

*glutamicum* και *S. thermophilus*. Η αντιβακτηριακή δράση σχετίζεται σε αρκετές περιπτώσεις με την αντικαρκινική δράση (Katsoulakou et al., 2008). Άλλωστε, η *cis*-πλατίνη, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2 του εισαγωγικού μέρους της διατριβής αυτής, ανακαλύφθηκε αρχικά ως ένας αναστολέας της βακτηριακής ανάπτυξης (Rosenberg et al., 1965, 1969).. Τα σύμπλοκα του βαναδίου και οι υποκαταστάτες τους δεν ανέστειλαν τη βακτηριακή ανάπτυξη. Το στέλεχος *C. glutamicum* παρουσίασε μικρή μείωση στην ανάπτυξή του παρουσία των συμπλόκων ψευδαργύρου **7** και **8**, στη συγκέντρωση των 200 μΜ. Όσον αφορά το σύμπλοκο **9** και τον υποκαταστάτη του, η παρουσία τους στο καλλιεργητικό μέσο προκάλεσε ισχυρή αναστολή της ανάπτυξης του βακτηρίου *Z. mobilis* (MIC 25 μΜ), ενώ στην περίπτωση των βακτηρίων *E. coli* και *C. glutamicum*, προκάλεσε μόνο μια μικρή καθυστέρηση στην ανάπτυξή τους.

Τα σύμπλοκα βαναδίου και ψευδαργύρου παρουσιάζουν ινσουλινομιμητική δράση, και για τον λόγο αυτό επιλέχθηκαν για την μελέτη της δράσης τους στην γλυκολυτική οδό και εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή. Αρχικά λοιπόν, και για να συγκριθούν οι διαφορετικές νεοπλασματικές σειρές μεταξύ τους ως προς τον μεταβολισμό τους, μετρήθηκε η γλυκόζη που υπήρχε διαθέσιμη στο καλλιεργητικό μέσο απουσία κυττάρων και εν συνεχεία παρουσία των κυττάρων. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι τα κύτταρα HepG2 καταναλώνουν την μεγαλύτερη ποσότητα γλυκόζης, ενώ ακολουθούν τα κύτταρα LMS και εν συνεχεία τα κύτταρα MCF-7. Οι κυτταρικές σειρές των φυσιολογικών ινοβλαστών και των HeLa, δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά, συγκρινόμενες μεταξύ τους, στην κατανάλωση γλυκόζης.

Μετά από επώαση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των συμπλόκων **1-5**, **7** και **8** παρατηρήθηκε μείωση της κατανάλωσης γλυκόζης, η οποία έφτασε και σε μηδενικά επίπεδα. Τα κύτταρα LMS ήταν και πάλι αυτά που παρουσίασαν την μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσία των συμπλόκων, ενώ το σύμπλοκο **7** του ψευδαργύρου είχε την πιο ισχυρή δράση.

Τα κύτταρα HepG2 παράγουν το περισσότερο ATP σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές, απουσία των συμπλόκων. Ακολουθούν τα κύτταρα HeLa που παράγουν περίπου την ίδια ποσότητα ATP με τα κύτταρα MRC-5, ενώ τα κύτταρα LMS και MCF-7 παράγουν τις λιγότερες ποσότητες ATP από όλες τις κυτταρικές σειρές.

Μετά την προσθήκη των συμπλόκων **1, 2, 7, 8**, καθώς και της 2-δεοξυγλυκόζης στις τιμές  $IC_{50}$  και  $IC_{30}$ , η παραγωγή ATP μειώθηκε με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, συγκρινόμενη με την αντίστοιχη των κυττάρων που δεν επώαστηκαν με καμία ουσία. Ο ψευδάργυρος έχει βρεθεί πως μπορεί να προκαλέσει μείωση των επιπέδων ATP στα κύτταρα μέσω αρνητικών αλληλεπιδράσεων με τα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού οξέος, αλλά και της αναπνευστικής αλυσίδας. (Dineley et al. 2003). Η μείωση αυτή όμως των επιπέδων ATP στα κύτταρα HepG2 και LMS, τα οποία με βάση την υψηλή κατανάλωση γλυκόζης, έχουν αυξημένο γλυκολυτικό ρυθμό, μπορεί να οφείλεται και στην αναστολή κάποιων ενζύμων της γλυκολυτικής οδού από τα σύμπλοκα που μελετήθηκαν.

Η παραγωγή γαλακτικού οξέος από τις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές επιβεβαίωσε τα ως τώρα παρουσιασθέντα δεδομένα. Τα κύτταρα LMS παράγουν το περισσότερο γαλακτικό οξύ, σε ποσότητες κατά πολύ μεγαλύτερες σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές. Ακολουθούν τα κύτταρα HepG2 που παράγουν και αυτά αρκετό γαλακτικό οξύ, σε ποσότητες όμως μικρότερες από τα κύτταρα LMS. Τα κύτταρα MCF-7 παράγουν, με μικρή διαφορά, περισσότερο γαλακτικό οξύ σε σύγκριση με τα κύτταρα MRC-5, ενώ η κυτταρική σειρά HeLa παράγει την λιγότερη ποσότητα γαλακτικού οξέος σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές.

Μετά την προσθήκη των συμπλόκων **1, 2, 5, 7** στην τιμή  $IC_{50}$  τους, η παραγωγή γαλακτικού οξέος μειώθηκε με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, συγκρινόμενη με την αντίστοιχη των κυττάρων που δεν επώαστηκαν με καμία ουσία. Το σύμπλοκο **7** προκάλεσε την μεγαλύτερη αναστολή στην παραγωγή γαλακτικού οξέος σε όλες τις κυτταρικές σειρές, εκτός των κυττάρων HeLa, τα οποία εξαρτώνται λιγότερο από την γλυκολυτική πορεία για την παραγωγή ATP με βάση τα αποτελέσματα μας. Η

αναστολή αυτή στην παραγωγή του γαλακτικού οξέος είναι πιο ισχυρή στην κυτταρική σειρά του λειομυοσαρκώματος, που αποδείξαμε πως στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στην γλυκολυτική πορεία για την σύνθεση ATP.

Τα αποτελέσματα από την μελέτη των πραγματοποιούμενων οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων των μιτοχονδρίων έδειξαν πως τα σύμπλοκα προκαλούν βλάβες στην αναπνευστική λειτουργία, μικρότερης κλίμακας όμως από την αναστολή στην παραγωγή γαλακτικού οξέος. Το σύμπλοκο **7** προκάλεσε την μικρότερη αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας, σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα, σε όλες τις κυτταρικές σειρές, που σημαίνει πως έχει μια πιο εξειδικευμένη δράση στην γλυκολυτική πορεία.

Για να εξακριβωθούν τα αποτελέσματα σε ό,τι αφορά τη μεταβολική δραστηριότητα των νεοπλασματικών σειρών με ή χωρίς την προσθήκη των συμπλόκων, μελετήθηκε αν υπερεκφράζουν το ένζυμο της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH), ενζύμου που καταλύει ένα κρίσιμο στάδιο της γλυκόλυσης, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και σε άλλους κυτταρικούς μηχανισμούς, και έχει προταθεί ως πιθανός στόχος για την αντικαρκινική θεραπεία.

Η κυτταρική σειρά HepG2 παρουσιάζει υπερέκφραση του ενζύμου της GAPDH, σε σύγκριση με τα κύτταρα των φυσιολογικών ινοβλαστών. Μικρή μείωση της έκφρασης παρατηρείται στην κυτταρική σειρά HeLa. Υποέκφραση παρατηρείται στην κυτταρική σειρά LMS, ενώ τα κύτταρα MCF-7 εκφράζουν την GAPDH, όπως οι φυσιολογικοί ινοβλάστες.

Μετά την προσθήκη των συμπλόκων **1,2** και **7** παρατηρήθηκε έντονη υποέκφραση του ενζύμου, μεγαλύτερη και από αυτή που προκαλεί ο μελετημένος αναστολέας ιωδιοξεικό οξύ (IAA). Μάλιστα, το σύμπλοκο **7** προκαλεί την μεγαλύτερη υποέκφραση του ενζύμου, και στην κυτταρική σειρά LMS δεν εκφράζεται καθόλου.

Υψηλές συγκεντρώσεις ψευδαργύρου (0.15 έως 0.20 mmol/L) έχει βρεθεί πως προκαλούν μείωση της ενεργότητας της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης και έως 55% αναστολή της δράσης της, χωρίς παράλληλη αναστολή της δράσης των μιτοχονδριακών ενζύμων. Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε μείωση της δράσης και

άλλων ενζύμων της γλυκολυτικής οδού, όπως της εξοκινάσης (Ronowska et al., 2007). Η δράση αυτή έχει κοινά σημεία με τη δράση του συμπλόκου 7.

Στη μελέτη οξείας τοξικότητας του συμπλόκου αυτού παρατηρήθηκε πως η ποσότητα στην οποία προκαλείται θάνατος στο 50% των πειραματοζώων ( $LD_{50}$ ) είναι μεγαλύτερη της 100 mg/kg, και συνεπώς δεν είναι πολύ τοξικό. Τέσσερα από τα ζώα της ομάδας Γ που έλαβε αυτή την δόση κατέληξαν την 4<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος. Ο παθολογοανατομικός έλεγχος έδειξε πως τα ζώα που κατέληξαν παρουσίασαν σωληναριακή νέκρωση που οδήγησε σε πνευμονικό οίδημα, ενώ το ήπαρ και η καρδιά δεν παρουσίασαν καμία βλάβη. Τα ζώα της ομάδας Γ, που δεν κατέληξαν, και δύο ζώα της ομάδας Β, παρουσίασαν ήπιο ενδοκυττάριο οίδημα των ουροφόρων σωληναρίων. Κανένα από τα υπόλοιπα ζώα δεν παρουσίασε βλάβη στα υπό εξέταση όργανα, με βάση τον παθολογοανατομικό έλεγχο.

Με βάση τα αποτελέσματα των αιματολογικών και βιοχημικών εξετάσεων στα ζώα που επέζησαν και τις 14 ημέρες της πειραματικής διαδικασίας, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στις ομάδες Α και Β, και μείωση στην ομάδα Γ. Παρατηρήθηκε επίσης μείωση των επιπέδων σιδήρου στο αίμα τους, σε σχέση με τους επίμυες της ομάδας αναφοράς, κάτι αναμενόμενο λόγω της πρόκλησης διαταραχών στην απορρόφηση του χαλκού (Vogelmeier et al. 1987). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του αιματοκρίτη σε καμία ομάδα, όμως ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων στην ομάδα που έλαβε την μεγαλύτερη δόση βρέθηκε κατά πολύ μειωμένος στους δύο από τους τρεις θηλυκούς επίμυες που επέζησαν. Οι τιμές των υπόλοιπων εξετάσεων δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά.

Με βάση την εκλεκτική ως προς τα νεοπλασματικά κύτταρα κυτταροτοξική δράση του συμπλόκου αυτού, την αναστολή που προκαλεί στην γλυκολυτική πορεία, και την μειωμένη τοξικότητα του στους επίμυες, προτείνεται η περαιτέρω φαρμακοκινητική μελέτη και ο έλεγχος της πιθανής αντικαρκινικής του δράσης.

Το παράδοξο, με μία πρώτη ανάγνωση των αποτελεσμάτων, είναι πως η ισχυρότερη δράση των συμπλόκων στην αναστολή της GAPDH ασκείται στην κυτταρική σειρά



LMS, η οποία με βάση τα αποτελέσματα από την μεταβολική ανάλυση (κατανάλωση γλυκόζης, παραγωγή ATP και γαλακτικού οξέος, μιτοχονδριακές βλάβες) χρησιμοποιεί κυρίως την γλυκολυτική πορεία για την παραγωγή του ATP, αλλά με βάση τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western υποεκφράζει το ένζυμο και απουσία των συμπλόκων.

Η κυτταρική αυτή σειρά λοιπόν παρουσιάζει μια ιδιαιτερότητα στον ενεργό μεταβολισμό της. Αυτό που θα μπορούσε να προταθεί σε ένα πρώτο επίπεδο είναι πως ναι μεν το ένζυμο της GAPDH υποεκφράζεται, αλλά η ενεργότητα του ενζύμου ίσως είναι υψηλότερη.

Μία άλλη πιθανή εξήγηση της υποέκφρασης της GAPDH, σε συνδυασμό με την αυξημένη παραγωγή γαλακτικού οξέος ίσως μπορεί να δοθεί μέσω του παρακυκλώματος των Rapoport – Luebering.

Το παρακύκλωμα των Rapoport – Luebering έχει μελετηθεί κατά κύριο λόγο στα ερυθροκύτταρα και αφορά την γενικότερη λειτουργία της απελευθέρωσης οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη μέσω των διακυμάνσεων του 2,3-DPG οι οποίες παρακολουθούν την μεταβολή της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου στο αίμα. Όταν οι συγκεντρώσεις του οξυγόνου ελαττώνονται η παραγωγή του 2,3-DPG αυξάνεται και αντιστρόφως ούτως ώστε να υπάρξει μια σχετική σταθεροποίηση της μέσης συγκέντρωσης του οξυγόνου στα υγρά του αίματος και κατ' επέκταση στους ιστούς. Δεν υπάρχουν μελέτες για τον ρόλο του 2,3-DPG σε άλλους τύπους κυττάρων, ούτε πληροφορίες που να θέτουν κάποια ιδιαίτερη λειτουργικότητα στην παθοφυσιολογία του καρκίνου, αλλά μερικές μελέτες δείχνουν ότι η συγκέντρωσή του στο ολικό αίμα παιδιών που πάσχουν από λευχαιμία είναι σχεδόν διπλάσια από εκείνη που συναντούμε στα φυσιολογικά παιδιά (Haidas et al., 1976). Οι αυξημένες τιμές των συγκεντρώσεων του 2,3-DPG δεν ερμηνεύτηκαν ως κάποια προσαρμογή του οργανισμού σχετιζόμενη με την κακοήθη νόσο. Επίσης παρά την σχετική αναζωπύρωση του ερευνητικού ενδιαφέροντος για την σημασία της γλυκόλυσης στον ενδιάμεσο μεταβολισμό των κακοήθων κυττάρων, εν τούτοις δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για την κατάσταση του παρακυκλώματος Rapoport –

Luebering στα νεοπλασματικά κύτταρα εν γένει. Η μελέτη της δράσης του 2,3-DPG και άλλων υψηλά φωσφορυλιωμένων ενώσεων στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων είναι και αυτή πολύ περιορισμένη, αλλά σχετικά πρόσφατα προέκυψαν ενδείξεις ότι ο εν λόγω μεταβολίτης αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση μειώνοντας την παραγωγή της θρομβοξάνης A<sub>2</sub> και συνεπώς δρα στο επίπεδο της αραχιδονικής οδού, με πιθανό στόχο το ένζυμο της αιμοπεταλιακής κυκλοξυγονάσης (Evangelou et al., 1990; Karkabounas et al., 1992; Daskalou et al., 2005). Σε μια σχετική διδακτορική διατριβή που εκπονήθηκε τα τέλη της δεκαετίας του 1980 στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων αναλύεται η σχέση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης με τον γλυκολυτικό αναερόβιο μεταβολισμό και επισημαίνεται ότι οι φυσιολογικοί αναστολείς του αναστέλλουν επίσης και την αιμοπεταλιακή συσσώρευση (Καρκαμπούνας, 1990). Επίσης υπογραμμίζεται ότι το 2,3-DPG αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλεί ο PAF (Platelet Activating Factor) ενδεχομένως διότι εμφανίζει κοινά δομικά στοιχεία με τον PAF (Καρκαμπούνας, 1990). Ωστόσο φαίνεται ότι το 2,3-διφωσφογλυκερικό οξύ αποτελεί έναν αναστολέα αυτής καθαυτής της γλυκολυτικής οδού, καθόσον η χορήγησή του στα αιμοπετάλια αναστέλλει πλήρως τον μεταβολισμό της γλυκόζης, ενώ η χορήγηση κυανιούχου νατρίου ή 2,4-δινιτροφαινόλης που αναστέλλουν την μιτοχονδριακή παραγωγή ATP δεν επηρεάζουν άμεσα την αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε αντίθεση με το ιωδιοξεικό οξύ το οποίο προκαλεί αναστροφή και παύση της συσσώρευσης (Καρκαμπούνας, 1990). Μια σχετικά πρόσφατη μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2007 και αναφέρεται στην ενεργειακή σημασία του παρακυκλώματος Rapoport-Luebering υποδεικνύει ότι η εν λόγω διακλάδωση της γλυκολυτικής οδού διατηρείται σε πολύ μεγάλη κλίμακα στην φυλογένεση ξεκινώντας από στοιχειώδεις οργανισμούς όπως τα μονοκύτταρα ευκαρυωτικά του τύπου *Dictyostelium discoideum* (οργανισμός αμοιβαδοειδής) αλλά και σε υψηλώς εξελιγμένα μετάζωα όπως π.χ τα πτηνά και τα θηλαστικά (Jaiesoon et al., 2008). Στην μελέτη αυτή οι συγγραφείς αποδεικνύουν ότι εκτός από την τυπική 2,3-DPG φωσφατάση που οδηγεί στην αποφωσφορυλίωση του 2,3-DPG υπάρχει και ένα άλλο ένζυμο (Multiple Inositol polyphosphate

phosphatase ή MIP1) το οποίο λειτουργεί αποφωσφορυλιωτικά τροφοδοτώντας τον μεταβολισμό των ινοσιτιδίων και ενεργοποιώντας τον καταρράκτη της AMP – activated protein kinase (AMPK). Δεδομένου ότι ο καταρράκτης της AMPK καθώς και ο μεταβολισμός των ινοσιτιδίων είναι κεφαλαιώδους σημασίας για την ενεργειακή παραγωγή των κυττάρων αντιλαμβανόμαστε ότι το παρακύκλωμα Raroport – Luebering είναι πιθανόν μεγάλης αξίας για την κυτταρική αύξηση και όχι μόνον για την αποδέσμευση του οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη. Σημειωτέον ότι η σύνθεση της σερίνης και της θρεονίνης λαμβάνει πρώτες ύλες από την γλυκολυτική αλυσίδα. Ίσως η διακλάδωση αυτή του γλυκολυτικού μεταβολισμού έχει κάποια σημασία και για τον ενεργειακό μεταβολισμό των κακοήθων κυττάρων. Από την άλλη πλευρά φαίνεται ότι η διευκόλυνση της αποδέσμευσης οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη, μέσω χρήσης ουσιών που δρουν με τον μηχανισμό δράσης του 2,3-DPG αυξάνει την αποτελεσματικότητα των ακτινοθεραπευτικών σχημάτων, ενδεχομένως διότι το αποδεσμευόμενο οξυγόνο υφίσταται διέγερση από την ιονίζουσα ακτινοβολία πυροδοτώντας έτσι τον καταρράκτη παραγωγής ενεργών μορίων στο εσωτερικό των κυττάρων των κακοήθων όγκων (Huagang et al., 2004). Τέλος μια εξαιρετική επισκόπηση πάνω στον ρόλο της γλυκολυτικής οδού στην βιολογία της κυτταρικής ανάπτυξης έγινε πρόσφατα από μια ομάδα συγγραφέων (Vander Heiden et al., 2011). Στην εν λόγω μελέτη επισημαίνεται ο ρόλος των γλυκολυτικών μεταβολιτών, όπως επίσης και ο ρόλος της πυροσταφυλικής κινάσης, η ένδεια της οποίας σχετίζεται ισχυρά με την αντιρροπιστική ισχύ του παρακυκλώματος Raroport – Luebering. Είναι φανερό ότι ο ρόλος της εν λόγω μεταβολικής διακλάδωσης της γλυκόλυσης πρέπει να αναθεωρηθεί και να μελετηθεί *de novo* στην βιολογία των νεοπλασμάτων. Είναι ενδεχόμενο κάποιοι εκλεκτικοί αναστολείς των ενζύμων που υπεισέρχονται στην εν λόγω γλυκολυτική διακλάδωση να ενέχουν ανασταλτικές δράσεις επί της ανάπτυξης των νεοπλασματικών κυττάρων. Επίσης ο χειρισμός της έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων που κωδικοποιούν τις εν λόγω πρωτεΐνες, ίσως να είναι ωφέλιμος για μια ουσιαστική μεταβολική αντιμετώπιση της νεοπλασματικής νόσου είτε με κύριο, είτε με επικουρικό χαρακτήρα των επικρατούντων θεραπευτών προσεγγίσεων.

Μολονότι τα νεοπλασματικά κύτταρα επιδεικνύουν αυξημένη γλυκόλυση και εξαρτώνται περισσότερο από το μονοπάτι αυτό για την παραγωγή ATP, η αναστολή της γλυκόλυσης από μόνη της ίσως δεν είναι επαρκής για να επιφέρει τον θάνατο στα κύτταρα αυτά. Έχει προταθεί ότι η μείωση της παραγωγής του ATP πρέπει να υπερβεί κάποιο ποσοστό για να πυροδοτήσει τον κυτταρικό θάνατο μέσω της απόπτωσης ή της νέκρωσης, με μείωση 25-70% του παραγόμενου ATP να οδηγεί στην απόπτωση και μείωση πάνω από 85% να οδηγεί στη νέκρωση (Liebenthal et al., 1998). Αφού όλα τα νεοπλασματικά κύτταρα διαθέτουν μιτοχόνδρια, σε κάποιο βαθμό θα είναι δυνατή η παραγωγή του ATP ακόμα και όταν ανασταλθεί η γλυκολυτική πορεία. Το γεγονός αυτό μπορεί να επηρεάσει κατά πολύ την ικανότητα των γλυκολυτικών αναστολέων να μειώσουν την παραγόμενη ποσότητα ATP εντός του κυττάρου. Ένας προτεινόμενος τρόπος για να μειωθεί αποτελεσματικά η ποσότητα του ATP είναι ο συνδυασμός πολλαπλών ουσιών που στοχεύουν στην παραγωγή του με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης (Martin et al., 2001). Πράγματι, έρευνες υποδεικνύουν πως ο συνδυασμός του γλυκολυτικού αναστολέα 2-δεοξυγλυκόζη με την αδριαμυκίνη ή την πακλιταξέλη έχει ως αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση της *in vivo* θεραπευτικής δράσης σε μοντέλα πειραματοζώων που νοσούν από οστεοσάρκωμα ή μη μικροκυτταρικό νεόπλασμα πνεύμονα (Maschek et al., 2004).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και μία έρευνα που υποδεικνύει πως τα κύτταρα που χρησιμοποιούν την αερόβια γλυκόλυση για να καλύψουν την βιοενεργητική τους υφίστανται ταχεία μείωση του παραγόμενου ATP και νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο ως απόκριση στην ενεργοποίηση της πολυμεράσης της πολύ(ADP-ριβόζης) (PARP) μετά από την προσθήκη αλκυλυωτικών παραγόντων (Zong et al., 2004). Η ενεργοποίηση της PARP από ουσίες που προκαλούν βλάβες στο DNA προκαλεί την ταχεία κατανάλωση  $\text{NAD}^+$ , έναν απαραίτητο συμπράγοντα για τις γλυκολυτικές αντιδράσεις. Με αυτό τον τρόπο, οποιαδήποτε βλάβη στο DNA ενεργοποιεί την PARP θα αναστείλει έμμεσα την γλυκόλυση μέσω της μείωσης της ποσότητας του  $\text{NAD}^+$ . Εξάλλου, αφού η επιδιόρθωση του DNA απαιτεί την ενέργεια από το ATP, η αναστολή της παραγωγής του λόγω της καταστολής της γλυκολυτικής πορείας θα

μείωνε δραματικά την ικανότητα των κυττάρων να επιδιορθώσουν το DNA. Έτσι, ο συνδυασμός των γλυκολυτικών αναστολέων με παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA φαίνεται να είναι μια ελκυστική θεραπευτική στρατηγική για την επιτυχή θανάτωση των νεοπλασματικών κυττάρων (Pelicano et al., 2006).

Ο συνδυασμός αναστολέων της γλυκολυτικής πορείας και της πορείας των φωσφορικών πεντοζών έχει επίσης ελεγχθεί για τη δυνατότητα να αυξάνει την ακτινοευαισθησία των νεοπλασιών (Varshney et al., 2005). Η συνδυαστική θεραπεία με 2-DG και 6-AN (έναν αναστολέα της G6PD) προκαλεί την προφανή μείωση του κυτταρικού περιεχομένου σε γλυουταθειόνη και αύξηση των βλαβών από την ακτινοβολία που οδηγεί στον μιτωτικό και αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (Varshney et al., 2005). Βασιζόμενοι σε παλαιότερες έρευνες που υποδείκνυαν πως η 2-DG ενισχύει τη δράση της ακτινοθεραπείας σε πειραματικά μοντέλα, οι Singh et al. (2005) προέβησαν στην πραγματοποίηση μιας κλινικής μελέτης για να εξετάσουν την ανοχή και την ασφάλεια της κλιμακούμενης χορήγησης 2-DG σε συνδυασμό με ραδιοθεραπεία σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα. Η έρευνα αυτή απέδειξε πως δόσεις έως 250 mg/kg σε συνδυασμό με 5 ακτινοβολήσεις ανά εβδομάδα είναι ασφαλείς, χωρίς να προκαλούν οξεία τοξικότητα ή μεταγενέστερες βλάβες στον εγκέφαλο των ασθενών. Οι συγγραφείς προτείνουν την διενέργεια περαιτέρω κλινικών ερευνών για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης συνδυαστικής θεραπευτικής προσέγγισης.

Ολοκληρώνοντας αυτή την μακροχρόνια διαδρομή, μέσω αυτής της διδακτορικής διατριβής, προτείνεται καταρχήν η μελέτη της κινητικής του ενζύμου της GAPDH στην κυτταρική σειρά των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων, για να αποσαφηνιστεί το ιδιαίτερο μεταβολικό της προφίλ, και γιατί παράλληλα είναι ελάχιστα μελετημένη στη διεθνή βιβλιογραφία. Με βάση μελέτες του εργαστηρίου Φυσιολογίας, που βρίσκονται ακόμα σε πρώιμο στάδιο, στην κυτταρική σειρά των LMS υπερεκφράζεται το ένζυμο της εξοκινάσης. Η υπερέκφραση του ενζύμου αυτού περιπλέκει ακόμα το μεταβολικό προφίλ των LMS κυττάρων και ίσως είναι η αιτία της υψηλής ανθεκτικότητας του λειομυοσαρκώματος στη χημειοθεραπεία και την

ακτινοθεραπεία. Αυτό που απαιτείται είναι ο έλεγχος όλως των ενζύμων της γλυκολυτικής οδού μέσω μεταβολομικής ανάλυσης (metabolomics). Επιπλέον, ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η μελέτη για την ύπαρξη του παρακυκλώματος Rapoport – Luebering στα νεοπλασματικά κύτταρα, η οποία θα έδινε μία εξήγηση για την αυξημένη παραγωγή του γαλακτικού οξέος στα κύτταρα αυτά, αλλά κυρίως θα προσέφερε μία επιπλέον προοπτική στο φαινόμενο Warburg και νέους πιθανούς στόχους για την χημειοθεραπεία των νεοπλασιών.

Αξίζει να σημειωθεί πως οι *in vitro* πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες φυσιολογικών συγκεντρώσεων οξυγόνου. Αναμένεται πως στις συνθήκες υποξίας που επικρατούν στο εσωτερικό των όγκων και η γλυκολυτική πορεία είναι κατά πολύ αυξημένη, τα σύμπλοκα μετάλλων που μελετήθηκαν θα εμφανίζουν ακόμα πιο ισχυρή και εκλεκτική δράση έναντι των νεοπλασματικών κυττάρων.

*«Κι αν πτωχική την βρεις, η Ιθάκη δε σε γέλασε. Έτσι σοφός που έγινες, με τόση πείρα, ήδη θα το κατάλαβες οι Ιθάκες τι σημαίνουν» (Κ.Π. Καβάφης).*

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**





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

- Τα σύμπλοκα βαναδίου και ψευδαργύρου εμφανίζουν ισχυρή δοσοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση ενάντια των υπό μελέτη νεοπλασματικών κυτταρικών σειρών, η οποία όμως είναι ηπιότερη στην φυσιολογική κυτταρική σειρά.
- Η σειρά κυτταροτοξικότητας έχει ως εξής: σύμπλοκο 5> σύμπλοκο 4> σύμπλοκο 2> σύμπλοκο 9> σύμπλοκο 1> σύμπλοκο 3> σύμπλοκο 6> σύμπλοκο 7> σύμπλοκο 8> σύμπλοκο 10.
- Ο επαγόμενος από την δράση τους κυτταρικός θάνατος είναι ο αποπτωτικός.
- Τα κύτταρα LMS απώλεσαν την ικανότητα ανάπτυξης μεγάλων, αυτοσυντηρούμενων αποικιών μετά από επώαση με τα σύμπλοκα.
- Τα σύμπλοκα του βαναδίου δεν ανέστειλαν την ανάπτυξη των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών.
- Η παρουσία του συμπλόκου 9 και του υποκαταστάτη του στο καλλιεργητικό μέσο προκάλεσε ισχυρή αναστολή της ανάπτυξης του βακτηρίου *Z. Mobilis*.
- Τα κύτταρα HepG2 καταναλώνουν την μεγαλύτερη ποσότητα γλυκόζης, ενώ ακολουθούν τα κύτταρα LMS και εν συνεχεία τα κύτταρα MCF-7. Οι κυτταρικές σειρές των φυσιολογικών ινοβλαστών και των HeLa, δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά, συγκρινόμενες μεταξύ τους, στην κατανάλωση γλυκόζης.
- Μετά από επώαση των κυττάρων με τα σύμπλοκα παρατηρήθηκε μείωση της κατανάλωσης γλυκόζης, η οποία έφτασε και σε μηδενικά επίπεδα. Τα κύτταρα LMS παρουσίασαν την μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσία των συμπλόκων, ενώ το σύμπλοκο 7 του ψευδαργύρου είχε την πιο ισχυρή δράση.

- Τα κύτταρα HepG2 παράγουν το περισσότερο ATP σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές, απουσία των συμπλόκων. Ακολουθούν τα κύτταρα HeLa που παράγουν περίπου την ίδια ποσότητα ATP με τα κύτταρα MRC-5, ενώ τα κύτταρα LMS και MCF-7 παράγουν τις λιγότερες ποσότητες ATP από όλες τις κυτταρικές σειρές. Μετά την προσθήκη των συμπλόκων η παραγωγή ATP μειώθηκε με δόσοεξαρτώμενο τρόπο.
- Τα κύτταρα LMS παράγουν το περισσότερο γαλακτικό οξύ, σε ποσότητες κατά πολύ μεγαλύτερες σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές. Ακολουθούν τα κύτταρα HepG2 που παράγουν και αυτά αρκετό γαλακτικό οξύ, σε ποσότητες όμως μικρότερες από τα κύτταρα LMS. Τα κύτταρα MCF-7 παράγουν, με μικρή διαφορά, περισσότερο γαλακτικό οξύ σε σύγκριση με τα κύτταρα MRC-5, ενώ η κυτταρική σειρά HeLa παράγει την λιγότερη ποσότητα γαλακτικού οξέος σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές.
- Τα σύμπλοκα προκαλούν δόσοεξαρτώμενη μείωση της παραγωγής γαλακτικού οξέος. Το σύμπλοκο **7** προκάλεσε την μεγαλύτερη αναστολή στην παραγωγή γαλακτικού οξέος σε όλες τις κυτταρικές σειρές, εκτός των κυττάρων HeLa. Η αναστολή αυτή στην παραγωγή του γαλακτικού οξέος είναι πιο ισχυρή στην κυτταρική σειρά του λειομυοσαρκώματος.
- Τα σύμπλοκα προκαλούν βλάβες στην αναπνευστική λειτουργία, μικρότερης κλίμακας όμως από την αναστολή στην παραγωγή γαλακτικού οξέος. Το σύμπλοκο **7** προκάλεσε την μικρότερη αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας, σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα, σε όλες τις κυτταρικές σειρές.
- Η κυτταρική σειρά HepG2 παρουσιάζει υπερέκφραση του ενζύμου της GAPDH, σε σύγκριση με τα κύτταρα των φυσιολογικών ινοβλαστών. Μικρή μείωση της έκφρασης παρατηρείται στην κυτταρική σειρά HeLa. Υποέκφραση παρατηρείται στην κυτταρική σειρά LMS, ενώ τα κύτταρα MCF-7 εκφράζουν την GAPDH, όπως οι φυσιολογικοί ινοβλάστες.

[179]

- Μετά την προσθήκη των συμπλόκων **1,2** και **7** παρατηρήθηκε έντονη υποέκφραση του ενζύμου. Μάλιστα, το σύμπλοκο **7** προκαλεί την μεγαλύτερη υποέκφραση του ενζύμου, και στην κυτταρική σειρά LMS δεν εκφράζεται σχεδόν καθόλου.
- Τέλος, τα *in vivo* πειράματα έδειξαν ότι το σύμπλοκο **7** το οποίο δοκιμάστηκε στους επίμυες Wistar εμφανίζει τοξική δράση μετά από την εφάπαξ χορήγηση του, σε ποσότητα 100 mg/kg βάρους σώματος.
- Με βάση την εκλεκτική ως προς τα νεοπλασματικά κύτταρα κυτταροτοξική δράση του συμπλόκου αυτού, την αναστολή που προκαλεί στην γλυκολυτική πορεία, και την μειωμένη τοξικότητα του στους επίμυες, προτείνεται η περαιτέρω φαρμακοκινητική μελέτη και ο έλεγχος της πιθανής αντικαρκινικής του δράσης.



# ΠΕΡΙΛΗΨΗ



Ο ρόλος της γλυκόλυσης στην ανάπτυξη των νεοπλασματικών κυττάρων έχει επισημανθεί εκ μέρους του Otto Warburg το 1926. Αν και ο Warburg τιμήθηκε με βραβείο Nobel το 1931 για την προσφορά του στην επιστήμη, εν τούτοις η μεταβολική ιδιαιτερότητα των νεοπλασματικών κυττάρων, η στήριξή τους δηλαδή στην γλυκόλυση για την παραγωγή ενέργειας, αγνοήθηκε για μεγάλο χρονικό διάστημα ως σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη μιας στρατηγικής θεραπευτικής αντιμετώπισης των νεοπλασιών. Από το 1980 και μετά, η έρευνα στράφηκε ξανά προς την κατεύθυνση αυτή. Σήμερα υπάρχει ένας ικανός αριθμός εργασιών που υποδεικνύουν την ρεαλιστικότητα αυτής της προσέγγισης με αποτελέσματα αξιολογικά και σαφή. Στο φαινόμενο που παρατήρησε ο Warburg, φαίνεται πως τα νεοπλασματικά κύτταρα φέρουν μιτοχόνδρια που έχουν υποστεί σημαντικές βλάβες, με αποτέλεσμα μεγάλες ποσότητες ATP να συντίθενται μέσω της γλυκόλυσης και μικρότερες μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Παρόλο που το φαινόμενο Warburg δεν είναι καθολικά αποδεκτό για όλους τους τύπους νεοπλασιών, αποτελεί σήμερα την βάση για την Τομογραφία Εκπομπής Ποζιτρονίων (PET) η οποία χρησιμοποιείται για την διάγνωση του καρκίνου καθώς και για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία που ακολουθούν. Στην τομογραφία αυτή χρησιμοποιείται ένα ανάλογο της γλυκόζης, η 18F-FDG (2-(<sup>18</sup>F)-fluoro-2-deoxy-D-glucose). Η FDG-PET συνδυαζόμενη με αξονική (υπολογιστική) τομογραφία (PET/CT) έχει >90% ακρίβεια για τους περισσότερους τύπους επιθηλιακών νεοπλασμάτων.

Η εκλεκτική τοξικότητα των χημειοθεραπευτικών μέσων, έτσι ώστε να μην βλάπτονται τα υγιή κύτταρα είναι το μεγαλύτερο πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπιστεί για την θεραπεία της νεοπλασματικής νόσου. Ο εντοπισμός λοιπόν των βιοχημικών διαφορών μεταξύ των φυσιολογικών και των νεοπλασματικών κυττάρων είναι απαραίτητος για τον σχεδιασμό νέων αντικαρκινικών φαρμάκων. Η παρατήρηση του Warburg ίσως αποτελεί μια πολύ καλή θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση των νεοπλασιών, χωρίς να δημιουργούνται βλάβες στα φυσιολογικά κύτταρα του πάσχοντος οργανισμού. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες,

η μεταβολική αλλαγή από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στη γλυκόλυση, δεν είναι η αιτία μετάλλαξης των φυσιολογικών κυττάρων σε νεοπλασματικά, όπως υπέθεσε ο Warburg, αλλά ένα επιφαινόμενο της καρκινογένεσης, που συνδέεται με υψηλά ποσοστά μεταστάσεων και ανοχής στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία. Πολλές μελέτες, κυρίως μετά το 2000, εστιάζουν στις θεραπευτικές ιδιότητες των αναστολέων της γλυκολυτικής οδού. Τα αποτελέσματα είναι άκρως ενθαρρυντικά για περαιτέρω έρευνα. Ένα πρόβλημα των ήδη υπαρχόντων ουσιών - αναστολέων της γλυκολυτικής οδού, που έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες, είναι πως δεν είναι σταθερές. Μια ενδεχόμενη σύνδεση των ουσιών αυτών με μέταλλα, υπό τη μορφή σύμπλοκων ενώσεων πιθανόν θα έλυne το πρόβλημα αυτό και παράλληλα λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους κάποιων συμπλόκων, οι ενώσεις αυτές δεν θα διαπερνούσαν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό αφού τα κύτταρα του εγκεφάλου είναι γλυκολυτικά.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η δράση δέκα νεοσυνθετιμένων συμπλόκων μετάλλων, έξι συμπλόκων του βαναδίου και τεσσάρων του ψευδαργύρου. Οι μοριακοί τύποι των συμπλόκων είναι οι ακόλουθοι:  $[(pyH)_6(V_{10}O_{28}) \cdot 2H_2O]$  **(1)**,  $(LH)_4\{V_{10}O_{26}(OH)_2\} \cdot 2L \cdot 2H_2O$  **(2)**,  $\{(L'H_2)(VO_3)_2\}_n$  **(3)**,  $(L''H_2)_3[V^{IV}_9V^V_6O_{36}] \cdot 14H_2O$  **(4)**,  $\{[V^{IV}_{11}V^V_7 Na_{10}O_{44}(N_3)(H_2O)_{32}] \cdot 14H_2O\}_n$  **(5)**,  $[V^{IV}_2O_2(SO_4)\{(py)_2C(OMe)(O)\}_2]$  **(6)**,  $[Zn(O_2CMe)_2(ampaoH)_2]$  **(7)**,  $[Zn(O_2CPh)_2(ampaoH)_2]$  **(8)**,  $[Zn(dapdoH_2)_2](NO_3)_2$  **(9)**,  $[Zn(dampdoH_2)_2](NO_3)_2$  **(10)**.

Οι υποκαταστάτες των συμπλόκων **1-6** είναι η πυριδίνη, το νικοτιναμίδιο, η πιπεραζίνη, η καδαβερίνη, το αζίδιο του νατρίου και η  $(py)_2CO$  (di-2-pyridyl ketone), αντίστοιχα. Τα τέσσερα σύμπλοκα του ψευδαργύρου έχουν ως υποκαταστάτες πυριδυλο οξίμες και διοξίμες και συγκεκριμένα τα σύμπλοκα **7** και **8** έχουν υποκαταστάτη το  $ampaoH$ , το σύμπλοκο **9** το  $dapdoH_2$  και το σύμπλοκο **10** το  $dampdoH_2$ .

Σε ένα πρώτο επίπεδο, μελετήθηκε η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των λειομυοσάρκωματικών κυττάρων επίμους Wistar (LMS), των κυττάρων αδενοκαρκινώματος μαστού ανθρώπου (MCF-7) και αδενοκαρκινώματος τραχήλου



μήτρας ανθρώπου (HeLa), των κυττάρων ηπατοκυτταρικού καρκίνου ανθρώπου (HepG2) και των φυσιολογικών ινοβλαστών μετά από επώαση με τα σύμπλοκα των **1-10**. Ελέγχτηκε εν συνεχεία η ικανότητα τους να αναστέλλουν την ικανότητα των κυττάρων LMS να αναπτύσσουν μεγάλες, αυτοσυντηρούμενες αποικίες, καθώς και ο μηχανισμός με τον οποίο επάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Τα σύμπλοκα μελετήθηκαν επιπλέον ως προς την πιθανή αντιβακτηριακή τους δράση, αλλά και ως προς την επίδρασή τους στις οξειδο-αναγωγικές αντιδράσεις των μιτοχονδρίων όλων των κυτταρικών σειρών.

Για την διερεύνηση του γλυκολυτικού ρυθμού των νεοπλασματικών κυττάρων σε σύγκριση με αυτόν των κυττάρων MRC-5, καθώς και της δράσης των συμπλόκων στην γλυκολυτική πορεία, εξετάστηκε η κατανάλωση γλυκόζης, η παραγωγή ATP και γαλακτικού οξέος, καθώς και η έκφραση του ενζύμου της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH), παρουσία και απουσία των συμπλόκων.

Τέλος, μελετήθηκε η οξεία τοξικότητα του συμπλόκου **7** σε επίμυες Wistar, για τον προσδιορισμό της LD<sub>50</sub> τιμής του και της τοξικής του επίδρασης σε επίπεδο οργανισμού.

Τα *in vitro* πειράματα απέδειξαν πως και τα δέκα σύμπλοκα μετάλλων ασκούν δόσοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση έναντι των κυττάρων LMS, MCF-7, HeLa και HepG2. Η σειρά κυτταροτοξικότητας έχει ως εξής: σύμπλοκο **5**> σύμπλοκο **4**> σύμπλοκο **2**> σύμπλοκο **9**> σύμπλοκο **1**> σύμπλοκο **3**> σύμπλοκο **6**> σύμπλοκο **7**> σύμπλοκο **8**> σύμπλοκο **10**. Τα σύμπλοκα παρουσία ηπιότερη δράση στη κυτταρική σειρά των φυσιολογικών ινοβλαστών. Ο μηχανισμός πρόκλησης κυτταρικού θανάτου είναι ο αποπτωτικός, ενώ η επώαση με τα σύμπλοκα προκάλεσε αναστολή της ικανότητας ανάπτυξης μεγάλων αποικιών. Τα σύμπλοκα του βαναδίου δεν ανέστειλαν την ανάπτυξη των βακτηρίων *Escherichia coli* DH5a, *Zymomonas mobilis* NCIB 11163, *Streptococcus thermophilus* LMG 18311 και *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253, ενώ Το στέλεχος *C. glutamicum* παρουσίασε μικρή μείωση στην ανάπτυξή του παρουσία των συμπλόκων ψευδαργύρου **7** και **8**, στη συγκέντρωση των 200 μM. Όσον αφορά το σύμπλοκο **9** και τον υποκαταστάτη του,

η παρουσία τους στο καλλιεργητικό μέσο προκάλεσε ισχυρή αναστολή της ανάπτυξης του βακτηρίου *Z. Mobilis*, ενώ στην περίπτωση των βακτηρίων *E. coli* και *C. glutamicum*, προκάλεσε μόνο μια μικρή καθυστέρηση στην ανάπτυξή τους.

Τα κύτταρα HepG2 καταναλώνουν την μεγαλύτερη ποσότητα γλυκόζης, ενώ ακολουθούν τα κύτταρα LMS και εν συνεχεία τα κύτταρα MCF-7. Οι κυτταρικές σειρές των φυσιολογικών ινοβλαστών και των HeLa, δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά, συγκρινόμενες μεταξύ τους, στην κατανάλωση γλυκόζης. Μετά από επώαση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των συμπλόκων παρατηρήθηκε μείωση της κατανάλωσης γλυκόζης, η οποία έφτασε και σε μηδενικά επίπεδα. Τα κύτταρα LMS παρουσίασαν την μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσία των συμπλόκων, ενώ το σύμπλοκο **7** του ψευδαργύρου είχε την πιο ισχυρή δράση.

Τα κύτταρα HepG2 παράγουν το περισσότερο ATP σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές, απουσία των συμπλόκων. Ακολουθούν τα κύτταρα HeLa που παράγουν περίπου την ίδια ποσότητα ATP με τα κύτταρα MRC-5, ενώ τα κύτταρα LMS και MCF-7 παράγουν τις λιγότερες ποσότητες ATP από όλες τις κυτταρικές σειρές. Μετά την προσθήκη των συμπλόκων η παραγωγή ATP μειώθηκε με δόσοεξαρτώμενο τρόπο.

Τα κύτταρα LMS παράγουν το περισσότερο γαλακτικό οξύ, σε ποσότητες κατά πολύ μεγαλύτερες σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές. Ακολουθούν τα κύτταρα HepG2 που παράγουν και αυτά αρκετό γαλακτικό οξύ, σε ποσότητες όμως μικρότερες από τα κύτταρα LMS. Τα κύτταρα MCF-7 παράγουν, με μικρή διαφορά, περισσότερο γαλακτικό οξύ σε σύγκριση με τα κύτταρα MRC-5, ενώ η κυτταρική σειρά HeLa παράγει την λιγότερη ποσότητα γαλακτικού οξέος σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές.

Μετά την προσθήκη των συμπλόκων η παραγωγή γαλακτικού οξέος μειώθηκε με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Το σύμπλοκο **7** προκάλεσε την μεγαλύτερη αναστολή στην παραγωγή γαλακτικού οξέος σε όλες τις κυτταρικές σειρές, εκτός των κυττάρων HeLa. Η αναστολή αυτή στην παραγωγή του γαλακτικού οξέος είναι πιο ισχυρή στην

κυτταρική σειρά του λειομυοσαρκώματος, που αποδείξαμε πως στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στην γλυκολυτική πορεία για την σύνθεση ATP.

Τα αποτελέσματα από την μελέτη των πραγματοποιούμενων οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων των μιτοχονδρίων έδειξαν πως τα σύμπλοκα προκαλούν βλάβες στην αναπνευστική λειτουργία, μικρότερης κλίμακας όμως από την αναστολή στην παραγωγή γαλακτικού οξέος. Το σύμπλοκο **7** προκάλεσε την μικρότερη αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας, σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα, σε όλες τις κυτταρικές σειρές, που σημαίνει πως έχει μια πιο εξειδικευμένη δράση στην γλυκολυτική πορεία.

Η κυτταρική σειρά HepG2 παρουσιάζει υπερέκφραση του ενζύμου της GAPDH, σε σύγκριση με τα κύτταρα των φυσιολογικών ινοβλαστών. Μικρή μείωση της έκφρασης παρατηρείται στην κυτταρική σειρά HeLa. Υποέκφραση παρατηρείται στην κυτταρική σειρά LMS, ενώ τα κύτταρα MCF-7 εκφράζουν την GAPDH, όπως οι φυσιολογικοί ινοβλάστες.

Μετά την προσθήκη των συμπλόκων **1,2** και **7** παρατηρήθηκε έντονη υποέκφραση του ενζύμου. Μάλιστα, το σύμπλοκο **7** προκαλεί την μεγαλύτερη υποέκφραση του ενζύμου, και στην κυτταρική σειρά LMS δεν εκφράζεται καθόλου.

Τέλος, τα *in vivo* πειράματα έδειξαν ότι το σύμπλοκο **7** το οποίο δοκιμάστηκε στους επίμυες Wistar εμφανίζει τοξική δράση μετά από την εφάπαξ χορήγηση του, σε ποσότητα 100 mg/kg βάρους σώματος, στους νεφρούς και κατ' επέκταση στους πνεύμονες, ενώ σε μικρότερες δόσεις δεν επιφέρει σημαντικές βλάβες.

Με βάση την εκλεκτική ως προς τα νεοπλασματικά κύτταρα κυτταροτοξική δράση του συμπλόκου αυτού, την αναστολή που προκαλεί στην γλυκολυτική πορεία, και την μειωμένη τοξικότητα του στους επίμυες, προτείνεται η περαιτέρω φαρμακοκινητική μελέτη και ο έλεγχος της πιθανής αντικαρκινικής του δράσης.



# **ABSTRACT**



The role of glycolysis in tumor cell growth has firstly been reported by Otto Warburg, in 1926. Even though Warburg won a Nobel prize in 1931 for his contribution in science, the metabolic switch of tumor cells from aerobic to anaerobic glycolysis, has been ignored for a long time. Almost 50 years later, this hypothesis has been used from many scientists as a starting point for developing new strategies in cancer therapy. Today, there is a remarkable number of scientific papers that demonstrate the feasibility of this approach with remarkable results. The Warburg “hypothesis”, is based on the fact that due to the lower oxygen levels, the cancer cells synthesize ATP mainly through glycolysis and less through oxidative phosphorylation. Although, the Warburg effect is not universally accepted for all types of neoplasms, it consists the basis that Positron Emission Tomography (PET) functions. PET Tomography uses a glucose analog  $^{18}\text{F}$ -FDG (2 - ( $^{18}\text{F}$ )-fluoro-2-deoxy-D-glucose) and it is used for the detection of cancer and for monitoring patients’ response to the treatment. When it combined with axial (computed) tomography (PET / CT), called FDG-PET, increasing its accuracy more than 90% for most types of epithelial neoplasms.

The toxicity of chemotherapeutic agents serves as a limiting factor in cancer treatment. Many efforts have been done to overcome this major problem, trying to minimize their side effects on healthy cells. The identification of the biochemical differences between normal and cancer cells is necessary to design new anticancer drugs. Warburg’s hypothesis consists possibly an effective therapeutic approach for cancer treatment, without effects to normal cells. Recent studies demonstrate that the metabolic switch from oxidative phosphorylation to glycolysis, does not cause mutations to normal cells, that lead to carcinogenesis as also reported by Warburg, but consists an epiphenomenon of carcinogenesis, associated with high rates of metastasis and tolerance to chemotherapy and radiotherapy. More researches, especially after 2000, focus on the therapeutic effect of glycolytic inhibitors, presenting encouraging results for further research. The major problem of the existing drugs - inhibitors of the glycolytic pathway, used in clinical studies, is their instability. Coupling these molecules with metals compounds would probably

ameliorate their half life time. Also due to the high molecular weight of metal compounds, it may not insert to the blood-brain barrier, protecting the normal cells located on the brain, because these cells also use mainly the glycolytic pathway for the production of ATP.

In this study, we investigated the biological effect of ten novel metal compounds, six vanadium and four zinc compounds. The molecular formulas are the followings: [(pyH)<sub>6</sub>(V10O<sub>28</sub>)·2H<sub>2</sub>O] (1), (LH)<sub>4</sub>{V10O<sub>26</sub>(OH)<sub>2</sub>}·2L·2H<sub>2</sub>O] (2), {(L'H<sub>2</sub>)(V<sub>3</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>}<sub>n</sub> (3), (L''H<sub>2</sub>)<sub>3</sub>[VIV<sub>9</sub>VV<sub>6</sub>O<sub>36</sub>]·14H<sub>2</sub>O (4), {[VIV<sub>11</sub>VV<sub>7</sub> Na<sub>10</sub>O<sub>44</sub>(N<sub>3</sub>)(H<sub>2</sub>O)<sub>32</sub>]·14H<sub>2</sub>O}<sub>n</sub> (5), [VIV<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>){(py)<sub>2</sub>C(OMe)(O)}<sub>2</sub>] (6), [Zn(O<sub>2</sub>CMe)<sub>2</sub>(ampaoH)<sub>2</sub>] (7), [Zn(O<sub>2</sub>CPh)<sub>2</sub>(ampaoH)<sub>2</sub>] (8), [Zn(dapdoH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (9), [Zn(dampdoH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (10).

The ligands of complexes 1 to 6 are: pyridine, nicotinamide, piperazine, cadaverine, azide and (py)<sub>2</sub>CO (di-2-pyridyl ketone). The ligands of zinc complexes are: pyridine-2-amidoxime (ampaoH), 2,6-diacetylpyridine dioxime (dapdoH<sub>2</sub>) and pyridine-2,6-diamidoxime (dampdoH<sub>2</sub>).

Cell growth inhibition of several cancer and normal cell lines, as leiomyosarcoma from Wistar rat (LMS), human breast cancer adenocarcinoma (MCF-7), human cervical cancer (HeLa), human hepatocellular adenocarcinoma and normal human fibroblasts (MRC-5), using all the above complexes, was evaluated using the MTT assay. Flow cytometry analysis (FACS) was used to determine the cell type death after treatment with the complexes. Further, high density clonogenic assay was used to determine the ability of those compounds to inhibit the colony formation of cancer cells and bacterial growth.

The effect of all complexes to the metabolic capacity of cells through the measurement of oxidation-reduction reactions, which principally occur in the mitochondria of live cells, was also analyzed. The results showed that, among all complexes, complex 4 has the highest cytotoxic activity against LMS, MCF-7, HeLa and HepG2 cells, which also does not present any cytotoxicity on MRC-5 cells. Moreover, flow cytometry analysis revealed that all complexes cause apoptosis to



LMS cells, at a dose-dependent manner and cause irreversible damage to the mitochondria of all cell lines. In conclusion, the experimental results are encouraging for the use of the above complexes as potent cytotoxic agents and for the development of new metal complexes with anticancer activity.

To investigate the glycolytic rate of cancer cells, compared to MRC-5 cells, and their activity to the glycolytic pathway, we measured the glucose consumption, the production of both ATP and lactate, and the expression of GAPDH, in the presence or absence of the complexes. Finally, we tested the acute toxicity of the complex 7 on healthy Wistar rats, for the determination of LD<sub>50</sub> value, as a marker for toxicity.

*In vitro* experiments revealed that all metal complexes exert dose-dependent cytotoxic activity against the cancer cell lines of LMS, MCF-7, HeLa and HepG2. The order of cytotoxicity is as follows: complex 5 > complex 4 > complex 2 > complex 9 > complex 1 > complex 3 > complex 6 > complex 7 > complex 8 > complex 10. Complexes present less effect on the normal cell line. The cell death is mainly driven by apoptotic phenomena, which is consistent with the results from clonogenic assay.

Complexes did not inhibit growth of *Escherichia coli* DH5a, *Zymomonas mobilis* NCIB 11163, *Streptococcus thermophilus* LMG 18311 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253, but *C. glutamicum* showed a slightly reduced growth in presence of C1 and C2 at the concentration of 200 µM. As for complex 9 and its ligand, their presence in the growth medium caused a strong inhibition in *Z. mobilis* growth, while only a slight growth delay in the cases of *E. coli* and *C. glutamicum*.

Among all cell lines, HepG2 cells consume the highest amounts of glucose, while LMS and MCF-7 cells follow. MRC-5 and HeLa cells do not exert a statistically significant difference, compared with each other, in the the glucose consumption. After incubating cells with increasing concentrations of the complexes, a decrease in the glucose consumption of glucose was observed that led to zero levels in some cases. LMS cells presented showed the highest sensitivity in the presence of the complexes, while complex 7 had the most potent action.

HepG2 cells produce more ATP compared to the other cell lines, in the absence of the complexes. HeLa cell line is the second one in the order of highest ATP production. They produce approximately the same amount of ATP as MRC-5 cells, while LMS and MCF-7 cells produce lower ATP, compared to the other cell lines. After the addition of the complexes, the production of ATP decreased in a dose dependent manner.

LMS cells produce the higher amount of lactate, in amounts far in excess to the other cell lines. Similarly, HepG2 cells produce high levels of lactate, but lower than LMS. MCF-7 cells produce, with a slight difference, more lactate compared to MRC-5, while HeLa cell line produces the lower levels of lactate compared to the other cells.

After the incubation with the complexes, lactate production was decreased in a dose dependent manner. The complex 7 caused the greatest inhibition in the production of lactate in all cell lines, but did not inhibit the lactate production of HeLa cells. The inhibition in the production of lactate is stronger in the leiomyosarcoma cell line, which was thought to rely on the glycolytic pathway for the ATP production.

The results from the study of redox reactions into mitochondria showed that the complexes cause damage to the respiratory function, yet smaller than inhibiting the production of lactate. Complex 7 caused less inhibition to the mitochondrial function, compared to the other complexes in all cell lines, which leads to the fact that it has a specific effect on the glycolytic pathway.

HepG2 cells present overexpression of GAPDH, compared to MRC-5 cells. A slight reduction to the expression of GAPDH is observed at HeLa cells. Under-expression is observed at LMS cells, while MCF-7 cells express GAPDH, as the MRC-5 cells.

After the incubation with the complexes **1,2** and **7** a strong under-expression of GAPDH was observed. Complex **7** caused the stronger under-expression of GAPDH, and in fact, at LMS cells GAPDH is slightly expressed.

Finally, the *in vivo* experiments revealed that complex 7, tested on healthy Wistar rats for its toxicity, after a single dose of administration, of 100 mg / kg body weight, exerts toxic effects to the kidney, and thus the lungs, while lower doses did not result in significant damage.

Based on the selective cytotoxicity of this complex to cancer cell lines towards neoplastic cells, the inhibition that cause to the glycolytic pathway, and its lower toxicity in Wistar rats, we suggest a further pharmacokinetic study and research of its possible anticancer action.



# **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**



**Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχει δημοσιευθεί**

**σε δύο διεθνή επιστημονικά περιοδικά:**

**1.** Konstantis F. Konidaris, **Maria Giouli**, Catherine P. Raptopoulou, Vassilis Psycharis, Ioannis I. Verginadis, Anastasios Vasiliadis, Amalia S. Afendra, Spyridon Karkabounas, Evy Manessi-Zoupa, and Theocharis C. Stamatatos (2012). *“Employment of pyridyl oximes and dioximes in zinc(II) chemistry: Synthesis, structural and spectroscopic characterization, and biological Evaluation”*. *Inorganica Chimica Acta* **396**: 49-59.

**2.** Harikleia Sartzi, Constantinos C. Stoumpos, **Maria Giouli**, Ioannis I. Verginadis, Spyridon Ch. Karkabounas, Luís Cunha-Silva, Albert Escuer, and Spyros P. Perlepes (2012). *“The “periodic table” of di-2-pyridyl ketone: Vanadium complexes”*. *Dalton Transactions* **41**(39):11984-8.

**και σε δύο πανελλήνια συνέδρια:**

1. 9<sup>th</sup> Tumor Markers and Targeting Therapy Congress, Athens, Greece. 1 poster: **Maria Gkiouli**, Ioannis I. Verginadis, Theocharis C. Stamatatos, Konstantis F. Konidaris, Catherine P. Raptopoulou, Vasilis Psycharis, Anastasios Vasiliadis, Amalia S. Afendra, Evy Manessi-Zoupa, Spyridon Karkabounas. 3rd award of the best posters

2. 36ο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, 8-10 Μαΐου 2014, Ιωάννινα. 1 poster:

**Γκιούλη Μαρία**, Ρουμπάτης Λεωνίδας, Δήμα Ίριδα, Γιαννακοπούλου Μαρία, Τσαλίκη Ελένη, Βελτσίστας Παναγιώτης, Άγγελος Ευαγγέλου και Καρκαμπούνας Σπυρίδων





## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**



## A

Abrams MJ, Murrer BA (1993). Metal compounds in therapy and diagnosis. *Science* 261(5122):725–30.

Abdellah A, Hadjikakou S, Hadjiliadis N, Kubicki M, Bakas T, Kourkoumelis N, Simos Y, Karkabounas S, Barsan M, Butler I (2009). Synthesis, characterization, and biological studies of organotin (IV) derivatives with o- or p-hydroxybenzoic acids. *Bioinorganic Chemistry and Applications* : 1-12.

Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ. (1999) Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 59(11):2615–22.

Alama A, Tasso B, Novelli F, Sparatore F. (2009) Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotins as antitumor agents *Drug Discov Today* 14(9–10):500–8.

Al-Shawi MK, Senior AE (1993). Characterization of the adenosine triphosphate activity of Chinese hamster P-glycoprotein. *J Biol Chem* 1993;268:4197–206.

Arora KK, Fanciulli M, Pedersen PL. (1990). Glucose phosphorylation in tumor cells. Cloning, sequencing, and overexpression in active form of a full-length cDNA encoding a mitochondrial bindable form of hexokinase. *J Biol Chem* 265:6481–6488.

Assimakopoulos D, Kolettas E, Zagorianakou N, Evangelou A, Skevas A, Agnantis N (2000) Prognostic significance of p53 in the cancer of the larynx. *Anticancer Res* 20:3555–64.

Aureliano M, UrelianoM, Gandara RMC (2005). Decavanadate effects in biological systems. *J Inorg Biochem* 299: 979-985.

## B

Balas V, Hadjikakou S, Hadjiliadis N, Kourkoumelis N, Light M, Hursthouse M, Metsios A, Karkabounas S (2008). Crystal structure and antitumor activity of the novel zwitterionic complex of tri-n-butyltin (IV) with 2-thiobarbituric acid. *Bioinorganic Chemistry and Applications* : 1-5.

Barceloux DG. (1999) Zinc. *Clin Toxicol* 37: 279-292.

Barnett B. L., Kretschmar H. C., Hartman F. A., 1977. *Inorg. Chem.* 16:1834–1838

Baumann M, Brand K. (1988). Purification and characterization of phosphohexose isomerase from human gastrointestinal carcinoma and its potential relationship to neuroleukin. *Cancer Res* 48:7018–7021.

Baumann M, Kappl A, Lang T, Brand K, Siegfried W, Paterok E. (1990). The diagnostic validity of the serum tumor marker phosphohexose isomerase (PHI) in patients with gastrointestinal, kidney, and breast cancer. *Cancer Investig* 8:351–356.

Benesch R and Benesch R.E (1967). The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun* 26 (2): 162–7.

Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126, 107–120.

Beyersmann D (2002) Homeostasis and cellular functions of zinc. *Mat Wiss U Werkstofftech* 33:764-769.

Bhowmilk D, Chiranjib KP, Kuman KPS (2010) A potential medicinal importance of zinc in human health and chronic disease. *Int J Pharm Biomed Sci* 1 (1): 05-11.

Biggerstaff JP, Seth N, Amirhosravi A, Amaya M (1999). Soluble fibrin augments platelet tumor cell adherence in vitro and in vivo and enhances experimental metastasis. *Clin Exp Metastasis* 17:723–30.

Blum R, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G, Kloog Y. (2005) Ras inhibition in glioblastoma down-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha, causing glycolysis shutdown and cell death. *Cancer Res* 65: 999–1006.

Boden G, Chen X, Ruiz J, van Rossum GDV, Turco S (1996). Effects of vandyl sulfate on carbohydrate and lipid metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 45:1130–5.

Boren J, Cascante M, Marin S, Comín-Anduix B, Centelles JJ, Lim S et al. (2001). *J Biol Chem* 276:37747–37753.

Bork P, Sander C, Valencia A. (1993). Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: the hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Prot Sci* 2:31–40.

Bosch F, Hatzoglou M, Park EA, Hanson BW (1990). Vanadate inhibits expression of the gene phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in rat hepatoma cells. *J Cell Biochem* 23:13677–82.

Brichard SM, Henquin J-C (1995). The role of vanadium in the management of diabetes. *Trends Pharmacol Sci* 16:265–70.

Brown J. (1962). *Metabolism* 11:1098–1112.

Bruce A, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P (2002). "Proton Gradients Produce Most of the Cell's ATP". *Molecular Biology of the Cell*. Garland. ISBN 0-8153-4072-9.

Bryson JM, Coy PE, Gottlob K, Hay N, Robey RB. (2002) Increased hexokinase activity, of either ectopic or endogenous origin, protects renal epithelial cells against acute oxidant-induced cell death. *J Biol Chem* 277:11392–11400.

Buczowska M, Bodtke A, Lindequist U, Gdaniec M, Bednarski P, 2011. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 344:605–616.

Burkle A (2000) Poly(ADP-ribosyl)ation, genomic instability and longevity. *Ann NY Acad Sci* 2000;908:126–32.

Bustamante E, Pedersen PL. (1977). High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:3735–3739.

## C

Calamai P, Carotti S, Guerri A, Mazzei T, Messori L, Mini E, Orioli P, Speroni GP. (1998) Cytotoxic effects of gold(III) complexes on established human tumor cell lines sensitive and resistant to cisplatin. *Anticancer Drug Des.* 13(1):67–80.

Calesnick B, Dilan AM (1988) Zinc deficiency and zinc toxicity. *Am Fam Physician* 37: 267-270.

Campanacci M. (2003) *Bone and soft tissue tumors*. 2<sup>nd</sup> Edition. ISBN 3-211-83235-1 Springer- Verlag Wien New York

Cantley LC, Resh M, Guidotti G (1978) Vanadate inhibits the red cell (Na,K)ATPase from the cytoplasmic side. *Nature* 27:552–4.

Capella LS, Alcantara JS, Maura-Neto V, Lopes AG, Capella MA (2000). Vanadate is toxic to adherent-growing multidrug-resistant cells. *Tumor Biol* 21:54–62.

Cardenas ML, Cornish-Bowden A, Ureta T. (1998). Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim Biophys Acta* 1401:242–264.

Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 2002;1:9.

Carroll E. Cross, Barry Halliwell, Edward T. Borish, William A. Pryor, Bruce N. Ames, Robert L. Saul, Joe M. McCord, and Denham Harman. Oxygen Radicals and Human Disease. *Ann Intern Med.* 1987;107(4):526-545

Castresana J, Saraste M. Evolution of energetic metabolism: the respiration-early hypothesis Volume 20, Issue 11, November 1995, Pages 443–448

Cattaneo A, Biocca S, Corvaja N, Calissano P. (1985). Nuclear localization of a lactic dehydrogenase with single-stranded DNA-binding properties. *Exp Cell Res* 161:130–140.

Cavenagh JD, Cahill MR, Kelsey SM (1998). Adhesion molecules in clinical medicine. *Crit Rev Clin Lab Sci* 55:415–59.

Chakravarty PK, Ghosh A, Chowdhury JR. Zinc in human malignancies. *Neoplasma.* 1986; 33(1):85–90.

Chang KL, Hung TC, Hsieh BS, Chen YH, Chen TF, Cheng HL. (2006). Zinc at pharmacologic concentrations affects cytokine expression and induces apoptosis of human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition.*

Chanutin A. and Curnish R.R (1967). The effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 121: 96.

Charalabopoulos A, Karkabounas S, Charalampopoulos A, Papalimneou V, Loachim E, Giannakopoulos X (2002) Inhibition of benzo[a]pyrene induced carcinogenesis by vitamin C alone and by pairs of vitamin C –vitamin E and Selenium-Glutathion. *Biol Trace Elem Res.* 93(1-3): 201-212.

Charalambopoulos K, Karkabounas S, Loachim E, Papalimneou V, Sirigos K, Evangelou A, Agnantis N and Hadjiiliadis N (2002). Antitumour and toxic effects on Wistar rats of two new platinum complexes. *European Journal of Clinical Investigation* 32 (2) : 129-133.

Charalabopoulos K, Kotsalos A, Karkabounas S, Vezyraki P, Kalfakakou V, Metsios A, Kolias C, Charalabopoulos A, Batistatou A, Evangelou A, Scand J (2006). Low selenium levels in serum and increasing concentrations in neoplastic tissues in patients with colorectal cancer: Correlation with serum carcinoembryonic antigen. *Gastroenterol* 41(3):359-360.

Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME (2012) Zinc and human health: an update. *86(4):521-34*.

Chen R.W., Saunders P.A., Wei H., Li Z., Seth P., Chuang D.M., Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and p53 in neuronal apoptosis: evidence that GAPDH is upregulated by p53, *J. Neurosci.* 19 (1999) 9654–9662.

Chi, S.L., Wahl, M.L., Mowery, Y.M., Shan, S., Mukhopadhyay, S., Hilderbrand, S.C., Kenan, D.J., Lipes, B.D., Johnson, C.E., Marusich, M.F., et al. (2007). Angiostatin-like activity of a monoclonal antibody to the catalytic subunit of F1F0 ATP synthase. *Cancer Res.* 67, 4716–4724.

Cho J, King J, Qian X, Harwood A, and Shears S (2008). Dephosphorylation of 2,3-bisphosphoglycerate by MIPP expands the regulatory capacity of the Rapoport–Luebering glycolytic shunt. *PNAS* 105(16): 5998-6003.

Chohan Z. H., Arif M., Sarfraz M., 2007. *Appl. Organomet. Chem.* 21:294.

Christiansen JJ, Rajasekaran AK. (2006). Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res.* 66(17):8319–26.

Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Wu, N., Asara, J.W., and Cantley, L.C. (2008). Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine binding protein. *Nature* 452, 181–186.

Chuang DM, Hough C, Senatorov VV. (2005). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:269–290.

Ciranni R, Antonetti M, Migliore L (1995). Vanadium salts induce cytogenic effects in in vivo treated mice. *Mut Res* 343:53–60.

Clegg MS, Hanna LA, Niles BJ, Momma TY, Keen CL (2005) Zinc deficiency-induced cell death. *IUBMB Life* 57:661–669

[208]

Colin M, Madoulet C, Baccard N, Arsac F, Jardiller JC (1994). Study of sodium orthovanadate as a reverser of multidrug resistance on lymphoblastic leukemic CEM/VLB100 cells. *Anticancer Res* 14:2383–7.

Comin-Anduix B, Boren J, Martinez S, Moro C, Centelles JJ, Trebukhina R et al. (2001). *Eur J Biochem* 268:4177–4182.

Condeelis, J., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263–266.

Cortizo A-M, Bruzzone L, Molinueve S, Echevery S-B (2000). A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity and the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines. *Toxicology* 147:89–99.

Costello LC, Franklin RB. (2006). The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. *Mol Cancer*. 5:17.

Coy JF, Dressler D, Wilde J, Schubert P. (2005). Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer. *Clin Lab* 51:257–273.

Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B.E., Forster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V.H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., et al. (2003). HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112, 645–657.

Culmsee, C., and Mattson, M.P. (2005). p53 in neuronal apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 761–777.

## D

Dang CV, Semenza GL. (1999) Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 24: 68–72.

Daskalou T, Karkabounas S, Binolis J, Toliopoulos I, Nanou G, Karabatakis N (2005). 2,3-DPG inhibits PAF induced platelet aggregation. XXX<sup>th</sup> World Congress of the International Society of Hematology, September 28 – October 2, 2005, Istanbul, Turkey. Abstract 608, Abstract book pg 255.



Dastoor Z, Dreyer JL. (2001). Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *J Cell Sci* 114:1643–1653.

D’Cruz OJ, Uckum FM (2000). Vanadocene mediated in vivo male germ cell apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 166:186–95.

DeBarardinis R., Julian L., Hatzivasiliou G., Thompson C. (2008) The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab.* (1):11-20.

Degani H, Gohin M, Karlsh SJD, Shechter Y (1981). Electron paramagnetic studies and insulin like effects of vanadium in rat adipocytes. *Biochemistry* 20:5795–9

De Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2000; 18(16):2938–47.

De Lena M, Lorusso V, Latorre A, Fanizza G, Gargano G, Caporusso L et al. (2001). *Eur J Cancer* 37:364–368.

Dharwan S, Singh S, Aggarwal BB (1997). Induction of endothelial cell surface adhesion molecules by tumor necrosis factor is blocked by protein tyrosine phosphatase inhibitors: role of nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B. *Eur Immunol* 27:2172–9.

Dhawan DK, Chadha VD (2010) Zinc: a promising agent in dietary chemoprevention of cancer. *Indian J Med Res* 132(6):676–682

Di Cosimo S, Ferretti G, Papaldo P, Carlini P, Fabi A, Cognetti F. (2003). *Drugs Today (Barc)* 39:157–174.

Dineley K. E., Votyakova T. V. and Reynolds I. J. (2003) Zinc inhibition of cellular energy production: implications for mitochondria and neurodegeneration. *J. Neurochem.* 85, 563–570.

Ding M, Li JJ, Leonard SS (1999). Vanadate-induced activation of activator protein-1. Role of reactive oxygen species. *Carcinogenesis* 20:663–8.

Divakaruni Ajit S. and Brand Martin D. (2011) The Regulation and Physiology of Mitochondrial Proton Leak. 26 : 192-205.

Doige CA, Yu X, Sharom FJ (1992). ATPase activity of partially purified P-glycoprotein from multidrug resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta* 1109:149–60.

Domingo JL, Gomez M, Sanchez DJ, Llobet JM, Keen CL (1995) Toxicology of vanadium compounds in diabetic rats: the action of chelating agents on vanadium accumulation. *Mol Cell Biochem* 153:233–40.

Dumas Jean-François, Roussel Damien and Servais Stéphane (2012). Mitochondria and cancer. *Cellular Bioenergetics in Health and Diseases: New Perspectives in Mitochondrial Biology*, 115-147, ISBN: 978-81-308-0487-3.

## E

Eckhardt S. Recent progress in the development of anticancer agents. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2002; 2(3):419–39

Edel J, Sabbioni E (1988). Retention of intratracheally instilled and ingested tetravalent and pentavalent vanadium in rat. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 21:23–30.

Elinder CG (1986) Health hazards from environmental or occupational exposure to cadmium. *Suppl* 7:24-30.

El-Serag HB, Rudolph KL (2007) Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132: 2557–2576.

Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. (2004) Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 64: 3892–3899.

English L, Macara JG, Cantley LC (1983) Vanadium stimulates (Na, K)ATPase in friend erythroleukemia cells and blocks erythropoiesis. *J Cell Biol* 97:1299–302.

Erer H., Yesilel O. Z., Darcan C., 2009. *Polyhedron* 28:3087–3093.

Erler, J.T., Bennewith, K.L., Nicolau, M., Dornhofer, N., Kong, C., Le, Q.T., Chi, J.T., Jeffrey, S.S., and Giaccia, A.J. (2006). Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 440, 1222–1226.

Esteban, M.A., Tran, M.G., Harten, S.K., Hill, P., Castellanos, M.C., Chandra, A., Raval, R., O'Brien, T.S., and Maxwell, P.H. (2006). Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor. *Cancer Res.* 66, 3567–3575.

Evangelou A, Karkabounas S and Tsoukatos D (1990). 2,3-Diphosphoglycerate : a potent physiological inhibitor of platelet aggregation, induced by Platelet Activating Factor (PAF), in vitro. *Chimica Chronica New Series* 19 (3-4): 243-246.

Evangelou A, Kalpouzos G, Karkabounas S, Liasko R, Nonni A, Stefanou D, Kallistratos G (1997). Dose-related preventive and therapeutic effects of antioxidants – anticarcinogens on experimentally induced malignant tumors in Wistar rats. *Cancer Letters* 115: 105-111.

Evangelou A, Karkabounas S, Kalpouzos G, Malamas M, Liasko R, Stefanou D, Vlahos A, Kabanos T (1997). Comparison of the therapeutic effects of two Vanadium complexes administrated at low doses on benzo(a)pyrene-induced malignant tumors in rats. *Cancer Letters* 118: 1-5.

## F

Faivre, S., Kroemer, G., and Raymond, E. (2006). Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 671–688.

Fantin, V.R., St-Pierre, J., and Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9, 425–434

Farrell N (1989). *Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents.*

Fawcett JP, Farquhar SJ, Thou T, Shand BI (1997). Oral vanadyl sulfate does not affect blood cells, viscosity or biochemistry in humans. *Pharmacol Toxicol* 80:202–6.

Feo S, Arcuri D, Piddini E, Passantino R, Giallongo A. (2000). ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). *FEBS Lett* 473:47–52.

Filella X, Molina R, Jo J, Mas E, Ballesta AM. (1991). Serum phosphohexose isomerase activities in patients with colorectal cancer. *Tumour Biol* 12:360–367.

Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., et al. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 109, 3812–3819.

Floridi A, Paggi MG, Marcante ML, Silvestrini B, Caputo A, De Martino C. (1981). *J Natl Cancer Inst* 66:497–499.

Formentini, L., Martinez-Reyes, I., and Cuezva, J.M. (2010). The mitochondrial bioenergetic capacity of carcinomas. *IUBMB Life* 62, 554–560.

Fraker PJ (2005) Roles for cell death in zinc deficiency. *J Nutr* 135:359–362

Frankel A, Man S, Elliott P, Adams J, Kerbel RS. (2000). Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. *Clin Cancer Res.* 6(9):3719–28.

Franklin RB, Costello LC. (2007). Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers. *Arch Biochem Biophys.* 463(2):211–7.

Franklin RB, Costello LC. The important role of the apoptotic effects of zinc in the development of cancers. *J Cell Biochem.* 2009; 106(5):750–7.

Funasaka T, Haga A, Raz A, Nagase H. (2001). Tumor autocrine motility factor is an angiogenic factor that stimulates endothelial cell motility. *Biochem Biophys Res Commun* 285:118–128.

Funasaka T, Haga A, Raz A, Nagase H. (2002). Autocrine motility factor secreted by tumor cells upregulates vascular endothelial growth factor receptor (Flt-1) expression in endothelial cells. *Int J Cancer* 101:217–223.

Funes, J.M., Quintero, M., Henderson, S., Martinez, D., Qureshi, U., Westwood, C., Clements, M.O., Bourboulia, D., Pedley, R.B., Moncada, S., and Boshoff, C. (2007). Transformation of human mesenchymal stem cells in creases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 6223–6228.

## G

Galanski M, Arion VB, Jakupec MA, Keppler BK. Recent developments in the field of tumorinhibiting metal complexes. *Curr Pharm Des.* 9(25):2078–89

Galanski M, Jakupec MA, Keppler BK. Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches. *Curr Med Chem.* 12(18):2075–94.

Galluzzi, L., Larochette, N., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2006). Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4812–4830.

Gambhir SS. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer* 2: 683–693, 2002.

Gao E, Sun T, Liu S, Shuang M, Zheng W, Wang Y, Zhu M, Wang L, Gao X, Guan F, Guo M, Liu F, (2010). *European Journal of Medicinal Chemistry* 45:4531-4538.

Gatenby, R.A., and Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4, 891–899.

Georgiou E, Metsios A, Verginadis I, Kourkoumelis N, Karkabounas S, Charalabopoulos K, Badeka A, Hadjikakou S (2011). Inhibition of lipoxygenase (LOX) and anticancer activity caused by gold (I) mixed ligands complexes of triphenylphosphines and thioamides. *Journal of Enzymes Inhibition and Medicinal Chemistry* 26(4): 592 – 597.

Geschwind JF, Ko YH, Torbenson MS, Magee C, Pedersen PL. (2002). *Cancer Res* 62:3909–3913.

Geschwind JF, Georgiades CS, Ko YH, Pedersen PL. (2004). *Expert Rev Anticancer Ther* 4:449–457.

Ghiso JA Aguirre, Farias EF, Alonso DF, Bal de Kier Joffe E (1998). Secretion of urokinase and metalloproteinase-9 induced by asturosporine is dependent on tyrosine kinase pathway in mammary tumor cells. *Int J Cancer* 76:362–7.

Glodek C, 1990. A history of the Michigan Cancer Foundation, the beginning and growth of Detroit's anticancer movement. Michigan Cancer Foundation, Detroit, page 68.

Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. (2008) Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol.* 2008 Apr;18(4):165-73.

Goldfine AB, Simonson DC, Folli F, Patti ME, Kahn CR (1995) Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Endocrinol Metabol* 80:3311–20.

Goldwasser I, Gefel D, Gershonov E, Fridkin M, Scheckter Y. Insulin-like effects of vanadium (2000). Basic and clinical implications. *J Inorg Biochem* 80:21–5.

Golshani-Hebroni SG, Bessman SP. (1997). Hexokinase binding to mitochondria: a basis for proliferative energy metabolism. *J Bioenerg Biomembr* 29:331–338.

Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N. (2001). Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev* 15:1406–1418.

Gottschalk S, Anderson N, Hainz C, Eckhardt SG, Serkova NJ. (2004). *Clin Cancer Res* 10:6661–6668.

Greenwald I (1925). A new type of phosphoric acid isolated from blood, with some remarks on the effect of substitution on the rotation of L-glyceric acid. *J. Biol. Chem.* 63:339

Grosse F, Nasheuer HP, Scholtissek S, Schomburg U. (1986). Lactate dehydrogenase and glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase are single-stranded DNA-binding proteins that affect the DNA-polymerase-alpha-primase complex. *Eur J Biochem* 160:459–467.

Guppy, M., Greiner, E., and Brand, K. (1993). The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes. *Eur. J. Biochem.* 212, 95–99.

Gupta SK, Singh SP, Shukla VK. (2005). Copper, zinc, and Cu/Zn ratio in carcinoma of the gallbladder. *J Surg Oncol.* 91(3):204–8.

## H

Haidas S, Zannos-Mariolea L, Matsaniotis N (1976). 2,3-diphosphoglycerate levels in children with iron deficiency anemia and acute leukemia. *Acta Paediatr. Scand.* 65(1): 12-16.

Hamel FG, Duckworth WC (1995). The relationship between insulin and vanadium metabolism in insulin target tissues. *Mol Cell Biochem* 153:95–102

Hanahan, D., Weinberg R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.

Hadjikakou S, Antoniadis C, Hadjiliadis N, Karkabounas S et al (2005) Synthesis and characterization of a new water stable antimony (III) complex with pyrimidine-2-thione and in vitro biological study. *Inorganica Chimica Acta* 358 (10): 2861 – 2866.

Hadjikakou S, Ozturk I, Xanthopoulou M, Zachariadis P, Zartilas S, Karkabounas S, Hadjiliadis N (2008) Synthesis, structural characterization and biological study of new organotin(IV), silver(I) and antimony(III) complexes with thioamides. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102(5-6): 1007-1015.

Harder HC and Rosenberg B (1970). Inhibitory effects of anti-tumor platinum compounds on DNA, RNA and protein syntheses in mammalian cells in vitro. *Int J Cancer*. 6(2):207-16.

Harding MM, Moksdi G (2000). Antitumor metallocenes: structure-activity studies and interactions with biomolecules. *Curr Med Chem*;7:1289–93.

Harrap KR (1985). Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative. *Cancer Treat Rev*. 12(Suppl A):21–33

Harrison RA. (1974). The detection of hexokinase, glucosephosphate isomerase and phosphoglucomutase activities in polyacrylamide gels after electrophoresis: a novel method using immobilized glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Anal Biochem* 61:500–507.

Heiden MG, Lunt SY, Dayton TL, Fiske BP, Israelsen WJ, Mattaini KR, Vokes NI, Stephanopoulos G, Cantley LC, Metallo CM, and Locasale JW (2012). Metabolic Pathway Alterations that Support Cell Proliferation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011 76: 325-334.

Heinz A, Rubinson KA, Grantham JJ (1982). The transport and accumulation of oxyvanadium compounds in human erythrocytes in vitro. *J Lab Clin Med* 100:593–612.

Herrero P, Galindez J, Ruiz N, Martinez-Campa C, Moreno F. (1995). Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HXK1, HXK2 and GLK1 genes. *Yeast* 11:137–144.

Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Anderson KC. (2001) The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res*. 61(7):3071–6.

Hirono Y, Fushida S, Yonemura Y, Yamamoto H, Watanabe H, Raz A. (1996). Expression of autocrine motility factor receptor correlates with disease progression in human gastric cancer. *Br J Cancer* 74:2003–2007.

Holko P, Ligeza J, Kisielewska J (2008). The effect of vanadyl sulphate (VOSO<sub>4</sub>) on autocrine growth of human epithelial cancer cell lines. *Pol J Pathol* 59: 3-8.

Hou H, Khan N, O'Hara J, Grinberg O, Dunn J, Abajian M, Wilmot C, Wilmot C, Makki M, Demidenko E, Lu Sh, Steffen R, Swartz H (2004). Effect of RSR13, an allosteric hemoglobin modifier, on oxygenation in murine tumors: an in vivo electron paramagnetic resonance oximetry and bold MRI study. *International Journal of Radiation Oncology* [59\(3\)](#): 834-843.

Huang C, Chen N, Ma WY, Dong Z (1998). Vanadium induces AP-1 and NF-kappaB dependent transcription activity. *Int J Oncol* 13:711–5.

## I

Iatridis SG, Iatridis PG, Markidou SG, Ragatz BH (1975). 2,3-diphosphoglycerate: a physiological inhibitor of platelet aggregation. *Science* 187(4176) :259-61.

Iatridis PG, Hadd H, Kotrotsou M, Iatridis SG (1986). The combined effects of 2,3-DPG and Na-arachidonate on platelet aggregation and on TXA<sub>2</sub> formation. *Thromb Res.*42(2): 177-85.

Igney, F.H., and Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 2, 277–288.

Ishikawa, K., Takenaga, K., Akimoto, M., Koshikawa, N., Yamaguchi, A., Imanishi, H., Nakada, K., Honma, Y., and Hayashi, J.-I. (2008). ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* 320, 661–664.

Ishitani R, Chuang DM. (1996). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antisense oligodeoxynucleotides protect against cytosine arabinonucleoside-induced apoptosis in cultured cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9937–9941

Itkes AV, Imamova LR, Alexandrova NM, Favorova OO, Kisselev LL (1990) Expression of c-myc gene in human ovary carcinoma cells treated with vanadate. *Exp Cell Res* 188:169–71.

Izyumov DS, Avetisyan AV, Pletjushkina OY, Sakharov DV, Wirtz KW, Chernyak BV et al. (2004). *Biochim Biophys Acta* 1658:141–147.



[217]

J

Jacobs A, 1970. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 277:168

Jaspers I, Samet JM, Erzurum S, Reed W (2000). Vanadium-induced kB dependent transcription depends upon peroxide-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23:95–102.

Johnson FA and Stonehill RB (1961). Chemical pneumonitis from inhalation of zinc chloride. *Dis Chest*. 40:619-24.

K

Kalfakakou VP, Evangelou AM, Benveniste J, Arnoux B (1993). The effects of Zn<sup>2+</sup> on guinea pig isolated heart preparations. *Biol Trace Elem Res*. 38(3):289-99

Kallistratos G, Fasske E, Karkabounas S, Charalampopoulos K (1988). Prolongation of the survival time of tumor bearing Wistar rats through a simultaneous oral Administration of Vitamins C and E and Selenium and glutathione. *Prog. Clin. Biol. Res* 259: 377-389.

Kallistratos G, Evangelou A, Agnantis N, Fasske E, Karkabounas S, Donos A (1994). Enhancement of the antineoplastic effect of anticarcinogens on benzo(a)pyrene-treated rats, in relation to their number and biological activity. *Cancer Letters* 82: 153-165.

Kang HT, Hwang ES. (2005). *Life Sci* 78:1392–1399.

Kanik-Ennulat C, Neff N (1990). Vanadate-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* show alterations in protein phosphorylation and growth control. *Mol Cell Biol* 10:898–909.

Καρκαμπούνας Σ (1990). Ενδογενείς και Εξωγενείς αναστολείς του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων. Διδακτορική διατριβή. Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων. Έκδοση Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Karkabounas S, Evangelou A, Tsoukatos D, Charalampopoulos K, Sofis G, Stefanou P, Karabetos D (1992). Biological activity and Chemical Structure of PAF inhibitors: Inhibition by glyceryl phosphate compounds of PAF – induced platelet aggregation, ex vivo. *Giorn. Ital. Patol. Clin. VII*: 147-153.

Katsoulakou E, Tiliakos M, Papaefstathiou G, Terzis A, Raptopoulou C, Geromichalos G, Papazisis K, Papi R, Pantazaki A, Kyriakidis D, Cordopatis P, Manessi-Zoupa E. (2008) Diorganotin(IV) complexes of dipeptides containing the α-aminoisobutyryl residue (Aib):

Preparation, structural characterization, antibacterial and antiproliferative activities of [(n-Bu)<sub>2</sub>Sn(H<sub>2</sub>L)] (LH = H-Aib-L-Leu-OH, H-Aib-L-Ala-OH) *J Inorg Biochem* 102: 1397–1405.

Keppler BK. (1993) *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*.

Kim HS, Hwang JT, Yun H, Chi SG, Lee SJ, Kang I, Yoon KS, Choe WJ, Kim SS, Ha J (2008). Inhibition of AMP-activated protein kinase sensitizes cancer cells to cisplatin-induced apoptosis via hyper-induction of p53. *J Biol Chem*. 283(7):3731-42.

Kim W., Yoon, J.H., Jeong, J.M., Cheon, G.J., Lee, T.S., Yang, J.I., Park, S.C., and Lee, H.S. (2007b). Apoptosis-inducing antitumor efficacy of hexokinase II inhibitor in hepatocellular carcinoma. *Mol. Cancer Ther.* 6, 2554–2562.

Klein A, Holko P, Ligęza J (2008). Sodium orthovanadate affects growth of some human epithelial cancer Cells (A549, DU145, HTB44). *Folia Biol Krakow* 56: 115-121.

Ko YH, Pedersen PL, Geschwind JF. (2001). *Cancer Lett* 173: 83–91.

Ko YH, Smith BL, Wang Y, Pomper MG, Rini DA, Torbenson MS et al. (2004). *Biochem Biophys Res Commun* 324:269–275.

Kondoh, H., Leonart, M.E., Gil, J., Wang, J., Degan, P., Peters, G., Martinez, D., Carnero, A., and Beach, D. (2005). Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res.* 65, 177–185.

Konidaris Konstantis F., Giouli Maria, Raptopoulou Catherine P., Psycharis Vassilis, Verginadis Ioannis I., Vasiliadis Anastasios, Afendra Amalia S., Karkabounas Spyridon, Manessi-Zoupa Evy, Stamatatos Theocharis C. (2012) "Employment of pyridyl oximes and dioximes in zinc(II) chemistry: Synthesis, structural and spectroscopic characterization, and biological Evaluation". *Inorganica Chimica Acta* 396: 49-59.

Kontargiris E, Vadalouka A, Ragos V, Kalfakakou V (2012). Zinc inhibits apoptosis and maintains NEP downregulation, induced by ropivacaine, in HaCaT cells. *Biol Trace Elem Res.* 150(1-3):460-6.

Κουτσελίνης Α (1997). *Τοξικολογία, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα*.

Kopf-Maier P, Krahl D (1983). Tumor inhibition by metallocenes: ultrastructural localization of titanium and vanadium in treated tumor cells by electron energy loss spectroscopy. *Chem Biol Interactions* 44:317–28.

Kopf-Maier P (1994). Complexes of metals other than platinum as antitumor agents. *Eur J Clin Pharmacol* 47:1–16.

Kordowiak AM, Klein A, Goc A (2007). Comparison of the effect of VOSO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and NaVO<sub>3</sub> on proliferation, viability and morphology of H35-19 rat hepatoma cell line. *Pol J Pathol* 58: 51-57.

Kovala-Demertzi D., Yadav P. N., Wiecek J., Skoulika S., Varadinova T., Demertzis A. (2006). *J. Inorg. Biochem*, 100, 1558–1567

Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* 87, 99–163.

Kyros L, Kourkoumelis N, Kubicki M, Male L, Hursthouse M, Verginadis I, Gouma E, Karkabounas S, Charalabopoulos K, Hadjikakou S (2010). Structural properties, cytotoxicity and anti-inflammatory activity of silver (I) complexes with tris(p-tolyl)phosphine and 5-Chloro-2-mercaptobenzothiazole. *Bioinorganic Chemistry and Applications* : 1-12.

## L

Lardner, A. (2001). The effects of extracellular pH on immune function. *J. Leukoc. Biol.* 69, 522–530.

Layzer RB, Rowland LP, Bank WJ. (1969). Physical and kinetic properties of human phosphofructokinase from skeletal muscle and erythrocytes. *J Biol Chem* 244:3823–3831.

Lehninger Albert, Principles of Biochemistry, Fourth Edition, David L. Nelson and Michael M. Cox, (2008).

Lelong IH, Cardarelli CO, Gottesman MM, Pastan I (1994). GTP-stimulated phosphorylation of P-glycoprotein in transporting vesicles from KB-V1 multidrug resistant cells. *Biochemistry* 33:8992–9.

Levenson A.S., Jordan V.C. (1997). MCF 7 the first hormone –responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* 57(15):3071-8

Li C, Xiao Z, Chen Z, Zhang X, Li J, Wu X et al. (2006). Proteome analysis of human lung squamous carcinoma. *Proteomics* 6:547–558.

Li M, Zhang Y, Liu Z, Bharadwaj U, Wang H, Wang X, Zhang S, Liuzzi JP, Chang SM, Cousins RJ, Fisher WE, Brunicardi FC, Logsdon CD, Chen C, Yao Q. (2007). Aberrant expression of zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) significantly contributes to human pancreatic cancer pathogenesis and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(47):18636–41.

Liasko R, Karkabounas S, Kabanos Th (2000). Antitumor effects of a vanadium complex with cysteine on malignant cell lines and tumor-bearing Wistar rats. *Metal Ions Biol Med* 6:577–9.

Lichten LA, Cousins RJ: Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu Rev Nutr* 2009; 29: 153–176.

Lieberthal W, Menza SA, Levine JS. (1998). *Am J Physiol Renal Physiol* 274:F315–F327.

Liguori P, Valentini A, Palma M, Bellusci A, Bernardini S, Ghedini M, Panno M, Pettinari C, Marchetti F, Crispini A, Pucci D, 2010. *Dalton Trans.* 39:4205–4212

Liotta LA, Mandler R, Murano G, Katz DA, Gordon RK, Chiang PK et al. (1986). Tumor cell autocrine motility factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3302–3306.

Little E, Ramakrishnan M, Roy B, Gazit G, Lee AS. (1994). *Crit Rev Eukaryotic Gene Expression* 4:1–18.

Liu H, Hu YP, Savaraj N, Priebe W, Lampidis TJ. (2001). *Biochemistry* 40:5542–5547.

Liu H, Savaraj N, Priebe W, Lampidis TJ. (2002). *Biochem Pharmacol* 64:1745–1751.

Lopez-Rios, F., Sanchez-Arago, M., Garcia-Garcia, E., Ortega, A.D., Berrendero, J.R., Pozo-Rodriguez, F., Lopez-Encuentra, A., Ballestin, C., and Cuezva, J.M. (2007). Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res.* 67, 9013–9017.

Lowry OH, Berger SJ, Carter JG, Chi MM, Manchester JK, Knor J & Pusateri ME (1983) Diversity of metabolic patterns in human brain tumors: enzymes of energy metabolism and related metabolites and cofactors. *J Neurochem* 41, 994–1010.

Luber B, Candidus S, Handsbusch G (2000). Tumor derived mutated E-cadherin influences beta-catenin localization and increases susceptibility to actin cytoskeletal changes induced by pervanadate. *Cell Adhes Commun* 7:391–408.

Luber K, Siess W (1994). Integrin-dependent protein dephosphorylation on tyrosine induced by activation of the thrombin receptor in human platelets. *Cell Signal* 6:279–84.

Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM (2009). Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med*. 133(9):1463-7.

Lynch RM, Fogarty KE, Fay FS. (1991). Modulation of hexokinase association with mitochondria analyzed with quantitative three-dimensional confocal microscopy. *J Cell Biol* 112:385–395.

## M

Macara IG, McLead GC, Kustin K (1979). Isolation properties and structural studies on a compound from tunicate blood cells that may be involved in vanadium accumulation. *Biochem J* 181:457–65.

Maher JC, Krishan A, Lampidis TJ. (2004). *Cancer Chemother Pharmacol* 53:116–122.

Majewski N, Nogueira V, Robey RB, Hay N. (2004). Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. *Mol Cell Biol* 24:730–740.

Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D (1997). MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385:540–4.

Malo JL, Malo J, Cartier A, Dolovich J. (1990). Acute lung reaction due to zinc inhalation. *Eur Respir J*. 3(1):111-4.

Mankoff, D.A., Eary, J.F., Link, J.M., Muzi, M., Rajendran, J.G., Spence, A.M., and Krohn, K.A. (2007). Tumor-specific positron emission tomography imaging in patients: [18F] fluorodeoxyglucose and beyond. *Clin. Cancer Res*. 13, 3460–3469

Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261–1274.

Manning DL, Robertson JF, Ellis IO, Elston CW, McClelland RA, Gee JM, Jones RJ, Green CD, Cannon P, Blamey RW, et al. (1994). Oestrogen-regulated genes in breast cancer: association of pLIV1 with lymph node involvement. *Eur J Cancer*. 30A(5):675–8.

Mansur N.R., Meyer-Siegler K., Wurzer J.C., Sirover M.A, Cell cycle regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/uracil DNA glycosylase gene in normal human cells, *Nucleic Acids Res*. 21 (1993) 993–998.

Marangos PJ, Parma AM, Goodwin FK. (1978). Functional properties of neuronal and glial isoenzymes of brain enolase. *J Neurochem* 31:727–732.

Maret W (2003) Cellular zinc and redox states converge in the metallothionein/thionein pair. *J Nutr* 133:1460-1462.

Margalioth EJ, Schenker JG, Chevion M. (1983). Copper and zinc levels in normal and malignant tissues. *Cancer* 52(5):868–72.

Margulis, Lynn, ed., 1991, *Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis*, The MIT Press, ISBN 0-262-13269-9

Margulis, Lynn, 1970, *Origin of Eukaryotic Cells*, Yale University Press, ISBN 0-300-01353-1

Margulis, Lynn, 1992, *Symbiosis in Cell Evolution: Microbial Communities in the Archean and Proterozoic Eons*, W.H. Freeman, ISBN 0-7167-7028-8

Margulis, Lynn, 1998, *Symbiotic Planet : A New Look at Evolution*, Basic Books, ISBN 0-465-07271-2

Margulis, Lynn, and Dorion Sagan, 2002, *Acquiring Genomes: A Theory of the Origins of Species*, Perseus Books Group, ISBN 0-465-04391-7

Marin-Hernandez A, Rodriguez-Enriquez S, Vital-Gonzalez PA, Flores-Rodriguez FL, Macias-Silva M, Sosa-Garrocho M & Moreno-Sanchez R (2006) Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an overexpressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J* 273, 1975–1988.

Martin C, Berrige G, Mistry P, Higgins C, Charlton P, Callaghan R (2000). Drug binding sites on P-glycoprotein are altered by ATP binding prior to nucleotide hydrolysis. *Biochemistry* 39:11901–6.

Martin DS, Spriggs D, Koutcher JA. (2001). *Apoptosis* 6:125–131.

Maruyama W., Akao Y., Youdim M.B., Davis B.A., Naoi M., Transfectionenforced Bcl-2 overexpression and an anti-Parkinson drug, rasagiline, prevent nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by an endogenous dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R) salsolinol, *J. Neurochem.* 78 (2001) 727–735.

Maschek G, Savaraj N, Priebe W, Braunschweiger P, Hamilton K, Tidmarsh GF et al. (2004). *Cancer Res* 64:31–34.

Masuda H, Tanaka T, Takahama U (1994). Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun.* 203(2):1175-80.

Mathupala S, Koc Y, Pedersenb P. (2009) Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer's stygian link to the "Warburg effect" and a pivotal target for effective therapy. *J.semancer. Review.*

Matoba, S., Kang, J.G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., and Hwang, P.M. (2006). p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312, 1650–1653.

Matsumoto K, Yamamoto S, Yoshikawa Y, Doe M., Kojima Y, Sakurai H. Hashimoto H. Kajiwara M. Naemi B. 2005. *Chem. Soc. Jpn.* 78:1077–1081.

Matsuyoshi N, Hamagushi M, Tanigushi S, Nagafuchi A, Tsukita S, Tackeishi M (1992). Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by the v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J Cell Biol* 118:703–14.

Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E. (2005). Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol* 15:300–308.

McGlynn KA, Tsao L, Hsing AW, Devesa SS, Fraumeni JF (2001) Jr. International trends and patterns of primary liver cancer. *Int J Cancer* 94:290–296.

Meldolesi MF, Macchia V & Laccetti P (1976) Differences in phosphofructokinase regulation in normal and tumor rat thyroid cells. *J Biol Chem* 251, 6244–6251.

Merritt K, Brown SA (1995). Distribution of titanium and vanadium followed repeated injection of high-dose salts. *J Biomed Mater Res* 29:1175–8.

Metsios A, Verginadis I, Simos Y, Batistatou A, Peschos D, Ragos V, Vezyraki P, Evangelou A, Karkabounas S (2012) Cytotoxic and anticancer effects of the triorganotin compound [(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>Sn(cmbzt)]: An in vitro, ex vivo and in vivo study. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 47: 490–496.

Miyamoto, S., Murphy, A.N., and Brown, J.H. (2008). Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ.* 15, 521–529.

Mocchegianni E, Muzzioli M (2000). Zinc, metallothioneins, immune responses, survival and ageing. *Biogerontology* 1:133-143.

Molinuevo MS, Barrio DA, Cortizo AM (2004) Antitumoral properties of two new vanadyl(IV) complexes in culture: role of apoptosis and oxidative stress. *Cancer Chemother Pharmacol* 53: 163-172.

Montero MR, Guerri C, Grisolia S (1981). Vanadate, alcohol or both increase passive membrane permeability of neuro-2a cells; lesser sensitivity of Hep-2 cells. *Life Sci* 28:641–6.

Munoz-Pinedo C, Ruiz-Ruiz C, Ruiz de Almodovar C, Palacios C, Lopez-Rivas A. (2003). *J Biol Chem* 278:12759–12768.

Murakami M, Hirano T. (2008). Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. *Cancer Sci.* 99(8): 1515–22.

## N

Nabi IR, Watanabe H, Raz A. (1990). Identification of B16-F1 melanoma autocrine motility-like factor receptor. *Cancer Res* 50:409–414.

Nagy E, Henics T, Eckert M, Miseta A, Lightowlers RN, Kellermayer M. (2000). Identification of the NAD(+)-binding fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel RNA-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* 275:253–260.

Nakashima RA, Paggi MG, Scott LJ & Pedersen PL (1988) Purification and characterization of bindable form of mitochondrial bound hexokinase from the highly glycolytic AS-30D rat hepatoma cell line. *Cancer Res* 48, 913–919.



Nakayama A, Hiromura M, Adachi Y, Sakurai H, 2008. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13:675.

Natali PG, Salsano F, Viora M, Nista A, Malorni W, Marolla A et al. (1984). *Oncology* 41:7–14.

Nath R, Kumar D, Li T, Singal KP (2000) Metallothioneins, oxidative stress and the cardiovascular system. *Toxicology* 155:17–26

Neckay BR, Nanninga LD, Nechay PS (1986) Vanadyl (IV) and vanadate (V) binding to selected endogenous phosphate, carboxyl and amino ligands; calculations on cellular vanadium species distribution. *Arch Biochem Biophys* 251:128–38.

Newsholme, E.A., Crabtree, B., and Ardawi, M.S. (1985). The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. *Biosci. Rep.* 5, 393–400.

Niederacher D, Entian KD. (1991). Characterization of Hex2 protein, a negative regulatory element necessary for glucose repression in yeast. *Eur J Biochem* 200:311–319.

Niinaka Y, Paku S, Haga A, Watanabe H, Raz A. (1998). Expression and secretion of neuroleukin/phosphohexose isomerase/maturation factor as autocrine motility factor by tumor cells. *Cancer Res* 58:2667–2674.

Niizeki H, Kobayashi M, Horiuchi I, Akakura N, Chen J, Wang J et al. (2002). Hypoxia enhances the expression of autocrine motility factor and the motility of human pancreatic cancer cells. *Br J Cancer* 86:1914–1919.

## O

Oskam R, Rijksen G, Staal GEJ & Vora S (1985) Isozymic composition and regulatory properties of phosphofructokinase from well-differentiated and anaplastic medullary thyroid carcinomas of the rat. *Cancer Res* 45, 135–142.

Oudard S, Carpentier A, Banu E, Fauchon F, Celerier D, Poupon MF et al. (2003). *J Neurooncol* 63:81–86.

Ozturk I, Metsios A, Filimonova-Orlova S, Kourkoumelis N, Hadjikakou S, Manos M, Tasiopoulos A, Karkabounas S, Milaeva E, Hadjiliadis N (2012). Study on single crystal structure of the antimony (III) bromide complex with 3-methyl-2-mercaptobenzothiazole and biological activity of some antimony(III) bromide complexes with thioamides. *Med. Chem. Res.* 21:3523–3531.

**P**

Page R, Matus RE, Leifer CE, Loar A (1985). Cisplatin, a new antineoplastic drug in veterinary medicine. *J Am Vet Med Assoc.* 186(3):288-90

Palecek E, Brazdova M, Cernocka H, Vlk D, Brazda V, Vojtesek B (1999) Effect of transition metals on binding of p53 protein to supercoiled DNA and to consensus sequence in DNA fragments. *Oncogene* 18(24):3617–3625

Pandey SK, Chiasson JL, Srivastava AK (1995). Vanadium salts stimulate mitogen-activated protein (MAP) kinases and ribosomal S6 kinases. *Mol Cell Biochem* 153:69–78.

Papaldo P, Lopez M, Cortesi E, Cammilluzzi E, Antimi M, Terzoli E et al. (2003). *J Clin Oncol* 21:3462–3468.

Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L., and Denko, N.C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 3, 187–197.

Parkin DM (2001). Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2:533–543.

Pasteur L. Influence de l'oxygene sur le developpement de la levure et la fermentation alcoolique [Influence of oxygen on development of yeast and alcoholic fermentation]. *Bull Soc Chim Paris* 1861; 28 June:79–80.

Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. (2002). Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 277:7610–7618.

Pastorino JG, Hoek JB. (2003). Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr Med Chem* 10:1535–1551.

Pastorino, J.G., Hoek, J.B., and Shulga, N. (2005). Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res.* 65, 10545–10554.

Patterson R.L., van Rossum D.B., Kaplin A.I., Barrow R.K., Snyder S.H. (2005) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/GAPDH complex augments Ca<sup>2+</sup> release via locally derived NADH, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:1357–1359.

[227]

Pedersen, P.L. (2007). Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 211–222.

Pelicano H, Carney D, Huang P. (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Upda*;7:97–110.

Pelicano H., Martin DS, Xu R-H, Huang P. (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25:4633-4646. Review.

Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzone, M., Giordano, S., and Comoglio, P.M. (2003). Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 3, 347–361.

Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT. Copeland WC. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res* 2001;488:119–33.

Perucho M, Salas J, Salas ML. (1980). Study of the interaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with DNA. *Biochim Biophys Acta* 606:181–195.

Plum L.M, Rink L, Haase H, (2010). The essential toxin: impact of zinc on human health. *Int J Environ Res Public Health* 7:1342-1365.

Pouyssegur, J., Dayan, F., and Mazure, N.M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441, 437–443

Prasad AS (2009). Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Curr Opinion Clin Nutr Metab Care* 12:646-652.

Provinciali M, Di Stefano G, Fabris N, 1995. Dose-dependent opposite effect of zinc on apoptosis in mouse thymocytes. *Int J Immunopharmacol.* 17(9):735–44.

## R

Rahbari R, Sheahan T, Modes V, 2009. A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques.* 46(4):277-84.

Rais B, Comin B, Puigjaner J, Brandes JL, Creppy E, Saboureau D et al. (1999). FEBS Lett 456:113–118.

Rapoport S and Guest M (1939). Decomposition of diphosphoglycerate in acidified blood: its relationship to reactions of the glycolytic cycle. J. Biol. Chem., 29:781.

Rapoport S and Wing A (1947). Dimensional, osmotic, and chemical changes of erythrocytes in stored blood. Blood preserved in sodium citrate, neutral, and acid citrate-glucose (ACD) mixtures. J Clin Invest. 26(4):591–615.

Rapoport S and Leubering J (1950). The formation of 2,3-DPG in rabbit erythrocytes: the existence of diphosphoglycerate mutase. J. Biol. Chem. 183:507.

Rapoport S and Leubering J (1951). Glycerate-2,3- diphosphatase., J. Biol. Chem. 189:683.

Rapoport S and Leubering J (1952). An Optical Study Of Diphosphoglycerate Mutase (From the Children's Hospital Research Foundation, Cincinnati, Ohio, and the Institute of Medical Chemistry of the University of Vienna, Austria) J. Biol. Chem. 196:583.

Rathmell JC, Fox CJ, Plas DR, Hammerman PS, Cinalli RM, Thompson CB. (2003). Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. Mol Cell Biol 23:7315–7328.

Reed E (1998). Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. Cancer Treat Rev. 1998 Oct;24(5):331-44

Rempel A, Mathupala SP, Griffin CA, Hawkins AL, Pedersen PL. (1996). Glucose catabolism in cancer cells: amplification of the gene encoding type II hexokinase. Cancer Res 56:2468–2471.

Ristow M. (2006). Oxidative metabolism in cancer growth. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 9:339-345. Review.

Rodriguez A, De La Cera T, Herrero P, Moreno F (2001). The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem J 355:625–631.

Ronowska A, Gul-Hinc S, Bielarczyk H, Pawełczyk T, Szutowicz A (2007). Effects of zinc on SN56 cholinergic neuroblastoma cells. Journal of Neurochemistry 103:972–983

Roodyn D.B and Wilkie D, The biogenesis of mitochondria, Methuen &co Lid, 1968.

Rosbe KW, Brann TW, Holden SA, Teicher BA, Frei III E. (1989). *Cancer Chemother Pharmacol* 25:32–36.

Rosenberg B. (1979) Anticancer activity of cis-dichlorodiammineplatinum(II) and some relevant chemistry. *Cancer Treat Rep.* 63(9-10):1433-8.

Rosenberg B, VanCamp L and Krigas T (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205:698-9.

Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. (1969) Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 222(5191):385-6.

Rusu V (2011). The true history of the first immortal cell lines of human origin. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 115(3):633-5

## S

Sabbioni E, Marafante E. (1981) Relations between iron and vanadium metabolism. The exchange of vanadium between transferrin and ferritin. *J Toxicol Environ Health* 8:419–29.

Sabbioni E, Pozzi G, Devos S, Pintar A, Gasella L, Fischbach M (1993). The intensity of vanadium (V)-induced cytotoxicity and morphological transformation in BALB/3T3 cells is dependent on glutathione mediated bioreduction to vanadium. *Carcinogenesis* 14:2565–8.

Sakurai H, Shimomura S, Fukuzawa K, Isshizu K (1980). Detection of oxovanadium (IV) and characterization of its ligand environment in subcellular fractions of the liver of rats treated with pentavalent vanadium (V). *Biochem Res Commun* 96:293–8.

Sakurai H, Tamura H, Okatani K (1995). Mechanism for a new vanadium complex: hydroxyl radical-dependent DNA cleavage by 1,10-phenanthroline-vanadyl complex in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 206:133–7.

Samet JM, Graves LM, Quay J, Dailey LA (1998). Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals. *Am J Pneumonol* 275:L551–8.

Sartzi H, Stoumpos C, Giouli M, Verginadis I, Karkabounas S, Cunha-Silva L, Escuer A, Perlepes S (2012). The “periodic table” of di-2-pyridyl ketone: Vanadium complexes. Dalton Transactions 41(39):11984-8.

Sanchez-Martinez C & Aragon JJ (1997) Analysis of phosphofructokinase subunits and isozymes in ascites tumor cells and its original tissue, murine mammary gland. FEBS Lett 409, 86–90.

Sandstead HH. (1981). Methods for determining nutrient requirement in pregnancy. Am J Clin Nutr. 34(Suppl 4):697-704

Sawa A., Khan A., Hester L.D., Snyder S.H., (1997) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 11669–11674.

Schenker MB, Speizer FE, Taylor JO (1981) Acute upper respiratory symptoms resulting from exposure to zinc chloride aerosol. Environ Res. 25(2):317-24

Schmitt SM, Frezza M, Dou QP. (2012) New applications of old metal-binding drugs in the treatment of human cancer. Front Biosci (Schol Ed) 4:375-91.

Schäfer G, Purschke W, Schmidt CL. On the origin of respiration: electron transport proteins from archaea to man. FEMS Microbiol Rev. 1996 May;18(2-3):173-88.

Schwartz AE, Leddicotte GW, Fink RW, Friedman EW. (1974). Trace elements in normal and malignant human breast tissue. Surgery. 76(2):325–9.

Scrivens PJ, Alaoui-Jamali MA, Giannini G (2003) Cdc25A- inhibitory properties and antineoplastic activity of bisperoxyvanadium analogues. Mol Cancer Ther. 2: 1053-1059.

Sedletska Y, Giraud-Panis MJ, Malinge JM (2005). Curr Med Chem Anticancer Agents. (3):251-65

Semenza, G.L. (2007). Hypoxia inducible factor (HIF-1) pathway. Sci. STKE, cm8.

Serkova N, Boros LG. (2005). Am J Pharmacogenomics 5:293–302.

Setyawati IA, Thompson KH, Yen VG, Sun Y (1998). Kinetic analysis of uptake distribution and excretion of 48V-labeled compounds in rats. J Appl Physiol 84:569–75.

Seve M, Chimienti F, Favier A (2002) Role of intracellular zinc in programmed cell death. *Pathol Biol (Paris)* 50:212–221 Sheikh et al. 2010

Sharma RP, Oberg SG, Parker RDR (1980). Vanadium retention in rat tissues following acute exposures to different dose levels. *J Toxicol Environ Health* 6:45–54.

Shashidharan P, Chalmers-Redman RM, Carlile GW, Rodic V, Gurvich N, Yuen T et al. (1999). Nuclear translocation of GAPDH-GFP fusion protein during apoptosis. *NeuroReport* 10:1149–1153.

Shaw, R.J., and Cantley, L.C. (2006). Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441, 424–430.

Shepard RL, Winter MA, Hsaio SC, Pearce HL, Beck WT, Dantzig AH (1998). Effects of modulators on the ATPase activity and vanadate nucleotide trapping of human P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 56:719–27.

Singh D, Banerji AK, Dwarakanath BS, Tripathi RP, Gupta JP, Mathew TL et al. (2005). *Strahlenther Onkol* 181:507–514.

Sirover MA. (2005). New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J Cell Biochem* 95:45–52.

Soares SS ,Martins H, Aureliano M (2006). Vanadium distribution following decavanadate administration. *Arch Environ Contam Toxicol* 50: 60-64

Solomons W. Noel (2013). The importance of dietary and environmental zinc for human health can be ignored only at significant peril to child well-being throughout the world. *Ann Nutr Metab* 2013;62(suppl 1):8–17

Soule H.D., Vazquez J., Long A., Albert S., Brennan M (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 51(5):1409-16.

Staal GEJ, Kalff A, Heesbeen EC, van Veelen CWM & Rijksen G (1987). Subunit composition, regulatory properties, and phosphorylation of phosphofructokinase from human gliomas. *Cancer Res* 47, 5047–5051.

Stanojkovic Tatjana P., Kovala-Demertzi Dimitra, Primikyri Alexandra, Garcia-Santos Isabel, Castineiras Alfonso, Juranic Zorica, Demertzis Mavroudis A. (2010) *J. Inorg. Biochem.* 104 467–476

Stefanidou M, Maravelias C, Dona A, Spiliopoulou C (2006). Zinc: A multipurpose trace element. *Arch Toxicol* 80 (1): 1-9

Stryer L. *Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company; 1995.

Stubbs M, Bashford CL & Griffiths JR (2003) Understanding the tumor-metabolic phenotype in the genomic era. *Curr Mol Med* 3, 49–59.

Swietach, P., Vaughan-Jones, R.D., and Harris, A.L. (2007). Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 299–310.

Sun YJ, Chou CC, Chen WS, Wu RT, Meng M, Hsiao CD. (1999). The crystal structure of a multifunctional protein: phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5412–5417.

Sundararaj K.P., Wood R.E., Ponnusamy S., Salas A.M., Szulc Z., Bielawska A., Obeid L.M., Hannun Y.A., Ogretmen B., Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 6152–6162.

## T

Takenaga K (1996). Suppression of metastatic potential of highmetastatic Lewis lung sarcoma cells by vanadate, an inhibitor of tyrosine phosphatase, through inhibiting cell-substrate adhesion. *Invasion Metastasis* 16:97–106.

Tajima H, Tsuchiya K, Yamada M, Kondo K, Katsube N, Ishitani R. (1999). Over-expression of GAPDH induces apoptosis in COS-7 cells transfected with cloned GAPDH cDNAs. *Neuro Report* 10:2029–2033.

Tapiero H, Tew KD (2003). Trace elements in human physiology and pathology: zinc and mettalothioneins. *Biomed Pharmacother* 57:399-411.

Tawa R, Uchida K, Taniyama J, Fujisawa Y (1999). A new insulin-mimetic vanadyl complex (N-pyridylmethylaspartate) oxovanadium (IV) with VO(N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) co-ordination mode, and



evaluation of its effects on uptake of D-glucose by Ehrlich ascites tumor cells. *J Pharm Pharmacol* 51:119–24.

Taylor KM, Morgan HE, Smart K, Zahari NM, Pumford S, Ellis IO, Robertson JF, Nicholson RI. (2007) The emerging role of the LIV-1 subfamily of zinc transporters in breast cancer. *Mol Med*. 13(7–8):396–406.

Thompson HJ, Chasteen DN, Neeker L (1984). Dietary vanadyl (IV) sulfate inhibits chemically-induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* 5:849–51.

Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281:1312–1316

Tomiya, A., Serizawa, S., Tachibana, K., Sakurada, K., Samejima, H., Kuchino, Y., and Kitanaka, C. (2006). Critical role for mitochondrial oxidative phosphorylation in the activation of tumor suppressors Bax and Bak. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 1462–1473.

Truong-Tran AQ, Grosser D, Ruffin RE, Murgia C, Zalewski PD (2003) Apoptosis in the normal and inflamed airway epithelium: role of zinc in epithelial protection and procaspase-3 regulation. *Biochem Pharmacol* 66:1459–1468

Tsiani E, Fantus IG (1997). Vanadium compounds. Biological actions and potential as pharmacological agents. *Trends Endocrinol Metab* 8:51–8.

## V

Valee BL (1995) The function of metallothionein. *Neurochem Int* 27:23-33.

VandeBerg JL. (1985). The phosphoglycerate kinase isozyme system in mammals: biochemical, genetic, developmental, and evolutionary aspects. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 12:133–187.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033.

Varshney R, Dwarakanath B, Jain V. (2005). *Int J Radiat Biol* 81:397–408.

Verginadis I, Karkabounas S, Simos Y, Kontargiris E, Hadjikakou S, Batistatou A, Evangelou A, Charalabopoulos K (2011). Anticancer and cytotoxic effects of a triorganotin compound with

2-mercapto-nicotinic acid in malignant cell lines and tumor bearing Wistar rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 42: 253–261.

Vogelmeier C, König G, Bencze K, Fruhmann G (1987). Pulmonary involvement in zinc fume fever. *Chest*. 92(5):946-8.

Vora S. (1983). Isozymes of human phosphofructokinase: biochemical and genetic aspects. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 11:3–23.

Vora S, Halper JP & Knowles DM (1985) Alterations in the activity and isozymic profile of human phosphofructokinase during malignant transformation in vivo and in vitro: transformation-and progression-linked discriminants of malignancy. *Cancer Res* 45, 2993–3001.

## W

Walkup G.K., Burdette S.C., Lippard S.J, Tsien R.Y. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* 122/23 5644–5645.

Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook JN (1998). The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signaling pathways on cell survival. *Biochem* 333:291–300.

Warburg O. (1930). *The Metabolism of Tumors*. Costable: London.

Warburg O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123:309–314.

Warburg O, Posener K, Negelein E. (1924). *Biochem Z* 152: 309–344.

Watanabe H, Takehana K, Date M, Shinozaki T, Raz A. (1996). Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer Res* 56:2960–2963.

Weindruch R, Keenan KP, Carney JM, Fernandes G, Feuers RJ, Floyd RA et al. (2001). *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56:20–33.

Williams KR, Reddigari S, Patel GL. (1985). Identification of a nucleic acid helix-destabilizing protein from rat liver as lactate dehydrogenase-5. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:5260–5264.

Wilson JE. (1995). Hexokinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 126:65–198.

Wilson JE. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol* 206:2049–2057.

Wong E, Giandomenico CM. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev.* 1999; 99(9):2451–66.

Wood IS & Trayhurn P (2003) Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89, 3–9.

Wozniak K, Blasiak J (2004). Vanadyl sulphate can differentially damage DNA in human lymphocytes and HeLa Cells. *Arch Toxicol.* 78: 7-15.

Wu M, Neilson A, Swift AL, Moran R, Tamagnine J, Parslow D, Armistead S, Lemire K, Orrell J, Teich J, Chomicz S, Ferrick DA (2006). Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Jan;292(1):C125-36.

## X

Xanthopoulou M, Hadjikakou S, Hadjiliadis N, Schurmann M, Jurkschat K, Michaelides S, Skoulika S, Bakas T, Binolis J, Karkabounas S, Charalabopoulos K (2003). Synthesis, structural characterization and in vitro cytotoxicity of organotin (IV) derivatives of heterocyclic thioamides, 2-mercaptobenzothiazole, 5-chloro-2-mercaptobenzothiazole, 3-methyl-2-mercaptobenzothiazole and 2-mercaptonicotinic acid. *J Inorg Biochem* 96(2-3): 425-34.

Xanthopoulou M, Hadjikakou S, Hadjiliadis N, Schurmann M, Jurkschat K, Binolis J, Karkabounas S, Charalabopoulos K (2003) Synthesis of a novel triphenyltin (IV) derivative of 2-mercaptonicotinic acid with strong cytotoxicity in vitro. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 13-4:227-231.

Xanthopoulou M, Hadjikakou S, Hadjiliadis D, Kubicki M, Karkabounas S, Charalabopoulos K, Kourkoumelis N, Bakas T (2006) Synthesis and characterization of a new chloro-di-phenyltin(IV) complex with 2-mercaptonicotinic acid : Study of its influence upon the catalytic oxidation of linoleic acid to hydroperoxylinoleic acid by the enzyme lipoxygenase. *Journal of Organometallic Chemistry* 621: 1780-1789.

Xanthopoulou M, Hadjikakou S, Milaeva R, Gracheva A, Tyurin U, Kourkoumelis N, Christoforidis C, Metsios K, Karkabounas S, Charalabopoulos K (2007) Biological studies of

new organotin(IV) complexes of thioamide ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry* xx 1-9.

Xanthopoulou M, Hadjikakou S, Hadjiliadis N, Kourkouvelis N, Milaeva R, Graecheva A, Tyurin Y, Verginadis I, Karkabounas S, Baril M, and Butler S (2007). Biological studies of organotin(IV) complexes with 2-mercaptopyridine. *Russian Chemical Bulletin International Edition*. Vol.56 No 4: 767 – 773 .

Xanthopoulou N, Kourkouvelis N, Hadjikakou S, Hadjiliadis N, Koubicki M, Karkabounas S, Bakas T (2008). Structural and biological studies of organotin(IV) derivatives with 2-mercapto-benzoic acid and 2-mercapto-4-methyl-pyrimidine. *Polyedron* 27(15): 3318-3324.

Xanthopoulou M, Hadjikakou S, Hadjiliadis N, Milaeva E, Gracheva J, Tyurin V, Kourkouvelis N, Christoforidis K, Metsios A, Karkabounas S, Charalabopoulos K (2008). Biological studies of new organotin (IV) complexes of thioamide ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43(2):327-335.

Xia Z, Dickens M, Raigeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326–31.

Xu RH, Pelicano H, Zhang H, Giles FJ, Keating MJ, Huang P. (2005a). *Leukemia* 19:2153–2158.

Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN et al. (2005b). *Cancer Res* 65:613–621.

## Y

Yang, M.H., Wu, M.Z., Chiou, S.H., Chen, P.M., Chang, S.Y., Liu, C.J., Teng, S.C., and Wu, K.J. (2008). Direct regulation of TWIST by HIF-1 $\alpha$  promotes metastasis. *Nat. Cell Biol.* 10, 295–305.

Yoon DY, Buchler P, Saarikoski ST, Hines OJ, Reber HA, Hankinson O. (2001). Identification of genes differentially induced by hypoxia in pancreatic cancer cells.

*Biochem Biophys Res Commun* 288:882–886.

## Z

Zartilas S, Hadjikakou S, Hadjiliadis N, Kourkoumelis N, Kyros L, Kubicki M, Baril M, Butler S, Karkabounas S, Balzarini J (2009). Tetrameric 1:1 and monomeric 1:3 complexes of silver (I) halides with tri(phenyl) - phosphine; a structural and biological study. *Inorganica Chimica Acta* 362(3): 1003 – 1010 Zelenak V., Gyoryova K., Mlynarcik D. 2002 *Met.-Based Drugs* 8: 269–274.

Zerahn B, Kofoed-Enevoldsen A, Jensen BV, Mølvig J, Ebbenhøj N, Johansen JS, Kanstrup IL (1999). Pulmonary damage after modest exposure to zinc chloride smoke. *Respir Med.* 93(12):885-90.

Zhang Z, Huang C, Li J (2001). Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 392: 311-320.

Zhao H, Eide D. (1996). The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(6):2454–8.

Zheng L, Roeder RG, Luo Y. (2003). S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* 114:255–266.

Zhou J, Sargiannidou I, Tuszynski GP (2000). The role of adhesive proteins in the hematogenous spread of cancer. *In Vivo* 14:1999–2080.

Zhou S., Kachhap S, Sun W, Wu G, Chuang A, Poeta L, Grumbine L, Mithani S.K, Chatterjee A, Koch W (2007). Frequency and phenotypic implications of mitochondrial DNA mutations in human squamous cell cancers of the head and neck. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 7540–7545.

Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 715–727.

Zu XL, Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313:459–65.