







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ



**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ**

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

***ΜΕΛΕΤΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ Ag (I)  
ΜΕ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥΣ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΕΣ ΚΑΙ  
ΕΓΛΩΒΙΣΜΟΣ, ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΣΩΜΙΑΚΩΝ  
ΝΑΝΟΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΤΟΥΣ,  
ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ IN VITRO ΚΑΙ IN VIVO ΜΟΝΤΕΛΑ***

**Ηλίας Β. Καραγκούνης**

Μοριακός-Κυτταρικός Βιολόγος (BSc, MSc)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013**



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



**Ημερομηνία αίτησης του κ. Καραγκούνη Ηλία:** 14-1-2008

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 635<sup>α</sup>/15-4-2008

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Αγγελίδης Χαράλαμπος Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Βεζυράκη Πατρώνα Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 28-5-2008

*«Μελέτη αξιολόγησης της βιοδραστικότητας συμπλόκων Ag (I) με οργανικούς υποκαταστάτες και εγκλωβισμός, ανάπτυξη και χαρακτηρισμός λιποσωμακίων νανοσυστημάτων μεταφοράς τους σε καρκινικά in vitro και in vivo μοντέλα»*

**Ημερομηνία 1ης Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 658<sup>α</sup>/7-4-2009

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Δεμέτζος Κωνσταντίνος Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήματος Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ

Καρκαμπούνας Σπυρίδωνας Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ :** 740<sup>α</sup>/3-7-2012

Ανωγειανάκης Γεώργιος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Δεμέτζος Κωνσταντίνος	Αναπληρωτής Καθηγητής του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας Τμήματος Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Χατζηκακού Σωτήριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Ανόργανης Χημείας Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βεζυράκη Πατρώνα	Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καρκαμπούνας Σπυρίδων	Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην





Πέσχος Δημήτριος

Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων

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

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 1-2-2013

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Μαργαρίτα Τσαφλίδου**

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής

Η Γραμματέας της Σχολής





*Στους γονείς μου,  
Βασίλη και Ελένη  
και στην αδερφή μου, Μαρία*

*Σας Ευχαριστώ  
από τα βάθη της καρδιάς μου!*

*...και σε αυτούς που δεν πρόλαβα να ζήσω όσο θα ήθελα!*



*«Να ‘μαστε απροσάρμοστοι, να η μεγάλη αρετή μας.  
Να μη βολευόμαστε, να ‘μαστε ανυπόμονοι, σκληροί, γιομάτοι ανησυχία και πίστη,  
να θέμε το αδύνατο -σαν τους ερωτευμένους»*

**Νικόλαος Καζαντζάκης**



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο καρκίνος αποτελεί από τα αρχαία χρόνια αναγνωρίσιμη ασθένεια η οποία έχει επηρεάσει τους προγόνους μας σε όλη την ανθρώπινη ιστορία καθώς και τη διάρκεια της ανθρώπινης εξέλιξης. Εξαιτίας των ποικίλων μορφών του αλλά και των μεγάλων ποσοστών θνησιμότητας που παρουσιάζει, έχει μαγνητίσει το ενδιαφέρον μιας πολύ μεγάλης μερίδας του επιστημονικού κόσμου, ο οποίος ασχολείται εντατικά με την αντικαρκινική θεραπεία αλλά πολύ περισσότερο με την αντικαρκινική έρευνα. Πλέον, ο σκοπός και ο στόχος κάθε αναπτυσσόμενης αντικαρκινικής στρατηγικής είναι η επιλεκτική δραστηριότητα των αντικαρκινικών προσεγγίσεων μόνο στα καρκινικά κύτταρα αφήνοντας απρόσβλητα και ανεπηρέαστα τα φυσιολογικά.

Στα πλαίσια των αντικαρκινικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων, η cis-platin ήταν το πρώτο αντινεοπλασματικό φάρμακο που είχε ως βάση το μέταλλο πλάτινα (Pt) και λίγα χρόνια αργότερα δύο ανάλογα της cis-platin, ή carboplatin και η oxaliplatin, εγκρίθηκαν ως αντινεοπλασματικοί παράγοντες. Ακόμα και σήμερα τα παραπάνω αντικαρκινικά φάρμακα με βάση μέταλλο είναι αξεπέραστα (με ελάχιστες εξαιρέσεις σε κλινικές δοκιμές), παρόλο που το επιστημονικό πεδίο της βιοανόργανης σύνθεσης συμπλόκων μετάλλων ή/και οργανομεταλλικών συμπλόκων με βιολογικές δράσεις και εν δυνάμει αντικαρκινικές ιδιότητες ολοένα και αυξάνεται.

Το Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων ασχολείται ερευνητικά περισσότερο από μια 10ετία με την μελέτη της βιοδραστηριότητας συμπλόκων μετάλλων όπως του βαναδίου, του σεληνίου, του αντιμονίου, του χρυσού και του αργύρου με διάφορους οργανικούς υποκαταστάτες (π.χ. θειοαμίδια). Έχοντας μελετήσει λοιπόν τη δράση πολλών συμπλόκων μεταλλικών ενώσεων και θέλοντας να συνεχίσουμε την έρευνα και την παράδοση του Εργαστηρίου Φυσιολογίας συντέθηκαν νέες σύμπλοκες ενώσεις του αργύρου σε συνεργασία με το Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων οι οποίες μελετήθηκαν για την βιοδραστηριότητα τους καθώς και τον τρόπο δράσης τους σε *in vitro* και *in vivo* καρκινικά μοντέλα. Ωστόσο, αυτό που καθιστά πρωτότυπη την παρούσα μελέτη σε σύγκριση με παλαιότερες είναι ότι έγινε προσπάθεια για πρώτη φορά, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών να εισαχθεί η нанοτεχνολογία

λιποσωμιακών φορέων προς τον εγκλωβισμό των εν λόγω συμπλόκων ώστε να επιτευχθεί καλύτερη και μεγαλύτερη στόχευση στα καρκινικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν.

Τα αποτελέσματα της αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στην παρούσα διδακτορική διατριβή και τώρα που το άκρως ενδιαφέρον αλλά και επίπονο ταξίδι φτάνει στην ολοκλήρωσή του, η σκέψη μου και οι μνήμες μου ανατρέχουν σε όλη την πορεία του καθώς και στους ανθρώπους που τοποθέτησαν ο καθένας το δικό του λίθο γνώσης, συμπαράστασης, υπομονής και θαλπωρής.

Κατ' αρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής, Καθηγητή Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων κ. Αγγελο Ευαγγέλου για την ευκαιρία και την δυνατότητα που μου έδωσε να εργαστώ στους κόλπους της ερευνητικής του ομάδας και να δοκιμαστώ στα ερευνητικά μου καθήκοντα ως υποψηφίου διδάκτορα, καθώς και για την άριστη συνεργασία, επίβλεψη, βοήθεια και εμπιστοσύνη που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια.

Επίσης, ευχαριστώ θερμότατα τον Καθηγητή Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Παν/μίου Αθηνών κ. Κωνσταντίνο Δεμέτζο, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την δυνατότητα που απλόχερα μου προσέφερε να εκπαιδευτώ και να εισέλθω στον «κόσμο» των λιποσωμιακής νανοτεχνολογίας καθώς και την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια του καθ' όλη την διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών και όχι μόνο.

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Περιβαλλοντικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων κ. Σπυρίδωνα Καρκαμπούνα, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, ο οποίος με καλοδέχτηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας, αλλά και για τις χρήσιμες υποδείξεις και την παροχή της γνώσης του στις πειραματικές διαδικασίες καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της Δ.Δ. καθώς και για το ότι ήταν πάντα δίπλα μου σε όλα τα επίπεδα.

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων κ. Σωτήριο Χατζηκακού, για τα σύμπλοκα του αργύρου που συνέθεσε και μου εμπιστεύτηκε, για την βοήθεια, τη συνεργασιμότητα και την εμπιστοσύνη που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ένα θερμό ευχαριστώ στον Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων κ. Δημήτριο Πέσχο για την βοήθεια του στα πειραματικά όσο αφορά την ιστοπαθολογική ανάλυση των πειραματοζώων καθώς και τη συμπαράστασή



του καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας και της συνύπαρξης μας στο εργαστήριο Φυσιολογίας.

Επίσης, ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων κα Πατρόνα Βεζυράκη για τις συμβουλές της καθώς και για την όμορφη συνύπαρξη που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω εγκάρδια τον Βιολόγο-Βιοτεχνολόγο Δρ. Ιωάννη Βεργινάδη για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε, για την άψογη συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια καθώς όμως και για την αμέριστη συμπαράσταση του σε δύσκολες στιγμές. Πάνω απ' όλα όμως, μέσα από τις απίστευτες συγκυρίες της ιστορίας του χρωστό την επαφή μου με το Εργαστήριο της Φυσιολογίας.

Ένα θερμότατο ευχαριστώ στον Κλινικό Διαιτολόγο-Διατροφολόγο Δρ. Ιωάννη Σίμο και στη Βιολόγο, Υποψήφια Διδάκτορα του Εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων, κα Αναστασία Βελαλοπούλου για την στενή συνεργασία που είχαμε, την αμέριστη βοήθειά τους μα πάνω απ' όλα για τη φιλία τους. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Βιολόγο Δρ. Αποστόλη Μέτσιο για τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής σε πειραματικό αλλά και προσωπικό επίπεδο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την Φαρμακοποιό, Υποψήφια Διδάκτωρ του Εργαστηρίου Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Παν/μίου Αθηνών κα Έλενα Μουρελάτου της οποίας η βοήθεια στην εκμάθηση των τεχνικών αλλά και οι γνώσεις της για την παρασκευή των λιποσωμιακών φορέων των συμπλόκων ήταν παραπάνω από πολύτιμες. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Φαρμακοποιό, Υποψήφια Διδάκτωρ του Εργαστηρίου Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Παν/μίου Αθηνών κα Νατάσσα Πίππα με την οποία είχαμε μια αρμονική συνύπαρξη και άψογη συνεργασία κατά την διάρκεια των πειραματικών μου εργασιών κατά την παραμονή μου στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής τεχνολογίας.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Χημικό, Δρ Ευάγγελο Παλαιολόγο του οποίου οι γνώσεις και η βοήθεια στον ποσοτικό προσδιορισμό του αργύρου μέσω της ατομικής απορρόφησης στις διάφορες μελέτες της παρούσας διατριβής υπήρξε αναγκαία και πολύτιμη.

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

Πάνω απ' όλα, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου και στην αδερφή μου για την συνεχή ενθάρρυνση, υποστήριξη και αγάπη με τα οποία ξεπερνούσα κάθε φορά τη φυσική απόσταση και μου έδιναν την ηρεμία και την αυτοπεποίθηση να αφήσω πίσω μου τις όποιες δυσκολίες και προκλήσεις που αντιμετώπιζα καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και στο εξωτερικό και εγχώρια. Τους χρωστώ αυτό που είμαι και αυτό που έγινα!

Ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου και με πολύ αγάπη την Μαρία Λιούσια η οποία υπήρξε συναγωνιστής και συμπαραστάτης και συνοδοιπόρος μου ακατάπαυστα μέχρι και σήμερα.

Ευχαριστώ επίσης τους φίλους μου, οι οποίοι έμμεσα ή άμεσα ήταν πάντοτε παρόντες όταν τους χρειαζόμουν.

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους αγαπημένους μου ανθρώπους που όμως δεν βρίσκονται κοντά μας, οι οποίοι σημάδεψαν ανεξίτηλα την μέχρι τώρα πορεία μου μέσα από τα διδάγματα και την αγάπη τους.

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>23</b>
<b>1.1 ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΩΣ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ</b>	<b>25</b>
1.1.1 Εισαγωγή	25
1.1.2 Ο ρόλος των ιόντων μετάλλου ως ικρίωμα	27
1.1.3 Σύμπλοκα του Λευκόχρυσου ή πλατίνας (Pt)	27
1.1.3.1 Ιστορική αναδρομή	27
1.1.3.2 Κλινική χρήση	28
1.1.3.3 Μηχανισμός Δράσης και Ανθεκτικότητα	30
1.1.3.4 Ενώσεις της cisplatin σε κλινικές δοκιμές	33
1.1.4 Μη πλατινικά σύμπλοκα μετάλλων	34
1.1.4.1 Ρουθίνιο (Ru)	34
1.1.4.2 Όσμιο (Os)	37
1.1.4.3 Τριοξείδιο του αρσενικού (As)	38
1.1.4.4 Γάλλιο (Ga)	38
1.1.4.5 Χρυσός (Au)	39
1.1.4.6 Μαργάνιο (Mn) - Μιμητικά σύμπλοκα της SOD	42
1.1.4.7 Τιτάνιο (Ti)	43
1.1.4.8 Κασσίτερος (Sn)	45
1.1.5 Άργυρος (Ag)	46
1.1.5.1 Γενικά στοιχεία	46
1.1.5.2 Εφαρμογές στην Ιατρική	46
1.1.5.3 Αντιμικροβιακές ιδιότητες και μηχανισμός δράσης	49
1.1.5.4 Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες	51
1.1.5.5 Αντικαρκινικές ιδιότητες	52
<b>1.2 ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ</b>	<b>55</b>
1.2.1 Γενικά Στοιχεία	55
1.2.2 Η Νανοτεχνολογία στη Φαρμακευτική Επιστήμη	56
<b>1.3 ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ</b>	<b>59</b>
1.3.1 Ιστορική Θεώρηση	59
1.3.2 Γενικά στοιχεία	63
1.3.3 Κατηγορίες Λιποσωμάτων	64
1.3.3.1 Σύμφωνα με τη Σύσταση	64
1.3.3.2 Σύμφωνα με το Μέγεθος και τον Αριθμό Στοιβάδων	65
1.3.4 Σύσταση των Λιποσωμάτων	66
1.3.4.1 Ταξινόμηση Φωσφολιπιδίων	68
1.3.5 Φυσικοχημική Σταθερότητα Λιποσωμάτων	70
1.3.5.1 Φυσική Σταθερότητα Λιποσωμάτων	71
1.3.5.2 Χημική Σταθερότητα των Λιποσωμάτων	73
1.3.6 Τεχνικές Παρασκευής των Λιποσωμάτων	73
1.3.6.1 Ενυδάτωση λεπτού λιπιδικού υμενίου (Thin-film hydration)	74
1.3.6.2 Έγχυση σε οργανικό διαλύτη (Solvent injection)	74
1.3.6.3 Μέθοδος απογαλακτοματοποίησης - εξάτμιση αντιστρόφου φάσης (Reverse-phase evaporation, REV)	75
1.3.6.4 Θερμική Μέθοδος (Heating Method)	75
1.3.7 Εισαγωγή Βιοδραστικών Μορίων στα Λιποσώματα	76
1.3.8 Πλεονεκτήματα των Λιποσωμάτων	77
1.3.9 Λυοφιλοποίηση	78
1.3.10 Τοξικότητα των Λιποσωμάτων	79
1.3.11 Λιποσώματα και Καρκίνος	81
1.3.11.1 Γενικά Στοιχεία	81
1.3.11.2 Λιποσώματα και Αντικαρκινική Θεραπεία	83
1.3.11.3 Τρόποι Δράσης-Φαινόμενο Αυξημένης Διαπερατότητας και Συγκράτησης (EPR effect)	83
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ</b>	<b>89</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>93</b>
<b>3.1 ΜΕΛΕΤΕΣ IN VITRO</b>	<b>95</b>
3.1.1 Σύμπλοκα Ag(I)	95
3.1.1.1 Απόθεμα Διαλύματος (stock solution) των συμπλόκων Ag(I)	96
3.1.2 Κυτταρικές σειρές	97
3.1.3 Κυτταροκαλλιέργειες	99
3.1.3.1 Υλικά-Οργανολογία	99
3.1.3.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο	100
3.1.4 Διατήρηση των Κυττάρων-Πάγωμα/Ξεπάγωμα	102

3.1.4.1 Υλικά-Οργανολογία.....	102
3.1.4.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο.....	102
3.1.5 Μέτρηση του Αριθμού ή της Συγκέντρωσης των Κυττάρων.....	103
3.1.5.1 Υλικά-Οργανολογία.....	103
3.1.5.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο.....	104
3.1.6 Σπορά Κυττάρων σε Πολυτρυβλία.....	106
3.1.6.1 Υλικά-Οργανολογία.....	106
3.1.6.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο.....	107
3.1.7 Μέθοδος MTT (MTT Assay).....	108
3.1.7.1 Υλικά-Οργανολογία.....	109
3.1.7.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο.....	109
3.1.8 Μελέτη φωτοενεργοποίησης με UVC ακτινοβολία.....	111
3.1.8.1 Υλικά-Οργανολογία.....	112
3.1.8.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο.....	113
3.1.9 Κυτταρομετρία Ροής – Μελέτη Απόπτωσης/Νέκρωσης.....	113
3.1.9.1 Υλικά-Οργανολογία.....	113
3.1.9.2 Μεθοδολογία-Οργανολογία.....	114
3.1.10 Κυτταρομετρία Ροής – Μελέτη του Κυτταρικού Κύκλου.....	114
3.1.10.1 Υλικά-Οργανολογία.....	114
3.1.10.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο.....	115
3.1.11 Σχηματισμός Αποικιών-(Clonogenic/Colony Formation Assay).....	115
3.1.11.1 Υλικά-Οργανολογία.....	116
3.1.11.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο.....	116
3.1.12 Μελέτη Ενδοκυτταρικής Απορρόφησης του Συμπλόκου.....	117
3.1.12.1 Υλικά-Οργανολογία.....	117
3.1.12.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο.....	117
3.1.13 Μέθοδος Comet (Comet Assay).....	118
3.1.13.1 Υλικά-Οργανολογία.....	118
3.1.13.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο.....	118
3.1.13.2.α Στάδιο 1 (Ημέρα 1).....	118
3.1.13.2.β Στάδιο 2 (Ημέρα 2).....	119
3.1.13.2.γ Στάδιο 3.....	121
<b>3.2 ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ.....</b>	<b>122</b>
3.2.1 Παρασκευή Λιπασώματων.....	122
3.2.1.1 Μέθοδος Ενυδάτωσης Λεπτού Λιπιδικού Υμενίου (Thin-film hydration).....	122
3.2.1.1.α. Υλικά-Οργανολογία.....	122
3.2.1.1.β. Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο.....	124
3.2.2 Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (Size Exclusion Chromatography, SEC).....	125
3.2.2.1 Υλικά-Οργανολογία.....	125
3.2.2.2 Μεθοδολογία- Πρωτόκολλο.....	125
3.2.3 Φασματοχημικός Χαρακτηρισμός Λιπασωμάτων.....	127
3.2.3.1 Φασματοσκοπία Συσχετισμού Φωτονίων (Photon Correlation Spectroscopy, PCS).....	127
3.2.3.1.α. Υλικά-Οργανολογία.....	127
3.2.3.1.β. Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο.....	127
3.2.3.2 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας Υψηλής Απόδοσης – Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας (High Performance Thin Layer Chromatography-Flame Ionization Detector, HPTLC-FID).....	128
3.2.3.2.α. Υλικά-Οργανολογία.....	128
3.2.3.2.β. Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο.....	128
3.2.3.2.γ. Πρωτόκολλο αφαίρεση της σουκρόζης.....	130
3.2.3.3 Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectroscopy).....	131
3.2.4 Λυοφιλοποίηση.....	132
3.2.4.1 Υλικά-Οργανολογία.....	132
3.2.4.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο.....	132
<b>3.3 ΜΕΛΕΤΕΣ IN VIVO.....</b>	<b>133</b>
3.3.1 Τοξικότητα σε επίμυες Wistar.....	133
3.3.1.1 Οξεία τοξικότητα.....	133
3.3.1.1.α Υλικά-Οργανολογία.....	133
3.3.1.1.β Πειραματική διαδικασία.....	133
3.3.1.2 Χρόνια Τοξικότητα.....	134
3.3.1.2.α. Υλικά-Οργανολογία.....	134
3.3.1.2.β. Πειραματική Διαδικασία.....	134
3.3.2 Καρκινογένεση-Ενοφθαλμισμός επίμυων Wistar.....	135
3.3.2.1 Ιστορικά Στοιχεία.....	135
3.3.2.1.α Υλικά-Οργανολογία.....	136
3.3.2.1.β Πειραματική Διαδικασία.....	136
3.3.3 Αντικαρκινική δράση σε καρκινοπαθείς επίμυες Wistar.....	138
3.3.3.1 Χορηγία Λιπασωμάτων.....	139
3.3.3.1.α. Πειραματική Διάταξη Χορήγησης Πτητικής Αναισθησίας.....	139
3.3.3.1.β. Κατασκευή Προσωπίδας.....	140
3.3.3.1.γ. Ενδοφλέβια χορήγηση των λιπασωμάτων.....	141
<b>3.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....</b>	<b>144</b>

<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>145</b>
<b>4.1 IN VITRO</b> .....	<b>147</b>
4.1.1. Μελέτες Κυτταροτοξικότητας.....	147
4.1.1.1 Δοσοεξαρτώμενη Μελέτη του Προσδιορισμού των $IC_{50}$ τιμών.....	147
4.1.1.2 Χρονοεξαρτώμενη Μελέτη του Προσδιορισμού των $IC_{50}$ τιμών.....	148
4.1.1.3 Μελέτη Φωτοενεργοποίησης των Συμπλόκων-Ag(I) με UVC.....	150
4.1.2 Κυτταρομετρία Ροής-Μελέτη Απόπτωσης/Νέκρωσης.....	153
4.1.2.1 Οπτική Παρατήρηση της Απόπτωσης.....	158
4.1.3 Κυτταρομετρία Ροής-Μελέτη του Κυτταρικού Κύκλου.....	159
4.1.4 Σχηματισμός Αποικιών-(Clonogenic/Colony Formation Assay) .....	160
4.1.5 Μελέτη της Ενδοκυττάριας Απορρόφησης του Συμπλόκου.....	164
4.1.6 Μέθοδος Comet (Comet Assay) .....	168
4.1.6.1 Πρότυπη καμπύλη $H_2O_2$ στα LMS κύτταρα.....	169
4.1.6.2 Δοσοεξαρτώμενη μελέτη της cisplatin.....	171
4.1.6.3 Χρονοεξαρτώμενη μελέτη της cisplatin.....	172
4.1.6.4 Δοσοεξαρτώμενη μελέτη του συμπλόκου [3] .....	172
4.1.6.5 Χρονοεξαρτώμενη μελέτη του συμπλόκου [3].....	173
<b>4.2 ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ</b> .....	<b>174</b>
4.2.1 Ρύθμιση του Μεγέθους .....	174
4.2.2 Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των Λιποσωμάτων .....	176
4.2.2.1 Φασματοσκοπία συσχετισμού φωτονίων.....	176
4.2.2.2 HPTLC-FID.....	177
4.2.2.2.α. Πρότυπες καμπύλες EPC, DPPG και Ag[3].....	177
4.2.2.2.β. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπιδίων.....	180
4.2.2.2.δ Μελέτη Κυτταροτοξικότητας.....	184
4.2.2.3 Λυοφιλοποίηση.....	188
<b>4.3 IN VIVO</b> .....	<b>189</b>
4.3.1 Έλεγχος Τοξικότητας.....	189
4.3.1.1 Οξεία Τοξικότητα (OT).....	189
4.3.1.2 Χρόνια τοξικότητα (ΧΤ) .....	190
4.3.2 Αντικαρκινική Δράση του Συμπλόκου Ag[3] σε Καρκινοπαθείς Επίμυες Wistar.....	192
4.3.2.1 Ιστοπαθολογική Ανάλυση.....	195
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>199</b>
<b>6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>213</b>
<b>7. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ</b> .....	<b>219</b>
7.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ.....	221
7.2 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ .....	225
<b>8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>229</b>
<b>9. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ</b> .....	<b>255</b>



# ***1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ***





## 1.1 Σύμπλοκα Μετάλλων ως Χημειοθεραπευτικοί Παράγοντες

### 1.1.1 Εισαγωγή

Οι ιατρικές και θεραπευτικές χρήσεις και εφαρμογές των μετάλλων και των συμπλόκων μετάλλων παρουσιάζουν ολοένα και αυξανόμενη κλινική και εμπορική σημασία. Μονογραφίες και σημαντικές ανασκοπήσεις μαρτυρούν την αυξανόμενη σημαντικότητα αυτού του επιστημονικού κλάδου ιδιαίτερα τα τελευταία 25 περίπου χρόνια (Chen 2009, Rijt 2009, Bruijninx 2008, Clarke 1999, Fricker 1994, Keppler 1993, Farrell 1989). Το πεδίο της βιοανόργανης χημείας στην ιατρική μπορεί επωφελώς να διαιρεθεί σε δύο κύριες κατηγορίες: η πρώτη, υποκαταστάτες ως φάρμακα που στοχεύουν μεταλλικά ιόντα σε κάποια μορφή, είτε ελεύθερα ή συνδεδεμένα σε πρωτεΐνες και η δεύτερη, φάρμακα με βάση μέταλλα και παράγοντες απεικόνισης όπου το κεντρικό ιόν μετάλλου είναι συνήθως το βασικό χαρακτηριστικό του μηχανισμού δράσης (Reynolds 1996). Η σημασία των μεταλλικών ενώσεων στην ιατρική είναι αδιαμφισβήτητη, όπως μπορεί να δικαιολογηθεί από τη χρήση ενώσεων, για παράδειγμα, αντιμονίου (κατά των πρωτόζωων), βισμούθιου (κατά του έλκους), χρυσού (αντι-αρθριτικό), σιδήρου (αντι-ελονοσιακό), αργύρου (αντιμικροβιακό) και λευκόχρυσου (αντικαρκινικό) στην θεραπεία διαφόρων ασθενειών.

Η ύπαρξη σχέσης μεταξύ του καρκίνου και των μετάλλων είναι ευρέως αναγνωρισμένη από τους ογκολόγους. Σχεδόν όλα τα μέταλλα είναι σε θέση να δημιουργήσουν δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), όπου η ιδιότητα αυτή εξηγεί ένα μεγάλο μέρος τόσο της καρκινογόνου δράσης τους όσο και της ικανότητά τους για τη θεραπεία του καρκίνου. Η αναστολή της δισμουτάσης του υπεροξειδίου οδηγεί σε επιλεκτική θανάτωση των καρκινικών κυττάρων *in vitro* και *in vivo* (Huang 2000). Κατά συνέπεια, οι ROS, καθώς όντας μια αιτία του καρκίνου, θα μπορούσε επίσης να αποτελεί μια λύση για την θεραπεία των όγκων (Desoize 2002). Από την άλλη πλευρά, είναι γνωστή η αλληλεπίδραση των βαρέων μετάλλων με τις ελεύθερες σουλφυδρυλικές ομάδες των πρωτεϊνών και επομένως η παραμόρφωση της δομής της πρωτεΐνης είναι ένας από τους προτεινόμενους, επαγόμενου από μέταλλα, μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου (Chasapis 2003, Goyer 1991). Σε όρους δραστηρότητας κατά των όγκων, ένα ευρύ φάσμα ενώσεων τόσο μετάλλων μεταπτώσεως (π.χ. Cu, Au, Ag) όσο και στοιχεία των κυρίων ομάδων έχουν μελετηθεί για την αποτελεσματικότητά τους. Η

παιλιότερη αναφορά σχετικά με τη θεραπευτική χρήση των μετάλλων ή ενώσεων που περιέχουν μέταλλα στον καρκίνο και στη λευχαιμία ανάγεται πίσω στο 16<sup>ο</sup> αιώνα (Körpf-Maier 1994).

<i>Element</i>	<i>Compound</i>	<i>Uses</i>	<i>Trade names/comments</i>
<i>Approved agents (mostly US or worldwide):</i>			
Li	Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Manic depression	Camcolit; Cibalith-S; Lithane (of many)
Fe	[Fe(NO)(CN) <sub>5</sub> ] <sup>2-</sup>	Vasodilation	Nipride. For acute shock. NO release
Ga	Ga(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Hypercalcemia of malignancy	Ganite. Possible anticancer agent. In clinical trials for use in lymphomas
As	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Anticancer agent	Trisenox. Use in acute promyelocytic leukemia
Ag	AgNO <sub>3</sub> Ag(sulfadiazene)	Disinfectant Antibacterial	Neonatal conjunctivitis Flamazine; Silvadene; treatment of burns. 1% cream
Sb	Sb <sup>III</sup> (tartarate)	Antiparasitic, leishmaniasis	Tartar Emetic Stibophen; Astiban
Pt	<i>cis</i> -[Pt(amine) <sub>2</sub> X <sub>2</sub> ]	Anticancer agents	Platinol; Paraplatin; Eloxatine Testicular, ovarian, colon cancers
Au	Au(PEt <sub>3</sub> )(acetylthioglucose)	Rheumatoid arthritis	Ridaura. Orally active
Bi	Bi(sugar) polymers	Antiulcer; antacid	Pepto-Bismol; Ranitidine Bismutrex; De-Nol
Hg	Hg-organic compounds	Antibacterial Antifungal	Thiomersal; mercurochrome (amongst many) Slow release of Hg <sup>2+</sup>
<i>Agents in clinical trials:</i>			
Pt	Polynuclear Pt <sup>IV</sup> species	Anticancer agents	BBR3464, Satraplatin, AMD-473 Expands spectrum of activity of cisplatin; overcomes resistance; oral activity?
Mn	Mn chelates	Anticancer agents	SOD mimics
Ru	<i>trans</i> -[RuCl <sub>4</sub> (Me <sub>2</sub> SO)(Im)] <sup>-</sup>	Anticancer agent	NAMI-A; antiangiogenic?
V	VO(maltate) <sub>2</sub>	Type II diabetes	BMOV; insulin mimetic
Ln	Ln(CO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Hyperphosphatemia	Fosrenol; phosphate binder

**Πίνακας 1.1:** Ιατρικής χρήσης και εν δυνάμει για ιατρική χρήση βιοανόργανες ενώσεις.

Τα μέταλλα, και ειδικότερα τα μέταλλα μετάπτωσης, προσφέρουν εν δυνάμει πλεονεκτήματα σε σχέση με τα κοινά – βασισμένα σε οργανικές ενώσεις – φάρμακα, όπως ένα ευρύ φάσμα συντονισμών και γεωμετριών, δεκτικότητα σε οξειδοαναγωγικές καταστάσεις, «τελειοποίηση» της θερμοδυναμικής και της κινητικής της υποκατάστασης του προσδέτη, καθώς και μια μεγάλη δομική ποικιλομορφία (Rijt 2009). Η ιατρική ανόργανη χημεία είναι ένας ακμάζων τομέας έρευνας (Hambley 2007, Sadler 2007, Storr 2006, Sessler 2005), ο οποίος τροφοδοτήθηκε αρχικά από την ανακάλυψη της μεταλλοφαρμακευτικής cisplatin περίπου 40 χρόνια πριν.

## 1.1.2 Ο ρόλος των ιόντων μετάλλου ως ικρίωμα

Τα ιόντα μετάλλων παραδοσιακά περιλαμβάνονται στους αντικαρκινικούς παράγοντες όσο αφορά στην εκμετάλλευση της αντιδραστικότητας τους και είναι ιδιαίτερα ελκυστικά λόγω του εξαιρετικά ευρέως φάσματος διαθέσιμων αντιδραστικότητων. Από την άλλη πλευρά, τα μέταλλα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως δομικά στοιχεία για σαφώς καθορισμένες, τρισδιάστατες δομές. Με τον τρόπο αυτό, η διαθεσιμότητα των πολλών διαφορετικών γεωμετριών συντονισμού επιτρέπει τη σύνθεση δομών με μοναδική στερεοχημεία και προσανατολισμό των οργανικών υποκαταστατών και δομές οι οποίες δεν είναι προσβάσιμες μέσω καθαρά οργανικών, με βάση τον άνθρακα ενώσεων. Η κινητική αδράνεια των πολωμένων ομοιοπολικών/οργανομεταλλικών δεσμών κάνουν αυτές τις ενώσεις αυτές εξ' αρχής να συμπεριφέρονται σαν οργανικές ενώσεις (Bruijninx 2008).

## 1.1.3 Σύμπλοκα του Λευκόχρυσου ή πλατίνας (Pt)

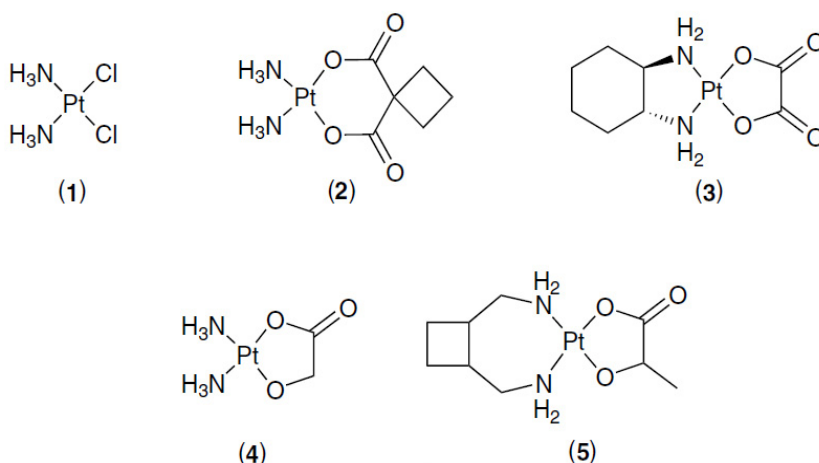
### 1.1.3.1 Ιστορική αναδρομή

Ο *cis*-διαμμινοδιχλωρολευκόχρυσος ή σισπλατίνη (*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], *cis*-Diammineplatinum(II) dichloride, *cis*-Dichlorodiammine platinum(II), *cis*-Platinum(II) diammine dichloride, Cisplatin, Cisplatinum, CDDP, *cis*-DDP) είναι πιθανόν το καλύτερα γνωστό παράδειγμα μικρομοριακού φαρμάκου που περιέχει μέταλλο. Σήμερα, 35 χρόνια μετά την έγκρισή του ως χημειοθεραπευτικό παράγοντα, η *cis*-DDP εξακολουθεί να είναι ένα από τα αντικαρκινικά φάρμακα με τις μεγαλύτερες πωλήσεις στον κόσμο. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1845 από τον M. Peyrone και ήταν γνωστή για πολλά χρόνια ως το «άλας του Peyrone» (Peyrone 1844). Η δομή της αποσαφηνίστηκε από τον νομπελίστα Alfred Werner το 1893. Η επαναστατική πρόοδος όμως επήλθε το 1965 από τον B. Rosenberg και συνεργάτες, του Michigan State University όπου ανακάλυψε ότι η ηλεκτρόλυση ηλεκτροδίων από πλατίνα δημιούργησε ένα διαλυτό σύμπλοκο της πλατίνας το οποίο ανέστειλε τη διχοτόμηση του βακτηρίου *Escherichia coli* (*E. Coli*). Παρόλο που η βακτηριακή κυτταρική ανάπτυξη συνεχίστηκε, η κυτταρική διαίρεση διακόπηκε και η ανάπτυξη των βακτηρίων ως νημάτια έφτασε περίπου τις 300 φορές του φυσιολογικού τους μήκους (Rosenberg 1965). Το οκταεδρικό Pt(IV) σύμπλοκο *cis*-PtCl<sub>4</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, αλλά όχι το *trans* ισομερές, βρέθηκε να είναι πιο αποτελεσματικό στην πρόκληση νηματώδους

ανάπτυξης των κυττάρων *E.coli*. Το τετραγωνικό επίπεδο σύμπλοκο της Pt(II), *cis*-PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> εμφανίστηκε ακόμα πιο αποτελεσματικό στον εξαναγκασμό της νηματοειδούς ανάπτυξης (Rosenberg 1967). Το παραπάνω εύρημα οδήγησε στην παρατήρηση ότι η *cis*-DDP ήταν όντως υψηλά δραστική στην οπισθοχώρηση της μάζας των σαρκωμάτων σε ποντίκια (Rosenberg 1969). Με την επιβεβαίωση αυτής της ανακάλυψης, καθώς και με την επέκταση των ελέγχων και σε άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές, ξεκίνησε τις ιατρικές εφαρμογές της η *cis*-DDP. Η *cis*-DDP εγκρίθηκε για την θεραπεία όγκων των όρχεων και των ωοθηκών από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των ΗΠΑ στις 19 Δεκεμβρίου του 1978.

### 1.1.3.2 Κλινική χρήση

Η χρήση και η αποτελεσματικότητα των συμπλόκων της πλατίνας στην αντικαρκινική θεραπεία από την εισαγωγή τους στην κλινική πράξη στα τέλη του 1970 έχει πλήρως τεκμηριωθεί (Lipert 1999, Kelland 2000, Wong 1999).



**Εικόνα 1.1** Δομές των συμπλόκων της πλατίνας που βρίσκονται σε κλινική χρήση. (1) cisplatin, (2) carboplatin, (3) oxaliplatin, (4) nedaplatin, (5) lobaplatin.

Η cisplatin έχει αναφερθεί για την θεραπεία καρκίνων των γεννητικών κυττάρων, τροφοβλαστικούς όγκους της κνήσεως, επιθηλιακούς καρκίνους των ωοθηκών και μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα καθώς και για την μετρίαση καρκίνων της ουροδόχου κύστης, του τραχήλου της μήτρας, του οισοφάγου, του ρινοφάρυγγα, της κεφαλής και του τραχήλου (λαιμού) (Lebwohl 1998, O'Dwyer 1997, Weiss 1993). Η transplatin, το *trans* στερεοϊσομερές της cisplatin, έχει τον τύπο *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], και

δεν παρουσιάζει ένα συγκριτικά χρήσιμο φαρμακολογικό αποτέλεσμα και εμφανίζεται κλινικά αναποτελεσματικό (Nafisi 2009). Η χαμηλή δραστηριότητα της, πιστεύεται γενικά, ότι οφείλεται στην ταχεία απενεργοποίηση της πριν φθάσει στο DNA. Είναι τοξικό και είναι επιθυμητό να δοκιμαστούν οι παρτίδες της cisplatin για την απουσία του *trans* ισομερούς. Σε μια διαδικασία σύμφωνα με τους Woollins και συνεργάτες, η οποία βασίζεται στη κλασική δοκιμή Kurnakov, η θειουρία αντιδρά με το δείγμα για να δώσει παράγωγα τα οποία μπορούν εύκολα να διαχωριστούν και να ανιχνευτούν με HPLC (Woollins 1983).

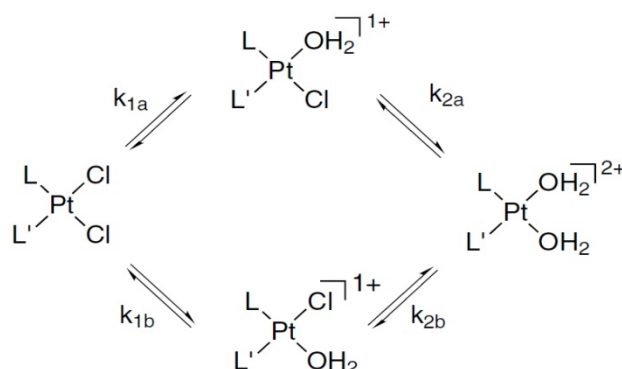
Η χρήση της *cis*-DDP (συνήθως ως κύριο συστατικό των συνδυαστικών σχημάτων) κατέστησε τουλάχιστον ένα καρκίνο, τον καρκίνο των όρχεων, ιάσιμο και είναι σημαντική στη θεραπεία των καρκίνων των ωοθηκών και της ουροδόχου κύστης. Η τυπική δοσολογία κυμαίνεται από 20 mg/m<sup>2</sup> έως 100 mg/m<sup>2</sup>, συνήθως για έως πέντε διαδοχικές ημέρες. Παρά την επιτυχία αυτή, υπάρχει ακόμη ένα περιορισμένο φάσμα όγκων ευαίσθητων στην *cis*-DDP- ορισμένοι καρκίνοι είναι εγγενώς ανθεκτικοί (O'Dwyer 1999, Highley 2000). Ένα περαιτέρω μειονέκτημα είναι η εμφάνιση αποκτηθείσας κλινικής ανθεκτικότητας μετά την αγωγή με το φάρμακο. Οι παρενέργειες της θεραπείας με *cis*-DDP είναι σοβαρές και περιλαμβάνουν την δόσοπεριοριστική νεφροτοξικότητα, νευροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα, και ναυτία και έμετο καθώς και απώλεια τριχών.

Οι "δεύτερης γενιάς" ενώσεις με βάση την δομή της *cis*-DDP αναπτύχθηκαν ως προσπάθειες για τη βελτίωση της τοξικότητας και/ή επέκτασης του φάσματος των ωφέλιμων αντικαρκινική δράσεων. Η carboplatin εισήλθε στην κλινική χρήση το 1989, κυρίως σε απόκριση προς την ανάγκη για τη μείωση των τοξικών παρενεργειών του μητρικού φαρμάκου (cisplatin). Παρά την χαμηλότερη τοξικότητα, η carboplatin είναι ουσιαστικά δραστική στην ίδια «ομάδα» όγκων όπως η cisplatin (Christian 1992). Για ορισμένους όγκους, η cisplatin φαίνεται να είναι θεραπευτικά αποτελεσματικότερη από την carboplatin (όγκους γεννητικών κυττάρων, κεφαλής και λαιμού, και της ουροδόχου κύστης), ενώ για τον καρκίνο του πνεύμονα και των ωοθηκών εμφανίζουν την ίδια αποτελεσματικότητα (Lokich 1998). Από την έλευση της cisplatin στην κλινική εφαρμογή, ως σταθεροί στόχοι για την ανάπτυξη των φαρμάκων υπήρξαν η βελτίωση του προφίλ τοξικότητας, η παράκαμψη της ανθεκτικότητας και την επέκταση του εύρους των όγκων ευαίσθητων στη θεραπεία με cisplatin. Η σημασία της παράκαμψης της ανθεκτικότητας αναγνωρίστηκε πολύ νωρίς και αναφορές της δραστηριότητας συμπλοκών που περιέχουν 1,2-διαμινοκυκλοεξάνιο (dach) σε μύες L1210 ανθεκτικούς στην cisplatin χρονολογούνται

από το 1978 (Burcheranal 1978). Μετά την έγκριση της στην Ευρώπη το 1996, η oxaliplatin έλαβε τελικά έγκριση για χρήση στις ΗΠΑ το 2002 για τον ορθοκολικό καρκίνο σε συνδυασμό με την 5-φθοριουρακίλη (5-FU) (Macdonald 2001, Pelley 2001). Λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για τη nedaplatin (Ota 1996) και τη lobaplatin (Welink 1999, McKeage 2001), οι οποίες έχουν εγκριθεί για χρήση στην Ιαπωνία το 1995 και την Κίνα το 2005, αντιστοίχως.

### 1.1.3.3 Μηχανισμός Δράσης και Ανθεκτικότητα

Το ρυθμοπεριοριστικό στάδιο στη σύνδεση της cisplatin με το DNA είναι η ενυδάτωση των δεσμών Pt-Cl. Τα κύρια προϊόντα της ενυδάτωσης της cisplatin είναι τα μόνο και δις-υδατικά είδη  $cis-[Pt(NH_3)_2(H_2O)Cl]^+$  και  $cis-[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$ , αντίστοιχα (Εικόνα 1.2).

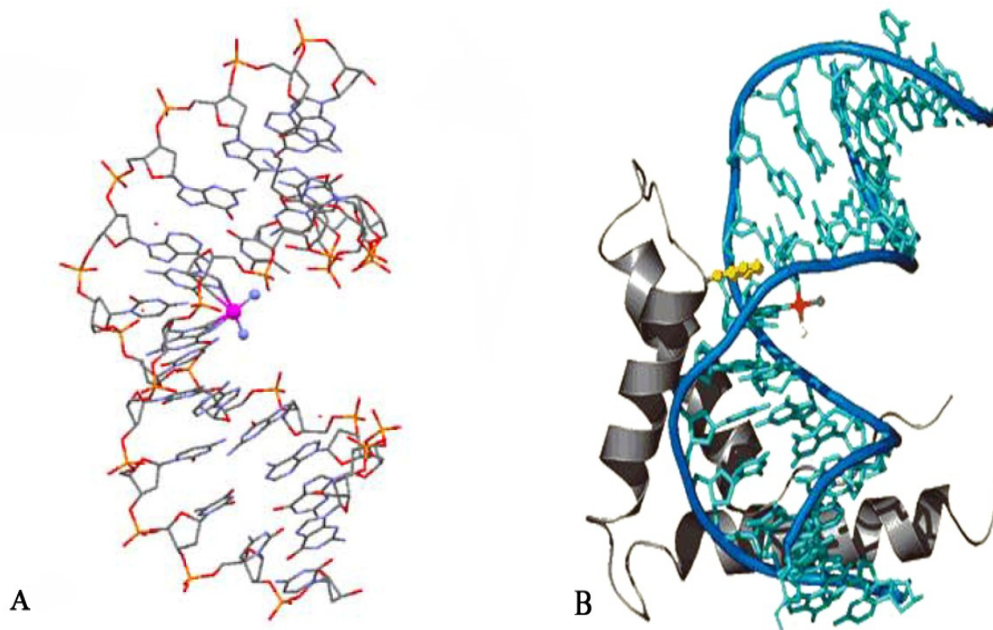


**Εικόνα 1.2** Περιγραφή της υδρόλυσης για τους αντικαρκινικούς παράγοντες με βάση την πλατίνα. Όπου  $L=L'=NH_3$  ενδείκνυται η cisplatin. Όπου  $L=NH_3$  και  $L'=2$ -picoline ή cha ο ρυθμός ενυδάτωσης των *trans*-χλωριούχων υποκαταστατών είναι διαφορετικός.

Μολονότι η ενεργοποιημένη (ενυδατωμένη) cisplatin μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλα βιομόρια, η αντικαρκινική δραστηριότητα της προέρχεται από την ικανότητά της να σχηματίσει διλειτουργικές σταυροειδείς συνδέσεις στο DNA, οι οποίες προκαλούν στρέβλωση (συστροφή) του DNA (Εικόνα 1.3) (Sherman 1985). Η επαγόμενη από το λευκόχρυσο στρέβλωση στο DNA θεωρείται ότι είναι η κρίσιμη βλάβη που οδηγεί σε μία αλυσίδα γεγονότων που περιλαμβάνει την πρωτεϊνική αναγνώριση (π.χ. από HMG, πρωτεϊνικές ομάδες υψηλής κινητικότητας) και τελικά την απόπτωση (Wang 2005).

Η αποπρωτονίωση δίνει αδρανή υδροξο-είδη, τα οποία μπορεί επίσης να σχηματίσουν διπυρηνικά και τριπυρηνικά υδροξο-γεφυρωμένα είδη σε συμπυκνωμένο διάλυμα. Ο υπολογισμός του  $pK_a$  των συντονισμένων μορίων νερού σε συνδυασμό με σταθερές

ισορροπίας τόσο για τις αντιδράσεις ενυδάτωσης όσο και για της αποπρωτονίωσης επιτρέπει τον υπολογισμό της ειδογένεσης σε βιολογικά μέσα (Berners 2000, Miller 1991).



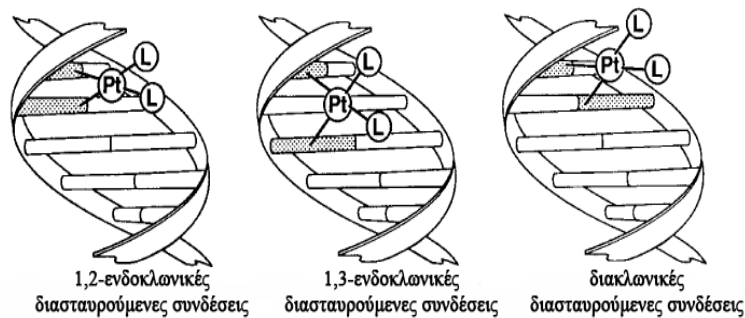
**Εικόνα 1.3** A: Δομή ακτίνων X που παρουσιάζει την στρέυλωση (κάμψη) του DNA εξαιτίας της σισπλατίνας (μωβ). B: Μια πρωτεΐνη HMG (MNGB1, γκριζα ταινία) εισάγει το φαινύλιο (κίτρινο) μιας φαινυλαανίνης στο διάκενο που δημιουργεί η σισπλατίνη, όταν αυτή δημιουργεί ένωση προσθήκης με το DNA εξαναγκάζοντας το να υποστεί στρέυλωση (κάμψη) στο σημείο σύνδεσης και έτσι να ξεκινήσει ο καταρράκτης της απόπτωσης.

Η ένωση, και τα άμεσα δομικά ανάλογα της, σχηματίζουν ενώσεις προσθήκης μεταξύ γειτονικών καταλοίπων (residues) γουανίνης στο DNA, σχηματίζοντας d(GG) 1,2-ενδοκλωνικές και d(GC) διακλωνικές διασταυρούμενες συνδέσεις, που παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.4. Μικρές βλάβες, οι οποίες δεν έχουν λάβει την απαραίτητη σημασία, είναι οι 1,2-ενδοκλωνικές διασταυρούμενες συνδέσεις που σχηματίζονται μεταξύ μιας αδενίνης και μιας γουανίνης σε μία ένωση προσθήκης d(AG) καθώς επίσης και οι 1,3-ενδοκλωνικές διασταυρούμενες συνδέσεις στις οποίες δύο γουανίνες με πλατίνα διαχωρίζονται από ένα ζεύγος βάσεων, d(GNG).

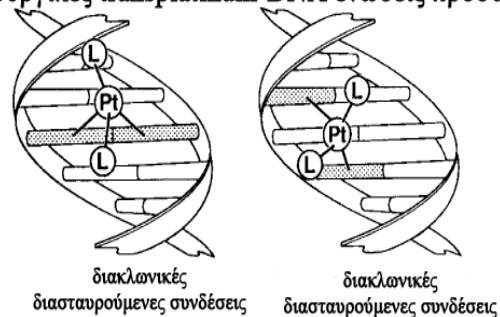
Στην ουσία, δύο κύρια μονοπάτια μπορούν να ακολουθηθούν σε ένα κύτταρο από τη στιγμή που αυτό θα λάβει μια «προσβολή» όπως ένα χημειοθεραπευτικό φάρμακο ή μια μεταλλαξιγόνο βλάβη με οποιοδήποτε τρόπο. Αυτά είναι (i) να διορθώσει τη ζημιά και (ii) η έναρξη του καταρράκτη της απόπτωσης (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την κυτταροτοξικότητα της cisplatin, είτε σε ευαίσθητα ή σε ανθεκτικά κύτταρα, συνοψίζονται στο Σχήμα 1.4. Η βλάβη του DNA από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες σε πολλές περιπτώσεις επάγεται μέσω του μονοπατιού της p53 (Ruley 1996). Οι βλάβες στο DNA που προκαλούνται από τη cisplatin διεγείρουν την απόπτωση μέσω του μονοπατιού της p53, αν και σε ορισμένες κυτταρικές σειρές ή τύπους όγκου παρατηρήθηκε ότι ακολουθείται ένα ανεξάρτητο της p53 μονοπάτι της απόπτωσης (Eastman 2001, Gonzalez 2001). Η ανθεκτικότητα στη cisplatin είναι πολυπαραγοντική και έχειδειχθεί ότι οφείλεται σε έναν συνδυασμό μειωμένης κυτταρικής συσσώρευσης της, αυξημένης εκροής της πλατίνας από το κύτταρο, αυξημένη κυτταροπλασματική αποτοξίνωση (μέσω της αύξησης των επιπέδων των κυτταρικών θειόλων όπως η GSH), ή αυξημένη επιδιόρθωση/ανεκτικότητα των πλατίνας-DNA προσαγωγών (Kartalou 2001(a), Perez 1998).

#### Διλειτουργικές cisplatinum-DNA ενώσεις προσθήκης



#### Διλειτουργικές transplatinum-DNA ενώσεις προσθήκης

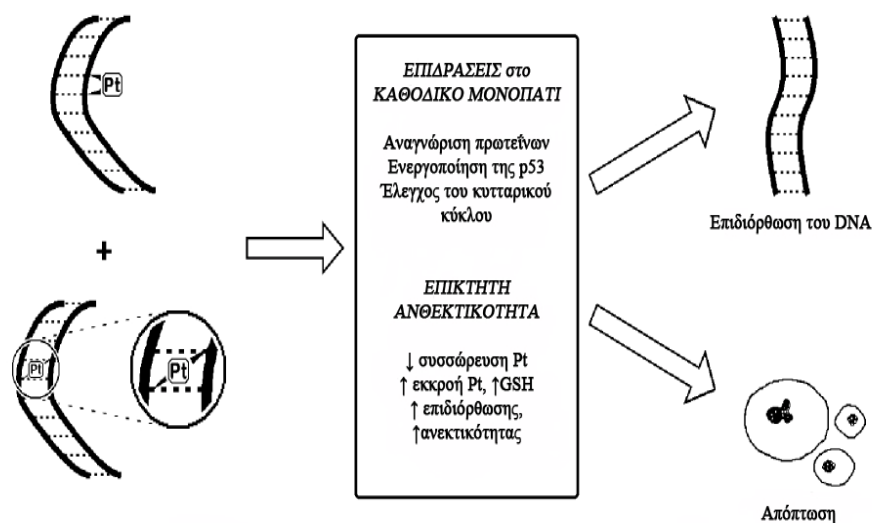


**Εικόνα 1.4** Σχηματική απεικόνιση των διασταυρούμενων συνδέσεων από την *cis*- και την *trans*-platin

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την κυτταροτοξικότητα της cisplatin, είτε σε ευαίσθητα ή σε ανθεκτικά κύτταρα, συνοψίζονται στην Εικόνα 1.5. Η βλάβη του DNA από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες σε πολλές περιπτώσεις επάγεται μέσω του μονοπατιού της p53 (Ruley 1996). Οι βλάβες στο DNA που προκαλούνται από τη cisplatin διεγείρουν



την απόπτωση μέσω του μονοπατιού της p53, αν και σε ορισμένες κυτταρικές σειρές ή τύπους όγκου παρατηρήθηκε ότι ακολουθείται ένα ανεξάρτητο της p53 μονοπάτι της απόπτωσης (Eastman 2001, Gonzalez 2001). Η ανθεκτικότητα στη cisplatin είναι πολυπαραγοντική και έχει δειχθεί ότι οφείλεται σε έναν συνδυασμό μειωμένης κυτταρικής συσσώρευσης της, αυξημένης εκροής της πλατίνας από το κύτταρο, αυξημένη κυτταροπλασματική αποτοξίνωση (μέσω της αύξησης των επιπέδων των κυτταρικών θειόλων όπως η GSH), ή αυξημένη επιδιόρθωση/ανθεκτικότητα των πλατίνας-DNA προσαγωγών (Kartalou 2001(a), Perez 1998).



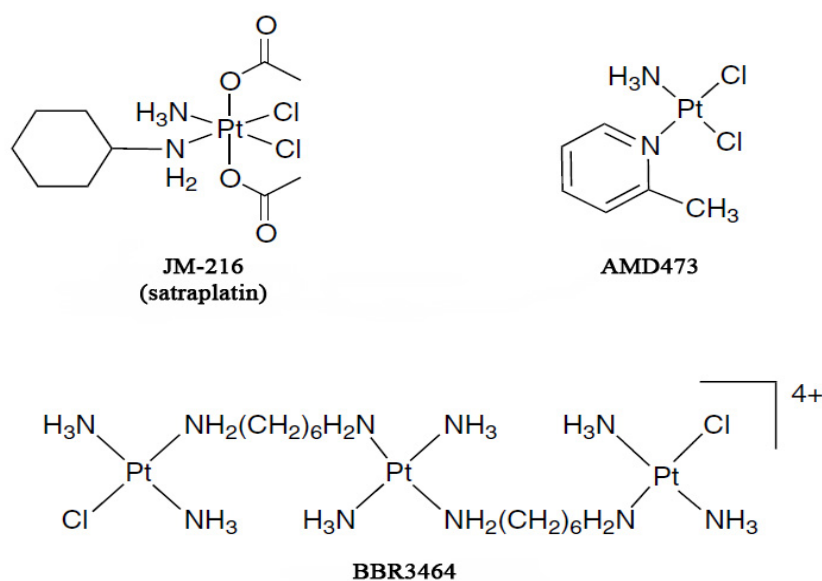
**Εικόνα 1.5.** Γενικό σχήμα της κυτταρικής απόκρισης στην επαγόμενη από την πλατίνα βλάβη του DNA.

Η κυτταρική συσσώρευση της cisplatin είναι μια πολύ πιο περίπλοκη διαδικασία από ό, τι εθεωρείτο μέχρι σήμερα. Πλέον θεωρείται ότι υπάρχουν μονοπάτια τόσο της ενεργητικής όσο και παθητικής διάχυσης (Kartalou 2001(b)). Η δημιουργία ανθεκτικών κυτταρικών σειρών με χαρακτηρισμένους και ρυθμισμένους μηχανισμούς δράσης βοήθησε σημαντικά στην προώθηση μιας μοριακής προσέγγισης για να ξεπεραστεί η ανθεκτικότητα (Loh 1992, Haggap 1990). Σε συνδυασμό με αυτή την αντίληψη υπήρξε η ανάγκη για κατανόηση της τύχης ή του μεταβολισμού της cisplatin στο βιολογικό περιβάλλον και να εξηγήσει το φαρμακοκινητικό προφίλ του φαρμάκου.

#### 1.1.3.4 Ενώσεις της cisplatin σε κλινικές δοκιμές

Η ανάγκη για νέους αντικαρκινικούς παράγοντες είναι εμφανής από την αδυναμία πρόβλεψης για ίαση ή από την επαγωγή ύφεσης σε κοινούς όγκους όπως του μαστού, του πνεύμονα, του παχέος εντέρου ή του καρκίνου του προστάτη. Οι νέοι

κυτταροτοξικοί παράγοντες που δημιουργούνται με βάση την εμπειρία και τις γνώσεις του παρόντος “οπλοστασίου” εξακολουθούν να διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην κλινική αντιμετώπιση του καρκίνου. Περίπου 28, άμεσα δομικά ανάλογα της cisplatin εισήχθησαν σε κλινικές δοκιμές, αλλά τα περισσότερα έχουν εγκαταλειφθεί εξαιτίας ενός συνδυασμού μη αποδεκτών προφίλ τοξικότητας και / ή έλλειψης βελτίωσης ή επέκτασης της αντικαρκινικής δραστηριότητας (Lebwohl 1998). Για να βρουν κλινική χρήση νέα, άμεσα δομικά ανάλογα της cisplatin θα πρέπει να επιδείξουν εξαιρετικές ιδιότητες. Σήμερα, υπάρχουν τρία κύρια φάρμακα (Εικόνα 1.6) σε κλινικές δοκιμές. Οι προσεγγίσεις για την ανάπτυξη τους αντιπροσωπεύουν παραδείγματα στερικού ελέγχου της αντιδραστικότητας, τον έλεγχο της οξειδωτικής κατάστασης και τη λιποφιλία του υποκαταστάτη που στοχεύουν στην παραγωγή δια του στόματος λαμβανόμενων δραστικών παραγόντων, και τον χειρισμό των νέων δομών για την παραγωγή νέων δομικά ενώσεων προσθήκης με το DNA.



Εικόνα 1.6 Φάρμακα με βάση την πλατίνα σε κλινικές δοκιμές

## 1.1.4 Μη πλατινικά σύμπλοκα μετάλλων

### 1.1.4.1 Ρουθίνιο (Ru)

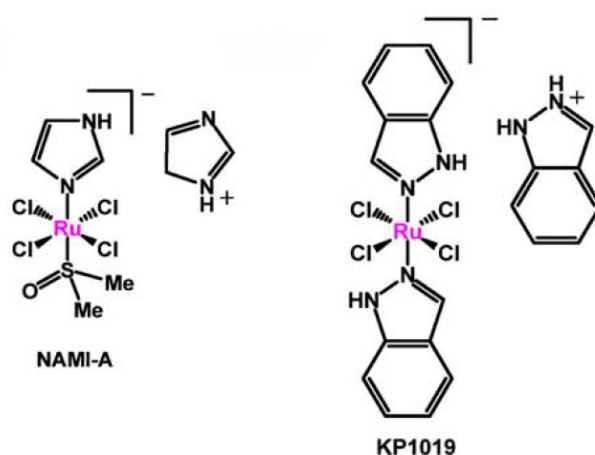
Οι ενώσεις που περιέχουν ρουθίνιο Ru(II) ή Ru(III) θεωρούνται ότι είναι κατάλληλοι υποψήφιοι για σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων επειδή παρουσιάζουν

παρόμοιο φάσμα κινητικής για τις αντιδράσεις υποκατάστασης του προσδέτη τους όπως ο λευκόχρυσος (II).

Το ρουθίνιο έχει δώσει ενώσεις πολλά υποσχόμενες, παρόλο που κανένα άμεσο ανάλογο δεν έχει προχωρήσει σε κλινικές δοκιμές. Τα σύμπλοκα αμμινορουθηνίου με γενικό τύπο  $[\text{RuCl}_n(\text{NH}_3)_{6-n}]^{2+}$  (όπου  $n = 3, 4, \text{ ή } 5$ ), *fac* $[\text{RuCl}_3(\text{NH}_3)_3]$  έδειξαν καλή δραστηριότητα αλλά δεν ήταν επαρκώς υδατοδιαλυτά για πραγματοποίηση εκτενών δοκιμών (Clarke 1999, Clarke 1989). Η θέση N7 της γουανίνης είναι η προτιμώμενη θέση δέσμευσης για τα υδατικά ειδών  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ , αλλά η μετανάστευση του μετάλλου μπορεί να συμβεί σε άλλες νουκλεοβάσεις (Frasca 1999). Η GSH ρυθμίζει την πρόσδεση των συμπλόκων του αμμινορουθηνίου στο DNA. Η ομοιοπολική σύνδεση του *trans*- $[(\text{H}_2\text{O})(\text{py})\text{Ru}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$  στο DNA συμβαίνει ειδικά στη θέση N7 της γουανίνης (Zhao 1999).

Μια μεγάλη ποικιλία συμπλόκων του Ru συμπεριλαμβανομένων των δι- και τριπυρηνικών συμπλόκων με γέφυρες καρβοξυλίου, επιδεικνύουν αντικαρκινική δράση σε ζωικά μοντέλα. Τα σύμπλοκα του ιμιδαζολίου *trans*- $[\text{RuCl}_4(\text{L})_2]^-$  (όπου L= ιμιδαζόλιο, ινδαζόλιο) έχουν καλή αντικαρκινική δραστηριότητα (Kerpler 1991, Pieper 1999). Η τρανσφερίνη και η λευκωματίνη του ορού μπορούν να ενεργούν ως μεταφορείς των συμπλόκων μετάλλου στο αίμα και το DNA θεωρείται ο απώτερος στόχος (Kratz 1994). Δύο σύμπλοκα του ρουθηνίου (III) έχουν εισέλθει σε κλινικές δοκιμές: *trans*- $\text{RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})\text{ImH}$  (NAMI-A, όπου Im = ιμιδαζόλιο) και *trans*- $[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]\text{IndH}$  (KP1019, όπου Ind = ινδαζόλιο).

Το NAMI-A είναι περισσότερο δραστικό έναντι μεταστάσεων από ό, τι έναντι των πρωτογενών όγκων (Rademaker-Lakhai 2004). Αντίθετα, το παρόμοια δομικά σύμπλοκο KP1019 είναι ενεργό εναντίον πρωτογενών όγκων (Jakupec 2005). Πιστεύεται ότι η δραστηριότητα των συμπλόκων του ρουθηνίου (III) εξαρτάται από την *in vivo* αναγωγή στα πιο δραστικά είδη του ρουθηνίου (II) (Clarke 1999).



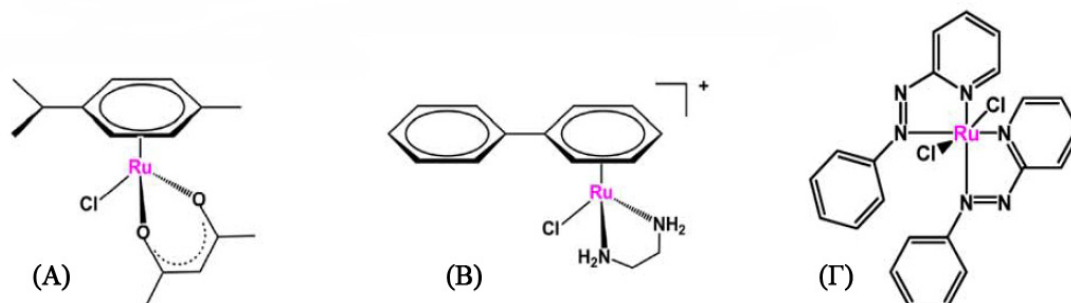
**Εικόνα 1.7** Δομή συμπλόκων ρουθηνίου σε κλινικές δοκιμές

Άλλα σύμπλοκα του ρουθηνίου με εξαιρετικό *in vitro* και *in vivo* ενδιαφέρον περιλαμβάνουν τα σύμπλοκα του Ru (II)-αρενίου τύπου half-sandwich (Εικόνα 1.9 (A), (B)) (Aird 2002). Ο μηχανισμός δράσης περιλαμβάνει την ένωση του συμπλόκου στη θέση N7 της γουανίνης στο DNA αλλά και ειδικούς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του χηλικού υποκαταστάτη και του C60 της γουανίνης (Chen 2002), όπου οι τελευταίοι έχουν ως αποτέλεσμα μοναδικούς τρόπους σύνδεσης στο δίκλωνο DNA και δομικές στρεβλώσεις που είναι σαφώς διαφορετικότερες από εκείνες που προκαλούνται από τη σισπλατίνη (Chen 2003).



**Εικόνα 1.8** Μοντέλο που δείχνει την παρεμβολή ενός συμπλόκου Ru<sup>II</sup>-αρενίου στο DNA.

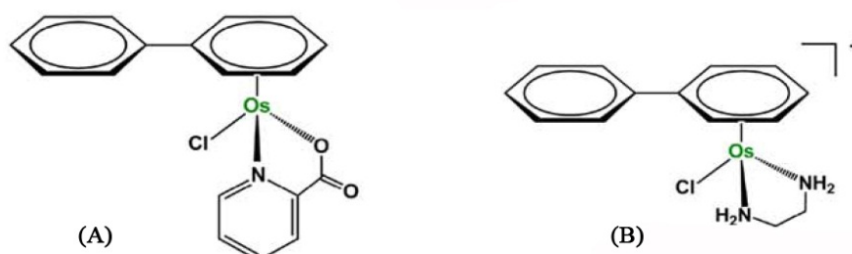
Επίσης τα σύμπλοκα του ρουθηνίου με αρυλαζοπυριδίνη (azpy) (Εικόνα 1.9 (Γ)) εμφανίζουν ενδιαφέρουσα κυτταροτοξική δραστηριότητα και κυτταροτοξικές μελέτες *in vitro* έχουν πραγματοποιηθεί από τους Hotze και λοιπούς (Hotze 2006).



**Εικόνα 1.9** Σύμπλοκα του Ρουθηνίου: (Α)-(Β) Παραδείγματα κυτταροτοξικών συμπλόκων του Ρουθηνίου (II) με αρένιο. (Γ)  $[\gamma\text{-Ru}(\text{azpy})_2\text{Cl}_2]$ .

#### 1.1.4.2 Όσμιο (Os)

Η αντικαρκινική δυνατότητα του οσμίου, ο βαρύτερος συγγενής του ρουθηνίου, έχει διερευνηθεί πρόσφατα. Τα σύμπλοκα του οσμίου έχουν φήμη ότι είναι είτε τοξικά ( $\text{OsO}_4$ ) είτε αδρανή στην υποκατάσταση (ενώσεις του Os(II) και Os(III)), και σαν συνέπεια, η θεραπευτικό τους δυναμικό έχει ελάχιστα διερευνηθεί. Ωστόσο, έχουν συντεθεί κάποια σύμπλοκα οσμίου (II)- αρενίου που επιδεικνύουν τοξικότητα σε καρκινικά κύτταρα που είναι συγκρίσιμη με τα κλινικά φάρμακα, καρβοπλατίνη και σισπλατίνη (Εικόνα 1.10) (Peacock 2008, van Rijt 2009). Αυτό επιτεύχθηκε με τη συστηματική μεταβολή της φύσης του χηλικού υποκαταστάτη για την τελειοποίηση της κινητικής και θερμοδυναμικής των αντιδράσεων των ενώσεων του οσμίου σε υδατικό διάλυμα (Peacock 2006, Peacock 2007). Τα αρένια του Os(II) πιστεύεται ότι αλληλεπιδρούν με το DNA με παρόμοιο τρόπο με τα ανάλογα του ρουθηνίου.



**Εικόνα 1.10** Παραδείγματα κυτταροτοξικών συμπλόκων Os(II) –αρένιο

Ενδιαφέρον προκαλεί η πρόσδεση των συμπλόκων του  $Os^{II}$ -αρενίων σε DNA θύμου μοσχαριού που οδηγεί σε ένα μεγάλο ξετύλιγμα της διπλής έλικας του DNA, σε αντίθεση με τη σισπλατίνη, η οποία προκαλεί κάμψη του DNA (Kostrhunova 2008). Αυτά τα σύμπλοκα του οσμίου δεν εμφανίζουν διασταυρούμενη ανθεκτικότητα με την cisplatin προς τα καρκινικά κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει την υπόσχεση για την αντιμετώπιση του προβλήματος της εγγενούς ή επίκτητης ανθεκτικότητας στη χημειοθεραπεία.

#### 1.1.4.3 Τριοξείδιο του αρσενικού (As)

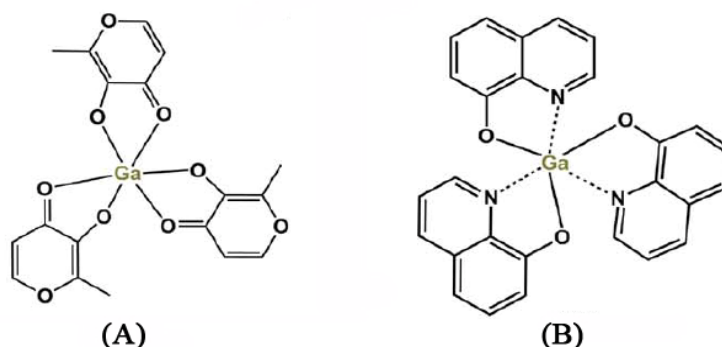
Το τριοξείδιο του αρσενικού,  $As_2O_3$  (Trisenox, Cell Therapeutics Inc, Seattle, USA) το οποίο εγκρίθηκε από το FDA τον Σεπτέμβριο του 2000 για τη θεραπεία της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (APL) σε ασθενείς που έχουν υποτροπιάσει ή να είναι ανθεκτικοί στη χημειοθεραπεία με ρετινοειδή και ανθρακυκλίνη. Το αρσενικό έχει χρησιμοποιηθεί για θεραπευτικούς σκοπούς για περισσότερο από 2,000 χρόνια και στη δεκαετία του 1930 χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας μέχρι που υποσκελίστηκε από νεότερες χημειοθεραπείες (Antman 2001, Waxman 2001). Παρόλα αυτά, το πρόσφατο ενδιαφέρον στο τριοξείδιο του αρσενικού αρχικά προέκυψε μέσω κινεζικών εκθέσεων της αποτελεσματικότητας και της χρήσης του (Shen 1997). Η συνιστώμενη δόση είναι  $0.15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$  έως την υποχώρηση του όγκου (Novick 2000). Ως παρενέργειες αναφέρονται η καρδιοτοξικότητα, τα δερματικά εξανθήματα, και η υπεργλυκαιμία (Rust 2001).

Το τριοξείδιο του αρσενικού επηρεάζει πολυάριθμα ενδοκυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος και προκαλεί πολλές μεταβολές στην κυτταρική λειτουργία. Έτσι, οι μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου που επάγονται από το τριοξείδιο του αρσενικού είναι πολλαπλοί όπως η επαγωγή της απόπτωσης, αναστολή του πολλαπλασιασμού, αναστολή της αγγειογένεσης (Miller 2002) αλλά και η αναστολή *in vitro* της GPX, πιθανόν μέσω της δημιουργίας συζεύξεων αρσενικού-GSH και η αύξηση του ενδοκυτταρικού υπεροξειδίου του υδρογόνου (Jing 1999).

#### 1.1.4.4 Γάλλιο (Ga)

Η χημική συμπεριφορά του γαλλίου (III), είναι παρόμοια με εκείνη του τρισθενούς σιδήρου,  $Fe(III)$ , αλλά διαφέρει στο ότι το  $Ga(III)$  είναι μη αναγωγίμο υπό φυσιολογικές συνθήκες, ενώ ο  $Fe(III)$  ανάγεται εύκολα προς  $Fe(II)$ . Η διαφορά αυτή παρέχει θεραπευτικό δυναμικό για το  $Ga(III)$ . Επί του παρόντος, δύο ενώσεις γαλλίου, η gallium

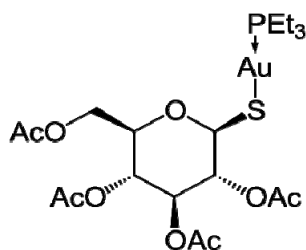
tris-8-quinolinolate (KP46) και η gallium tris-maltolate, διερευνώνται σε κλινικές δοκιμές (Jakupec 2004). Ο μηχανισμός δράσης τους σχετίζεται με την αναστολή της αναγωγής του ριβονουκλεοτιδίου (RR). Αυτό το ένζυμο καταλύει τη μετατροπή των ριβονουκλεοτιδίων σε δεσοξυριβονουκλεοτίδια και παράγεται κατά τη διάρκεια της μετάβασης από την G1 στην φάση S του κυτταρικού κύκλου ως προϋπόθεση για την αντιγραφή του DNA και εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά στα καρκινικά κύτταρα.



**Εικόνα 1.11** Δομές συμπλόκων του γαλλίου: (A) KP46, (B) Gallium tris-maltolate

#### 1.1.4.5 Χρυσός (Au)

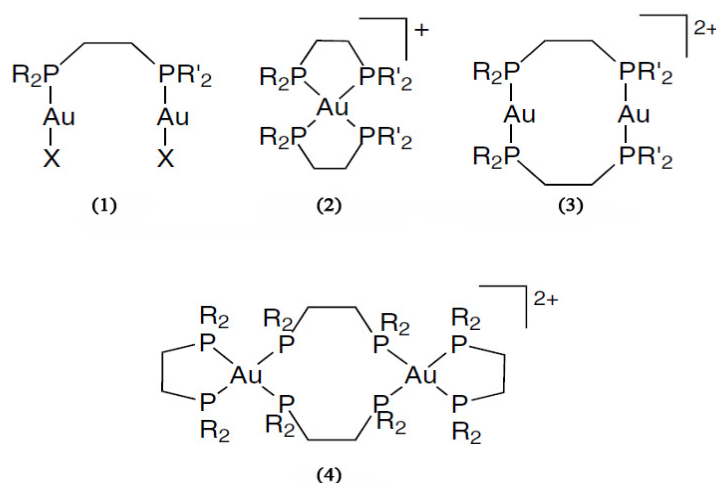
Τα σύμπλοκα χρυσού είναι γνωστά φαρμακευτικά προϊόντα, κυρίως για την εφαρμογή τους ως φάρμακα για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Ridaura® (auranofin)).



**Εικόνα 1.12** Η δομή της auranofin

Τα σύμπλοκα χρυσού-φωσφάνης (Εικόνα 1.13) είναι παραδείγματα λιπόφιλων κατιόντων που μπορεί να έχουν επίσης έναν ρόλο στην μιτοχονδριακή τοξικότητα (McKeage 2002, Berners-Price 1999). Παρόλο ότι ο ρόλος των αλάτων χρυσού στη αντιαρθρική θεραπεία είναι στενά συνδεδεμένη με τη σύνδεση με θειόλη, οι τετραεδρικές διφωσφινικές ενώσεις είναι πολύ λιγότερο δραστικές ως προς τις θειόλες

(Shaw 1999, Berners-Price 1987). Το λιπόφιλο κατιόν  $[\text{Au}(\text{dprpe})_2]^+$  (όπου  $\text{dprpe} = 2\text{-bis}(\text{diphenylphosphino})\text{ethane}$ ) έδειξε ισχυρή κυτταροτοξικότητα *in vitro* με ένδειξη αντιμιτοχονδριακής λειτουργίας (Berners-Price 1990) αλλά η ηπατοτοξικότητα που αποδίδεται σε μεταβολές στη μιτοχονδριακή λειτουργία ανέστειλαν τις κλινικές δοκιμές. Η χημεία των ενώσεων του διφώσφινο-χρυσού είναι πλούσια και η ανταλλαγή μεταξύ μονοπυρηνικών και διπυρηνικών ειδών γεφυρών φωσφίνης έχει εκτενώς εξεταστεί (Berners-Price 1996). Η υποκατάσταση των ομάδων φαινυλίου από 2-πυριδύλομάδες παρέχει μια ευκαιρία να ερευνηθεί συστηματικά η σχέση της δραστηριότητας του φαρμάκου με τη λιποφιλία (McKeage 2000, Berners-Price 1999). Αλλοίωση της λιποφιλίας επηρεάζεται σημαντικά την κυτταρική πρόσληψη και δέσμευση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Μεταβολές στη λιποφιλία επηρεάζουν επίσης την τοξικότητα του ξενιστή, επιτρέποντας την ευκαιρία για τη βελτιστοποίηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων.

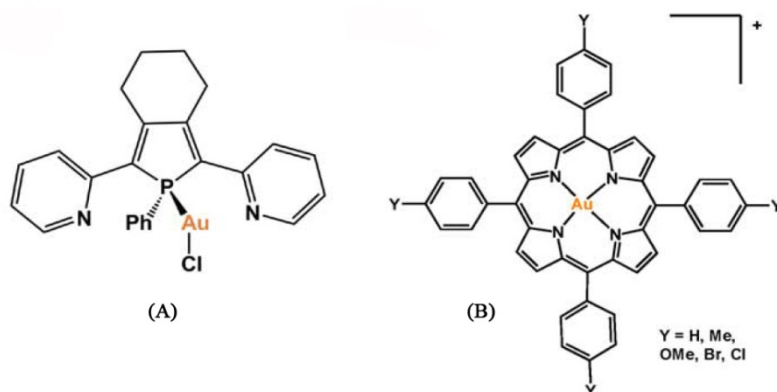


**Εικόνα 1.13** Δομές των συμπλόκων Au-phosphane ως εν δυνάμει φάρμακα για την διαταραχή της μιτοχονδριακής λειτουργίας.

Επιπρόσθετα, νεότερες μελέτες επιβεβαίωσαν ότι κάποια τετραεδρικά σύμπλοκα του  $\text{Au(I)}$  με φωσφίνη επιδεικνύουν ένα μεγάλο εύρος αντικαρκινικών ιδιοτήτων *in vitro* ιδιαίτερα σε κυτταρικές σειρές που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στη σισπλατίνη (Barnard 2007). Η κυτταροτοξικότητα τους μεσολαβείται από την ικανότητά τους να αναστέλλουν την μιτοχονδριακή ανθρώπινη αναγωγή της γλουταθειόνης ( $\text{hGR}$ ) και την αναγωγή της θειορεντοξίνης ( $\text{hTrxR}$ ) αμετάκλητα (Powis 2007). Ειδικότερα, τα σύμπλοκα phosphol- $\text{Au(I)}$  (Εικόνα 1.14) αποτελούν ισχυρούς αναστολείς (σε nanomolar συγκέντρωση) τόσο



της hGR όσο και της hTrxR (Urig 2006). Η hTrxR, συνδέεται με πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως η αντιοξειδωτική άμυνα και η οξειδοαναγωγική ομοιόσταση και βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

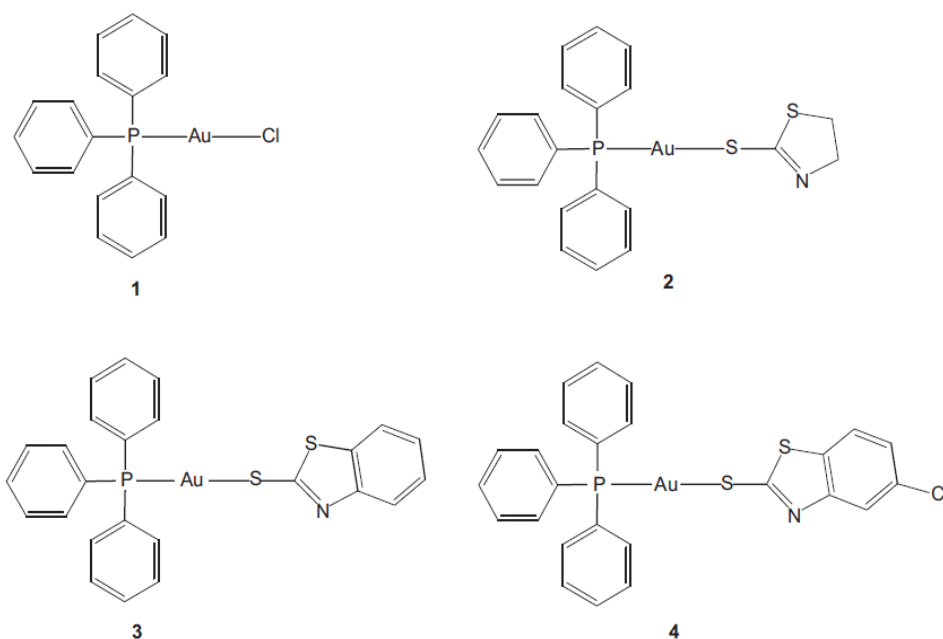


**Εικόνα 1.14** Δομές συμπλόκων χρυσού: (A) phosphol-Au(I), (B) meso-tetraarylporphyrins-Au(III).

Ο Au(III) εμφανίζει ισοηλεκτρονικές και ισοδομικές ιδιότητες (γεωμετρία επίπεδου τετραγώνου) με την Pt(II) (Tiekink 2002). Συνεπώς, ανάλογα του Au(III) με τα φάρμακα της Pt(II) ερευνήθηκαν για τις βιολογικές τους εν δυνάμει ιδιότητες αμέσως μετά την εμφάνιση της σισπλατίνης στην κλινική εφαρμογή. Δυστυχώς, αυτά βρέθηκαν να είναι σχετικά ασταθή και εύκολα αναγώγιμα στο μεταλλικό χρυσό υπό φυσιολογικές συνθήκες (Shaw 1999). Κατά τα τελευταία χρόνια, ωστόσο, αρκετές ενώσεις του Au(III) που ενσωματώνουν υποκαταστάτες για την αύξηση της σταθερότητας του στην οξειδωτική κατάσταση Au(III) έχουν αναφερθεί. Για παράδειγμα, ενώσεις του Au(III) με πορφυρίνες (Εικόνα 1.14) παρουσιάζουν *in vitro* και *in vivo* δραστηριότητα σε ηπατοκυτταρικό και ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα (Che 2003). Άλλες ενώσεις του Au(III) με ελπιδοφόρα βιολογική δραστηριότητα περιλαμβάνουν ενώσεις του Au(III) με διπυριδύλιο (Li 2006), διπυρηνικά σύμπλοκα Oxo- Au(III) (Gabbiani 2008) και του Au(III) με διθειοκαρβαμικά (Saggiolo 2007). Για τις ενώσεις αυτές, πιστεύεται ότι ο στόχος είναι τα μιτοχόνδρια και το πρωτεάσωμα (Bindoli 2009).

Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη το γενικό αναγωγικό περιβάλλον των θηλαστικών, οι ενώσεις που περιέχουν χρυσό (III) αναμένεται να μειθούν *in vivo* σε χρυσό (I) και αυτό επίσης οδήγησε στην έρευνα πιθανών αντικαρκινικών ιδιοτήτων του χρυσού (I) ενώσεων. Στα πλαίσια αυτά το 2009 συντέθηκαν σύμπλοκα του χρυσού (III) και του χρυσού (I) με θειοαμίδια και τριφαινυλοφωσφίνη τα οποία επέδειξαν ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις

αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε κύτταρα λειομυοσαρκώματος (Kourkoulis 2009). Περαιτέρω έρευνα αποκάλυψε ότι τα σύμπλοκα του χρυσού (I) με τριφαινυλοφωσφίνη και θειοαμίδια (Εικόνα 1.15) μπορούν να αναστείλουν τη δράση της λιποξυγενάσης (LOX) (Georgiou 2010), ένα ένζυμο που έχει αποδειχτεί ότι η ανεξέλεγκτη δραστηριότητα του σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες και την καρκινογένεση (Pidgeon 2007, Cuendet 2000, Klurfeld 1997) καθιστώντας το σημαντικό φαρμακολογικό στόχο.



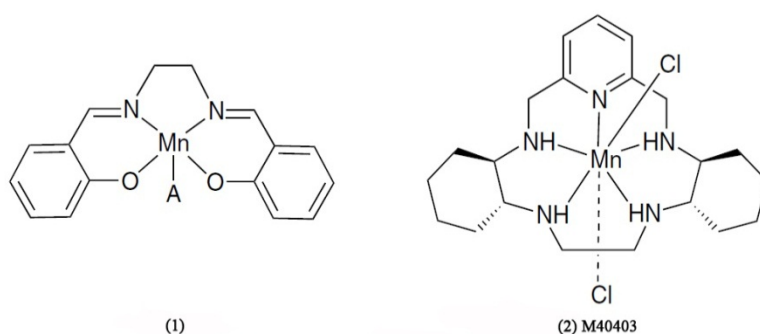
**Εικόνα 1.15** Συντακτικοί τύποι των συμπλόκων [Au(tpp)Cl] (1) [Au(tpp)(mtzd)] (2), [Au(tpp)(mbzt)] (3) and [Au(tpp)(cmbzt)] (4).

#### 1.1.4.6 Μαγγάνιο (Mn) - Μιμητικά σύμπλοκα της SOD

Το ένζυμο της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD), είτε περιέχοντας μαγγάνιο MnSOD (παρόν στο μιτοχόνδριο) ή ως διπυρηνικό Cu/Zn-SOD (που υπάρχει στο κυτταρόπλασμα και στον εξωκυτταρικό χώρο), επιτελεί το ρόλο της αποτοξίνωσης από το υπεροξείδιο στα φυσιολογικά κύτταρα και στους ιστούς (McCord 1969). Προσπάθειες για χρήση του ίδιου του ενζύμου ως θεραπευτικού παράγοντα υπήρξαν εν μέρει επιτυχείσες σε ζώα, αλλά όχι σε ανθρώπους (Kramer 2000). Τα φαρμακοκινητικά προβλήματα, συμπεριλαμβανομένων των προβλημάτων διανομής και της βραχείας ημιζωής στο αίμα, αποτελούν σημαντικά εμπόδια για τη χρήση του ενζύμου σε ανθρώπους.

Παρασκευάσματα Cu/Zn-SOD (εμπορικές ονομασίες Palosein, Orotein) χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία φλεγμονωδών ασθενειών σε σκύλους και άλογα. Μικρά

μιμητικά μόρια των φυσικών ενζύμων όπως της SOD μπορεί να επιδράσουν με την ίδια χημεία και έτσι να είναι χρήσιμες στην αγωγή νοσηρών καταστάσεων που προκαλούνται από μια ανισορροπία του υπεροξειδίου. Οι σκέψεις για την επιτυχή εφαρμογή της στρατηγικής αυτής είναι πολλές: μία ένωση πρέπει να έχει υψηλή χημική σταθερότητα, δραστηριότητα παρόμοιας της SOD, εκλεκτικότητα υπό βιολογικές συνθήκες, χαμηλή τοξικότητα, και ευνοϊκή βιοκατανομή. Χηλικές ενώσεις του μαγγανίου όπως (Εικόνα 1.16), ιδιαίτερα εκείνες που βασίζονται στα cyclam(1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane) και *N, N'*-bis(salicylaldehyde) ethylenediamine (salen), αποτελούν σημαντικές υποσχέσεις προς αυτή την κατεύθυνση (Melon 2000, Weiss 1999, Doctrow 1997). Μέσω ορθολογικής σχεδίασης έχει παραχθεί μια βέλτιστη δομή η M40403 η οποία είναι ένας κορυφαίος υποψήφιος για κλινικές δοκιμές (Aston 2001, Salvemini 1999). Αυτό το βασισμένο σε πυριδίνη μακρόκυκλο έχει χρησιμοποιηθεί ως συνδυαστική θεραπεία για τον καρκίνο με ιντερλευκίνη-2 (IL-2), ένα ανοσολογικό φάρμακο διεγέρσεως της κυτοκίνης που είναι εγκεκριμένο για χρήση σε μεταστατικό μελάνωμα και νεφροκυτταρικού καρκινώματος.



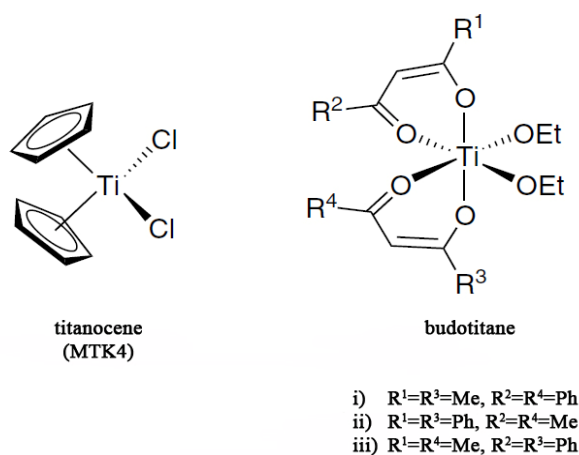
**Εικόνα 1.16** Μιμητικά σύμπλοκα της SOD με βάση το μαγγάνιο

#### 1.1.4.7 Τιτάνιο (Ti)

Δύο ενώσεις τιτανίου έλαβαν κλινικές δοκιμές στη Γερμανία. Η ένωση τιτανοκένιο (titanocene)  $[\text{TiCl}_2\text{Cp}_2]$  και βουδοτιτάνιο (budotitane), ένα δικετονικό παράγωγο, είναι δομικά αρκετά διαφορετικές ενώσεις (Εικόνα 1.17).

Η φάση I της κλινικής δοκιμής του  $[\text{TiCl}_2\text{Cp}_2]$  επέδειξε μέγιστη ανεκτή δόση (MTD) στα 315mg m<sup>-2</sup> για μία εφάπαξ ενδοφλέβια έγχυση, και 185mg m<sup>-2</sup> εβδομαδιαίως (Christodoulou 1998). Η δοσοπεριοριστική τοξικότητα ήταν η νεφροτοξικότητα (Korfel 1998). Η φάση II κλινικής δοκιμής σε καρκίνο νεφρών, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει πλεονέκτημα που έχει αποκτηθεί από τη χρήση του  $[\text{TiCl}_2\text{Cp}_2]$  (Lümmen 1998).

Υποθετικά το DNA είναι ο κύριος στόχος του titanocene λόγω της ομοιότητας της απόστασης μεταξύ των ατόμων του χλωρίου αν και δεν έχει υποστηριχθεί πειραματικά (Kuo 1996). Άλλες βιολογικές επιδράσεις που παρατηρήθηκαν για το [TiCl<sub>2</sub>Cp<sub>2</sub>] περιλαμβάνουν την αναστολή της πρωτεϊνικής κινάσης C και δραστηριότητα της DNA τοποϊσομεράσης II, καθώς και αναστολή της δραστηριότητας της κολλαγενάσης τύπου IV, υποδηλώνοντας κάποια αντιμεταστατική συμπεριφορά. Το τιτανίου μπορεί επίσης να αντικαταστήσει το σίδηρο στην τρανσφερίνη, επιτρέποντας έναν πιθανό μηχανισμό πρόσληψη εντός των καρκινικών κυττάρων (Sun 1998).



**Εικόνα 1.17** Σύμπλοκα τιτανίου που έχουν λάβει κλινικές δοκιμές. Το budotitane αποτελείται από τρία ισομερή (i, ii, iii).

Λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με τον τρόπο δράσης του budotitane το οποίο σχηματίζεται σε ένα μίγμα γλυκολών και νερού λόγω της έλλειψης διαλυτότητας σε νερό (Melendez 2002). Το budotitane υπάρχει σαν ένα μίγμα τριών *cis* ισομερών σε θερμική ισορροπία, έτσι ώστε κανένα καθαρό ισομερές δεν έχει απομονωθεί (Comba 1994). Η υδρόλυση των αιθόξυ ομάδων είναι ταχεία-η δόμηση επιβραδύνει την υδρόλυση και αποτρέπει το σχηματισμό των ολιγομερών οξο-γεφυρωμένων συμπλοκών. Η MTD της ήταν στα 230 mg m<sup>-2</sup> και η δοσοπεριοριστική της τοξικότητα ήταν η καρδιακή αρρυθμία (Schilling 1996). Οι φτωχά καθορισμένες υδατικές ιδιότητες και η έλλειψη στοιχείων σχετικά με το μηχανισμό δράσης δεν αποτέλεσε καλό οίονο για αυτό το φάρμακο.

#### 1.1.4.8 Κασσίτερος (Sn)

Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις έχουν πολλές εφαρμογές και μεταξύ των άλλων χρησιμοποιούνται εμπορικά ως γεωργικά φάρμακα, βιοκτόνα, εξαιτίας των αντιμυκητιασικών ιδιοτήτων τους (Smith 1998, Davis 1997, van de Kerk 1976, River 1973). Τα σύμπλοκα του κασσιτέρου συνήθως είναι λιγότερο δραστικά από τα αντίστοιχα αντικαρκινικά της πλατίνας αλλά εμφανίζουν το πλεονέκτημα της μικρότερης τοξικότητας (Couce 1996).

Οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα με θειοαμίδια έχουν συντεθεί και μελετηθεί για την αντικαρκινική τους δράση (Berceanu 2002, de Sousa 2000, Schmiedgen 1998, Huber 1997). Ο μηχανισμός της βιολογικής δράσης των οργανοκασσιτερικών(IV) συμπλόκων ή ακόμα και των μητρικών οργανοκασσιτερικών(IV) ενώσεων, δεν έχει ακόμα πλήρως αποσαφηνιστεί και μπορεί να διαφοροποιείται από ένωση σε ένωση (Pellerito 2002, Nath 2001, Saxena 1989). Παρόλα αυτά, έχει προταθεί ότι η βιολογική δράση αυτών των μορίων μπορεί να εξαρτάται από έναν αριθμό ομάδων αποχώρησης διαθέσιμων γύρω από το ιόν του Sn(IV) και επακολούθως στη γεωμετρία ή στην ισχύ των δεσμών Sn-S ή/και Sn-N των συμπλόκων (Nath 2001).

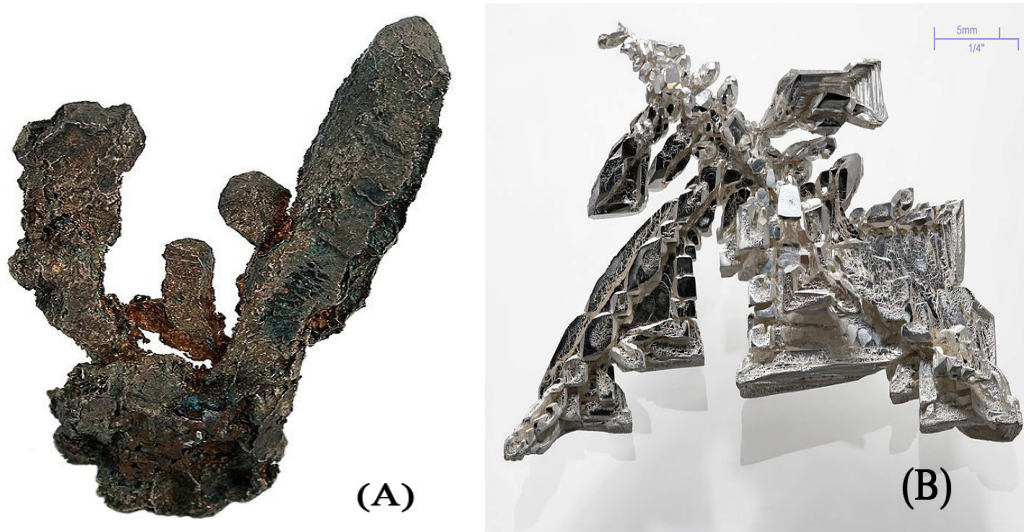
Υπό αυτή την οπτική, νέα οργανοκασσιτερικά(IV) σύμπλοκα με ετεροκυκλικά θειοαμίδια (2-μερκαπτοβενζοθειαζόλιο (Hmbzt), 5-χλώρο-2-μέρκαπτοβενζοθειαζόλιο (Hcmbzt), 3-μέθυλ-2-μερκαπτοβενζοθειαζόλιο (mmbzt) και 2-μερκαπτονικοτινικό οξύ (H<sub>2</sub>mna)) συντέθηκαν και ελέγχθησαν για τις κυτταροτοξικές τους ιδιότητες έναντι σε κυτταρική σειρά λειομυοσαρκώματος (Xanthoroulou 2003). Από τα παραπάνω σύμπλοκα αυτά που περιείχαν τα θειοαμίδια Hmbzt και Hcmbzt επέδειξαν ισχυρή κυτταροτοξική δράση σε nM επίπεδα συγκέντρωσης. Η Ξανθοπούλου και συνεργάτες (Xanthoroulou 2006), συνεχίζοντας την μελέτη οργανοκασσιτερικών(IV) συμπλόκων με θειοαμίδια συνέθεσαν ένα σύμπλοκο του χλωρο-δι-φαινυλκασσιτέρου(IV) με 2-μερκαπτο-νικοτινικό οξύ, το οποίο φαίνεται ότι επηρεάζει την καταλυτική οξείδωση του λινολεϊκού οξέως σε υδροπεροξυλινολεϊκό οξύ από το ένζυμο της λιποξυγενάσης. Η LOX είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την οξείδωση του αραχιδονικού οξέως σε λευκοτριένια, μηχανισμός που παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση (Knapp 2003, Samuelsson 1987).

## 1.1.5 Άργυρος (Ag)

### 1.1.5.1 Γενικά στοιχεία

Ο άργυρος ή ασήμι είναι από τα πρώτα μέταλλα που χρησιμοποίησε ο άνθρωπος και ήταν γνωστός ήδη από την προϊστορική εποχή στους λαούς που κατοικούσαν στη Μεσοποταμία, στον Ελλαδικό Χώρο, στη Μέση Ανατολή και στην Αίγυπτο. Ανήκει στα ευγενή μέταλλα μαζί με το ρουθίνιο, το ρόδιο, το όσμιο, το ιρίδιο, το παλλάδιο, το λευκόχρυσο και το χρυσό.

Ο άργυρος (χημικό σύμβολο “Ag”), είναι βαρύ, μαλακό και σπάνιο μέταλλο με έντονη μεταλλική λάμψη. Ο ατομικός του αριθμός είναι 47 και η σχετική ατομική του μάζα είναι 107, 8682. Ανήκει στην ομάδα 11 (I<sub>B</sub>, με την παλαιότερη ταξινόμηση) του περιοδικού πίνακα, στην περίοδο 5, στον τομέα d και στη 2η κύρια σειρά των στοιχείων μετάπτωσης. Έχει θερμοκρασία τήξης 961,78°C και θερμοκρασία βρασμού 2162°C



**Εικόνα 1.18** (A) Αυτοφυής άργυρος, παρόλο που υπάρχει στη φύση είναι εξαιρετικά σπάνιος, (B) Κρύσταλλοι Ag καθαρότητας >99,95%

### 1.1.5.2 Εφαρμογές στην Ιατρική

Ο πατέρας της σύγχρονης ιατρικής, ο Ιπποκράτης, τόνιζε ότι τι ασήμι είχε ευεργετικές θεραπευτικές ιδιότητες. Ο άργυρος είναι γνωστός για τις αντισηπτικές του ιδιότητες από την αρχαιότητα ενώ ασημένια χειρουργικά εργαλεία χρησιμοποιούνταν το

Μεσαίωνα στην Ευρώπη (Lansdown 2010a). Οι Φοίνικες τον χρησιμοποιούσαν για αποθήκευση νερού, κρασιού και ξυδιού, ενώ σύμφωνα με τον Ηρόδοτο, ο Πέρσης βασιλιάς Κύρος ο Μέγας αποθήκευε τις προσωπικές του προμήθειες νερού σε ασημένια δοχεία κατόπιν βρασμού. Αργότερα, στις αρχές του 1900 στις Η.Π.Α., για να παρατείνουν την φρεσκάδα του γάλακτος τοποθετούσαν ασημένια δολάρια στα μπουκάλια με το γάλα. Κατά τη διάρκεια του Β' Π.Π. παρατηρήθηκε ότι η σουλφαδιαζίνη του αργύρου κατείχε εξίσου αποτελεσματικές αντιβακτηριδιακές ιδιότητες με τον νιτρικό άργυρο ελείπει όμως των μειονεκτημάτων του που είναι η αντίδραση του τελευταίου με χλωριούχα ιόντα και έτσι την μείωση της μικροβιοκτόνου αποτελεσματικότητας του (102).

Ο άργυρος είναι ευρέως διαδεδομένος στο φλοιό της Γης και βρίσκεται στο έδαφος, στο φρέσκο και θαλασσινό νερό, και στον αέρα. Είναι εύκολα απορροφήσιμος από το ανθρώπινο σώμα μέσω της κατανάλωσης των τροφών, των ποτών και μέσω εισπνοής, αλλά τα χαμηλά επίπεδα του αργύρου που απαντώνται συνήθως στην κυκλοφορία του αίματος (<2,3 μg/L) και σε βασικούς ιστούς όπως στο ήπαρ και στους νεφρούς δεν έχουν συσχετισθεί με οποιαδήποτε νόσο ή ανικανότητα (Wan 1991). Ο άργυρος δεν είναι ένα αναγνωρίσιμο ιχνοστοιχείο στο ανθρώπινο σώμα και δεν εκπληρώνει κανένα φυσιολογικό ή βιοχημικό ρόλο σε οποιοδήποτε ιστό μολονότι αλληλεπιδρά με πολλά βασικά στοιχεία όπως ο ψευδάργυρος και το ασβέστιο (Lansdown 1995, Lansdown 2002). Ο άργυρος έχει μια μακρά ιστορία στη θεραπεία ασθενειών του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένης της επιληψίας, της νεογνικής ασθένειας των ματιών, των αφροδίσιων νοσημάτων, και μολύνσεις τραυμάτων (White 1999, Klasen 2000). Έχει χρησιμοποιηθεί στον καθαρισμό του νερού και επί του παρόντος χρησιμοποιούνται για τη διαφύλαξη των συστημάτων ζεστού νερού των νοσοκομείων από τις λοιμώξεις από το βακτήριο *Legionella* (Hambidge 2001).

Οι κύριες οδοί έκθεσης του ανθρώπου στον άργυρο στις μέρες μας είναι μέσω της χρήσης του ως αντιμικροβιακού παράγοντα σε προϊόντα φροντίδας τραυμάτων και ιατρικές συσκευές, συμπεριλαμβανομένων-καθετήρες, τσιμέντα των οστών, καρδιακές βαλβίδες και προσθέσεις, ορθοπεδικές καρφίτσες, και οδοντιατρικές συσκευές. Σε κάθε περίπτωση, οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του αργύρου εξαρτώνται από την απελευθέρωση των βιολογικά δραστικών ιόντων του αργύρου ( $Ag^+$ ) από το μεταλλικό άργυρο (συμπεριλαμβανομένων των μη κρυσταλλικών μορφών), το νιτρικό άργυρο, τη νιτρική σουλφαδιαζίνη, και άλλες ενώσεις αργύρου που ενσωματώνονται στις διάφορες συσκευές, και της θανατηφόρου επίδραση επί των παθογόνων οργανισμών. Η εμπειρία έχει δείξει ότι

ένα μεγάλο ποσοστό των ιόντων αργύρου που απελευθερώνεται από τις ιατρικές συσκευές δεν απαιτείται για αντιμικροβιακή δράση και διαδίδεται σε υγρά των ιστών και στις εκκρίσεις, όπου συνδέεται με λευκώματα και μακροσφαιρίνες (Lansdown 2005). Αυτά τα σύμπλοκα αργύρου-πρωτεΐνης απορροφώνται στη συστηματική κυκλοφορία και εναποθέτονται σε βασικούς μαλακούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του δέρματος, του ήπατος, των νεφρών, του σπλήνα, των πνευμόνων και του εγκεφάλου (Humphreys 1998, Fung 1996). Ως ξενοβιοτικό υλικό, ο άργυρος πρέπει να θεωρείται ότι παρουσιάζει κίνδυνο για την υγεία για τα εκτεθειμένα άτομα κάτω από ορισμένες συνθήκες. Σε αντίθεση με τα καλά τεκμηριωμένα νευροτοξικά μέταλλα όπως ο μόλυβδος και ο υδράργυρος, ο άργυρος δεν φαίνεται να είναι ένα σωρευτικό δηλητήριο και αποβάλλεται από το σώμα μέσω των ούρων και των κοπράνων (Wan 1991, Boosalis 1982). Απέκκριση του αργύρου μέσω αυτών των οδών μπορεί να είναι ένα μέτρο της μέσης ημερήσιας πρόσληψης, αλλά δεδομένου ότι η άποψη αυτή βασίζεται σε μεγάλο βαθμό την κλινική χρήση του νιτρικού αργύρου και της αργυρούχου σουλφαδιαζίνης που χρησιμοποιείται σε θεραπεία κατά των εγκαυμάτων, η αληθινή σημασία του μεταβολισμού του αργύρου που χρησιμοποιείται στο ευρύτερο πλαίσιο των ιατρικών συσκευών είναι αμφίβολη.

Η αργυρία είναι η πιο ευρέως γνωστή κλινική κατάσταση που σχετίζεται με τη συσσώρευση αργύρου στο αίμα και στους μαλακούς ιστούς (Lansdown 2004, Coombs 1992, Pariser 1978). Εμφανίζεται συνήθως σε άτομα που εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα αργύρου επαγγελματικά (μεταλλουργία, φωτογραφία, και βιομηχανίες εξόρυξης), είτε καταναλώνοντας είτε εισπνέοντας ασημένια προϊόντα υγιεινής (συμπεριλαμβανομένων των κολλοειδών προϊόντων αργύρου) για μακροχρόνιες περιόδους (Bleehan 1981). Ο άργυρος απορροφάται μέσα στο σώμα και εναποτίθενται στις περιαγγειακές περιοχές του δέρματος και άλλων μαλακών ιστών ως μαύρο κόκκοι σουλφιδίου του αργύρου ή σεληνιούχου αργύρου. Ο προκύπτων σχιστολιθικός γκρίζος αποχρωματισμός του δέρματος έχει περιστασιακά συσχετισθεί με μελανογονιδιακές αλλαγές, είναι ημιμόνιμος και κοσμητικά ανεπιθύμητος αλλά δεν είναι γνωστό ότι είναι η απειλητικός για τη ζωή (Lansdown 2004). Ο διάσημος “Blue Man” (μπλε άνθρωπος), μέλος του Barnum and Bailey Circus sideshow, υπήρξε κλασική περίπτωση αργυρίας και πιστεύεται ότι είχε περίπου 90-100g αργύρου στο σώμα του με εναποθέσεις στα οστά (0.21%), στους μύες (0.16%), στα νεφρά (0.24%) και στον καρδιακό μυ (0.15%)(Gettler 1927), αλλά η αξιοπιστία της ποσοτικοποίησης του αργύρου στους ιστούς το 1927 είναι αμφισβητήσιμη (Lansdown 2010b). Οι Fung και Bowen ανέφεραν ότι μέχρι 10% κατάποση αλάτων



αργύρου μπορούν να εναποτεθούν σε μαλακούς ιστούς, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στο δέρμα, ήπαρ, σπλήνα, και τα επινεφρίδια και με μικρότερα επίπεδα στο μυ και στον εγκέφαλο (Fung 1996). Οι κλινικές επιπτώσεις της αργυρίας έχουν συζητηθεί εκτενώς στη διεθνή βιβλιογραφία και υπάρχουν αποδείξεις ότι σε σοβαρές περιπτώσεις, η εναπόθεση του αργύρου που εναποτίθεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα «μπορεί να είναι μια αιτία» νευρομυϊκής δυσλειτουργίας και ανώμαλης συμπεριφοράς (Mirsattari 2004, Sudmann 1994, Landas 1986, Vic 1985, Deitl 1984). Αυτό δεν έχει σαφώς τεκμηριωθεί κλινικά ή πειραματικά (Lansdown 2007a).



**Εικόνα 1.19** Διάφορες εικόνες από ανθρώπους με αργύρωση (κερατοειδής χιτώνας οφθαλμού και επιπεφυκώς) και αργυρία (χόριο).

### 1.1.5.3 Αντιμικροβιακές ιδιότητες και μηχανισμός δράσης

Είναι καλά γνωστό ότι τα ιόντα Ag και οι ενώσεις του αργύρου έχουν ισχυρές αντιμικροβιακές επιδράσεις και πολλοί ερευνητές ενδιαφέρονται για τη χρήση άλλων ανόργανων νανοσωματιδίων ως αντιβακτηριακών παραγόντων (Furno 2004, Abuskhuna 2004, Crabtree 2003, Hamouda 2000). Το πιο σημαντικό πρόβλημα που προκαλείται από τους χημικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες είναι η πολυφαρμακευτική ανθεκτικότητα. Γενικά, ο αντιμικροβιακός μηχανισμός των χημικών παραγόντων εξαρτάται από την εκλεκτική σύνδεση με την επιφάνεια και το μεταβολισμό των παραγόντων εντός του μικροοργανισμού. Διάφοροι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει φαρμακευτική ανθεκτικότητα κατά τη διάρκεια πολλών γενεών. Μέχρι τώρα, αυτοί οι αντιμικροβιακοί παράγοντες που βασίζονται σε χημικές ουσίες υπήρξαν αποτελεσματικοί για θεραπεία.

Ωστόσο, έχουν περιοριστεί για χρήση στις ιατρικές συσκευές και για την προφύλαξη αντιμικροβιακών εγκαταστάσεων.

Τα ιόντα Ag και άλατα Ag έχουν χρησιμοποιηθεί για δεκαετίες ως αντιμικροβιακοί παράγοντες σε διάφορους τομείς εξαιτίας της αύξησης της ικανότητας αναστολής της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Σήμερα, ο αργύρος χρησιμοποιείται ευρέως σε επιδέσμους τραύματος και ιατρικές συσκευές ως αντιβιοτικό ευρέος φάσματος. Χαμηλές συγκεντρώσεις του αργύρου απαντώνται στο ανθρώπινο σώμα μέσω της εισπνοής σωματιδίων στον αέρα και μόλυνσης των τροφών και του πόσιμου νερού, αλλά δεν εξυπηρετεί καμία αξία ως ιχνοστοιχείο στο ανθρώπινο σώμα. Σήμερα, η αποτελεσματικότητα του αργύρου ως χημειοθεραπευτικό αντιβακτηριακό και αντιμυκητιασικό παράγοντα οδηγεί στην αυξανόμενη και ευρεία χρήση του σε προϊόντα φροντίδας τραυμάτων, ιατρικές συσκευές (τσιμέντα οστών, καθετήρες, χειρουργικά ράμματα, καρδιαγγειακές προσθέσεις και οδοντικά σφραγίσματα), υφάσματα, καλλυντικά, ακόμη και οι οικιακές συσκευές.

Πολλοί άλλοι ερευνητές έχουν προσπαθήσει να μετρήσουν η δραστικότητα των μεταλλικών ιόντων ενάντια σε μικροοργανισμούς. Μελέτες του Russel και Hugo σχετικά με τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του Ag και Cu (Russel 1994) και του Marsh σε Zn έχουν αναφερθεί (Marsh 1992). Ωστόσο, τα ιόντα αργύρου ή τα άλατα του έχουν μόνον περιορισμένη χρησιμότητα ως αντιμικροβιακοί παράγοντες για διάφορους λόγους, συμπεριλαμβανομένων των παρεμβαλλόμενων επιδράσεων των αλάτων και του αντιμικροβιακού μηχανισμού (η συνεχής απελευθέρωση αρκετής συγκέντρωσης ιόντων Ag από την μεταλλική μορφή). Σε αντίθεση, αυτά τα είδη των περιορισμών μπορούν να ξεπεραστούν με τη χρήση νανοσωματιδίων Ag.

Ο ιονισμός του μεταλλικού αργύρου είναι ανάλογος προς το εμβαδόν επιφανείας των σωματιδίων. Η απελευθέρωση  $Ag^+$  από νανοκρυσταλλικά σωματίδια των <20 nm είναι περισσότερο από 100 φορές υψηλότερη από ότι από φύλλο αργύρου ή άλλες μεταλλικές μορφές του. Συγκριτικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο νανοκρυσταλλικός άργυρος με υψηλότερη διαλυτότητα στο νερό επιδεικνύει μια εξαπλάσια ή υψηλότερη λογαριθμική μείωση στο βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* σε καλλιέργεια (Burrell 2003). Ο  $Ag^+$  δεσμεύει κατάλοιπα πρωτεϊνών στις κυτταρικές μεμβράνες των ευαίσθητων βακτηριδίων, μυκήτων και πρωτόζωων και απορροφάται ενδοκυτταρικά με πινοκύττωση. Μεταγενέστερη μετουσίωση και αδρανοποίηση των πρωτεϊνών και των ουσιωδών ενζύμων συμπεριλαμβανομένων των ριβονουκλεασών και δεσοξυριβονουκλεασών

αποτελεί τη βάση της γενετικά ελεγχόμενης αντιμικροβιακής δράσης του αργύρου (Lansdown 2007b, Russell 1994). Τα ευαίσθητα στον άργυρο στελέχη των βακτηρίων και των μυκήτων έχει αποδειχθεί ότι απορροφούν και συγκεντρώνουν  $Ag^+$  από αραιά διαλύματα (1 ppm) με μια ολιγοδυναμική δράση που περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Ελβετό βοτανολόγο Von Nägeli το 1893 (Von Nägeli 1893). Πειραματικές μελέτες υποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις των 60 ppm  $Ag^+$  θα πρέπει να είναι επαρκείς για να ελέγξουν την πλειονότητα των βακτηριακών και μυκητιασικών παθογόνων (Burrell 2003). Οι Sondí Salopek-Sondí (Sondí 2004) ανέφεραν ότι η αντιμικροβιακή δράση νανοσωματιδίων του αργύρου σε Gram-αρνητικά βακτήρια εξαρτάται από τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων  $Ag$ , και είναι στενά συνδεδεμένη με το σχηματισμό του «βοθρίων» στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων. Στη συνέχεια, τα νανοσωματίδια  $Ag$  συσσωρεύονται στη βακτηριακή μεμβράνη και προκαλούν την διαπερατότητα, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Οι Amro και συνεργάτες, πρότειναν ότι η εξασθένηση του μετάλλου μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό ακανόνιστου σχήματος βοθρίων (κοιλοτήτων) στην εξωτερική μεμβράνη και αλλαγή στη διαπερατότητα της μεμβράνης, η οποία προκαλείται από την προοδευτική απελευθέρωση λιποπολυσακχαριτικών μορίων και μεμβρανικών πρωτεϊνών (Amro 2000). Επίσης, οι Sondí και Salopek-Sondí εικάζουν ότι ένας παρόμοιος μηχανισμός μπορεί να προκαλέσει την αποικοδόμηση της μεμβρανικής δομής της *E. coli* κατά τη διάρκεια της θεραπείας με νανοσωματίδια  $Ag$  (Sondí 2004). Αν και η παρέμβασή τους περιλαμβάνει κάποιο είδος δεσμευτικού μηχανισμού, είναι ακόμα ασαφής ο μηχανισμός της αλληλεπίδρασης μεταξύ των νανοσωματιδίων  $Ag$  και του συστατικού/κών της εξωτερικής μεμβράνης.

#### 1.1.5.4 Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες

Τα αντι-φλεγμονώδη αποτελέσματα των νιτρικού αργύρου ή του νανοκρυσταλλικού αργύρου έχουν αναγνωρισθεί πειραματικά στη φροντίδα τραυμάτων, τη θεραπεία της αλλεργικής δερματίτιδας εξ επαφής, την ελκώδη κολίτιδα και την κυστίτιδα (Nadworny 2008, Boucher 2008, Bhol 2007, Bhol 2005, Wright 2002). Σε δινιτροχλωροβενζόλιο επαγόμενη χοίρου ή ποντικού μειωμένη φλεγμονή του δέρματος μετά την εφαρμογή του νανοκρυσταλλικού αργύρου συνδέθηκε με απόπτωση των λεμφοκυττάρων, μειωμένη έκφραση των προφλεγμονωδών κυτοκινών και μειωμένη δραστηριότητα ζελατινάσης. Νιτρικός άργυρος (0,5%) προκάλεσε ένα ευρύτερο επίπεδο κυτταρικής απόπτωσης, αλλά καθυστέρησε την επούλωση του τραύματος. Σε ένα μοντέλο

αρουραίου με ελκώδη κολίτιδα, η χορήγηση των 4 mg/kg Σ.Β. νανοκρυσταλλικού αργύρου ενδοκολονικά ή 40 mg/kg Σ.Β. από το στόμα μείωσε σημαντικά φλεγμονώδεις μεταβολές, εν μέρει μέσω της καταστολής των μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας (MMP-9), του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF), και της ιντερλευκίνης-β (IL-β) και IL-12 (Bhol 2007). Άλλες αντι-φλεγμονώδεις μεταβολές που συνδέονται με ενδοκυτταρική χορήγηση του νανοκρυσταλλικού αργύρου σε κυστίτιδα μυ συμπεριλαμβάνουν την καταστολή των ιστιοκυττάρων και τα επίπεδα της ισταμίνης στα ούρα (Boucher 2007).

#### 1.1.5.5 Αντικαρκινικές ιδιότητες

Ο άργυρος έχει γίνει ευρέως γνωστός εξαιτίας των εξαιρετικών αντιβακτηριακών και αντισηπτικών ιδιοτήτων του. Ακριβώς επειδή παρουσιάζει αυτή τη δυναμικότητα τελευταία γίνεται προσπάθεια αναγνώρισης των αντικαρκινικών του ιδιοτήτων.

Μελέτες έδειξαν ότι νανοσωματίδια οξειδίου του αργύρου επέδειξαν αντικαρκινικές ιδιότητες όταν χορηγήθηκαν με ενδοφλέβια έγχυση στη μορφή υδατικού μέσου διασποράς, σε καρκινικό μοντέλο αρουραίου με λεμφοσάρκωμα (Rutberg 2008). Τα νανοσωματίδια αργύρου αναστέλλουν την αγγειογένεση που επάγεται από τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) σε βόεια αμφιβληστροειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα (Kalishwaralal 2009). Παρόμοιες μελέτες έχουν αποδείξει ανασταλτική τους δράση στην αγγειακή διαπερατότητα που επάγεται από τον VEGF, ιντερλευκίνη (IL)-1β (Sheikpranbabu 2009), και της προχωρημένης προηγμένης γλυκοζυλίωσης τελικό προϊόν (Sheikpranbabu 2010) σε αμφιβληστροειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα ισχυρά αντιαγγειογενετικά και αντιδιαπερατότητας αποτελέσματα των AgNPs, μαζί με την ικανότητά τους να σταματούν την εξέλιξη του όγκου σε κύτταρα λεμφοσαρκώματος Pliss, ώθησαν την μελέτη των αντικαρκινικών επιδράσεων των AgNPs σε ασκτικούς όγκους.

Οι Sriram και συνεργάτες, κατέδειξαν την αποτελεσματικότητα των βιολογικά συντιθέμενων νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) ως αντικαρκινικών παραγόντων χρησιμοποιώντας ως *in vitro* και *in vivo* καρκινικό μοντέλο το ασκτικό λέμφωμα του Dalton (DLA). Τα AgNPs εμφάνισαν δόσοεξαρτώμενη κυτταροτοξικότητα έναντι των DLA κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης του ενζύμου κασπάσης 3, οδηγώντας σε επαγωγή της απόπτωσης η οποία επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με τον κατακερματισμό του πυρηνικού DNA. Τα AgNPs αύξησε σημαντικά το χρόνο επιβίωσης στο μοντέλο ποντικού που έφερε τον όγκο κατά περίπου 50% σε σύγκριση με την καρκινική ομάδα ελέγχου. Τα AgNPs επίσης μείωσαν τον όγκο του ασκτικού υγρού σε ποντικούς φέροντες όγκο κατά 65%,

επιστρέφοντας έτσι το σωματικό βάρος στα φυσιολογικά επίπεδα. Ο αυξημένος αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων στο ασκитικό υγρό από τα φέροντα όγκο ποντίκια επανήλθε σε σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα. Η ιστοπαθολογική ανάλυση του ασκитικού υγρού έδειξε μείωση στον αριθμό των κυττάρων DLA σε ποντικούς φέροντες όγκο που έλαβαν αγωγή με AgNPs. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν τις αντικαρκινικές ιδιότητες των AgNPs, και υποδεικνύουν ότι μπορεί να είναι μια οικονομικά αποδοτική εναλλακτική λύση στη θεραπεία του καρκίνου και των σχετικών με την αγγειογένεση διαταραχών.

Εκτός από τα νανοσωματίδια του αργύρου, ένας μεγάλος αριθμός από σύμπλοκα του αργύρου (I) με διάφορους οργανικούς υποκαταστάτες έχουν δοκιμαστεί για τις βιολογικές και αντικαρκινικές δράσεις τους προσπαθώντας να συνδυάσουν τα πλεονεκτήματα των ιόντων του αργύρου που αναλύσαμε παραπάνω με τα πλεονεκτήματα εκλεκτικότητας των οργανικών υποκαταστατών τους.

Οι Deegan και συνεργάτες (Deegan 2006), συνέθεσαν σύμπλοκα του αργύρου με υποκαταστάτη 1,10-φαιναθρολίνη-5,6-διόνη (φαινδιόνη). Το σύμπλοκο αυτό επέδειξε δόσοεξαρτώμενη μείωση της βιωσιμότητας στις κυτταρικές σειρές A-498 (ανθρώπινο νεφρικό καρκίνωμα), Hep-G2 (ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα), HK-2 (ανθρώπινα φυσιολογικά αθανатоποιημένα επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα) CHANG (ανθρώπινα φυσιολογικά ηπατοκύτταρα) και οι IC<sub>50</sub> τιμές ήταν περίπου 10, 17, 22.5 και 150 φορές χαμηλότερα από τις τιμές της σισπλατίνης, αντίστοιχα. Παρά το υψηλό επίπεδο δραστηριότητας αυτής της ένωσης, δεν εμφανίζει ένα φαινομενικό κυτταρο-επιλεκτικό προφίλ καθώς μείωσε τη βιωσιμότητα τόσο των νεοπλασματικών όσο και των μη νεοπλασματικών κυττάρων περίπου το ίδιο. Ωστόσο, οι επιλεγμένες μηχανιστικές μελέτες έδειξαν ότι η φαινδιόνη και το σύμπλοκο της με Ag ανέστειλε τη σύνθεση του DNA, η οποία δεν φαίνεται να μεσολαβείται μέσω παρεμβολής της στο μόριο του DNA.

Οι Thati και συνεργάτες μελέτησαν το μηχανισμό δράσης του συμπλόκου του αργύρου με το 6-υδροξυκουμαρινικό-3-καρβοξυλικό οξύ σε ανθρώπινα κακοήγη ηπατοκύτταρα. Ο κυτταρικός μηχανισμός θανάτου βρέθηκε να είναι η επαγωγή της απόπτωσης και ο μοριακός μηχανισμός προσδιορίστηκε από την αύξηση της έκφρασης των προ-αποπτωτικών κασπασών 3 και 9 και παρατηρήθηκε αυξημένη διάσπαση της poly(ADPRibose)-πρωτεϊνικής πολυμεράσης (PARP). Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύθηκε περαιτέρω από την εμφάνιση μιας υπο-G1 κορυφής, που αντιπροσωπεύει τα υπο-διπλοειδή κύτταρα, χρησιμοποιώντας ανάλυση του κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής.

Περαιτέρω, το 6-OH-C-COO-Ag φάνηκε να λειτουργεί μέσω μίας μεταβολής του ποσοστού των κυττάρων που εισέρχονται στην G0/G1 φάση του κυτταρικού κύκλου. Κατά συνέπεια, το 6-OH-O-COO-Ag φαίνεται να είναι πιο ισχυρός και εκλεκτικός αντικαρκινικός παράγοντας από τη σισπλατίνη, ικανός να μεταβάλλει βασικά βιοχημικά γεγονότα που οδηγούν στη εκτέλεση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (Thati 2007). Μια άλλη μελέτη των Liu και συνεργατών (Liu 2008), αξιολόγησε τα *in vitro* αντικαρκινικά και ηπατοτοξικά προφίλ μιας σειράς συμπλόκων Ag(I) με δισχιδή φαινύλιο και πυριδίνη σε μία ομάδα ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών με ανθεκτικότητα στη σισπλατίνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυτά τα σύμπλοκα υπερκερούν των ανθεκτικότητα στις *cis*-DDP στις CH1-*cis*R, 41M-*cis*R και SKOV-3 κυτταρικές σειρές δείχνοντας πως η κυτταροτοξική τους δυναμική συνδέεται ισχυρά με την λιποφιλία τους. Το προφίλ της κυτταροτοξικότητας τους ήταν παρόμοιο με τα κλασικά μιτοχονδριακά δηλητήρια και ένα παράδειγμα αυτής της ένωσης εμφανίστηκε να συσσωρεύεται κατά προτίμηση στα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων κατά τρόπο που εξαρτιόταν από το μιτοχονδριακό δυναμικό της μεμβράνης.

Μεγάλο ενδιαφέρον δείχνουν τα σύμπλοκα του Ag(I) με φωσφίνες και θειοαμίδια μιας και εμφανίζουν αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές. Σύμφωνα με τους Hadjikakou και συνεργάτες, συντέθηκαν σύμπλοκα του Ag(I) με 2-μέρκαπτο-3,4,5,6-τετραϋδρο-πυριμιδίνη, 2-μέρκαπτο-νικοτινικό οξύ και tris(*p*-tolyl)phosphine (TPTP) και ελέγχθησαν για την κυτταροτοξική τους δράση απέναντι σε κυτταρικές σειρές λευχαιμίας μυ (L1210), ανθρώπινων Τα-λεμφοκυττάρων (Molt4/C8 και CEM) καθώς και σάρκωμα επίμυος Wistar. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα συγκεκριμένα σύμπλοκα εμφανίζουν ισχυρή κυτταροτοξική δράσης που όμως είναι αρκετά μικρότερη από τα αντίστοιχα σύμπλοκα του κασσιτέρου της ίδιας μελέτης (Hadjikakou 2008). Επίσης, τετραμερή 1:1 και μονομερή 1:3 σύμπλοκα του αργύρου(I) με TPTP και αλογονίδια (Cl, Br, I), συντέθηκαν και ελέγχθησαν για την βιοδραστικότητα τους *in vitro*, έναντι σε σάρκωμα επίμυος Wistar. Όλα τα σύμπλοκα της μελέτης εμφάνισαν ισχυρή κυτταροτοξική δράση στις κυτταρικές σειρές λευχαιμίας μυ (L1210), ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (Molt4/C8 και CEM) καθώς και σάρκωμα επίμυος Wistar. Τα χαμηλότερα επίπεδα της IC<sub>50</sub> βρέθηκαν στο σάρκωμα του επίμυος Wistar σε επίπεδο nM (Zartilas 2009). Ακόμα μια μελέτη των Kyros και συνεργάτες για την σύνθεση ενός συμπλόκου του Ag(I) με TPTP και 5-γλώρο-2-μέρκαπτοβενζοθειαζόλιο ήρθε να επιβεβαιώσει την ισχυρή κυτταροτοξική δράση

έναντι κακοήθων κυτταρικών σειρών (LMS) των συμπλόκων με θειοαμίδια και φωσφίνες αλλά και ο μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου μέσω της απόπτωσης αποσαφηνίστηκε με κυτταρομετρία ροής. Επίσης, το συγκεκριμένο σύμπλοκο  $\{[AgCl(CMBZT)(TPTP)2] \cdot (MeOH)\}$  εμφάνισε ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση που φάνηκε από τα *in vivo* πειράματα επούλωσης εγκαύματος που έγιναν σ' αυτή τη μελέτη (Kyros 2010). Οι Poyraz και συνεργάτες, συνέθεσαν δύο σύμπλοκα με triphenylphosphine (TPP) και ασπιρίνη (1) και σαλικυλικό οξύ (2). Η *in vitro* κυτταροτοξικότητα τους ελέγχθηκε απέναντι σε κύτταρα λειομυοσάρκωματος επίμυος Wistar (LMS), ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος μαστού (MCF-7) και ανθρώπινες εμβρυικές πνευμονικές ινοβλάστες (MRC-5) και βρέθηκε ότι διαθέτουν ισχυρή κυτταροτοξική δράση απέναντι στις νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές αλλά είναι λιγότερο τοξικά στα MRC-5. Επίσης, εμφανίστηκαν δραστικότερα της σισπλατίνης. Στην ίδια μελέτη επίσης μελετήθηκε το είδος του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου που είναι μέσω της απόπτωσης (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) αλλά και η αναστολή της LOX επιτεύχθηκε σε υψηλά επίπεδα σε χαμηλές συγκεντρώσεις των συμπλόκων (Poyraz 2011).

## 1.2 Νανοτεχνολογία

### 1.2.1 Γενικά Στοιχεία

Ημερομηνία γέννησης της νανοτεχνολογίας θεωρείται η 29<sup>η</sup> Δεκεμβρίου 1959 όταν ο Richard Feynman κατά τη διάλεξή του στην ετήσια συνάντηση της Αμερικανικής Εταιρίας Φυσικής στο Τεχνολογικό Ινστιτούτο της Καλιφόρνια (CalTech) είπε την περίφημη φράση «There is plenty of room at the bottom» (μετ: υπάρχει αρκετός χώρος στο βάθος. Ως νανοτεχνολογία ορίζεται η επιστήμη και η τεχνολογία που δεν αφορά σε μια ιδιαίτερη επιστημονική περιοχή αλλά στην κατανόηση και την διαχείριση της ύλης όταν αυτή βρίσκεται σε διαστάσεις της τάξης του δισεκατομυριοστού του μέτρου ( $10^{-9}m = 0.000000001m = 1nm$ ), διαστάσεις μεγέθους τάξης μερικών δεκάδων ατόμων, δηλαδή δομές οι οποίες δεν υπακούουν στους νόμους της Κλασσικής Μηχανικής, αλλά της Κβαντομηχανικής, δομές με τις οποίες αγγίζουμε τα όρια του κόσμου που ζούμε. Σύμφωνα με έναν ορισμό του πρωτοπόρου της νανοτεχνολογίας Albert Franks ως νανοτεχνολογία ορίζεται «η περιοχή της επιστήμης και της τεχνολογίας όπου η διάμετρος

και οι ανοχές είναι της τάξης 0.1 έως 100nm» (Γεωργόπουλος 2005). Τα νανοσωματίδια και τα νάνο-υλικά εμφανίζουν νέες μοναδικές και πρωτοφανείς ιδιότητες που οφείλονται αποκλειστικά και μόνο στα γεωμετρικά χαρακτηριστικά τους, δηλαδή στο μέγεθος και στο σχήμα τους και που θα ήταν διαφορετικές αν το σωματίδιο κατείχε μεγαλύτερες διαστάσεις. Το βασικότερο λόγο για τη διαφορετική συμπεριφορά των υλικών στις νάνο-διαστάσεις αποτελεί το γεγονός πως σε αυτή την περίπτωση διαθέτουν πολύ μεγάλο λόγο επιφάνειας προς μάζα. Καθώς δηλαδή τα σωματίδια σμικρύνονται, μειώνεται σημαντικά η μάζα τους ενώ αυξάνεται αναλογικά η επιφάνεια τους. Υπερτερούν έτσι σημαντικά οι επιφανειακές ιδιότητες έναντι των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων της κυρίως μάζας του υλικού αυτού.



**Εικόνα 1.20** Σύγκριση μεγεθών μορίων και βιολογικών οντοτήτων

Ο όρος νανοτεχνολογία χρησιμοποιείται εδώ ως περιληπτικός όρος, και καλύπτει τους διάφορους κλάδους νανοεπιστημών και νανοτεχνολογιών. Η νανοτεχνολογία αναφέρεται στην επιστήμη και τεχνολογία που αναπτύσσεται σε κλίμακα μορίων και υπερμοριακών συστημάτων (νανοκλίμακα), καθώς και σε επιστημονικές αρχές και νέες ιδιότητες για την κατανόηση σε βάθος των λειτουργιών και των δυνατοτήτων της ύλης σε αυτή την κλίμακα μεγέθους. Τέτοιες ιδιότητες στη συνέχεια ανιχνεύονται με διάφορες μεθόδους και να τις εκμεταλλευόμαστε σε μικροκλίμακα ή μακροκλίμακα για την ανάπτυξη π.χ. υλικών και εφευρέσεων με νεωτεριστικές λειτουργίες και επιδόσεις. Η νανοτεχνολογία κάνει χρήση της επιστημονικής γνώσης που προέρχεται από το πεδίο έρευνας των νανοεπιστημών, όπου είναι η δραστηριότητα που στοχεύει στην κατανόηση των φυσικών νόμων που διέπουν τα φαινόμενα που εμφανίζονται σε νανοκλίμακα.

### 1.2.2 Η Νανοτεχνολογία στη Φαρμακευτική Επιστήμη

Οι Φαρμακευτικές επιστήμες στα πλαίσια των τεχνολογικών εξελίξεων, είναι σαφές ότι έχουν τεράστιο ενδιαφέρον για την αξιοποίηση των προϊόντων νανοτεχνολογίας,



αλλά και την κατανόηση της συμπεριφοράς των νέων υλικών μέσα από τις εξελίξεις των αναλυτικών συσκευών και των δυνατοτήτων λήψης μετρήσεων και φωτογραφιών σε προϊόντα και συσκευές της τάξης των νανομεγεθών. Η νανοτεχνολογία είναι ένα διεπιστημονικό πεδίο που περιλαμβάνει τη χρήση υλικών, συσκευών ή συστημάτων με μέγεθος νανοκλίμακας. Η νανοτεχνολογία εφαρμόζει τις αρχές την μηχανολογίας, της ηλεκτρονικής και της επιστήμης των υλικών σε κατασκευές μεγέθους νανοκλίμακας. Τα νάνο-υλικά μπορεί να είναι μία συσκευή ή ένα σύστημα, υπερμοριακές δομές, σύμπλοκα ή σύνθετα υλικά.

Σε επίπεδο νανοκλίμακας, οι φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες των υλικών έχουν θεμελιακές διαφορές και παρουσιάζουν απρόσμενες ιδιότητες σε σχέση με το αρχικό υλικό, επειδή οι κβαντομηχανικές αλληλεπιδράσεις σε επίπεδο ατόμων επηρεάζονται από τις διακυμάνσεις του υλικού σε επίπεδο νανοκλίμακας.

Οι νανοσυσκευές έχουν την ίδια τάξη μεγέθους με τις βιολογικές οντότητες. Νανοσυσκευές, με διαστάσεις μικρότερες των 100 nm, είναι μικρότερες από το ανθρώπινο κύτταρο (με διαμέτρους 2.000 έως 150.000 nm) και τα οργανίδια και συγκρίσιμα σε μέγεθος με τα βιομόρια όπως τα ένζυμα και οι υποδοχείς. Για παράδειγμα η αιμοσφαιρίνη έχει μέγεθος διάμετρο περίπου 5nm, ενώ η λιπιδική μεμβράνη του κυττάρου έχει πάχος περίπου 6nm. Νανοσυσκευές, μικρότερες των 50 nm μπορούν εύκολα να εισέλθουν στα περισσότερα κύτταρα, ενώ αυτές που είναι μικρότερες από 20nm μπορούν να διαπεράσουν τα αιμοφόρα αγγεία, καθιστώντας έτσι τις νανοσυσκευές ικανές να διαπερνούν βιολογικούς φραγμούς, όπως ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός και το επιθήλιο του στομάχου, που εμποδίζουν τα φάρμακα και τις σκιαγραφικές ουσίες να φθάνουν σε κάποιους όγκους.

Λόγω του μικρού τους μεγέθους οι νανοσυσκευές μπορούν να αλληλεπιδρούν με βιομόρια που βρίσκονται και στις δύο πλευρές της κυτταρικής μεμβράνης, όσο και εντός του κυττάρου, συχνά με τρόπο που δεν επηρεάζει τη συμπεριφορά και τις βιοχημικές ιδιότητες αυτών των μορίων. Η μη επιθετική πρόσβαση στο εσωτερικό του ζωντανού κυττάρου προσφέρει τη δυνατότητα καλύτερης κατανόησης των πολύπλοκων ρυθμιστικών και σηματοδοτικών μηχανισμών που κατευθύνουν τη συμπεριφορά των φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων.

Η ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας, της ηλεκτρονικής και της ρομποτικής αναμένεται να προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε βίο-ιατρικές εφαρμογές, όπως η γονιδιακή θεραπεία, η χορήγηση φαρμάκων, η απεικόνιση και οι τεχνικές ανακάλυψης

νέων φαρμάκων. Ειδικότερα, η νανοτεχνολογία παρέχει τη δυνατότητα μελέτης και αλληλεπίδρασης τόσο με το υγιές, όσο και με το καρκινικό κύτταρο σε πραγματικό χρόνο, σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο στα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης.

Η νανοτεχνολογία μπορεί να προσφέρει λύσεις σε τομείς όπως:

- ❖ η απεικόνιση και η διαγνωστική που θα επιτρέψουν στους γιατρούς να διαγνώσουν τον καρκίνο σε πρώιμο στάδιο και έτσι να γίνει ευκολότερα ιάσιμος.
- ❖ συστήματα που θα επιτρέπουν την εκτίμηση σε πραγματικό χρόνο της αποτελεσματικότητας της θεραπείας
- ❖ πολυλειτουργικές συσκευές στόχευσης που θα μπορούν να παρακάμψουν τους βιολογικούς φραγμούς και να μεταφέρουν φαρμακευτικές ουσίες σε υψηλές τοπικές συγκεντρώσεις στον επιθυμητό χρόνο απευθείας στα καρκινικά κύτταρα και στους γεινιάζοντες ιστούς που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου και στη δημιουργία μεταστάσεων.
- ❖ ουσίες, ικανές να διακρίνουν μοριακές αλλαγές και να προλάβουν την εξαλλαγή των προκαρκινικών κυττάρων σε καρκινικά
- ❖ συστήματα παρακολούθησης που θα ανιχνεύουν μεταλλάξεις που μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο και γενετικούς δείκτες που δείχνουν προδιάθεση για καρκίνο
- ❖ ερευνητικά εργαλεία που θα επιτρέπουν στους ερευνητές να ταυτοποιούν γρήγορα νέους στόχους για κλινικές έρευνες και να προβλέπουν την αντίσταση στα φάρμακα

Για τη φαρμακευτική βιομηχανία οι νέες τεχνολογίες μεταφοράς φαρμάκων αποτελούν στρατηγικό εργαλείο για την αύξηση της αποτελεσματικότητας και της δραστηριότητας τους. Η τεχνολογία μπορεί να προσφέρει νέες λύσεις για ήδη υπάρχοντα φάρμακα, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητά τους βελτιώνοντας την ασφάλειά τους και την ανοχή τους από τους ασθενείς. Επιπρόσθετα τα νέα φάρμακα που αναπτύσσονται με τη βοήθεια της υπολογιστικής χημείας, χρησιμοποιώντας τις γνώσεις από το πρόγραμμα αποκρυπτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος, για να είναι αποτελεσματικά χρειάζονται συστήματα χορήγησης και μεταφοράς. Η νανοτεχνολογία παρέχει τη δυνατότητα χορήγησης φαρμάκων που είναι πρακτικά αδιάλυτα στο νερό ή ασταθή στο βιολογικό περιβάλλον.

Παρόλο που η νανοτεχνολογία παρέχει τη δυνατότητα δημιουργίας αποτελεσματικών συστημάτων χορήγησης και μεταφοράς φαρμάκων όλων των κατηγοριών, οι κύριες κατευθύνσεις είναι η ανάπτυξη συστημάτων για χορήγηση φαρμάκων σε παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος, του Κεντρικού Νευρικού

Συστήματος και του καρδιαγγειακού, ενώ παράλληλα αναπτύσσονται και συστήματα χορήγησης και μεταφοράς αντικαρκινικών φαρμάκων, ορμονών και εμβολίων.

## 1.3 Λιποσώματα

### 1.3.1 Ιστορική Θεώρηση

Η σύλληψη ότι οι στοιβάδες που σχηματίζουν τα λιπίδια σε υδατικό σύστημα θα μπορούσε να είναι χρήσιμο ως μοντέλο προσομοίωσης για την κυτταρική μεμβράνη έχει μεγάλη ιστορία. Εντούτοις, ήταν στις αρχές της δεκαετίας του 1960 όταν δόθηκε μεγαλύτερη έμφαση σε μελέτες που αφορούσαν τις ιδιότητες που είχαν συστήματα που αποτελούνταν από λιπιδική και υδατική φάση ως μοντέλα προσομοίωσης κυτταρικών μεμβρανών. Αρχικά ονομάστηκαν “Bangosomes” μετά από το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που δόθηκε από τον επιστημονικό κόσμο στον A.D. Bangham (Bangham 1965) αλλά αργότερα ονομάστηκαν “liposomes”. Ο ίδιος ο Bangham πρότεινε τον όρο “amphisomes” (=αμφισώματα), ως περισσότερο κατάλληλο διότι τα δομικά μόρια των κυτταρικών μεμβρανών ήταν χαρακτηριστικά αμφιφιλικά μόρια.

Καινοτόμοι στο πεδίο προσομοίωσης του μοντέλου των βιομεμβρανών, ο Bangham, ο Charman, ο Dervchian και ο Luzzti μελέτησαν το σύστημα από διαφορετικές οπτικές γωνίες. Η μελέτη των δυναμικών και μικροσκοπικών ιδιοτήτων αυτών των μοντέλων των βιομεμβρανών, όπως είναι η ρευστότητα και οι αλλαγές στις μεσομορφικές δομές των λιπιδικών στοιβάδων και στη φάση της κύριας μετάβασης, ήταν σαφώς μετατοπισμένη προς τη μελέτη των μακροσκοπικών ιδιοτήτων όπως των χαρακτηριστικών αποδέσμευσης. Οι πρώτες αναφορές, που έγιναν από παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο των λιποσωμάτων, τα οποία αναφέρονται και ως “spherulites” εκείνη την εποχή, δημοσιεύτηκαν το 1964 (Bangham 1964, Lucy 1964). Αυτές οι μελέτες εμπεριείχαν την εφαρμογή των κυστιδίων που αποτελούνταν από διάφορες συγκεντρώσεις λιπιδικών στοιβάδων, γνωστών σήμερα ως πολυστοιβαδικών λιποσωμάτων (MLV) αποτελούνταν από φωσφατιδυλοχολίνη (λεκιθίνη) ή μείγματα της με χοληστερόλη ή/και σαπωνίνη. Το 1967, ο Δ. Παπαχατζόπουλος περιέγραψε τη δομή υπερηχημένων μικροκυστιδίων, τα οποία αργότερα έγιναν γνωστά ως μικρά μονοστοιβαδικά κυστίδια (SUV) (Paparadjopoulos 1967).

Μερικές από αυτές τις έρευνες ήταν χρήσιμες διότι προσέφεραν διορατικότητα για την εξήγηση της δυναμικής δομής των βιομεμβρανών, όπως της ρευστότητας της λιπιδικής διπλοστοιβάδας και των ιδιοτήτων διάχυσης, ενόσω κάποιοι άλλοι επιστήμονες οδηγούνταν ευθέως στη δυνητική χρήση τους για μεταφορά φαρμακομορίων.

Στις αρχές του 1970 ο Γ. Γρηγοριάδης πρότεινε τη χρήση των λιποσωμάτων ως φορέων για τη χορήγηση εμβολίων, ιδέα που άνοιξε το δρόμο για την εφαρμογή των λιποσωμάτων στην ιατρική. Η δεκαετία του '80 χαρακτηρίστηκε από τις πρωτοποριακές έρευνες του Δ. Παπαχατζόπουλος που αφορούσαν τη χρήση των λιποσωμάτων ως φορέων αντικαρκινικών φαρμάκων με σκοπό τη μείωση της τοξικότητας τους και τη βελτίωση των φαρμακοκινητικών τους παραμέτρων. Αποτέλεσμα των μελετών αυτών ήταν η κυκλοφορία των πρώτων λιποσωμιακών φαρμάκων, Doxil<sup>®</sup> (1995) και DaunoXome<sup>®</sup> (1996) (λιποσωμιακή δοξορουβικίνη) για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

Έρευνες για το ρόλο των λιποσωμάτων ως μεταφορικών κυστιδίων για θεραπευτικούς παράγοντες αναπτύχθηκαν σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Κάποιες περιοχές αναζήτησης που προσέλκυσαν την προσοχή περιελάμβαναν τη φύση των αλληλεπιδράσεων με τις εγκλωβισμένες σε αυτά ουσίες (νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, φαρμακομόρια) των λιποσωμάτων, τη θέση των λιποσωμάτων στην *in vivo* χορήγηση, τους μηχανισμούς με τους οποίους τα λιποσώματα προσλαμβάνονται από το κύτταρο και τις ανοσολογικές ιδιότητες των λιποσωμάτων. Παραλλαγές στη λιπιδική σύσταση, στο φορτίο και στο μέγεθος των λιποσωμάτων αναγνωρίστηκαν εκείνη την περίοδο ως σημαντικά φυσικά χαρακτηριστικά τα οποία μπορούν να προσδιορίσουν τη συμπεριφορά των λιποσωμάτων *in vivo* και *in vitro*.

Πρέπει να σημειωθεί πως τα λιποσώματα βρίσκονται φυσικώς παρόντα και στο ανθρώπινο γάλα. (Keller 2001).

**Πίνακας 1.2**  
**Λιποσωμιακά φάρμακα στην αγορά (Chang 2012)**

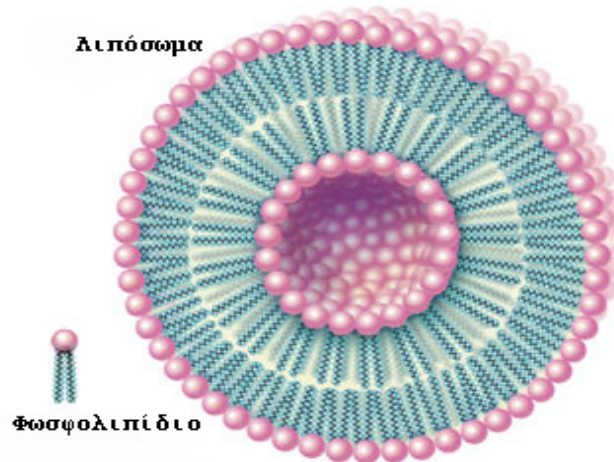
Product name	Route of injection	Drug	Particle type/size	Drug form/Storage time	Lipid composition	Approved indication
Ambisome	Intravenous	Amphotericin B	Liposome	Powder/36 months	HSPC, DSPC, cholesterol, and amphotericin B (2:0.8:1:0.4 molar ratio)	Sever fungal infections
Abelcet	Intravenous	Amphotericin B	Lipid complex	Suspension/24 months	DMPC and DMPG (7:3 molar ratio)	Sever fungal infections
Amphotec	Intravenous	Amphotericin B	Lipid complex	Powder/24 months	Cholesteryl sulfate	Sever fungal infections
DaunoXome	Intravenous	Daunorubicin	Liposome	Emulsion/12 months	DSPC and cholesterol (2:1 molar ratio)	Blood tumors
Doxil	Intravenous	Doxorubicin	PEGylated liposome	Suspension/20 months	HSPC, cholesterol, and PEG 2000-DSPE (56:39:5 molar ratio)	Kaposi's sarcoma, Ovarian/breast cancer
Lipo-dox	Intravenous	Doxorubicin	PEGylated liposome	Suspension/36 months	DSPC, cholesterol, and PEG 2000-DSPE (56:39:5 molar ratio)	Kaposi's sarcoma, ovarian/breast cancer
Myocet	Intravenous	Doxorubicin	Liposome	Powder/18 months	EPC and cholesterol (55:45 molar ratio)	Combination therapy with cyclophosphamide in metastatic breast cancer
Visudyne	Intravenous	Verteporfin	Liposome	Powder/48 months	EPG and DMPC (3:5 molar ratio)	Age-related molecular degeneration, pathologic myopia, ocular histoplasmosis
Depocyt	Spinal	Cytarabine	Liposome	Suspension/18 months	Cholesterol, Triolein, DOPC, and DPPG (11:1:7:1 molar ratio)	Neoplastic meningitis and lymphomatous meningitis
DepoDur	Epidural	Morphine sulfate	Liposome	Suspension/24 months	Cholesterol, Triolein, DOPC, and DPPG (11:1:7:1 molar ratio)	Pain management
Epaxal	Intramuscular	Inactivated hepatitis A virus (strain RG-SB)	Liposome	Suspension/36 months	DOPC and DOPE	Hepatitis A
Inflexal V	Intramuscular	Inactivated hemagglutinine of Influenza virus strains A and B	Liposome	Suspension/12 months	DOPC and DOPE	Influenza

### Πίνακας 1.3 Λιποσωμιακά φάρμακα σε κλινικές δοκιμές (Chang 2012)

Product name	Route of injection	Drug	Lipid composition	Approved indication	Trial phase
LEP-ETU (powder/12 months)	Intravenous	Paclitaxel	DOPC, cholesterol, and cardiolipin (90:5:5 molar ratio)	Ovarian, breast, and lung cancers	Phase I/II
LEN-ETU	Intravenous	Mitoxantrone	DOPC, cholesterol, and cardiolipin in 90:5:5 molar ratio	Leukemia, breast, stomach, liver, ovarian cancers	Phase I
EndoTAG-1 (powder/24 months)	Intravenous	Paclitaxel	DOTAP, DOPC, and paclitaxel (50:47:3 molar ratio)	Anti-angiogenic properties; breast cancer; pancreatic cancer	Phase II
Arikace	Portable aerosol delivery	Amikacin	DPPC and cholesterol	Lung infection	Phase III
Marqibo	Intravenous	Vincristine	Cholesterol and egg sphingomyelin (4:5:5 molar ratio)	Metastatic malignant uveal melanoma	Phase III
ThermoDox	Intravenous	Doxorubicin	DPPC, MSPC, and PEG 2000-DSPE (90:10:4 molar ratio)	Non-resectable hepatocellular carcinoma	Phase III
Atragen	Intravenous	Tretinoin	DMPC and soybean oil	Acute promyelocytic leukemia, hormone-refractory prostate cancer	Phase II
T4N5 liposome lotion	Topical	Bacteriophage T4 endonuclease 5	Unknown	Xeroderma pigmentosum.	Phase III
Liposomal Grb-2	Intravenous	Grb2 antisense oligodeoxynucleotide	Unknown	Acute myeloid leukemia, chronic myelogenous leukemia, acute lymphoblastic leukemia	Phase I
Nyotran	Intravenous	Nystatin	DMPC, DMPC, and cholesterol	Systemic fungal infections	Phase I/II
LE-SX38	Intravenous	SN-38, the active metabolite of irinotecan	DOPC, cholesterol, and cardiolipin	Metastatic colorectal cancer	Phase I/II
Aroplatin	Intraleural	Cisplatin analog (L-NDDP)	DMPC and DMPC	Metastatic colorectal carcinoma	Phase II
Liprosin	Intravenous	Prostaglandin E1	Unknown	Peripheral vascular disease	Phase II/III
StimuVax	Subcutaneous	ELP25 lipopeptide (MUC1-targeted peptide)	Monophosphoryl lipid A, cholesterol, DMPC, and DPPC	Cancer vaccine for multiple myeloma developed encephalitis	Phase III
SP1-077	Intravenous	Cisplatin	SHPC, cholesterol, and DSPE-PEG	Head and neck cancer; lung cancer	Phase I/II
Lipoplatin (suspension/36 months)	Intravenous	Cisplatin	SPC, DPPG, cholesterol, and mPEG 2000-DSPE	Pancreatic cancer; head and neck cancer; mesothelioma, breast and gastric cancer, and non-squamous non-small-cell lung cancer	Phase III
S-CKD602	Intravenous	Camptothecin analog	DFSC and DSPE-PEG (9:5:5 molar ratio)	Recurrent or progressive carcinoma of the uterine cervix	Phase I/II
OSI-211	Intravenous	Lurtotecan	HSFC and cholesterol (2:1 molar ratio)	Ovarian cancer, head, and neck cancer	Phase II
INX-0125	Intravenous	Vinorelbine	Cholesterol and egg sphingomyelin (4:5:5 molar ratio)	Advanced solid tumors	Phase I
INX-0076	Intravenous	Topotecan	Cholesterol and egg sphingomyelin (4:5:5 molar ratio)	Advanced solid tumors	Phase I
Liposome-annamycin (powder)	Intravenous	Annamycin	DSPC, DSPG, and Tween	Acute lymphocytic leukemia	Phase I/II

### 1.3.2 Γενικά στοιχεία

Έχουν περάσει σχεδόν 50 χρόνια από την πρωτοποριακή παρατήρηση του Βρετανού αιματολόγου Dr Alec D Bangham το 1964 στο Ινστιτούτο Babraham στο Cambridge ότι τα φωσφολιπίδια σε υδατικά συστήματα μπορούν να σχηματίσουν κλειστές διπλοστοιβαδικές δομές (Bangham 1965).



Εικόνα 1.21 Σχηματική αναπαράσταση ενός λιποσώματος

Η διασπορά των φωσφολιπιδίων σε υδατικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα τη αυθόρμητα διατεταγμένη συσσώρευσή τους σε δομές διπλοστοιβάδων. Τα υδρόφοβα άκρα των σχηματιζόμενων διπλοστοιβάδων έρχονται σε ενεργειακά μη ευνοϊκή επαφή με το υδατικό περιβάλλον, γεγονός το οποίο τις εξωθεί σε κάμψη ώστε τα άκρα να συνενωθούν και να ελαχιστοποιηθούν οι εκτεθειμένες λιπιδικές αλυσίδες. Η ενέργεια που απαιτείται για την κάμψη της διπλοστοιβάδας καλύπτεται από την αύξηση της ενέργειας που επιφέρει στο σύστημα η έκθεση υδρόφοβων τμημάτων της διπλοστοιβάδας στο υδατικό περιβάλλον. Το αποτέλεσμα της κάμψης και συνένωσης των υδρόφοβων άκρων της διπλοστοιβάδας είναι ο σχηματισμός λιπιδικών κυστιδίων ή όπως είναι περισσότερο γνωστά με το χαρακτηρισμό «λιποσώματα». Έτσι, τα λιποσώματα ορίζονται ως κλειστές σφαιρικές δομές μιας ή περισσοτέρων λιπιδικών διπλοστοιβάδων οι οποίες περικλείουν το μέσο διασποράς των φωσφολιπιδίων. Ο σχηματισμός αυτός προσδίδει στα λιποσώματα την πολύτιμη ιδιότητα να αποτελούνται τόσο από υδρόφοβο όσο και υδρόφιλο εσωτερικό περιβάλλον το οποίο καθορίζεται από τις λιπιδικές αλυσίδες των φωσφολιπιδίων και το

υδατικό μέσο διασποράς αντίστοιχα. Για το λόγο αυτό, τα λιποσώματα μπορούν να εγκλωβίσουν στο εσωτερικό τους τόσο υδρόφοβα ή αμφίφιλα, όσο και υδρόφιλα μόρια.

### 1.3.3 Κατηγορίες Λιποσωμάτων

Η αλματώδης ανάπτυξη και μελέτης των λιποσωμάτων καθώς και η δυνατότητα τροποποίησής τους που έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια με σκοπό την εξειδικευμένη χρήση τους, έχει δυσχεράνει την ταξινόμηση τους σε κατηγορίες. Τα λιποσώματα ανήκουν στην κατηγορία των λιπιδικών κolloειδών συστημάτων μεταφοράς και ελεγχόμενης αποδέσμευσης βιοδραστικών μορίων (Feng 2003). Ωστόσο, έχει καθιερωθεί τα λιποσώματα να ταξινομούνται με βάση τη σύσταση, το μέγεθος και τον αριθμό των στοιβάδων που περιέχουν, αν και συχνά συναντώνται μορφές οι οποίες αποτελούν κράματα διαφόρων κατηγοριών τους.

#### 1.3.3.1 Σύμφωνα με τη Σύσταση

Τα λιποσώματα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σύμφωνα με τη σύστασή τους ως:

##### ❖ **Συμβατικά (conventional).**

Ως συμβατικά χαρακτηρίζονται τα λιποσώματα τα οποία αποτελούνται από φωσφολιπίδια ουδέτερα (τα ουδέτερα φωσφολιπίδια είναι στην πραγματικότητα ιοντικής φύσης, το συνολικό τους φορτίο είναι μηδενικό επειδή περιέχουν ισάριθμα θετικά και αρνητικά φορτία) ή ανιονικά φορτισμένα.

##### ❖ **Κατιονικά (cationic).**

Ως κατιονικά λιποσώματα, όπως υποδηλώνει και η ονομασία τους, χαρακτηρίζονται αυτά τα οποία φέρουν καθαρό θετικό φορτίο (π.χ. DOTAP 1,2-διελαϊκόξυ-3-(τριμεθυλαμμώνιο)-προπάνιο, DOTMA χλωριούχο N-{1-(2,3- διελαϊκόξυ)-πρότυλο}-N,N,N-τριμέθυλο –αμμώνιο). Χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά στην ενδοκυττάρια μεταφορά αρνητικά φορτισμένων μακρομορίων όπως των νουκλεϊκών οξέων DNA και RNA, αλλά και ολιγονουκλεοτιδίων.

##### ❖ **pH-ευαίσθητα (pH-sensitive).**

Τα λιποσώματα αυτά περιέχουν στη μάζα τους φωσφολιπίδια (π.χ. DPPE 1,2-διπαλμιτόϋλο-sn-γλύκερο-3- φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη) ή ελεύθερα λιπαρά οξέα (π.χ. ελαϊκό οξύ) τα οποία ανάλογα με το pH του υδατικού περιβάλλοντος στο οποίο εκτίθενται παρουσιάζουν διαφορετικό φορτίο.



❖ **Ανοσολιποσώματα (immunoliposomes or antibody-targeted).**

Η κατηγορία αυτή αφορά λιποσώματα κατευθυνόμενης στόχευσης τα οποία φέρουν στην επιφάνειά τους ένα αντίσωμα το οποίο λειτουργεί ως κέντρο αναγνώρισης από αντιγόνα επιφανείας των κυττάρων στόχων. Συνήθως το αντίσωμα συνδέεται ομοιοπολικά με δραστική ομάδα στην επιφάνεια της διπλοστοιβάδας των λιποσωμάτων η οποία συνήθως είναι το μόριο του μαλειμιδίου.

❖ **Παρατεταμένης Κυκλοφορίας (long-circulating ή sterically stabilized ή stealth).**

Τα λιποσώματα αυτά περιέχουν στη διπλοστοιβάδα τους φωσφολιπίδια στα οποία τα πολικά άκρα είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα με υδρόφιλη πολυμερή αιθυλενογλυκόλη (PEG). Η πολυαιθυλενογλυκόλη παρέχει ένα είδος στερικής σταθεροποίησης, δηλαδή έναν φραγμό στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της επιφανείας των λιποσωμάτων και των συστατικών του βιολογικού περιβάλλοντος. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν συνήθως διείδυση πρωτεϊνών του πλάσματος στη διπλοστοιβάδα οι οποίες μπορεί να αποσταθεροποιήσουν τη δομή του λιποσώματος ή να φέρουν ιδιότητες οψονινών, η παρεμπόδιση των οποίων μειώνουν την πιθανότητα αναγνώρισης από μονοκύτταρα φαγοκύτταρα. Έτσι, τα λιποσώματα αυτά παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στην κυκλοφορία του αίματος χωρίς να απαιτείται να έχουν αναγκαστικά μικρό μέγεθος.

### 1.3.3.2 Σύμφωνα με το Μέγεθος και τον Αριθμό Στοιβάδων

Ανάλογα με το μέγεθος και τον αριθμό των στοιβάδων ταξινομούνται ως:

❖ **Μεγάλα Πολυστοιβαδικά Λιποσώματα (MLV multi-lamellar vesicles)**, των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται μεταξύ 1000-3000nm. Χαρακτηριστικό των λιποσωμάτων αυτών είναι ότι περιέχουν περισσότερες από μία διπλοστοιβάδες, άρα και συνολικά υδρόφοβη επιφάνεια και γι' αυτό εγκλωβίζουν αποτελεσματικότερα υδρόφοβα μόρια, είναι σχετικά σταθερά, ωστόσο απομακρύνονται από την κυκλοφορία του αίματος σχετικά γρήγορα καθώς αναγνωρίζονται από τα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

❖ **Μεγάλα Μονοστοιβαδικά Λιποσώματα (LUV large unilamellar vesicles)** με μέγεθος 200-1000nm. Περιέχουν στη δομή τους μία και μοναδική διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων και αυτό τα καθιστά αποτελεσματικότερα στον εγκλωβισμό υδρόφιλων μορίων καθώς περιέχουν μεγαλύτερο εσωτερικό υδρόφιλο τμήμα σε σχέση με τη υδρόφοβη επιφάνεια της διπλοστοιβάδας τους. Τα λιποσώματα αυτά

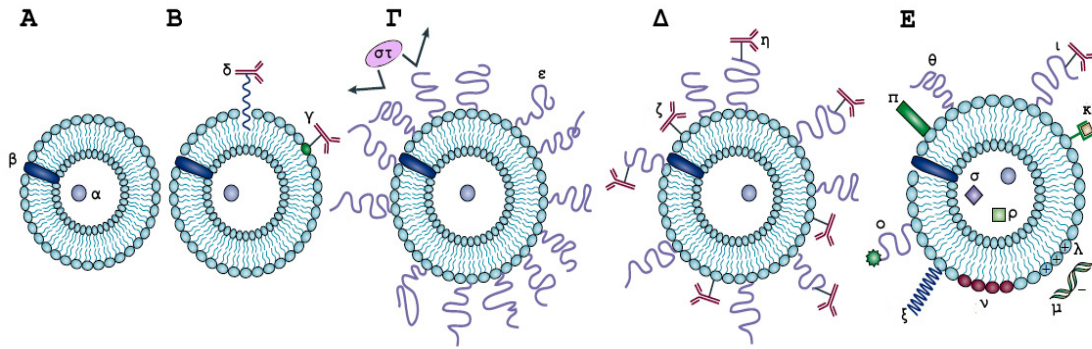
λόγω του μεγάλου μεγέθους τους αναγνωρίζονται εύκολα από τα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως και στην περίπτωση των MLV's.

- ❖ **Μικρά Μονοστοιβαδικά Λιποσώματα (SUV small unilamellar vesicles)** με μέγεθος 30-200nm. Αποτελούνται από μία διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων. Τα μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα εμφανίζουν μεγάλη ομοιογένεια στο μέγεθος, ωστόσο χαρακτηρίζονται από θερμοδυναμική αστάθεια και οδηγούνται γρήγορα σε συγχώνευση προς σχηματισμό μεγαλύτερων λιποσωμάτων και/ή συσσωμάτωση και καθίζηση. Λόγω του μικρότερου μεγέθους σε σχέση με τις υπόλοιπες κατηγορίες λιποσωμάτων η παρουσία τους στο κυκλοφορικό σύστημα παρατείνεται καθώς «ξεφεύγουν» από την εποπτεία του ανοσοποιητικού συστήματος.

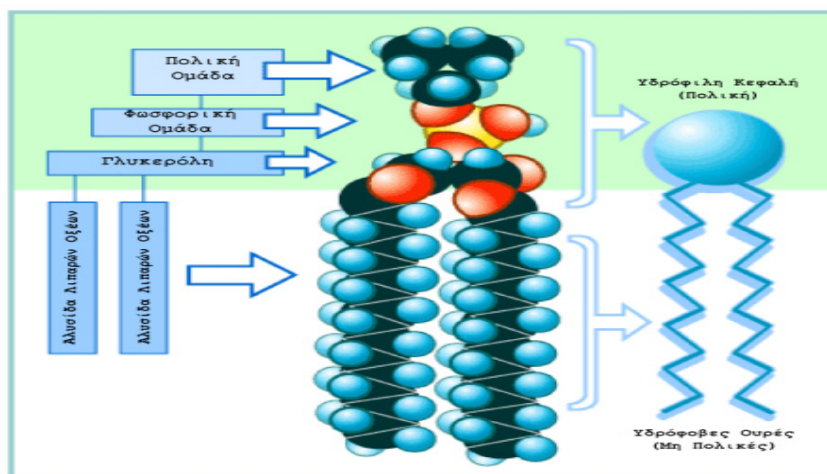
χρυσού ή αργύρου (σ) για ηλεκτρονική μικροσκοπία. (Torchilin 2005).

### 1.3.4 Σύσταση των Λιποσωμάτων

Η κύρια δομική μονάδα των λιποσωμάτων είναι τα φωσφολιπίδια. Τα φωσφολιπίδια είναι μια ομάδα λιπιδίων που αποτελείται από μια ποικιλία διαφορετικών μορίων. Είναι σύνθετα λιπίδια και το μόριο τους μπορεί να περιέχει υποκαταστάτες, το οποίο κάνει την κατηγοριοποίηση τους δύσκολο έργο. Η παρουσία στο φωσφολιπιδικό μόριο, ειδικών υδρόφιλων και υδρόφοβων περιοχών δίνει σε αυτή τη δομή αμφιφιλικές ιδιότητες που επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την φυσικοχημική τους συμπεριφορά. Ανήκουν στα διπλής αλυσίδας αμφίφιλα και είναι τα δομικά στοιχεία όλων των βιολογικών μεμβρανών. Τα φωσφολιπίδια είναι διεστέρες της γλυκερόλης. Οι sn-1 και sn-2 θέσεις της γλυκερόλης είναι εστεροποιημένες με λιπαρά οξέα (sn: στερεοειδικός αριθμός σύμφωνα με την ονοματολογία της γλυκερίνης), ποικίλων βαθμών ακορεστότητας και αριθμού ατόμων άνθρακα. Η θέση sn-3 της γλυκερόλης είναι εστεροποιημένη με φωσφορική ομάδα. Η φωσφορική ομάδα είναι επίσης εστεροποιημένη σε μια αλκοόλη που καθορίζει το φωσφολιπίδιο.



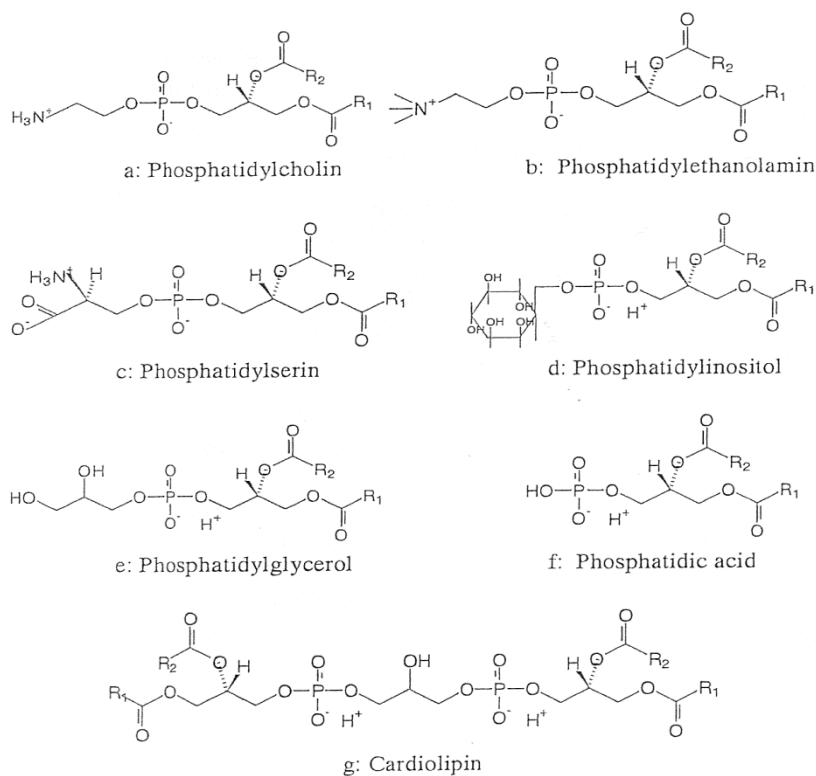
Εικόνα 1.22 Εξέλιξη των λιποσωμάτων: Α: Απλά συμβατικά λιποσώματα με υδατοδιαλυτό φάρμακο (α) εγκλωβισμένο στο υδατικό λιποσωματικό εσωτερικό και λιποδιαλυτό φάρμακο (β) ενσωματωμένο μέσα στην λιποσωματική μεμβράνη (αυτοί οι προσδιορισμοί δεν επαναλαμβάνονται στις άλλες εικόνες) Β: Ανοσολιπόσωμα με στοχευμένο αντίσωμα με το αντίσωμα ομοιοπολικά συνδεδεμένο (γ) στα αντιδρώντα φωσφολιπίδια στην μεμβράνη ή υδροφοβικά αγκιστρωμένο (δ) εσωτερικά στην λιποσωματική μεμβράνη μετά από μία προκαταρκτική μετατροπή με ένα υδροφοβικό τμήμα. Γ: Μακράς κυκλοφορίας λιπόσωμα ενοφθαλμισμένο με ένα προστατευτικό πολυμερές (ε) όπως το PEG, το οποίο δημιουργεί μια ασπίδα στην επιφάνεια του λιποσώματος από την αλληλεπίδραση με οψωνοποιημένες πρωτεΐνες (στ). Δ: Μακράς κυκλοφορίας ανοσολιπόσωμα φέροντας ταυτόχρονα και προστατευτικό πολυμερές και αντίσωμα το οποίο μπορεί να συνδεθεί στην επιφάνεια του λιποσώματος (ζ) ή προτιμότερα στο τελικό άκρο της ενοφθαλμισμένης πολυμερικής αλυσίδας (η). Ε: Νέας γενιάς λιπόσωμα, η επιφάνεια του οποίου μπορεί να τροποποιηθεί (ξεχωριστά ή ταυτόχρονα) με διαφορετικούς τρόπους. Μεταξύ αυτών των τροποποιήσεων είναι: η σύνδεση προστατευτικού πολυμερούς (θ) ή προστατευτικού πολυμερούς και στοχευμένου υποκαταστάτη όπως αντίσωμα (ι), η σύνδεση/ενσωμάτωση της διαγνωστικής ετικέτας (κ), η ενσωμάτωση θετικά φορτισμένων λιπιδίων (λ) που επιτρέπουν την συμπλοκή με το DNA (μ), η ενσωμάτωση ευαίσθητων σε ερεθίσματα λιπιδίων (ν), η σύνδεση ευαίσθητου σε ερεθίσματα πολυμερούς (ξ), η σύνδεση ενός διεισδυτικού στο κύτταρο πεπτιδίου (ο), η ενσωμάτωση ικών συστατικών (π). Επιπρόσθετα του φαρμάκου, το λιπόσωμα μπορεί να φορτωθεί με μαγνητικά σωματίδια (ρ) για μαγνητική στόχευση και/ή κολλοειδικά σωματίδια



Εικόνα 1.23 Γενική δομή του φωσφολιπιδίου

### 1.3.4.1 Ταξινόμηση Φωσφολιπιδίων

Τα φωσφολιπίδια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σύμφωνα με την πολική κεφαλή τους στις παρακάτω υποομάδες (Εικόνα 1.24).

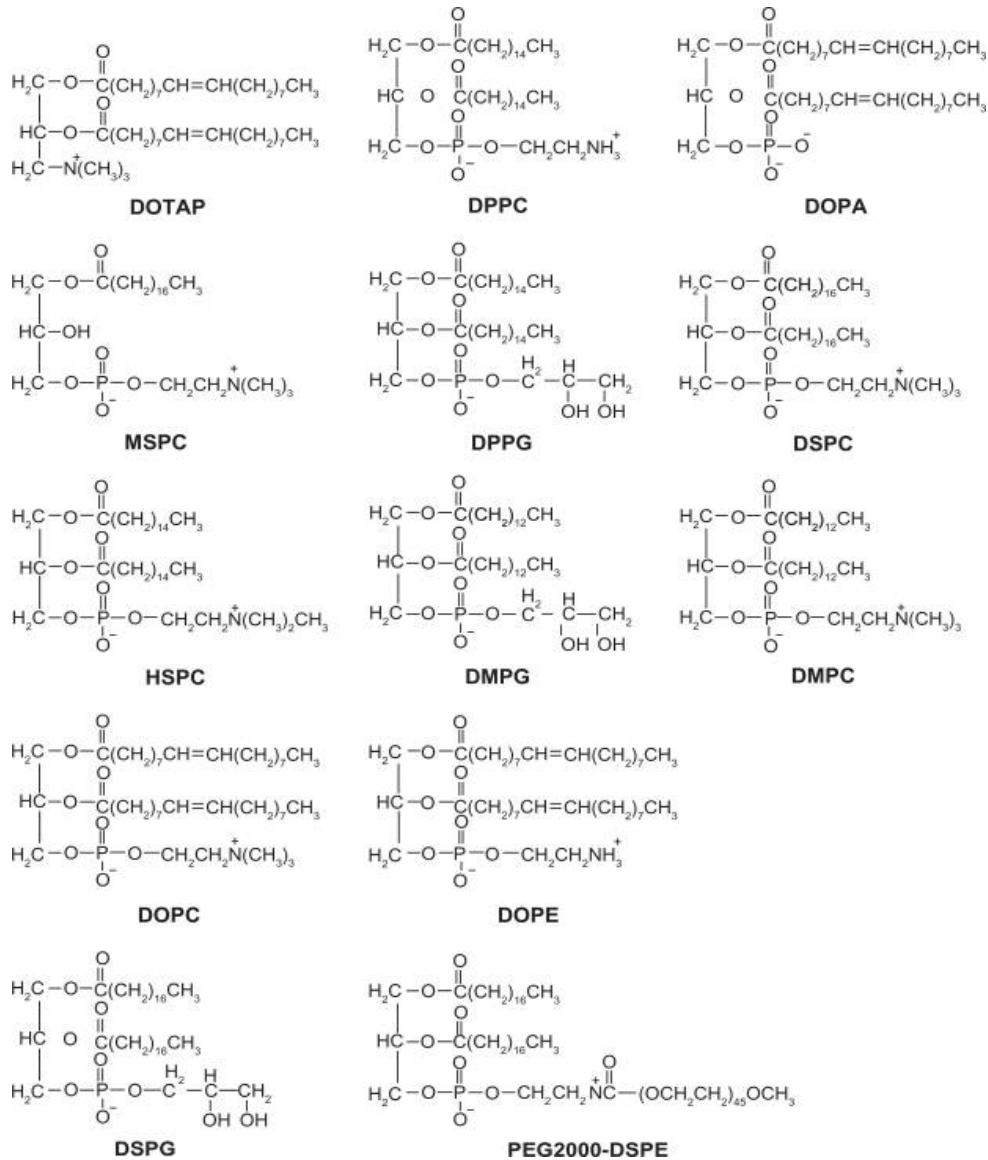


Εικόνα 1.24 Κατηγοριοποίηση των φωσφολιπιδίων σύμφωνα με την πολική τους κεφαλή (Hatziantoniou 2008).

- ❖ **Φωσφατιδυλοχολίνες (Phosphatidylcholines, PC) (1,2-diacyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine).** Οι φωσφατιδυλοχολίνες είναι επικρατούσες στις κυτταρικές μεμβράνες των ζώων (Gennis 1989). Συχνά αποκαλούνται λεκιθίνες (από την ελληνική λέξη *λέκιθος* = κρόκος αυγού) και το περιεχόμενό τους στις βιομεμβράνες ή στους ζωικούς ιστούς είναι πολύ υψηλό. Είναι οι κύριες λιπιδικές ενώσεις στις μεμβράνες των φυτών αλλά το ποσοστό τους στις βακτηριακές μεμβράνες είναι πολύ μικρό και σπάνιο. Τα αμφιτεριονικά (zwitterionic) φωσφολιπίδια όπως η φωσφατιδυλοχολίνη, σε φυσιολογικό pH είναι ηλεκτρικά ουδέτερα.
- ❖ **Φωσφατιδυλοεθανολαμίνες (Phosphatidylethanolamines, PE).** Είναι επίσης γνωστές ως κεφαλίνες και απομονώθηκαν για πρώτη φορά από εγκεφαλικά λιπίδια (από την ελληνική λέξη *κεφάλι*) και είναι τα κύρια φωσφολιπίδια των βακτηριακών

μεμβρανών. Η ζωικής καταγωγής φωσφατιδυλοεθανολαμίνη περιέχει το υψηλότερο ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε σύγκριση με το περιεχόμενο της φωσφατιδυλοχολίνης του ίδιου ιστού. Ο σχηματισμός διπλοστοιβάδας ή λιποσωμάτων από PE είναι δύσκολος εξαιτίας του ότι η ομάδα της πολικής κεφαλής (εθανολαμίνη) του μορίου είναι μικρή σε σύγκριση με τις ακυλ-αλυσίδες. Σε pH >8 η αμφιτεριονική πολική κεφαλή φορτίζεται και η γεωμετρία αλλάζει, αυξάνοντας σε μέγεθος εξαιτίας της ενυδάτωσης της πολικής ομάδας, επομένως διευκολύνει το σχηματισμό διπλοστοιβάδας ή λιποσωμάτων.

- ❖ **Φωσφατιδυλοσερίνη (Phosphatidylserine, PS).** Είναι παρούσα σε ζωικούς και φυτικούς ιστούς καθώς και σε βακτήρια. Φέρει καθαρό αρνητικό φορτίο. Η φωσφατιδυλοσερίνη σε αντίθεση με τη φωσφατιδυλοχολίνη περιέχει μια επιπρόσθετη αρνητικά φορτισμένη καρβοξυλομάδα και σε φυσιολογικό pH το συνολικό φορτίο του μορίου είναι αρνητικό.
- ❖ **Φωσφατιδυλοϊνσιτόλη (Phosphatidylinositol, PI).** Είναι ένα σύνθετο λιπίδιο στους ζωικούς και φυτικούς ιστούς καθώς και στα βακτήρια. Είναι διαλυτό στο νερό και σε μείγματα διαλυτών χλωροφορμίου/μεθανόλης, εξαιτίας της γλυκο- ομάδας της πολικής κεφαλής, η οποία παράγει αρκετούς δεσμούς υδρογόνου. Περιέχει ινσιτόλη στην οπτικά αδρανή μορφή της.
- ❖ **Φωσφατιδυλογλυκερόλη (Phosphatidylglycerol, PG).** Είναι κυρίαρχη η παρουσία του στα ανώτερα φυτά (30%) και εντοπίζεται στους χλωροπλάστες. Τα μιτοχόνδρια είναι η τοποθεσία εντοπισμού τους στα κύτταρα των θηλαστικών.
- ❖ **Καρδιολιπίνη (Cardiolipin, CL).** Εντοπίζεται στις μιτοχονδριακές μεμβράνες και απομονώνεται το μυικό ιστό (10% των ολικών φωσφολιπιδίων). Η CL, έχει παρουσιάσει ανοσολογική δραστηριότητα.
- ❖ **Συνθετικά φωσφολιπίδια.** Είναι εμπορικά διαθέσιμα και περιέχουν πολικές κεφαλές που απαντώνται στη φύση και τον ίδιο τύπο λιπαρού οξέως και στις δύο, *sn*-1 και *sn*-2, θέσεις. Η άκυλο- αλυσίδες μπορεί να είναι κυρίως myristoyl (C14:0), palmitoyl (C16:0), oleoyl (C16:1) ή stearoyl (C18:0) κατάλοιπα. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιπιδικών διπλοστοιβάδων που παρασκευάζονται από συνθετικά φωσφολιπίδια είναι σαφώς καθορισμένα. Η λιπιδική σύσταση επηρεάζει πολλές φυσικές ιδιότητες των μοντέλων μεμβρανών και έχειδειχθεί ότι μονά συνθετικά λιπίδια ή μείγματα μικρών και μακρών αλυσίδων λιπαρών οξέων μπορεί να παράγουν σταθερές λιπιδικές διπλοστοιβάδες και λιποσώματα.



**Εικόνα 1.25** Συντακτικοί τύποι των λιπιδίων που λαμβάνουν μέρος στα λιποσωμιακά παρασκευάσματα (Chang 2012). (Δες Συντομογραφίες για την πλήρη ονομασία)

### 1.3.5 Φυσικοχημική Σταθερότητα Λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα αποτελούν ένα ασταθές θερμοδυναμικά σύστημα το οποίο οδηγείται σ' αυτή τη μορφή μέσα από διάφορες μετασταθερές καταστάσεις που εξαρτώνται από τον τρόπο παρασκευής τους. Η θερμοδυναμική τους αστάθεια στη μονάδα του χρόνου, προκύπτει μέσα από ενεργειακές μεταβολές που ακολουθούν τη συνεχόμενη αναδιοργάνωση των δομών των σωματιδίων, καθώς και τις μεταβολές στη σύστασή τους. Έτσι η σταθερότητα των λιποσωμάτων αναλύεται με όρους φυσικής και χημικής

σταθερότητας. Η φυσική σταθερότητα των λιποσωμάτων αφορά τόσο τις φυσικές ιδιότητες των μορίων των φωσφολιπιδίων όσο και τη μεταξύ των λιποσωμάτων αλληλεπίδραση. Η χημική σταθερότητα από την άλλη, αφορά κυρίως διαδικασίες οι οποίες τροποποιούν τη χημική σύσταση των λιποσωμάτων. Τόσο η φυσική όσο και η χημική σταθερότητα των λιποσωμάτων καθορίζουν τον εγκλωβισμό, την αποδέσμευση, το χρόνο διατήρησης και την *in vivo* συμπεριφορά και φαρμακοκινητική των μορίων που φέρουν είτε στη λιπιδική τους διπλοστοιβάδα είτε στο εσωτερικό υδατικό τους περιβάλλον. Επομένως, οι μηχανισμοί που καθορίζουν τη σταθερότητα των λιποσωμάτων αποτελούν σημαντική παράμετρο κατά τη διαδικασία παρασκευής τους. Ωστόσο, τα μόρια που εγκλωβίζονται στα λιποσώματα συχνά συμμετέχουν σε διαδικασίες αποσταθεροποίησης υποβοηθώντας μεταβολές σε σημαντικές ιδιότητές τους (φυσικές ή χημικές) και για το λόγο αυτό θα πρέπει η παρουσία τους να λαμβάνεται υπόψη (Demetzos, 2008).

#### **1.3.5.1 Φυσική Σταθερότητα Λιποσωμάτων**

Η γνώση των δυνάμεων που αναπτύσσονται κατά την προσέγγιση παρακείμενων λιπιδικών διπλοστοιβάδων είναι απαραίτητη για την κατανόηση των ιδιοτήτων και κατ' επέκταση της φυσικής σταθερότητας των λιποσωμάτων. Σύμφωνα με την κλασική θεωρία DLVO, (η θεωρία πήρε το όνομά της από τα αρχικά γράμματα των επωνύμων των ερευνητών που την ανέπτυξαν Derjaguin, Landau, 1941, Verwey, Overbeek, 1948), η απόσταση μεταξύ δύο επιφανειών που περικλείονται από συγκεκριμένο διαλύτη καθορίζεται από την ισορροπία μεταξύ αλληλεπιδράσεων οι οποίες αναπτύσσονται σε μεγάλη και μικρή ακτίνα δράσης. Η θεωρία αυτή περιγράφει τη σχέση δυναμικής ενέργειας και απόστασης μεταξύ των δύο επιφανειών ως συνάρτηση των ελκτικών δυνάμεων van der Waals και των απωστικών ηλεκτροστατικών δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ τους. Λαμβάνοντας υπόψη όσα προαναφέρθηκαν, η απουσία ισχυρής ηλεκτροστατικής άπωσης, όπως στην περίπτωση των ουδέτερων φωσφολιπιδίων, οδηγεί σε αυθόρμητη μη αντιστρεπτή προσκόλληση των παρακείμενων επιφανειών. Το γεγονός ότι αυτό δεν συμβαίνει στην πραγματικότητα καθώς επιπρόσθετες απωστικές δυνάμεις ενυδάτωσης (hydration force) ή αλλιώς δυνάμεις επιδιαλύτωσης (solvation force) συντηρούν τις δύο επιφάνειες σε απόσταση μεταξύ τους. Οι απωστικές δυνάμεις ενυδάτωσης μεταξύ παρακείμενων επιφανειών ή λιποσωμάτων προκύπτουν από το έργο που απαιτείται για την απομάκρυνση μορίων ύδατος από τις μεταξύ τους υδρόφιλες

επιφάνειες ή τα πολικά άκρα των φωσφολιπιδίων και αναπτύσσονται όταν βρεθούν σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους η οποία δεν υπερβαίνει τα 3nm. Έτσι, η ισορροπία μεταξύ των ελκτικών δυνάμεων van der Waals και των απωστικών δυνάμεων ηλεκτροστατικής φύσης και ενυδάτωσης καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τη φυσική σταθερότητα των λιποσωμάτων. Οποιοσδήποτε παράγοντας ικανός να μεταβάλλει τη ισχύ των δυνάμεων αυτών μπορεί να οδηγήσει τα λιποσώματα σε συγχώνευση ή συσσωμάτωση. (Parahadjoroulos 1991) Για παράδειγμα η εμφάνιση ατελειών υδρόφοβης φύσης (οι ατέλειες υδρόφοβης φύσης συναντώνται στη βιβλιογραφία με τον όρο “hydrophobic defects”, χαρακτηρίζονται έτσι ενεργειακά μη ευνοϊκά επιφανειακά σημεία της διπλοστοιβάδας, τα οποία ενώ είναι υδρόφοβης φύσης, έρχονται σε επαφή με το υδατικό περιβάλλον) στη διπλοστοιβάδα λόγω έντονης κάμψης της, ιδιαίτερα σε μικρά λιποσώματα, ή εξαιτίας της παρουσίας αμφίφιλων μορίων που προκαλούν τέτοιου είδους «ελαττώματα» ενισχύει τις ελκτικές δυνάμεις van der Waals μεταξύ παρακείμενων λιποσωμάτων. Από την άλλη πλευρά, αμφίφιλα μόρια τα οποία αντικαθιστούν τα μόρια του ύδατος από την περιοχή των πολικών άκρων, εξασθενούν τις δυνάμεις ενυδάτωσης. Η παρουσία ανιονικών ή κατιονικών φωσφολιπιδίων ενισχύουν τις απωστικές δυνάμεις ηλεκτροστατικής φύσης.

Η αύξηση του ιξώδους στα λιποσωματικά εναιωρήματα και η μετατροπή τους σε πήκτωμα αποτελεί επίσης παράγοντα αποσταθεροποίησης των λιποσωμάτων. Η μετατροπή των λιποσωμάτων σε πήκτωμα είναι τις περισσότερες φορές μη αναστρέψιμη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει την απώλεια της δομής τους. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί βέβαια απόρροια συσσωμάτωσης και συγχώνευσης των λιποσωμάτων αλλά μπορεί να εμφανιστεί κάτω από ιδιαίτερες συνθήκες στην παρουσία μορίων που είναι ικανά να επάγουν ενδοεισχώρηση λιπιδικών αλυσίδων, με την προϋπόθεση ότι τα λιποσώματα αποτελούνται από φωσφολιπίδια με κορεσμένες λιπιδικές αλυσίδες και το εναιώρημά τους έχει εκτεθεί σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από αυτήν που απαιτείται για την εκκίνηση του φαινομένου.

Το φαινόμενο του πολυμορφισμού των φωσφολιπιδίων από τα οποία αποτελούνται τα λιποσώματα αποτελεί επίσης σημαντικό παράγοντα που καθορίζει τη φυσική σταθερότητά τους, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία στην οποία εκτίθενται. Έτσι, SUV λιποσώματα τα οποία αποτελούνται κυρίως από φωσφολιπίδια με κορεσμένες λιπιδικές αλυσίδες (π.χ. DPPC) έχουν την τάση να υπόκεινται σε συγχώνευση σε θερμοκρασίες χαμηλότερες της κύριας μετάπτωσης των λιπιδίων, όπου απαντώνται στη μη



ελαστική άκαμπτη φάση γέλης. Επίσης, σε συγχώνευση οδηγούνται λιποσώματα μιγμάτων φωσφολιπιδίων καθώς εννοείται ο πλάγιος διαχωρισμός φάσεων και η ανάπτυξη ατελειών υδρόφοβης φύσης στα όρια αυτών των φάσεων.

### **1.3.5.2 Χημική Σταθερότητα των Λιποσωμάτων**

Διαδικασίες διαφοροποίησης της σύστασης των λιποσωμάτων αν και αποτελούν σημαντικό παράγοντα στον καθορισμό της χημικής σταθερότητας των λιποσωμάτων, εντούτοις μπορούν να ελέγχουν σε μεγαλύτερο βαθμό από τους αντίστοιχους παράγοντες που καθορίζουν τη φυσική τους σταθερότητα. (Grit et al., 1993) Η χημική σταθερότητα των φωσφολιπιδίων αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα που καθορίζει και τη σταθερότητα των λιποσωμάτων. Τα φωσφολιπίδια κάτω από ιδιαίτερες συνθήκες στο υδατικό τους περιβάλλον δύναται να εμφανίσουν ευπάθεια έναντι της υδρόλυσης των εστερικών δεσμών της γλυκερόλης. Η υδρόλυση των φωσφολιπιδίων οδηγεί στο σχηματισμό ελεύθερων λιπαρών οξέων και λυσοφωσφολιπιδίων η ύπαρξη των οποίων μεταβάλλει την οργάνωση των μορίων στη διπλοστοιβάδα επιταχύνοντας τη διαδικασία συγχώνευσης των λιποσωμάτων ενώ παράλληλα η διαπερατότητα της διπλοστοιβάδας αυξάνεται. Επίσης, η παρουσία των ελευθέρων λιπαρών οξέων μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό συστημάτων μικκυλίων.

Επίσης, τα φωσφολιπίδια τα οποία περιέχουν ακόρεστες λιπιδικές αλυσίδες μπορούν να υποστούν οξείδωση των διπλών δεσμών προς σχηματισμό υπεροξειδίων. Ο σχηματισμός των υπεροξειδίων οδηγεί τα φωσφολιπίδια σε αποικοδόμηση προς πλήθος προϊόντων διαφορετικής χημικής σύστασης όπως εποξειδία, κορεσμένες και ακόρεστες αλδεϋδες, κετόνες και υδρογονάνθρακες. Η διαδικασία αυτή μεταβάλλει τόσο τη διαπερατότητα της διπλοστοιβάδας των φωσφολιπιδίων, όσο και την ίδια την ακεραιότητα των λιποσωμάτων.

### **1.3.6 Τεχνικές Παρασκευής των Λιποσωμάτων**

Τα λιποσώματα μπορούν να παρασκευαστούν με διάφορες τεχνικές οι οποίες ωστόσο βασίζονται στην ίδια αρχή, της ενέργειας δηλαδή που απαιτείται προκειμένου οι διπλοστοιβάδες των φωσφολιπιδίων να καμφθούν και να σχηματίσουν κλειστές σφαιρικές δομές. Η τεχνική που ακολουθείται για την παρασκευή των λιποσωμάτων εξαρτάται από τα επιθυμητά χαρακτηριστικά και μεγέθη.

### **1.3.6.1 Ενυδάτωση λεπτού λιπιδικού υμενίου (Thin-film hydration)**

Η μέθοδος αυτή αποτελεί την περισσότερο διαδεδομένη και απλή μέθοδο για την παρασκευή πολυστοιβαδικών λιποσωμάτων (MLV). Βασίζεται στη διασπορά των φωσφολιπιδίων υπό μορφή υμενίου που καταλαμβάνει όσο το δυνατό μεγαλύτερη επιφάνεια και ενυδάτωση αυτού σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία κύριας μετάπτωσης των φωσφολιπιδίων. Το μόριο που πρόκειται να ενσωματωθεί ή να εγκλωβιστεί προστίθεται, είτε στο λιπιδικό υμένιο κατά την παρασκευή του στην περίπτωση που είναι λιπόφιλο, είτε στο υδατικό μέσο κατά την ενυδάτωση αν είναι υδατοδιαλυτό. Η μέθοδος ενυδάτωσης του λεπτού λιπιδικού υμενίου οδηγεί στο σχηματισμό πολυστοιβαδικών λιποσωμάτων που χαρακτηρίζονται από μεγάλη ανομοιογένεια στο μέγεθος (1-5 $\mu$ m). Τα λιποσώματα αυτά ωστόσο είναι δυνατόν να υποστούν μείωση μεγέθους και να μετατραπούν σε μικρά (SUV) ή μεγάλα (LUV) μονοστοιβαδικά με μεγαλύτερη ομοιογένεια σε μέγεθος υποβάλλοντας το μείγμα τους σε υπερήχηση μέσω αισθητήρα ή εξώθηση από πολυκαρβονικά φίλτρα συγκεκριμένου πορώδους. Τόσο η υπερήχηση όσο και η εξώθηση μέσω πολυκαρβονικών φίλτρων συγκεκριμένου πορώδους προσδίδουν στο σύστημα την ενέργεια (θερμική, μηχανική) που απαιτείται για τη θραυσματοποίηση των διπλοστοιβάδων των MLV λιποσωμάτων σε μικρές λιποειδείς πλάκες οι οποίες μετά από συγχώνευση σχηματίζουν μονοστοιβαδικά λιποσώματα ελαχιστοποιώντας την έκθεση των υδρόφοβων άκρων τους στο υδατικό περιβάλλον. Συνήθως, πριν τη χρήση πολυκαρβονικών φίλτρων, το μίγμα των MLV λιποσωμάτων υποβάλλεται σε διαδικασία σύντηξης για προκαταρτική μείωση στο μέγεθός τους. Η μέθοδος της σύντηξης (freeze-thaw) περιλαμβάνει την απότομη εναλλαγή ψύξης-θέρμανσης μεταξύ θερμοκρασιών ξηρού πάγου ή υγρού αζώτου και της θερμοκρασίας κύριας μετάβασης των φωσφολιπιδίων. Οι ακραίες αυτές συνθήκες προκαλούν θραυσματοποίηση των διπλοστοιβάδων και επανασχηματισμό μικρότερων πολυστοιβαδικών λιποσωμάτων. (Parahadjopoulos 1967)

### **1.3.6.2 Έγχυση σε οργανικό διαλύτη (Solvent injection)**

Η τεχνική της έγχυσης διαλύματος φωσφολιπιδίων σε αιθανόλη ή διαιθυλαιθέρα στο υδατικό μέσο αποτελεί μέθοδο παρασκευής μικρών ή μεγάλων μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων (SUV, LUV). Τα φωσφολιπίδια διαλύονται αρχικά σε μικρό όγκο αιθανόλης ή διαιθυλαιθέρα και στη συνέχεια εγχύονται με βίαιο τρόπο, ή εξαιρετικά αργά αντίστοιχα, σε υδατικό περιβάλλον το οποίο συνήθως βρίσκεται σε θερμοκρασία

μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία της κύριας μετάβασης των λιπιδίων. Ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται με εξάτμιση, διήθηση ή διαπίδυση. Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από απλότητα στην εφαρμογή της και από την απουσία χρήσης επιβλαβών, για τα συστατικά, χημικών ή φυσικών διεργασιών, κάτι το οποίο αποτελεί και το σημαντικότερο πλεονέκτημα της μεθόδου. Ωστόσο, μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το επιπρόσθετο στάδιο απομάκρυνσης του οργανικού διαλύτη και τα αραιά διαλύματα των λιποσωμάτων που παράγονται. (Riaz 1996)

### **1.3.6.3 Μέθοδος απογαλακτωματοποίησης - εξάτμιση αντιστρόφου φάσης (Reverse-phase evaporation, REV).**

Παρόμοια με τη μέθοδο έγχυσης οργανικού διαλύτη, τα λιπίδια διασπείρονται σε υδατικό περιβάλλον μέσω οργανικής φάσης. Η οργανική φάση ωστόσο δεν απομακρύνεται άμεσα αλλά σχηματίζει γαλάκτωμα H<sub>2</sub>O σε έλαιο (w/o). Τα μόρια των λιπιδίων στο σχηματιζόμενο γαλάκτωμα διατάσσονται σε μονοστοιβάδες με μορφή αντίστροφων μικκυλίων γύρω από τα σταγονίδια του ύδατος, οι οποίες κατά το στάδιο απομάκρυνσης του οργανικού διαλύτη συνενώνονται προς σχηματισμό μίγματος μονοστοιβαδικών και πολυστοιβαδικών λιποσωμάτων. Συνήθως στο διάλυμα των λιπιδίων σε οργανικό διαλύτη προστίθεται μέρος του υδατικού μέσου που θα χρησιμοποιηθεί για την Παρασκευή των λιποσωμάτων, ενώ το υπόλοιπο προστίθεται μετά την απομάκρυνση της οργανικής φάσης. Πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η μεγάλη απόδοση στον εγκλωβισμό υδατοδιαλυτών μορίων (Szoka 1978).

### **1.3.6.4 Θερμική Μέθοδος (Heating Method).**

Πρόσφατα αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος για την Παρασκευή λιποσωμάτων και νανολιποσωμάτων (nanoliposomes) χωρίς τη χρήση επικίνδυνων χημικών ουσιών και διαδικασιών. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη ενυδάτωση των συστατικών που δομούν τα λιποσώματα σε υδατικό μέσο και ακολουθεί θέρμανση των συστατικών αυτών παρουσία γλυκερόλης σε θερμοκρασία 120°C. Η γλυκερόλη είναι υδατοδιαλυτό μόριο και φυσιολογικά αποδεκτό χημικό μόριο από τον ανθρώπινο οργανισμό, με την ικανότητα να αυξάνει τη σταθερότητα των λιπιδικών κυστιδίων και δε χρειάζεται να απομακρυνθεί από το τελικό λιποσωμακό προϊόν. Όσο για τη διαδικασία της θέρμανσης αποτελεί το κύριο στάδιο της μεθοδολογίας παρασκευής και γι' αυτό ορίζεται ως «θερμική μέθοδος» και τα σχηματιζόμενα λιποσώματα από τη διαδικασία αυτή ως ΗΜ-λιποσώματα (HMV- heating

method vesicles). Εφαρμόζοντας της θερμική μέθοδο καταργείται η αναγκαιότητα για αποστείρωση των σκευών που χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία ενώ ταυτόχρονα μειώνεται ο χρόνος και το κόστος για τη παρασκευή λιποσωμάτων με τη θερμική μέθοδο. Τα ΗΜV μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων και για τη προσομοίωση βιολογικών μεμβρανών. Στη μέθοδο αυτή δεν χρησιμοποιούνται οι πτητικοί οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή συμβατικών λιποσωμάτων, αλλά μόνο η γλυκερόλη που είναι ένας βιοσυμβατός και μη τοξικός παράγοντας, που έχει ήδη χρησιμοποιηθεί σε φαρμακευτικά σκευάσματα και συγχρόνως συμβάλλει στη διατήρηση της ωσμωτικότητας κατά τη λιποσωματική παρασκευή . (Mozafari 2005)

### **1.3.7 Εισαγωγή Βιοδραστικών Μορίων στα Λιποσώματα**

Η εισαγωγή βιοδραστικών μορίων σε λιποσώματα εξαρτάται κυρίως από τη φύση τους (Εικόνα 8). Ανεξάρτητα από τη μέθοδο παρασκευής των λιποσωμάτων, τρεις κύριες τεχνικές ακολουθούνται ανάλογα με τις ιδιότητες του μορίου, το οποίο μπορεί να είναι υδατοδιαλυτό, υδρόφοβο ή αμφίφιλο, ή επαμφοτερίζον (ασθενής βάση ή οξύ) (Kawa 1999).

#### **❖ Εγκλωβισμός (Encapsulation).**

Ο εγκλωβισμός ως όρος χρησιμοποιείται κυρίως στην περίπτωση ενός υδατοδιαλυτού μορίου. Η διαδικασία περιλαμβάνει την ενυδάτωση των φωσφολιπιδίων με υδατικό διάλυμα του προς εγκλωβισμό μορίου. Ο σχηματισμός των λιποσωμάτων παθητικά εγκλωβίζει το υδατοδιαλυτό μόριο στο εσωτερικό υδατικό περιβάλλον τους και στις μεταξύ των διπλοστοιβάδων περιοχές.

#### **❖ Μερисμός (ενσωμάτωση) (Partitioning).**

Ένα μόριο το οποίο είναι υδρόφοβο ή αμφίφιλο και διαλύεται σε οργανικό διαλύτη, αναμιγνύεται με τα φωσφολιπίδια στο στάδιο διασποράς τους στην οργανική φάση. Η ενυδάτωση του μίγματος έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό λιποσωμάτων στα οποία τα υδρόφοβα ή αμφίφιλα μόρια έχουν ενσωματωθεί στη λιπιδική διπλοστοιβάδα.

#### **❖ Ενεργός φόρτιση (Active loading).**

Βασίζεται στο γεγονός της παθητικής διάχυσης μορίων διαμέσου της λιπιδικής διπλοστοιβάδας των λιποσωμάτων. Μόρια όπως ασθενή οξέα απαντώνται σε ουδέτερη ή διστάμενη μορφή ανάλογα με το pH του μέσου διάλυσης. Ένα τέτοιο μόριο φέρεται στην

αδιάστατη μορφή του και αφήνεται να διαπεράσει τη διπλοστοιβάδα των λιποσωμάτων. Το pH στο εσωτερικό περιβάλλον των λιποσωμάτων ρυθμίζεται ώστε το μόριο να απαντάται στη δισταμένη του μορφή. Καθώς το άτομο είναι πλέον φορτισμένο δεν μπορεί να διαπεράσει τη λιπιδική διπλοστοιβάδα προς το εξωτερικό περιβάλλον και συσσωρεύεται στο εσωτερικό των λιποσωμάτων.

### 1.3.8 Πλεονεκτήματα των Λιποσωμάτων

Σκοπός κάθε φαρμακοτεχνικής μορφής είναι η βελτίωση της κατανομής της δραστικής ουσίας στον οργανισμό και η επίτευξη του μέγιστου θεραπευτικού αποτελέσματος. Τα λιποσώματα, έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν ένα ευρύ φάσμα βιοδραστικών ουσιών και διαθέτουν τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

- ❖ **Προσανατολισμός-στόχευση:** τα λιποσώματα μπορούν να κατευθύνουν το φαρμακομόριο σε συγκεκριμένα σημεία του οργανισμού (πάσχοντες ιστούς) ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο τη θεραπευτική του αποτελεσματικότητα, ενώ παράλληλα, αποφεύγεται η συσσώρευση του φαρμάκου στους υγιείς ιστούς, με συνέπεια τη μείωση της τοξικότητας και των παρενεργειών.
- ❖ **Ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμακομορίου:** τα λιποσώματα λειτουργούν ως «δεξαμενή» αποδεσμεύοντας το φαρμακομόριο με ελεγχόμενο ρυθμό. Αυτή τους η ιδιότητα βοηθά στη διατήρηση θεραπευτικών επιπέδων του φαρμακομορίου στον οργανισμό χωρίς να προκαλούνται τοξικές επιπτώσεις.
- ❖ **Προστασία εγκλωβισμένου φαρμακομορίου:** Οι φαρμακευτικές ουσίες που εγκλείονται σε λιποσώματα, ιδίως εκείνες που παγιδεύονται στον υδατικό τους πυρήνα είναι περισσότερο προστατευμένες καθώς δεν υφίστανται την επίδραση αποικοδομητικών ενζύμων.
- ❖ **Διευκόλυνση εισόδου ουσιών στα κύτταρα:** Τα λιποσώματα έχουν τη δυνατότητα μεταφοράς ουσιών στο εσωτερικό των κυττάρων οι οποίες, υπό διαφορετικές συνθήκες, δε θα μπορούσαν να εισέλθουν λόγω διαφορετικών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών.

Σήμερα κυκλοφορούν λιποσωμακά σκευάσματα στο εμπόριο, τόσο για θεραπευτικούς, όσο και για κοσμητολογικούς σκοπούς.

Τα λιποσώματα λόγω της διπλής τους φύσης (λιπόφιλη διπλοστοιβάδα, υδρόφιλο εσωτερικό) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς τόσο λιπόφιλων όσο και υδρόφιλων

ουσιών. Ανάλογα με τη φύση τους οι διάφορες ουσίες μπορούν να τοποθετηθούν στη λιπιδική διπλοστοιβάδα ή στο υδρόφιλο εσωτερικό του λιποσώματος, όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα.

### 1.3.9 Λυοφιλοποίηση

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της ανάπτυξη των φαρμακευτικών προϊόντων είναι η σταθερότητα κατά την αποθήκευσή τους. Συχνά ένα φαρμακευτικό προϊόν όταν διατηρείται σε μορφή έτοιμου προς χρήση διαλύματος, υφίσταται φυσικές και χημικές μεταβολές. Η λυοφιλοποίηση είναι η μέθοδος εκείνη που εξασφαλίζει τη σταθερότητα ενός ασταθούς διαλύματος μετατρέποντάς το σε στερεό. Η αφαίρεση του ύδατος πρέπει να τονιστεί ότι γίνεται με εξάχνωση και όχι με απλή εξάτμιση.

Κατά τη λυοφιλοποίηση, τα φιαλίδια γεμίζονται με το διάλυμα και στη συνέχεια τοποθετούνται μέσα στο λυοφιλοποιητή (Εικόνα 3.23), όπου οι συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης μπορούν να μεταβάλλονται κατά βούληση σε μεγάλα όρια, στη συνέχεια ψύχονται, κατόπιν δημιουργείται υψηλό κενό και όταν πια οι συνθήκες έχουν περάσει «κάτω από το τριπλούν σημείο του ύδατος» προσφέρεται θερμότητα στο προϊόν. Τότε το νερό αρχίζει να φεύγει υπό τη μορφή ατμών και να συγκεντρώνεται σε ένα ιδιαίτερα κρύο σημείο του μηχανήματος το συμπυκνωτή (condenser) ακολουθώντας την αρχή της «ψυχράς παρειάς» του Watt. Αυτή η διεργασία διαρκεί συνήθως από 20 έως 96 ώρες και είναι αυτό που αποκαλείται «κύκλος της λυοφιλοποίησης» (freeze drying cycle). Στο τέλος του κύκλου στα φιαλίδια έχει παραμείνει μόνο το φάρμακο σε στερεά ξηρή μορφή που είναι το λυόφιλο προϊόν ή υαλώδες πλακούντιο (cake). Η χαρακτηριστική ιδιότητα του λυόφιλου προϊόντος είναι ότι το στερεό συστατικό που είναι μέσα στο φιαλίδιο δεν είναι μία σκόνη αλλά ένα «αφράτο» σπογγώδες στερεό που στην πράξη έχει τον όγκο που είχε το διάλυμα από το οποίο προήλθε. Όταν λοιπόν σε αυτό το στερεό προστεθεί το νερό ακριβώς πριν από τη χρήση, η διάλυση και ανασύσταση του προϊόντος είναι αν όχι ακαριαία, σίγουρα πάρα πολύ ταχύτερη από τη διάλυση που θα είχε το ίδιο στερεό υπό τη μορφή μιας κοινής σκόνης, για το λόγο ότι η σπογγώδης υφή του αυξάνει πάρα πολύ την επιφάνεια επαφής μεταξύ φαρμάκου και διαλύτη και επιταχύνει δραματικά τη διάλυση. Εξ αιτίας αυτής της ιδιότητας προέρχεται και η ονομασία («λυόφιλο» = «φίλος της διάλυσης»). Σ' αυτό το σημείο επαναλαμβάνεται ότι το νερό μέσα στο λυοφιλοποιητή δεν εξατμίζεται (που σημαίνει ότι από υγρό γίνεται υδρατμός) αλλά εξαχνούται που σημαίνει

ότι από στερεό (πάγος) γίνεται υδρατμός. Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά λυοφιλοποιημένων σκευασμάτων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Κατά τη διαδικασία της λυοφιλοποίησης και της ανασύστασης τα λιποσώματα μπορούν να υποστούν βλάβες τόσο κατά τη διάρκεια της ψύξης όσο και κατά τη διάρκεια της ανασύστασης. Για την αποφυγή αυτών των βλαβών χρησιμοποιούνται κρυοπροστατευτικά (προστασία κατά την ψύξη) και λυοπροστατευτικά (προστασία κατά την ανασύσταση). Κατά τη διάρκεια της λυοφιλοποίησης των λιποσωμάτων σε υδατικό μέσο σχηματίζονται κρύσταλλοι πάγου και αυξάνεται η συγκέντρωση του διαλυμένου συστατικού στο εναπομένον διάλυμα. Ο σχηματισμός κρυστάλλων και η αύξηση της συγκέντρωσης μπορούν να καταστρέψουν τη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Ως κρυοπροστατευτικά και λυοπροστατευτικά χρησιμοποιούνται δισακχαρίτες. Για να είναι αποτελεσματικό το λυοπροστατευτικό πρέπει να βρίσκεται τόσο στο εξωτερικό όσο και στο εσωτερικό του λιποσώματος. Εκτός αυτού η συγκέντρωσή του λυοπροστατευτικού και του εγκλωβισμένου φαρμακομορίου πρέπει να είναι τέτοια ώστε η οσμωτικότητα στο εσωτερικό και στο εξωτερικό του λιποσώματος να είναι ίδια. Σημαντική επίδραση στην προστασία των λιποσωμάτων έχει η κατά βάρος αναλογία σακχάρου/φωσφολιπιδίου.

### **1.3.10 Τοξικότητα των Λιποσωμάτων**

Τα λιποσώματα συνήθως παρασκευάζονται από συστατικά φυσικής προέλευσης και ακριβώς εξαιτίας της σύστασής τους, είναι βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα, μη τοξικά και δεν προκαλούν ανοσολογική απάντηση. Παρόλα αυτά όμως ορισμένα λιπίδια σε κάποιες συγκεντρώσεις παρουσιάζουν τοξικότητα για τον οργανισμό. Γενικά, όμως τα περισσότερα λιπίδια ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις, δεν προκαλούν τοξικότητα ή άλλε ανεπιθύμητες ενέργειες. Για παράδειγμα διάφορα φωσφολιπιδικά μικρογαλακτώματα που χορηγούνται παρεντερικά σε δόση μεγαλύτερη των 100g ημερησίως.

Γενικότερα τα λιποσώματα είναι δυνατόν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες ενέργειες οι οποίες οφείλονται στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους. Τα λιποσώματα είναι δυνατόν να προκαλέσουν:

- ❖ Πιθανή τοξικότητα στο ΔΕΣ (δίκτυο-ενδοθηλιακό σύστημα) – ειδικά όταν τα λιποσώματα μεταφέρουν φαρμακομόρια- ή σε αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις σε περίπτωση κορεσμού του ανοσοποιητικού συστήματος, το οποίο είναι υπεύθυνο για την απομάκρυνση ξένων σωματιδίων από το αίμα.

- ❖ Αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και με μακρομόρια που μπορεί να προκαλέσουν αλλαγές στη χημεία του αίματος.
- ❖ Αλληλεπιδράσεις με τα κύτταρα της κυκλοφορίας του αίματος μπορεί να προκαλέσουν μείωση των λιπιδίων και της χοληστερόλης, καθώς και μείωση της δράσης των μεμβρανικών πρωτεϊνικών, κάτι που οδηγεί σε αλλαγή των λειτουργιών των κυττάρων. Μπορεί να αλλάξουν και να επηρεάσουν την λειτουργικότητα των λιποπρωτεϊνών εξαιτίας της φωσφολιπιδικής ανταλλαγής όταν βρίσκονται στον ορό. Δηλαδή γίνεται ανταλλαγή λιποσωματικών λιπιδίων με τα λιπίδια διαφόρων κυτταρικών μεμβρανών.
- ❖ Για παράδειγμα, αυξάνοντας την αναλογία χοληστερόλη / λιπίδια στην μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων, η δραστηριότητα της  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  μειώνεται. Τα λιποσώματα μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσουν με τα αιμοπετάλια προκαλώντας μεταβολή στην θρόμβωση του αίματος. Οι περισσότερες μελέτες έδειξαν αντιστρεπτή συγκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων και όχι σημαντική συσχέτιση με την θρόμβωση του αίματος. Κάποιες λιποσωμακές φόρμουλες είναι πιθανόν να προκαλέσουν αιμόλυση.
- ❖ Απόφραξη τριχοειδών αγγείων από μεγάλα λιποσώματα και πιθανή φυσικοχημική βλάβη αυτών κυρίως κατά την ενδοεγκεφαλική χορήγηση των λιποσωμάτων. Επίσης, είναι δυνατόν να φράξουν τα τριχοειδή αγγεία των πνευμόνων προκαλώντας έτσι πνευμονική εμβολή.
- ❖ Πιθανή ανοσογέννεση.
- ❖ Φαρμακολογικά αποτελέσματα ορισμένων λιπιδίων. Ορισμένα εξωγενή λιπίδια μπορεί να επηρεάσουν τον εγκεφαλικό μεταβολισμό, ενώ πολυακόρεστες άκυκλο αλυσίδες από λιποσώματα μπορεί να είναι πρώτες ύλες διαφόρων βιολογικά ενεργών ουσιών, π.χ. το αραχιδονικό οξύ του οποίου οι μεταβολίτες περιλαμβάνουν προσταγλαδίνες, λευκοτριένια, θρομβοξάνες και λιποξίνες.
- ❖ Βλάβες εξαιτίας των τοξικών προϊόντων αποικοδόμησης της χοληστερόλης ή των λιπιδίων.

Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο εγκλωβισμός ορισμένων φαρμάκων στα λιποσώματα μπορεί να προκαλέσει αλλαγή στη φαρμακοκινητική και τη βιοδιαθεσιμότητα των μορίων και αύξηση της τοξικότητάς τους. Για παράδειγμα, ο εγκλωβισμός του φαρμακομορίου cytosine arabinose σε λιποσώματα μειώνει εξαιρετικά τη χημική του



διάσπαση και αυξάνει κατά πολύ την τοξικότητα του. Οι περισσότερες από τις παρενέργειες αυτές οφείλονται στην παρουσία ορισμένων λιπιδίων στις διπλοστοιβάδες. Τυπικό παράδειγμα η στεαρυλαμίνη SA η οποία φαίνεται να καταστρέφει τις μεμβράνες των λυσοσωμάτων και να προκαλεί απελευθέρωση λυσοσωματικών ενζύμων.

Παρόλο που γενικά τα λιποσώματα δεν προκαλούν λύση των ερυθρών κυττάρων, η πιθανή αιμόλυση από τα λιποσώματα ή τα συστατικά τους πρέπει να ελέγχει. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων μπορεί να προκαλέσει παρενέργειες και συγκεκριμένα βλάβες στο δίκτυοενδοθηλιακό σύστημα και μόλυνση των ερυθροκυττάρων. Αυτές οι παρενέργειες μπορούν να μειωθούν ή να εξαλειφθούν με την ενσωμάτωση αντιοξειδωτικών στη λιπιδική μεμβράνη.

Γενικά οι περισσότερες από αυτές τις παρενέργειες δεν έχουν μελετηθεί ολοκληρωτικά ακόμη. Σε αντίθεση με όλα τα παραπάνω στις περισσότερες των περιπτώσεων φαίνεται ότι τα λιποσώματα είναι ασφαλή, αφού είναι βιοσυμβατά, βιοαποικοδομήσιμα και μη ανοσογόνα.

### **1.3.11 Λιποσώματα και Καρκίνος**

#### **1.3.11.1 Γενικά Στοιχεία**

Ο καρκίνος αποτελεί μία όλο και συχνότερα απαντώμενη νόσο στο σύγχρονο κόσμο. Πριν τριάντα περίπου χρόνια μπορούσαμε να πούμε ότι ο καρκίνος ήταν μια ομάδα ασθενειών της οποίας η διαδικασία ανάπτυξης δεν είχε κατανοηθεί πλήρως. Όμως τα τελευταία χρόνια η μοριακή βιολογία έκανε μεγάλες προόδους όσον αφορά τη διευκρίνιση των μηχανισμών καρκινογένεσης, χωρίς όμως ακόμη να τους έχει πλήρως διαλευκάνει. Σήμερα γνωρίζουμε, ότι ένα κύτταρο αρχίζει να γίνεται κακόηθες σαν αποτέλεσμα των μεταλλαγών του γενετικού του υλικού, το οποίο ακολουθείται από μια σειρά βιολογικών αλλαγών στην συμπεριφορά του. Η διαδικασία αυτή μπορεί να διαρκέσει αρκετά χρόνια έως ότου το καρκινικό κύτταρο καταλήξει στην μορφή του κακοήθους όγκου. Η κατανόηση σε μεγάλο βαθμό των γενετικών μεταβολών που ευθύνονται για την δημιουργία καρκινικών κυττάρων άλλαξε και την στρατηγική της θεραπευτικής αντιμετώπισης της ασθένειας. Τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται νέες μέθοδοι στην διάγνωση, στην ανίχνευση και στην θεραπευτική αντιμετώπιση, με κύριο στόχο την έγκαιρη διάγνωση της κακοήθειας. Έχει επίσης γίνει κατανοητό στους επιστήμονες, ότι το

μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων επηρεάζει την θεραπεία και εμποδίζει την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων. Έτσι, αν και τα κύτταρα τα οποία γειτνιάζουν με τα καρκινικά δεν παρουσιάζουν μεταβολές του γενετικού τους υλικού, εν τούτοις μπορούν να μεταβάλουν την φυσιολογική τους δραστηριότητα λόγω αυτής ακριβώς της γειτνίασης τους με τα καρκινικά κύτταρα.

Η κατανόηση λοιπόν όχι μόνο της εξέλιξης και της συμπεριφοράς των καρκινικών κυττάρων αλλά και του μικροπεριβάλλοντος τους είναι απαραίτητη για να κατανοήσουμε τον τρόπο ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, αλλά και για να σχεδιάσουμε τη στρατηγική που θα πρέπει να ακολουθήσουμε ώστε να αναπτυχθούν αποτελεσματικά φάρμακα λαμβάνοντας υπόψη όχι μόνο τον καρκινικό όγκο αλλά και το περιβάλλον του.

Οι παράμετροι – χαρακτηριστικά του «συστήματος» αυτού μπορούν να ταξινομηθούν όπως στη συνέχεια χωρίς να αναπτυχθούν περαιτέρω μιας και αυτό αποτελεί αντικείμενο χωριστής πραγματείας.

- ❖ Υπάρχουν παράγοντες που σχετίζονται με την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και θα πρέπει να ελέγχονται.
- ❖ Τα καρκινικά κύτταρα δεν ανταποκρίνονται στους φυσιολογικούς παράγοντες ελέγχου της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού με βάση τις γενετικές πληροφορίες.
- ❖ Τα καρκινικά κύτταρα δεν υπακούουν στην διαδικασία της απόπτωσης (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος).
- ❖ Δημιουργία δικτύου αγγείων (αγγειογένεση) γύρω από τον όγκο για την τροφοδοσία του με οξυγόνο και με θρεπτικά συστατικά.
- ❖ Μετάσταση των καρκινικών κυττάρων από τον αρχικό όγκο έχει σαν αποτέλεσμα το θάνατο του 90% των ασθενών από την νόσο.

Η προσέγγιση ότι ο καρκίνος πρέπει να αντιμετωπισθεί σαν ένα πολύπλοκο «σύστημα» δημιούργησε νέες τάσεις στην ανάπτυξη καινοτόμων φαρμάκων, τα οποία σχεδιάζονται λαμβάνοντας υπόψη το «σύστημα» καρκίνος με τις παραμέτρους που το χαρακτηρίζουν. Η θεραπευτική του καρκίνου σήμερα προσανατολίζεται στην διεπιστημονική συνεργασία και στις νέες τεχνολογίες με τις οποίες θα μπορούμε να ανιχνεύσουμε όσον το δυνατόν συντομότερα το «δακτυλικό καρκινικό αποτύπωμα», να κατανοήσουμε το μικροπεριβάλλον και να σχεδιάσουμε συστήματα μεταφοράς, παράδοσης και στόχευσης των φαρμακομορίων.

Με βάση όλα τα παραπάνω το Ινστιτούτο Έρευνας του Καρκίνου (NCI) των Η.Π.Α ανέπτυξε ένα σχέδιο για την καταπολέμηση του καρκίνου σε ολόκληρο τον κόσμο, ενεργοποιώντας την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα. Το πρόγραμμα αυτό περιλαμβάνει, την κατανόηση της δημιουργίας και ανάπτυξης του καρκίνου και επίσης την έγκαιρη ανίχνευση και θεραπεία του με βάση τη νανοτεχνολογία. Το σχέδιο αυτό που ονομάζεται Cancer Nanotechnology Plan (CNPlan) έχει ως στόχο την ουσιαστική αντιμετώπιση και ελάττωση του καρκίνου παγκοσμίως μέχρι το 2015 (<http://nano.cancer.gov>).

### **1.3.11.2 Λιποσώματα και Αντικαρκινική Θεραπεία**

Ο μικρός θεραπευτικός δείκτης των αντικαρκινικών φαρμάκων εξαιτίας της μικρής αντικαρκινικής δραστηριότητας και/ή των σοβαρών παρενεργειών είναι το κυριότερο πρόβλημα στην χημειοθεραπεία του καρκίνου. Αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι οι υγιείς ιστοί επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό εξαιτίας της μη στοχευμένης δράσης των αντικαρκινικών φαρμάκων στα καρκινικά κύτταρα. Επιπροσθέτως κάποια φάρμακα έχουν μικρό χρόνο ημιζωής στην συστηματική κυκλοφορία λόγω της γρήγορης ενζυμικής αποικοδόμησής τους, με συνέπεια την αύξηση της χορηγούμενης δόσης που έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση παρενεργειών (Massing 2000). Για να αντιμετωπιστεί το συγκεκριμένο πρόβλημα έχουν αναπτυχθεί 2 στρατηγικές. Η πρώτη περιλαμβάνει την κατασκευή φαρμάκων που δρουν σε ειδικούς μηχανισμούς των καρκινικών κυττάρων και η δεύτερη αφορά την ανάπτυξη φορέων μεταφοράς και στόχευσης (π.χ. λιποσώματα) που εξασφαλίζουν την επιλεκτική συσσώρευση του φαρμάκου στα καρκινικά κύτταρα.

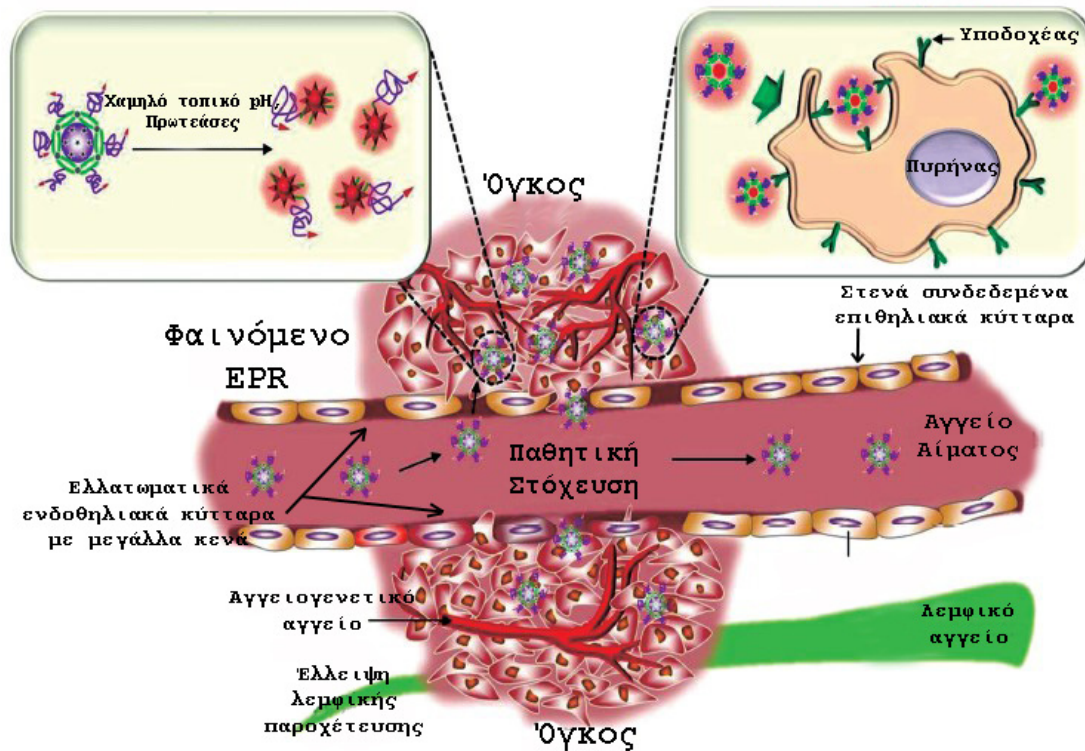
Όσο αφορά τα λιποσώματα, κατά την εισαγωγή τους στην συστηματική κυκλοφορία ο οργανισμός παραπλανάται και δεν αναγνωρίζει το ελεύθερο φάρμακο αλλά τα λιποσώματα. Η φαρμακοκινητική του φαρμάκου επηρεάζεται από το λιποσωμιακό φορέα. Οι βασικές ιδιότητες των λιποσωμάτων είναι η προστασία του φαρμάκου από τα αποικοδομητικά ένζυμα, η μικρή τοξικότητα, η μη πρόκληση ανοσολογικής απάντησης και το ότι είναι βιοαποικοδομήσιμα (Gregoriadis 1995).

### **1.3.11.3 Τρόποι Δράσης-Φαινόμενο Αυξημένης Διαπερατότητας και Συγκράτησης (EPR effect).**

Η αγγείωση του όγκου τυπικά αποτελείται από κακώς ευθυγραμμισμένα ελαττωματικά ενδοθηλιακά κύτταρα με μεγάλα κενά (έως 4μm) (Greish 2010), που

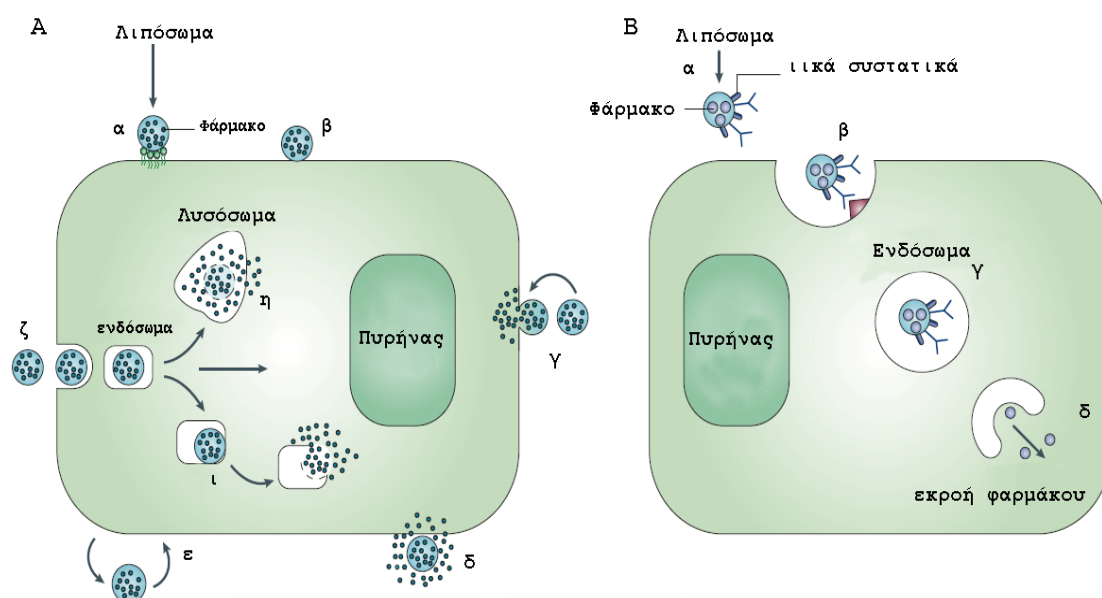
στερούνται στιβάδας λείων μυικών ινών ή νεύρωσης, με σχετικά ευρύ αυλό και εξασθενημένη λειτουργία υποδοχέα για αγγειοδραστικούς μεσολαβητές ιδιαίτερα της αγγειοτενσίνης II. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ταχείας ανάπτυξης των αιμοφόρων αγγείων του αίματος για να μπορέσουν να υποστηρίξουν τη γρήγορη ανάπτυξη του όγκου (Gastl 1997). Επιπροσθέτως, στερούνται λειτουργικά λεμφαγγεία (Hashizume 2000, Folkman 1995, Yuan 1994) ώστε να απομακρύνουν ουσίες και νανοσωματίδια. Επιπλέον, η υπερπαραγωγή της αγγειακών μεσολαβητών, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας ανάπτυξης, η βραδυκινίνη, το υπεροξυνιτρώδες νιτρικό οξείδιο, οι προσταγλανδίνες και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες του στρώματος (Noguchi 1998, Wu 1998, Maeda 1996, Doi 1996, Maeda 1988), συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην παρούσα υπερδιαπερατότητα στους καρκινικούς ιστούς. Το φαινόμενο EPR περιλαμβάνει δύο κύρια χαρακτηριστικά, πρώτα της μεταβληθείσας βιοκατανομής, όπου τα νάνο-μεγέθους φάρμακα παρουσιάζουν διαφορετική συσσώρευση στους ιστούς των όγκων φθάνοντας σε υψηλότερη συγκέντρωση από εκείνη στο πλάσμα ή σε άλλα όργανα (Greish 2010). Αυτό το αποτέλεσμα είναι χρονοεξαρτώμενο και μπορεί να αναπαραχθεί σε όγκους διάφορων μεγεθών. Έτσι, νανοσωματίδια, όπως τα βιολογικά μακρομόρια ή συνθετικά πολυμερή με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 30-40 kDa και τα λιποσώματα με διάμετρο έως 500 nm μπορούν να διαπεράσουν τα αιμοφόρα αγγεία του όγκου και να συσσωρευτούν στον καρκινικό ιστό, ενώ δεν συσσωρεύονται στα υγιή όργανα και ιστούς (Yuan 1994). Η άλλη πτυχή του φαινομένου EPR είναι ο αυξημένος χρόνος ημιζωής στο πλάσμα των νάνο-μεγέθους φαρμάκων και των λιποσωμάτων καθώς το μέγεθος τους υπερβαίνει το όριο της νεφρικής απέκκρισης, περιορίζοντας την εκκαθάριση τους, αλλά και εξαιτίας της ανικανότητάς τους να διεισδύσουν ενδιάμεσα από τις στενές ενδοθηλιακές ενώσεις των φυσιολογικών αγγείων του αίματος. Καθώς το φαρμακολογικό αποτέλεσμα και η συγκέντρωση στο πλάσμα είναι παράλληλα, αυτό το φαινόμενο έχει ως αποτέλεσμα την παρατεταμένη θεραπευτική δράση επιπλέον της στόχευσης (Seymour 1995, Matsumura 1986). Το κέρδος που αναμένεται από το φαινόμενο EPR είναι προς το μέγεθος των 7 - έως 10-φορές υψηλότερης συγκέντρωσης του φαρμάκου στον όγκο σε σύγκριση με τις ισοδύναμες δόσεις του ίδιου φαρμάκου στην χαμηλού μοριακού βάρους μορφή εξαιτίας της έλλειψης αποτελεσματικής λεμφικής παροχέτευσης στους στερεούς όγκους (Greish 2004). Το φαινόμενο EPR είναι ένα παθητικό φαινόμενο (passive targeting) που μπορεί να αυξηθεί ενεργά από τις ακόλουθες τεχνικές που σχετίζονται με τις ανωμαλίες της αγγείωσης του όγκου.

Με τη σύνδεση αντισωμάτων στην επιφάνεια των λιποσωμάτων (ανοσολιποσώματα) επιτυγχάνεται η εξειδικευμένη αλληλεπίδρασή τους με τα κύτταρα – στόχους και έχουμε ενεργητική στόχευση (active targeting). Τα ανοσολιποσώματα έχουν στην επιφάνειά τους αντισώματα τα οποία λειτουργούν σαν κέντρα αναγνώρισης από τα αντιγόνα επιφανείας που υπάρχουν στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων. Από τα μέσα της δεκαετίας του 1980 έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές σύνδεσης μονοκλωνικών αντισωμάτων στην επιφάνεια των λιποσωμάτων. Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στην αντίδραση των θειο-ομάδων της πρωτεΐνης με κατάλληλες ομάδες, συνδεδεμένες με φωσφολιπίδια, τα οποία έχουν ενσωματωθεί μέσα στην λιπιδική διπλοστιβάδα των λιποσωμάτων. Στην επιφάνεια των λιποσωμάτων έχουν κατά καιρούς συνδεθεί διάφορα αντισώματα με στόχο την κυτταρική στόχευση.

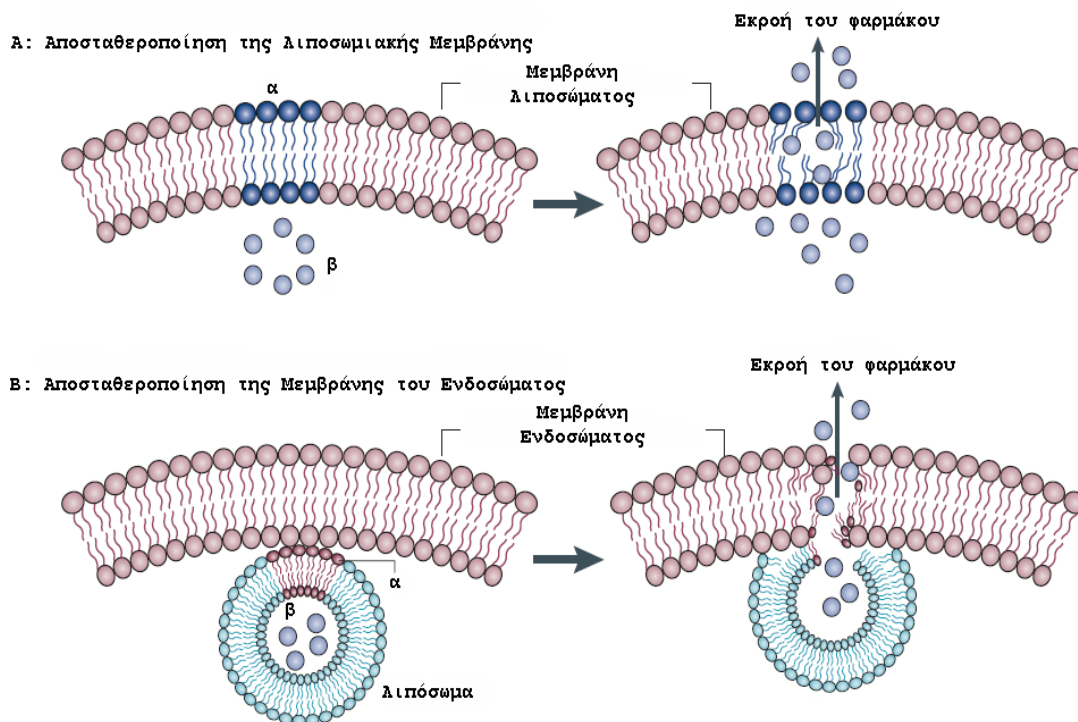


**Εικόνα 1.26** Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών μηχανισμών με τους οποίους οι νανοφορείς μπορούν να παραδώσουν τα φάρμακα στους όγκους. Παρουσιάζεται η παθητική στόχευση των ιστών μέσω φαινομένου EPR καθώς και η ενεργητική κυτταρική στόχευση που επιτυγχάνεται με την τροποποίηση της επιφάνειας των λιποσωμάτων με την ένωση ειδικών/εκλεκτικών αντισωμάτων. Τα πολυμερικά νανοσωματίδια αντιπροσωπεύονται από τους κύκλους.

Η πειραματική χρήση των ανοσολιποσωμάτων στο καρκίνο του μαστού, είχε σαν αποτέλεσμα την βελτίωση της δράσης του αντικαρκινικού φαρμάκου, όχι μόνο σε σύγκριση με το ελεύθερο φάρμακο αλλά και με τα συμβατικά λιποσώματα τα οποία είχαν εγκλωβισμένο το φάρμακο (Kirpotin 1997). Έτσι η παράδοση του φαρμάκου μέσω των λιποσωμάτων ως φορέων χορήγησης, ελαττώνει την τοξικότητα στους υγιείς ιστούς και αυξάνει την θεραπευτική αξία της θεραπείας. Τα φαρμακομόρια τα οποία έχουν εγκλωβισθεί σε λιποσώματα με μονοκλωνικά αντισώματα στην επιφάνειά τους είναι τα αντικαρκινικά φάρμακα δοξορουβικίνη της κατηγορίας των ανθρακυκλινών τα αλκαλοειδή της βίνκα, και η ταξόλη της κατηγορίας των ταξανών (Sapra 2003).



**Εικόνα 1.27** Αλληλεπίδραση λιποσώματος με κύτταρο. **A.** Φαρμακευτικά λιποσώματα μπορούν ειδικά (**α**) ή μη ειδικά (**β**) να απορροφηθούν από την κυτταρική επιφάνεια. Τα λιποσώματα μπορούν επίσης να συγχωνευτούν με την κυτταρική μεμβράνη (**γ**) και να απελευθερώσουν το περιεχόμενό τους στο κυτταρόπλασμα ή μπορούν να αποσταθεροποιηθούν από συγκεκριμένα συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης όταν απορροφηθούν στην επιφάνεια (**δ**) έτσι ώστε το απελευθερωμένο φάρμακο μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο μέσω μικροπινοκύτωσης. Το λιπόσωμα μπορεί να υποστεί την άμεση ή την ανταλλαγή των λιπιδικών συστατικών με την κυτταρική μεμβράνη επαγόμενη από πρωτεΐνες-μεταφορείς (**ε**) ή να υποβληθεί σε ειδική ή μη ειδική ενδοκύτωση (**ζ**). Στην περίπτωση της ενδοκύτωσης, το λιπόσωμα μπορεί να παραδοθεί από το ενδόσωμα στο λυσόσωμα (**η**) ή καθοδόν προς το λυσόσωμα, τα λιποσώματα μπορεί να προκαλέσουν αποσταθεροποίηση του ενδοσώματος (**ι**) η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του φαρμάκου στο κυτταρόπλασμα. **B.** Λιπόσωμα που έχει φορτωθεί με συγκεκριμένα ιικά συστατικά (**α**) και περιέχει φάρμακο, μπορεί ειδικά να επιδράσει στα κύτταρα (**β**), να προκαλέσει ενδοκύτωση και μέσω της αλληλεπίδρασης με τα ιικά συστατικά με την εσωτερική μεμβράνη του ενδοσώματος (**γ**) να επιτρέψει την εκροή του φαρμάκου στο κυτταρόπλασμα (**δ**) (Torchilin 2005).



**Εικόνα 1.28** Συντηκογόνα και ευαίσθητα σε ερεθίσματα λιποσώματα. **A.** Αποσταθεροποίηση της λιποσωμιακής μεμβράνης. Μετά τη συσώρευση στις επιθυμητές θέσεις στο σώμα, τα λιποσώματα που περιέχουν συστατικά ευαίσθητα σε διεγέρτες, όπως τα λιπίδια (**α**) στη μεμβράνη και στο φάρμακο (**β**) μέσα, και αφού έχει υποβληθεί σε τοπική δράση του αντίστοιχου ερεθίσματος (όπως το pH ή η θερμοκρασία), υφίστανται τοπική αποσταθεροποίηση της μεμβράνης (μεταφορά από αριστερά προς τα δεξιά του πίνακα **A**) που επιτρέπει την εκροή του φαρμάκου από το λιπόσωμα στο περιβάλλον. **B.** αποσταθεροποίηση της μεμβράνης του ενδοσώματος. Μετά την ενδοκύτωση από το κύτταρο και τη λήψη στο εσωτερικό του ενδοσώματος, το λιπόσωμα που περιέχει συστατικά ευαίσθητα (στο pH) διεγερτών, όπως τα λιπίδια (**α**) στη μεμβράνη και στο φάρμακο (**β**) μέσα, μπορεί να υποστεί αποσταθεροποίηση ανεξάρτητη του pH και να ξεκινήσει η αποσταθεροποίηση της λιποσωμιακής μεμβράνης (μεταφορά από αριστερά στα δεξιά του πάνελ **B**) που επιτρέπει την εκροή του φαρμάκου στο κυτταρόπλασμα (Torchilin 2005).





## ***2. ΣΚΟΠΟΣ***



Η παρούσα διδακτορική διατριβή αξιολογεί τη βιοδραστικότητα τεσσάρων (4) νέων μεικτών συμπλόκων του Ag(I) με υποκαταστάτες τριφαινυλοφωσφίνη και θειοαμίδια, όσο αφορά τη δράση τους και τη δραστικότητα τους σε σχέση με τον υποκαταστάτη που φέρει ο άργυρος κάθε φορά σε *in vitro* καρκινικά και φυσιολογικά μοντέλα. Επίσης, περιλαμβάνει μελέτες για την ενσωμάτωση ενός επιλεγθέντος (από τα τέσσερα) συμπλόκου, το οποίο λαμβάνεται υπ' όψιν ως πρότυπο σύμπλοκο μετάλλου, σε κατάλληλους λιποσωμιακούς νανοφορείς, ώστε να ενισχύσουμε τη θεραπευτική του δράση σε *in vivo* καρκινοπαθή μοντέλα, με σκοπό την αύξηση του αντικαρκινικού θεραπευτικού αποτελέσματος. Πιο συγκεκριμένα η παρούσα διδακτορική διατριβή χωρίζεται σε πέντε (5) φάσεις:

### **Φάση I.**

Στην παρούσα φάση πραγματοποιήθηκε η μελέτη αξιολόγησης της κυτταροτοξικής δράσης που παρουσιάζουν τα σύμπλοκα του Ag(I) σε καρκινικές και φυσιολογικές κυτταρικές σειρές καθώς και η μελέτη ανίχνευσης του μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου (απόπτωση/νέκρωση) που προκαλείται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε μελέτη αξιολόγησης της φωτοενεργοποιούμενης κυτταροτοξικότητας τους σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, έπειτα από ενδοκυτταρική έκθεση τους σε UVC ακτινβολία.

### **Φάση II.**

Σε αυτή τη φάση πραγματοποιήθηκε η επιλογή του δραστικότερου κατά συνθήκη συμπλόκου το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο ώστε να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός δράσης του. Έλαβαν μέρος μελέτες α) κυτταροτοξικότητας σε περισσότερες καρκινικές κυτταρικές σειρές προκειμένου να ελέγξουμε εάν υπάρχει κυτταρική επιλεκτικότητα του συμπλόκου, β) απορρόφησης του συμπλόκου σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μέσω της ανίχνευσης του αργύρου ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά ώστε να ελεγχθεί κατά πρώτον εάν το σύμπλοκο εισέρχεται στα κύτταρα και κατά δεύτερον τον ρυθμό απορρόφησης του, γ) αξιολόγησης της δημιουργίας αποικιών των καρκινικών κυττάρων τα οποία επώαστηκαν με το σύμπλοκο και έπειτα αφέθηκαν να αναπτυχθούν, δ) ανίχνευσης των φάσεων του κυτταρικού κύκλου προς προσδιορισμό της φάσης κατά την οποία δρα το σύμπλοκο (cell cycle dependent/independent), ε) αξιολόγησης της προκαλούμενης βλάβης στο DNA σε δοσοεξαρτώμενα και χρονοεξαρτώμενα σχήματα χορήγησης του συμπλόκου

και σύγκρισης της με τη αντίστοιχη προκαλούμενη από τη cisplatin βλάβη προκειμένου να ανιχνευτεί εάν ο μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται πραγματοποιείται μέσω σύνδεσης του συμπλόκου με το DNA (comet assay).

### **Φάση III.**

Εδώ πραγματοποιήθηκαν οι μελέτες ενσωμάτωσης του επιλεχθέντος συμπλόκου (Φαση II) σε λιποσωμιακούς νανοφορείς. Πιο συγκεκριμένα οι μελέτες περιέλαβαν α) την ανίχνευση και την επιλογή κατάλληλων λιπιδίων προς σχηματισμό των λιποσωμάτων που θα ενσωματώσουν το σύμπλοκο, β) την ανάπτυξη αυτών των λιποσωμιακών συστημάτων και τη ρύθμιση του μεγέθους των λιποσωμάτων, γ) τον φυσικοχημικό τους προσδιορισμό που περιλαμβάνει τον προσδιορισμό του μέσου μεγέθους, τη διασπορά των τιμών των μεγέθων, το ζ-δυναμικό, τον προσδιορισμό της τελικής συγκέντρωσης και μοριακής αναλογίας των λιπιδίων στο τελικό λιποσωμιακό προϊόν καθώς και τη μοριακή αναλογία του συμπλόκου σε σχέση με τα λιπίδια αλλά και τη συγκέντρωση του συμπλόκου στο τελικό λιποσωμιακό παρασκεύασμα, δ) μελέτες σταθερότητας και ε) in vitro μελέτες κυτταροτοξικής αξιολόγησης των λιποσωμάτων σε καρκινικές και φυσιολογικές κυτταρικές σειρές.

### **Φάση IV.**

Πραγματοποιήθηκαν μελέτες τοξικότητας της ελεύθερης (όχι σε λιποσώματα) μορφής του συμπλόκου σε υγιής επίμυες Wistar. Οι μελέτες τοξικότητας περιελάμβαναν α) μελέτη οξείας τοξικότητας κατά την οποία ακολουθήθηκε λογαριθμικό σχήμα χορήγησης μίας εφάπαξ δόσης του συμπλόκου ενδοπεριτοναϊκά και β) μελέτη χρόνιας τοξικότητας κατά την οποία ακολουθήθηκαν 2 διαφορετικά σχήματα χορήγησης 6 δόσεων/ επίμυ Wistar για συνολική διάρκεια 30 ημερών. Επίσης πραγματοποιήθηκε ιστοπαθολογική εξέταση και παθολογοανατομική αξιολόγηση των οργάνων των πειραματοζώων που έλαβαν μέρος.

### **Φάση V.**

Πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση των αντικαρκινικών δράσεων και του θεραπευτικού αποτελέσματος της ελεύθερης μορφής του συμπλόκου και της ενσωματωμένης σε λιποσώματα, σε καρκινοπαθείς επίμυες Wistar. Επίσης πραγματοποιήθηκε ιστοπαθολογική εξέταση και παθολογοανατομική αξιολόγηση των οργάνων των πειραματοζώων που έλαβαν μέρος.

### ***3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ***



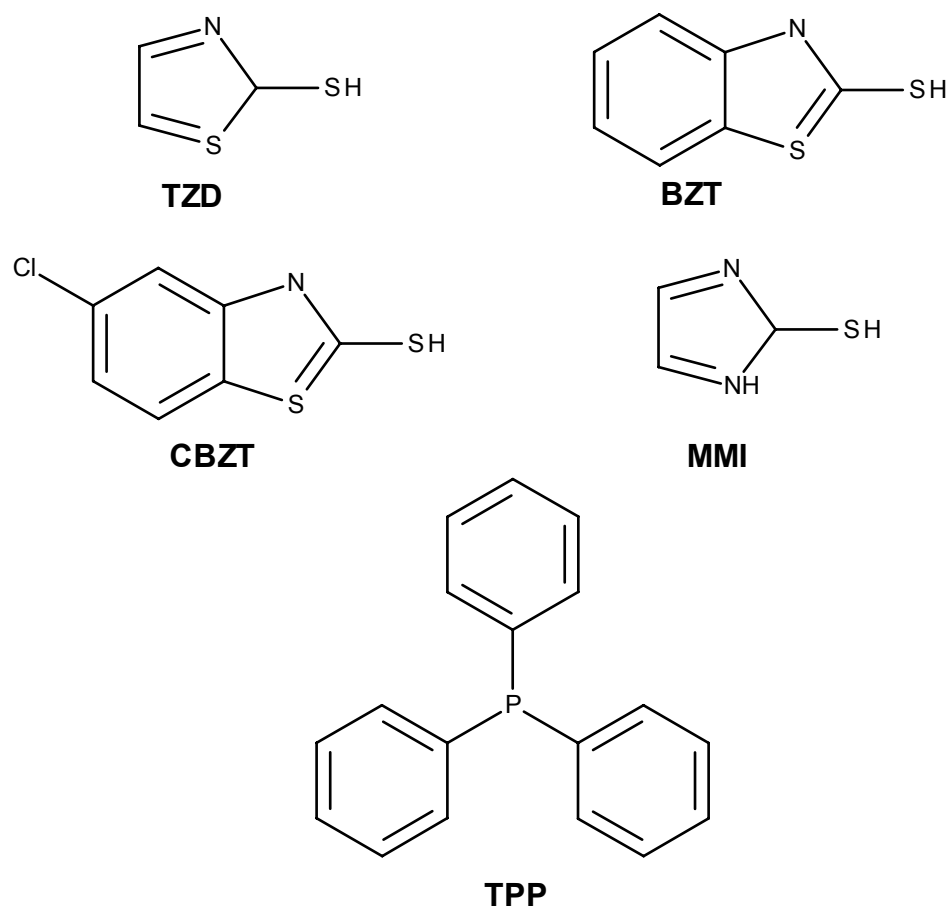
## 3.1 Μελέτες *In Vitro*

### 3.1.1 Σύμπλοκα Ag(I)

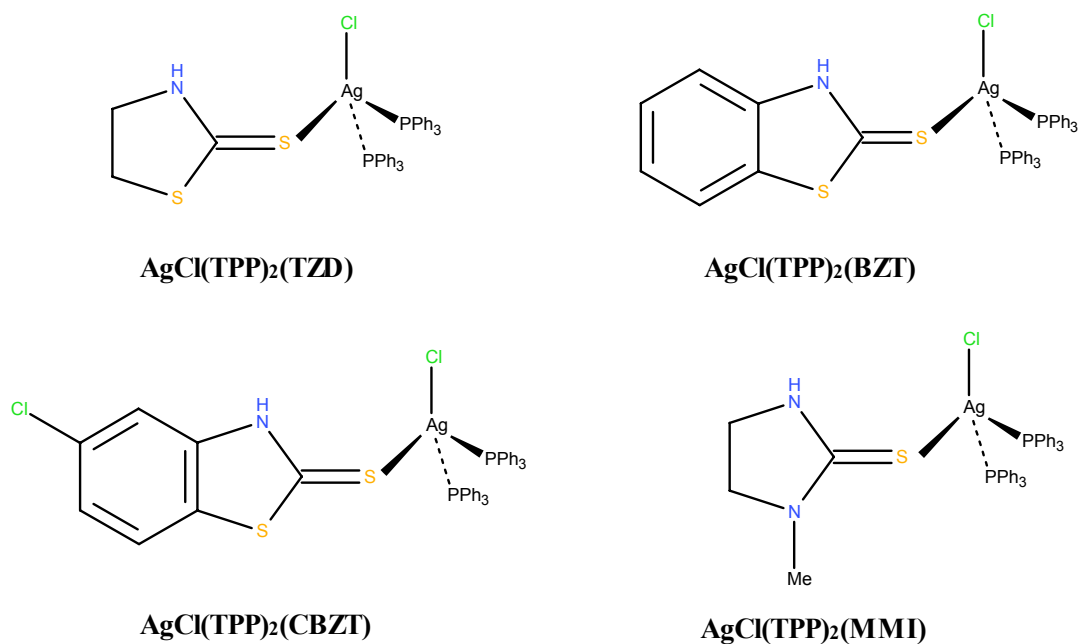
Η παρούσα διδακτορική διατριβή περιλαμβάνει τη μελέτη της βιοδραστικότητας 4 μεικτών συμπλόκων του αργύρου (I) με τα θειοαμίδια (Αναφορά: Λουκάς Κύρος, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας, Επίβλεψη ΣΚ Χατζηκακού)

- ❖ 2-μέρκαπτο-θειαζόλιο (TZD) [1]
- ❖ 2-μέρκαπτο-βενζοθειαζόλιο (BZT) [2]
- ❖ 5-χλώρο-2-μέρκαπτο-βενζοθειαζόλιο (CBZT) [3]
- ❖ 2-μέρκαπτο-ιμιδαζόλιο (MMI) [4]

με γενικό τύπο  $[AgCl(TPP)_2(L)]$  (TPP = τριφαινυλοφωσφίνη, L = θειοαμίδιο).



Εικόνα 3.1 Οι συντακτικοί τύποι των θειοαμιδίων και της τριφαινυλοφωσφίνης



**Εικόνα 3.2** Οι συντακτικοί τύποι των συμπλόκων του Ag(I) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Τα μοριακά βάρη των συμπλόκων είναι:

Σύμπλοκο	Μοριακό βάρος (g/mol)
Ag[1]	784,6
Ag[2]	1013,43
Ag[3]	869
Ag[4]	781,5

### 3.1.1.1 Απόθεμα Διαλύματος (stock solution) των συμπλόκων Ag(I)

Τα σύμπλοκα χορηγήθηκαν σε μορφή στερεών κρυστάλλων και διαλύθηκαν σε DMSO. Τα σύμπλοκα μετρήθηκαν σε ζυγό ακριβείας και κατάλληλη ποσότητα μετρήθηκε ώστε να δημιουργηθούν αποθέματα συγκέντρωσης  $10^{-2}$ M. Η σισπλατίνα, που χρησιμοποιήθηκε ως ουσία ελέγχου (control) σε κάποια πειράματα, αγοράστηκε από τη Sigma-Aldrich (P4394). Διαλύθηκε σε NaCl (0.9%) προς τελικό απόθεμα 3.3mM (1mg/ml).



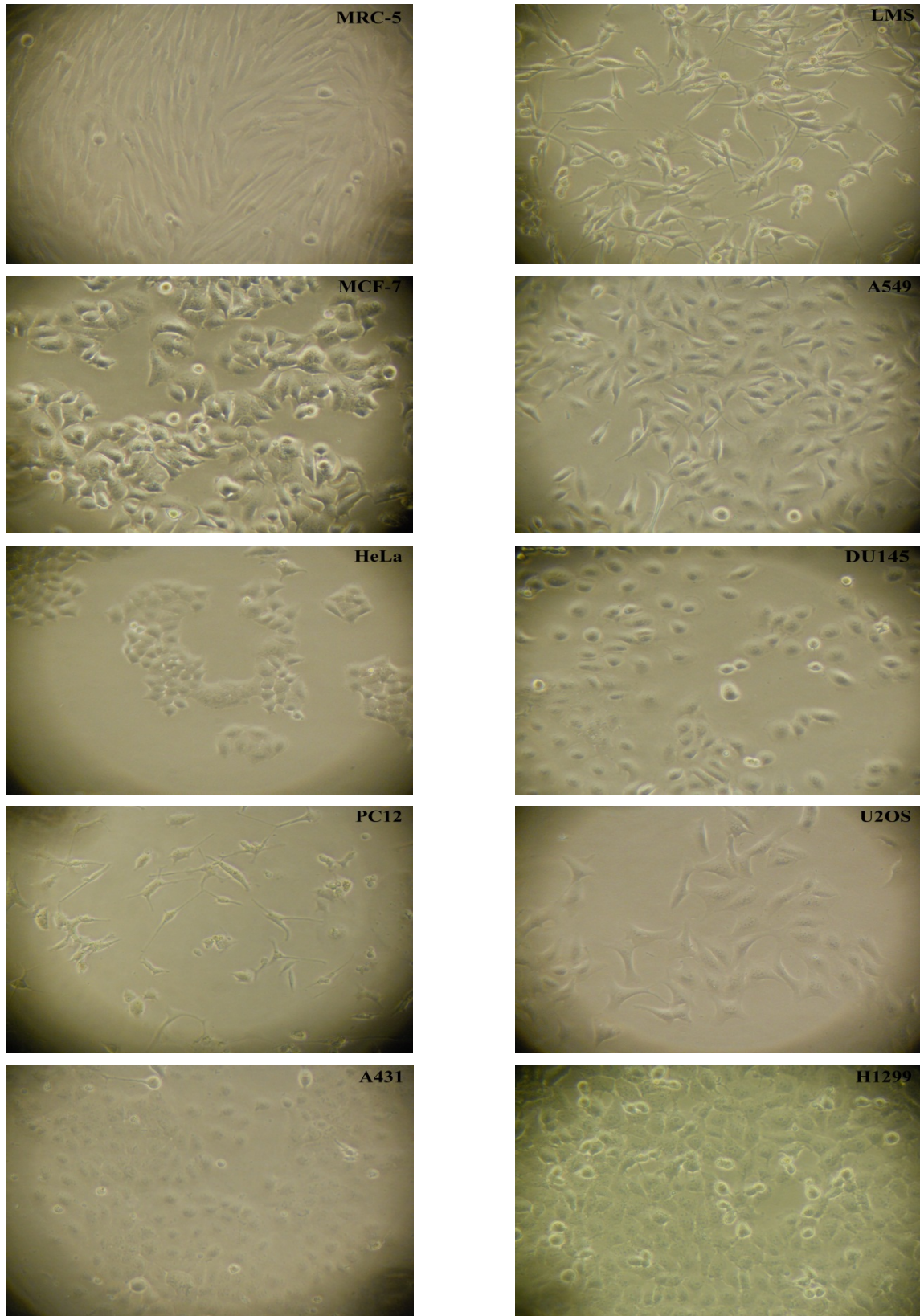
### 3.1.2 Κυτταρικές σειρές

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι *in vitro* μελέτες του ελέγχου της βιοδραστικότητας των παραπάνω συμπλόκων του Ag(I), χρησιμοποιήθηκαν καρκινικές αλλά και φυσιολογικές κυτταρικές σειρές.

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή αναφέρονται στον Πίνακα 3.1.

<b>Κυτταρική Σειρά</b>	<b>Περιγραφή</b>
<i>MRC-5</i>	Φυσιολογικές εμβρυικές ινοβλάστες πνεύμονα ανθρώπου
<i>LMS</i>	Νεοπλασματικά κύτταρα λειομυοσαρκώματος επίμυος Wistar
<i>MCF-7</i>	Αδενοκαρκίνωμα μαστού ανθρώπου επιθηλιακού τύπου
<i>A549</i>	Αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα ανθρώπου επιθηλιακού τύπου
<i>HeLa</i>	Αδενοκαρκίνωμα τραχήλου ανθρώπου επιθηλιακού τύπου
<i>U2OS</i>	Οστεοσάρκωμα ανθρώπου επιθηλιακού τύπου
<i>DUI45</i>	Καρκίνωμα προστάτη ανθρώπου επιθηλιακού τύπου
<i>PC12</i>	Φαιοχρωμοκύττωμα μυελού επινεφριδίων επίμυος
<i>A431</i>	Επιδερμοειδές καρκίνωμα ανθρώπου
<i>H1299</i>	Μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα ανθρώπου

**Πίνακας 3.1** Αναφέρονται οι κυτταρικές σειρές, η περιγραφή τους καθώς και το πείραμα στο οποίο έλαβα μέρος.



**Εικόνα 3.3** Φωτογραφίες των διαφορετικών κυτταρικών σειρών από οπτικό μικροσκόπιο.

### 3.1.3 Κυτταροκαλλιέργειες

#### 3.1.3.1 Υλικά-Οργανολογία

- ❖ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with low glucose (1g/L), sterile, Gibco® by Life technologies™, 31885-023
- ❖ Fetal Bovine Serum (FBS), sterile, Biochrom AG, S0115
- ❖ L-Glutamine 200mM (100X), Sterile, Gibco® by Life technologies™, 25030-024
- ❖ Penicillin-Streptomycin (10000Units/ml Penicilin, 10000μg/ml streptomycin), sterile, Gibco® by Life technologies™, 15140-122
- ❖ Trypsin/EDTA Solution (0.05%/0.02% w/v) in PBS w/o Ca<sup>2+</sup>, w/o Mg<sup>2+</sup>, sterile, Biochrom AG, L2143
- ❖ Phosphate Buffered Saline (PBS), Sigma-Aldrich®
- ❖ Ethanol absolute, Sigma-Aldrich®, 24194
- ❖ Τρυβλία καλλιέργειας κυττάρων και ιστών Petri (100x20mm και 60x15mm), Cellstar®, greiner bio-one, 664 160 και 628 160
- ❖ Σιφώνια Pasteur (Pasteur pipettes) γυάλινα-225mm, ISOLAB *Laborgeräte GmbH*, 084.01.002
- ❖ Σιφώνια (Pipettes) των 25, 10 και 5ml, Costar®, Corning Incorporated, 4250, 4101, 4051
- ❖ Πλαστικοί σωλήνες falcon (15 ή 50ml), Cellstar® Tubes, sterile, 118 271 και 227 261
- ❖ Σωλήνες Eppendorf
- ❖ Ρύγχι πιπετών διαφόρων μεγεθών
- ❖ Πιπέττες μηχανικές άντλησης και έγχυσης (0.5-2, 2-20, 20-200, 100-1000μl), Orange Scientific
- ❖ Ηλεκτρονική Αντλία για σιφώνια, pipetus®-akku, Hirschmann Laborgeräte
- ❖ Εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νηματικής ροής, (cell/tissue culture hood) Faster BHA 48, Italy
- ❖ Επωαστής (επωαστικός κλίβανος), Galaxy B, RS Biotech CO<sub>2</sub> Incubator, CMB Scientific, USA
- ❖ Οπτικό ανεστραμμένο μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσεως) Olympus CK2 με λάμπα αλογόνου (6V, 20W).
- ❖ Υδατόλουτρο, memmert GmbH + Co.KG, Schwabach FRG, Germany
- ❖ Αυτόκαυστο, Prestige Medical Autoclave 2100 Series, camlab.



**Εικόνα 3.4** Α) Εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νηματικής ροής, Β) Επωαστικός κλίβανος CO<sub>2</sub>, Γ) Οπτικό ανεστραμμένο μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσεως), Δ) Αυτόκαυστο

### 3.1.3.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο

Όλα τα παραπάνω κύτταρα καλλιεργήθηκαν στο ίδιο θρεπτικό μέσο. Η τελική σύσταση του κατάλληλου θρεπτικού μέσου, DMEM (low glucose), πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 10% v/v FBS, αντιβιοτικά (100IU πενικιλίνη και 100μg/ml στρεπτομυκίνη) και L-γλουταμίνης τελικής συγκέντρωσης 2mM. Οι κυτταρικές καλλιέργειες διατηρήθηκαν σε σταθερές συνθήκες υγραποιημένης ατμόσφαιρας στους 37°C, 5%CO<sub>2</sub> μέσα σε επωαστικό κλίβανο (επωαστής, incubator).

Οι ανακαλλιέργειες των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν στην εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νηματικής ροής (culture hood). Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας των κυττάρων λάμβανε χώρα όποτε τα κύτταρα ξεπερνούσαν το 70-80% της πληρότητας του τρυβλίου Petri έτσι ώστε τα κύτταρα να διατηρούνται πάντα στην log φάση της ανάπτυξης τους και να μην επιδρούν πάνω τους στρεσογόνες συνθήκες. Ο έλεγχος της καλής κατάστασης των κυττάρων αλλά και του ελέγχου πληρότητας των τρυβλίων πραγματοποιούνταν μετά από οπτική παρατήρηση σε οπτικό ανεστραμμένο μικροσκόπιο Olympus. Οι παράγοντες που καθόριζαν τους χρόνους της ανακαλλιέργειας ήταν ο χρόνος διπλασιασμού της κάθε κυτταρικής σειράς καθώς και ο αριθμός των κυττάρων που αφήνονταν για καλλιέργεια, ο οποίος καθοριζόταν από την απόδοση της σποράς (plating efficiency, PE) των εκάστοτε κυτταρικών σειρών. Η κυτταρική ανάπτυξη σε καλλιέργεια υφίσταται γενικά μία πτώση μετά την σπορά, και γραφικά, η PE είναι η παγκόσμια ελάχιστη (χαμηλότερο σημείο) της καμπύλης ανάπτυξης σε μία ημέρα, μετά την οποία ο ρυθμός ανάπτυξης αυξάνεται και πάλι. Η μείωση στα βιώσιμα κύτταρα μετά τη σπορά οφείλεται στην «εξάρτηση της προσκόλλησης» - τα κύτταρα πρέπει να προσκολληθούν στον πυθμένα του τρυβλίου καλλιέργειας. Μικρότερος αριθμός κυττάρων για καλλιέργεια από τον αριθμό της PE δεν εγγυάται την ομοιογένεια και τη διατήρηση της καλής φυσιολογίας των κυττάρων και είναι πιθανόν να οδηγήσει μέχρι και στην απώλεια της κυτταρικής σειράς. Η PE είναι μία από τις παραμέτρους που τυπικά χρησιμοποιούνται για να καθορίσουν τις ιδιότητες ανάπτυξης των κυττάρων σε καλλιέργεια. Έτσι η ανακαλλιέργεια λάμβανε χώρα για τη διατήρηση των κυτταρικών σειρών αλλά και για την απόκτηση επαρκών πληθυσμών σε καλή κατάσταση για όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα που ακολουθούν.

Για την ανακαλλιέργεια των κυτταρικών σειρών τα παρακάτω βήματα λάμβαναν χώρα κάθε φορά: Ζέσταμα του DMEM, της θρυψίνης και του PBS για περίπου 10min στους 37°C σε υδατόλουτρο πριν από την έναρξη της διαδικασίας της ανακαλλιέργειας. Επίσης σε όλα τα υλικά και τα όργανα τα οποία εισέρχονταν στην εστία κυτταροκαλλιέργειας πραγματοποιούταν ψεκασμός τους με 70% αιθανόλη (σε διατεταγμένο νερό) για αποστείρωση. Απομάκρυνση μέσω αναρρόφησης του ήδη υπάρχοντος DMEM από το τρυβλίο, πλύση των κυττάρων με 2x5ml\* PBS και προσθήκη 1ml\* θρυψίνης. Το τρυβλίο τοποθετούνταν στον επωαστή για 2-5min. Το τρυβλίο απομακρυνόταν από τον επωαστή και πραγματοποιούνταν οπτικός έλεγχος αλλά και μικροσκοπικός, της αποκόλλησης των κυττάρων από τον πυθμένα του τρυβλίου. Αν σε

περίπτωση δεν είχε επέλθει αποκόλληση τότε μέσω ήπιου μηχανικού τραντάγματος με την παλάμη του χεριού πραγματοποιούνταν η πλήρης αποκόλληση. Έπειτα γινόταν προσθήκη 9ml\* DMEM και λάμβανε χώρα ήπια και καλή ανάδευση έως ότου πραγματοποιηθεί όσο το δυνατόν καλύτερη εναιώρηση προς καλύτερη ομοιογένεια αλλά και προς αποφυγή συμπλεγμάτων κυττάρων (clusters). Αφού επιτεύχθηκε η ομοιογένεια, σ' αυτό το στάδιο μπορούσε να πραγματοποιηθεί είτε η μέτρηση των κυττάρων (βλέπε «Μέτρηση Κυττάρων») είτε αφηνόταν στο τρυβλίο ο επιθυμητός όγκος και κατ' επέκταση ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων και γινόταν προσθήκη DMEM μέχρι τελικού όγκου 10ml\*. Όλη η διαδικασία της καλλιέργειας/ανακαλλιέργειας κυττάρων λάμβανε χώρα κάτω από άσηπτες συνθήκες. Τα υλικά τα οποία δεν ήταν αποστειρωμένα από αγοράς τους (Διάλυμα PBS, ρύγχη, Eppendorf) αποστειρώνονταν σε Αυτόκαυστο (120°C, 1bar).

\* Οι όγκοι που αναφέρονται παραπάνω αφορούν ανακαλλιέργειες σε τρυβλία Petri των 10mm. Όταν χρειαζόταν να γίνουν σε μικρότερα τρυβλία τότε οι όγκοι προσαρμόζονταν στο μέγεθος των τρυβλίων προς χρήση ανάλογα.

### **3.1.4 Διατήρηση των Κυττάρων-Πάγωμα/Ξεπάγωμα**

Η διατήρηση των κυττάρων εκτός επωαστή/ανακαλλιέργεια για μεγάλο χρονικό διάστημα είναι εφικτή με την φύλαξή τους είτε σε ψυγείο βαθειάς κατάψυξης (-80°C για περίπου 6μήνες με 1 χρόνο) είτε σε υγρό άζωτο (-192°C για αρκετά χρόνια).

#### **3.1.4.1 Υλικά-Οργανολογία**

- ❖ Όλα τα υλικά που περιγράφονται στην υποενότητα 3.1.3.1
- ❖ DMSO, Fisher Chemical, Fisher Scientific, UK, D/4121/PB15
- ❖ Cryogenic vials, Cryo.S™, sterile, greiner bio-one
- ❖ Aluminium Cryocanes, Nalgene 5015-0001
- ❖ Liquid nitrogen dewar
- ❖ Ψυγείο βαθειάς κατάψυξης (-80°C)

#### **3.1.4.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο**

Η διαδικασία παγώματος των κυττάρων ακολούθησε τα παρακάτω βήματα: Σε ένα τρυβλίο Petri (10mm) 70-80% πληρότητας ταπητίου έγινε αναρρόφηση του DMEM,

πλύση με 2x5ml PBS και προσθήκη 1ml θρυψίνης. Πραγματοποιήθηκε η τοποθέτηση του τρυβλίου στον επωαστή για 2-5min. Τα αποκολλημένα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 9ml PBS και μεταφέρθηκαν σε πλαστικούς αποστειρωμένους σωλήνες falcon των 15 ml για φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3500rpm. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το κυτταρικό ίζημα (cell pellet) επαναιωρήθηκε σε 1 ή 2ml διαλύματος συντήρησης. Το διάλυμα συντήρησης αποτελείται από 90% FBS και 10% DMSO v/v. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε ειδικές αμπούλες (cryogenic vials) του 1 ml και αποθηκεύτηκε αμέσως είτε στους  $-86^{\circ}\text{C}$  είτε στο υγρό άζωτο.

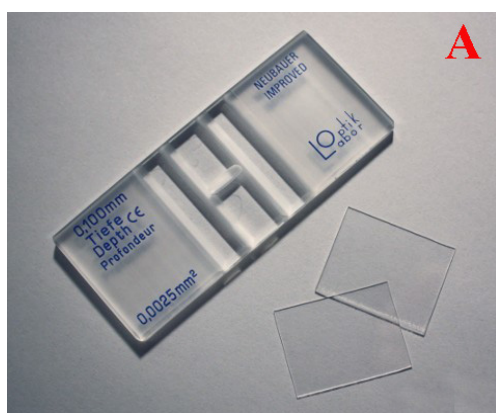
Οι παραπάνω συνθήκες περιγράφουν την διαδικασία παγώματος των κυττάρων για ένα τρυβλίο Petri. Για παραπάνω τρυβλία ακολουθείται η διαδικασία ανάλογα.

### 3.1.5 Μέτρηση του Αριθμού ή της Συγκέντρωσης των Κυττάρων

Για να πραγματοποιηθεί οποιαδήποτε *in vitro* μέθοδος θα πρέπει να γνωρίζουμε τον ακριβή αριθμό των κυττάρων που θα λάβουν μέρος στην πειραματική διαδικασία. Έτσι, ο προσδιορισμός του αριθμού ή της συγκέντρωσης των κυττάρων σε ένα κυτταρικό εναιώρημα πραγματοποιείται με το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.

#### 3.1.5.1 Υλικά-Οργανολογία

- ❖ Όλα τα υλικά που περιγράφονται στην υποενότητα 3.1.3.1
- ❖ Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (Neubauer haemocytometer)
- ❖ Καλυπτρίδα
- ❖ Οπτικό μικροσκόπιο (σκοτεινού πεδίου) Olympus CH20

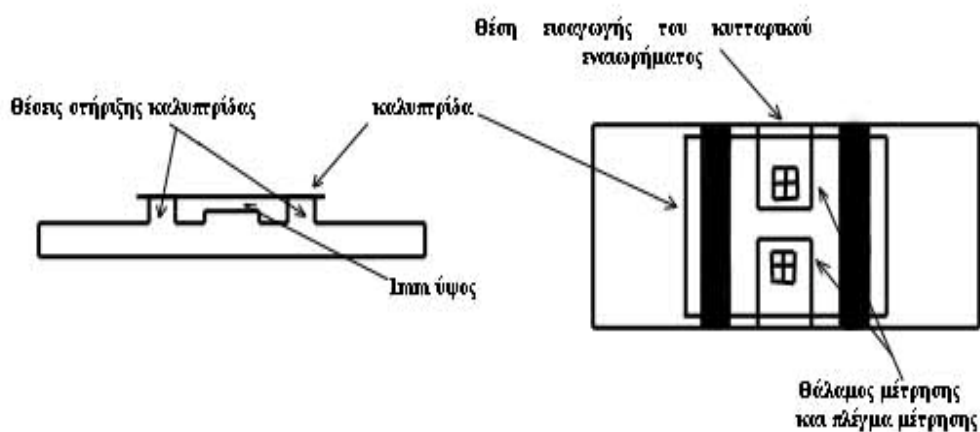


Εικόνα 3.5 A) Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, B) Οπτικό μικροσκόπιο (σκοτεινού πεδίου).

### 3.1.5.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο

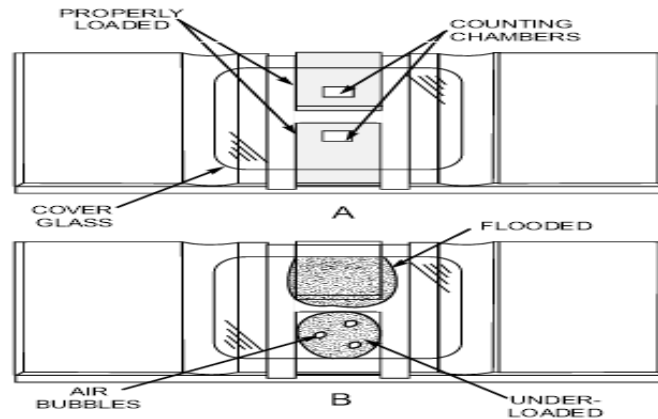
Προκειμένου να γίνει η μέτρηση του αριθμού ή/και της συγκέντρωσης των κυττάρων ακολουθούμε τη διαδικασία που περιγράφεται στην υποενότητα 3.1.3.2. μέχρι το σημείο όπου μετά την αποκόλληση των κυττάρων προσθέτουμε 9ml DMEM και αναδεύουμε για την επίτευξη ομοιογένειας του εναιωρήματος των κυττάρων. Τώρα στο τρυβλίο έχουμε συνολικά 10ml κυτταρικού εναιωρήματος (9ml DMEM + 1ml θρυψίνης). Έπειτα χρησιμοποιώντας μια ηλεκτρονική αντλία σιφωνίου αναρροφούμε το κυτταρικό εναιώρημα και το τοποθετούμε σε ένα σωλήνα falcon των 15ml. Σε αυτό το σημείο είναι πολύ σημαντικό το εναιώρημα των κυττάρων (στο DMEM) να είναι όσο το δυνατόν πιο ομοιογενές γίνεται και χωρίς συμπλέγματα κάτι που επιτυγχάνεται με την καλή αποκόλληση και ανάδευση των κυττάρων. Επακολουθεί άμεσα, η λήψη 10-11μl από το κυτταρικό εναιώρημα και τοποθετείται προσεκτικά στην πλάκα Neubauer στο μικρό κενό που δημιουργείται μεταξύ της Neubauer και της καλυπτρίδας όπως δείχνει η Εικόνα 3.6. Μεγάλη προσοχή χρειάζεται να μην γίνει υποφόρτιση και υπερφόρτωση του κυτταρικού εναιωρήματος ή η εισαγωγή φυσαλίδων αέρα (Εικόνα 3.7). Και οι τρεις αυτές συνθήκες αποτελούν παράγοντα λανθασμένης μέτρησης.

Έπειτα η πλάκα Neubauer τοποθετείται στο οπτικό μικροσκόπιο (σκοτεινού πεδίου) όπου με κατάλληλη μεγέθυνση μετρούνται τα κύτταρα όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.8.

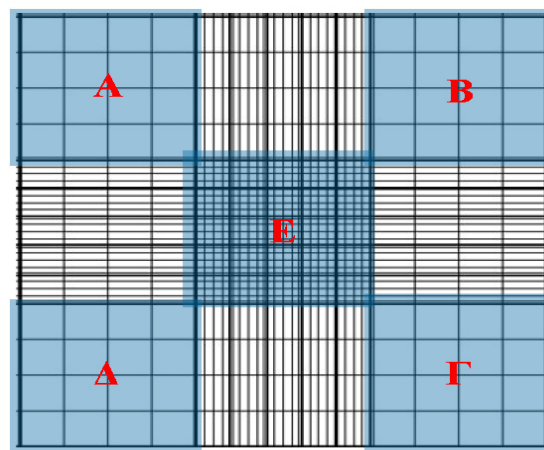


Εικόνα 3.6 Η πλάκα Neubauer και τα στοιχεία που την απαρτίζουν





**Εικόνα 3.7** Α) Παρουσιάζεται η σωστή φόρτωση του κυτταρικού εναιωρήματος στους θαλάμους μέτρησης, Β) Εξαιτίας του ότι η απορρόφηση του κυτταρικού εναιωρήματος από την πιπέττα στο θάλαμο μέτρησης οφείλεται στο τριχοειδικό φαινόμενο αρχικά, σημαίνει ότι η υπερφόρτωση του δείγματος (πάνω) δημιουργεί υπερχειλίση κάνοντας τα κύτταρα να φύγουν προς τα έξω, ενώ η υποφόρτωση του δείγματος και ιδίως η παρουσία φυσαλίδων δεν επιτρέπει στη σωστή κατανομή των κυττάρων με αποτέλεσμα τη λάθος μέτρηση.



**Εικόνα 3.8** Παρουσιάζεται η οριοθετημένη θέση του θαλάμου μέτρησης του αιμοκυτταρόμετρου Neubauer. Υπάρχουν 2 βασικοί τρόποι μέτρησης: Ο πρώτος περιλαμβάνει τα 4 μεγάλα γωνιακά τετράγωνα (Α, Β, Γ και Δ). Κάθε ένα από τα μεγάλα τετράγωνα Α, Β, Γ και Δ (μπλε φόντο) αποτελείται από επιμέρους 16 μικρότερα τετράγωνα. Η μέτρηση συμπεριλαμβάνει τα κύτταρα που βρίσκονται εντός των ορίων των τεσσάρων μεγάλων τετραγώνων Α, Β, Γ και Δ λαμβάνοντας υπόψιν τα κύτταρα που ακουμπούν στα πάνω και αριστερά όρια των τετραγώνων αλλά όχι αυτά που ακουμπούν στα κάτω και δεξιά όρια των τετραγώνων. Ο δεύτερος περιλαμβάνει το μεγάλο κεντρικό τετράγωνο Ε όπου αυτό αποτελείται από 25 επιμέρους τετράγωνα όπου το κάθε ένα από αυτά αποτελείται από 16 μικρότερα τετράγωνα. Σε αυτό το τετράγωνο (Ε) μπορούν να μετρηθούν τα κύτταρα που βρίσκονται στα 4 γωνιακά τετράγωνα και το κεντρικό (των επιμέρους 25) ή να μετρηθούν και τα 25.

Συνήθως για τη μέτρηση σωματικών κυττάρων χρησιμοποιείται ο πρώτος τρόπος ενώ για τη μέτρηση γαμετικών κυττάρων (σπερματοζωαρίων) ο δεύτερος (Εικόνα 3.8). Έτσι στον πρώτο μετράμε το σύνολο των κυττάρων και στα τέσσερα τετράγωνα Α, Β, Γ και Δ διαιρούμε με το 4 για να βρούμε το μέσο όρο. Ο όγκος ενός από τα 4 τετράγωνα είναι  $0,1\text{mm}^3 = 0.001\text{ml}$ . Οπότε πολλαπλασιάζουμε με το  $10^4$  και βρίσκουμε το αποτέλεσμα σε κύτταρα/ml. Επομένως από τη στιγμή που γνωρίζουμε τη συγκέντρωση των κυττάρων (κύτταρα/ml) μπορούμε να υπολογίσουμε τον συνολικό αριθμό κυττάρων σε ένα κυτταρικό εναιώρημα. Στην περίπτωση που έχουμε περιγράψει στην αρχή της υποενότητας 3.5.1.2 ο συνολικός όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος είναι 10ml οπότε αν έχουμε βρει  $X$  κύτταρα/ml τότε ο συνολικός αριθμός των κυττάρων στο εναιώρημα είναι  $X \times 10\text{ml}$ .

Με τον δεύτερο τρόπο, στο μεγάλο κεντρικό τετράγωνο Ε, μετράμε τα κύτταρα σε 5 συνολικά τετράγωνα από τα 25 (τα 4 γωνιακά και το κεντρικό) και βρίσκουμε το μέσο όρο (μπορούμε φυσικά να μετρήσουμε και τα 25 σε πιο αραιά κυτταρικά εναιωρήματα και να βγάλουμε το μέσο όρο). Κάθε ένα από τα 24 τετράγωνα δημιουργεί έναν όγκο της τάξης των 4nl. Οπότε ο Μ.Ο. των κυττάρων πολλαπλασιάζεται με  $25 \times 10^4$  μας βγάζει το αποτέλεσμα σε κύτταρα/ml.

Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε συγκεκριμένους αριθμούς κυττάρων για σπορά για τα *in vitro* πειράματα.

### 3.1.6 Σπορά Κυττάρων σε Πολυτρυβλία

Όταν τα τρυβλία Petri με την εκάστοτε κυτταρική σειρά βρίσκονταν σε πληρότητα ταπητίου 70-80% (confluent) τότε βρίσκονταν στην κατάλληλη φάση για την πραγματοποίηση σποράς. Στις πειραματικές μεθόδους που ακολουθούν η σπορά των κυττάρων, όλων των κυτταρικών σειρών, πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία 6x, 24x και 96x, όπου x είναι τα φρεάτια (wells) του κάθε πολυτρυβλίου.

#### 3.1.6.1 Υλικά-Οργανολογία

- ❖ Όλα τα υλικά των υποενότητων 3.1.3.1 και 3.1.5.1
- ❖ Πλαστικά σκαφάκια για χρήση πολυκάναλων πιπεττών
- ❖ Πολυτρυβλία 6 φρεατίων, Orange Scientific, sterile, 5330500
- ❖ Πολυτριβλία 24 φρεατίων, Cellstar<sup>®</sup>, sterile, greiner bio-one, 662 160

- ❖ Πολυτριβλία 96 φρεατίων, nunc, sterile, Thermo-scientific, 167008
- ❖ Ηλεκτρονική Οκτακάναλη πιπέττα (1-20μl και 20-300μl),

### 3.1.6.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ανακαλλιέργεια και την μέτρηση των κυττάρων των διαφορετικών κυτταρικών σειρών περιγράφηκε στις υποενότητες 3.1.3.2 και 3.1.5.2.

Ο τελικός αριθμός κυττάρων για σπορά υπολογίζεται ως κάτωθι. Εδώ θα δώσουμε ένα παράδειγμα για σπορά LMS κυττάρων σε 1 πολυτριβλίο 96 φρεατίων. Βασική προϋπόθεση είναι να γνωρίζουμε τον αριθμό των κυττάρων που θέλουμε να κάνουμε σπορά σε κάθε φρεάτιο, ο οποίος εξαρτάται από τον χρόνο διπλασιασμού της κάθε κυτταρικής σειράς, από τον χρόνο διεξαγωγής του πειράματος (π.χ. 24, 48 ή 72 ώρες) και κάποιες φορές από το μέγεθος των κυττάρων (πολύ σπανιότερα). Βασική προϋπόθεση είναι τα κύτταρα να μην έχουν 100% πληρότητα ταπητίου διότι στρασογόνοι παράγοντες θα αρχίσουν να επιδρούν στα κύτταρα. Έτσι για τα LMS χρειαζόμαστε (από εμπειρία και πειραματισμό) 3000 κύτταρα/φρεάτιο για διεξαγωγή πειράματος 72 ωρών. Επίσης σε κάθε φρεάτιο ενός πολυτριβλίου 96 θέσεων χρειάζεται να προστεθεί για σπορά ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων (3000 για τα LMS) σε 100μl DMEM.

Έτσι έχουμε: 96 x 100μl DMEM = 9600μl DMEM για να καλυφθούν και τα 96 φρεάτια. Όμως πάντα κάνουμε λίγη παραπάνω ποσότητα για να ισοσταθμίσουμε το σφάλμα της πιπέττας. Υπολογίζουμε λοιπόν για τελικό όγκο 12ml. Εάν έχουμε βρει X συγκέντρωση κυττάρων από την μέτρηση χρησιμοποιούμε την παρακάτω εξίσωση των αραιώσεων.

$$C_{αρχ} * V_{αρχ} = C_{τελ} * V_{τελ}$$

Όπου:  $C_{αρχ}$  = Η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων (κύτταρα/ml)

$V_{αρχ}$  = Ο όγκος που ψάχνουμε (ml)

$C_{τελ}$  = Η τελική συγκέντρωση των κυττάρων (είναι αυτή που επιθυμούμε)

$V_{τελ}$  = Ο τελικός όγκος που χρειαζόμαστε.

Επόμενος το  $C_{αρχ}$  = **έστω**  $50 \times 10^4$  κύτταρα/ml (γνωστό από την μέτρηση),  $V_{αρχ}$  = άγνωστο,  $C_{τελ}$  =  $3 \times 10^4$  κύτταρα/ml (ώστε αν πάρουμε 100μl να έχουμε 3000κύτταρα) και  $V_{τελ}$  = 12ml.

Λύνουμε ως προς  $V_{\text{αρχ}} = (3 \times 10^4 \times 12)/50 \times 10^4 = 0.72\text{ml}$ .

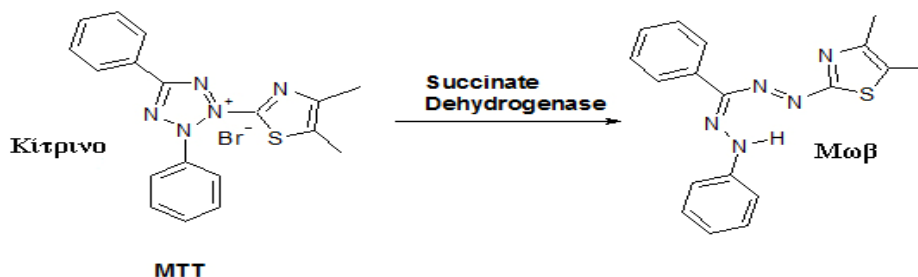
Προσθέτουμε λοιπόν σε ένα σωλήνα falcon των 15ml 0.72ml από το κυτταρικό μας εναιώρημα και 11.28ml DMEM ώστε ο τελικός όγκος να γίνει 12ml. Έπειτα αναδεύουμε αρκετες φορές ώστε το εναιώρημα να αποκτήσει μεγαλύτερη ομοιογένεια διασποράς. Τοποθετούμε το κυτταρικό εναιώρημα σε ένα πλαστικό σκαφάκι και με τη χρήση μιας οκτακάναλης πιπέττας πραγματοποιούμε τη σπορά 100μl κυτταρικού εναιωρήματος (συγκέντρωσης 3000κυττάρων/100μl) σε πολυτρυβλίο 96 φρεατίων.

Ακολουθως πραγματοποιούνται οι σπορές σε πουτρυβλία 6 και 24άρων φρεατίων μόνο που σαν τελικός όγκος φρεατίου θα πρέπει να ληφθεί τα 3ml και το 1ml αντίστοιχα.

Μέτα τη σπορά, το κάθε πολυτρυβλίο τοποθετούνταν στον επωαστή (37oC, 5% CO<sub>2</sub>) για 24 ώρες ώστε τα κύτταρα να κολλήσουν και να αναπτυχθούν. Μετά τις 24 ώρες επώασης προσθέταμε το σύμπλοκο ή πραγματοποιούσαμε το εκάστοτε πειραματικό πρωτόκολλο.

### 3.1.7 Μέθοδος MTT (MTT Assay)

Με τη μέθοδο του MTT πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος και η μέτρηση της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αυτή η μέθοδος ικανοποιεί τα κριτήρια του να είναι γρήγορη, απλή και εύκολη στην εφαρμογή πολλαπλών δειγμάτων. Η εφαρμογή αυτή εκμεταλεύεται την ιδιότητα του MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) να ανάγεται από τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα και συγκεκριμένα από το μιτοχονδριακό ένζυμο της σουκινικής αφυδρογονάσης (succinate dehydrogenase), προς δημιουργία αναγωγικών ισοδυνάμων όπως NAD και NADPH. Το προκύπτων ενδοκυτταρικό, αδιάλυτο στο νερό, μωβ ίζημα της φορμαζάνης (Εικόνα 3.9) μπορεί να διαλυθεί και να ποσοτικοποιηθεί με φασματοφωτομετρικά μέσα. Η μέθοδος αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Mosmann το 1983 (Mosmann 1983)



**Εικόνα 3.9** Το μιτοχονδριακό ένζυμο σουκινική αφυδρογονάση είναι ο ουσιώσης καταλύτης προκειμένου το άλας του βρομιούχου τετραζολίου (κίτρινο) να αναχθεί σε στο ίζημα της φορμαζάνης (μωβ).

### 3.1.7.1 Υλικά-Οργανολογία

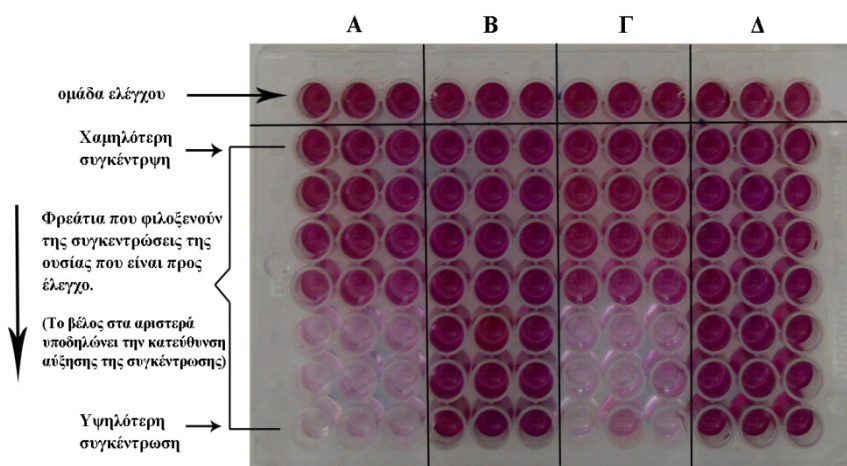
- ❖ Όλα τα υλικά των υποενοτήτων 3.1.3.1, 3.1.5.1 και 3.1.6.1 (εκτός των 6 και 24 φρεατίων πολυτρυβλία).
- ❖ Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, M5655
- ❖ DMSO Fisher Chemical, Fisher Scientific, UK, D/4121/PB15
- ❖ Φασματοφωτόμετρο, Multiscan<sup>®</sup> Spectrum και Skanlt<sup>®</sup> Software v.2.4.2, Thermo Scientific



Εικόνα 3.9 Το φασματοφωτόμετρο Multiscan<sup>®</sup> Spectrum

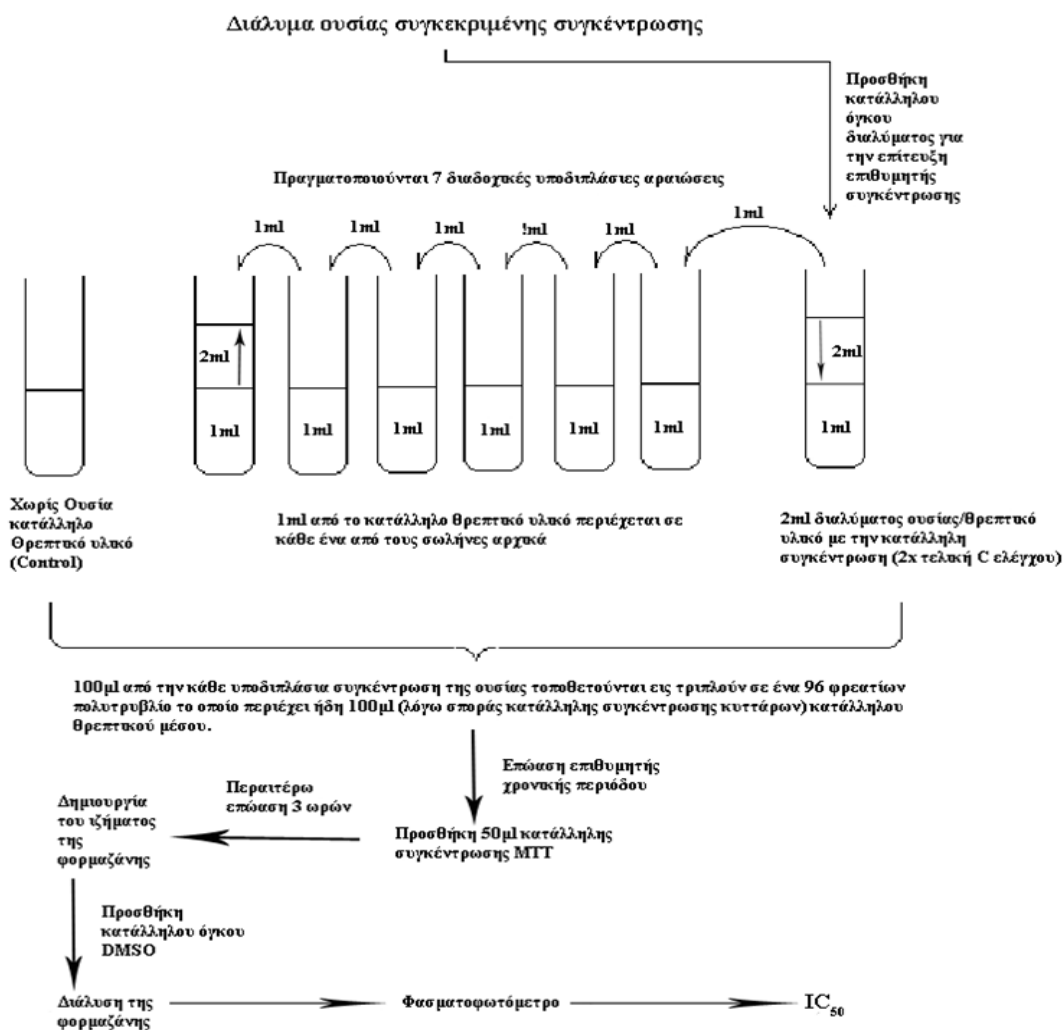
### 3.1.7.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο

Για την πραγματοποίηση της παρακάτω μεθόδου πραγματοποιήθηκε σπορά όλων των κυτταρικών σειρών (που αναφέρονται στην Ενότητα 3.1.2, στους αριθμούς που αναφέρονται στην υποενοότητα 3.1.6.2) σε 96 φρεατίων πολυτρυβλία. Σε κάθε φρεάτιο προστέθηκε ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων σε τελικό όγκο κυτταρικού εναιωρήματος 100μl σε DMEM. Τα πολυτρυβλία αφέθηκαν στον επωαστή (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) για 24 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκαν τα σύμπλοκα σε διάφορες συγκεντρώσεις ή τα λιποσώματα ή τα λιποσώματα με το εγκλωβισμένο σύμπλοκο του Ag(I) σε διάφορους όγκους και συγκεντρώσεις για διάφορους επιθυμητούς χρόνους επώασης (π.χ. 24 ή/και 48h). Από κάθε συκέντρωση ουσίας προστέθηκαν 100μl επιπλέον σε κάθε κατάλληλο φρεάτιο (Εικόνα 3.10). Στα φρεάτια ελέγχου προστέθηκαν 100μl DMEM. Ο τελικός όγκος κάθε φρεατίου ήταν τώρα στα 200μl.



**Εικόνα 3.10** Παράδειγμα ενός τρυβλίου 96 φρεατίων μετά από έλεγχο ουσιών και της διάλυσης του σχηματιζόμενου ιζήματος της φορμαζάνης με DMSO. Στις στήλες A, B, Γ, και Δ μπορούν να τοποθετηθούν είτε 4 διαφορετικές ουσίες στην ίδια κυτταρική σειρά, είτε η ίδια ουσία σε 4 διαφορετικές κυτταρικές σειρές, είτε διαφορετική ουσία σε διαφορετική κυτταρική σειρά. Η τοποθέτηση κάθε ουσίας πραγματοποιείται σε τριπλέτα φρεατίων. Στην ομάδα ελέγχου (control) δεν τοποθετούμε ουσία παρά μόνο κατάλληλο θεραπευτικό υλικό και αφήνουμε τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν υπό φυσιολογικές συνθήκες λαμβάνοντας υπόψη ότι οι τιμές του είναι το 100%. Το πολυτρυβλίο είναι έτοιμο προς μέτρηση.

Μετά το πέρας του κατάλληλου χρόνου επώασης σε κάθε φρεάτιο προστέθηκαν 50μl MTT (3 mg/ml σε PBS) και τα πολυτρυβλία επωάστηκαν για επιπλέον 3 ώρες. Μετά το πέρας των τριών ωρών αναρροφήθηκε το υπερκείμενο από το κάθε φρεάτιο, με μεγάλη προσοχή να μην πειραχτούν οι μωβ κρύσταλλοι φορμαζάνης. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl DMSO σε κάθε φρεάτιο και πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση με τη βοήθεια της οκτακάναλης ηλεκτρονικής πιπέττας, ώστε να διαλυθούν οι κρύσταλλοι και το διάλυμα να γίνει ομοιογενές. Τέλος, τα πολυτρυβλία μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο στα 540nm και 690nm (background) και πραγματοποιήθηκε αυτόματη αφαίρεση της τιμής της οπτικής πυκνότητας (Optical density (OD) σε αυθόρμητες μονάδες) στα 690nm από τα 540nm. Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων στα φρεάτια πειράματος εκφράστηκε σε ποσοστό επί τοις εκατό σε σχέση με τα φρεάτια ελέγχου (control). Με τα πειράματα αυτά προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της ουσίας στην οποία είχαμε το 50% του κυτταρικού θάνατο αλλά και άλλες παράμετροι. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.



**Εικόνα 3.11** Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου του MTT

Προσοχή λήφθηκε κατά την δημιουργία των κατάλληλων stock συγκεντρώσεων των συμπλόκων. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση ελέγχου των συμπλόκων ήταν στα 20μM μέσα στο φρεάτιο οπότε του stock ήταν 40μM (2πλάσια) μιας και επήλθε αραιώση 1:2 (100μl ήδη μέσα στο φρεάτιο από τη σπορά + 100μl διαλύματος του συμπλόκου). Από τα 40μM της συγκέντρωσης του stock επήλθαν οι 7 διαδοχικές υποδιπλάσιες συγκέντρωσης αραιώσεις (Εικόνα 3.11). που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο.

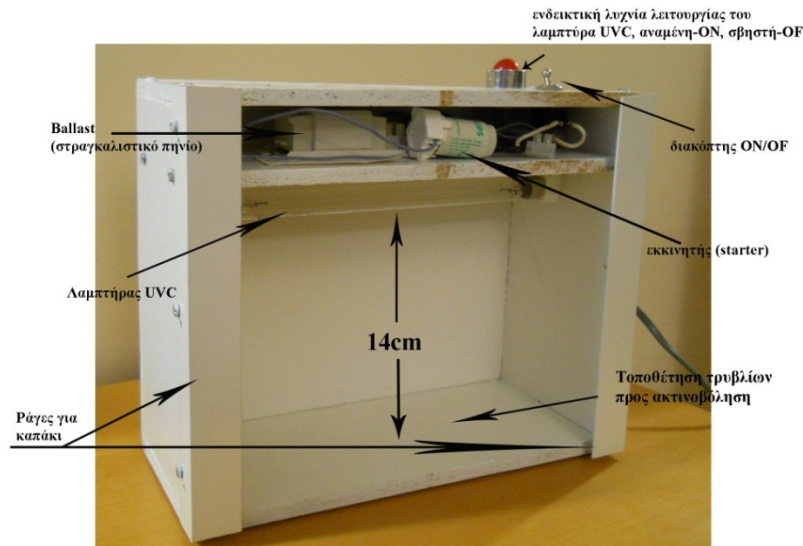
### 3.1.8 Μελέτη φωτοενεργοποίησης με UVC ακτινοβολία

Στην παρούσα προκαταρκτική μελέτη ελέγχθηκε η φωτοενεργοποίηση των συμπλόκων μέσα στα κύτταρα έπειτα από την επίδραση της UVC ακτινοβολίας όσο

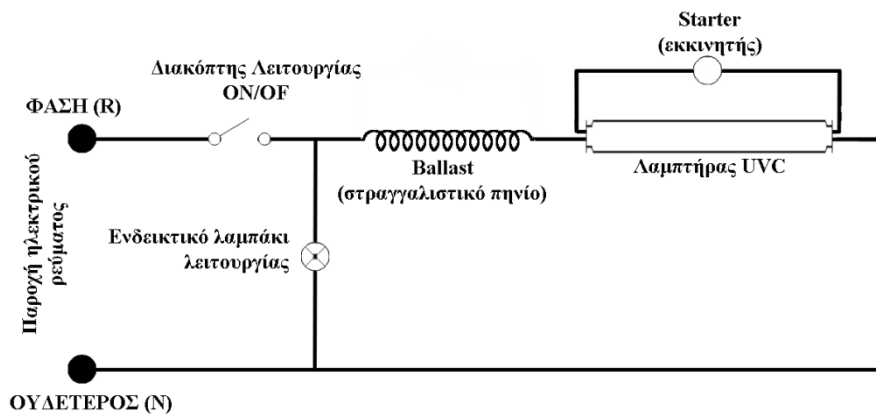
αφορά την επίδραση των φωτοενεργοποιούμενων κυτταροτοξικών τους δράσεων στις κυτταρικές σειρές LMS και MCF7. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο MTT.

### 3.1.8.1 Υλικά-Οργανολογία

- ❖ Όλα τα υλικά των υποενοτήτων 3.1.3.1, 3.1.5.1, 3.1.6.1 και 3.1.7.1
- ❖ Αυτοσχέδια διάταξη λαμπτήρα UVC για εκπομπή UVC ακτινοβολίας



**Εικόνα 3.12** Η αυτοσχέδια συσκευή τοποθέτησης τρυβλίων/πολυτρυβλίων για έκθεση σε UVC ακτινοβολία. Κατά τη διάρκεια της ακτινοβολίας στο μπροστά μέρος τοποθετούνταν καπάκι για να μην διαφεύγει η UVC ακτινοβολία (Κατασκευή συσκευής: Βασίλειος Η. Καραγκούνης, Ηλεκτρολόγος-Ηλεκτρονικός)



**Εικόνα 3.13** Διάγραμμα ηλεκτρολογικής συνδεσμολογίας της συσκευής εκπομπής ακτινοβολίας UVC (Οικονομόπουλος 1975, Δημόπουλος 1973)



### 3.1.8.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο

Πριν τη μελέτη της πιθανής φωτοενεργοποιούμενης δράσης των συμπλόκων στις κυτταρικές σειρές, ελέγχθηκε η επίδραση της UVC ακτινοβολίας στις κυτταρικές σειρές LMS και MCF7. Έτσι ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της σποράς κυττάρων σε πολυτριβλίο 96 φρεατίων (βλ. υποενότητα 3.6.1.2). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24h σε σταθερές συνθήκες (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Μέχρι το τέλος της περιόδου αυτής, το DMEM απομακρύνθηκε, τα κύτταρα πλύθηκαν με 50μl PBS και μετά το PBS απομακρύνθηκε. Η συσκευή της Εικόνας 3.12 τοποθετήθηκε μέσα στην εστία κυτταροκαλλιέργειας (hood). Τα τριβλία τοποθετήθηκαν μέσα στη UVC-συσκευή και τα κύτταρα εκτέθηκαν σε UVC ακτινοβολία για 5, 15, 30, 45, 60 και 75 δευτερόλεπτα, του προσαρτημένου Phillips-TUV (-6W) λαμπτήρα. Επείτα από την ακτινοβολία των κυττάρων προστέθηκαν ξανά 200μl DMEM/φρεάτιο. Μετά από 48 ώρες επώαση, 50μl MTT προστέθηκαν σε κάθε φρεάτιο και έλαβε χώρα το πρωτόκολλο της υποενότητας 3.1.7.2. Έτσι, καθορίστηκε η σχέση μεταξύ του χρόνου ακτινοβολίας των κυττάρων με UVC και της προκαλούμενης τοξικότητας. Ο χρόνος αυτός της ελάχιστης βλάβης από τη UVC ακτινοβολία καθορίστηκε στα 5sec.

Για το έλεγχο της φωτοενεργοποιούμενης δράσης των συμπλόκων από UVC ακτινοβολία πραγματοποιήθηκε σπορά 3000 κυττάρων/φρεάτιο LMS και MCF-7 και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24h. Εν συνεχεία προστέθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις των συμπλόκων και τα σύμπλοκα Ag[1] και Ag[3] ακτινοβολήθηκαν στις 32 ώρες για 5sec ενώ τα σύμπλοκα Ag[2] και Ag[4] στις 24h για 5sec. Με την πάροδο 24 ωρών από την ακτινοβολία, 50μl MTT προστέθηκαν σε κάθε φρεάτιο και έλαβε χώρα το πρωτόκολλο της υποενότητας 3.1.7.2 για τον καθορισμό των νέων IC<sub>50</sub> τιμών.

### 3.1.9 Κυτταρομετρία Ροής – Μελέτη Απόπτωσης/Νέκρωσης

#### 3.1.9.1 Υλικά-Οργανολογία

- ❖ Όλα τα υλικά των υποενότητων 3.1.3.1, 3.1.5.1 και 3.1.6.1
- ❖ Πολυτριβλία 6 φρεατίων
- ❖ Calcium Buffer 1x
- ❖ Annexin V-FITC, BD Pharmingen™, 556420
- ❖ Κυτταρόμετρο, CyFlow® ML, Partec και software FloMax v.3, Munster, Germany

### 3.9.1.2 Μεθοδολογία-Οργανολογία

Πραγματοποιήθηκε σπορά LMS σε 6 φρεατίων τρυβλία (60.000 κύτταρα/φρεάτιο σε τελικό όγκο 3ml DMEM) και επώαστηκαν για 24 ώρες. Με το πέρας αυτού του χρόνου προστέθηκαν τα σύμπλοκα στις επιθυμητές συγκεντρώσεις και αφέθηκαν στον επωαστή για άλλες 48 ώρες. Έπειτα, έγινε συλλογή του υπεκειμένου από κάθε φρεάτιο σε αντίστοιχους σωλήνες falcon, ξέπλυμα 1 φορά με 2ml PBS κάθε φρεάτιο το οποίο συλλέχθηκε επίσης και τοποθετήθηκε στο αντίστοιχο falcon. Έπειτα τοποθετήθηκαν 0.3ml θρυψίνης/φρεάτιο, τοποθετήθηκαν στον επωαστή για 2-5min μέχρι που αποκολλήθηκαν. Προστέθηκαν επιπλέον 2 ml PBS/φρεάτιο και πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση και συλλογή του κυτταρικού εναιωρήματος και τοποθέτηση του στα αντίστοιχα falcon. Η μέτρηση των κυτταρικών εναιωρημάτων που συλλέχθηκε έγινε με τη χρήση του αιμοκυτταρομέτρου neubauer (υποενοότητα 3.1.5.2). Τα κυτταρικά εναιωρήματα φυγοκεντρήθηκαν στις 3,000rpm για 5min. Στο ενδιάμεσο υπολογίσαμε τον όγκο του Calcium Buffer 1x, που έπρεπε να προσθέσουμε σε κάθε falcon ώστε να έχουμε 100,000 κύτταρα/100μl Calcium Buffer 1x. Με το τέλος της φυγοκέντρωσης αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε ο κατάλληλος όγκος του Calcium Buffer 1x στο κυτταρικό ίζημα και εφαρμόστηκε ήπια ανάδευση του. Έπειτα τα κυτταρικά εναιωρήματα μεταφέρθηκαν σε eppendorf (100μl/100,000 κύτταρα/eppendorf). Τα eppendorf μεταφέρθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο όπου σε κάθε ένα προστέθηκαν 5μl Annexin και 4μl PI, αναδέυτηκαν ήπια και αφέθηκαν 15min για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου. Με το τέλος των 15min έγινε επιπλέον προσθήκη 1ml Calcium Buffer 1x (τελικός όγκος σε κάθε eppendorf = 1.1ml). Τα δείγματα μετρήθηκαν στο κυτταρόμετρο ροής CyFlow® ML με argon laser ( $\lambda_{ex}$  488nm) όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση και προσδιορισμός % του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται σε αποπτωτική ή νεκρωτική φάση.

## 3.1.10 Κυτταρομετρία Ροής – Μελέτη του Κυτταρικού Κύκλου

### 3.1.10.1 Υλικά-Οργανολογία

- ❖ Όλα τα υλικά των υποενοτήτων 3.1.3.1, 3.1.5.1 και 3.1.6.1
- ❖ Διάλυμα αιθανόλης 70%
- ❖ RNase A, Sigma-Aldrich®,
- ❖ Proteinase K, Sigma-Aldrich®,
- ❖ Κυτταρόμετρο, CyFlow® ML, Partec και software FloMax v.3, Munster, Germany

### **3.1.10.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο**

Πραγματοποιήθηκε σπορά 250,000 κυττάρων/φρεάτιο σε πολυτριβλίο 6 φρεατίων και αφέθηκε στον επωαστή για τρεις ώρες προκειμένου να προσκολληθούν τα κύτταρα. Έπειτα από τρεις ώρες προστέθηκε το σύμπλοκο Ag[3] σε διάφορες συγκεντρώσεις και αφέθηκε πάλι στον επωαστή για 24 ή/και 48 ώρες. Μετά από το χρόνο επώασης αναρροφήθηκε το υπερκείμενο, έγινε πλύση με 3 ml PBS το οποίο και αυτό αναρροφήθηκε και προστέθηκαν 0.3ml θρυσίνης σε κάθε φρεάτιο και τα πολυτριβλία τοποθετήθηκαν στον επωαστή για περίπου 2-5min έως ότου αποκολληθούν τα κύτταρα. Με την αποκόλληση των κυττάρων προστέθηκαν επιπλέον 1.2ml DMEM και τα κύτταρα αναδεύτηκαν ήπια με τη χρήση πιπέτας και το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε errendorf. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 1,500 rpm για 5min και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρήθηκαν σε 0.5 ml κρύου διαλύματος αιθανόλης 70% (ice cold ethanol) και τοποθετήθηκαν στους 0°C για 10 λεπτά. Τα μονιμοποιημένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν (1,500rpm, 5min) και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0.5ml PBS, φυγοκεντρήθηκαν στις 1,500rpm για 5min και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Στην συνέχεια σε κάθε errendorf προστέθηκαν 50μl RNase (100μg/ml διαλύματος σε PBS) και αφέθηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Επιπλέον, προστέθηκαν 0.3ml PI (50μg/ml διαλύματος σε PBS), έγινε καλή ανάδευση και τα μονιμοποιημένα κύτταρα αφέθηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το κάθε δείγμα αραιώθηκε με 0.8ml PBS και μεταφέρθηκαν στο κυτταρόμετρο ροής CyFlow<sup>®</sup> ML, με argon laser (lex 488nm) όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου και προσδιορισμός % του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε φάση αυτού (G0/G1, S, G2/M).

### **3.1.11 Σχηματισμός Αποικιών-(Clonogenic/Colony Formation Assay)**

Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε για το σύμπλοκο Ag[3] στις κυτταρικές σειρές LMS και MCF-7 ώστε να ελέγξουμε την ικανότητα δημιουργίας αποικιών σε χαμηλή πυκνότητα σποράς αυτών των κυττάρων μετά από την επώαση τους με το σύμπλοκο.

### 3.1.11.1 Υλικά-Οργανολογία

- ❖ Όλα τα υλικά των υποενοτήτων 3.1.3.1, 3.1.5.1 και 3.1.6.1
- ❖ Μεθανόλη (Methanol), Fisher Scientific, 67-56-1
- ❖ Οξικό οξύ (glacial Acetic Acid), Pancreac, 64-19-7
- ❖ Giemsa, Merck, 1092040500

### 3.1.11.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο

Πραγματοποιήθηκε σπορά 20,000 κυττάρων/φρεάτιο (σε τελικό όγκο 1ml DMEM/φρεάτιο) σε ένα 24άρων φρεατίων πολυτριβλίο και τοποθετήθηκαν στον επωαστή για 24 ώρες. Έπειτα προστέθηκε το σύμπλοκο Ag[3] σε διάφορες συγκεντρώσεις και τα κύτταρα αφήθηκαν 24 ώρες προς επώαση με το σύμπλοκο. Με το πέρας των 24άρων ωρών το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 1ml/φρεάτιο PBS. Έπειτα προστέθηκαν 0.1ml θρυψίνης και τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στον επωαστή για 2-5min. Μετά την αποκόλληση των κυττάρων τοποθετήθηκαν σε κάθε φρεάτιο 0.9ml DMEM και έγινε ήπια ανάδευση για να επιτευχθεί ομοιογένεια του κυτταρικού εναιωρήματος και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε μέτρηση των κυττάρων του κάθε δείγματος. Από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν 2,500 κύτταρα σε τρυβλία Petri (60mm x 15mm) και προστέθηκαν 5ml DMEM σε κάθε τρυβλίο και αφήθηκαν για ανάπτυξη μιας εβδομάδας στον επωαστή. Καθ' όλη τη διάρκεια επώασης πραγματοποιούνταν καθημερινός οπτικός έλεγχος μέσω του οπτικού ανεστραμμένου μικροσκοπίου για τον έλεγχο της εξέλιξης των αποικιών. Στις 3 ½ ημέρες πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού υλικού. Με το πέρας της μιας εβδομάδας το υπερκείμενο απορρίφθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 2 x 3ml PBS και το PBS απορρίφθηκε. Έπειτα προστέθηκε σε κάθε τρυβλίο 5ml μίγματος μεθανόλης-οξικού οξέος 3:1 v/v και τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στους -20°C για 10min για να μονιμοποιηθούν τα κύτταρα. Ακολούθησε η απόρριψη του μίγματος μεθανόλης-οξικού οξέος και τα τρυβλία αφήθηκαν σε απαγωγό για να στεγνώσουν. Μόλις στέγνωναν (περίπου 30min) προστέθηκε σε κάθε τρυβλίο 5ml διαλύματος χρωστικής Giemsa-δισαπεσταγμένο νερό 1:10 v/v και τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30min, μέχρι να βαφτούν οι αποικίες. Τέλος, η χρωστική απορρίφθηκε και τα τρυβλία ξεπλύθηκαν πολύ καλά με νερό βρύσης και τοποθετήθηκαν σε απαγωγό για να στεγνώσουν. Όταν στέγνωναν πραγματοποιήθηκε η μέτρηση των αποικιών και η ανάπτυξη των αριθμού αποικιών των κυττάρων που έλαβαν το σύμπλοκο Ag[3] λήφθηκε ως ποσοστό % σε σύγκριση με τις αποικίες που αναπτύχθηκαν από κύτταρα που αφήθηκαν να έχουν φυσιολογική ανάπτυξη.

### 3.1.12 Μελέτη Ενδοκυτταρικής Απορρόφησης του Συμπλόκου

Η μελέτη αυτή περιλαμβάνει την επώαση των LMS κυττάρων με διάφορες συγκεντρώσεις του συμπλόκου Ag[3] και τη μελέτη απορρόφησης του συμπλόκου από τα κύτταρα μέσω της ποσοτικής ανίχνευσης του Ag με τη μέθοδο της ατομικής απορρόφησης.

#### 3.1.12.1 Υλικά-Οργανολογία

- ❖ Όλα τα υλικά των υποενοτήτων 3.1.3.1, 3.1.5.1 και 3.1.6.1
- ❖ Ατομική απορρόφηση, Perkin Elmer 3300, φούρνος γραφίτη GFAAS στα 328,1 nm

#### 3.1.12.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο

Πραγματοποιήθηκε σπορά 40,000 κυττάρων/φρεάτιο (σε τελικό ανά φρεάτιο όγκο 3ml) σε 6 φρεατίων πολυτυβλίο και τα πολυτυβλία τοποθετήθηκαν στον επωαστή για 24 ώρες. Με το πέρας των 24ώρων ωρών προστέθηκε το σύμπλοκο Ag[3] σε διάφορες συγκεντρώσεις και αφέθηκε να επωαστεί για 8 ώρες στον επωαστή. Με το πέρας αυτού του χρόνου συλλέχθηκε το υπερκείμενο κάθε δόσης σε σωλήνες falcon. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 x 5ml PBS και το PBS κάθε δείγματος συλλέχθηκε στο ίδιο falcon με το αντίστοιχο υπερκείμενο. Έπειτα προστέθηκε 0,5ml θρυψίνη στα κύτταρα και αφέθηκαν στον επωαστή για 2-5min. Εν συνεχεία, όταν τα κύτταρα αποκολλήθηκαν προστέθηκε 1ml PBS/φρεάτιο, πραγματοποιήθηκε ανάδευση του κυτταρικού εναιωρήματος και η συλλογή του σε eppendorf.

Στη συνέχεια τα δείγματα δόθηκαν για ανίχνευση Ag εξωκυτταρικά (υπερκείμενο) και ενδοκυτταρικά (κύτταρα) μέσω της μεθόδου της φασματοσκοπίας της ατομικής απορρόφησης. Το δείγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε δοχείο πέψης από teflon και σε αυτό προστίθενται 2 ml υπερκάθαρου (suprapure) HNO<sub>3</sub> και 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p.a.). Στη συνέχεια υφίσταται πέψη και το προϊόν αραιώνεται στα 10 ml εντός ογκομετρικής φιάλης με υπερκάθαρο νερό. Η μέτρηση του Ag γίνεται σε ατομική απορρόφηση Perkin Elmer 3300 με την τεχνική του φούρνου γραφίτη GFAAS στα 328,1 nm.

### 3.1.13 Μέθοδος Comet (Comet Assay)

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε για την εύρεση του μηχανισμού δράσης του συμπλόκου Ag[3] στα LMS κύτταρα μέσω της ποιοτική και ποσοτικής ανίχνευσης της βλάβης του DNA κάτω από αλκαλικές συνθήκες.

#### 3.1.13.1 Υλικά-Οργανολογία

- ❖ Όλα τα υλικά των υποενοτήτων 3.1.3.1, 3.1.5.1 και 3.1.6.1
- ❖ Αντικειμενοφόρες πλάκες, Microscope slides (26 x 76mm), EUROTUBO® DELTALAB, LOT 2007-01 with frosted ends
- ❖ Poly-L-Lysine, 0.01% Solution, Sigma-Aldrich Company, P4707
- ❖ Αγαρόζη, Agarose, Sigma-Aldrich Company, A5093
- ❖ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hydrogen Peroxide) 35% (10,3M), Sigma-Aldrich Company, 95299
- ❖ 24-well Tissue Culture testplates, Orange Scientific, Cat#: 5530300
- ❖ PBS (Phosphate Buffered Saline), Sigma-Aldrich Company, P4417
- ❖ Trypsin-EDTA (1x), 0.05%/0.02% in PBS, PAA The Cell Culture Company, Cat.No: L11-004
- ❖ Eppendorf Tubes, REF 1003/G, LOT 091060801, CE
- ❖ DMSO (Dimethyl sulfoxide), Fisher Scientific, Code: D/4121/PB15, CAS No:67-68-5
- ❖ UltraPure™ LMP Agarose (low melting point), Invitrogen, Cat.No 16520-050
- ❖ Καλυπτρίδες, Coverslips (24 x 50mm), Knittel Gläser (100 Deckgläser)
- ❖ Tris-HCl (Trizma® hydrochloride), Sigma-Aldrich Company, T5941
- ❖ SYBR® Gold nucleic acid gel stain (10000X concentration in DMSO), Invitrogen, S11494
- ❖ Συσκευή ηλεκτροφόρησης με κατάλληλο τροφοδοτικό (Εικόνα 3.15)
- ❖ Φθορίζον μικροσκόπιο Zeiss Germany, Axioskop 20, με μεγεθυντικό φακό Zeiss Achromplan 20x/0.45. HBO 100W/2. Κάμερα PCO CCD Imaging, D93309 Kelheim Germany, Typ VC44, S/N 344 Cl 0205
- ❖ Software: MetaSystems, Comet Imager 1.2

#### 3.1.13.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο

##### 3.1.13.2.α Στάδιο 1 (Ημέρα 1)

Προετοιμασία των αντικειμενοφόρων πλακών και σπορά κυττάρων:

- Οι αντικειμενοφόρες πλάκες καθαρίστηκαν προσεκτικά με το διάλυμα της poly-L-Lysine (προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν ακαθαρσίες, σκόνες και υπολείματα πρωτεϊνών προκειμένου να διευκοληθεί η προσκόλληση της αγαρόζης) και αφήθηκαν να στεγνώσουν για 30min.
- Έπειτα η κάθε αντικειμενοφόρος επικαλύφθηκε με 0.9ml τηγμένης 1% w/v (1g in 100ml) αγαρόζης σε δισαπεσταγμένο νερό.
- Οι αντικειμενοφόρες πλάκες καλύφθηκαν για προστασία από σκόνες και αφήθηκαν να στεγνώνουν κατά τη διάρκεια της νύχτας (overnight).

Επίσης πραγματοποιήθηκε σπορά 10,000 κυττάρων/φρεάτιο σε 24άρων φρεατίων πολυτρυβλίο (0.5ml DMEM/φρεάτιο) και τοποθετήθηκε στον επωαστή (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) για 24 ώρες.

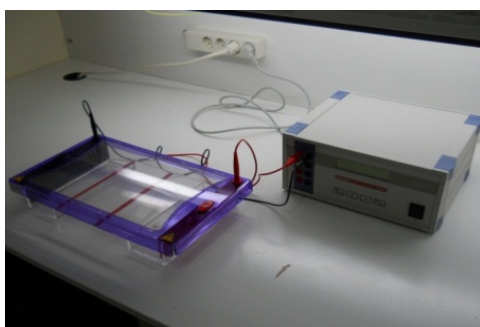
### 3.1.13.2.β Στάδιο 2 (Ημέρα 2)

Κατ' αρχήν πριν να εφαρμόσουμε τη μέθοδο Comet για το σύμπλοκο του Ag(I) και για τη cisplatin (ως control), έπρεπε να ανιχνεύσουμε την κατάλληλη συγκέντρωση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στην οποία προκαλείται περίπου 80-85% βλάβη στο DNA. Έτσι διαφορετικές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1ml/φρεάτιο) προστέθηκαν σε κάθε φρεάτιο του 24άρων φρεατίων πολυτρυβλίο που κάναμε σπορά με LMS κύτταρα την προηγούμενη ημέρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις διάφορες συγκεντρώσεις του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 15min. Με το πέρας του χρόνου των 15min τα κύτταρα βγήκαν από τον επωαστή, το υπερκείμενο απορρίφθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS (1ml/φρεάτιο), το PBS αφαιρέθηκε, προστέθηκε θρυψίνη (100μl/φρεάτιο) και τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στον επωαστή για 2-5min ώστε να βοηθήσουμε την θρυψίνη να τα αποκολλήσει. Όταν τα κύτταρα αποκολλήθηκαν, προστέθηκαν 0.4ml/φρεάτιο από το κατάλληλο θρεπτικό υλικό (DMEM στην περίπτωση μας), τα κύτταρα αναδεύτηκαν και οι όγκοι των κυτταρικών εναιωρημάτων ανά φρεάτιο μεταφέρθηκαν στα αντίστοιχα erpendorf. Σε αυτό το στάδιο τα κύτταρα μπορούσαν είτε να αποθηκευτούν, προσθέτωντας σε κάθε erpendorf 10% v/v DMSO (50μl) και αποθηκεύοντας τα στους -80°C, είτε να συνεχιστεί η διαδικασία του comet assay.

Συνεχίζοντας τη διαδικασία, οι αντικειμενοφόρες πλάκες σημαδεύτηκαν με μολύβι στο frost end (για να γνωρίζουμε ποιο δείγμα είναι ποιο), και μεταφέρθηκαν στην καλυμμένη με αλουμινόχαρτο επιφάνεια του θρυμματισμένου πάγου που έχουμε τοποθετήσει μέσα σε ένα δοχείο.

Παράλληλα είχαμε προετοιμάσει κατάλληλη ποσότητα τηγμένης 1% w/v (π.χ. 1g/100ml) LMP αγαρόζη σε δισαπεσταγμένο νερό.

Σε κάθε eppendorf (που είχαμε το κυτταρικό μας εναιώρημα), προστέθηκε 1ml από την τηγμένη LMP αγαρόζη και έγινε καλή ανάδευση. Το κυτταρικό εναιώρημα πλέον στην LMP αγαρόζη μεταφέρθηκε προσεκτικά στην αντίστοιχη αντικειμενοφόρο πλάκα (που εντωμεταξύ είχε κρυώσει από την επαφή του με τον πάγο ώστε να διευκολυνθεί η πήξη της LMP αγαρόζης) και αμέσως τοποθετήθηκε μία καλυπτρίδα από πάνω ώστε να διασφαλιστεί ότι η επιφάνεια της αγαρόζης θα είναι επίπεδη. Μόλις έπηξε η LMP αγαρόζη, οι καλυπτρίδες αφαιρέθηκαν και οι αντικειμενοφόρες πλάκες μεταφέρθηκαν σε δοχείο που περιείχε το cold lysis buffer και αφέθηκαν για 1h. Με το πέρας της μίας ώρας τα slides τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο δισαπεσταγμένου νερού (θερμοκρασίας δωματίου) για 15min. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 3 φορές, κάθε φορά με καινούριο νερό. Έπειτα τα slides τοποθετήθηκαν στην δεξαμενή της ηλεκτροφορητικής συσκευής, στην οποία προστέθηκε το unwinding buffer έως ότου να καλυφθούν εξ' ολοκλήρου τα slides.



**Εικόνα 3.15** Η διάταξη ηλεκτροφόρησης

Η παραμονή διήρκησε 35min ώστε η αποελίκωση του DNA να λάβει χώρα. Μετά από αυτή την περίοδο, τοποθετήθηκε το καπάκι της ηλεκτροφορητικής συσκευής και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 25V, 300mA για 20min.

Μετά την ηλεκτροφόρηση τα slides μεταφέρθηκαν προσεκτικά σε χαρτί ώστε να αποστραγγιστεί το unwinding buffer. Έπειτα τα slides ουδετεροποιήθηκαν ρίχνοντας σε όλη την επιφάνεια της αγαρόζης 2x1ml (2M) Tris-HCl και αφέθηκαν για 5min. Ακολούθως, ξεπλύθηκαν τα slides με 2x1ml PBS και αμέσως αποστραγγίστηκαν. Τέλος τα slides εμβυθίστηκαν σε αραιωμένη Syber gold stain (1:10,000 v/v) (5μl σε 50ml ddH<sub>2</sub>O), τοποθετήθηκε μια μεγάλη καλυπτρίδα στην επιφάνεια της αγαρόζης και προστατεύτηκαν

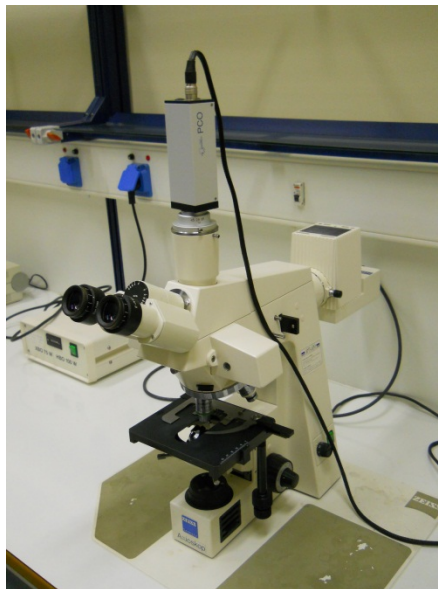


από το φως. Σε αυτό το σημείο, τα slides μπορούν να μετρηθούν αμέσως ή να αφεθούν να στεγνώσουν και να μετρηθούν αργότερα προσθέτοντας μερικές σταγόνες ddH<sub>2</sub>O.

### 3.1.13.2.γ Στάδιο 3

Η ηλεκτροφόρηση σε υψηλό pH έχει ως αποτέλεσμα δομές που μοιάζουν με κομήτες (εξού και το “comet”), οι οποίες μετρήθηκαν με τη χρήση φθορίζοντος μικροσκοπίου σε μεγένθυση 20x χρησιμοποιώντας την πράσινη ακτινοβολία.

Εικόνες λήφθηκαν (περίπου 50/slide) χρησιμοποιώντας μια συνδεδεμένη στο μικροσκόπιο φωτογραφική μηχανή και αναλύθηκαν με το κατάλληλο πρόγραμμα (comet imager 1.2).



**Εικόνα 3.16** Το φθορίζον μικροσκόπιο για την ανάλυση των comet

Η περιγραφή της παραπάνω διαδικασίας αφορά την εύρεση της κατάλληλης συγκέντρωσης H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> πρόκλησης βλάβης της τάξης του 80-85% στο DNA. Με τον όρο «80-85% βλάβη στο DNA» εννοούμε το ποσοστό του DNA που βρίσκεται στην «ουρά» του comet σε σχέση με το «κεφάλι» του comet.

Γνωρίζουμε ότι η cisplatin (που χρησιμοποιήσαμε ως control) δημιουργεί διασταυρούμενες συνδέσεις (X-links) με το DNA. Οπότε μπορούμε να υπολογίσουμε το ποσοστό % των X-links που η cisplatin δημιουργεί σε χρονοεξαρτώμενο και

δοσοεξαρτώμενο σχήμα. Έτσι η διαφορά που υπάρχει σε σχέση με το παραπάνω πρωτόκολλο διαφοροποιείται ως κάτωθι:

Αφού πραγματοποιήθηκε η σπορά των κυττάρων στα 24 φρεατίων τρυβλία και η επώαση των 24 ωρών, χορηγήθηκαν οι συγκεντρώσεις προς έλεγχο (0.1ml/φρεάτιο) της cisplatin. Μετά το τέλος του επιθυμητού χρόνου επώασης, το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 1ml/φρεάτιο PBS. Έπειτα προστέθηκε 0.5ml/φρεάτιο φρέσκο θρεπτικό υλικό και αμέσως μετά η κατάλληλη συγκέντρωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1ml/φρεάτιο) που έχει βρεθεί ότι κάνει περίπου 80-85% βλάβη στο DNA, και μια περαιτέρω επώαση 15 λεπτών πραγματοποιήθηκε. Ακολούθησε η αφαίρεση του θρεπτικού υλικού, η πλύση των κυττάρων με PBS, η αποκόλληση των κυττάρων με θρυψίνη και η συλλογή του κυτταρικού εναιωρήματος σε erpendorf. Όλη η υπόλοιπη διαδικασία μέχρι και την μέτρηση των comet είναι η ίδια, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Ένας προκαταρκτικός έλεγχος του συμπλόκου Ag[3] με την διαδικασία που ακολουθήθηκε για την cisplatin, πραγματοποιήθηκε και ο οποίος έδειξε πως τα comet αντί να «μικραίνουν» μεγάλωναν, κάτι που σημαίνει πως το σύμπλοκο Ag[3] δεν λειτουργεί με τον ίδιο μηχανισμό με την cisplatin. Έτσι τροποποιήθηκε το πρωτόκολλο και στον έλεγχο του συμπλόκου Ag[3] δεν χρησιμοποιήσαμε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> όπως στην cisplatin. Αντ' αυτού αντιμετωπίσαμε διαδικαστικά το σύμπλοκο όπως το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> από μόνο του. Η διαδικασία είναι ίδια μ' αυτή που περιγράφηκε στο Στάδιο 1, στο Στάδιο 2 και στο Στάδιο 3 μέχρι και την ανάλυση των comet.

## **3.2 Λιποσώματα**

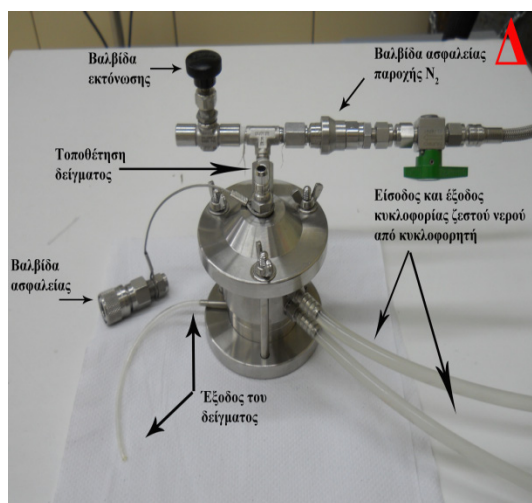
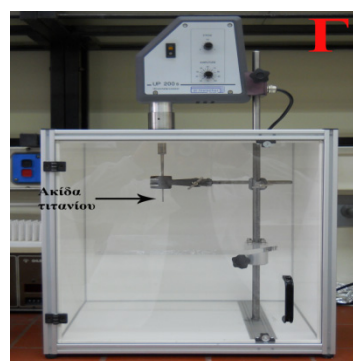
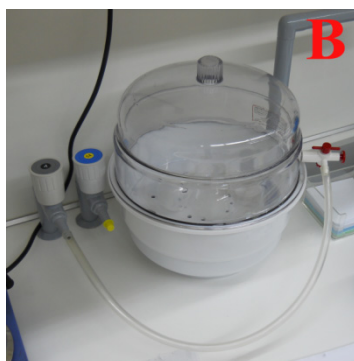
### **3.2.1 Παρασκευή Λιποσώματων**

#### **3.2.1.1 Μέθοδος Ενυδάτωσης Λεπτού Λιπιδικού Υμενίου (Thin-film hydration)**

##### 3.2.1.1.α. Υλικά-Οργανολογία

- ❖ Χλωροφόρμιο (Chloroform), Lab-Scan analytical sciences Ltd, Ireland
- ❖ Μεθανόλη (Methanol), Fisher Scientific, 67-56-1
- ❖ H<sub>2</sub>O (HPLC Gradient), PRO TMPS Labconco System
- ❖ Glass beads

- ❖ Φωσφατιδυλοχολίνη αυγού (L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (Egg, Chicken), **EPC**), Avanti® Polar Lipids Inc., 840051P
- ❖ Διπαλμιτουλοφωσφατιδυλογλυκερόλη (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt), **DPPG**), Avanti® Polar Lipids Inc., 840455P
- ❖ Χοληστερόλη (cholesterol), Sigma-Aldrich®, C3045
- ❖ Ξηραντήρας κενού
- ❖ Ζυγός (College B154, Mettler-Toledo, Switzerland)
- ❖ Πιπέττες και ρύγχη για πιπέττες
- ❖ Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό (Rotary Evaporator), Laborota 4000, Heidolph Instruments
- ❖ PROBE SONICATOR (Αισθητήρας υπερήχων), UP 200 S (Ultrasonic processor for stationary operation), Dr Hielscher GmbH
- ❖ Extruder, συσκευή μηχανικής εξώθησης μέσω πολυκαρβονικών φίλτρων για ρύθμιση του μεγέθους των λιποσωμάτων



Εικόνα 3.17 Α) Rotary evaporator, Β) Ξηραντήρας κενού, Γ) Probe Sonication, Δ) Extruder

### 3.2.1.1.β. Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο

#### A) Φάση Δημιουργίας Λεπτού Λιπιδικού Υμενίου (Lasic 1993)

Η παρασκευή των λιποσωμάτων αρχίζει από τον υπολογισμό της μοριακής αναλογίας των λιπιδίων που θα χρησιμοποιηθούν ή/και της ουσίας που θα ενσωματωθεί ή θα εγκλωβιστεί, της αρχικής συγκέντρωσης των λιπιδίων και του τελικού όγκου που θέλουμε να παρασκευάσουμε. Έτσι έχουμε π.χ. EPC:DPPG (9:1), σε αρχική συγκέντρωση λιπιδίων 40mg/ml σε τελικό όγκο 1ml ή (EPC:DPPG):Ag[3] σε μοριακή αναλογία (9:1):0.05, σε συγκέντρωση λιπιδίων 30mg/ml σε τελικό όγκο 2ml.

Το λεπτό λιπιδικό υμένιο παρασκευάστηκε αναμιγνύοντας φωσφατιδυλοχολίνη αυγού (EPC) και διπαλμιτοϋλοφωσφατιδουλογλυκερόλη (DPPG) σε μοριακή αναλογία 9:1. Αρχικά υπολογίστηκε η ποσότητα του DPPG και μεταφέρθηκε σε μια σφαιρική φιάλη των 100ml. Το DPPG διαλύθηκε από μίγμα χλωροφορμίου-μεθανόλης 1:1. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η ποσότητα του EPC και το οποίο μεταφέρθηκε στην ίδια σφαιρική φιάλη. Ο διαλύτης εξατμίζεται αργά σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό μέχρι το σχηματισμό ομοιογενούς υμενίου. Το σχηματιζόμενο υμένιο αφήνεται σε ξηραντήρα κενού τουλάχιστον για 24 ώρες για την απομάκρυνση πιθανών ιχνών διαλυτών.

Ίδιας σύστασης και μοριακής αναλογίας λεπτό λιπιδικό υμένιο παρασκευάστηκε ξανά αλλά αυτή τη φορά προσθέσαμε και το σύμπλοκο Ag[3]. Το σύμπλοκο αυτό του αργύρου (I) είναι ένα λιπόφιλο μόριο, διαλύεται σε DMSO και χλωροφόρμιο και τα λιπόφιλα μόρια εισάγονται μέσω μερισμού/ενσωμάτωσης (partitioning) και αναμιγνύονται με τα φωσφολιπίδια στο στάδιο διασποράς τους στην οργανική φάση. Στην παρούσα μελέτη διαλύσαμε το σύμπλοκο σε χλωροφόρμιο μιας και είναι ο ίδιος διαλύτης που διαλύει και τα φωσφολιπίδια αλλά και επειδή το DMSO έχει μεγάλο ιξώδες και δεν είναι πτητικό οπότε δεν θα μπορούσαμε να το αποβάλλουμε. Η αρχική μοριακή αναλογία ανάμιξης των λιπιδίων και του συμπλόκου ήταν (9:1):0.05.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις λιπιδίων όπως 20mg/ml, 30mg/ml, 40mg/ml και 50mg/ml. Ο τελικός όγκος του λιπιδικού εναιωρήματος συνήθως ήταν στα 2ml.

#### B) Φάση Ενυδάτωσης

Έπειτα από 24 ώρες παραμονής των λεπτών λιπιδικών υμενίων στον ξηραντήρα κενού προσθέσαμε τον κατάλληλο όγκο H<sub>2</sub>O (HPLC καθαρότητας) ή/και ρυθμιστικού διαλύματος σουκρόζης (sucrose buffer) που είχαμε υπολογίσει ότι θα φτιάχναμε από την

αρχή (π.χ. 2ml) και προσθέσαμε σε κάθε σφαιρική φιάλη και μερικά glass beads ώστε να διευκολυνθεί η ενυδάτωση του λεπτού λιπιδικού υμενίου με την καλύτερη ανάδευση αλλά και αποκόλληση του υμενίου από το τοίχωμα της φιάλης. Η ενυδάτωση πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο πάνω από τη θερμοκρασία μετάβασης των λιπιδίων (που στην περιπτωσή μας είναι οι 40°C) με αργή περιστροφή της φιάλης για μία ώρα. Έπειτα το λιποσωματικό εναιώρημα μεταφέρθηκε από την σφαιρική φιάλη σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, ογκομετρήθηκε και συμπληρώθηκε όσος όγκος νερού χάθηκε κατά τη διάρκεια της ενυδάτωσης. Τα σχηματιζόμενα πολυστοιβαδικά λιποσώματα (MLVs) αφήθηκαν σε ηρεμία για 30 λεπτά. Εν συνεχεία η ρύθμιση του μεγέθους των λιποσωμάτων επιτεύχθηκε με τη χρήση της μεθόδου εξώθησης μέσω πολυκαρβονικών φίλτρων (extruder). Το λιποσωματικό εναιώρημα πέρασε μέσα από πολυκαρβονικά φίλτρα 400nm 5 φορές και έπειτα από 100nm 10 φορές.

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρασκευάσαμε και λιποσώματα με EPC και χοληστερόλη σε μοριακές αναλογίες 55:45, 65:35 και 70:30 καθώς και λιποσώματα στις ίδιες μοριακές αναλογίες λιπιδίων με το σύμπλοκο Ag[3] σε συνολικές μοριακές αναλογίες (55:45):10, (65:35):5, (70:30):5 αλλά και (65:35):0.05. Η ρύθμιση του μεγέθους των συγκεκριμένων λιποσωμάτων πραγματοποιήθηκε σε 4 κύκλους υπερήχησης με διακοπή 5 λεπτών στο ενδιάμεσο σε ποτήρι ζέσεως με νερό, χρησιμοποιώντας αισθητήρα υπερήχησης (πλάτος ταλάντωσης 70%, διάρκεια παλμού 0.7sec).

### **3.2.2 Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (Size Exclusion Chromatography, SEC).**

Με αυτή την τεχνική πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός του ελεύθερου συμπλόκου Ag[3] από το εγκλωβισμένο στα λιποσώματα.

#### **3.2.2.1 Υλικά-Οργανολογία**

- ❖ Στήλη χρωματογραφίας με silica (διοξείδιο του πυριτίου)
- ❖ Sephadex G-75, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, G75120

#### **3.2.2.2 Μεθοδολογία- Πρωτόκολλο**

Παρασκευάστηκε διάλυμα με sephadex G-75 (14g/500ml ddH<sub>2</sub>O) (μέγεθος σφαιριδίων 40-120μm). Τοποθετήσαμε μια στήλη χρωματογραφίας (διαμέτρου 1cm και

ύψους 22cm με silica στο κάτω μέρος) στο stand, τη γεμίσαμε με το διάλυμα G-75 και αυτό άρχισε να «πακετάρεται» στο κάτω μέρος της στήλης. Ξαναγεμίστηκε με το διάλυμα όταν κρίθηκε απαραίτητο μέχρι που το τελικό πακετάρισμα έφτασε τα 10cm στη στήλη. Όταν έγινε το πακετάρισμα η στήλη γεμίστηκε, προσεκτικά ώστε να μην γίνει ανακάτεμα της επιφάνειας των πακεταρισμένων σφαιριδίων του sephadex, με την κατάλληλη υδατική φάση αρκετές φορές ώστε το πακετάρισμα να βελτιστοποιηθεί. Μόλις το ύψος της υδατικής φάσης έφτασε στην επιφάνεια του sephadex τότε με πολύ μεγάλη προσοχή προστέθηκαν 200μl λιποσωμακού εναιωρήματος στην επιφάνεια του sephadex και όταν αυτά απορροφήθηκαν από τη στήλη τότε προστέθηκε προσεκτικά επιπλέον κατάλληλη υδατική φάση. Παρατηρώντας χρωματογραφικά το λιποσωμακό κλάσμα να περνά μέσα από τη στήλη, μόλις φτάσει στο τέλος το μαζεύω σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα (test tube). Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται εως ότου όλο το δείγμα να περάσει από τη στήλη.



**Εικόνα 3.18** Στήλες χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού

Από τη στήλη χρωματογραφίας περάσαμε πρώτα τα σκέτα λιποσώματα ώστε να επέλθει κορεσμός της στήλης και μετά τα αντίστοιχης σύστασης λιποσώματα με το ενσωματωμένο φάρμακο για να μην έχουμε απώλειες κατακράτησης λιποσωμάτων με το σύμπλοκο από τη στήλη. Αφού ολοκληρώθηκε ο καθαρισμός του δείγματος η στήλη γεμίστηκε αρκετές φορές (3-4 φορές ) με την κατάλληλη υδατική φάση ώστε να ξεπλυθεί και να καθαρίσει. Έπειτα η στήλη σφαιρίστηκε για μελλοντική χρήση.

### 3.2.3 Φυσικοχημικός Χαρακτηρισμός Λιποσωμάτων

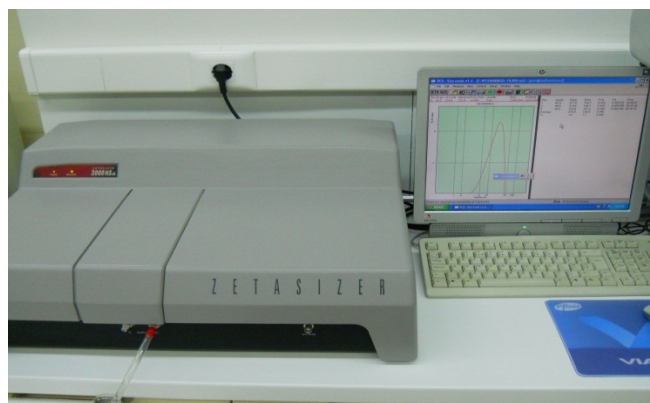
#### 3.2.3.1 Φασματοσκοπία Συσχετισμού Φωτονίων (Photon Correlation Spectroscopy, PCS)

##### 3.2.3.1.α. Υλικά-Οργανολογία

- ❖ Όργανο Φασματοσκοπίας Συσχετισμού Φωτονίων, Zetasizer Particle Size and Zeta Potential Analyser 3000, Malvern Instruments Ltd

##### 3.2.3.1.β. Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο

Το μέγεθος (μέση υδροδυναμική διάμετρος, Z<sub>Ave</sub>), ο δείκτης πολυδιασποράς (Polydisperse Index, PI) και το ζ-δυναμικό (Zeta Potential) των λιποσωμάτων μετράται άμεσα μετά την παρασκευή των λιποσωμάτων ως ακολούθως:



**Εικόνα 3.19** Όργανο Φασματοσκοπίας Συσχετισμού Φωτονίων

Προστίθενται 20μl λιποσωματικού εναιωρήματος σε 2980μl NaCl (10mM) σε κυψελίδα όγκου 3ml και η μέση υδροδυναμική διάμετρος (Z<sub>Ave</sub>), ο δείκτης πολυδιασποράς (PI) και το ζ-δυναμικό (Zeta) των λιποσωμάτων μετρώνται με φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων. Τα δείγματα σκεδάζονται (633nm) υπό γωνία 90° και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25°C. Τα αποτελέσματα αναλύονται με τη μέθοδο CONTIN του πακέτου λογισμικού MALVERN.

Σε όλα τα λιποσωματικά εναιωρήματα που κατασκευάστηκαν, ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός τους πραγματοποιήθηκε τα τουλάχιστον τρεις φορές.

Τα παρασκευασθέντα λιποσώματα διατηρήθηκαν στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4°C και η σταθερότητα τους μετρούνταν κάθε πέντε ημέρες.

### 3.2.3.2 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας Υψηλής Απόδοσης – Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας (High Performance Thin Layer Chromatography-Flame Ionization Detector, HPTLC-FID).

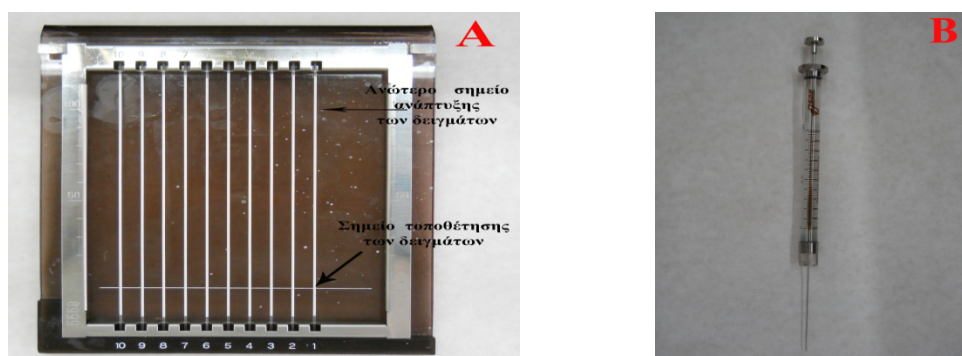
Η μέθοδος του HPLTC-FID εφαρμόστηκε προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός των λιπιδίων και του συμπλόκου στα λιποσώματα.

#### 3.2.3.2.α. Υλικά-Οργανολογία

- ❖ SGE glass HPTLC syringe
- ❖ HPTLC-FID Analyser, IATROSCAN™ newMK-5, Iatroscan Laboratories, Inc.

#### 3.2.3.2.β. Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο

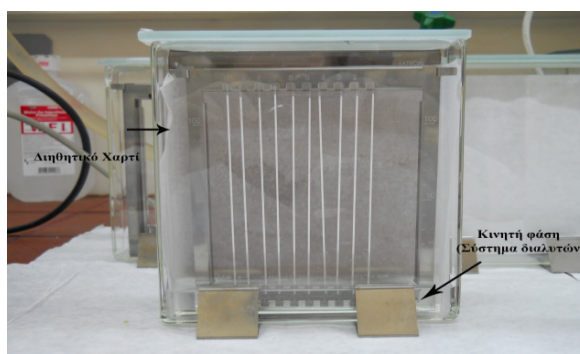
Πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων και των προτύπων στα ραβδία, οι ράβδοι τοποθετήθηκαν κενές στο όργανο και σαρώθηκαν από τη φλόγα υδρογόνου. Με τον τρόπο αυτόν έγινε ταυτόχρονα καθαρισμός και ενεργοποίηση (απομάκρυνση της υγρασίας) των ραβδίων. Το προς ανάλυση δείγμα ήταν τα λιποσώματα με ή χωρίς το σύμπλοκο καθώς και ποσότητες των προτύπων λιπιδίων και συμπλόκου διαλυμένα σε κατάλληλο διαλύτη (πχ. Χλωροφόρμιο). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν με μικροσύριγγα ακριβείας (της τάξεως των  $\mu\text{l}$ ) στο άκρο ειδικών ραβδίων από πυρίμαχο και χημικά σταθερό υλικό (CROMAROD), που περιβάλλονται από την ομοιόμορφα επιστρωμένη στατική φάση (silica gel).



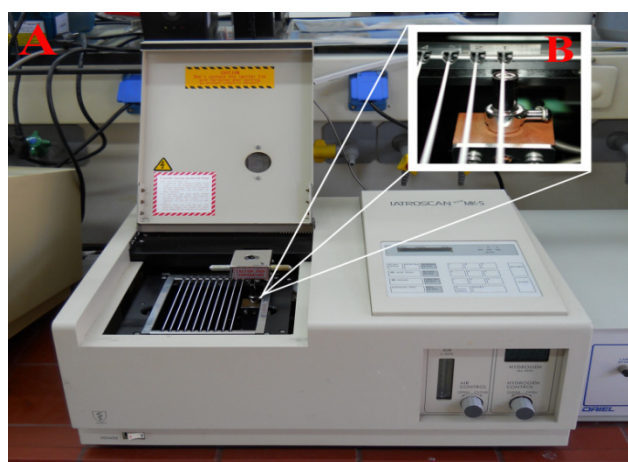
**Εικόνα 3.20** Α) Ειδικά ραβδία πάνω στα οποία φορτώνεται το δείγμα και αφήνεται να αναπτυχθεί. Φαίνεται το σημείο τοποθέτησης του δείγματος καθώς και το ανώτερο σημείο που αφήνονται τα δείγματα να αναπτυχθούν στην κινητή φάση από το σύστημα ανάπτυξης. Β) Μικροσύριγγα μέγιστης χωρητικότητας 1 $\mu\text{l}$ .



Παράλληλα φτιάξαμε το σύστημα ανάπτυξης (κινητή φάση) και το προσθέσαμε στο θάλαμο ανάπτυξης. Μέσα στο θάλαμο ανάπτυξης τοποθετήθηκε κατάλληλου μεγέθους διηθητικό χαρτί ώστε να γίνεται έλεγχος του κορεσμού της ατμόσφαιρας του θαλάμου από το σύστημα ανάπτυξης (Εικόνα 3.21). Η διάταξη με τα ραβδάκια (που φέρουν πλέον τα δείγματα) τοποθετήθηκε στο θάλαμο ανάπτυξης προσεκτικά και ευθυγραμμισμένα και ο θάλαμος καλύφθηκε ξανά με το γυάλινο καπάκι. Τα δείγματα αφέθηκαν να αναπτυχθούν και να διαχωριστούν με το κατάλληλο σύστημα ανάπτυξης πάνω σε αυτές τις λεπτές ράβδους, όπως γίνεται στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Μετά το τέλος της ανάπτυξης (όταν το μέτωπο του διαλύτη έφτασε λίγο πριν το άνω άκρο της επικάλυψης του ραβδίου, Εικόνα 3.20<sup>A</sup>), η διάταξη με τις ράβδους απομακρύνθηκε από το θάλαμο ανάπτυξης και τοποθετήθηκε για λίγα λεπτά στο φούρνο (60°C) για να εξατμιστεί πλήρως το σύστημα των διαλυτών ανάπτυξης.



**Εικόνα 3.21** Παρουσιάζεται ο θάλαμος ανάπτυξης, η κινητή φάση (σύστημα ανάπτυξης), η διάταξη με τα ραβδάκια (στα οποία φορτώνονται τα δείγματα) και το διηθητικό χαρτί ελέγχου του κορεσμού του εσωτερικού περιβάλλοντος του θαλάμου.



**Εικόνα 3.22** . A) HPTLC-FID Analyser, IATROSCAN™, εμφανίζεται η θέση της διάταξη με τις ράβδους πριν την ανάλυση από τον ανιχνευτή φλόγας ενώ B) σε μεγένθυση όταν η φλόγα περνά πάνω από κάθε ράβδο.

Στη συνέχεια, το set με τα ραβδάκια περνούν με σταθερή ταχύτητα από τον ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας υδρογόνου (FID), η οποία προκαλεί ιονισμό των οργανικών συστατικών των διαχωρισμένων κηλίδων (Εικόνα 3.22). Η διαφορά δυναμικού, μεταξύ των πόλων του ανιχνευτή, αναγκάζει τα παραγόμενα ιόντα να κινηθούν προς τον πόλο του αντίθετου φορτίου, δημιουργώντας ρεύμα, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της ποσότητας της οργανικής ουσίας που σάρωσε η φλόγα. Το παραγόμενο ρεύμα μετατρέπεται σε αναλογικό σήμα από έναν ποτενσιομετρικό διπλό καταγραφέα και διοχετεύεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή που το καταγράφει ως χρωματογράφημα.

Στον ηλεκτρονικό υπολογιστή γίνεται στη συνέχεια η επεξεργασία αυτών των χρωματογραφημάτων. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιείται:

- Ταυτοποίηση (ποιοτικός προσδιορισμός) των ουσιών του δείγματος, δηλαδή προσδιορισμό των Rf των κορυφών του δείγματος, μετά από σύγκριση με τα Rf κορυφών πρότυπων ουσιών.
- Ποσοτικός προσδιορισμός των ουσιών του δείγματος, μετά από ολοκλήρωση του εμβαδού κάθε κορυφής, το οποίο είναι ανάλογο της ποσότητας της αντίστοιχης ουσίας που περιέχεται μέσα στο δείγμα.

Οι συνθήκες εκτέλεσης των πειραμάτων συμπεριλαμβάνουν τη ροή του αερίου H<sub>2</sub> στα 160ml/min και του Αέρα στα 1900ml/min. Η ταχύτητα σάρωσης είναι στα 30sec/ράβδο.

#### 3.2.3.2.γ. Πρωτόκολλο αφαίρεση της σουκρόζης

Για να πραγματοποιηθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός με HPTLC-FID των λιπιδίων που ενυδατώθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα σουκρόζης και λυοφιλοποιήθηκαν έπρεπε να αφαιρεθεί η σουκρόζη. Ένα απλό πρωτόκολλο αφαίρεσης περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

Λίγο βαμβάκι πλάστηκε και τοποθετήθηκε σε μια πιπέτα pasteur. Με μια μικρή σπάτουλα το βαμβάκι συμπιέστηκε ώστε να γίνει καλό πακετάρισμα του στο λαιμό της pasteur. Το βαμβάκι πακεταρισμένο θα πρέπει να είναι περίπου 1-2cm. Έπειτα περάστηκε από την pasteur περίπου 2-3ml από το κατάλληλο σύστημα διαλυτών (που χρησιμοποιήσαμε για να διαλυθούν τα λιπίδια χωρίς όμως να διαλυθεί η σουκρόζη). Το λυοφιλοποιημένο δείγμα μας το ξεκολλήσαμε από τα τοιχώματα του φιαλιδίου που το είχαμε αποθηκεύσει και λυοφιλοποιήσει και το τρίψαμε μέχρι να κονιορτοποιηθεί. Έπειτα προσθέσαμε το κατάλληλο σύστημα διαλυτών και έγινε πολύ καλή ανάδευση. Με μια άλλη pasteur συλλέξαμε το δείγμα και το τοποθετήσαμε στην pasteur με το βαμβάκι.

Ελαφριά πίεση εφαρμόστηκε με τη βοήθεια ενός κατάλληλου πουάρ και οι διαλύτες με τα διαλυμένα λιπίδια πέρασαν και συλλέχθηκαν σε ένα φιαλίδιο ενώ η σουκρόζη παρέμεινε πάνω στο βαμβάκι. Οι διαλύτες εξατμίστηκαν και έτσι πήραμε το καθαρό προϊόν (ίσως να υπάρχει μια μικρή παραμένουσα ποσότητα σουκρόζης).

### **3.2.3.3 Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφσεως (Atomic Absorption Spectroscopy)**

Η φασματοσκοπία ατομικής απορρόφσεως στην αναλυτική χημεία είναι μια τεχνική για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενός συγκεκριμένου στοιχείου μετάλλου εντός ενός δείγματος. Η φασματοσκοπία ατομικής απορρόφσεως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αναλύσει τη συγκέντρωση σε πάνω από 62 διαφορετικά μέταλλα σε ένα διάλυμα.

Τυπικώς, η τεχνική κάνει χρήση μιας φλόγας για να ατομικοποιήσει το δείγμα, αλλά άλλοι ατομικοποιητές όπως ένας φούρνος γραφίτη, χρησιμοποιούνται επίσης. Τα τρία βήματα που εμπλέκονται στην μετατροπή ενός υγρού δείγματος σε ένα ατομικό αέριο:

- Διάλυση - ο υγρός διαλύτης εξατμίζεται, και το ξηρό δείγμα παραμένει
- Εξάτμιση - το στερεό δείγμα εξατμίζεται σε αέριο
- Πτητικοποίηση - οι ενώσεις που αποτελούν το δείγμα διασπώνται σε ελεύθερα άτομα.

Η φλόγα είναι διατεταγμένη έτσι ώστε να είναι πλευρικά μακριά (συνήθως 10cm) και όχι κατά βάθος. Το ύψος της φλόγας πρέπει επίσης να ελέγχεται με τον έλεγχο της ροής του καυσίμου μίγματος. Μια ακτίνα του φωτός εστιάζεται μέσω αυτής της φλόγας στο μακρύτερο άξονά του (πλευρικός άξονας) επί ενός ανιχνευτή που διαπερνά τη φλόγα. Το φως που εστιάζεται μέσα στην φλόγα παράγεται από ένα κοίλο καθοδικό λαμπτήρα. Στο εσωτερικό του λαμπτήρα είναι μία κυλινδρική μεταλλική κάθοδος που περιέχει το μέταλλο προς διεγερση, και μία άνοδο. Όταν μια υψηλή τάση εφαρμόζεται στην άνοδο και την κάθοδο, τα άτομα μετάλλου στην κάθοδο διεγείρονται σε παραγωγή φωτός με ένα συγκεκριμένο φάσμα εκπομπής. Ο τύπος του κοίλου σωλήνα καθόδου εξαρτάται από το μέταλλο που αναλύεται. Για την ανάλυση της συγκέντρωσης του χαλκού σε ένα μέταλλευμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένας σωλήνας καθόδου χαλκού, και ομοίως για οποιοδήποτε άλλο μέταλλο που αναλύεται. Τα ηλεκτρόνια των ατόμων στην φλόγα μπορεί να προάγονται σε ανώτερα τροχιακά για μία στιγμή απορροφώντας μία ποσότητα ενέργειας. Αυτό το ποσό της ενέργειας είναι συγκεκριμένο σε μια συγκεκριμένη μετάβαση ηλεκτρονίων σε ένα συγκεκριμένο στοιχείο. Καθώς η ποσότητα της ενέργειας

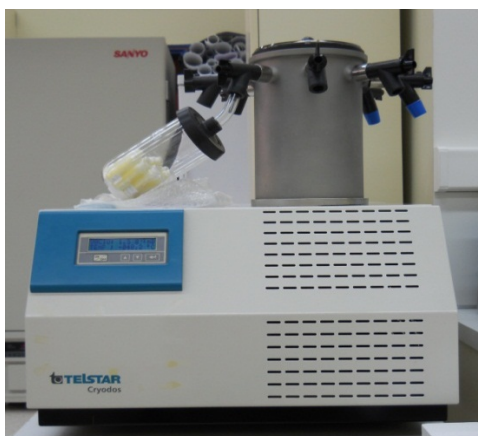
που τίθεται μέσα στην φλόγα είναι γνωστή και η ποσότητα που απομένει στην άλλη πλευρά (από τον ανιχνευτή) μπορεί να μετρηθεί, είναι δυνατόν να υπολογιστεί πόσες από αυτές τις μεταβάσεις πραγματοποιήθηκαν και έτσι να ληφθεί ένα σήμα το οποίο είναι ανάλογο στη συγκέντρωση του στοιχείου που μετράται.

Στην παρούσα μελέτη η φασματοσκοπία της ατομικής απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του αργύρου στα λιποσώματα.

### 3.2.4 Λυοφιλοποίηση

#### 3.2.4.1 Υλικά-Οργανολογία

- ❖ Λυοφιλοποιητής, Cryodos 50, TELSTAR Cryodos.



**Εικόνα 3.23** Ο Λυοφιλοποιητής εν ώρα λειτουργίας. Φαίνονται τα τοποθετημένα προς λυοφιλοποίηση δείγματα

#### 3.2.4.2 Μεθοδολογία-Πρωτόκολλο

Τα δείγματα λιποσωμάτων που ενυδατώθηκαν με το υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα της σουκρόζης, επείτα από την επεξεργασία τους, το τελικό προϊόν τοποθετήθηκε σε φιαλίδια, των οποίων τα στόμια κλείστηκαν με parafilm και στα οποία δημιουργήθηκαν μικρές τομές με βελόνη. Έπειτα τοποθετήθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 1ώρα. Αμέσως ενεργοποιήθηκε και ο λυοφιλοποιητής για να μπορέσει να πιάσει τις συνθήκες λειτουργίας (κενό:  $1.8 \cdot 10^{-1}$  mB, Θερμοκρασία:  $-54.6^{\circ}\text{C}$ )

Με το πέρας της ώρας, με γρήγορες κινήσεις για να μην λιώσει ο πάγος, τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε γυάλινη φιάλη στην οποία εφαρμόζει πλαστικό εύκαμπτο καπάκι και

στο κέντρο του είναι προσαρτημένος ένας γυάλινος σωλήνας που εξυπηρετεί για τη σύνδεσή του με τον λυοφιλοποιητή (Εικόνα 3.23). Μόλις πραγματοποιήθηκε η σύνδεση, η βαλβίδα απελευθέρωσης του κενού ανοίχτηκε και το κενό μεταφέρθηκε στη φιάλη των δειγμάτων κάνοντας έναρξη της διαδικασίας της λυοφιλοποίησης. Η λυοφιλοποίηση των δειγμάτων κράτησε τουλάχιστον 24 ώρες.

Με το πέρας της λυοφιλοποίησης τα φιαλίδια των δειγμάτων κουμπώθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους 4°C.

### 3.3 Μελέτες *In Vivo*

#### 3.3.1 Τοξικότητα σε επίμυες Wistar

##### 3.3.1.1 Οξεία τοξικότητα

###### 3.3.1.1.α Υλικά-Οργανολογία

- ❖ Τρικαπριλίνη, Glyceryl trioctanoate, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, T9126
- ❖ Σύριγγες 1ml
- ❖ Βελόνες 23G
- ❖ Δοχεία συλλογής ούρων, αποστειρωμένα, U-TEST, Latex A.B.E.E., Ελλάδα
- ❖ Αιθέρας, Diethyl Ether
- ❖ Φορμαλδεϋδη, Formaldehyde solution min 37%, Merck

###### 3.3.1.1.β Πειραματική διαδικασία

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της οξείας τοξικότητας του συμπλόκου Ag[3], έπειτα από χορήγηση μίας εφάπαξ δόσης του συμπλόκου. Οι δόσεις ακολούθησαν λογαριθμικό σχήμα χορήγησης.

Για τα πειράματα οξείας τοξικότητας χρησιμοποιήθηκαν 37 θηλυκοί επίμυες Wistar, ηλικίας 12 εβδομάδων και βάρους  $195 \pm 10$ g. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν τυχαία σε 5 επιμέρους ομάδες. Τα πειραματόζωα της ομάδας οξείας τοξικότητας OT1 (7 πειραματόζωα) έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά μία εφάπαξ δόση του Ag[3] των 0.8mg/kg ΣΒ διαλυμένο σε 1ml τρικαπρυλίνης. Τα πειραματόζωα των ομάδων OT2 και OT3 (10 πειραματόζωα/ομάδα) έλαβαν 8mg/kg ΣΒ και 80mg/Kg ΣΒ αντιστοίχως ολοκληρώνοντας

το λογαριθμικό σχήμα χορήγησης. Επίσης τα πειραματόζωα της OT4 (5 πειραματόζωα) έλαβαν εφάπαξ τη διπλάσια δόση της μεγαλύτερης δόσης του λογαριθμικού σχήματος των 160mg/kg ΣΒ. Τα πειραματόζωα της ομάδας OT5 (5 πειραματόζωα) αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου και έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά μόνο την αντίστοιχη ποσότητα του διαλύτη (1ml τρικαπριλίνης).

Τα πειραματόζωα δεν τράφηκαν για 4-5 ώρες πριν την πειραματική διαδικασία. Μισή ώρα μετά την χορήγηση του συμπλόκου τα πειραματόζωα αφέθηκαν ελεύθερα να τραφούν. Κάθε δύο μέρες γινόταν μέτρηση του Σωματικού Βάρους (ΣΒ) των πειραματοζώων και το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης τοξικότητας.

Η ποσοστιαία αλλαγή του ΣΒ υπολογίστηκε ως η  $\Delta\Sigma\text{B}\%$  και η οποία δίνεται από τον εξής τύπο:

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

*Όπου  $\Pi$  = ημέρα πειράματος*

Κανένα από τα ζώα των παραπάνω ομάδων δεν κατέληξαν, και όλα θυσιάστηκαν την 7η ημέρα με αιθέρα ώστε να υπάρξει παθολογοανατομική εκτίμηση της πιθανής προκαλούμενης τοξικότητας. Τα εσωτερικά όργανα αφαιρέθηκαν *en bloc* και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία (ουροδοχεία) που περιείχε φορμαλδεΰδη 10% για την μονιμοποίησή τους. Έπειτα λήφθηκαν αντιπροσωπευτικές τομές από κάθε όργανο και εμβαπτίστηκαν σε κύβους παραφίνης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν λεπτές τομές (4 $\mu\text{m}$ ) στους ιστούς και χρώστηκαν με την ειδική χρώση haematoxylin-eosin. Οι τομές εξετάστηκαν κάτω από οπτικό μικροσκόπιο.

### **3.3.1.2 Χρόνια Τοξικότητα**

#### **3.3.1.2.α. Υλικά-Οργανολογία**

❖ Όλα τα υλικά της υποενότητας 3.3.1.1.α

#### **3.3.1.2.β. Πειραματική Διαδικασία**

Για τα πειράματα οξείας τοξικότητας χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί επίμυες Wistar, ηλικίας 12 εβδομάδων και βάρους 195  $\pm$  10g. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες (7 πειραματόζωα ανά ομάδα). Η επιλογή των δόσεων σε αυτή την πειραματική διαδικασία έγινε με βάση τα αποτελέσματα της οξείας τοξικότητας (παράγραφος 3.3.1.1.β).

Τα πειραματόζωα της ομάδας 1 της χρόνιας τοξικότητας, (XT1), έλαβαν 6 δόσεις x 8mg/kg ΣΒ (48mg/kg ΣΒ), διαλυμένα σε 1ml τρικαπριλίνης, κάθε 6<sup>ο</sup> συμπληρωμένο 24ωρο από την 1<sup>η</sup> ημέρα χορήγησης (D0) κ.ο.κ. (1<sup>η</sup> δόση D0 – 6<sup>η</sup> δόση D30).

Τα πειραματόζωα της ομάδας 2 της χρόνιας τοξικότητας (XT2), έλαβαν 6 δόσεις x 27mg/kg ΣΒ (=162mg/kg ΣΒ), διαλυμένα σε 1ml τρικαπριλίνης, κάθε 6<sup>ο</sup> συμπληρωμένο 24ωρο από την 1<sup>η</sup> ημέρα χορήγησης (D0) κ.ο.κ. (1η δόση D0 – 6η δόση D30).

Τα πειραματόζωα της ομάδας 3 της χρόνιας τοξικότητας (XT3), έλαβαν 6 δόσεις x 1ml τρικαπριλίνη, κάθε 6<sup>ο</sup> συμπληρωμένο 24ωρο από την 1<sup>η</sup> ημέρα χορήγησης (D0) κ.ο.κ. (1η δόση D0 – 6η δόση D30).

Ο συνολικός χρόνος χορήγησης ήταν 30 ημέρες.

Κανένα από τα ζώα των παραπάνω ομάδων δεν κατέληξαν, και όλα θυσιάστηκαν την 7η ημέρα μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης με αιθέρα ώστε να υπάρξει παθολογοανατομική εκτίμηση της πιθανής προκαλούμενης τοξικότητας. Τα εσωτερικά όργανα αφαιρέθηκαν en bloc και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία (ουροδοχεία) που περιείχε φορμαλδεΰδη 10% για την μονιμοποίησή τους. Έπειτα λήφθηκαν αντιπροσωπευτικές τομές από κάθε όργανο και εμβαπτίστηκαν σε κύβους παραφίνης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν λεπτές τομές (4μm) στους ιστούς και χρώστηκαν με την ειδική χρώση haematoxylin-eosin. Οι τομές εξετάστηκαν κάτω από οπτικό μικροσκόπιο.

### **3.3.2 Καρκινογένεση-Ενοφθαλμισμός επίμυων Wistar**

#### **3.3.2.1 Ιστορικά Στοιχεία**

Στο εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων απομονώθηκαν κύτταρα λειομυοσαρκώματος τα οποία δημιουργήθηκαν μετά από την bolus υποδόρια έγχυση 10,08 mg B[a]P ανά επίμυ ηλικίας 2 μηνών (Liasko 1998, Evangelou 1997).

Ο ενοφθαλμισμός λειομυοσαρκωματικών (LMS) κυττάρων είναι ένα ταχύ και με μεγάλο ποσοστό επιτυχίας μοντέλο ανάπτυξης όγκων σε πειραματόζωα για να μπορέσουμε να μελετήσουμε την αντικαρκινική δράση των διαφόρων συμπλόκων χωρίς να περιμένουμε αρκετούς μήνες όπως αυτό συμβαίνει στο μοντέλο της χημικής καρκινογένεσης μέσω B[a]P (βενζοπυρένιο).

### 3.3.2.1.α Υλικά-Οργανολογία

- ❖ Όλα τα υλικά των υποενοτήτων 3.1.3.1 και 3.1.5.1
- ❖ Νυστέρια, Xinda, N° 22 και 10
- ❖ Χειρουργικά εργαλεία: Λαβίδες Mosquito, Στελέχη νυστεριών N°3 και 4, ψαλίδια
- ❖ Κολλητική ταινία συγκράτησης, 3M, Transpore™
- ❖ Ράμματα, 4-0, 5-0, Coated Vicryl, sterile, ETHICON, W9501T
- ❖ Ραμματα 4-0, POLYSORB, sterile, Syneture, SL-607
- ❖ NaCl, διαλυμα για ενδοφλέβια έγχυση 0.9% w/v, Fresenius, KabiPac
- ❖ Μιδαζολάμη (ενέσιμο διάλυμα), Damizol® (5mg/ml), SPECIFAR Pharmaceuticals
- ❖ Μιδαζολάμη (ενέσιμο διάλυμα), Dormicum® (5mg/ml), Roche
- ❖ Κεταμίνη (ενέσιμο διάλυμα), IMALGENE® 1000 (ketamine hydrochloride 100mg/ml), Merial

### 3.3.2.1.β Πειραματική Διαδικασία

Στην παρούσα μελέτη ενοφθαλμίστηκαν LMS κύτταρα επίμυος Wistar σε επίμυες Wistar. Η διαδικασία ενοφθαλμισμού περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

#### A) Παρασκευή κυτταρικού εναιωρήματος για ενοφθαλμισμό

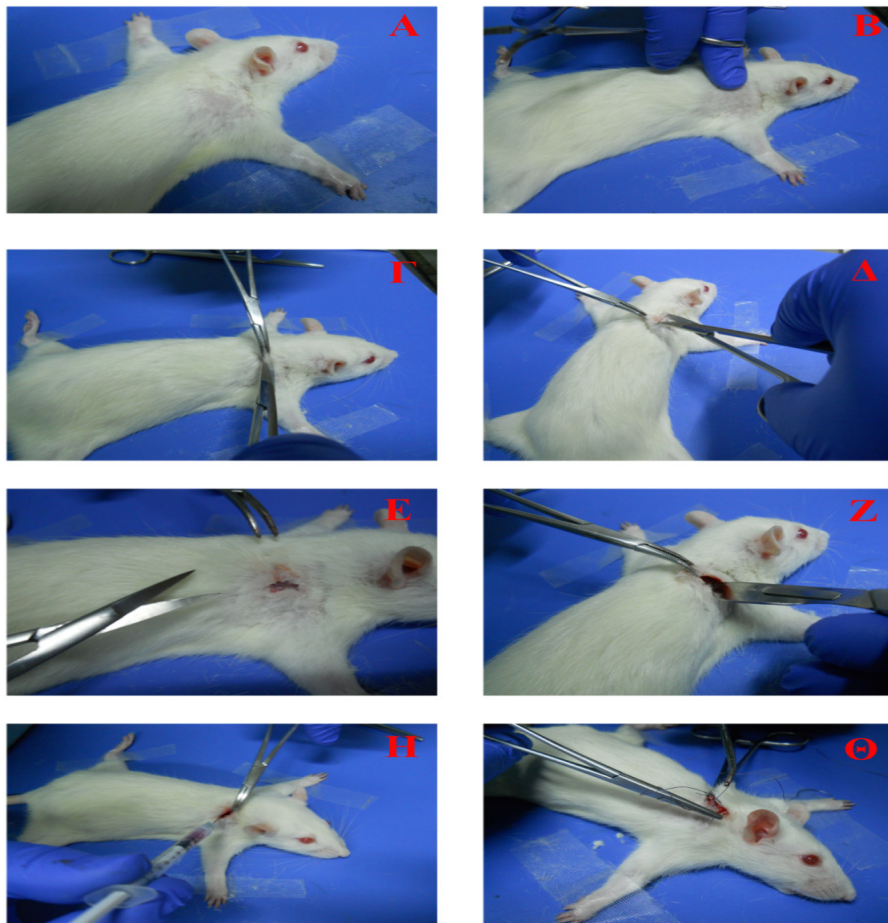
LMS κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri (100 x 20mm) και αφέθηκαν να φτάσουν το 70-80% πληρότητα ταπητίου. Έπειτα, το θρεπτικό υλικό απορρίφθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και θρυψινοποιήθηκαν ώστε να αποκολληθούν. Στη συνέχεια προστέθηκε κανουριο θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε falcon ενώ ακολούθησε μέτρηση των κυττάρων για τον προσδιορισμό του αριθμού τους (βλ. υποενοτήτα 3.1.3.1 και 3.1.5.2). Έπειτα τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε νέο θρεπτικό υλικό DMEM έτσι ώστε το κυτταρικό εναιώρημα να έχει συγκέντρωση  $5 \times 10^6$  LMS/1ml DMEM. Το διάλυμα των κυττάρων τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένη σύριγγα του 1ml με βελόνα 23G.

#### B) Αναισθητοποίηση πειραματοζώων επίμυων Wistar

Πριν τη διαδικασία του ενοφθαλμισμού τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με διάλυμα κεταμίνης(100mg/ml):μιδαζολάμης(5mg/ml):NaCl (0.9%) σε v/v 1:4:5. Σε κάθε ζώο πραγματοποιήθηκε IP έγχυση 0.5-1ml από το παραπάνω διάλυμα ανάλογα με την ευκολία ή τη δυσκολία που η αναισθησία επηρέαζε το πειραματόζωο. Μετά την αναισθητοποίηση,



ακίνητοποιήθηκε το πειραματόζωο και έγινε μια μικρή τομή στο ανώτερο δεξιό τμήμα της ωμοπλάτης. Κατόπιν το πειραματόζωο τραυματίστηκε με νυστέρι ελαφρά εσωτερικά της τομής και προκλήθηκε αιμορραγία. Εκείνη τη στιγμή έγινε έγχυση 1ml του κυτταρικού διαλύματος. Μια ποσότητα κυτταρικού διαλύματος προστέθηκε ξανά σε καλλιεργητικό υγρό (DMEM) και πραγματοποιήθηκε παράλληλα έλεγχος για την ικανότητα ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Έγινε προσεκτική συρραφή της τομής με ράμματα 5-0 ή 4-0 και στη συνέχεια το κάθε πειραματόζωο τοποθετήθηκε σε ξεχωριστό κλουβί μέχρι να συνέλθει από την αναισθησία. Αυτό έγινε για να αποφευχθεί το φαινόμενο του «κανιβαλισμού», όπου το ένα πειραματόζωο τρώει το άλλο όταν μυριστεί πληγή και αίμα. Τα πειραματόζωα ελέγχονταν δύο φορές την ημέρα για τις πρώτες 10 ημέρες όπου και υπήρξαν οι πρώτοι ψηλαφητοί όγκοι.



**Εικόνα 3.24** Διαδικασία ενοφθαλισμού LMS κυττάρων σε επίμυες Wistar. A) Αναισθητοποίηση, B) Ψηλάφηση της ωμοπλάτης όπου θα γίνει η τομή, Γ, Δ και E) Δημιουργία κατάλληλης τομής, Z) Τραυματισμός των παρακείμενων στην ωμοπλάτη μυών, H) Ενοφθαλισμός (έγχυση LMS κυττάρων, Θ) Κλείσιμο της τομής με ράμματα.

### 3.3.3 Αντικαρκινική δράση σε καρκινοπαθείς επίμυες Wistar

Σε αυτό το κομμάτι της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν ενοφθαλμισμοί (βλ.υποενότητα 3.3.2.1.β) σε θηλυκούς επίμυες Wistar 12 εβδομάδων και βάρους  $195 \pm 10\text{g}$ , οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να ελεγχθούν οι *in vivo* αντικαρκινικές ιδιότητες του συμπλόκου Ag[3] στην ελεύθερη αλλά και στην ενσωματωμένη μορφή του σε λιποσώματα.

35 επίμυες Wistar με ανάπτυξη ψηλαφητού όγκου στην δεξιά ωμοπλάτη (>1cm) χωρίστηκαν τυχαία σε 5 ομάδες:

1. ΟΕ: Ομάδα ελέγχου, πειραματόζωα τα οποία δεν έλαβαν καμία θεραπεία και αφέθηκαν μέχρι να καταλήξουν.
2. ΟΠ1: Πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε IP μικρή δόση (8mg/kg ΣΒ) της ελεύθερης μορφής του συμπλόκου, διαλυμένου σε 1ml τρικαπρυλίνης. Λήφθησαν 6 δόσεις, μία δόση κάθε 3<sup>ο</sup> συμπληρωμένο 24ωρο από την 1<sup>η</sup> δόση κ.ο.κ (Διάρκεια θεραπείας 16 ημέρες από την 1<sup>η</sup> δόση μέχρι και την 6<sup>η</sup> δόση).
3. ΟΠ2: Πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε IP μεγάλη δόση (27mg/kg ΣΒ) της ελεύθερης μορφής του συμπλόκου, διαλυμένου σε 1ml τρικαπρυλίνης. Λήφθησαν 6 δόσεις, μία δόση κάθε 3ο συμπληρωμένο 24ωρο από την 1η δόση κ.ο.κ (Διάρκεια θεραπείας 16 ημέρες από την 1η δόση μέχρι και την 6η δόση).
4. ΟΠL: Πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε IV, 1ml από το λιποσωματικό εναιώρημα των 30mg/ml λιπιδίων χωρίς σύμπλοκο. Λήφθησαν 6 δόσεις, μία δόση κάθε 3ο συμπληρωμένο 24ωρο από την 1η δόση κ.ο.κ (Διάρκεια θεραπείας 16 ημέρες από την 1η μέχρι και την 6η δόση).
5. ΟΠLAg: Πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε IV, 1ml από το λιποσωματικό εναιώρημα των 30mg/ml λιπιδίων με σύμπλοκο (Δόση συμπλόκου Ag[3] ~2.5μg/kg ΣΒ). Λήφθησαν 6 δόσεις, μία δόση κάθε 3ο συμπληρωμένο 24ωρο από την 1η δόση κ.ο.κ (Διάρκεια θεραπείας 16 ημέρες από την 1η μέχρι και την 6<sup>η</sup> δόση).

Όλα τα πειραματόζωα ελέγχονταν μία φορά την ημέρα. Μετά τον θάνατο του κάθε ζώου, καταγράφηκε η ημερομηνία, πραγματοποιήθηκε αυτοψία, τα εσωτερικά όργανα μονιμοποιήθηκαν σε φορμαλδεΰδη 10% και πραγματοποιήθηκε ιστοπαθολογική μελέτη.

Βάσει των ημερομηνιών θανάτου, υπολογίστηκαν και για τις δύο ομάδες ο μέσος όρος επιβίωσης (MST), το μέσο βάρος του όγκου (MTW) και ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης του

όγκου (MTGR). Ο ρυθμός ανάπτυξης του όγκου για κάθε πειραματόζωο υπολογίστηκε από την παρακάτω σχέση:

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

### 3.3.3.1 Χορηγία Λιποσωμάτων

Ενώ η χορηγία του ελεύθερου συμπλόκου σε τρικαπρυλίνη, που πραγματοποιήθηκε με τη έγχυση του διαλύματος στην ενδοπεριτοναϊκή χώρα είναι μια σχετικά εύκολη διαδικασία, η χορήγηση των λιποσωμάτων πραγματοποιήθηκε ενδοφλέβια (IV), διαδικασία που είναι δυσκολότερη και απαιτεί λεπτότερους χειρισμούς αλλά και μια σειρά διατάξεων προκειμένου το ζώο να αναισθητοποιηθεί.

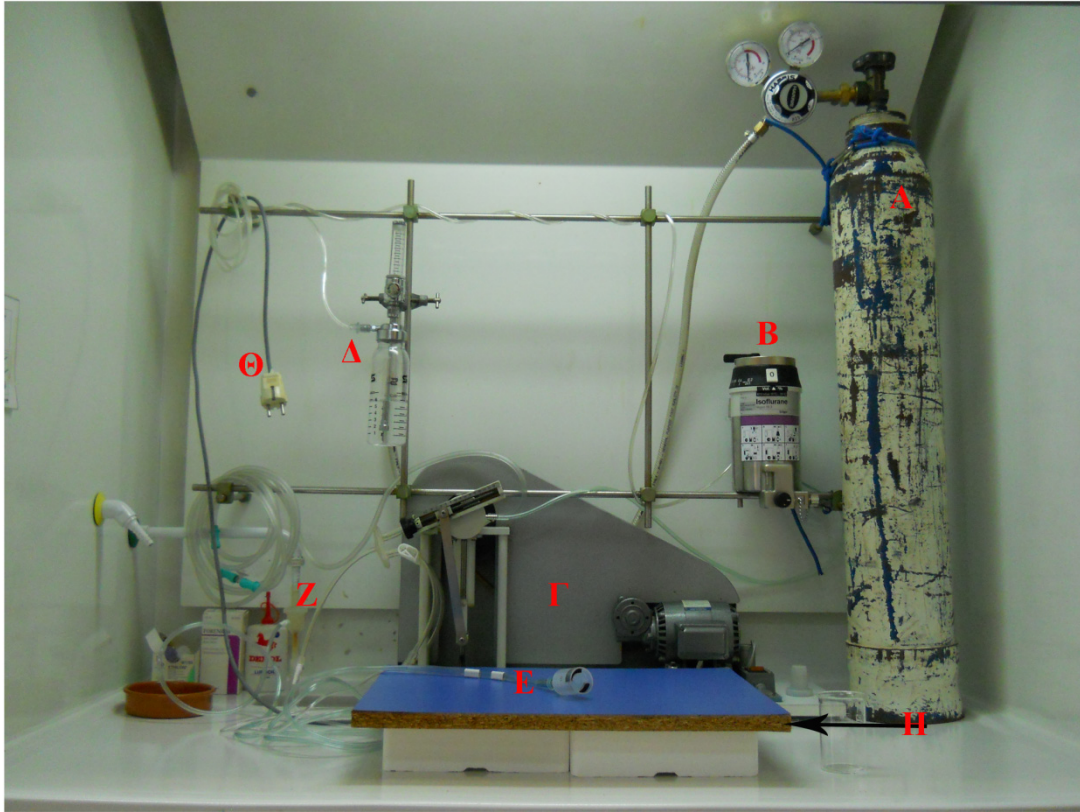
#### 3.3.3.1.α. Πειραματική Διάταξη Χορήγησης Πτητικής Αναισθησίας

Υλικά-Οργανολογία

- ❖ Ισοφλουράνιο, Forenium<sup>®</sup> (Isoflurane 99.9% w/w), ABBOTT, No B506
- ❖ Ηλεκτρικό μοτέρ Parvalux (V:220/240, A:0.37, Hz: 50, W: 35, RPM: 1400), England, σε συσκευή παροχής μηχανικού αερισμού συνεχών θετικών πιέσεων, Harvard Aparatus Limited.
- ❖ Φιάλη Οξυγόνου
- ❖ Ειδικό δοχείο αποθήκευσης του πτητικού αναισθητικού ισοφλουρανίου, Isoflurane Vapor 19.3, Dräger Medizintechnik GmbH, Lübeck, Germany, Fabr. Nr. ARND-0516
- ❖ Ειδική κατασκευασμένη προσωπίδα για χορήγηση εισπνεόμενης αναισθησίας σε επίμυες

Πειραματική Διαδικασία

Η πειραματική διάταξη για τη διατήρηση της αναισθησίας των επίμυων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.25. Αποτελείται από μια φιάλη οξυγόνου, μια αναπνευστική συσκευή μηχανικού αερισμού συνεχών θετικών πιέσεων, ειδικό δοχείο αποθήκευσης του πτητικού αναισθητικού ισοφλουρανίου και μία ειδική κατασκευασμένη προσωπίδα για την παροχή εισπνεόμενης αναισθησίας στους επίμυες.



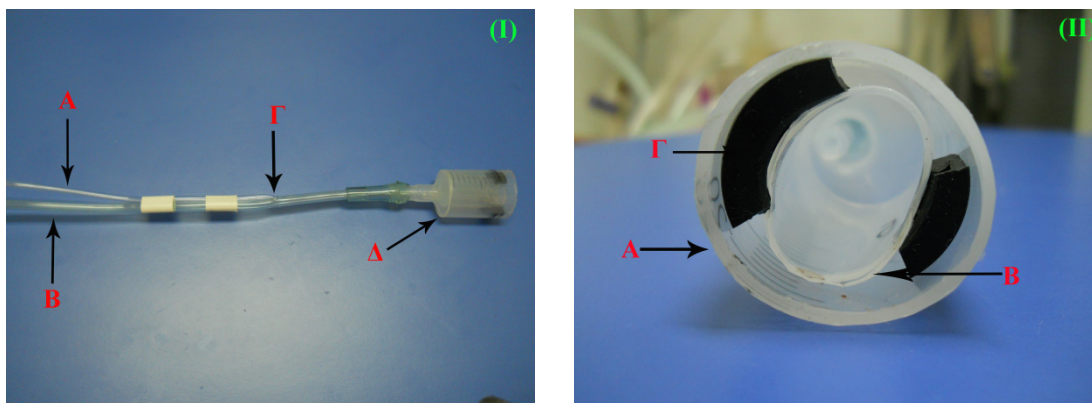
**Εικόνα 3.25** Η διάταξη έχει σχηματιστεί μέσα σε απαγωγό ώστε να εξαληφθεί οποιαδήποτε πιθανότητα διαρροής του ισοφλουρανίου. Α) Φιάλη οξυγόνου, Β) Δοχείο ισοφλουρανίου, Γ) αναπνευστική συσκευή μηχανικού αερισμού συνεχών θετικών πιέσεων Δ) Ρυθμιστής ροής οξυγόνου και μίξης με το πτητικό αναισθητικό, Ε) Προσωπίδα παροχής αναισθησίας, Ζ) αρνητικής πίεσης σωλήνας συνδεδεμένος στη βρύση του απαγωγού που ενώνεται με τον έναν από τους δύο σωλήνες της προσωπίδας, Η) επιφάνεια εργασίας, Θ) Πρίζα τροφοδοσίας ηλεκτρικού ρεύματος της συσκευής μηχανικού αερισμού.

### 3.3.3.1.β. Κατασκευή Προσωπίδας

Προκειμένου να γίνει παροχή της εισπνεόμενης αναισθησίας στους καρκινοπαθείς επίμυες προτιμήθηκε η χρήση προσωπίδας. Η προσωπίδα κατασκευάστηκε από φτηνά υλικά και παρείχε το πλεονέκτημα της άμεσης, εύκολης και ακίνδυνης χρήσης της έναντι για παράδειγμα της στοματοτραχειακής διασωλήνωσης.

Αποτελείται ουσιαστικά από ένα μικρότερο πλαστικό, εύκαμπτο σωλήνα μέσα σε ένα μεγαλύτερο, πλαστικό και εύκαμπτο σωλήνα όπου ο μικρότερος είναι συνδεδεμένος με τον εξαερωτήρα της αναισθητικής μηχανής και ο μεγαλύτερος με το σωλήνα απαγωγής. Στην άκρη των σωλήνων αυτών είναι συνδεδεμένα τεμάχια από σύριγγες (η μικρότερη σύριγγα στο μικρό (εσωτερικό σωλήνα) και η μεγάλη στον εξωτερικό οι οποίες σχηματίζουν την προσωπίδα. Το πρόσωπο του επίμυ εφαρμόζει στην μικρή και εσωτερική

παροχή ενώ η μεγάλη καλύπτει ένα ευρύτερο μέρος του προσώπου του. Έτσι οποιαδήποτε ποσότητα ισοφλουρανίου διαρρέυσει από την εσωτερική παροχή θα απαχθεί από το μεγαλύτερο σωλήνα αναρρόφησης. Οι Balafas και συνεργάτες δίνουν μια αναλυτικότερη περιγραφή της κατασκευής της μάσκας στη δημοσίευσή τους το 2011 (Balafas 2011).



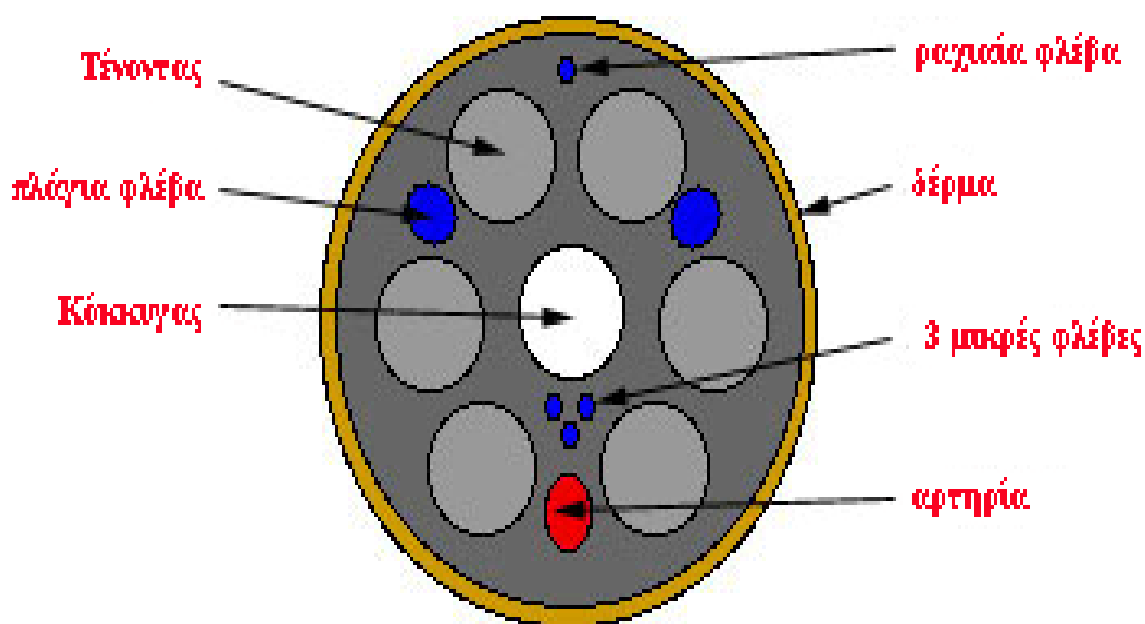
**Εικόνα 3.26** Διάφορες απόψεις της προσωπίδας. (I) A) σωλήνας παροχής αναισθησίας, B) σωλήνας αναρρόφησης, Γ) Σημείο εισόδου του σωλήνα παροχής αναισθησίας στο σωλήνα αναρρόφησης, Δ) προσωπίδα. (II) A) Μεγάλη σύριγγα συνδέεται με το σωλήνα αναρρόφησης, B) μικρή σύριγγα συνδέεται με το σωλήνα παροχής της αναισθησίας, Γ) τμήματα από το πλαστικό έμβολο της σύριγγας τα οποία είναι τοποθετημένα στο κενό διάστημα μεταξύ των τοιχωμάτων των δύο συρίγγων.

### 3.3.3.1.γ. Ενδοφλέβια χορήγηση των λιποσωμάτων

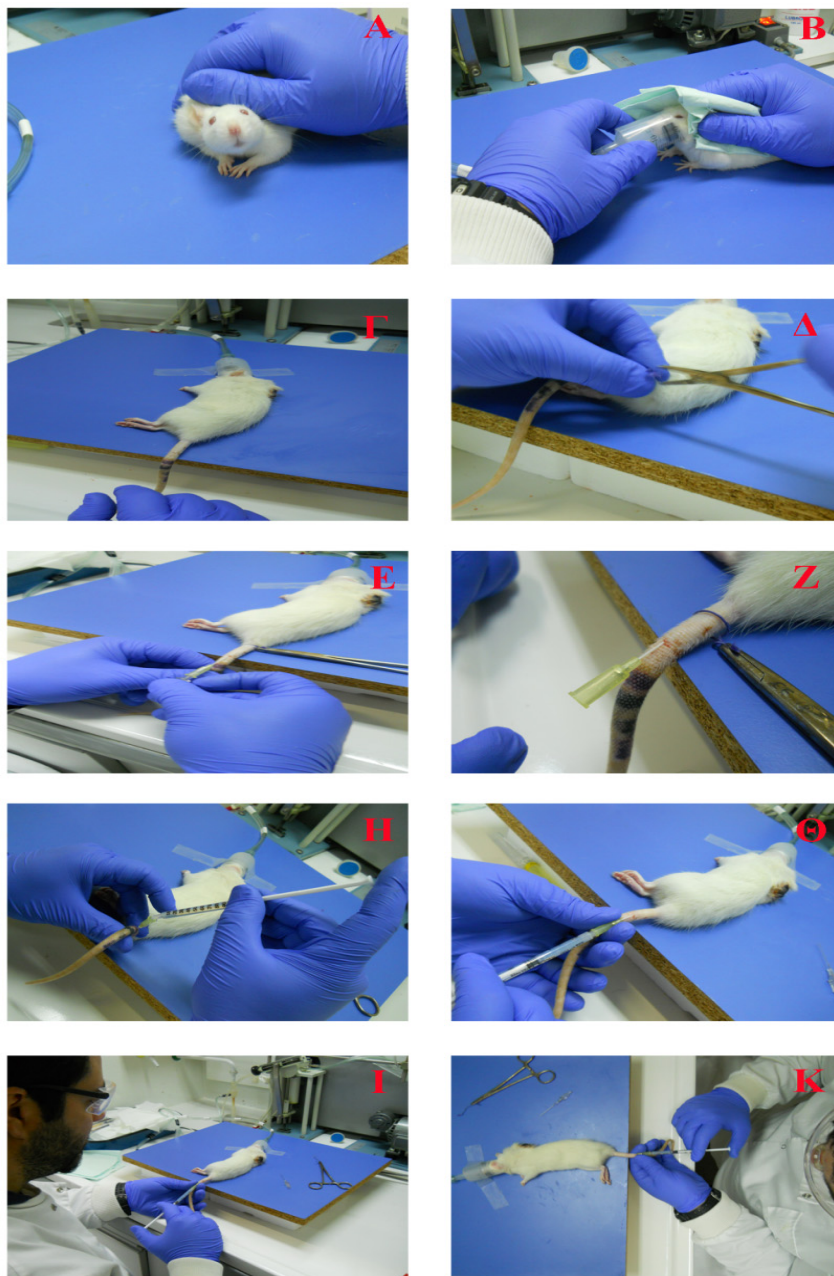
Τα πρώτο στάδιο είναι η επανασύσταση των λυοφιλοποιημένων λιποσωμάτων με κατάλληλο όγκο ddH<sub>2</sub>O (όσο είχαν πριν τη λυοφιλοποίηση). Η χορηγούμενη δόση των λιποσωμάτων (με και χωρίς σύμπλοκο) ήταν το 1ml το οποίο είναι κοντά στο ανώτερο όριο ενδοφλέβιας χορήγησης σε επίμυες Wistar αλλά και επειδή η χορήγηση μεγαλύτερης ποσότητας αυξάνει το ήδη μεγάλο κόστος της παρασκευής των λιποσωμάτων. Η δόση χορήγησης του λιποσωματικού συμπλόκου [3] ήταν τα 0.0025mg/kg ΣΒ (ή 2.5μg/kg ΣΒ).

Η υπόλοιπη διαδικασία έχει ως εξής: Το πειραματόζωο ακινητοποιήθηκε και στο πρόσωπό του εφαρμόστηκε η προσωπίδα η οποία παρείχε την πτητική αναισθησία. Μόλις αναισθητοποιήθηκε (~ 30sec), δέσαμε τη βάση της ουράς με ένα ράμμα και σφίξαμε με μια λαβίδα mosquito (με ευθύ ρύγχος). Η περιοχή της ουράς απολυμάνθηκε με αιθανόλη 70% και σκουπίστηκε με γάζα. Έπειτα, με ένα φλεβοκαθετήρα 24G πραγματοποιήθηκε καθετηριασμός της πλάγιας κοκκυγικής φλέβας (Εικόνα 3.26). Η είσοδος της βελόνας έγινε σχεδόν παράλληλα με το αγγείο μειώνοντας έτσι τις πιθανότητες να περάσουμε κάτω

από αυτό. Μόλις εισήλθαμε στη φλέβα, αφαιρέσαμε τη βελόνα και αίμα εισήλθε στο μπεκ του καθετήρα (ένδειξη ότι είμαστε μέσα στη φλέβα) και παράλληλα εισάγαμε βαθύτερα τον καθετήρα στη φλέβα όπου η διαδικασία αυτή γίνεται με άνεση εάν ο καθετηριασμός είναι επιτυχής. Αμέσως απελευθερώσαμε την βάση της ουράς από το ράμμα που την έσφιγγε απελευθερώνοντας το από την mosquito. Εν συνεχεία, σηκώσαμε την ουρά με τον καθετήρα προς τα πάνω και στο μπεκ του καθετήρα στάξαμε πολύ προσεκτικά 1-2 σταγόνες από το λιποσωμιακό μας ελαιώρημα ώστε να αφαιρέσουμε τον αέρα, και μετά προσαρμόσαμε τη σύριγγα του 1ml που περιείχε το δείγμα μας στο μπεκ του καθετήρα και αρχίσαμε τη χορήγηση. Η χορήγηση 1ml λιποσωμάτων διήρκησε περίπου 1.5-2min. Με το τέλος της χορήγησης, αφαιρέσαμε την άδεια σύριγγα και με μια γάζα κρατήσαμε την ουρα και τον καθετήρα στο σημείο εισόδου του καθετήρα στη φλέβα. Έπειτα πιέζοντας ελαφρά το σημείο αυτό αφαιρέσαμε τον καθετήρα και αμέσως αφαιρέσαμε και την προσωπίδα της αναισθησίας από το πειραματόζωο. Η επαναφορά των αισθήσεων του πειραματόζωου ήταν σχετικά άμεση με χρόνους περίπου 1-3min.



**Εικόνα 3.27** Εγκάρσια τομή της ουράς επίμους Wistar. Ο καθετηριασμός πραγματοποιήθηκε στην μία από τις δύο πλάγιες φλέβες (μεγάλοι μπλε κύκλοι).



**Εικόνα 3.28** Παρουσιάζονται τα διάφορα στάδια της χορήγησης των λιποσωμάτων. Α) Το πειραματόζωο τοποθετείτε στην επιφάνεια εργασίας και το κρατάμε απαλά για να ηρεμήσει, Β) Προσαρμόζουμε την προσωπίδα παροχής εισπνεόμενης αναισθησίας στα πρόσωπο του, Γ) Το πειραματόζωο έχει αναισθητοποιηθεί και ακινητοποιούμε την προσωπίδα στην επιφάνεια εργασίας με ταινία, Δ) Δένουμε τη βάση της ουράς με ράμμα και σφίγγουμε (με την πίεση αποκαλύπτεται η φλέβα), Ε) καθετηριάζουμε την πλάγια κοκκυγική φλέβα, Ζ) εισάγουμε το καθετήρα βαθύτερα (η ευκολία εισαγωγής υποδηλώνει τον επιτυχή καθετηριασμό, Η) τοποθετούμε 1-2 σταγόνες από το δείγμα μας στο μπεκ ώστε να αφαιρέσουμε το κενό. Σε περίπτωση που δεν το κάνουμε αυτό και εισάγουμε φυσαλίδα αέρα στην κυκλοφορία του αίματος είναι πολύ πιθανό το πειραματόζωο να πεθάνει από εμβολή, Θ, Ι, Κ) Χορήγηση των λιποσωμάτων.

### **3.4 Στατιστική ανάλυση**

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



## ***4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ***



## 4.1 In Vitro

### 4.1.1. Μελέτες Κυτταροτοξικότητας

#### 4.1.1.1 Δοσοεξαρτώμενη Μελέτη του Προσδιορισμού των IC<sub>50</sub> τιμών

Με τη μέθοδο του MTT (MTT assay) προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά 50% που προκάλεσαν τα συμπλόκα [1], [2], [3], [4] και οι υποκαταστάτες τους μετά την προσθήκη τους στις κυτταρικές σειρές ελέγχου σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις και σε χρονική περίοδο επώασης 48 ωρών (Πίνακας 4.1).

	IC <sub>50</sub> (μM)			
	<i>MRC5</i>	<i>LMS</i>	<i>MCF7</i>	<i>A549</i>
TZD	25.49 ±1.33	21.19 ±0.47	32.37 ±0.52	17.30 ±0.55
BZT	23.19 ±1.42	19.93 ±0.14	31.55 ±0.18	21.16 ±1.65
CBZT	25.50 ±0.88	20.72 ±3.34	52.69 ±2.52	21.99 ±2.2
MMI	22.10 ±0.57	33.26 ±5.16	19.19 ±1.05	17.44 ±1.09
TPP	68.10 ±3.74	74.36 ±8.49	93.29 ±7.62	87.22 ±2.63
[1]	27.75 ±3.47	6.99 ±0.83	9.41 ±1.95	9.78 ±0,66
[2]	7.81 ±0.98	2.69 ±0.08	2.90 ±0.34	3.12 ±0,47
[3]	14.08 ±1.08	2.77 ±0.36	3.31 ±0.28	3,19 ±0,94
[4]	7.10 ±0.83	2.88 ±0.69	2.48 ±0.61	3,56 ±0,54
cisplatin	13.23 ±1,25	5.48 ±0.53	32.85 ±2.39	12.53 ±1.22

**Πίνακας 4.1** Παρουσιάζονται οι IC<sub>50</sub> (μM) τιμές των συμπλόκων και των υποκαταστατών προς τις κυτταρικές σειρές που ελέγχθησαν μετά από επώαση 48ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

Πραγματοποιήθηκε επίσης μια περαιτέρω μελέτη ελέγχου (screening) της πρόκλησης αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού του συμπλόκου [3] απέναντι σε διάφορες άλλες κυτταρικές σειρές διαθέσιμες προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχει τυχόν κυτταρική επιλεκτικότητα του συγκεκριμένου συμπλόκου. Αυτή η μελέτη

πραγματοποιήθηκε χρονικά μετά τη μελέτη του μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου μέσω κυτταρομετρίας ροής και αφού το σύμπλοκο [3] είχε επιλεγεί ως ιδανικότερο των τεσσάρων για την περαιτέρω μελέτη της βιοδραστικότητας και του μηχανισμού δράσης του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται εδώ λόγω μεγαλύτερης συνάφειας αντικειμένου ανάλυσης. Στην ίδια μελέτη ελέγχθηκε και η cisplatin απέναντι στις ίδιες κυτταρικές σειρές συγκριτικά (Πίνακας 4.2).

	IC <sub>50</sub> (μM)					
	<i>HeLa</i>	<i>U2OS</i>	<i>DUI45</i>	<i>PCI2</i>	<i>A431</i>	<i>H1299</i>
[3]	2.86±0.65	3.39±0.76	4.52±1.24	1.22±0.86	4.69±1.27	2.32±0.88
cisplatin	5.54±0.68	20.51±1.25	3.85±1.30	8.45±1.12	10.39±1.39	50.71±7.25

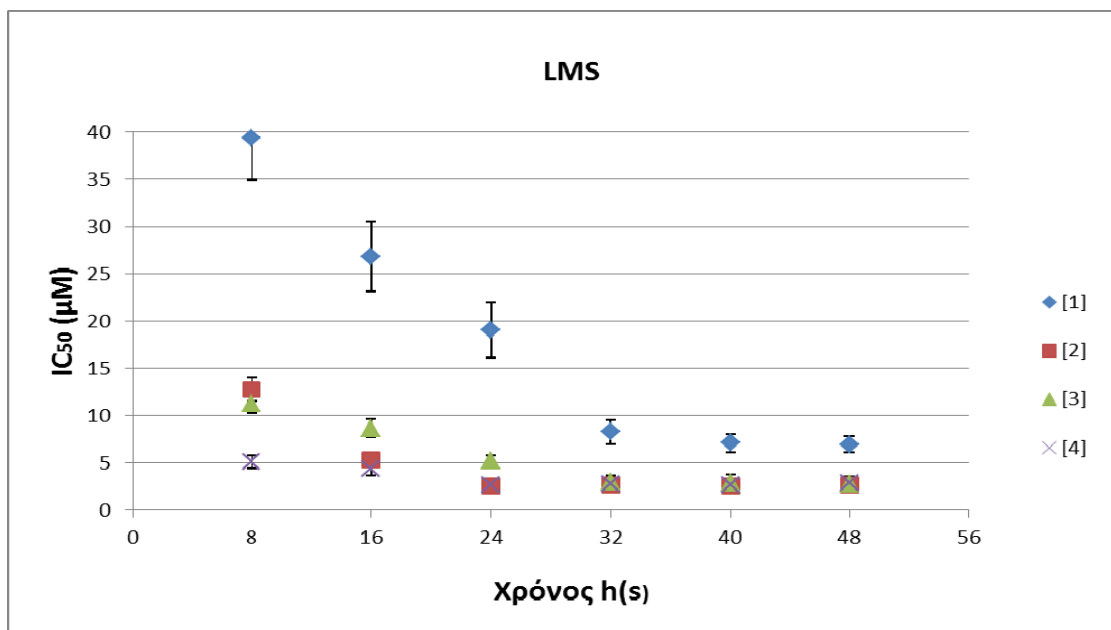
**Πίνακας 4.2** Παρουσιάζονται οι IC<sub>50</sub> τιμές του συμπλόκου [3] και της cisplatin σε διάφορες κυτταρικές σειρές έπειτα από επώαση 48 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

#### 4.1.1.2 Χρονοεξαρτώμενη Μελέτη του Προσδιορισμού των IC<sub>50</sub> τιμών

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν οι IC<sub>50</sub> που προκάλεσαν τα σύμπλοκα [1], [2], [3], και [4] μετά την προσθήκη τους στις κυτταρικές σειρές ελέγχου, LMS και MCF7, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις και έπειτα από επώαση των συμπλόκων 8 – 48 ωρών (με διαστήματα των 8 ωρών), με τη μέθοδο MTT.

<i>LMS</i>	IC <sub>50</sub> (μM)			
	[1]	[2]	[3]	[4]
Χρόνος (h)				
8	39.39 ±4.45	12.76 ±1.23	11.34 ± 1.01	5.13 ±0.71
16	26.79 ±3.67	5.34 ±0.68	8.67 ±0.97	4.35 ±0.63
24	19.1 ±2.91	2.55 ±0.12	5.19 ±0.58	2.73 ±0.67
32	8.29 ±1.3	2.64 ±0.18	3.04 ±0.69	2.81 ±0.72
40	7.12 ±0.95	2.53 ±0.15	2.94 ±0.84	2.73 ±0.58
48	6.99 ±0.83	2.69 ±0.08	2.77 ±0.36	2.88 ±0.69

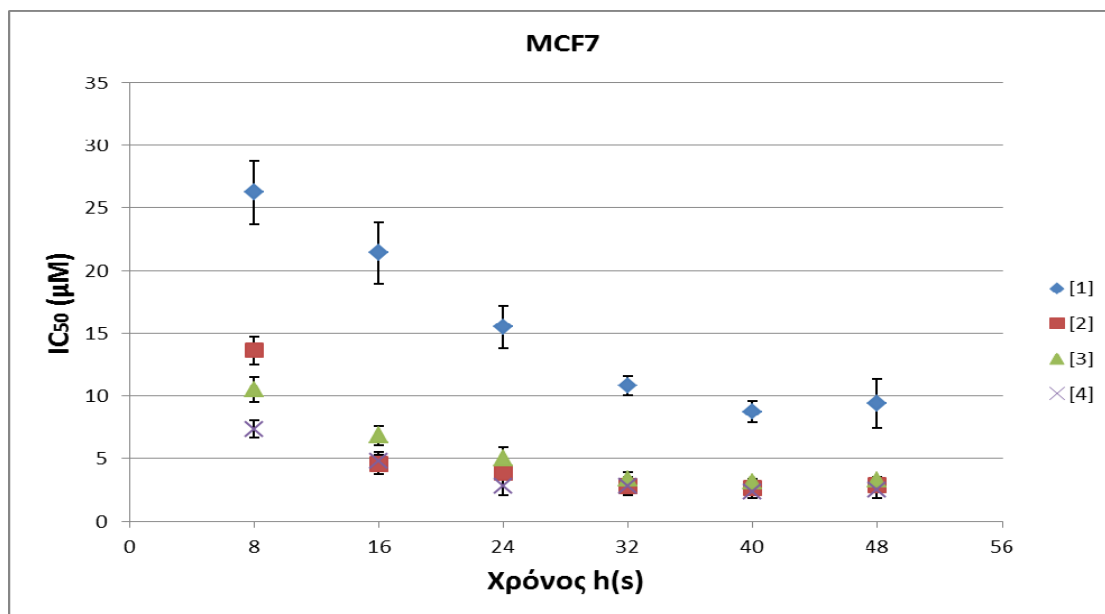
**Πίνακας 4.3** Παρουσιάζονται οι IC<sub>50</sub> τιμές και των τεσσάρων συμπλόκων στην κυτταρική σειρά LMS, μετρημένες μετά από επώαση χρονικών περιόδων των 8 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.



**Γράφημα 4.1** Παρουσιάζει την διακύμανση των  $IC_{50}$  τιμών για κάθε ένα από τα σύμπλοκα σε σχέση με το χρόνο στα LMS κύτταρα.

<i>MCF7</i>	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )			
Χρόνος (h)	[1]	[2]	[3]	[4]
8	$26.27 \pm 2.54$	$13.62 \pm 1.14$	$10.52 \pm 1.02$	$7.36 \pm 0.69$
16	$21.43 \pm 2.43$	$4.55 \pm 0.76$	$6.86 \pm 0.76$	$4.78 \pm 0.75$
24	$15.51 \pm 1.68$	$3.84 \pm 0.58$	$5.04 \pm 0.84$	$2.8 \pm 0.68$
32	$10.81 \pm 0.78$	$2.8 \pm 0.39$	$3.42 \pm 0.51$	$2.8 \pm 0.74$
40	$8.72 \pm 0.86$	$2.66 \pm 0.43$	$3.14 \pm 0.18$	$2.32 \pm 0.43$
48	$9.41 \pm 1.95$	$2.9 \pm 0.34$	$3.31 \pm 0.28$	$2.48 \pm 0.61$

**Πίνακας 4.4** Παρουσιάζονται οι  $IC_{50}$  τιμές και των τεσσάρων συμπλόκων στην κυτταρική σειρά MCF7, μετρημένες μετά από επώαση χρονικών περιόδων των 8 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τ.α.

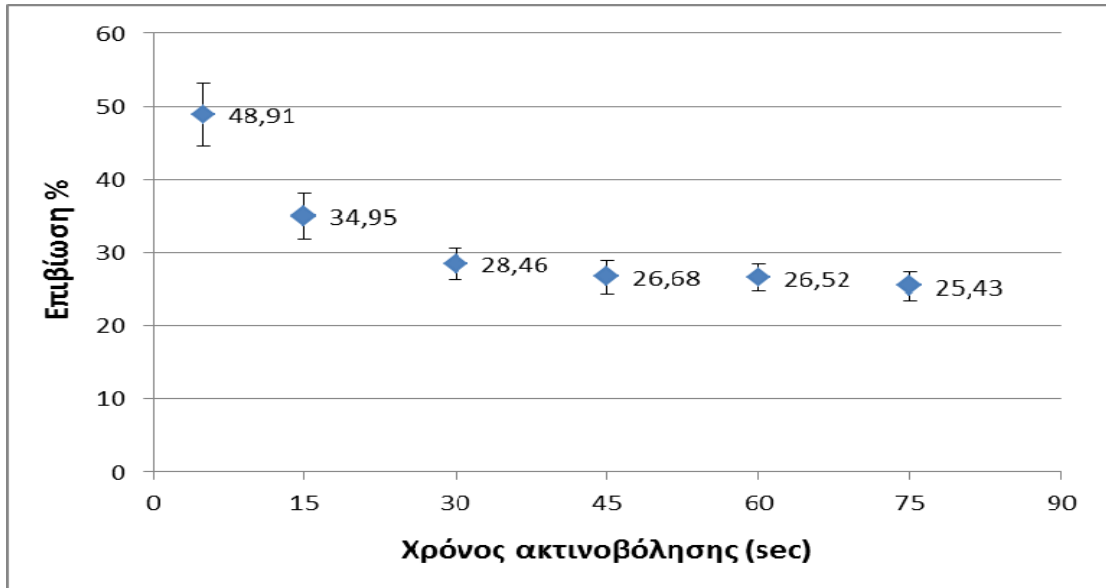


**Γράφημα 4.2** Παρουσιάζει την διακύμανση των IC<sub>50</sub> τιμών για κάθε ένα από τα σύμπλοκα σε σχέση με το χρόνο στα MCF7 κύτταρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

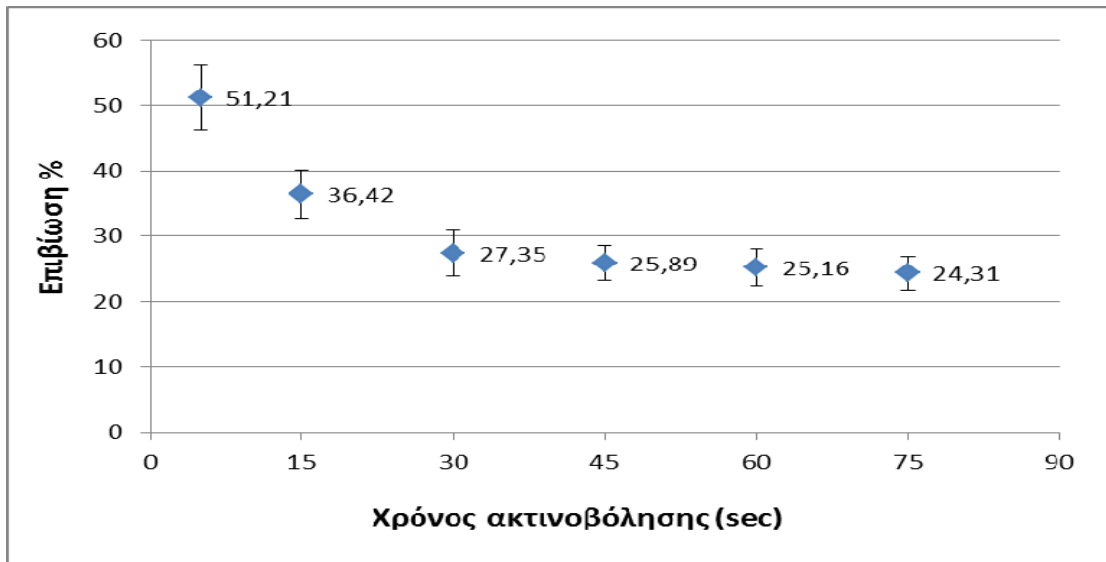
Από τα γραφήματα 4.1 και 4.2 που αναφέρονται για τις κυτταρικές σειρές LMS και MCF7 αντίστοιχα, αλλά και από τους Πίνακες 4.3 και 4.4. παρατηρούμε ότι για τα σύμπλοκα [1] και [3] δεν υπάρχει περαιτέρω μείωση στην προκαλούμενη κυτταροτοξικότητα και στις δύο κυτταρικές σειρές μετά τις 32 ώρες επώασης τους με τα κύτταρα, ενώ για τα σύμπλοκα [2] και [4] δεν υπάρχει περαιτέρω μεταβολή στην προκαλούμενη κυτταροτοξικότητα μετά από τις 24 ώρες. Η μελέτη αυτή μας βοήθησε ώστε να αποφασίσουμε τη χρονική περίοδο στην οποία θα ακτινοβολούσαμε τα κύτταρα που είχαν ήδη λάβει φάρμακο ώστε να υπάρξει πιθανή φωτοενεργοποίηση των συμπλόκων και ταυτόχρονα μετρήσιμη μεταβολή.

#### 4.1.1.3 Μελέτη Φωτοενεργοποίησης των Συμπλόκων-Ag(I) με UVC

Στην παρούσα μελέτη ελέγξαμε την επίδραση στην κυτταροτοξικότητα των συμπλόκων [1], [2], [3], και [4] σε κύτταρα LMS και MCF7 έπειτα από την ενεργοποίηση τους με ακτινοβολία UVC. Πρώτα όμως μελετήσαμε τη επίδραση της UVC ακτινοβολίας στα ίδια τα LMS και MCF7 κύτταρα.



**Γράφημα 4.3** Παρουσιάζονται τα ποσοστά επιβίωσης των LMS κυττάρων σε σχέση με το χρόνο έκθεσης στην ακτινοβολία UVC. Τα ποσοστά αυτά εμφανίζονται σε σχέση με κύτταρα LMS τα οποία δεν ακτινοβολήθηκαν και των οποίων η ανάπτυξη στους ίδιους χρόνους λήφθηκε ως το 100%. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τ.α.



**Γράφημα 4.4** Παρουσιάζονται τα ποσοστά επιβίωσης των MCF7 κυττάρων σε σχέση με το χρόνο έκθεσης στην ακτινοβολία UVC. Τα ποσοστά αυτά εμφανίζονται σε σχέση με κύτταρα MCF7 τα οποία δεν ακτινοβολήθηκαν και των οποίων η ανάπτυξη στους ίδιους χρόνους λήφθηκε ως το 100%. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τ.α.

Από τα Γραφήματα 4.3 και 4.4 παρατηρούμε ότι η επίδραση της ακτινοβολίας UVC είναι άμεσα καταστρεπτική και για τις δύο κυτταρικές σειρές. Η επιβίωση των κυττάρων μειώνεται στο 50% μόλις στα 5 πρώτα sec της έκθεσης στην ακτινοβολία. Έτσι ως χρόνος έκθεσης στην UVC ακτινοβολία καθορίστηκαν τα 5sec.

<i>LMS</i>			
Σύμπλοκο	IC <sub>50</sub> (μM) Χωρίς ακτινοβόληση	IC <sub>50</sub> (μM) Με ακτινοβόληση	% διαφορά
[1]	6.99 ± 0.83	5.26 ± 0.33	-25.03*
[2]	2.69 ± 0.08	2.05 ± 0.01	-23.66*
[3]	2.77 ± 0.36	1.95 ± 0.15	-29.61*
[4]	2.88 ± 0.69	2.12 ± 0.09	-26.38

**Πίνακας 4.5** Παρουσιάζονται οι τιμές IC<sub>50</sub> των συμπλόκων για τα κύτταρα LMS χωρίς και με έκθεση στην ακτινοβολία UVC καθώς και η % διαφορά.. Οι τιμές στην % διαφορά εμφανίζονται με αρνητικό πρόσημο για να υποδηλώσουν μείωση της IC<sub>50</sub> τιμής. \*Στατιστικά σημαντική μείωση, p<0.05. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

<i>MCF7</i>			
Σύμπλοκο	IC <sub>50</sub> (μM) Χωρίς ακτινοβόληση	IC <sub>50</sub> (μM) Με ακτινοβόληση	% διαφορά
[1]	9.41 ± 1.95	7.95 ± 0.41	-15.48*
[2]	2.90 ± 0.34	2.30 ± 0.06	-20.55*
[3]	3.31 ± 0,28	2.71 ± 0.15	-18.13*
[4]	2.48 ± 0.61	2.38 ± 0.20	-11.72

**Πίνακας 4.6** Παρουσιάζονται οι τιμές IC<sub>50</sub> των συμπλόκων για τα κύτταρα MCF7 χωρίς και με έκθεση στην ακτινοβολία UVC καθώς και η % διαφορά.. Οι τιμές στην % διαφορά εμφανίζονται με αρνητικό πρόσημο για να υποδηλώσουν μείωση της IC<sub>50</sub> τιμής. \*Στατιστικά σημαντική μείωση, p<0.05. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

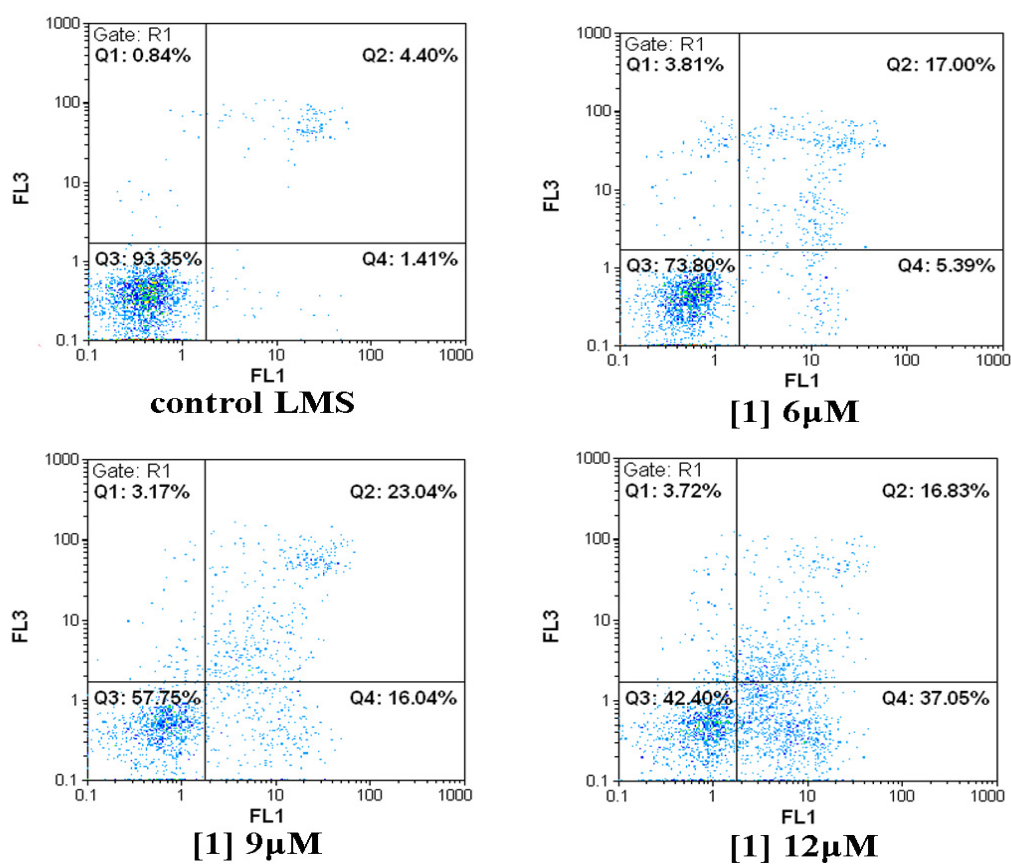
Σύμφωνα τους Πίνακες 4.5 και 4.6 παρατηρούμε ότι η οι τιμές IC<sub>50</sub> και των τεσσάρων συμπλόκων μετά την έκθεση τους σε ακτινοβολία UVC έχουν μειωθεί σε σύγκριση με τις τιμές IC<sub>50</sub> των μη ακτινοβολημένων συμπλόκων και μάλιστα αυτή η



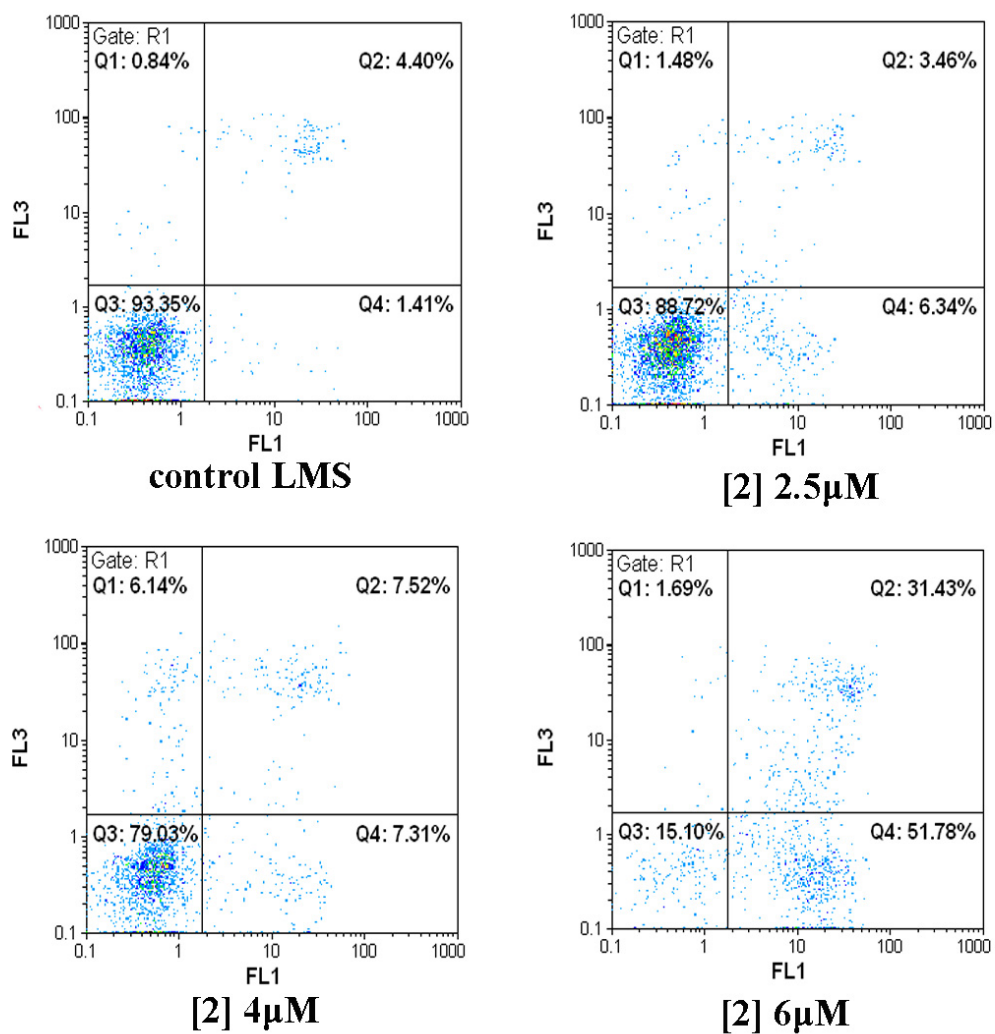
μείωση είναι στατιστικά σημαντική στα σύμπλοκα [1], [2] και [3]. Μάλιστα, στην περίπτωση του [3], η μείωση της τιμής  $IC_{50}$  στα LMS κύτταρα μειώθηκε σχεδόν 30%.

#### 4.1.2 Κυτταρομετρία Ροής-Μελέτη Απόπτωσης/Νέκρωσης

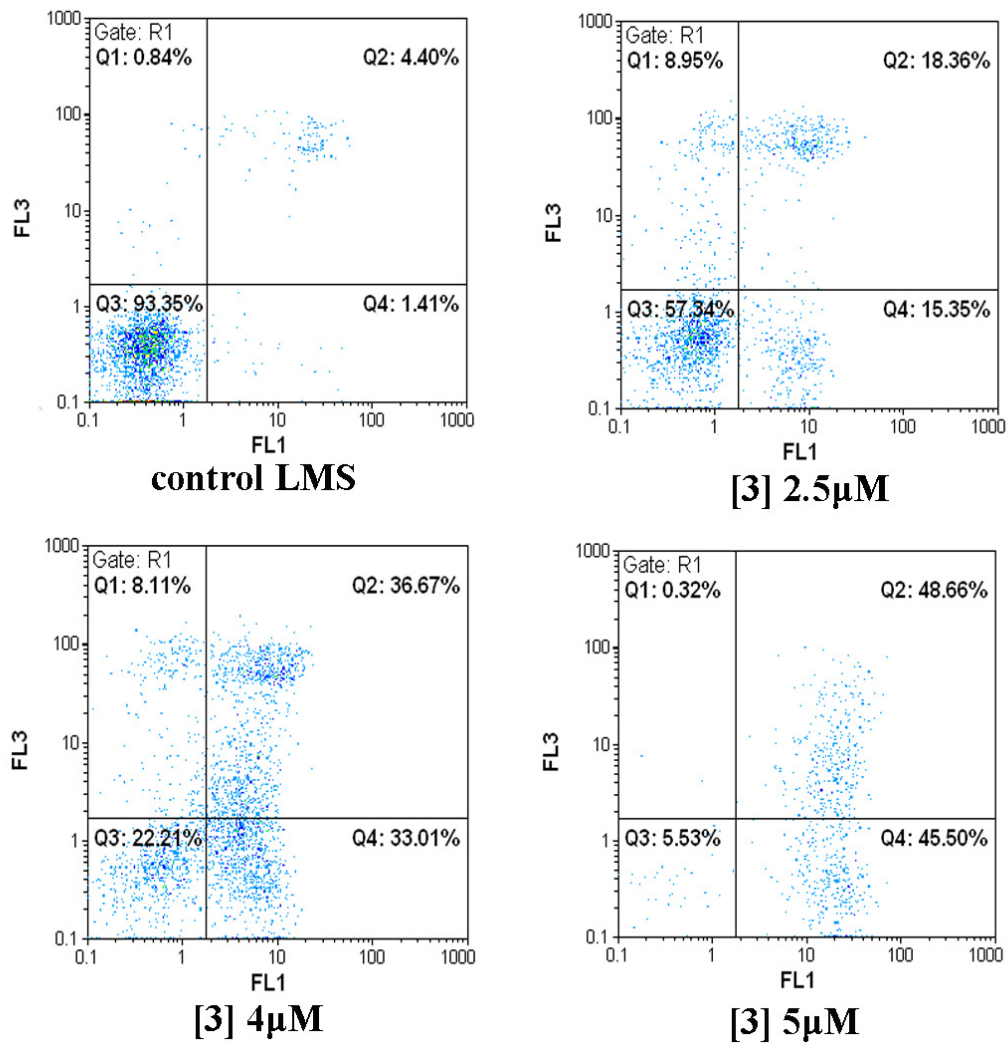
Με την κυτταρομετρία ροής, πραγματοποιήθηκε η μελέτη της ανίχνευσης του είδους του κυτταρικού θανάτου που προκαλούν τα σύμπλοκα του Ag(I) στα LMS κύτταρα. Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα σύμπλοκα [1], [2], [3].



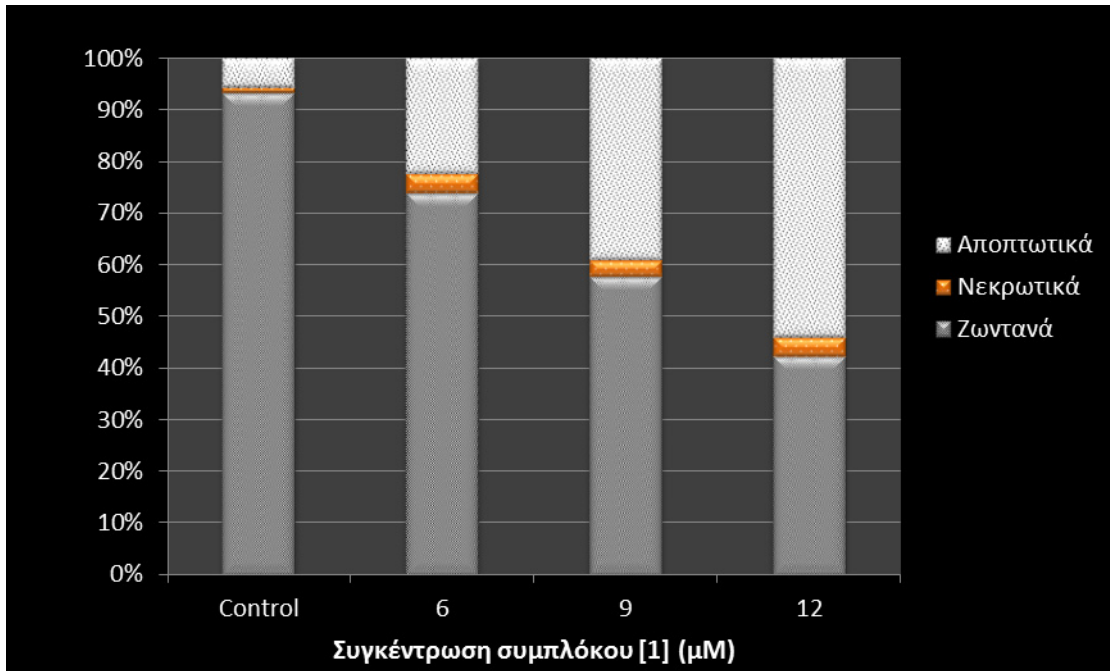
**Εικόνα 4.1** Κυτταρομετρία ροής με χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά την 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του [1].



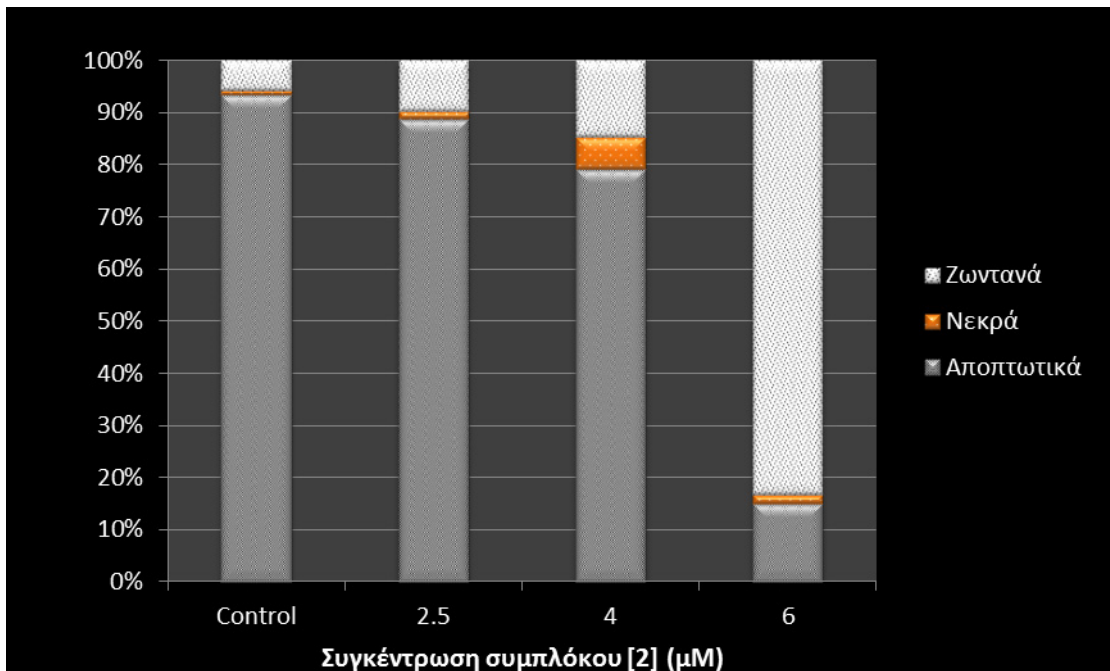
**Εικόνα 4.2** Κυτταρομέτρη ροής με χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά την 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του [2].



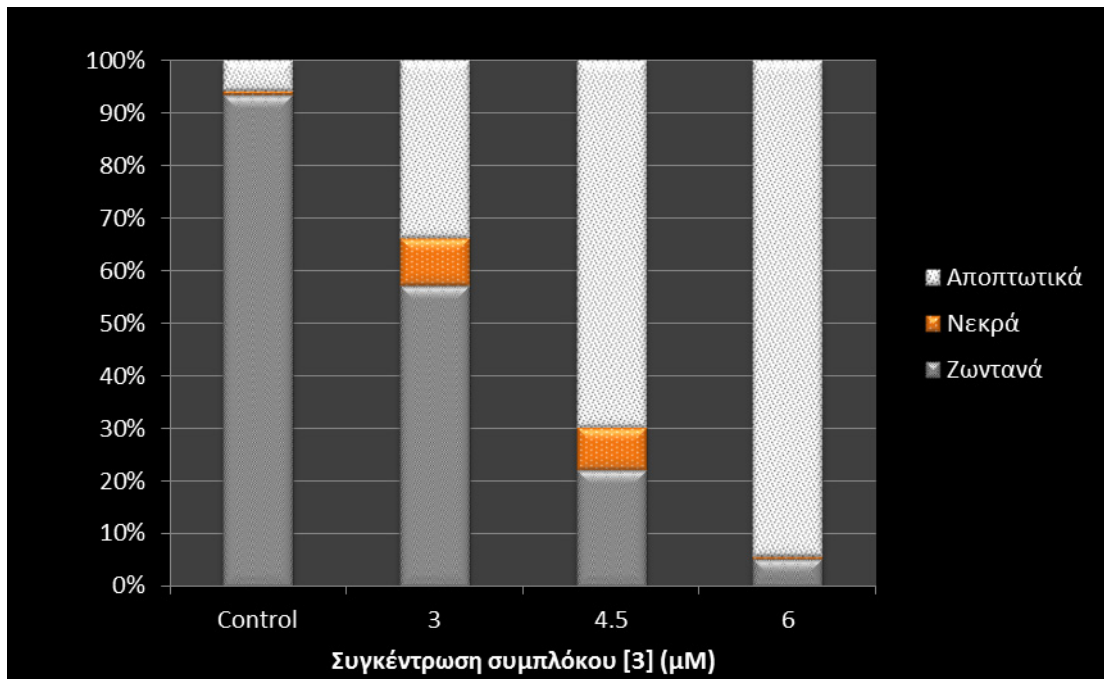
**Εικόνα 4.3** Κυτταρομέτρία ροής με χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά την 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του [3].



**Γράφημα 4.5** Παρουσιάζονται τα ποσοστά της δοσοεξαρτώμενης αποπτωτικής δράσης του συμπλόκου [1] στα LMS κύτταρα έπειτα από επώαση 48 ωρών. Οι προς έλεγχο συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν σύμφωνα με τις IC<sub>50</sub> τιμές αλλά και μετά από πειραματισμό. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση τιμή των μετρήσεων.



**Γράφημα 4.6** Παρουσιάζονται τα ποσοστά της δοσοεξαρτώμενης αποπτωτικής δράσης του συμπλόκου [2] στα LMS κύτταρα έπειτα από επώαση 48 ωρών. Οι προς έλεγχο συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν σύμφωνα με τις IC<sub>50</sub> τιμές αλλά και μετά από πειραματισμό. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση τιμή των μετρήσεων.

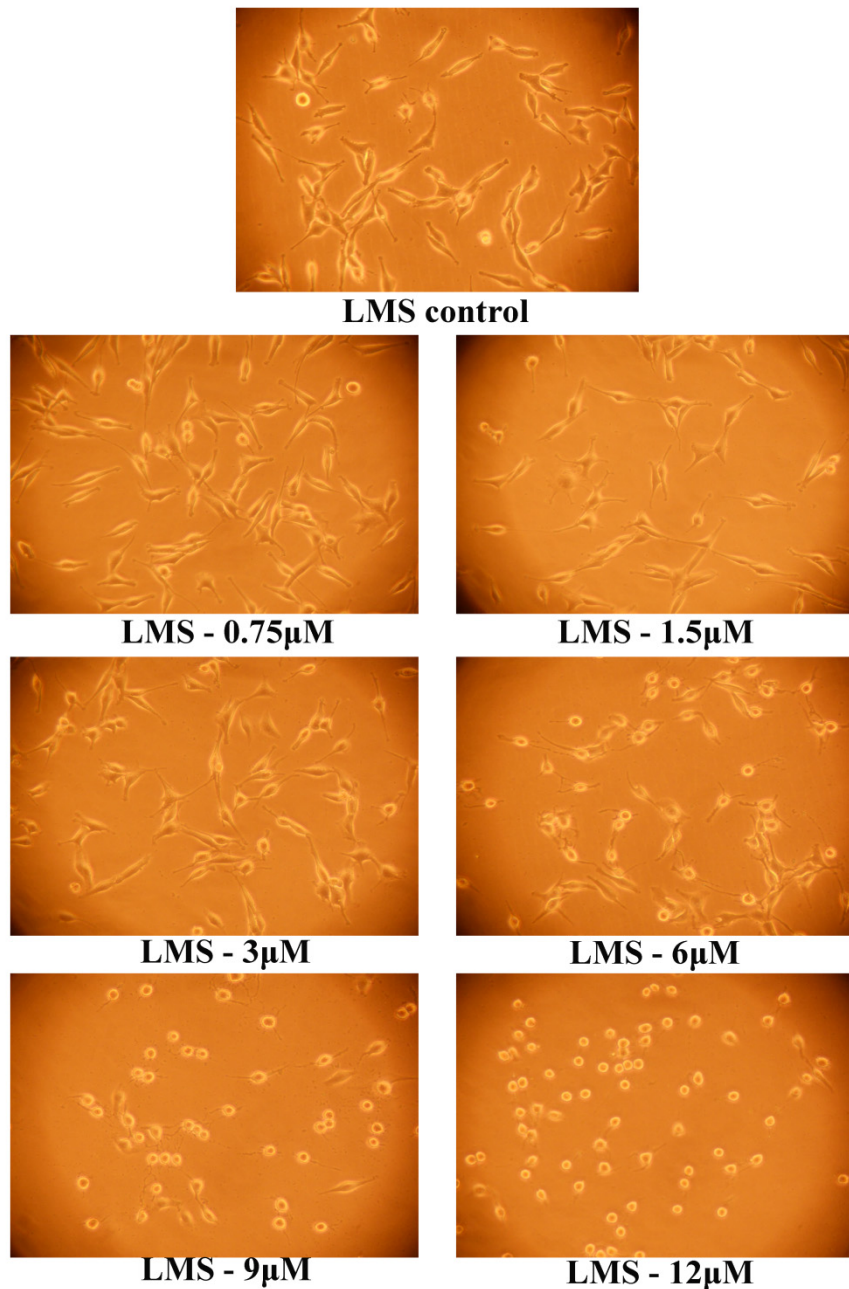


**Γράφημα 4.7** Παρουσιάζονται τα ποσοστά της δοσοεξαρτώμενης αποπτωτικής δράσης του συμπλόκου [3] στα LMS κύτταρα έπειτα από επώαση 48 ωρών. Οι προς έλεγχο συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν σύμφωνα με τις  $IC_{50}$  τιμές αλλά και μετά από πειραματισμό. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση τιμή των μετρήσεων.

Μέσω της κυτταρομετρίας ροής αποκαλύφθηκε ότι το είδος του κυτταρικού θανάτου που τα τρία σύμπλοκα προκαλούν επάγεται μέσω του φαινομένου της απόπτωσης (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος).

Σε αυτό το στάδιο της μελέτης έγινε η επιλογή του συμπλόκου το οποίο παρουσίαζε τις καλύτερες κυτταροτοξικές και αποπτωτικές ιδιότητες ώστε να συνεχιστεί περαιτέρω η μελέτη του. Το σύμπλοκο που επιλέχθηκε ήταν το [3] μιας και εμφανίζει μία από τις χαμηλότερες τιμές  $IC_{50}$  σε σύγκριση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα αυτής της μελέτης στις κυτταρικές σειρές που ελέγχτηκε αλλά ιδιαίτερα εξαιτίας της χαμηλής σε συγκέντρωση δοσοεξαρτώμενης αποπτωτικής δράσης που παρουσιάζει. Σε δόση  $2 \times IC_{50}$  εμφανίζει απόπτωση σε πάνω από το 90% των κυττάρων LMS αλλά και στο εύρος της  $IC_{50}$  εμφανίζει αποπτωτική δράση κατά 34%.

#### 4.1.2.1 Οπτική Παρατήρηση της Απόπτωσης

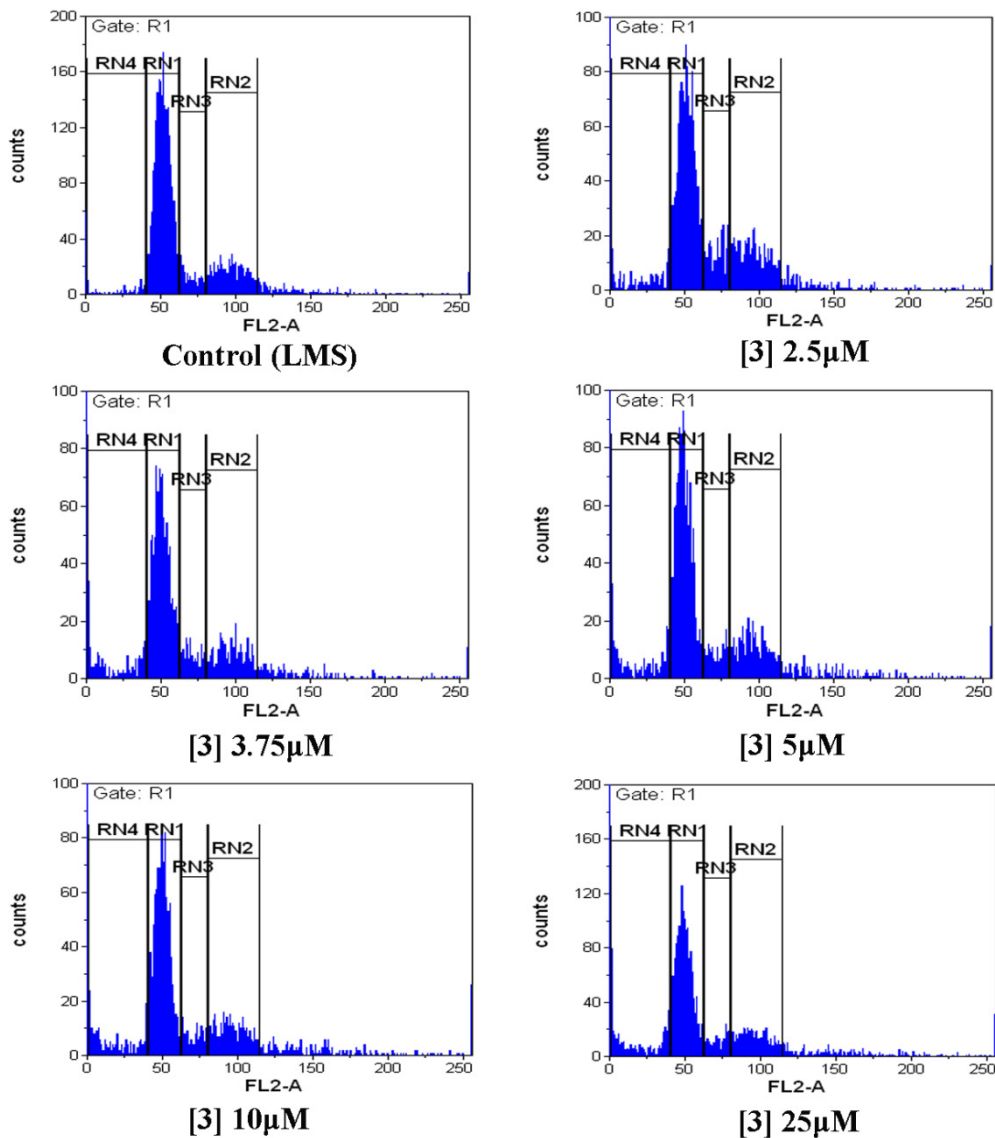


**Εικόνα 4.4** Οπτική παρατήρηση των LMS κυττάρων έπειτα από επώαση με το σύμπλοκο [3] σε διάφορες συγκεντρώσεις και σε χρόνο 8 ωρών μετά τη χορήγηση του. Παρατηρείται το φαινόμενο της απόπτωσης από τις χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές των κυττάρων.

Όπως είναι γνωστό, τα βιοχημικά γεγονότα της απόπτωσης οδηγούν σε χαρακτηριστικές κυτταρικές αλλαγές στη μορφολογία. Το κύτταρο που πεθαίνει αρχίζει να αποκολλάται από τα άλλα γειτονικά κύτταρα και το εξωκυτταρικό στρώμα και γίνεται στρογγυλό. Αυτή είναι η χαρακτηριστική κυτταρική συρρίκνωση που είναι εμφανής κάτω από φωτεινό μικροσκόπιο.

### 4.1.3 Κυτταρομετρία Ροής-Μελέτη του Κυτταρικού Κύκλου.

Η παρακάτω μελέτη πραγματοποιήθηκε προκειμένου να ελέγξουμε εάν η κυτταροτοξική δράση του συμπλόκου [3] είναι εξαρτώμενη του κυτταρικού κύκλου και σε ποιο στάδιο. Έτσι αυξανόμενες δόσεις του συμπλόκου χορηγήθηκαν σε LMS κύτταρα και αφέθηκαν να δράσουν 24 ώρες (χρόνος διπλασιασμού της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς).



**Εικόνα 4.5** Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των LMS κυτάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του [3]. Τα ποσοστά τις κάθε συνθήκης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.7

	<i>G0/G1</i>	<i>S</i>	<i>G2/M</i>	<i>SubG1</i>
control	62.89	7.28	17.64	3.17
[3]2.5μM	47.59	10.62	19.04	7.11
[3]3.75μM	41.73	6.86	13.34	9.29
[3]5μM	42.72	6.5	14.45	9.36
[3]10μM	40.23	5.75	13.14	8.79
[3]25μM	39.08	6.04	13.34	11.76

**Πίνακας 4.7** Ποσοστό % των LMS κυττάρων σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 4.7, παρατηρούμε ότι σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του [3] υπάρχει μια σημαντική μείωση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στην φάση G0/G1, ενώ δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή σε σύγκριση με το control στη φάση S (S phase arrest). Επίσης μικρές μειώσεις παρατηρήθηκαν στη φάση G2/M που όμως δεν παρουσιάζουν δόσοεξαρτώμενο χαρακτήρα. Αυτό σημαίνει ότι το σύμπλοκο δεν επιδρά κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA ούτε και κατά τη διάρκεια της μείωσης. Αντίθετα, παρατηρούμε μια σημαντική δόσοεξαρτώμενη αύξηση της SubG1 φάσης η οποία υποδηλώνει το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων σε σχέση με τη μείωση της G0/G1 φάσης.

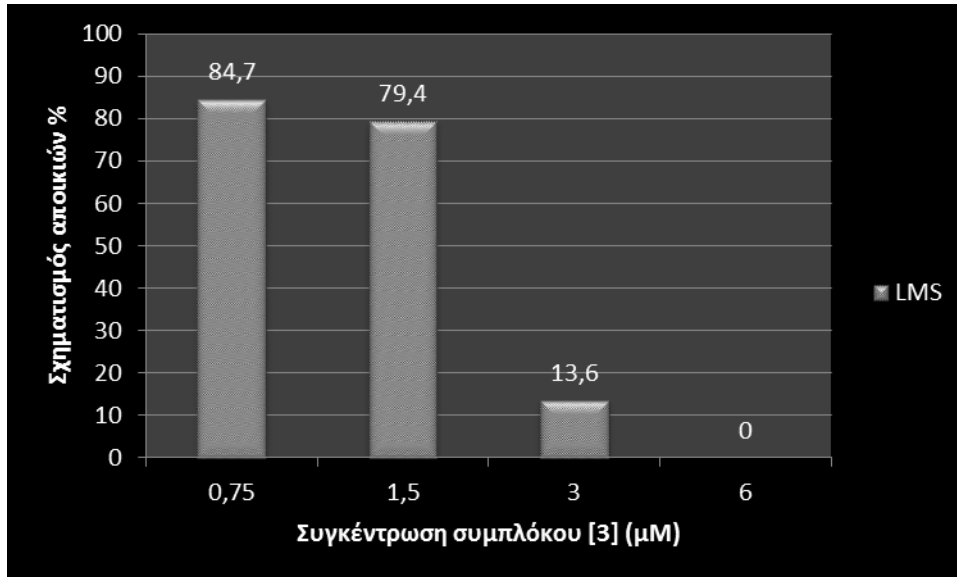
#### **4.1.4 Σχηματισμός Αποικιών-(Clonogenic/Colony Formation Assay)**

Η μελέτη του σχηματισμού αποικιών σε χαμηλή πυκνότητα σποράς μας δίνει δεδομένα της ικανότητας των κυττάρων που επιβίωσαν, σε μια χρονική στιγμή, από μια συγκεκριμένη θεραπεία (treatment) με κάποιο παράγοντα, να μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να δώσουν αποικίες και αν αυτές είναι βιώσιμες ή όχι απουσία αυτού του παράγοντα. Η παρούσα μέθοδος είναι μέτρο αξιολόγησης χημειοθεραπευτικών και όχι μόνο παραγόντων (π.χ. ακτινοβολιών), αν η επίδραση τους στα κύτταρα συνεχίζει να υφίσταται και χωρίς την παρουσία τους (π.χ. μεταλλαξιογόνος επίδραση).

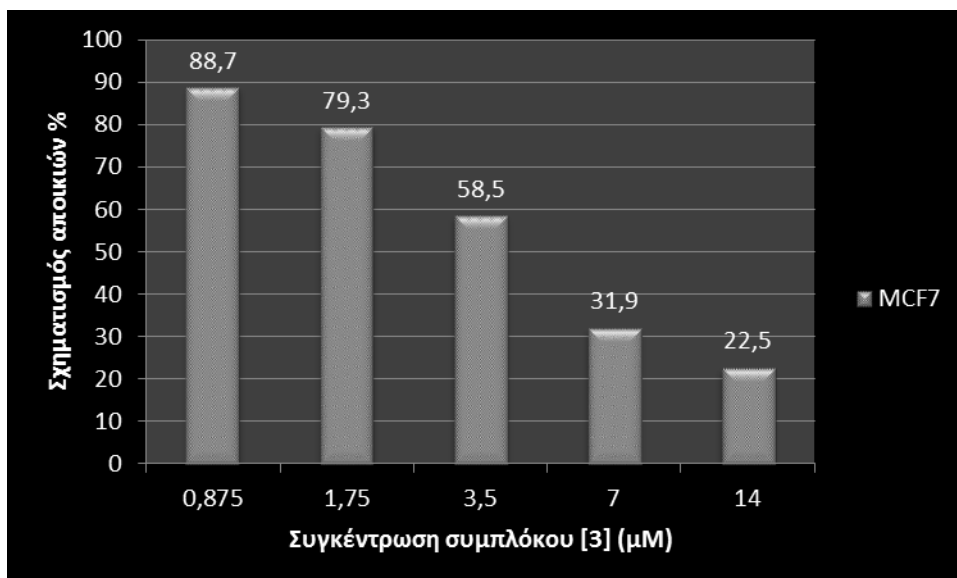
Στην παρούσα μελέτη το σύμπλοκο [3] ελέγχθηκε για την ικανότητα του υπό αυξανόμενες συγκεντρώσεις χορήγησης να αναστέλλει την δημιουργία αποικιών LMS και MCF7 κυττάρων. Οι δόσεις που επιλέχθηκαν προς έλεγχο και για τις δύο κυτταρικές σειρές είναι



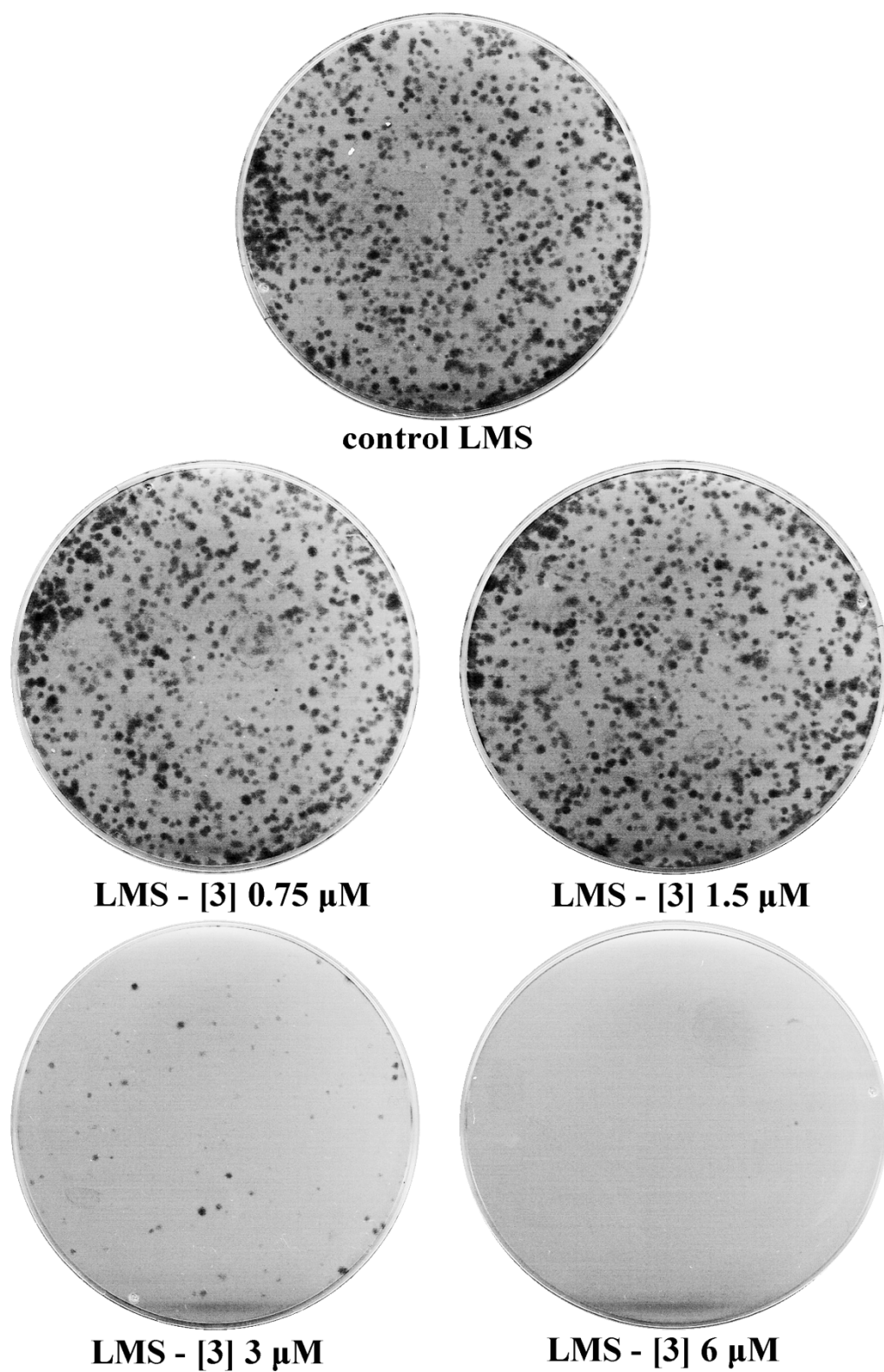
οι τιμές των  $IC_{50}$  τους αντίστοιχα (λαμβάνεται ως  $IC_{50}$  τιμή η ανώτερη της τυπικής απόκλισης της μέσης τιμής, 3 $\mu$ M και 3.5 $\mu$ M για τα LMS και τα MCF7 αντίστοιχα) καθώς και υποπολλαπλασίες και υπερπολλαπλασίες αυτών. Η επώαση των κυττάρων με τις διάφορες συγκεντρώσεις του συμπλόκου [3] έλαβε χώρα 24ώρες πριν να μπουν για σπορά αποικιών.



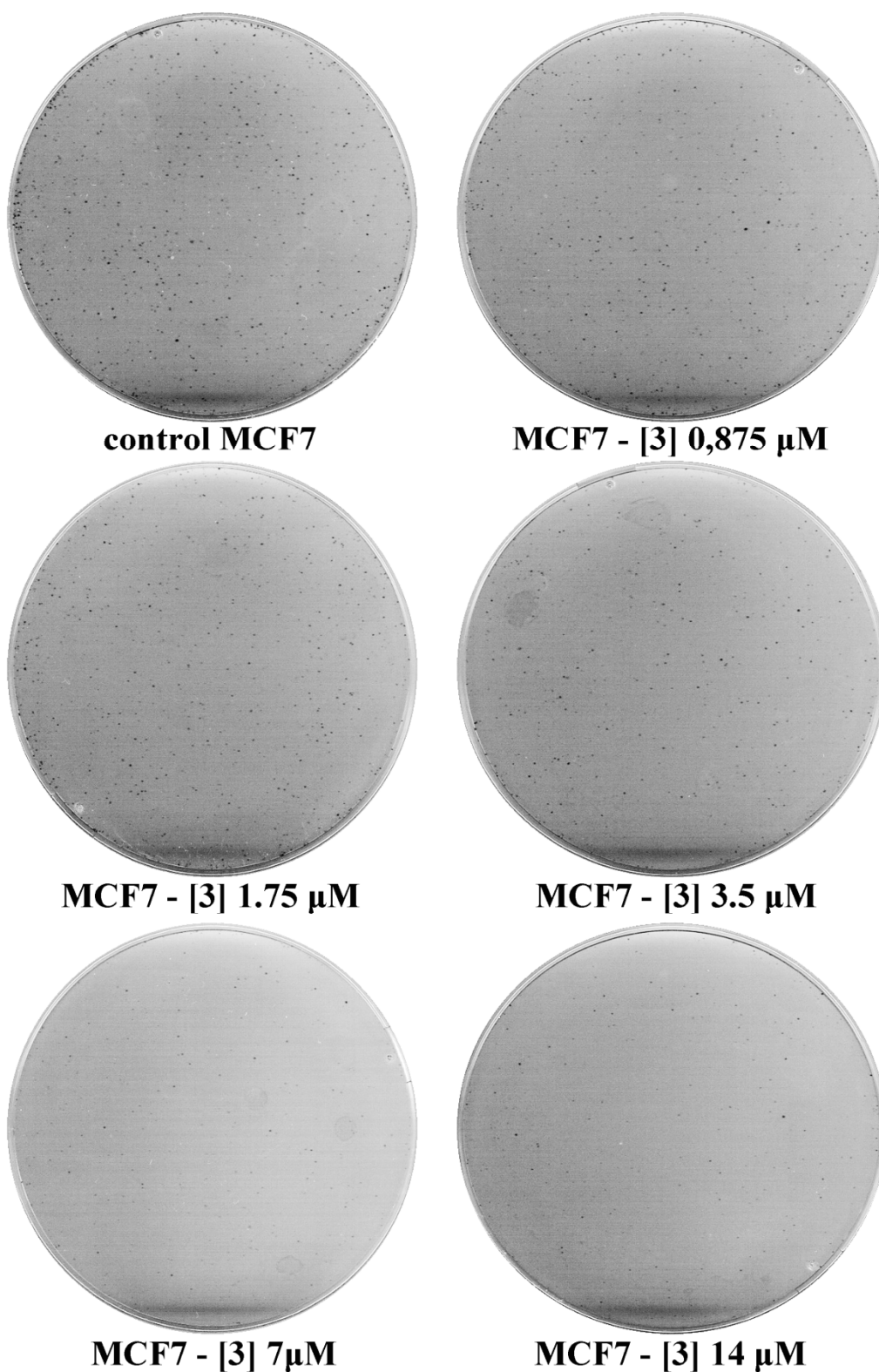
**Γράφημα 4.8** παρουσιάζεται το % ποσοστό του σχηματισμού των αποικιών LMS κυττάρων σε σύγκριση με το control (κύτταρά χωρίς θεραπεία).



**Γράφημα 4.9** παρουσιάζεται το % ποσοστό του σχηματισμού των αποικιών MCF7 κυττάρων σε σύγκριση με το control (κύτταρά χωρίς θεραπεία).



**Εικόνα 4.6** Ενδεικτική εικόνα των σχηματιζόμενων αποικιών υπό την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων του συμπλόκου [3] στα LMS κύτταρα.

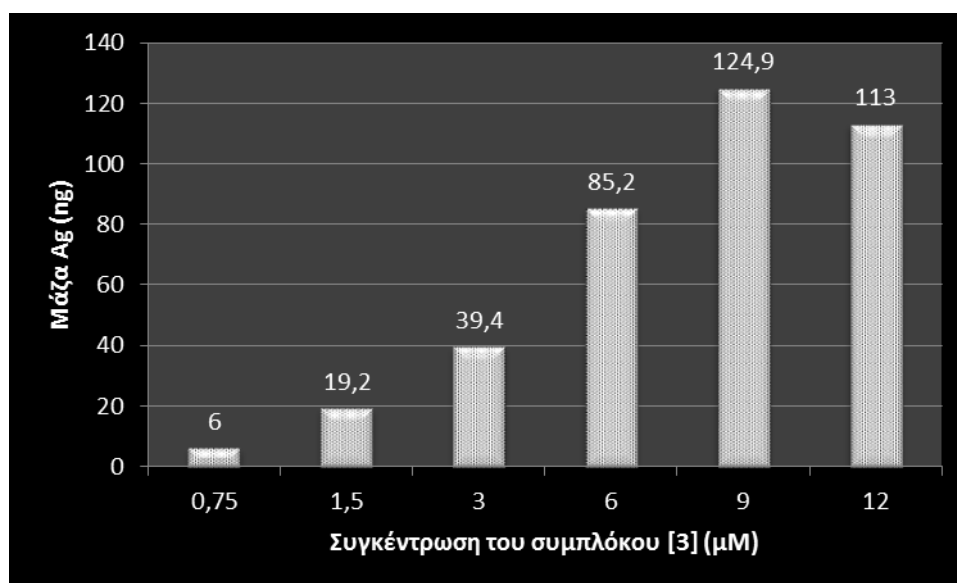


**Εικόνα 4.7** Ενδεικτική εικόνα των σχηματιζόμενων αποικιών υπό την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων του συμπλόκου [3] στα MCF7 κύτταρα.

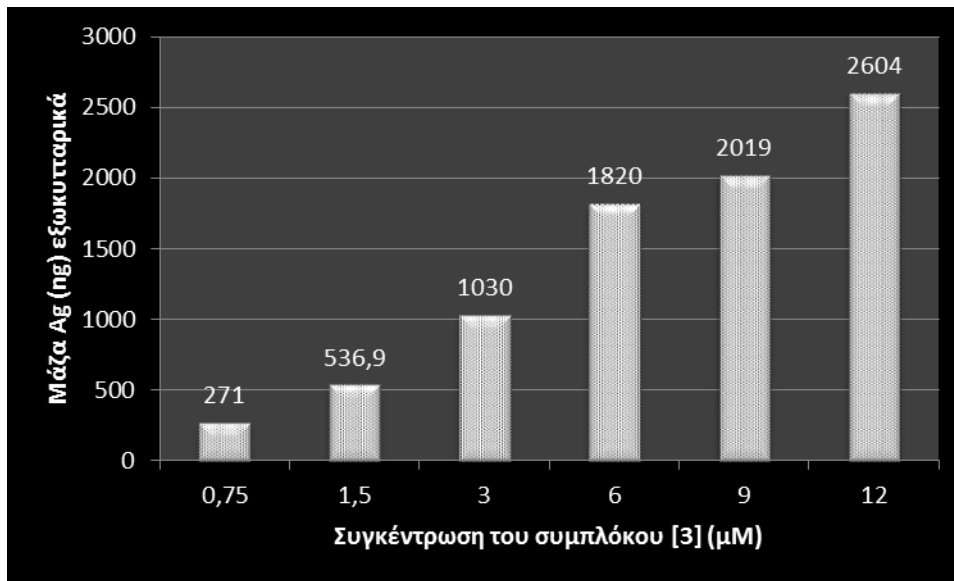
Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι ο σχηματισμός αποικιών και για τις δύο κυτταρικές σειρές που ελέγχθησαν ακολουθεί δοσοεξαρτώμενο σχήμα. Τα LMS εμφανίζονται πιο ευάλωτα στην επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (σύμπλοκο [3]) μιας και στην διπλάσια (2x) της  $IC_{50}$  τιμής δεν παρατηρείται κανένας σχηματισμός αποικιών, ενώ τα MCF7, που εμφανίζουν μια σχεδόν γραμμική μείωση του ποσοστού αποικιών εμφανίζουν 22,5% σχηματισμό αποικιών σε δόση τετραπλάσια (4x) της  $IC_{50}$ .

#### 4.1.5 Μελέτη της Ενδοκυττάριας Απορρόφησης του Συμπλόκου

Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήσαμε πολλαπλάσιες και υποπολλαπλάσιες συγκεντρώσεις της  $IC_{50}$  (λαμβάνεται ως  $IC_{50}$  η ανώτερη της τυπικής απόκλισης της μέσης τιμής, 3 $\mu$ M (Πίνακας 4.1)) του συμπλόκου [3] για χρονική περίοδο επώασης του συμπλόκου στα LMS κύτταρα των 8 ωρών.



**Γράφημα 4.10** Παρουσιάζεται η μάζα του Ag (ng) που ανιχνεύτηκε ενδοκυτταρικά σε σχέση με την συγκέντρωση του συμπλόκου που χορηγήθηκε στα LMS κύτταρα σε περίοδο επώασης 8 ωρών.



**Γράφημα 4.11** Παρουσιάζεται η μάζα του Ag (ng) που ανιχνεύτηκε εξωκυτταρικά (υπερκείμενο) σε σχέση με την συγκέντρωση του συμπλόκου που χορηγήθηκε στα LMS κύτταρα σε περίοδο επώασης 8 ωρών.

Παρατηρούμε ότι η μάζα του Ag που ανιχνεύτηκε ενδοκυτταρικά είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση (και κατ' επέκταση την ποσότητα) του συμπλόκου που χορηγήθηκε στα κύτταρα καθώς και ότι η απορρόφηση του συμπλόκου [3] ακολουθεί δόσοεξαρτώμενο πρότυπο. Οι ποσότητες του Ag που ανιχνεύτηκαν ενδοκυτταρικά υποδηλώνουν ότι ο ρυθμός απορρόφησης του συμπλόκου (και όχι απλά ιόντων Ag) από τα LMS κύτταρα είναι αναλογικός με τη χορηγούμενη κατά συνθήκη συγκέντρωση του συμπλόκου [3].

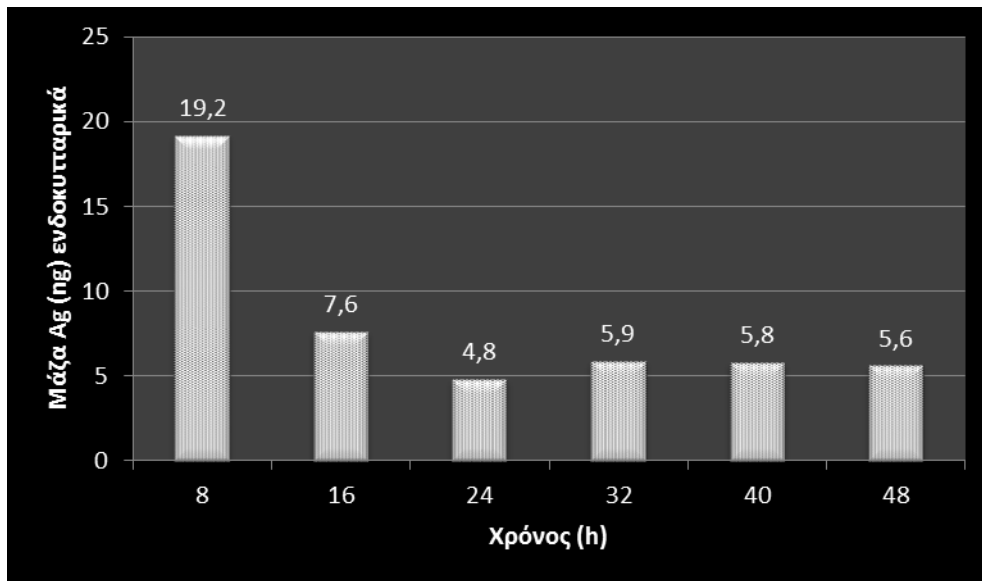
Για να επιβεβαιώσουμε την παραπάνω θεώρηση υπολογίσαμε την εκάστοτε μάζα του συμπλόκου [3] από τη χορηγούμενη συγκέντρωση του. Έπειτα συγκρίναμε τη συνολική ποσότητα του Ag που θα έπρεπε να έχουμε σύμφωνα με τη χορηγούμενη συγκέντρωση του με το άθροισμα των μαζών του Ag που ανιχνεύτηκαν ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά από την ίδια συνθήκη χορήγησης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.8.

μM συμπλόκου [3]	μάζα Ag (ng) (σε 3ml-βοθρίο βαριών)	Ανίχνευση Ag μέσα (ng) A.A.	Ανίχνευση Ag έξω (ng) A.A.	Σύνολο Ag (ng) από την A.A.
0,75	242,70345	6	271	277
1,5	485,4069	19,2	536,9	556,1
3	970,8138	39,4	1030	1069,4
6	1941,6276	85,2	1820	1905,2
9	2912,4414	124,9	2019	2143,9
12	3883,2552	113	2604	2717

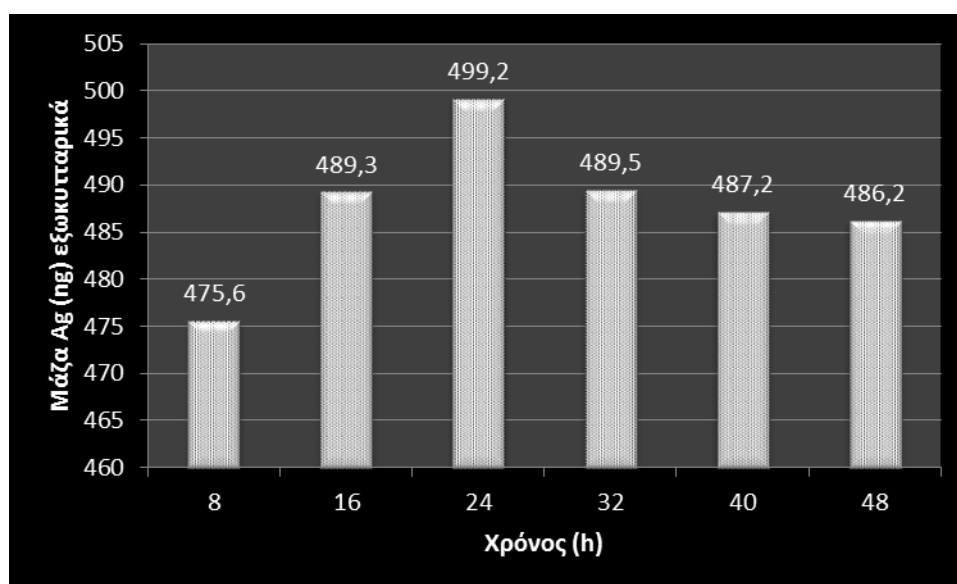
**Πίνακας 4.8** Παρουσιάζονται τα θεωρητικά αποτελέσματα των υπολογισμών εύρεσης της μάζας του Ag ανάλογα με τη χορηγούμενη συγκέντρωση του συμπλόκου (Σε 1 φρεάτιο από 24άρων φρεατίων πολυτριβλίο) σε σύγκριση με την ποσοτική ανίχνευση του Ag ενδοκυτταρικά, εξωκυτταρικά και εκ του συνόλου ανά συνθήκη, μέσω της μεθόδου της ατομικής απορρόφησης (A.A.)

Παρατηρούμε ότι ο θεωρητικός υπολογισμός της μάζας του Ag σε σύγκριση με την πρακτική ανίχνευση του ως σύνολο αποτελούν τιμές σχεδόν εφάμιλλες, αν λάβουμε κιόλας υπόψη το πειραματικό λάθος του  $\pm 10\%$ .

Επίσης πραγματοποιήθηκε και μια χρονοεξαρτώμενη μελέτη απορρόφησης του συμπλόκου κάτω από σταθερή συγκέντρωση χορήγησης (1.5μM –τιμή χαμηλότερη κατά το ήμισυ από την IC<sub>50</sub> του 48ώρου (Πίνακας 4.1) και για μέγιστο διάστημα 48 ωρών (με ενδιάμεσα διαστήματα μετρήσεων των 8 ωρών).



**Γράφημα 4.12** Παρουσιάζεται η μάζα του Ag (ng) που ανιχνεύτηκε ενδοκυτταρικά σε σχέση με το χρόνο επώασης του συμπλόκου [3] σε συγκέντρωση 1.5μM σε LMS κύτταρα.



**Γράφημα 4.13** Παρουσιάζεται η μάζα του Ag (ng) που ανιχνεύτηκε εξωκυτταρικά σε σχέση με το χρόνο επώασης του συμπλόκου [3] σε συγκέντρωση 1.5μM σε LMS κύτταρα.

Παρατηρούμε ότι η μάζα του Ag που ανιχνεύτηκε ενδοκυτταρικά έχει την υψηλότερη τιμή της στις πρώτες 8 ώρες επώασης του συμπλόκου και μετά πέφτει μέχρι τη συμπλήρωση του 24ώρου (χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων LMS), ενώ μετά τον διπλασιασμό αυξάνεται ελάχιστα για το πρώτο δωρο αλλά παραμένει σταθερός μέχρι το

πέρας του 48ώρου από τη χορήγηση. Ανάλογη εικόνα εκ του αντιθέτου παρατηρείται στην εξωκυτταρική αντίχνευση του αργύρου.

Χρόνος (h)	μάζα Ag (ng) (σε 3ml-βοθρίο βαριών)	Ανίχνευση Ag μέσα (ng) A.A.	Ανίχνευση Ag έξω (ng) A.A.	Σύνολο Ag (ng) από την A.A.
8	485,4069	19,2	475,6	494,8
16	485,4069	7,6	489,3	496,9
24	485,4069	4,8	499,2	504
32	485,4069	5,9	489,5	495,4
40	485,4069	5,8	487,2	493
48	485,4069	5,6	486,2	491,8

**Πίνακας 4.9** Παρουσιάζονται τα θεωρητικά αποτελέσματα των υπολογισμών εύρεσης της μάζας του Ag ανάλογα με το χρόνο επώασης του συμπλόκου [3] στα 1.5μM (Σε 1 φρεάτιο από 24άρων φρεατίων πολυτριβλίο) σε σύγκριση με την ποσοτική αντίχνευση του Ag ενδοκυτταρικά, εξωκυτταρικά και εκ του συνόλου ανά συνθήκη, μέσω της μεθόδου της ατομικής απορρόφησης (A.A.)

Παρατηρούμε ότι ο θεωρητικός υπολογισμός της μάζας του Ag σε σύγκριση με την πρακτική αντίχνευση του ως σύνολο αποτελούν τιμές σχεδόν εφάμιλλες, αν λάβουμε κιάλας υπόψη το πειραματικό λάθος του  $\pm 10\%$ .

#### 4.1.6 Μέθοδος Comet (Comet Assay)

Με τη μέθοδο comet προσδιορίσαμε την ποιοτική και ποσοτική βλάβη που προκαλείται στο DNA υπό την επίδραση του συμπλόκου [3] καθώς και τον πιθανό μοριακό μηχανισμό δράσης του. Η γνώση ότι η cisplatin κάνει διασταυρούμενες συνδέσεις (X-links) με το μόριο του DNA μας δίνει τη δυνατότητα επιβεβαίωσης μέσω του alkaline comet assay καθώς και του ποσοστού των συνδέσεων που κάνει με το DNA. Με τον ίδιο τρόπο μπορούμε να επιβεβαιώσουμε ή να αποκλείσουμε αυτόν τον πιθανό μηχανισμό



δράσης του συμπλόκου [3]. Το comet assay εφαρμόστηκε για το σύμπλοκο [3] αλλά και για τη cisplatin στην κυτταρική σειρά LMS.

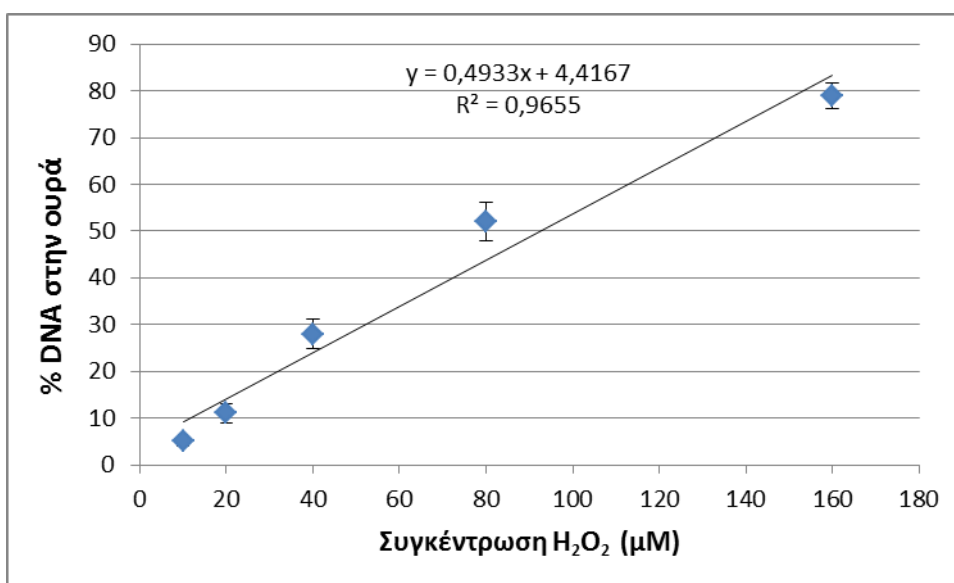
#### 4.1.6.1 Πρότυπη καμπύλη H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα LMS κύτταρα

Πριν την εφαρμογή του comet assay στο σύμπλοκο [3] και στη cisplatin, πραγματοποιήθηκε comet για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρόκλησης βλάβης του DNA κατά 80-85% μέσω ενός βίαιου οξειδωτικού παράγοντα, του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Ο υπολογισμός του ποσοστού του DNA στην ουρά του comet υπολογίστηκε από την παρακάτω εξίσωση:

#### Εξίσωση 1

$$\text{(Tail intensity/ (Head + Tail Intensity))} \times 100$$



**Γράφημα 4.14** Παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα LMS κύτταρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

Σύμφωνα με την εξίσωση της γραφικής παράστασης το 80% της βλάβης του DNA προσδιορίστηκε ότι προκαλείται στα 153,2 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Οπότε για λόγους ευκολίας χρησιμοποιήσαμε 150μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Επίσης για να πραγματοποιηθεί ο υπολογισμός του ποσοστού των X-links που δημιουργεί η cisplatin με το DNA, οι παρακάτω εξισώσεις χρησιμοποιήθηκαν:

### Εξίσωση 2

$$\frac{Drugavg\%DNAinTail - CtrlUntr.avg\%DNAinTail}{CtrlH2O2avg\%DNAinTail - CtrlUntr.avg\%DNAinTail} \times 100$$

Η παραπάνω εξίσωση ανάγει τα αποτελέσματα των % ποσοστών που βρέθηκαν από την εξίσωση 1 για όλες τις διαφορετικές συνθήκες, σχετικά στο 100%.

Έτσι έχουμε:

1. Drugavg%DNAinTail = Είναι ο μέσος όρος του % ποσοστού του DNA στην ουρά των comet από τη χορήγηση φαρμάκου
2. CtrlUntr.avg%DNAinTail = Είναι ο μέσος όρος του % ποσοστού του DNA στην ουρά των comet των κυττάρων που δεν έχουν λάβει ούτε φάρμακο ούτε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
3. CtrlH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>avg%DNAinTail = Είναι ο μέσος όρος του % ποσοστού του DNA στην ουρά των comet των κυττάρων που έλαβαν μόνο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Τέλος, προκειμένου να υπολογιστεί το % ποσοστό των DNA X-links η παρακάτω εξίσωση χρησιμοποιήθηκε:

### Εξίσωση 3

100-εξίσωση 2

Για να γίνει κατανοητό, γίνεται παράθεση του παρακάτω παραδείγματος (τυχαία νούμερα):

Έστω ότι από την εξίσωση 1 έχει βρεθεί ότι:

$$Drugavg\%DNAinTail = 50\%$$

$$CtrlUntr.avg\%DNAinTail = 1\%$$

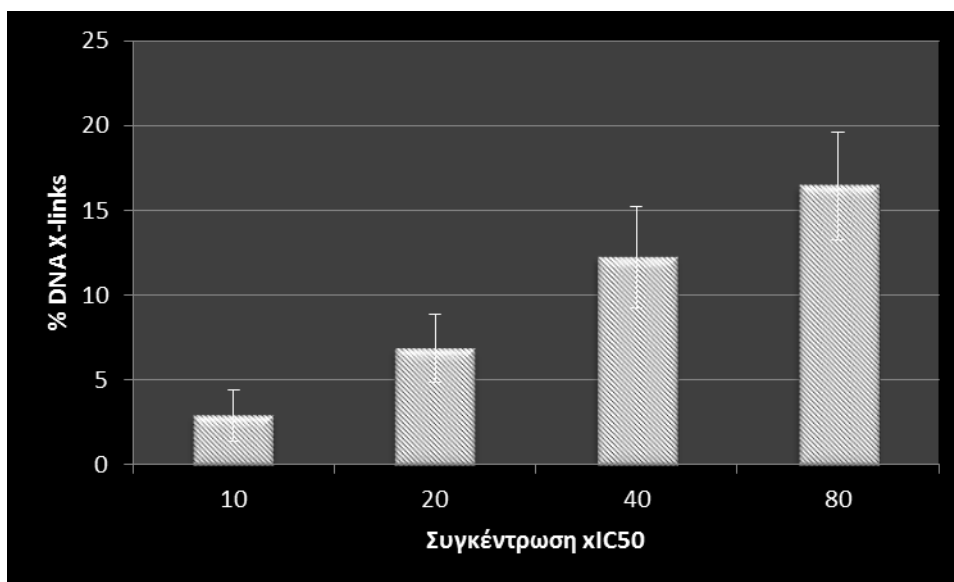
$$CtrlH_2O_2avg\%DNAinTail = 80\%$$

Έχουμε:  $50 - 1 / 80 - 1 = 0,62 * 100 = 62\%$  DNA στην ουρά

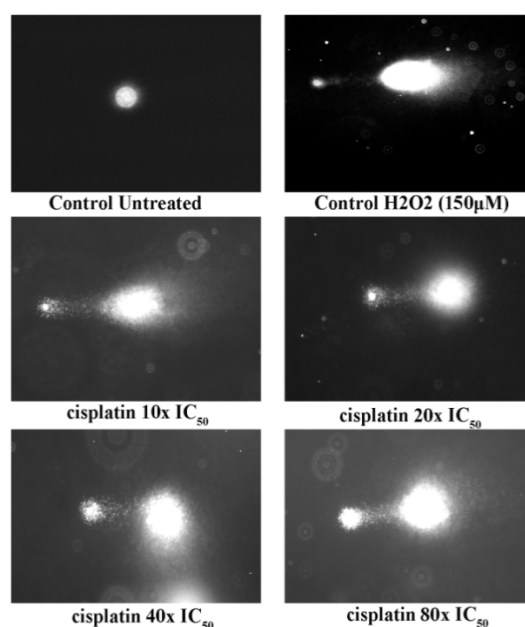
Οπότε :  $100 - 62 = 38\%$  DNA X-links

#### 4.1.6.2 Δοσοεξαρτώμενη μελέτη της cisplatin

Στην παρακάτω μελέτη χρησιμοποιήσαμε πολλαπλάσιες συγκεντρώσεις της IC<sub>50</sub> στα LMS κύτταρα της cisplatin. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: 10x, 20x, 40x, 80x IC<sub>50</sub> (5.5μM) για χρονική επώαση 2 ωρών.



**Γράφημα 4.15** Παρουσιάζονται τα ποσοστά των DNA X-links σε σχέση με τη συγκέντρωση της cisplatin στα LMS κύτταρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

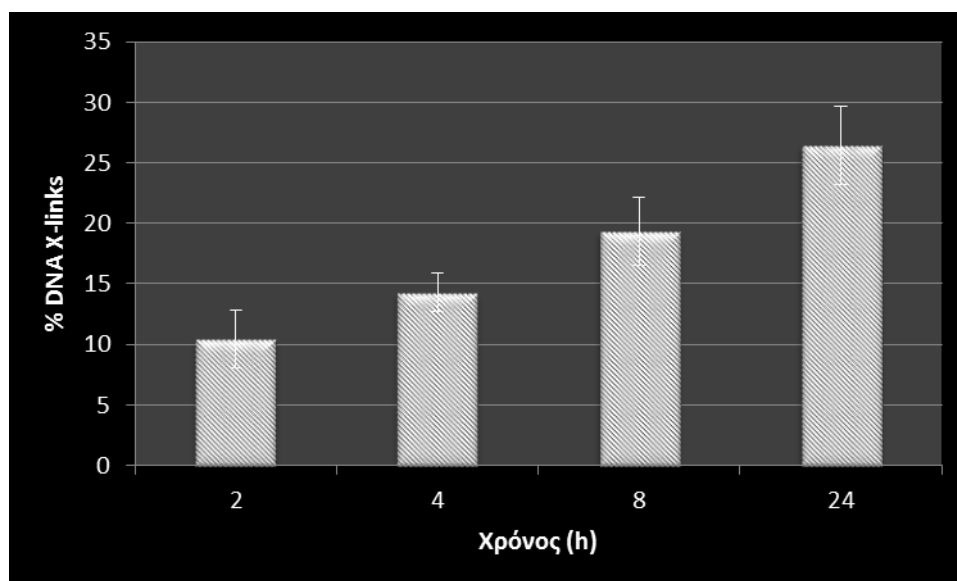


**Εικόνα 4.8** Ενδεικτικά comet. Το control untreated είναι κύτταρα χωρίς καμία επέμβαση. Το control H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι κύτταρα που έχουν λάβει μόνο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε συγκέντρωση 150μM η οποία προκαλεί βλάβη ~80-85%. Ακολούθως οι υπόλοιπες φωτογραφίες παρουσιάζουν comet σε διάφορες συγκεντρώσεις cisplatin μετά από τον χειρισμό τους με πλατίνα και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Σ' αυτή τη δοσοεξαρτώμενη μελέτη της cisplatin παρατηρήσαμε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της cisplatin στην οποία τα κύτταρα εκτέθηκαν τόσο το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη μειώνεται σε σχέση με το κεφάλι του κομήτη. Αυτό οφείλεται στις διασταυρούμενες συνδέσεις (X-links) που κάνει η cisplatin με το DNA. Εκ του αντιθέτου όταν χορηγήσαμε στα κύτταρα το σύμπλοκο [3] σε πολλαπλάσιες συγκεντρώσεις της  $IC_{50}$  (10x, 20x, 40x και 80x) η προκληθείσα ζημιά ήταν τόσο μεγάλη που δεν ήταν δυνατό να μετρηθούν comet καθώς δεν υπήρχε καθόλου «κεφάλι» και όλο το DNA είχε χαθεί μέσα στο πήκτωμα της LMP αγαρόζης (agarose gel).

#### 4.1.6.3 Χρονοεξαρτώμενη μελέτη της cisplatin

Στην παρακάτω μελέτη χρησιμοποιήσαμε την μέγιστη συγκέντρωση (80x  $IC_{50}$ ) της cisplatin στα LMS κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε στη δοσοεξαρτώμενη μελέτη. Οι χρόνοι επώασης της cisplatin στα κύτταρα ήταν 2, 4, 8 και 24 ώρες.

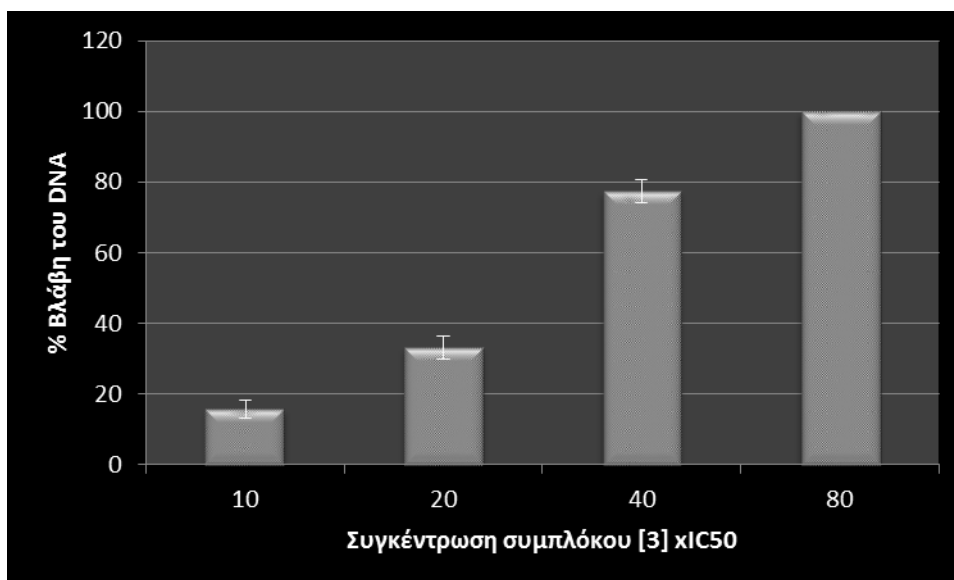


**Γράφημα 4.16** Παρουσιάζονται τα ποσοστά των DNA X-links σε σχέση με το χρόνο επώασης της cisplatin στα LMS κύτταρα σε συγκέντρωση 80x  $IC_{50}$ . Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τ.α.

#### 4.1.6.4 Δοσοεξαρτώμενη μελέτη του συμπλόκου [3]

Το σύμπλοκο [3], όπως προαναφέρθηκε, όταν αφέθηκε να επιδράσει στα κύτταρα όπως στην περίπτωση της cisplatin, βρέθηκε ότι προάγει τη βλάβη του DNA. Η παρατήρηση αυτή έγινε εξαιτίας του ότι οι ουρές των κομητών δεν παρουσίασαν μείωση του ποσοστού του DNA σε σχέση με το κεφάλι των κομητών. Έτσι επαναλάβαμε το comet

αλλά χωρίς την επίδραση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αυτή τη φορά. Οι δόσεις του συμπλόκου [3] που ελέγχθησαν ήταν οι 10x, 20x, 40x και 80x IC<sub>50</sub> (λαμβάνεται ως IC<sub>50</sub> η ανώτερη της τυπικής απόκλισης της μέσης τιμής, 3μM (Πίνακας 4.1)) , για χρόνο επώασης 2 ωρών με τα LMS κύτταρα



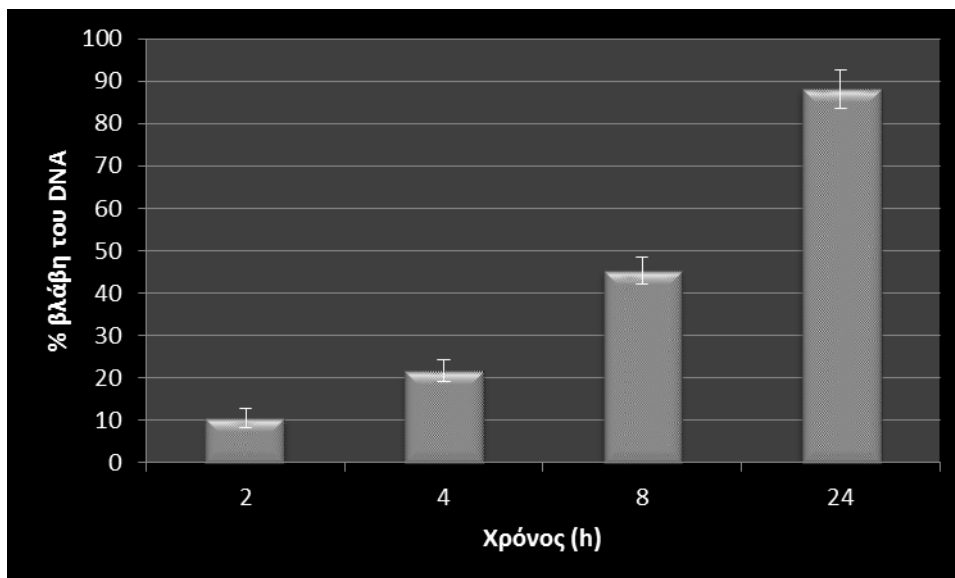
**Γράφημα 4.17** Παρουσιάζεται το ποσοστό βλάβης του DNA των LMS κυττάρων έναντι της χορηγούμενης συγκέντρωσης του συμπλόκου [3]. Στη δόση των 80x η βλάβη ήταν σε τόσο μεγάλη έκταση που δεν μπορούσαν να μετρηθούν οι κομήτες. Οπότε λαμβάνουμε την τιμή ως 100% βλάβη χωρίς τ.α. Τα υπόλοιπα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

Η συγκεκριμένη μελέτη αποκάλυψε ότι η χορήγηση του συμπλόκου [3] προκαλεί κατακερματισμό του DNA ακολουθώντας ένα δοσοεξαρτώμενο πρότυπο.

#### 4.1.6.5 Χρονοεξαρτώμενη μελέτη του συμπλόκου [3]

Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήσαμε την 5x IC<sub>50</sub> (λαμβάνεται ως IC<sub>50</sub> η ανώτερη της τυπικής απόκλισης της μέσης τιμής, 3μM (Πίνακας 4.1)) του συμπλόκου [3] ώστε να προστατεύσουμε το κύτταρο από την εκτεταμένη προκαλούμενη απόπτωση του που ήδη γνωρίζουμε ότι προκαλεί. Οι χρόνοι μελέτης ορίστηκαν στις 2, 4, 8 και 24 ώρες.

\*Υπενθυμίζουμε ότι η IC<sub>50</sub> του συμπλόκου στις 8 ώρες είναι 11.34μM (Πίνακας 4.3).



**Γράφημα 4.18** Παρουσιάζεται το ποσοστό βλάβης του DNA των LMS κυττάρων έναντι του χρόνου επώασης σταθερής συγκέντρωσης ( $5 \times IC_{50}$ ) του συμπλόκου [3]. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τ.α.

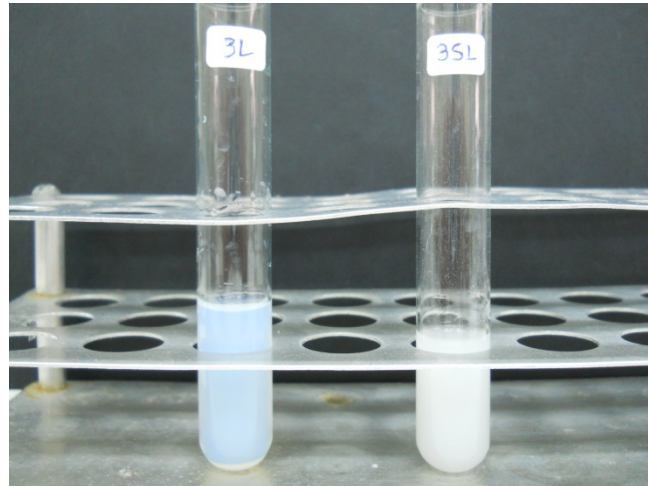
Τα αποτελέσματα (Γράφημα 4.12) επιβεβαίωσαν το χρονοεξαρτώμενο μοτίβο της βλάβης του DNA που προκαλείται υπό σταθερή συγκέντρωση του συμπλόκου.

## 4.2 Λιπосώματα

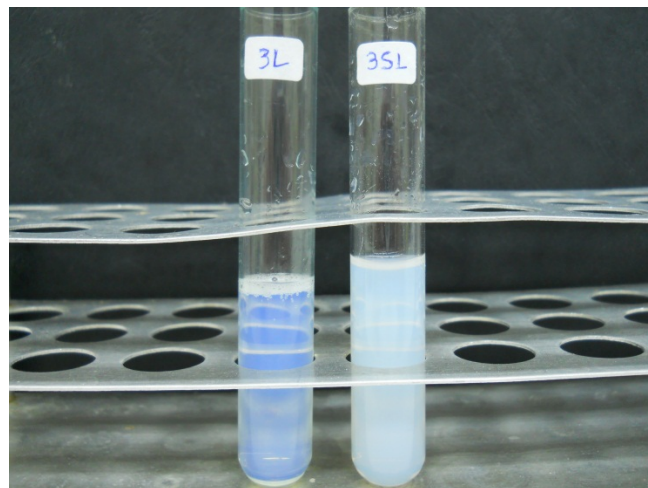
Παρασκευάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν λιπосώματα, σύστασης EPC:DPPG με μοριακή αναλογία λιπιδίων 9:1 και συγκέντρωσης 30mg/ml [3SL] καθώς και λιπосώματα σύστασης (EPC:DPPG):Ag[3] με μοριακή αναλογία (9:1):0.05. και συγκέντρωσης 30mg/ml (3SLAg[3]). Ως Ag[3] σημειώνεται το σύμπλοκο [3].

### 4.2.1 Ρύθμιση του Μεγέθους.

Η πρώτη ένδειξη του ποιοτικού χαρακτηρισμού των λιπосωμάτων είναι η οπτική παρατήρηση του χρώματος τους και της διαύγειας τους καθώς και του ιξώδους του λιπосωματικού εναιωρήματος ή/και η παρουσία φυσαλίδων εγκλωβισμένου αέρα κατά την διάρκεια της παρασκευής τους οι οποίες επιμένουν αρκετά ακόμα και μετά από αρκετή ώρα σε ηρεμία. Η ρύθμιση του μεγέθους των λιπосωμάτων στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου εξώθησης μέσω πολυκαρβονικών φίλτρων (extruder).



**Εικόνα 4.9** Παρουσιάζονται 2 λιποσωμακά εναιωρήματα ακριβώς μετά την ενυδάτωση. Στα αριστερά (3L) είναι λιποσώματα ενυδατωμένα σε  $H_2O$ , ενώ στα δεξιά (3SL) σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα σουκρόζης. Και τα δύο αποτελούνται από την ίδια σύσταση (EPC:DPPG), ίδια μοριακή αναλογία λιπιδίων 9:1, καθώς και ίδια συγκέντρωση λιπιδίων (30mg/ml). Η φωτογραφία παρουσιάζει την οπτική τους διαύγεια και το χρώμα τους πριν τη ρύθμιση του μεγέθους. Η έντονη θολερότητα των 3SL οφείλεται στη σουκρόζη.



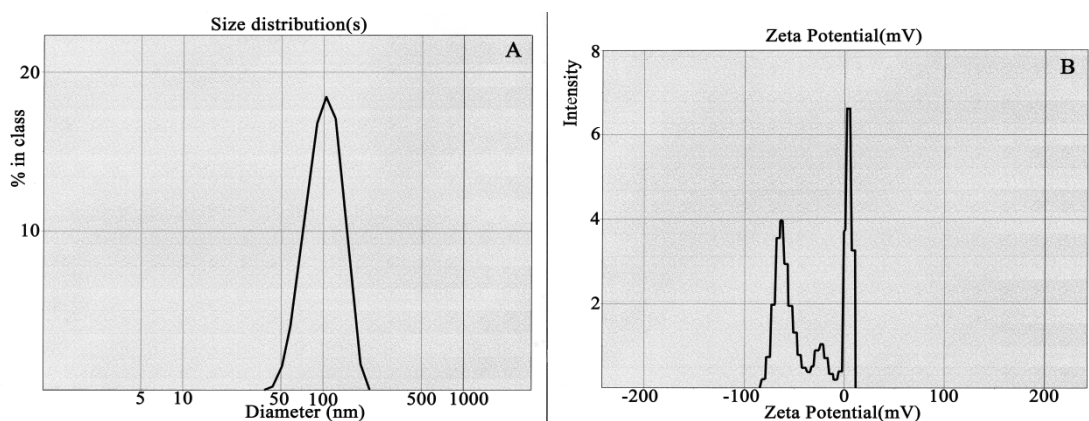
**Εικόνα 4.10** Παρουσιάζονται τα 2 λιποσωμακά εναιωρήματα της Εικόνας 4.9 έπειτα τη ρύθμιση του μεγέθους τους της μεθόδου του extruder. Παρατηρείται ότι η διαύγεια και των δύο λιποσωμακών εναιωρημάτων είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με πριν. Αυτό οφείλεται στο γεγονός της ρύθμισης του μεγέθους τους όπου από τα μεγάλα αυθόρμητα πολυστοιβαδικά λιποσώματα περνάμε στα μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα όπου η διέλευση του φωτός είναι ευκολότερη. Η εικόνα αυτή είναι χαρακτηριστική της ποιότητας που θα πρέπει να αναμένουμε. Το δείγμα 3SL οφείλει το γαλακτερό του χρώμα στη σουκρόζη.

## 4.2.2 Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των Λιποσωμάτων

Ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των λιποσωμάτων που κατασκευάστηκαν πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου της PSC, της HPTLC-FID και της ατομική απορρόφησης.

### 4.2.2.1 Φασματοσκοπία συσχετισμού φωτονίων

Μέσω της φασματοσκοπίας συσχετισμού φωτονίων (PCS), μετρήθηκαν τρεις βασικοί παράμετροι του φυσικού χαρακτηρισμού των λιποσωμάτων –τη μέση υδροδυναμική διάμετρος δηλαδή το μέγεθος (ZAve), η κατανομή των μεγεθών που προσδιορίζεται από το δείκτη πολυδιασποράς (Polydispersity Index, PI), και το ζ-δυναμικό (Zeta potential).

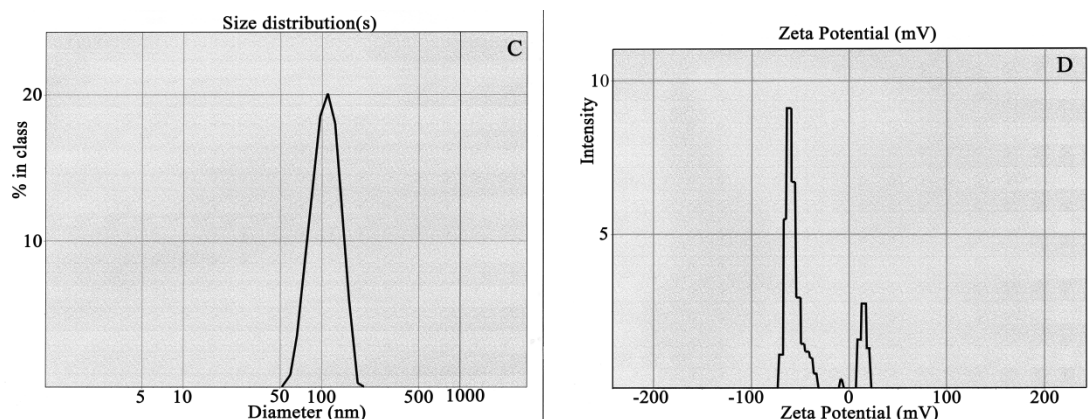


**Γράφημα 4.19** . A) Παρουσιάζει τη μέση υδροδυναμική διάμετρο (μέγεθος) καθώς και την κατανομή του μεγέθους (PI) των 3SL. B) Παρουσιάζει το ζ-δυναμικό των 3SL. Τα γράφηματα A και B βγαίνουν απευθείας από το κατάλληλο πρόγραμμα που συνοδεύει το όργανο φασματοσκοπίας συσχετισμού φωτονίων (υποενότητα 3.2.3.1.α)

Η μέση υδροδυναμική διάμετρος των 3SL μετρήθηκε στα 97,7nm ( $\pm 1.1$ nm) με διασπορά μεγέθους των τιμών 0,064 ( $\pm 0.004$ ) ενώ το ζ-δυναμικό τους μετρήθηκε στα -31mV ( $\pm 6$ mV). Η παραπάνω τιμές είναι ικανοποιητικές και αναμενόμενες μιας και η ρύθμιση του μεγέθους πραγματοποιείται με μηχανική εξώθηση μέσω πολυκαρβονικών φίλτρων όπου δεν δύναται να υπάρχει μεγάλη πολυδιασπορά των τιμών του μεγέθους σε αντίθεση με την ρύθμιση του μεγέθους μέσω υπερήχων. Το ζ-δυναμικό παίρνει αναμενόμενες μεγάλες



αρνητικές τιμές μιας και το DPPG έχει συνολικό αρνητικό φορτίο λόγω της πολικής κεφαλής του.



**Γράφημα 4.19** . Α) Παρουσιάζει τη μέση υδροδυναμική διάμετρο (μέγεθος) καθώς και την κατανομή του μεγέθους (PI) των 3SLAg[3]. Β) Παρουσιάζει το ζ-δυναμικό των 3SL. Τα γράφηματα Α και Β βγαίνουν απευθείας από το κατάλληλο πρόγραμμα που συνοδεύει το όργανο φασματοσκοπίας συσχετισμού φωτονίων (υποενότητα 3.2.3.1.α)

Η μέση υδροδυναμική διάμετρος των 3SLAg[3] μετρήθηκε στα 102.9nm ( $\pm 0.2$ nm) με διασπορά μεγέθους των τιμών 0,088 ( $\pm 0.031$ ) ενώ το ζ-δυναμικό τους μετρήθηκε στα -51.2mV ( $\pm 5.6$ mV). Όπως και με τα 3SL, τα αποτελέσματα αυτά είναι ικανοποιητικά και αναμενόμενα.

#### 4.2.2.2 HPTLC-FID

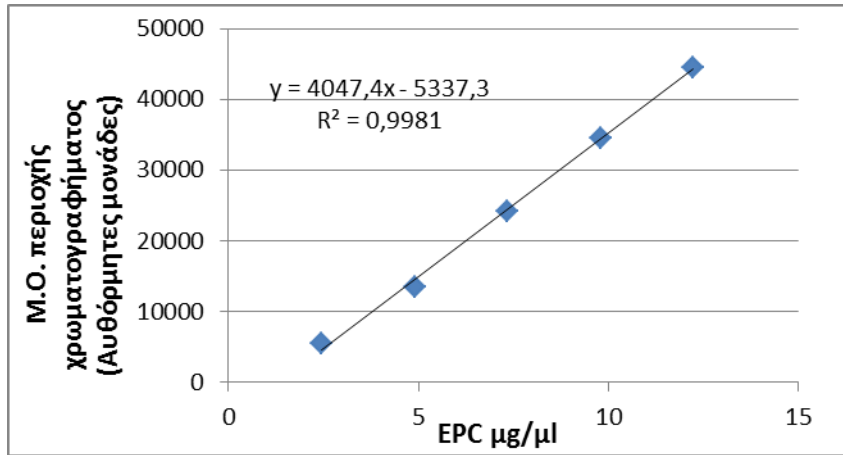
Μέσω αυτή της μεθόδου πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός των λιπιδίων στο τελικό προϊόν των 3SL και των 3SLAg[3]. Το σύστημα ανάπτυξης (κινητή φάση) που τελικά απέδωσε τον καλύτερο διαχωρισμό του EPC, DPPG και Ag[3] ήταν:

Χλωροφόρμιο : Μεθανόλη : Οξικό Οξύ (CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:gAcA)

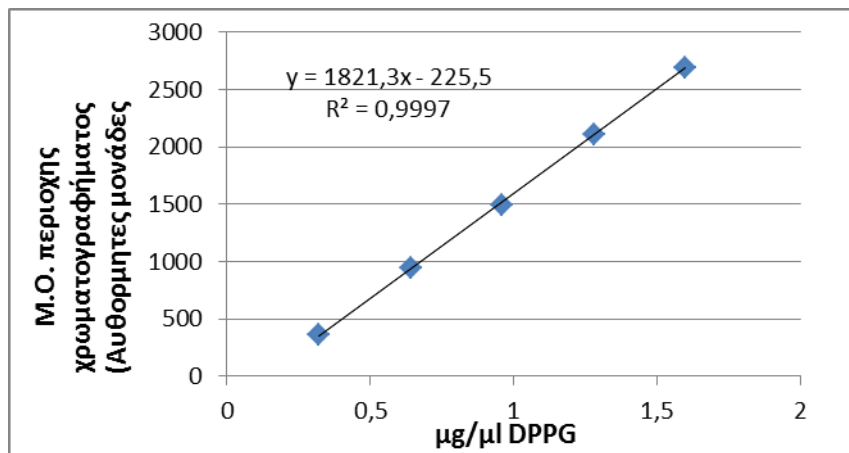
60 : 20 : 3.2 v/v

##### 4.2.2.2.α. Πρότυπες καμπύλες EPC, DPPG και Ag[3]

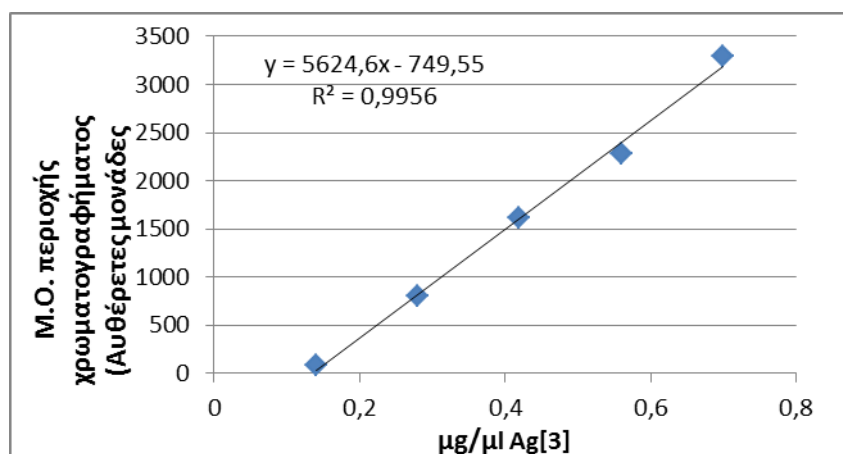
Μέσω των πρότυπων καμπυλών (CC), καθίσταται δυνατή η ποσοτικοποίηση του EPC, του DPPG και του Ag[3] στο τελικό λιποσωματικό εναιώρημα.



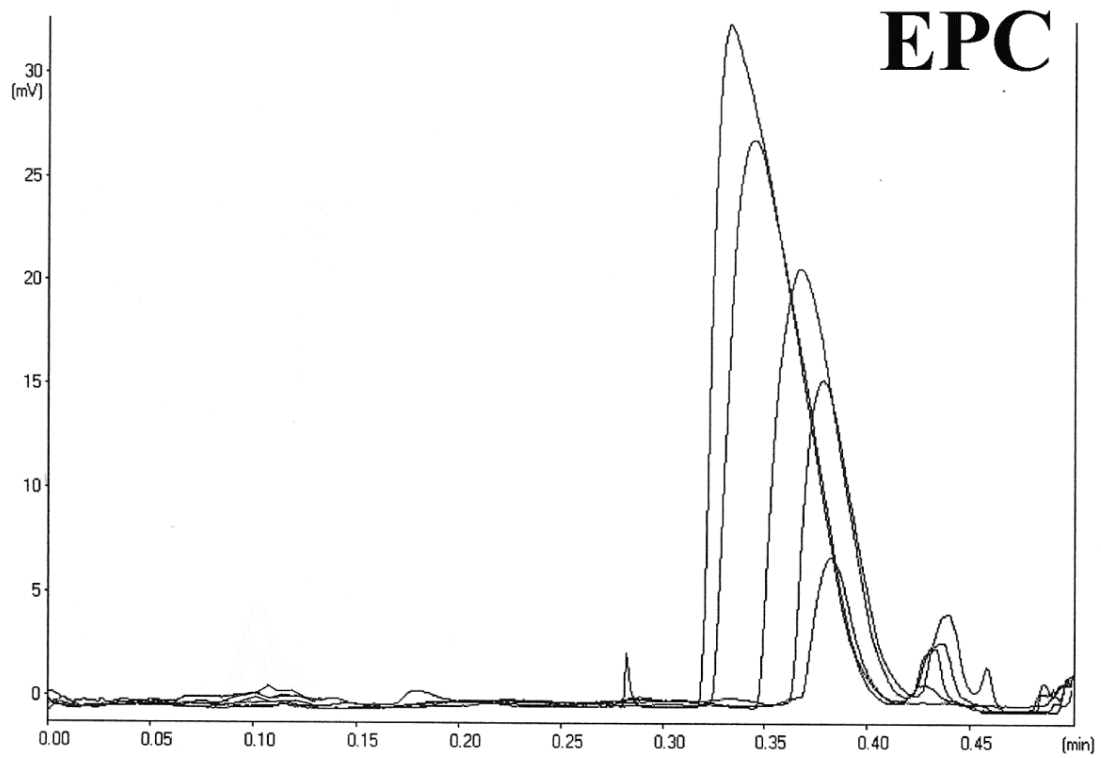
Γράφημα 4.20. Πρότυπη καμπύλη του ΕΡC.



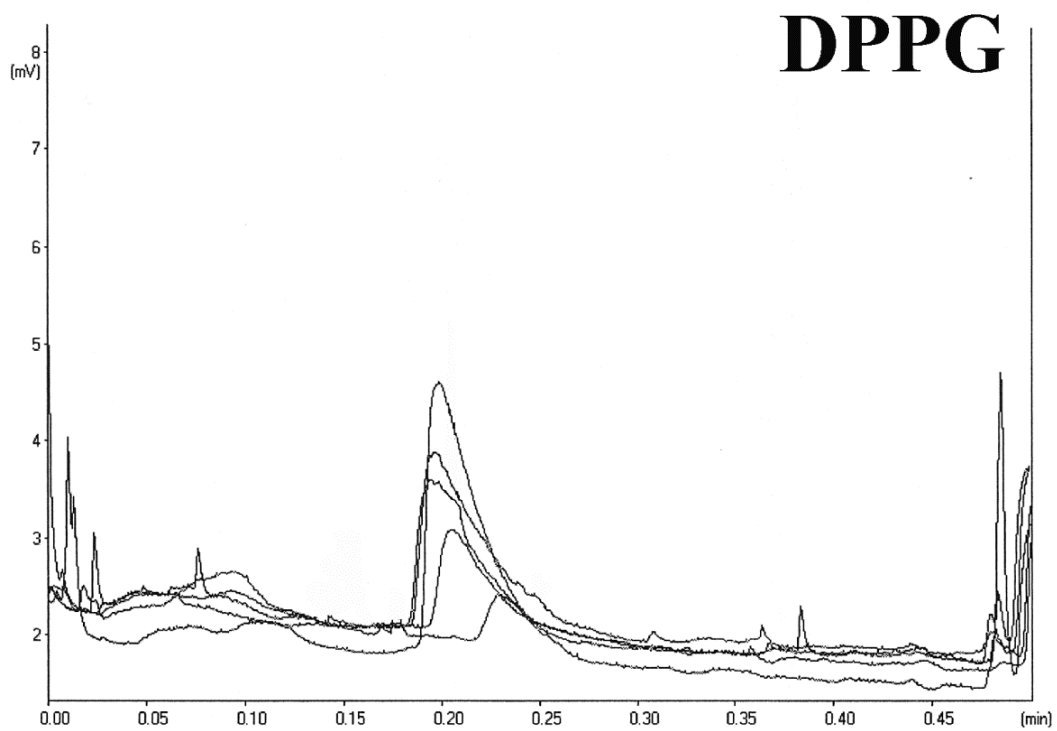
Γράφημα 4.21. Πρότυπη καμπύλη του DPPG



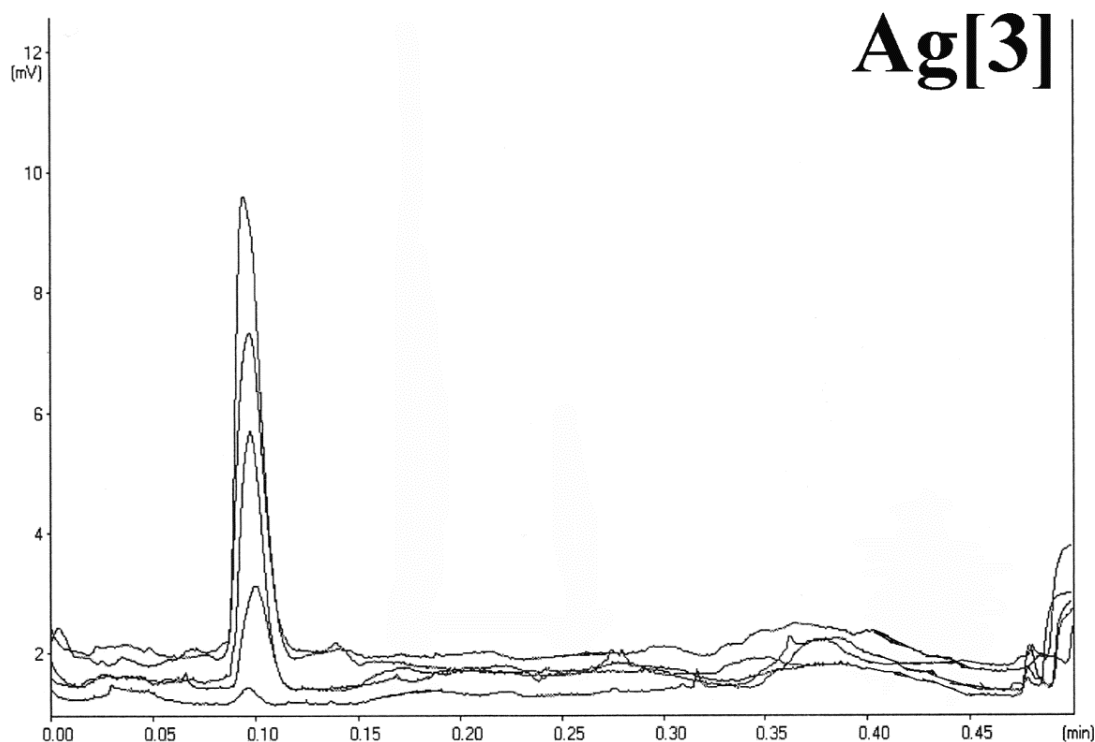
Γράφημα 4.22. Πρότυπη καμπύλη του Ag[3]



Γράφημα 4.23 Χρωματογράφημα της πρότυπης καμπύλης του EPC.



Γράφημα 4.24 Χρωματογράφημα της πρότυπης καμπύλης του DPPG

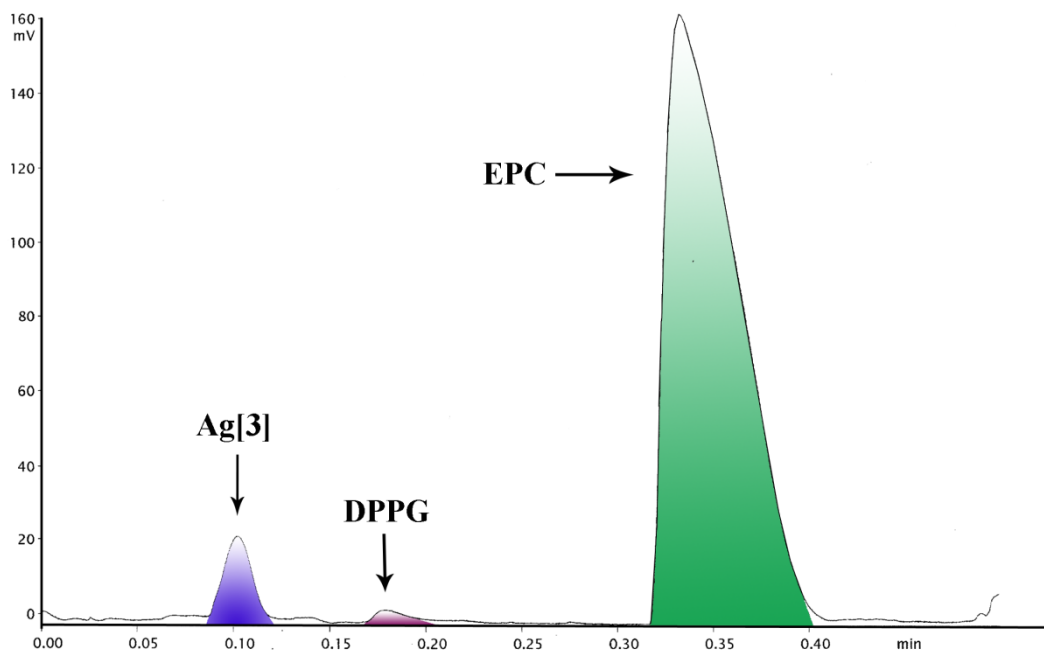


**Γράφημα 4.25** Χρωματογράφημα της πρότυπης καμπύλης του Ag[3]

Παρατηρούμε ότι τα Rf (rate of flow) του EPC είναι στα 0.32-0.40min, του DPPG στα 0.20-0.25min ενώ του Ag[3] στα 0.9-0.11min. Αυτό σημαίνει ότι το σύστημα ανάπτυξης του χλωροφορμίου/μεθανόλης/οξικού οξέως επέτυχε το διαχωρισμό των συστατικών των λιποσωμάτων ώστε να είναι εφικτός ο προσδιορισμός τους στο τελικό προϊόν.

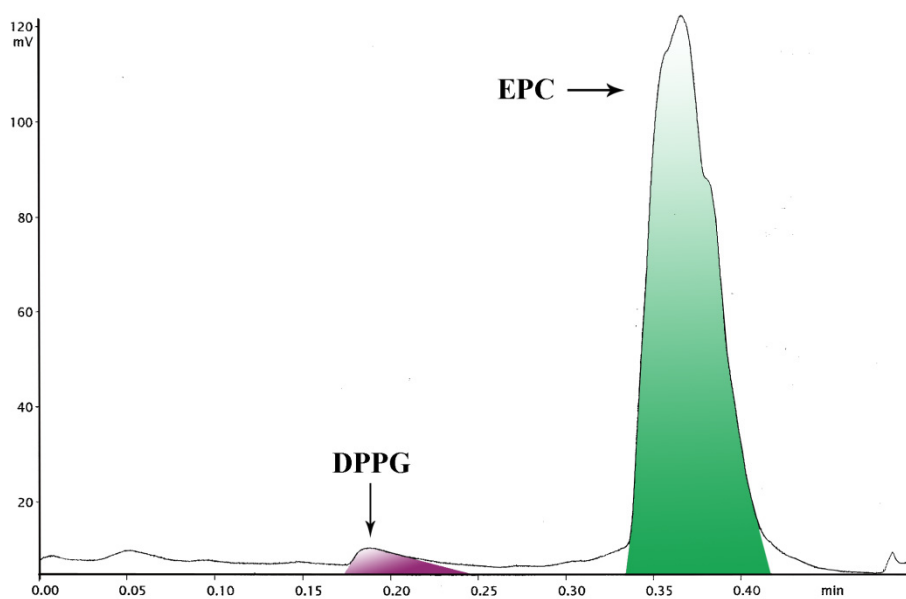
#### 4.2.2.2.β. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπιδίων

Μετά τη δημιουργία των πρότυπων καμπυλών των συστατικών (EPC, DPPG, Ag[3]) των λιποσωμάτων 3SL και 3SLAg[3], πραγματοποιήθηκε ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών προκειμένου να προσδιορίσουμε τη σύσταση των τελικών λιποσωμακίων προϊόντων.



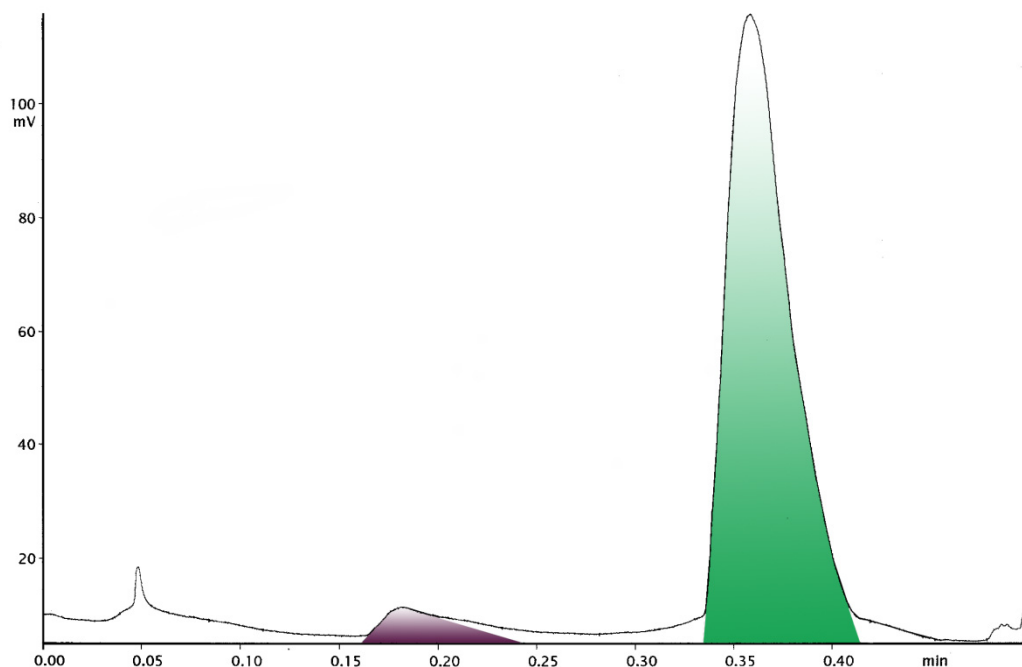
**Γράφημα 4.26** Χρωματογράφημα που παρουσιάζει και τα τρία διαφορετικά συστατικά των λιποσωμάτων σε δόσεις των πρότυπων (καθαρών) μορφών των ουσιών.

Σύμφωνα με το Γράφημα 4.26 είναι εμφανής ο καθαρός διαχωρισμός του EPC από το DPPG και το Ag[3] σε πρότυπες δόσεις από το σύστημα ανάπτυξης  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{gAcA}$  (60:20:3.2 v/v). Αυτό το σύστημα ανάπτυξης ήταν το ιδανικό που μας επέτρεψε την περαιτέρω ανάλυση των λιποσωμάτων.



**Γράφημα 4.27** Χρωματογράφημα των λιποσωμάτων 3SL

Από την ανάλυση του χρωματογραφήματος η τελική μοριακή αναλογία των EPC:DPPG στα λιποσώματα 3SL προσδιορίστηκε στα 27,4:1 με τελική συγκέντρωση 27mg/ml



**Γράφημα 4.28** Χρωματογράφημα των λιποσωμάτων 3SLAg[3]. Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει ανίχνευση του συμπλόκου [3].

Η τελική μοριακή αναλογία των EPC:DPPG στα λιποσώματα 3SLAg[3] προσδιορίστηκε στα 18,4:1 με τελική συγκέντρωση 25,5mg/ml.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του ενσωματωμένου Ag[3] στα λιποσώματα δεν ήταν δυνατός να γίνει μέσω της HPTLC-FID η οποία ανιχνεύει το οργανικό μέρος του συμπλόκου (τους υποκαταστάτες trp και CBZT) πιθανόν εξαιτίας του πολύ χαμηλού ποσοστού ενσωμάτωσης στα λιποσώματα επιπρόσθετα της μικρής ευαισθησίας της τεχνικής σε τόσο χαμηλά ποσοστά. Έτσι λιποσώματα στάλθηκαν για μέτρηση μέσω της φασματοσκοπίας της ατομικής απορρόφησης η οποία μετράει το ανόργανο μέρος του συμπλόκου, δηλαδή τον άργυρο, και η ευαισθησία της ανίχνευσης αγγίζει τα ανώτερα όρια των ng/lit.

Η τελική μοριακή αναλογία του συμπλόκου προς τα λιποσώματα (drug/lipid molar ratio) προσδιορίστηκε στα  $1.76 \times 10^{-5}$  με τελική συγκέντρωση του συμπλόκου [3] στα 0.584μM.

#### 4.2.2.2.γ Μελέτη Σταθερότητας

Πραγματοποιήθηκε μελέτη σταθερότητας των λιποσωματικών παρασκευασμάτων 3SL και 3SLAg[3] για διάρκεια 20 ημερών.

3SL						
Ημέρα	Μέγεθος (nm)	TA (nm)	PI	TA	ζ-δυναμικό (mV)	TA (mV)
0	97,7	1,3	0,072	0,013	-31	6
5	98,2	1,2	0,068	0,02	-28,4	3,5
10	97,9	0,1	0,072	0,018	-27,9	4,9
15	99,5	1,2	0,076	0,014	-25,3	5,2
20	98,8	1,1	0,069	0,022	-18,4	4,8

**Πίνακας 4.10** Μελέτη σταθερότητας των λιποσωμάτων 3SL. Ως TA ορίζεται η τυπική απόκλιση της εκάστοτε τιμής

3SLAg						
Ημέρα	Μέγεθος (nm)	TA (nm)	PI	TA	ζ-δυναμικό (mV)	TA (mV)
0	102,9	0,2	0,112	0,006	-51,2	5,6
5	100,5	1,3	0,131	0,019	-43,5	1,6
10	101,2	1,1	0,131	0,027	-43,7	8,6
15	102,4	0,9	0,124	0,015	-44,2	5,5
20	103,2	1,2	0,119	0,021	-42,3	6,1

**Πίνακας 4.11** Μελέτη σταθερότητας των λιποσωμάτων 3SLAg. Ως TA ορίζεται η τυπική απόκλιση της εκάστοτε τιμής

Από τα δεδομένα που παρουσιάζονται στους Πίνακες 4.10 και 4.11 τα δύο λιποσωμιακά παρασκευάσματα παρουσίασαν σταθερότητα τόσο στο μέγεθός τους όσο και στην πολυδιασπορά των τιμών (PI) του μεγέθους τους για τουλάχιστον 20 ημέρες που πραγματοποιήθηκε η μελέτη. Το ζ-δυναμικό παρουσίασε μια μικρή μειωτική τάση του αρνητικού φορτίου αλλά παρέμεινε σε αρκετά υψηλά αρνητικά επίπεδα κατά τη διάρκεια όλης της μελέτης.

#### 4.2.2.2.δ Μελέτη Κυτταροτοξικότητας

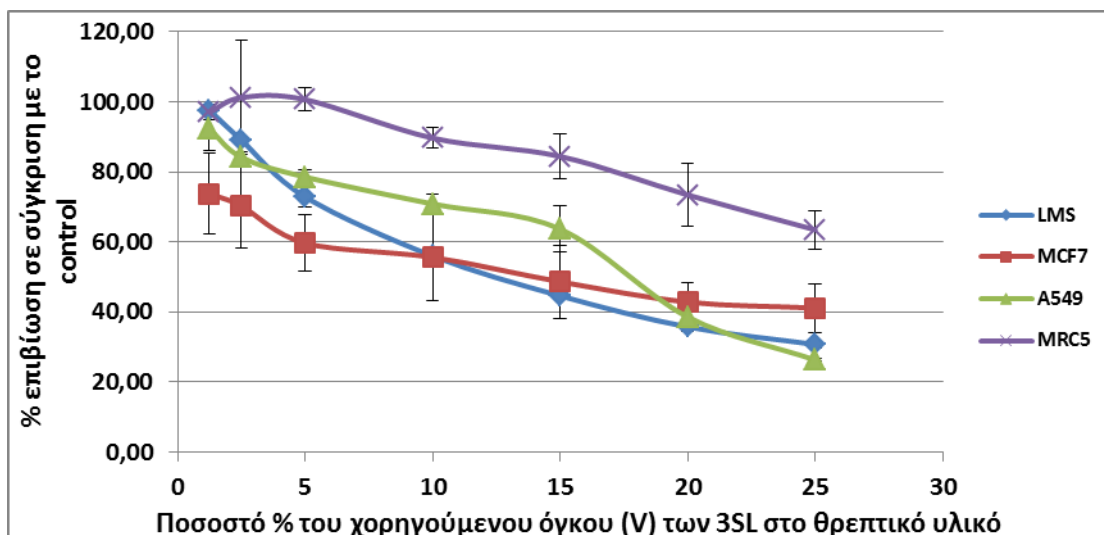
Τα λιποσωμιακά παρασκευάσματα ελέγχθησαν απέναντι στις κυτταρικές σειρές MRC5, LMS, MCF7 και A549 για τις κυτταροτοξικές του ιδιότητες. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου του MTT.

Σ' αυτή τη μελέτη χορηγήθηκαν διάφοροι όγκοι των 3SL και οι αντίστοιχοι όγκοι των 3SLAg[3] και μετρήθηκε η αναστολή της κυτταρικής επιβίωσης στους αντίστοιχους όγκους χορήγησης.

	LMS		MCF7		A549		MRC5	
	% ποσοστό του χορηγούμενου όγκου (V) των 3SL στο θρεπτικό υλικό	% επιβίωση (±) T.A.	% επιβίωση (±) T.A.	% επιβίωση (±) T.A.	% επιβίωση (±) T.A.	% επιβίωση (±) T.A.	% επιβίωση (±) T.A.	
1,25	97,59	0,80	73,79	11,61	92,28	6,24	97,08	2,27
2,5	89,06	0,70	70,24	11,96	84,17	1,44	101,22	16,39
5	72,86	2,80	59,68	7,98	78,56	2,09	100,66	3,38
10	55,98	2,80	55,62	12,37	70,86	2,91	89,66	2,9
15	44,61	1,10	48,64	10,39	63,65	6,67	84,43	6,41
20	35,75	1,20	42,83	5,512	38,58	2,94	73,44	9,09
25	30,74	0,90	41,12	6,99	26,32	0,48	63,48	5,55

**Πίνακας 4.12** Παρουσιάζει τα ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων των διαφορετικών σειρών σε σύγκριση με το % ποσοστό του χορηγούμενου όγκου (V) των λιποσωμάτων 3SL στον τελικό όγκο του διαλύματος DMEM+3SL. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

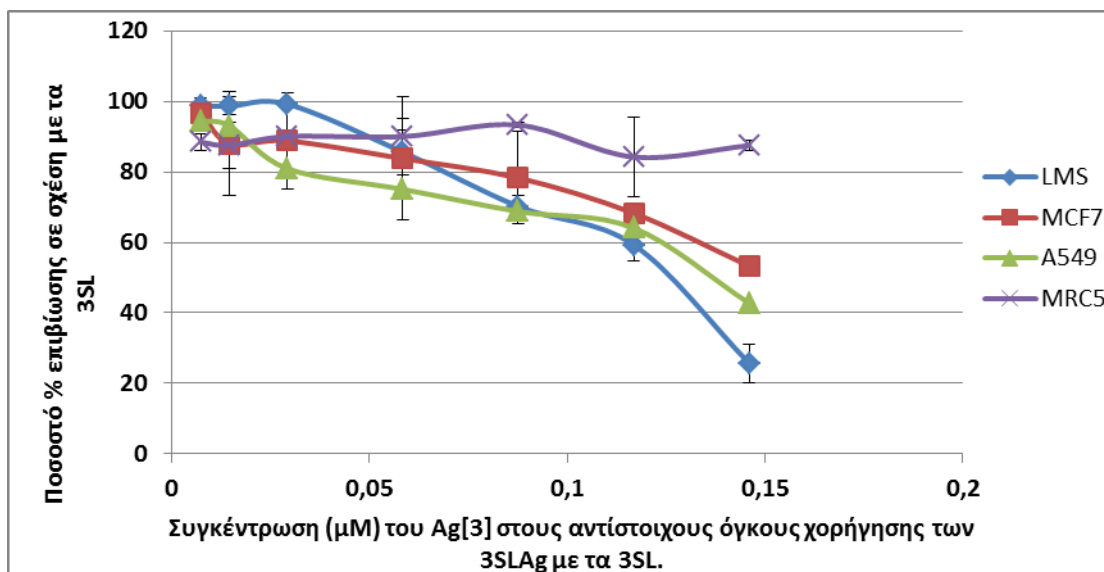




**Γράφημα 4.29** Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της χορήγησης των λιποσωμάτων 3SL σε τέσσερις κυτταρικές σειρές. Το παρόν γράφημα παρουσιάζει την μειωτική τάση επιβίωσης των κυττάρων σε αυξανόμενους όγκους χορήγησης λιποσωμάτων. Η κυτταροτοξική δράση που εμφανίζεται είναι σε σχέση με το % ποσοστό του χορηγούμενου όγκου (V) των 3SL στο τελικό όγκο του διαλύματος DMEM+3SL. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τ.α.

	LMS		MCF7		A549		MRC5	
C του Ag[3] στις χορηγούμενες ποσότητες λιποσωμάτων ( $\mu$ M)	% επιβίωση	T.A. ( $\pm$ )	% επιβίωση	T.A. ( $\pm$ )	% επιβίωση	T.A. ( $\pm$ )	% επιβίωση	T.A. ( $\pm$ )
0,0073	98,76	0,78	96,63	4,39	94,48	6,11	88,43	2,35
0,0146	98,61	2,55	87,98	14,83	93,05	8,11	87,55	6,65
0,0292	99,23	1,09	88,81	13,7	80,91	1,8	90,04	0,33
0,0584	85,62	6,39	83,78	17,57	75,06	8,67	90,03	5,15
0,0876	70,17	3,02	78,28	13,17	68,76	4,19	93,29	0,77
0,1168	59,27	4,49	68,26	1,95	64,07	8,11	84,22	11,32
0,146	25,65	5,59	53,25	1,39	42,69	3,17	87,49	1,62

**Πίνακας 4.13** Παρουσιάζει τα καθαρά ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων σε σχέση με τη χορηγούμενη εγκλωβισμένη στα λιποσώματα 3SLAg[3] συγκέντρωση του Ag[3]. Τα ποσοστά αυτά είναι μετά την αφαίρεση των ποσοστών κυτταροτοξικότητας των 3SL στους ίδιους όγκους χορήγησης (Πίνακας 4.12). Οπότε η μείωση αυτή στην επιβίωση οφείλεται στη καθαρή δράση του Ag[3]. Τα ποσοστά των χορηγούμενων όγκων σε σχέση με τον τελικό όγκο του διαλύματος DMEM+λιποσώματα αναφέρονται στο Γράφημα 4.29. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τ.α.



**Γράφημα 4.30** Γραφική αναπαράσταση του Πίνακα 4.13 που παρουσιάζει την τάση της κυτταροτοξικής δράσης που οφείλεται στο σύμπλοκο Ag[3] που βρίσκεται ενσωματωμένο στα λιποσώματα 3SLAg[3] αφού αφαιρέθηκε η κυτταροτοξικότητα που παρουσιάζουν τα 3SL στους ίδιους χορηγούμενους όγκους.

		LMS		MCF7		A549		MRC5	
% του όγκου χορήγησης	C (μM) του Ag[3] στους αντίστοιχους όγκους χορήγησης των 3SLAg με τα 3SL.	% αύξηση	SD	% αύξηση	SD	% αύξηση	SD	% αύξηση	SD
1,25	0,0073	1,24	0,71	3,38	4,4	5,52	6,11	11,56	2,35
2,5	0,0146	1,39	2,55	12,02	14,84	6,94	8,11	12,44	6,65
5	0,0292	0,77	1,09	11,19	13,7	19,09	1,8	9,95	0,32
10	0,0584	14,38	6,4	16,22	17,52	24,94	8,66	9,97	5,15
15	0,0876	29,83	3,02	21,71	13,17	31,23	4,19	6,7	0,76
20	0,1168	40,73	4,5	31,74	1,95	35,92	8,1	15,77	11,31
25	0,146	74,35	5,6	46,75	1,39	57,3	3,17	12,5	1,61

**Πίνακας 4.14** Παρουσιάζονται τα ποσοστά αύξησης της κυτταροτοξικής δράσης των 3SLAg σε σχέση με τα 3SL λιποσώματα η οποία οφείλεται στο Ag[3]. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

Η παραπάνω μελέτη της κυτταροτοξικότητας των λιποσωμάτων αποκάλυψε ότι η δράση των σκέτων λιποσωμάτων (3SL) στα κύτταρα *in vitro* παρουσιάζει ικανότητα αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού η οποία εμφανίζει ένα δοσοεξαρτώμενο πρότυπο. Επίσης η χορήγηση των λιποσωμάτων με το ενσωματωμένο φάρμακο (3SLAg) αποκάλυψε επίσης αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που όμως εμφανίζεται σε μεγαλύτερα ποσοστά πράγμα που σημαίνει ότι η ενισχυμένη δράση πάνω στα κύτταρα οφείλεται στο ίδιο το σύμπλοκο του αργύρου το οποίο μάλιστα βρίσκεται σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις απ' ό τι στην ελεύθερη μορφή της χορήγησης του.

Σε αυτό το σημείο θα μπορούσαμε να κάνουμε μια σύγκριση μεταξύ της χορηγούμενης ελεύθερης μορφής του Ag[3] και της ενσωματωμένης σε λιποσώματα αν θεωρήσουμε την καθαρή την δράση του Ag[3] πέρα από την προκαλούμενη κυτταροτοξικότητα των λιποσωμάτων. Έτσι έχουμε:

Ag[3]			
Ελεύθερη μορφή		Στο σύμπλοκο	
C (μM)	% επιβίωση	C (μM)	% επιβίωση
0,3125	95	0,007	98,76
0,625	84	0,015	98,61
1,25	71	0,029	99,23
2,5	57,63	0,058	85,62
5	19,98	0,087	70,17
10	0,8	0,1168	59,27
		0,146	25,65

**Πίνακας 4.15** Σύγκριση της επιβίωσης των LMS κυττάρων σε αυξανουσες συγκεντρώσεις του Ag[3] στην ελεύθερη και στην λιποσωματική του μορφή.

Η IC<sub>50</sub> στα LMS με την ελεύθερη μορφή βρέθηκε στα 2.78 μM ενώ στη λιποσωματική μορφή στα 0.12μM.

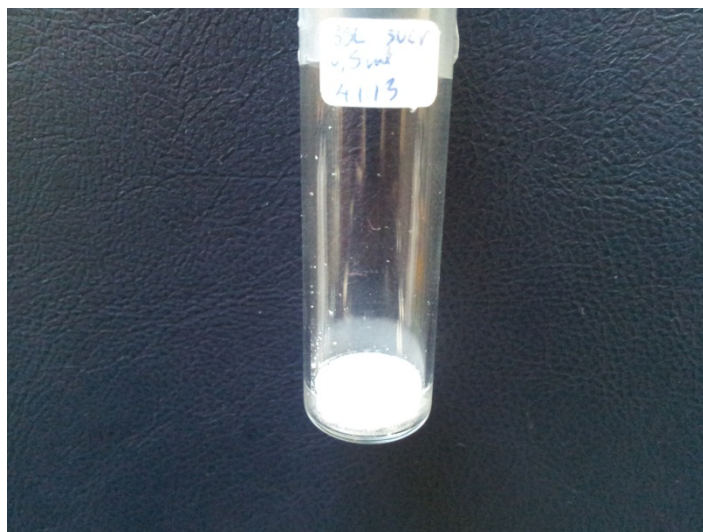
Αντιστοίχως μπορούν να υπολογιστούν και οι IC<sub>50</sub> και στις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές που έχει πραγματοποιηθεί μελέτη.

		IC <sub>50</sub> (μM)			
		MRC5	LMS	MCF7	A549
Ag[3]	Ελεύθερο	14.08	2.78	3.31	3.19
	Λιποσωμακό	Δ/Μ	0.11	0.169	0.151

**Πίνακας 4.16** Συγκεντρωτικός πίνακας σύγκρισης των IC<sub>50</sub> τιμών μεταξύ της χορηγούμενης ελεύθερης μορφής του συμπλόκου και της λιποσωματικής. Δεν ήταν δυνατή η εύρεση της IC<sub>50</sub> στα MRC5 στην λιποσωματική μορφή μιας και είχαμε περιορισμό του όγκου χορήγησης. Στους όγκους όμως που χορηγήθηκε είχαμε επιβίωση >80% (Πίνακας 4.13).

#### 4.2.2.3 Λυοφιλοποίηση

Προκειμένου να αποθηκευτούν τα δείγματα για μεγάλα χρονικά διαστήματα λυοφιλοποιήθηκαν και την κατάλληλη χρονική στιγμή έγινε επανασύσταση τους με ddH<sub>2</sub>O.



**Εικόνα 4.11** Μορφή Λυοφιλοποιημένου δείγματος. Η επανασύσταση πραγματοποιείται με τον ίδιο όγκο νερού που είχε πριν τη λυοφιλοποίηση.

## 4.3 *In Vivo*

### 4.3.1 Έλεγχος Τοξικότητας

#### 4.3.1.1 Οξεία Τοξικότητα (OT)

Η μελέτη της οξείας τοξικότητας περιελάμβανε μία εφάπαξ δόση του 1ml σε τρικαπρυλίνη του συμπλόκου Ag[3], λογαριθμικού σχήματος χορήγησης των 0.8, 8, 80 mg/kg ΣΒ. Μετά την χορήγηση της δόσης τα πειραματόζωα εμφάνισαν ατονικότητα για τις επόμενες περίπου 12 ώρες. Παρ' όλα αυτά τα πειραματόζωα επανήλθαν στη φυσιολογική τους κατάσταση την επόμενη ημέρα. Η εμφάνιση της ατονικότητας, συνοδευόμενη από πόνο, προήλθε μετά την IP έγχυση της δόσης. Η ίδια συμπεριφορά υπήρχε και στα πειραματόζωα που έλαβαν 1ml μόνο από το διαλύτη (τρικαπρυλίνη). Αυτό η συμπεριφορά λοιπόν φαίνεται να επάγεται από το διαλύτη και όχι από το σύμπλοκο.

Σε καμία από τις χορηγούμενες δόσεις δεν παρατηρήθηκε τοξικός θάνατος από την ίδια την δόση, οπότε αποφασίστηκε να χορηγηθεί και η διπλάσια της ανώτερης δόσης του λογαριθμικού σχήματος, δηλαδή στα 160mg/kg ΣΒ. Ούτε και σε αυτή την δόση δεν παρατηρήθηκε τοξικός θάνατος. Η δοκιμασία της οξείας τοξικότητας σταμάτησε σε αυτή τη δόση και δεν υπήρχε δυνατότητα αύξηση της δόσης για έλεγχο της οξείας τοξικότητας. Η LD<sub>50</sub> (δόση η οποία προκαλεί θάνατο στο 50% των πειραματοζώων), δεν προσδιορίστηκε.

Η τοξικότητα του Ag[3] προσδιορίστηκε στα πειραματόζωα Wistar βασιζόμενη στην κλινική εικόνα, στον έλεγχο πιθανής απώλειας σωματικού βάρους και στα ιστολογικά ευρήματα. Σύμφωνα με την μικροσκοπική εξέταση των ιστών δεν παρατηρήθηκε καμία ιστοπαθολογική αλλοίωση στην OT1. Στην OT2 παρατηρήθηκε ήπια φλεγμονή στο ήπαρ κατά φύση εικόνα στα υπόλοιπα όργανα που ελέχθησαν (πνεύμονας, εγκέφαλος, καρδιά, σπλήνας, και νεφρά). Παρόμοια εικόνα είχαμε στα πειραματόζωα της OT3 με ήπια προς ελάχιστη φλεγμονή στο ήπαρ και ήπιο οίδημα κυψελίδων με κατά φύση εικόνα στα υπόλοιπα όργανα. Στην OT4 δεν άλλαξε η εικόνα και παρατηρήθηκε μια ήπια προς ελάχιστη φλεγμονή στο ήπαρ καθώς και ήπιο οίδημα στον πνεύμονα με κατά φύση εικόνα στα υπόλοιπα όργανα.

Δόση (mg/kg ΣΒ)	Πνεύμονας	Ήπαρ	Νεφρός	ΔΣΒ% <sup>a</sup>	Θάνατος (%)
OT1 (0.8)	(-)	(-)	(-)	+ 0.41	0
OT2 (8)	(-)	(+-)	(-)	+0.11	0
OT3 (80)	(+)	(+-)	(-)	+1.67	0
OT4 (160)	(+-)	(+-)	(-)	+1,2	0
OT5 (control)	(-)	(-)	(-)	+0,2	0

**Πίνακας 4.17** Εκτίμηση των ιστοπαθολογικών ευρημάτων των πειραματοζώων της μελέτης της οξείας τοξικότητας .

<sup>a</sup>ΔΣΒ% = [(Μέσο ΣΒ της ημέρας Π – Μέσο ΣΒ ημέρας 0)/(Μέσο ΣΒ ημέρας 0)]\*100

(-) = απουσία ιστολογικών αλλοιώσεων, (+-) = ελάχιστες ιστολογικές αλλοιώσεις, (+) ήπιες ιστολογικές αλλοιώσεις

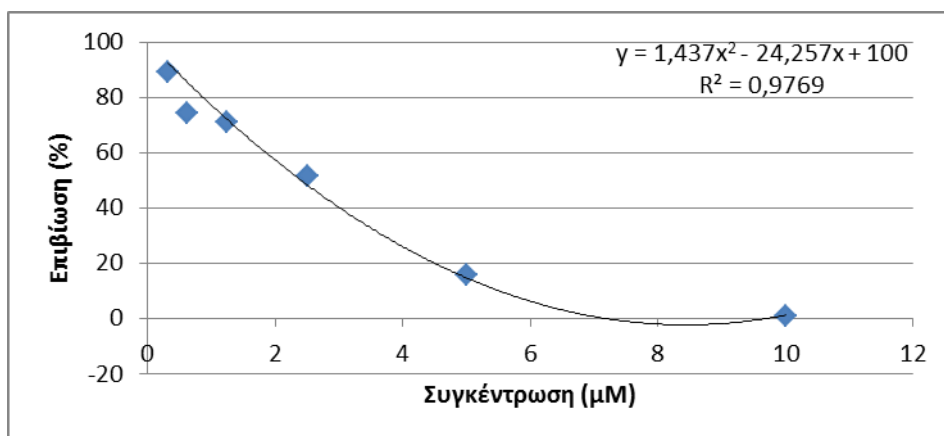
ΔΣΒ%: Ποσοστό αλλαγής Σωματικού Βάρους, OT1: Οξεία τοξικότητα 1 (0.8mg/kg ΣΒ), OT2: Οξεία τοξικότητα 2 (8mg/kg ΣΒ), OT3: Οξεία τοξικότητα 3 (80mg/kg ΣΒ), OT4: Οξεία τοξικότητα 4 (160mg/kg ΣΒ), OT5: Οξεία τοξικότητα 5-ομάδα ελέγχου(control).

#### 4.3.1.2 Χρόνια τοξικότητα (ΧΤ)

Όπως και στα πειράματα της οξείας τοξικότητας έτσι και εδώ η χρόνια τοξικότητα προσδιορίστηκε με βάση την κλινική εικόνα, την απώλεια σωματικού βάρους και τα ιστοπαθολογικά ευρήματα.

Οι δόσεις που επιλέχθηκαν για την μελέτη της χρόνιας τοξικότητας επιλέχθηκαν με κριτήριο τα δεδομένα της οξείας τοξικότητας καθώς και των ιστοπαθολογικών της αναλύσεων. Η μεγαλύτερη εφάπαξ δόση που χορηγήθηκε στην οξεία τοξικότητα ήταν τα 160mg/kg ΣΒ. Έτσι μη θέλοντας να ξεπεραστεί αυτή η δόση (λόγω έλλειψης ιστοπαθολογικών και τοξικότητας δεδομένων) επιλέξαμε τα 27mg/kg ΣΒ για 6 δόσεις (σύνολο 162mg –τα 2mg θεωρούνται αμελητέα αν ληφθεί υπ' όψιν το πειραματικό λάθος και ο μεγάλος χρόνος χορήγησης) σε διαστήματα χορήγησης των 6 ημερών σε σύνολο χορήγησης τις 30 ημέρες. Επιλέχθηκαν οι 30 ημέρες ως διάστημα χορήγησης, μιας και προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι αυτός είναι ο μέσος όρος επιβίωσης του καρκινικού μοντέλου των επίμυων Wistar που χρησιμοποιεί το εργαστήριο της Φυσιολογίας και που επίσης θα χρησιμοποιηθεί και για την παρούσα μελέτη. Τα 8mg/kg ΣΒ επιλέχθηκαν διότι προσπαθήσαμε να κάνουμε εξομοίωση των *in vitro* αποτελεσμάτων των κυτταροτοξικών μελετών. Θεωρώντας κατά σύμβαση, ότι ένα πειραματόζωο 200g αντιστοιχεί σε έναν

υδατικό «σάκο» 200ml και λαμβάνοντας υπόψη ότι η IC<sub>100</sub> του Ag[3] στα LMS κύτταρα είναι 10μM (Γράφημα 4.31) υπολογίστηκε ότι η μία δόση είναι λίγο υψηλότερα από 8mg/kg ΣΒ. Έτσι επιλέχθηκαν οι δοσολογίες για την προκαταρκτική μελέτη της χρόνιας τοξικότητας.



**Γράφημα 4.31** Παρουσιάζεται η δοσοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση του συμπλόκου [3] σε LMS κύτταρα.

Και στις δύο ομάδες, τη XT1 και τη XT2 δεν παρατηρήθηκαν καθόλου ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις και οι η γενική εικόνα του πνεύμονα, του ήπατος και των νεφρών ήταν κατά φύσιν.

Δόση (mg/kg ΣΒ)	Πνεύμονας	Ήπαρ	Νεφρός	ΔΣΒ% <sup>a</sup>	Θάνατος (%)
XT1 (8)	(-)	(-)	(-)	+ 0.23	0
XT2 (27)	(-)	(-)	(-)	+0.15	0
XT3 (control)	(-)	(-)	(-)	+0.18	0

**Πίνακας 4.18** Εκτίμηση των ιστοπαθολογικών ευρημάτων των πειραματοζώων της μελέτης της χρόνιας τοξικότητας

<sup>a</sup>ΔΣΒ% = [(Μέσο ΣΒ της ημέρας Π – Μέσο ΣΒ ημέρας 0)/(Μέσο ΣΒ ημέρας 0)]\*100

(-) = απουσία ιστολογικών αλλοιώσεων

ΔΣΒ%: Ποσοστό αλλαγής Σωματικού Βάρους; XT1: Χρόνια τοξικότητα 1(6x8mg/kg ΣΒ), XT2: Χρόνια τοξικότητα 2 (6x27mg/kg ΣΒ), XT3: Χρόνια τοξικότητα 3-ομάδα ελέγχου (control)

### 4.3.2 Αντικαρκινική Δράση του Συμπλόκου Ag[3] σε Καρκινοπαθείς

#### Επίμους Wistar

Μετά την μελέτη της οξείας και χρόνιας τοξικότητας, εκτιμήθηκε η αντικαρκινική πλέον δράση του συμπλόκου Ag[3], χορηγούμενο σε τρεις διαφορετικές συνθήκες η οποίες περιελάμβαναν την IP χορήγηση του σε δύο διαφορετικά φαρμακευτικά σχήματα στην ελεύθερη του μορφή (στα 8 και 27mg/kg ΣΒ) και την IV χορήγηση του στη λιποσωμακή του μορφή (2.5μg/kg ΣΒ). Οι δόσεις της IP έγχυσης της ελεύθερης μορφής του φαρμάκου επιλέχθηκαν εξαιτίας των αποτελεσμάτων της μελέτης της χρόνιας τοξικότητας κατά την οποία δεν ανιχνεύτηκε καμία ιστοπαθολογική αλλοίωση. Από την άλλη η δόση της λιποσωμακής μορφής του Ag[3] ήταν η μέγιστη που μπορούσαμε να χορηγήσουμε σύμφωνα με το ποσοστό ενσωμάτωσης του συμπλόκου στα λιποσώματα. Η δόση αυτή περιέχεται σε 1ml λιποσωμακού εναιωρήματος που είναι στα ήδη αρκετός όγκος για ενδοφλέβια χορήγηση. Σύμφωνα πάντα με τα αποτελέσματα από τη στιγμή που η χρόνια και η οξεία τοξικότητα δεν έδειξαν σοβαρά ιστοπαθολογικά ευρήματα, αποφασίστηκε η χορήγηση των 6 δόσεων ανά καρκινοπαθές Wistar να πραγματοποιείται κάθε 3 24ωρα ώστε να επιτευχθεί αύξηση της φαρμακευτικής αποτελεσματικότητας.

ΟΜΑΔΑ	MST (D)	Median Min-Max (D)	MTW (g)	MTGR (g/D)
OE	27,5±3,3	28 (22-32)	76,2±23,3	2,77±0,76
ΟΠ1	39,7±3,3*	38 (36-45)	76,2±22,9	1,88±0,38*
ΟΠ2	43,3±2,05* <sup>#</sup>	44 (40-46)	58,2±13,2* <sup>#</sup>	1,34±0,32* <sup>#</sup>
ΟΠL	35±4,1*	34 (32-44)	103,1±30,25*	2,92±0,59
ΟΠLAg	43,3±2,8* <sup>^</sup> <sup>#</sup>	44 (40-46)	65,41±12,23 <sup>^</sup>	1,5±0,23* <sup>^</sup> <sup>#</sup>

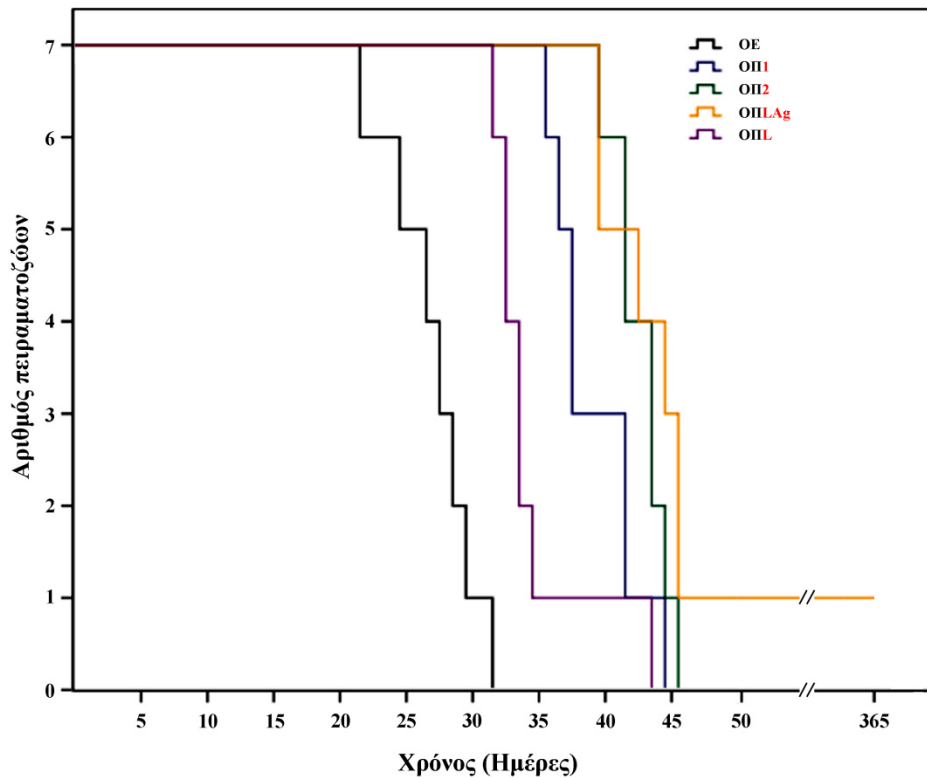
**Πίνακας 4.19** Σύγκριση των δεικτών μεταξύ των πειραματικών ομάδων που έλαβαν μέρος στην *in vivo* αντικαρκινική μελέτη του συμπλόκου του Ag[3].

Για τους συμβολισμούς των ομάδων βλ.υποενότητα 3.3.3.

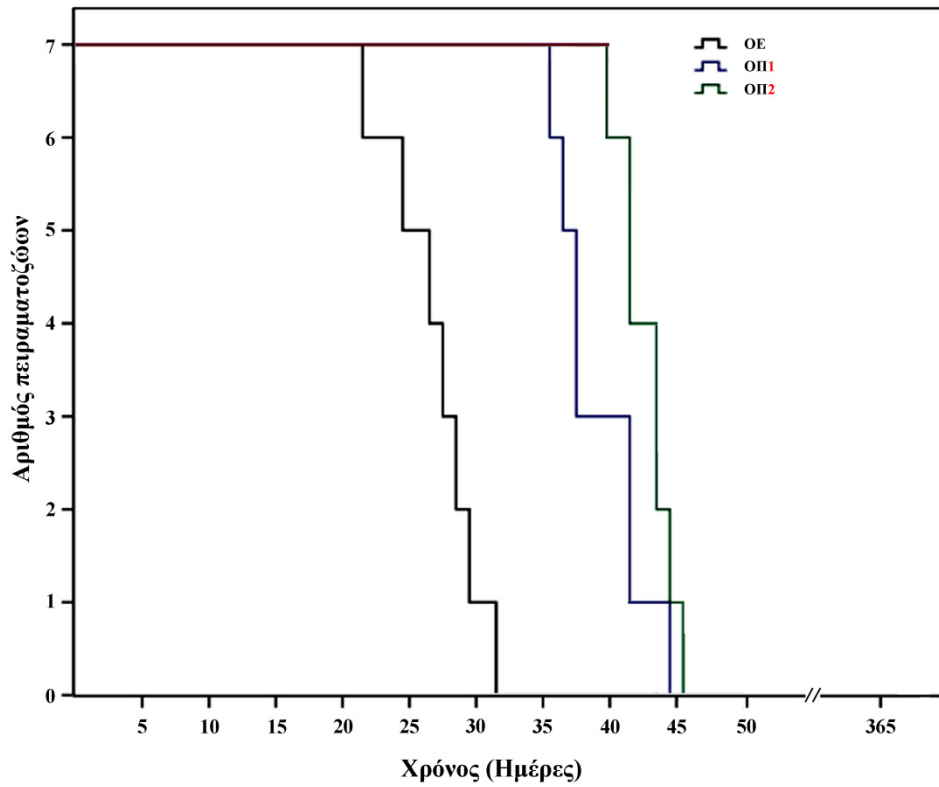
MST = Μέσος χρόνος επιβίωσης, MTW: μέσο βάρος όγκων; MTGR: Μέσος όρος ανάπτυξης όγκου, D = ημέρες, \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την OE (p<0.05), <sup>^</sup>Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ΟΠL(p<0.05), <sup>#</sup>Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ΟΠ1 (p<0.05). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.



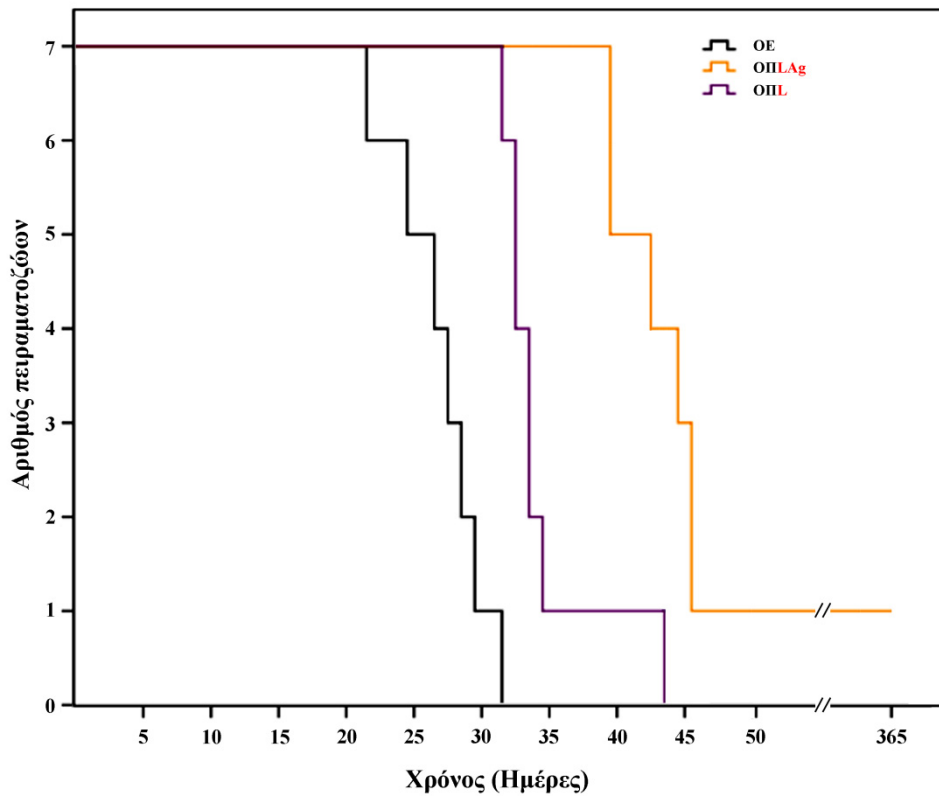
Σύμφωνα με τον Πίνακα 4.19 οι μέσοι χρόνοι επιβίωσης όλων των ομάδων έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ΟΕ. Επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά έχουν στο ρυθμό ανάπτυξης του όγκου σε σύγκριση με την ΟΕ εκτός από την ΟΠΛ. Οι ομάδες ΟΠΛ και ΟΠ2 έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τη ΟΕ στο μέσο όρο της μάζας των όγκων. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις παραμέτρους μεταξύ των ομάδων ΟΠ2 και ΟΠΛAg. Όμως και οι δύο αυτές ομάδες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με την ΟΠ1. Ακόμα η ΟΠ1 και η ΟΠ2 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε όλες τις παραμέτρους. Τέλος όλοι οι παράμετροι της ΟΠΛAg εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με την ΟΠΛ.



**Γράφημα 4.32** Παρουσιάζει την καμπύλη θανάτου (death curve) των πειραματοζώων όλων των ομάδων.



**Γράφημα 4.33** Παρουσιάζει την καμπύλη θανάτου (death curve) των πειραματοζώων των ομάδων που έλαβαν την ελεύθερη μορφή του θανάτου σε σύγκριση με την OE



**Γράφημα 4.34** Παρουσιάζει την καμπύλη θανάτου (death curve) των πειραματοζώων των ομάδων που έλαβαν τα λιποσώματα με (3SLAg[3]) και χωρίς (3SL) το σύμπλοκο σε σύγκριση με την OE.

#### 4.3.2.1 Ιστοπαθολογική Ανάλυση

Μετά το θάνατο τους, τα όργανα των πειραματοζώων συλλέχτηκαν και στάλθηκαν για παθολογοανατομική ανάλυση.

Η ανάλυση έδειξε ότι στα πειραματόζωα της ομάδας ΟΕ τα όργανα (πνεύμονας, ήπαρ και νεφρός) ήταν κατά φύσιν ενώ τεμάχια του όγκου αποκάλυψαν < 30% γεωγραφική νέκρωση.

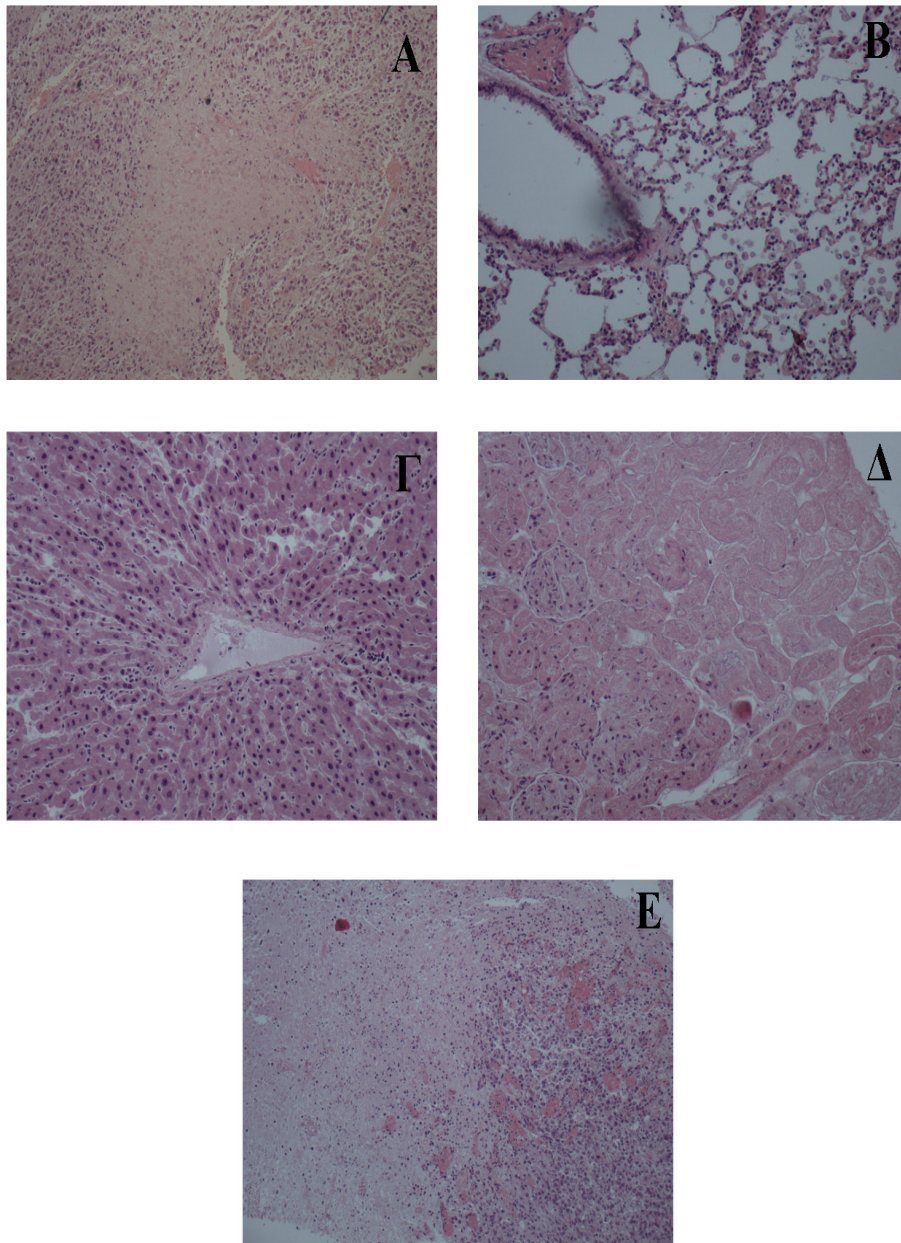
Στα πειραματόζωα της ομάδας ΟΠ1 αποκαλύφθηκε ήπιο οίδημα των πνευμονικών κυψελίδων και ήπια φλεγμονή του ήπατος καθώς και επιπολής νέκρωση στο 1/3 του φλοιού των νεφρών. Η ανάλυση τεμαχίων του όγκου έδειξε εκτεταμένη τοξική νέκρωση σε >50% του όγκου

Η ομάδα ΟΠ2 είχε περίπου τα ίδια αποτελέσματα με την ΟΠ, με αφρώδη μακροφάγα στις κυψελίδες (ήπια φλεγμονή) και πάνω από το 50% του όγκου ήταν νεκρωτικό. Το ήπαρ και οι νεφροί εμφανίστηκαν φυσιολογικοί.

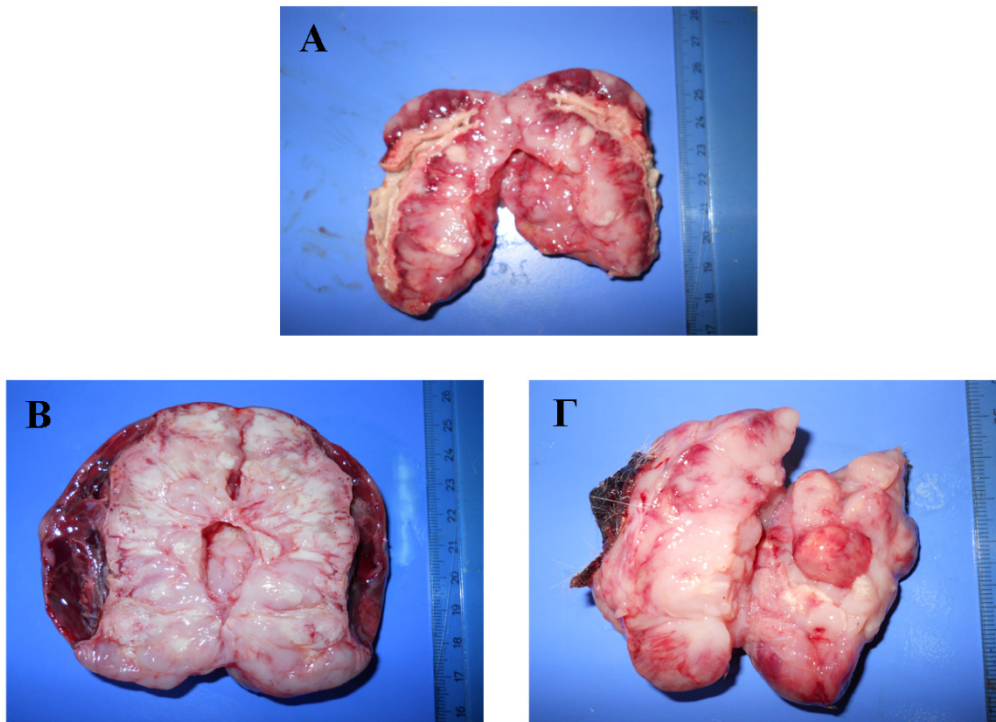
Στην ομάδα ΟΠLAg δεν εμφανίστηκαν αλλοιώσεις σε κανέναν από τους ηπατικούς, νεφρικούς και πνευμονικούς ιστούς και η εικόνα τους ήταν κατά φύσιν. Η ιστοπαθολογική ανάλυση του όγκου έδειξε νέκρωση περίπου στο 30%. Τέλος η ιστοπαθολογική ανάλυση της ομάδας ΟΠL εμφάνισε ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά με την ομάδα ελέγχου.

Ομάδα	Πνεύμονας	Ήπαρ	Νεφρός	Όγκος	
				%	Μεταστάσεις
ΟΕ	(-)	(-)	(-)	30	Πνεύμονας
ΟΠ1	(+-)	(+-)	(+-)	50	-
ΟΠ2	(+-)	(-)	(-)	50	-
ΟΠL	(-)	(-)	(-)	30	-
ΟΠLAg	(-)	(-)	(-)	30	-

**Πίνακας 4.20** Εκτίμηση των ιστοπαθολογικών ευρημάτων των καρκινοπαθών πειραματοζώων της μελέτης της αντικαρκινικής δράσης της ελεύθερης και της λιποσωμιακής μορφής του συμπλόκου [3].



**Εικόνα 4.12** Αντιπροσωπευτικές εικόνες που απεικονίζουν Α) τεμάχιο όγκου λειομυοσαρκώματος με 30% νέκρωση (x100), αντιπροσωπευτικό για τις ομάδες ΟΕ, ΟΠΛΑg και ΟΠΛ.Β) ήπια φλεγμονή των πνευμόνων με εμφάνιση αφρόδων μακροφάγων στις κυψελίδες (x200), αντιπροσωπευτικό των ομάδων ΟΠ1 και ΟΠ2, Γ) ήπια φλεγμονή του ήπατος (x200), αντιπροσωπευτική της ομάδας ΟΠ1, Δ) εμφάνιση ήπια νεφροτοξικότητας (x200) αντιπροσωπευτική της ΟΠ1 και Ε) τεμάχιο όγκου με νέκρωση πάνω από το 50% (x100), ομάδες ΟΠ1 και ΟΠ2.

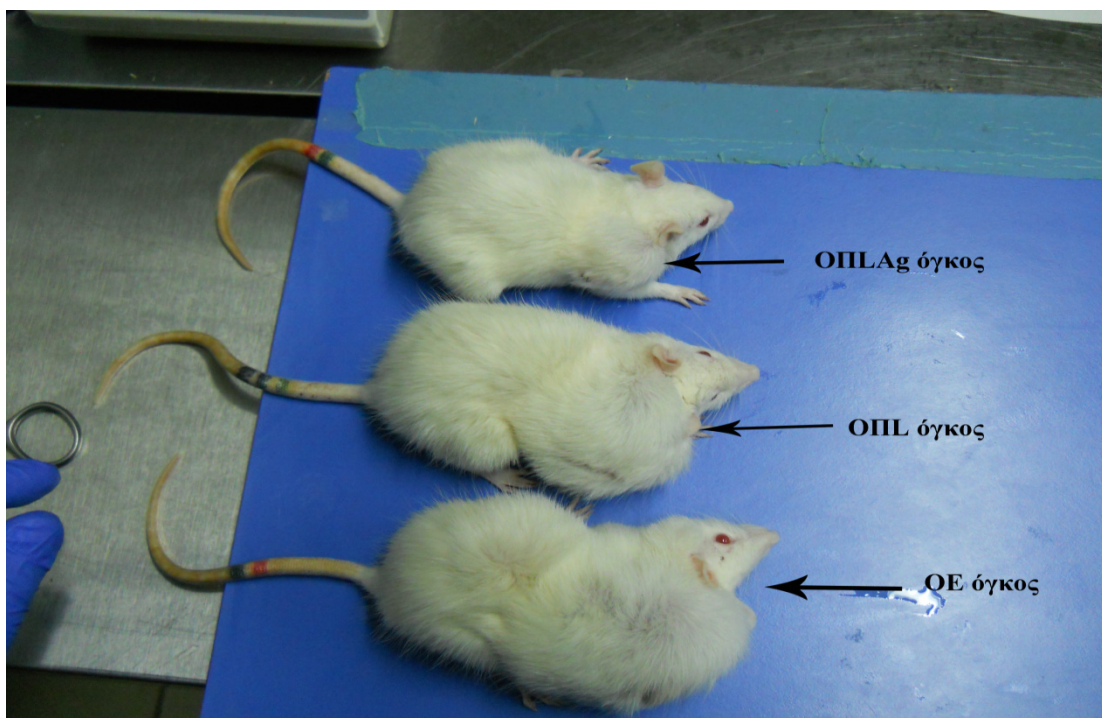


**Εικόνα 4.13** Όγκοι λειομυοσαρκώματος από πειραματόζωα της Α) ομάδας ΟΕ, Β) ΟΠ1 και Γ) ΟΠ2. Στις φωτογραφίες Β και Γ είναι εμφανής η έκταση της νέκρωσης σε σύγκριση με της Α, όπως επιβεβαιώθηκε και από την ιστοπαθολογική ανάλυση των βιοψιών όγκου από τις ίδιες ομάδες.

Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά των καρκινικών όγκων ήταν το μοτίβου ανάπτυξης κάτω από τις διαφορετικές συνθήκες θεραπείας. Έτσι παρατηρήθηκε ότι κατά τη διάρκεια των χορηγήσεων των δοσολογιών του συμπλόκου Ag[3] στην ελεύθερη μορφή του, ομάδες ΟΠ1 και ΟΠ2, η ανάπτυξη του όγκου καθυστερούσε σε σύγκριση με αυτή της ομάδας ΟΕ. Ακόμα καλύτερα, στην ομάδα ΟΠLAg, η ανάπτυξη του όγκου είχε σταματήσει όσο διαρκούσε η χορήγηση της λιποσωμιακής μορφής του Ag[3]. Με το τέλος των 6 δόσεων, σε όλες τις ομάδες είχαμε υποτροπή και ο όγκος άρχισε να εξελίσσεται ραγδαία. Χαρακτηριστικό παρατήρηση είναι το γεγονός ότι οι δοσολογίες σε όλα τα φαρμακευτικά σχήματα που χορηγήθηκαν ήταν διάρκειας 16 ημερών. Αν λάβουμε υπόψη το γεγονός ότι ο μέσος χρόνος επιβίωσης της ομάδας ελέγχου ήταν οι 27.5 ημέρες και προσθέσουμε τις 16 της χορήγησης ο χρόνος επιβίωσης φτάνει ακριβώς τις 43.5 ημέρες που είναι ο μέσος χρόνος επιβίωσης των ομάδων ΟΠ2 και ΟΠLAg.

Ομάδα Πειράματος	% αύξησης της επιβίωσης σε σχέση με την ΟΕ.
ΟΠ1	44,36*
ΟΠ2	57,45*
ΟΠL	27,27*
ΟΠLAg	57,45*

**Πίνακας 4.20** Παρουσιάζονται τα ποσοστά αύξησης της επιβίωσης σε σύγκριση με την ΟΕ. \*Στατιστικά σημαντική αύξηση,  $p < 0.05$



**Εικόνα 4.14** Παρουσιάζονται 3 καρκινοπαθή πειραματόζωα διαφορετικών ομάδων. Το κοινό χαρακτηριστικό και των τριών είναι ότι ανιχνεύτηκε ψηλαφητός όγκος ~1,5cm την 5<sup>η</sup> ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό και χωρίστηκαν αμέσως τυχαία σε ομάδες. Η χορήγηση λιποσωμιακού Ag[3] (ομάδα ΟΠLAg), άρχισε την επόμενη ακριβώς ημέρα καθώς και η χορήγηση σκέτων λιποσωμάτων (ομάδα ΟΠL) ως control. Στο 3<sup>ο</sup> πειραματόζωο δεν χορηγήθηκε τίποτα (ομάδα ελέγχου). Εδώ παρουσιάζονται και τα τρία πειραματόζωα 14 ημέρες μετά την πρώτη χορήγηση και ακριβώς την προηγούμενη πριν την τελευταία δόση. Παρατηρείται ότι στο πειραματόζωο που έχει λάβει τη λιποσωμιακή μορφή του συμπλόκου η ανάπτυξη του όγκου έχει σταματήσει εντελώς, ενώ αυτό που λαμβάνει το σκέτο το λιπόσωμα έχει σχεδόν 30% μικρότερο όγκο λειομυοσαρκόματος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

## ***5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ***





Η αντιμετώπιση του καρκίνου μέχρι σήμερα αποτελεί ένα βίαιης αναγκαιότητας πεδίο ερευνητικής πρόκλησης εξαιτίας των πολλών διαφορετικών μορφών του αλλά ιδιαίτερα των μεγάλων ποσοστών θνησιμότητας που τον χαρακτηρίζουν. Στους περισσότερους καρκίνους, η χημειοθεραπεία αποτελεί την καλύτερη δυνατή προσέγγιση, παρά το μικρό γενικά θεραπευτικό της δείκτη, εξαιτίας όχι μόνο της φτωχής και μη εκλεκτικής στόχευσης των αντικαρκινικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων στους όγκους αλλά και στους υγιείς ιστούς, με αποτέλεσμα σοβαρές και δυσμενείς παρενέργειες. Επομένως, η επιλεκτικότητα στην θανάτωση μόνο των καρκινικών κυττάρων αφήνοντας ανεπηρέαστα τα φυσιολογικά είναι ο σκοπός και ο στόχος του κάθε είδους αντικαρκινικής στρατηγικής (Cooper 1992). Η χημειοθεραπεία σήμερα χρησιμοποιείται είτε αυτόνομα είτε επικουρικά συνδυαζόμενη με άλλες θεραπείες όπως η ακτινοθεραπεία και η χειρουργική αντιμετώπιση, ώστε να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητά της (Einhorn 2003, Savarese 2003). Συνεπώς η δημιουργία νέων χημειοθεραπευτικών παραγόντων με εκλεκτική και στοχευμένη δράση αλλά και χημειοθεραπευτικές προσεγγίσεις που εκμεταλλεύονται είτε ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες του ίδιου του παράγοντα είτε ανωμαλίες και ιδιαιτερότητες των *in vivo* συστημάτων (Σύμπλοκα μετάλλων με ιδιαίτερους και εξειδικευμένους υποκαταστάτες, PDT, λιποσώματα), αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη ερευνητική περιοχή για την ανάπτυξη νέων αποτελεσματικότερων φαρμάκων που θα προκαλούν επιλεκτική στόχευση αλλά και ατοξικότητα στον οργανισμό.

Είναι ήδη γνωστό από την αρχαιότητα, ότι ο άργυρος και οι ενώσεις του αργύρου αποτελούν ισχυρούς αντιμικροβιακούς παράγοντες (Kim 2007, Silver 1996), και εμφανίζουν βιοκτόνα αποτελέσματα σε περισσότερο από 12 είδη μικροβίων συμπεριλαμβανομένου και της *E.coli* (Zhao 1998). Τελευταία όμως το ενδιαφέρον έχει στραφεί στις εν δυνάμει αντικαρκινικές ιδιότητες του αργύρου και των συμπλόκων του, ελέγχοντας πρώτα απ' όλα της κυτταροτοξικές του επιδράσεις απέναντι σε μια πληθώρα καρκινικών σειρών αλλά και *in vivo* καρκινικών μοντέλων (Sriram 2010, Cavicchioli 2010, Kyros 2009). Οι *in vitro* και οι *in vivo* μελέτες μας επιβεβαιώνουν την αποτελεσματικότητά και την καλή φαρμακολογική δράση των συμπλόκων του αργύρου (I) με θειαμίδια και τριφαινυλοφωσφίνη και ιδιαίτερα του συμπλόκου  $\text{AgCl}(\text{TPP})_2(\text{CBZT})$  (ή [3]), ως ένα αρκετά ισχυρό βιοδραστικό και εν δυνάμει αντικαρκινικό παράγοντα.

Το παρόν ταξίδι ξεκίνησε από της μελέτες της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω της ευρύτατα διαδεδομένης βιομεθόδου του MTT assay. Αρχικά

τα τέσσερα σύμπλοκα του αργύρου (I) ελέγχθηκαν απέναντι σε τρεις νεοπλασματικές σειρές (LMS, MCF7 και A549) και μία φυσιολογική κυτταρική σειρά (MRC5). Όλα τα σύμπλοκα παρουσίασαν ισχυρή κυτταροτοξική δράση με  $IC_{50}$  τιμές αρκετά χαμηλότερες από 10 $\mu$ M και έτσι ως καθαρές ενώσεις μπορούν να θεωρηθούν ως ενεργές (Farnsworth 1990). Παράλληλα επέδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών των  $IC_{50}$  τους και εκείνων της cisplatin στις αντίστοιχες κυτταρικές σειρές. Η cisplatin είναι ένας από τους πιο γνωστούς και διαδεδομένους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, ο οποίος κρατά το ενδιαφέρον για μελέτη αρκετά ψηλά ακόμα και σήμερα, παρά το γεγονός ότι βρίσκεται εν δράση τα τελευταία 35 χρόνια και ανεξάρτητα από την πληθώρα ισχυρών παρενεργειών που επάγει, ιδιαίτερα της ανθεκτικότητας των κυττάρων που έχουν λάβει cisplatin με αποτέλεσμα την μείωση έως ελαχιστοποίηση της αποτελεσματικότητας της. Παρ' όλα αυτά στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήσαμε τη cisplatin είτε ως ουσία/φάρμακο ελέγχου (control) με ισχυρή κυτταροτοξική δράση είτε ως πρότυπο φάρμακο εξαιτίας της εκτεταμένης μελέτης που έχει λάβει, προκειμένου να ελεγχθούν συγκεκριμένα μοριακά μονοπάτια.

Η ανάγκη για εκλεκτικότητα στη χημειοθεραπεία ή/και για μεγαλύτερη στόχευση μέσω αυξημένης δραστηριότητας οδήγησε στην προκαταρκτική μελέτη αυτών των τεσσάρων συμπλόκων του Ag για πιθανή αυξημένη φωτοενεργοποιούμενη δράση μέσω της ακτινοβόλησης τους από UVC ακτινοβολία. Ο λόγος για τον οποίο πραγματοποιήθηκε αυτή η μελέτη είναι οι ιδιότητες των μεταλλικών συμπλόκων με στερεοδιάταξη  $d^{10}$  στο κέντρο του μετάλλου τους όπως ο χαλκός (I) και ο άργυρος (I) και ιδιαίτερα εκείνα που περιέχουν φωσφινικούς υποκαταστάτες, να παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες φωτοφυσικές και φωτοχημικές ιδιότητες (Furberg 1973, Jensen 2004, Simmons 1979, Karagiannidis 1990, Hadjikakou 1991a, b, 1992a, b, Aslanidis 1993, Lazarou 2010). Τα φωτοενεργοποιούμενα μεταλλοθεραπευτικά είναι ενώσεις οι οποίες φωτοδιασπώνται στα καρκινικά κύτταρα οδηγώντας τα σε κυτταρικό θάνατο (Farrer 2010). Ένα από τα πλεονεκτήματα που μπορεί να προσφέρει αυτή η μέθοδος είναι η επιλεκτική ενεργοποίηση των μεταλλοχημειοθεραπευτικών φωτοενεργοποιούμενων συμπλόκων στο στόχο. Έτσι ακτινοβολώντας και τα τέσσερα σύμπλοκα του αργύρου με UVC ακτινοβολία ενδοκυτταρικά ύστερα από επώαση των συμπλόκων με LMS και MCF7 κύτταρα, πήραμε  $IC_{50}$  τιμές μειωμένες έως και σχεδόν 30% (σύμπλοκο [3]) σε σύγκριση με την  $IC_{50}$  τιμή που λήφθηκε χωρίς την ακτινοβόληση, μειώσεις που ήταν στατιστικά σημαντικές. Σε μια ανάλογη μελέτη η φωτοενεργοποίηση ενός συμπλόκου του Ag (I) με τριφαινυλοφωσφίνη

και 2-μερκαπτοπυριμιδίνη έριξε την  $IC_{50}$  τιμή του κατά περίπου 28% (Velalopoulou 2012). Ανεξάρτητα από τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα αυτής της μελέτης, ακριβώς επειδή η UVC ακτινοβολία είναι κυτταροτοξική κατά 50% μόνο στα πρώτα 5 δευτερόλεπτα της έκθεσης θα πρέπει να επαναπροσδιοριστεί ο σχεδιασμός της και η πηγή ακτινοβολίας της ώστε να γίνει πιο ασφαλής και με πολύ μικρότερες κυτταροτοξικές επιδράσεις μόνο και μόνο από την πηγή ακτινοβολίας. Επίσης είναι γνωστό ότι η UVC ακτινοβολία προκαλεί η ίδια απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) (Gentile 2003, Kulms 2000, Aragane 1998). Θα πρέπει περαιτέρω μελέτες να λάβουν χώρα ώστε να αποκλειστεί ο παράγοντας πιθανής συνέργειας των συμπλόκων με τη UVC ακτινοβολία (ιδιαίτερα όταν υπάρχει τόσο μεγάλο ποσοστό θανάτου σε τόσο μικρή χρονική έκθεση), ιδιαίτερα όταν και τα σύμπλοκα δρουν αποπτωτικά, όπως στην περίπτωση μας.

Μια από τις κύριες μελέτες που λαμβάνει χώρα όταν μελετάμε για πρώτη φορά καινούριες ουσίες ή σύμπλοκα με κυτταροτοξικές δράσεις, είναι η ανίχνευση του είδους του κυτταρικού θανάτου που προκαλούν, δηλαδή νέκρωση ή απόπτωση (Wu 2009, Houghton 1999). Το επαγόμενο φαινόμενο της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον μιας και τα καρκινικά κύτταρα από μόνα τους δεν επάγονται στην απόπτωση, οπότε εάν ένας χημειοθεραπευτικός παράγοντας μπορέσει να υπερπηδήσει την «φυσική επιλογή» των καρκινικών κυττάρων να μην εισέρχονται στον αποπτωτικό μηχανισμό του κυτταρικού θανάτου, σημαίνει πως υπάρχει ένας πιθανός κυτταρικός/μοριακός στόχος προς ενεργοποίηση αυτού του μηχανισμού μέσω της δημιουργίας νέων κατάλληλων φαρμάκων. Οι ουσίες του αργύρου που μελετάμε επάγουν με δοσοεξαρτώμενη σχέση το μηχανισμό της απόπτωσης στα LMS κύτταρα. Έχει βρεθεί ότι σύμπλοκο του αργύρου με τριφαίνυλοφωσφίνη και 2-μερκαπτοπυριμιδίνη επάγει επίσης τον αποπτωτικό κυτταρικό μηχανισμό θανάτου σε LMS κύτταρα (Velalopoulou 2012). Ακολούθως σύμπλοκα του αργύρου (I) με τριφαίνυλοφωσφίνη και ασπιρίνη η σαλικυλικό οξύ προκαλούν απόπτωση (Poyraz 2011).

Σε αυτό το σημείο της μελέτης μας επιλέξαμε το σύμπλοκο που επέδειξε στο σύνολο του την καλύτερη βιοδραστικότητα, όσο αφορά την κυτταροτοξικότητα του καθώς και το μηχανισμό του κυτταρικού θανάτου που επάγει, ώστε να το χρησιμοποιήσουμε ως πρότυπο και να συνεχίσουμε τη μελέτη ελέγχου των ιδιοτήτων του. Το σύμπλοκο που επιλέχθηκε ήταν το  $AgCl(TPP)_2(CBZT)$  ([3]).

Πραγματοποιήθηκε μια προκαταρκτική μελέτη ελέγχου της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω του MTT assay σε μια πληθώρα κακοήθων

κυτταρικών σειρών οι οποίες υπήρχαν διαθέσιμες στο εργαστήριο Φυσιολογίας. Το σύμπλοκο [3] επέδειξε αρκετά χαμηλές τιμές  $IC_{50}$  και πάντα μικρότερες από τις αντίστοιχες τις cisplatin. Μέσα από αυτή τη μελέτη δεν εμφανίστηκε, παρόλα αυτά, κάποια κυτταρική εκλεκτικότητα στα κακοήθη κύτταρα ενώ η  $IC_{50}$  στην φυσιολογική σειρά MRC5 προσδιορίστηκε στα 14 $\mu$ M. Αυτή η διαφορά είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα αν αναλογιστούμε ότι η  $IC_{100}$  στα LMS κύτταρα (τα οποία χρησιμοποιούνται για την δημιουργία όγκων στις in vivo μελέτες μας) είναι <10 $\mu$ M (Γράφημα 4.31). Έτσι το συμπέρασμα που εξάγεται είναι ότι η συγκέντρωση στην οποία έχουμε το 100% του κυτταρικού θανάτου στα LMS κύτταρα, είναι μικρότερη από την  $IC_{50}$  τιμή στα MRC5 κύτταρα.

Επίσης το υπό μελέτη σύμπλοκο έδειξε ότι έχει την ικανότητα να αναστείλει την δημιουργία αποικιών τόσο στα LMS όσο και στα MCF7 σε δοσοεξαρτώμενο μοτίβο. Ιδιαίτερα στα LMS κύτταρα η αναστολή των αποικιών έφτασε το 87% σε συγκέντρωση διπλάσια της  $IC_{50}$ . Η αναστολή των αποικιών στα MCF7 εμφάνισε ένα πιο γραμμικό μοντέλο μείωσης το οποίο έφτασε σε επίπεδα αναστολής 80% σε συγκέντρωση 14 $\mu$ M.

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε μελέτη του κυτταρικού κύκλου σε LMS κύτταρα προσπαθώντας να αποσαφηνιστεί αν το σύμπλοκο είναι cell cycle-dependent ή αλλιώς αν η δράση του εξαρτάται ή είναι επιλεκτική κάποιου σταδίου του κυτταρικού κύκλου. Είναι γνωστό ότι η πλατίνα ως αλκυλιωτικός παράγοντας ενώνεται στο DNA σχηματίζοντας διασταυρούμενες συνδέσεις (cross-links ή X-links) οι οποίες κάμπτουν το DNA προκαλώντας απόπτωση με την αναστολή της σύνθεσης του DNA στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (Yasutake 1995) ή στη G2/M (Mueller 2006). Αυτό σημαίνει ότι στην ανάλυση του κυτταρικού κύκλου της cisplatin θα βλέπαμε διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην S φάση (που σημαίνει διπλάσιο τουλάχιστον ποσοστό κυττάρων στην S φάση σε σχέση με το control)(Sekiguchi 1996, Jäkel 1991) ή στη G2/M (Mueller 2006). Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου LMS κυττάρων με το σύμπλοκο Ag[3] δεν αποκάλυψε κάποια σχέση επίδρασης του συμπλόκου με την S φάση ή τη G2/M. Υπήρχε μια μείωση των κυττάρων στην G0/G1 με μια παράλληλη αύξηση της subG1 φάσης που δηλώνει τα αποπτωτικά κύτταρα κάτι που είναι ήδη γνωστό από την μελέτη της απόπτωσης/νέκρωσης μέσω της κυτταρομετρίας ροής.

Οι Deegan και οι συνεργάτες παρατήρησαν μέσα από μηχανιστικές μελέτες ότι το σύμπλοκο του Ag(I) με φαινιδόνη που είχαν συνθέσει ανέστειλε τη σύνθεση του DNA όχι όμως μέσω παρεμβολής επί αυτού (Deegan 2006). Εκ του αντιθέτου, μεικτά σύμπλοκα του

αργύρου (I) με τριφαίνυλοφωσφίνη και υδροξυβενζοϊκό οξύ ή ασπιρίνη ή σαλικυλικό οξύ φαίνεται να έχουν ισχυρή πρόσδεση σε DNA θύμου αδένος βοδινού (Banti 2012) εξωκυτταρικά κάτι που όμως δεν αποδεικνύει την σύνδεση των συμπλόκων αυτών ενδοκυτταρικά με το DNA μιας και ανάλογες μελέτες δεν πραγματοποιήθηκαν από τους συγγραφείς. Προκειμένου να μελετήσουμε την πιθανή πρόσδεση του συμπλόκου [3] με το DNA χρησιμοποιήσαμε το comet assay και παράλληλα τη cisplatin ως ήδη γνωστό μόριο που προσδένεται στο DNA. Το comet αποκάλυψε ότι η cisplatin προσδένεται στο DNA, υπολογίζοντας επιπροσθέτως το ποσοστό των X-links που σχηματίζει η cisplatin με το μόριο του DNA, ενώ εκ του αντιθέτου το σύμπλοκο μας προκάλεσε κατακερματισμό και στους δύο κλώνους του DNA (ανίχνευση μέσω alkaline comet assay).

Έτσι ο πιθανός μηχανισμός δράσης του συμπλόκου [3] δεν είναι μέσω της σύνδεσης του με το DNA αλλά μέσω πιθανότατα της παραγωγής ROS (η οποία ακολουθεί την ισχυρή αντιμικροβιακή δράση του αργύρου) και οφείλεται στον ιοντισμό του αργύρου παρουσία υγρασίας, σωματικών υγρών και εκκρίσεων και απελευθερώνεται έτσι ο βιολογικά δραστικός  $Ag^+$  που δείχνει μία ισχυρή έλξη για σουλφυδρυλομάδες και άλλους ανιονικούς υποκαταστάτες πρωτεϊνών, κυτταρικές μεμβράνες, και υπολείμματα ιστού (Burrell 2003). Επίσης, μερικές μελέτες ανέφεραν ότι κατιόν του Ag είναι κρίσιμης σημασίας για την αντιμικροβιακή δράση του μέσω της ηλεκτροστατικής έλξης ανάμεσα στην αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη του μικροοργανισμού και των θετικά φορτισμένων νανοσωματιδίων (Dibron 2002, Hamouda 2000, Dragieva 1999). Πρόσφατα, οι Danilczuk και συνεργάτες, ανέφεραν την παραγωγή ελεύθερων ριζών επαγόμενων αργύρου μέσω μελέτης συντονισμού ηλεκτρονικής στροφορμής (ESR) των νανοσωματιδίων Ag (Danilczuk 2006). Τα αποτελέσματα της μελέτης των νανοσωματιδίων Ag με ESR επιβεβαιώθηκαν και από τους Kim και συνεργάτες οι οποίοι συνεχίζοντας την έρευνα για τον μηχανισμό δράσης κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ελεύθερες ρίζες παράγονται από την επιφάνεια των νανοσωματιδίων του Ag όταν παρατηρήθηκε ότι η αντιμικροβιακή δράση των νανοσωματιδίων του Ag και του νιτρικού αργύρου έναντι της *E. coli* επηρεάστηκε από την παρουσία της N-ακέτυλο-κυστεΐνης (Kim 2007).

Επίσης, πρόσφατες μελέτες επέδειξαν ότι η μιτοχονδριακή λειτουργία, σε αρκετές κυτταρικές σειρές που εκτέθηκαν σε AgN (νανοσωματίδια αργύρου), μειώθηκε (Yacobi, 2007, Hussain 2006, Braydish-Stolle 2005). Σύμφωνα με τους Costa και συνεργάτες, τα AgN μείωσαν την *in vitro* δραστηριότητα των μιτοχονδριακών συμπλόκων I, II, III και IV

της αναπνευστικής αλυσίδας, σε ιστούς εγκεφάλου, σκελετικών μυών, καρδιακού μυός και ηπατικού. Τα σύμπλοκα της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας (Horn 2008) είναι απαραίτητα για την οξειδωτική φωσφορυλίωση, την κύρια οδό παραγωγής ATP, που παρέχει περισσότερο από το 95% των απαιτήσεων σε ενέργεια του κυττάρου (Rex 2004, Wallimann 1992, Bessman 1985). Οι Almofti και συνεργάτες (Almofti 2003) προτείνουν ότι τα AgN διαταράσσουν τα μιτοχόνδρια μέσω αλληλεπιδράσεων με θειολικές ομάδες στην εσωτερική μεμβράνη τους. Είναι γνωστό ότι η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα από μόνη της είναι ευάλωτη σε βλάβες προκαλούμενες από ROS, που μπορεί να δράσουν οξειδώνοντας τις σουλφυδρυλομάδες των ενζύμων εντός της αλυσίδας (Navarro 2007, Adam-Vizi 2005). Επιπλέον, τα AgN μπορεί να τραυματίσουν τα κύτταρα οξειδώνοντας τις θειολικές ομάδες των σημαντικών πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία αλλάζει διαπερατότητα και διαταράσσει τις μιτοχονδριακές λειτουργίες, καθώς και μειώνοντας τους αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς, το οποίο οδηγεί σε οξειδωτικό στρες (Yacobi 2007, Kone 1988, Rangachari 1985, Chappell 1954). Η βλάβη των κυτταρικών μεμβρανών φαίνεται να είναι ένα μέρος του μηχανισμού των της κυτταροτοξικότητας των AgN που προηγείται της μιτοχονδριακής διαταραχής, αφού οι πρωτεΐνες που περιέχουν θειολικές ομάδες είναι άφθονες στην κυτταρική μεμβράνη (Chen 2008). Τέλος, πρόσφατα μελετήθηκε ότι τα AgN αναστέλλουν επίσης την *in vitro* δραστηριότητα της κινάσης της κρεατίνης, ένα σημαντικό ένζυμο που ρυθμίζει τα κυτταρικά επίπεδα του ATP (Paula 2009). Το ένζυμο αυτό παρουσιάζει πολλά κυστεϊνικά κατάλοιπα στη δομή του, τα οποία μπορεί να αποτελούν στόχους για οξείδωση από ROS (Wallimann 1992, Bessman 1985). Έτσι το σύμπλοκο [3] μπορεί να ακολουθεί εν μέρει τη δράση των νανοσωματιδίων του αργύρου που περιγράφηκε παραπάνω.

Το μεγάλο πρόβλημα στη χημειοθεραπεία του καρκίνου όπως έχουμε περιγράψει και παραπάνω, είναι ο μικρός θεραπευτικός δείκτης των αντικαρκινικών χημειοθεραπευτικών ουσιών εξαιτίας της προσβολής των υγιών ιστών ταυτόχρονα με τους καρκινικούς. Έτσι παρασκευάσαμε λιποσώματα τα οποία προσφέρουν μία πληθώρα πλεονεκτημάτων όπως προσανατολισμό και στόχευση, ελεγχόμενη αποδέσμευση του φαρμακομορίου, προστασία του εγκλωβισμένου φαρμακομορίου καθώς και διευκόλυνση εισόδου στα κύτταρα. Τα λιποσώματα αυτά είχαν σύσταση EPC:DPPG και προσέφεραν αρκετά μεγάλη σε χρονική διάρκεια (20 ημερών) σταθερότητα σε υδατικό περιβάλλον αν και στις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν λυοφιλοποιημένα λιποσώματα στα οποία γινόταν ανασύσταση τη στιγμή του πειράματος αποφεύγοντας έτσι

όποιον κίνδυνο αποσταθεροποίησης των λιποσωμάτων. Πραγματοποιήθηκε φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των λιποσωμάτων με και χωρίς το σύμπλοκο. Ένα από τα κύρια προβλήματα κατά την παρασκευή των λιποσωμάτων με το σύμπλοκο [3] υπήρξε το γεγονός του μεγάλου μοριακού βάρους καθώς και της τρισδιάστατης τριγωνικής διπυραμιδικής δομής που διαθέτει. Αυτό αποτέλεσε ανασταλτικό παράγοντα ενσωμάτωσης του συγκεκριμένου μορίου σε λιποσώματα σύστασης EPC:Cholesterol που παρασκευάστηκαν δοκιμαστικά και ιδιαίτερα στη ρύθμιση του μεγέθους των λιποσωμάτων με ακίδα υπερήχων. Στο σύστημα αυτό το σύμπλοκο κατακρημνιζόταν ως ίζημα και η τιμές που λαμβάνονταν για τη διασπορά των τιμών καθώς και το μέγεθος των λιποσωμάτων ήταν κατά πολύ μεγαλύτερα του επιθυμητού. Αυτό συνέβη διότι το μόριο της χοληστερόλης, ενώ από τη μία βοηθά στη διατήρηση της σταθερότητας των λιποσωμάτων (σε μοριακή αναλογία ως προς το φωσφολιπίδιο πάνω από 30-35%), εντούτοις δρα ανταγωνιστικά ως προς το σύμπλοκο μιας και η χοληστερόλη (ως μη-φωσφολιπίδιο) ενσωματώνεται και αυτό στη διπλοστοιβάδα των φωσφολιπιδίων που αποτελούν το λιπόσωμα. Τα παραπάνω εμπόδια ξεπεράστηκαν α) χρησιμοποιώντας λιποσώματα σύστασης EPC-DPPG και β) ρυθμίζοντας το μέγεθος των λιποσωμάτων μέσω της μεθόδου του extruder. Το DPPG είναι συνολικά αρνητικά φορτισμένο και το αρνητικό φορτίο (μέτρηση του ζ-δυναμικού) που προσδίδει στο τελικό λιποσωμακό προϊόν αποτελεί το εχέγγυο της μακράς σταθερότητας του συστήματος μέσω της αμοιβαίας απόθησης των λιποσωμάτων. Όσο αφορά τη ρύθμιση του μεγέθους μέσω του extruder, αυτή είναι διασφαλισμένη τόσο για το μέσο όρο του μεγέθους των λιποσωμάτων (επιθυμητό ~100nm) όσο και για τη διασπορά των τιμών του μεγέθους (επιθυμητό όσο πιο κοντά στο 0). Παρόλα αυτά εμφανίστηκε το παρακάτω πρόβλημα. Η λειτουργία του extruder βασίζεται στη ρύθμιση του μεγέθους των λιποσωμάτων με μηχανική εξώθηση μέσω πολυκαρβονικών φίλτρων. Έτσι, καθώς μειώνεται σταδιακά το μέγεθος (μέχρι το επιθυμητό) αυξάνεται η κυρτότητα των λιποσωμάτων. Στην περίπτωση του συμπλόκου [3] αυτό αποτέλεσε μεγάλο κίνδυνο εξώθησης-απόρριψης του συμπλόκου από το λιπόσωμα μιας και το μεγάλο μοριακό του βάρος από τη μία και η άκαμπτη πολυδιάστατη δομή του από την άλλη δεν επέτρεπε σε περιθώρια ανοχής, ιδιαίτερα όσο το μέγεθος των λιποσωμάτων μικραίνει. Αυτό είχε σαν συνέπεια το μικρό ποσοστό ενσωμάτωσης του συμπλόκου στα λιποσώματα και τη μικρή μοριακή αναλογία μεταξύ του συμπλόκου και των λιπιδίων (drug/lipid ratio) η οποία ήταν  $D/L = 1,76 \times 10^{-5}$  με συγκέντρωση 0,584μM. Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι η μέθοδος της HPTLC-FID υπήρξε ακατάλληλη όσο

αφορά τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της ενσωμάτωσης του συμπλόκου [3] εξαιτίας της μικρής ευαισθησίας ανίχνευσης του συμπλόκου σε τόσο μικρές ποσότητες ενσωμάτωσης. Η ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση του συμπλόκου πραγματοποιήθηκε μέσω της φασματοσκοπίας ατομικής απορρόφησης. Παρά το γεγονός του μικρού ποσοστού ενσωμάτωσης, η λιποσωματική μορφή του συμπλόκου επέδειξε ισχυρή κυτταροτοξική δράση στις *in vitro* μελέτες που πραγματοποιήθηκαν. Η IC<sub>50</sub> τιμή της δράσης της λιποσωματικής μορφής του συμπλόκου και όσο αφορά την καθαρή δράση του συμπλόκου υπολογίστηκε στα 0.11μM σε σχέση με την IC<sub>50</sub> της ελεύθερης μορφής του συμπλόκου που υπολογίστηκε στα 2,77μM (βλ. Πίνακα 4.16). Επίσης παρατηρήθηκε *in vitro* κυτταροτοξικότητα που προκλήθηκε από τη χορήγηση των απλών λιποσωμάτων (χωρίς το σύμπλοκο) σε όλες τις κυτταρικές σειρές που ελέγχθηκαν. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον τρόπο δράσης για την εισαγωγή των λιποσωμάτων στα κύτταρα, τα οποία δρουν μέσω απορρόφησης-σύντηξης στην ίδια την κυτταρική μεμβράνη ή/και μέσω φαγοκυττάρωσης όπου εγκολώνονται σε ενδοσώματα και έτσι πιθανόν διαταράσσουν την υγρή κρυσταλλική κατάσταση της κυτταρικής μεμβράνης ή των μεμβρανών των οργανιδίων του κυττάρου με αποτέλεσμα την αλλαγή της ομοιόστασης και κατ' επέκταση τη διαταραχή της λειτουργικότητας του κυττάρου με συνέπεια τη διέγερση μοριακών μηχανισμών για την πρόκληση κυτταρικού θανάτου. Αυτό το φαινόμενο πιθανόν να εξαρτάται και από την συγκέντρωση των λιποσωμάτων που χορηγούνται και ακολούθως «επιτίθενται» στα κύτταρα-στόχους. Η κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου-στόχος έχει κάποιο ποσοστό ανοχής απορρόφησης των φωσφολιπιδίων των λιποσωμάτων που προσκολλώνται πριν να ενεργοποιηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί πρόκλησης κυτταρικού θανάτου. Μεγαλύτεροι «αριθμοί» λιποσωμάτων που θα ενσωματωθούν στο κύτταρο πιθανόν να ενεργοποιήσουν γρηγορότερα και μη αντιστρεπτά τους μηχανισμούς αυτούς.

Οι *in vivo* μελέτες περιέλαβαν μελέτες οξείας και χρόνιας τοξικότητας του συμπλόκου χορηγούμενο στην ελεύθερη μορφή του. Και στις δύο αυτές μελέτες δεν προκλήθηκε θάνατος σε κανένα πειραματόζωο. Η αξιολόγηση της οξείας και χρόνιας τοξικότητας πραγματοποιήθηκε μέσα από την ιστοπαθολογική εξέταση των οργάνων των πειραματοζώων. Τα ιστοπαθολογικά ευρήματα έδειξαν ήπιες αλλοιώσεις στο ήπαρ και στον πνεύμονα των πειραματοζώων που έλαβαν 80 και 160mg/kg ΣΒ. Όσο αφορά τη χρόνια τοξικότητα και στις δύο ομάδες, τη XT1 και τη XT2 δεν παρατηρήθηκαν καθόλου ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις και η γενική εικόνα του πνεύμονα, του ήπατος και των νεφρών ήταν κατά φύσιν. Μελέτες οξείας τοξικότητας, σε επίμυες Wistar, ενός συμπλόκου



του κασσιτέρου με υποκαταστάτη το θειοαμίδιο 5-χλώρο-2-μερκαπτοβενζοθειαζόλιο έδειξαν ότι το σύμπλοκο προκάλεσε 100% θάνατο των πειραματοζώων σε δόση 80mg/kg ΣΒ μέσα στις πρώτες 24 ώρες από τη χορήγηση του και η ιστοπαθολογική ανάλυση αποκάλυψε οξεία τοξικότητα στους νεφρούς με νέκρωση των κυττάρων και των δύο ουροφόρων σωληναρίων με νεφρικά σπειράματα καθώς και τοξικότητα του ήπατος με διάταση των κολλοειδών και νέκρωση των ηπατοκυττάρων γύρω από την κεντρική φλέβα (Metsios 2012). Επίσης μελέτη οξείας τοξικότητας σε επίμυες Wistar, ενός συμπλόκου του κασσιτέρου με υποκαταστάτη το θειοαμίδιο 2-μερκαπτο-νικοτινικό οξύ, έδειξε ότι το σύμπλοκο προκάλεσε 60% θάνατο των πειραματοζώων σε δόση 80mg/kg ΣΒ και η ιστοπαθολογική ανάλυση έδειξε πλήρως καταστραμμένους νεφρούς καθώς και ενδοκυψελιδικό οίδημα στους πνεύμονες με μεγάλη μείωση (16.3%) του σωματικού τους βάρους (Verginadis 2011). Επίσης στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε εντερικό οίδημα και εκχύμωση του νεφρικού σωληναριακού επιθηλίου με μικρή μείωση του σωματικού βάρους (1.7%) στη δόση των 8mg/kg ΣΒ. Επιπροσθέτως στις μελέτες της χρόνιας τοξικότητας του ίδιου συμπλόκου σε δόσεις 4 x 8mg/kg ΣΒ παρατηρήθηκε θάνατος στο 20% των πειραματοζώων, εντελώς κατεστραμμένα νεφρά, οίδημα στον πνεύμονα και μείωση 12.3% του ΣΒ, ενώ στο σχήμα χορήγησης 4 x 5.4mg/kg ΣΒ δεν παρατηρήθηκαν θάνατοι αλλά ήπιες βλάβες σε νεφρά και πνεύμονα καθώς και μείωση του ΣΒ κατά 4.1% (Verginadis 2011).

Οι *in vivo* μελέτες περιελάμβαναν επίσης την αξιολόγηση της αντικαρκινικής δράσης επί καρκινοπαθών με λειομυοσάρκωμα επίμυων Wistar έπειτα από χορήγηση και της ελεύθερης αλλά και της ενσωματωμένης σε λιποσώματα μορφής του συμπλόκου. Παρατηρήθηκε ότι και οι δύο δόσεις της ελεύθερης χορηγούμενης μορφής του συμπλόκου επιμήκυναν το προσδόκιμο ζωής κατά 44.36% και 57.45% στη μικρή και στη μεγάλη δόση αντίστοιχα με στασιμότητα της μέσης μάζας των όγκων για την μικρή δόση και μείωση κατά 23.6% στη μεγάλη δόση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπροσθέτως, στις ομάδες που χορηγήθηκαν μόνο λιποσώματα και λιποσώματα με σύμπλοκο παρατηρήθηκε αύξηση της επιβίωσης κατά 27.27% και 57.45% αντίστοιχα με αύξηση της μέσης μάζας όγκου κατά 35% στην ΟΠΛ ενώ μείωση κατά 14.2% στην ομάδα ΟΠΛAg. Πρέπει να σημειωθεί ότι στην ομάδα που χορηγήθηκε η λιποσωματική μορφή του συμπλόκου ένα πειραματοζώο επιβιώνει μέχρι και σήμερα χωρίς ίχνος ψηλαφητού όγκου. Η αύξηση της μέσης μάζας του όγκου στην ομάδα ΟΠΛ συνοδεύει την αύξηση της επιβίωσης της ίδιας ομάδας. Το πρώτο φαινόμενο οφείλεται στην απουσία του συμπλόκου [3] από τη μία ως ογκοκατασταλτικού

παράγοντας αλλά η αύξηση της επιβίωσης από την άλλη οφείλεται στις τοξικές ιδιότητες που παρουσιάζουν τα ίδια τα λιποσώματα και που έχουν αναφερθεί εκτενέστατα (βλ. υποενότητα 1.3.10). Το φαρμακευτικό αντικαρκινικό αποτέλεσμα του λιποσωματικού συμπλόκου [3] ήταν εφάμιλλο της μεγάλης δόσης του χορηγούμενου στην ελεύθερη μορφή του συμπλόκου παρόλο που η δόση του εγκλωβισμένου συμπλόκου [3] στα λιποσώματα ήταν μια τάξη μεγέθους κάτω, 2.5mg/kg ΣΒ έναντι 27mg/kg ΣΒ. Η ιστοπαθολογική εξέταση των πειραματοζώων δεν αποκάλυψε καμία ιστική βλάβη για τα πειραματοζώα των ομάδων ΟΠΛ και ΟΠΛAg και η νέκρωση στον όγκο έφτανε στο 30%. Από την άλλη η βιοψία των πειραματοζώων που τους χορηγήθηκε η ελεύθερη μορφή του φαρμάκου έδειξε νέκρωση όγκου πάνω από 50% και ήπιες βλάβες στον πνεύμονα και στο ήπαρ. Επίσης, η χορήγηση της ελεύθερης μορφής του συμπλόκου προκάλεσε επιβράδυνση του ρυθμού ανάπτυξης των όγκων μέχρι και το τέλος των δόσεων όπου από εκεί και μετά άρχισε η επιτάχυνση του ρυθμού ανάπτυξης των όγκων. Η χορήγηση της λιποσωματικής μορφής του συμπλόκου [3] προκάλεσε στασιμότητα της ανάπτυξης των όγκων καθόλη τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης ενώ με τη λήξη της χορήγησης των δόσεων παρατηρήθηκε αύξηση της μάζας των όγκων. Σε αντίστοιχη μελέτη σε καρκινοπαθείς με λειομυοσάρκωμα επίμυες Wistar, ένα σύμπλοκο του κασσιτέρου με το θειοαμίδιο 5-γλώρο-2-μερκαπτοβενζοθειαζόλιο σε χορηγούμενες δόσεις 4 x 2mg/kg ΣΒ κάθε 5 ημέρες και 3 x 2.7mg/kg ΣΒ κάθε 10 ημέρες προκάλεσαν αύξηση του μέσου όρου επιβίωσης κατά 47% και 70% αντίστοιχα με παράλληλη αύξηση όμως της μέσης μάζας του όγκου κατά 63.5% και 88.7% αντίστοιχα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Metsios 2012). Σύμφωνα με τους Verginadis και συνεργάτες (Verginadis 2011), η χορήγηση ενός συμπλόκου του κασσιτέρου με υποκαταστάτη το θειοαμίδιο 2-μερκαπτο-νικοτινικό οξύ σε δόση 4 x 5.4mg/kg ΣΒ σε καρκινοπαθείς με λειομυοσάρκωμα επίμυες Wistar, θανάτωσε το 40% των πειραματοζώων σε διάστημα μικρότερο από το μέσο όρο επιβίωσης της ομάδας ελέγχου, το 30% των πειραματοζώων παρουσίασε αύξηση της επιβίωσης κατά 100% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου με παράλληλη μείωση στη μέση μάζα του όγκου κατά 55% και το 30% των πειραματοζώων επιβίωσε με πλήρη υποστροφή του όγκου.

Τα σύμπλοκα του αργύρου που μελετήσαμε παρουσιάζουν πολύ καλές κυτταροτοξικές ιδιότητες τις οποίες και εκφράζουν επάγοντας τον κυτταρικό θάνατο μέσω του φαινομένου της απόπτωσης. Το γεγονός αυτό από μόνο του αποτελεί πεδίο έρευνας και μελέτης για την δημιουργία νέων αντικαρκινικών παραγόντων μιας και τα καρκινικά κύτταρα δεν εισέρχονται σε αποπτωτικό θάνατο από μόνα τους. Η μελέτη των

συγκεκριμένων συμπλόκων ως πρωταρχικά/πρότυπα μόρια (lead compounds) για την δημιουργία αποτελεσματικότερων φαρμακολογικών ουσιών τα καθιστά ιδανικά μιας και ο άργυρος φαίνεται να εμφανίζεται ηπιότερος σε τοξικότητα απ' ότι αντίστοιχα σύμπλοκα του κασσιτέρου ή του χρυσού με όμοιους υποκαταστάτες. Η μελέτη του μηχανισμού δράσης αποκάλυψε ανεξάρτητη δράση του συμπλόκου [3] σε σχέση με τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (cell-cycle independent) καθώς και ότι ο μηχανισμός δράσης του είναι δεν επάγεται μέσω της σύνδεσης του με το DNA. Τα σύμπλοκα αυτά δεν εμφανίζουν κάποια κυτταρική εκλεκτικότητα στη δράση τους. Γενικά τα σύμπλοκα μετάλλων ενώ εμφανίζουν πολύ καλές κυτταροτοξικές δράσεις, πολλές φορές πολύ ισχυρότερες από αυτές της cisplatin, εντούτοις δεν φαίνεται να παρουσιάζουν κάποια κυτταρική επιλεκτικότητα ή δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές γεγονός που τα κάνει να υστερούν σε εκλεκτικότητα. Το σημαντικότερο πρόβλημα της χημειοθεραπείας σήμερα ανακύπτει ακριβώς από αυτό το γεγονός της μη εκλεκτικής δράσης των χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε καρκινικούς και υγιείς ιστούς με αποτέλεσμα τις σοβαρότατες παρενέργειες που παρουσιάζει η χημειοθεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου. Έτσι είναι απαραίτητη η εύρεση στατηγικών προσεγγίσεων προς την εκλεκτική στόχευση τους η οποία θα οδηγήσει σε αύξηση του θεραπευτικού αποτελέσματος και στη μείωση των παρενεργειών και της επαγόμενης ιστικής τοξικότητας. Σε αυτή τη διδακτορική διατριβή έγινε προσπάθεια να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο και να βρεθούν νέοι τρόποι χορήγησης των συμπλόκων αυτών μέσω της χρήσης της λιποσωμιακής τεχνολογίας. Τα αποτελέσματα, ιδίως των *in vivo* μελετών, δικαίωσαν την προσπάθεια αυτή μιας και πετύχαμε τα ίδια και καλύτερα αντικαρκινικά αποτελέσματα μεταξύ της ελεύθερης και της λιποσωμιακής μορφής του συμπλόκου σε πολύ χαμηλότερες χορηγούμενες δόσεις του συμπλόκου (27mg/kg ΣΒ έναντι 0.0025mg/kg ΣΒ) στη λιποσωμιακή του μορφή. Έτσι η ιδέα να εισάγουμε την τεχνολογία των λιποσωμάτων στην χορήγηση των συμπλόκων του αργύρου άνοιξε έναν νέο δρόμο προσέγγισης και αντιμετώπισης της βιοανόργανης επιστήμης (της επιστήμης που ασχολείται με τη σύνθεση των συμπλόκων αυτών). Με τα παραγόμενα αποτελέσματα καθίσταται σαφές ότι η ενσωμάτωση της νανοτεχνολογίας των λιποσωμάτων ως φορείς των συμπλόκων μετάλλων αλλάζει την προοπτική διαχείρισης αλλά και αντιμετώπισης τους ως εν δυνάμει αντικαρκινικών μορίων και αποτελεί ένα πανίσχυρο εργαλείο, αλλά και κατά τα φαινόμενα μία αναγκαιότητα, στην αντιμετώπιση των νεοπλασιών και όχι μόνο.



## ***6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ***



Από την παρούσα διδακτορική διατριβή μπορούμε να εξάγουμε τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Τα σύμπλοκα του Ag(I) με θειοαμίδια και τριφαίνυλοφωσφίνη παρουσιάζουν *in vitro* ισχυρή κυτταροτοξική δράση και εμφανίζονται στατιστικά σημαντικά πιο ισχυρά από τη cisplatin στις καρκινικές κυτταρικές σειρές που ελέγχθησαν.
2. Τα σύμπλοκα του Ag(I) επάγουν το μηχανισμό της απόπτωσης για την πρόκληση κυτταρικού θανάτου, σε δοσοεξαρτώμενο σχήμα χορήγησης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.
3. Όλα τα σύμπλοκα του αργύρου εμφανίζουν αύξηση της κυτταροτοξικότητας τους έπειτα από την ενδοκυτταρική φωτοενεργοποίηση τους μέσω ακτινοβολίας UVC, σε σχέση με την απλή χορήγηση της ελεύθερης μορφής των συμπλόκων.
4. Το σύμπλοκο του αργύρου [3], εμφανίζει ιδιότητες αναστολής του σχηματισμού αποικιών σε δοσοεξαρτώμενο σχήμα χορήγησης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.
5. Το σύμπλοκο του αργύρου [3], δεν παρουσιάζει σχέση δράσης με τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, σε αυξανόμενες δόσεις ελέγχου, σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.
6. Επίσης, οι παρούσες μελέτες δεν αποκάλυψαν σχέση δράσης του συμπλόκου [3] με τη σύνδεση του στο DNA.
7. *In vivo*, η ελεύθερη χορηγούμενη μορφή του συμπλόκου [3], σε μελέτες οξείας (OT) και χρόνιας (XT) τοξικότητας, δεν προκάλεσε το θάνατο κανενός πειραματοζώου στις δοσολογίες που χορηγήθηκε και εμφάνισε πολύ ήπια τοξικότητα στο ήπαρ και στον πνεύμονα στις μεγαλύτερες δόσεις της OT ενώ δεν παρατηρήθηκαν ιστοπαθολογικές βλάβες σε καμία από τις ομάδες χορήγησης της XT.
8. Επίσης, η ελεύθερη χορηγούμενη μορφή του συμπλόκου [3] παρουσίασε ισχυρές αντικαρκινικές δράσεις σε καρκινοπαθές μοντέλο επίμυων Wistar και εμφάνισε πολύ ήπια τοξικότητα στους ιστούς του ήπατος, του πνεύμονα και των νεφρών.
9. Επιτεύχθηκε ενσωμάτωση του συμπλόκου [3] σε λιποσωματικούς νανοφορείς σύστασης EPC:DPPG αλλά το ποσοστό της ενσωμάτωσης του ήταν πολύ μικρό.
10. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος ο ποσοτικός προσδιορισμός υπήρξε αδύνατος μέσω της μεθόδου HPTLC-FID και επιτεύχθηκε μέσω της μεθόδου της φασματοσκοπίας ατομικής απορρόφησης.
11. Η ενσωμάτωση του οδήγησε στο σχηματισμό σταθερών λιποσωματικών συστημάτων.

12. Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας των λιποσωμάτων αποκάλυψε ότι τα απλά λιποσώματα (χωρίς το σύμπλοκο) εμφανίζουν ποσοστά κυτταροτοξικής δράσης σε όλες τις κυτταρικές σειρές που ελέγχθηκαν.
13. Η λιποσωμιακή μορφή του συμπλόκου [3] προκάλεσε περαιτέρω αύξηση της κυτταροτοξικότητας σε σχέση με τα απλά λιποσώματα και η υπολογίσιμη τιμή της  $IC_{50}$  είναι κατά μία τάξη μεγέθους χαμηλότερη από αυτήν της ελεύθερης χορηγούμενης μορφής του.
14. Παρόλο το μικρό ποσοστό ενσωμάτωσης του συμπλόκου [3] στα λιποσώματα, κατέστη δυνατή η ενεργοποίηση της κυτταροτοξικής δράσης του σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.
15. *In vivo*, το απλό λιπόσωμα εμφάνισε μικρή αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση της επιβίωσης σε καρκινοπαθείς επίμυες Wistar, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (OE).
16. Η λιποσωμιακή μορφή του συμπλόκου [3] επέδειξε ισχυρές αντικαρκινικές δράσεις σε καρκινοπαθείς επίμυες Wistar, οι οποίες εμφανίστηκαν εφάμιλλες των δράσεων της μεγάλης δόσης της ελεύθερης μορφής του συμπλόκου.
17. Η χορήγηση της ελεύθερης μορφής του συμπλόκου προκάλεσε επιβράδυνση του ρυθμού ανάπτυξης των όγκων μέχρι και το τέλος των δόσεων όπου από εκεί και μετά άρχισε η επιτάχυνση του ρυθμού ανάπτυξης των όγκων. Η χορήγηση της λιποσωμιακής μορφής του συμπλόκου [3] προκάλεσε στασιμότητα της ανάπτυξης των όγκων καθόλη τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης ενώ με τη λήξη της χορήγησης των δόσεων παρατηρήθηκε αύξηση της μάζας των όγκων.
18. Στην ομάδα των καρκινοπαθών επίμυων Wistar που χορηγήθηκε η λιποσωμιακή μορφή του συμπλόκου [3] υπήρξε αναστολή και υποχώρηση της ανάπτυξης των όγκων με αποτέλεσμα την πλήρη ίαση ενός εκ των πειραματοζώων, το οποίο επιβιώνει μέχρι σήμερα.
19. Οι συμπεριφορικές παρατηρήσεις των πειραματοζώων ανέδειξαν ότι η ενδοφλέβια χορήγηση των λιποσωμάτων υπήρξε πολύ καλύτερα διαχειρίσιμη από τα πειραματόζωα απ' ότι η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της ελεύθερης μορφής του συμπλόκου σε τρικαπρυλίνη, όπου παρατηρήθηκε έντονος πόνος και δυσφορία για πάρα πολλές ώρες μετά τη χορήγηση και κατά την οποία τα πειραματόζωα απείχαν από την κατανάλωση τροφής ενώ αυξήσαν κατακόρυφα την κατανάλωση του νερού.
20. Από τα παραπάνω αποτελέσματα, η λιποσωμιακή μορφή του συμπλόκου [3] ενίσχυσε τη θεραπευτική δράση του συμπλόκου, βελτιώνοντας τις φυσικοχημικές του ιδιότητες,



και εξαλείφοντας τις λίγες κατά τα άλλα, τοξικολογικές παρενέργειες που παρατηρήθηκαν στη χορήγηση της ελεύθερης μορφής του συμπλόκου αναδुकνεύοντας έτσι το θεραπευτικό του αποτέλεσμα.

- 21.** Τα σύμπλοκα του αργύρου που μελετήθηκαν, μπορούν να αποτελέσουν πρόδρομα αλλά και πρότυπα μόρια μελέτης και ανάπτυξης ισχυρών χημειο-μεταλλοθεραπευτικών παραγόντων και ιδιαίτερα πρότυπα μοντέλα ανάπτυξης νέων συμπλόκων αργύρου ή άλλων μετάλλων με οργανικούς υποκαταστάτες για ενσωμάτωση ή εγκλωβισμό σε λιποσωμακούς φορείς με μεγαλύτερα ποσοστά ενσωμάτωσης και αυξημένη φαρμακολογική και θεραπευτική δράση.
- 22.** Γενικά, καθίσταται σαφές ότι η ενσωμάτωση της νανοτεχνολογίας των λιποσωμάτων ως φορείς βιοδραστικών μορίων αλλάζει την προοπτική διαχείρισης αλλά και προσέγγισης της ερευνητικής επιστήμης των συμπλόκων μετάλλων ως εν δυνάμει αντικαρκινικών παραγόντων και αποτελεί ένα πανίχυρο εργαλείο στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των νεοπλασιών μέσα από τη στοχευμένη δράση, τη μείωση των παρενεργειών και την αύξηση του φαρμακολογικού θεραπευτικού αποτελέσματος του αντικαρκινικού παράγοντα που φέρουν.



## ***7. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ***



## 7.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

*«Μελέτη αξιολόγησης της βιοδραστικότητας συμπλόκων Ag (I) με οργανικούς υποκαταστάτες και εγκλωβισμός, ανάπτυξη και χαρακτηρισμός λιποσωμιακών νανοσυστημάτων μεταφοράς τους, σε καρκινικά *in vitro* και *in vivo* μοντέλα»*

Η αξία της χημειοθεραπείας παραμένει ακλόνητη μέχρι σήμερα αλλά οι νέες αντικαρκινικές προσεγγίσεις κερδίζουν ολοένα και περισσότερο έδαφος στην καταπολέμηση του καρκίνου.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αξιολογήθηκε η βιοδραστικότητα τεσσάρων (4) νέων μεικτών συμπλόκων του Ag(I) με υποκαταστάτες τριφαινυλοφωσφίνη και θειοαμίδια με μοριακούς τύπους  $\text{AgCl}(\text{TPP})_2(\text{TZD})$  [1],  $\text{AgCl}(\text{TPP})_2(\text{BZT})$  [2],  $\text{AgCl}(\text{TPP})_2(\text{CBZT})$  [3],  $\text{AgCl}(\text{TPP})_2(\text{MMI})$  [4], όσο αφορά τη δράση τους και τη δραστικότητά τους σε σχέση με τον υποκαταστάτη που φέρει ο άργυρος κάθε φορά σε *in vitro* καρκινικά και φυσιολογικά μοντέλα. Επίσης, περιέλαβε μελέτες για την ενσωμάτωση του επιλεγθέντος συμπλόκου (εκ των τεσσάρων)  $\text{AgCl}(\text{TPP})_2(\text{CBZT})$ , το οποίο εκλήφθηκε ως πρότυπο σύμπλοκο μετάλλου, σε κατάλληλους λιποσωμιακούς νανοφορείς, ώστε να ενισχυθεί η θεραπευτική του δράση σε καρκινοπαθή με λειομυοσάρκωμα μοντέλα επίμυων Wistar, με σκοπό την αύξηση του αντικαρκινικού θεραπευτικού αποτελέσματος.

Πραγματοποιήθηκαν *in vitro* μελέτες αξιολόγησης της αναστολής του κυτταρικής βιωσιμότητας των συμπλόκων αυτών τα οποία εμφάνισαν ισχυρή κυτταροτοξική δράση και στατιστικά σημαντικά μικρότερες  $\text{IC}_{50}$  τιμές απ' αυτές της cisplatin στις ίδιες κακοήθεις κυτταρικές σειρές (LMS, MCF7 και A549) που ελέγχθησαν. Η φυσιολογική κυτταρική σειρά MRC5 εμφανίζει μια σχετική ανθεκτικότητα απέναντι στα σύμπλοκα του αργύρου με τις  $\text{IC}_{50}$  τιμές να πλησιάζουν ή να ξεπερνάνε τα 10 $\mu\text{M}$ . Στη συνέχεια, ανιχνεύτηκε ο κυτταρικός μηχανισμός του θανάτου που προκαλούν και ο οποίος βρέθηκε ότι επάγεται δόσοεξαρτώμενα μέσω της απόπτωσης. Παράλληλα αξιολογήθηκαν για τις φωτοενεργοποιούμενες κυτταροτοξικές δράσεις τους έπειτα από την ενδοκυτταρική έκθεση τους σε ακτινοβολία UVC οι οποίες εμφάνισαν αύξηση της αναστολής της κυτταρικής βιωσιμότητας στις καρκινικές κυτταρικές σειρές LMS και MCF7 σε σύγκριση με την αναστολή που προκαλεί η ελεύθερη μορφή των συμπλόκων από μόνη της.

Μετά τον προκαταρκτικό έλεγχο επιλέχθηκε το σύμπλοκο με τις καλύτερες βιολογικές δράσεις ώστε να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τις περαιτέρω μελέτες. Το

σύμπλοκο που επιλέχθηκε ήταν το [3]. Εν συνεχεία, το σύμπλοκο [3] ελέγχθηκε σε μια πληθώρα καρκινικών κυτταρικών σειρών αλλά όμως δεν παρατηρήθηκε κάποια κυτταρική επιλεκτικότητα με τις IC<sub>50</sub> τιμές να παραμένουν στα ίδια επίπεδα σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Έπειτα χρησιμοποιώντας το Clonogenic assay, παρατηρήθηκε ότι η επώαση με το σύμπλοκο [3] των καρκινικών κυττάρων LMS και MCF7 ανέστειλε δοσοεξαρτώμενα την δημιουργία αποικιών των συγκεκριμένων κυττάρων. Επιπροσθέτως, η μελέτη του κυτταρικού κύκλου δεν εμφάνισε σχέση μεταξύ της δράσης του [3] και των φάσεων S και G2/M του κυτταρικού κύκλου. Τέλος, μέσω του comet assay δεν ανιχνεύτηκε σχέση δράσης του συμπλόκου μέσω της σύνδεσης του στο DNA, αλλά εμφάνισε δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη πρόκληση βλάβης στο DNA πιθανόν μέσω της δημιουργίας ROS.

Ο εγκλωβισμός του συμπλόκου [3] σε συμβατικά λιποσώματα σύστασης EPC:DPPG ήταν επιτυχής, οδήγησε σε σταθερά συστήματα αλλά εμφάνισε χαμηλά ποσοστά ενσωμάτωσης ( $D/L = 1.76 \times 10^{-5}$ ,  $C = 0.584\mu\text{M}$ ). Οι *in vitro* μελέτες του ελέγχου της κυτταροτοξικής δράσης επέδειξαν ότι η λιποσωματική μορφή του συμπλόκου [3], παρά τη μικρή συγκέντρωσή του, αύξησε την κυτταροτοξική του δράση μειώνοντας την IC<sub>50</sub> τιμή του σχεδόν 25 φορές σε σχέση με αυτή που επέδειξε η ελεύθερη μορφή χορήγησης του συμπλόκου και στις τρεις κυτταρικές σειρές που δοκιμάστηκαν (LMS, MCF7, A549)

Οι *in vivo* μελέτες τις οξείας τοξικότητας (OT) περιελάμβαναν την εφάπαξ δόση της ελεύθερης μορφής του συμπλόκου ενδοπεριτοναϊκά σε υγιείς επίμυες Wistar, ακολουθώντας λογαριθμικό σχήμα χορήγησης των 0,8, 8 και 80mg/kg ΣΒ κατά τις οποίες δεν υπήρξε θάνατος πειραματοζώου. Τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν την 7<sup>η</sup> ημέρα από τη χορήγηση για ιστοπαθολογική εξέταση η οποία αποκάλυψε πολύ ήπιες βλάβες στον ιστό του πνεύμονα και του ήπατος στη δόση των 80mg/kg ΣΒ. Από τα παραπάνω αποτελέσματα υπήρξε ανέφικτος ο προσδιορισμός της LD<sub>50</sub> και έτσι χορηγήθηκε μια ακόμα δόση OT στα 160mg/kg ΣΒ. Τα αποτελέσματα ήταν εφάμιλλα της δόσης των 80mg/kg ΣΒ.

Ακολούθησαν μελέτες χρόνιας τοξικότητας (XT) στην οποία έλαβαν μέρος υγιείς επίμυες Wistar. Χορηγήθηκαν 2 διαφορετικά σχήματα στα 8 και στα 27mg/kg ΣΒ των 6 δόσεων ανά 6 ημέρες για συνολικό χρονικό διάστημα χορήγησης 30 ημερών. Σε καμία από τις ομάδες χορήγησης δεν υπήρξε θάνατος πειραματοζώου. Τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν την 7<sup>η</sup> ημέρα μετά την τελευταία χορήγηση για ιστοπαθολογική εξέταση η οποία δεν αποκάλυψε καμία βλάβη σε κανέναν από τους εξεταζόμενους ιστούς.

Η τελευταία μελέτη που έλαβε μέρος ήταν η αντικαρκινική αξιολόγηση της δράσης της ελεύθερης και της λιποσωμιακής μορφής του συμπλόκου σε καρκινοπαθή μοντέλα λειομυοσαρκώματος επίμυων Wistar και η σύγκριση των αποτελεσμάτων προς ανεύρεση του καταλληλότερου φαρμακευτικού θεραπευτικού σχήματος. Η ελεύθερη μορφή του συμπλόκου ακολούθησε τα δύο σχήματα χορήγησης της ΧΤ στα 8 και 27mg/mg ΣΒ για 6 δόσεις αλλά κάθε 3 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της επιβίωσης των καρκινοπαθών επίμυων κατά 44.6% και 57.45% αντίστοιχα στη μικρή και στη μεγάλη δόση αντίστοιχα σε σύγκριση με το control και ο ιστοπαθολογικός έλεγχος αποκάλυψε εκτεταμένη νέκρωση του όγκου της τάξης του 50%, ενώ ανιχνεύτηκαν πολύ ήπιες βλάβες στους ιστούς του πνεύμονα, του ήπατος και των νεφρών. Η λιποσωμιακή μορφή του συμπλόκου σε δόση 0.0025mg/kg ΣΒ, προκάλεσε αύξηση της επιβίωσης των καρκινοπαθών επίμυων κατά 57.45% και η οποία ήταν εφάμιλλη της μεγάλης δόσης της ελεύθερης μορφής του συμπλόκου. Η ιστοπαθολογική ανάλυση δεν ανίχνευσε ιστικές βλάβες και η εικόνα που παρουσίαζαν οι ιστοί ήταν κατά φύσιν.

Καθίσταται σαφές ότι η ενσωμάτωση της νανοτεχνολογίας των λιποσωμάτων ως βιοδραστικών μορίων αλλάζει την προοπτική διαχείρισης αλλά και προσέγγισης της ερευνητικής επιστήμης των συμπλόκων μετάλλων ως εν δυνάμει αντικαρκινικών παραγόντων και αποτελεί ένα πανίχυρο εργαλείο στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των νεοπλασιών μέσα από τη στοχευμένη δράση, τη μείωση των παρενεργειών και την αύξηση του φαρμακολογικού θεραπευτικού αποτελέσματος του αντικαρκινικού παράγοντα που φέρουν.





## 7.2 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ

### Overview of the Doctorate Thesis

*“Evaluation studies of bioactivity of mixed-complexes of Ag (I) with organic ligands and partitioning, development and characterization of their liposomal transfer nanosystems in in vitro and in vivo cancer models.”*

#### Doctorate thesis – Ilias Karagounis

The value of chemotherapy still remains undisputed but new anticancer approaches are gaining more and more ground in the fight against cancer.

This doctorate thesis evaluated the bioactivity of four new mixed-complexes of Ag (I) with triphenylphosphine (TPP) and thioamides (2-mercaptothiazole [1], 2-mercaptobenzothiazole [2], 5-Chloro-2-mercaptobenzothiazole [3], and 2-mercaptoimidazole [4]) as ligands, with molecular types: AgCl(TPP)<sub>2</sub>(TZD) [1], AgCl(TPP)<sub>2</sub>(BZT) [2], AgCl(TPP)<sub>2</sub>(CBZT) [3], AgCl(TPP)<sub>2</sub>(MMI) [4], as regards their activity and potency with respect to the ligand that silver carries each time, in *in vitro* tumor and normal models. Also, studies took place for the partitioning of the selected complex (of the four) AgCl(TPP)<sub>2</sub>(CBZT), which was considered as representative standard of the silver complexes, at appropriate liposomal nanocarriers, in order to enhance its therapeutic effect in leiomyosarcoma tumor-bearing Wistar rat models, hence to increase the anticancer therapeutic outcome.

*In vitro* studies were performed to evaluate the inhibition of cell viability of these silver complexes which showed potent cytotoxic activity ( $\ll 10\mu\text{M}$ ) and significantly lower IC<sub>50</sub> values than those of cisplatin in the same malignant cell lines tested (LMS, MCF7 and A549) (Table 4.1). The normal cell line MRC5 showed a relative resistance towards these silver complexes compared to the cancer cell lines (Table 4.1). Then, the cellular mechanism of death caused by them was detected by flowcytometry and which was found to dose-dependently induced by apoptosis (Graph 4.5, 4.6, 4.7). Also, they were evaluated for their photoactivated cytotoxic actions after their intracellular exposure to UVC radiation which showed increased inhibition of cell viability in cancer cell lines LMS and MCF7 compared to the one without UVC treatment (Table 4.5, 4.6).

After the preliminary screening, the silver complex with the best biological activities was selected to be used as a model for further studies for the mode of action. The complex chosen was the [3]. Thereafter, complex [3] was tested in a variety of tumor cell lines but none cell specificity was observed and the IC<sub>50</sub> values remain similar in all tumor cell lines tested (Table 4.2). Then, using the Clonogenic assay, it was observed that the incubation of the LMS and MCF7 tumor cells with the silver complex [3] inhibited in dose-dependent manner the colonization of these cells after they were left to grow freely without any kind of treatment (Graph 4.8, 4.9). Additionally, the study of cell cycle showed no relationship between the action of complex [3] and the phases of the cell cycle and was indicated as cell-cycle independent (Table 4.7). Finally, by performing comet assay it was detected that its activity does not come by its binding to the DNA (DNA X-links) but instead it was found that causes DNA strand breaking (Graph 4.17, 4.18), possible caused by silver induced ROS. Also, this is enhanced by the fact that complex [3] didn't follow cisplatin pattern, which was tested as control, and appeared to act dose-dependently and time-dependently by creating X-links with DNA (Graph 4.15, 4.16).

The partitioning of the silver complex [3] in conventional liposomes composed by EPC:DPPG was successful, leading to stable liposomal systems but showed low levels of incorporation (D/L =  $1.76 \times 10^{-5}$ , C = 0.584 $\mu$ M). The method of liposomal preparation was the thin film hydration. The sizing of liposomes was achieved by using the extruder method. Size exclusion chromatography used in order to clean the liposomal form of the complex from its free form. Photon Correlation Spectroscopy used in order to measure the mean hydrodynamic diameter (size), polydisperse index and Z-potential of the liposomes. HPTLC-FID used to quantify the final lipid content of the liposomes but due to low levels of incorporation of silver complex [3] into liposomes this method appeared to be unsuitable to quantify the silver complex. Quantification of the silver complex in liposomal content was achieved by atomic absorption spectroscopy of silver metal. The *in vitro* evaluation studies of the cytotoxic action demonstrated that the liposomal form of the complex [3], despite the small concentration, increased its cytotoxic action by reducing the IC<sub>50</sub> value of about 25-fold compared to that shown by its free form in all three cell lines tested (LMS, MCF7, A549).

The *in vivo* studies of acute toxicity (AT) included a single dose of the free form of the silver complex intraperitoneally into healthy female Wistar rats, following a logarithmic pattern of doses of 0.8, 8 and 80mg/kg BW, where there was no death of

experimental animal. The animals were sacrificed on the 7th day of the administration day for histopathological examination which revealed a very mild damage to lung and liver tissue at the dose of 80mg/kg BW. According the above results the determination of the LD<sub>50</sub> value was impossible and thus a higher dose was tested at 160mg/kg BW. The results were comparable to those of the dose of 80mg/kg BW with no deaths of the experimental animals and a very mild damage to lung and liver tissues.

Studies of chronic toxicity (CT) followed, in which healthy female Wistar rats were used. Two different treatment doses were administered, at 8 and 27mg/kg BW for 6 doses per 6 days for a total administration period of 30 days. In none of the groups death was occurred. The animals were sacrificed on the 7th day after the last administration dose for histopathological examination which revealed no damage to any of the examined tissues.

The last study which took place was the evaluation of the antitumor activity of both free and liposomal forms of silver complex [3] in leiomyosarcoma tumor bearing Wistar rats and the comparison of the results to identify the most suitable pharmaceutical regimen. The free form of the complex was administered in two different treatment doses of 8 and 27mg/mg BW for 6 doses every 3 days. The results showed increased mean survival time (MST) of the tumor bearing rats by 44.6% and 57.45% in the small and large dose respectively compared to the control group (MST=27.5 ± 3.3 Days) and the histopathological examination revealed extensive tumor necrosis of 50% while a very mild tissue damage was detected in lung, liver and kidneys. The liposomal formulation of the silver complex [3] was administered intravenously at a dose 0.0025mg/kg BW (near the maximum dose that could be administered; this dose was contained in 1ml of liposomal formulation), caused an increase in the MST of the tumor-bearing rats of 57.45%, which was comparable to the high dose of the free form of the complex. Histopathological analysis did not detect any tissue damage.

It is clear, that the exploitation of nanotechnology of liposomes as bioactive molecule carriers changes the perspective management and approach of the science research field of metal complexes, as potential anticancer agents, and it has been proven a powerful tool to treat cancers through targeted action, reduced side effects and increased pharmacological therapeutic effect of the anticancer agent bearing.



## ***8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ***



1. Abuskhuna S, Briody J, McCann M, Devereux M, Kavanagh K, Fontecha JB, McKee V. Synthesis, structure and anti-fungal activity of dimeric Ag(I) complexes containing bis-imidasole ligands. *Polyhedron*, 2004; 23: 1249-1255
2. Adam-Vizi V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxidant Redox Signal*, 2005; 7: 1140–1149
3. Aird RE, Cummings J, Ritchie AA, Muir M, Morris RE, Chen H, Sadler PJ, Jodrell DI. In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 2002; 20 (86): 1652-1657
4. Almofti MR, Ichikawa T, Yamashita K, Terada H, Shinohara Y. Silver ion induces a cyclosporine A-insensitive permeability transition in rat liver mitochondria and release of apoptogenic cytochrome c. *Biochemical Journal*, 2003; 134: 43–49
5. Amro NA, Kotra LP, Wadu-Mesthrige K, Bulychev A, Mobashery S, Liu G. High-resolution atomic force microscopy studies of the Escherichia coli outer membrane: structural basis for permeability. *Langmuir*, 2000; 16: 2789- 2796
6. Antman KH. Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy. *Oncologist*, 2001; 6: 1-2
7. Aragane Y, Kulms D, Metze D, Gabriele W, Pöppelmann B, Luger TA, Schwarz T. Ultraviolet Light Induces Apoptosis via Direct Activation of CD95 (Fas/APO-1) Independently of Its Ligand CD95L. *The Journal of Cell Biology*, 1998; 140(1): 171-182.
8. Aslanidis P, Hadjikakou SK, Karagiannidis P, Gdaniec M, Kosturkiewicz Z. 4-Coordinate copper(I) iodide complexes with triphenylphosphine and heterocyclic thione ligands—the crystal structure of [Cu(Pph<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(Pymth)I]. *Polyhedron*, 1993; 12(18): 2221–2226
9. Aston K, Rath N, Naik A, Slomczynska U, Schall OF, Riley DP. Computer-aided design (CAD) of Mn(II) complexes: superoxide dismutase mimetics with catalytic activity exceeding the native enzyme. *Inorganic Chemistry*, 2001; 40 (8): 1779-1789
10. Balafas E, Papastefanou A, Katsimpoulas M, Kostomitsopoulos N. A low cost face mask for inhalation anaesthesia in Rats. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 2011; 38 (2): 111- 115

11. Bangham AD and Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*, 1964; 8 (5): 660-668
12. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 1965; 13: 238-252
13. Banti CN, Giannoulis AD, Kourkoumelis N, Owczarzac AM, Poyraz M, Kubicki M, Charalabopoulos K, Hadjikakou SK. Mixed ligand-silver(I) complexes with anti-inflammatory agents which can bind to lipoxygenase and calf-thymus DNA, modulating their function and inducing apoptosis. *Metallomics*, 2012; 4(6): 545-560
14. Barnard PJ and Berners-Price SJ. Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, 2007; 251: 1889–1902
15. Berceanc V, Crainic C, Haiduc I, Mahon MF, Molloy KC, Venter MM, Wilson PJ. The structural chemistry of organotin derivatives of 5-mercapto-3-phenyl-1,3,4-thiadiazoline-2-thione: supramolecular structures involving intermolecular Sn center dot center dot center dot S, N-H center dot center dot center dot S or S center dot center dot center dot S interactions. *Journal of the Chemical Society: Dalton Transactions*, 2002: 6: 1036-1045.
16. Berners-Price SJ, Appleton TG. *The Chemistry of Cisplatin in Aqueous Solution*; In *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy*. Kelland, L. R.; Farrell, N., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 2000
17. Berners-Price SJ, Bowen RJ, Galettis P, Healy PC, McKeage MJ. Structural and solution chemistry of gold(I) and silver(I) of bidentate pyridyl phosphines: selective antitumor agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 1999; 186-186, 823-836
18. Berners-Price SJ, Bowen RJ, Hambley TW, Healy PC. NMR and structural studies of gold(I) chloride adducts with bidentate 2-, 3- and 4-pyridyl phosphines. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 1999; 8: 1337-1346
19. Berners-Price SJ, Girard GR, Hill DT, Sutton BM, Jarrett PS, Faucette LF, Johnson RK, Mirabelli CK, Sadler PJ. Cytotoxicity and antitumour activity of some tetrahedral bis(diphosphino)gold(I) chelates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1990; 33: 1386-1392
20. Berners-Price SJ, Jarret PS, Sadler PJ. <sup>31</sup>P NMR studies of [Au<sub>2</sub>(μ-dppe)]<sup>2+</sup> antitumor complexes. Conversion into [Au(dppe)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> induced by thiols and blood plasma. *Inorganic Chemistry*, 1987; 26: 3074-3077



21. Berners-Price SJ, Sadler P. Coordination chemistry of metallodrugs: insights into biological speciation from NMR spectroscopy. *Coordination Chemistry Reviews*, 1996; 151: 1-40
22. Bessman SP and Carpenter CL. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annual Reviews in Biochemistry*, 1985; 54: 831–862
23. Bhol KC and Schechter PJ. Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis. *British Journal of Dermatology*, 2005; 152 (6): 1235–1242
24. Bhol KC and Schechter PJ. Effects of nanocrystalline silver (NPI 32101) in a rat model of ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 2007; 52 (10): 2732–2742
25. Bindoli A, Rigobello MP, Scutari G, Gabbiani C, Casini A, Messori L. Thioredoxin reductase: A target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews*, 2009; 253 (11-12): 1692-1707
26. Bleehan SS, Gold DJ, Harrington CI, Durrant TE, Slater DN, Underwood JC. Occupational argyria: Light and electron microscopic studies and X-ray microanalysis. *British Journal of Dermatology*, 1981; 104 (1): 19-26
27. Boosalis MG, McCall JT, Ahrenholtz DH, Solem LD, McClain CJ. Serum and urinary silver levels in thermal injury patients. *Surgery*, 1987; 101 (1): 40-43.
28. Boucher W, Stern JM, Kotsinyan V, Kempuraj D, Papaliadis D, Cohen MS, Theoharides TC. Intravesical nanocrystalline silver decreases experimental bladder inflammation. *Journal of Urology*, 2008; 179 (4): 1598–1602
29. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences*, 2005; 88: 412–419
30. Bruijninx PCA and Sadler PJ. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2008; 12:197-206
31. Burchenal JH, Kalaher K, Dew K. Studies of cross-resistance, synergistic combinations and blocking of activity of platinum derivatives. *Biochimie*, 1978; 60 (9): 961-965
32. Burrell RE. A scientific perspective on the use of topical silver preparations. *Ostomy Wound Management*, 2003; 49 (5): 19–24

33. Cavicchioli M, Massabni AC, Heinrich TA, Costa-Neto CM, Abrao EP, Fonseca BAL, Castellano EE, Corbi PP, Lustri WR, Leite CQF. Pt(II) and Ag(I) complexes with acesulfameQ Crystal structure and a study of their antitumoral, antimicrobial and antiviral activities. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2010; 194: 533-540
34. Chang HI, Yeh MK. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization and therapeutic efficacy. *International Journal of Nanomedicine*, 2012; 7: 49-60
35. Chappell JB and Greviller GD. Effect of silver ions on mitochondrial adenosine triphosphatase. *Nature*, 1954; 174: 930–931
36. Chasapis ChT, Hadjikakou SK, Garoufis A, Hadjiliadis N, Bakas Th, Kubichi M, Ming Y. Oragnotin(IV) derivatives of L-cysteine and their *in vitro* anti-tumor properties. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2004; 2 (1-2): 43-54
37. Che CM, Sun RW, Yu WY, Ko CB, Zhu N, Sun H. Gold(III) porphyrins as a new class of anticancer drugs: cytotoxicity, DNA binding and induction of apoptosis in human cervix epitheloid cancer cells. *Chemical Communications (Cambridge)*, 2003; 14: 1718-1719
38. Chen D, Milacic V, Frezza M, Ping Dou Q. Metal complexes, their cellular targets and potential for cancer therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 2009; 15(7):777-791
39. Chen H, Parkinson JA, Nováková O, Bella J, Wang F, Dawson A, Gould R, Parsons S, Brabec V, Sadler PJ. Induced-fit recognition of DNA by organometallic complexes with dynamic stereogenic centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003; 100 (25): 14623-14628
40. Chen H, Parkinson JA, Parsons S, Coxall RA, Gould RO, Sadler PJ. Organometallic ruthenium(II) diamine anticancer complexes: arene-nucleobase stacking and stereospecific hydrogen-bonding in guanine adducts. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124 (12): 3064-3082
41. Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters*, 2008; 176: 1–12
42. Christian MC. The current status of new platinum analogs. *Seminars in Oncology*, 1992; 19 (6): 720–733
43. Christodoulou CV, Ferry DR, Fyfe DW, Young A, Doran J, Sheehan TM, Eliopoulos A, Hale K, Baumgart J, Sass G, Kerr DJ. Phase I trial of weekly scheduling and

- pharmacokinetics of titanocene dichloride in patients with advanced cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 1998; 16 (8): 2761-2769
44. Clarke MJ. Ruthenium Chemistry Pertaining to the Design of Anticancer Agents; *Progress in Clinical Biochemistry and Medicine*; Springer-Verlag: Berlin, 1989; 10: 25–40
  45. Clarke MJ and Sadler PJ. *Metallopharmaceuticals I: DNA interactions*, Springer-Verlag: Berlin, 1999
  46. Clarke MJ, Zhu F, Frasca DR. Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. *Chemical Reviews*, 1999; 99 (9): 2511-2534
  47. Clarke MJ, Zhu F, Frasca D. Non-Platinum Chemotherapeutic Metallopharmaceuticals. *Chemical Reviews*, 1999; 99: 2511-2533
  48. Comba P, Jakob H, Nuber B, and Keppler BK. Solution structures and isomer distribution of bis (b-diketonato) complexes of titanium(IV) and cobalt(III). *Inorganic Chemistry*, 1996; 33: 3396–3400
  49. Coombs CJ, Wan AT, Masterton JP, Conyers RA, Pedersen J, Chia YT. Do burn patients have a silver lining? *Burns*, 1992; 18 (3): 179-184
  50. Cooper MG. *Treatment of Cancer*, Jones & Bartlett Publisher, 1992
  51. Costa CS, Ronconi JV, Daufenbach JF, Gonçalves CL, Rezin GT, Streck EL, Paula MM. In vitro effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2010; 342 (1-2): 51-56
  52. Couce MD, Faraglia G, Russo U, Sindellari L, Valle G. Synthesis, characterization and X-ray crystal structures of diorganotin(IV) complexes with 2-mercaptopyridine derivatives. *Journal of Organometallic Chemistry*, 1996; 513 (1-2): 77-83
  53. Crabtree JH, Burchette RJ, Siddiqi RA, Huen IT, Handott LL, Fishman A. The efficacy of silver-ion implanted catheters in reducing peritoneal dialysis-related infections. *Peritoneal Dialysis International*, 2003; 23 (4): 368- 74.
  54. Danilczuk M, Lund A, Saldo J, Yamada H, Michalik J. Conduction electron spin resonance of small silver particles. *Spectrochimica Acta Part A* , 2006; 63:189-191
  55. Davis AG, *Organotin Chemistry*, VCH, Weinheim, 1997
  56. Deegan C, Coyle B, McCann M, Devereux M, Egan DA. In vitro anti-tumour effect of 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendione),  $[\text{Cu}(\text{phendione})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  and  $[\text{Ag}(\text{phendione})_2]\text{ClO}_4$  using human epithelial cell lines. *Chemico-Biological Interactions*, 2006; 164: 115-125

57. Deitl HW, Anzil AP, Mehraein P. Brain involvement in generalised argyria. *Clinical Neuropathology*, 1984; 3 (1): 32-36.
58. Demetzos C. Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability. *Journal of Liposome Research*, 2008; 18 (3): 159-173
59. Desoize B. Cancer and metals and metal compounds: Part II- Cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2002; 42: 213-215
60. De Sousa APG, Silva RM, Cesar A, Wardell JL, Huffman JC, Abras A. Structures, semi-empirical calculations and thermolyses of some five- and six-membered chelate organotin mercaptide complexes. *Journal of Organometallic Chemistry*, 2000; 605 (1): 82-88
61. Dibrov P, Dzioba J, Gosink KK, Häse CC. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag(+) in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 2002; 46: 2668- 70.
62. Doctrow SR, Huffman K, Marcus CB, Musleh W, Bruce A, Baudry M, Malfroy B. Salen-manganese complexes: combined superoxide dismutase/catalase mimics with broad pharmacological efficacy. *Advanced Pharmacology*, 1997; 38: 247-269
63. Doi K, Akaike T, Horie H, Noguchi Y, Fujii S, Beppu T, Ogawa M, Maeda H. Excessive production of nitric oxide in rat solid tumor and its implication in rapid tumor growth. *Cancer*, 1996; 77: 1598–1604.
64. Dragieva I, Stoeva S, Stoimenov P, Pavlikianov E, Klabunde K. Complex formation in solutions for chemical synthesis of nanoscaled particles prepared by borohydride reduction process. *Nanostructured Materials*, 1999; 12: 267-270
65. Drulis-Kawa Z and Dorotkiewicz-Jach A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010; 387 (1-2): 187-198
66. Eastman A. The Mechanism of Action of Cisplatin: From Adducts to Apoptosis. In *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*; Lippert B., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1999; 111–134
67. Einhorn N, Tropé C, Ridderheim M, Boman K, Sorbe B, Cavallin-Ståhl E. A systematic overview of radiation therapy effects in cervical cancer (cervix uteri). *Acta Oncology*, 2003; 42 (5-6): 546-556
68. Evangelou A, Kalpouzou G, Karkabounas S, Liasko R, Nonni A, Stefanou D, Kallistratos G. Dose-related preventive and therapeutic effects of antioxidants-

- anticarcinogens on experimentally induced malignant tumors in Wistar rats. *Cancer Letters*, 1997; 115 (1): 105-111
69. Farrell NP. Transition metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1989
  70. Farrell N. Chapter 9.18-Metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents. *Comprehensive Coordination Chemistry II*. Elsevier, 2003; 9: 809-840
  71. Farrer NJ, Woods JA, Salassa L, Zhao Y, Robinson KS, Clarkson G, Mackay FS, Sadler P. A potent trans-diimine platinum anticancer complex photoactivated by visible light. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010; 49(47): 8905–8908
  72. Farnsworth, N. R. *Bioactive Compounds from Plants*, John Wiley & Sons, 1990
  73. Feng SS and Chien S. Chemotherapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chemical Engineering Science*, 2003; 58: 4087-4114
  74. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*, 1995; 1: 27–31.
  75. Frasca DR, Clarke MJ. Alterations in the Binding of  $[\text{Cl}(\text{NH}_3)_5\text{Ru}^{\text{III}}]^{2+}$  to DNA by Glutathione: Reduction, Autoxidation, Coordination, and Decomposition. *Journal of the American Chemical Society*, 1999; 121: 8523-8532
  76. Fricker SP. *Metal compounds in cancer therapy*. Chapman & Hall: London, 1994
  77. Fung MC and Bowen DL. Silver products for medical indications: risk-benefit assessment. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology*, 1996; 34: 119-126
  78. Furno F, Morley KS, Wong B, Sharp BL, Arnold PL, Howdle SM, Bayston R, Brown PD, Winship PD, Reid HJ. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004; 54 (6): 1019- 1024.
  79. Furberg S and Solbakk J. Crystal-structure of arginine diethyl phosphate. *Acta Chemica Scandinavica*, 1973; 27(4): 1226–1232
  80. Gabbiani C, Casini A, Messori L, Guerri A, Cinellu MA, Minghetti G, Corsini M, Rosani C, Zanella P, Arca M. Structural characterization, solution studies, and DFT calculations on a series of binuclear gold(III) oxo complexes: relationships to biological properties. *Inorganic Chemistry*, 2008; 47 (7): 2368-2379
  81. Gastl G, Hermann T, Steurer M, Zmija J, Gunsilius E, Unger C, Kraft A. Angiogenesis as a target for tumor treatment. *Oncology*, 1997; 54: 177-184

82. Gennis RB. Biomembranes Molecular Structure and Function. Springer-Verlag New York, 1989; 23
83. Gentile M, Latonen L, Laiho M. Cell cycle arrest and apoptosis provoked by UV radiation - induced DNA damage are transcriptionally highly divergent responses. *Nucleic Acids Research*, 2003; 31(16): 4779-4790
84. Georgiou E, Metsios A, Kourkoumelis N, Karkabounas S, Charalabopoulos K, Badeka A, Hadjikakou SK. Inhibition of lipoxygenase (LOX) and anticancer activity caused by gold(I) mixed ligands complexes of triphenylphosphine and thioamides. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2011; 26 (4): 592-527
85. Gettler AO, Rhoads A, Weiss A. A contribution to pathology of generalised argyria with a discussion on the fate of silver in the human body. *American Journal of Pathology*, 1927; 3: 631–652
86. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Molecular Pharmacology*, 2001; 59 (4): 657-63
87. Goyer RA in: M.O. Amdur, J. Doull, C.D. Klaassen (Eds.), *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, Pergamon Press, New York, 1991; 629
88. Greish K. Chapter 3-Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting, in *Cancer Nanotechnology, Methods in Molecular Biology*, eds Grobmyer SR and Moudgil BM. Springer Science+Business Media, 2010
89. Greish K, Sawa T, Fang J, Akaike T, Maeda H. SMA-doxorubicin, a new polymeric micellar drug for effective targeting to solid tumours. *Journal of Controlled Release*, 2004; 97: 219–230.
90. Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends in Biotechnology*, 1995; 13: 527-537
91. Hadjikakou SK, Aslanidis P, Karagiannidis P, Hountas A, Terzis A. Synthesis and photolysis of a new series of Cu(I) complexes with tri-meta-tolylphosphine and heterocyclic thiones— the crystal-structure of bis[ $\mu$ -iodo(pyridine-2-thione)(tri-metatolylphosphine) copper(I)]. *Inorganica Chimica Acta*, 1991a 184(2): 161–166
92. Hadjikakou SK, Aslanidis P, Karagiannidis P, Mentzafos D, Terzis A. Synthesis and photolysis of a new series of Cu(I) complexes with tri-ortho-tolylphosphine and heterocyclic thiones as ligands—the crystal-structure of (thiazolidine-2-thione)(trio-

- tolylphosphine)-copper(I)bromide. *Inorganica Chimica Acta*, 1991b; 186(2): 199–204
93. Hadjikakou SK, Aslanidis P, Akrivos PD, Karagiannidis P, Kojicprodic B, Luic M. Study of mixed-ligand copper(I) complexes with tri-meta-tolyl-phosphine (tmtp) and heterocyclic thiones—crystal-structures of bis[ $\mu$ -s(benzimidazoline-2-thione)(tmtp) copper(I) chloride] and bis[ $\mu$ -br(thiazolidine- 2-thione)(tmtp) copper(I)]. *Inorg Chim Acta*, 1992a; 197(1): 31–38
  94. Hadjikakou SK, Aslanidis P, Karagiannidis P, Aubry A, Skoulika S. Copper(I) Complexes with tri-ortho-tolylphosphine and heterocyclic thione ligands—crystal-structures of [(pyrimidine- 2-thione)(tri-ortho-tolylphosphine)copper(I) chloride] and [(pyridine- 2-thione)(tri-ortho-tolylphosphine)copper(I) iodide]. *Inorg Chim Acta*, 1992b; 193(2): 129–135
  95. Hadjikakou SK, Ozturk II, Xanthopoulou MN, Zachariadis PC, Zartilas S, Karkabounas S, Hadjiliadis N. Synthesis, structural characterization and biological study of new organotin(IV), silver(I) and antimony(III) complexes with thioamides. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2008; 102: 1007-1015.
  96. Hambidge A. Reviewing efficacy of alternative water treatment techniques. *Health Estate*, 2001; 55 (6): 23-25.
  97. Hambley TW. Metal-based therapeutics. *Science*, 2007; 318: 1392-1393
  98. Hamouda T, Myc A, Donovan B, Shih A, Reuter JD, Baker Jr JR. A novel surfactant nanoemulsion with a unique non-irritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi. *Microbiological Research*, 2000; 156: 1 -7
  99. Harrap KR, Jones M, Siracky J, Pollard LA, Kelland LR. The establishment, characterization and calibration of human ovarian carcinoma xenografts for the evaluation of novel platinum anticancer drugs. *Annals of Oncology*, 1990; 1 (1): 65-76
  100. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*, 2000; 156: 1363–1380.
  101. Hatziantoniou S and Demetzos C. Lipids of membranes: Chemistry, biological role and applications as drug carriers. *Studies in Natural Products Chemistry*, 2008; 34: 173-202

102. Highley MS, Calvert AH. Clinical Experience with Cisplatin and Carboplatin. Kelland LR, Farrell NP., Eds.; Humana Press: Totowa NJ, 2000: 89–113.
103. Horn D and Barrientos A. Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase. *IUBMB life*, 2008; 60: 421–429
104. Hotze AC, Kariuki BM, Hannon MJ. Dinuclear double-stranded metallosupramolecular ruthenium complexes: potential anticancer drugs. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006; 45 (29): 4839-4842
105. Houghton JA. Apoptosis and drug response. *Current Opinions in Oncology*, 1999 11: 475-481.
106. Huang P, Li F, Oldham EA, Keating MJ, Plunkett W. Superoxide dismutase as a target for selective killing of cancer cells. *Nature*, 2000; 407: 390-395
107. Huber F, Schmiedgen R, Schürmann M, Barbieri R, Ruisi G, Silvestri A. Mono-organotin(IV) and tin(IV) derivatives of 2-mercaptopyridine and 2-mercaptopyrimidine: X-ray structures of methyl-tris(2-pyridinethiolato)tin(IV) and phenyl-tris(2-pyridinethiolato)tin(IV)·1.5CHCl<sub>3</sub>. *Applied Organometallic Chemistry*, 1997; 11 (10-11): 869-888).
108. Humphreys SDM and Routledge PA. The toxicology of silver nitrate. *Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews*, 1998; 17 (2-3): 115-143
109. Hussain SM, Javorina AK, Schrand AM, Duhart HM, Ali SF, Schlager JJ. The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol Sci*, 2006; 92: 456–463
110. Jäckel M and Köpf-Maier P. Influence of cisplatin on cell-cycle progression in xenografted human head and neck carcinomas. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1991; 27: 464-471
111. Jakupec MA, Arion VB, Kapitza S, Reisner E, Eichinger A, Pongratz M, Marian B, Graf von Keyserlingk N, Keppler BK. KP1019 (FFC14A) from bench to bedside: preclinical and early clinical development--an overview. *International Journal of Clinical Pharmacology*, 2005; 43 (12): 595-596
112. Jakupec MA, Keppler BK. Gallium in cancer treatment. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2004; 4 (15): 1575-1583
113. Jensen GB, Smith G, Sagatys DS, Healy PC, White JM. Bis (2-pyrimidinyl) disulfide dihydrate: a redetermination. *Acta Crystallographica*, 2004; E 60: O2438–O2440



114. Jing Y, Dai J, Chalmers-Redman RM, Tatton WG, Waxman S. Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. *Blood*, 1999; 94 (6): 2102–2111
115. Kalishwaralal K, Banumathi E, Pandian SRK, Deepak V, Muniyandi J, Eom SH, Gurunathan S. Silver nanoparticles inhibit VEGF induced cell proliferation and migration in bovine retinal endothelial cells. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009; 73: 51–57
116. Karagiannidis P, Hadjikakou SK, Aslanidis P, Hountas A. Synthesis and photochemical study of Cu(I) complexes with tri-P-tolylphosphine and heterocyclic thiones—the crystal-structure of [CuCl(pymth)(p-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)<sub>3</sub>P]<sub>2</sub>. *Inorganica Chimica Acta*, 1990; 178(1): 27–34
117. Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research*, 2001; 478 (1-2): 23-43 (a)
118. Kartalou M, Essigmann JM. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutation Research*, 2001; 478 (1-2): 1-21 (b)
119. Kelland LR, Farrell NP. *Platinum-based Drugs in Cancer Therapy*; Humana Press, Totawa, New Jersey. 2000
120. Keller BC. Liposomes in nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 2001; 12: 25-31
121. Keppler BK. *Metal complexes in cancer chemotherapy*. VCH: Basel, 1993
122. Keppler BK, Friesen C, Moritz HG, Vongerichten H, Vogel E. Tumor-inhibiting bis(-diketonato) metal complexes. Budotitane, *cis*-Diethoxybis(1- phenylbutane-1,3-dionato)titanium(IV), the first transition metal complex after platinum complexes to have qualified for clinical trials. *Structure & Bonding*, 1991; 78: 97-127
123. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY, Kim YK, Lee YS, Jeong DH, Cho MH. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2007; 3 (1): 95-101
124. Kirpotin D, Park JW, Hong K, Zalipsky S, Li WL, Carter P, Benz CC, Papahadjopoulos D. Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro. *Biochemistry*, 1997; 36: 66-75.
125. Klasen HJ. A historical review of the history of silver in burns. *Burns*, 2000; 26: 117-130

126. Knapp MJ and Klinman JP. Kinetic studies of oxygen reactivity in soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry*, 2003; 42 (39): 11466-11475
127. Kone B, Kaleta M, Gullans S. Silver ion ( $\text{Ag}^+$ )-Induced increases in cell membrane  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  permeability in the renal proximal tubule: reversal by thiol reagents. *Journal of Membrane Biology*, 1988; 102: 11–19
128. Köpf-Maier P. Complexes of metals other than platinum as antitumour agents. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1994; 47: 1-16
129. Korfel A, Scheulen ME, Schmoll HJ, Gründel O, Harstrick A, Knoche M, Fels LM, Skorzec M, Bach F, Baumgart J, Sass G, Seeber S, Thiel E, Berdel WE. Phase I clinical and pharmacokinetic study of titanocene dichloride in adults with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 1998; 4 (11): 2701-2708
130. Kostrhunova H, Florian J, Novakova O, Peacock AF, Sadler PJ, Brabec V. DNA interactions of monofunctional organometallic osmium(II) antitumor complexes in cell-free media. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008; 51 (12): 3635-3643
131. Kourkoulis KN, Hadjikakou SK, Kourkoumelis N, Kubicki M, Male L, Hursthouse M, Skoulika S, Metsios AK, Tyurin VY, Dolganov AV, Milaeva ER, Hadjiliadis N. Synthesis, structural characterization and in vitro cytotoxicity of new Au(III) and Au(I) complexes with thioamides. *Dalton Transactions*, 2009; 47: 10446-10456
132. Kramer R. The pharmaceutical potential of manganese- based superoxide dismutase mimics. *Angewandte Chemie International Edition*, 2000; 39: 4469-4470
133. Kratz F, Hartmann M, Keppler B, Messori L. The binding properties of two antitumor ruthenium (III) complexes to apotransferrin. *Journal of Biological Chemistry*, 1994; 269: 2581-2588
134. Kulms D, Schwarz T. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine*, 2000; 16: 195–201
135. Kuo LY, Liu AH, Marks TJ. Metallocene interactions with DNA and DNA-processing enzymes. *Metal Ions in Biological Systems*, 1996; 33: 53-85
136. Kyros L, Kourkoumelis N, Kubicki M, Male L, Hursthouse MB, Verginadis II, Gouma E, Karkabounas S, Charalabopoulos K, Hadjikakou SK. 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*, 2010; doi: 10.1155/2010/386860

137. Landas S, Bonsib SM, Ellerbroek R, Fischer J. Argyria: Microanalytic-morphologic correlation using paraffin embedded tissue. *Ultrastructural Pathology*, 1986; 10 (2): 129-135
138. Lansdown, ABG. Physiological and toxicological changes in the skin resulting from the action and interaction of metal ions. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 1995; 25 (5): 397-462
139. Lansdown, A.B.G. Silver 2: Toxicity in mammals and how its products aid wound repair. *Journal of Wound Care*, 2002; 11 (5): 173-177
140. Lansdown ABG. Critical Observations on the neurotoxicity of silver. *Critical Reviews in Toxicology*, 2007 (a); 37 (3): 237-250
141. Lansdown ABG and Williams A. Bacterial resistance to silver in wound care and medical devices. *Journal of Wound Care*, 2007(b); 16 (1): 15–19
142. Lansdown ABG. Silver in Healthcare: it's antimicrobial efficacy and safety in use. Royal Society of Chemistry, 2010a.
143. Lansdown ABG. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2010b; 2010
144. Lansdown ABG and Williams A. How safe is silver in wound care? *Journal of Wound Care*, 2004; 13 (4): 131- 136
145. Lansdown ABG, Williams A, Chandler S, Benfield S. Silver absorption and antibacterial efficacy of silver dressings. *Journal of Wound Care*, 2005; 14 (4): 155-160.
146. Lasic DD, *Liposomes: From Physics to Applications*, Elsevier, 1993
147. Lazarou K, Bednarz B, Kubicki M, Verginadis II, Charalabopoulos K, Kourkoumelis N, Hadjidakou SK. Structural, photolysis and biological studies of the bis( $\mu$ 2)-chloro)-tris(triphenylphosphine)- di-copper(I) and chloro-tris(triphenylphosphine)-copper(I) complexes. Study of copper(I)–copper(I) interactions. *Inorganica Chimica Acta*, 2010; 363(4):763–772
148. Lebowhl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *European Journal of Cancer*, 1998; 34 (10): 1522-1534

149. Li CK, Sun RW, Kui SC, Zhu N, Che CM. Anticancer cyclometalated  $[Au(III)_m(C(\text{wedge})N(\text{wedge})C)mL]_{n+}$  compounds: Synthesis and cytotoxic properties. *Chemistry*, 2006; 12 (20): 5253-5266
150. Liasko R, Kabanos TA, Karkabounas S, Malamas M, Tasiopoulos AJ, Stefanou D, Collery P, Evangelou A. Beneficial effects of a vanadium complex with cysteine, administered at low doses on benzo(alpha)pyrene-induced leiomyosarcomas in Wistar rats. *Anticancer Research*, 1998; 18 (5A): 3609-3613
151. Lippert, B., Ed. *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*; Wiley-VCH: New York, 1999.
152. Liu JJ, Galettis P, Farr A, Maharaj L, Samarasinha H, McGechan AC, Baguley BC, Bowen RJ, Berners-Price SJ, McKeage MJ. In vitro antitumour and hepatotoxicity profiles of Au(I) and Ag(I) bidentate pyridyl phosphine complexes and relationships to cellular uptake. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2008; 102 (2): 303-310
153. Loh SY, Mistry P, Kelland LR, Abel G, Harrap KR. Reduced drug accumulation as a major mechanism of acquired resistance to cisplatin in a human ovarian carcinoma cell line: circumvention studies using novel platinum (II) and (IV) ammine/amine complexes. *British Journal of Cancer*, 1992; 66 (6): 1109–1115
154. Lokich J, Anderson N. Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. *Annals of Oncology*, 1998; 9: 13–21
155. Lucy JA and Glauert AM. Structure and assembly of macromolecular lipid complexes composed of globular micelles. *Journal of Molecular Biology*, 1964; 8 (5): 727-748
156. Lümnen G, Sperling H, Luboldt H, Otto T, Rübber H. Phase II trial of titanocene dichloride in advanced renal-cell carcinoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1998; 42 (5): 415-417
157. Macdonald JS, Astrow AB. Adjuvant therapy of colon cancer. *Seminars in Oncology*, 2001; 28(1): 30-40
158. Maeda H, Akaike T, Wu J, Noguchi Y, Sakata Y. Bradykinin and nitric oxide in infectious disease and cancer. *Immunopharmacology*, 1996; 33: 222–230.
159. Maeda H, Matsumura Y, Kato H. Purification and identification of [hydroxypropyl<sup>3</sup>]bradykinin in ascitic fluid from a patient with gastric cancer. *J Biological Chemistry*, 1988; 263: 16051–16054.

160. Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *Journal of Dental Research*, 1992; 71: 1431-1438
161. Massing U and Fuxius S. Liposomal formulations of anticancer drugs: selectivity and effectiveness. *Drug Resistance Updates*, 2000; 3: 171-177
162. Matsumura Y. and Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research*, 1986; 46: 6387–6392.
163. McCord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase, An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocytin). *Journal of Biological Chemistry*, 1969; 244: 6049–6055
164. McKeage MJ. Lobaplatin: a new antitumour platinum drug. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2001; 10 (1): 119-128
165. McKeage M, Berners-Price S, Galettis P, Bowen R, Brouwer W, Ding L, Zhuang L, Baguley BC. Role of lipophilicity in determining cellular uptake and antitumour activity of gold phosphine complexes. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2000; 46: 343-350
166. McKeage MJ, Maharaj L, Berners-Price SJ. Mechanisms of cytotoxicity and antitumor activity of gold(I) phosphine complexes: the possible role of mitochondria. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002; 232: 127–135
167. Meléndez E. Titanium complexes in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, 2002; 42 (3): 309-315
168. Melov S, Ravenscroft J, Malic S, Gill MS, Walker DW, Clayton PE, Wallace DC, Malfroy B, Doctrow SR, Lithgow GJ. Extension of life span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science*, 2000; 289: 1567-1569
169. Metsios A, Verginadis I, Simos I, Batistatou A, Peschos D, Ragos V, Vezyraki P, Evangelou A, Karkabounas S. 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*, 2012; 47: 490-496
170. Miller SE, House DA. The hydrolysis products of cis-diamminedi-chloroplatinum(II) 5. The anation kinetics of *cis*-Pt(X)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sup>+</sup>(X=Cl, OH) with glycine, monohydrogen malonate and chloride. *Inorganica Chimica Acta*, 1991; 187: 125-132
171. Miller WH Jr, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Research*, 2002; 62: 3893–3903

172. Mirsattari SM, Hammond AR, Sharpe MD, Leung FY, Young GB. Myoclonic status epilepticus following repeated oral ingestion of colloidal silver. *Neurology*, 2004; 62 (8): 1408-1410
173. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *Journal of Immunological methods*, 1983; 65 (1-2): 55-63
174. Mozafari MR and Mortazavi SM. *Nanoliposomes: From fundamentals to recent developments*. Trafford Publishing, UK, 2005
175. Mueller S, Schittenhelm M, Honecker F, Malenke E, Lauber K, Wesselborg S, Hartmann JT, Bokemeyer C, Mayer F. Cell-cycle progression and response of germ cell tumors to cisplatin in vitro. *International Journal of Oncology*, 2006; 29 (2): 471-479
176. Nadworny PL, Wang J, Tredget EE, Burrell RE. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2008; 4 (3): 241–251
177. Nafisi S, Norouzi Z. A comparative study on the interaction of cis- and trans-platin with DNA and RNA. *DNA and Cell Biology*, 2009; 28 (9): 469-477
178. Nath M, Pokharia S, Yadav R. Organotin(IV) complexes of amino acids and peptides. *Coordination chemistry Reviews*, 2001; 215 (1): 99-149
179. Navarro A and Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2007; 292: 670–686
180. Noguchi Y, Wu J, Duncan R, Strohaln J, Ulbrich K, Akaike T, Maeda H. Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Japanese Journal of Cancer Research*, 1998; 89: 307–314
181. Novick SC, Warrell RP Jr. Arsenicals in hematologic cancers. *Seminars in Oncology*, 2000; 27: 495-501
182. O'Dwyer, P. J.; Johnson, S. W.; Hamilton, T. C. Cisplatin and Its Analogues. In *Cancer Principles and Practice of Oncology* 5th ed. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Lippincott-Raven: Philadelphia, 1997; 2: 418–431.
183. O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Johnson SW. Clinical Status of Cisplatin, Carboplatin, and Other Platinum-based Antitumor Drugs. In *Cisplatin: Chemistry and*

- Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*; Lippert, B., Ed.; Wiley-VCH: New York, 1999: 31–72
184. Ota K. [Nedaplatin] (in Japanese). *Gan to Kagaku Ryoho*, 1996; 23 (3): 379-387
  185. Papahadjopoulos D, Allen T M, Gabizons A, Mayhew E, Matthay K, Huang SK, Lee D, Woodle MC, Lasic DD, Redemann C, Martin FJ. Sterically stabilized liposomes: Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proceedings of National Academy of Science, USA*, 1991; 88: 11460-11464
  186. Papahadjopoulos D and Watkins JC. Phospholipid model membranes. II. Permeability properties of hydrated liquid crystals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1967; 135 (4): 639-952
  187. Pariser RJ. Generalised argyria: clinicopathologic features and histochemical studies. *Archives of Dermatology*, 1978; 114 (3): 373-377
  188. Paula MMS, Costa CS, Baldin MC, Scaini G, Rezin GT, Segala K, Andrade VM, Franco CV, Streck EL. In vitro effect of silver nanoparticles on creatine kinase activity. *Journal of the Brazilian Chemistry Society*, 2009; 20 (8): 1556–1560
  189. Peacock AF, Habtemariam A, Fernández R, Walland V, Fabbiani FP, Parsons S, Aird RE, Jodrell DI, Sadler PJ. Tuning the reactivity of osmium(II) and ruthenium(II) arene complexes under physiological conditions. *Journal of American Chemistry Society*, 2006; 128 (5): 1739-1748
  190. Peacock AF, Parsons S, Sadler PJ. Tuning the hydrolytic aqueous chemistry of osmium arene complexes with N,O-chelating ligands to achieve cancer cell cytotoxicity. *Journal of American Chemistry Society*, 2007; 129 (11): 3348-3357
  191. Peacock AFA and Sadler PJ. Medicinal organometallic chemistry: designing metal arene complexes as anticancer agents. *Chemistry-an Asian Journal*, 2008; 3: 1890–1899
  192. Pellerito L, Nagy L. Organotin(IV)<sup>n+</sup> complexes formed with biologically active ligands: equilibrium and structural studies, and some biological aspects. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002; 224: 111-150
  193. Pelley RJ. Oxaliplatin: a new agent for colorectal cancer. *Current Oncology Reports*, 2001; 3: 147-155
  194. Perez RP. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *European Journal of Cancer*, 1998; 34: 1535-1542

195. Peyrone M. Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür. *Annalen der Chemie und Pharmacie*, 1844; 51 (1): 1-29
196. Pieper T, Borsky K, Keppler BK. Non-platinum Antitumor Compounds; In *Metallopharmaceuticals I: DNA Interactions*, Clarke MJ, Sadler PJ, Eds.; Springer-Verlag: Berlin, 1999; 1: 171–199
197. Piver WT. Organotin compounds: Industrial applications and biological investigation. *Environmental Health Perspective*, 1973; 4: 61-80
198. Powis G and Kirkpatrick DL. Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 2007; 7: 392–397
199. Poyraz M, Banti CN, Kourkoumelis N, Dorokou V, Manos MJ, Simčić M, Golič-Grdadolnik S, Mavromoustakos T, Giannoulis AD, Verginadis II, Charalabopoulos K, Hadjikakou SK. Synthesis, structural characterization and biological studies of novel mixed ligand Ag(I) complexes with triphenylphosphine and aspirin or salicylic acid. *Inorganica Chimica Acta*, 2011; 375: 114-121
200. Rademaker-Lakhai JM, van den Bongard D, Pluim D, Beijnen JH, Schellens JH. A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. *Clinical Cancer Research*, 2004; 10 (11): 3717-3727
201. Rangachari PK and Matthews J. Effect of Ag<sup>+</sup> on isolated bullfrog gastric mucosa. *American Journal of Physiology*, 1985; 248: 443–449
202. Rex A, Schickert R, Fink H. Antidepressant-like effect of nicotinamide adenine dinucleotide in the forced swim test in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 2004; 77: 303–307
203. Reynolds JEF. Ed., *Martindale the Extra Pharmacopoeia*, 31<sup>st</sup> ed; The Royal Pharmaceutical Society; London, 1996
204. Riaz M. Liposomes Preparation Methods. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1996; 19 (1): 65-77
205. Rosenberg B, Van Camp L, Grimley EB, Thomson AJ. The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum (IV) complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 1967; 242 (6): 1347-1352
206. Rosenberg B, Van Camp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, 1969; 222 (5191): 385-386



207. Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 1965; 205: 698-699
208. Ruley HE. p53 and response to chemotherapy and radiotherapy. *Important Advances in Oncology*. 1996; 37-56
209. Russell AD and W. B. Hugo WB. Antimicrobial activity and action of silver. *Progress in Medicinal Chemistry*, 1994; 31: 351-370
210. Rust DM, Soignet SL. Risk/benefit profile of arsenic trioxide. *Oncologist*, 2001; 6 (2): 29-32
211. Rutberg FG, Dubina MV, Kolikov VA, Moiseenko FV, Ignat'eva EV, Volkov NM, Snetov VN, Stogov AYu. Effect of silver oxide nanoparticles on tumor growth in vivo. *Dokl Biochem Biophys*. 2008; 421: 191-193
212. Sadler PJ, Muncle C, Shipman MA. Chapter VII-Metals in medicine. In *Biological Inorganic Chemistry: Structure and Reactivity*. University Science Books, 2007; 95-135
213. Saggioro D, Rigobello MP, Paloschi L, Folda A, Moggach SA, Parsons S, Ronconi L, Fregona D, Bindoli A. Gold(III)-dithiocarbamate complexes induce cancer cell death triggered by thioredoxin redox system inhibition and activation of ERK pathway. *Chemistry & Biology*, 2007; 14 (10): 1128-1139
214. Salvemini D, Wang ZQ, Zweier JL, Samouilov A, Macarthur H, Misko TP, Currie MG, Cuzzocrea S, Sikorski JA, Riley DP. A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. *Science*, 1999; 286: 304-306
215. Samuelsson B, SE Dahlen, JA Lindgren, CA Rouzer, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis and biological effects. *Science*, 1987; 237: 1171-1176
216. Sapra P and Allen TM. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Progress in Lipid Research*, 2003; 42: 439-462.
217. Sava G, Alessio E, Bergamo A, Mestroni G. Sulfoxide Ruthenium Complexes: Non Toxic Tools for the Selective Treatment of Solid Tumor Metastases; In *Metallopharmaceuticals I: DNA Interactions*, Clarke MJ and Sadler PJ, Ed.; Springer-Verlag: Berlin, 1999; 1: 143-170
218. Savarese A and Cognetti F. New drugs in the treatment of recurrent or metastatic cervical cancer. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, 2003; 48: 323-327.

219. Saxena AK and Huber F. Organotin Compounds and Cancer Chemotherapy. *Coordination Chemistry Reviews*, 1989; 95: 109-123
220. Schilling T, Keppler KB, Heim ME, Niebch G, Dietzfelbinger H, Rastetter J, Hanauske AR. Clinical phase I and pharmacokinetic trial of the new titanium complex budotitane. *Investigational New Drugs*, 1996; 13 (4): 327-332
221. Schmiedgen R, Huber F, Silvestri A, Ruisi G, Rossi M, Barbieri R. Diorganotin (IV)-2-mercaptopyrimidine complexes. *Applied Organometallic Chemistry*, 1998; 12: 861-871.
222. Sekiguchi I, Suzuki M, Tamada T, Shinomiya N, Tsuru S, Murata M. Effects of cisplatin on cell cycle kinetics, morphological change, and cleavage pattern of DNA in two human ovarian carcinoma cell lines. *Oncology*, 1996; 53 (1): 19-26
223. Sessler JL, Doctrow SR, McMurry TJ, Lippard SJ. *Medicinal Inorganic Chemistry (ACS Symposium Series)*. CAPLUS, 2005; 903: 453
224. Seymour L W, Miyamoto Y, Maeda H, Brereton M, Strohalm J, Ulbrich K, Duncan R. Influence of molecular weight on passive tumour accumulation of a soluble macromolecular drug carrier. *European Journal of Cancer*, 1995; 31A: 766-770
225. Shaw CF. Gold-based therapeutic agents. *Chemistry Reviews*, 1999; 99: 2589-2600
226. Sheikpranbabu S, Kalishwaralal K, Lee KJ, Vaidyanathan R, Eom SH, Gurunathan S. The inhibition of advanced glycation end-products-induced retinal vascular permeability by silver nanoparticles. *Biomaterials*, 2010; 31: 1318-1329
227. Sheikpranbabu S, Kalishwaralal K, Venkataraman D, Eom SH, Park J, Gurunathan S. Silver nanoparticles inhibit VEGF-and IL-1-induced vascular permeability via Src dependent pathway in porcine retinal endothelial cells. *Journal of Nanobiotechnology*, 2009; 7: 8.
228. Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu QY, Zhu J, Tang W, Sun GL, Yang KQ, Chen Y, Zhou L, Fang ZW, Wang YT, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Chen SJ, Chen Z, Wang ZY. Use of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelotic leukemia (APL):II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood*, 1997; 89 (9): 3354-3360
229. Sherman SE, Gibson D, Wang AH, Lippard SJ. X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(d(pGpG))]. *Science*, 1985; 230 (4724): 412-417

230. Silver S and Phung LT. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual Reviews in Microbiology*, 1996; 50: 753-789
231. Simmons CJ, Lundeen M, Seff K. Centric organic disulfide (C-S-S-C = 180-degrees)—crystal and molecular-structures of chloro[bis(2-pyrimidyl) disulfide]copper(I) monohydrate and of bis-(2-pyrimidyl) disulfide. *Inorg Chem*, 1979; 18(12): 3444–3452
232. Smith PJ. *Chemistry of Tin*. Blackie Academic & Professional an imprint of Thomson Science, London, 1998
233. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004; 275: 177-182
234. Sriram MI, Kanth SB, Kalishwaralal K, Gurunathan S. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. *Int J Nanomedicine*, 2010; 5: 753-762.
235. Storr T, Thompson KH, Orvig Ch. Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry. *Chemical Society Reviews*, 2006; 35: 534-544
236. Sudmann E, Vik H, Rait M, Todnem K, Andersen KJ, Julsham K, Flesland O, Runqby J. Systemic and local silver accumulation after total hip replacement using silverimpregnated bone cement. *Medical Progress through Technology*, 1994; 20 (3-4): 179–184
237. Sun H, Li H, Weir RA, Sadler PJ. The first specific TiIV-protein complex: potential relevance to anticancer activity of titanocenes. *Angewandte Chemie International Edition (English)*, 1998; 37: 1577–1579
238. Szoka F and Papahadjopoulos D. A new procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1978; 75 (9): 4194-4198
239. Thati B, Noble A, Creaven BS, Walsh M, McCann M, Kavanagh K, Devereux M, Egan DA. A study of the role of apoptotic cell death and cell cycle events mediating the mechanism of action of 6-hydroxycoumarin-3-carboxylatosilver in human malignant hepatic cells. *Cancer Letters*, 2007; 250: 128-139
240. Tiekink ER. Gold derivatives for the treatment of cancer. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, 2002; 42 (3): 255-248

241. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews*, 2005; 4: 145-160
242. Urig S, Fritz-Wolf K, Réau R, Herold-Mende C, Tóth K, Davioud-Charvet E, Becker K. Undressing of phosphine gold(I) complexes as irreversible inhibitors of human disulfide reductases. *Angewandte Chemie International Edition (English)*, 2006; 45 (12): 1881-1886
243. van de Kerk GJM. Organotin compounds. In Zuckerman JJ (Ed.), *American Chemical Washington, DC*, 1976; 1
244. van Rijt SH, Peacock AF, Johnstone RD, Parsons S, Sadler PJ. Organometallic osmium(II) arene anticancer complexes containing picolinate derivatives. *Inorganic Chemistry*, 2009; 48 (4): 1753-1762
245. van Rijt SH and Sadler PJ. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discovery Today*, 2009; 14 (23/24): 1089-1097
246. Velalopoulou A, Batsala GK, Kourkoumelis N, Karkabounas S, Evangelou A, Hadjikakou SK. Photo-activated metallotherapeutics: copper(I) or silver(I) mixed ligand complexes with 2-mercaptopyrimidine and triphenylphosphine. *Medical Chemistry Research*, 2012; 10.1007/s00044-012-0219-3
247. Vik H, Andersen KJ, Juhlshamn K, Todnem K. Neuropathy caused by silver absorption from arthroplasty cement. *Lancet*, 1985; 1 (8433): 872
248. Von Nägeli K. On the oligodynamic phenomenon in living cells. *Denkschriften der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft*, 1893; 33 (1): 174–182
249. Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the ‘phosphocreatine circuit’ for cellular energy homeostasis. *Biochemical Journal*, 1992; 281 (1): 21-40
250. Wan AT, Conyers RAJ, Coombs CJ, Masterton, JP. Determination of silver in blood, urine and tissues of volunteers and burn patients. *Clinical Chemistry*, 1991; 37: 1683-1687
251. Wang D and Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005; 4: 307–320
252. Waxman S, Anderson KC. History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy. *Oncologist*. 2001; 6: 3-10

253. Weiss R B, Christian MC. New cisplatin analogues in development. A review. *Drugs*, 1993; 46: 360-377
254. Weiss R, Riley D. Therapeutic Aspects of Manganese(II)-based Superoxide Dismutase Mimics; In *Uses of Inorganic Chemistry in Medicine*, Farrell N, Ed.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1999; 77–92
255. Welink J, Boven E, Vermorken JB, Gall HE, van der Vijgh WJF. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lobaplatin (D-19466) in patients with advanced solid tumors, including patients with impaired renal or liver function. *Clinical Cancer Research*, 1999; 5: 2349-2358
256. White RJ. A historical review of silver in wound management. *British Journal of Nursing*, 1999; S3–S8
257. Wong E, Giandomenico CM. Current status of platinum-based antitumour drugs. *Chemical Reviews*, 1999; 99: 2451–2466
258. Woollins JD, Woolins A, Rosenberg B. The detection of trace amounts of *trans*-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in the presence of *cis*-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A high performance liquid chromatographic application of kurnakow's test. *Polyhedron*, 1983; 2 (3): 175-178
259. Wright JB, Lam K, Buret AG, Olson ME, Burrell RE. Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing. *Wound Repair and Regeneration*, 2002; 10 (3): 141–151
260. Wu K and Bonavida B. The activated NF-kappaB-Snail-RKIP circuitry in cancer regulates both the metastatic cascade and resistance to apoptosis by cytotoxic drugs. *Critical Reviews in Immunology*, 2009; 29: 241-254.
261. Wu J, Akaike T, Maeda H. Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger. *Cancer Research*, 1998; 58: 159–165
262. Xanthopoulou MN, Hadjikakou SK, Hadgiliadis N, Milaeva ER, Gracheva JA, Tyurin VY, Kourkoumelis N, Christoforidis KC, Metsios AK, Karkabounas S, Charalabopoulos K. Biological studies of new organotin(IV) complexes of thioamide ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2008; 43: 327-335.
263. Xanthopoulou MN, Hadjikakou SK, Hadjiliadis N, Schürmann M, Jurkschat K, Michaelides A, Skoulika S, Bakas Th, Binolis J, Karkabounas S, Charalabopoulos K. Synthesis, structural characterization and in vitro cytotoxicity of organotin(IV)

- derivatives of heterocyclic thioamides, 2-mercaptobenzothiazole, 5-chloro-2-mercaptobenzothiazole, 3-methyl-2-mercaptobenzothiazole and 2-mercaptonicotinic acid. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2003; 96: 425-434
264. Yacobi NR, Phuleria HC, Demaio L, Liang CH, Peng C, Sioutas C, Borok Z, Kim K, Crandall ED. Nanoparticle effects on rat alveolar epithelial cell monolayer barrier properties. *Toxicology In Vitro*, 2007; 21: 1373–1381
265. Yasutake H, Tsuchiya H, Tomita K, Matsunaga T, Nikaido O, Mori T. Inhibitory effect of caffeine on potentially lethal damage repair in cisplatin-treated human osteosarcoma cells. *Anticancer Research*, 1995; 15(3): 831-837
266. Yuan F, Leuning M, Huang SK, Berk DA, Papahadjopoulos D, Jain RK. Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (Stealth) liposomes in human tumor xenograft. *Cancer Research*, 1994; 54: 3352-3356
267. Yuan F, Salehi HA, Boucher Y, Vasthare US, Tuma RF, Jain RK. Vascular permeability and microcirculation of gliomas and mammary carcinomas transplanted in rat and mouse cranial windows. *Cancer Research* 1994; 54: 4564–4568.
268. Zartilas S, Hadjikakou SK, Hadjiliadis N, Kourkoumelis N, Kyros L, Kubicki M, Baril M, Butler IS, Karkabounas S, Balzarini J. Tetrameric 1:1 and monomeric 1:3 complexes of silver(I) halides with tri(*p*-tolyl)-phosphine: A structural and biological study. *Inorganica Chimica Acta*, 2009; 362: 1003-1010.
269. Zhao M, Clarke MJ. Trans-Pyridine Tetraammine Complexes of Ru<sup>II</sup> and Ru<sup>III</sup> with N7-Coordinated Purine Nucleosides. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 1999; 4: 318-324
270. Zhao G and Stevens Jr SE. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *Biometals*, 1998; 11: 27 - 32.
271. Γεωργόπουλος Α και Δεμέτζος Κ. *Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία*. *Φαρμακευτική*, 2005; 18: 1-11.
272. Δημόπουλος ΦΔ, *Φωτοτεχνία-Ηλεκτρικά Συσκευαί*. 1973; σελ. 162, 166-168
273. Οικονομόπουλος ΙΑ, *Θεωρητική και Εφαρμοσμένη Φωτοτεχνία*. 1975; σελ. 71-75, 97-125

#### ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

1. <http://nano.cancer.gov>

## ***9. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ***





Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχει παρουσιαστεί σε 2 εθνικά συνέδρια:

*«Εγκλωβισμός, ανάπτυξη και χαρακτηρισμός λιποσωμιακών νανοσυστημάτων μεταφοράς συμπλόκου Ag (I) και μελέτη της κυτταροτοξικότητας τους in vitro».*

**Καραγκούνης Β. Ηλίας**<sup>1,2</sup>, Μουρελάτου Α. Έλενα<sup>2</sup>, Παλαιολόγος Κ. Ευάγγελος<sup>1,3</sup>, Χατζηκακού Κ. Σωτήριος<sup>4</sup>, Καρκαμπούνας Χρ. Σπυρίδων<sup>1</sup>, Ευαγγέλου Μ. Άγγελος<sup>1</sup>, Δεμέτζος Ν. Κωνσταντίνος<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας

<sup>2</sup>Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας

<sup>3</sup>Γενικό Χημείο του Κράτους – Χημική Υπηρεσία Ιωαννίνων

<sup>4</sup>Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας, Τομέας Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας

9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου και Στοχευμένης Θεραπείας, 29/11-1/12 2012, Crown Plaza Hotel, Αθήνα

*«Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης νέων συμπλόκων ενώσεων αργύρου (I) και της στοχευμένης φωτοενεργοποιούμενης κυτταροτοξικής τους δράσης με ακτινοβολία UVC».*

**Καραγκούνης Η.Β.**<sup>α</sup>, Μπάτσαλα Γ.Κ.<sup>β</sup>, Ευαγγέλου Α.Μ.<sup>α</sup>, Καρκαμπούνας Σπ.Χρ.<sup>α</sup>, Χατζηκακού Σ.Κ.<sup>β</sup>

<sup>α</sup> Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Παν/μιο Ιωαννίνων

<sup>β</sup> Τομέας Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Παν/μιο Ιωαννίνων

8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου και Στοχευμένης Θεραπείας, 25-27 Νοεμβρίου 2010, Crown Plaza Hotel, Αθήνα και 28 Νοεμβρίου, Διεθνές Κέντρο Αντικαρκινικής Έρευνας

