



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

*" Αντικαρκινικές ιδιότητες σύμπλοκων ενώσεων μεταλλικών ιόντων σε  
χημικά και βιολογικά μοντέλα "*

**Χριστίνα Ν. Μπαντή**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014**









**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

*" Αντικαρκινικές ιδιότητες σύμπλοκων ενώσεων μεταλλικών ιόντων σε  
χημικά και βιολογικά μοντέλα "*

**Χριστίνα Ν. Μπαντή**  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014



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





**Ημερομηνία αίτησης της κ. Μπαντή Χριστίνας:** 14-10-2009

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 672<sup>α</sup>/1-12-2009

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Χαραλαμπίδης Κωνσταντίνος Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κλινική – Λειτουργική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

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

Μπατιστάτου Άννα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 17-1-2010

*«Αντικαρκινικές ιδιότητες συμπλόκων ενώσεων μεταλλικών ιόντων σε χημικά και βιολογικά μοντέλα»*

**Ημερομηνία ανασυγκρότησης της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 695<sup>α</sup>/2-11-2010

Επιβλέπων

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

Μέλη

Χαραλαμπίδης Κωνσταντίνος Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης

Μπατιστάτου Άννα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ** : 763<sup>α</sup>/10-4-2014

<b>Ευαγγέλου Άγγελος</b>	Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Καλφακάκου Βασιλική</b>	Καθηγήτρια Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μπατιστάτου Άννα</b>	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Περλεπές Σπυρίδων</b>	Καθηγητής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών
<b>Χαραλαμπίδης Κωνσταντίνος</b>	Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης



**Χατζηκακού Σωτήριος** Καθηγητής Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας του  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Κουρκουμέλης Νικόλαος** Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής του Τμήματος Ιατρικής  
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 12-6-2014

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Ανδρέας Φωτόπουλος**  
Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής

**Η Γραμματέας του Τμήματος**



**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΤΟΠΟΥΛΟΥ**



Στους γονείς μου



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Α. Ευαγγέλου, Καθηγητή Φυσιολογίας του εργαστήριου της Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων επιβλέποντα της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ, τον κ. Κ. Χαραλαμπίδου, Καθηγητή Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θράκης για τις παρατηρήσεις του καθόλη την διάρκεια της διδακτορικής διατριβής ως επιβλέπων αρχικά και ως συνεπιβλέπων της διατριβής στην συνέχεια, καθώς μέχρι την εκλογή του στην Ιατρική Σχολή της Θράκης και την μετακίνηση του από τα Ιωάννινα, ήταν επιβλέπων της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ την κ. Α. Μπατιστάτου, Καθηγήτρια της Παθολογικής Ανατομίας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την μελέτη των παθολογοανατομικών δειγμάτων.

Επίσης, ευχαριστώ το εργαστήριο της Φυσιολογίας και τα μέλη αυτού που ασχολούνται με το συγκεκριμένο ερευνητικό πεδίο, (κ. Βεζυράκη, κ. Ευαγγέλου, κ. Καλφακάκου, κ. Κιόρτση, κ. Καρκαμπούνα, κ. Κωλέττα. Κ. Πέσχο, κ. Χαραλαμπίδου κα) για την συνεργασία τους.

Ευχαριστώ τον κ. Σ. Χατζηκακού, Καθηγητή Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την καθοδήγηση. Στο Εργαστήριο της Βιοανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν τα σύμπλοκα. Πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα της ηλεκτροφόρησης του DNA, μέρος της κυτταροστατικής μελέτης, τα πειράματα αναστολής της λιποξυγενάσης και τα πειράματα πρόσδεσης των συμπλόκων στο DNA.

Ευχαριστώ τον κ. Ν. Κουρκουμέλη, Επίκουρο Καθηγητή της Πυρηνικής Φυσικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την συνεργασία και την πραγματοποίηση των θεωρητικών υπολογισμών της λιποξυγενάσης και του DNA.

Ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, κ. Σ. Περλεπέ, Καθηγητή Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών και την κ. Β. Καλφακάκου, Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ευχαριστώ όλους τους συνεργάτες στο Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας στο Τμήμα Χημείας για το ευχάριστο κλίμα και την συνεργασία τους σε όλη την διάρκεια των τεσσάρων χρόνων.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου, για την στήριξη σε ψυχολογικό και οικονομικό επίπεδο σε όλο το χρονικό διάστημα.



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1. Καρκίνος.....	11
1.1.1. Χημειοθεραπεία (αντικαρκινικά φάρμακα).....	12
1.1.3. Ακτινοθεραπεία .....	17
1.1.4. Ανοσοθεραπεία ή θεραπεία με αντισώματα .....	19
1.1.5. Ορμονική θεραπεία.....	20
1.1.6. Γονιδιακή θεραπεία .....	21
1.2. Κυτταροκαλλιέργειες .....	22
1.3. Πειραματόζωα .....	24
1.4. Τοξικότητα .....	25
1.4.1. Οξεία τοξικότητα.....	25
1.4.2. Υποχρόνια τοξικότητα.....	26
1.5. Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος.....	26
1.5.1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά απόπτωσης .....	27
1.5.2. Μηχανισμοί της απόπτωσης.....	28
1.5.3. Βιοχημικά χαρακτηριστικά.....	30
1.5.4. Εξωγενές (extrinsic) ή οδός υποδοχέων θανάτου (death receptor pathway) .....	32
1.5.5. Αποπτωτική οδός περφορίνης/granzyme .....	34
1.5.6. Ενδογενές μονοπάτι.....	35
1.6. Νέκρωση.....	37
1.7. Αλληλεπίδραση μεταλλικών συμπλόκων με το DNA.....	38
1.8. Αλληλεπίδραση με λιποξυγενάση .....	41
1.9. Φλεγμονή και καρκινογένεση .....	43
1.10. Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs) .....	44
1.10.1. Μηχανισμός δράσης NSAIDs .....	46
1.10.2. Φαρμακοκινητική των NSAIDs .....	47
1.10.3. Καρκίνος και NSAIDs.....	48
1.11. Βιοανόργανη Χημεία -Μεταλλοθεραπευτικά .....	49
1.12. Χρήση και εφαρμογή των μετάλλων στην ιατρική .....	50
1.12.1. Μεταλλικά ιόντα σε ασθένειες. Χρήση χηλικών παραγόντων.....	50

1.12.2. Μεταλλοπρωτεΐνες ως στόχοι φαρμάκου.....	50
1.12.3. Τα κυτταρικά οργανίδια στόχοι των μετάλλων.....	50
1.12.4. Αλληλεπίδραση μετάλλου-φαρμάκου .....	51
1.12.5. Μεταλλοθεραπευτικά φάρμακα .....	51
1.12.6. Ραδιοϊσότοπα στην ιατρική .....	52
1.13. Ιατρικές Εφαρμογές Αργύρου .....	53
1.14. Μεταλλοθεραπευτικά Σύμπλοκα Αργύρου(I).....	54
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	57
3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	59
3.1. Συνθήκες Καλλιέργειας.....	59
3.2. Ανα-καλλιέργεια κυττάρων .....	59
3.3. Κρυσυντήρηση κυττάρων σε υγρό άζωτο .....	61
3.4. DMSO.....	62
3.5. Μέθοδος MTT - Μέθοδος μέτρησης κυτταρικής ανάπτυξης (cell growth proliferation) 63	
3.5.1. Αρχή Μεθόδου .....	63
3.5.2. Πειραματική Διαδικασία MTT assay .....	64
3.6. Μέθοδος Trypan Blue - Μέθοδος μέτρησης κυτταρικής βιωσιμότητας (cell viability) ..	65
3.6.1. Αρχή Μεθόδου .....	65
3.6.2. Πειραματική Διαδικασία Trypan Blue assay .....	65
3.7. Μορφολογία LMS κυττάρων .....	66
3.8. Κυτταρομετρία Ροής .....	67
3.8.1. Αρχή Μεθόδου .....	67
3.8.2. Μέθοδος Annexin V για τον προσδιορισμό της απόπτωσης.....	67
3.8.3. Πειραματική Διαδικασία μεθόδου Annexin V για τον προσδιορισμό της απόπτωσης.....	69
3.9. Ηλεκτροφόρηση DNA.....	71
3.9.1. Αρχή Μεθόδου .....	71
3.9.2. Πειραματική Διαδικασία Ηλεκτροφόρησης DNA .....	72
3.9.3. Παρασκευή πηκτώματος αгарόζης.....	73
3.9.4. Παρασκευή διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης .....	74
3.10. Γενικές αρχές λειτουργίας φασματοφωτόμετρου ορατού-υπεριώδους.....	75
3.11. Μελέτη αναστολής της λιποξυγενάσης.....	76
3.11.1. Διαδικασία .....	76

3.12. Μελέτη αλληλεπίδρασης συμπλόκων 1-3 με το DNA.....	76
3.12.1. Διαδικασία.....	76
3.13. Πειράματα in vivo-Μελέτη τοξικότητας σε επίμυες Wistar Rat.....	77
3.13.1. Οξεία τοξικότητα.....	77
3.13.2. Υποχρόνια τοξικότητα.....	78
3.14. Καρκινογένεση σε επίμυες Wistar Rat.....	79
3.14.1. Παθολογοανατομική εξέταση.....	80
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	81
4.1. Μελέτη Συμπλόκων.....	81
4.1.1. Δομή συμπλόκων.....	82
4.1.2. Δημιουργία Δεσμών Υδρογόνου.....	84
4.1.3. Σταθερότητα συμπλόκων.....	86
4.2. Αποτελέσματα από την μέθοδο MTT.....	88
4.3. Αποτελέσματα από την Μέθοδο Trypan Blue.....	90
4.4. Αποτελέσματα Μορφολογίας LMS Κυττάρων.....	96
4.5. Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής.....	98
4.6. Αποτελέσματα Ηλεκτροφόρησης DNA.....	101
4.7. Αποτελέσματα αναστολής της λιποξυγενάσης LOX από τα σύμπλοκα 1-3.....	103
4.8. Θεωρητικοί υπολογισμοί πρόσδεσης της LOX στα σύμπλοκα 1-3.....	110
4.9. Αποτελέσματα για την αλληλεπίδραση των συμπλόκων 1-3 με το DNA.....	111
4.10. Θεωρητικοί υπολογισμοί πρόσδεσης των συμπλόκων 1-3 με το DNA.....	117
4.11. Αποτελέσματα τοξικότητας in vivo.....	118
4.12. Υποχρόνια τοξικότητα.....	127
4.13. Αποτελέσματα καρκινογένεσης σε Wistar Rat.....	132
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	145
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	151
7. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ.....	157
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	163



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

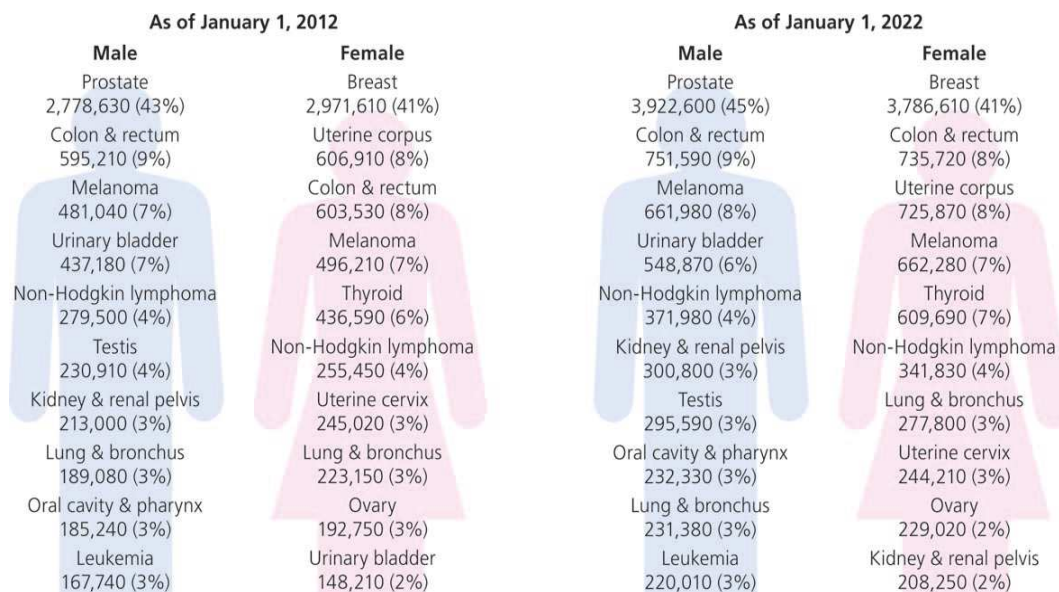
Ag-SD= Silver sulfadiazine
A-498= Ανθρώπινο καρκίνωμα του ήπατος
AIF= Apoptosis Inducing Factor
Apaf-1= Apoptotic protease activating factor
aspH= o-acetylsalicylic acid-ασπιρίνη
Bax= Bcl-2-associated X protein
Bcl-2= B-cell lymphoma protein 2
BGC= Γαστρικό καρκίνωμα
CAD= Caspase-Activated DNase
Cal-27= Πλακώδες καρκίνωμα της γλώσσας
c-FLIP= FLICE-inhibitory protein
CHANG= Φυσιολογικά ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα
CNE= Ρινοκαρκίνωμα
COX= Κυκλοξυγενάση
cpdH <sub>2</sub> = Cyclopentane-1,1-dicarboxylic acid
DISC= Death-inducing signaling complex
DMEM= Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO= Διμέθυλ-σουλφοξείδιο
DR3= Death receptor 3
DR4= Death receptor 4
DR5= Death receptor 5
DR6= Death receptor 6
FADD= Fas-associated death domain protein
FAS= Υποδοχέα θανάτου
FasL= Fatty acid synthetase ligand
FasR= Acid synthetase receptor
fbcH= 4-fluorobenzoic acid
FBS= Fetal bovine serum, βοδινός ορός
HeLa= Αδενοκαρκίνωμα μήτρας
HepG2= Καρκίνωμα ηπατοκυττάρων
HK-2= Proximal tubular cells
IC <sub>50</sub> = Τιμή αναστολής του 50% της ανάπτυξης των κυττάρων
ICAD= Inhibitor of Caspase Activated DNase
idcH <sub>2</sub> = Iminodiacetic acid
L-02= Φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα ήπατος
LD <sub>50</sub> = Μέση θανατηφόρα δόση
LOX= Λιποξυγενάση
malH <sub>2</sub> = Μαλονικό οξύ
MCF-7= Μαστικά καρκινικά κύτταρα

MRC-5= Υγιείς ινοβλάστες
NIH3T3= Υγιείς ινοβλάστες επίμυων
NSAIDs= Μη στεροειδή, αντι-φλεγμονώδη φάρμακα
PARP= Poly-ADP-ribose-polymerase
PBS= Phosphate buffered saline, αλατούχο διάλυμα φωσφορικών
p-HbzaH= 4-hydroxybenzoic Acid-παρα-βενζοϊκό οξύ
phen= 1,10-φenaφρολίνη
PI= Propidium iodide
RIP= Receptor-interacting protein
ROM= Reactive oxygen metabolites
ROS= Reactive oxygen species
tBid= Πρωτεΐνη Bid
TNFR1= Tumor necrosis factor receptor 1
TNF- $\alpha$ = Tumor necrosis factor-alpha
tpp= Triphenylphosphine-τριφαινυλο-φωσφίνη
TRADD= TNF receptor-associated death domain
TNR1= Tumor necrosis factor receptor 1
95-D= Καρκίνωμα του πνεύμονα

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι η πρώτη αιτία θανάτου στις αναπτυγμένες χώρες και η δεύτερη στις αναπτυσσόμενες (Jemal A. et al 2011). Περίπου 12.7 εκατομμύρια περιπτώσεις καρκίνου και 7.6 εκατομμύρια θάνατοι έχει εκτιμηθεί ότι συνέβησαν το 2008 παγκοσμίως (Jemal A. et al 2011). Οι τρεις κυρίαρχοι καρκίνοι στους άντρες είναι ο καρκίνος του προστάτη (43%), του εντέρου (9%) και το μελάνωμα σε ποσοστό (7%) (Siegel R. et al 2012). Στις γυναίκες τα ποσοστά αλλάζουν, πρώτος είναι ο καρκίνος του μαστού (41%), της μήτρας (8%) και του παχέος εντέρου (8%) (Siegel R. et al 2012).



Εικόνα 1: Ποσοστά εμφάνισης καρκίνου για το 2012 και οι εκτιμήσεις για το 2022 στα δύο φύλα, στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (Siegel R. et al 2012)

Η Εικόνα 1 παρουσιάζει τα ποσοστά εμφάνισης του καρκίνου για το 2012 και τις εκτιμήσεις για το 2022 και στα δύο φύλα στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (Siegel R. et al 2012). Εκτιμάται ότι το 2022, οι καρκινοπαθείς θα αυξηθούν συνολικά σε 18

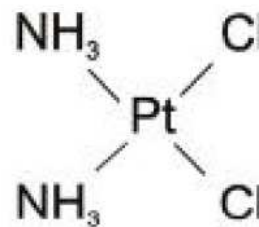
εκατομμύρια (8.8 εκατομμύρια άντρες και 9.2 εκατομμύρια γυναίκες) στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής.

Πλήθος συγγραμάτων και περιοδικών αναφέρονται στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Σήμερα, για τη θεραπεία του καρκίνου έχουν αναπτυχθεί οι παρακάτω προσεγγίσεις:

- i. Χημειοθεραπεία (αντικαρκινικά φάρμακα)
- ii. Εγχείρηση
- iii. Ακτινοθεραπεία
- iv. Ανοσοθεραπεία ή θεραπεία με αντισώματα
- v. Ορμονική θεραπεία
- vi. Γονιδιακή θεραπεία

#### *1.1.1. Χημειοθεραπεία (αντικαρκινικά φάρμακα)*

Θεωρούμε απαραίτητο να αναφερθούμε εδώ στο μεταλλικό σύμπλοκο της cisplatin καθώς αυτό είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο από πολλών ετών. Σύμπλοκα της πλατίνας όπως είναι το cisplatin (Εικόνα 2) και το carboplatin, χρησιμοποιούνται ευρέως στην χημειοθεραπεία (Gust R. et al 2009). Σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως



Εικόνα 2: Η δομή του cisplatin (Hanigan M.H. et al 2003)

π.χ. στην περίπτωση του καρκίνου των ωοθηκών, το cisplatin σε συνδυασμό με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα προκαλεί θεωρείται αρκετά αποτελεσματικό (Gust R. et al 2009). Αντιθέτως, δεν φαίνεται να είναι τόσο αποτελεσματικό στον καρκίνο των όρχεων και ειδικά στην μεταστατική νόσο κυρίως λόγω της ανθεκτικότητας που αναπτύσσουν τα κύτταρα στο φάρμακο (Gust R. et al 2009). Επιπλέον, το cisplatin εμφανίζει το μειονέκτημα των παρενεργειών, όπως της νεφροτοξικότητας, της νευροτοξικότητας, της



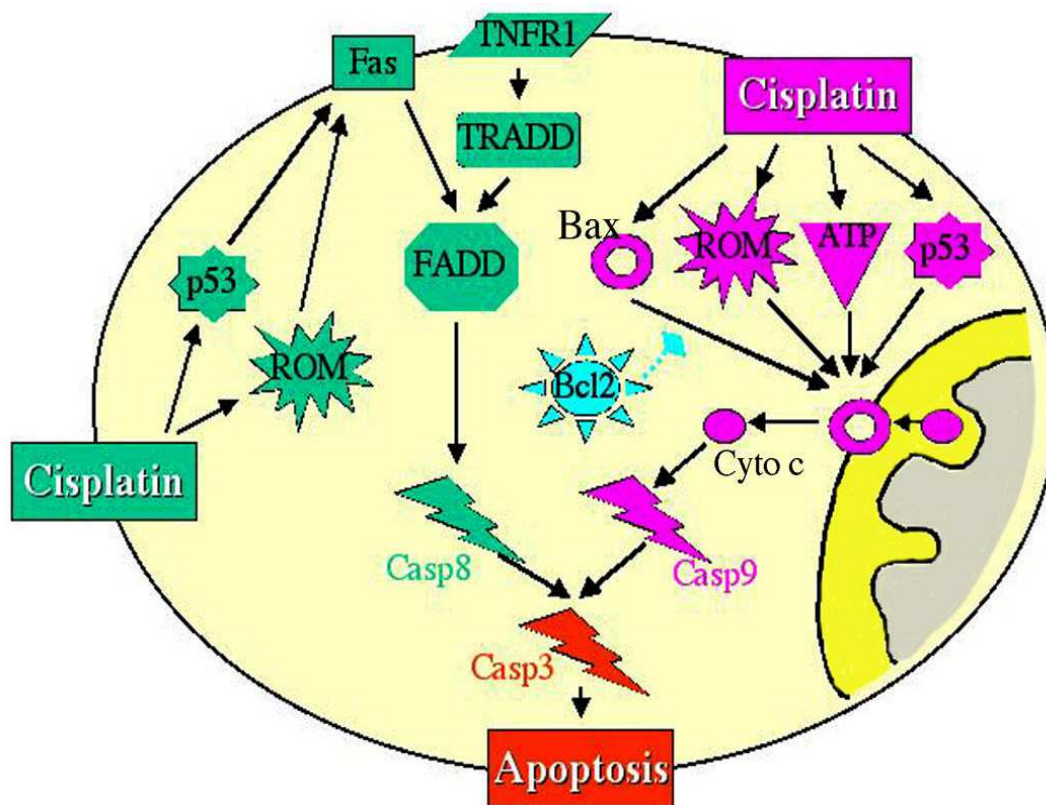
αλωπεκίας και του ιλίγγου με ταυτόχρονη εμφάνιση εμετού (Brazil M. 2005). Έτσι στην καθημερινή έρευνα γίνεται αναζήτηση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων με σύμπλοκο μεταλλικό ιόν. Το cisplatin, συνδέεται με το DNA, σε περιοχές πλούσιες σε γουανίνη και σχηματίζει σύμπλοκα με τις βάσεις, τα  $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}\{\text{d}(\text{GrG})\}]$  και  $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}\{\text{d}(\text{GrA})\}]$ , παραμορφώνοντας έτσι την δομή του DNA. Οι παραπάνω δομικές αλλαγές που προκαλεί το cisplatin επιδρούν στην αντιγραφή και στην μετάφραση του DNA, προκαλώντας αναστολή στην ανάπτυξη του όγκου (Gust R. et al 2009). Το cisplatin, μεταφέρεται στα κύτταρα από τον μεταφορέα χαλκού (Ctr1) (Hanigan M.H. et al 2003). Κατά την είσοδο του συμπλόκου στα κύτταρα απομακρύνονται τα μόρια του χλωρίου λόγω της χαμηλής ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του χλωρίου σε σχέση με αυτήν στο πλάσμα του αίματος (Hanigan M.H. et al 2003). Το θετικό φορτίο του συμπλόκου cisplatin, δίνει την δυνατότητα να προσδεθεί στο DNA, στο RNA και στις πρωτεΐνες (Hanigan M.H. et al 2003).

Ο μηχανισμός δράσης του συμπλόκου cisplatin έγκειται κυρίως στην ενεργοποίηση της απόπτωσης, είτε μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα θανάτου, είτε μέσω της μιτοχονδριακής οδού (Hanigan M.H. et al 2003). Ουσιαστικά ενεργοποιεί την εξωγενή οδό ή την οδό των υποδοχέων θανάτου καθώς και την ενδογενή ή μιτοχονδριακή οδό (Elmore S. et al 2007) (Εικόνα 3). Μελέτες του συμπλόκου σε επιθηλιακά κύτταρα έδειξαν απόπτωση είτε μέσω της υπερ-έκφρασης του υποδοχέα θανάτου (FAS), είτε του παράγοντα νέκρωσης των όγκων άλφα (tumor necrosis factor (TNF)-alpha) (Hanigan M.H. et al 2003). Η πρόσδεση του προσδέτη FAS στον υποδοχέα FAS και η πρόσδεση του προσδέτη TNF στον υποδοχέα TNF, προκαλεί την πρόσδεση στον προσαρμογέα πρωτεΐνης TRADD (TNF receptor-associated death domain) με την βοήθεια του πρωτεϊνικού προσαρμοστή FADD (Fas-associated death domain protein) και της receptor-interacting protein (RIP), (Elmore S. et al 2007). Στη συνέχεια, ενεργοποιείται

αυτοκαταλυτικά η προ-κασπάση 8, παράγοντας την κασπάση 8 (Elmore S. et al 2007). Σε άλλες μελέτες που έχουν γίνει φαίνεται επίσης πως και η πρωτεΐνη p53 και το οξειδωτικό στρες είναι δυνατόν να επάγουν τους υποδοχείς θανάτου (Hanigan M.H. et al 2003). Η επαγωγή της απόπτωσης από το cisplatin, συνδυάζεται από αυξημένη δραστηριότητα της κασπάσης 8, του κατακερματισμού του DNA και την μεταφορά της πρωτεΐνης Bax (Bcl-2-associated X protein) από το κυτταρόπλασμα στο μιτοχόνδριο, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα (Hanigan M.H. et al 2003). Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c ενεργοποιεί την κασπάση 9, προσδένοντας και ενεργοποιώντας αρχικά του apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1), για να ενεργοποιήσει την προ-κασπάση 9 στη συνέχεια (Elmore S. et al 2007). Σύμφωνα με μελέτες φαίνεται ότι η μιτοχονδριακή οδός της απόπτωσης παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση που προκαλείται από το cisplatin στα καρκινικά κύτταρα (Hanigan M.H. et al 2003) (Εικόνα 3). Τέλος, η κασπάση 3, ενεργοποιείται από τις κασπάσες 8, 9 και 10, με αποτέλεσμα να επάγει την ενδονουκλεάση CAD (Elmore S. et al 2007). Η ενδονουκλεάση CAD προκαλεί κατακερματισμό του χρωμοσωμικού DNA και η κασπάση 3 προκαλεί αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων (Elmore S. et al 2007). Το cisplatin σύμφωνα με μερικές μελέτες φαίνεται ότι προκαλεί απόπτωση μέσω κασπασο-εξαρτώμενων μηχανισμών' όμως ισχύει και το αρνητικό (Hanigan M.H. et al 2003). Επίσης η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιείται από τις αλλαγές που έχει προκαλέσει το σύμπλοκο στο DNA, με αποτέλεσμα να ενεργοποιηθεί στη συνέχεια η πρωτεΐνη Bax και ο υποδοχέας FAS (Hanigan M.H. et al 2003) (Εικόνα 3).

Έρευνες έχουν δείξει την σημαντικότητα των αντιδραστικών μεταβολιτών του οξυγόνου (reactive oxygen metabolites, ROM) στην απόπτωση που προκαλείται από το cisplatin (Hanigan M.H. et al 2003). Το μιτοχόνδριο παράγει αντιδραστικούς μεταβολίτες του οξυγόνου, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου μέσω αντι-οξειδωτικών ενζύμων

(Hanigan M.H. et al 2003). Το cisplatin, είναι γνωστό ότι συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια των νεφρικών επιθηλιακών κυττάρων και επάγει τα ROS (Reactive oxygen species) μειώνοντας την δραστικότητα αντι-οξειδωτικών ενζύμων και τις ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης (Hanigan M.H. et al 2003). Πολλά οξειδωτικά μόρια μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση. Τα οξειδωτικά μόρια επάγουν τον υποδοχέα FAS, ενεργοποιούν την πρωτεΐνη p53 και έτσι αυξάνεται η διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης, οπότε απελευθερώνεται το κυτόχρωμα c και τέλος γίνεται η ενεργοποίηση των κασπασών (Hanigan M.H. et al 2003).



Εικόνα 3: Μηχανισμός δράσης του cisplatin (Hanigan M.H. et al 2003).

Περισσότερα από 50 χρόνια, φάρμακα όπως το cisplatin χρησιμοποιούνται ευρέως στην καθημερινή θεραπευτική προσέγγιση καρκινοπαθών ασθενών. Εκτός του cisplatin

και το carboplatin έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στην θεραπεία του καρκίνου (Kostova I. 2006). Επειδή πολλά από τα χρησιμοποιούμενα φάρμακα εμφανίζουν παρενέργειες, οι ερευνητές συνεχώς προσπαθούν να συνθέσουν άλλα σύμπλοκα πλατίνας με αντικαρκινικές ιδιότητες (Kostova I. 2006). Για παράδειγμα, σύμπλοκα πλατίνας δεύτερης γενιάς αποτελεί το carboplatin  $[Pt(C_6H_6O_4)(NH_3)_2]$ , το οποίο εμφανίζει λιγότερες παρενέργειες από το cisplatin, μπορεί να συνδυαστεί και με άλλες θεραπείες και μπορεί ακόμη να χορηγηθεί σε υψηλές δόσεις λόγω έλλειψης σοβαρών παρενεργειών (Kostova I. 2006). Το carboplatin χρησιμοποιείται για την θεραπεία του καρκίνου της μήτρας, ενώ το oxaliplatin, ένα άλλο σύμπλοκο της πλατίνας είναι γνωστό ότι είναι αποτελεσματικό στην θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου (Kostova I. 2006).



Στην βιβλιογραφία, άλλα σύμπλοκα με άλλα μέταλλα όπως ο χρυσός, το ρουθίνιο (σύμπλοκα του ρουθινίου χρησιμοποιούνται σήμερα σε κλινικές δοκιμές), το παλλάδιο (αποτελεί σήμερα ένα σημαντικό αντικείμενο έρευνας) και το ρόδιο (με πιθανή αντικαρκινική δράση) σχεδιάζονται και μελετώνται ευρέως από ερευνητικές ομάδες (Jones C.J et al 2008). Επίσης, σύμπλοκα του αργύρου φαίνεται ότι έχουν ισχυρή αντικαρκινική δράση. Συγκεκριμένα, σύμπλοκα χρυσού χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, λόγω της ικανότητας του χρυσού να συνδέεται στην αλβουμίνη και να μεταφέρεται στο αίμα (Jones C.J. et al 2008). Επίσης, σύμπλοκα του βαναδίου χρησιμοποιούνται ως μιμητές της ινσουλίνης και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (Jones C.J. et al 2008). Πέρα της εφαρμογής τους ως αντικαρκινικών, μερικά άλλα μέταλλα χρησιμοποιούνται επίσης θεραπευτικά. Έτσι το βισμούθιο

χρησιμοποιείται ως φάρμακο για την αντιμετώπιση του έλκους, το αντιμόνιο ως αντιπαρασιτικό και το αρσενικό για την θεραπεία τη λευχαιμίας. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν την εμπλοκή των συμπλόκων βισμούθιου και αντιμονίου και στην θεραπεία του καρκίνου επιπλέον (Jones C.J. et al 2008).

### *1.1.3. Ακτινοθεραπεία*

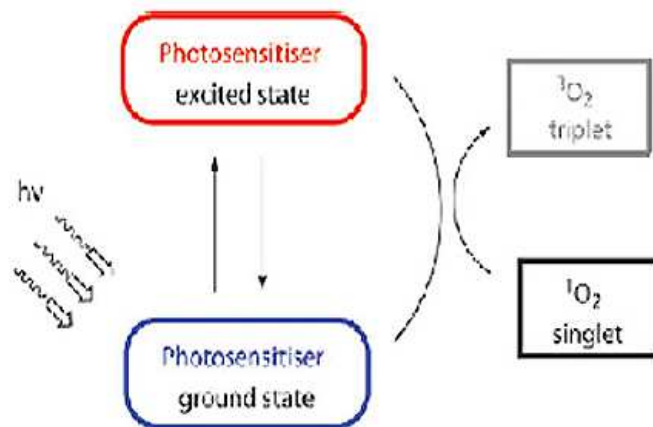
Καθώς η χρήση των χημειοθεραπευτικών συχνά περιορίζεται λόγω των παρενεργειών τους, η χρήση συγκεκριμένων ακτινοβολιών για την ενεργοποίηση μεταφορέων-φαρμάκων είναι μια εναλλακτική στρατηγική για την ανάπτυξη νέων επιτυχημένων θεραπειών. Η θεραπεία με ακτινοβολία (photoactivated chemotherapy) παρέχει την ικανότητα ελέγχου για το που και το πως ενεργοποιείται το φάρμακο (Crespy D. et al 2010). Η χρήση μιας ανενεργούς πρόδρομης ουσίας ή ενός προ-φαρμάκου που ενεργοποιείται (μετατρέπεται σε δραστική ουσία) εκλεκτικά με την επίδραση της ακτινοβολίας στο στόχο είναι απαραίτητα βήματα για την θεραπεία με ακτινοβολία.

Στις θεραπείες με ακτινοβολία ανήκουν επίσης και η φωτοδυναμική θεραπεία και οι ραδιο-ανοσοθεραπείες.

Ένα είδος φωτο-χημειοθεραπείας είναι η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) που χρησιμοποιείται για την θεραπεία των όγκων των πνευμόνων, του εγκεφάλου, του ήπατος αλλά και σε περιπτώσεις νεοπλασματικών ασθενειών του δέρματος (Bowen's disease) (Crespy D. et al 2010). Στην συγκεκριμένη θεραπεία χρησιμοποιείται ορατό φως, το οξυγόνο των ιστών και μία φωτο-ευαίσθητη ουσία (π.χ. πορφυρίνη) (Crespy D. et al 2010). Η θεραπεία συνίσταται στην πρόσληψη και κατακράτηση από τον καρκινωματώδη ιστό της φωτοευαισθητοποιούμενης ουσίας (π.χ. πορφυρίνης) η οποία στη συνέχεια ακτινοβολείται με ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος, και αποδιεγείρομενη

εκπέμπει ενέργεια στα γειτονικά μόρια οξυγόνου  $O_2$ . Από τα μόρια αυτά παράγεται δραστικό οξυγόνο και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου οι οποίες είναι καταστρεπτικές για τους ιστούς. Οι ελεύθερες ρίζες καταστρέφουν πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα και άλλα κυτταρικά συστατικά. (Εικόνα 4).

Στη φωτοδυναμική θεραπεία ο φωτοευαισθητοποιός παράγοντας εισέρχεται στο σώμα με ενδοφλέβια χορήγηση και απορροφάται από τα κύτταρα του σώματος. Η ουσία αυτή παραμένει στα καρκινικά κύτταρα για περισσότερο χρόνο από ότι στα φυσιολογικά κύτταρα. Όταν τα καρκινικά κύτταρα ακτινοβολούνται η φωτοευαισθητοποιός ουσία απορροφά την ακτινοβολία και παράγει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου οι οποίες καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα (Crespy D. et al 2010). Η ακτινοβολία των καρκινικών κυττάρων πρέπει να γίνει στον κατάλληλο χρόνο ώστε η φωτοευαισθητοποιός ουσία να έχει φύγει από τα υγιή κύτταρα αλλά να έχει παραμείνει στα καρκινωματώδη κύτταρα. Τα πλεονεκτήματα της θεραπείας είναι ότι επιτρέπει τον έλεγχο της θεραπευτικής ουσίας ως προς την θέση, τον χρόνο και τη δοσολογία της (Crespy D. et al 2010).



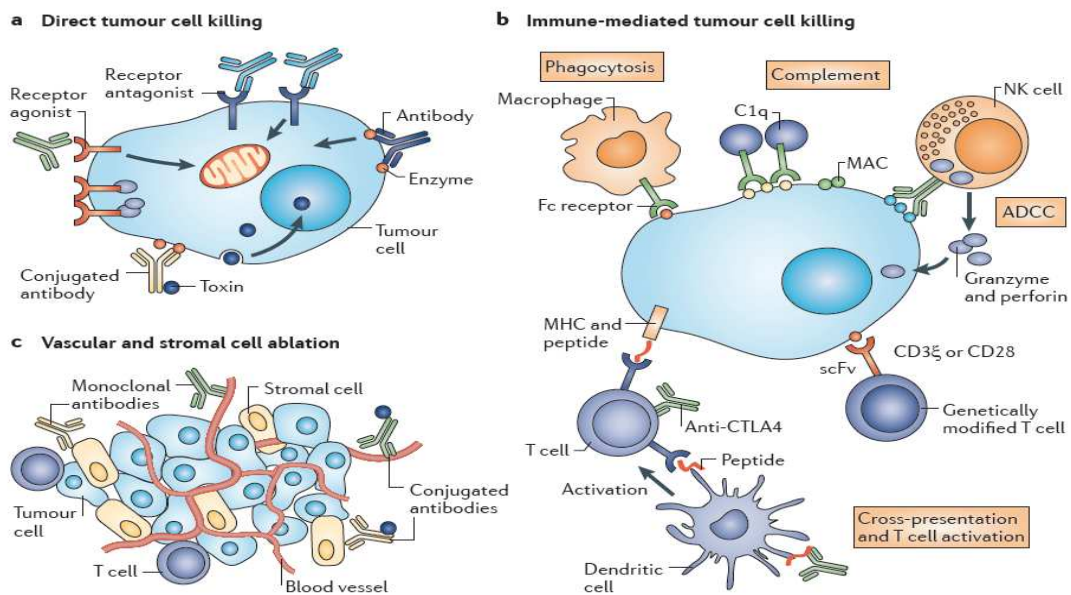
Εικόνα 4: Μηχανισμός φωτοδυναμικής θεραπείας (Crespy D. et al 2010).

Η ραδιοθεραπεία είναι μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος θεραπείας που εφαρμόζεται σε περισσότερους από τους μισούς καρκινοπαθείς ανά τον κόσμο. Πρόκειται για ένα είδος βιολογικού χειρουργείου, όπου το νυστέρι αντικαθίσταται από ένα μικροσκοπικό σωματίδιο ικανό να καταστρέψει τα κακοήγη κύτταρα, αποκόβοντας το DNA που προκαλεί τον πολλαπλασιασμό τους. Η πιο διαδεδομένη μορφή ραδιοθεραπείας χρησιμοποιεί ακτίνες-X ή ηλεκτρόνια που προέρχονται από έναν γραμμικό επιταχυντή. Οι ακτίνες-X ή οι δέσμες ηλεκτρονίων οδηγούνται πάνω στον όγκο και έχουν τόση ενέργεια όση χρειάζεται για να φτάσουν και να χτυπήσουν τα καρκινικά κύτταρα. Από την δεκαετία του 1960 τα νετρόνια χρησιμοποιούνται και στην ραδιοθεραπεία. Τα νετρόνια απελευθερώνουν ενέργεια με τρόπο διαφορετικό από τις ακτίνες X ή τα ηλεκτρόνια, πράγμα που τα καθιστά καταλληλότερα για τη θεραπεία ορισμένων όγκων. Η θεραπεία με νετρόνια είναι πιο δαπανηρή από τη θεραπεία με ακτίνες X ή ηλεκτρόνια. Με τις πιο πρόσφατες εξελίξεις, επιταχυντές πρωτονίων έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται για τη ραδιοθεραπεία ή την θεραπεία με αδρόνια, καθώς αυτό το αναπτυσσόμενο πεδίο έρευνας γίνεται γνωστότερο. Το πλεονέκτημα των πρωτονίων είναι ότι εναποθέτουν όλη τους την ενέργεια στο ίδιο σημείο. Αυτό κάνει τη θεραπεία με αδρόνια ιδανική για όγκους που εμφανίζονται κοντά σε ζωτικά όργανα, όπου η ακρίβεια είναι θεμελιώδους σημασίας.

#### *1.1.4. Ανοσοθεραπεία ή θεραπεία με αντισώματα*

Η χρήση του ανοσοποιητικού συστήματος για την επίθεση και την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων ονομάζεται ανοσοθεραπεία. Η ανοσοθεραπεία ή η θεραπεία με αντισώματα έχει εδραιωθεί τα τελευταία 15 χρόνια. Η μέθοδος αυτή είναι γνωστή και ως βιολογική θεραπεία ή θεραπεία μετατροπής βιολογικής αντίδρασης. Η ανοσοθεραπεία μπορεί να γίνει μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες για τον καρκίνο. Ενεργοποιεί

και κατευθύνει το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού να καταπολεμήσει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Η βάση της ανοσοθεραπείας στηρίζεται στο χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων να εκφράζουν αντιγόνα (Εικόνα 5). Τα αντιγόνα των καρκινικών κυττάρων, που βρίσκονται στην επιφάνεια τους, υπερ-εκφράζονται ή μεταλλάσσονται είτε εκφράζονται επιλεκτικά σε σχέση με τα υγιή κύτταρα. Η βασική πρόκληση είναι να ταυτοποιηθούν τα αντιγόνα που είναι κατάλληλοι υποδοχείς για τα αντισώματα ούτως ώστε τα εκλεκτικά προς αυτούς τους υποδοχείς αντισώματα να καταστρέφουν τελικά το καρκινικό κύτταρο (Scott A.M. et al 2012)



Εικόνα 5: Μηχανισμός ανοσοθεραπείας (Scott A.M. et al 2012).

### 1.1.5. Ορμονική θεραπεία

Η ορμονική θεραπεία χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις καρκίνου, όπως του προστάτη, των όρχεων, του μαστού, του θυρεοειδή και της μήτρας (Siegel R. et al 2012). Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του προστάτη, το 80% των ασθενών ανταποκρίνεται στην

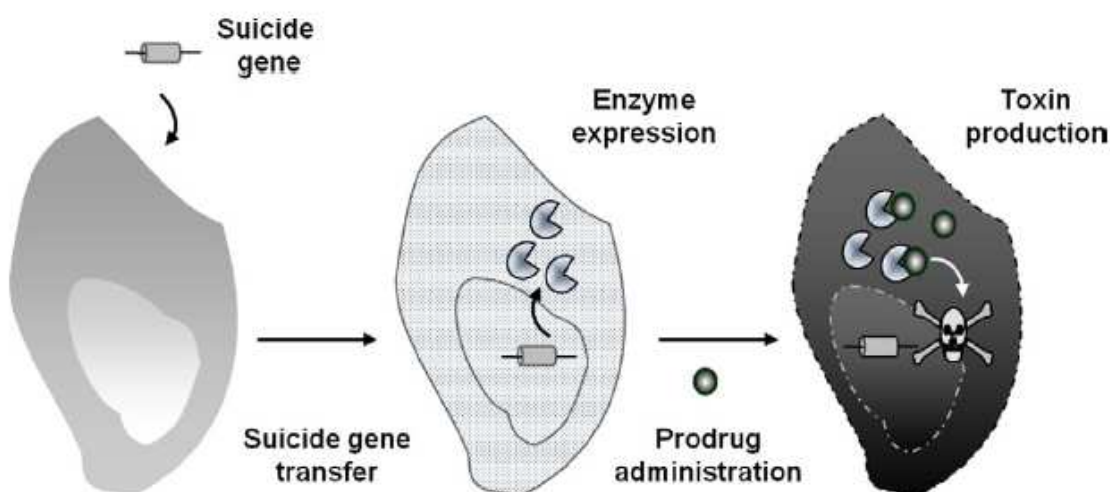


θεραπεία στέρξης των ανδρογόνων (Kojima S. et al 2004). Επίσης, και στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, που είναι οιστρογονοεξαρτώμενος, μειώνοντας τα επίπεδα των οιστρογόνων μπορεί να αντιμετωπιστεί καλύτερα ο καρκίνος (Coombes R.C. et al 2004).

### 1.1.6. Γονιδιακή θεραπεία

Η γονιδιακή θεραπεία χρησιμοποιείται ως μια εναλλακτική μέθοδος για την θεραπεία ορισμένων τύπων καρκίνων, εφόσον στην πλειονότητα οι καρκίνοι αυτοί παραμένουν ανθεκτικοί στην οποιαδήποτε θεραπευτική προσέγγιση. Η γονιδιακή θεραπεία στοχεύει, στην διόρθωση της μετάλλαξης, με την βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι των καρκινικών κυττάρων, με επίδραση στο RNA και την λύση των καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιώντας ιούς, αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες και γονιδιακές θεραπείες αυτοκτονίας (suicide gene therapies) (Duarte S. et al 2012).

Η γονιδιακή θεραπεία αυτοκτονίας στηρίζεται στην εισαγωγή ενός ιϊκού ή βακτηριδιακού γονιδίου σε ένα καρκινικό κύτταρο και στην συνέχεια την ενεργοποίηση ενός ενζύμου, το οποίο θα μετατρέψει ένα προ-φάρμακο σε δραστικό φάρμακο καταστρέφοντας κύτταρα μέσω τοξινών (Duarte S. et al 2012) (Εικόνα 6).



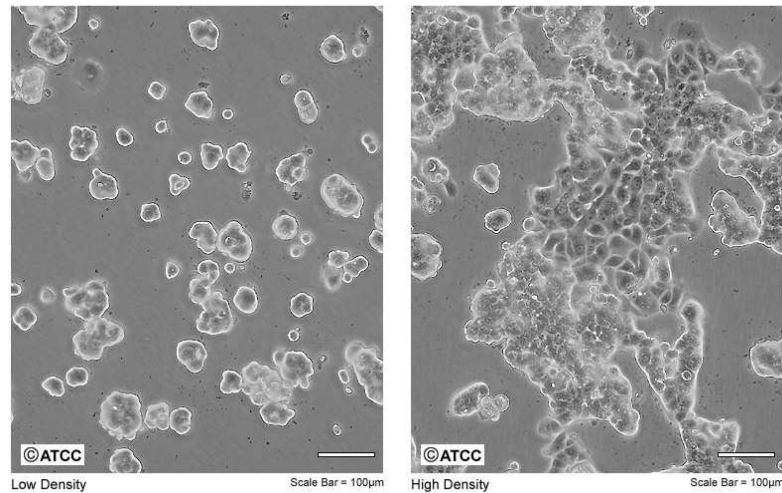
Εικόνα 6: Μηχανισμός γονιδιακή θεραπεία αυτοκτονίας (Duarte S. et al 2012).

## **1.2. Κυτταροκαλλιέργειες**

Η τεχνική της κυτταροκαλλιέργειας χρησιμοποιείται σε ολόκληρο τον κόσμο, επιτρέποντας στα κύτταρα να αναπτυχθούν και να διατηρηθούν εκτός του σώματος (Langdon S.P. 2001). Η τεχνική της κυτταροκαλλιέργειας δίνει την δυνατότητα κατανόησης πλήρως της φυσιολογίας των καρκινικών κυττάρων (Langdon S.P. 2001). Η πρώτη, ανθρώπινη κυτταρική σειρά που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο ήταν ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας το 1951 (Langdon S.P. 2001). Παραδείγματα καρκινικών σειρών είναι οι καρκινικές κυτταρικές σειρές αδenoκαρκινώματος του μαστού (MCF-7) και λειομυοσαρκώματος (LMS). Το πρώτο μοντέλο ανθρώπινων κυτταρικών σειρών, είναι τα κύτταρα, τα οποία απομονώθηκαν το 1951 από την αμερικανίδα Henriette Lack που έπασχε από καρκίνο και χρησιμοποιούνται εδώ και δεκαετίες από πολλά επιστημονικά κέντρα σε ολόκληρο τον κόσμο. Τα κύτταρα HeLa βοήθησαν μεταξύ άλλων στην ανάπτυξη του εμβολίου της πολιομυελίτιδας, προσέφεραν σημαντικά νέα στοιχεία για τον καρκίνο και το AIDS και χρησιμοποιήθηκαν σε έρευνες που βραβεύτηκαν με δύο Νόμπελ.

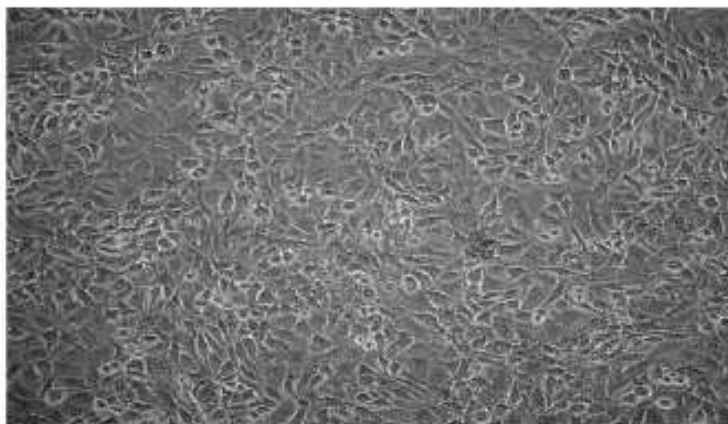
Τα MCF-7 κύτταρα, αποτελούν μοντέλο μελέτης του καρκίνου του μαστού (Leporatti S. et al 2009) (Εικόνα 7). Ο καρκίνος του μαστού είναι ο δεύτερος συχνότερος καρκίνος στις γυναίκες (23% σε σχέση με όλους τους καρκίνους) (Max Parkin D. et al 2005). Τα πιο αυξημένα ποσοστά παρατηρούνται στις ανεπτυγμένες χώρες (εκτός από την Ιαπωνία, όπου είναι τρίτος μετά τον καρκίνο του παχέος εντέρου και του στομάχου) (Max Parkin D. et al 2005). Τα μικρότερα ποσοστά εμφάνισης ανευρίσκονται στη Κεντρική Αφρική (Max Parkin D. et al 2005). Οι κυριότεροι παράγοντες εμφάνισης του καρκίνου του μαστού, είναι κυρίως οι αναπαραγωγικοί παράγοντες, η μάζα του σώματος, η παχυσαρκία, το αλκοόλ, η σωματική δραστηριότητα, οι εξωγενείς ορμόνες (ορμόνες

θεραπείας υποκατάστασης, αντισυλληπτικά) καθώς και η διατροφή (Max Parkin D. et al 2005).



Εικόνα 7: Μορφολογία MCF-7 καρκινικών κυττάρων, (Φωτογραφία από ATCC)

Τα λειομυοσαρκώματα (LMS), είναι κακοήθεις όγκοι με προέλευση από τις λείες μυικές ίνες και είναι συχνότερα σε άτομα με ανοσοανεπάρκεια (Jenson H.B. et al 1999) (Εικόνα 8). Το λειομυοσάρκωμα στους ενήλικες συνήθως εμφανίζεται στην μήτρα ενώ στα παιδιά εμφανίζεται ως σπλαχνικό λειομυοσάρκωμα, σε ποσοστά 1 στα 10 εκατομμύρια παιδιά (Jenson H.B. et al 1999). Τα λειομυοσαρκώματα παρουσιάζουν μεγάλη συχνότητα σε ασθενείς που λαμβάνουν αντικαρκινικά φάρμακα ή φάρμακα κατά της απόρριψης του μοσχεύματος (Jenson H.B. et al 1999). Προσεγγιστικά, 1 άτομο στα 5000 παιδιά εμφανίζει λειομυοσάρκωμα με σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS). Το λειομυοσάρκωμα είναι ο δεύτερος πιο συχνός όγκος σε παιδιά με AIDS (Jenson H.B. et al 1999).



Εικόνα 8: Μορφολογία LMS καρκινικών κυττάρων

### **1.3. Πειραματόζωα**

Η χρήση των ζώων στην έρευνα κατά του καρκίνου είναι ένα σημαντικό εργαλείο σε ότι αναφορά τον μηχανισμό μελέτης των γονιδίων, των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι εμφάνισης, στην ανάπτυξη, στον σχεδιασμό, στον χαρακτηρισμό και στην εκτίμηση διαφόρων θεραπευτικών προσεγγίσεων (Santos E. 2002). Η αναγκαιότητα και η χρήση των πειραματόζωων στην μελέτη της αιτιολογίας και της θεραπείας στην παθολογία είναι εμφανής (Santos E. 2002). Για αυτό το λόγο, μια πληθώρα πειραματοζώων χρησιμοποιείται σε μελέτες φαρμακολογικές, τοξικολογικές αλλά και στις ανθρώπινες ασθένειες (Santos E. 2002). Σήμερα, η ιστοσελίδα του NIH, για τους οργανισμούς με επιστημονικό ενδιαφέρον περιέχει, θηλαστικά (ποντίκια και αρουραίους), μη θηλαστικά (όπως ο μύκητας, *Saccharomyces cerevisiae*, το *Dictiostelium discoideum* (αμοιβάδα), *Caenorhabditis elegans* (σκώληκας), *Drosophila melanogaster* (φρουτόμυγα), *Danio rerio* (zebra fish), *Xenopus laevis* (γυρίνος) και φυτά όπως το είδος *Arabidopsis* (Santos E. 2002). Όμως τα εργαστηριακά ποντίκια εξακολουθούν να παραμένουν τα καλύτερα

μοντέλα για την μελέτη του καρκίνου *in vivo*, λόγω των χαρακτηριστικών του μικρού μεγέθους τους και της ομοιότητας του γονιδιώματος τους με τον άνθρωπο (Leenders M.W.H. et al 2008).

Τα πειραματόζωα Wistar rat, δημιουργήθηκαν στο Wistar Institute το 1906 (Εικόνα 9). Τα ζώα αυτά είναι εύκολα στον χειρισμό τους και η επιθετικότητα των αρσενικών επίμυων εμφανίζεται σχετικά αργά. Είναι καθαρά ή αμιγή στελέχη και υπάρχουν πολλά είδη στον κόσμο. Άλλα είδη που χρησιμοποιούνται είναι τα Sprague - Dawley albino και τα Long - Evans hooded.



Εικόνα 9: Wistar Rat

Το χαρακτηριστικό των ζώων είναι ότι έχουν ένα έντονο κερκάρδιο ρυθμό, ο οποίος επηρεάζεται από τις αλλαγές στο περιβάλλον (Hubrecht R. et al 2010). Ο μέγιστος χρόνος ζωής των αρσενικών είναι 1200 μέρες και των θηλυκών είναι 1400 μέρες. Ο μέσος όρος είναι 850 και 900 μέρες αντίστοιχα για αρσενικά και θηλυκά. Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων είναι 42 (Hubrecht R. et al 2010).

## **1.4. Τοξικότητα**

### **1.4.1. Οξεία τοξικότητα**

Η οξεία τοξικότητα αφορά στον βαθμό της τοξικότητας μιας χημικής ουσίας σε σχέση με την δόση και τις παρενέργειες της, τα τοξικά αποτελέσματα και τον τρόπο δράσης της. Στοχεύει επίσης στο να συγκριθεί με άλλες ήδη γνωστές τοξικές ουσίες. Με βάση την οξεία τοξικότητα μπορεί να υπολογιστεί και η μέση θανατηφόρα δόση (LD<sub>50</sub>). Η μελέτη μπορεί να διαρκέσει τουλάχιστον 5 ημέρες αλλά όχι περισσότερο από 14 ημέρες σε μια μόνο δόση (Souza A. Torsoni et al 2002, Aranowska K. et al 2006).

#### *1.4.2. Υποχρόνια τοξικότητα*

Κατά την εκτίμηση των τοξικών χαρακτηριστικών μίας χημικής ουσίας, προσδιορίζεται επίσης και η υποχρόνια τοξικότητα χρησιμοποιώντας επαναλαμβανόμενες δόσεις με βάση τις παρατηρήσεις της οξείας τοξικότητας. Η υποχρόνια τοξικότητα των 90 ημερών παρέχει πληροφορίες για τους πιθανούς κινδύνους που μπορεί να προκληθούν από την επαναλαμβανόμενη έκθεση για μεγάλο χρονικό διάστημα (2-4 μεσοδιαστήματα). Η μελέτη θα παρέχει πληροφορίες για τις κύριες επιπτώσεις στα όργανα, την δυνατότητα συσσώρευσης αλλά και για τον καθορισμό της δόσης του φαρμάκου που δεν επηρεάζει το πειραματόζωο (OECD 408).

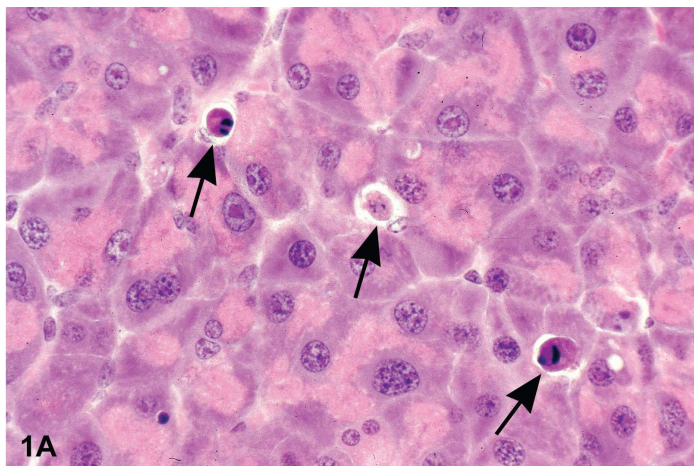
#### *1.5. Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος*

Η ρύθμιση του αριθμού των κυττάρων στους ιστούς είναι σημαντικός παράγοντας για τους πολυκύτταρους οργανισμούς (Fischer U. et al 2005). Το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από  $10^{14}$  κύτταρα (Fischer U. et al 2005). Κάθε μέρα εκατομμύρια κύτταρα πεθαίνουν για να εξασφαλίσουν την ομαλή λειτουργία του οργανισμού (Fischer U. et al 2005). Οξείες παθολογικές καταστάσεις, όπως το εγκεφαλικό επεισόδιο, η καρδιακή προσβολή, το νευρο-εκφυλιστικό σύνδρομο συνδέονται με ξαφνικό θάνατο κυτταρικών περιοχών σε ιστούς ή όργανα (Fischer U. et al 2005). Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος καλείται απόπτωση. Χαμηλά ποσοστά απόπτωσης μπορεί να προάγουν την επιβίωση και την συσσώρευση ανώμαλων κυττάρων που μπορούν να οδηγήσουν σε σχηματισμό όγκου ή αυτοάνοσων νοσημάτων (Fischer U. et al 2005). Η απόπτωση αποτελεί μία εξαιρετική αποτελεσματική κυτταρική οδό αυτοκτονίας (Fischer U. et al 2005).

Ο όρος απόπτωση (από-πτώση) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στο άρθρο του Kerr και Currie το 1992 για να περιγράψει την μορφολογία του κυτταρικού θανάτου. Η απόπτωση συμβαίνει φυσιολογικά στην ανάπτυξη και στην γήρανση ως ένας ομοιοστατικός μηχανισμός για να διατηρήσει σταθερό τον αριθμό των κυττάρων στους ιστούς (Elmore S. et al 2007). Επίσης, η απόπτωση αποτελεί και έναν τρόπο άμυνας στο ανοσοποιητικό σύστημα όταν τα κύτταρα καταστρέφονται από ασθένειες ή επιβλαβείς παράγοντες (Elmore S. et al 2007). Η ακτινοβολία ή τα φάρμακα δυνατόν να οδηγήσουν σε απόπτωση, μέσω της ενεργοποίησης μιας εξαρτώμενης οδού από την p53 πρωτεΐνη (Elmore S. et al 2007). Επίσης, ορμόνες όπως τα κορτικοειδή, ίσως οδηγούν σε αποπτωτικό θάνατο κύτταρα του θύμου αδένου, παρόλο που άλλα είδη κυττάρων δεν θα επηρεαστούν όταν διεγερθούν από αυτές τις ορμόνες (Elmore S. et al 2007). Ακόμα, σε πολλές περιπτώσεις η υποξία, η θερμοκρασία, η ακτινοβολία καθώς και η δράση αντικαρκινικών φαρμάκων δυνατόν να επάγουν απόπτωση (Elmore S. et al 2007).

#### *1.5.1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά απόπτωσης*

Στο οπτικό μικροσκόπιο, στα πρώτα στάδια της απόπτωσης είναι εμφανής η κυτταρική συρρίκνωση και η πύκνωση (Elmore S. et al 2007). Με την συρρίκνωση των κυττάρων, τα κύτταρα μειώνονται σε μέγεθος, το κυτταρόπλασμα γίνεται πυκνό και τα οργανίδια πιο πακεταρισμένα (Elmore S. et al 2007) (Εικόνα 10). Η πύκνωση είναι το αποτέλεσμα της συμπύκνωσης της χρωματίνης (Elmore S. et al 2007).



Εικόνα 10: Τομή από πάγκρεας από B6C3F1 επίμυες. Το βέλος υποδηλώνει αποπτωτικά κύτταρα, τα οποία έχουν συρρικνωθεί. Η χρωματίνη έχει συμπυκνωθεί και κατακερματιστεί (Elmore S. et al 2007).

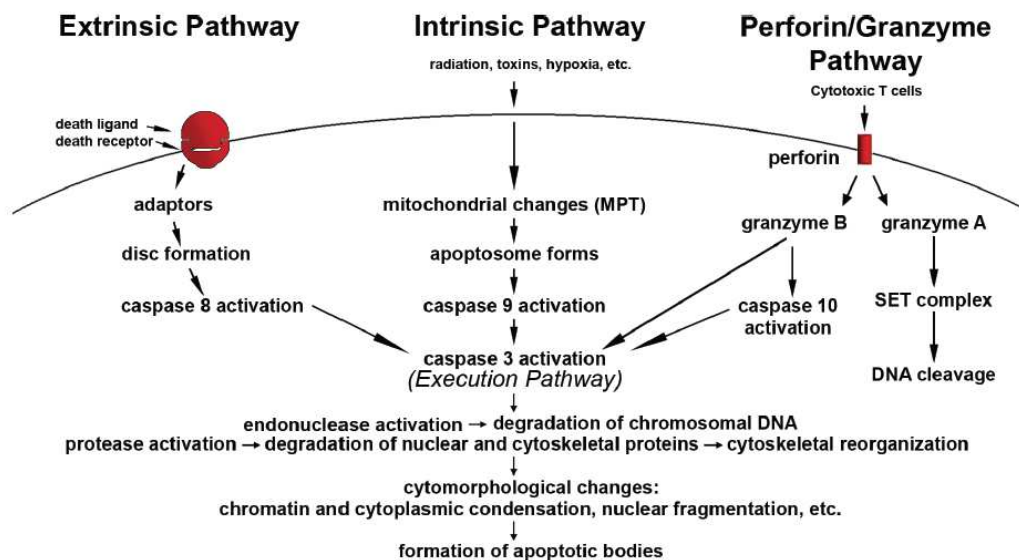
Οι κύριες μορφολογικές αλλαγές της απόπτωσης συμπεριλαμβάνουν, την συμπύκνωση της χρωματίνης του κυτταρικού πυρήνα, τον κατακερματισμό του πυρηνικού DNA σε θραύσματα διαφορετικών μεγεθών (DNA laddering), την δημιουργία οπών (διάυλων-πόρων) μεγάλης διαμέτρου στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων, την εμφάνιση χαρακτηριστικών προεξοχών στην κυτταρική μεμβράνη και το σχηματισμό φαγοσωμάτων που περιέχουν κυτταροπλασματικά και πυρηνικά υπολείμματα (Μαργαρίτης Λ.Χ 2004). Όλα τα νεκρά κύτταρα απομακρύνονται ταχύτατα με την μορφή φαγοσωμάτων από γειτονικά μακροφάγα, προστατεύοντας έτσι τους παρακείμενους ιστούς από πιθανές φλεγμονές και καταστροφικές αλλοιώσεις (Μαργαρίτης Λ.Χ 2004).

#### 1.5.2. Μηχανισμοί της απόπτωσης

Οι μηχανισμοί της απόπτωσης είναι μια περίπλοκη διαδικασία και όλη η διαδικασία εξαρτάται από ένα σύνολο αντιδράσεων (Elmore S. et al 2007). Υπάρχουν δύο κύρια αποπτωτικά μονοπάτια, το εξωγενές (extrinsic) ή death receptor pathway και το



ενδογενές (intrinsic) ή μιτοχονδριακό μονοπάτι (Elmore S. et al 2007). Υπάρχουν όμως ενδείξεις, ότι οι δυο αυτές οδοί συνδέονται και ότι η μία οδός μπορεί να επηρεάσει την άλλη. Επιπλέον, υπάρχει ένα άλλο μονοπάτι, που περιλαμβάνει και τα κυτταροτοξικά T κύτταρα. Αυτή είναι η οδός της περφορίνης/granzyme (Elmore S. et al 2007). Το μονοπάτι αυτό μπορεί να επάγει απόπτωση μέσω του granzyme A ή B. Όμως και τα τρία μονοπάτια καταλήγουν στο ίδιο τελικό αποτέλεσμα, οδηγώντας σε απόπτωση (Elmore S. et al 2007) (Εικόνα 11). Συγκεκριμένα, στην διάσπαση της κασπάσης-3, στην θραυσματοποίηση του DNA, στην αποικοδόμηση του κυτταροσκελετού και των πυρηνικών πρωτεϊνών, στο cross-link των πρωτεϊνών, στην δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων και στην έκφραση ειδικών προσδετών για τους υποδοχείς των φαγοκυττάρων (Elmore S. et al 2007). Το μονοπάτι του granzyme A πυροδοτεί ένα παράλληλο μονοπάτι ανεξάρτητο από τις κασπάσες μέσω μονόκλωνων βλαβών στο DNA (Elmore S. et al 2007).



Εικόνα 11: Μηχανισμοί απόπτωσης (Elmore S. et al 2007).

### *1.5.3. Βιοχημικά χαρακτηριστικά*

Οι κασπάσες ανιχνεύονται σε ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών κυτταρικών τύπων με την μορφή πρόδρομων ανενεργών προ-ενζύμων (ζυμογόνων). Μέσω της πρωτεόλυσης, μετατρέπεται το προ-ένζυμο σε καταλυτικά ενεργή κασπάση. (Μαργαρίτης Λ.Χ 2004).

Η πρώτη ενεργοποιημένη κασπάση ή εναρκτήριοις κασπάση ενεργοποιεί μέσω διαδοχικών πρωτεολυτικών γεγονότων διαφορετικά μέλη της οικογένειας, που ονομάζονται κασπάσες τελεστές (caspases effector) (Μαργαρίτης Λ.Χ 2004). Οι κασπάσες τελεστές αναγνωρίζουν εκλεκτικά και πρωτεολύουν κυτταροπλασματικές και πυρηνικές πρωτεΐνες, όπως οι πυρηνικές λαμίνες, η ρυθμιστική πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού της ακτίνης (πηκτωλυματίνη ή γκελσολίνη και η πυρηνική πρωτεΐνη PARP (poly-ADP-ribose-polymerase) (Μαργαρίτης Λ.Χ 2004). Η αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης γίνεται με την πρωτεολυτική θραύση του προδρόμου μορίου της πηκτωλυματίνης σε ενεργή μορφή. Ο θρυμματισμός του πυρηνικού DNA σχετίζεται με την απενεργοποίηση ενός πυρηνικού αναστολέα του ειδικού νουκλεοτικού ενζύμου της απόπτωσης (ICAD, Inhibitor of Caspase ActivatedDNAse). Η πρωτεολυτική δράση του ICAD από τις ενεργοποιημένες κασπάσες απελευθερώνει την πρωτεΐνη CAD από το ανενεργό σύμπλοκο ICAD/CAD και επάγει την νουκλεοτική δράση (δράση DNAσης) , έτσι ώστε να θραυματοποιηθεί το DNA. Η διάσπαση του DNA εξαρτάται από εξαρτώμενες ενδονουκλεάσες  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$  και το αποτέλεσμα είναι το DNA να διασπάται σε θραύσματα των 180 μέχρι 200 ζευγών βάσεων. Το χαρακτηριστικό σπάσιμο (DNA ladder) μπορεί να γίνει ορατό με ηλεκτρόφορηση σε πηκτή αгарόζης (Elmore S. et al 2007).

Κατά την διάρκεια της απόπτωσης, οι ενεργοποιημένες κασπάσες πρωτεολύουν και απενεργοποιούν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, με αποτέλεσμα την κατάργηση της διακυτταρικής επικοινωνίας, την αποδιοργάνωση του κυτταρικού

σκελετού, την παρεμπόδιση της αντιγραφής και τη παρεμπόδιση της επιδιόρθωσης του θρυμματισμένου πυρηνικού DNA (Μαργαρίτης Λ.Χ 2004).

Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί δέκα κασπάσες και έχουν κατηγοριοποιηθεί ως εκκινήτες (initiators) (κασπάσες-2, -8, -9, -10), οι τελεστές (κασπάσες-3, -6, -7) και φλεγμονώδεις (κασπάσες-1, -4, -5) (Elmore S. et al 2007). Άλλες κασπάσες που έχουν εντοπιστεί, είναι η κασπάση-11, η οποία φαίνεται πως ρυθμίζει την απόπτωση και την ωρίμανση κυτταροκινών κατά την διάρκεια του σηπτικού σοκ. Επίσης, η κασπάση-12 ρυθμίζει την ενδοπλασματική απόπτωση και την κυτταροτοξικότητα του β-αμυλοειδούς. Η κασπάση-13 καθορίζεται από ένα γονίδιο που εκφράζεται στο χοίρους και η κασπάση 14 εκφράζεται σε ιστούς εμβρύων και όχι ενηλίκων (Elmore S. et al 2007).

Ένα άλλο χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι η παρουσία στην επιφάνεια των κυττάρων κάποιων δεικτών, οι οποίοι βοηθούν στην έγκαιρη αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων από τα φαγοκύτταρα των γειτονικών κυττάρων (Elmore S. et al 2007). Αυτό επιτυγχάνεται με την μετακίνηση της φωσφαδιλο-σερίνης στις εξωτερικές στρώσεις της κυτταρικής μεμβράνης. Επίσης, άλλες πρωτεΐνες, όπως είναι η αννεξίνη I και η calreticulin εκτίθενται στην κυτταρική μεμβράνη των αποπτωτικών κυττάρων (Elmore S. et al 2007).

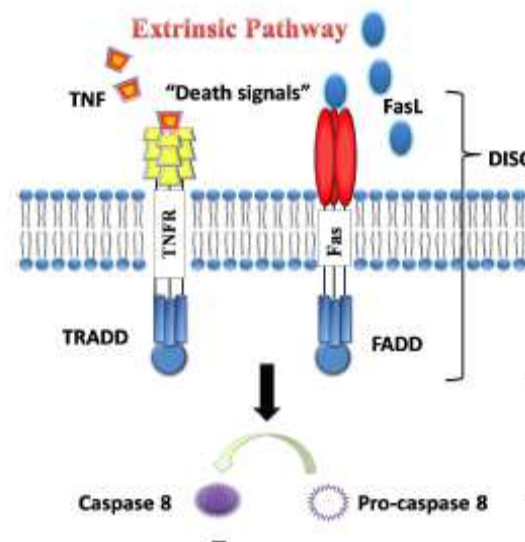
Οι ιδιότητες αυτές χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση της απόπτωσης. Για παράδειγμα, η αννεξίνη V είναι μία ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που έχει την ικανότητα να συνδέεται σε κατάλοιπα φωσφατιδυλο-σερίνης και έτσι ανιχνεύεται η απόπτωση (Elmore S. et al 2007).

1.5.4. Εξωγενές (*extrinsic*) ή οδός υποδοχέων θανάτου (*death receptor pathway*)

Το εξωγενές μονοπάτι ή οδός υποδοχέων θανάτου εξαρτάται από τους υποδοχείς θανάτου που ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των παραγόντων νέκρωσης των όγκων (TNF, tumor necrosis factor) (Elmore S. et al 2007). Οι υποδοχείς αυτοί έχουν πλούσιες ενδοκυτταρικές περιοχές σε κυστεΐνη και μία άλλη κυτταροπλασματική περιοχή (death domain) 80 αμινοξέων (Elmore S. et al 2007). Η περιοχή θανάτου (death domain) παίζει σημαντικό ρόλο στην μετάδοση του σήματος από την κυτταρική επιφάνεια στις ενδοκυττάρειες οδούς. Το εξωγενές μονοπάτι περιλαμβάνει τους υποδοχείς θανάτου TNFR1 (Tumor necrosis factor receptor 1), DR3 (Death receptor 3), DR4 (Death receptor 4), DR5 (Death receptor 5), DR6 (Death receptor 6), το σύμπλεγμα Fas και τις κασπάσες 8 και 10 που τελικά ενεργοποιούν τις υπόλοιπες κασπάσες οδηγώντας στην απόπτωση (Elmore S. et al 2007).

Η αλληλουχία των γεγονότων της απόπτωσης για το εξωγενές μονοπάτι χαρακτηρίζονται καλύτερα από τα σύμπλοκα προσδέτη-υποδοχέα FasL (Fatty acid synthetase ligand)/FasR (Fatty acid synthetase receptor) και TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha)/TNFR1 (Tumor necrosis factor receptor 1) (Elmore S. et al 2007). Το σύστημα FasL/FasR ρυθμίζει την απομάκρυνση των περιφερειακών ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων, των κυττάρων που είναι μολυσμένα από ιό και των καρκινικών κυττάρων. Το σύστημα TNF- $\alpha$ /TNFR1 συμμετέχει στην δημιουργία φλεγμονώδων αποκρίσεων σε συνθήκες έντονης φόρτισης (Μαργαρίτης Λ.Χ 2004). Σε αυτά τα μοντέλα υπάρχει ένα συσσωμάτωμα υποδοχέων οι οποίοι συνδέονται με ομόλογους τριμελείς προσδέτες. Όταν, προσδεθεί ο προσδέτης, στρατολογούνται κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και συνδέονται με τους υποδοχείς (Elmore S. et al 2007). Η σύνδεση του προσδέτη Fas έχει ως αποτέλεσμα την σύνδεση σε αυτόν του πρωτεϊνικού προσαρμοστή FADD (Fas-associated death domain protein). Στην περίπτωση του προσδέτη και

υποδοχέα TNF έχουμε σύνδεση του προσαρμογέα TRADD (TNF receptor-associated death domain). Η πρωτεΐνη FADD συνδέεται με την προ-κασπάση-8 (Elmore S. et al 2007). Στην συνέχεια, ένα σύστημα πρωτεϊνών DISC (death-inducing signaling complex) σχηματίζεται και οδηγεί με αυτο-πρωτεολυτική δράση την προ-κασπάση-8 σε ενεργό κασπάση-8 (Elmore S. et al 2007). Η ενεργός κασπάση-8, απελευθερώνεται από το σύμπλοκο του υποδοχέα και μετακινείται στο κυτοσόλιο, όπου αναγνωρίζει εκλεκτικά και πρωτεολύει υποστρώματα, όπως η προ-κασπάση 3 και άλλες προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες (Bid, BH3 interacting domain death agonist) (Μαργαρίτης Λ.Χ 2004). Η παραπάνω οδός μπορεί να ανασταλεί από την πρωτεΐνη c-FLIP (FLICE-inhibitory protein) καθιστώντας ανενεργές τόσο στην πρωτεΐνη FADD όσο και στην κασπάση-8 (Elmore T.S. et al 2007) (Εικόνα 12).

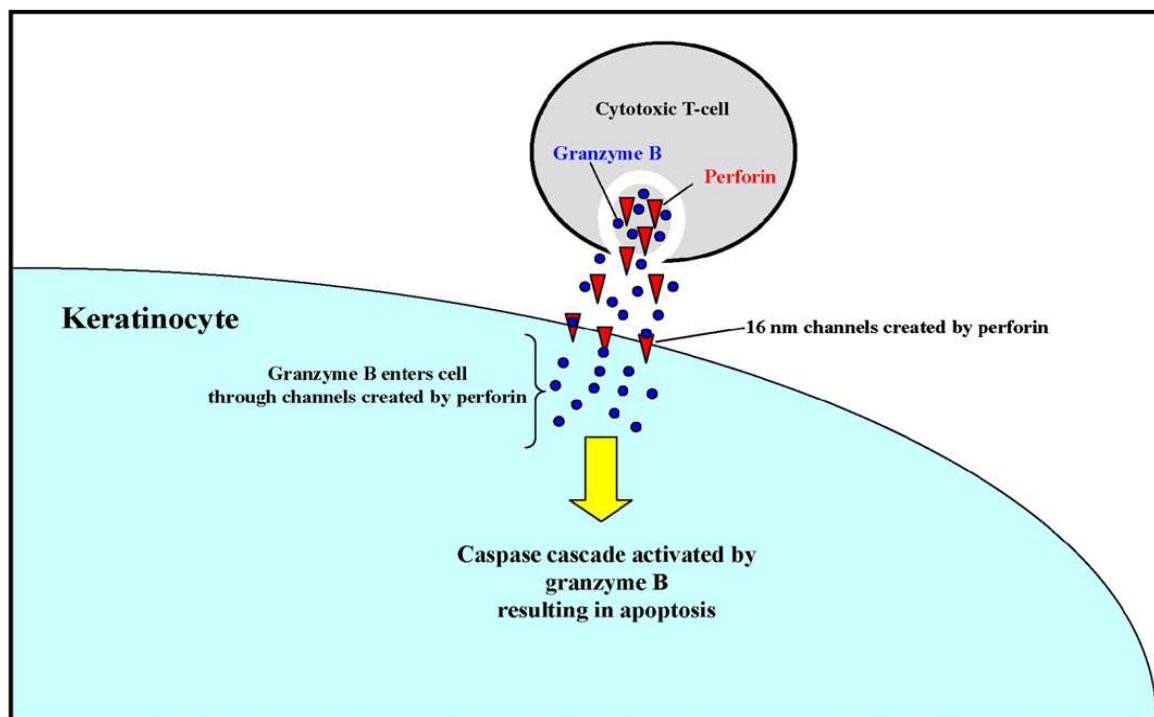


Εικόνα 12: Εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης (SY Wong R. 2011)

### 1.5.5. Αποπτωτική οδός περφορίνης/granzyme

Η περφορίνη και το granzyme είναι αποθηκευμένες πρωτεΐνες σε κοκκία κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (Pereira F.A. et al 2007). Όταν τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα αναγνωρίσουν ένα κύτταρο στόχο, απελευθερώνουν την περφορίνη, η οποία δημιουργεί κανάλια 16 nm στην μεμβράνη του κυττάρου στόχου, με αποτέλεσμα η πρωτεάση granzyme B να περνά μέσα από τους διαύλους και να ενεργοποιεί τις κασπάσες (Pereira F.A. et al 2007). Συγκεκριμένα το granzyme B διασπά πρωτεΐνες ICAD και ενεργοποιεί την προ-κασπάση 10 (Elmore S. et al 2007). Αναφορές έχουν δείξει ότι το granzyme B χρησιμοποιεί η μιτοχονδριακή οδό για να ενισχύσει το σήμα θανάτου με την διάσπαση της Bid και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Elmore S. et al 2007).

Το granzyme A είναι επίσης σημαντικό στα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα για την επαγωγή της απόπτωσης μέσω κασπασών. Το granzyme A προκαλεί διάσπαση στο DNA (Elmore S. et al 2007) (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Αποπτωτική οδός περφορίνης/granzyme (Pereira F.A. et al 2007).

### 1.5.6. Ενδογενές μονοπάτι

Το ενδογενές μονοπάτι επάγει απόπτωση μέσω της παραγωγής ενδοκυτταρικών σημάτων που δρουν κατευθείαν σε κύτταρα στόχους (Elmore S. et al 2007). Ενδοκυτταρικά σήματα που μπορεί να οδηγήσουν σε απόπτωση είναι η απουσία αυξητικών παραγόντων, ορμόνες, ακτινοβολία, τοξίνες, υποξία, υπερθερμία, ιογενείς λοιμώξεις και ελεύθερες ρίζες (Elmore S. et al 2007).

Όλα αυτά τα πιθανά σήματα είναι ικανά να προκαλέσουν αλλαγές στις μιτοχονδριακές μεμβράνες, με αποτέλεσμα την δημιουργία πόρων στην μεμβράνη, προκαλώντας απελευθέρωση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα, όπως είναι το κυτόχρωμα c, με ταυτόχρονη ενεργοποίηση των κασπασών (Elmore S. et al 2007). Το κυτόχρωμα c προσδένει και ενεργοποιεί τον Apaf-1, (Apoptotic protease activating factor) καθώς και την προκασπάση 9 δημιουργώντας ένα αποπτώσωμα, ενεργοποιώντας τελικά την κασπάση 9 (Elmore S. et al 2007).

Άλλες προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες είναι ο AIF (Apoptosis Inducing Factor), η ενδονουκλέαση G και το CAD (Caspase-Activated DNase), οι οποίες απελευθερώνονται από το μιτοχόνδριο, όταν το κύτταρο βρίσκεται σε απόπτωση (Elmore S. et al 2007). Η AIF μεταφέρεται στον πυρήνα και προκαλεί διάσπαση του DNA σε 50-300 Kb και συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης. Η ενδονουκλέαση G επίσης μεταναστεύει στον πυρήνα όπου διασπά την πυρηνική χρωματίνη δημιουργώντας oligo-νουκλεοτίδια (Elmore S. et al 2007). Η πρωτεΐνη CAD απελευθερώνεται από το μιτοχόνδριο και μεταφέρεται στον πυρήνα όπου μετά από την διάσπαση από την κασπάση 3 προκαλείται διάσπαση του DNA σε oligονουκλεοτίδια και συμπυκνώνεται η χρωματίνη (Elmore S. et al 2007).

Ο έλεγχος και η ρύθμιση αυτών των αποπτωτικών μιτοχονδριακών γεγονότων συμβαίνει μέσω μιας οικογένειας πρωτεϊνών της Bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2). Η

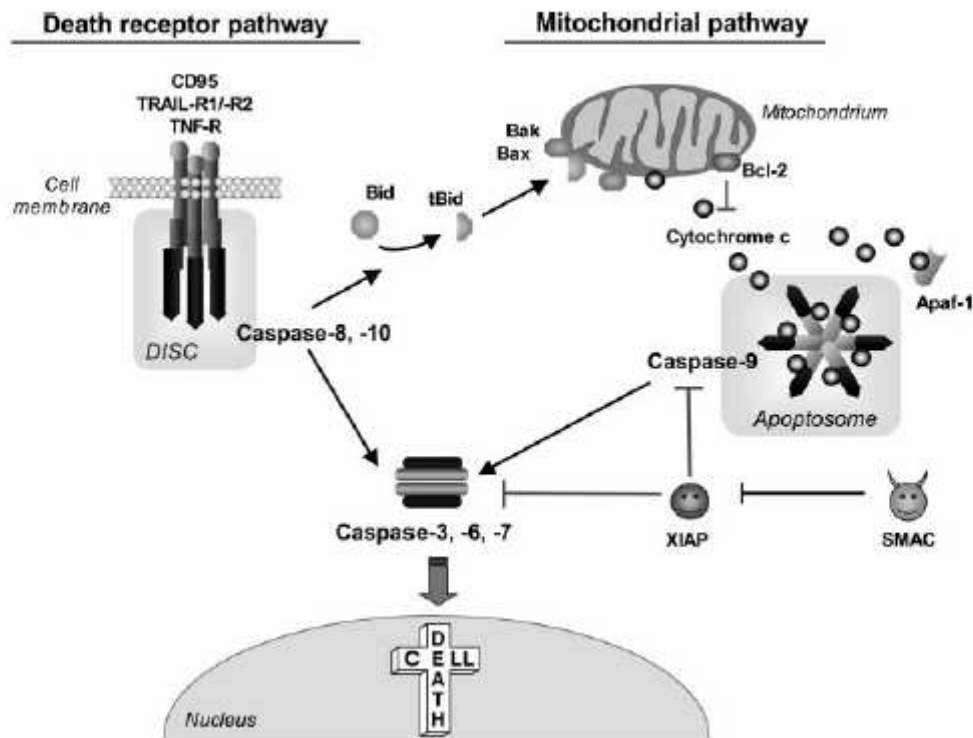
οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 ρυθμίζεται από το ογκοκατασφατικό γονίδιο p53 (Elmore S. et al 2007). Οι πρωτεΐνες Bcl ρυθμίζουν την διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης, συγκεκριμένα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και μπορεί έτσι να θεωρούνται προ-αποπτωτικές (Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, Blk) ή αντι-αποπτωτικές (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG) (Elmore S. et al 2007).

Το ενδογενές μονοπάτι δεν είναι ανεξάρτητο από το μονοπάτι των υποδοχέων (Εικόνα 14). Για παράδειγμα στην υπερ-οικογένεια Bcl-2 ανήκει η Bid πρωτεΐνη (Elmore S. et al 2007). Η ενεργή μορφή της πρωτεΐνης Bid (tBid) ενεργοποιείται από την κασπάση-8, η οποία ενεργοποιήθηκε με την σειρά της από το μονοπάτι των υποδοχέων (Fas ή TNRF υποδοχέα) (Elmore S. et al 2007). Η tBid μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια προκαλώντας την μετακίνηση του κυτοχρώματος c. Επίσης η tBid επεμβαίνει στην λειτουργία και στην τοπολογία της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax (S. Elmore et al 2007).

Η μετακίνηση της πρωτεΐνης Bax από το κυτταρόπλασμα στην μιτοχονδριακή μεμβράνη με την μορφή διμερούς προκαλεί αλλοιώσεις στο ηλεκτρικό δυναμικό, προκαλεί απελευθέρωση ενεργών ριζών υδρογόνου, ενεργοποιεί κασπάσες και απελευθερώνει το κυτόχρωμα c. (Elmore S. et al 2007).

Τέλος και η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bad σχετίζεται δομικά και λειτουργικά με τις δύο πρωτεΐνες Bid και Bax. Η πρωτεΐνη Bad μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στις μιτοχονδριακές μεμβράνες κατά την διάρκεια του αποπτωτικού θανάτου αιμοποιητικών και μυελοειδικών κυττάρων (Elmore S. et al 2007).





Εικόνα 14: Ενδογενές μονοπάτι απόπτωσης (Fischer U. et al 2005).

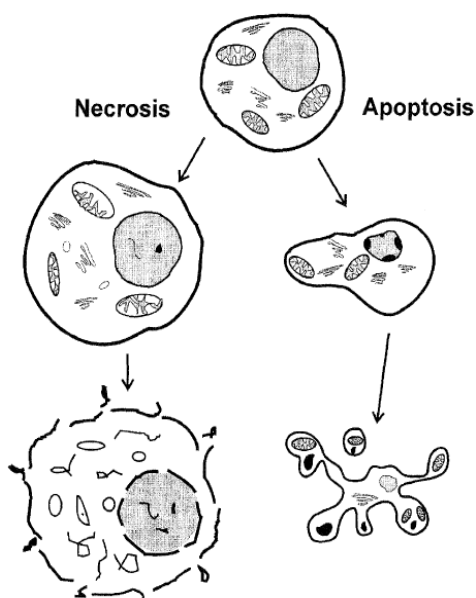
## 1.6. Νέκρωση

Ένας άλλος εναλλακτικός τρόπος θανάτου των κυττάρων είναι η νέκρωση, η οποία θεωρείται μία τοξική διαδικασία για τον οργανισμό, στην οποία τα κύτταρα πεθαίνουν παθητικά χωρίς κατανάλωση ενέργειας (ATP) (Elmore S. et al 2007). Η νέκρωση είναι μια μη-ελεγχόμενη και παθητική διαδικασία και συνήθως επηρεάζει μεγάλες περιοχές κυττάρων (Elmore S. et al 2007).

### 1.6.1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά νέκρωσης

Οι κύριες μορφολογικές αλλαγές που γίνονται κατά την νέκρωση είναι, η διόγκωση των κυττάρων, ο σχηματισμός κυτταροπλασματικών κενотоπιών, η διαστολή του

ενδοπλασματικού δικτύου, ο σχηματισμός κυτταροπλασματικών φυσαλίδων, τα συμπυκνωμένα ή θραυσμένα μιτοχόνδρια, η αποκόλληση των ριβοσωμάτων, οι καταστρεμμένες κυτταρικές μεμβράνες, η ρήξη των λυσοσωμάτων και τελικά η διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης (Εικόνα 15) (Elmore S. et al 2007). Οι απώλειες της ακεραιότητας της μεμβράνης και η απελευθέρωση των κυτταροπλασματικών οργανιδίων, στέλνουν μηνύματα για την ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κυττάρων, σε αντίθεση με την απόπτωση όπου δεν ενεργοποιείται η διαδικασία της φλεγμονής (Elmore S. et al 2007).



Εικόνα 15: Μορφολογικές διαφορές απόπτωσης-νέκρωσης (Robertson J.D. et al 2000)

### **1.7. Αλληλεπίδραση μεταλλικών συμπλόκων με το DNA**

Το DNA αποτελεί ένα κύριο στόχο για τα μεταλλικά σύμπλοκα (Komoret A.C. al 2013). Είναι ζωτικής σημασίας να ερευνηθεί ο τρόπος πρόσδεσης του μεταλλικού

συμπλόκου με το DNA, μέσω της μικρής\μεγάλης αύλακας, της παρεμβολής ή με μικτό τρόπο, με σκοπό να ερευνηθεί ο τρόπος με το οποίο το φάρμακο δρα αποτελεσματικά και εκλεκτικά (Reyzer M.L. et al 2001)

Το DNA μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα μεταλλικά σύμπλοκα είτε αλληλεπιδρώντας με φωσφορικές ομάδες, είτε εντασσόμενα στις βάσεις (Komoret A.C. al 2013).

Το ανιονικό φορτίο των νουκλεϊκών οξέων εξηγεί το λόγο για τον οποίο τα ελεύθερα μέταλλα ή μέταλλα ενταγμένα σε κατιονικές ενώσεις συνδέονται με το DNA. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μεταλλικών ενώσεων και DNA μπορεί να είναι ομοιοπολικές ή μη-ομοιοπολικές και υπάγονται τις παρακάτω περιπτώσεις (Εικόνα 16):

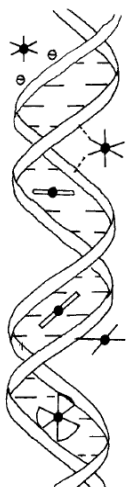
A. ιονική έλξη

B. δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των νουκλεϊκών βάσεων και των υποκαταστατών

Γ. παρεμβολή των μεταλλικών συμπλόκων που περιέχουν επίπεδους ή ετεροατομικούς υποκαταστάτες

Δ. σύνδεση με την αύλακα (μικρή ή μεγάλη) των υποκατάστατων σε συνδυασμό με την γ περίπτωση

Ε. ομοιοπολική σύνδεση με του συμπλόκου με το ετεροκυκλικό μέρος μιας νουκλεοβάσης (σύμπλοκα πλατίνας), είτε με τα φωσφορικά οξυγόνα (σύμπλοκα μαγνησίου), είτε με τα οξυγόνα των πεντοζών (σύμπλοκα χαλκού ή οσμίου (osmium)) ή με συνδυασμό των παραπάνω (Lippert B. 1992)



Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταλλικών συμπλόκων και του DNA (από πάνω προς τα κάτω: ιονική έλξη, δεσμούς υδρογόνου, παρεμβολή, σύνδεση με την μικρή αύλακα, ομοιοπολική σύνδεση και σύνδεση με την μεγάλη αύλακα (Lippert B. 1992).

Ένα φάρμακο που προσδένεται στο DNA μπορεί να παρεμβαίνει στους μηχανισμούς μεταγραφής και αντιγραφής του DNA, με αποτέλεσμα να προκαλεί απόπτωση και να οδηγείται το κύτταρο σε θάνατο (Reedijk J. 2003).

Ένα μεταλλικό σύμπλοκο που έχει την ικανότητα να προσδένεται στο DNA αλλά συγχρόνως παρουσιάζει αντικαρκινική δράση πρέπει να πληροί τις παρακάτω προϋποθέσεις (Reedijk J. 2003):

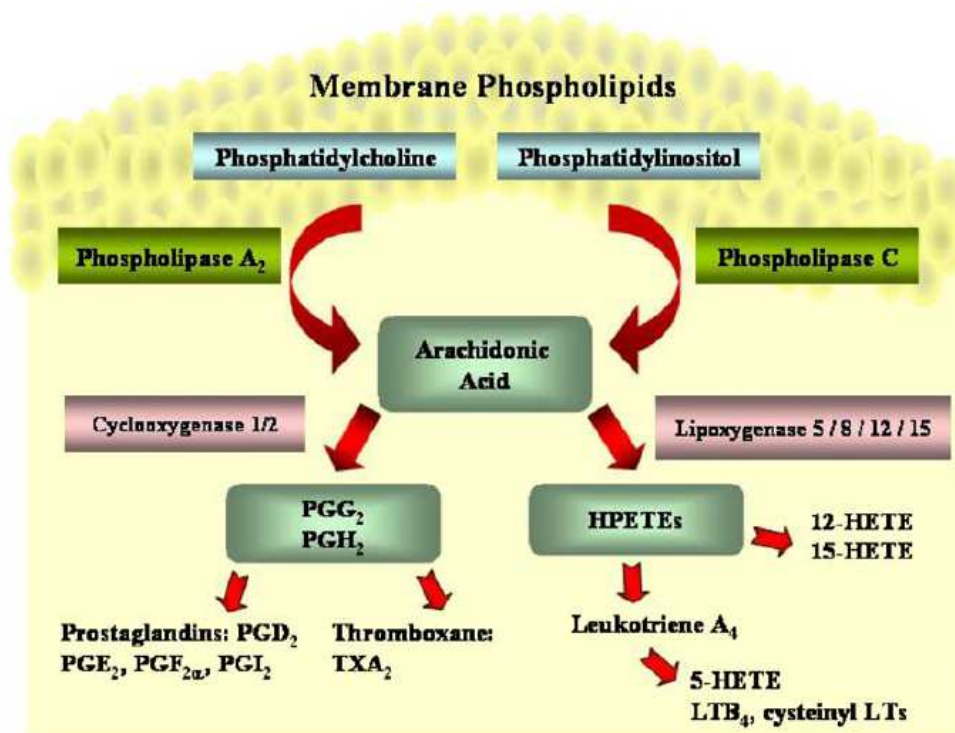
- i. Καλές χημικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της διαλυτότητας και της σταθερότητας για να φτάνει άθικτο στον κυτταρικό στόχο.
- ii. Να μεταφέρεται αποτελεσματικά από το αίμα στις μεμβράνες των κυττάρων
- iii. Να δεσμεύεται αποτελεσματικά με το DNA και να παρουσιάζει μικρή δραστικότητα με τις πρωτεΐνες
- iv. Να έχει την ικανότητα να δρα επιλεκτικά σε καρκινικά κύτταρα, διατηρώντας ανέπαφα τα υγιή κύτταρα.

- v. Τα καρκινικά κύτταρα να είναι ανθεκτικά στην δράση των μεταλλικών συμπλόκων όπως και να είναι πιο ανθεκτικά σε σχέση με το ήδη χρησιμοποιούμενο φάρμακο cisplatin και τα παράγωγα του

### ***1.8. Αλληλεπίδραση με λιποξυγενάση***

Η αλληλεπίδραση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, του μεταβολισμού των λιπιδίων, της φλεγμονής και της καρκινογένεσης έχει μελετηθεί εκτενώς, αποκαλύπτοντας πιθανόν ενδεχόμενους στόχους θεραπείας και πρόληψης πληθώρας τύπων καρκίνου (Pidgeon G.P. et al 2007).

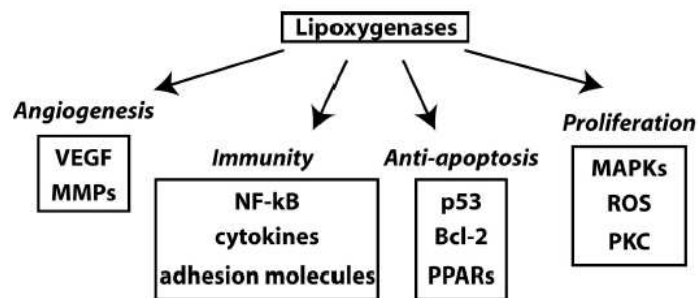
Τρία είδη ενζύμων, κυκλοξυγενάσες, εποξυγενάσες (κυτόχρωμα P450) και οι λιποξυγενάσες μπορούν να ρυθμίσουν τον μεταβολισμό του αραχιδονικού σε εικοσανοειδή (Εικόνα 17). Τα λιποξείδια των υπεροξειδίων που παράγονται από αυτόν τον μεταβολισμό μπορούν να ρυθμίσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την κυτταρική διαφοροποίηση και την γήρανση (Pidgeon G.P. et al 2007). Αυτά τα ένζυμα παράγουν προϊόντα διαφορετικής βιολογικής δραστηριότητας εισάγοντας οξυγόνο σε διαφορετικές θέσεις στο υπόστρωμα (Catalano A. et al 2005).



Εικόνα 17: Τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών μετατρέπονται σε αραχιδονικό από την φωσφολιπάση A<sub>2</sub> και C. Το αραχιδονικό στην συνέχεια μεταβολίζεται σε δύο μονοπάτια. Στο πρώτο (μονοπάτι αραχιδονικού) μετατρέπεται σε μη σταθερά κυκλικά ενδοπεροξείδια (PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>), τα οποία μετατρέπονται σε προσταγλανδίνες και θρομβοξάνες. Το δεύτερο μονοπάτι (μονοπάτι λιποξυγενάσης) μεταβολίζει το αραχιδονικό σε υδρο-περοξείδια (HPETE<sub>s</sub>), τα οποία μετατρέπονται σε HETE και λευκοτριένια A<sub>4</sub>. τα λευκοτριένια A<sub>4</sub> μεταβολίζονται σε LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> και LTE<sub>4</sub> (Pidgeon G.P. et al 2007).

Το ένζυμο λιποξυγενάση είναι σημαντικό στους ανθρώπους και εκφράζεται όμως στα ζώα και στα φυτά. Η λιποξυγενάση των θηλαστικών έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στην παθογένεια της φλεγμονής σε νόσους όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση και το άσθμα (Maccarrone M. et al 2001). Πιστεύεται επίσης ότι παίζει ρόλο στην αθηροσκλήρωση, στην εγκεφαλική γήρανση, στην λοίμωξη από HIV, στην νεφρική νόσο και στη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων (Maccarrone M. et al 2001). Η λιποξυγενάση και τα μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται στην ενεργοποίησή της είναι σημαντικά για την καρκινογένεση και για την ανάπτυξη του όγκου (Εικόνα 18)

(Catalano A. et al 2005). Έρευνες έχουν δείξει την σημαντικότητα της οδού της λιποξυγενάσης στην ανάπτυξη του καρκίνου του παγκρέατος, του μαστού, του προστάτη και του εντέρου (Tong W.G. et al 2002). Έχει βρεθεί ότι αναστολείς της λιποξυγενάσης επάγουν απόπτωση μέσω της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα (μιτοχονδριακή οδό απόπτωσης) (Tong W.G. et al 2002). Η λιποξυγενάση-1 (LOX-1) είναι μια 15-λιποξυγενάση και χρησιμοποιείται ως πρότυπο για την μελέτη ομόλογων οικογενειών λιποξυγενάσης από ιστούς διαφορετικών ειδών με δομικές και κινητικές διαφορές (Maccarrone M. et al 2001)



Εικόνα 18: Οι LOXs επάγουν τέσσερα είδη μορίων. Πρώτον τα μόρια που συμμετέχουν στον έλεγχο της αγγειογένεσης, δεύτερον, μόρια που εξυπηρετούν λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος, τρίτον, μόρια που ελέγχουν τον κυτταρικό θάνατο και τέταρτον, μόρια που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Catalano A. et al 2005).

### 1.9. Φλεγμονή και καρκινογένεση

Έρευνες που σχετίζουν την φλεγμονή και τον καρκίνο είναι γνωστές εδώ και πολλά χρόνια (Catalano A. et al 2005). Όμως ο επακριβής μηχανισμός που συνδέει την φλεγμονή με την καρκινογένεση παραμένει άγνωστος (Catalano A. et al 2005). Μερικά

ειδή ενζύμων, όπως η λιποξυγενάση (LOX) και ενεργοποιούνται σε απόκριση στην φλεγμονή. Πιθανόν ο συνδετικός κρίκος αυτών των δύο διαδικασιών είναι η LOX (Catalano A. et al 2005). Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη των MCF-7 καρκινικών κυττάρων μαστού φαίνεται να σχετίζεται με τις προσταγλανδίνες και την παραγωγή λευκοτριενίων (Wallace J.M. 2002). Επωάζοντας τα καρκινικά κύτταρα με έναν αναστολέα της LOX (όπως το nordihydroguaiaretic acid) παρατηρείται αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού *in vitro*, ενώ η επώαση παρουσία ενός αναστολέα κυκλοξυγενάσης (COX) δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (όπως η indomethacin) (Wallace J.M. 2002). Η ανάπτυξη του αδενοκαρκινώματος ίσως αναστέλλεται από αναστολείς της LOX *in vivo* (Wallace J.M. 2002).

Η έκφραση των ενζύμων της LOX μεταβάλλεται στην περίπτωση του καρκίνου και μελέτες έχουν δείξει ότι αυτό το μονοπάτι εμπλέκεται στην καρκινογένεση και στην ανάπτυξη του όγκου (Guo C. et al 2012). Μελέτες με ζώα δείχνουν ότι αυτά τα ένζυμα, είναι πιθανοί στόχοι για παρέμβαση στην ανάπτυξη του καρκίνου επειδή μειώνουν την πιθανότητα εμφάνισης του όγκου (Guo C. et al 2012). Δυστυχώς αυτά τα δεδομένα δεν έχουν ακόμα προχωρήσει σε κλινικό επίπεδο μελέτης (Guo C. et al 2012). Η ανάπτυξη νέων αναστολέων της LOX ή μεταβολιτών της LOX ή των υποδοχέων τους, μπορεί να παρέχει καινοτόμες και αποτελεσματικές στρατηγικές θεραπείας (Guo C. et al 2012).

### ***1.10. Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs)***

Περίπου πριν από 3.500 χρόνια στην αρχαία Αίγυπτο, ο πάπυρος με επεξεργασία ενός αφεινήματος αποξηραμένων φύλλων μυρτιάς βοηθούσε στην ανακούφιση από ρευματικούς πόνους (Vane J.R. et al 1998). Χίλια χρόνια αργότερα, ο Ιπποκράτης



συνιστούσε τους χυμούς της λεύκας για τη θεραπεία των ματιών από ασθένειες, καθώς και χυμούς από φλοιό ιτιάς για να ανακουφίσει τον πόνο κατά τον τοκετό και να μειώσει τον πυρετό (Vane J.R. et al 1998). Όλα αυτά τα παραπάνω φυτικά συστατικά περιέχουν σαλικυλικό οξύ και παράγωγα του (Vane J.R. et al 1998).

Το 30 μ.Χ., ο Κέλσος περιγράφει τα χαρακτηριστικά της φλεγμονής (οίδημα, ερυθρότητα, θερμότητα, πόνο) και χρησιμοποιεί εκχυλίσματα φύλλων ιτιάς για την ανακούφιση (Vane J.R. et al 1998). Καθ' όλη τη ρωμαϊκή εποχή η χρήση εκχυλισμάτων που περιέχουν σαλικυλικό οξύ χρησιμοποιήθηκε ευρέως και κυρίως χρησιμοποιήθηκε ο φλοιός της ιτιάς. Αυτό συνέβαινε επίσης στην Κίνα καθώς και σε άλλες περιοχές της Ασίας (Vane J.R. et al 1998).

Το σαλικυλικό οξύ συντέθηκε στην Γερμανία το 1859 και χρησιμοποιήθηκε ως αντισηπτικό και αντιπυρετικό καθώς και για την θεραπεία της ρευματοειδής αρθρίτιδας (Vane J.R. et al 1998). Ο F. Hoffman το 1899, στη συνέχεια, συνέθεσε το ακετυλοσαλικυλικό οξύ (ή την ασπιρίνη) (Vane J.R. et al 1998). Στις αρχές του 1900, η θεραπευτική δράση της ασπιρίνης (και του σαλικυλικού νατρίου) αναγνωρίστηκε ως αντιπυρετική, αντιφλεγμονώδης και αναλγητική (Vane J.R. et al 1998). Με την πάροδο του χρόνου, διάφορα άλλα φάρμακα εμφανίζουν μερικές ή και όλες από τις δράσεις της ασπιρίνης (Vane J.R. et al 1998). Τα φάρμακα αυτά περιλαμβάνουν την αντιπυρίνη (antipyrine), την φαινακετίνη (phenacetin), την ακεταμινοφαίνη ή παρακεταμόλη (acetaminophen), το phenylbutazone, και, πιο πρόσφατα, τα φεναμικά παράγωγα (fenamates), την ινδομεθακίνη (indomethacin) και τη ναπροξένη (naproxen) (Vane J.R. et al 1998). Λόγω της ομοιότητας τα φάρμακα αυτά έτειναν να θεωρηθούν ως μία ομάδα. Επειδή διαφέρουν από τα γλυκοκορτικοειδή (άλλη μεγάλη ομάδα παραγόντων που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της φλεγμονής), τα φάρμακα αυτά ονομάζεται "μη στεροειδή αντι-φλεγμονώδη φάρμακα" (NSAIDs) (Vane J.R. et al 1998).

Εκτός από την ποικιλία των χημικών δομών των παραπάνω φαρμάκων, όλα τα φάρμακα εμφανίζουν τις ίδιες θεραπευτικές ιδιότητες και τις ίδιες παρενέργειες (Vane J.R. et al 1998). Έτσι είναι βέβαιο ότι οι δράσεις αυτών των φαρμάκων βασίζονται σε μία κοινή βιοχημική οδό (Vane J.R. et al 1998).

#### 1.10.1. Μηχανισμός δράσης NSAIDs

Ο μηχανισμός της δράσης των NSAIDs εμπλέκεται στην φλεγμονή, στον πόνο και στον πυρετό (Dugowson C.E. et al 2006).

##### a. Αντιφλεγμονώδης δράση

Τα NSAIDs ασκούν την αντιφλεγμονώδη δράση με αναστολή της συνθετάσης των προσταγλανδινών ή της κυκλοξυγενάσης (COX) (Dugowson C.E. et al 2006). Η κυκλοξυγενάση έχει δύο τύπους την COX-1 και COX-2 (Dugowson C.E. et al 2006). Η εκλεκτική αναστολή της COX-2 οδηγεί σε λιγότερες παρενέργειες από το γαστρεντερικό σύστημα. Πρόσφατες έρευνες, προτείνουν ότι η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά και μορίων προσκόλλησης παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των κυττάρων κατά την φλεγμονή (Dugowson C.E. et al 2006). Τα NSAIDs αναστέλλουν μερικά μόρια προσκόλλησης και αναστέλλουν έτσι την λειτουργία των ουδετερόφιλων (Dugowson C.E. et al 2006).

Επίσης, πολλά NSAIDs δυναντούν να αναστέλλουν τις λιποξυγενάσες *in vitro* και *in vivo* στα ζώα (Oates J.A. et al 1991). Έτσι η δικλοφενάκη και η ινδομεθακίνη μειώνουν την παραγωγή των λευκοτριενίων και προσταγλανδινών από τα λεμφοκύτταρα (Oates J.A. et al 1991).

b. Αναλγητική δράση

Τα NSAIDs παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία του πόνου, αυξάνουν την περιφερειακή ευαισθητοποίηση, που παρατηρείται κατά την διάρκεια της φλεγμονής και αναστέλλουν τους αισθητικούς υποδοχείς του πόνου (. Dugowson C.E et al 2006).

c. Αντιπυρετική δράση

Τα NSAIDs ασκούν την αντιπυρετική τους δράση με αναστολή της σύνθεσης της προσταγαλνδίνης E2, η οποία είναι υπεύθυνη για την απόκριση του υποθαλάμου στην αύξηση της θερμοκρασίας κατά την φλεγμονή (. Dugowson C.E et al 2006).

*1.10.2. Φαρμακοκινητική των NSAIDs*

Τα NSAIDs μεταβολίζονται αρχικά στο ήπαρ. Έχουν διαφορετικό χρόνο ημι-ζωής και βιοδιαθεσιμότητα, επιτρέποντας την χορήγηση διαφορετικών δόσεων φαρμάκου (. Dugowson C.E et al 2006). Η παρατεταμένη διάρκεια χορήγησης των NSAIDs επιφέρει προβλήματα στην νεφρική λειτουργία. Επίσης, εικάζεται ότι η καθημερινή χορήγηση των NSAIDs, μειώνει τον κίνδυνο από αιμορραγία του γαστρεντερικού συστήματος (Dugowson C.E. et al 2006). Οι διαφορετικές παρενέργειες των NSAIDs φαίνονται ότι δεν οφείλονται στην διαφορετική φαρμακοκινητική αλλά κυρίως στην ηπατική και νεφρική λειτουργία καθώς και στην ηλικία του ατόμου (Dugowson C.E. et al 2006).

*Επίδραση στα αιμοπετάλια*

Η ασπιρίνη και τα μη εκλεκτικά-NSAIDs αναστέλλουν την λειτουργία των αιμοπεταλίων μέσω της αναστολής του ενζύμου COX-1. Στη περίπτωση της ασπιρίνης, η αναστολή είναι μη ανεστρέψιμη, έτσι η επίδραση στην λειτουργία των αιμοπεταλίων

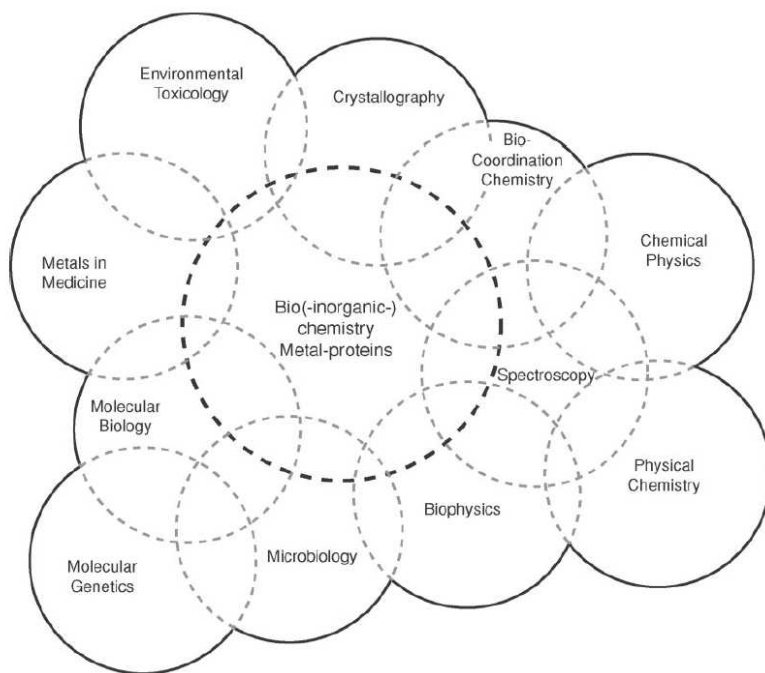
παραμένει όσο και η διάρκεια ζωής τους (7-10 μέρες). Στην περίπτωση των μη εκλεκτικών NSAIDs η αναστολή είναι αναστρέψιμη, άρα η επίδραση διαρκεί όσο και ο χρόνος ημιζωής του φαρμάκου (2-12 ώρες) (Dugowson C.E. et al 2006).

### *1.10.3. Καρκίνος και NSAIDs*

Ένας αριθμός επιδημιολογικών ερευνών έχουν δείξει ότι η μακροχρόνια χρήση ασπιρίνης/NSAIDs σχετίζεται με 30-50% μείωση της εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου ή αδενωματωδών πολυπόδων (Zha S. et al 2004). Επιπλέον, μελέτες δείχνουν ότι η διάρκεια χορήγησης των NSAIDs είναι πιο σημαντική από την δόση του φαρμάκου για την θεραπεία. Άλλες επιδημιολογικές μελέτες διαπιστώνουν συσχετίσεις μεταξύ NSAIDs και χαμηλού ποσοστού θανάτου από περιπτώσεις καρκίνου όπως του οισοφάγου, στομάχου, μαστού, πνεύμονα, προστάτη, ουροδόχου κύστης και ωοθηκών (Zha S. et al 2004). Η αυξημένη συγκέντρωση προσταγλανδίνης (PGE<sub>2</sub> και TxA<sub>2</sub>) στο καρκίνο του μαστού αναφέρθηκε στις αρχές του 1980 (Zha S. et al 2004). Η μακροχρόνια χρήση των NSAIDs έχει επίσης συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού (Zha S. et al 2004). Οι Kargman et al. δεν βρίσκουν να εκφράζεται η COX-2 στο καρκίνο του μαστού αλλά ανιχνεύουν σημαντική επίπεδα έκφρασης της COX-2 σε δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου (Zha S. et al 2004). Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η μακροχρόνια χρήση των NSAIDs οδηγεί σε 40-50% μείωση του καρκίνου του μαστού (Wallace J.M. 2002). Σημαντική μείωση του όγκου μπορεί να επιτευχθεί με χορήγηση ιμπουπροφένης ή celecoxib σε ποντικούς με καρκίνο μαστού (Wallace J.M. 2002).

### 1.11. Βιοανόργανη Χημεία -Μεταλλοθεραπευτικά

Η Μεταλλομική ή Βιοανόργανη Χημεία είναι ένα νέο πεδίο, παρόλο που από τον 19<sup>ο</sup> αιώνα υπάρχουν πολλές αναφορές για μέταλλα που δεσμεύονται με πρωτεΐνες ή ένζυμα (Beinert H. 2002). Βιοανόργανη Χημεία είναι ένα πολυσυνθετο-επιστημονικό πεδίο που συνδυάζει γνώσεις κλάδων Βιολογικών Επιστημών και Ανόργανης Χημείας και απαιτεί την εφαρμογή προηγμένων φυσικών και θεωρητικών μεθοδολογιών (Εικόνα 19) (Garner C.D. 1997, Beinert H. 2002)



Εικόνα 19: Επικαλυπτόμενα πεδία της Βιοανόργανης Χημείας (Beinert H. 2002)

Η κατανόηση ενός βιολογικού συστήματος και η αναγνώριση των μοναδικών χαρακτηριστικών του, απαιτούν συμπληρωματικές πληροφορίες από χημικά συστήματα (Garner C.D. 1997, Beinert H. 2002). Επιπλέον, είναι απαραίτητες οι φασματοσκοπικές

τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των κέντρων μετάλλων σε βιολογικά συστήματα (Garner C.D. 1997, Beinert H. 2002).

### ***1.12. Χρήση και εφαρμογή των μετάλλων στην ιατρική***

#### *1.12.1. Μεταλλικά ιόντα σε ασθένειες. Χρήση χηλικών παραγόντων*

Χηλικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται για να θεραπεύσουν την περίσσεια του μεταλλικού ιόντος που οφείλεται είτε σε εξωγενή δηλητηρίαση από κατάποση ή σε μεταβολικές ανωμαλίες των ενδογενών μετάλλων οδηγώντας σε συσσώρευση, όπως στη νόσο του Wilson (χαλκός, Cu) και στην Θαλασσαιμία (σίδηρος, Fe). Επίσης χηλικοί παράγοντες έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της σύφιλης (Farrell N. 2002).

#### *1.12.2. Μεταλλοπρωτεΐνες ως στόχοι φαρμάκου*

Ο ρόλος των μεταλλοπρωτεϊνών για την ανθρώπινη υγεία παρουσιάζει αυξανόμενο ενδιαφέρον λόγω της μεγάλης σημασίας της γενετικής ρύθμισης των πρωτεϊνών αυτών (Farrell N. 2002). Πρόοδοι στην κατανόηση του μηχανισμού επίδρασης των μετάλλων στα κύτταρα και στην γενετική βάση της ασθένειας, έχουν ως αποτέλεσμα την εισαγωγή της Βιοανόργανης Χημείας στις σύγχρονες επιστήμες (Farrell N. 2002).

#### *1.12.3. Τα κυτταρικά οργανίδια στόχοι των μετάλλων*

Τα μιτοχόνδρια συνδράμουν στην ρύθμιση της παραγωγής ενέργειας, του μεταβολισμού, της οξειδοαναγωγής και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Farrell N. 2002). Το μιτοχονδριακό DNA είναι ένας σημαντικός στόχος γιατί είναι

περισσότερο ευαίσθητο σε ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις σε σχέση με το πυρηνικό DNA λόγω της έλλειψης ιστονών (Farrell N. 2002). Λιπόφιλα κατιόντα συσσωρεύονται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων, ως συνέπεια του υψηλότερου δυναμικού μεμβράνης (Farrell N. 2002).

#### *1.12.4. Αλληλεπίδραση μετάλλου-φαρμάκου*

Πολλά φάρμακα περιέχουν περιοχές πρόσδεσης μετάλλων, οι οποίες αλλάζουν τις ιδιότητες του ελεύθερου μετάλλου (Farrell N. 2002). Για παράδειγμα, η κυτταρική πρόσληψη του συμπλόκου χαλκού-θειοσεμικαρβαζονών βελτιώνεται σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη λόγω της αυξημένης λιποφιλίας του συμπλόκου (Farrell N. 2002).

#### *1.12.5. Μεταλλοθεραπευτικά φάρμακα*

Φαρμακευτικές ουσίες, ο μεταβολισμός και τρόπος δράσης των μεταλλικών συμπλόκων είναι επιστημονικά πεδία που μελετώνται σήμερα ευρέως. Οι μελέτες αυτές, σε συνδυασμό με χημικές μελέτες οδηγούν στην κατανόηση της βιολογικής συμπεριφοράς των συμπλόκων αλλά και στον σχεδιασμό και στην ανάπτυξη νέων παραλλαγών (Garner C.D. 1997). Οι παραπάνω μελέτες είναι σημαντικές για τα μεταλλικά αντικαρκινικά σύμπλοκα, με σκοπό πάντοτε να παρακαμφθεί η αντίσταση των κυττάρων και να μειωθούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες (Garner C.D. 1997).

Το cisplatin είναι πιθανώς το πιο γνωστό παράδειγμα φαρμάκου που περιέχει μέταλλο. Η χρήση και η αποτελεσματικότητα του είναι καλά τεκμηριωμένες (Farrell N. 2002). Σήμερα, έχουν ανακαλυφθεί, φάρμακα δεύτερης γενιάς βασισμένα στο cisplatin, στα οποία έχει βελτιωθεί η τοξικότητα τους και το εύρος της αντικαρκινικής τους επίδρασης (Farrell N. 2002). Σήμερα το carboplatin και στην συνέχεια το oxaliplatin

χρησιμοποιούνται κλινικά (Farrell N. 2002). Οι επιστήμονες πλέον προσπαθούν να συνθέσουν ανόμοιες δομικά ουσίες με το cisplatin και να δημιουργήσουν διαφορετικά παράγωγα Pt/DNA που θα οδηγήσουν σε ενώσεις με μεγαλύτερο φάσμα κλινικής δραστηριότητας από ότι το cisplatin (Farrell N. 2002).

Ένα πλήθος από σύμπλοκα της πλατίνας(IV) έχουν υποβληθεί σε κλινικές δοκιμές, συμπεριλαμβανων του tetraplatin, CHIP (ή Iproplatin) και του πιο πρόσφατα συντεθέντος JM-216. Επίσης trans-σύμπλοκα Pt(IV) έχουν δοκιμαστεί *in vivo* (Farrell N. 2002).

Σύμπλοκα ρουθηνίου και ροδίου έχουν αποδεχτεί ότι είναι ελπιδοφόρα για χρήση σαν φάρμακα (Farrell N. 2002).

Η χημειοθεραπεία έχει ως σκοπό τα φάρμακα να εισβάλλουν στον οργανισμό χωρίς να τραυματίσουν τον ξενιστή (Farrell N. 2002). Ο κύριος υποδοχέας για οποιοδήποτε φάρμακο είναι οι πρωτεΐνες του πλάσματος και ιδιαίτερα στον ανθρώπινο ορό η αλβουμίνη (Farrell N. 2002). Παρά την έντονη μελέτη της αλληλεπίδρασης Pt/DNA μόλις πρόσφατα έχουν δημοσιευτεί λεπτομερείς μελέτες σχετικά με την αλβουμίνη (Farrell N. 2002). Είναι πλέον αδήριτη ανάγκη να γίνει κατανοητός ο μεταβολισμός των μεταλλικών συμπλόκων (Farrell N. 2002).

#### 1.12.6. Ραδιοϊσότοπα στην ιατρική

Η *in vivo* χρήση των μεταλλικών ραδιοϊσοτόπων είτε των συμπλόκων τους στην ανίχνευση και την θεραπεία του καρκίνου όπως και στην απεικόνιση είναι σημαντική (Farrell N. 2002).



### 1.13. Ιατρικές Εφαρμογές Αργύρου

Ο άργυρος έχει μακρά ιστορία στην θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων της επιληψίας, ασθενειών του οφθαλμού, αφροδισιακών νοσημάτων, χολέρας, δυσεντερίας και δερματικών παθήσεων. Αργυρούχα χειρουργικά μεταλλικά εργαλεία χρησιμοποιούνταν από τους χειρουργούς από τον Μεσαίωνα (Lansdown A.B. 2010). Για αιώνες, ο άργυρος ήταν γνωστός για τις αντι-βακτηριακές του ιδιότητες (Atiyeh B.S. et al 2007). Ο Ιπποκράτης είχε αναφέρει πρώτος τις επούλωτικές του ιδιότητες (Biersack B. et al 2012). Ήδη από το 1000 π.Χ, χρησιμοποιούσαν τις αντι-βακτηριακές ιδιότητες του αργύρου για την μεταφορά πόσιμου νερού (Atiyeh B.S. et al 2007). Πριν την χρήση των αντιβιοτικών τον 20ο αιώνα, χρησιμοποιήθηκε για την θεραπεία του τέτανου, της γονόρροιας, του κρυολογήματος και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Atiyeh B.S. et al 2007). Επίσης, ενδιαφέρον προέκυψε για την θεραπεία εγκαυμάτων, αλλά το ενδιαφέρον εξαφανίστηκε στον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο (Atiyeh B.S. et al 2007).

Στην συνέχεια, ο C.A. Moyer ανακάλυψε ότι ο νιτρικός άργυρος μπορεί να θεραπεύσει τα εγκαύματα (Klasen H.J. 2000). Εφόσον, μέχρι τότε, η ανάπτυξη των μικροοργανισμών και η διείσδυση μέσα στον οργανισμό αποτελούσε εξέχον πρόβλημα, οδηγώντας την έρευνα στον εντοπισμό ενός αντισηπτικού παράγοντα για την πρόληψη των λοιμώξεων (Klasen H.J. 2000). Το πλεονέκτημα της θεραπείας με νιτρικό άργυρο είναι ότι δεν ανεπτυσσόταν αντίσταση στο φάρμακο αυτό (Klasen H.J. 2000).



C.A. Moyer  
(1908-1970)

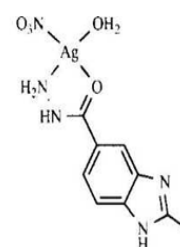
Η χρυσή τομή για την θεραπεία των εγκαυμάτων έγινε με την εισαγωγή της σουλφαδιαζίνης του αργύρου (Ag-SD), από τον C.L. Fox (Atiyeh B.S. et al 2007). Τα

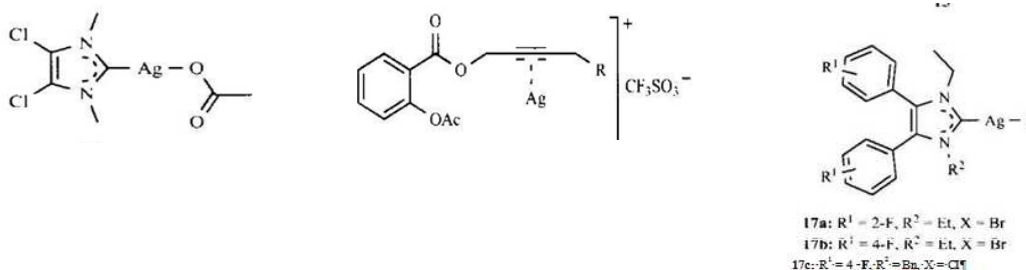
ευεργετικά αποτελέσματα του αργύρου στην θεραπεία του τραύματος και στη επούλωση οφείλονται στην αντιμικροβιακή του δράση (Atiyeh B.S. et al 2007). Μία πιθανή εξήγηση της δράσης του συμπλόκου είναι ίσως η ισχυρή σύνδεση της Ag-SD με το DNA (Klasen H.J. 2000). Αυτοί οι δεσμοί διαφέρουν σε σχέση με τον νιτρικό άργυρο ή άλλα αργυρούχα άλατα (Klasen H.J. 2000). Επίσης, ένας άλλος λόγος της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου είναι ότι αντιδρά με το χλωριούχο νάτριο του ορού οδηγώντας σε σταδιακή απελευθέρωση των ιόντων αργύρου στην πληγή (Klasen H.J. 2000). Έτσι ακόμη και μια μικρή ποσότητα μπορεί να είναι αποτελεσματική.

Γενικά, ο άργυρος είναι αποτελεσματικός σε μια ευρεία ομάδα Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων (Biersack B. et al 2012). Τα ιόντα φαίνεται, να καταστρέφουν τις κυτταρικές μεμβράνες των μικροβίων και παρεμβαίνουν σε ένζυμα κλειδιά οδηγώντας σε διακοπή της αναπνευστικής αλυσίδας ενώ παράλληλα εμποδίζουν την αντιγραφή του DNA και του RNA (Biersack B. et al 2012).

#### **1.14. Μεταλλοθεραπευτικά Σύμπλοκα Αργύρου(I)**

Ένα σύνολο αντικαρκινικών συμπλόκων αργύρου(I) με ποικίλους υποκαταστάτες έχει ερευνηθεί τα τελευταία χρόνια (Biersack B. et al 2012). Οι Galal et al. δημοσίευσαν ένα σύμπλοκο αργύρου(I) με υποκαταστάτη N,O-chelating benzimidazole-5-carboxyhydrazide. Το σύμπλοκο αυτό ανέστειλε τον καρκίνο του μαστού ( $IC_{50} = 2.0 \mu M$ ) (Biersack B. et al 2012).





Οι ερευνητές Gust et al. συνέθεσαν ένα σύμπλοκο με υποκαταστάτη propargyl acetylsalicylates (Biersack B. et al 2012). Αυτό εμφάνισε κυτταροτοξικότητα σε καρκινικές σειρές μαστού ορμονοεξαρτώμενες (MCF-7) και μη ορμονοεξαρτώμενες (MDA-MB-231) (Biersack B. et al 2012). Οι τιμές αναστολής του 50% της ανάπτυξης των κυττάρων (IC<sub>50</sub>) για τα MCF-7, MDA-MB-231 είναι 4.9 μM και 5.0 μM, αντίστοιχα. Επίσης, έχει βρεθεί ότι το σύμπλοκο αυτό αναστέλλει το ένζυμο COX-1 σε ποσοστό 36.6% (Biersack B. et al 2012). Επιπλέον, σύμπλοκα αργύρου(I) με υποκαταστάτες καρβένια δείχνουν επίσης κυτταροτοξικότητα (Biersack B. et al 2012). Οι Youngs et al. αναφέρουν ότι το σύμπλοκο με ενταγμένο τον υποκαταστάτη acetate-imidazol-2-ylidene αναστέλλει την ανάπτυξη των μαστικών καρκινικών κυττάρων MDA-MB-157 αποτελεσματικότερα από ότι το cisplatin (Biersack B. et al 2012). Επίσης, *in vivo* μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια χωρίς να παρατηρείται καμμία παρενέργεια. Άλλες ερευνητικές ομάδες έχουν βρει ότι τα σύμπλοκα αργύρου(I) με καρβένια, με υποκαταστάτες που προέρχονται από 4,5-diarylimidazole εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα σε μαστικά καρκινικά κύτταρα από 3.4-3.6 μM (Biersack B. et al 2012).

Πρόσφατα, πραγματοποιήθηκαν μελέτες για την κυτταροτοξικότητα των νανοσωματιδίων αργύρου σε καρκινικά μαστικά κύτταρα με υποδοχείς οιστρογόνων (T47D) (IC<sub>50</sub> = 6.31 mg/mL) (Biersack B. et al 2012). Επίσης, τα σύμπλοκα αυτά είναι πιο κυτταροστατικά σε συγκέντρωση 2.5 mg/mL όταν εφαρμόζονται σε συνδυασμό με μη τοξικές συγκεντρώσεις tamoxifen (1μM) (B. Biersack et al 2012). Τα αποτελέσματα αυτά

είναι σημαντικά διότι τα εν λόγω σχήματα συνδυασμού με χαμηλές δόσεις tamoxifen είναι πολύ πιθανόν να μειώσουν τις ανεπιθύμητες παρενέργειες (Biersack B. et al 2012). Η πρόωρη ανάπτυξη αντοχής από το tamoxifen είναι ένα σημαντικό κλινικό πρόβλημα στη αντιμετώπιση των ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων από οιστρογόνα (καρκίνος του μαστού) (Biersack B. et al 2012). Οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν αρχικά στην θεραπεία με tamoxifen, στην συνέχεια εμφάνισαν ανθεκτικότητα στο φάρμακο. Πιθανόν, οι ασθενείς αυτοί να ωφελούνταν περισσότερο με θεραπείες με νανοσωματιδία αργύρου (Biersack B. et al 2012).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της κυτταροξικότητας συμπλόκων αργύρου(I) αλλά παράλληλα η μελέτη του μηχανισμού δράσης αυτών των συμπλόκων ανάλογα με την δομή των νεοσυντιθέμενων ουσιών.

Μελετήθηκαν σύμπλοκα αργύρου(I) με καρβοξυλικά οξέα και συγκεκριμένα με σαλικιλικό οξύ και τα παράγωγα του, όπως είναι η ασπιρίνη και το παρα-βενζοϊκό οξύ με τριφαινυλοφωσφίνη. Τα σύμπλοκα σχεδιάστηκαν ώστε να διαφοροποιούνται ως προς την δομή τους και με βάση την ικανότητα να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου, ενδομοριακούς ή διαμοριακούς. Επίσης μελετήθηκε ο τρόπος της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με ενδοκυτταρικά μόρια και οργανίδια όπως είναι το DNA, η LOX και το μιτοχόνδριο, που συμμετέχουν στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, απόπτωση, ή στην διαδικασία της νέκρωσης. Η απόπτωση διερευνάται και επιβεβαιώνεται στην συνέχεια με κυτταρομετρία ροής και ηλεκτροφόρηση πυρηνικού DNA καρκινικών κυττάρων. Επίσης μελετάται η ικανότητα πρόσδεσης των συμπλόκων στο DNA.

Τελικά, το σύμπλοκο με την καλύτερη δράση στα κύτταρα μελετάται σε πειράματα σε επίμυες *in vivo* για να διαπιστωθεί η αντικαρκινική του δράση.



### 3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. Συνθήκες Καλλιέργειας

Τα μαστικά καρκινικά κύτταρα (MCF-7) και τα λειομυοσαρκωματικά (LMS) καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες 37°C και 5% CO<sub>2</sub>. Το θρεπτικό ανάπτυξης είναι το Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) εμπλουτισμένο με αντιβιοτικά, γλουταμίνη και βοδινό ορό (FBS).

Στο θρεπτικό μέσο προσθέτονται αντιβιοτικά (5 mL πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη) και 2,5 mL L-glutamine επειδή το θρεπτικό στερείται γλουταμίνης (w/o glutamine). Η πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη έχει δράση αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή. Επιπλέον το θρεπτικό μέσο εμπλουτίζεται με 56 mL FBS (με αναλογία 10 %), το οποίο προσδίδει ιχνοστοιχεία αλλά και σταματάει την δράση της θρυψίνης.

Οι υγιείς ινοβλάστες MRC-5, αναπτύχθηκαν στις ίδιες συνθήκες με τα ίδια αντιδραστήρια, με την διαφορά ότι απαιτούνταν μεγαλύτερη ποσότητα γλουταμίνης (5 mL).

#### 3.2. Ανα-καλλιέργεια κυττάρων

1. Αρχικά, παρατηρείται το τρυβλίο στο μικροσκόπιο για να αξιολογηθεί η κατάσταση των κυττάρων και να επιβεβαιωθεί η απουσία βακτηριακών και μυκητιακών επιμολυσματικών παραγόντων.

2. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό.

3. Γίνεται έκπλυση των κυττάρων με 10mL αλατούχο διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffered saline, PBS). Επαναλαμβάνεται το παραπάνω βήμα πλυσίματος αν παρατηρηθεί η ύπαρξη πολλών νεκρών κυττάρων. Η θρυψίνη αδρανοποιείται παρουσία ορού. Επομένως, είναι ουσιαστικό να αφαιρεθούν όλα τα ίχνη ορού από το θρεπτικό υλικό με την πλύση με PBS.

4. Προστίθεται στο τρυβλίο 1mL θρυψίνης. Με κυκλικές κινήσεις απλώνεται σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Η θρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που διασπά τις ιντεγκρίνες και τις CAM πρωτεΐνες (πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη προσκόλληση των κυττάρων στη πλαστική επίστρωση).

5. Τοποθετείται το τρυβλίο στον επωαστήρα για 3-5 λεπτά.

6. Εξετάζεται το τρυβλίο με ένα μικροσκόπιο, μετά το πέρας του παραπάνω χρονικού διαστήματος, αν τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια του τρυβλίου. Τα κύτταρα δεν πρέπει να εκτεθούν σε θρυψίνη αρκετό χρονικό διάστημα γιατί επέρχεται διάρρηξη των μεμβρανών τους.

7. Στην συνέχεια προστίθενται 10 mL θρεπτικού υλικού για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης. Με κυκλικές κινήσεις, με την βοήθεια μίας αυτόματης πιπέτας τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια του τρυβλίου.

8. Τέλος, μερικά mL θρεπτικού υλικού-κυττάρων απομακρύνονται (ανάλογα με την πληρότητα του ταπητίου) και προστίθενται τα αντίστοιχα mL θρεπτικού υλικού για να συμπληρωθούν συνολικά 10 mL θρεπτικού υλικού.



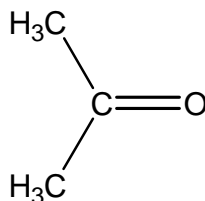
### 3.3. Κρυοσυντήρηση κυττάρων σε υγρό άζωτο

Όταν το ταπήτιο του τρυβλίου είναι σχεδόν πλήρες (70-80 %), προτιμάται η κρυοσυντήρηση των κυττάρων

1. Αναρροφάται το θρεπτικό υλικό.
2. Γίνεται έκπλυση των κυττάρων με 10 mL PBS.
3. Προστίθεται στο τρυβλίο 1 mL θρυψίνης. Με κυκλικές κινήσεις απλώνεται σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου.
4. Τοποθετείται το τρυβλίο στον επωαστήρα για 3-5 λεπτά.
5. Εξετάζεται το τρυβλίο σε μικροσκόπιο, μετά το πέρας του παραπάνω χρονικού διαστήματος, αν τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια του τρυβλίου.
6. Στην συνέχεια προστίθενται 10 mL θρεπτικού υλικού για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης. Με κυκλικές κινήσεις, με την βοήθεια μίας αυτόματης πιπέτας τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια του τρυβλίου.
7. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε ένα falcon των 15 mL και φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 3000 στροφές.
8. Τα κύτταρα καθιζάνουν και απομακρύνεται το υπερκείμενο μέρος.
9. Προστίθενται 900 μL βοδινού ορού (10%) για την επιβίωση των κυττάρων και 100 μL DMSO (διμέθυλ-σουλφοξείδιο), για τον εμποδισμό της δημιουργίας παγοκρυστάλλων που είναι καταστρεπτικοί για τα κύτταρα.

### 3.4. DMSO

Το διμέθυλ-σουλφοξείδιο (DMSO) ανακαλύφθηκε από τον Alexander Saytzeff το 1866, αλλά μόνο στα τέλη του 1940 έγινε γνωστό και χρησιμοποιήθηκε ευρέως (Dujonny M. et al 1983). Το DMSO έχει μία απλή μοριακή δομή (Σχήμα 1).



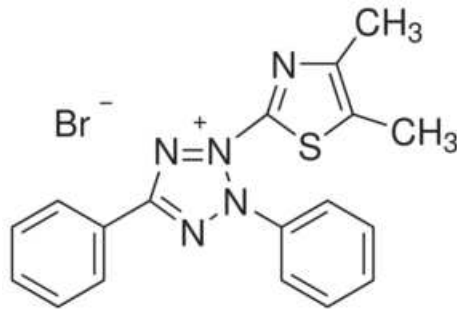
**Σχήμα 1.** Συντακτικός τύπος του διμέθυλ-σουλφοξείδιο (DMSO)

Εύκολα μπορεί να διεισδύσει στους ιστούς των μεμβρανών χωρίς να προκαλέσει σημαντική αλλοίωση των ιστών. Αυτή η ιδιότητά του οφείλεται στην πολική του φύση και στην ικανότητά του να δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου (Dujonny M. et al 1983). Γενικότερα το DMSO μειώνει την κατανάλωση του οξυγόνου, έχει την ικανότητα να διεισδύει σε όλες τις κυτταρικές μεμβράνες. Η ιδιότητα αυτή το κάνει να χρησιμοποιείται από τους επιστήμονες για την μεταφορά φαρμάκων (Dujonny M. et al 1983). Η κυριότερη ιδιότητά του είναι να αναστέλλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Λειτουργεί ως αναστολέας, εμποδίζοντας τα αιμοπετάλια να συσσωρευτούν, μειώνει την παραγωγή της φιβρίνης, αναστέλλει την παραγωγή του αραχιδονικού οξέος και γενικότερα αποτελεί αναστολέα της βιοσύνθεσης των προσταγλανδινών (Dujonny M. et al 1983). Τέλος, το DMSO εμποδίζει την λειτουργία της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) (λειτουργεί ως δευτερεύων αγγελιοφόρος για τη μεταφορά μηνυμάτων από τον εξωκυττάριο χώρο στον ενδοκυττάριο χώρο) (Dujonny M. et al 1983). Το DMSO χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης των ουσιών που ερευνήθηκαν.

### 3.5. Μέθοδος MTT - Μέθοδος μέτρησης κυτταρικής ανάπτυξης (*cell growth proliferation*)

#### 3.5.1. Αρχή Μεθόδου

Η μέθοδος MTT εισήχθη από τον T. Mosmann προσπαθώντας να δημιουργήσει μια φασματοσκοπική μέθοδο για την εκτίμηση της επιβίωσης και της πολλαπλασιαστικής ικανότητας θηλαστικών κυττάρων (Mosmann T. 1983).



Εικόνα 20: 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)

Η μέθοδος χρησιμοποιεί ένα άλας, το tetrazolium salt 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (Εικόνα 20) (Mosmann T. 1983). Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα του ενζύμου αφυδρογονάση των μιτοχονδρίων των ζωντανών μόνο κυττάρων να διασπών τους δακτυλίους τετραζολίου της κίτρινης χρωστικής MTT με αποτέλεσμα το σχηματισμό πορφυρών κρυστάλλων. Οι κρύσταλλοι αυτοί έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και να συσσωρεύονται στο ενδοκυττάριο χώρο των ζωντανών κυττάρων. Με την προσθήκη του DMSO ή ισοπροπανόλης οι κρύσταλλοι απελευθερώνονται στο εξωκυττάριο χώρο και ο αριθμός τους είναι ανάλογος του αριθμού των ζωντανών κυττάρων (Price P. et al 1990). Η

απορρόφηση που θα μετρηθεί θα είναι ανάλογη με την ποσότητα των ζωντανών κυττάρων (Price P. et al 1990).

### *3.5.2. Πειραματική Διαδικασία MTT assay*

Την πρώτη μέρα της σποράς, τα κύτταρα αποκολλώνται από το ταπήτιο και συγκεντρώνονται σε ένα falcon των 15 mL. Στην συνέχεια, 11  $\mu$ L κυττάρων μεταφέρονται με αυτόματη πιπέττα σε πλάκα Neubauer, για να εκτιμηθεί ο συνολικός αριθμός των κυττάρων μέσα στο falcon. Στην συνέχεια μεταφέρεται ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων σε falcon των 50 mL και αραιώνεται με θρεπτικό υλικό, ώστε να επιτευχθεί αριθμός 3,000 κυττάρων/well για MCF-7, LMS ενώ 5,000 κυττάρων/well για MRC-5.

Η σπορά των κυττάρων γίνεται σε τρυβλίο 96 well. 1 well=100  $\mu$ L. Τα κύτταρα επωάζονται σε επωαστή για 24 ώρες μέχρι την προσθήκη των ουσιών προς έλεγχο.

Μετά το πέρας 24 ωρών από την σπορά, γίνεται επώαση των κυττάρων με έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις, επαναλαμβανόμενες τρεις φορές. Ο συνολικός όγκος του well είναι 200  $\mu$ L μετά την προσθήκη συμπλόκου-θρεπτικού μέσου.

Τα σύμπλοκα αρχικά διαλύονται σε αρχική συγκέντρωση  $10^{-2}$  M σε DMSO και στην συνέχεια αραιώνονται σε θρεπτικό μέσο. Η αναλογία DMSO σε DMEM είναι 0.005–0.035 % v/v.

Τα κύτταρα επωάζονται με τα σύμπλοκα για 48 ώρες. Στην συνέχεια, προστίθεται 50  $\mu$ L MTT (συγκέντρωσης 3 mg/mL σε PBS) και επωάζονται για άλλες 3 ώρες. Τέλος, αναρροφάται όλη η ποσότητα θρεπτικού υλικού-MTT-κυττάρων από κάθε well και προστίθεται σε κάθε well, 200  $\mu$ L DMSO. Πραγματοποιείται ανάδευση με αυτόματη πιπέττα και μετράται η απορρόφηση με ELISA (ενζυμο-συνδεδετική ανασολογική

δοκιμασία) ((Diagnostics Pasteur LP 400), με μήκος κύματος 540nm και αναφορά στα 690nm.

### **3.6. Μέθοδος Trypan Blue - Μέθοδος μέτρησης κυτταρικής βιωσιμότητας (cell viability)**

#### **3.6.1. Αρχή Μεθόδου**

Η κυτταρική βιωσιμότητα θα εκτιμηθεί με την μέθοδο Trypan Blue. Το Trypan Blue είναι μία χρωστική ή οποία χρησιμοποιείται για την μέτρηση κυττάρων. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα πρόσληψης της χρωστικής από τα νεκρά κύτταρα και όχι τα ζωντανά (Durkin W.J. et al 1979). Είναι μία πολική χρωστική, η οποία δεν μπορεί να διαπεράσει τις μεμβράνες των ζωντανών κυττάρων αλλά διαπερνά τις μεμβράνες των κυττάρων που έπαθαν νέκρωση καθώς και των κυττάρων που υπέστησαν απόπτωση και εμφανίζουν τις δευτερογενείς αλλοιώσεις της νέκρωσης (Gionagnini L. et al 2005).

#### **3.6.2. Πειραματική Διαδικασία Trypan Blue assay**

Την πρώτη μέρα της σποράς, τα κύτταρα αποκολλούνται από το ταπήτιο και συγκεντρώνονται σε ένα σωληνάριο των 15 mL. Στην συνέχεια, 10μL κυττάρων μεταφέρονται με αυτόματη πιπέττα σε πλάκα Neubauer, για να εκτιμηθεί ο συνολικός αριθμός των κυττάρων μέσα στο σωληνάριο. Στην συνέχεια μεταφέρεται ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων σε σωληνάριο των 50 mL και αραιώνεται με θρεπτικό υλικό, ώστε να επιτευχθεί αριθμός 5,000 κυττάρων/well για MCF-7 και LMS. Η σπορά των κυττάρων γίνεται σε τρυβλίο 24 well. Τα κύτταρα επωάζονται σε επωαστή για 24 ώρες μέχρι την

προσθήκη των ουσιών προς έλεγχο. Καθέ well μετά την διαδικασία της σποράς περιέχει 1 mL θρεπτικό υλικό.

Μετά το πέρας 24 ωρών από την σπορά, γίνεται επώαση των κυττάρων σε έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις. Ο συνολικός όγκος του well είναι 1 mL μετά την προσθήκη συμπλόκου-θρεπτικού μέσου.

Τα σύμπλοκα αρχικά διαλύονται σε αρχική συγκέντρωση  $10^{-2}$  M σε DMSO και στην συνέχεια αραιώνονται σε θρεπτικό μέσο. Η αναλογία DMSO σε DMEM είναι 0.005–0.035 % v/v.

Μετά την συμπλήρωση 48 ωρών, απομακρύνεται το DMEM και προστίθεται σε κάθε well 1 mL PBS. Στην συνέχεια αναρροφάται και προστίθενται 250  $\mu$ L θρυψίνης και επώάζεται το τρυβλίο για 5 λεπτά στον 37 °C. Εφόσον τα κύτταρα αποκολληθούν από το ταπήτιο του τρυβλίου προστίθενται 250  $\mu$ L PBS και 500  $\mu$ L χρωστικής Trypan Blue (0.4 % w/v) και πραγματοποιείται ανάδευση. Μετά το πέρας 5 λεπτών από την προσθήκης της χρωστικής γίνεται μέτρηση των κυττάρων σε πλάκα Neubauer.

### ***3.7. Μορφολογία LMS κυττάρων***

Εξετάζεται η μορφολογία των LMS κυττάρων με την χρήση μικροσκοπίου ανάστροφης φάσης μετά την επώαση των κυττάρων με τα σύμπλοκα (48 ώρες) για να εκτιμηθεί αν τα σύμπλοκα έχουν την ικανότητα να επάγουν απόπτωση.

### 3.8. Κυτταρομετρία Ροής

#### 3.8.1. Αρχή Μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία αυτοματοποιημένη, πολυπαραμετρική και ποσοτική μέθοδος μέτρησης και ανάλυσης των σημάτων σκεδασμού-φθορισμού που παράγονται καθώς μία κυτταρική διάταξη διέρχεται μπροστά από μία πηγή Laser. Η κυτταρομετρία ροής γίνεται με μικροσκόπια ανοσοφθορισμού (FACS, fluorescence-activated cell sorter) (Papadogiannakis E.I. et al 2005). Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται στον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των κυττάρων, στην ταυτοποίηση αντισωμάτων άγνωστης ειδικότητας, στον προσδιορισμό κυτταροπλασματικών συστατικών ενός πληθυσμού, στην εκτίμηση διαφοροποίησης ενός κυτταρικού πληθυσμού, στην αναγνώριση του σταδίου του κυτταρικού κύκλου, στην μέτρηση του κυτταρικού  $Ca^{2+}$  και στην ανίχνευση της απόπτωσης (Papadogiannakis E.I. et al 2005).

#### 3.8.2. Μέθοδος Annexin V για τον προσδιορισμό της απόπτωσης

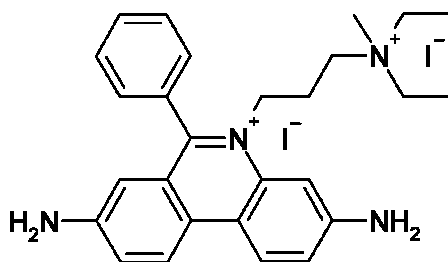
Βασίζεται στην ικανότητα της φωσφατιδυλοσερίνης (φωσφογλυκερίδιο, η οποία περιέχει σερίνη και αποτελεί συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών) να συνδέεται εκλεκτικά με την annexin V (van Engeland M. et al 1998). Η annexin V είναι μία ενδογενής ανθρώπινη πρωτεΐνη, η οποία κατανέμεται ενδοκυττάρια σε μεγάλες συγκεντρώσεις μέσα στον ανθρώπινο σώμα (Blankenberg F.G. 2008). Σήμερα, χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση της απόπτωσης.

Οι Koorman et al. πρώτοι περιέγραψαν την μέθοδο ανίχνευσης της απόπτωσης μέσω της σήμανσης της annexin V με FITC ή βιοτίνη (van Engeland M. et al 1998). Η

σημασμένη annexin V έχει την ικανότητα να συνδέεται σε εκτεθειμένα μόρια φωσφατιδυλοσερίνης των αποπτωτικών κυττάρων (Εικόνα 21) (van Engeland M. et al 1998). Γενικά, τα υγιή κύτταρα χαρακτηρίζονται από μια ασυμμετρία στην κυτταρική τους μεμβράνη (εμφανίζουν πολύ διαφορετική όψη στο εσωτερικό του κυττάρου ή του οργανιδίου από ότι στην εξωτερική επιφάνειά τους), η οποία αναιρείται στη περίπτωση της απόπτωσης (van Engeland M. et al 1998).

Η annexin V δεν έχει την ικανότητα να συνδέεται με τα υγιή κύτταρα εφόσον η πρωτεΐνη δεν έχει την ικανότητα να διεισδύσει στην φωσφολιπιδική μεμβράνη και να ενωθεί με την φωσφατιδυλοσερίνη, η οποία βρίσκεται στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης. Κατά την απόπτωση, και λόγω της αύξησης των ιόντων  $Ca^{+2}$  εκτίθεται η φωσφατιδυλοσερίνη στο εξωτερική πλευρά του κυττάρου (van Engeland M. et al 1998).

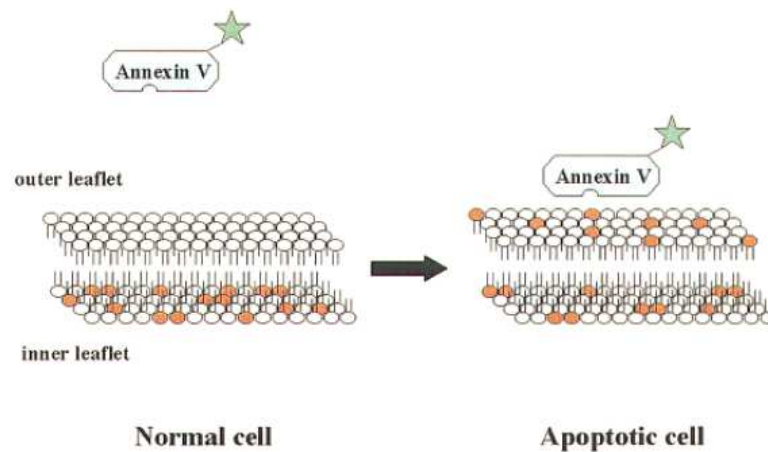
Για να γίνει διάκριση των νεκρών και από τα αποπτωτικά κύτταρα, χρησιμοποιείται μια χρωστική αδιαπέραστη στις μεμβράνες (όπως το propidium iodide (PI) (Σχήμα 2)).



Σχήμα 2. Συντακτικός τύπος του PI.

Έτσι, με αυτό τον τρόπο μπορούν να διαχωριστούν τα ζωντανά, τα αποπτωτικά και τα νεκρωτικά κύτταρα με διπλό χρωματισμό και να αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής (van Engeland M. et al 1998).





Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση της κυτταρικής ασυμμετρίας κατά την απόπτωση. Κατά την απόπτωση η κυτταρική ασυμμετρία διακόπτεται, εκθέτοντας της φωσφατιδυλοσερίνη (κόκκινο). Η σημασμένη annexin V μπορεί να συνδέεται με την εκτεθειμένη φωσφατιδυλοσερίνη στην εξωτερική πλευρά του κυττάρου (van Engeland M. et al 1998).

### 3.8.3. Πειραματική Διαδικασία μεθόδου Annexin V για τον προσδιορισμό της απόπτωσης

Τα κύτταρα που θα χρησιμοποιηθούν για την σπορά των LMS κυττάρων για κυτταρομετρία ροής πρέπει να είναι σε καλή κατάσταση (όχι πολλά νεκρά κύτταρα, και να μην είναι πλήρες το ταπήτιο του τρυβλίου).

Η σπορά πραγματοποιείται σε τρυβλίο 6 well (60,000 cells/well). Η χωρητικότητα του κάθε well είναι 3 mL.

Μετά το πέρας των 24 ωρών από την σπορά των LMS κυττάρων, προστίθεται στο θρεπτικό υλικό τα σύμπλοκα σε συγκεντρώσεις, την  $IC_{50}$  τιμή και μία τιμή μεγαλύτερη από την  $IC_{50}$ .

Τα σύμπλοκα αρχικά διαλύονται σε αρχική συγκέντρωση  $10^{-2}$  M σε DMSO και στην συνέχεια αραιώνονται σε θρεπτικό μέσο. Η αναλογία DMSO σε DMEM είναι 0.005–0.035 % v/v. Τα κύτταρα επωάζονται με τα σύμπλοκα για 48 ώρες.

Στο πείραμα υπάρχει και το τρυβλίο ελέγχου, κύτταρα τα οποία δεν έχουν δεχτεί ουσία. Το τρυβλίο ελέγχου πρέπει να περιέχει 500,000-600,000 κύτταρα στις 48 ώρες για να πραγματοποιηθεί και να θεωρηθεί αξιόπιστο το πείραμα.

1. Αρχικά, από κάθε well, το θρεπτικό υλικό μεταφέρεται στο αντίστοιχο σωληνάριο.
2. Σε κάθε well γίνεται έκπλυση με 3mL PBS και μεταφέρεται στο αντίστοιχο σωληνάριο.
3. 300  $\mu$ L θρυψίνης προστίθενται σε κάθε well και επωάζονται τα κύτταρα για 3 λεπτά στον επωαστήρα.
4. Ακολουθεί, προσθήκη 3 mL PBS σε κάθε well και μεταφορά στο αντίστοιχο σωληνάριο, όπου φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά στις 3,000 στροφές.
5. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 mL PBS σε κάθε σωληνάριο και ακολουθεί καταμέτρηση των κυττάρων με πλάκα Neubauer. Από κάθε falcon πρέπει να μεταφερθούν σε σωληνάρια erpendorf 100,000 κύτταρα στην αντίστοιχη ποσότητα PBS. Αν σε κάποιο σωληνάριο περιέχονται λιγότερα από 100,000 κύτταρα, τότε λαμβάνεται όλη η ποσότητα και μεταφέρεται σε σωληνάρια erpendorf.
6. Τα σωληνάρια erpendorf φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά στις 3,000 στροφές.
7. Απομακρύνεται το υπερκείμενο μέρος και διαλυτοποιείται το ίζημα με 100  $\mu$ L Calcium Buffer 20x, αραιωμένο σε PBS.
8. Τα σωληνάρια erpendorf μεταφέρονται στον σκοτεινό θάλαμο, όπου προστίθενται 5  $\mu$ L annexin V και 4  $\mu$ L PI. Μετά το πέρας των 15 λεπτών παρουσίας των erpendorf στον σκοτεινό θάλαμο, προστίθεται 1mL Calcium Buffer 20x, και τα κύτταρα είναι έτοιμα για την μέτρηση στο κυτταρόμετρο ροής (Partec ML, Partec GmbH, Germany).

#### **Δημιουργία Calcium Buffer 20x**

2.6 gr Hepes

0.28 gr CaCl<sub>2</sub>

8.18 gr NaCl

Γίνεται αραίωση σε 50 mL PBS

### **3.9. Ηλεκτροφόρηση DNA**

#### *3.9.1. Αρχή Μεθόδου*

Ο όρος ηλεκτροφόρηση περιγράφει την μετακίνηση ενός φορτισμένου σωματιδίου κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Χρησιμοποιείται για τον καθορισμό, το διαχωρισμό ή την ταυτοποίηση βιολογικών μορίων (Βαρθολομάτος Γ. 2006).

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μία μέθοδος διαχωρισμού τμημάτων DNA (Βαρθολομάτος Γ. 2006). Βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να έχει αρνητικό φορτίο και να κινείται προς τον θετικό πόλο όταν βρεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την μετακίνηση του DNA είναι:

- το μέγεθος του DNA, τα γραμμικά μόρια κινούνται στο πήκτωμα αγαρόζης αντιστρόφως ανάλογα με τον δεκαδικό λογάριθμο του μεγέθους τους
- η συγκέντρωση της αγαρόζης,
- η τάση του πεδίου, ο καλύτερος διαχωρισμός των τμημάτων DNA γίνεται σε τάση μικρότερη ή ίση του 5 Volt/cm
- και η διαμόρφωση του DNA, αν είναι γραμμικό, κυκλικό ή υπερσπειρωμένο.

Η ανίχνευση των νουκλεϊκών οξέων γίνεται με χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβαίνει στην διπλή αλυσίδα του DNA και τροποποιεί την υπερελικωμένη δομή (Βαρθολομάτος Γ. 2006).

### *3.9.2. Πειραματική Διαδικασία Ηλεκτροφόρησης DNA*

1. Αρχικά γίνεται σπορά LMS κυττάρων σε τρυβλία Petri. Η σπορά γίνεται με πυκνότητα 300,000 κυττάρων σε 10mL θρεπτικού υλικού.

2. Μετά από 48 ώρες, προστίθενται τα σύμπλοκα σε δύο συγκεντρώσεις, η IC<sub>50</sub> τιμή και μία τιμή μεγαλύτερη από την IC<sub>50</sub> τιμή. Τα σύμπλοκα αρχικά διαλύονται σε αρχική συγκέντρωση 10<sup>-2</sup> M σε DMSO και στην συνέχεια αραιώνονται σε θρεπτικό μέσο. Η αναλογία DMSO σε DMEM είναι 0.005–0.035 % v/v. Τα κύτταρα επωάζονται με τα σύμπλοκα για 48 ώρες.

3. Μετά από 48 ώρες με την επώαση των κυττάρων με τα σύμπλοκα, μεταφέρεται το θρεπτικό υλικό σε σωληνάριο των 15 mL

4. Γίνεται έκλυση των τρυβλίων με 5 mL PBS

5. Γίνεται φυγοκέντρηση των σωληναρίων στις 2,000 στροφές για 5 λεπτά

6. Τα δύο παραπάνω βήματα πραγματοποιούνται δύο φορές

7. Μετά την φυγοκέντρηση, απορρίπτεται το υπερκείμενο

8. Σε κάθε τρυβλίο προστίθενται 2 mL PBS, και με την βοήθεια σιλικόνης αποκολλώνται τα κύτταρα από το ταπήτιο και μεταφέρονται στο σωληνάριο και φυγοκεντρώνονται στις 2,000 στροφές για 5 λεπτά

9. Απορρίπτεται το υπερκείμενο, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1 mL PBS και μεταφέρονται σε σωληνάρια eppendorf

10. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6,000 στροφές για 8 λεπτά, το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθενται 100  $\mu\text{L}$  lysis buffer
11. Επωάζονται για 10 λεπτά στον πάγο, και αναδεύονται συχνά
12. Φυγοκεντρούνται τα eppendorf στις 6,000 στροφές για 70 λεπτά, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf και προστίθεται 2 $\mu\text{L}$  RNaseA (10 mg/mL), επωάζονται για 2 ώρες στους 37°C
13. Μετά, προστίθεται 2.5  $\mu\text{L}$  Proteinase K (20mg/mL), σε κάθε eppendorf και επωάζονται για 2 ώρες στους 37°C
14. Τέλος, προστίθενται στα eppendorf μετά τις επωάσεις 20  $\mu\text{L}$  NaCl 5 M και 120 $\mu\text{L}$  ισοπροπανόλης για κατακρίμνηση του DNA.
15. Τα eppendorf τοποθετούνται στους -20 °C για μία νύχτα
16. Την επόμενη ημέρα, τα eppendorf φυγοκεντρήθηκαν στις 6,000 στροφές για 70 λεπτά, απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθενται 20  $\mu\text{L}$  1xTE
17. Ακολουθεί επώαση των eppendorf για 3 ώρες στους 37°C με συνεχή ανάδευση κάθε μισή ώρα.
18. Για την φόρτιση των δειγμάτων είναι απαραίτητη η προσθήκη 2  $\mu\text{L}$  loading buffer.

### 3.9.3. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Παρασκευάζεται πήκτωμα 1.6% αγαρόζης σε 0.5xTBE, με 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  βρωμιούχου αιθιδίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διάλυμα 0.5xTBE.

Η ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος αγαρόζης τρέχει για δύο ώρες στα 60 V, και στην συνέχεια γίνεται εμφάνιση του πηκτώματος με λάμπα υπεριώδους.

*3.9.4. Παρασκευή διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης*

**1M Tris-Cl, pH=7.4**

Ζύγιση 6.057 gr tris(hydroxymethyl)aminomethane σε 50mL αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό και ρύθμιση του pH=7.4 με HCl 37 %

Αποστείρωση και αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου

**0.5M EDTA, pH=8**

Ζύγιση 7.306 gr EDTA σε 50 mL αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό και ρύθμιση του pH=8 με NaOH 10 M.

Αποστείρωση και αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου

**1xTE, pH=7.4**

0.5 mL 1M Tris-Cl, pH=7.6

0.1 mL 0.5M EDTA

49.4 mL αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό

Αποστείρωση και αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου

**5xTBE**

27 gr tris(hydroxymethyl)aminomethane

13.75 gr βορικού οξέος

20 mL 0.5 M EDTA, pH=8

480mL αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό

Αποστείρωση και αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου

### **DNA lysis Buffer**

1 mL 1 M Tris-Cl, pH=7.4

2 mL 0.5 M EDTA, pH=8

97.5 mL αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό, μετά την αποστείρωση προσθήκη 0.5 mL Triton-X

Αποστείρωση και αποθήκευση στο ψυγείο

### **Loading Buffer**

0.1 mL 0.5 EDTA, pH=8

25 mL γλυκερόλη

25 mL αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό

Αποθήκευση στο ψυγείο

### **3.10. Γενικές αρχές λειτουργίας φασματοφωτόμετρου ορατού-υπεριώδους**

Το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιεί την διαπερατότητα του φωτός μέσω ενός διαλύματος για να προσδιορίσει την συγκέντρωση ενός συστατικού που βρίσκεται στο διάλυμα (Βαρθολομάτος Γ. 2006). Το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιεί πρίσμα για τον διαχωρισμό του φωτός. Στηρίζεται στην ικανότητα της διέλευσης του φωτός γνωστού μήκους κύματος ή ενός εύρους μήκους κύματος και στην μέτρηση της ποσότητας της φωτεινής ενέργειας που απορροφάται από ένα διάλυμα (Βαρθολομάτος Γ. 2006). Όλα τα μόρια απορροφούν ενέργεια ακτινοβολίας σε συγκεκριμένο μήκος κύματος ( $\lambda_{max}$ ) που είναι χαρακτηριστικό για αυτά. Οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν φωτεινή ενέργεια στην περιοχή του υπεριώδους (Βαρθολομάτος Γ. 2006).

### **3.11. Μελέτη αναστολής της λιποξυγενάσης**

#### *3.11.1. Διαδικασία*

Για την μελέτη της αναστολής της λιποξυγενάσης από τα σύμπλοκα, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους.

Αρχικό διάλυμα βορικού οξέος παρασκευάστηκε σε 500 mL απεσταγμένου νερού σε pH=9, με NaOH (50%). Παρασκευάστηκε υπόστρωμα λινολεϊκού οξέος με μεθανόλη.

Δημιουργήθηκε γαλάκτωμα και προστέθηκαν 60 mL απεσταγμένου νερού. Στην συνέχεια το λινολεϊκό οξύ αραιώθηκε με διάλυμα βορικού οξέος σε τελική συγκέντρωση 50 mM.

Το ένζυμο λιποξυγενάση που χρησιμοποιήθηκε διαλύθηκε σε απεσταγμένο νερό. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης και σε κάθε μέτρηση προστίθενται 60μL ενζύμου.

### **3.12. Μελέτη αλληλεπίδρασης συμπλόκων 1-3 με το DNA**

#### *3.12.1. Διαδικασία*

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης συμπλόκων με το DNA, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους

Διαλύεται το CT-DNA σε διάλυμα buffer pH=7.

Το διάλυμα buffer pH=7.0 παρασκευάζεται με NaCl 200 mM και κιτρικού νατρίου συγκέντρωσης 150 mM δις-απεσταγμένο νερό, pH=7.0.



Το DNA απορροφά στα 260 nm και στα 280 nm οι πρωτεΐνες (πχ. τρυπτοφάνη), από τον λόγο  $A_{260}/A_{280}$ , μπορεί αν υπολογιστεί η καθαρότητα του διαλύματος DNA. Αρχικά για να διαπιστωθεί ότι υπάρχει αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το CT-DNA θα διαφοροποιηθούν οι αναλογίες r (r=0, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11, 0.13). Για να υπολογιστεί η σταθερά σύνδεσης του συμπλόκου με το DNA διαφοροποιηθούν οι αναλογίες r (r=1, 0.5, 0.25, 0.17, 0.125, 0.1)

Τα σύμπλοκα αρχικά διαλύονται σε αρχική συγκέντρωση  $10^{-2}$  M σε DMSO και στην συνέχεια αραιώνονται σε θεραπευτικό μέσο. Η αναλογία DMSO σε DMEM είναι 0.00025–0.001 % v/v.

### **3.13. Πειράματα *in vivo*-Μελέτη τοξικότητας σε επίμυες Wistar Rat**

Η ηλικία των επίμυων Wistar Rat πρέπει να είναι 8-12 εβδομάδων για τον έλεγχο της τοξικότητας. Πέντε ημέρες πριν την έναρξη του πειράματος πρέπει να τοποθετηθούν σε κλουβιά για να μπορέσουν να εγκλιματιστούν. Οι συνθήκες διαβίωσης των επίμυων είναι  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ , υγρασία 30%, 12 ώρες ημέρα, 12 ώρες νύχτα. 12 ώρες πριν το πείραμα οι επίμυες δεν τρέφονται αλλά έχουν πρόσβαση σε νερό.

Οι επίμυες Wistar Rat που χρησιμοποιήθηκαν είναι όλοι θηλυκοί λόγω ότι παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε φάρμακα σε σχέση με τους αρσενικούς επίμυες.

#### **3.13.1. Οξεία τοξικότητα**

Συνολικά υπήρχαν 20 ζώα και χωρίστηκαν σε ομάδες των πέντε ζώων.

Σε κάθε ομάδα δόθηκε το σύμπλοκο της ασπιρίνης σε δόσεις των 0.5 mg/kg (1η ομάδα), 5 mg/kg (2η ομάδα) και των 50 mg/kg (3η ομάδα). Υπήρχε η ομάδα ελέγχου, η οποία δεν πήρε καμία θεραπεία, αλλά μόνο τον διαλύτη (4η ομάδα).

Ο μέσος όρος βάρους κάθε ζώου ήταν 183 gr.

Κάθε ζώο δέχτηκε μία δόση εφ'άπαξ, σε συνολικό όγκο 1mL. Η ένεση έγινε ενδοπεριτοναϊκά.

Η ουσία διαλύθηκε αρχικά σε DMSO και στην συνέχεια σε ορό 0.9 %. Η μέγιστη αναλογία του DMSO είναι 13.7 % v/v.

Στην 4η ομάδα δόθηκε μόνο DMSO σε αναλογία 13.7 % v/v του ορού 0.9 %.

Μόλις δόθηκε η ουσία, τα ζώα παρατηρήθηκαν για μισή ώρα και δεν παρουσίασαν καμμία εμφανή μεταβολή. Μετά από 3-4 ώρες είχαν ξανά πρόσβαση σε νερό και τροφή.

Μετά το πέρας των 14 ημερών τα ζώα θανατώθηκαν με αιθέρα σύμφωνα με την διεθνή διακήρυξη και τα όργανα διατηρήθηκαν σε φορμόλη 4% μέχρι την παθολογοανατομική τους εξέταση.

### *3.13.2. Υποχρόνια τοξικότητα*

Συνολικά υπήρχαν 4 ζώα και χωρίστηκαν σε ομάδες των δύο ζώων.

Σε κάθε ομάδα δόθηκε το σύμπλοκο της ασπιρίνης σε δόσεις των 0.5 mg/kg (1η ομάδα), 5mg/kg (2η ομάδα). Ο μέσος όρος βάρους κάθε ζώου ήταν 200 gr.

Κάθε ζώο δεχόταν τέσσερις δόσεις για κάθε μία εβδομάδα, σε συνολικό όγκο 1mL.

Η ένεση γινόταν ενδοπεριτοναϊκά.

Η ουσία διαλύθηκε αρχικά σε DMSO και στην συνέχεια σε ορό 0.9 %. Η μέγιστη αναλογία του DMSO είναι 9.1 % v/v.

Μόλις δίνονταν η ουσία, τα ζώα παρατηρούνταν για μισή ώρα και δεν παρουσίαζαν καμμία εμφανή μεταβολή. Μετά από 3-4 ώρες είχαν ξανά πρόσβαση σε νερό και τροφή.

Μετά το πέρας των 90 ημερών τα ζώα θανατώνονταν με αιθέρα και τα όργανα διατηρούνταν σε φορμόλη 4% μέχρι την παθολογοανατομική τους εξέταση.

### **3.14. Καρκινογένεση σε επίμυες Wistar Rat**

Το Εργαστήριο της Φυσιολογίας έχει μακρά εμπειρία στην καρκινογένεση των επίμυων Wistar Rat. Το Εργαστήριο της Φυσιολογίας και τα μέλη ασχολούνται με το συγκεκριμένο ερευνητικό πεδίο, δημοσιεύοντας πληθώρα εργασιών (Kallistratos, G, 1974, Kallistratos, G, 1975, Kallistratos, G. et al 1979, Kallistratos, G. et al 1980, Kallistratos, G.I. et al 1988, Kallistratos, G. et al 1994, Karkabounas, S. et al 2002, Charalabopoulos, K. et al 2002, Karkabounas, S. et al 2003, Papaioannou, A et al 2004, Charalabopoulos, K. et al 2004, Batistatou, A. et al 2006, Batistatou, A. et al 2006, Batistatou, A. et al 2006, Charalabopoulos, K. et al 2010, Verginadis, I.I et al 2011).

Αρχικά πραγματοποιείται σπορά LMS κυττάρων σε τρυβλίο Petri, αφού αναπτυχθούν τα κύτταρα και καλύψουν το ταπήτιο, μεταφέρονται με την διαδικασία της ανακαλλιέργειας σε falcon για να μετρηθεί ο πληθυσμός τους. Στην συνέχεια φυγοκεντρώνται και απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και επαναδιαλυτοποιούνται σε ορό 0.9%. Σε κάθε ζώο, θα δοθούν 3,000,000 κύτταρα σε τελικό όγκο 1.5mL.

Αρχικά τα ζώα αναισθητοποιούνται με αιθέρα και πραγματοποιείται η ένεση στην ράχη υποδόρια.

Ενέσεις έγιναν σε 6 ζώα, τα οποία χωρίστηκαν σε ομάδες των δύο.

Σε κάθε ομάδα δόθηκε το σύμπλοκο της ασπιρίνης σε δόσεις των 0.5 mg/kg (1η ομάδα), 5 mg/kg (2η ομάδα). Υπήρχε η τυφλή ομάδα, η οποία δεν δέχτηκε καμία θεραπεία, αλλά μόνο τον διαλύτη (3η ομάδα).

Η έναρξη της θεραπείας άρχισε μετά από πέντε ημέρες από την καρκινογένεση (αριθμός ικανός ημερών για την επώαση των καρκινικών κυττάρων). Η κάθε ομάδα δέχτηκε έξι δόσεις κάθε μία εβδομάδα.

Ο μέσος όρος βάρους κάθε ζώου ήταν 210 mg.

Υπήρξε και δεύτερη σειρά πειραμάτων όπου τα ζώα δέχτηκαν θεραπεία με το σύμπλοκο της ασπιρίνης εφόσον πρώτα είχαν αναπτύξει όγκο. Οι ομάδες είναι 0.5 mg/kg (1η ομάδα) και 5 mg/kg (2η ομάδα), από δύο ζώα η κάθε ομάδα.

Από την τελευταία σειρά πειραμάτων εκτός των οργάνων που απομακρύνθηκαν και διατηρήθηκαν σε φορμόλη 4 %.

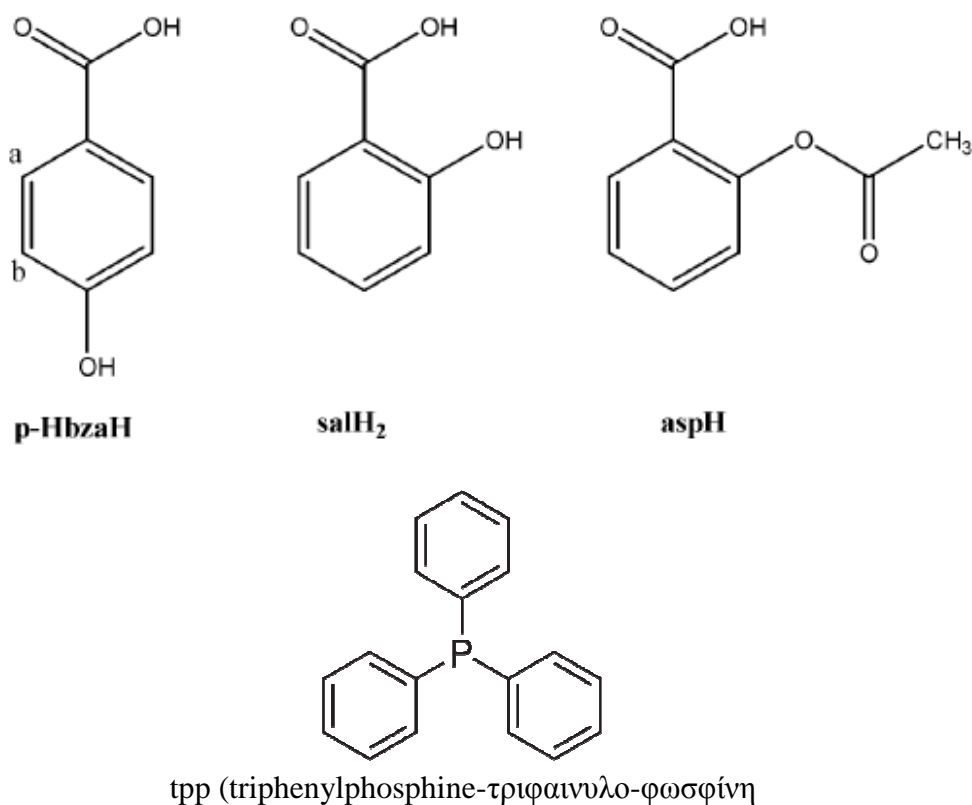
#### *3.14.1. Παθολογοανατομική εξέταση*

Αντιπροσωπευτικές τομές πάρθηκαν από κάθε όργανο. Τομές πάχους 4μm κόπηκαν και χρωματίστηκαν με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Τα δείγματα εξετάστηκαν μικροσκοπικά σε συνεργασία με ειδικευμένη Παθολογοανατόμο (Α.Μ.).

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. Μελέτη Συμπλόκων

Στην διατριβή αυτή μελετήθηκαν τα μικτά σύμπλοκα του αργύρου(I) με σαλικυλικό οξύ (ορθο-ύδροξυ-βενζοϊκό οξύ ή o-hydroxy-benzoic acid ή SalH<sub>2</sub> [Ag(tpp)<sub>2</sub>(o-Hbza)] (**1**) ή των παραγώγων του, ακετυλοσαλικυλικού οξέος (ασπιρίνη ή aspH) {[Ag(tpp)<sub>3</sub>(asp)](dmf)} (**2**) ή παρα-ύδροξυ-βενζοϊκό οξύ (p-HbzaH) Ag(tpp)<sub>2</sub>(p-Hbza)] (**3**) (Εικόνα 3) και triphenylphosphine-τριφαινυλο-φωσφίνη (tpp). Οι ενώσεις αυτές συντέθηκαν σύμφωνα με την βιβλιογραφία Hadjikakou et al.

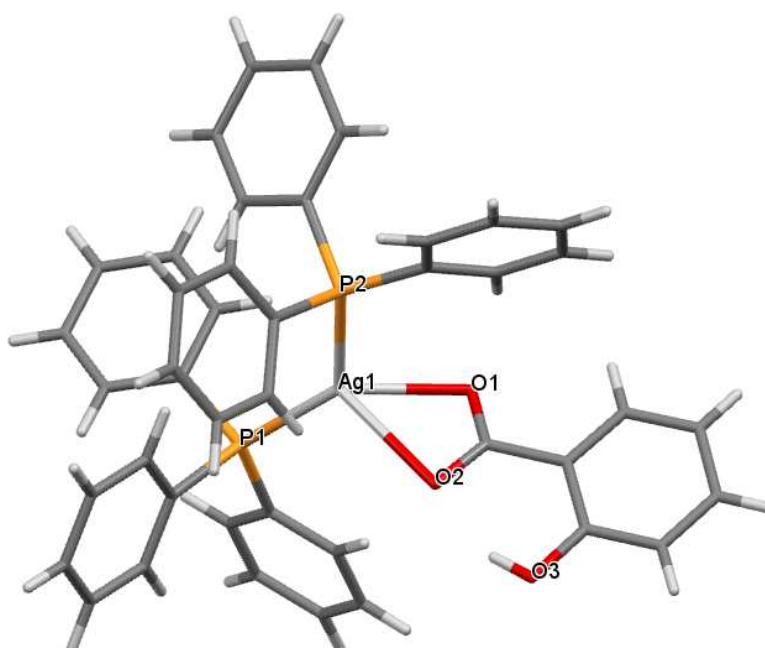


Σχήμα 3. Δομές υποκαταστατών

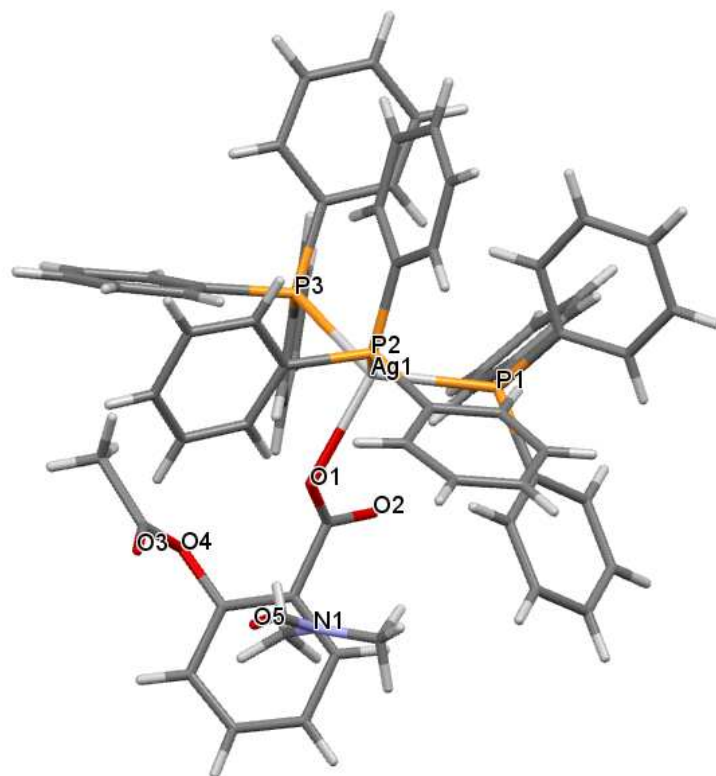
Τα σύμπλοκα αργύρου(I) έχουν χαρακτηριστεί με σημείο τήξεως, στοιχειακή ανάλυση, φασματοσκοπία υπερύθρου,  $^1\text{H-NMR}$ , UV-vis, ESI-MS και με κρυσταλλογραφία ακτίνων X.

#### 4.1.1. Δομή συμπλόκων

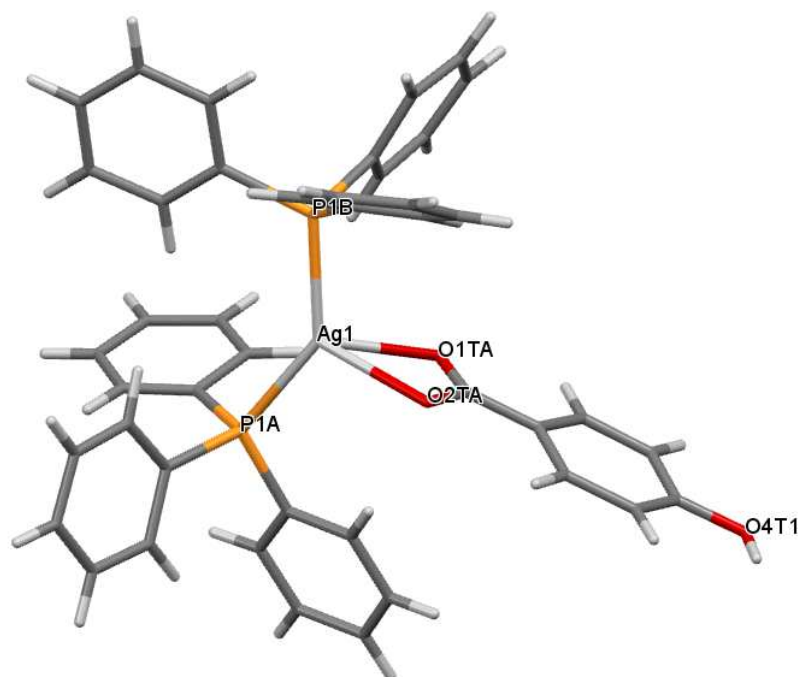
Η μοριακή δομή των συμπλόκων δίνεται στις παρακάτω Εικόνες



[Ag(tpp)<sub>2</sub>(o-Hbza)] (1) (o-HbzaH = o-hydroxy-benzoic acid ή SalH<sub>2</sub>)



{[Ag(tpp)<sub>3</sub>(asp)](dmf)} (2) (aspH= o-acetylsalicylicacid-ασπιρίνη)



[Ag(tpp)<sub>2</sub>(p-Hbza)] (3) (p-HbzaH = 4-hydroxybenzoic Acid)

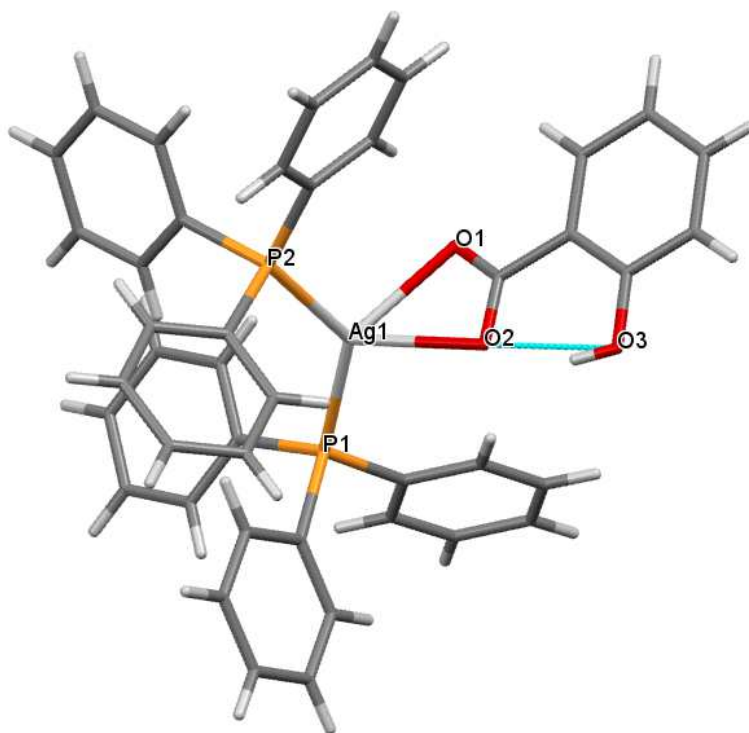
## 4.1.2. Δημιουργία Δεσμών Υδρογόνου

Η επιλογή των ligand έγινε με βάση την ικανότητα ή μη να δημιουργηθούν δεσμούς υδρογόνου μετά την συμπλοκοποίηση τους με ένα μέταλλο ώστε να μελετηθεί η δράση τους σε διάφορα ενδοκυτταρικά βιομόρια.

Το σύμπλοκο  $[Ag(tpp)_2(o-Hbza)]$  (**1**) έχει την ικανότητα να σχηματίζει ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του H(O3) υδροξυλίου και του O2 της καρβοξυλικής ομάδας του SalH2 (Εικόνα 22)

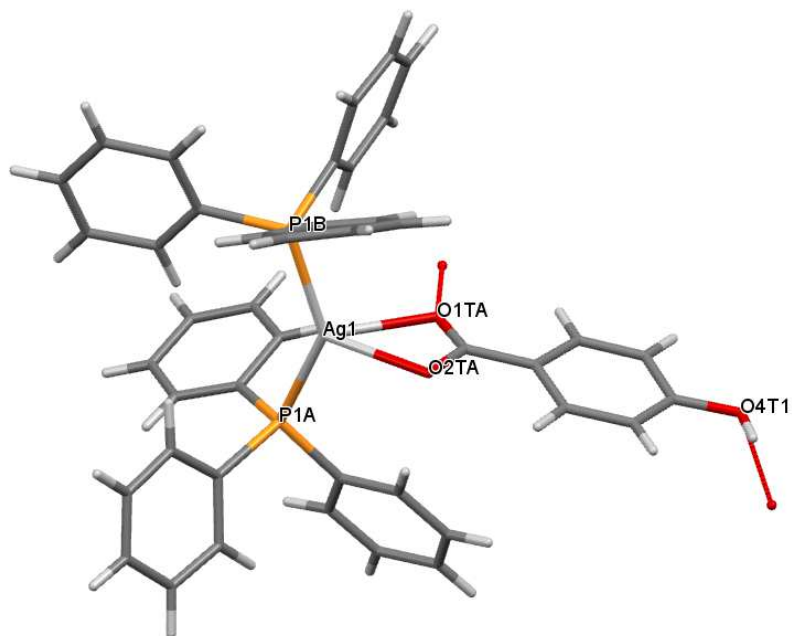
Το σύμπλοκο  $[Ag(tpp)_3(asp)](dmf)$  (**2**) δεν έχει την ικανότητα να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου

Το σύμπλοκο  $[Ag(tpp)_2(p-Hbza)]$  (**3**) έχει την ικανότητα να σχηματίζει διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου από το του O του καρβοξυλικού οξέος και του H(O) του υδροξυλίου p-HbzaH, με άλλα μόρια συμπλόκου **3** (Εικόνα 23) σχηματίζοντας με υπερμοριακή δομή (Εικόνα 24)

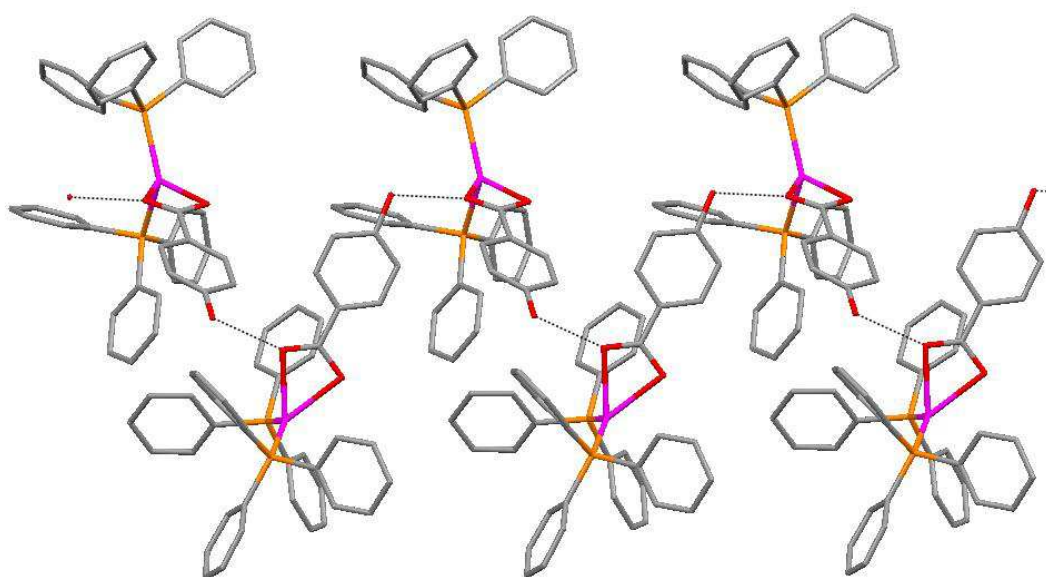


Εικόνα 22: Οι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου  $[Ag(tpp)_2(o-Hbza)]$  (**1**)





Εικόνα 23: Οι ενδομοριακοί και διαμοριακοί δεσμοί υδρογόνου  $[Ag(tpp)_2(p-Hbza)]$  (**3**)

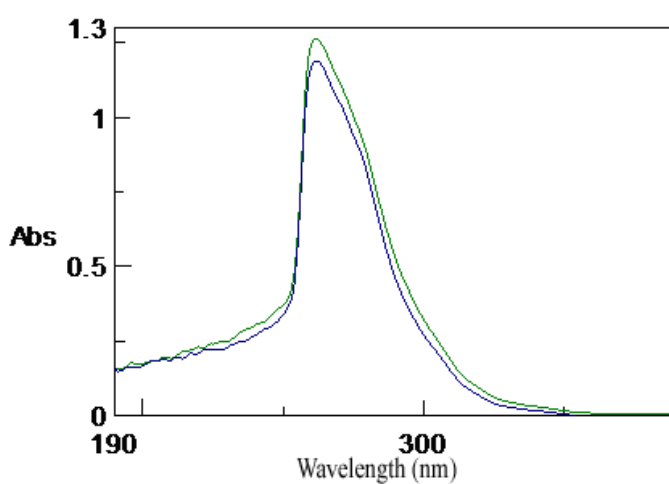


Εικόνα 22: Οι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου  $[Ag(tpp)_2(p-Hbza)]$  (**1**)

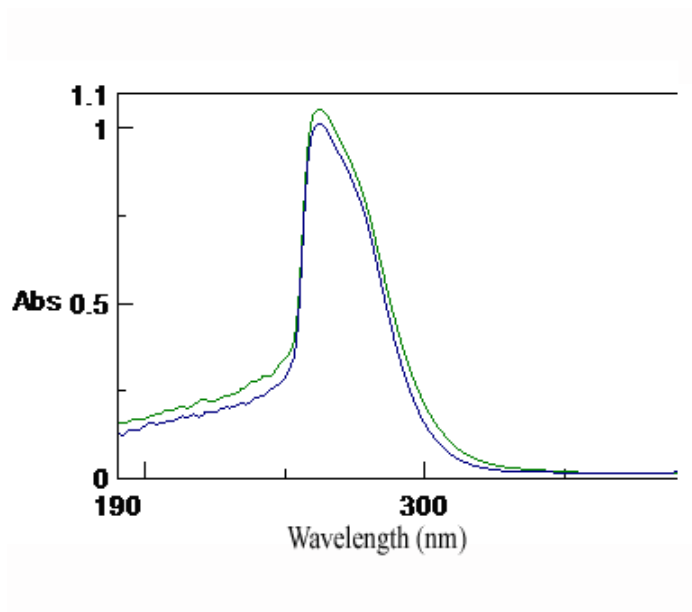
4.1.3. Σταθερότητα συμπλόκων

Η σταθερότητα των συμπλόκων ελέγχθηκε με φασματοκοπία ορατού-υπεριώδους καθώς και με μελέτη της αγωγιμομετρίας. Καμία μεταβολή σε σχέση με τα αρχικά διαλύματα δεν επήλθε στα φάσματα υπεριώδους σε διαλύματα των συμπλόκων σε DMSO για χρονική περίοδο 48 ώρες (χρόνος επώασης των συμπλόκων στα κύτταρα).

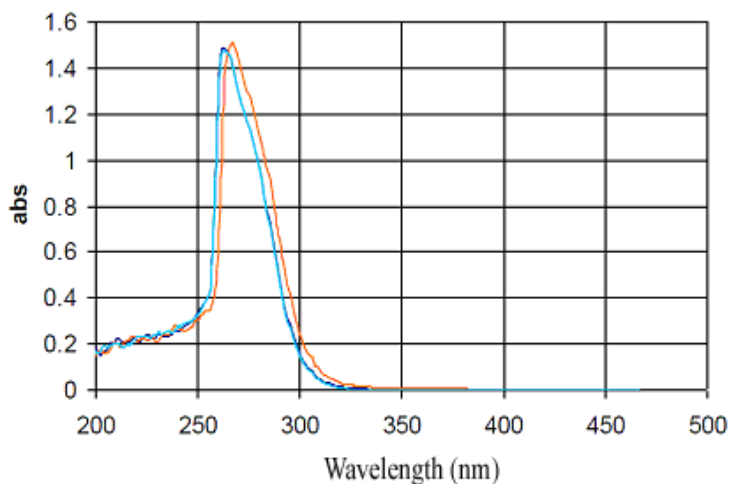
Τα φάσματα υπεριώδους-ορατού για τα σύμπλοκα είναι τα παρακάτω Εικόνα 25



(1)



(2)



(3)

Εικόνα 25: Φάσματα υπεριώδους-ορατού για τα σύμπλοκα **1-3**, σε συγκεντρώσεις  $5 \cdot 10^{-5}$  M για το **1** και **3**,  $2.5 \cdot 10^{-5}$  M για το **2**, για 0 (—) και 48 (—) ώρες

Η σταθερότητα ελέγχθηκε επίσης με μετρήσεις αγωγιμότητας, μια ηλεκτροχημική μέθοδο. Τα ιόντα του ηλεκτρολύτη που μεταφέρουν φορτία, άγουν το ηλεκτρικό ρεύμα μέσω του διαλύτη. Όταν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο, τα ιόντα κινούνται. Στην αγωγιμομετρία μετράται η ένταση του ρεύματος. Η αγωγιμότητα διαλύματος διαφέρει ανάλογα με τον αριθμό, μέγεθος και φορτίο των ιόντων που υπάρχουν στο διάλυμα. Ιόντα διαφορετικών σωματιδίων θα έχουν διαφορετική αγωγιμότητα. Αν σε μια αντίδραση αντικατασταθεί ένα ιόν με ένα άλλο διαφορετικού μεγέθους η/και φορτίου παρατηρείται μεταβολή στην αγωγιμότητα.

Με σκοπό να εξεταστεί η πιθανή διάσπαση των συμπλόκων η μη σε ιόντα που πιθανόν δημιουργούνται σε διάλυμα DMSO ή DMSO/νερό, μετρήθηκε η μοριακή αγωγιμότητα ( $A_m$ ). Η μοριακή αγωγιμότητα για τα σύμπλοκα **1-3** δίνεται στον Πίνακα 1.

Οι τιμές δείχνουν ότι δεν έχουν δημιουργηθεί ιόντα στο διάλυμα, αποδεικνύοντας την σταθερότητα των συμπλόκων

Πίνακας1

Σύμπλοκα Ωρες (h)	Μοριακή αγωγιμότητα ( $\Lambda_m$ ) σε DMSO		
	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
0 h	17.8	15.0	5.2
48 h	18.1	15.2	5.6
72 h	14.4	15.0	6.8

#### 4.2. Αποτελέσματα από την μέθοδο MTT

Τα σύμπλοκα **1-3** καθώς και οι υποκαταστάτες τους ελέγχθηκαν με την μέθοδο MTT έναντι καρκινικών σειρών, αδενοκαρκινώματος του μαστού (MCF-7) και λειομυοσαρκώματος (LMS) καθώς και σε υγιή σειρά ινοβλάστων (MRC-5). Υπολογίστηκαν οι τιμές  $IC_{50}$  για την εκτίμηση της κυτταρικής ανάπτυξης των κυττάρων υπό την επίδραση των συμπλόκων. Οι τιμές  $IC_{50}$  φαίνονται στον Πίνακα 2. Τα σύμπλοκα δείχνουν να εμφανίζουν εκλεκτικότητα ως προς το λειομυοσαρκωματικά και τα μαστικά καρκινικά κύτταρα έναντι των υγιών κυττάρων. Το πιο δραστικό σύμπλοκο φαίνεται να είναι το σύμπλοκο με ασπιρίνη ( $[Ag(tpp)_3(asp)](dmf)$ ) (**2**) με μικρή τιμή  $IC_{50}$  και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές αλλά και μεγάλη τιμή  $IC_{50}$  έναντι των υγιών ινοβλαστών. Συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα **1-3** φαίνεται να είναι δύο φορές λιγότερα δραστικά στους υγιείς ινοβλάστες σε σχέση με το λειομυοσάρκωμα και περίπου 1.5 φορά σε σχέση με το

αδενοκαρκίνωμα του μαστού. Το παραπάνω χαρακτηριστικό των συμπλόκων είναι πολύ σημαντικό γιατί υποδηλώνει ότι εμφανίζουν μια εκλεκτικότητα σε σχέση με τα καρκινικά και τα υγιή κύτταρα, χαρακτηριστικό σημαντικό για τα μεταλλοθεραπευτικά σύμφωνα με τον J. Reedijk (J. Reedijk 2003). Τα σύμπλοκα **1** και **3** αντίστοιχα, τα οποία έχουν το ίδιο μοριακό βάρος με την μόνη διαφορά ότι το OH βρίσκεται σε όρθο- ή πάρα- θέση αντίστοιχα, εμφανίζουν παρόμοια δραστικότητα στα υγιή και καρκινικά κύτταρα. Το σύμπλοκο **2**, το σύμπλοκο της ασπιρίνης, εμφανίζει την μεγαλύτερη δραστικότητα που μπορεί να οφείλεται στην παρουσία των τριών μορίων trp αλλά και της εστερομάδας της ασπιρίνης.

Επίσης, ελέγχθηκαν οι υποκατάστατες των συμπλόκων για τη ικανότητα αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης. Οι υποκατάστατες δεν έχουν την ικανότητα να αναστείλουν τα καρκινικά ή τα υγιή κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι η παρουσία του μετάλλου αλλάζει τις ιδιότητες των υποκαταστατών, κάνοντας τους πιο δραστικούς και αποτελεσματικούς έναντι καρκινικών κυττάρων. Επίσης, πρότυπες ουσίες, όπως ο  $\text{AgNO}_3$  και το cisplatin, μελετήθηκαν και αποδείχτηκε ότι είναι λιγότερο δραστικές από ότι οι σύμπλοκες ενώσεις.

Πίνακας 2

Complexes	IC <sub>50</sub> (μM)		
	MCF-7	LMS	MRC-5
<b>1</b>	2.5±0.5	1.6±0.3	3.1±0.3
<b>2</b>	1.6±0.2	1.5±0.1	2.9±0.1
<b>3</b>	2.0±0.2	1.6±0.1	3.5±0.3
AgNO <sub>3</sub>	3.3±0.2	3.7±0.3	27.7±3.3
AspNa	>350	>350	>350
o-hbzaH	>400	>400	>400
tpp	56.5±10.6	67.4±13.9	>160
Cisplatin	20	25	

#### 4.3. Αποτελέσματα από την Μέθοδο Trypan Blue

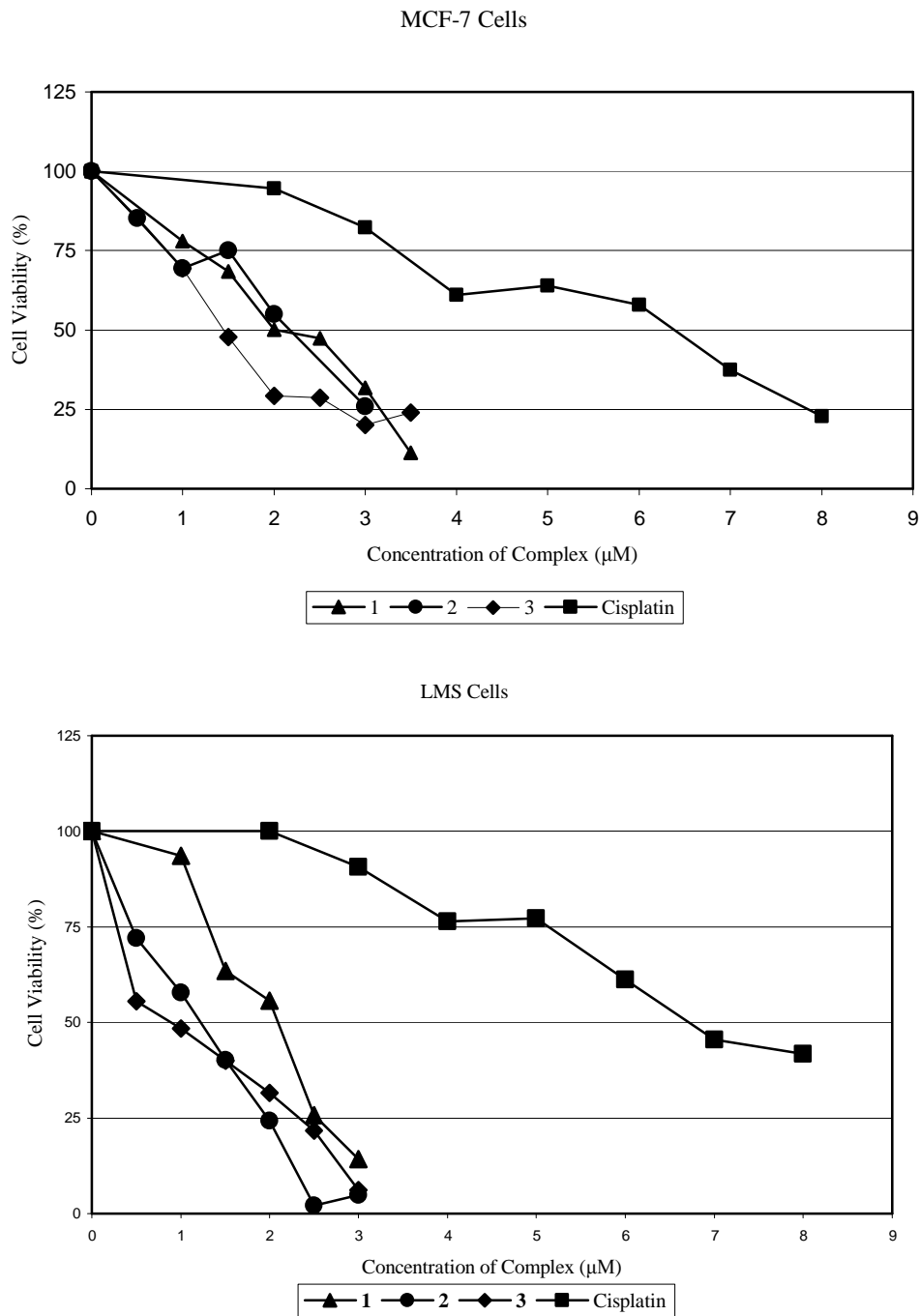
Τα σύμπλοκα **1-3** ελέγχθηκαν και ως προς την ικανότητα τους να αναστείλουν την κυτταρική βιωσιμότητα (μέθοδος Trypan Blue). Οι τιμές IC<sub>50</sub> φαίνονται στον Πίνακα 3. Οι IC<sub>50</sub> τιμές των συμπλόκων μετά από 48 ώρες είναι για τα MCF-7: 2.25±0.34 (**1**), 2.26±0.29 (**2**) και 1.36±0.43 (**3**). Για τα LMS κύτταρα οι τιμές IC<sub>50</sub> είναι: 1.25±0.25 (**1**), 1.97±0.16 (**2**) και 1.06±0.24 (**3**). Με την μέθοδο Trypan Blue, παρατηρείται μια μικρή εκλεκτικότητα των κυττάρων ως προς το σάρκωμα (λειομυοσάρκωμα). Το πιο δραστικό σύμπλοκο φαίνεται είναι το σύμπλοκο με το παρα-παράγωγο του βενζοϊκού οξέος (παρα-βενζοϊκό οξύ) (**3**).

Επίσης, τα σύμπλοκα είναι πιο δραστικά (2-3 φορές) σε σχέση με το cisplatin, βασική προϋπόθεση σύμφωνα με το J. Reedijk, για να χαρακτηριστεί ένα σύμπλοκο αντικαρκινικό (Reedijk J. 2003).

Στην Εικόνα 26 είναι τα διαγράμματα κυτταρικής βιωσιμότητας ως προς την συγκέντρωση των συμπλόκων και του cisplatin, στα καρκινικά κύτταρα MCF-7 και LMS για τον υπολογισμό των  $IC_{50}$  τιμών.

Πίνακας 3

Complexes	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	
	MCF-7	LMS
<b>1</b>	2.26 $\pm$ 0.29	1.97 $\pm$ 0.16
<b>2</b>	2.25 $\pm$ 0.34	1.25 $\pm$ 0.25
<b>3</b>	1.36 $\pm$ 0.43	1.06 $\pm$ 0.24
Cisplatin	6.81 $\pm$ 0.32	6.53 $\pm$ 0.43



Εικόνα 26: Διαγράμματα κυτταρικής βιωσιμότητας ως προς την συγκέντρωση των συμπλόκων και του cisplatin σε MCF-7 και LMS.



Σύμπλοκα αργύρου(I) με καρβοξυλικά οξέα στην βιβλιογραφία έχουν αποδειχτεί ότι παρουσιάζουν μεγάλη δραστηριότητα έναντι πολλών ειδών καρκινικών σειρών και αντίθετα μικρή δραστηριότητα έναντι υγιών κυττάρων.

Τα σύμπλοκα  $[Ag_2(NH_3)_2(salH)_2]$  (**4b**) και  $[Ag_2(salH)_2]$  (**4c**) τα οποία περιέχουν σαλικυλικό οξύ και διαφέρουν με τα σύμπλοκα **1-3** που εξεταστήκαν στην διατριβή ως προς την παρουσία αμμωνίας και όχι trp. Τα σύμπλοκα μελετήθηκαν σε καρκινικές σειρές (πλακώδες καρκίνωμα της γλώσσας (Cal-27), καρκίνωμα ηπατοκυττάρων (HepG2), και ανθρώπινο καρκίνωμα του ήπατος (A-498). Οι τιμές  $IC_{50}$  κυμαίνονται από 9-51  $\mu M$ , δείχνοντας πολύ μικρότερη δραστηριότητα από ότι τα μελετημένα στην διατριβή αυτή σύμπλοκα **1-3**. Ένας πιθανός λόγος είναι η παρουσία φωσφίνης αλλά και ο διαφορετικός τύπος καρκινικών κυττάρων (Coyle B. et al 2004).

Πολυμέρη σύμπλοκα αργύρου(I) με δομή  $[Ag(fbc)]_n$  (**5a**),  $[Ag_2(cpd)]_n$  (**5b**),  $[Ag_2(idc)]_n$  (**5c**) που περιέχουν τους καρβοξυλικούς υποκαταστάτες 4-fluorobenzoic acid (fbcH), cyclopentane-1,1-dicarboxylic acid (cpdH<sub>2</sub>) και iminodiacetic acid (idcH<sub>2</sub>) και το σύμπλοκο  $\{Na[Ag(NH_2SO_3)_2]\}_n$  (**6**), που περιέχει σουλφαμικό οξύ μελετήθηκαν σε υγιή κύτταρα (υγιείς ινοβλάστες επίμυων (NIH3T3) και φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα ήπατος (L-02) και σε καρκινικά κύτταρα, αδenoκαρκίνωμα μήτρας (HeLa), HepG2, γαστρικό καρκίνωμα (BGC), καρκίνωμα του πνεύμονα (95-D) και ρινοκαρκίνωμα (CNE) (Πίνακας 4). Από τα τρία παραπάνω σύμπλοκα, το πιο δραστικό είναι το  $[Ag_2(cpd)]_n$  σε όλες τις καρκινικές σειρές, αλλά είναι εξίσου τοξικό σε υγιή κύτταρα (Zhu H.L. et al 2003, Liu X.Y. et al 2005).

Άλλα σύμπλοκα με καρβοξυλικά οξέα που έχουν μελετηθεί από ερευνητές είναι  $[Ag_2(phen)_3(mal)] \cdot 2H_2O$  (**7**) (malH<sub>2</sub>= μαλονικό οξύ, phen= 1,10-φenaφρολίνη), (6-OH-C-COO-Ag) (**8a**) 6-hydroxycoumarin-3-carboxylatosilver, (7-OH-C-COO-Ag) (**8b**) 7-hydroxycoumarin-3-carboxylatosilver and (8-OH-C-COOAg) (**8c**) 8-hydroxycoumarin-3-

carboxylatosilver μελετήθηκαν στις καρκινικές σειρές A-498 και HepG2. Οι τιμές  $IC_{50}$  κυμαίνονται 17-35  $\mu M$  και 2.7-7.5  $\mu M$  για τα A-498 και Hep-G2, αντίστοιχα. Δείχνοντας ότι εμφανίζουν μια εκλεκτικότητα ως προς το καρκίνωμα ηπατοκυττάρων. Τα σύμπλοκα **4a-c** μελετήθηκαν και έναντι υγιών κυττάρων φυσιολογικά ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα (CHANG) και proximal tubular cells (HK-2) και εμφάνισαν μικρή δραστηριότητα (Deegan C. et al 2007, Thati B. et al 2007).

Οι ερευνητές Gust et al. συνέθεσαν σύμπλοκο με υποκαταστάτη propargyl acetylsalicylates (Biersack B. et al 2012). Εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα MCF-7 ( $IC_{50}=4.9 \mu M$ ) (Biersack B. et al 2012). Τιμή  $IC_{50}$  δυο φορές μικρότερη από ότι τα σύμπλοκα που μελετήθηκαν.

Από τον παρακάτω Πίνακα 4, φαίνεται ότι τα σύμπλοκα αργύρου(I) με σαλικυλικό οξύ ( $SalH_2$ ), ή των παραγώγων του ακετυλοσαλικυλικό οξύ ( $aspH$ ) και παρα-ύδροξυ-βενζοϊκό οξύ ( $p-HbzaH$ ) εμφανίζουν μεγάλη δραστηριότητα έναντι καρκινικών κυττάρων αλλά και μικρή δραστηριότητα σε υγιή κύτταρα. Η παρουσία της φωσφίνης φαίνεται να επηρεάζει την κυτταροτοξικότητα των συμπλόκων σε σύγκριση τα σύμπλοκα  $[Ag_2(NH_3)_2(salH)_2]$  (**4b**) και  $[Ag_2(salH)_2]$  (**4c**), τα οποία είχαν αμμωνία ή απουσία άλλου υποκαταστάτη. Τα σύμπλοκα **5a-c** και **6** παρουσιάζουν μεγάλη δραστηριότητα σε υγιή κύτταρα (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. (A-498= ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα, HeLa= αδενοκαρκίνωμα τραχήλου, MCF-7 = αδενοκαρκίνωμα μαστού, HepG2 = ηπατοκαρκίνωμα, HK-2= Proximal tubular cell, BGC= γαστρικό καρκίνωμα, 95-D= καρκίνωμα του πνεύμονα, CNE= ρινοκαρκίνωμα, Cal-27= Πλακώδες καρκίνωμα της γλώσσας, LMS= λειομυοσάρκωμα, NIH3T3= ινοβλάστες επίμυων, L-02= φυσιολογικά κύτταρα ήπατος, CHANG= φυσιολογικά κύτταρα ήπατος, HK-2= Proximal tubular cell, MRC-5= ινοβλάστες πνεύμονα)

Σύνπλοκα	IC <sub>50</sub> μM														Ref.
	HeLa	A-498	MCF-7	HepG2	BGC	95-D	CNE	Cal-27	LMS	NIH3T3	L-02	CHAN G	HK-2	MRC-5	
Cisplatin	25	14	20	15					6.53			45	18	19.6	
AgNO <sub>3</sub>	24.1		3.3						3.7					27.7	
[Ag(tpp) <sub>2</sub> (o-Hbza)] <b>1</b>			2.5						1.6					3.1	
{[Ag(tpp) <sub>3</sub> (asp)](dmf)} <b>2</b>			1.6						1.5					2.9	
[Ag(tpp) <sub>2</sub> (p-Hbza)] <b>3</b>			2						1.6						
[Ag <sub>2</sub> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (salH) <sub>2</sub> ] <b>4b</b>		32		9				51							Coyle B. et al 2004
[Ag <sub>2</sub> (salH) <sub>2</sub> ] <b>4c</b>		18		20				27							Coyle B. et al 2004
[Ag(fbc)] <sub>n</sub> <b>5a</b>	8.1			8.7	9.3	8.7	16.2			41.6	17.4				Zhu H.L. et al 2003, Liu X.Y. et al 2005
[Ag <sub>2</sub> (cpd)] <sub>n</sub> <b>5b</b>	4.2			4.2	6.3	4.2	10.8			4.2	4.2				Zhu H.L. et al 2003, Liu X.Y. et al 2005
[Ag <sub>2</sub> (idc)] <sub>n</sub> <b>5c</b>	20.6			13.4	25.4	26.8	60.1			11.7	25.8				Zhu H.L. et al 2003, Liu X.Y. et al 2005
{Na[Ag(NH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]} <sub>n</sub> <b>6</b>	12.1			15.3	9.9	13.2	11.7			15.4	8.6				Liu Z.D. et al 2004
[Ag <sub>2</sub> (phen) <sub>3</sub> (mal)]·2H <sub>2</sub> O <b>7</b>		4		4.7											Deegan C. et al 2007, Thati B. et al 2007
(6-OH-C-COO-Ag) <b>8a</b>		30		2.7								110	185		Thati B. et al 2007
(7-OH-C-COO-Ag) <b>8b</b>		35		7.5								>250	>250		Thati B. et al 2007
(8-OH-C-COOAg) <b>8c</b>		17		5.5								>250	>250		Thati B. et al 2007

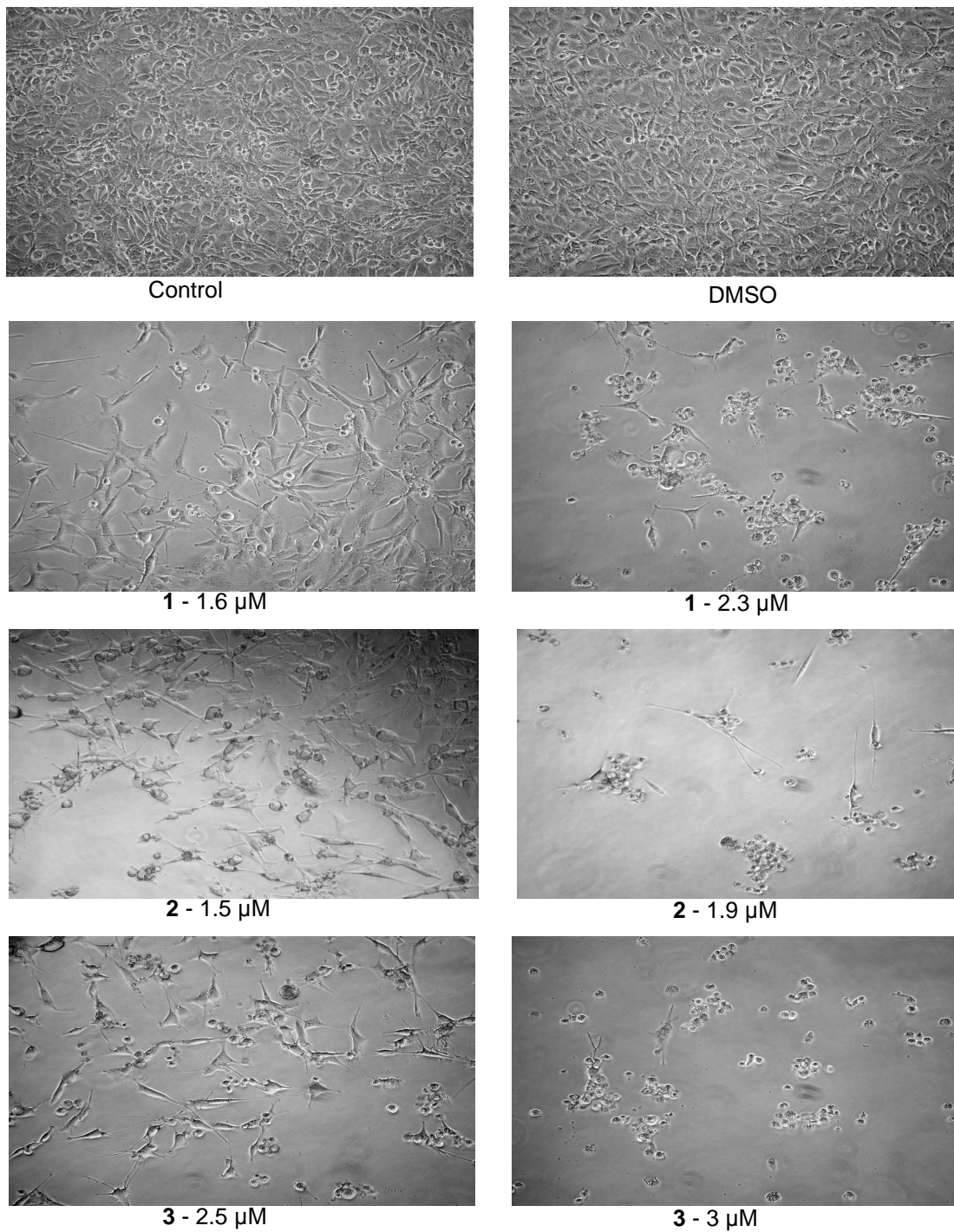
#### **4.4. Αποτελέσματα Μορφολογίας LMS Κυττάρων**

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η απόπτωση μπορεί να είναι εμφανής στο μικροσκόπιο. Η η συρρίκνωση των κυττάρων, η πύκνωση (λόγω της συμπύκνωσης της χρωματίνης) και το πακετάρισμα των οργανιδίων (Elmore S. et al 2007) είναι τα πρώτα εμφανή χαρακτηριστικά της απόπτωσης.

Αρχικά, για να εκτιμηθεί η ικανότητα των συμπλόκων να προκαλούν απόπτωση, τα LMS κύτταρα, μετά από επώαση με τα σύμπλοκα **1-3** , για 48 ώρες, παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο. Στην εικόνα 27 παρατηρείται ότι τα LMS κύτταρα μετά την επώαση με τα σύμπλοκα, δεν διατηρούν πλέον την μορφολογία τους (από επιμήκη μετατρέπονται σε στρογγυλά), διακόπτουν την επαφή μεταξύ τους, αποκολλούνται από το ταπήτιο του τρυβλίου (αιωρούνται στο τρυβλίο), συρρικνώνονται και μειώνεται η ανάπτυξή τους.

Επιπλέον, φαίνεται ότι με αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκων, οι αλλαγές που συμβαίνουν στα κύτταρα είναι πιο έντονες, δείχνοντας έναν πιθανό δόσο-εξαρτώμενο μηχανισμό απόπτωσης. Πολλές φορές παρατηρείται ότι τα ζωντανά-προσκολλημένα κύτταρα είναι ελάχιστα σε σχέση με τα κύτταρα που δεν δεχτήκαν σύμπλοκα, αποδεικνύοντας την κυτταροτοξικότητα των συμπλόκων σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις.

Τα κύτταρα επώαστηκαν επίσης με τον διαλύτη των συμπλόκων DMSO, στην μεγαλύτερη συγκέντρωση για σύγκριση. Το DMSO φαίνεται ότι δεν επηρεάζει την μορφολογία και την ανάπτυξη των LMS κυττάρων αλλά είναι ίδιο με τα κύτταρα που δεν δέχτηκαν κανένα σύμπλοκο.



Εικόνα 27: Μορφολογία LMS κυττάρων, μετά από επώαση με τα σύμπλοκα **1-3**, μετά από 48 ώρες

#### 4.5. Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής

Με την χρήση της κυτταρομετρίας ροής αποδείχτηκε η απόπτωση που προκαλούν τα σύμπλοκα **1-3** στα LMS κύτταρα μετά από επώαση τους για 48 ώρες.

Τα διαγράμματα στην Εικόνα 28 δείχνουν την απόπτωση ή νέκρωση σε σχέση με τα κύτταρα που δεν έχουν επωαστεί με τα σύμπλοκα. Το πεδίο Q1 αντιστοιχεί σε νεκρωτικά κύτταρα, το πεδίο Q2 σε μετα-αποπτωτικά κύτταρα (late apoptotic cells), το πεδίο Q3 στα ζωντανά κύτταρα και το πεδίο Q4 σε προ-αποπτωτικά κύτταρα (early apoptotic cells). Το ποσοστό της απόπτωσης υπολογίζεται με την άθροιση των πεδίων Q2 και Q4.

Για την περίπτωση του συμπλόκου **1**, που περιέχει ορθο-ύδροξυ-βενζοϊκό οξύ, το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων σε συγκέντρωση 1.6  $\mu\text{M}$  είναι 65.4 %, το ποσοστό των νεκρωτικών 5.0% και των αποπτωτικών 29.6%. Τα κύτταρα που δεν έχουν υποστεί επώαση με το σύμπλοκο, έχουν ποσοστό ζωντανών κυττάρων 84.9%, νεκρωτικών 4.8% και αποπτωτικών 10.4%. Συμπεραίνεται ότι το σύμπλοκο **1**, στην τιμή  $\text{IC}_{50}$  προκαλεί απόπτωση σε ποσοστό 29.6%. Το σύμπλοκο **1** σε μεγαλύτερη συγκέντρωση 2.3  $\mu\text{M}$ , αυξάνεται το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων (81.3%), ενώ τα νεκρωτικά κύτταρα ανέρχονται σε ποσοστό 1.6% και τα ζωντανά 17.1%. υποδεικνύοντας ότι το σύμπλοκο προκαλεί απόπτωση με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του συμπλόκου, αυξάνεται και το ποσοστό απόπτωσης).

Το σύμπλοκο **2**, το οποίο περιέχει ασπιρίνη, σε συγκέντρωση ίδια με το  $\text{IC}_{50}$  το ποσοστό της απόπτωσης είναι 44.0%, ενώ της νέκρωσης 8.8% και των ζωντανών κυττάρων σε ποσοστό 47.2%. Τα κύτταρα που δεν έχουν επωαστεί με το σύμπλοκο έχουν ποσοστό αποπτωτικών 10.4%, νεκρωτικών 4.8% και ζωντανών κυττάρων 84.9%.

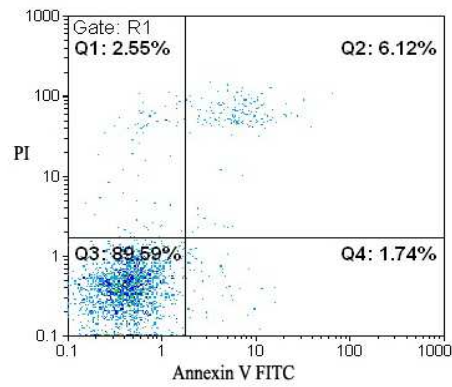
Η δυνατότητα του συμπλόκου **2** να προκαλεί απόπτωση, ελέγχθηκε και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση 1.9  $\mu\text{M}$ . Το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων αυξάνεται (69.4%), έναντι των νεκρωτικών 8.9% και των ζωντανών 21.7%.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η ασπιρίνη, δεν προκαλεί απόπτωση, υποδεικνύοντας ότι παρουσία του μετάλλου, αλλάζουν οι ιδιότητες της και μπορεί να είναι κυτταροτοξική στα καρκινικά κύτταρα, προκαλώντας απόπτωση (Lu X. et al 1995).

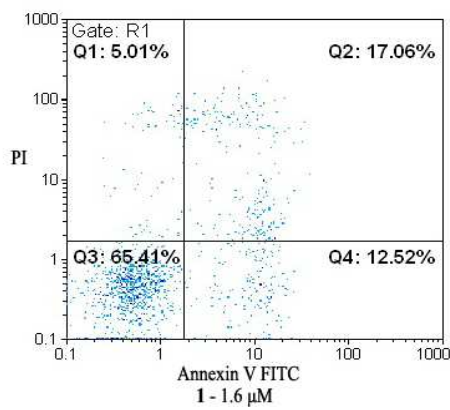
Στην περίπτωση του συμπλόκου **3**, το οποίο περιέχει παρα-ύδροξυ-βενζοϊκό οξύ, το ποσοστό της απόπτωσης που προκαλείται σε συγκέντρωση 2.5  $\mu\text{M}$  είναι 81.2%, ενώ ποσοστό της νέκρωσης ανέρχεται σε 1.1% και των ζωντανών κυττάρων σε 17.6%. Ενώ, τα αντίστοιχα κύτταρα που δεν έχουν επωαστεί με το σύμπλοκο, τα ποσοστά απόπτωσης είναι 10.4%, νέκρωσης 4.8% και των ζωντανών κυττάρων 84.9%. Το σύμπλοκο **3**, σε συγκέντρωση 3  $\mu\text{M}$  προκαλεί υψηλό ποσοστό απόπτωσης 89.5%, νέκρωσης 0.8% και των ζωντανών κυττάρων 9.7%.

Με την κυτταρομετρία ροής, αποδεικνύεται, ότι τα σύμπλοκα **1-3** προκαλούν απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) στα LMS κύτταρα με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, όμως σε αυτό το στάδιο των πειραμάτων δεν μπορεί να δηλωθεί με πιο μηχανισμό (ενδογενές ή εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης).

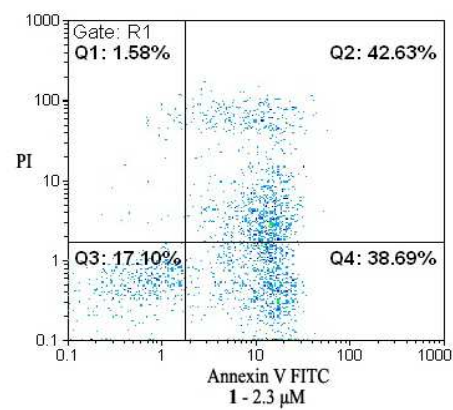
Σύμφωνα με την βιβλιογραφία το σύμπλοκο αργύρου(I) (6-OH-C-COO-Ag), έχει την ικανότητα να προκαλεί απόπτωση στα HepG2 καρκινικά κύτταρα μετά από επώαση τους με το σύμπλοκο για 24 ώρες, αποδεικνύοντας το μέσω της τροποποίησης του πληθυσμού των κυττάρων που εισάγονται στην  $G_0/G_1$  φάση του κυτταρικού κύκλου. Τα κύτταρα εισέρχονται από την φάση  $G_1$  στην  $G_0$  όταν το περιβάλλον δεν είναι ευνοϊκό (Thati B. et al 2007).



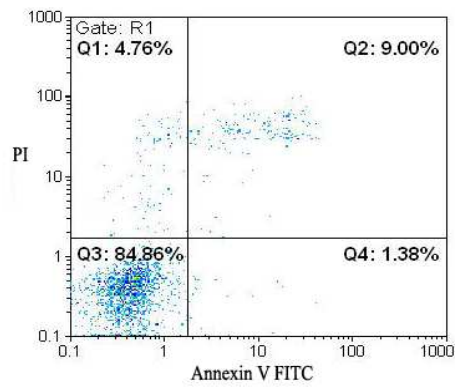
Control



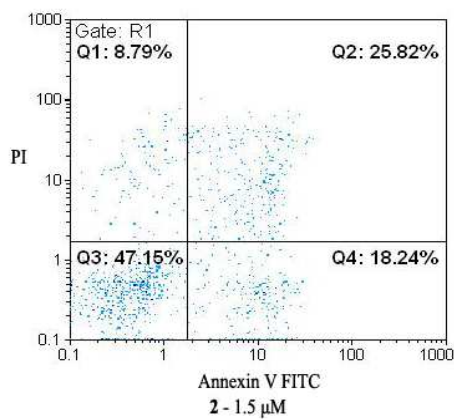
1 - 1.6  $\mu$ M



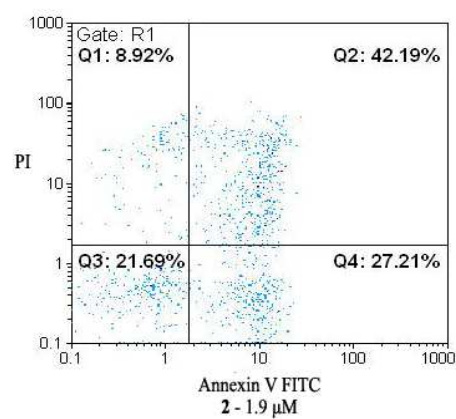
1 - 2.3  $\mu$ M



Control

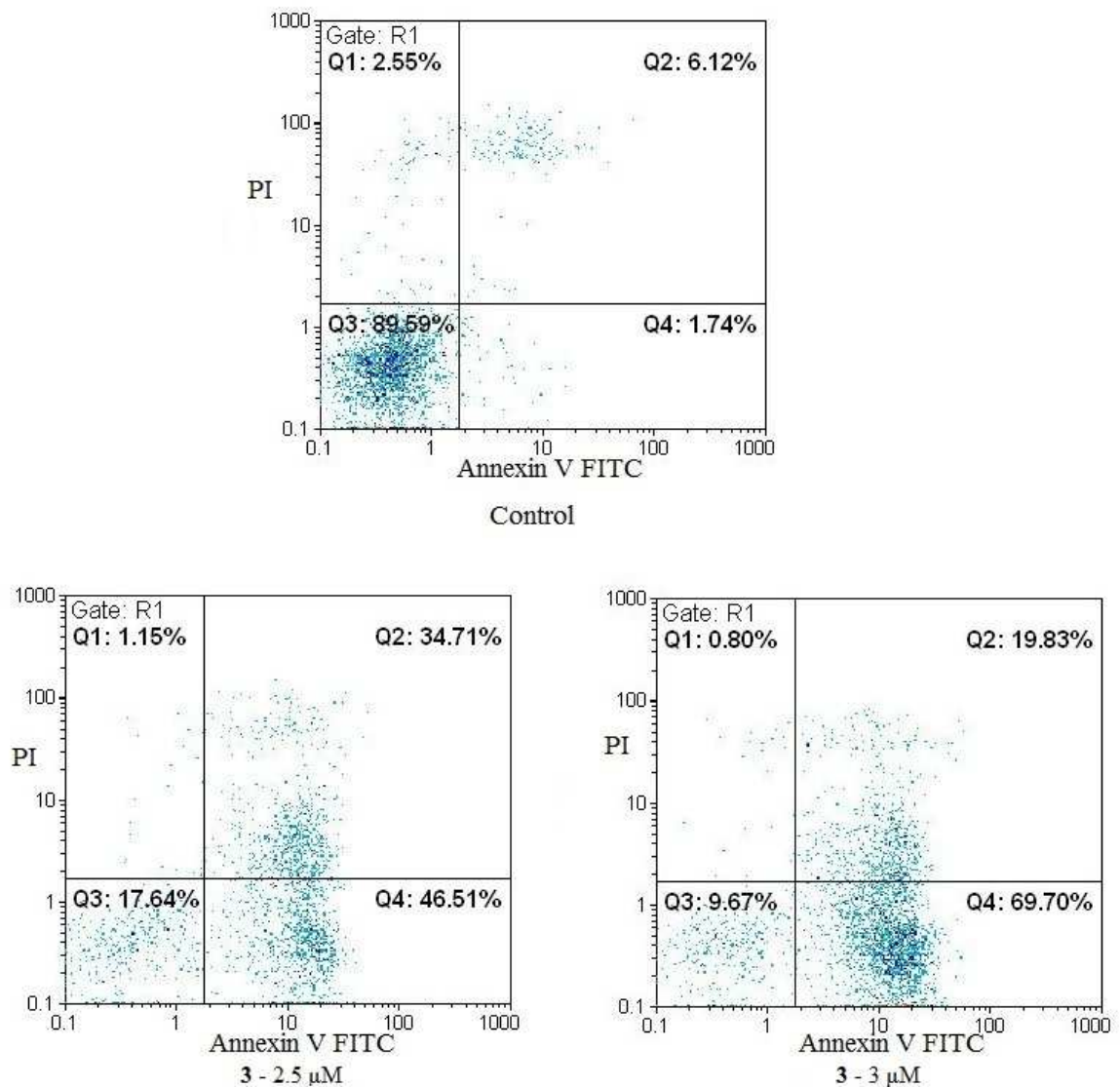


2 - 1.5  $\mu$ M



2 - 1.9  $\mu$ M





Εικόνα 28: Διαγράμματα κυτταρομετρία ροής LMS κυττάρων με επώαση των συμπλόκων **1-3** για 48 ώρες.

#### 4.6. Αποτελέσματα Ηλεκτροφόρησης DNA

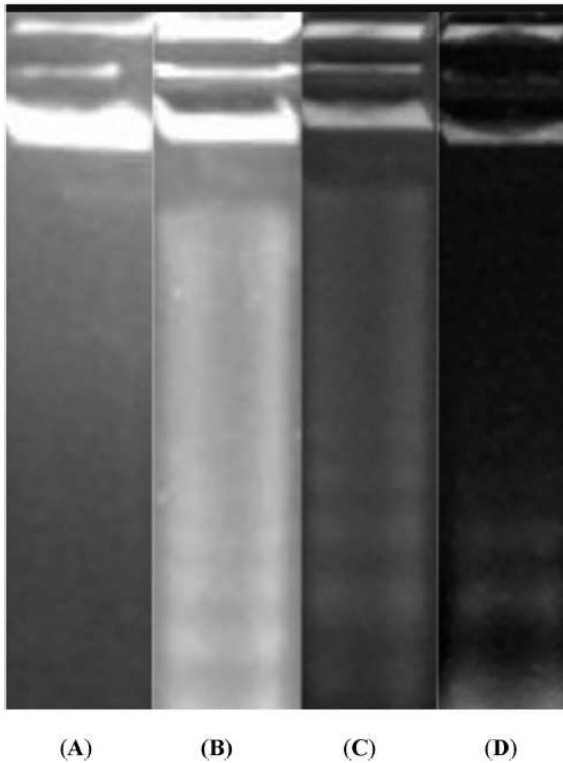
Κύριες μορφολογικές αλλαγές της απόπτωσης συμπεριλαμβάνονται, η συμπύκνωση της χρωματίνης του κυτταρικού πυρήνα, ο κατακερματισμός του πυρηνικού

DNA σε θραύσματα διαφορετικών μεγεθών (DNA laddering), η δημιουργία οπών (διαύλων-πόρων) μεγάλης διαμέτρου στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων, η εμφάνιση χαρακτηριστικών προεξοχών στην κυτταρική μεμβράνη και ο σχηματισμός φαγοσωμάτων που περιέχουν κυτταροπλασματικά και πυρηνικά υπολείμματα (Μαργαρίτης Λ.Χ 2004).

Η απόπτωση μπορεί να επιβεβαιωθεί με DNA laddering ή DNA fragmentation και πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση του πυρηνικού DNA, η ύπαρξη θραυσμάτων διαφορετικών μεγεθών μπορεί να φανεί στο πήκτωμα αγαρόζης.

Τα LMS κύτταρα επώστηκαν με τα σύμπλοκα **1-3** για 48 ώρες για να επιβεβαιωθεί η απόπτωση με την ύπαρξη θραυσμάτων DNA (Εικόνα 29). Η γραμμή (A) αντιστοιχεί στα LMS κύτταρα, τα οποία έχουν επωαστεί με την μέγιστη ποσότητα διαλύματος των συμπλόκων (DMSO). Οι γραμμές (B), (C) και (D) αντιστοιχούν στα σύμπλοκα **3** (2.2 μM), **1** (1.6 μM) και **2** (1.9μM), αντίστοιχα.

Παρατηρείται ότι η γραμμή (A), αντιστοιχεί σε κύτταρα, τα οποία δεν έχουν επωαστεί με τα σύμπλοκα, και δεν εμφανίζει το χαρακτηριστικό της απόπτωσης, την θραυσματοποίηση του πυρηνικού DNA. Οι γραμμές (B), (C) και (D) εμφανίζουν θραύσματα που οφείλονται στην δράση των συμπλόκων **1-3** στο πυρηνικό DNA των LMS κυττάρων, αποδεικνύοντας ότι τα σύμπλοκα **1-3** προκαλούν απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο).



Εικόνα 29: Ηλεκτροφόρηση πυρηνικού DNA LMS κυττάρων, μετά από επώαση τους με τα σύμπλοκα **1-3** για 48 ώρες.

#### 4.7. Αποτελέσματα αναστολής της λιποξυγενάσης LOX από τα σύμπλοκα 1-3

Η LOX αποτελεί ένα σημαντικό ένζυμο, εφόσον εμπλέκεται στην ανάπτυξη του καρκίνου του παγκρέατος, του μαστού, του προστάτη και του εντέρου (Tong W.G. et al 2002). Έχει βρεθεί ότι η αναστολή της LOX προκαλεί απόπτωση μέσω της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτοσόλιο (ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι απόπτωσης) (Tong W.G. et al 2002). Επίσης, η LOX κατά κύριο λόγο κατανέμεται στο μιτοχόνδριο (Boudnitskaya V. et al 1972, Husson F. et al 1998). Η μελέτη αναστολής της LOX από σύμπλοκα **1-3** είναι σημαντικό για να διευκρινιστεί ο τρόπος μηχανισμού δράσης τους.

Τα σύμπλοκα **1-3** μελετήθηκαν σε ποικίλες συγκεντρώσεις για την δυνατότητα τους να αναστέλλουν την LOX. Η αναστολή (%) της LOX συναρτήσει των συγκεντρώσεων των συμπλόκων **1-3** φαίνεται στην Εικόνα 30. Ο Πίνακας 5, δείχνει τις τιμές αναστολής της LOX σε  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ). Το μικρότερο  $\text{IC}_{50}$ , 2.3  $\mu\text{M}$  το εμφανίζει το σύμπλοκο **1**, το οποίο περιέχει ορθο-ύδροξυ-βενζοϊκό οξύ, το μικρότερο  $\text{IC}_{50}$  που έχει υπολογιστεί για μεταλλικά σύμπλοκα αργύρου(I) και κασσιτέρου(IV), μέχρι τώρα από το Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας. Τα σύμπλοκα **2-3**, τα οποία περιέχουν ασπιρίνη και παρα-ύδροξυ-βενζοϊκό οξύ, αντίστοιχα, εμφανίζουν παρόμοιο  $\text{IC}_{50}$ , 7.6 και 7.2  $\mu\text{M}$ . Οι υποκαταστάτες trp και το άλας της ασπιρίνης με νάτριο μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα να αναστέλλουν την LOX. Το  $\text{IC}_{50}$  της trp είναι 51.4  $\mu\text{M}$ , ενώ το άλας της ασπιρίνης δεν εμφανίζει  $\text{IC}_{50}$  σε συγκέντρωση 300  $\mu\text{M}$ . Η ασπιρίνη φαίνεται να μην επηρεάζει την δράση του ενζύμου LOX, αλλά σύμφωνα με την βιβλιογραφία αναστέλλει την COX-1. Η ένταξη των υποκαταστατών, trp και το άλας της ασπιρίνης, στο μέταλλο είχε ως αποτέλεσμα, την αλλαγή των ιδιοτήτων τους. Τέλος, για λόγους σύγκρισης, μελετήθηκε και το cisplatin, το οποίο φαίνεται να αναστέλλει την LOX σε μεγάλη συγκέντρωση  $\text{IC}_{50}= 65.9 \mu\text{M}$ .

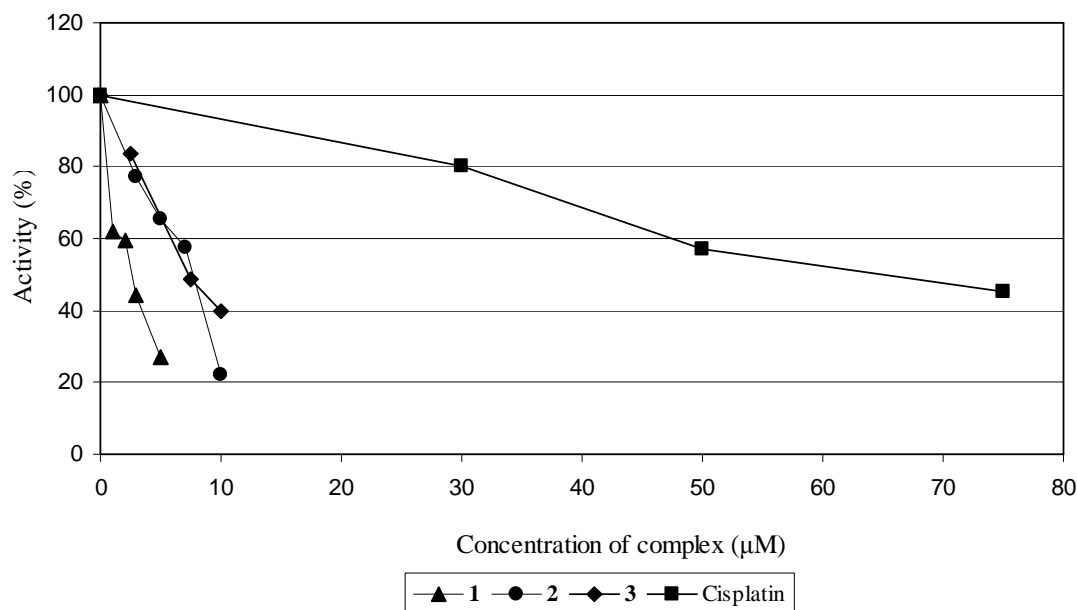
Τα σύμπλοκα **1-3** αναστέλλουν την LOX, ιδιότητα που δεν έχουν οι υποκαταστάτες τους, δείχνοντας ότι παρουσία του μετάλλου σχηματίζεται ένα πιο δραστικό σύμπλοκο με νέες ιδιότητες. Επίσης τα σύμπλοκα έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την LOX πιο αποτελεσματικά και σε μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με το cisplatin, έχοντας το ίδιο αποτέλεσμα σε μικρότερη ποσότητα συμπλόκου. Οι τιμές αναστολής της LOX είναι πολύ μικρές, δείχνοντας την ικανότητα των συμπλόκων **1-3** να προσδένονται στην LOX και να την αναστέλλουν ισχυρά. Πιθανόν, τα σύμπλοκα προσδένονται στην LOX, η οποία βρίσκεται στο μιτοχόνδριο. Με την αναστολή της LOX

το κύτταρο επάγει την απόπτωση μέσω του μιτοχονδριακού ή ενδογενούς μονοπατιού, ελευθερώνοντας το κυτόχρωμα c και επάγοντας τις κασπάσες.

Τέλος, έχει αποδειχτεί (Lazarou K. et al 2010, Ozturk I. et al 2010, Kouroulis K.N. et al 2009, Abdellah M.A. et al 2009, Xanthopoulou M.N. et al 2008, Xanthopoulou M.N. et al 2007, Xanthopoulou M.N. et al 2003) ότι η αναστολή της λιποξυγενάσης σχετίζεται με την κυτταροστατικότητα των συμπλόκων σε καρκινικά κύτταρα. Η μεγάλη δράση των συμπλόκων **1-3** έναντι μαστικών και λειομυοσαρκοματικών κυττάρων μπορεί να οφείλεται στην ανασταλτική τους δράση έναντι του ενζύμου της λιποξυγενάσης.

Πίνακας 5

Σύμπλοκα	LOX activity (IC <sub>50</sub> μM)
<b>1</b>	2.3
<b>2</b>	7.6
<b>3</b>	7.2
AspH	>300
Trp	51.4
Cisplatin	65.9



Εικόνα 30: Η αναστολή (%) της LOX συναρτήσσει των συγκεντρώσεων των συμπλόκων **1-3**.

Η μελέτη της παρεμπόδισης των ενζύμων αποκαλύπτει πληροφορίες για την εξειδίκευση τους, την αρχιτεκτονική του ενζύμου καθώς και χαρακτηριστικά της κινητικής τους (Σταμάτης Χ. 2007). Για τον διευκρινισμό της αναστολής της LOX από τα σύμπλοκα **1-3**, μελετήθηκε ο τρόπος αναστολής τους (αντιστρεπτός ή μη αντιστρεπτός αναστολέας).

Οι αναστολείς διακρίνονται σε αντιστρεπτούς και μη αντιστρεπτούς. Ο αντιστρεπτός αναστολέας έχει την ικανότητα να δεσμεύεται με το ένζυμο αντιστρεπτά, ουσιαστικά απομακρύνεται εύκολα, αποκτώντας το ένζυμο ξανά την δραστηρότητά του (Σταμάτης Χ. 2007).

Σε αντίθεση, ο μη αντιστρεπτός αναστολέας, συνδέεται ισχυρά, κυρίως με ομοιοπολικό δεσμό και μόνιμα με το ένζυμο, αδρανοποιώντας τον οριστικά (Σταμάτης Χ. 2007).

Ο αντιστρεπτός ή μη τρόπος αναστολής των συμπλόκων **1-3** ελέγχθηκε με επώαση των συμπλόκων με το υπόστρωμα σε διαφορετικούς χρόνους επώασης, αποδεικνύοντας ότι οι αναστολείς είναι αντιστρεπτοί. Στην συνέχεια μελετήθηκε ο τρόπος μηχανισμού αναστολής των αντιστρεπτών συμπλόκων **1-3** ως προς την LOX.

Οι κατηγορίες παρεμπόδισης της ενζυμικής δράση είναι (Σταμάτης Χ. 2007):

#### Συναγωνιστική παρεμπόδιση (competitive inhibition)

Στην περίπτωση αυτή, ο αναστολέας συναγωνίζεται πολλές φορές για την ίδια θέση του ενζύμου με τον υπόστρωμα, και το αντίστροφο. Συνήθως, ο αναστολέας είναι μία ένωση που έχει ανάλογη δομή ή προέρχεται από μετατροπή του πραγματικού υποστρώματος ή ένα εναλλακτικό υπόστρωμα ή προϊόν ενζυμικής δράσης (Σταμάτης Χ. 2007).

#### Μη συναγωνιστική παρεμπόδιση (non competitive inhibition)

Ο μη συναγωνιστικός αναστολέας δεν επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος στο ένζυμο. Το υπόστρωμα και ο αναστολέας συνδέονται με το ένζυμο με αντιστρεπτό τρόπο με διαφορετική σειρά και σε διαφορετικό σημείο πρόσδεσης (Σταμάτης Χ. 2007).

#### Ανταγωνιστική παρεμπόδιση (uncompetitive inhibition)

Ο αναστολέας προσδένεται αντιστρεπτά στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, σχηματίζοντας ένα ανενεργό σύμπλοκο ένζυμο-υπόστρωμα-αναστολέα που δεν έχει την ικανότητα να προσδεθεί στο ελεύθερο ένζυμο. Αυτό το είδος παρεμπόδισης, εμφανίζεται σε ενζυμικές αντιδράσεις με περισσότερα από ένα υποστρώματα (Σταμάτης Χ. 2007).

#### Μικτή παρεμπόδιση (mixed noncompetitive inhibition)

Ο αναστολέας επηρεάζει τόσο την καταλυτική ικανότητα του ενζύμου, δημιουργώντας το σύμπλοκο ένζυμο-υπόστρωμα-αναστολέας, αλλά και την ικανότητα πρόσδεσης του υποστρώματος στο ένζυμο (Σταμάτης Χ. 2007).

Η παρουσία ενός αναστολέα προκαλεί μεταβολές στις σταθερές κινητικές σταθερές: σταθερά Michaelis σύνδεσης ( $K_m$ ) και μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης ( $V_{max}$ ) που υπολογίζονται από τα διαγράμματα Lineweaver-Burk.

Η σταθερά  $K_m$  αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του υποστρώματος στην οποία η ταχύτητα της αντίδρασης ισούται με το μισό της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής δράσης, με την προϋπόθεση ότι τυχόν άλλα υποστρώματα βρίσκονται σε κορεσμό. Η σταθερά  $K_m$  εξαρτάται από το υπόστρωμα, το pH, την θερμοκρασία και την ιοντική ισχύ (Σταμάτης X. 2007).

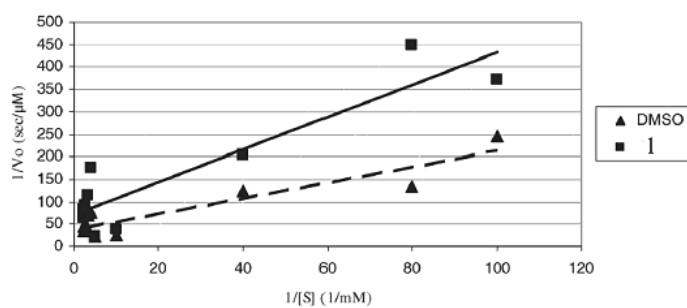
Η σταθερά  $V_{max}$  είναι η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης που επιτυγχάνεται όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος βρίσκεται σε επίπεδο κορεσμού και όταν το ένζυμο συμμετέχει στον σχηματισμό του συμπλόκου ένζυμο-υπόστρωμα. Η σταθερά  $V_{max}$  εξαρτάται από την συγκέντρωση του ενζύμου (Σταμάτης X. 2007).

Ο τρόπος μηχανισμού αναστολής των αντιστρεπτών συμπλόκων **1-3** ως προς την LOX, μελετήθηκε σε πολλές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Τα διαγράμματα Lineweaver-Burk παρατίθενται στην Εικόνα 31, καθώς και οι σταθερές  $K_m$ ,  $V_{max}$  στον Πίνακα 6 παρουσία και απουσία συμπλόκων **1-3**. Τα σύμπλοκα **1** και **2** αναστέλλουν το ένζυμο με μικτή παρεμπόδιση, λόγω του ότι μειώνεται η  $V_{max}$  και μεγαλώνει η  $K_m$  απουσία συμπλόκου. Σε αυτό το είδος αναστολής, το σύμπλοκο ένζυμο-αναστολέας και το σύμπλοκο ένζυμο-υπόστρωμα-αναστολέας σχηματίζονται συγχρόνως. Στην περίπτωση του συμπλόκου **3**, ο μηχανισμός αναστολής είναι η ανταγωνιστική παρεμπόδιση, όπου μειώνονται οι σταθερές  $K_m$  και  $V_{max}$ , απουσία συμπλόκου. Σε αυτό το είδος παρεμπόδισης το σύμπλοκο ένζυμο-υπόστρωμα-αναστολέας σχηματίζεται πριν το σχηματισμό του συμπλόκου ένζυμο-υπόστρωμα.

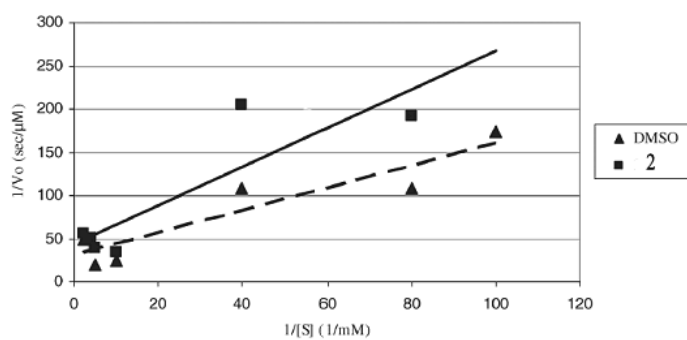


Πίνακας 6

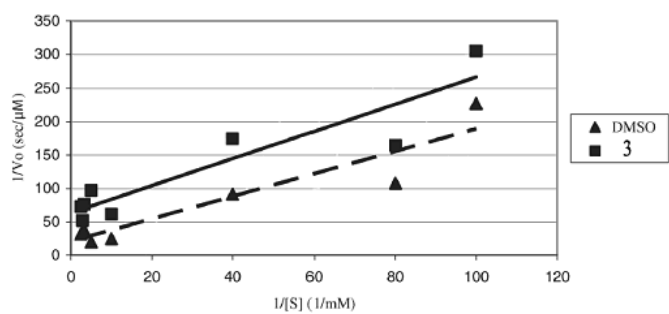
	1	DMSO 1	2	DMSO 2	3	DMSO 3
K <sub>m</sub> (mM)	0.051	0.045	0.052	0.042	0.032	0.083
V <sub>max</sub> (mM/sec) (x10 <sup>-4</sup> )	0.140	0.259	0.232	0.321	0.157	0.491



(A)



(B)



(C)

Εικόνα 31: Διαγράμματα Lineweaver-Burk παρουσία και απουσία συμπλόκων 1-3

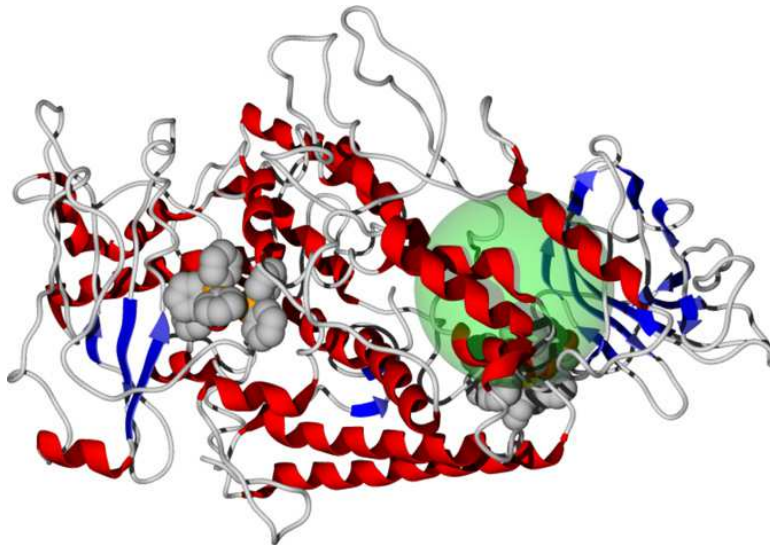
#### 4.8. Θεωρητικοί υπολογισμοί πρόσδεσης της LOX στα σύμπλοκα 1-3

Θεωρητικοί υπολογισμοί για την ικανότητα πρόσδεσης της LOX στα σύμπλοκα 1-2 πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κουρκουμέλη

Τα σύμπλοκα ελλιμενίζονται σε δύο διαφορετικές περιοχές του ενζύμου LOX, δείχνοντας τον διαφορετικό τρόπο δράσης τους.

Το σύμπλοκο 1 προσδέεται σε μία περιοχή όγκου 256 Å από τα αμινοξέα Ala569, Arg360, Arg588, Asn355, Asn502, Asn573, Asp408, Asp411, Asp578, Asp584, Cys357, Gln579, Ile359, Ile412, Leu407, Leu501, Lys587, Met406, Met497, Ser498, Trp574, Tyr409, Tyr493, Tyr571, Val358, Val570 και Val575. Δεσμοί υδρογόνου πρωτεϊνών-υποκαταστάτη μεταξύ του O του υποκαταστάτη και του N της Arg360 και του O της Tyr493. Η ενέργεια σχηματισμού του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα είναι -76.7 kJ/mol.

Το σύμπλοκο 2 προσδέεται σε μια υδροφοβική περιοχή της LOX, όγκου 573 Å, και σε μία μικρότερη περιοχή όγκου 160 Å. Τα αμινοξέα, που απαρτίζουν αυτή την θήκη πρόσδεσης είναι Ala76, Arg767, Asn128, Asn769, Asp760, Asp768, Gln766, Glu78, Glu761, Gly75, Gly765, His771, Leu74, Lys110, Met15, Phe782, Pro770, Thr73, Trp772 και Val762. Δεσμοί υδρογόνου δημιουργούνται μεταξύ του ακέτυλου-O και του N της Arg767. Η μικρότερη ενέργεια σχηματισμού του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα είναι -55.7 kJ/mol. Για αυτή την θέση πρόσδεσης και την τιμή ενέργειας σχηματισμού οι δεσμοί υδρογόνου συνεισφέρουν κατά 7% ενώ σημαντική συνεισφορά έχουν και στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις. Οι θέσεις σύνδεσης για το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα φαίνονται στο Εικόνα 32, η σφαίρα υποδεικνύει την ενεργή θέση της για τους αναστρέψιμους αναστολείς (Xanthoroulou M.N. et al 2008). Αποδεικνύεται ότι το σύμπλοκο 2 δεσμεύεται στην LOX στην ίδια περιοχή που όλοι οι αναστρέψιμοι αναστολείς προσδέονται, ενώ το σύμπλοκο 1 σε διαφορετική περιοχή.



Εικόνα 32: Οι περιοχές πρόσδεσης του συμπλόκου ένζυμου-αναστολέα. Η πράσινη σφαίρα υποδηλώνει το ενεργό κέντρο του ενζύμου.

#### **4.9. Αποτελέσματα για την αλληλεπίδραση των συμπλόκων 1-3 με το DNA**

Το DNA αποτελεί ένα κύριο στόχο για τα μεταλλικά σύμπλοκα (Komoret A.C. et al 2013) για αυτό το λόγο είναι ζωτική σημασίας να ερευνηθεί ο τρόπος πρόσδεσης του μεταλλικού συμπλόκου με το DNA. Σύμφωνα με το J. Reedijk, μία προϋπόθεση για να θεωρηθεί ένα σύμπλοκο αντικαρκινικό είναι η ικανότητα του αν προσδένεται στο DNA.

Η ηλεκτρονική φασματοσκοπία απορρόφησης (Uv-Vis) μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην μελέτη των ιδιοτήτων σύνδεσης των μεταλλικών συμπλοκών με το DNA. Υπερχρωισμός (αύξηση της απορρόφησης) ή υποχρωισμός (μείωση της απορρόφησης) μπορεί να παρατηρηθούν κατά την συμπλοκοποίηση του DNA με τα σύμπλοκα **1-3**. Ο υποχρωισμός υποδηλώνει παρεμβολή και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Afrati T. et

al 2010). Ενώ, ο υπερχρωισμός υποδηλώνει σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου, της δομής του DNA (Afrati T. et al 2010).

Η Εικόνα 33 παρουσιάζει τα διαγράμματα DNA σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκων **1-3**. Παρατηρείται ότι υπάρχει αύξηση της απορρόφησης στα σύμπλοκα **1-3**. Στην περίπτωση του συμπλόκου **1**, με ορθο-ύδροξυ-βενζοϊκό οξύ, η απορρόφηση αυξάνεται κατά 47.2%, στην περίπτωση **2**, με ασπιρίνη, η απορρόφηση αυξάνεται κατά 36.3%, ενώ στην περίπτωση του συμπλόκου **3**, με παρα-ύδροξυ-βενζοϊκό οξύ, η απορρόφηση αυξάνεται 36.5% αλλά παρατηρείται και συγχρόνως μετατόπιση στο  $\lambda_{\max}$  (μείωση του  $\lambda_{\max}$ ) (Πίνακας 7).

Στην περίπτωση των συμπλόκων **1-2**, η απορρόφηση συνεχώς αυξάνεται, χωρίς να υπάρχει μετατόπιση στο  $\lambda_{\max}$ . Ο υπερχρωισμός που παρατηρείται υποδηλώνει την σύνδεση του συμπλόκου με το DNA, η οποία μπορεί να είναι εξωτερικής φύσεως ή να έχει την ικανότητα το σύμπλοκο να ξετυλίγει την ελικοειδή δομή του DNA (Πίνακας 7).

Ο υπερχρωισμός που παρατηρείται στην περίπτωση του συμπλόκου **3**, σχετίζεται γραμμικά με τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις του συμπλόκου. Υποδηλώνοντας, το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου και συνεπώς και της δευτεροταγής δομής του DNA (Πίνακας 7).

Οι σταθερές πρόσδεσης των συμπλόκων **1-3** ως προς το DNA ( $K_b$ ), μελετήθηκαν από τα διαγράμματα της Εικόνας 34, με αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκων **1-3**. Οι σταθερές πρόσδεσης ( $K_b$ ) είναι για τα σύμπλοκα **1-3**:  $(13.3 \pm 6.5) \times 10^4$  (**1**),  $(11 \pm 2.8) \times 10^4$  (**2**) και  $(27.7 \pm 7.9) \times 10^4$  για το **3** σύμπλοκο, δείχνοντας ισχυρή αλληλεπίδραση με το DNA.

Το σημαντικό είναι ότι οι υποκαταστάτες  $\text{salH}_2$  και η  $\text{aspH}$ , παρουσιάζουν μικρότερες σταθερές  $K_b$ . Οι τιμές  $K_b$  των συμπλόκων **1-2** είναι 20 και 65 φορές ισχυρότερες από ότι οι αντίστοιχοι υποκαταστάτες ορθο-ύδροξυ-βενζοϊκό οξύ ή ασπιρίνη.

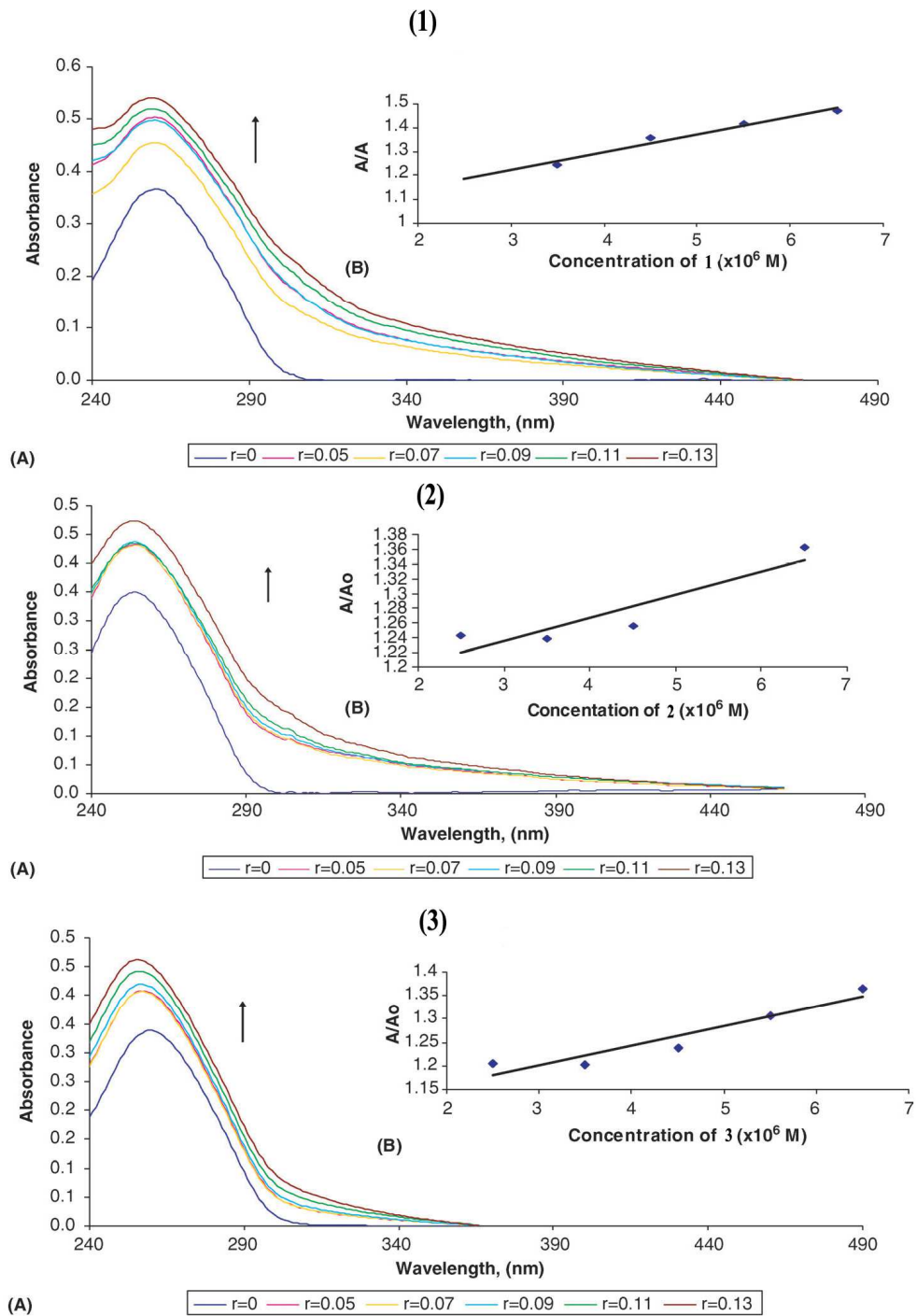
Παρουσιάζοντας την σημαντικότητα του μετάλλου στην ένταξη του με τους υποκαταστάτες. Επίσης, οι τιμές  $K_b$  των συμπλόκων **1-3** είναι ισχυρότερα από την τιμή  $K_b$  του cisplatin (2-5 φορές).

Οι διαφορετικές τιμές  $K_b$  των συμπλόκων **1-3** μπορεί να οφείλονται στην ικανότητα ή όχι των συμπλόκων να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου. Το σύμπλοκο **3** (παρα-ύδροξυ-βενζοϊκό οξύ), σχηματίζει ενδομοριακούς και διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου, με αποτέλεσμα να έχει την μεγαλύτερη τιμή  $K_b$ . Το -OH του παρα-ύδροξυ-βενζοϊκό οξύ είναι αποπροστατευμένο και δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου. Το σύμπλοκο **1**, σχηματίζει μόνο ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου, εμφανίζει την δεύτερη μεγαλύτερη τιμή  $K_b$ , ενώ το σύμπλοκο **2**, το οποίο δεν έχει την δυνατότητα να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου έχει την μικρότερη σταθερά σύνδεσης. Αποδεικνύοντας την σημασία των δεσμών υδρογόνου στην αλληλεπίδραση τους με το DNA.

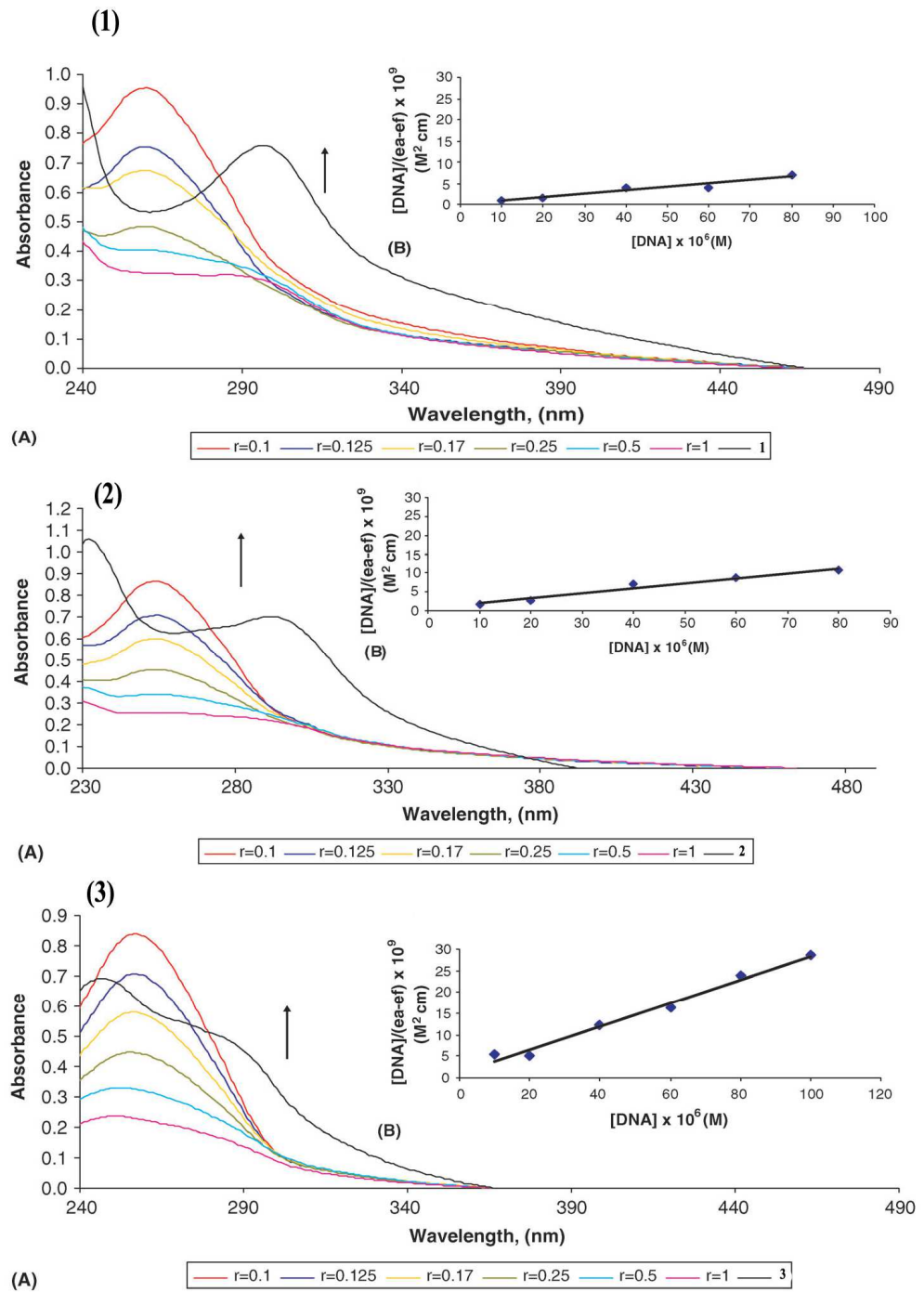
Στην βιβλιογραφία, τετραεδρικά σύμπλοκα με δομή  $[Ag(Tpms)]$ ,  $[Ag(Tpms)(PPh_3)]$ ,  $Ag(Tpms)(PCy_3)$ ,  $[Ag(PTA)][BF_4]$  και  $[Ag(Tpms)(PTA)]$ , όπου {Tpms= tris(pyrazol-1-yl)-methanesulfonate,  $PPh_3$ = triphenylphosphane,  $PCy_3$ = tricyclohexylphosphane, PTA= 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane} προκαλούν υποχρωισμό και οι σταθερές πρόσδεσης είναι μεγαλύτερες από του  $AgNO_3$ , εκτός του συμπλόκου  $[Ag(Tpms)(PTA)]$  (Pettinari C. et al 2011). Η διαφορετική αλληλεπίδραση των συμπλόκων με το DNA, πιθανόν να οφείλεται στην διαφορετική φύση των υποκαταστατών.

Πίνακας 7

Σύμπλοκα	$K_b$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta\lambda$ (nm)	Shift	Υπερχρωισμός/ Υποχρωισμός	H (%)	Ref.
<b>1</b>	$(13.3\pm 6.5) \times 10^4$	-	-	Hyper	47.2	
<b>2</b>	$(11\pm 2.8) \times 10^4$	-	-	Hyper	36.3	
<b>3</b>	$(27.7\pm 7.9) \times 10^4$	4	Blue	Hyper	36.5	
Cisplatin	$(5.73\pm 0.45) \times 10^4$	-	-	-	-	N'soukpoe-Kossi C.N. et al 2008
salH <sub>2</sub>	$(6.7\pm 0.2) \times 10^3$	-	-	-	-	Bathaiea S.Z. et al 2010
aspH	$(1.7\pm 0.7) \times 10^3$	-	-	-	-	Bathaiea S.Z et al 2010



Εικόνα 33: Διαγράμματα UV DNA παρουσία και απουσία συμπλόκων **1-3**



Εικόνα 34: Διαγράμματα UV DNA παρουσία και απουσία συμπλόκων 1-3, για τον υπολογισμό  $K_b$



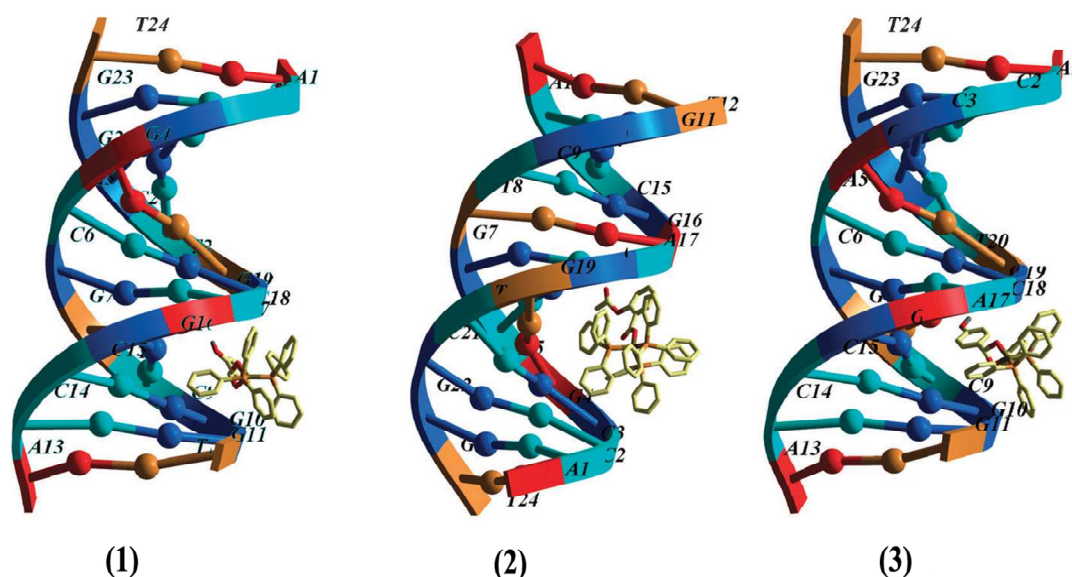
#### 4.10. Θεωρητικοί υπολογισμοί πρόσδεσης των συμπλόκων 1-3 με το DNA

Οι θεωρητικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν για να επιβεβαιώσουν τον τρόπο σύνδεσης των συμπλόκων **1-3** με το DNA (Εικόνα 35). Όλα τα σύμπλοκα γειτνιάζουν με την κυτοσίνη 18. Τα σύμπλοκα **1** και **3** αλληλεπιδρούν με το B-DNA σε περιοχές πλούσιες σε γουανίνη-κυτοσίνη στην μικρή αύλακα του DNA. Τα σύμπλοκα **1** και **3** σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του O(4) του C(18) και της πολικής ομάδας του OH. Αυτή η αλληλεπίδραση έχει ως αποτέλεσμα την σταθεροποίηση του συμπλόκου με το DNA ιδιαίτερα στην περίπτωση του συμπλόκου **3**, το οποίο το μη-προστατευμένο OH δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου. Η σταθεροποίηση επιτυγχάνεται και με αλληλεπιδράσεις van der Waals. Το σύμπλοκο **2**, καταλαμβάνει μεγάλο όγκο σε σχέση με τους άλλους υποκαταστάτες, παρουσιάζοντας ισχυρές στερικές αλληλεπιδράσεις και συνδέεται στην μεγάλη αύλακα. Ίσως η σύνδεση του συμπλόκου **2** στην μεγάλη αύλακα το διαφοροποιεί σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα και εμφανίζει την μικρότερη τιμή  $K_b$ . Συνήθως η μεγάλη αύλακα προσελκύει ογκώδη μόρια. Οι περιοχές αδενίνης-θυμίνης έχουν την ικανότητα να δημιουργούν δεσμούς van der Waals, δεδομένου ότι είναι στενότερες σε σύγκριση με τις περιοχές γουανίνης-κυτοσίνης. Οι περιοχές αδενίνης-θυμίνης είναι κατάλληλες για την τον ελλιμενισμό μικρών ευέλικτων μορίων (Sahoo B.K. et al 2008). Παρόλο αυτά, τα σύμπλοκα προτιμούν τις περιοχές γουανίνης-κυτοσίνης πιθανόν γιατί είναι ογκώδη μόρια με μη ευέλικτο σκελετό.

Ο πίνακας 8 δείχνει την συγγένεια και την ενέργεια του κάθε συμπλόκου με το DNA. Οι αρνητικές τιμές δείχνουν αυξημένη προσδεσιμότητα των συμπλόκων ως προς το DNA,

Πίνακας 8

Σύμπλοκα	Binding energy (kcal mol <sup>-1</sup> )	Conformation energy(kcal mol <sup>-1</sup> )
1	-26.9	-90.2
2	-29.4	-110.9
3	-44	-127.6



Εικόνα 35: Περιοχές πρόσδεσης των συμπλόκων **1-3** με το DNA. Τα σύμπλοκα **1-3** αλληλεπιδρούν με το DNA σε περιοχές πλούσιες με γουανίνη και κυτοσίνη στην μικρή αύλακα.

#### 4.11. Αποτελέσματα τοξικότητας *in vivo*

Το σύμπλοκο **2**, το οποίο περιέχει ασπιρίνη δόθηκε στα πειραματόζωα Wistar Rat, σε διαφορετικές δόσεις για να ελεγχθεί η τοξικότητα του.

Αρχικά, εξετάστηκε η οξεία τοξικότητα η οποία υποδηλώνει τον βαθμό της τοξικότητας μιας χημικής ουσίας σε σχέση με την δόση, τις παρενέργειες και τα τοξικά αποτελέσματα που προκαλεί η χημική ουσία, το σύμπλοκο. Η μελέτη αυτή, μπορεί να διαρκέσει τουλάχιστον 5 ημέρες αλλά όχι περισσότερο από 14 ημέρες σε μια μόνο δόση (Souza A. Torsoni et al 2002, Aranowska K. et al 2006, OECD 423).

Οι επίμυες Wistar Rat, χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες των πέντε ατόμων η κάθε ομάδα. Η πρώτη ομάδα έλαβε σύμπλοκο δόσης 0.5 mg/kg, η δεύτερη ομάδα έλαβε σύμπλοκο δόσης 5 mg/kg και η τρίτη ομάδα έλαβε σύμπλοκο δόσης 50 mg/kg. Ενώ υπήρχε και η ομάδα ελέγχου που λάμβανε τον διαλύτη της ουσίας (DMSO) με ορό. σε τελικό όγκο ενός ml. Στην κάθε ομάδα πραγματοποιήθηκε μόνο μια ένεση του συμπλόκου. Μετά την λήψη της δόσης του συμπλόκου, τα ζώα δεν εμφάνισαν κανένα σύμπτωμα κατά την διάρκεια των 14 ημερών όπου και θυσιάστηκαν την 14<sup>η</sup> ημέρα. Το μοναδικό σύμπτωμα που εμφάνισαν οι επίμυες είναι η απώλεια τριχών κυρίως στην δόση των 50 mg/kg συμπλόκου, το οποίο αποδεικνύεται από τα ιστολογικά δείγματα δέρματος, στους τριχοθύλακες.

Η πρώτη ομάδα των ζώων που έλαβαν σύμπλοκο 0.5 mg/kg δεν παρουσιάζουν καμμία μεταβολή στο μέσο βάρος τους σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Σε αντίθεση, οι ομάδες 2 και 3 όπου έλαβαν δόσεις 5 mg/kg και 50 mg/kg του συμπλόκου αντίστοιχα, παρουσιάζουν αύξηση (2%) και μείωση (2%) του βάρους τους, αντίστοιχα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Πιθανόν αυτή η διαφορά να οφείλεται σε στατιστικό λάθος (Πίνακας 9).

Η ιστολογική τομή του νεφρού δεν παρουσιάζει ουσιώδη ιστοπαθολογικά ευρήματα όταν λαμβάνεται σε δόσεις συμπλόκου 0.5 mg/kg και 5 mg/kg, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Σε αντίθεση, η δόση των 50 mg/kg του συμπλόκου εμφανίζει μία ήπια

υδρωπική εκφύλιση στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων που επενδύουν τα ουροφόρα σωληνάρια (Εικόνα 36).

Οι ιστολογικές τομές της καρδιάς και του σπλήνα δεν εμφανίζουν ουσιώδη ιστοπαθολογικά ευρήματα όταν το σύμπλοκο χορηγείται σε δόσεις των 0.5 mg/kg, 5 mg/kg και 50 mg/kg, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 37-38).

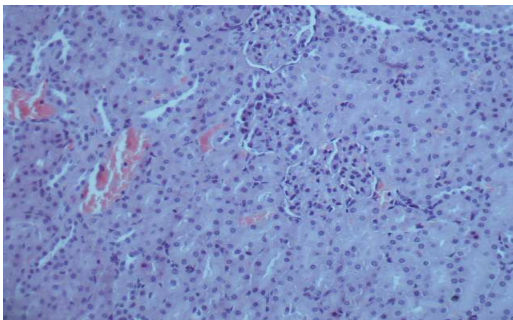
Η ιστολογική τομή του ήπατος δεν εμφανίζει ουσιώδη ιστοπαθολογικά ευρήματα όταν το σύμπλοκο λαμβάνεται σε δόση των 0.5 mg/kg. Όταν χορηγείται το σύμπλοκο σε επίμυες σε δόσεις των 5 mg/kg και 50 mg/kg τότε παρουσιάζεται μία ήπια διάταση των κολποειδών, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 39).

Η ιστολογική τομή του πνεύμονα παρουσιάζει αιμορραγική διήθηση στις κυψελίδες όταν λαμβάνεται το σύμπλοκο στην δόση των 0.5 mg/kg. Αντίθετα, ήπια αιμορραγική διήθηση στις κυψελίδες παρουσιάζεται όταν λαμβάνεται το σύμπλοκο από τους επίμυες στην δόση των 5 mg/kg. Ήπια σύμπτυξη των κυψελίδων και ήπιο οίδημα παρουσιάζεται, όταν λαμβάνεται στην δόση των 50 mg/kg από τους επίμυες (Εικόνα 40).

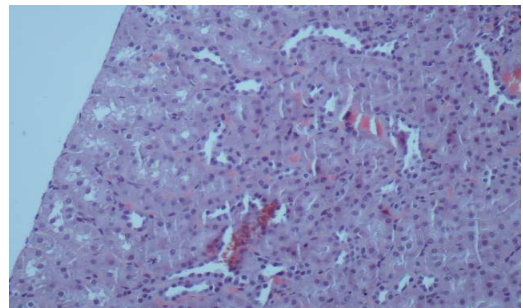
Τέλος, σε ιστολογικές τομές δέρματος παρατηρήθηκε ήπια ελάττωση των τριχοθυλάκων όταν το σύμπλοκο λαμβάνεται σε δόση των 50 mg/kg (Εικόνα 41).

Συμπερασματικά, το σύμπλοκο της ασπιρίνης όταν λαμβάνεται από τους επίμυες σε δόση των 0.5 mg/kg προκαλεί μόνο ήπιες αλλοιώσεις στον πνεύμονα. Η δεύτερη μεγαλύτερη δόση (5 mg/kg) όταν χορηγείται στους επίμυες προκαλεί στο ήπαρ διάταση των κολποειδών και στους πνεύμονες ήπια αιμορραγική διήθηση των κυψελίδων και ήπιο οίδημα σε ποσοστό μικρότερο του 10%. Τέλος, η μεγαλύτερη δόση (50 mg/kg) όταν χορηγείται στους επίμυες προκαλεί σημαντικότερα προβλήματα σε περισσότερα όργανα (ήπαρ, πνεύμονες, νεφρό) και στο απώλεια τριχών στο δέρμα. Στο ήπαρ προκαλεί διάταση των κολποειδών, στους πνεύμονες προκαλεί ήπια σύμπτυξη των κυψελίδων και ήπιο οίδημα σε ποσοστό μικρότερο του 10%, στο νεφρό, ήπια υδρωπική εκφύλιση στο

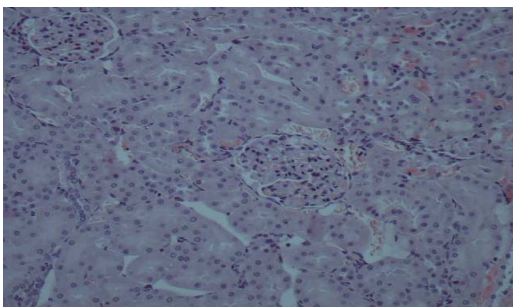
κυτταρόπλασμα των κυττάρων που επενδύουν τα ουροφόρα σωληνάρια και προκαλεί στο δέρμα αραίωση των τριχών. Το πιο σημαντικό εύρημα είναι ότι το σύμπλοκο της ασπιρίνης δεν προκάλεσε τον θάνατο στους επίμυες στις δόσεις που χορηγήθηκε το σύμπλοκο (0.5 mg/kg, 5 mg/kg και 50 mg/kg).



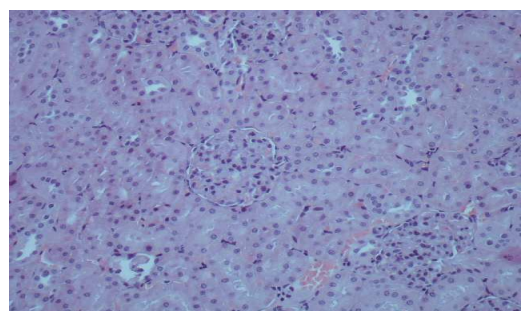
**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg



**Γ.** Δόση του συμπλόκου 50 mgr/Kg



**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg



**Δ.** Ομάδα ελέγχου

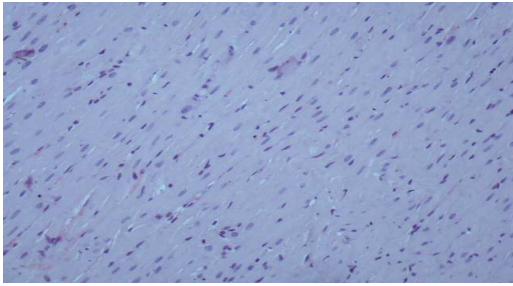
Εικόνα 36: Ιστολογική τομή νεφρού (μεγέθυνση x200, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg

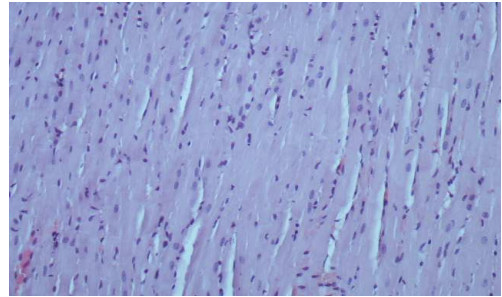
**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg

**Γ.** Δόση του συμπλόκου 50 mgr/Kg

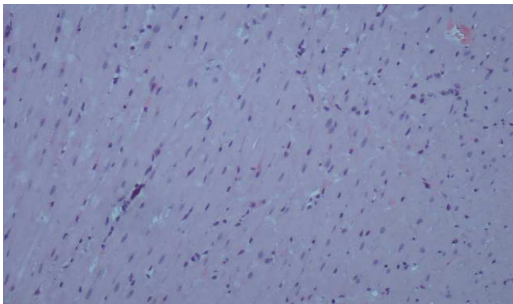
**Δ.** Ομάδα ελέγχου



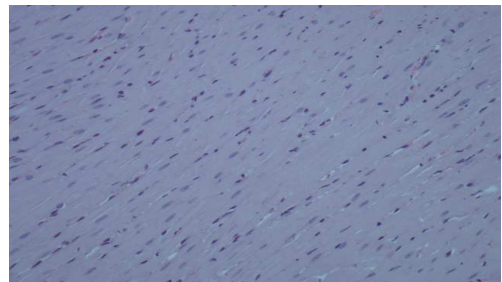
**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg



**Γ.** Δόση του συμπλόκου 50 mgr/Kg



**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg



**Δ.** Ομάδα ελέγχου

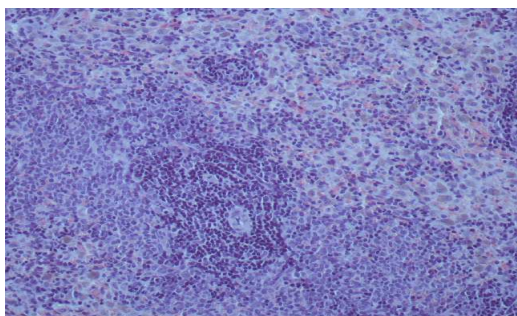
Εικόνα 37: Ιστολογική Τομή καρδιάς (μεγέθυνση x200, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg

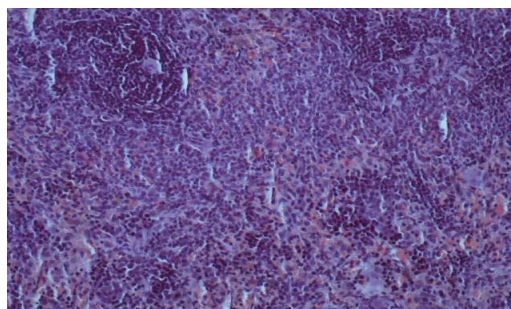
**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg

**Γ.** Δόση του συμπλόκου 50 mgr/Kg

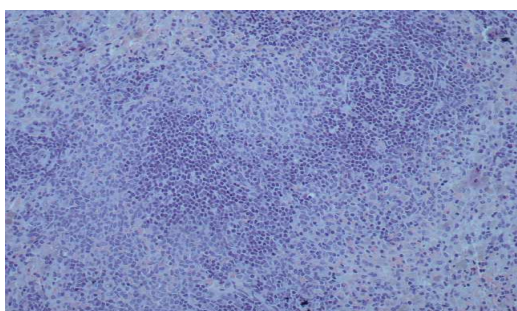
**Δ.** Ομάδα ελέγχου



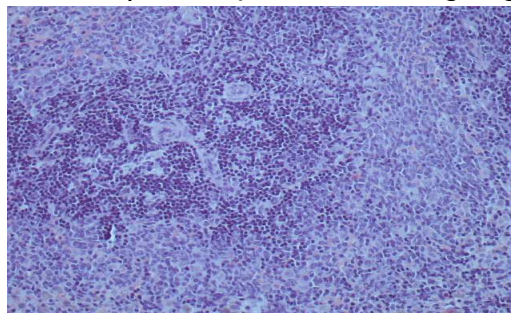
**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg



**Γ.** Δόση του συμπλόκου 50 mgr/Kg



**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg



**Δ.** Ομάδα ελέγχου

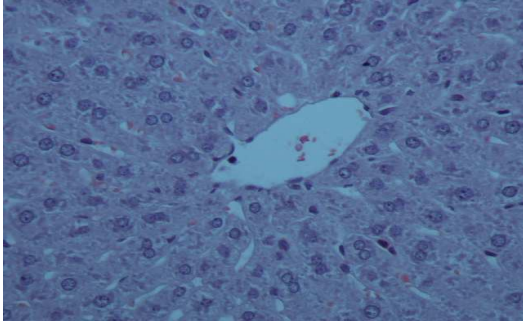
Εικόνα 38: Ιστολογική Τομή σπλήνα (μεγέθυνση x200, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg

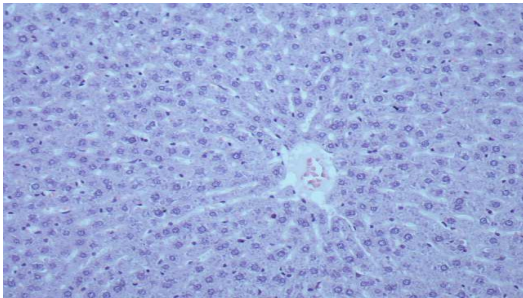
**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg

**Γ.** Δόση του συμπλόκου 50 mgr/Kg

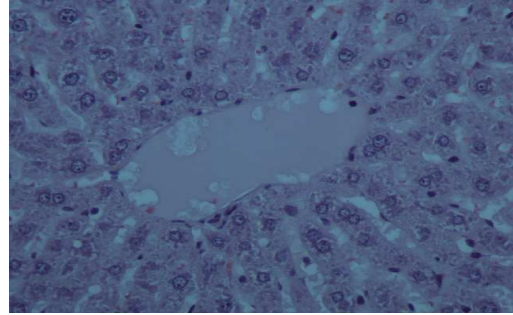
**Δ.** Ομάδα ελέγχου



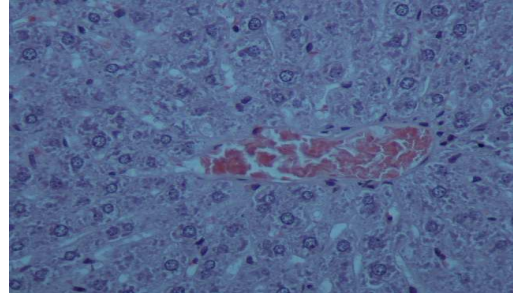
**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg



**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg



**Γ.** Δόση του συμπλόκου 50 mgr/Kg



**Δ.** Ομάδα ελέγχου

Εικόνα 39: Ιστολογική τομή ήπατος (κεντρική φλέβα, μεγέθυνση x400, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

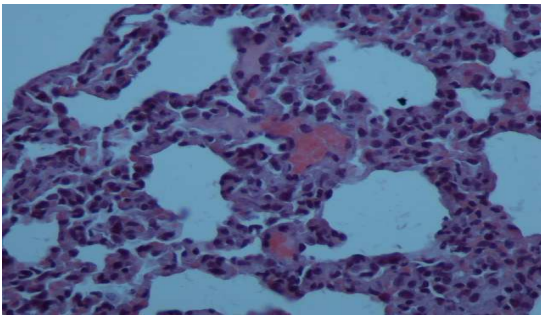
**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg

**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg

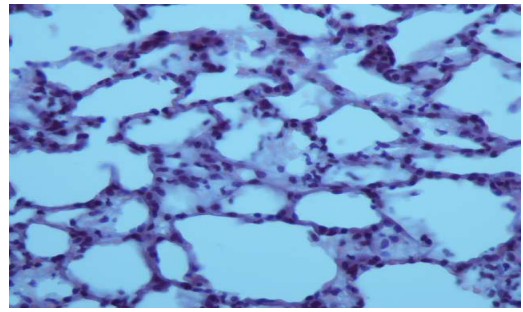
**Γ.** Δόση του συμπλόκου 50 mgr/Kg

**Δ.** Ομάδα ελέγχου

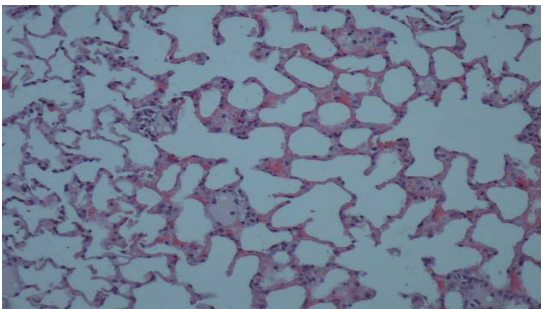




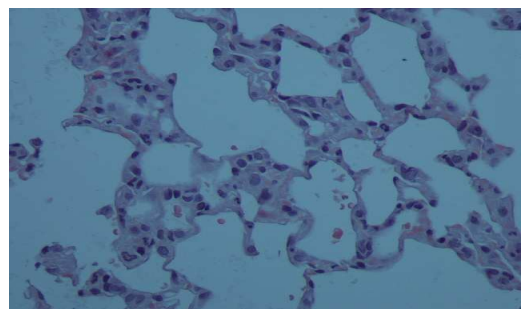
**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg



**Γ.** Δόση του συμπλόκου 50 mgr/Kg



**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg



**Δ.** Ομάδα ελέγχου

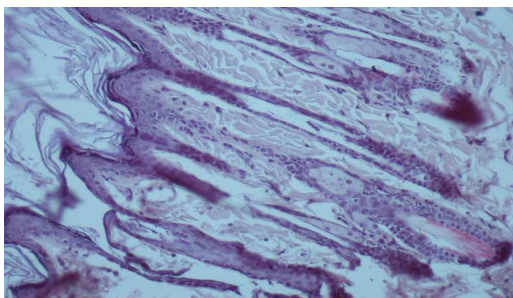
Εικόνα 40: Ιστολογική Τομή πνεύμονα (μεγέθυνση x400, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg

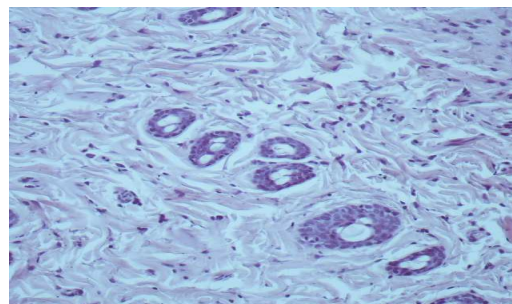
**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg

**Γ.** Δόση του συμπλόκου 50 mgr/Kg

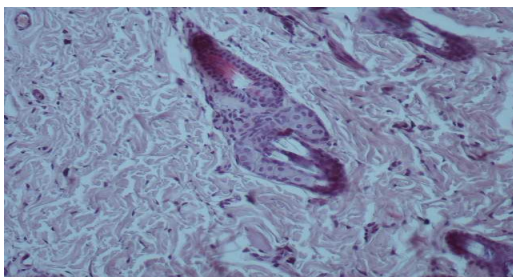
**Δ.** Ομάδα ελέγχου



**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg



**Γ.** Δόση του συμπλόκου 50 mgr/Kg



**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg

Εικόνα 41: Ιστολογική Τομή Δέρματος (τριχοθυλάκες μεγέθυνση x400, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg

**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg

**Γ.** Δόση του συμπλόκου 50 mgr/Kg

**Δ.** Ομάδα ελέγχου

Πίνακας 9

Acute toxicity	Weight Day 0 (gr)	Weight Day 14 (gr)	ΔW
Control	170.8±14.6	192.4±17.7	12.6%
Group 1 (0.5 mgr/kg)	178.8±9.5	200.4±8.0	12.1%
Group 2 (5 mgr/kg)	168.0±5.6	191.8±5.6	14.2%
Group 3 (50 mgr/kg)	180.2±11.2	199.2±10.4	10.5%

#### **4.12. Υποχρόνια τοξικότητα**

Η υποχρόνια τοξικότητα εκτιμάται χρησιμοποιώντας επαναλαμβανόμενες δόσεις του φαρμάκου με βάση τις παρατηρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στην οξεία τοξικότητα. Η υποχρόνια τοξικότητα των 90 ημερών παρέχει πληροφορίες για τους πιθανούς κινδύνους που μπορεί να προκληθούν από την επαναλαμβανόμενη έκθεση του φαρμάκου και παρέχει πληροφορίες για τις επιπτώσεις στα όργανα, την δυνατότητα συσσώρευσης του φαρμάκου αλλά σε ποια δόση το φάρμακο δεν επηρεάζει το πειραματόζωο (OECD 408). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι σύμφωνη με την μέθοδο του OECD (Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 408).

Οι δόσεις του συμπλόκου που έλαβαν οι επίμυες είναι 0.5 mg/kg (αποτελέσαν την 1<sup>η</sup> ομάδα), 5 mg/kg (αποτελέσαν την 2<sup>η</sup> ομάδα). Από την οξεία τοξικότητα του απορρίφθηκε η δόση συμπλόκου των 50 mg/kg λόγω ότι προκαλεί προβλήματα στα παρακάτω εσωτερικά όργανα (ήπαρ, πνεύμονες, νεφρό) και στο δέρμα. Μετά το πέρας των 90 ημερών τα ζώα θυσιάστηκαν. Κατά την διάρκεια των 90 ημερών, δεν παρατηρήθηκε απώλεια τριχών σε καμία από τις ομάδες όπου χορηγήθηκε το σύμπλοκο, καθώς και κανένα πειραματόζωο δεν πέθανε κατά την διάρκεια των 90 ημερών.

Οι επίμυες που έλαβαν το σύμπλοκο σε δόση των 0.5 mg/kg (1η ομάδα), εμφανίζουν άυξηση του μέσου βάρους τους σε σχέση με του επίμυες που έλαβαν την δόση των 5 mg/kg (2η ομάδα). Πιθανόν, το σύμπλοκο της ασπιρίνης, επηρεάζει το βάρος των ζώων σε δόση μεγαλύτερη των 0.5 mg/kg (Πίνακας 10).

Η ιστολογική τομή του νεφρού εμφανίζει ήπιο οίδημα των ουροφόρων σωληναρίων σε δόσεις του συμπλόκου 0.5 mg/kg και 5 mg/kg. Σε αντίθεση, στην οξεία

τοξικότητα η ιστολογική τομή των νεφρών δεν εμφανίζουν ουσιώδη ιστοπαθολογικά ευρήματα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, στις αντίστοιχες δόσεις (Εικόνα 42).

Οι ιστολογικές τομές της καρδιάς και του σπλήνα δεν παρουσιάζουν ουσιώδη ιστοπαθολογικά ευρήματα στις δόσεις του συμπλόκου 0.5 mg/kg και 5 mg/kg, το οποίο παρατηρήθηκε και στην οξεία τοξικότητα, στις αντίστοιχες δόσεις του συμπλόκου, που χορηγήθηκαν στους επίμυες (Εικόνα 43-44).

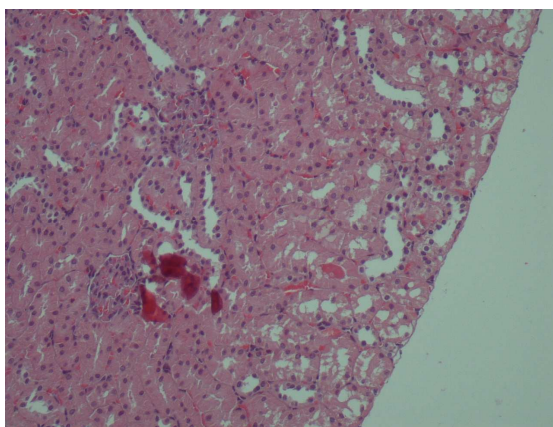
Η ιστολογική τομή του ήπατος (κεντρική φλέβα) μετά από χορήγηση συμπλόκου δόσης 0.5 mg/kg παρουσιάζει ήπια διάταση των κολποειδών ενώ στην δόση του συμπλόκου 5 mg/kg δεν παρουσιάζει ουσιώδη ιστοπαθολογικά ευρήματα στην ιστολογική τομή της κεντρικής φλέβας του ήπατος. Στην οξεία τοξικότητα, η δόση του συμπλόκου των 5 mg/kg παρουσιάζει ήπια διάταση των κολποειδών, ενώ η δόση του συμπλόκου των 0.5 mg/kg δεν προκαλούσε κάποιο πρόβλημα στο ήπαρ (Εικόνα 45).

Η ιστολογική τομή των πνευμόνων εμφανίζει ήπια αιμορραγική διήθηση στις κυψελίδες και ήπιο οίδημα στην δόση του συμπλόκου των 0.5 mg/kg. Ενώ στην δόση του συμπλόκου των 5 mg/kg παρουσιάζει μέτρια πύκνωση κυψελίδων και ήπιο οίδημα, παρόμοια συμπτώματα με της οξείας τοξικότητας (Εικόνα 46).

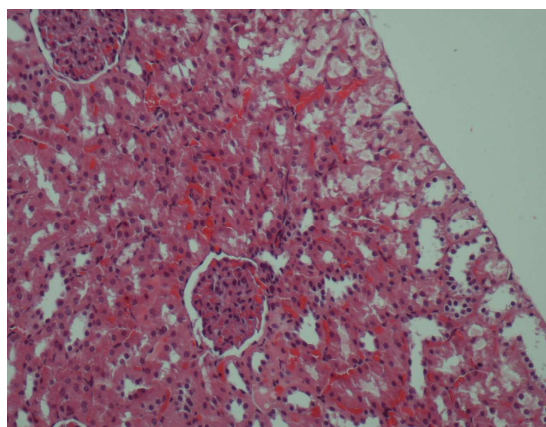
Τέλος, οι ιστολογικές τομές του δέρματος (τριχοθύλακες) παρουσιάζουν ότι το σύμπλοκο σε δόσεις των 0.5 mg/kg και 5 mg/kg προκαλεί ήπια απώλεια των τριχών (Εικόνα 47).

Συμπερασματικά, το σύμπλοκο της ασπιρίνης όταν χορηγείται σε δόση των 0.5 mg/kg προκαλεί ήπιες αλλοιώσεις στο νεφρό, στην κεντρική φλέβα του ήπατος, στον πνεύμονα και στους τριχοθύλακες. Χωρίς κατά την διάρκεια των 90 ημερών να προκαλεί θάνατο στους επίμυες. Όταν το σύμπλοκο χορηγείται σε μεγαλύτερη δόση των 5 mg/kg προκαλεί ήπιες αλλοιώσεις στο νεφρό, στην κεντρική φλέβα του ήπατος, στον πνεύμονα και στους τριχοθύλακες. Όπως παρουσιάζεται στην οξεία τοξικότητα δεν προκαλούνται

αλλοιώσεις στην καρδιά και στον σπλήνα από την δράση του συμπλόκου. Σε αντίθεση, στην περίπτωση του πνεύμονα, όπου η χορήγηση του συμπλόκου σε δόση των 5 mg/kg προκαλεί αλλοιώσεις στον πνεύμονα με μέτρια πύκνωση των κυψελίδων και ήπιο οίδημα. Τέλος, κανένας επίμυς δεν πέθανε κατά την διάρκεια του πειράματος, κανένας δεν εμφάνισε κάποιο άλλο εμφανές σύμπτωμα εκτός της μικρής απώλεια τριχών που παρατηρήθηκε μακροσκοπικά αλλά και από την ιστολογική τομή του δέρματος.



**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg

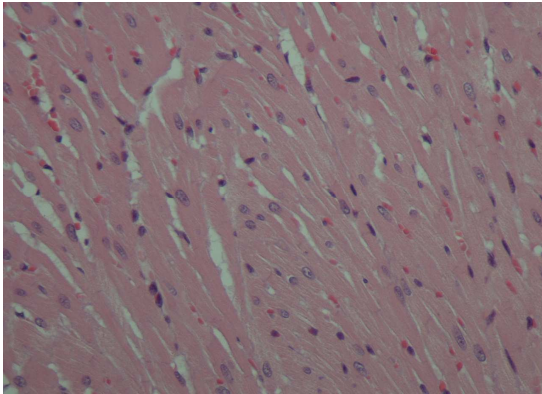


**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg

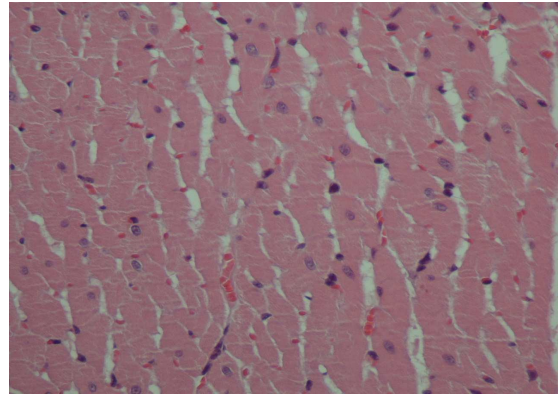
Εικόνα 42: Ιστολογική τομή νεφρού (μεγέθυνση x200, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg

**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg



**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg

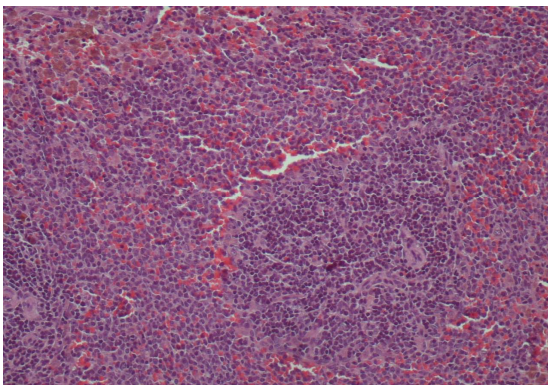


**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg

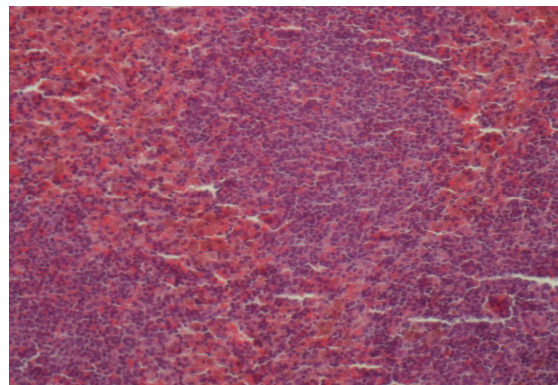
Εικόνα 43: Ιστολογική Τομή καρδιάς (μεγέθυνση x400, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg

**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg



**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg

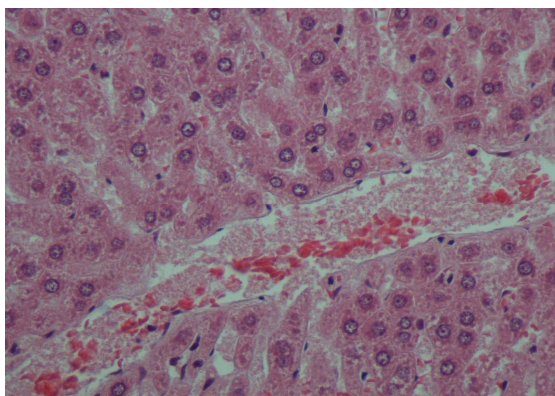


**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg

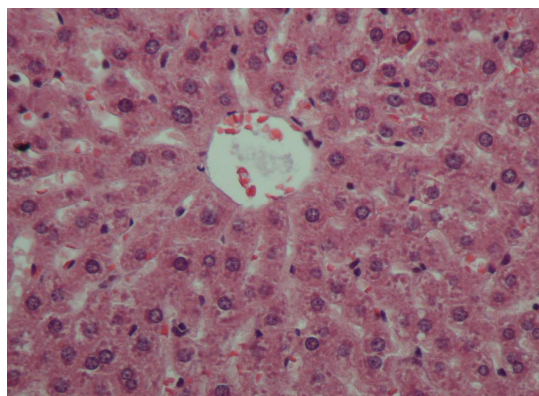
Εικόνα 44: Ιστολογική Τομή σπλήνα (μεγέθυνση x200, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg

**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg



**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg

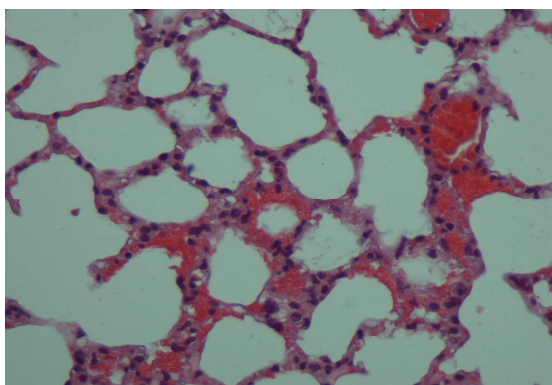


**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg

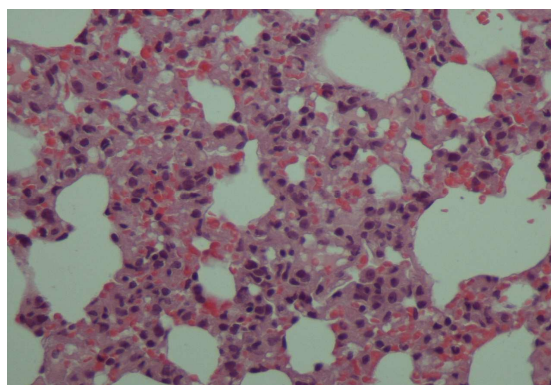
Εικόνα 45: Ιστολογική τομή ήπατος (κεντρική φλέβα, μεγέθυνση x400, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg

**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg



**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg

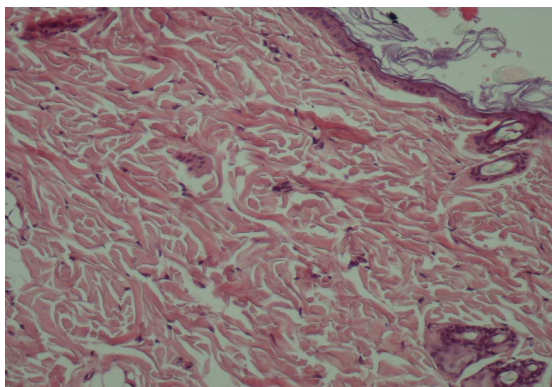


**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg

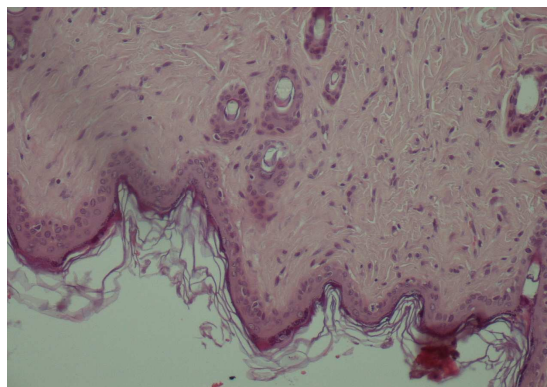
Εικόνα 46: Ιστολογική Τομή πνεύμονα (μεγέθυνση x400, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg

**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg



**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg



**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg

Εικόνα 47: Ιστολογική Τομή Δέρματος (τριχοθυλάκες μεγέθυνση x200, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mgr/Kg

**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mgr/Kg

Πίνακας 10

	Weight Day 0 (gr)	Weight Day 90 (gr)	ΔW (%)
<b>Group 0.5mgr/kg</b>	201±9	234±14	16.7
<b>Group 5mgr/kg</b>	203±44	224±16	10.6

#### 4.13. Αποτελέσματα καρκινογένεσης σε Wistar Rat

Τα πειράματα της καρκινογένεσης, πραγματοποιήθηκαν σε δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, οι επίμυες αφού δέχτηκαν ένεση υποδόρια λειομυοσαρκωματικών κυττάρων (LMS κύτταρα), άρχισε η χορήγηση του συμπλόκου σε δόσεις των 0.5 mgr/kg και 5 mgr/kg συμπλόκου μετά το πέρας των 5 ημερών από την ένεση των καρκινικών κυττάρων.



Στο δεύτερο στάδιο, οι επίμυες δεχτήκαν ένεση υποδόρια λειομυοσαρκωματικών κυττάρων (LMS κύτταρα) και εφόσον προηγήθηκε η εμφάνιση του καρκινικού όγκου, άρχισε η χορήγηση του συμπλόκου σε δόσεις των 0.5 mgr/kg και 5 mgr/kg.

Στο πρώτο στάδιο του πειράματος, οι επίμυες, οι οποίοι έλαβαν σύμπλοκο σε δόση των 0.5 mgr/kg ανέπτυξαν καρκινικό όγκο, σε αντίθεση με τους επίμυες που τους χορηγήθηκε δόση συμπλόκου 5 mgr/kg και δεν εμφάνισαν καρκινικό όγκο. Οι επίμυες θυσιάστηκαν με αιθέρα την 150<sup>η</sup> ημέρα από την ένεση των LMS κυττάρων. Στα δύο στάδια του πειράματος, υπήρχε ομάδα ελέγχου, η οποία δεν έλαβε κανένα είδος θεραπείας, ενώ τους είχε πραγματοποιηθεί ένεση καρκινικών κυττάρων.

Οι επίμυες, οι οποίοι έλαβαν θεραπεία με σύμπλοκο δόσης 0.5 mgr/kg εμφάνισαν νεοπλασματική μάζα. Μικροσκοπικά, στην ιστολογική τομή του νεοπλάσματος αναγνωρίστηκαν μικρές εστίες νέκρωσης σε σύγκριση με του επίμυες που δεν τους χορηγήθηκε κανένα είδος θεραπείας. Επίσης, δεν παρουσιάζεται κανένα είδος τοξικότητας στα εσωτερικά όργανα των επίμυων. Η ομάδα που της χορηγήθηκε σύμπλοκο δόσης 0.5 mgr/kg αποτελούνταν από δύο επίμυες. Το μέγεθος του νεοπλάσματος στον έναν επίμυ αυξήθηκε κατά 43.8%, ενώ στο άλλο ζώο της ομάδας μειώθηκε κατά 35.4%. Ο ένας επίμυς επιβίωσε 15 ημέρες και ο δεύτερος 25 ημέρες περισσότερες από την ομάδα ελέγχου, η οποία δεν έλαβε κανένα είδος θεραπείας. Σε όλα τα ζώα χορηγήθηκε όλη η θεραπεία του συμπλόκου (σύνολο έξι ενέσεων), δόσεως 0.5 mgr/kg, πριν πεθάνουν (Εικόνα 48-49).

Η δεύτερη ομάδα των επίμυων αποτελούνταν από δύο ζώα, στα όποια τους χορηγήθηκε σύμπλοκο δόσης 5 mgr/kg. Οι επίμυες, δεν εμφάνισαν καρκινικό όγκο και οι ιστολογικές τομές των οργάνων δεν παρουσίασαν καμμία μικροσκοπική μεταβολή σε σύγκριση με την ομάδα έλεγχου. Η παραπάνω παρατήρηση έρχεται σε αντίθεση με τα

αποτελέσματα της οξείας και της υποχρόνιας τοξικότητας, όπου εμφανίζονταν αλλοιώσεις στον νεφρό, στον πνεύμονα και στους τριχοθύλακες.

Στο δεύτερο στάδιο του πειράματος, η θεραπεία των επίμυων άρχισε μετά την ανάπτυξη όγκου. Παρατηρείται η ύπαρξη μεγάλου ποσοστού νέκρωσης στα ζώα, τα οποία έλαβαν θεραπεία με σύμπλοκο δόσης 5 mgr/kg και μικρό ποσοστό νέκρωσης στα ζώα που τους χορηγήθηκε σύμπλοκο δόσης 0.5 mgr/kg. Κανένα ζώο δεν εμφάνισε τοξικότητα σε κάποιο όργανο λόγω του φαρμάκου.

Τα ζώα που έλαβαν θεραπεία με σύμπλοκο δόσης 0.5 mgr/kg, το ένα από τα δύο ζώα εμφάνισε καρκινικό όγκο και δέχτηκε μόνο τις τέσσερις από τις έξι ενέσεις συνολικά. Επιβίωσε 3 ημέρες περισσότερες σε σχέση με τα ζώα που δεν δέχτηκαν κανένα είδος θεραπείας. Το μέσος βάρος του καρκινικού όγκου ήταν κατά 33% μικρότερος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το δεύτερο ζώο δεν δημιούργησε καρκινικό όγκο, επιβίωσε μέχρι και την 150η ημέρα, όπου θυσιάστηκε. Δέχτηκε όλη την θεραπεία, με το σύνολο των έξι ενέσεων του συμπλόκου, δόσης 0.5 mgr/kg. Το ζώο που ανέπτυξε όγκο ήταν κατά 33.3% μικρότερος σε σχέση με τα ζώα που δεν δεχτήκανε φάρμακο (Εικόνα 48-49).

Τα δύο ζώα που έλαβαν σύμπλοκο δόσης 5 mgr/kg έζησαν 4 και 6 ημέρες περισσότερο. Το μέγεθος του καρκινικού όγκου, στο ένα ζώο, αυξήθηκε κατά 21.0% και στο δεύτερο μειώθηκε κατά 19.1%, σε σχέση με τους επίμυες που δεν δέχτηκαν κανένα είδος θεραπείας. Το ποσοστό της νέκρωσης που προκάλεσε το σύμπλοκο είναι μεγάλο και είναι σημαντική η απουσία τοξικότητας στα εσωτερικά όργανα σε δόση συμπλόκου 5 mgr/kg (Εικόνα 48-49).

Από τις παρακάτω Εικόνες 50-54, φαίνεται ότι η δόση του συμπλόκου των 5 mgr/kg προκαλεί μεγαλύτερες εστίες νέκρωσης στους επίμυες, από αυτούς που τους έλαβαν σύμπλοκο δόσης 0.5 mgr/kg. Επίσης, οι επίμυες που δεν έλαβαν κανένα είδος θεραπείας, τα δύο από τα τρία ζώα συνολικά, εμφάνισαν εξομυελική αιμοποίηση

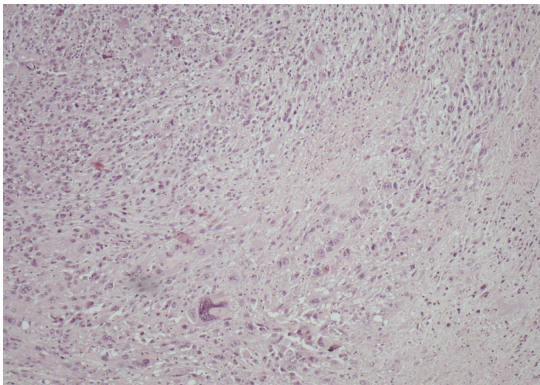
(καταστροφή του μυελού των οστών, αδυναμία να παράξουν κύτταρα του αίματος και αδυναμία να αντιμετωπίσουν μολύνσεις). Πιθανόν, το παραπάνω εύρημα να προκαλείται λόγω του ενοφθαλμισμού των λειομυοσαρκωματικών καρκινικών κυττάρων και όχι λόγω της χορήγησης του συμπλόκου. Να σημειωθεί ότι στην οξεία και στην υποχρόνια τοξικότητα δεν εμφανίστηκε παρόμοιο σύμπτωμα στους επίμυες. Ένας επίμυς από την ομάδα ελέγχου, ο οποίος δεν δέχτηκε θεραπεία με το σύμπλοκο, πέθανε από λοίμωξη και όχι λόγω της ανάπτυξης καρκινικού όγκου του καρκίνου, επίσης είχε εμφανίσει εξομυελική αιμοποίηση (Εικόνα 50-54).

Τα ζώα που δέχτηκαν σύμπλοκο δόσης 0.5 mgr/kg, από τους δύο επίμυες, ο ένας εμφάνισε εξομυελική αιμοποίηση ενώ στις δόσεις του συμπλόκου των 5 mgr/kg, μόνο σε ένα επίμυ πραγματοποιήθηκε ιστολογική τομή του σπλήνα, όπου δεν εμφάνισε κάποια αλλοίωση (Εικόνα 50-54).

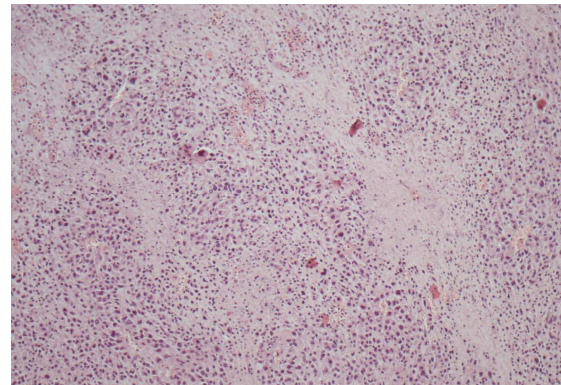
Το σύμπλοκο της ασπιρίνης σε αυτά τα πρωταρχικά *in vivo* πειράματα φαίνεται ότι προκαλεί νέκρωση του νεοπλασματικού όγκου, κυρίως στη δόση του συμπλόκου των 5 mgr/kg. Στην δόση των 0.5 mgr/kg του συμπλόκου προκαλείται μια μικρή μείωση των εστιών του νεοπλάσματος. Το χαρακτηριστικό, είναι ότι οι επίμυες στην οξεία και υποχρόνια τοξικότητα είχαν εμφανίσει συμπτώματα τοξικότητας σε κάποια όργανα (νεφρό, πνεύμονα) και πτώση των τριχών. Στα πειράματα της καρκινογένεσης δεν εμφανίζονται τα αντίστοιχα ή άλλα συμπτώματα και τα εσωτερικά όργανα είναι απολύτως φυσιολογικά. Πιθανόν, το νεόπλασμα δεσμεύει τον σύμπλοκο μειώνοντας την τοξικότητα στους ιστούς και στα όργανα των επίμυων.

Εν κατακλείδι, τα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα πιθανόν προκαλούν εξομυελική αιμοποίηση στο νεφρό των επίμυων. Αυτό είναι ένα χαρακτηριστικό του νεοπλάσματος και όχι του συμπλόκου, για το λόγο ότι δεν εμφανίζονται παρόμοια χαρακτηριστικά στους

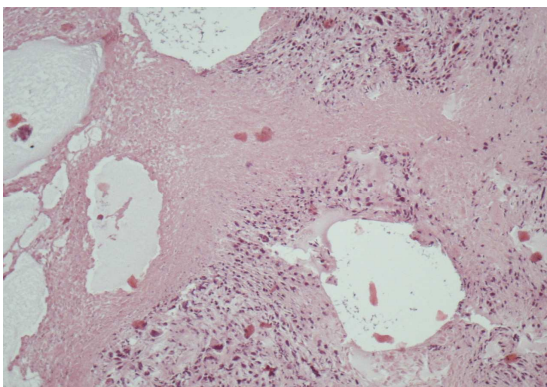
επίμυες στα πειράματα της οξείας και υποχρόνιας τοξικότητας. Το σύμπτωμα της εξομυελικής αιμοποίησης στο νεφρό εμφανίζεται στην δόση του συμπλόκου των 0.5 mgr/kg αλλά όχι στην δόση του συμπλόκου των 5 mgr/kg. Δεν μπορεί να ισχυριστεί με ακρίβεια ότι το παραπάνω εύρημα αποτελεί ένα τυχαίο γεγονός το ότι δεν εμφανίστηκε στους επίμυες που έλαβαν θεραπεία, λόγω του μικρού δείγματος ζώων (Εικόνα 50-54).



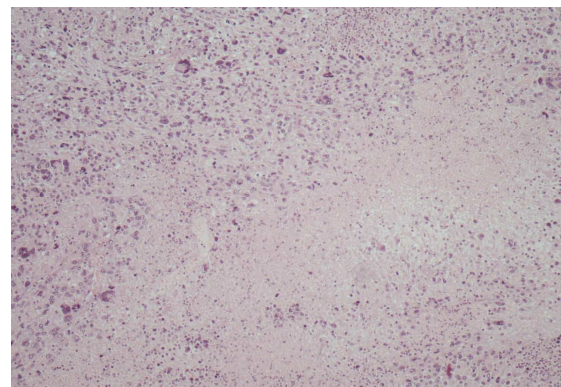
**A1.** Ομάδα Ελέγχου



**A2.** Ομάδα Ελέγχου



**B1.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mg/kg



**B2.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mg/kg

Εικόνα 48: Ιστολογική Τομή νεοπλάσματος (μεγέθυνση x100, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

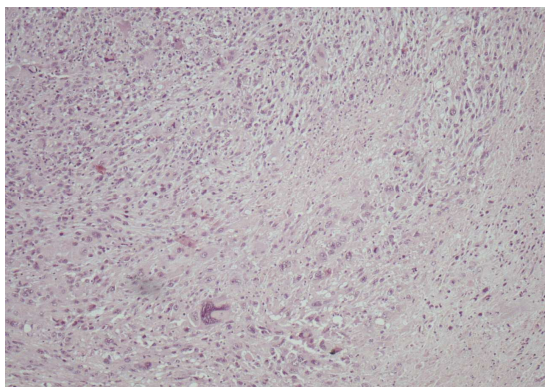
**A1.** Ομάδα Ελέγχου

**A2.** Ομάδα Ελέγχου

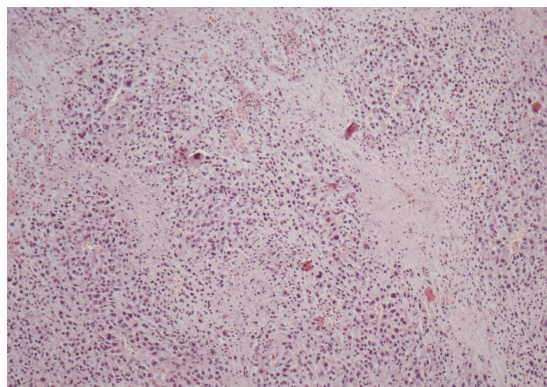
**B1.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mg/kg

**B2.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mg/kg

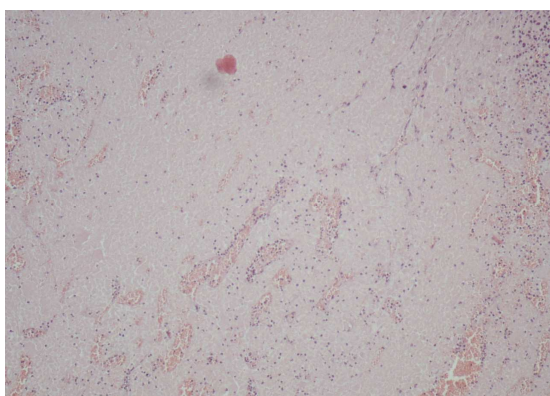
Οι επίμυες που δεν έλαβαν θεραπεία, εμφανίζουν μικρές εστίες νέκρωσης. Οι επίμυες που έλαβαν δόση συμπλόκου των 0.5 mg/kg εμφανίζουν λίγο μεγαλύτερη έκταση νέκρωσης.



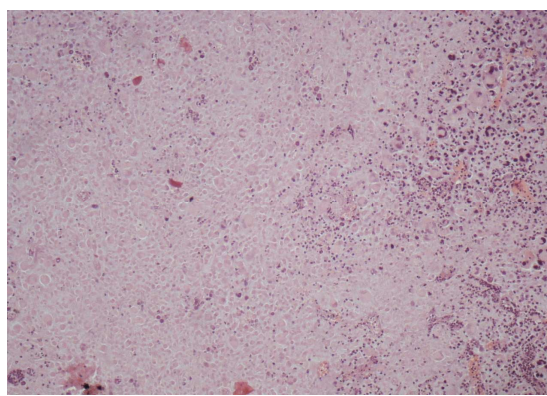
**A1.** Ομάδα Ελέγχου



**A2.** Ομάδα Ελέγχου



**B1.** Δόση του συμπλόκου 5 mg/kg



**B2.** Δόση του συμπλόκου 5 mg/kg

Εικόνα 49: Ιστολογική Τομή νεοπλάσματος (μεγέθυνση x100, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

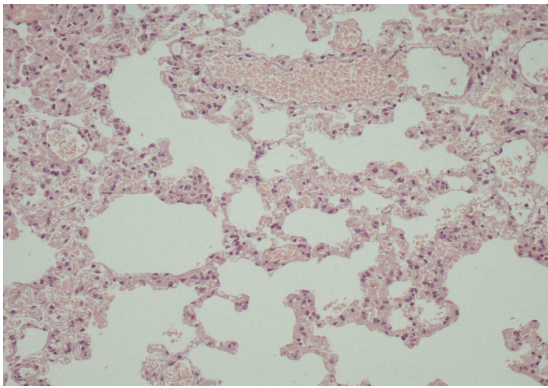
**A1.** Ομάδα Ελέγχου

**A2.** Ομάδα Ελέγχου

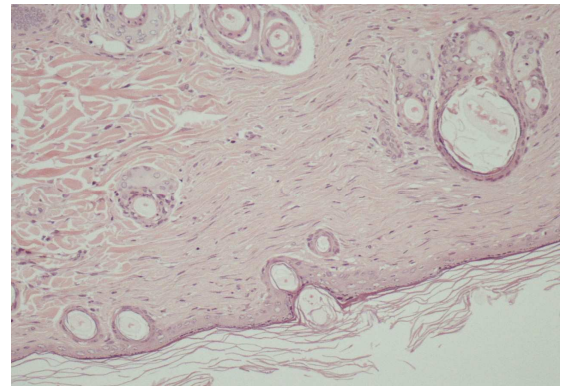
**B1.** Δόση του συμπλόκου 5 mg/kg

**B2.** Δόση του συμπλόκου 5 mg/kg

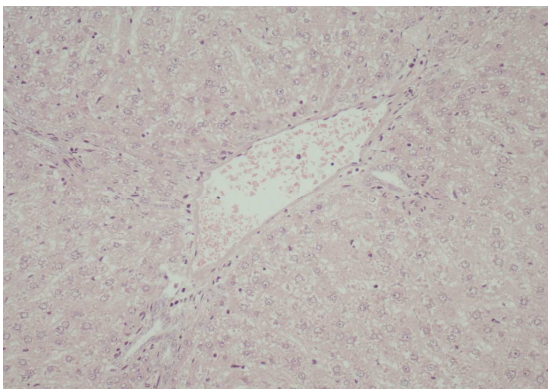
Οι επίμυες που δεν έλαβαν θεραπεία, εμφανίζουν μικρές εστίες νέκρωσης. Οι επίμυες που έλαβαν δόση συμπλόκου των 5 mg/kg εμφανίζουν μεγαλύτερη έκταση νέκρωσης.



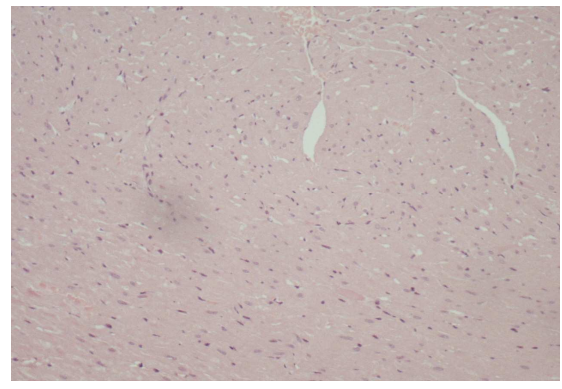
**A.** Ομάδα Ελέγχου



**B.** Ομάδα Ελέγχου



**Γ.** Ομάδα Ελέγχου



**Δ.** Ομάδα Ελέγχου

Εικόνα 50: Ιστολογικές Τομές εσωτερικών οργάνων (μεγέθυνση x200, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

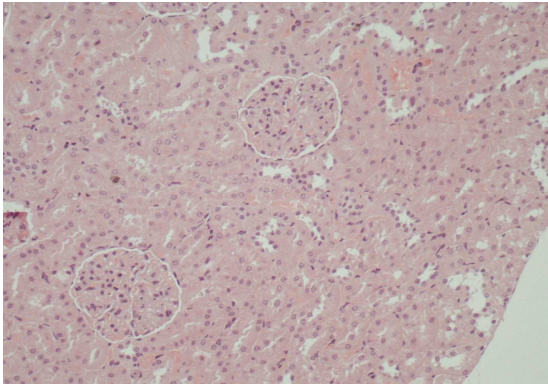
**A.** Ομάδα Ελέγχου, Ιστολογική τομή πνεύμονα

**B.** Ομάδα Ελέγχου, Ιστολογική τομή δέρματος (τριχοθύλακες)

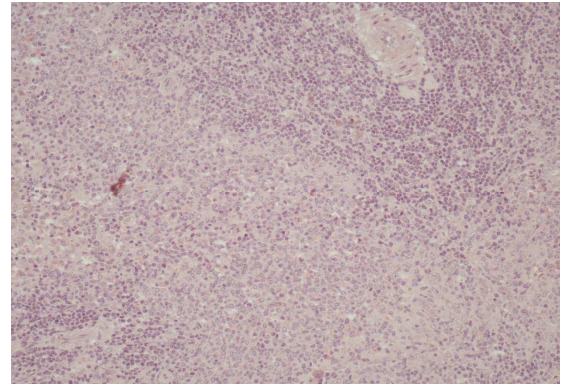
**Γ.** Ομάδα Ελέγχου, Ιστολογική τομή ήπατος (κεντρική φλέβα)

**Δ.** Ομάδα Ελέγχου, Ιστολογική τομή καρδιάς

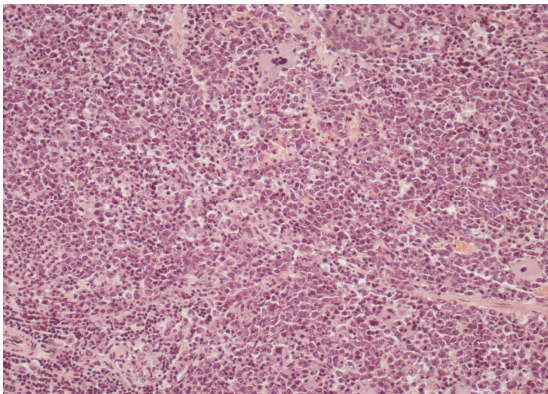
Τα εσωτερικά όργανα των επίμυων που δεν έλαβαν θεραπεία είναι φυσιολογικά και δεν παρουσιάζουν κάποιο τοξικολογικό σύμπτωμα.



**A.** Ομάδα Ελέγχου



**B.** Ομάδα Ελέγχου



**Γ.** Ομάδα Ελέγχου

Εικόνα 51: Ιστολογικές Τομές εσωτερικών οργάνων (μεγέθυνση x200, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

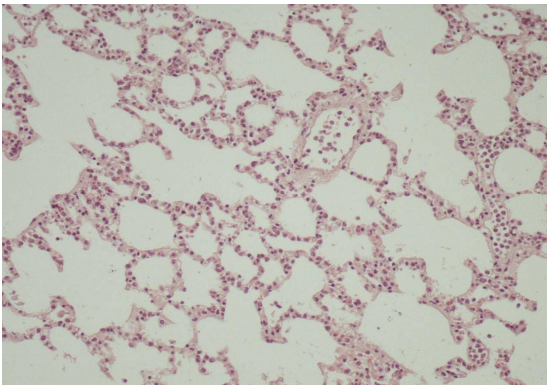
**A.** Ομάδα Ελέγχου, Ιστολογική τομή νεφρού

**B.** Ομάδα Ελέγχου, Ιστολογική τομή σπλήνα

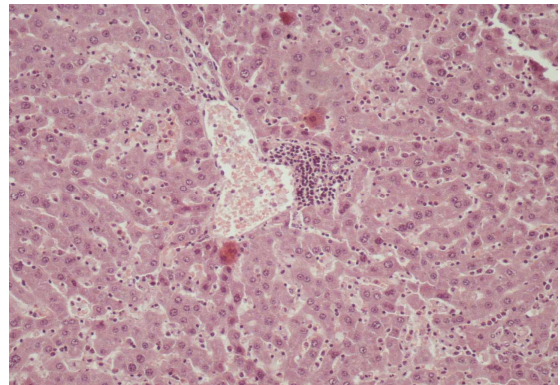
**Γ.** Ομάδα Ελέγχου, Ιστολογική τομή σπλήνα (εξομυελική αιμοποίηση)

Τα εσωτερικά όργανα των επίμυων που δεν έλαβαν θεραπεία είναι φυσιολογικά και δεν παρουσιάζουν κάποιο τοξικολογικό σύμπτωμα, εκτός του σπλήνα, ο οποίος εμφανίζει εξομυελική αιμοποίηση.

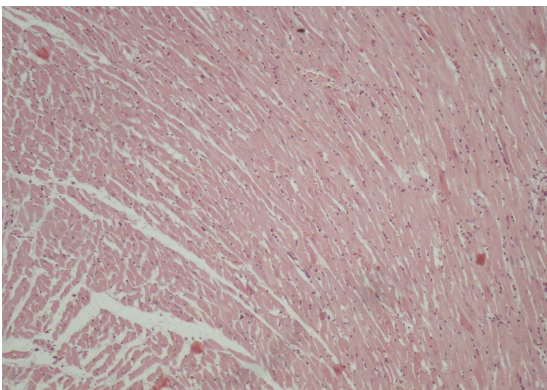




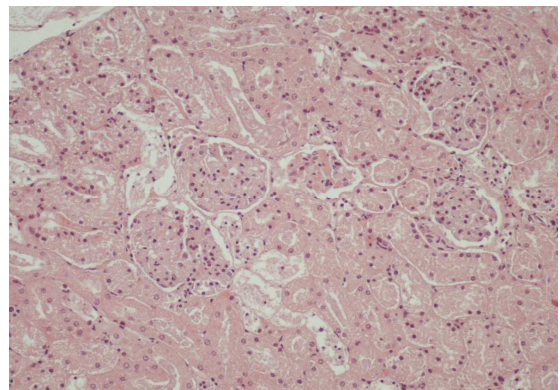
**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mg/kg



**B.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mg/kg



**Γ.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mg/kg



**Δ.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mg/kg

Εικόνα 52: Ιστολογικές Τομές εσωτερικών οργάνων (μεγέθυνση x200, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

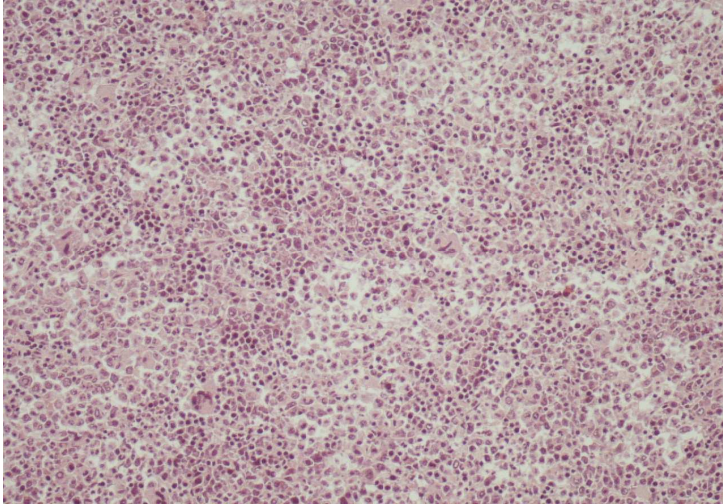
**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mg/kg, Ιστολογική τομή πνεύμονα

**B.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mg/kg, Ιστολογική τομή ήπατος (κεντρική φλέβα)

**Γ.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mg/kg, Ιστολογική τομή καρδιάς

**Δ.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mg/kg, Ιστολογική τομή νεφρού

Τα εσωτερικά όργανα των επίμυων που έλαβαν σύμπλοκο δόσης 0.5 mg/kg είναι φυσιολογικά και δεν παρουσιάζουν κάποιο τοξικολογικό σύμπτωμα, σε σύγκριση με τους επίμυες που δεν έλαβαν θεραπεία.

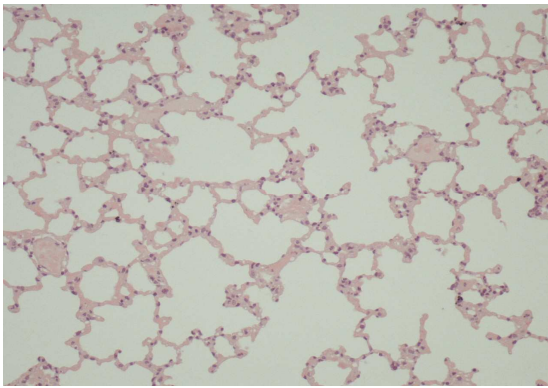


**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mg/kg

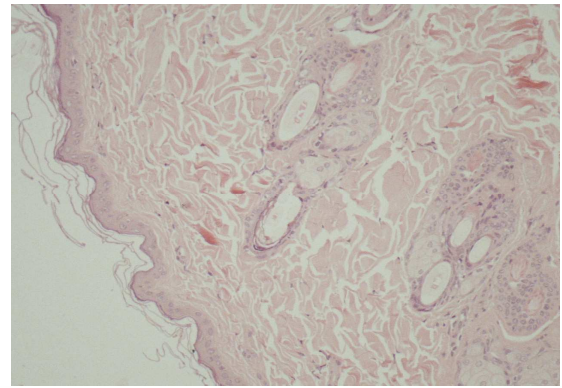
Εικόνα 53: Ιστολογική Τομή σπλήνα (μεγέθυνση x200, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

**A.** Δόση του συμπλόκου 0.5 mg/kg, Ιστολογική τομή σπλήνα

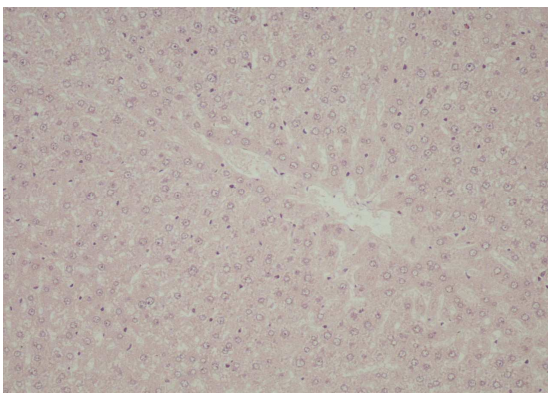
Η ιστολογική τομή σπλήνα παρουσιάζει εξομυελική αιμοποίηση σε επίμυ που έλαβε θεραπεία με 0.5 mg/kg συμπλόκου.



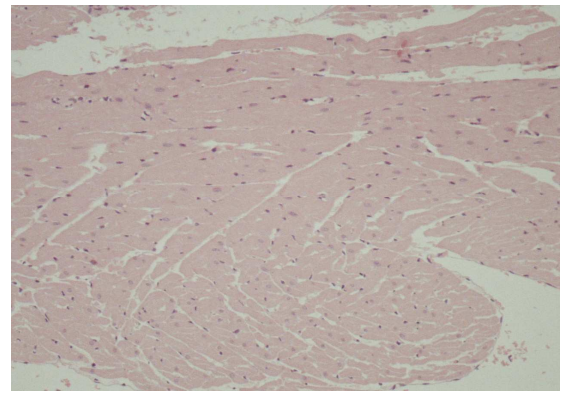
**A.** Δόση του συμπλόκου 5 mg/kg



**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mg/kg



**Γ.** Δόση του συμπλόκου 5 mg/kg



**Δ.** Δόση του συμπλόκου 5 mg/kg

Εικόνα 54: Ιστολογικές Τομές εσωτερικών οργάνων (μεγέθυνση x200, αιματοξυλίνη-ηωσίνη).

**A.** Δόση του συμπλόκου 5 mg/kg, Ιστολογική τομή πνεύμονα

**B.** Δόση του συμπλόκου 5 mg/kg, Ιστολογική τομή δέρματος (τριχοθύλακες)

**Γ.** Δόση του συμπλόκου 5 mg/kg, Ιστολογική τομή ήπατος (κεντρική φλέβα)

**Δ.** Δόση του συμπλόκου 5 mg/kg, Ιστολογική τομή καρδιάς

Τα εσωτερικά όργανα (πνεύμονα, καρδια) και το δέρμα των επίμυων που έλαβαν σύμπλοκο δόσης 5 mg/kg είναι φυσιολογικά και δεν παρουσιάζουν κάποιο τοξικολογικό σύμπτωμα, σε σύγκριση με τους επίμυες που δεν έλαβαν θεραπεία. Εκτός του ήπατος, που παρουσιάζει μια ήπια φλεγμονή.



## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν τρία σύμπλοκα αργύρου(I) με σαλικυλικό οξύ και τα παράγωγα του (ασπιρίνη) και με παρα-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ με τριφαινυλο-φωσφίνη σε συνεργασία με το Εργαστήριο της Βιοανόργανης Χημείας. Ο τύπος των συμπλόκων είναι  $[Ag(trp)_2(o-Hbza)]$  (**1**),  $[Ag(trp)_3(asp)](dmf)$  (**2**) και  $[Ag(trp)_2(p-Hbza)]$  (**3**). Τα σύμπλοκα αργύρου(I) έχουν χαρακτηριστεί με σημείο τήξεως, στοιχειακή ανάλυση, φασματοσκοπία υπέρυθρου,  $^1H-NMR$ , UV-vis, ESI-MS και με κρυσταλλογραφία ακτίνων X για να επιβεβαιωθεί η δομή τους.

Τα παραπάνω σύμπλοκα διαφέρουν ως προς την ικανότητα να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου (διαμοριακούς και ενδομοριακούς). Το σύμπλοκο **1**, με σαλικυλικό οξύ έχει την ικανότητα να δημιουργεί ενδομοριακούς δεσμούς, το σύμπλοκο **3**, με παρα-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ σχηματίζει ενδομοριακούς δεσμούς και διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου. Ενώ το σύμπλοκο **2**, με ασπιρίνη, δεν έχει την ικανότητα να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου, λόγω των στερικών παρεμποδίσεων των ομάδων των υποκαταστών. Από την παρούσα διατριβή φαίνεται ότι οι δεσμοί υδρογόνου επηρεάζουν την δραστηριότητα των συμπλόκων σε σχέση με τα κυτταρικά οργανίδια (ένζυμα και DNA).

Τα σύμπλοκα **1-3**, παραμένουν σταθερά σε 48 ώρες με μελέτη σε φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους και αγωγιμομετρίας. Ο χρόνος αυτός είναι σημαντικός γιατί η επώαση των κυττάρων με τα σύμπλοκα διαρκεί 48 ώρες. Η σταθερότητα των συμπλόκων είναι πολύ σημαντική για την δράση των συμπλόκων και

αποδεικνύει ότι δεν διασπώνται κατά την διάρκεια των πειραμάτων αλλά και ότι δεν παράγονται ιόντα.

Επίσης πραγματοποιήθηκαν μελέτες για τον υπολογισμό του  $IC_{50}$  των συμπλόκων **1-3** με τις μεθόδους MTT και Trypan Blue, έναντι καρκινικών σειρών LMS, MCF-7 και υγιών ινοβλαστών MRC-5. Οι τιμές  $IC_{50}$  των συμπλόκων **1-3** είναι πολύ μικρές, κυμαίνονται από 1.36-2.26  $\mu\text{M}$  για τα MCF-7 και από 1.06-1.97  $\mu\text{M}$  για τα LMS. Τα σύμπλοκα **1-3** έδειξαν επίσης μία εκλεκτικότητα ως προς τα LMS κύτταρα (λόγω της μικρότερης τιμής  $IC_{50}$ ), υποδηλώνοντας μια ευαισθησία του σαρκώματος έναντι του αδενοκαρκινώματος των συμπλόκων. Επίσης, σημαντικό στοιχείο είναι ότι οι τιμές  $IC_{50}$  των συμπλόκων **1-3** ως προς του υγιείς ινοβλάστες είναι σχετικά μεγαλύτερες από ότι στα καρκινικά κύτταρα. Η εκλεκτικότητα έναντι των υγιών κυττάρων σε σχέση με τα καρκινικά (μαστικά και λειομυοσαρκωματικά) κύτταρα είναι ένα εξίσου σημαντικό χαρακτηριστικό, για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών παραγόντων όπως και η χημική σταθερότητα των συμπλόκων J. Reedijk, (Reedijk J. 2003). Τέλος, τα σύμπλοκα **1-3** είναι πιο δραστικά 2-3 φορές από ότι το cisplatin, τον νιτρικό άργυρος και τους υποκαταστάτες των συμπλόκων trp (τριφαινυλοφωσφίνη), asp (ασπιρίνη), oHbza (σαλικυλικό οξύ). Δείχνοντας την σημασία ύπαρξη του μετάλλου, το οποίο τροποποιεί εντελώς τις ιδιότητες των υποκαταστατών όταν εντάσσεται παρουσία υποκαταστατών.

Επίσης μελετήθηκε μικροσκοπικά η μορφολογία των LMS κυττάρων όταν επώαστηκαν με τα σύμπλοκα **1-3**. Η μορφολογία των LMS κυττάρων πραγματοποιήθηκε για τον εντοπισμό χαρακτηριστικών απόπτωσης. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα δεν διατηρούν πλέον την μορφολογία τους, μετά την επώαση τους με τα σύμπλοκα **1-3** (από επιμήκη μετατρέπονται σε στρογγυλά), διακόπτουν την επαφή μεταξύ τους, αποκολλούνται από το ταπήτιο του τρυβλίου (αιωρούνται στο τρυβλίο), συρρικνώνονται και μειώνεται η ανάπτυξή τους. Τα χαρακτηριστικά αυτά μαρτυρούν

απόπτωση. Επίσης παρατηρήθηκε ότι με αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκων τα χαρακτηριστικά γίνονται πιο έντονα και υπήρχαν περισσότερα αποπτωτικά κύτταρα. Στην συνέχεια ο αποπτωτικός θάνατος των κυττάρων επιβεβαιώθηκε με κυτταρομετρία ροής. Η κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε στις τιμές  $IC_{50}$  και σε μεγαλύτερες τιμές από το  $IC_{50}$ . Τα σύμπλοκα προκαλούν απόπτωση σε μεγάλο ποσοστό σε σχέση με τα κύτταρα που δεν επώαστηκαν με τα σύμπλοκα, και όχι νέκρωση. Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο **1** σε συγκέντρωση 2.3  $\mu$ M προκαλεί 81.3% απόπτωση, το σύμπλοκο **2** σε συγκέντρωση 1.9  $\mu$ M προκαλεί απόπτωση 69.4% και τέλος το σύμπλοκο **3**, σε συγκέντρωση 3  $\mu$ M προκαλεί το υψηλότερο ποσοστό απόπτωσης 89.5%. Τα ποσοστά της νέκρωσης που προκαλούν τα παραπάνω σύμπλοκα στις τιμές  $IC_{50}$  και σε τιμές άνω του  $IC_{50}$  κυμαίνονται από 0.8-8.9%. Με την κυτταρομετρία ροής, αποδεικνύεται, ότι τα σύμπλοκα **1-3** προκαλούν απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) στα LMS κύτταρα με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, όμως σε αυτό το στάδιο των πειραμάτων δεν μπορεί να δηλωθεί με πιο μηχανισμό προκαλούν απόπτωση (ενδογενές ή εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης).

Ένα άλλο χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι ο κατακερματισμός του πυρηνικού DNA σε θραύσματα διαφορετικών μεγεθών (DNA laddering), ο οποίος αποδείχτηκε με ηλεκτροφόρηση πυρηνικού DNA κυττάρων LMS μετά από επώαση των συμπλόκων **1-3** με τις τιμές  $IC_{50}$  και τιμές άνω του  $IC_{50}$ . Από την εικόνα της ηλεκτροφόρησης αποδεικνύεται ότι υπάρχει κατακερματισμός του DNA σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκων **1-3**.

Για να εξακριβωθεί ο μηχανισμός απόπτωσης (ενδογενές ή εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης) των συμπλόκων **1-3**, μελετήθηκε η ικανότητα τους να αναστέλλουν την λιποξυγενάση. Τα σύμπλοκα **1-3** αναστέλλουν ισχυρά την λιποξυγενάση σε συγκεντρώσεις από 2.3-7.6  $\mu$ M, ενώ οι υποκαταστάτες δεν έχουν αυτή την δυνατότητα.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, δεν υπάρχουν άλλα σύμπλοκα αργύρου(I) να αναστέλλουν την λιποξυγενάση σε αυτό το εύρος συγκεντρώσεων. Το ένζυμο, λιποξυγενάση, κατανέμεται κυρίως στα μιτοχόνδρια και έχει βρεθεί ότι η αναστολή του ενζύμου αυτού ενεργοποιεί το ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης. Τα σύμπλοκα προσδέονται στην λιποξυγενάση, σύμφωνα με τους θεωρητικούς υπολογισμούς και αναστέλλουν ισχυρά την δράση του ενζύμου. Αποδεικνύεται ότι το σύμπλοκο **2** δεσμεύεται στην LOX στην ίδια περιοχή που όλοι οι αναστρέψιμοι αναστολείς προσδέονται, ενώ το σύμπλοκο **1** σε διαφορετική περιοχή μακριά από το ενεργό κέντρο. Επίσης τα σύμπλοκα σταθεροποιούνται με την λιποξυγενάση με την δημιουργία δεσμών υδρογόνου. Το σύμπλοκο **1** δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου πρωτεϊνών-υποκαταστάτη μεταξύ του O του υποκαταστάτη και του N της Arg360 και του O της Tyr493. Το σύμπλοκο **2** δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του ακέτυλου-O και του N της Arg767. Πιθανόν τα σύμπλοκα **1-3**, προκαλούν απόπτωση μέσω του ενδογενούς ή μιτοχονδριακού μονοπατιού, ελευθερώνοντας τον κυτόχρωμα c από τα μιτοχόνδρια, και προκαλώντας τον καταρράκτη της ενεργοποίησης της απόπτωσης. Επίσης, το cisplatin, φαίνεται ότι δεν δρα στην λιποξυγενάση και παρουσιάζει πολύ μεγάλο IC<sub>50</sub> σε σχέση με τα εξεταζόμενα σύμπλοκα.

Επίσης, για να εξηγηθεί το μεγάλο ποσοστό απόπτωσης που προκαλούν τα σύμπλοκα με τις πολύ μικρές τιμές IC<sub>50</sub>, ελέγχθηκε η ικανότητα τους να συνδέονται στο DNA. Τα σύμπλοκα **1-3** όταν συνδέονται στο DNA προκαλούν μεγάλο ποσοστό υπερχρωισμού και στη περίπτωση του συμπλόκου **3** και μετατόπιση στο λ<sub>max</sub>. Ο υπερχρωισμός που παρατηρείται στα σύμπλοκα **1** και **2** υποδηλώνει την σύνδεση των συμπλόκων με το DNA, η οποία μπορεί να είναι εξωτερικής φύσεως ή να έχει την ικανότητα το σύμπλοκο να ξετυλίγει την ελικοειδή δομή του DNA. Ο υπερχρωισμός που παρατηρείται στην περίπτωση του συμπλόκου **3**, υποδηλώνει σπάσιμο των δεσμών



υδρογόνου και συνεπώς και της δευτεροταγής δομής του DNA. Υπολογίστηκαν οι σταθερές πρόσδεσης των συμπλόκων **1-3** ως προς το DNA ( $K_b$ ),  $(13.3 \pm 6.5) \times 10^4$  (**1**),  $(11 \pm 2.8) \times 10^4$  (**2**) και  $(27.7 \pm 7.9) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  για το **3** σύμπλοκο, δείχνοντας ισχυρή αλληλεπίδραση με το DNA.

Το σύμπλοκο **3**, εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό απόπτωσης αλλά και την μεγαλύτερη τιμή πρόσδεσης στο DNA. Η ικανότητα του συμπλόκου **3** να σχηματίζει ενδομοριακούς και διαμοριακούς δεσμούς το κάνει πιο ισχυρό και του δίνει την δυνατότητα να συνδέεται ισχυρότερα στο DNA και να προκαλεί απόπτωση σε μεγαλύτερο ποσοστό. Το σύμπλοκο **1** που δημιουργεί μόνο ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου έχει την δεύτερη μεγαλύτερη τιμή  $K_b$ . Υποδηλώνοντας ότι τα σύμπλοκα που έχουν την ικανότητα να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου, συνδέονται ισχυρά με το DNA. Φαίνεται ότι η τιμή πρόσδεσης στο DNA σχετίζεται με την ικανότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου. Επίσης, οι θεωρητικοί υπολογισμοί, αποδεικνύουν ότι τα σύμπλοκα **1** και **3** προσδέονται σε περιοχές πλούσιες σε γουανίνη-κυτοσίνη στην μικρή αύλακα του DNA πιθανόν γιατί είναι ογκώδη μόρια με μη ευέλικτο σκελετό. Το σύμπλοκο **2**, καταλαμβάνει μεγάλο όγκο σε σχέση με τους άλλους υποκαταστάτες, παρουσιάζοντας ισχυρές στερικές αλληλεπιδράσεις και συνδέεται στην μεγάλη αύλακα, ίσως σε αυτό οφείλεται ότι διαφοροποιείται σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα.

Πραγματοποιήθηκαν κάποια πρωταρχικά πειράματα με επίμυες Wistar Rat *in vivo*. Μελετήθηκε η τοξικότητα του συμπλόκου με ασπιρίνη και εκτιμήθηκε η ικανότητά του να εμποδίζει την ανάπτυξη όγκου. Η οξεία τοξικότητα έδειξε, ότι το σύμπλοκο με ασπιρίνη δεν είναι τοξικό μέχρι την δόση των 50 mg/kg και εμφάνιζε προβλήματα σε ήπαρ, νεφρό, πνεύμονες και πτώση των τριχών. Για αυτό το λόγο απορρίφθηκε αυτή η δόση για την μελέτη της χρόνιας τοξικότητας. Στις μικρότερες δόσεις προκαλεί προβλήματα σε ήπαρ και

πνεύμονες. Στην συνέχεια η υποχρόνια τοξικότητα, το σύμπλοκο προκαλεί τα ίδια συμπτώματα στα όργανα, αλλά δεν προκαλεί τον θάνατο των ζώων που έχουν δεχτεί την θεραπεία.

Τέλος, στα ζώα προκλήθηκε καρκινογένεση με ένεση LMS κυττάρων υποδόρια. Η δόση των 5 mg/kg δείχνει ένα μικρό ποσοστό νέκρωσης του όγκου αλλά χωρίς να εμφανίζει τοξικότητα στα όργανα και στου ιστούς. Πιθανόν, ελκύεται από τα καρκινικά κύτταρα και μειώνεται η τοξικότητά της.

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Τρία σύμπλοκα αργύρου(I) με σαλικυλικό οξύ και τα παράγωγα του (ασπιρίνη) και με παρα-υδροξύ-βενζοϊκό οξύ με τριφαινυλο-φωσφίνη σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά

- Ο τύπος των συμπλόκων είναι  $[\text{Ag}(\text{tpp})_2(\text{o-Hbza})]$  (**1**),  $[\text{Ag}(\text{tpp})_3(\text{asp})](\text{dmf})$  (**2**) και  $[\text{Ag}(\text{tpp})_2(\text{p-Hbza})]$  (**3**).

- Τα σύμπλοκα αργύρου(I) χαρακτηρίστηκαν με σημείο τήξεως, στοιχειακή ανάλυση, φασματοσκοπία υπερύθρου,  $^1\text{H-NMR}$ , UV-vis, ESI-MS και με κρυσταλλογραφία ακτίνων X

2. Τα σύμπλοκα διαφέρουν ως προς την ικανότητα να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου (διαμοριακούς και ενδομοριακούς).

- Το σύμπλοκο **1** δημιουργεί ενδομοριακούς δεσμούς, το σύμπλοκο **2** δεν έχει την ικανότητα να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου, λόγω των στερικών παρεμποδίσεων των ομάδων των υποκαταστών το σύμπλοκο **3**, σχηματίζει ενδομοριακούς δεσμούς και διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου.

- Τα σύμπλοκα **1-3**, παραμένουν σταθερά σε 48 ώρες με μελέτη σε φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους και αγωγιμομετρίας.

- Τα σύμπλοκα **1-3** δεν διασπώνται κατά την διάρκεια των πειραμάτων αλλά και δεν παράγονται ιόντα.
3. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες για τον υπολογισμό του IC<sub>50</sub> των συμπλόκων **1-3** με τις μεθόδους MTT και Trypan Blue, έναντι καρκινικών σειρών LMS, MCF-7 και υγιών ινοβλαστών MRC-5.
- Οι τιμές IC<sub>50</sub> των συμπλόκων **1-3** είναι πολύ μικρές, κυμαίνονται από 1.36-2.26 μM για τα MCF-7 και από 1.06-1.97 μM για τα LMS.
4. Τα σύμπλοκα **1-3** έδειξαν επίσης μία εκλεκτικότητα ως προς τα LMS κύτταρα (υποδηλώνοντας μια ευαισθησία του σαρκώματος έναντι του αδενοκαρκινώματος των συμπλόκων.
- Οι τιμές IC<sub>50</sub> των συμπλόκων **1-3** ως προς του υγιείς ινοβλάστες είναι σχετικά μεγαλύτερες από ότι στα καρκινικά κύτταρα.
  - Τα σύμπλοκα **1-3** είναι πιο δραστικά 2-3 φορές από ότι το cisplatin, τον νιτρικό άργυρο και τους υποκαταστάτες των συμπλόκων trp (τριφαινυλοφωσφίνη), asp (ασπιρίνη), oHbza (σαλικυλικό οξύ).
5. Επίσης μελετήθηκε μικροσκοπικά η μορφολογία των LMS κυττάρων όταν επώαστηκαν με τα σύμπλοκα **1-3**.

- Μετά την επώαση των LMS κυττάρων με τα σύμπλοκα **1-3** παρατηρείται ότι τα LMS κύτταρα διακόπτουν την επαφή μεταξύ τους, αποκολλούνται από το ταπήτιο του τρυβλίου συρρικνώνονται και μειώνεται η ανάπτυξή τους. Τα χαρακτηριστικά αυτά μαρτυρούν απόπτωση.
  - Ο αποπτωτικός θάνατος των κυττάρων επιβεβαιώθηκε με κυτταρομετρία ροής.
6. Τα σύμπλοκα προκαλούν απόπτωση σε μεγάλο ποσοστό σε σχέση με τα κύτταρα που δεν επώαστηκαν με τα σύμπλοκα, και όχι νέκρωση.
- Τα σύμπλοκα **1-3** προκαλούν απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) στα LMS κύτταρα με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο
7. Αποδείχτηκε με ηλεκτροφόρηση πυρηνικού DNA των κυττάρων LMS ο κατακερματισμός του πυρηνικού DNA σε θραύσματα διαφορετικών μεγεθών (DNA laddering), μετά από επώαση των συμπλόκων **1-3** με τις τιμές  $IC_{50}$  και τιμές άνω του  $IC_{50}$ .
8. Τα σύμπλοκα **1-3** αναστέλλουν ισχυρά την λιποξυγενάση σε συγκεντρώσεις από 2.3-7.6  $\mu M$ , ενώ οι υποκαταστάτες δεν έχουν αυτή την δυνατότητα.
- Η αναστολή της λιποξυγενάσης ενεργοποιεί το ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης.

- Σύμφωνα με τους θεωρητικούς υπολογισμούς, τα σύμπλοκα προσδένονται στην λιποξυγενάση, και αναστέλλουν ισχυρά την δράση του ενζύμου
- Τα σύμπλοκα σταθεροποιούνται με την λιποξυγενάση με την δημιουργία δεσμών υδρογόνου.
- Τα σύμπλοκα **1-3**, προκαλούν απόπτωση μέσω του ενδογενούς ή μιτοχondριακού μονοπατιού, ελευθερώνοντας τον κυτόχρωμα c από τα μιτοχόνδρια, και προκαλώντας τον καταρράκτη της ενεργοποίησης της απόπτωσης.

9. Το cisplatin δεν δρα στην λιποξυγενάση και παρουσιάζει πολύ μεγάλο IC<sub>50</sub> σε σχέση με τα εξεταζόμενα σύμπλοκα.

10. Τα σύμπλοκα **1-3** όταν συνδέονται στο DNA προκαλούν μεγάλο ποσοστό υπερχρωισμού και στη περίπτωση του συμπλόκου **3** και μετατόπιση στο λmax.

- Ο υπερχρωισμός που παρατηρείται στα σύμπλοκα **1** και **2** υποδηλώνει την σύνδεση των συμπλόκων με το DNA, η οποία μπορεί να είναι εξωτερικής φύσεως ή να έχει την ικανότητα το σύμπλοκο να ξετυλίγει την ελικοειδή δομή του DNA.

- Ο υπερχρωισμός που παρατηρείται στην περίπτωση του συμπλόκου **3**, υποδηλώνει σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου και συνεπώς και της δευτεροταγής δομής του DNA.
- Το σύμπλοκο **3**, εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό απόπτωσης αλλά και την μεγαλύτερη τιμή πρόσδεσης στο DNA.

11. Η ικανότητα του συμπλόκου **3** να σχηματίζει ενδομοριακούς και διαμοριακούς δεσμούς το κάνει πιο ισχυρό και του δίνει την δυνατότητα να συνδέεται ισχυρότερα στο DNA και να προκαλεί απόπτωση σε μεγαλύτερο ποσοστό.

- Το σύμπλοκο **1** που δημιουργεί μόνο ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου έχει την δεύτερη μεγαλύτερη τιμή  $K_b$ . Υποδηλώνοντας ότι τα σύμπλοκα που έχουν την ικανότητα να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου, συνδέονται ισχυρά με το DNA.
- Η τιμή πρόσδεσης στο DNA σχετίζεται με την ικανότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου.
- Οι θεωρητικοί υπολογισμοί, αποδεικνύουν ότι τα σύμπλοκα **1** και **3** προσδένονται σε περιοχές πλούσιες σε γουανίνη-κυτοσίνη στην μικρή αύλακα του DNA πιθανόν γιατί είναι ογκώδη μόρια με μη ευέλικτο σκελετό.

- Το σύμπλοκο **2**, καταλαμβάνει μεγάλο όγκο σε σχέση με τους άλλους υποκαταστάτες, παρουσιάζοντας ισχυρές στερικές αλληλεπιδράσεις και συνδέεται στην μεγάλη αύλακα, ίσως σε αυτό οφείλεται ότι διαφοροποιείται σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα.
- Πραγματοποιήθηκαν πειράματα με επίμυες Wistar Rat *in vivo*. Μελετήθηκε η τοξικότητα του συμπλόκου με ασπιρίνη σε επίμυες Wistar Rat *in vivo*.

12. Η οξεία τοξικότητα έδειξε, ότι το σύμπλοκο με ασπιρίνη δεν είναι τοξικό μέχρι την δόση των 50 mg/kg και εμφάνιζε προβλήματα σε ήπαρ, νεφρό, πνεύμονες και πτώση των τριχών.

- Η υποχρόνια τοξικότητα έδειξε ότι το σύμπλοκο προκαλεί τα ίδια συμπτώματα στα όργανα, αλλά δεν προκαλεί τον θάνατο των ζώων που έχουν δεχτεί την θεραπεία.
- Στα ζώα προκλήθηκε καρκινογένεση με ένεση LMS κυττάρων υποδόρια. Η δόση των 5 mg/kg δείχνει ένα μικρό ποσοστό νέκρωσης του όγκου αλλά χωρίς να εμφανίζει τοξικότητα στα όργανα και στου ιστούς. Πιθανόν, ελκύεται από τα καρκινικά κύτταρα και μειώνεται η τοξικότητά της.



## 7. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

Περίληψη στην Ελληνική

Σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν τρία σύμπλοκα αργύρου(I) με σαλικυλικό οξύ και τα παράγωγα του (ασπιρίνη) και με παρα-υδροξύ-βενζοϊκό οξύ με τριφαινυλο-φωσφίνη, με δομή  $[\text{Ag}(\text{tpp})_2(\text{o-Hbza})]$  (**1**),  $[\text{Ag}(\text{tpp})_3(\text{asp})](\text{dmf})$  (**2**) και  $[\text{Ag}(\text{tpp})_2(\text{p-Hbza})]$  (**3**). Τα σύμπλοκα **1-3** χαρακτηρίστηκαν με σημείο τήξεως, στοιχειακή ανάλυση, φασματοσκοπία υπερύθρου,  $^1\text{H-NMR}$ , UV-vis, ESI-MS και με κρυσταλλογραφία ακτίνων X.

Τα σύμπλοκα **1-3** διαφέρουν ως προς την ικανότητα να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου. Το σύμπλοκο **1**, έχει την ικανότητα να δημιουργεί ενδομοριακούς δεσμούς, το σύμπλοκο **2**, δεν έχει την ικανότητα να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου και το σύμπλοκο **3** σχηματίζει ενδομοριακούς και διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου.

Για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας των συμπλόκων, πραγματοποιήθηκαν μελέτες για τον υπολογισμό του  $\text{IC}_{50}$  με τις μεθόδους MTT και Trypan Blue, έναντι καρκινικών σειρών LMS, MCF-7 και υγιών ινοβλαστών MRC-5. Τα σύμπλοκα **1-3** έδειξαν επίσης μία εκλεκτικότητα ως προς τα LMS κύτταρα, υποδηλώνοντας μια ευαισθησία του σαρκώματος έναντι του αδενοκαρκινώματος. Οι τιμές  $\text{IC}_{50}$  των συμπλόκων **1-3** ως προς του υγιείς ινοβλάστες είναι μεγαλύτερες από ότι στα καρκινικά κύτταρα. Τα σύμπλοκα **1-3** είναι 2-3 φορές πιο δραστικά από ότι το cisplatin, τον νιτρικό άργυρο και τους υποκαταστάτες των συμπλόκων.

Για να εκτιμηθεί αρχικά η ικανότητα των συμπλόκων να προκαλούν απόπτωση, μελετήθηκε η μορφολογία των LMS κυττάρων μετά από επώαση τους με τα σύμπλοκα **1-3**. Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα δεν διατηρούν την μορφολογία τους αλλά αποκτούν

χαρακτηριστικά τα οποία μαρτυρούν απόπτωση. Στην συνέχεια, ο αποπτωτικός θάνατος των κυττάρων επιβεβαιώθηκε με κυτταρομετρία ροής. Τα σύμπλοκα προκαλούν απόπτωση με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο.

Επιπλέον, η απόπτωση επιβεβαιώθηκε και με ηλεκτροφόρηση πυρηνικού DNA κυττάρων LMS μετά από επώαση των συμπλόκων **1-3**. Η εικόνα της ηλεκτροφόρησης αποδεικνύεται ότι υπάρχει κατακερματισμός του DNA.

Για την εξακρίβωση του μηχανισμού απόπτωσης, μελετήθηκε η ικανότητα των συμπλόκων **1-3** να αναστέλλουν την λιποξυγενάση. Τα σύμπλοκα **1-3** αναστέλλουν ισχυρά την λιποξυγενάση σε συγκεντρώσεις από 2.3-7.6  $\mu\text{M}$ , ενώ οι υποκαταστάτες δεν έχουν αυτή την ιδιότητα. Η αναστολή και η πρόσδεση των συμπλόκων **1-3** ισχυροποιείται και με τους θεωρητικούς υπολογισμούς. Πιθανόν τα σύμπλοκα **1-3**, προκαλούν απόπτωση μέσω του ενδογενούς ή μιτοχονδριακού μονοπατιού, ελευθερώνοντας τον κυτόχρωμα c από τα μιτοχόνδρια, και προκαλώντας τον καταρράκτη της απόπτωσης.

Επίσης, για να εξηγηθεί το μεγάλο ποσοστό απόπτωσης που προκαλούν τα σύμπλοκα με τις πολύ μικρές τιμές  $\text{IC}_{50}$ , ελέγχθηκε η ικανότητα τους να συνδέονται στο DNA πειραματικά και με θεωρητικούς υπολογισμούς. Τα σύμπλοκα **1-3** όταν συνδέονται στο DNA προκαλούν μεγάλο ποσοστό υπερχρωισμού υποδηλώνοντας πραγματοποιείται σύνδεση των συμπλόκων με τις αύλακες του DNA.

Συμπερασματικά, αποδείχτηκε ότι τα σύμπλοκα που έχουν την ικανότητα να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου, συνδέονται ισχυρά με το DNA και ότι η τιμή πρόσδεσης στο DNA σχετίζεται με την ικανότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με επίμυες Wistar Rat *in vivo*. Μελετήθηκε η τοξικότητα του συμπλόκου με ασπιρίνη και εκτιμήθηκε η ικανότητά του να εμποδίζει την ανάπτυξη όγκου. Η οξεία τοξικότητα έδειξε, ότι το σύμπλοκο με ασπιρίνη δεν είναι τοξικό μέχρι την δόση των 50 mg/kg και εμφάνιζε προβλήματα σε ήπαρ, νεφρό, πνεύμονες και πτώση των

τριχών. Στην υποχρόνια τοξικότητα, το σύμπλοκο προκαλεί τα ίδια συμπτώματα στα όργανα, αλλά δεν προκαλεί τον θάνατο των ζώων που έχουν δεχτεί την θεραπεία.

Τέλος, στα ζώα προκλήθηκε καρκινογένεση με ένεση LMS κυττάρων υποδόρια. Η δόση των 5 mg/kg δείχνει ένα μικρό ποσοστό νέκρωσης του όγκου αλλά χωρίς να εμφανίζει τοξικότητα στα όργανα και στου ιστούς.



Περίληψη στην Αγγλική

Three new novel complexes of silver(I) with salicylic acid and its derivatives (aspirin) and para-hydroxy - benzoic acid with triphenyl phosphine, are designed, synthesized and characterized by melting point, elemental analysis, infrared spectroscopy,  $^1\text{H-NMR}$ , UV-vis, ESI-MS and X-ray crystallography. The formulae of the complexes are  $[\text{Ag}(\text{tpp})_2(\text{o-Hbza})]$  (**1**),  $[\text{Ag}(\text{tpp})_3(\text{asp})](\text{dmf})$  (**2**) and  $[\text{Ag}(\text{tpp})_2(\text{p-Hbza})]$  (**3**).

The complexes **1-3** differed in their ability to form hydrogen bonds. The complex **1** has the ability to form intramolecular bonds, complex **2** has no ability to form hydrogen bonds and complex **3** forms intramolecular and intermolecular hydrogen bonds.

The cytotoxicity of complexes was calculated by MTT and Trypan Blue methods, against tumor lines LMS, MCF-7 and normal fibroblast MRC-5.

Complexes **1-3** showed selectivity to the LMS cells, indicating sensitivity to sarcoma instead of adenocarcinoma. The  $\text{IC}_{50}$  values of complexes **1-3** are higher to lung human fibroblasts (MCF-7) than that in the cancer cell lines (LMS and MCF-7). Complexes **1-3** are 2-3 times more potent than the cisplatin, the silver nitrate and the lignads.

Initially, in an attempt to evaluate the type of cell death, the alterations in cellular morphology observed within cultured and seeded LMS cells after their incubation with complexes **1-3**. It was observed that the cells do not retain their morphology but acquire characteristics which indicate apoptosis. The apoptotic cell death was also confirmed by flow cytometry. The complexes induce apoptosis in a dose - dependent manner. To ascertain the apoptotic type of LMS cell death when they are treated with 1–3, DNA fragmentation studies were also performed. Complexes 1–3 caused DNA laddering which

is a typical pattern of internucleosomal fragmentation

To ascertain the mechanism of apoptosis, it was studied the ability of complexes **1-3** to inhibit lipoxygenase. Complexes **1-3** strongly inhibit lipoxygenase at concentrations of 2.3-7.6  $\mu\text{M}$ . These results was confirmed by docking studies. The complexes 1-3, maybe cause apoptosis through the intrinsic mitochondrial pathway, releasing cytochrome c from the mitochondria and trigger the cascade of apoptosis.

In order to be explained the large percentage of apoptosis which is caused by the complexes **1-3**, it was tested the ability of the complexes to bind to DNA experimentally and theoretical. The complexes 1-3 are linked to DNA and cause hypercroism and they can dock to the grooves of the DNA (major or minor).

In conclusion, it was demonstrated that the complexes have the ability to form hydrogen bonds through binding to DNA and the ability of the complexes to bind to DNA is associated with the capacity to form hydrogen bond.

Finally, experiments were performed in rats Wistar *in vivo*. It was tested the acute and subchronic toxicity of the complex which contain aspirin. Is was also evaluated its ability of the complex to prevent tumor development. The acute toxicity showed, that the complex with aspirin, is not toxic to the dose of 50 mg/kg. The acute toxicity affects the liver, kidney, lungs and it also noticed that the hair falls. In subchronic toxicity, the complex causes the same symptoms in the organs , also no animals was died due to the toxicity of the complex. Finally, it was induced carcinogenesis in animals through injection with LMS cells subcutaneously. The dose of the complex of 5 mg/kg shows a small percentage of tumor necrosis and there is no toxicity to the organs and tissues.

## 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdellah M.A., Hadjikakou S.K, Hadjiliadis N., Kubicki M., Bakas T., Kourkoumelis N., Simos Y.V., Karkabounas S., Barsan M., Butler I.S., (2009) *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2009, Synthesis, Characterization, and Biological Studies of Organotin(IV) Derivatives with o- or p-hydroxybenzoic Acids, DOI:10.1155/2009/542979
- Afrati T., Pantazaki A.A., Dendrinou-Samara C., Raptopoulou C., Terzis A., Kessissoglou D.P., (2010) *Dalton Trans.*, Copper inverse-9-metallacrown-3 compounds interacting with DNA, 39: 765–7750
- Aranowska K., Graczyk J., Checinska L., Pakulska W., Ochocki J., (2006) *Pharmazie*, Antitumor effect of Pt(II) amine phosphonate complexes on sarcoma Sa-180 in mice. Crystal structure of cis-dichlorobis(diethyl-4-pyridylmethylphosphonate- kN)platinum(II) hydrate, cis-[PtCl<sub>2</sub>(4-pmpe)<sub>2</sub>]·H<sub>2</sub>O, 61: 457-560
- Atiyeh B.S., Costagliola M., Hayek S.N., Dibo S.A., (2007) *Burns*, Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature, 33: 139-148
- Bathaiea S.Z., Nikfarjama L., Rahmanpoura R., Moosavi-Movahedi A.A., (2010) *Spectrochim. Acta, Part A*, Spectroscopic studies of the interaction of aspirin

and its important metabolite, salicylate ion, with DNA, A·T and G·C rich sequences, 77: 1077–1083

Batistatou, A., Charalabopoulos, K, (2006), *Experimental Oncology*, Crossing chromosomes in pleomorphic sarcoma, 28, 3, 248

Batistatou, A., Charalabopoulos, K.A, (2006), *International journal of surgical pathology, Images in pathology. Leiomyosarcoma twins*, 14, 2, 145

Batistatou, A., Charalabopoulos, K.A., (2006), *International Journal of Surgical Pathology, Leiomyosarcoma twins*, 14, 2, 145

Beinert H., (2002) *J. Biol. Chem., Bioinorganic Chemistry: A New Field or Discipline? Words, Meanings, and Reality* 277: 37967–37972

Biersack B., Ahmad A., Sarkar F.H., Schobert R., (2012) *Current Medicinal Chemistry, Coinage Metal Complexes Against Breast Cancer*, 19: 3949-3956

Blankenberg F.G., (2008) *The Journal Of Nuclear Medicine, In Vivo Detection of Apoptosis*, 49: 81s-96s

Boudnitskaya V., Borisova I.G., (1972) *FEBS Lett., Investigation of lipoxygenase functions in chloroplasts and mitochondria from pisum sativum seedlings*, 24: 359–362



Brazil M., (2005) *Nat. Rev. Drug Discov.*, Long-term study proposed for COX2 inhibitors, 4: 307–320

Catalano A., Procopio A., (2005) *Histol Histopathol*, New aspects on the role of lipoxygenases in cancer progression 20:969-975

Charalabopoulos, K., Karkabounas, S., Dimicco, P., Binolis, J., Charalabopoulos, A., Zelovitis, J., Avdikos, A., Metsios, A., Peschos, D., Agnantis, N.J., Evangelou, A., (2004), *Journal of B.U.ON*, The role of ascorbic acid, selenium, and glutathione on benzo[a]pyrene-induced carcinogenesis in wistar rats, 9, 2, 187-192

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

Coombes R.C., Hall E., Gibson L.J., Paridaens R., Jassem J., Delozier T., Jones S.E., Alvarez I., Bertelli G., Ortmann O., Coates A.S, Bajetta E., Dodwell D., Coleman R.E., Fallowfield L.J., Mickiewicz E., Andersen J., Lonning P.E., Cocconi G., Stewart A., Stuart N., Snowdon C.F., Carpentieri M., Massimini G., Bliss J.M., (2004) *N Engl J Med*, A Randomized Trial of Exemestane after Two to Three Years of Tamoxifen Therapy in Postmenopausal Women with Primary Breast Cancer, 350: 1081-1093

- Coyle B., McCann M., Kavanagh K., Devereux M., McKee V., Kayal N., Egan D., Deegan C., Finn G.J., (2004) *J. Inorg. Biochem.*, Synthesis, X-ray crystal structure, anti-fungal and anti-cancer activity of  $[\text{Ag}_2(\text{NH}_3)_2(\text{salH})_2]$  ( $\text{salH}_2$ =salicylic acid), 98: 1361–1366
- Crespy D., Landfester K., Schubert U.S., Schiller A., (2010) *Chem. Commun.*, Potential photoactivated metallopharmaceuticals: from active molecules to supported drugs 46: 6651–6662
- Deegan C., McCann M., Devereux M., Coyle B., Egan D.A., (2007) *Cancer Lett.*, *In vitro* cancer chemotherapeutic activity of 1,10-phenanthroline (phen),  $[\text{Ag}_2(\text{phen})_3(\text{mal})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{mal})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and  $[\text{Mn}(\text{phen})_2(\text{mal})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{malH}_2$  = malonic acid) using human cancer cells, 247: 224–233
- Duarte S., Carle G., Faneca H., Pedroso de Lima M.C., Pierrefite-Carle V., (2012) *Cancer Letters* 324 Suicide gene therapy in cancer: Where do we stand now? 160–170
- Dugowson C.E., Gnanashanmugam P., (2006) *Phys Med Rehabil Clin N Am*, Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs 17: 347-354
- Dujovny M., Rozario R., Kossovsky N., Diaz F.G., Segal R., (1983) *Ann N Y Acad Sci.*, Antiplatelet effect of dimethyl sulfoxide, barbiturates, and methyl prednisolone, 411: 234-44

Durkin W.J., Ghanta V.K., Balch C.M., Davis D.W., Hiramoto R.N., (1979) *Cancer Res*,  
A Methodological Approach to the Prediction of Anticancer Drug Effect in  
Humans, 39: 402-407

Elmore S., (2007) *Toxicol Pathol*, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, 35:  
495-516

Farrell N. (2002) *Coordination Chemistry Reviews*, Biomedical uses and applications  
of inorganic chemistry. An overview, 232: 1-4

Fischer U., Schulze-Osthoff K., (2005) *Pharmacol Rev*, New Approaches and  
Therapeutics Targeting Apoptosis in Disease, 57: 187-215

Garner C.D., *J. Chem. Soc.*, (1997) *Dalton Trans.*, Bioinorganic Chemistry: a personal  
perspective, 3903–3908

Giovagnini L., Ronconi L., Aldinucci D., Lorenzon D., Sitran S., Fregona D., (2005) *J.*  
*Med. Chem.*, Synthesis, Characterization, and Comparative *in Vitro*  
Cytotoxicity Studies of Platinum(II), Palladium(II), and Gold(III)  
Methylsarcosinedithiocarbamate Complexes, 48: 1588-1595

Guo C., Nie D., (2012) *J Carcinogen Mutagen*, Are Lipoxygenases Valid Targets of  
Cancer Prevention and Treatment?, doi:10.4172/2157-2518.S1-008

Gust R., Beck W., Jaouen G., Schonenberger H., (2009) *Coordination Chemistry Reviews*, Optimization of cisplatin for the treatment of hormone dependent tumoral diseases Part 1: Use of steroidal ligands, 253: 2742–2759

Hadjikakou, S.K., Balas, V.I., Hadjiliadis, N., Kourkoumelis, N., Light, M.E., Hursthouse, M., Metsios, A.K., Karkabounas, S., (2008), *Bioinorganic Chemistry and Applications*, Crystal structure and antitumor activity of the novel zwitterionic complex of tri- n -butyltin(IV) with 2-thiobarbituric acid, 2008, 654137

Hadjikakou, S.K., Kyros, L., Kourkoumelis, N., Kubicki, M., Male, L., Hursthouse, M.B., Verginadis, I.I., Gouma, E., Karkabounas, S., Charalabopoulos, K., (2010), *Bioinorganic Chemistry and Applications*, Structural properties, cytotoxicity, and anti-inflammatory activity of silver(I) Complexes with tris(p-tolyl)Phosphine and 5-Chloro-2- mercaptobenzothiazole., 2010, 386860

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

- Hanigan M.H., Devarajan P., (2003) *Cancer Therapy, Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms*, 1: 47-61
- Hubrecht R., Kirkwood J., *The UFAW Handbook on The Care and Management of Laboratory and Other Research Animals: Eighth Edition, 2010 the Universities Federation for Animal Welfare. ISBN: 978-1-405-17523-4*
- Husson F., Pagot Y., Kermasha S., Belin J.M., (1998) *Enzyme Microb. Technol., Fusarium proliferatum: Induction and intracellular location of a lipoxygenase*, 23: 42–48
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D., (2011) *Ca Cancer J Clin, Global Cancer Statistics*, 61: 69-90
- Jenson H.B., Montalvo E.A., McClain K.L., Ench Y., Heard P., Christy B.A., Dewalt-Hagan P.J., Pat Moyer M., (1999) *Journal of Medical Virology, Characterization of Natural Epstein-Barr Virus Infection and Replication in Smooth Muscle Cells From a Leiomyosarcoma*, 57: 36-46
- Jones C.J., Thornback J.R., (2008) *Medicinal Applications of Coordination Chemistry, Platinum Metals Rev.*, 52: 21-22
- Kallistratos, G, (1974), *Naturwissenschaften, Inhibitory action of putrescine on benzo(a)pyrene carcinogenesis in mice*, 61, 10, 459

- Kallistratos, G. (1975), *Experientia*, The significance of the cis aconitic acid for the biological inactivation of the 3,4 benzopyrene cancerogenesis, 31, 4, 490-491
- Kallistratos, G., Evangelou, A., Agnantis, N., Fasske, E., Karkabounas, S., Donos, A., (1994), *Cancer Letters*, Enhancement of the antineoplastic effect of anticarcinogens on benzo[a]pyrene-treated Wistar rats, in relation to their number and biological activity, 82, 2, 153-165
- Kallistratos, G., Fasske, E. (1979), *Folia Biochimica et Biologica Graeca*, Inhibition of benzo(a)pyrene carcinogenesis in rats with vitamin C, 16, 1-2, 15-30
- Kallistratos, G., Fasske, E. (1980), *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, Inhibition of benzo(a)pyrene Carcinogenesis in rats with vitamin C, 97, 1, 91-96
- Kallistratos, G.I., Fasske, E.E., Karkabounas, S., Charalambopoulos, K., (1988), *Progress in clinical and biological research*, Prolongation of the survival time of tumor bearing Wistar rats through a simultaneous oral administration of vitamins C + E and selenium with glutathione, 259, 377-389
- Karkabounas, S., Binolis, J., Zelovitis, J., Kotsis, N., Charalabopoulos, A., Avdikos, A., Zuridakis, A., Liasko, R., Giannakopoulos, X., Charalabopoulos, K., (2002), *Experimental Oncology*, Inhibition and modification of

benzo(a)pyrene induced chemical carcinogenesis by ascorbic acid alone or in combination with  $\alpha$ -tocopherol in wistar rats, 24, 4, 274-278

Karkabounas, S., Kiortsis, D.N., Zelovitis, J., Skafida, P., Demetzos, C., Malamas, M., Elisaf, M., Evangelou, A, (2003), In Vivo, Effects of Cupressus sempervirens cone extract on lipid parameters in Wistar rats, 17, 1, 101-103

Klasen H.J., (2000) Burns, A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver, 26: 131-138

Kojima S., Suzuki H., Akakura K., Shimbo M., Ichikawa T., Ito H., (2004) Urology, Alternative antiandrogens to treat prostate cancer relapse after initial hormone therapy, 171: 679–683

Komor A.C., Barton J.K., (2013) Chem. Commun., The path for metal complexes to a DNA target, 49: 3617-3630

Kostova I., (2006) Platinum Complexes as Anticancer Agents, Recent Pat Anti-Canc, 1: 1-22

Kouroulis K.N., Hadjidakou S.K., Kourkoumelis N., Kubicki M., Male L., Hursthouse M., Skoulika S., Metsios A.K., Tyurin V.Y., Dolganov A.V., Milaeva E.R., Hadjiliadis N., (2009) Dalton Trans., Synthesis, structural

characterization and *in vitro* cytotoxicity of new Au(III) and Au(I) complexes with thioamides, 10446–10456

Lansdown A.B., Silver in healthcare, its antimicrobial efficacy in use, page261, 2010, ISBN: 978-1-84973-006-8

Lazarou K., Bednarz B., Kubicki M., Verginadis I.I., Charalabopoulos K., Kourkoumelis N., Hadjidakou S.K., (2010) *Inorg. Chim. Acta*, 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, 363:763–772

Leenders M.W.H., Nijkamp M.W., Borel Rinkes I.H.M., (2008) *World J Gastroenterol*, Mouse models in liver cancer research: A review of current literature 14: 6915-6923

Leporatti S., Vergara D., Zacheo A., Vergaro V., Maruccio G., Cingolani R., Rinaldi R., (2009) *Nanotechnology*, 2009, 20 Cytomechanical and topological investigation of MCF-7 cells by scanning force microscopy, 05510-005516

Lippert B., (1992) *BioMetals*, From cisplatin to artificial nucleases- the role of metal ion-nucleic acid interactions in biology, 5:195-208



- Liu X.Y., Zhu H.L., (2005) *Synth. React. Inorg., Met.-Org., Nano-Met. Chem., Strong Silver-Silver Interactions in Three Silver(I) Carboxylate Complexes with High Cytotoxicity Properties*, 35: 325–332
- Lu X., Xielt W., Reed D., Bradshaaw W.S., Simmons D.L., (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Nonsteroidal antiinflammatory drugs cause apoptosis and induce cyclooxygenases in chicken embryo fibroblasts*, 92: 7961–7965
- Maccarrone M., Melino G, Finazzi-Agro A., (2001) *Cell Death and Differentiation, Lipoxygenases and their involvement in programmed cell death*, 8: 776-784
- Max Parkin D., Bray F., Ferlay J., Pisani P., (2005) *Ca Cancer J Clin, Global Cancer Statistics, 2002*, 55: 74-108
- Mosmann T., (1983) *Journal of Immunological Methods, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*, 65: 55-63
- N'soukpoe-Kossi C.N., Descoteaux C., Asselin E., Tajmir-Riahi H.A., Berube G., (2008) *DNA Cell Biol., DNA Interaction with Novel Antitumor Estradiol–Platinum(II) Hybrid Molecule: A Comparative Study with Cisplatin Drug* 27: 101–107

- Oates J.A., Wood A.J.J., (1991) *New Engl J Med*, Nonsteroidal antiinflammatory drugs- differences and similarities 1716-1725
- Ozturk I., Filimonova S., Hadjikakou S.K., Kourkoumelis N., Dokorou V., Manos M.J., Tasiopoulos A.J., Barsan M.M., Butler I.S., Milaeva E.R., Balzarini J., Hadjiliadis N., (2010) *Inorg. Chem.*, Structural Motifs and Biological Studies of New Antimony(III) Iodide Complexes with Thiones, 49: 488–501
- Papadogiannakis E.I., Kontos V.I., Tamamidou M., Roumeliotou A., (2005) *Journal Of The Hellenic Veterinary Medical Society*, Flow cytometry and its applications, 56: 71-77
- Papaioannou, A., Manos, M., Karkabounas, S., Liasko, R., Evangelou, A.M., Correia, I.c, Kalfakakou, V., Costa Pessoa, J., Kabanos, T., (2004), *Journal of Inorganic Biochemistry*, Solid state and solution studies of a vanadium(III)-L-cysteine compound and demonstration of its antimetastatic, antioxidant and inhibition of neutral endopeptidase activities, 98, 6, 959-968
- Pereira F.A., Vijay Mudgil A., Rosmarin D.M., (2007) *J Am Acad Dermatol*, Toxic epidermal necrolysis, 56: 181-200
- Pettinari C., Marchetti F., Lupidi G., Quassinti L., Bramucci M., Petrelli DVitali., L.A., M. Fatima C. Guedes da Silva, Martins L.M.D.R.S., Smolenski P., Pombeiro A.J.L., (2011) *Inorg. Chem.*, Synthesis, Antimicrobial and Antiproliferative

Activity of Novel Silver(I) Tris(pyrazolyl)methanesulfonate and 1,3,5-Triaza-7-phosphadamantane Complexes, 50: 11173–11183

Pidgeon G.P., Lysaght J., Krishnamoorthy S., Reynolds J.V., O'Byrne K., Nie D., Honn K.V., (2007) *Cancer Metastasis Rev*, *In Vivo* Detection of Apoptosis, 26: 503–524

Price P., McMillan T.J., (1990) *Cancer Research*, Use of the Tetrazolium Assay in Measuring the Response of Human Tumor Cells to Ionizing Radiation, 50: 1392-1396

Reedijk J., (2003) *PNAS*, New clues for platinum antitumor chemistry: Kinetically controlled metal binding to DNA, 100, 7: 3611–3616

Reyzer M.L., Brodbelt J.S., Kerwin S.M., Kumar D., (2001) *Nucleic Acids Research*, Evaluation of complexation of metal-mediated DNA-binding drugs to oligonucleotides via electrospray ionization mass spectrometry, 29:e103-115

Robertson J.D., Orrenius S., (2000) *Critical Reviews in Toxicology*, Molecular Mechanisms of Apoptosis Induced by Cytotoxic Chemicals, 30: 609-627

Sahoo B.K., Ghosh K.S., Bera R., Dasgupta S., (2008) *Chem. Phys.*, Studies on the interaction of diacetylcurcumin with calf thymus-DNA, 351: 163–169

Santos E., (2002) *Rev Oncol*, The use of animal models in cancer research, 4: 55-59

Scott A.M., Wolchok J.D., Old L.J., (2012) Nature Reviews, Antibody therapy of cancer, 12: 278-287

Siegel R., DeSantis C., Virgo K., Stein K., Mariotto A., Smith T., Cooper D., Gansler T., Lerro C., Fedewa S., Lin C., Leach C., Spillers Cannady R., Cho H., Scoppa S., Hachey M., Kirch R., Jemal A., Ward E., (2012) Ca Cancer J Clin, Cancer Treatment and Survivorship Statistics 2012, 62: 220-241

Souza Torsoni A., Figueiredo B. de Barros, Carlos J. Toledo, Haun M., Helena M. Krieger, Tfouni E., Wagner D. Franco, (2002) Nitric Oxide: Biology and Chemistry, Hypotensive Properties and Acute Toxicity of trans-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>P(OEt)<sub>3</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, a New Nitric Oxide Donor, 6:247-254

SY Wong R. (2011) Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment 30: 87-113

Thati B., Noble A., Creaven B.S., Walsh M., McCann M., Kavanagh K., Devereux M., Egan D.A., (2007) Cancer Lett., *In vitro* anti-tumour and cyto-selective effects of coumarin-3-carboxylic acid and three of its hydroxylated derivatives, along with their silver-based complexes, using human epithelial carcinoma cell lines, 248: 321-331

Tong W.G., Ding X.Z., Witt R.C., Adrian T.E., (2002) Molecular Cancer Therapeutics, Lipoygenase Inhibitors Attenuate Growth of Human Pancreatic Cancer

Xenografts and Induce Apoptosis through the Mitochondrial Pathway, 1:  
929–935

Van Engeland M., Nieland L.J.W., Ramaekers F.C.S., Schutte B., Reutelingsperger  
C.P.M., (1998) Cytometry, Annexin V-Affinity Assay: A Review on an  
Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure, 31: 1-9

Vane J.R., Botting R.M., (1998) Inflamm. res., Anti-inflammatory drugs and their  
mechanism of action, 47: S78–S87

Verginadis, I.I., Karkabounas, S., Simos, Y., Kontargiris, E., Hadjidakou, S.K., Batistatou,  
A., Evangelou, A., Charalabopoulos, K., (2011), European Journal of  
Pharmaceutical Sciences, Anticancer and cytotoxic effects of a triorganotin  
compound with 2-mercapto-nicotinic acid in malignant cell lines and tumor  
bearing Wistar rats, 42, 3, 253-261

Wallace J.M., (2002) Integr Cancer Ther, Nutritional and Botanical Modulation of the  
Inflammatory Cascade-Eicosanoids, Cyclooxygenases, and Lipoxygenases-  
As an Adjunct in Cancer Therapy, 1: 7-37

Xanthopoulou, M.N., Hadjidakou, S.K., Hadjiliadis, N., Kourkoumelis, N., Milaeva,  
E.R., Gracheva, Yu.A., Tyurin, V.Yu., Verginadis, I., Karkabounas, S., Baril,  
M., Butler, I.S., (2007), Russian Chemical Bulletin, Biological studies of  
organotin(IV) complexes with 2-mercaptopyrimidine, 56, 4, 767-773

Xanthopoulou M.N., Hadjikakou S.K, Hadjiliadis N., Kubicki M., Skoulika S., Bakas T., Baril M., Butler I.S., (2007) *Inorg. Chem.*, Synthesis, structural characterization, and biological studies of six- and five-coordinate organotin(IV) complexes with the thioamides 2-mercaptobenzothiazole, 5-chloro-2-mercaptobenzothiazole, and 2-mercaptobenzoxazole, 46: 1187–1195.

Xanthopoulou M.N., Hadjikakou S. K., Hadjiliadis N., Schurmann M., Jurkschat K., Michaelides A., Skoulika S., Bakas T., Binolis J., Karkabounas S., Charalabopoulos K., (2003) *J. Inorg. Biochem.*, 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 96: 425–434

Xanthopoulou M.N., Hadjikakou S.K., Hadjiliadis N., Milaeva E.R., Gracheva J.A, Yu V., Tyurin, Kourkoumelis N., Christoforidis K.C., Metsios A.K., Karkabounas S., Charalabopoulos K., (2008) *Eur. J. Med. Chem.*, Biological studies of new organotin(IV) complexes of thioamide ligands, 43: 327–335

Zha S., Yegnasubramanian V., Nelsona W.G., Isaacs W.B., De Marzo A.M., (2004) *Cancer Lett.*, Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective, 215: 1-20

Zhu H.L., Zhang X.M., Liu X.Y., Wang X.J., Liu G.F., Usman A., Fun H.K, (2003)  
Inorg. Chem. Commun., Clear Ag–Ag bonds in three silver(I) carboxylate  
complexes with high cytotoxicity properties, 6: 1113–1116

Βαρθολομάτος Γ., Δραΐνας Κ., Κολιός Γ., Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας Ι,  
Ιωάννινα 2006

Μαργαρίτης Λ.Χ., Βιολογία Κυττάρου, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Τέταρτη Έκδοση,  
2004

Σταμάτης Χ., Εργαστηριακές και υπολογιστικές ασκήσεις Βιοχημικής Μηχανικής,  
Ιωάννινα 2007

Σταμάτης Χ., Στοιχεία Βιοχημικής και Μεταβολικής Μηχανικής, Ιωάννινα 2007