



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

***«ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ
ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΑ ΠΕΔΙΑ.
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ»***

**Ιωάννης Η. Βεργινάδης
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

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

Ημερομηνία αίτησης του κ Βεργινάδη Ιωάννη: 21-12-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 603^α/24-4-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Καρκαμπούνας Σπυρίδων Λέκτορας Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Βελτιστάς Παναγιώτης Επίκουρος Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 3-5-2007

«Αλληλεπίδραση βιολογικά δραστικών ουσιών με ηλεκτρομαγνητικά πεδία »

Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής 653^α/3-2-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

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

Χατζηκακού Σωτήριος Αναπληρωτής Καθηγητής Ανόργανης Χημείας Τμήματος Χημείας

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 693^α/21-9-2010

Ανωγειανάκης Γεώργιος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χαραλαμπόπουλος Κωνσταντίνος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης
Μπατιστάτου Άννα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χατζηκακού Σωτήριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Ανόργανης Χημείας Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καρκαμπούνας Σπυρίδων	Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πέσχος Δημήτριος	Λέκτορας Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 10-12-2010

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής



ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ -ΖΩΗ

Αφιερώσεις

*Στους Γονείς μου,
Ηλία και Νικολέτα
στον αδερφό μου, Παναγιώτη
στη γιαγιά μου, Δήμητρα*

«Πίστευε και μη, ερεύνα»

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι αρχαίοι Έλληνες πίστευαν ότι τα αστρικά (ηλεκτρομαγνητικά πεδία) βοηθούσαν στην ίαση και αποκατάσταση διαφόρων ασθενειών (σωματικών και ψυχικών) και γι' αυτό έχτιζαν τα Ασκληπιεία (αρχαία ιατρεία) σε περιοχές με έντονα μαγνητικά πεδία (π.χ. Επίδαυρος). Ως αξίωμα, τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα αναφέρθηκαν για πρώτη φορά από τον James Clerk Maxwell το 1871 και μετέπειτα επιβεβαιώθηκαν από τον Heinrich Hertz, εισάγοντας έτσι ένα νέο παρθένο επιστημονικό πεδίο για έρευνα. Οι ιδιότητές τους και οι επιδράσεις τους «μάγευαν» τους επιστήμονες με αποτέλεσμα όλο και περισσότεροι να ασχολούνται με αυτά. Ειδικότερα, κατά τις τρεις τελευταίες δεκαετίες, εξαιτίας της πλειάδας των ηλεκτρονικών και ηλεκτρικών συσκευών που έχουν εισαχθεί στον καθημερινότητά μας και των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων που δημιουργούνται γύρω από αυτές, μία μεγάλη μερίδα επιστημόνων ερευνούν τις πιθανές επιπτώσεις τους στον ανθρώπινο οργανισμό.

Παρ' όλες τις μελέτες και τα δεδομένα που υπάρχουν στην έρευνα για τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία, δεν υπάρχει κανένας γενικά αποδεκτός μηχανισμός για το πώς αυτά επηρεάζουν τα βιολογικά συστήματα. Μια πιθανότητα είναι ότι το DNA καταστρέφεται από τις ελεύθερες ρίζες οι οποίες σχηματίζονται μέσα στα κύτταρα μετά την έκθεσή τους στα ηλεκτρομαγνητικά πεδία, ειδικότερα σε αυτά των υψηλών συχνοτήτων, αλλά και αυτή η θεωρία απαιτεί πολλές μελέτες για να επιβεβαιωθεί.

Το Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων ασχολείται ερευνητικά με την επίδραση των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων συγκεκριμένων συχνοτήτων (συντονισμού) σε πειραματικά μοντέλα την τελευταία δεκαετία. Ωστόσο, αυτό που καθιστά πρωτότυπη και μοναδική αυτή την έρευνα συγκριτικά με εκείνες των

άλλων ερευνητικών ομάδων είναι ότι δεν χρησιμοποιούνται πεδία συχνοτήτων κινητών τηλεφώνων, ηλεκτρικών συσκευών, ηλεκτροφόρων καλωδίων κ.ά., αλλά συχνότητες συντονισμού χημικών ή βιολογικών μορίων, ούτως ώστε η εκπομπή αυτών να προσομοιάσει και πιθανόν να αντικαταστήσει την φυσική παρουσία και δράση των ίδιων χημικών ή βιολογικών μορίων, στα διάφορα πειραματικά μοντέλα και σε όλα τα επίπεδα, *in vitro*, *in vivo* και *ex vivo*. Το κάθε χημικό ή βιολογικό μόριο έχει τις δικές του συχνότητες συντονισμού που είναι μοναδικές και θεωρούνται ως «ηλεκτρομαγνητικό αποτύπωμα». Η πρωτοτυπία αυτή σε συνδυασμό με τα πολύ σημαντικά αποτελέσματα που παρατήρησα στα πλαίσια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, με ώθησαν να συνεχίσω την έρευνα μου σε αυτό το ενδιαφέρον επιστημονικό πεδίο και να αναλάβω την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Όσο όμως πρωτότυπο και ενδιαφέρον είναι αυτό το επιστημονικό πεδίο τόσο περισσότερες δυσκολίες προκύπτουν σε θεωρητικό και σε πρακτικό επίπεδο. Για να ξεπεραστούν όλα αυτά τα εμπόδια και για να ολοκληρωθεί η παρούσα διδακτορική διατριβή δεν μου απομένει παρά να ευχαριστήσω όλους όσους μου προσέφεραν τη βοήθειά τους και το χρόνο τους.

Πρώτα απ' όλα, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της Διατριβής μου Καθηγητή μου κ. Άγγελο Ευαγγέλου, για την δυνατότητα που προσέφερε να εργαστώ και να δοκιμαστώ σε αυτό το πρωτότυπο και δύσκολο ερευνητικό πεδίο, καθώς και για την επίβλεψη και τη βοήθεια που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σπυρίδωνα Καρκαμπούνα, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις χρήσιμες υποδείξεις στις πειραματικές διαδικασίες για την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σωτήριο Χατζηκακού, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τα οργανομεταλλικά σύμπλοκα που συνέθεσε

και την υποστήριξη που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους Κωνσταντίνο Χαβέλα και Γιώργο Χατζηαϊβάζη, οι οποίοι μου παραχώρησαν τη συσκευή εκπομπής ηλεκτρομαγνητικών πεδίων και με υποστήριξαν τόσο τεχνικά όσο και θεωρητικά.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Χαραλαμπίδου για την υποστήριξη και το χρόνο που διέθεσε στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής.

Επίσης ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Άννα Μπατιστάτου για τη βοήθεια και τις υποδείξεις που προσέφερε στις ιστολογικές μελέτες.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον Κλινικό Διαιτολόγο-Διατροφολόγο Ιωάννη Σίμο για την πολύτιμη βοήθεια που προσέφερε, το χρόνο που διέθεσε καθώς και την άψογη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ επίσης το Βιολόγο Αποστόλη Μέτσιο, τη Βιολόγο Αναστασία Βελαλοπούλου και το Μοριακό Βιολόγο Ηλία Καραγκούνη για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν αυτά τα χρόνια καθώς για τη συμπαράσταση που επέδειξε ο ένας στον άλλο σε όλες τις δύσκολες στιγμές. Θέλω να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Βαγγέλη Κωλέττα και το Μοριακό Βιολόγο Βαγγέλη Κονταργύρη για τις υποδείξεις και τη συνεργασία μας σε πειραματικά πρωτόκολλα μοριακών τεχνικών. Ακόμη θέλω να ευχαριστήσω το Γεωπόνο Ιωάννη Ζελοβίτη για την καθοδήγηση και τις υποδείξεις του στους χειρισμούς πειραματοζώων και τη Βιολόγο Χρυσούλα Αναστασιάδου για την καλή συνεργασία που υπήρξε στη διεξαγωγή ορισμένων πειραμάτων.

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

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τους γονείς μου για τη βοήθειά, τη συμπαράσταση και την υποστήριξη που μου πρόσφεραν όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Κασσίτερος.....	7
1.1.1 Ιδιότητες.....	7
1.1.2 Τοξικότητα συμπλόκων κασσιτέρου.....	8
1.1.3 Αντικαρκινική δράση συμπλόκων κασσιτέρου.....	8
1.2 Αναλγησία-Μορφίνη	10
1.3 Ηλεκτρομαγνητικά πεδία	12
1.3.1 Ηλεκτρομαγνητικό πεδίο-ηλεκτρομαγνητικά κύματα.....	12
1.3.2 Συνοπτικά τα χαρακτηριστικά μεγέθη ηλεκτρομαγνητικών πεδίων.....	16
1.3.3 Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.....	17
1.3.4 Θερμική ακτινοβολία και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ως μια μορφή θερμότητας.....	21
1.3.5 Ηλεκτρομαγνητικά πεδία και έρευνα.....	22
1.4 Φαινόμενο συντονισμού	24
1.5 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR).....	25
1.6 Επιδράσεις ηλεκτρομαγνητικών πεδίων - ασθένειες	27
1.6.1 Βλάβη στο DNA.....	27
1.6.2 Επιδράσεις από την έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία υψηλών συχνοτήτων - χρήση κινητών τηλεφώνων.....	28
1.6.3 Έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία πολύ χαμηλών συχνοτήτων (ELF EMF).....	30
1.6.4 Πιθανός μηχανισμός δράσης ηλεκτρομαγνητικών πεδίων.....	31
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	35
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
3.1 Εξαγωγή συχνοτήτων συντονισμού – συσκευή εκπομπής.....	37
3.1.1 Εύρεση συχνοτήτων από το ¹ H- NMR φάσμα.....	37
3.1.2 Εύρεση συχνοτήτων από το IR φάσμα.....	38
3.1.3 Συσκευή εκπομπής ηλεκτρομαγνητικών πεδίων.....	38
3.2 In vitro.....	40
3.2.1 Υλικά και Μηχανήματα-Συντομογραφίες.....	40
3.2.2 Κυτταρικές σειρές και κυτταροκαλλιέργεια.....	42
3.2.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων.....	43
3.2.4 Διατήρηση των κυττάρων – Πάγωμα / Ξεπάγωμα.....	43
3.2.5 Σπορά κυττάρων σε πολυτρυβλία.....	44
3.2.6 Υπολογισμός κυτταρικής βιωσιμότητας με Trypan Blue.....	45
3.2.7 Υπολογισμός αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη χρήση MTT.....	46
3.2.8 Δημιουργία αποικιών – μέτρηση.....	47
3.2.9 Προσθήκη συμπλόκου του Κασσιτέρου σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις.....	48
3.2.10 Προσδιορισμός απόπτωσης – νέκρωσης με κυτταρομετρία ροής.....	49
3.2.11 Προσδιορισμός κατακερματισμού του DNA – Ηλεκτροφόρηση DNA.....	50
3.2.12 Κυτταρικός κύκλος.....	52
3.2.13 Έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία – συχνότητες συντονισμού.....	53
3.2.13.1 Έκθεση κυτταρικών στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα συχνοτήτων συντονισμού (¹ H- NMR).....	53
3.2.13.2 Έκθεση κυττάρων στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα συχνοτήτων φάσματος υπερύθρου (IR).....	55

3.2.13.3 Έκθεση θρεπτικού υλικού στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα συχνότητας συντονισμού (¹ H- NMR)	56
3.3 Ex vivo	57
3.3.1 Αιμοπεταλιακή συσσώρευση.....	57
3.3.1.1 Σύμπλοκο.....	57
3.4 In vivo	59
3.4.1 Τοξικότητα σε επίμνες <i>Wistar</i>	59
3.4.1.1 Οξεία τοξικότητα.....	59
3.4.1.2 Χρόνια τοξικότητα	60
3.4.2 Ενοφθαλμισμός επίμνων <i>Wistar</i>	61
3.4.3 Αντικαρκινική δράση σε καρκινοπαθείς επίμνες <i>Wistar</i>	62
3.4.3.1 Δράση του συμπλόκου	62
3.4.3.2 Δράση των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων συχνοτήτων συντονισμού.....	63
3.4.4 <i>Tail Flick Test</i>	64
3.4.5 <i>Hot Plate Test</i>	66
3.4.6. Στατιστική ανάλυση.....	67
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	69
4.1 Συχνότητες συντονισμού από το ¹H-NMR φάσμα του SnMNA και της μορφίνης	69
4.2 Συχνότητες από το IR φάσμα του SnMNA	72
4.3 In vitro	74
4.3.1 Κυτταρικής βιωσιμότητας με <i>Trypan Blue</i>	74
4.3.2 Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη χρήση <i>MTT</i>	77
4.3.3 Αποικίες	102
4.3.4 Κυτταρομετρία ροής - απόπτωση – νέκρωση	104
4.3.5 Προσδιορισμός κατακερματισμού του <i>DNA</i> – Ηλεκτροφόρηση <i>DNA</i>	110
4.3.6 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου.....	111
4.4 Ex vivo	113
4.4.1 Αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης με τη χρήση του <i>SnMNA</i>	113
4.5 In vivo	115
4.5.1 Τοξικότητα σε επίμνες <i>Wistar</i>	115
4.5.1.1 Οξεία τοξικότητα.....	115
4.5.1.2 Χρόνια τοξικότητα	117
4.5.2 Αντικαρκινική δράση σε καρκινοπαθείς επίμνες <i>Wistar</i> με τη χρήση του <i>SnMNA</i> .	118
4.5.3 Αντικαρκινική δράση σε καρκινοπαθείς επίμνες <i>Wistar</i> με τη χρήση συχνοτήτων συντονισμού από το φάσμα <i>NMR</i> του <i>SnMNA</i>	121
4.5.4 <i>Tail Flick Test</i>	124
4.5.5 <i>Hot Plate Test</i>	127
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	131
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	145
7. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	147
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	151
9. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ - ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ.....	169

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κασσίτερος

1.1.1 Ιδιότητες

Το χημικό στοιχείο Κασσίτερος (λατινικά: Stannum) είναι ένα μέταλλο με ατομικό αριθμό 50 και ατομικό βάρος 118.69. Το σύμβολό του είναι Sn. Έχει θερμοκρασία τήξης 231.9 C° και θερμοκρασία βρασμού 2270 C°. Δεν οξειδώνεται όταν παραμένει ελεύθερος στην ατμόσφαιρα και δεν προσβάλλεται εύκολα από χημικές ουσίες. Γι' αυτό χρησιμοποιείται για την επικάλυψη διάφορων μετάλλων, για να προφυλάσσονται αυτά από την οξείδωση και την καταστροφή. Η επεξεργασία αυτή των μετάλλων με τον κασσίτερο ονομάζεται επικασσιτέρωση (καλλάι). Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως είναι η χρήση τους ως αντιμυκητιακά, παρασιτοκτόνα, και γενικότερα εμποδίζουν την εξάπλωση των μικροοργανισμών.

Η ανακάλυψη των αντιπολλαπλασιαστικών και των αντικαρκινικών ιδιοτήτων της πλατίνας (cisplatin) και των παραγώγων της, έδωσε ώθηση στην έρευνα για πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές άλλων συμπλόκων μετάλλων, συχνά οργανομεταλλικών συμπλόκων, και πιο εξειδικευμένα σύμπλοκα με κασσίτερο (organotin(IV)) (Charalabopoulos et al. 2002; Pellerito and Nagy 2002; Gielen and Tiekink 2005; Xanthopoulou et al. 2008; Kyros et al. 2010). Επομένως, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον η έρευνα για ανάλογα σύμπλοκα του cisplatin ή σύμπλοκα με άλλα μέταλλα, όπως αυτά του κασσιτέρου, ικανά να προσφέρουν ένα πολύ ικανοποιητικό ποσοστό τοξικότητας σε σειρές καρκινικών κυττάρων και βελτιωμένη αντικαρκινική δράση σε καρκινοπαθή πειραματόζωα (Gielen 1995; Koch et al. 2008). Η βιολογική δραστηριότητα των οργανοκασσιτερικών συμπλόκων έχει αρχίσει να μελετάται αρκετά χρόνια πριν από τους

Gielen και Cookson και τους συνεργάτες τους (Bulten and Budding 1985; Cardarelli and Kanakkanatt 1987; Gielen 1994; Cookson et al. 1998).

1.1.2 Τοξικότητα συμπλόκων κασσιτέρου

Γενικότερα τα σύμπλοκα κασσιτέρου παρουσιάζουν τοξικότητα σε διάφορα επίπεδα και σε διαφορετικό βαθμό. Συγκεκριμένα τα τριαλκυλ- και τριαρυλ-παράγωγα εμφανίζουν ισχυρή τοξικότητα στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Αυτά μπορεί να προκαλέσουν ακόμη και παράλυση και να οδηγήσουν σε θάνατο (Maeda 1995). Επίσης όλα τα οργανοκασσιτερικά παράγωγα είναι ικανά να προκαλέσουν διαταραχή στην γαστρεντερική περιοχή ανάλογα με τη συγκέντρωση. Ο Davies et al. αναφέρει ότι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πειραματόζωα εμφάνισαν τοξικότητα και οξεία φαινόμενα δηλητηρίασης στον εγκέφαλο, το ήπαρ και τους νεφρούς (Davies et al. 1980).

Τα οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα και ιδιαίτερα αυτά με τρία φαινύλια, είναι επίσης γνωστό από μελέτες ότι παρουσιάζουν υψηλή τοξικότητα. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρήθηκε νευροτοξικότητα καθώς και νεφρική τοξικότητα σε ποντίκια και ανθρώπους (Ehman et al. 2007; Baken et al. 2007).

1.1.3 Αντικαρκινική δράση συμπλόκων κασσιτέρου

Κατανοώντας τον ρόλο των οργανοκασσιτερικών συμπλόκων στην κυτταροτοξικότητα και βάσει των αποτελεσμάτων πρόσφατα συντιθέμενων συμπλόκων του κασσιτέρου (organotin(IV) o- or p-hydroxybenzoates) (Abdellah et al. 2009), τα οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα παρουσιάζουν αξιόλογη κυτταροτοξική και αντικαρκινική δράση ανταγωνιζόμενα άλλα ευρέως χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Από τη μελέτη του Hadjikakou et al., ελέγχθηκαν σύμπλοκα του κασσιτέρου για την

κυτταροτοξική τους δράση. Το σύμπλοκο που περιείχε τρία φαινύλια (triphenyltin(IV)) βρέθηκε να είναι το πιο δραστικό (Hadjikakou et al. 2009). Επίσης έχουν βρεθεί δύο σύμπλοκα του κασσιτέρου (dibutyltin(IV) cyanoximates complexes) που παρουσίασαν ίδια, ακόμη και μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα σε σύγκριση με αυτήν της cisplatin σε καρκινικές σειρές HeLa (καρκίνου τραχήλου) και WiDR (καρκίνο παχέος εντέρου) (Gerasimchuk et al. 2007).

Ωστόσο, υπάρχουν ελάχιστα πρόσφατα αποτελέσματα που αφορούν τις αντικαρκινικές δράσεις των οργανοκασσιτερικών συμπλόκων έναντι καρκινοπαθών πειραματοζώων (Koch et al. 2009). Βάσει αυτών των μελετών, προκύπτουν δεδομένα που αναφέρεται η αξιολογή αντικαρκινική δράση αυτών των συμπλόκων καθώς και η παράταση επιβίωσης καρκινοπαθών πειραματόζωων (Barbieri et al. 2000).

Αν και η πλειοψηφία των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων που κυκλοφορούν σήμερα στο εμπόριο στοχεύουν σε πρόκληση βλαβών του DNA (Eastman 1990), ο ακριβής μηχανισμός δράσης της απόπτωσης δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πλήρως. Αρκετά οργανοκασσιτερικά παράγωγα είναι γνωστά ότι έχουν μια αποτελεσματική αντικαρκινική δράση, αλλά ο ακριβής μηχανισμός δράσης αυτών είναι ακόμη υπό έρευνα (Barbieri et al. 2001; Chasapis et al. 2004; Balas et al. 2008). Ο Barbieri et al. έχει βρει ότι κάποια σύμπλοκα του κασσιτέρου επάγουν τις κυτταροτοξικές τους δράσεις μέσω της οδού της απόπτωσης (Barbieri et al. 2001). Συνεχίζοντας στην ίδια μελέτη το σύμπλοκο triethyltin(IV) lupinylsulfide hydrochloride (IST-FS 29) βρέθηκε ότι επάγει την απόπτωση στην καρκινική κυτταρική σειρά HCT-8 (καρκίνος παχέος εντέρου) (Barbieri et al. 2001). Σε μια άλλη μελέτη αναφέρεται ότι τρία οργανοκασσιτερικά (Sn(IV)) σύμπλοκα με N(4)-phenyl-2-benzoylpyridine thiosemicarbazone (H₂Bz₄Ph) επέφεραν αποπτωτικό θάνατο σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις στα καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου μελανώματος UACC-62

αλλά όχι και στη κυτταρική σειρά ανθρώπινου καρκίνου του μαστού MCF-7 (Perez-Rebolledo et al. 2005).

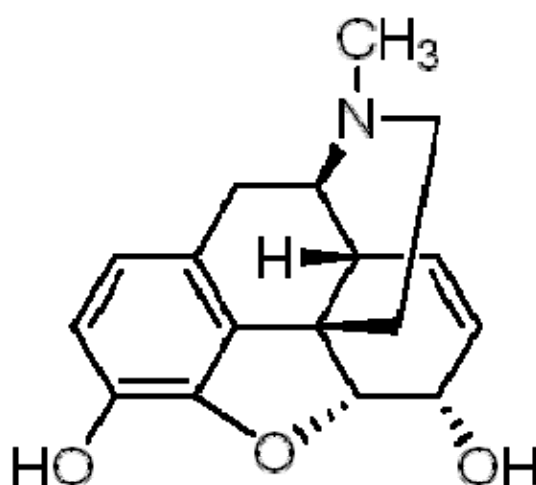
Στηριζόμενοι, στα δεδομένα των μελετών για την κυτταροτοξικότητα, την τοξικότητα και τις αντικαρκινικές δράσεις των οργανοκασσιτερικών συμπλόκων μελετήθηκε διεξοδικά το σύμπλοκο bis[triphenyltin(IV)](3-carboxy-pyridine-2-thionato) ή συντομογραφικά SnMNA. Το σύμπλοκο αυτό είχε ήδη συντεθεί και χαρακτηριστεί το 2003 (με στοιχειακή ανάλυση σημείο τήξεως, φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$, FT-IR, Uv-Vis and Mossbauer φωτομετρικές τεχνικές και κρυσταλλογραφία X-ray), ενώ είχε μελετηθεί σε πρώτη φάση για τις βασικές κυτταροτοξικές του ιδιότητες (Xanthopoulou et al. 2003a, Xanthopoulou et al. 2003b).

1.2 Αναλγησία-Μορφίνη

Η μορφίνη (morphine) είναι ένα ισχυρό αναλγητικό το οποίο χρησιμοποιούταν στη θεραπεία του σφοδρού πόνου για αιώνες (Σχήμα 1.1). Οι αναλγητικές επιδράσεις της μορφίνης είναι κυρίως μέσω των μ -υποδοχέων οι οποίοι κατανέμονται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα, συμπεριλαμβάνοντας τον νωτιαίο μυελό (Arvidsson et al. 1995; Hashimoto et al. 2006). Ωστόσο, η μορφίνη και άλλα αναλγητικά που δρουν κεντρικά μέσω των μ -υποδοχέων προκαλούν, εκτός από τις αναλγητικές τους επιδράσεις, ποικίλες παράπλευρες επιδράσεις όπως αναπνευστική καταστολή, αναστολή της γαστρεντερικής κινητικότητας, φυσική εξάρτηση και ανθεκτικότητα που μπορούν να μειώσουν τη χρήση τους στη θεραπεία του πόνου (Schiller 2005). Ο Yanwei et al., αναφέρει ότι το αλκαλοειδές oxymatrine (εκχύλισμα του κινέζικου βοτάνου - *Sophora japonica* L.) έχει τη δυνατότητα να προσαρμόζει την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη

μορφίνη χωρίς να επιδρά στα αναλγητικά αποτελέσματα της τελευταίας (Li Y et al. 2010). Έχει βρεθεί τελευταία ότι η χορήγηση μορφίνης, ως ισχυρό αναλγητικό, οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων κυττάρων γλοιοβλαστώματος T98G (Lazarczyk et al. 2010). Αντίθετα, υπάρχουν εργασίες που αναφέρουν ότι η χορήγηση υψηλών δόσεων μορφίνης αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές και επάγει τον κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο, ο μηχανισμός δεν είναι ακόμη γνωστός (Tegeder et al. 2003; Lin et al. 2009).

Η ναλοξόνη (naloxone) είναι ένας μικρής διάρκειας, μη-επιλεκτικός ανταγωνιστής υποδοχέα οπιούχων, η οποία έχει μεγάλη ιστορία στην κλινική χρήση οπιούχων σε εξαρτημένους ασθενείς, στη θεραπεία της αναπνευστικής καταστολής και ταχείας αποτοξίνωσης ύστερα από υπερδοσολογία οπιούχων και η οποία είναι ασφαλής σε ένα ευρύ φάσμα δόσεων (μέχρι 10 mg/kg ΣΒ) (van Dorp et al. 2007). Η *in vivo* αναλγητική επίδραση της μορφίνης όπως και άλλων οπιούχων, οι οποίες εξισορροπούνται από τις δράσεις της ναλοξόνης, μπορούν πειραματικά να υπολογιστούν είτε με το Tail Flick test ή με το Hot Plate test (Taracha et al. 2009; Minami et al. 2009).



Σχήμα 1.1. Χημική δομή μορφίνης

1.3 Ηλεκτρομαγνητικά πεδία

1.3.1 Ηλεκτρομαγνητικό πεδίο-ηλεκτρομαγνητικά κύματα

Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα αναφέρθηκαν ως αξίωμα για πρώτη φορά από τον James Clerk Maxwell και μετέπειτα επιβεβαιώθηκαν από τον Heinrich Hertz. Ο Maxwell παρήγαγε έναν ηλεκτρομαγνητικό τύπο από τις εξισώσεις του ηλεκτρικού και του μαγνητικού πεδίου, αποκαλύπτοντας την κυματική φύση τόσο των ηλεκτρικών όσο και μαγνητικών πεδίων, καθώς και τη συμμετρικότητά τους. Επειδή η ταχύτητα των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων προβλέπεται από την εξίσωση της κυματικής που συμπίπτει με τη μετρούμενη ταχύτητα του φωτός, ο Maxwell κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το ίδιο το φως είναι ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα.

Σύμφωνα με τις εξισώσεις του Maxwell, ένα χωρικά-μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο δημιουργεί ένα χρονικά-μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο και το αντίστροφο. Κατά συνέπεια, καθώς ένα ταλαντούμενο ηλεκτρικό πεδίο δημιουργεί ένα ταλαντούμενο μαγνητικό πεδίο, το μαγνητικό πεδίο με τη σειρά του δημιουργεί ένα ταλαντούμενο ηλεκτρικό πεδίο και ούτω καθεξής. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία είναι ένα εγκάρσιο κύμα με την έννοια ότι οι ταλαντώσεις των κυμάτων είναι κάθετες στην κατεύθυνση της μεταφοράς ενέργειας και της κίνησης (Σχήμα 1.2). Μια σημαντική πτυχή της φύσης του φωτός είναι η συχνότητα. Η συχνότητα ενός κύματος είναι ο ρυθμός ταλάντωσής του και μετριέται σε hertz, σύμφωνα με το διεθνές σύστημα μετρήσεων (SI), όπου ένα hertz είναι ίσο με μια ταλάντωση ανά δευτερόλεπτο. Διαφορετικές συχνότητες υφίστανται σε διαφορετικές γωνίες διαθλάσεως.

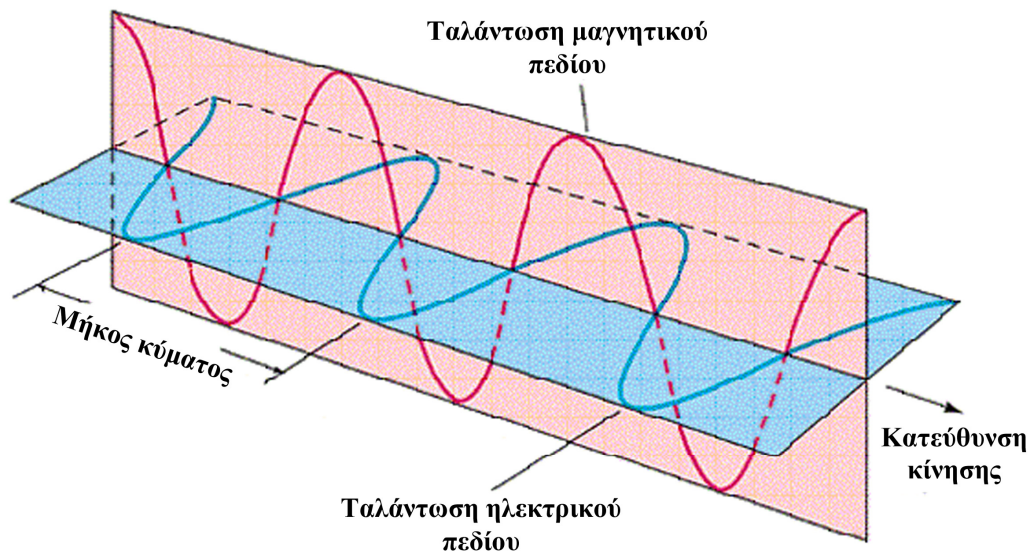
Ένα κύμα αποτελείται από διαδοχικές κορυφές (crests) και κατώτατα σημεία (troughs) και η απόσταση μεταξύ δύο γειτονικών κορυφών ή κατωτάτων σημείων ονομάζεται μήκος κύματος (wavelength) (Σχήμα 1.2). Τα κύματα του ηλεκτρομαγνητικού

φάσματος διαφέρουν πολύ σε μέγεθος. Για παράδειγμα, στα πολύ υψηλά ραδιοκύματα το μέγεθος του κύματος αντιστοιχεί με το μέγεθος ενός κτιρίου, ενώ στις πολύ χαμηλές ακτίνες γάμμα το μέγεθος είναι μικρότερο από τον πυρήνα ενός ατόμου. Η συχνότητα είναι αντιστρόφως ανάλογη του μήκους κύματος, σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$f = v / \lambda \quad (1)$$

όπου v είναι η ταχύτητα του κύματος, f είναι η συχνότητα και λ το μήκος κύματος.

Ένας κανόνας που ισχύει ανεξάρτητα από τις περιστάσεις: Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στο κενό ταξιδεύει πάντα με την ταχύτητα του φωτός ($c=299,792.458$ m/s), σε σχέση με τον παρατηρητή, ανεξάρτητα από την ταχύτητα του παρατηρητή (αυτή η παρατήρηση οδήγησε τον Albert Einstein να αναπτύξει τη θεωρία της σχετικότητας).



Σχήμα 1.2. Σχηματική απεικόνιση του ηλεκτρομαγνητικού κύματος στο χώρο.

Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα παράγονται από κινούμενα ηλεκτρικά φορτία. Δημιουργούνται επίσης όταν ένα ηλεκτρόνιο κάποιου ατόμου χάνει μέρος της ενέργειάς του και μεταπίπτει σε χαμηλότερη τροχιά ή ενεργειακή στάθμη κοντά στον πυρήνα. Αυτό έχει ως συνέπεια να δημιουργηθεί μια ταλάντωση που διαδίδεται πλέον στο χώρο με τη μορφή ενός ταυτόχρονα ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου.

Ανάλογα με τις καταστάσεις, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία πιθανόν να συμπεριφέρεται ως κύμα ή ως σωματίδια. Ως κύμα, χαρακτηρίζεται από μια ταχύτητα (την ταχύτητα του φωτός), από το μήκος κύματος και από μια συχνότητα. Όταν αυτό θεωρείται ως σωματίδια, που είναι γνωστά ως φωτόνια, καθένα από αυτά έχει μια ενέργεια σχετική με τη συχνότητα του κύματος.

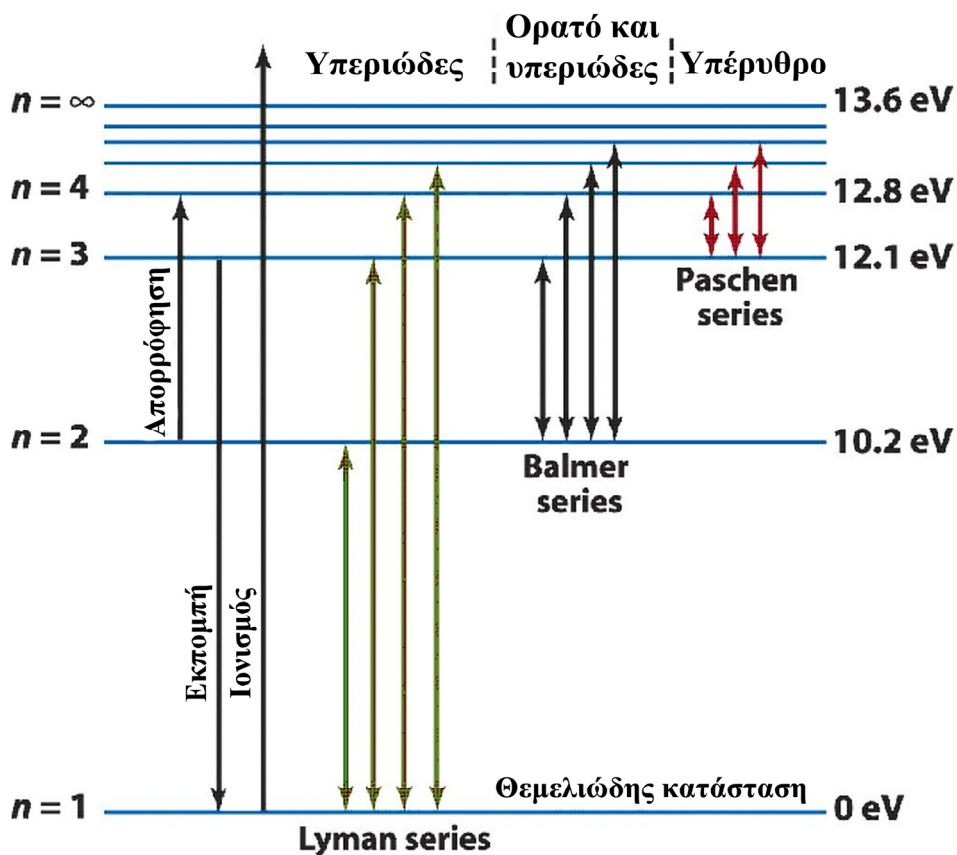
Επειδή η ενέργεια ενός ηλεκτρομαγνητικού πεδίου είναι κβαντισμένη, στο μοντέλο των σωματιδίων της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, ένα κύμα αποτελείται από πακέτα ενέργειας, ή κβάντα, που ονομάζονται φωτόνια (Weinberg 1995). Επειδή τα φωτόνια εκπέμπονται και απορροφώνται από φορτισμένα σωματίδια, αυτά δρουν ως μεταφορείς της ενέργειας. Η ενέργεια ανά φωτόνιο μπορεί να υπολογισθεί από την εξίσωση των Planck–Einstein:

$$E = h \cdot f \quad (2)$$

όπου E είναι η ενέργεια, h είναι η σταθερή του Planck ($h=6.626068 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg/s}$) και f η συχνότητα (Paul and Monk 2004). Συχνά η ενέργεια εκφράζεται σε ηλεκτρονιοβολτ (eV).

Καθώς ένα φωτόνιο απορροφάται από ένα άτομο, αυτό διεγείρει το άτομο, ανυψώνοντας ένα ηλεκτρόνιο σε μια υψηλότερη ενεργειακή στιβάδα (Σχήμα 1.3). Εάν αυτή η ενέργεια είναι υπερβολικά μεγάλη, έτσι ώστε το ηλεκτρόνιο να μεταβεί σε πολύ

υψηλότερη ενεργειακή στιβάδα, πιθανόν να διαφύγει την θετική έλξη που προκαλεί ο πυρήνας και να απελευθερωθεί από το άτομο με μια διαδικασία που ονομάζεται φωτοϊονισμός (Σχήμα 1.3). Αντιστρόφως, ένα ηλεκτρόνιο που πέφτει σε μια στιβάδα μικρότερης ενέργειας σε ένα άτομο εκπέμπει ένα φωτόνιο με ενέργεια ίση με τη διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο στιβάδων. Τα ενεργειακά επίπεδα των ηλεκτρονίων σε ένα άτομο είναι διακριτά, και έτσι κάθε στοιχείο εκπέμπει και απορροφά στις δικές του χαρακτηριστικές συχνότητες (Σχήμα 1.3).



Σχήμα 1.3. Σχηματική απεικόνιση των ενεργειακών στιβάδων και των τρόπων διέγερσης-αποδιέγερσης των ηλεκτρονίων.

Από κοινού, αυτά τα αποτελέσματα επεξηγούν την εκπομπή και την απορρόφηση των φασμάτων του φωτός. Οι σκουρόχρωμες περιοχές στο φάσμα της απορρόφησης εμφανίζονται λόγω του ότι τα άτομα που παρεμβαίνουν στο μέσο απορροφούν διαφορετικές συχνότητες φωτός. Η σύνθεση του μέσου στο οποίο το φως ταξιδεύει προσδιορίζει και την φύση του φάσματος απορρόφησης. Για παράδειγμα, οι σκουρόχρωμες περιοχές στο φως που εκπέμπεται από ένα μακρινό αστέρι οφείλονται σε άτομα στην ατμόσφαιρα του αστεριού. Αυτές οι περιοχές αντιστοιχούν στα επιτρεπτά ενεργειακά επίπεδα των ατόμων. Ένα παρόμοιο φαινόμενο συντελείται και στην εκπομπή. Καθώς τα ηλεκτρόνια κατεβαίνουν σε χαμηλότερες ενεργειακές στιβάδες, το φάσμα που εκπέμπεται αντιπροσωπεύει τις μεταβάσεις ανάμεσα στις ενεργειακές στιβάδες των ηλεκτρονίων. Αυτό εκδηλώνεται στο εκπεμπόμενο φάσμα των νεφελωμάτων. Σήμερα, οι επιστήμονες χρησιμοποιούν αυτό το φαινόμενο για να παρατηρήσουν από ποια στοιχεία αποτελούνται ορισμένα άστρα. Επίσης χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό της απόστασης των αστερών, χρησιμοποιώντας την μετατόπιση του κόκκινου χρώματος.

1.3.2 Συνοπτικά τα χαρακτηριστικά μεγέθη ηλεκτρομαγνητικών πεδίων

Τόσο το ηλεκτρικό όσο και το μαγνητικό κύμα προσδιορίζονται από μερικά χαρακτηριστικά:

- A) Το μήκος κύματος (λ), δηλαδή την απόσταση που το κάθε κύμα συμπληρώνει μια πλήρη εναλλαγή, σε μέτρα m.
- B) Τη συχνότητα (ν) δηλαδή τον αριθμό των πλήρων εναλλαγών ανά δευτερόλεπτο που μετράται σε Hertz (Hz).

Το μήκος κύματος (λ) και η συχνότητα (ν) ενός κύματος συνδέονται με την ταχύτητα του φωτός στο κενό ($c \approx 300.000 \text{ km/sec}$) με την εξίσωση 1. Για παράδειγμα η

συχνότητα (ν) του συνήθους ηλεκτρικού ρεύματος του δικτύου της ΔΕΗ είναι 50 εναλλαγές ή κύκλοι ανά δευτερόλεπτο ή 50 Hz ενώ το μήκος κύματος (λ) είναι 6.000 χλμ (Km).

Άλλα χαρακτηριστικά μεγέθη των Ηλεκτρομαγνητικών πεδίων είναι:

- Η ηλεκτρική τάση σε volts ή V.
- Η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος I σε Amperes ή A.
- Η πυκνότητα έντασης του ηλεκτρικού ρεύματος σε A/m^2 (amperes ανά τετραγωνικό μέτρο)
- Η ένταση του Ηλεκτρικού Πεδίου E σε V/m^2
- Η ένταση του Μαγνητικού Πεδίου H σε Ampere/m ή A/m
- Η ένταση του Μαγνητικού Πεδίου B σε: α) Gauss, G ή β) Tesla, T που σχετίζονται με την εξίσωση μετατροπής $1T = 10.000 G$ και $1 G = 80 A/m$.
- Η ισχύς N σε Watt (W)
- Η πυκνότητα ισχύος P ή S σε $/m^2$.

1.3.3 Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα ονομάζεται το εύρος της περιοχής συχνοτήτων που καλύπτουν τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα. Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα εκτείνεται θεωρητικά από σχεδόν μηδενικές συχνότητες έως το άπειρο. Με βάση κάποιες χαρακτηριστικές ιδιότητες των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων (ένταση και μήκος κύματος) το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα χωρίζεται σε επιμέρους ζώνες. Αυτές είναι τα ραδιοκύματα, τα μικροκύματα, η υπέρυθρη ακτινοβολία, η ορατή ακτινοβολία (φως), η υπεριώδης ακτινοβολία, οι ακτίνες X και οι ακτίνες γ. Ακολουθεί μια μικρή ανάλυση για την κάθε περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος:

Ραδιοκύματα

Τα ραδιοκύματα είναι ηλεκτρομαγνητικά κύματα χαμηλών σχετικά συχνοτήτων. Καλύπτουν περιοχή συχνοτήτων 0-300MHz. Η ενέργεια των φωτονίων τους είναι πολύ χαμηλή και φτάνει μέχρι τα 10^{-5} eV. Παράγονται από κεραίες και χρησιμοποιούνται ευρύτατα στις τηλεπικοινωνίες. Χωρίζονται σε επιμέρους κατηγορίες με βάση την συχνότητα τους ή ισοδύναμα με βάση το μήκος κύματός τους. Η χαμηλότερη ζώνη συχνοτήτων των ραδιοκυμάτων είναι η περιοχή των βιομηχανικών κυμάτων και η υψηλότερη ζώνη είναι η περιοχή των υπερβραχέων.

Μικροκύματα

Τα μικροκύματα θεωρούνται και αυτά τμήμα των ραδιοκυμάτων λόγω του ότι παράγονται από κεραίες και έχουν πλήθος εφαρμογών στις τηλεπικοινωνίες. Παρουσιάζουν όμως και διαφορετικές ιδιότητες σε σχέση με τα υπόλοιπα ραδιοκύματα, λόγω της υψηλότερης ενέργειας των φωτονίων τους. Τα μικροκύματα καλύπτουν περιοχή συχνοτήτων από 300MHz -300GHz και η ενέργεια των φωτονίων τους κυμαίνεται από 10^{-5} - 10^{-3} eV. Χωρίζονται και αυτά σε τρεις επιμέρους ζώνες. Την ζώνη των δεκατομετρικών μικροκυμάτων ή UHF, στην ζώνη των εκατοστομετρικών μικροκυμάτων ή SHF και στην ζώνη των χιλιοστομετρικών μικροκυμάτων EHF

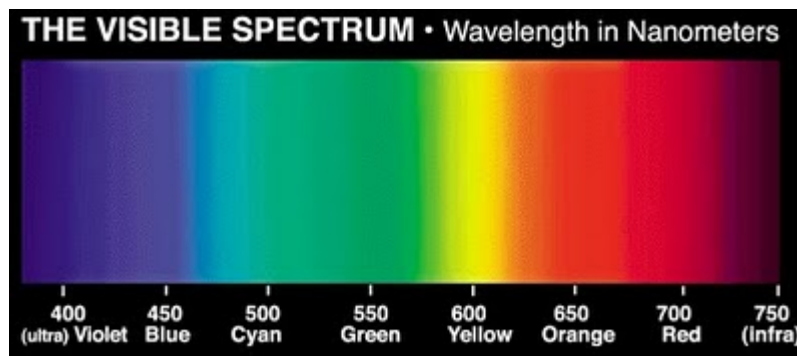
Υπέρυθρη ακτινοβολία

Η υπέρυθρη ακτινοβολία καλύπτει ζώνη συχνοτήτων από 300GHz - 400THz και η ενέργεια των φωτονίων της είναι από 10^{-3} – 1.6eV. Υπέρυθρη ακτινοβολία εκπέμπουν όλα τα σώματα λόγω θερμότητας. Βρίσκει πολλές εφαρμογές στην τεχνολογία. Οι υπέρυθρες ακτίνες χρησιμοποιούνται στα οπτικά ηλεκτρονικά μέσα όπως τα CD player, στις ηλεκτρονικές επικοινωνίες με οπτικές ίνες αλλά και με ασύρματη εκπομπή υπέρυθρων.

Πολύ σημαντική εφαρμογή έχει η υπέρυθη φωτογραφία που βρίσκει εφαρμογές στην αρχαιολογία, τη γεωργία, την οικολογία, τη δασοπονία και τη γεωλογία.

Ορατό φώς

Η ζώνη του ορατού φωτός είναι μία στενή ζώνη του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, στην οποία είναι ευαίσθητο το αισθητήριο της όρασης των ζωντανών οργανισμών καλύπτει περιοχή συχνοτήτων 400-800MHz και η ενέργεια των φωτονίων κυμαίνεται από 1.6 – 3.2 eV. Το ορατό φάσμα χωρίζεται σε επιμέρους ζώνες τις οποίες το ανθρώπινο μάτι τις αντιλαμβάνεται ως διαφορετικά χρώματα.



Υπεριώδης ακτινοβολία

Η Υπεριώδης ακτινοβολία καλύπτει την περιοχή συχνοτήτων από 800THz – 3×10^{17} Hz και η ενέργεια των φωτονίων της είναι μεταξύ 3eV - 2000eV. Εκπέμπεται από εξαιρετικά θερμά σώματα όπως τα άστρα. Η υπεριώδης είναι ακτινοβολία υψηλής ενέργειας και αρκετά επιβλαβής για τους ζωντανούς ιστούς.

Ακτινοβολία X

Η ακτινοβολία X εκτείνεται από 3×10^{17} Hz – 5×10^{19} Hz και η ενέργεια των φωτονίων της είναι 1200 eV – 2.4×10^5 eV. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος παραγωγής ακτίνων X είναι μέσω της επιτάχυνσης ηλεκτρονίων από δυναμικό τάξης μεγέθους των δεκάδων χιλιάδων βολτ και πρόσπτωσή τους σε στόχο ο οποίος αποτελείται από μεταλλικό υλικό μεγάλου ατομικού αριθμού.

Ακτινοβολία γ

Η ακτινοβολία γ είναι ακτινοβολία εξαιρετικά υψηλής συχνότητας που κυμαίνεται από 5×10^{19} Hz – 3×10^{22} Hz. Οι ενέργειες των φωτονίων της είναι πολύ υψηλές και κυμαίνονται 10^5 eV - 10^7 eV. Λόγω της υψηλής ενέργειας προκαλούν Οι ακτίνες γ παράγονται από ραδιενεργούς πυρήνες και από αστέρια στο διάστημα

Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και ατμόσφαιρα

Το σύμπαν είναι διάχυτο από ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Το φως που εκπέμπεται από τα άστρα είναι μέρος του συνολικού φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που συναντάται στο σύμπαν. Η ατμόσφαιρα της γης λειτουργεί σαν προστατευτική ασπίδα για τις επικίνδυνες ακτινοβολίες πολύ υψηλής συχνότητας. Η ατμόσφαιρα απορροφά το μεγαλύτερο μέρος των κοσμικών ακτίνων αλλά και της υπεριώδους ακτινοβολίας. Αντίθετα επιτρέπει πλήρως την διέλευση των ραδιοκυμάτων υψηλής συχνότητας, των μικροκυμάτων χαμηλότερης συχνότητας, του φωτός και ενός τμήματος της υπέρυθρης ακτινοβολίας. Τα ραδιοκύματα χαμηλών συχνοτήτων ανακλώνται σ' ένα μεγάλο ποσοστό στο ατμοσφαιρικό στρώμα της ιονόσφαιρας.

1.3.4 Θερμική ακτινοβολία και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ως μια μορφή θερμότητας

Όταν η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία προσπέσει στην ύλη, αναγκάζει τα φορτισμένα σωματίδια να αυξήσουν το πλάτος της ταλάντωσης και να αποκτήσουν ενέργεια. Η κατάληξη αυτής της ενέργειας εξαρτάται από την κατάσταση. Θα μπορούσε να επανα-ακτινοβοληθεί αμέσως και να εμφανιστεί ως σκεδασμένη, ανακλώμενη, ή εκπεμπόμενη ακτινοβολία. Μπορεί επίσης να διαχυθεί με άλλες μικροσκοπικές κινήσεις εντός της ύλης, να έρθει σε θερμική ισορροπία και να εκδηλωθεί ως θερμική ενέργεια στην ύλη. Εκτός από λίγες εξαιρέσεις, όπως του φθορισμού, τις φωτοχημικές αντιδράσεις και το φωτοβολταϊκό φαινόμενο, η απορροφούμενη ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αποδίδει μέρος της ενέργειάς της στη θέρμανση της ύλης. Αυτό συμβαίνει τόσο για την υπέρυθρες όσο και για τις μη-υπέρυθρες ακτινοβολίες (στην περιοχή των ραδιοφωνικών συχνοτήτων και των μικροκυμάτων). Η ionίζουσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μπορεί να δημιουργήσει υψηλής ταχύτητας ηλεκτρόνια σε ένα υλικό και να διασπάσει τους χημικούς δεσμούς, αλλά έπειτα από αυτές τις συγκρούσεις των ηλεκτρονίων με άλλα άτομα στο υλικό, τελικά το μεγαλύτερο ποσοστό ενέργειας υποβαθμίζεται (μετατρέπεται) σε θερμική ενέργεια. Όλη αυτή η διαδικασία συμβαίνει σε κλάσματα του δευτερολέπτου. Οποιαδήποτε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μπορεί να θερμάνει ένα υλικό όταν απορροφηθεί.

Η αντίστροφη ή η χρονικά-ανεστραμμένη διαδικασία της απορρόφησης είναι υπεύθυνη για τη θερμική ακτινοβολία. Το μεγαλύτερο ποσοστό θερμικής ενέργειας στην ύλη αποτελείται από τυχαίες κινήσεις φορτισμένων σωματιδίων, και αυτή η ενέργεια μπορεί να εκπεμφθεί μακριά από το υλικό. Η απορρέουσα ακτινοβολία πιθανόν με τη σειρά της να απορροφηθεί από ένα άλλο κομμάτι του υλικού, με την αποθηκευμένη

ενέργεια να θερμαίνει το υλικό. Η ακτινοβολία είναι ένας σημαντικός μηχανισμός μεταφοράς ενέργειας.

Αυτές οι αυξήσεις της θερμοκρασίας, μέσω της μεταφοράς ενέργειας, που προκαλούνται από τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία συγκεκριμένων συχνοτήτων (και ενεργειών) μπορεί να οδηγήσουν σε βλάβες στο υλικό που συντελούνται.

Είναι προφανές ότι τα πεδία της κινητής τηλεφωνίας (συσκευές, σταθμοί, κεραιές) μπορεί να έχουν τόσο θερμικές όσο και αθερμικές επιδράσεις (ισχύς πεδίων κινητής τηλεφωνίας $1 - 2 \text{ W/cm}^2$). Οι θερμικές βλάβες προκαλούνται από την άνοδο της θερμοκρασίας στους ιστούς, υπερβαίνοντας την θερμορυθμιστική ικανότητα του οργανισμού ή του ιστού. (Graham 1998).

Η θερμική δράση των πεδίων της κινητής τηλεφωνίας οφείλεται στο γεγονός ότι η ακτινοβολία τους θέτει σε εξαναγκασμένη ταλάντωση τα ηλεκτρικά δίπολα των μορίων του νερού των ιστών με αποτέλεσμα η ακτινοβολούμενη ενέργεια να αποδίδεται τοπικά ως θερμότητα, η οποία αυξάνει τοπικά τη θερμοκρασία του ιστού. Ο εγκέφαλος, το ήπαρ, οι όρχεις, τα σπλάχνα οι ιστοί των οποίων απορροφούν εκλεκτικά την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία είναι τα πιο ευαίσθητα όργανα.

1.3.5 Ηλεκτρομαγνητικά πεδία και έρευνα

Οι ιδιότητες των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων και ερευνητών τις τελευταίες τρεις δεκαετίες. Η επίδραση των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων στα βιολογικά συστήματα έχουν αποδειχθεί μέσω ενός μεγάλου αριθμού μελετών (Aaron and Ciombor 1993; Walker et al. 1994; Tao and Henderson 1999; Tofani et al. 2002). Ένα μεγάλο στοίχημα στην έρευνα είναι να αποδειχθεί ότι η έκθεση ηλεκτρομαγνητικών πεδίων χαμηλών συχνοτήτων μπορεί να

προκαλέσει αλλαγές στα ζώντα συστήματα. Αυτές οι αλλαγές αναφέρονται στη μεταβολή του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αλλαγές στα επίπεδα mRNA και πρωτεϊνικής σύνθεσης, αλλαγές στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και στη μεταφορά ιόντων Ca^{2+} , Na^+ και K^+ . Όλα τα παραπάνω οδηγούν σε αλλαγές στην ηλεκτρική και μεταβολική συμπεριφορά των κυττάρων, επηρεάζουν τη διαφοροποίηση των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων και αλλάζουν τον ρυθμό απόπτωσης τόσο των φυσιολογικών όσο και των νεοπλασματικών κυττάρων (Walker et al. 1994; Han et al. 1998; Tao et al. 1999; Islamov et al. 2002; Tofani et al. 2002; Stronati et al. 2004). Υπάρχουν σχετικές μελέτες που υποδεικνύουν ότι τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία λειτουργούν ως παράγοντες προώθησης της καρκινογένεσης, έπειτα από προ-χορήγηση benzo[a]pyrene (Simko et al. 2001), ενώ άλλες μελέτες δείχνουν ότι τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν σημαντικά την ανάπτυξη όγκων σε αθυμικά ποντίκια και σε άλλα μοντέλα με νεοπλασματικές ασθένειες (Tofani et al. 2001; Tofani et al. 2002).

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο Εργαστήριο Φυσιολογίας υποδεικνύουν ότι τα παλμικά ηλεκτρομαγνητικά πεδία επιταχύνουν στατιστικά σημαντικά τον ρυθμό επούλωσης και βελτιώνουν την διαδικασία επούλωσης δευτέρου βαθμού δερματικής πληγής σε επίμυες Wistar (Athanasίου et al. 2007), ενώ ηλεκτρομαγνητικά πεδία συντονισμού (συγκεκριμένων συχνοτήτων) επιμηκύνουν στατιστικά σημαντικά το χρόνο επιβίωσης και μειώνουν τον ρυθμό ανάπτυξης όγκου στην ομάδα πειράματος, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Avdikos et al. 2007).

1.4 Φαινόμενο συντονισμού

Συντονισμός στην κυματική ονομάζεται η ταύτιση της συχνότητας του διεγέρτη με την ιδιοσυχνότητα του ταλαντωτή. Κάθε ταλαντωτής μπορεί να ταλαντώνεται σε μία ή περισσότερες συχνότητες. Όταν το σύστημα διεγείρεται στιγμιαία, τότε αρχίζει η ταλάντωση, η οποία συμβαίνει με τη συχνότητα που ταυτίζεται με την ιδιοσυχνότητά του. Οι συχνότητες αυτές είναι γνωστές ως οι συχνότητες συντονισμού του συστήματος. Σε αυτές τις συχνότητες ακόμη και μικρές καθοδηγούμενες δυνάμεις μπορούν να παράγουν ταλαντώσεις μεγάλου πλάτους, επειδή το σύστημα αποθηκεύει την ενέργεια δόνησης.

Οι συντονισμοί συμβαίνουν όταν ένα σύστημα είναι ικανό να αποθηκεύσει και στη συνέχεια να μεταφέρει εύκολα την ενέργεια μεταξύ δύο ή περισσότερων καταστάσεων αποθήκευσης (όπως κινητική ενέργεια και δυναμική ενέργεια στην περίπτωση του εκκρεμούς). Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες απώλειες από κύκλο σε κύκλο, που ονομάζονται αποσβέσεις. Όταν η απόσβεση είναι μικρή, η συχνότητα συντονισμού είναι περίπου ίση με τη φυσική συχνότητα του συστήματος, η οποία είναι μια συχνότητα μη εξαναγκασμένων δονήσεων (unforced vibrations). Ορισμένα συστήματα έχουν πολλαπλές, διακριτές συχνότητες συντονισμού.

Τα φαινόμενα συντονισμού συντελούνται σε όλους τους τύπους δονήσεων ή κυμάτων. Υπάρχει ο μηχανικός συντονισμός, ο ακουστικός συντονισμός, ο ηλεκτρομαγνητικός συντονισμός, ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR), ο ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός (EPR) και ο συντονισμός των κβαντικών κυμάτων. Τα συστήματα συντονισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να δημιουργήσουμε δονήσεις από μια συγκεκριμένη συχνότητα (π.χ. μουσικό όργανο), ή να ξεχωρίσουμε συγκεκριμένες συχνότητες από ένα σύνολο δονήσεων που περιέχουν πολλές

συχνότητες. Ο συντονισμός αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1602 από τον Γαλιλαίο (Galileo Galilei) από τις έρευνές του στο εκκρεμές και στα μουσικά έγχορδα (Drake et al. 1999; Frova and Marenzana 2006).

1.5 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Nuclear magnetic resonance-NMR) είναι η μαγνητική ιδιότητα που έχει ένας πυρήνας όταν βρίσκεται σε ένα μαγνητικό πεδίο ή σε ένα ηλεκτρομαγνητικό παλμό ή παλμούς, να απορροφήσει ενέργεια από τον ηλεκτρομαγνητικό παλμό, την οποία εκπέμπει ξανά πίσω. Η ενέργεια που εκπέμπεται πίσω είναι συγκεκριμένης συχνότητας συντονισμού η οποία εξαρτάται από την ένταση του μαγνητικού πεδίου και άλλου παράγοντα. Αυτό επιτρέπει στην παρατήρηση των κβαντομηχανικά μαγνητικών ιδιοτήτων του ατομικού πυρήνα.

Η φασματοσκοπία NMR, είναι η τεχνική που εκμεταλλεύεται τις μαγνητικές ιδιότητες ενός καθορισμένου πυρήνα. Οι πιο σημαντικές εφαρμογές για την οργανική χημεία είναι η φασματοσκοπία του ^1H -NMR και του ^{13}C -NMR. Η ανάλυση του φάσματος NMR φάσματος μιας ουσίας, ενός διαμαγνητικού συμπλόκου κ.ά., μας παρέχει πληροφορίες για τον αριθμό των ατόμων και το χημικό τύπο σε ένα μόριο. Η επίδραση της φασματοσκοπίας NMR στις φυσικές επιστήμες είναι μεγάλη και ουσιώδης. Μπορεί, μεταξύ των άλλων να χρησιμοποιηθεί για να κατανοήσουμε τις δυναμικές επιδράσεις, όπως αλλαγές στη θερμοκρασία και στους μηχανισμούς αντίδρασης, και επίσης θεωρείται ένα ανεκτίμητο εργαλείο για να κατανοήσουμε τις δομές και τις λειτουργίες των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων. Μπορεί να εφαρμοστεί σε μια ευρεία γκάμα

δειγμάτων, τόσο σε στερεή όσο και σε υγρή κατάσταση. Όπως αναφέραμε πριν ο πυρήνας εκπέμπει μια συγκεκριμένη συχνότητα συντονισμού όταν διεγερθεί κατάλληλα από ένα μαγνητικό πεδίο. Η συχνότητα συντονισμού, η ενέργεια της απορρόφησης και η ένταση του σήματος είναι ανάλογα της έντασης του μαγνητικού πεδίου που εφαρμόστηκε.

Αναλόγως του τοπικού χημικού περιβάλλοντος, μέσα σε ένα μόριο διαφορετικά πρωτόνια συντονίζονται σε ελάχιστα διαφορετικές συχνότητες. Επειδή τόσο η μετατόπιση συχνότητας όσο και η θεμελιώδης συχνότητα συντονισμού είναι ευθέως ανάλογες της έντασης του μαγνητικού πεδίου, η μετατόπιση μετατρέπεται σε μια αδιάστατη τιμή ανεξάρτητη του πεδίου γνωστή ως χημική μετατόπιση. Η χημική μετατόπιση αναφέρεται ως μια σχετική μέτρηση ως προς κάποιες συχνότητες συντονισμού αναφοράς και ορίζεται ως η διαφορά της συχνότητας του σήματος και της συχνότητας αναφοράς διαιρούμενη με τη συχνότητα του σήματος αναφοράς. Επίσης, εκφράζεται σε μέρη ανά εκατομμύριο (ppm) (Rabi et al. 1992).

Η εφαρμογή του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού είναι γνωστή στο ευρύτερο κοινό ως μαγνητική τομογραφία για την ιατρική διάγνωση και ως μικροσκοπία μαγνητικού συντονισμού για τα ερευνητικά δεδομένα. Επίσης μπορούν να ληφθούν βιοχημικές πληροφορίες από ζωντανούς ιστούς (π.χ. ανθρώπινους όγκους εγκεφάλου) με μια τεχνική γνωστή ως *in vivo* φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού ή NMR μικροσκοπία χημικής μετατόπισης. Επιπλέον, το NMR χρησιμοποιείται για να δημιουργήσει μεταβολικά αποτυπώματα από βιολογικά υγρά ώστε να ληφθούν οι πληροφορίες για την κατάσταση μιας ασθένειας.

Μια άλλη τεχνική είναι η φασματοσκοπία υπερώθρου (Infrared Spectroscopy-IR). Η φασματοσκοπία IR (Iconomidou et al. 2001) είναι φασματοσκοπία ταλάντωσης. Τα φάσματα IR δίνουν λεπτομερείς πληροφορίες για τις μοριακές ταλαντώσεις, προσφέροντάς μας πληροφορίες για την ταυτότητα των λειτουργικών ομάδων.

1.6 Επιδράσεις ηλεκτρομαγνητικών πεδίων - ασθένειες

Μια σημαντική υπόθεση των παρενεργειών από την έκθεση σε μη ιοντιζόμενα ηλεκτρομαγνητικά πεδία είναι η πρόκληση καρκίνου. Δεδομένου ότι η πλειοψηφία των καρκίνων αρχίζουν από βλάβη στο γονιδίωμα ενός κυττάρου, πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για να διερευνηθούν οι επιπτώσεις των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων στο DNA και τις χρωμοσωμικές δομές. Επιπλέον, οι βλάβες στο DNA μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές των κυτταρικών λειτουργιών και στον κυτταρικό θάνατο. Η τεχνική «comet assay», έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην έρευνα των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων για τον προσδιορισμό της βλάβης του DNA, η οποία εκφράζεται ως μονόκλινα θραύσματα (single-strand breaks), δίκλινα θραύσματα (double-strand breaks), και διασταυρούμενες ενώσεις. Μελέτες έχουν επίσης πραγματοποιηθεί για τη διερεύνηση των αλλαγών στη διαμόρφωση των χρωμοσωμάτων σε κύτταρα μετά από έκθεση τους σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία.

1.6.1 Βλάβη στο DNA

Το DNA καταστρέφεται συχνά από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες και στη συνέχεια επιδιορθώνεται από τα επιδιορθωτικά ένζυμα (π.χ. DNA polymerase). Οποιαδήποτε ανισορροπία στη ζημιά και επιδιόρθωση αυτής και στα λάθη κατά την επιδιόρθωση οδηγεί στη συσσώρευση κατεστραμμένου DNA. Τελικά, αυτό θα οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο, σε γήρανση ή σε καρκίνο. Υπάρχουν αρκετοί τύποι πρόκλησης βλάβης στο DNA. Ένας από αυτούς είναι μονόκλινα ή δίκλινα θραύσματα (single or double-strand breaks). Γενικότερα τα θραύσματα των αλυσίδων του DNA έχουν συσχετιστεί με τον κυτταρικό θάνατο (Ward 1990; Walker et al. 1991; Onishi et al. 1993;

Prigent et al. 1993; Schindowski et al. 2000), τη γήρανση (Hart et al. 1974; Lieber 1998; Li H. et al. 2008) και τον καρκίνο (Cerutti 1985; Ames 1989; Helleday et al. 2007).

1.6.2 Επιδράσεις από την έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία υψηλών συχνοτήτων - χρήση κινητών τηλεφώνων

Υπάρχει πληθώρα μελετών που σχετίζουν την έκθεση κυττάρων, πειραματοζώων και ανθρώπων σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία υψηλών συχνοτήτων (π.χ. αυτά που χρησιμοποιούνται στην κινητή τηλεφωνία) με πρόκληση βλάβης στο DNA. Ο Diem et al., αναφέρει ότι η έκθεση ανθρώπινων ινοβλαστών και κοκκιωδών κυττάρων ποντικού σε σήμα κινητού τηλεφώνου (1800 MHz, SAR 1.2 ή 2W/kg, διαφορετικές διαμορφώσεις, για 4, 16 και 24ώρες, διακεκομμένη έκθεση 5λεπτά ναι/10 λεπτά όχι ή συνεχόμενη) προκάλεσε μονόκλινα ή δίκλινα θραύσματα DNA. Οι επιδράσεις αυτές επιτεύχθηκαν έπειτα από 16 ώρες έκθεσης σε διαφορετικές διαμορφώσεις του κινητού τηλεφώνου και στους δύο κυτταρικούς τύπους (Diem et al. 2005). Η διακεκομμένη έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία προκάλεσε στατιστικά μεγαλύτερη επίδραση σε σύγκριση με τη συνεχόμενη έκθεση. Οι Gandhi and Anita αναφέρουν ότι παρατηρήθηκαν αυξήσεις στα θραύσματα αλυσίδων του DNA και μικροπυρήνωση στα λεμφοκύτταρα στους χρήστες κινητών τηλεφώνων (Gandhi et al. 2005). Ο Zhang et al., αναφέρει ότι το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο των 1800 MHz στα 3W/kg προκάλεσε βλάβη στο DNA των κυττάρων του πνεύμονα σε κινέζικα χάμστερ έπειτα από 24 ώρες έκθεσης (Zhang et al. 2006), ενώ ο Aitken et al., παρουσιάζει την έκθεση ποντικών σε ηλεκτρομαγνητικό πεδίο ραδιοφωνικών συχνοτήτων 900 MHz με τιμή SAR 0.09W/kg για 12 ώρες/ημέρα για 7 συνεχόμενες ημέρες όπου παρατηρήθηκε βλάβη στο ουριαίο τμήμα της επιδιδυμίδας των σπερματοζωαρίων (Aitken et al. 2005). Υπάρχουν μελέτες στις οποίες αναφέρεται ότι η

έκθεση κυττάρων ή πειραματοζώων σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία υψηλών συχνοτήτων (1.7 GHz, 1.8GHz, 2.45GHz και κυμαινόμενες τιμές SAR) προκαλούν βλάβες στη μία ή και στις δύο έλικες του DNA (Phillips et al. 1998; Nikolova et al. 2005; Sun et al. 2006), αλλαγές στη μορφολογία και στο γονιδίωμα των σπερματικών κυττάρων καθώς και αυξημένη θνησιμότητα αυτών (Sarkar et al. 1994; Eroglu et al. 2006), ορμονικές αλλαγές (Forgacs et al. 2006; Ozguner et al. 2005) καθώς και επίδραση στη διαμόρφωση της χρωματίνης (Markova et al. 2005). Η έκθεση κυττάρων σε μικροκύματα προκάλεσε ενεργοποίηση πλήθους κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών, μεταξύ των οποίων και του hsp27/p38MAPK, μονοπατιού αντίδρασης στο στρες (Leszczynski et al. 2002). Σε σχετικά πρόσφατες εργασίες, Σκανδιναβοί επιστήμονες προσδιόρισαν ένα αυξημένο κίνδυνο για την δημιουργία ακουστικού νευρινώματος (καλοήθης όγκος στο 8^ο κρανιακό νεύρο) στους χρήστες κινητού τηλεφώνου, όπως επίσης και μια ήπια αύξηση του κινδύνου για κακοήθεις όγκους εγκεφάλου, όπως αστροκύτωμα και μηνιγγίωμα στην πλευρά του εγκεφάλου που γίνεται χρήση του κινητού (Hardell et al. 1999; Hardell et al. 2005; Lonn et al. 2004). Τέλος, η έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία υψηλών συχνοτήτων μείωσε την παραγωγή της IL-2 και της INF-gamma στα περιφερειακά μονοκύτταρα ερυθρά κύτταρα (Boscol et al. 2001), προκάλεσε σημαντική αύξηση στην παραγωγή του TNF των μακροφάγων του περιτόναιου (Fesenko et al. 1999) και επηρέασε την έκφραση πολλών πρωτεϊνών (p38, ERK κ.ά.) (Friedman et al. 2007).

Εκτός από τις μελέτες που αναφέρουν όλες τις αρνητικές συνέπειες από την έκθεση πειραματοζώων και κυτταρικών σειρών στις συχνότητες λειτουργίας των κινητών τηλεφώνων υπάρχουν και αντίστοιχες μελέτες που αναφέρουν ότι δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή ή επίδραση ή βλάβη στο DNA. Συγκεκριμένα, μελέτες του Roti Roti και των συνεργατών που αφορούσαν την έκθεση κυττάρων και πειραματοζώων σε ραδιοφωνικές συχνότητες δεν ανέφεραν καμία βλάβη στο DNA (Malyapa et al. 1997;

Malyapa et al. 1998; Roti Roti et al. 2001). Πρέπει να αναφερθεί ότι η μελέτη του Roti Roti χρηματοδοτήθηκε από την εταιρεία Motorola. Παρόμοιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί, στις οποίες η έκθεση ινοβλαστών ποντικού C3H10T1/2 (Li L. et al. 2001), κυττάρων Molt-4 (Hook et al. 2004), ανθρώπινων λεμφοκυττάρων (Vijayalaxmi et al. 2000; Tice et al. 2002; McNamee et al. 2003; Zeni et al. 2005), λεμφοκυττάρων ποντικού (Gatta et al. 2003), γλοιοβλαστώματος A172 ανθρώπου (Sakuma et al. 2006), ανθρώπινων αιμοκυττάρων (Stronati et al. 2006) και ποντικών (Verschaeve et al. 2006) δεν παρουσίασαν σημαντική αύξηση στη βλάβη του DNA. Επίσης ο Tuschl et al. αναφέρει ότι τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία από τη χρήση των κινητών τηλεφώνων δεν παρουσίασαν καμία σημαντική επίδραση σε κύτταρα του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος (Tuschl et al. 2006).

1.6.3 Έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία πολύ χαμηλών συχνοτήτων (ELF EMF)

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που αναφέρουν ότι η έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία πολύ χαμηλών συχνοτήτων (ELF EMF), όπως τα 50 και 60Hz, θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε γενικότερη βλάβη του DNA, αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, επίδραση στη σύνθεση του μιτοχονδριακού DNA και χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Zmyslony et al. 2000; Jajte et al. 2001; Ivancsits et al. 2002; Schmitz et al. 2004; Winker et al. 2005; Wolf et al. 2005; Yokus et al. 2005), μείωση της δραστηριότητας των NK κυττάρων (Gobba et al. 2009), διαφοροποίηση των HL-60 κυττάρων (Tao et al. 1999) όπως επίσης υπάρχουν και αρκετές εργασίες που συνδέουν την παιδική λευχαιμία με χαμηλής έντασης ηλεκτρομαγνητικά πεδία, όπως αυτά των ηλεκτροφόρων καλωδίων (London et al. 1991; Kheifets et al. 1995; Greenland et al. 2000).

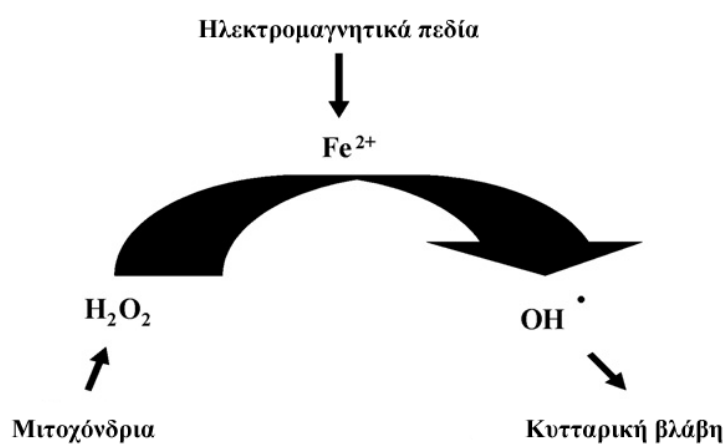
Υπάρχουν δύο εργασίες που παρουσιάζουν ότι η έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία πολύ χαμηλών συχνοτήτων λειτουργεί ως μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA (Chow et al. 2000; Robison et al. 2002). Παρόμοιες εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί, όπου αναφέρεται η διαφοροποίηση κυττάρων που ομοιάζουν με οστεοβλάστες καθώς και θεραπεία οστικών συνδρόμων (Bassette et al. 1982; Grace et al. 1998; Wei et al. 2008) και πολύ χαμηλής συχνότητας μαγνητικά πεδία προκαλούν στατιστικά σημαντική μείωση στην ανάπτυξη όγκων, αύξηση της απόπτωσης των εκτιθέμενων κυττάρων, σημαντική μείωση της p53 και της αμινοτρανσφεράση της αλανίνης (Tofani et al. 2001; Tofani et al. 2002).

1.6.4 Πιθανός μηχανισμός δράσης ηλεκτρομαγνητικών πεδίων

Παρ' όλες τις μελέτες και τα δεδομένα που υπάρχουν στην έρευνα για το βιοηλεκτρομαγνητισμό είναι το ότι δεν υπάρχει ένας γενικά αποδεκτός μηχανισμός για το πώς τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία επηρεάζουν τα βιολογικά συστήματα. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία δημιουργούν αλλαγές στα DNA είναι άγνωστος. Από τότε που το ενεργειακό επίπεδο σχετίστηκε με την έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία δεν είναι επαρκές για να προκαλέσει απευθείας σπάσιμο στους χημικούς δεσμούς των μορίων, τα αποτελέσματα είναι πιθανόν έμμεσα και δευτερεύοντα μέσω πρόκλησης άλλων βιοχημικών αλλαγών στα κύτταρα (Phillips et al. 2009).

Μια πιθανότητα είναι ότι το DNA καταστρέφεται από τις ελεύθερες ρίζες οι οποίες σχηματίζονται μέσα στα κύτταρα μετά την έκθεσή τους στα ηλεκτρομαγνητικά πεδία (Zmyslony et al. 2000; Jajte et al. 2001; Wolf et al. 2005). Οι ελεύθερες ρίζες επηρεάζουν τα κύτταρα καταστρέφοντας τα μακρομόρια, όπως το DNA, πρωτεΐνες και τα μεμβρανικά λιπίδια. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία ενισχύουν την

δραστικότητα των ελευθέρων ριζών στα κύτταρα (Lai and Singh 1997, Lai and Singh 2005, Oral et al. 2006; Simko 2007) και πιο συγκεκριμένα μέσω της αντίδρασης Fenton (Lai and Singh 2004). Η αντίδραση Fenton είναι μια διαδικασία που καταλύεται από το σίδηρο, στην οποία το υπεροξείδιο του υδρογόνου, ως προϊόν της οξειδωτικής αναπνοής στα μιτοχόνδρια, μετατρέπεται σε ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου, που είναι πολύ ισχυρά και κυτταροτοξικά μόρια. (Σχήμα 1.4).



Η αντίδραση Fenton

Σχήμα 1.4 Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης Fenton και ο ρόλος της ως μεσολαβητή στις βιολογικές επιδράσεις που προκαλούνται από τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία.

Οι επιδράσεις μέσω της αντίδρασης Fenton προβλέπουν το πώς ένα κύτταρο θα μπορούσε να ανταποκριθεί στα ηλεκτρομαγνητικά πεδία. Για παράδειγμα:

- 1) Τα κύτταρα που είναι μεταβολικά ενεργά θα μπορούσαν να είναι περισσότερο ευαίσθητα στα ηλεκτρομαγνητικά πεδία, επειδή παράγεται περισσότερο υπεροξείδιο του υδρογόνου στα μιτοχόνδρια για να τροφοδοτήσει την αντίδραση.

- 2) Τα κύτταρα που διαθέτουν υψηλό ποσοστό ελεύθερου ενδοκυττάριου σιδήρου θα μπορούσαν να είναι περισσότερο ευαίσθητα στα ηλεκτρομαγνητικά πεδία. Τα καρκινικά κύτταρα και τα κύτταρα που βρίσκονται σε μη φυσιολογική διαίρεση έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις ελεύθερου σιδήρου επειδή προσλαμβάνουν περισσότερο σίδηρο και έχουν λιγότερο αποτελεσματική ρύθμιση στην αποθήκευση του σιδήρου. Επομένως, αυτά τα κύτταρα μπορεί να είναι υποστούν επιλεκτική βλάβη από τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία (Jajte et al. 2001).
- 3) Αφού ο εγκέφαλός μας εκτίθεται σε υψηλά επίπεδα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας κατά τη διάρκεια χρήσης του κινητού τηλεφώνου, οι γενετικές βλάβες στα εγκεφαλικά κύτταρα που προκαλούνται από τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία είναι ιδιαίτερα σημαντικές. Τα εγκεφαλικά κύτταρα είναι πλούσια σε σίδηρο. Άτομα σιδήρου έχει βρεθεί ότι παρεμβάλλονται στο DNA των μορίων. Επιπλέον, τα νευρικά κύτταρα έχουν μικρή ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA, και μπορεί πολύ εύκολα να συσσωρευτούν βλάβες του DNA. Επίσης ενδιαφέρον είναι η παρουσία υπερπαραμαγνητικών μορίων σιδήρου, τα οποία θα μπορούσαν να ενισχύσουν την δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών στα κύτταρα και να προκληθούν κυτταρικές βλάβες από την επίδραση των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων. Πρέπει να συμπεριληφθεί ότι λόγω της φύσης των νευρικών κυττάρων, ότι δηλαδή δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν και επομένως δεν μπορούν να μετατραπούν σε καρκινικά, οι πιο συχνές συνέπειες της βλάβης του DNA σε αυτά τα κύτταρα περιλαμβάνουν αλλαγές στις κυτταρικές λειτουργίες και στον κυτταρικό θάνατο. Συσσωρευμένες βλάβες του DNA στα νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου έχουν σχετιστεί με νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως Alzheimer, ασθένεια Huntington και Parkinson.

- 4) Δύο μελέτες, των Blank and Soo (Blank et al. 2003) και Blank and Goodman (Blank et al. 2008) υποστηρίζουν την πιθανότητα, ότι η έκθεση στα ηλεκτρομαγνητικά πεδία χαμηλής ενέργειας έχει μια άμεση επίδραση στην διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων.
- 5) Από την άλλη μεριά, τα κύτταρα διαθέτουν μεγάλα ποσά αντιοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ενζύμων που τα κάνουν λιγότερο ευαίσθητα στα ηλεκτρομαγνητικά πεδία.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ως σκοπό να μελετήσει: α) την επίδραση των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων συγκεκριμένων συχνοτήτων συντονισμού *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo*, β) την επίδραση του φάσματος συντονισμού ενός χημικού συμπλόκου ή βιολογικού μορίου σε *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo* μοντέλα, γ) την εν δυνάμει προσομοίωση ή ακόμη και αντικατάσταση της φυσικής παρουσίας και δράσης των χημικών συμπλόκων ή βιολογικών μορίων έπειτα από έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία συχνοτήτων συντονισμού των ίδιων συμπλόκων ή μορίων και δ) την πιθανή εμφάνιση του φαινομένου της συνέργειας των δράσεων του συμπλόκου ή μορίου και του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος συντονισμού αυτών.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Εξαγωγή συχνοτήτων συντονισμού – συσκευή εκπομπής

3.1.1 Εύρεση συχνοτήτων από το ¹H- NMR φάσμα

Το σύμπλοκο το οποίο μελετήθηκε όπως αναφέρεται παρακάτω έχει συντεθεί και έχει πλήρως χαρακτηριστεί (Μοριακό Βάρος, σημείο βρασμού, X-crystallography, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, UV-vis, FT-IR κ.ά.) (Xanthopoulou et al. 2003a, Xanthopoulou et al. 2003b). Από το φάσμα του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) του ¹H, πήραμε τις τιμές που αντιστοιχούν στα σήματα συντονισμού των πυρήνων H (χημική μετατόπιση in ppm). Πολλαπλασιάζοντας τις χημικές μετατοπίσεις με τη βασική συχνότητα λειτουργίας του οργάνου (εδώ είναι 250 MHz) λάβαμε το σύνολο των συχνοτήτων συντονισμού (του πυρήνα του συμπλόκου) και οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στις αντίστοιχες πειραματικές διαδικασίες. Το σύνολο των συχνοτήτων ήταν 22 και οι οποίες κυμαίνονται από 1770 Hz μέχρι 2058 Hz. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για την μετατροπή των χημικών μετατοπίσεων σε συχνότητες συντονισμού είναι η εξής:

$$\text{Συχνότητα συντονισμού (Hz)} = \text{χημική μετατόπιση (ppm)} \times A \text{ MHz (όπου } A, \text{ η βασική συχνότητα λειτουργίας του φασματοφωτόμετρου)} \text{ (Keeler 2005) (Εξίσωση 3)}$$

Επίσης στις πειραματικές διαδικασίες που περιγράφονται στις παραγράφους 3.4.4 και 3.4.5 χρησιμοποιήθηκε τόσο η μορφίνη όσο και το ¹H-NMR φάσμα της από το οποίο πήραμε 36 συχνότητες συντονισμού που κυμαίνονται από 410 μέχρι 1527Hz. Οι συχνότητες συντονισμού της μορφίνης που χρησιμοποιήθηκαν προέκυψαν από τον

πολλαπλασιασμό των χημικών μετατοπίσεων με τη βασική συχνότητα λειτουργίας του φωτόμετρου (200 MHz), όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

3.1.2 Εύρεση συχνοτήτων από το IR φάσμα

Από το φάσμα υπερύθρου του SnMNA συμπλόκου (IR) πήραμε τις τιμές που αντιστοιχούν στις κορυφές και τις μετατρέψαμε σε συχνότητες με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Συχνότητα (Hz)} = \text{ταχύτητα φωτός (km/sec)} \times \text{αντίστροφο μήκος κύματος (cm}^{-1}\text{)}$$

(Brown et al. 2009) (Εξίσωση 4)

Έτσι συνολικά λάβαμε 22 συχνότητες οι οποίες κυμαίνονται από 1140 μέχρι 14.670GHz.

3.1.3 Συσκευή εκπομπής ηλεκτρομαγνητικών πεδίων

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για όλες τις *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo* πειραματικές διαδικασίες έκθεσης ονομάζεται Multi Channel Dynamic Exciter (MCDE) και αποτελείται από δύο μέρη: A) Το αποθηκευτικό σύστημα και B) τη γεννήτρια παραγωγής πεδίων. Το αποθηκευτικό σύστημα είναι ένας υπολογιστής ο οποίος περιέχει ένα εξειδικευμένο λογισμικό μέσω του οποίου είναι δυνατόν να καταγράψουμε, να αποθηκεύσουμε και να τροποποιήσουμε τις οποιεσδήποτε συχνότητες θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε ή να επεξεργαστούμε (Εικόνα 1). Ένα τμήμα του λογισμικού αφορά την εξαγωγή της κυματοσυνάρτησης η οποία αντιστοιχεί στην εκπομπή που προέρχεται από ένα χημικό σώμα. Εφόσον η συνάρτηση προσδιοριστεί είμαστε σε θέση να εφαρμόσουμε επί αυτής μια σχέση η οποία την μετατρέπει σε άλλη συνάρτηση. Η νέα

συνάρτηση μπορεί κατόπιν να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία εκπομπής ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων σύμφωνα με το δικό της μαθηματικό πρότυπο. Με τη χρησιμοποίηση κάποιων αλγόριθμων που δεν θα περιγράψουμε εδώ το φάσμα ραδιοφωνικών συχνοτήτων συντονισμού είναι σε θέση να μετατραπεί στο κατοπτρικό του, να αποθηκευτεί και κατόπιν να εκπεμφθεί επί του αρχικού μοριακού στόχου από τον οποίο προέρχεται. Η γεννήτρια παραγωγής πεδίων χρησιμοποιεί τις κυματοσυναρτήσεις που προαναφέραμε όπως επίσης και τις αλγοριθμικές μετατροπές τους για την παραγωγή ηλεκτρομαγνητικών πεδίων στις συχνότητες που αντιστοιχούν σε συντονισμούς. Τα κύματα αυτά μπορούν να εκπεμφθούν πάνω στο σύστημα στόχο και να προκαλέσουν ποικίλα φαινόμενα διέγερσης και αποδιέγερσής τους, όπως για παράδειγμα θάνατο καρκινικών κυττάρων, επαγωγή γονιδίων, καταστολή φαινοτύπων, μίμηση δράσης ιδιοτήτων βιολογικώς ενεργών ουσιών.



Εικόνα 1. Η συσκευή MCDE μέσα σε κλωβό Faraday.

Η γεννήτρια των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία δημιουργούσε πεδία εντάσεων από 1.1 μέχρι 1.11 ± 0.01 V/m για το ηλεκτρικό πεδίο και 0.0027 μέχρι 0.0029 ± 0.00005 A/m για το μαγνητικό πεδίο. Επίσης οι ραδιοσυχνότητες που παρήγαγε ξεκινούσαν από τα 10 Hz έως 1 MHz. Η συσκευή είχε ελεγχθεί από εξειδικευμένο εργαστήριο του Κέντρου Φυσικών Ερευνών «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ» του Ελληνικού τμήματος της Διεθνούς Επιτροπής Ατομικής Ενέργειας για τον προσδιορισμό των ανώτερων ορίων ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που εκπέμπει και βρέθηκε ότι οι εκπομπές της ήταν ασφαλείς για παρατεταμένη έκθεση ανθρώπων, ζώων και άλλων βιολογικών οργανισμών (Karabetsos 2000).

3.2 *In vitro*

3.2.1 Υλικά και Μηχάνημα-Συντομογραφίες

Τα υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση των πειραματικών διαδικασιών της εν λόγω διδακτορικής διατριβής αναφέρονται παρακάτω. Επίσης ταυτόχρονα με τη λίστα των αντιδραστηρίων αναγράφονται και οι συντομογραφίες αυτών.

Πίνακας 3.1			
Όνομασία (Αγγλικά)	Όνομασία (Ελληνικά)	Συντομογραφία	Εταιρεία προμήθειας
Dubelcco's Modified Eagle's Medium		DMEM	PAA
Trypsin Solution 0.4% -	Θρυψίνη	-	PAA
Trypan Blue	-	-	Sigma

Dimethyl Sulfoxide	Διμέθυλο-σουλφοξείδιο	DMSO	Riedel-de Haen
Phosphate Buffer Saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών	PBS	Sigma
Fetal Bovine Serum	Εμβρυϊκός ορός βοοειδούς	FBS	PAA
Glyceryl Trioctanoate	Τρικαπρυλίνη	Tricapryline	Sigma
Hank's balanced salt solution	-	-	Sigma
3-(4.5-dimethylthiazol-2-yl)- 2.5-diphenyltetrazolium bromide assay	-	MTT	Sigma
Annexin V FITC	-	-	BD
Propidium Iodide	Ιωδιούχο προπίδιο	PI	Sigma
Proteinase K	-	-	Sigma
RNAse A	-	-	Sigma
Agarose	Αγαρόζη	-	Sigma
Ethidium Bromide	Βρωμιούχο Αιθίδιο	-	Sigma
Penicillin-streptomycin	Πενικιλίνη - στρεπτομυκίνη	-	PAA
L-glutamine	L-γλουταμίνη	-	PAA
Arachidonic Acid	Αραχιδονικό οξύ	ARA	Sigma
Platelet Activating Factor	Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων	PAF	Sigma
Adenosine Diphosphate		ADP	Sigma
Ketamine	Κεταμίνη	-	Imalgene
Dormicum	-	-	Roche
Σύριγγες 1ml - 25G	-	-	BD
Ράμματα 7-0 (Mersilk), 45cm	-	-	Johnson & Johnson

3.2.2 Κυτταρικές σειρές και κυτταροκαλλιέργεια

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω κυτταρικές σειρές (Πίνακας 3.2):

Πίνακας 3.2. Περιγραφή κυτταρικών σειρών		
Κυτταρική Σειρά	Περιγραφή	Βιβλιογραφική αναφορά
LMS	Λειομυοσαρκωματικά κύτταρα επίμυος Wistar έπειτα από χημική καρκινογένεση	Evangelou et al. 1997 Liasko et al. 1998
MCF-7	Καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος μαστού	Από κ. Κωλέττα Βαγγέλη
MRC-5	Φυσιολογικό στέλεχος ανθρώπινων εμβρυϊκών ινοβλαστών πνεύμονα	Jacobs et al. 1970

Κύτταρα LMS, MCF-7 και MRC-5 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοοειδούς (Fetal Bovine Serum) (FBS), 100 IU/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη και 1.4 mM L-γλουταμίνη στους 37°C με 5% CO₂. Όλα τα υλικά κυτταροκαλλιέργειας ήταν από τη Costar και PAA.

Για την ανάπτυξη οποιασδήποτε κυτταρικής σειράς συνήθως απαιτείται προσθήκη ορού στο καλλιεργητικό μέσο. Αν και δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί όλα τα συστατικά του ορού, κυρίως αυξητικοί παράγοντες (growth factors), είναι αναγκαία για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Εξαιρετική πηγή των παραγόντων αυτών θεωρείται ο ορός από έμβρυο βοοειδούς.

Το πλήρες καλλιεργητικό υγρό (DMEM) που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από: 440 ml DMEM που περιείχε 3.7g/l NaHCO₃ και 1.0g/l D-γλυκόζης, προστέθηκαν 55 ml ορός από έμβρυο βοοειδούς, 5,0 ml 10000IU/ml πενικιλίνης και 10000μg/ml στρεπτομυκίνης και 5.5 ml 200 mM L- γλουταμίνης. Οι τελικές συγκεντρώσεις που προέκυψαν ήταν: 10% ορός από έμβρυο βοοειδούς, 100 μg/ml στρεπτομυκίνης, 100 U/ml πενικιλίνης και 2 mM L- γλουταμίνης.

3.2.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Η ανακαλλιέργεια των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε στην εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νηματικής ροής (Tissue culture hood). Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιούνταν για τους εξής λόγους: 1) Για να διατηρηθούν τα καλλιεργούμενα κύτταρα όλων των κυτταρικών σειρών ζωντανά, και 2) Για να έχουμε επαρκείς πληθυσμούς κυττάρων σε καλή κατάσταση για όλες τις πειραματικές διαδικασίες που ακολουθούν.

Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία των 90 mm, ενώ τα κύτταρα αφήνονταν να δημιουργήσουν πλήρες ταπήτιο (confluent). Για την ανακαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε αλλαγή DMEM, πλύση με PBS και προσθήκη 1ml θρυψίνης. Έπειτα προστέθηκαν 10ml DMEM και τοποθετήθηκε ο κατάλληλος όγκος σε τρυβλία των 90mm. Προστέθηκε DMEM σε κάθε τρυβλίο έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 10ml.

3.2.4 Διατήρηση των κυττάρων – Πάγωμα / Ξεπάγωμα

Η διατήρηση των κυττάρων εκτός επωαστή/ανακαλλιέργεια για μεγάλο χρονικό διάστημα είναι εφικτή με την φύλαξή τους είτε σε καταψύκτες (-75 °C για περίπου 4-6 μήνες) είτε σε υγρό άζωτο (-192°C για αρκετά χρόνια). Για να πραγματοποιηθεί αυτό,

έγινε αναρρόφηση του DMEM, πλύση με PBS και προσθήκη 1ml θρυψίνης. Τα αποκολλημένα κύτταρα επανειωρήθηκαν σε 10ml PBS και μεταφέρθηκαν σε πλαστικούς αποστειρωμένους σωλήνες falcon των 15 ml για φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3500 rpm. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επανειωρήθηκε στο διάλυμα συντήρησης που αποτελείται από 90% FBS και 10% διμεθυλο-σουλφοξειδίου (DMSO). Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε ειδικές αμπούλες (cryovials) του 1 ml.

3.2.5 Σπορά κυττάρων σε πολυτρυβλία

Όταν τα τρυβλία με την εκάστοτε κυτταρική σειρά βρίσκονται σε κατάσταση πλήρους ανάπτυξης κυττάρων (confluent) τότε είναι στην κατάλληλη φάση για να πραγματοποιήσουμε τη σπορά. Στις πειραματικές μεθόδους που ακολουθούν η σπορά των κυττάρων, όλων των κυτταρικών σειρών, πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία 6x, 24x και 96x, όπου x είναι τα φρεάτια (wells) του κάθε πολυτρυβλίου. Συγκεκριμένα αναρροφήθηκε το DMEM, έγινε πλύση με PBS και τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν (1ml θρυψίνης). Προστέθηκαν 10 ml DMEM και το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετήθηκε σε falcon. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση στο αιμοκυτταρόμετρο και υπολογίστηκε ο όγκος που θα πάρουμε από το falcon για να έχουμε τελικό αριθμό κυττάρων στο κάθε πολυτρυβλίο ως εξής:

Πίνακας 3.3. Αριθμός κυττάρων για σπορά σε πολυτρυβλία				
Κυτταρική σειρά	Είδος πολυτρυβλίου / Αριθμός κυττάρων			
	6x*	24x*	96x*	Αριθμός κυττάρων
LMS	60.000	20.000	3.000	
MCF-7	60.000	20.000	3.000	
MRC-5	-	-	5.000	

*Όπου x ο αριθμός των πηγαδιών (wells) του κάθε πολυτρυβλίου

Μετά τη σπορά βάζαμε το κάθε πολυτρυβλίο στον επωαστή 37°C, 5% CO₂ για 24 ώρες ώστε τα κύτταρα να κολλήσουν και να αναπτυχθούν. Μετά τις 24 ώρες επώασης προσθέταμε το σύμπλοκο ή εκθέταμε το πολυτρυβλίο σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία συχνοτήτων συντονισμού ανάλογα με το εκάστοτε πειραματικό πρωτόκολλο.

3.2.6 Υπολογισμός κυτταρικής βιωσιμότητας με Trypan Blue

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτών χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα των κυτταρικών σειρών LMS και MCF-7. Πραγματοποιήθηκε σπορά 25.000 κυττάρων, σε πολυτρυβλία 24x και προστέθηκε DMEM σε κάθε φρεάτιο έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 1 ml. Τα πολυτρυβλία αφήθηκαν στον επωαστή 37°C, 5% CO₂ για 24 ώρες και έπειτα προστέθηκαν τα σύμπλοκα σε διάφορες συγκεντρώσεις ή εκτέθηκαν σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία συχνοτήτων συντονισμού για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (45, 120, 300 min) ή προστέθηκε ποσότητα θρεπτικού υλικού (1 ml) ή οποία πριν είχε εκτεθεί στα ηλεκτρομαγνητικά πεδία, ενώ υπήρχαν πάντα και τα φρεάτια που αντιστοιχούσαν στην ομάδα ελέγχου (control) του κάθε πειράματος. Μετά το πέρας 24 ή 48 ωρών αναρροφήθηκε το DMEM, εκπλύναμε με 1 ml PBS και προστέθηκε 0.25 ml θρυψίνη. Τα πολυτρυβλία τοποθετήθηκαν στον επωαστή για 3-5 λεπτά για να αποκολληθούν τα κύτταρα και στη συνέχεια προστέθηκαν 0.25 ml PBS. Από ένα αρχικό διάλυμα Trypan Blue 0.4% που είχαμε φτιάξει (ζυγίστηκαν 400 mg και τα διαλύθηκαν σε 100 ml PBS), προστέθηκαν 0.5 ml σε κάθε φρεάτιο (τελικός όγκος 1 ml). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 5 λεπτά και στη συνέχεια με καλή ανάδευση (για την αποφυγή κυτταρικών συσσωμάτων) λήφθηκαν 11 μl κυτταρικού εναιωρήματος και τοποθετήθηκαν στο αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer Chamber) όπου και έγινε η μέτρηση των κυττάρων. Μετρήθηκαν μόνο τα κύτταρα που ήταν αρνητικά στην χρώση (βιώσιμα κύτταρα). Το

ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων στα φρεάτια πειράματος (σύμπλοκα και ηλεκτρομαγνητικά) εκφράστηκε σε ποσοστό επί τοις εκατό σε σχέση με τα φρεάτια ελέγχου (control). Μέσω των πειραμάτων αυτών προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της ουσίας στην οποία είχαμε 50% θάνατο των κυττάρων (IC_{50}), όπως επίσης και η ελάχιστη συγκέντρωση ουσίας η οποία προκαλούσε πλήρη θάνατο (100%) στα κύτταρα (MLC). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

3.2.7 Υπολογισμός αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη χρήση MTT

Για την πραγματοποίηση αυτών των πειραμάτων οι κυτταρικές σειρές LMS, MCF-7 και MRC-5. Πραγματοποιήθηκε σπορά 3.000 LMS και MCF-7 κυττάρων και 5.000 MRC-5 κύτταρα, σε πολυτρυβλία 96x και προστέθηκε DMEM σε κάθε φρεάτιο έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 200 μ l. Τα πολυτρυβλία αφέθηκαν στον επωαστή $37^{\circ}C$, 5% CO_2 για 24 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκαν τα σύμπλοκα σε διάφορες συγκεντρώσεις ή εκτέθηκαν σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία συχνοτήτων συντονισμού για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (45, 120, 300 min) ή προστέθηκε ποσότητα θρεπτικού υλικού (200 μ l) ή οποία πριν είχε εκτεθεί στα ηλεκτρομαγνητικά πεδία. Εδώ υπήρχαν πάλι φρεάτια που αντιστοιχούσαν στην ομάδα ελέγχου (control) του κάθε πειράματος. Μετά το πέρας 48 ωρών σε κάθε φρεάτιο προστέθηκαν 50 μ l MTT (3 mg / ml) και τα πολυτρυβλία επώαστηκαν για επιπλέον 3 ώρες. Μετά το πέρας των τριών ωρών αναρροφήθηκε το DMEM μαζί με το MTT από το κάθε φρεάτιο, με προσοχή να μην αποκολληθεί το κυτταρικό ίζημα (μπλε-μωβ χρώμα), και στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μ l DMSO. Με τη βοήθεια μιας πολυπιπέτας 8 καναλιών πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση για να διαλυθεί το κυτταρικό ίζημα στο DMSO. Τέλος τα πολυτρυβλία μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρα σε μήκος κύματος 540 αφαιρώντας την τιμή σε μήκος κύματος 690

(background). Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων στα φρεάτια πειράματος (σύμπλοκα και ηλεκτρομαγνητικά) εκφράστηκε σε ποσοστό επί τοις εκατό σε σχέση με τα φρεάτια ελέγχου (control). Με τα πειράματα αυτά προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της ουσίας στην οποία είχαμε 50% θάνατο των κυττάρων (IC_{50}), όπως επίσης και η ελάχιστη συγκέντρωση ουσίας η οποία προκαλούσε πλήρη θάνατο (100%) στα κύτταρα (MLC). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

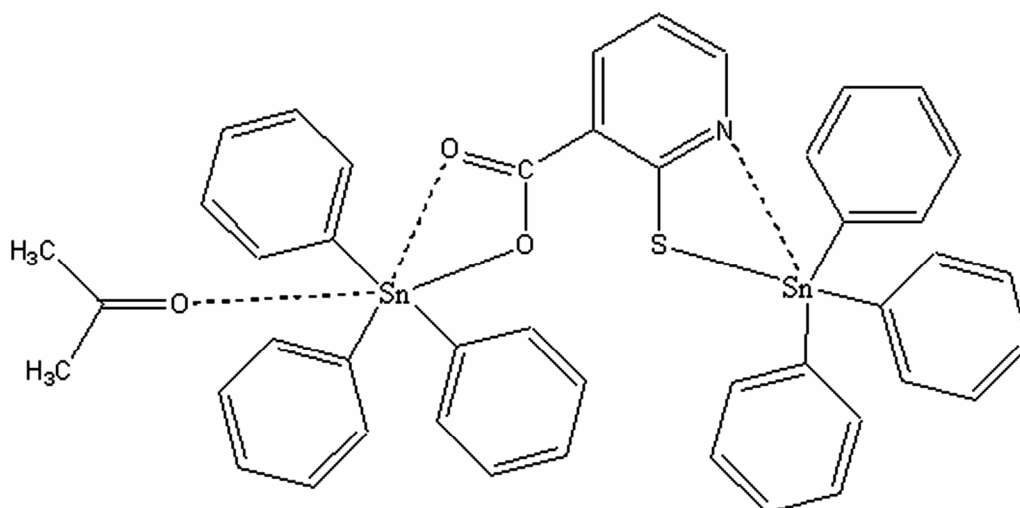
3.2.8 Δημιουργία αποικιών – μέτρηση

Πραγματοποιήθηκε σπορά LMS και MCF-7 κυττάρων σε πολυτρυβλία 24x. Μετά από 24 επώασης των πολυτρυβλίων προστέθηκε το σύμπλοκο σε διάφορες συγκεντρώσεις ή εκτέθηκαν σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία συχνοτήτων συντονισμού σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (300 min). Έπειτα από 48 ώρες επώασης ακολουθήθηκε η διαδικασία όπως ακριβώς με τη μέθοδο υπολογισμού βιωσιμότητας με Trypan Blue με τη μόνη διαφορά ότι αντί να προστεθούν 0.5 ml Trypan Blue και 0.25 ml PBS προστέθηκαν 0.75 ml DMEM. Υπολογίστηκε ο συνολικός αριθμός των κυττάρων σε κάθε φρεάτιο με τη μέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο και υπολογίστηκε ο κατάλληλος όγκος που αντιστοιχούν 5.000 κύτταρα. Στην περίπτωση που δεν υπάρχουν 5.000 κύτταρα τότε λαμβάνεται ο συνολικός όγκος. Ο όγκος αυτός στη συνέχεια προστέθηκε σε τρυβλία 90 mm που περιείχαν 10 ml DMEM. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 3 ημέρες και πραγματοποιήθηκε αλλαγή θρεπτικού υλικού. Μετά από 4 ημέρες επιπλέον επώασης, αναρροφήθηκε το DMEM, έγινε πλύση με 10 ml PBS και προστέθηκαν 10 ml μείγματος μεθανόλης / οξικού οξέος σε αναλογία 3:1. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε καταψύκτη στους $-20^{\circ}C$ για 10 λεπτά. Έπειτα αφαιρέθηκαν τα 10 ml του μείγματος και τα τρυβλία αφέθηκαν με ανοιχτό καπάκι μέσα σε απαγωγό χώρο για να στεγνώσουν. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 ml

χρωστικής Giemsa, αραιωμένη με νερό 1:10, και αφέθηκε για 20 λεπτά για να βαφτούν οι αποικίες. Μετά το πέρας του εικοσάλεπτου τα τρυβλία πλύθηκαν αρκετά καλά με νερό βρύσης για να απομακρυνθεί η χρωστική (οι αποικίες είναι μονιμοποιημένες και δεν μπορούν να αποκολληθούν με το πλύσιμο) και αφέθηκαν να στεγνώσουν πολύ καλά. Οι εμφανείς βαμμένες αποικίες καταμετρήθηκαν και υπολογίστηκε σε ποσοστό επί τοις εκατό ο αριθμός των αποικιών πειράματος σε σχέση με τις αποικίες ελέγχου.

3.2.9 Προσθήκη συμπλόκου του Κασσιτέρου σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις

Το σύμπλοκο κασσιτέρου που χρησιμοποιήθηκε για όλες τις πειραματικές διαδικασίες έχει παρασκευαστεί και έχει πλήρως χαρακτηριστεί σε προηγούμενη μελέτη (Xanthopoulou et al. 2003a, Xanthopoulou et al. 2003b). Η δομή του συμπλόκου παρουσιάζεται στο παρακάτω (Σχήμα 3.1). Για να βρεθεί η συγκέντρωση η οποία προκαλεί θάνατο κατά 50% με τη μέθοδο Trypan Blue το σύμπλοκο προστέθηκε στις εξής συγκεντρώσεις: 0.5 nM, 0.75 nM, 1 nM, 5 nM, 20 nM, 50 nM, 75 nM, 100 nM, 125 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM. Για να βρεθεί η συγκέντρωση του συμπλόκου που προκαλεί κατά 50% αναστολή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με MTT το σύμπλοκο προστέθηκε στις εξής συγκεντρώσεις: 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM, 160 nM, 320 nM. Για να προκύψουν αυτές οι συγκεντρώσεις ζυγίστηκαν 9.11 mg συμπλόκου και διαλύθηκαν σε 1 ml DMSO. Η συγκέντρωση που προέκυψε είναι 10^{-2} M ($M.B_{\text{συμπλόκου}} = 911$). Από το αρχικό διάλυμα (stock solution) πραγματοποιήσαμε διαδοχικές αραιώσεις σε DMEM για να προκύψουν όλες οι προαναφερθείσες συγκεντρώσεις.



Σχήμα 3.1. Σχηματική απεικόνιση του συμπλόκου SnMNA

3.2.10 Προσδιορισμός απόπτωσης – νέκρωσης με κυτταρομετρία ροής

Πραγματοποιήθηκε σπορά 60.000 κυττάρων, LMS και MCF-7, σε πολυτρυβλίο 6x. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα προστέθηκε το σύμπλοκο στις επιθυμητές συγκεντρώσεις ή τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία συχνοτήτων συντονισμού σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (120 και 300 min).

Μετά από 48 ώρες επώασης συλλέχθηκε το θρεπτικό υλικό από το κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου σε σωλήνες falcon των 15 ml. Έγινε πλύση με 3 ml PBS το οποίο και αυτό συλλέχθηκε στα αντίστοιχα falcon. Προστέθηκαν 0.3 ml θρυψίνης σε κάθε φρεάτιο και τα πολυτρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για περίπου 5 λεπτά έως ότου αποκολληθούν τα κύτταρα. Προστέθηκαν επιπλέον 3 ml PBS και τα κύτταρα αναδεύτηκαν ήπια με τη χρήση πιπέτας. Αφού αποκολλήθηκαν πλήρως τα κύτταρα συλλέχθηκαν ξανά στα αντίστοιχα falcon. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων. Τα falcon φυγοκεντροήθηκαν στις 3.500 rpm για 10 λεπτά και απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρήθηκαν σε 1 ml διαλύματος Calcium Buffer 1x και με τους κατάλληλους υπολογισμούς λήφθηκαν και τοποθετήθηκαν σε erpendorf 100.000 κύτταρα

σε 100μL Calcium Buffer 1x. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο όπου σε κάθε erppendorf προστέθηκαν 5 μl Annexin και 4 μl Propidium Iodide. Όλα τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Μετά το πέρας των 15 λεπτών προστέθηκε επιπλέον 1 ml Calcium Buffer 1x (τελικός όγκος 1.1 ml). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε κυτταρόμετρο ροής (CyFlow[®]ML, Partec, Munster, Germany) όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση και προσδιορισμός % του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται σε αποπτωτική ή νεκρωτική φάση.

3.2.11 Προσδιορισμός κατακερματισμού του DNA – Ηλεκτροφόρηση DNA

Πραγματοποιήθηκε σπορά 160.000 κυττάρων σε τρυβλία 90 mm. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 48 ώρες σε επωαστικό θάλαμο σε σταθερές συνθήκες (37°C, 5% CO₂, 95% O₂). Με την πάροδο 48 ωρών πραγματοποιήθηκε η προσθήκη του συμπλόκου στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Ακολούθησε νέα επώαση 48 ωρών σε επωαστικό θάλαμο. Μετά το 48ωρο, το θρεπτικό υλικό από τα τρυβλία συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε στους αντίστοιχους σωλήνες falcon των 15ml. Πραγματοποιήθηκε διπλή πλύση με PBS-EDTA (5 ml η καθεμία), το οποίο συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε στα αντίστοιχα falcon. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2 ml PBS-EDTA στα τρυβλία ενώ ακολούθησε φυγοκέντρηση των falcon στις 2000 rpm για 5 λεπτά. Όλες οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν στον ψυκτικό θάλαμο στους 4 °C. Μετά τις φυγοκεντρήσεις το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Με ένα κομμάτι σιλικόνης αποκολλήθηκαν τα κύτταρα που βρίσκονταν στον πυθμένα των τρυβλίων και μεταφέρθηκαν στα αντίστοιχα falcon. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες (2000 rpm για 5 λεπτά) και απόρριψη του υπερκειμένου. Προστέθηκε 1 ml PBS-EDTA σε κάθε falcon και με ήπια ανάδευση με την πιπέττα αποκολλήθηκε το ίζημα και μεταφέρθηκε στα αντίστοιχα erppendorfs. Τα erppendorfs φυγοκεντρήθηκαν στις 6000 rpm

για 5 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίφθηκε ξανά. Προστέθηκαν 100 μl DNA Lysis Buffer σε κάθε eppendorf και ανακινήθηκαν απαλά με το δάχτυλο (tapping) για να επιτευχθεί λύση και ομογενοποίηση των κυττάρων. Μετά από επώαση 10 λεπτών στον πάγο, τα eppendorfs φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 rpm για 30 λεπτά, μέσα στον ψυκτικό θάλαμο στους 4 °C. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα eppendorfs όπου και προστέθηκαν 2 μl RNase A σε καθένα από αυτά. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C σε υδατόλουτρο για περίπου 2 ώρες. Έπειτα προστέθηκαν 2.5 μl Proteinase K σε κάθε eppendorf και τα δείγματα επώαστηκαν ξανά στους 37°C σε υδατόλουτρο για περίπου 2 ώρες. Τέλος, προστέθηκαν 20 μl 5M NaCl και 120 μl Isopropanol και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -20°C για ολόκληρη τη νύχτα (overnight). Την επόμενη μέρα, αφού ξεπάγωσαν τα δείγματα, φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C, στις 13000 rpm για 30 λεπτά. Με το τέλος της φυγοκέντρωσης, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και τα eppendorfs αφέθηκαν ανάποδα για να στεγνώσουν, πάνω σε απορροφητικό χαρτί. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 20 μl 1xTE pH 7.4 και τα δείγματα επώαστηκαν για 3 ώρες στους 37°C, ενώ πραγματοποιούταν ανάδευση με το δάχτυλο κάθε 20 λεπτά. Τα δείγματα έπειτα μπορούν να διατηρηθούν στους -20 °C για μέρες. Για την παρασκευή του gel ηλεκτροφόρησης διαλύθηκαν 0,84 γραμμάρια αγαρόζης σε 70 ml διαλύματος TBE 0.5x (1.2%). Το διάλυμα ζεστάθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για την πλήρη διαλυτοποίηση της αγαρόζης. Το ζεστό διάλυμα της αγαρόζης αφέθηκε να κρυώσει, προστέθηκαν 2.7 μl Ethidium Bromide και τοποθετήθηκε στην ειδική φόρμα με χτενάκι ώστε να σχηματιστούν τα φρεάτια στα οποία θα τοποθετηθούν τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση. Το διάλυμα αγαρόζης αφέθηκε να κρυώσει ώστε να σχηματιστεί το πήγμα αγαρόζης. Παράλληλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για να πραγματοποιηθεί η σταδιακή απόψυξή τους. Προστέθηκαν 2 μl Loading Buffer σε όλα τα eppendorf και φυγοκεντρήθηκαν για να συλλέξουμε πλήρως όλο το δείγμα. Όταν

σχηματίστηκε πλήρως η πηκτή αγορόζης, μεταφέρθηκε στην αντίστοιχη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τα δείγματα (20 μl το καθένα) φορτώθηκαν με τη βοήθεια της 20άρας πιπέτας στα αντίστοιχα φρεάτια. Στη συσκευή προστέθηκαν 430 ml διαλύματος TBE 0,5x και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση (40V για 10 λεπτά και 60V για 1.5 ώρες). Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης φωτογραφήθηκε το πηγμα αγορόζης με κάμερα UV.

3.2.12 Κυτταρικός κύκλος

Πραγματοποιήθηκε σπορά 60.000 LMS κυττάρων σε πολυτρυβλίο 6x. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα προστέθηκε το σύμπλοκο στις επιθυμητές συγκεντρώσεις ή τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία συχνοτήτων συντονισμού σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (120 και 300 min). Μετά από 48 ώρες επώασης αναρροφήθηκε το υπερκείμενο, έγινε πλύση με 3 ml PBS το οποίο και αυτό αναρροφήθηκε και προστέθηκαν 0.3 ml θρυψίνης σε κάθε φρεάτιο και τα πολυτρυβλία επωάστηκαν στους 37°C για περίπου 5 λεπτά έως ότου αποκολληθούν τα κύτταρα. Προστέθηκαν επιπλέον 3 ml PBS και τα κύτταρα αναδεύτηκαν ήπια με τη χρήση πιπέτας. Αφού αποκολλήθηκαν πλήρως τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε falcon και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 3.500 rpm για 5 λεπτά και απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρήθηκαν σε 0.5 ml κρύου διαλύματος αιθανόλης 70% και τοποθετήθηκαν στους 0°C για 10 λεπτά. Στην συνέχεια προστέθηκαν 0.5 ml PBS και τα μονιμοποιημένα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε erpendorf όπου φυγοκεντρήθηκαν στις 3.500 rpm για 5 λεπτά και απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Στην συνέχεια σε κάθε erpendorf προστέθηκαν 50 μl RNase (100 μg/ml διαλύματος σε PBS) και αφέθηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Επιπλέον, προστέθηκαν 0.3 ml PI

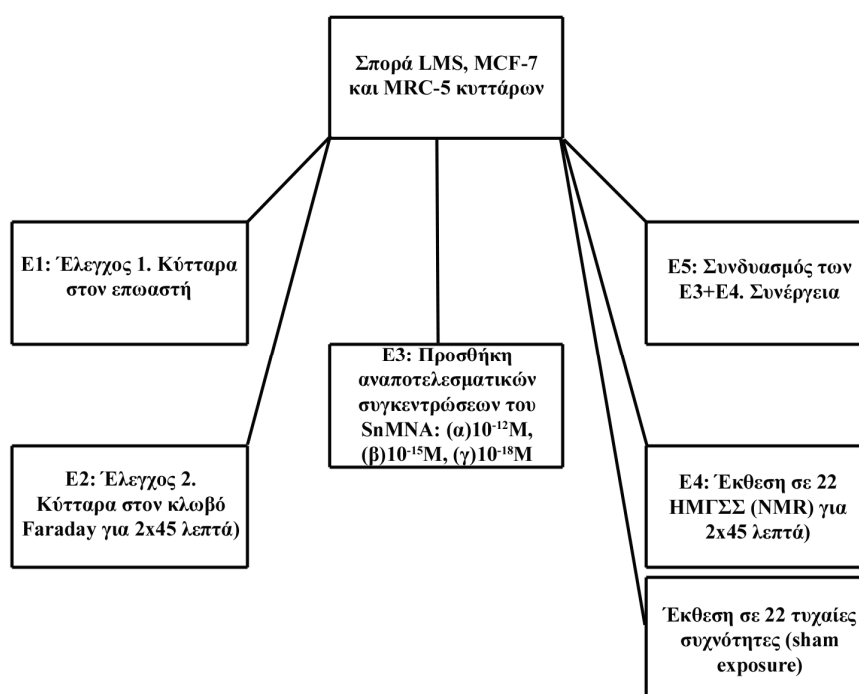
(50 µg/ml διαλύματος σε PBS), έγινε καλή ανάδευση και τα μονιμοποιημένα κύτταρα αφέθηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το κάθε δείγμα αραιώθηκε με 0.8 ml PBS και μεταφέρθηκαν σε κυτταρόμετρο ροής (CyFlow[®]ML, Partec, Munster, Germany) όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου και προσδιορισμός % του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε φάση αυτού (G0/G1, S, G2/M).

3.2.13 Έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία – συχνότητες συντονισμού

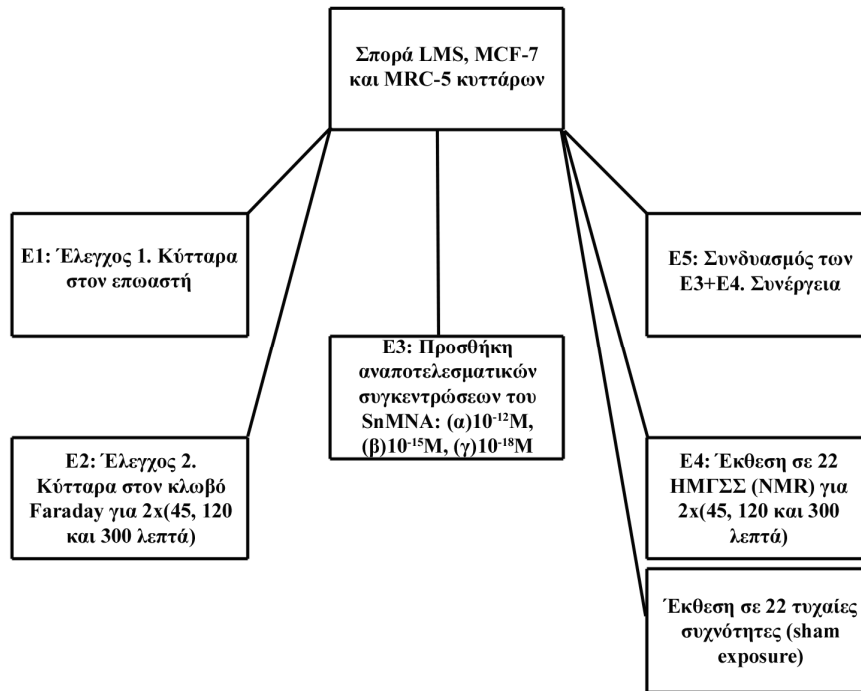
3.2.13.1 Έκθεση κυτταρικών στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα συχνοτήτων συντονισμού (¹H-NMR)

Πραγματοποιήθηκε σπορά LMS, MCF-7 και MRC-5 κυττάρων σε πολυτρυβλία 24x (υπολογισμός κυτταρικής βιωσιμότητας) και 96x (υπολογισμός αναστολής κυτταρικού πολλαπλασιασμού) και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες. Σε αυτό το σημείο η πειραματική διαδικασία χωρίζεται σε 5 διαφορετικές πειραματικές διαδικασίες όπως παρουσιάζεται στα παρακάτω σχήματα (Σχήμα 3.2, Σχήμα 3.3). Στη μέθοδο Trypan Blue για τις διάφορες πειραματικές διαδικασίες χρησιμοποιείται ως διακριτό γράμμα το T, ενώ για το MTT χρησιμοποιείται το E. Η πρώτη αποτελείται από κύτταρα όλων των κυτταρικών σειρών τα οποία αφέθηκαν στον επωαστή για 48 ώρες και έπειτα πραγματοποιήθηκε η μέτρηση σύμφωνα με τις παραγράφους 3.2.6 και 3.2.7 (T1 ή E1). Τα πολυτρυβλία της δεύτερης διαδικασίας αφέθηκαν στο περιβάλλον του κλωβού Faraday (30±1 °C) για 45, 120 και 300 min/ημέρα, για 2 συνεχόμενες ημέρες και έπειτα (στις 48 ώρες) πραγματοποιήθηκε η μέτρηση (στην περίπτωση της κυτταρικής βιωσιμότητας αφέθηκαν 45min/ημέρα) (T2 ή E2). Στην τρίτη πειραματική διαδικασία προστέθηκε το σύμπλοκο σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (με κατάλληλη αραιώση πήραμε συγκεντρώσεις (α) 10⁻¹², (β) 10⁻¹⁵, (γ) 10⁻¹⁸ M), αφέθηκαν στο περιβάλλον του κλωβού

Faraday για 45, 120 και 300 min/ημέρα, για 2 συνεχόμενες ημέρες και μετά από 48 ώρες επώασης πραγματοποιήθηκε η μέτρηση (T3 ή E3:(α), (β), (γ)). Στην τέταρτη πειραματική διαδικασία τα πολυτρυβλία αφέθηκαν στον κλωβό Faraday και εκτέθηκαν στα ηλεκτρομαγνητικά πεδία, σε 22 συχνότητες συντονισμού (T4 ή E4). Τέλος στην πέμπτη πειραματική διαδικασία προστέθηκε το σύμπλοκο σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και τα πολυτρυβλία ταυτόχρονα εκτέθηκαν στα ηλεκτρομαγνητικά πεδία (22 συχνότητες συντονισμού) για 45, 120 και 300 min/ημέρα για 2 συνεχόμενες ημέρες (στην περίπτωση της κυτταρικής βιωσιμότητας αφέθηκαν 45min/ημέρα) (T5 ή E5:(α), (β), (γ)). Να σημειωθεί ότι σε κάθε πειραματική διαδικασία που εμπλεκόταν το σύμπλοκο (αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις) πάντα γινόταν ανεξάρτητος έλεγχος της IC₅₀ τιμής του συμπλόκου για να ελεγχθεί αν είχε χαθεί η δραστικότητά του (δεν ενσωματώνεται στα γραφήματα των αποτελεσμάτων).



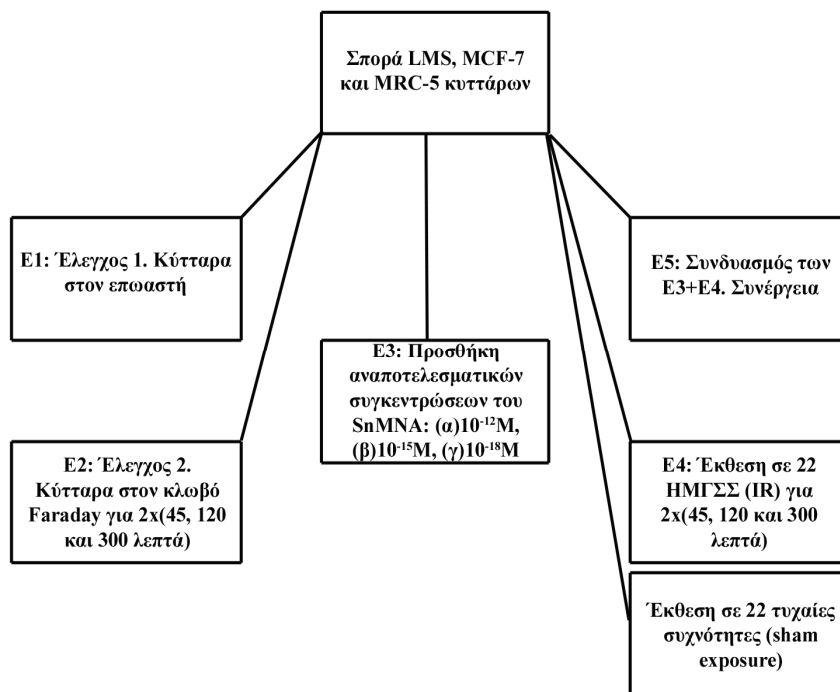
Σχήμα 3.2. Σχηματική απεικόνιση των 5 διαφορετικών πειραματικών διαδικασιών (συχνότητες από NMR) με τη μέθοδο Trypan Blue.



Σχήμα 3.3. Σχηματική απεικόνιση των 5 διαφορετικών πειραματικών διαδικασιών (συχνότητες από NMR) πειραμάτων με τη μέθοδο MTT.

3.2.13.2 Έκθεση κυττάρων στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα συχνότητας φάσματος υπερύθρου (IR)

Η πειραματική αυτή διαδικασία είναι ακριβώς η ίδια με την προηγούμενη “Έκθεση κυτταρικών σειρών σε ηλεκτρομαγνητικό φάσμα – συχνότητες συντονισμού (NMR)” με τη μόνη διαφορά ότι εδώ χρησιμοποιήθηκαν 22 συχνότητες συντονισμού που προήλθαν από την επεξεργασία του φάσματος IR του συμπλόκου (παράγραφος 3.1.2). Επίσης, αυτή η πειραματική διαδικασία αναλύθηκε μόνο με τη μέθοδο MTT.

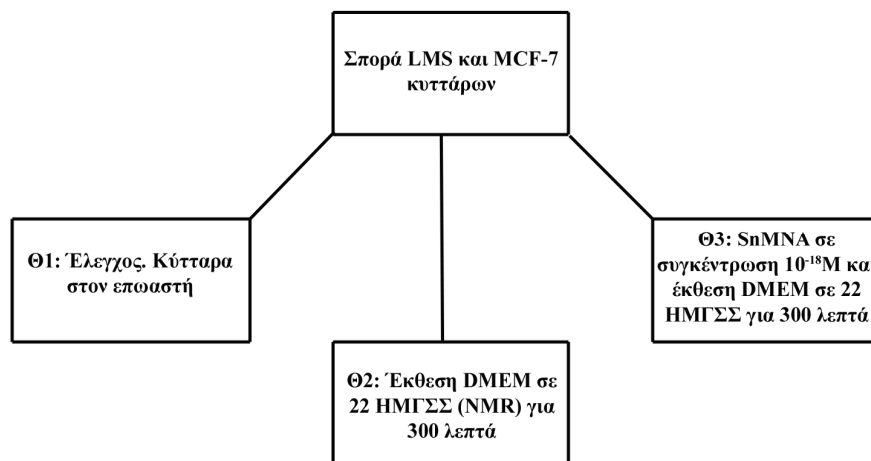


Σχήμα 3.4. Σχηματική απεικόνιση των 5 διαφορετικών πειραματικών διαδικασιών (συχνότητες από IR) πειραμάτων με τη μέθοδο MTT.

3.2.13.3 Έκθεση θρεπτικού υλικού στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα συχνοτήτων συντονισμού (¹H-NMR)

Πραγματοποιήθηκε σπορά LMS, MCF-7 κυττάρων σε πολυτρυβλία 96x (υπολογισμός αναστολής κυτταρικού πολλαπλασιασμού) και ακολούθησε επώαση για 24. Σε αυτό το σημείο η πειραματική διαδικασία χωρίζεται σε 3 διαφορετικές πειραματικές διαδικασίες όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.5). Η πρώτη αποτελείται από κύτταρα όλων των κυτταρικών σειρών τα οποία αφέθηκαν στον επωαστή για 48 ώρες και έπειτα πραγματοποιήθηκε η μέτρηση σύμφωνα με τις παραγράφους 3.2.6 και 3.2.7 (Θ1). Η δεύτερη αποτελείται από κύτταρα όλων των κυτταρικών σειρών στα οποία προστέθηκε θρεπτικό υλικό το οποίο είχε εκτεθεί σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία 22 συχνοτήτων συντονισμού για 300 λεπτά στο πρώτο 24ωρο και επαναλήφθηκε η ίδια

διαδικασία για το δεύτερο 24ωρο (Θ2). Τέλος, η τρίτη πειραματική διαδικασία αποτελείται από κύτταρα όλων των κυτταρικών σειρών στα οποία προστέθηκε θρεπτικό υλικό με (διάλυμα SnMNA 10^{-18} M), το οποίο είχε εκτεθεί σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία, 22 συχνότητες συντονισμού στο πρώτο και δεύτερο 24ωρο (Θ3).



Σχήμα 3.5. Σχηματική απεικόνιση των 5 διαφορετικών πειραματικών διαδικασιών (συχνότητες από NMR) πειραμάτων με τη μέθοδο MTT.

3.3 *Ex vivo*

3.3.1 Αιμοπεταλιακή συσσώρευση

3.3.1.1 Σύμπλοκο

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων συσσώρευσης – αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων ανθρώπου χρησιμοποιήθηκαν 10 υγιείς εθελοντές (27 ± 2.5 ετών), μη καπνιστές, οι οποίοι απείχαν από την κατανάλωση φαρμακευτικών ουσιών και οινοπνευματωδών ποτών για 10 ημέρες τουλάχιστον πριν την ημερομηνία της αιμοληψίας. Στους εθελοντές αυτούς γινόταν μία αιμοληψία 10 ml αίματος την εβδομάδα

χρησιμοποιώντας ως αντιπηκτικό, κιτρικά (1 ml διαλύματος κιτρικών / 9 ml αίματος). Το αίμα φυγοκεντρήθηκε στις 900 rpm επί 10 min, για το διαχωρισμό του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος (PRP) και φυλάχθηκε στους 37°C για τις δοκιμασίες συσσώρευσης και το εναπομείναν φυγοκεντρήθηκε στις 3100 rpm επί 15 min για το διαχωρισμό του φτωχού σε αιμοπετάλια πλάσματος (PPP), το οποίο κατόπιν χρησιμοποιήθηκε για τη ρύθμιση (calibration) του συσσωρευόμετρου. Για την πραγματοποίηση κάθε δοκιμής υπήρχαν δύο κυψελίδες. Στην πρώτη προστέθηκαν 450 μl PRP και ένας μικρός πλαστικοποιημένος μαγνήτης για την ανάδευση του πλάσματος. Κατόπιν ρυθμίστηκε την ταχύτητα περιστροφής του μαγνήτη στις 1500 rpm ώστε το PRP να αναδεύεται ισχυρά προσομοιάζοντας τις συνθήκες της στροβιλώδους αιματικής ροής στην οποία η αιμοπεταλιακή συσσώρευση συμβαίνει αυθόρμητα. Αυτή λειτουργούσε ως μέτρηση ελέγχου και μηδενισμού. Στη δεύτερη κυψελίδα τοποθετήθηκε ίση ποσότητα (450 μl) PPP και το οποίο αντιστοιχεί σε μέγιστη, μη αντιστρεπτή αιμοπεταλιακή συσσώρευση (συσσώρευση 100%). Μετά από τη ρύθμιση (calibration) της συσκευής και με το PPP πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμές συσσώρευσης με το σύμπλοκο σε διάφορες συγκεντρώσεις. Για τον έλεγχο των αιμοπεταλίων χρησιμοποιήθηκαν 450μl PRP και προστέθηκε ένας από τους διεγέρτες συσσώρευσης (ADP, PAF ή LMS) ώστε τα αιμοπετάλια να διεγερθούν και να συσσωρευτούν κατά μη αντιστρεπτό τρόπο.

Σε μια κυψελίδα προστέθηκαν τα 450μl PRP και στη συνέχεια ποσότητα διαλύματος του συμπλόκου και αφέθηκαν να επωαστούν για 2 – 3 min. Μετά την επώαση τοποθετήσαμε στην κυψελίδα έναν από τους προαναφερθέντες διεγέρτες ADP, PAF, LMS κύτταρα. Υπολογίστηκε η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλούσε 50% αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης ($IC_{50}PLT$) καθώς και η ελάχιστη συγκέντρωσή της που προκαλούσε πλήρη αιμοπεταλιακή αναστολή (MIC). Αντίστοιχα έγιναν και δοκιμές για τη

συσσώρευση ή την αναστολή συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με τον διαλύτη του συμπλόκου (DMSO).

3.4 In vivo

3.4.1 Τοξικότητα σε επίμυες Wistar

3.4.1.1 Οξεία τοξικότητα

Για τα πειράματα οξείας τοξικότητας χρησιμοποιήθηκαν 35 θηλυκοί επίμυες Wistar, ηλικίας 2-3 μηνών και βάρους 190±15gr. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 4 επιμέρους ομάδες. Τα πειραματόζωα δεν τράφηκαν για 4-5 ώρες πριν την πειραματική διαδικασία. Τα πειραματόζωα της ομάδας οξείας τοξικότητας OT1 (10 πειραματόζωα) έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά μία εφάπαξ δόση του συμπλόκου των 0.8mg/Kg ΣΒ διαλυμένη σε 1ml διαλύματος τρικαπριλίνης. Τα πειραματόζωα των ομάδων OT2 και OT3 (10 πειραματόζωα/ομάδα) έλαβαν 8mg/Kg ΣΒ και 80mg/Kg ΣΒ αντιστοίχως. Αυτό έγινε για να επιτύχουμε μια λογαριθμική αύξηση της δόσης. Τα πειραματόζωα της ομάδας OT4 (5 πειραματόζωα) αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου και έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά μόνο την αντίστοιχη ποσότητα του διαλύτη (1ml τρικαπριλίνης). Μισή ώρα μετά την χορήγηση του συμπλόκου τα πειραματόζωα αφέθηκαν ελεύθερα να τραφούν. Γινόταν έλεγχος δύο φορές την ημέρα και καταγράφονταν όλες οι παρατηρήσεις. Κάθε δύο μέρες γινόταν μέτρηση του Σωματικού Βάρους (ΣΒ) των πειραματοζώων και το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης τοξικότητας. Η ποσοστιαία αλλαγή του ΣΒ υπολογίστηκε ως η ΔΣΒ% και η οποία δίνεται από τον εξής τύπο:

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

Όπου Π = ημέρα πειράματος

Όσα από τα πειραματόζωα δεν κατέληξαν, θυσιάστηκαν την 5^η ημέρα με αιθέρα. Τα εσωτερικά όργανα αφαιρέθηκαν *en bloc* και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία που περιείχε φορμαλδεΰδη 10% για την μονιμοποίησή τους. Έπειτα λήφθηκαν αντιπροσωπευτικές τομές από κάθε όργανο και εμβαπτίστηκαν σε κύβους παραφίνης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν λεπτές τομές (4μm) στους ιστούς και χρώστηκαν με την ειδική χρώση haematoxylin-eosin. Οι τομές εξετάστηκαν κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο.

3.4.1.2 Χρόνια τοξικότητα

Για να μελετήσουμε την χρόνια τοξικότητα του συμπλόκου χρησιμοποιήθηκαν 30 επίμυες Wistar 2-3 μηνών και 190±15gr. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες (10 πειραματόζωα ανά ομάδα). Η επιλογή των δόσεων σε αυτή την πειραματική διαδικασία έγινε με βάση τα αποτελέσματα της οξείας τοξικότητας (παράγραφος 3.4.1.1). Τα πειραματόζωα της ομάδας 1 της χρόνιας τοξικότητας, XT1, λάμβαναν μια δόση 5.4mg/Kg ΣΒ, διαλυμένα σε 1ml τρικαπριλίνης, την εβδομάδα για 4 εβδομάδες. Τα πειραματόζωα της ομάδας XT2 λάμβαναν μια δόση 8mg/Kg ΣΒ, διαλυμένα σε 1ml τρικαπριλίνης, την εβδομάδα για 4 εβδομάδες. Η τρίτη ομάδα πειραματοζώων, XT3, αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου και λάμβανε 1ml τρικαπριλίνης την εβδομάδα για 4 εβδομάδες. Όλα τα ζώα παρακολουθούνταν μια φορά την ημέρα ως προς τη συμπεριφορά τους. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του ΣΒ κάθε 2 ημέρες και αυτό χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης τοξικότητας. Η ποσοστιαία αλλαγή του ΣΒ υπολογίστηκε όπως πριν (παράγραφος 3.4.1.1). Όσα πειραματόζωα δεν κατέληξαν θανατώθηκαν στο τέλος του πειράματος (μετά το πέρας των 4 εβδομάδων) με αιθέρα. Έγινε αμέσως αυτοψία, αφαίρεση και

μονιμοποίηση των εσωτερικών οργάνων σε φορμαλδεΰδη 10%. Επίσης πραγματοποιήθηκε ιστοπαθολογική εξέταση.

3.4.2 Ενοφθαλμισμός επίμυων Wistar

Ο ενοφθαλμισμός είναι ένα ταχύ και με μεγάλο ποσοστό επιτυχίας μοντέλο ανάπτυξης όγκων σε πειραματόζωα για να μπορέσουμε να μελετήσουμε την αντικαρκινική δράση των διαφόρων συμπλόκων χωρίς να περιμένουμε αρκετούς μήνες όπως αυτό συμβαίνει στο μοντέλο της χημικής καρκινογένεσης. Καλλιεργήθηκαν τα LMS σε τρυβλία 96mm και αφέθηκαν να φτάσουν σε πλήρη ανάπτυξη. Έπειτα αποκολλήθηκαν τα κύτταρα και συλλέχθηκαν σε falcon, ενώ πραγματοποιήθηκε μέτρηση για να υπολογιστεί ο ακριβής αριθμός τους. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε Hank's balanced solution έτσι ώστε να υπάρχουν $3.5-4 \times 10^6$ LMS κύτταρα / ml διαλύματος. Το διάλυμα των κυττάρων τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένη σύριγγα (5G) των 5ml. Για την αναισθητοποίηση του κάθε πειραματόζωου χρησιμοποιήθηκαν 0.5-1 ml αναισθητικού (10% ketamine, 40% midazolame και 50% φυσιολογικός ορός 0.9%). Μετά την αναισθητοποίηση, ακινητοποιήθηκε το πειραματόζωο και έγινε μια μικρή τομή στο ανώτερο δεξιό τμήμα της ωμοπλάτης. Κατόπιν το πειραματόζωο τραυματίστηκε ελαφρά εσωτερικά της τομής και προκλήθηκε αιμορραγία. Εκείνη τη στιγμή έγινε έγχυση 1ml του κυτταρικού διαλύματος. Μια ποσότητα κυτταρικού διαλύματος προστέθηκε ξανά σε καλλιεργητικό υγρό (DMEM) και πραγματοποιήθηκε παράλληλα έλεγχος για την ικανότητα ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Έγινε προσεκτική συρραφή της τομής με ράμματα V7 και στη συνέχεια το κάθε πειραματόζωο τοποθετήθηκε σε ξεχωριστό κλουβί μέχρι να συνέλθει από την αναισθησία. Αυτό έγινε για να αποφευχθεί το φαινόμενο του «κανιβαλισμού», όπου το ένα πειραματόζωο τρώει το άλλο. Τα

πειραματόζωα ελέγχονταν δύο φορές την ημέρα για τις πρώτες 10 ημέρες όπου και υπήρξαν οι πρώτοι ψηλαφητοί όγκοι.

3.4.3 Αντικαρκινική δράση σε καρκινοπαθείς επίμυες Wistar

3.4.3.1 Δράση του συμπλόκου

Για την πραγματοποίηση αυτής της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν 20 θηλυκοί επίμυες Wistar ηλικίας 2-3 μηνών και 190 ± 15 gr ΣΒ. Πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός LMS κυττάρων και στους 20 επίμυες όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.3. Μετά το πέρας 10 ημερών όλοι οι επίμυες Wistar ανέπτυξαν ψηλαφητούς όγκους (>1.5 cm) στην ανώτερη δεξιά πλευρά της ωμοπλάτης. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 2 ομάδες: η πρώτη είναι η ομάδα ελέγχου ΟΕ, στην οποία τα καρκινοπαθή πειραματόζωα δεν έλαβαν τίποτα και αφέθηκαν στους κλωβούς μέχρι να καταλήξουν. Τα πειραματόζωα της ομάδας πειράματος ΟΠ, λάμβαναν ενδοπεριτοναϊκά 5.4mg/Kg ΣΒ συμπλόκου διαλυμένα σε 1ml τρικαπριλίνης κάθε 3 ημέρες. Όλα τα πειραματόζωα ελέγχονταν μία φορά την ημέρα. Μετά τον θάνατο του κάθε ζώου, καταγράφηκε η ημερομηνία, πραγματοποιήθηκε αυτοψία, τα εσωτερικά όργανα μονιμοποιήθηκαν σε φορμαλδεΰδη 10% και πραγματοποιήθηκε ιστοπαθολογική μελέτη. Βάσει των ημερομηνιών θανάτου, υπολογίστηκαν και για τις δύο ομάδες ο μέσος όρος επιβίωσης (MST), το μέσο βάρος του όγκου (MTW) και ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης του όγκου (MTGR). Ο ρυθμός ανάπτυξης του όγκου για κάθε πειραματόζωο υπολογίστηκε από την παρακάτω σχέση:

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

3.4.3.2 Δράση των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων συχνοτήτων συντονισμού

Σε αυτό το κομμάτι της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν 40 επίμυες Wistar. Μετά τον ενοφθαλμισμό αυτών (περιγράφεται στην παράγραφο 3.4.2) και την ανάπτυξη ψηλαφητού όγκου (περίπου 12 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό), τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 5 ομάδες: ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η ομάδα ΟΕ (5 επίμυες) της προηγούμενης πειραματικής διαδικασίας, στην πρώτη ομάδα πειράματος (ΟΠ1) (5 επίμυες) εγχύθηκε ενδοπεριτοναϊκά μη αποτελεσματική συγκέντρωση του συμπλόκου (4x5.4μg/Kg ΣΒ) διαλυμένη σε 1ml τρικαπριλίνης. Η δεύτερη ομάδα πειράματος (ΟΠ2) (10 επίμυες) αποτελείται από καρκινοπαθή πειραματόζωα τα οποία εκτέθηκαν σε ηλεκτρομαγνητικό φάσμα συχνοτήτων συντονισμού (22 συχνότητες) του συμπλόκου για 5h καθημερινά. Τα πειραματόζωα της τρίτης ομάδας πειράματος (ΟΠ3 – 10 επίμυες), έλαβαν μη αποτελεσματική δράση του συμπλόκου (όπως οι επίμυες της ΟΠ1) και ταυτόχρονα εκτέθηκαν σε ηλεκτρομαγνητικό πεδίο συχνοτήτων συντονισμού του συμπλόκου (όπως οι επίμυες της ΟΠ2) για 5h καθημερινά. Τέλος, τα πειραματόζωα της τέταρτης ομάδας πειράματος ΟΠ4 (5 επίμυες) εκτέθηκαν σε ηλεκτρομαγνητικό φάσμα 22 τυχαίων συχνοτήτων καθημερινά. Τα πειραματόζωα ελέγχονταν καθημερινά και καταγραφόταν η ημερομηνία θανάτου τους. Μετά τον θάνατο του κάθε ζώου, καταγράφηκε η ημερομηνία, πραγματοποιήθηκε αυτοψία, τα εσωτερικά όργανα μονιμοποιήθηκαν σε φορμαλδεΰδη 10% και πραγματοποιήθηκε ιστοπαθολογική μελέτη. Όπως στην προηγούμενη παράγραφο (2.4.4.1) έτσι και εδώ υπολογίστηκαν οι MST, TGR και MTGR.

3.4.4 Tail Flick Test

Οι αναλγητικές επιδράσεις της μορφίνης και του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου συχνοτήτων συντονισμού της, που προκύπτουν από το NMR φάσμα της μορφίνης (παράγραφος 3.1.1), μελετήθηκαν με το Tail Flick Test και το Hot Plate Test. Στη tail flick δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν 25 πειραματόζωα που χωρίστηκαν σε 5 ομάδες: στην πρώτη ομάδα (TFT1) τα πειραματόζωα δεν έλαβαν καμία μεταχείριση, στη δεύτερη ομάδα (TFT2) σε κάθε πειραματόζωο χορηγήθηκαν 10mg/kg ΣΒ μορφίνης, στη τρίτη ομάδα (TFT3) τα πειραματόζωα εκτέθηκαν σε ηλεκτρομαγνητικό φάσμα 36 συχνοτήτων συντονισμού για 5 συνεχόμενες ώρες, στην τέταρτη ομάδα (TFT4) σε κάθε πειραματόζωο χορηγήθηκε 1mg/kg ΣΒ naloxone και ταυτόχρονα εκτέθηκαν σε ηλεκτρομαγνητικό φάσμα 36 συχνοτήτων συντονισμού για 5 συνεχόμενες ώρες και τέλος η πέμπτη ομάδα (TFT5) όπου τα πειραματόζωα εκτέθηκαν σε ηλεκτρομαγνητικό φάσμα τυχαίων επιλεγμένων συχνοτήτων για 5 συνεχόμενες ώρες.

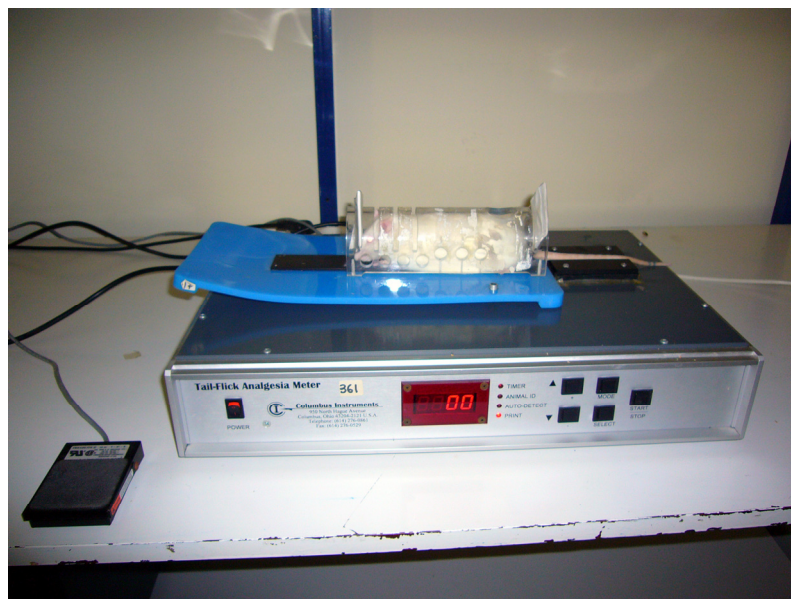
Για τη μέτρηση στο tail flick έλεγχο το κάθε πειραματόζωο τοποθετήθηκε σε μια πλαστική βάση και ακινητοποιήθηκε έτσι ώστε η ουρά του να βρίσκεται εκτεθειμένη σε μια συγκεκριμένη θέση όπου από εκεί διέρχεται η δέσμη φωτός που παράγεται από μια θερμική λάμπα ($55\pm 1^{\circ}\text{C}$) (Εικόνα 2). Αρχίζει η καταγραφή του χρόνου και ανάβει αυτόματα η θερμική δέσμη φωτός. Ο χρόνος παγώνει όταν η ουρά του πειραματόζωου εκτείνεται εκτός της δέσμης φωτός και καταγράφεται ο χρόνος απόκρισης (latency time). Ο μέγιστος χρόνος που αφήνουμε την ουρά του πειραματόζωου στη θερμική δέσμη φωτός είναι 15sec (cut-off time), για να αποφύγουμε θερμικούς τραυματισμούς (εγκαύματα). Όλες οι μετρήσεις για την καταγραφή των αναλγητικών επιδράσεων ήταν στις 1, 5 και 6h.

Για το tail flick test η τιμή αναφοράς (φυσική απόκριση στην βλαβερή διέγερση) καταγράφηκε πριν από την έναρξη οποιασδήποτε πειραματικής διαδικασίας. Δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφορά ως προς την τιμή αναφοράς μεταξύ των

πειραματικών ομάδων και οι χρόνοι απόκρισης κανονικοποιούνται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Δείκτης αναλγητικής δραστηριότητας (IAA)} = (\text{χρόνος απόκρισης πειράματος}) - (\text{χρόνος απόκρισης τιμής αναφοράς}) / (\text{μέγιστος επιτρεπτός χρόνος}) - (\text{χρόνος απόκρισης τιμής αναφοράς}) \text{ (Εξίσωση 4)}$$

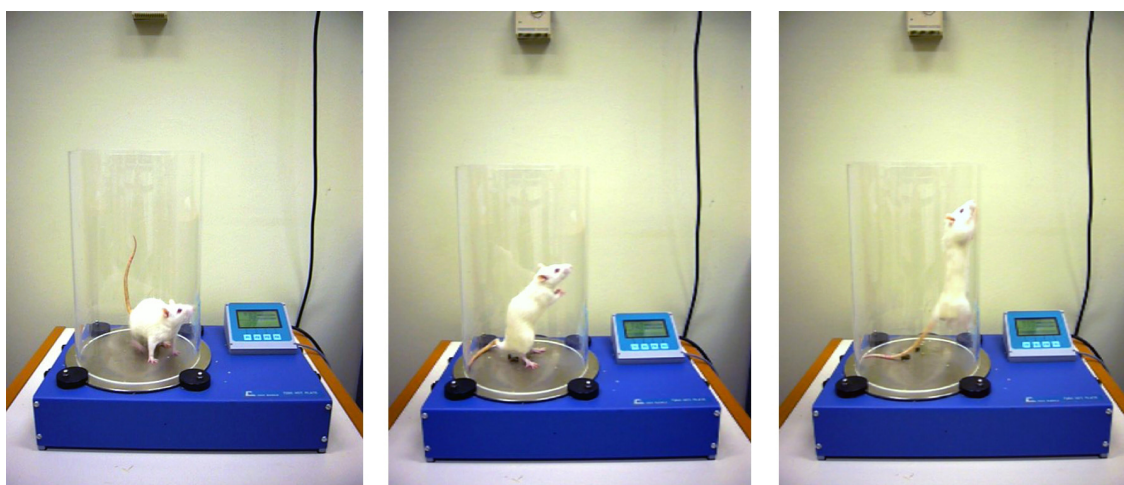
Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μ.Ο.±τ.α. των χρόνων απόκρισης και σχεδιάζονται τα γραφήματα των τιμών IAA ως προς τις χρονικές περιόδους καταγραφής. Επίσης υπολογίζεται το εμβαδό κάτω από την καμπύλη (AUC) στα γραφήματα IAA-χρονικές περιόδοι και αναπαριστάται σε νέα γραφήματα για τη κάθε πειραματική ομάδα.



Εικόνα 2. Απεικονίζει τη συσκευή που χρησιμοποιείται για την πειραματική διαδικασία Tail Flick Test μαζί με ένα από τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν.

3.4.5 Hot Plate Test

Στο hot plate έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν 35 πειραματόζωα και χωρίστηκαν σε 7 ισοδύναμες ομάδες όπως ακριβώς και στην πειραματική διαδικασία του Tail Flick Test με τη διαφορά ότι υπάρχουν δύο επιπλέον ομάδες: πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε αναποτελεσματική συγκέντρωση μορφίνης (0.1mg/kg ΣΒ) (HPT6) και πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε αναποτελεσματική συγκέντρωση μορφίνης και παράλληλα εκτέθηκαν στις 36 συχνότητες συντονισμού (HPT7). Οι ομάδες ελέγχου και πειράματος χαρακτηρίζονται ως HPT1 και HPT2-HPT7, αντίστοιχα. Το κάθε πειραματόζωο τοποθετήθηκε στη συσκευή hot plate (Eddy's hot-plate) με πλαστικοποιημένα τοιχώματα και η θερμοκρασία ήταν ρυθμισμένη στους $55\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Εικόνα 3). Σταματούσαμε το χρόνο καταγραφής είτε όταν κάποιο πειραματόζωο πηδούσε προς τα τοιχώματα είτε όταν έγλυφε τα μπροστινά τους πόδια. Ο χρόνος καταγραφόταν και το πειραματόζωο τοποθετούνταν στο αντίστοιχο κλουβί του. Ο μέγιστος επιτρεπτός χρόνος παραμονής τους πειραματόζωου στη συσκευή hot plate ήταν 40sec ώστε να μην προκληθεί κάποια βλάβη. Όπως στο tail flick test έτσι και για το hot plate test υπολογίζεται η τιμή αναφοράς, ο IAA (Εξίσωση 4) και του AUC καταγράφηκαν και δημιουργήθηκαν τα αντίστοιχα γραφήματα.



Εικόνα 3. Απεικονίζει τη συσκευή που χρησιμοποιείται για την πειραματική διαδικασία Hot Plate Test μαζί με ένα από τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν.

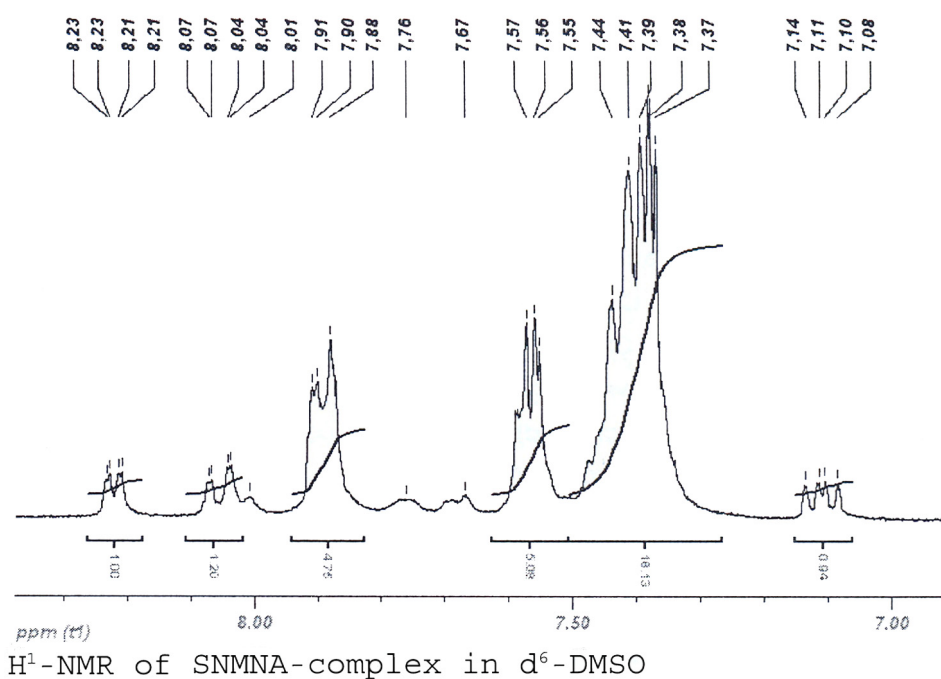
3.4.6. Στατιστική ανάλυση

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

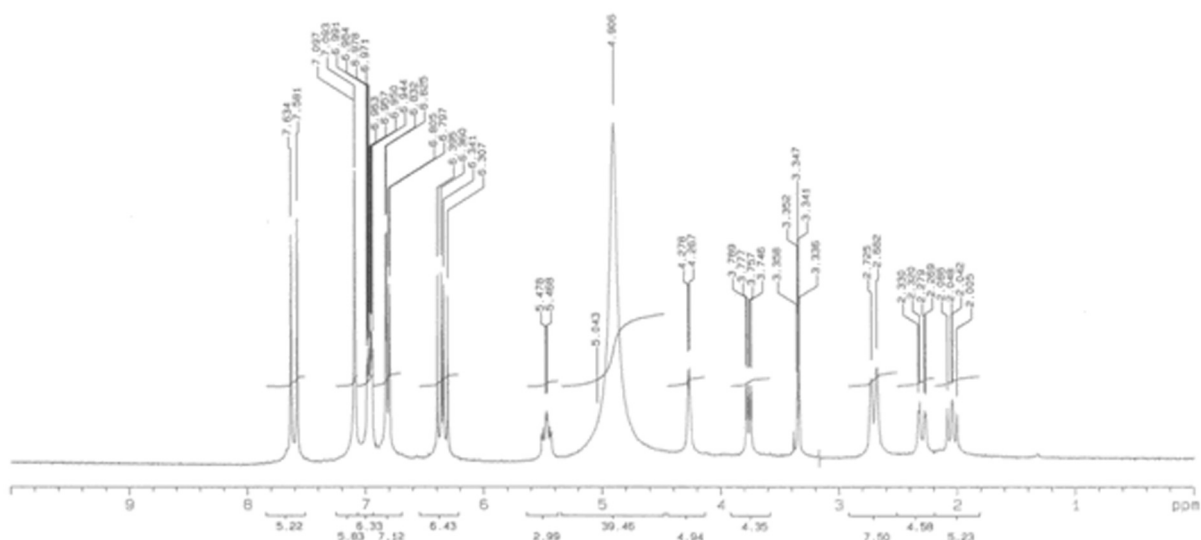
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Συχνότητες συντονισμού από το $^1\text{H-NMR}$ φάσμα του SnMNA και της μορφίνης

Τα παρακάτω σχήματα, 4.1 και 4.2, αναπαριστούν τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ του SnMNA και της μορφίνης. Επιπλέον μετά τα σχήματα των φασμάτων ακολουθεί ένας συγκεντρωτικός Πίνακας (Πίνακας 4.1) που αναλύει τη μετατροπή των συχνοτήτων συντονισμού των φασμάτων του SnMNA και της μορφίνης που χρησιμοποιήθηκαν στα αντίστοιχα πειράματα με βάση την εξίσωση 3.



Σχήμα 4.1. Απεικόνιση του $^1\text{H-NMR}$ φάσματος του SnMNA



Σχήμα 4.2. Απεικόνιση του $^1\text{H-NMR}$ φάσματος της μορφίνης

Πίνακας 4.1. Μετατροπή των συχνοτήτων

A/A	SnMNA		Μορφίνη	
	Χημική μετατόπιση (ppm)	Συχνότητα συντονισμού* (Hz)*	Χημική μετατόπιση (ppm)	Συχνότητα συντονισμού (Hz)**
1	7.08	1770	2.048	410
2	7.1	1775	2.086	417
3	7.11	1778	2.279	456
4	7.14	1785	2.32	464
5	7.37	1843	2.33	466
6	7.38	1845	2.682	536
7	7.39	1848	2.725	545
8	7.41	1853	3.048	610
9	7.44	1860	3.352	670
10	7.55	1888	3.358	672
11	7.56	1890	3.746	749
12	7.57	1893	3.757	751
13	7.67	1918	3.777	755
14	7.76	1940	3.789	758
15	7.88	1970	4.048	810
16	7.9	1975	4.267	853
17	7.91	1978	4.278	856
18	8.01	2003	4.906	981
19	8.04	2010	5.043	1009
20	8.07	2018	5.468	1094
21	8.21	2053	5.478	1096
22	8.23	2058	6.307	1261

23	6.341	1268
24	6.36	1272
25	6.395	1279
26	6.797	1359
27	6.805	1361
28	6.825	1365
29	6.832	1366
30	6.957	1391
31	6.971	1394
32	6.984	1397
33	6.991	1398
34	7.097	1419
35	7.581	1516
36	7.634	1527

Υπάρχει στρογγυλοποίηση ως προς το πρώτο δεκαδικό ψηφίο στις συχνότητες συντονισμού.

* Η βασική συχνότητα του οργάνου ήταν 250 MHz (δες παρ. 3.1.1)

** Η βασική συχνότητα του οργάνου ήταν 200 MHz (δες παρ. 3.1.1)

Βάση της εξίσωσης 2, υπολογίσαμε το σύνολο της ενέργειας των 22 συχνοτήτων του SnMNA και των 36 συχνοτήτων της μορφίνης. Το σύνολο της ενέργειας θα χρησιμοποιηθεί έτσι ώστε και οι αντίστοιχες τυχαίες συχνότητες να έχουν σχεδόν την ίδια ενέργεια.

Για το SnMNA η συνολική ενέργεια των 22 συχνοτήτων (από το NMR φάσμα) είναι:

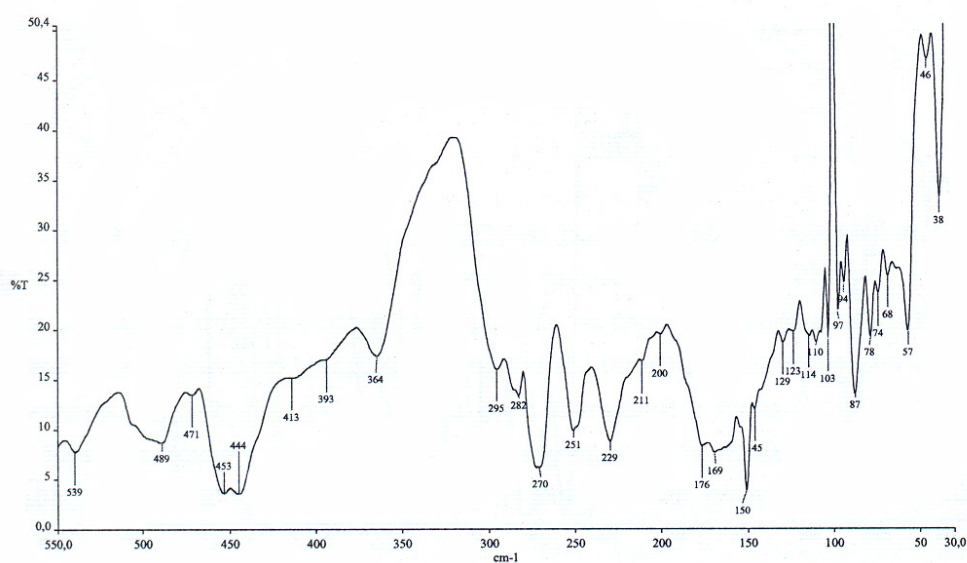
$$\sum_{i=1}^{22} Ei = h \cdot \sum_{i=1}^{22} fi \Rightarrow \sum_{i=1}^{22} Ei = 1.7347 \cdot 10^{-10} eV$$

Για τη μορφίνη η συνολική ενέργεια των 36 συχνοτήτων (από το NMR φάσμα) είναι:

$$\sum_{i=1}^{36} Ei = h \cdot \sum_{i=1}^{36} fi \Rightarrow \sum_{i=1}^{36} Ei = 1.46944 \cdot 10^{-10} eV$$

4.2 Συχνότητες από το IR φάσμα του SnMNA

Όπως και στην παράγραφο 4.1 έτσι και εδώ παρουσιάζεται το σχήμα του φάσματος IR του συμπλόκου και ο Πίνακας (Πίνακας 4.2) που αναλύει τον υπολογισμό των συχνοτήτων που χρησιμοποιήθηκαν.



Σχήμα 4.3. Far IR φάσμα του SnMNA

Πίνακας 4.2. Μετατροπή των συχνοτήτων

SnMNA			
A/A	Αντίστροφο μήκους κύματος (cm^{-1})	Συχνότητα (GHz)	Αρμονική Συχνότητα (Hz)
1	38	1140	1140
2	46	1380	1380
3	78	2340	2340
4	87	2610	2610
5	97	2910	2910
6	110	3300	3300
7	123	3690	3690
8	129	3870	3870
9	150	4500	4500
10	176	5280	5280

11	200	6000	6000
12	270	8100	8100
13	295	8850	8850
14	364	10920	10920
15	375	11250	11250
16	393	11790	11790
17	413	12390	12390
18	421	12630	12630
19	445	13350	13350
20	471	14130	14130
21	483	14490	14490
22	489	14670	14670

Στον Πίνακα 4.2 η τρίτη στήλη αντιστοιχεί στις συχνότητες μετά από μετατροπή από το IR φάσμα του SnMNA. Η μετατροπή έγινε σύμφωνα με την εξίσωση 4. Επειδή οι συχνότητες είναι πολύ υψηλές χρησιμοποιήσαμε τις αρμονικές τους, οι οποίες είναι υποβαθμισμένες κατά ένα παράγοντα 10^{-9} .

Με βάση την εξίσωση 2, υπολογίσαμε το σύνολο της ενέργειας των 22 συχνοτήτων του SnMNA από το IR φάσμα. Το σύνολο της ενέργειας θα χρησιμοποιηθεί έτσι ώστε και οι αντίστοιχες τυχαίες συχνότητες να έχουν σχεδόν την ίδια ενέργεια.

Για το SnMNA η συνολική ενέργεια των 22 συχνοτήτων (από το IR φάσμα) είναι:

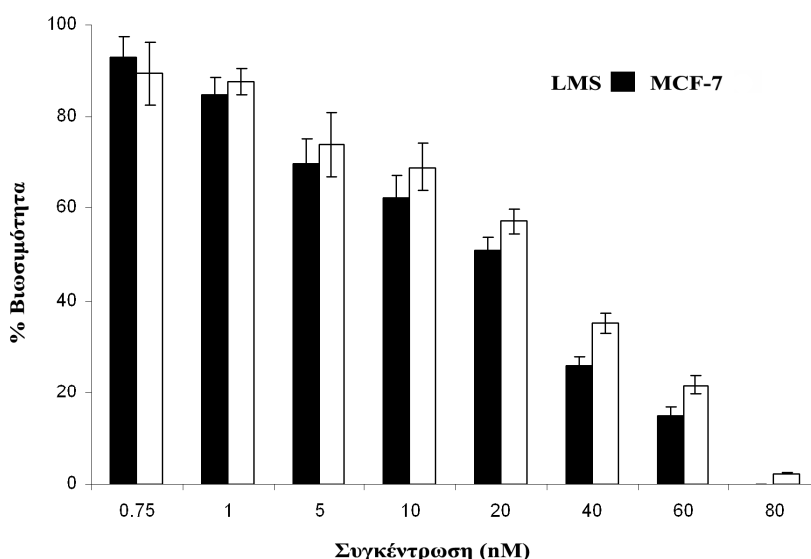
$$\sum_{i=1}^{22} Ei = h \cdot \sum_{i=1}^{22} fi \Rightarrow \sum_{i=1}^{22} Ei = 0.701366eV$$

Λόγω της μετατροπής των αρχικών συχνοτήτων σε αρμονικές, το σύνολο της ενέργειας των 22 αρμονικών είναι:

$$\sum_{i=1}^{22} Ei = h \cdot \sum_{i=1}^{22} fi \Rightarrow \sum_{i=1}^{22} Ei = 0.701366 \cdot 10^{-9} eV$$

4.3 *In vitro*

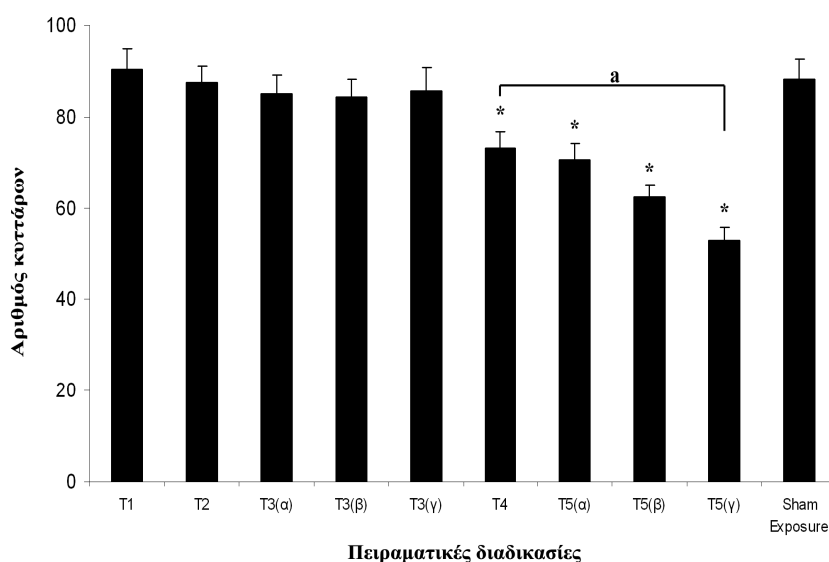
4.3.1 Κυτταρικής βιωσιμότητας με Trypan Blue



Γράφημα 4.1. Ποσοστό βιωσιμότητας των LMS και MCF-7 κυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του SnMNA και για 48 ώρες επώασης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Με βάση τα πειράματα της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο Trypan Blue υπολογίστηκε η συγκέντρωση του συμπλόκου που είναι ικανή να μειώσει κατά 50% την κυτταρική βιωσιμότητα (IC_{50}). Η τιμή αυτή υπολογίστηκε τόσο για τα LMS όσο και για τα MCF-7. Συγκεκριμένα για τα LMS η IC_{50} είναι 22.4 ± 5 nM και για τα MCF-7 είναι 29.9 ± 5.6 nM, όταν τα εν λόγω κύτταρα επώαστηκαν με το σύμπλοκο SnMNA για 48 ώρες. Παρατηρούμε ότι η τιμή αυτή είναι έως και 220 φορές μικρότερη σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή της cisplatin ($IC_{50} = 4-5$ μ M) (Hadjikakou et al. 2008). Από το Γράφημα 4.1 παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση του SnMNA που προκαλεί πλήρη κυτταρικό θάνατο τόσο στα LMS όσο και στα MCF-7 είναι 80 nM. Φαίνεται επίσης ότι η δράση του SnMNA είναι δόσοεξαρτώμενη τόσο για τα LMS όσο και για τα MCF-7. Παρά τη μεγάλη κυτταροτοξικότητα του SnMNA στις καρκινικές σειρές, αυτό παρουσιάζει μικρότερη

δραστικότητα στους φυσιολογικούς ινοβλάστες με την IC_{50} τιμή να είναι μεγαλύτερη από 300nM. Αυτό είναι πολύ σημαντικό και θα συνδυαστεί αργότερα με τα αποτελέσματα των *in vivo* πειραμάτων.



Γράφημα 4.2. Βιωσιμότητα των LMS κυττάρων στις 5 πειραματικές διαδικασίες (T1-T5). T1: Διπλό τυφλό; T2: Τυφλό (εκτός επωαστή για 2x45min); T3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); T4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x45min; T5: Συνέργεια (Συνδυασμός των T3+T4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την T2, $p < 0.05$. ^aΣτατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των T4 και T5(γ), $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

Πραγματοποιήθηκε σπορά κυττάρων για τα LMS κύτταρα και τα πολυτροβλία χωρίστηκαν σε 5 διαφορετικές πειραματικές διαδικασίες. Στα παραπάνω διαγράμματα αποτελεσμάτων αυτές αναφέρονται ως T1: το πολυτροβλίο παραμένει στον επωαστή, T2: το πολυτροβλίο τοποθετείται στον κλωβό Faraday για 45min/ημέρα για δυο συνεχόμενες ημέρες, T3: γίνεται προσθήκη μη αποτελεσματικών συγκεντρώσεων του συμπλόκου (α) 10^{-12} M, (β) 10^{-15} M και (γ) 10^{-18} M, T4: έκθεση των πολυτροβλίων στις 22 συχνότητες

συντονισμού που προκύπτουν από το $^1\text{H-NMR}$ φάσμα του SnMNA για 45min/ημέρα για 2 ημέρες και T5: ταυτόχρονη προσθήκη του SnMNA σε αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις (α) 10^{-12}M , (β) 10^{-15}M και (γ) 10^{-18}M και έκθεση στις 22 συχνότητες συντονισμού για 45min/ημέρα για 2 συνεχόμενες ημέρες. Ουσιαστικά η T5 πειραματική διαδικασία είναι συνδυασμός της T3 και T4.

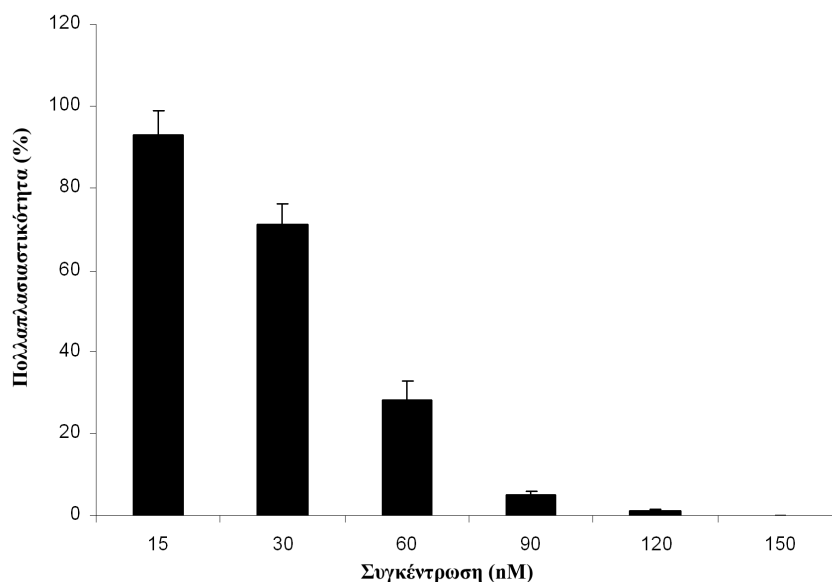
Η πειραματική διαδικασία T2 θεωρείται ως το τυφλό (control) στην οποία ανάγονται τα αποτελέσματα των πειραματικών διαδικασιών T3, T4 και T5. Η πειραματική διαδικασία T1 αποτελεί το διπλό τυφλό, βάση της οποίας γίνεται έλεγχος μόνο για τη πειραματική διαδικασία T2. Από το Γράφημα 4.2, παρατηρούμε ότι τα LMS κύτταρα στην T2 εμφανίζουν μικρή μείωση (3.2%) στον κυτταρικό πληθυσμό σε σύγκριση με τη πειραματική διαδικασία T1. Αυτό είναι σημαντικό λόγω του ότι τα κύτταρα δεν επηρεάζονται (κυτταρικός θάνατος) όταν βρίσκονται εκτός επωαστή για το χρονικό διάστημα των 45min των δύο συνεχόμενων ημερών. Επομένως, οποιαδήποτε επιπρόσθετη μείωση εμφανιστεί στις υπόλοιπες πειραματικές διαδικασίες θα οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στον εκάστοτε παράγονται και όχι στην 2x45 min παραμονή των πολυτροβλίων εκτός επωαστή. Αναμενόμενα είναι και τα αποτελέσματα της T3:(α), (β), (γ), όπου το SnMNA προστέθηκε σε αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις. Ο κυτταρικός πληθυσμός της T3 παρουσίασε μια ελάχιστη μείωση που κυμαίνεται από 2.1-3.7% σε σύγκριση με τον κυτταρικό αριθμό της T2.

Αντιθέτως, τα αποτελέσματα των πειραματικών διαδικασιών T4 και T5 είναι διαφορετικά, ειδικότερα για την πειραματική διαδικασία T5(γ). Όταν τα κύτταρα της T4 εκτέθηκαν για 2x45min στα ΗΜΠΣΣ παρουσίασαν μια στατιστικά σημαντικά αύξηση στην κυτταροτοξική δράση σε σχέση με την T2 (16.2%) ($p<0.05$). Η κυτταροτοξική δράση αυξήθηκε αρκετά όταν προστέθηκε το SnMNA σε αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις και ταυτόχρονα τα κύτταρα εκτέθηκαν για 2x45min στα ΗΜΠΣΣ. Συγκεκριμένα υπήρχε

στατιστικά σημαντική μείωση 19.1%, 28.7% και 39.4% για τις πειραματικές διαδικασίες T5(α), (β) και (γ) αντιστοίχως ($p < 0.05$). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν σε τυχαίες συχνότητες (sham exposure) για 2x45 min δεν υπήρξε καμία διαφορά στον κυτταρικό αριθμό σε σύγκριση με τη T2.

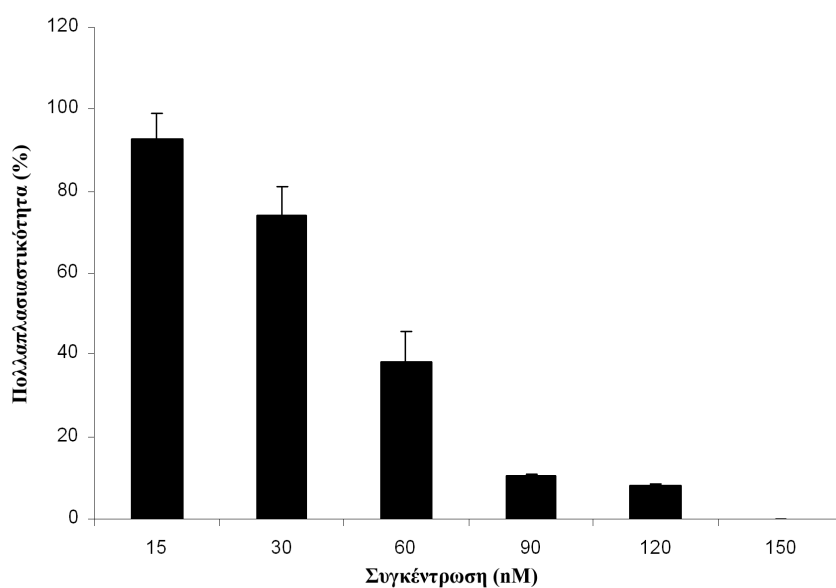
4.3.2 Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη χρήση MTT

Με την χρήση του MTT προσδιορίστηκε η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε όλες τις κυτταρικές σειρές μετά την προσθήκη του SnMNA σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ή την έκθεση των κυττάρων σε ΗΜΠΣΣ. Παρακάτω ακολουθούν τα γραφήματα με τα αποτελέσματα της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες.



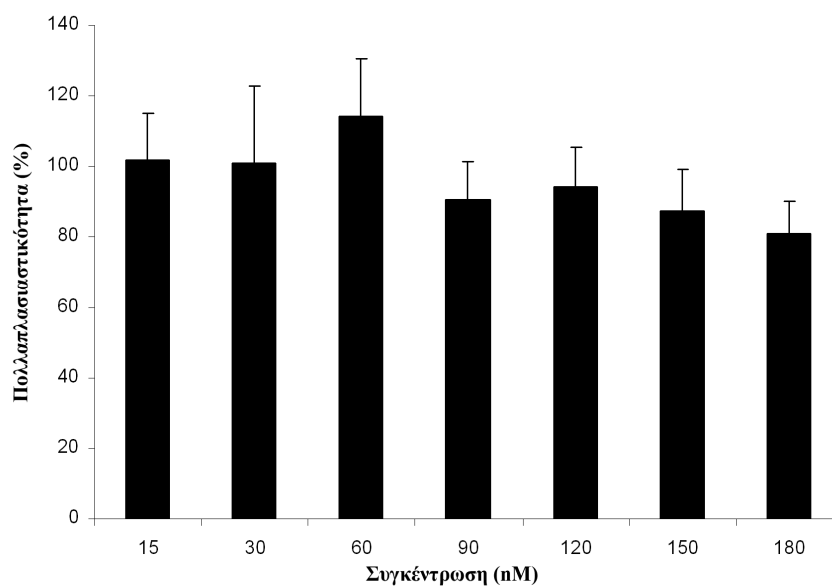
Γράφημα 4.3. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των LMS κυττάρων μετά πό 48 ώρες επώασης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του SnMNA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Σε αυτό το γράφημα παρουσιάζεται η αναστολή της πολλαπλασιαστικότητας των LMS κυττάρων μετά την προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων του SnMNA έπειτα από 48ώρες επώασης. Η IC_{50} τιμή του συμπλόκου για τα LMS κύτταρα είναι 40.7 ± 2.3 nM, ενώ παρατηρούμε ότι η αναστολή της πολλαπλασιαστικότητας μεγιστοποιείται λίγο πάνω από τα 90 nM.



Γράφημα 4.4. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MCF-7 κυττάρων μετά από 48 ώρες επώασης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του SnMNA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

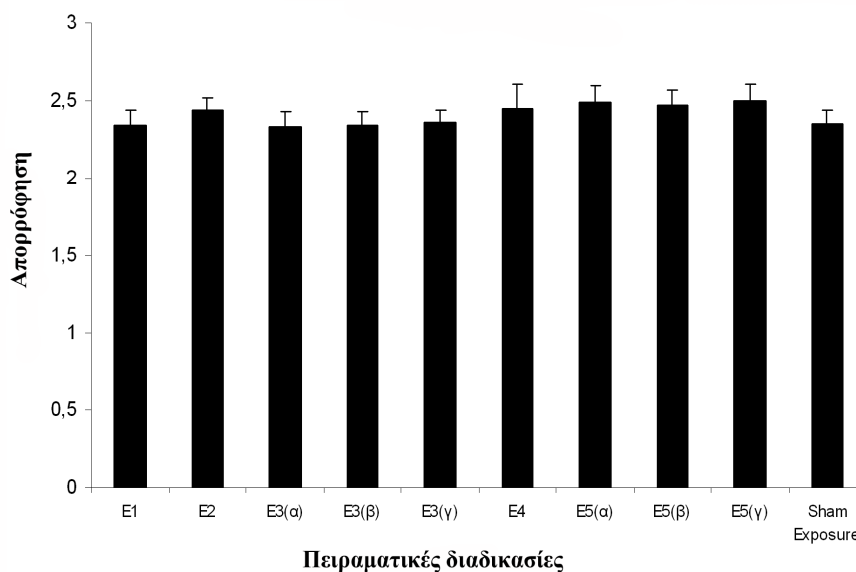
Στο Γράφημα 4.4 παρουσιάζεται η αναστολή της πολλαπλασιαστικότητας των MCF-7 κυττάρων μετά την προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων του SnMNA έπειτα από 48ώρες επώασης. Η IC_{50} τιμή του συμπλόκου για τα MCF-7 κύτταρα είναι 45.3 ± 3.3 nM, ενώ παρατηρούμε ότι η αναστολή της πολλαπλασιαστικότητας μεγιστοποιείται πάνω από τα 120 nM.



Γράφημα 4.5. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός των MRC-5 κυττάρων μετά πό 48 ώρες επώασης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του SnMNA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Στο Γράφημα 4.5 παρουσιάζεται η αναστολή της πολλαπλασιαστικότητας των MRC-5 κυττάρων μετά την προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων του SnMNA έπειτα από 48ώρες επώασης. Παρατηρούμε ότι το σύμπλοκο δεν έχει σημαντική κυτταροτοξική δράση μέχρι τα 200 nM.

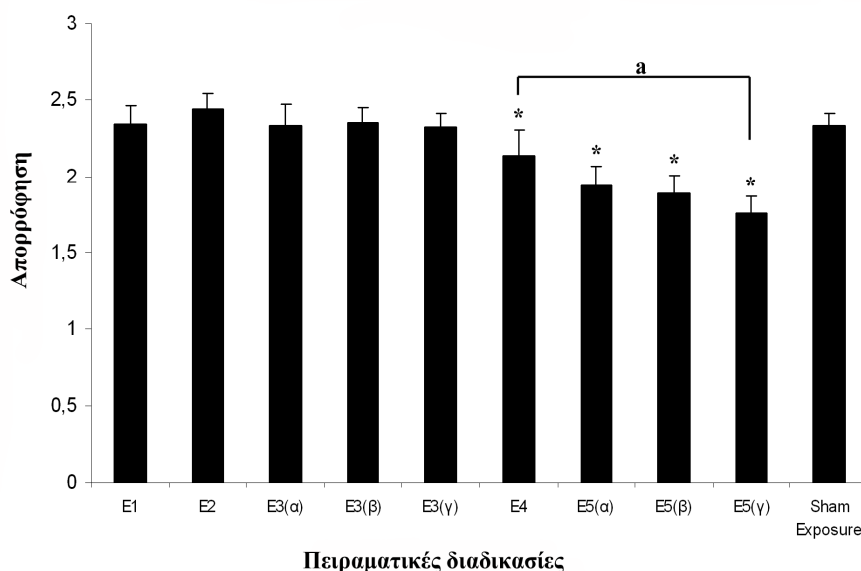
Ακολουθούν τα γραφήματα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού για τις 5 πειραματικές διαδικασίες (με τη χρήση 22 συχνοτήτων που εξήχθησαν από το NMR φάσμα του SnMNA) στα LMS, MCF-7 και MRC-5 κύτταρα.



Γράφημα 4.6. Τιμές απορρόφησης των LMS κυττάρων μετά από 48 ώρες επώσης στις κάθε μια από 5 πειραματικές διαδικασίες (2x45 λεπτά έκθεσης). E1: Διπλό τυφλό; E2: Τυφλό (εκτός επωαστή για 2x45min); E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x45min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Το Γράφημα 4.6 αναπαριστά την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των LMS κυττάρων στις διάφορες πειραματικές διαδικασίες. Εδώ, η αναστολή αυτή δεν περιγράφεται ως % πολλαπλασιαστικότητα όπως στο Γράφημα 4.3, αλλά αναφέρονται οι τιμές της απορρόφησης όπως αυτές προέκυψαν από την μέτρησή τους στο φασματοφωτόμετρο. Η μείωση της απορρόφησης ερμηνεύεται ως αύξηση της αναστολής πολλαπλασιαστικότητας. Το ίδιο ισχύει και για όλα τα ακόλουθα γραφήματα. Το γράφημα αυτό αφορά την έκθεση των LMS κυττάρων για 2x45min στις 22 συχνότητες συντονισμού του SnMNA. Παρατηρούμε ότι καμία από τις πειραματικές διαδικασίες δεν παρουσιάζει κάποια μείωση της απορρόφησης και μάλιστα οι πειραματικές διαδικασίες E4, E5(α), E5(β) και E5(γ) παρουσιάζουν μεγαλύτερη απορρόφηση, υποδηλώνοντας αύξηση της

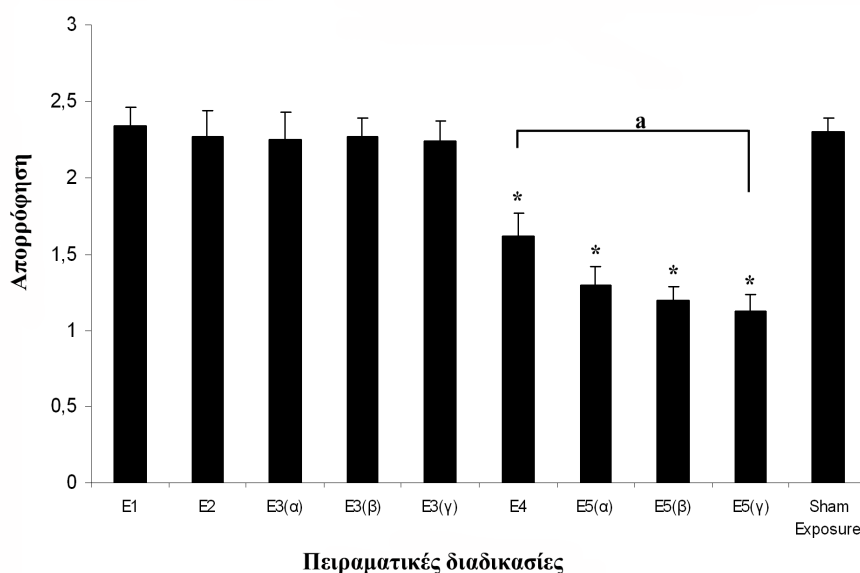
πολλαπλασιαστικότητας σε σύγκριση με την E1 και E2. Φαίνεται ότι σε αυτό το χρόνο έκθεσης δεν έχουμε αναστολή αλλά αύξηση της πολλαπλασιαστικότητας.



Γράφημα 4.7. Τιμές απορρόφησης των LMS κυττάρων μετά από 48 ώρες επώσης στις 5 πειραματικές διαδικασίες (2x120 λεπτά έκθεσης). E1: Διπλό τυφλό; E2: Τυφλό (εκτός επωαστή για 2x120min); E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x120min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την E2, $p < 0.05$. ^aΣτατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των E4 και E5(γ), $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Το Γράφημα 4.7 αυτό είναι το ίδιο με το γράφημα Γράφημα 4.6 με τη μόνη διαφορά ότι ο χρόνος έκθεσης είναι 2x120min. Η πειραματική διαδικασία E1 είναι η ίδια όπως πριν. Η πειραματική διαδικασία E2 δεν παρουσιάζει κάποια μεταβολή σε σύγκριση με την E1 και οι πειραματικές διαδικασίες E3(α), (β) και (γ) παρουσιάζουν μια μικρή μείωση από 3.9-4.8% σε σύγκριση με την E2. Ενώ στο προηγούμενο γράφημα (2x45min) οι πειραματικές διαδικασίες E4 και E5 παρουσίασαν αύξηση της απορρόφησης, σε αυτό το γράφημα (2x120min) έχουμε στατιστικά σημαντική μείωση της απορρόφησης.

Ειδικότερα, η πειραματική διαδικασία E4 παρουσιάζει μία σημαντική μείωση 12.7% ($p<0.05$), ενώ οι πειραματικές διαδικασίες E5(α), (β) και (γ) παρουσίασαν σημαντική αύξηση 21, 22.7 και 28% αντιστοίχως ($p<0.05$). Παρατηρούμε ότι σε όλη τη πειραματική διαδικασία E5 η μείωση της απορρόφησης ήταν μεγαλύτερη του απόλυτου αθροίσματος των πειραματικών διαδικασιών E3+E4. Αυτό σημαίνει ότι έχουμε ένα είδος συνέργειας το οποίο αποδίδει καλύτερα από το άθροισμα των αντίστοιχων πειραματικών διαδικασιών E3+E4. Όπως και πριν έτσι και σε αυτό το γράφημα η δράση των τυχαίων συχνοτήτων ήταν αμελητέα, της τάξης του 4.6% σε σύγκριση με την E2.



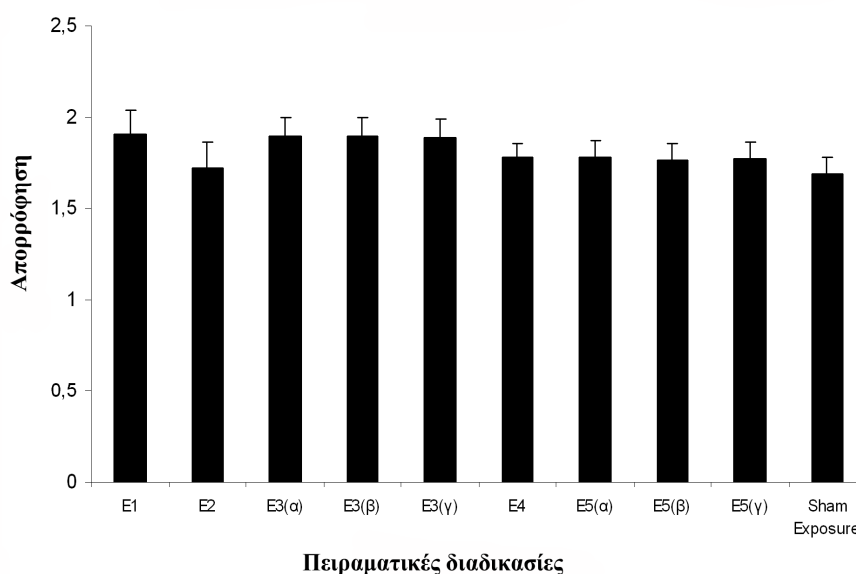
Γράφημα 4.8. Τιμές απορρόφησης των LMS κυττάρων μετά από 48 ώρες επώσης στις 5 πειραματικές διαδικασίες (2x300 λεπτά έκθεσης). E1: Διπλό τυφλό; E2: Τυφλό (εκτός επωαστή για 2x300min); E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x300min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνοτήτες. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την E2, $p<0.05$. ^aΣτατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των E4 και E5(γ), $p<0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Το γράφημα αυτό είναι το ίδιο με το γράφημα Γράφημα 4.6 με τη μόνη διαφορά ότι ο χρόνος έκθεσης είναι 2x300min. Η πειραματική διαδικασία E2 παρουσιάζει μια μείωση 2.8% σε σύγκριση με την E1. Οι πειραματικές διαδικασίες E3(α), (β) και (γ) είναι αμετάβλητες σε σύγκριση με την E2. Πολύ μεγάλη και στατιστικά σημαντική μείωση της απορρόφησης παρατηρήθηκε στις πειραματικές διαδικασίες E4 και E5. Ειδικότερα, στη πειραματική διαδικασία E4 είχαμε σημαντική μείωση 29.1% ($p<0.05$), ενώ στις πειραματικές διαδικασίες E5(α), (β) και (γ) είχαμε 43.1, 47.3 και 50.6% σε σύγκριση με την E2 ($p<0.05$). Όπως και στο γράφημα Γράφημα 4.7 έτσι και σε αυτό παρατηρήθηκε το φαινόμενο της συνέργειας, δηλαδή της μεγαλύτερης μείωσης της απορρόφησης στην πειραματική διαδικασία E5 σε σχέση με το απόλυτο άθροισμα των πειραματικών διαδικασιών E3+E5. Όπως και στα προηγούμενα γραφήματα έτσι και εδώ δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή μετά την 2x300min έκθεση σε τυχαίες συχνότητες (sham exposure).

Πίνακας 4.3			
% μεταβολή σε σύγκριση με την E2			
Χρόνος έκθεσης →			
Πειραματική διαδικασία ↓	2x45min	2x120min	2x300min
E3(α)	-4.40	-4.40	-0.88
E3(β)	-4.08	-3.90	-0.05
E3(γ)	-3.50	-4.89	-1.37
E4	12.40	-12.70 ^{*,a}	-29.07 ^{*,a}
E5(α)	14.09	-20.96 [*]	-43.06 [*]
E5(β)	13.10	-22.74 [*]	-47.35 [*]
E5(γ)	14.50	-28.03 ^{*,a}	-50.55 ^{*,a}
Sham Exposure	-3.84	-4.62	1.17

E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x45, 120, 300min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. ^{*}Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την E2, $p<0.05$. ^aΣτατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των E4 και E5(γ), $p<0.05$.

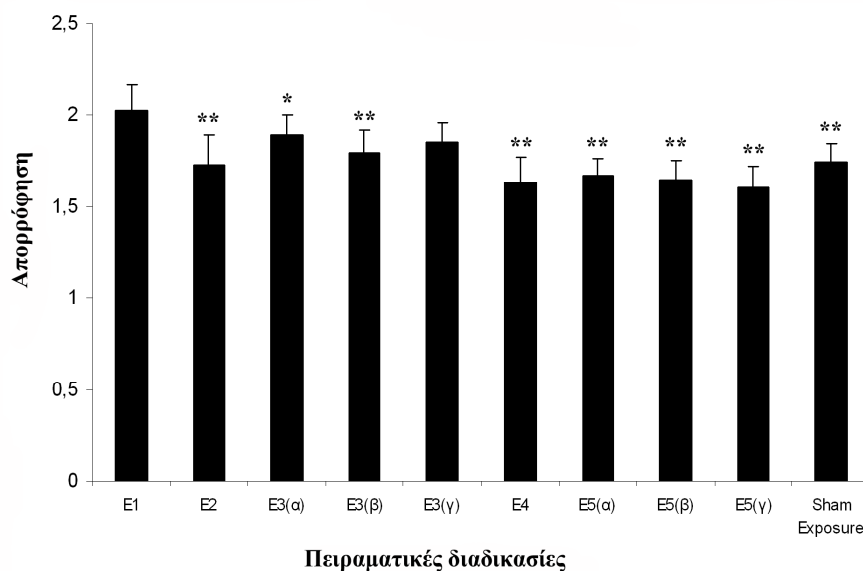
Ο Πίνακας 4.3 περιέχει τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τα προηγούμενα 3 γραφήματα. Οι τιμές που περιέχονται στον Πίνακα 4.3 αντιπροσωπεύουν τις % μεταβολές των πειραματικών διαδικασιών E3, E4, E5 και την έκθεση σε τυχαίες συχνότητες (sham exposure) σε σύγκριση με την E2 σε όλους τους χρόνους έκθεσης (2x45, 2x120 και 2x300min).



Γράφημα 4.9. Τιμές απορρόφησης των MCF-7 κυττάρων μετά από 48 ώρες επώσης στις 5 πειραματικές διαδικασίες (2x45 λεπτά έκθεσης). E1: Διπλό τυφλό; E2: Τυφλό (εκτός επωαστή για 2x45min); E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x45min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Αυτό το γράφημα και τα υπόλοιπα δύο που έπονται είναι παρόμοια με τα Γραφήματα 4.6-4.8 με τη διαφορά ότι αυτά αφορούν την κυτταρική σειρά MCF-7. Σε αυτό το γράφημα ο χρόνος έκθεσης των MCF-7 κυττάρων είναι 2x45min. Όπως παρατηρούμε από το γράφημα δεν υπάρχει κάποια αξιόλογη μεταβολή στην τιμή της

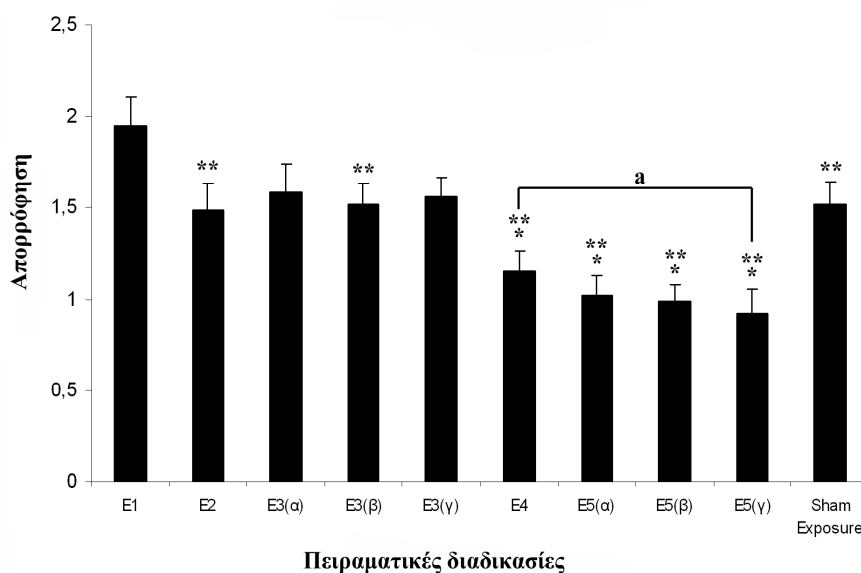
απορρόφησης σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες σε σύγκριση με την E2. Η έκθεση σε τυχαίες συχνότητες δεν είχε καμία επίδραση.



Γράφημα 4.10. Τιμές απορρόφησης των MCF-7 κυττάρων μετά από 48 ώρες επώσης στις 5 πειραματικές διαδικασίες (2x120 λεπτά έκθεσης). E1: Διπλό τυφλό; E2: Τυφλό (εκτός επωαστή για 2x120min); E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x120min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την E2, $p < 0.05$. **Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την E1, $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

Σε αυτό το γράφημα ο χρόνος έκθεσης των MCF-7 κυττάρων στις 22 συχνότητες συντονισμού του SnMNA είναι 2x120min. Παρατηρούμε μια στατιστικά σημαντική μείωση της E2 κατά 14.7% σε σύγκριση με την E1 ($p < 0.05$). Στις πειραματικές διαδικασίες E3 (β) και (γ) έχουμε αυξήσεις στις τιμές της απορρόφησης κατά 4.1 και 7.3% αντίστοιχα, στην πειραματική διαδικασία E3(α) έχουμε στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 9.6% ($p < 0.05$), ενώ στις πειραματικές διαδικασίες E4 και E5 παρατηρούμε μια μείωση από 3.3 μέχρι 7% σε σύγκριση με το E2. Η μείωση σε αυτό το χρόνο έκθεσης είναι

μικρότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη μείωση που είχε παρατηρηθεί στα LMS κύτταρα για τον ίδιο χρόνο έκθεσης. Η έκθεση σε τυχαίες συχνότητες δεν είχε καμία επίδραση.



Γράφημα 4.11. Τιμές απορρόφησης των MCF-7 κυττάρων μετά από 48 ώρες επώσης στις 5 πειραματικές διαδικασίες (2x300 λεπτά έκθεσης). E1: Διπλό τυφλό; E2: Τυφλό (εκτός επωαστή για 2x300min); E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x300min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την E2, $p < 0.05$. **Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την E1, $p < 0.05$. ^aΣτατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των E4 και E5(γ), $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Τέλος, στο Γράφημα 4.11 ο χρόνος έκθεσης στις συχνότητες συντονισμού, που προκύπτουν από το NMR φάσμα του SnMNA, είναι 2x300min. Η πειραματική διαδικασία E2 παρουσιάζει μια στατιστικά σημαντική μείωση της απορρόφησης κατά 24% σε σύγκριση με την E1. Αυτό σημαίνει ότι τα MCF-7 κύτταρα επηρεάστηκαν περισσότερο

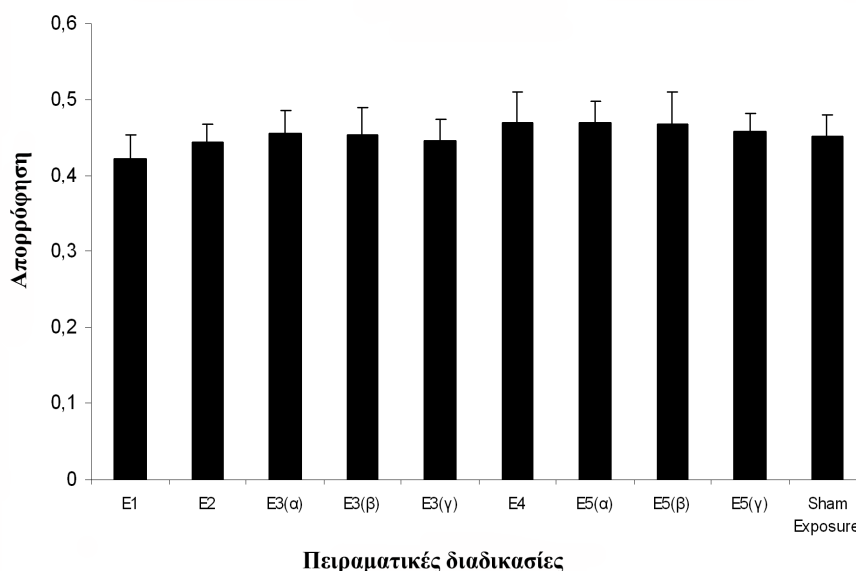
από την παραμονή τους εκτός επωαστή. Η πειραματική διαδικασία E3 παρουσίασε μια αύξηση, ενώ οι πειραματικές διαδικασίες E4, E(α), (β) και (γ) παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση 21.9, 31, 33.5 και 37.6% αντιστοίχως σε σύγκριση με την E2 (p<0.05). Όπως και προηγουμένως έτσι και σε αυτό το γράφημα οι έκθεση σε τυχαίες συχνότητες δεν προκάλεσαν μεταβολή στην τιμή της απορρόφησης. Αντιθέτως με τους προηγούμενους δύο χρόνους έκθεσης, στο χρόνο έκθεσης 2x300min παρατηρήθηκε το φαινόμενο της συνέργειας, όπου η πειραματική διαδικασία E5 παρουσίασε μεγαλύτερη μείωση από το απόλυτο άθροισμα των E3+E4.

Πίνακας 4.4			
% μεταβολή σε σύγκριση με το E2			
Χρόνος έκθεσης →			
Πειραματική διαδικασία ↓	2x45min	2x120min	2x300min
E3(α)	10.22	9.85*	6.83
E3(β)	9.88	4.06	2.51
E3(γ)	9.67	7.30	5.34
E4	3.38	-5.55	-21.90*
E5(α)	3.40	-3.32	-30.98*
E5(β)	2.26	-4.69	-33.47*
E5(γ)	2.98	-6.99	-37.61 ^{*,a}
Sham Exposure	-1.95	0.98	2.75

E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x45, 120, 300min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την E2, p<0.05. ^aΣτατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των E4 και E5(γ), p<0.05.

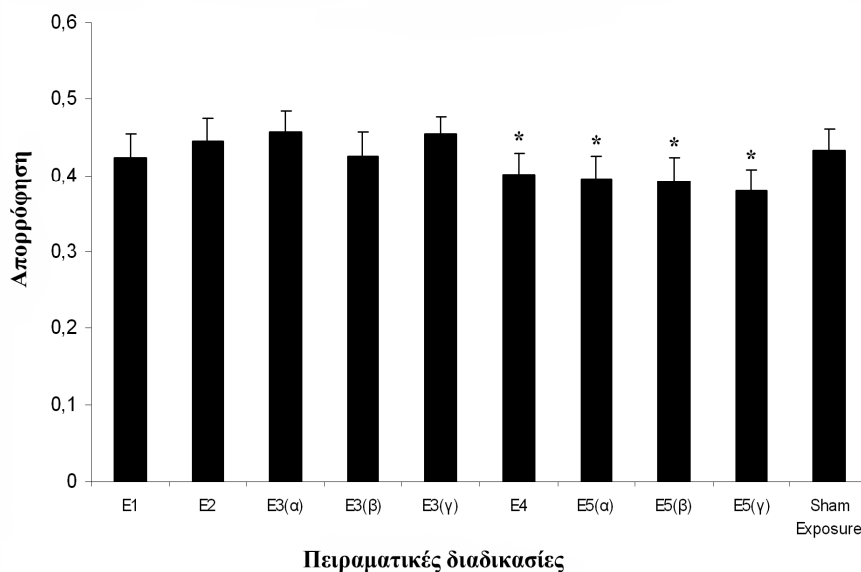
Ο Πίνακας 4.4 περιέχει τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τα προηγούμενα 3 γραφήματα. Οι τιμές που περιέχονται στον Πίνακα αντιπροσωπεύουν τις % μεταβολές των πειραματικών διαδικασιών E3, E4, E5 και την έκθεση σε τυχαίες συχνότητες (sham

exposure) σε σύγκριση με την E2 σε όλους τους χρόνους έκθεσης (2x45, 2x120 και 2x300min).



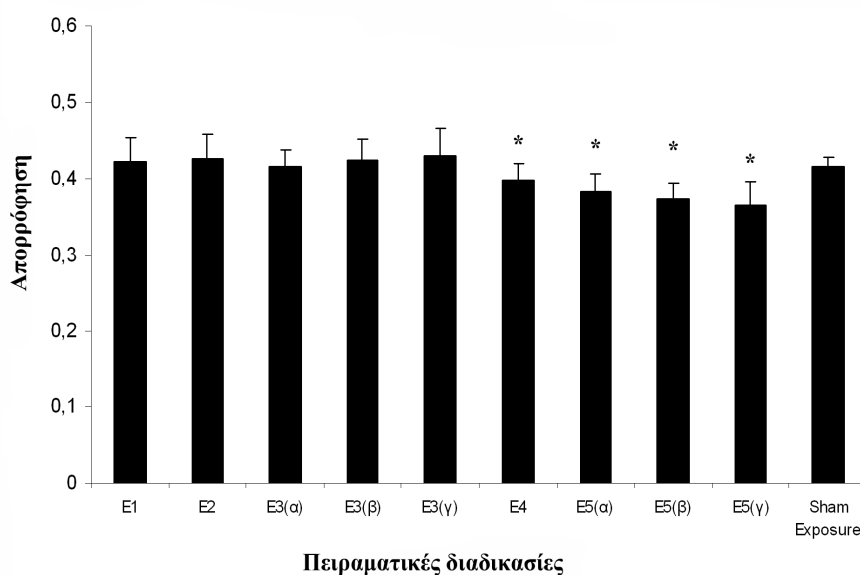
Γράφημα 4.12. Τιμές απορρόφησης των MRC-5 κυττάρων μετά από 48 ώρες επώσης στις 5 πειραματικές διαδικασίες (2x45 λεπτά έκθεσης). E1: Διπλό τυφλό; E2: Τυφλό (εκτός επωαστή για 2x45min); E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x45min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Εκτός από τις δύο προηγούμενες καρκινικές σειρές LMS και MCF-7, οι πειραματικές διαδικασίες E1-E5 δοκιμάστηκαν και στη φυσιολογική κυτταρική σειρά ινοβλαστών MRC-5. Στον χρόνο έκθεσης των 45min για 2 συνεχόμενες ημέρες υπήρξε αύξηση σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες πειραμάτων E3-E5 σε σύγκριση με την E2.



Γράφημα 4.13. Τιμές απορρόφησης των MRC-5 κυττάρων μετά από 48 ώρες επώσης στις 5 πειραματικές διαδικασίες (2x120 λεπτά έκθεσης). E1: Διπλό τυφλό; E2: Τυφλό (εκτός επωαστή για 2x120min); E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x120min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την E2, $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Όταν οι φυσιολογικοί ινοβλάστες εκτέθηκαν για 2x120min στις συχνότητες συντονισμού του SnMNA υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση της πειραματικής διαδικασίας E4, E5(α), (β) και (γ) κατά 9.7, 11.1, 11.8 και 14.5% αντίστοιχα σε σύγκριση με το E2 ($p < 0.05$). Οι πειραματικές διαδικασίες E3(α), (β), (γ) και sham exposure δεν εμφάνισαν κάποια σημαντική μεταβολή ως προς την E2. Σε αυτό το γράφημα δεν παρατηρείτε το φαινόμενο της συνέργειας.



Γράφημα 4.14. Τιμές απορρόφησης των MRC-5 κυττάρων μετά από 48 ώρες επώσης στις 5 πειραματικές διαδικασίες (2x300 λεπτά έκθεσης). E1: Διπλό τυφλό; E2: Τυφλό (εκτός επωαστή για 2x300min); E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x300min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την E2, $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Τέλος, τα MRC-5 κύτταρα εκτέθηκαν για 2x300min στις συχνότητες συντονισμού. Οι πειραματικές διαδικασίες E3 και sham exposure δεν παρουσίασαν μεταβολή στην τιμή της απορρόφησης σε σύγκριση με την E2. Αντιθέτως, οι πειραματικές διαδικασίες E4 και E4(α), (β) και (γ) παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση κατά 6.6, 10.4, 12.7 και 14.3% αντιστοίχως σε σύγκριση με την E2 ($p < 0.05$). Σε αυτή την περίπτωση υπάρχει το φαινόμενο της συνέργειας. Αν και στις πειραματικές διαδικασίες E4 και E5 για τα MRC-5 κύτταρα υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση της απορρόφησης σε σύγκριση με την E2, ωστόσο η μείωση αυτή είναι πολύ μικρότερη με τις αντίστοιχες μειώσεις που παρουσιάστηκαν στις άλλες δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές (LMS και MCF-7).

Πίνακας 4.5			
% μεταβολή σε σύγκριση με το E2			
Χρόνος έκθεσης →	2x45min	2x120min	2x300min
Πειραματική διαδικασία ↓			
E3(α)	2.78	2.78	-2.17
E3(β)	2.25	-4.35	-0.46
E3(γ)	0.25	2.48	1.16
E4	5.83	-9.67*	-6.59*
E5(α)	5.62	-11.11*	-10.42*
E5(β)	5.40	-11.78*	-12.69*
E5(γ)	3.08	-14.52*	-14.33*
Sham Exposure	1.76	-2.66	-2.34

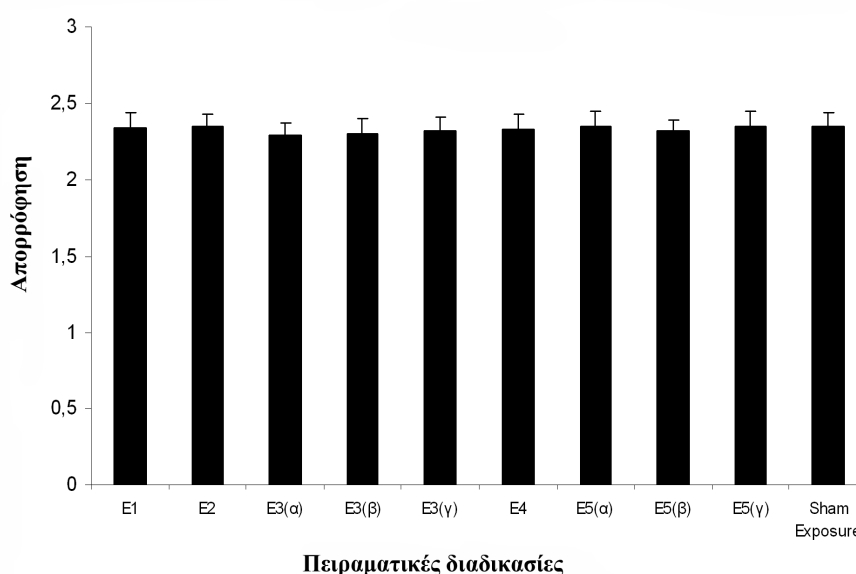
E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x45, 120, 300min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την E2, $p<0.05$.

Ο Πίνακας 4.5 περιέχει τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τα προηγούμενα 3 γραφήματα. Οι τιμές που περιέχονται στον Πίνακα αντιπροσωπεύουν τις % μεταβολές των πειραματικών διαδικασιών E3, E4, E5 και την έκθεση σε τυχαίες συχνότητες (sham exposure) σε σύγκριση με την E2 σε όλους τους χρόνους έκθεσης (2x45, 2x120 και 2x300min).

Συνοψίζοντας, παρατηρούμε ότι οι 22 συχνότητες συντονισμού που προκύπτουν από το NMR φάσμα του SnMNA προκαλούν στατιστικά σημαντική αύξηση της κυτταροτοξικότητας στις καρκινικές σειρές LMS και MCF-7 και στατιστικά σημαντική αύξηση, αλλά πολύ μικρότερη εκείνης που παρατηρήθηκε στις δύο καρκινικές σειρές, στους φυσιολογικούς ινοβλάστες MRC-5 ($p<0.05$). Η μέγιστη αύξηση παρατηρήθηκε στο χρόνο έκθεσης 2x300min για όλες τις κυτταρικές σειρές (έως και 50.6% στα LMS κύτταρα), ενώ στο χρόνο έκθεσης 2x120min παρατηρήθηκε μόνο στις κυτταρικές σειρές

LMS και MRC-5. Αντιθέτως, στο χρόνο έκθεσης 2x45min δεν υπήρξε κάποια ουσιαστική μεταβολή. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί και το φαινόμενο της συνέργειας που παρατηρήθηκε σε όλες τις κυτταρικές σειρές και ειδικότερα στο χρόνο έκθεσης 2x300min.

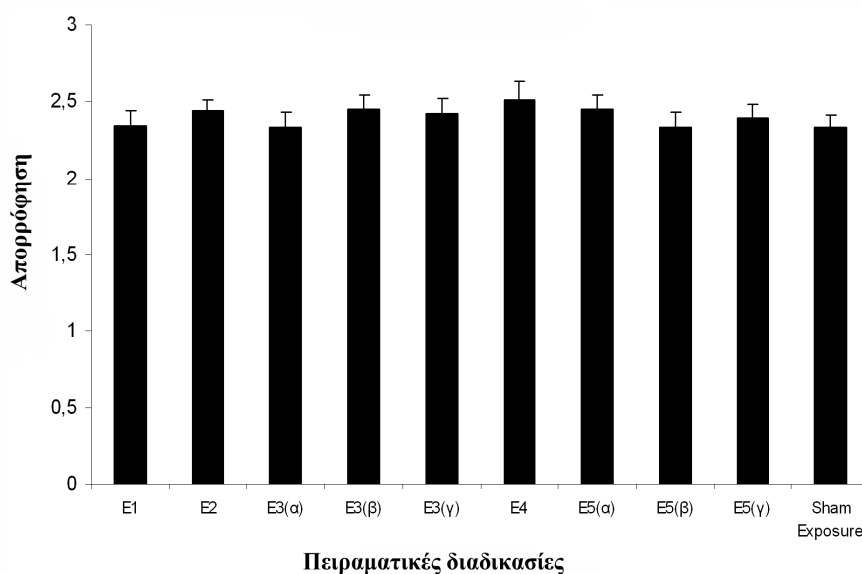
Εκτός από τις 22 συχνότητες συντονισμού που προέκυψαν από το NMR φάσμα του SnMNA, τα κύτταρα όλων των κυτταρικών σειρών εκτέθηκαν και στις 22 συχνότητες που προέκυψαν από το IR φάσμα του SnMNA. Όπως ακριβώς παρουσιάστηκαν τα αποτελέσματα στα προηγούμενα γραφήματα έτσι και εδώ υπάρχουν οι 5 πειραματικές διαδικασίες E1-E5. Στην κυτταρική σειρά LMS στην οποία παρατηρήθηκαν και οι μεγαλύτερες ποσοστιαίες μεταβολές των πειραματικών διαδικασιών E4 και E5 (φαινόμενο συνέργειας), πραγματοποιήθηκε η έκθεση των κυττάρων στις συχνότητες που προέκυψαν από το IR φάσμα του SnMNA σε όλους τους χρόνους έκθεσης (2x45, 2x120 και 2x300min). Στις κυτταρικές σειρές MCF-7 και MRC-5 χρησιμοποιήθηκε μόνο ο χρόνος έκθεσης των 2x300min. Στα γραφήματα που ακολουθούν γίνεται ανάλυση των αποτελεσμάτων.



Γράφημα 4.15. Τιμές απορρόφησης των LMS κυττάρων μετά από 48 ώρες επώσης στις 5 πειραματικές διαδικασίες (2x45 λεπτά έκθεσης). E1: Διπλό τυφλό; E2: Τυφλό (εκτός επωαστή για 2x45min); E3:

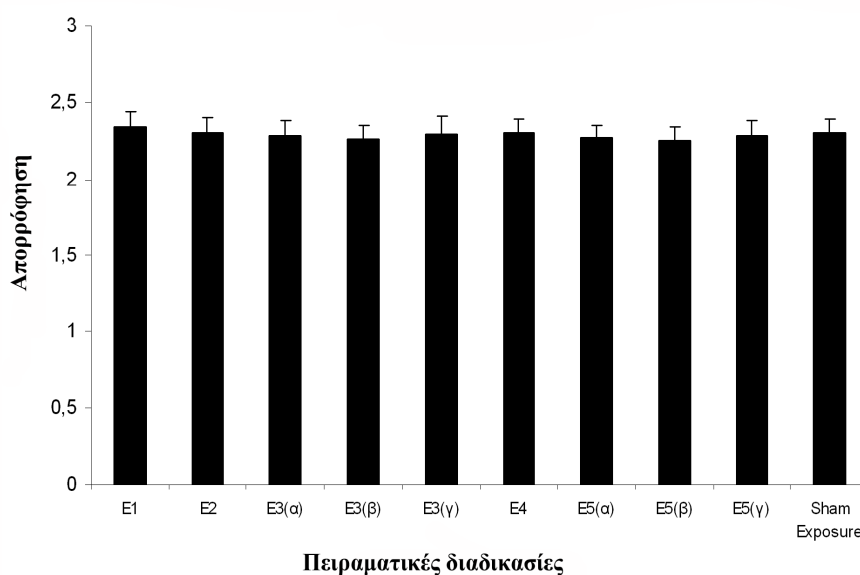
Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣ (IR) για 2x45min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Σε αυτό το γράφημα παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει ουσιαστική μεταβολή σε καμία από τις πειραματικές διαδικασίες E1-E5 και sham exposure. Σε αυτό το χρόνο έκθεσης δεν παρατηρείται καμία μεταβολή.



Γράφημα 4.16. Τιμές απορρόφησης των LMS κυττάρων μετά από 48 ώρες επώσης στις 5 πειραματικές διαδικασίες (2x120 λεπτά έκθεσης). E1: Διπλό τυφλό; E2: Τυφλό (εκτός επωαστή για 2x120min); E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣ (IR) για 2x120min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Όπως και στο προηγούμενο έτσι και σε αυτό το γράφημα παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει σημαντική μεταβολή σε καμία από τις πειραματικές διαδικασίες E1-E5 και sham exposure. Η μεγαλύτερη μεταβολή που παρατηρήθηκε ήταν 4.4% στην πειραματική διαδικασία E5(β) και 4.6% στο sham exposure σε σύγκριση με την E2.



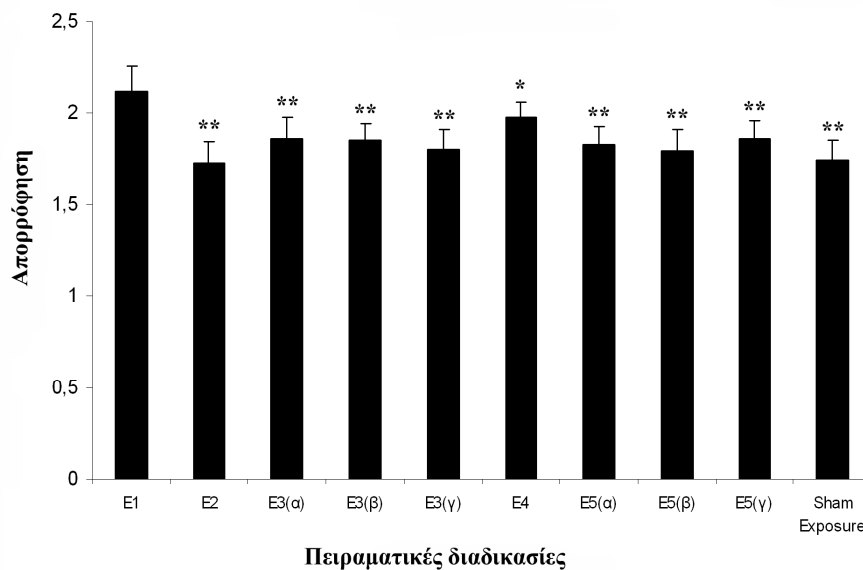
Γράφημα 4.17. Τιμές απορρόφησης των LMS κυττάρων μετά από 48 ώρες επώσης στις 5 πειραματικές διαδικασίες (2x300 λεπτά έκθεσης). E1: Διπλό τυφλό; E2: Τυφλό (εκτός επωαστή για 2x300min); E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣ (IR) για 2x300min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Τέλος, στο χρόνο έκθεσης 2x300min δεν παρατηρήθηκε επίσης καμία μεταβολή της τιμής της απορρόφησης σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες όπως έγινε και στους δύο προηγούμενους χρόνους έκθεσης.

Ο Πίνακας 4.6 περιέχει τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τα προηγούμενα 3 γραφήματα. Οι τιμές που περιέχονται στον Πίνακα αντιπροσωπεύουν τις % μεταβολές των πειραματικών διαδικασιών E3, E4, E5 και την έκθεση σε τυχαίες συχνότητες (sham exposure) σε σύγκριση με την E2 σε όλους τους χρόνους έκθεσης (2x45, 2x120 και 2x300min).

Πίνακας 4.6			
% μεταβολή σε σχέση με το E2			
Χρόνος έκθεσης →			
Πειραματική διαδικασία ↓	2x45min	2x120min	2x300min
E3(α)	-2.55	-4.40	-0.88
E3(β)	-2.13	0.45	-1.73
E3(γ)	-1.30	-0.81	-0.58
E4	-1.01	2.78	-0.16
E5(α)	-0.09	0.45	-1.30
E5(β)	-1.51	-4.40	-2.16
E5(γ)	0.02	-2.08	-1.01
Sham Exposure	-0.19	-4.62	-0.27

E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣ (IR) για 2x45, 120, 300min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες.



Γράφημα 4.18. Τιμές απορρόφησης των MCF-7 κυττάρων μετά από 48 ώρες επώσης στις 5 πειραματικές διαδικασίες πειράματος (2x300 λεπτά έκθεσης). E1: Διπλό τυφλό; E2: Τυφλό (εκτός επωαστή για 2x300min); E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣ (IR) για 2x300min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την E2, $p < 0.05$. **Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την E1, $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

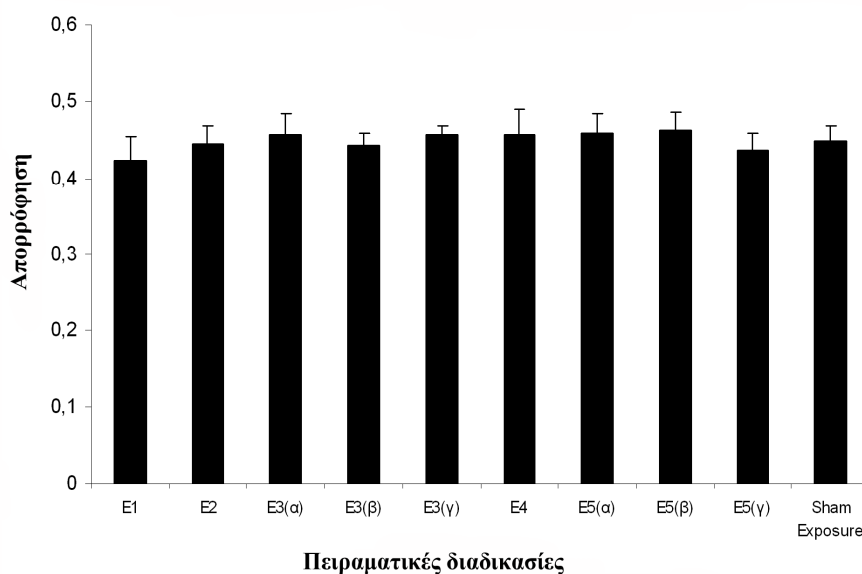
Το γράφημα αυτό αντιστοιχεί στις τιμές απορρόφησης που λήφθηκαν για όλες τις πειραματικές διαδικασίες E1-E5 και για χρόνο έκθεσης 2x300min στα MCF-7 κύτταρα. Παρόμοιο μοτίβο επαναλαμβάνεται και σε αυτή την κυτταρική σειρά, όπως προηγουμένως για τα LMS, όπου οι πειραματικές διαδικασίες E2-E5 και sham exposure δεν παρουσιάζουν αύξηση της κυτταροτοξικότητας. Αντιθέτως, η πειραματική διαδικασία E4 παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση 14.4% ως προς την E2 (p<0.05). Η πειραματική διαδικασία E2 παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση 18.6% ως προς την E1 (p<0.05). Αυτό επαληθεύει την μείωση που είχε παρουσιάσει η πειραματική διαδικασία E2 (14.7%) στο αντίστοιχο Γράφημα 4.10.

Πίνακας 4.7

% μεταβολή σε σχέση με το E2	
Χρόνος έκθεσης →	
Πειραματική διαδικασία ↓	2x300min
E3(α)	8.06
E3(β)	7.21
E3(γ)	4.42
E4	14.44*
E5(α)	5.85
E5(β)	4.06
E5(γ)	8.05
Sham Exposure	1.16

E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣ (IR) για 2x300min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την E2, p<0.05.

Ο Πίνακας 4.7 περιέχει τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τα προηγούμενα 3 γραφήματα. Οι τιμές που περιέχονται στον πίνακα αντιπροσωπεύουν τις % μεταβολές των πειραματικών διαδικασιών E3, E4, E5 και την έκθεση σε τυχαίες συχνότητες (sham exposure) σε σύγκριση με την E2 σε χρόνο έκθεσης 2x300min.



Γράφημα 4.19. Τιμές απορρόφησης των MRC-5 κυττάρων μετά από 48 ώρες επώσης στις 5 πειραματικές διαδικασίες (2x300 λεπτά έκθεσης). E1: Διπλό τυφλό; E2: Τυφλό (εκτός επωαστή για 2x300min); E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣ (IR) για 2x300min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

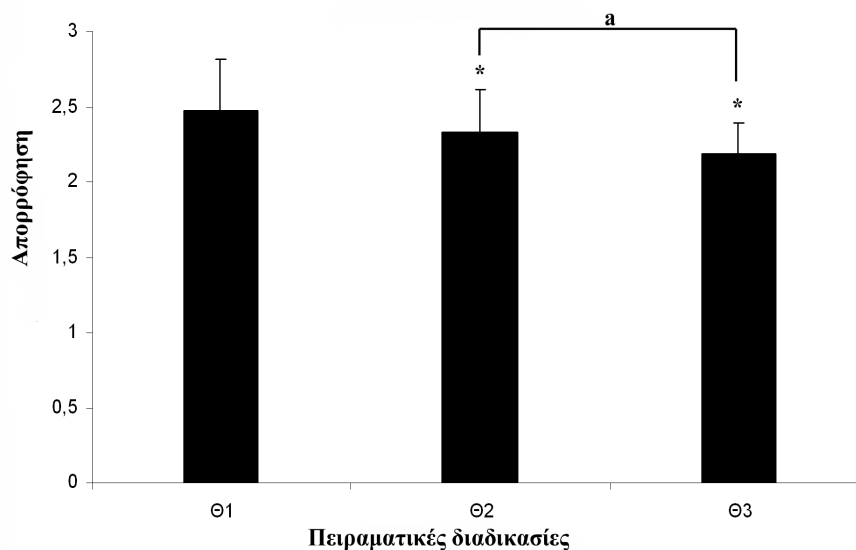
Τέλος, στα MRC-5 κύτταρα, παρατηρήθηκε αύξηση της τιμής της απορρόφησης (μείωση της κυτταροτοξικότητας) σε όλες σχεδόν τις πειραματικές διαδικασίες (εκτός των E3(β) και E5(γ)) σε σύγκριση με την E2.

Πίνακας 4.8	
% μεταβολή σε σχέση με το E2	
Χρόνος έκθεσης →	
Πειραματική διαδικασία ↓	2x300min
E3(α)	2.78
E3(β)	-0.28
E3(γ)	2.66
E4	3.07
E5(α)	3.07
E5(β)	3.97
E5(γ)	-1.85
Sham Exposure	1.09

E3: Αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις του SnMNA ((α): 10^{-12} , (β) 10^{-15} , (γ) 10^{-18} M); E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣ (IR) για 2x300min; E5: Συνέργεια (Συνδυασμός των E3+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες.

Από τα Γραφήματα 4.15-4.19 συμπεραίνουμε ότι οι συχνότητες που προέκυψαν από το IR φάσμα του SnMNA όχι μόνο δεν προκάλεσαν αύξηση της κυτταροτοξικότητας αλλά και μείωση αυτής (αύξηση της πολλαπλασιαστικότητας). Επομένως, η εικόνα που παρουσιάστηκε είναι εντελώς διαφορετική με αυτή που έδειξε η δράση των συχνοτήτων συντονισμού που προέκυψαν από το NMR φάσμα του SnMNA.

Εκτός από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν μετά από την έκθεση των πολυτρυβλίων σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία συχνοτήτων συντονισμού και μη (NMR και IR), πραγματοποιήθηκαν και μετρήσεις όπου εκτέθηκε το θρεπτικό υλικό (με ή χωρίς αραιωμένο σύμπλοκο) και στη συνέχεια προστέθηκε στα πολυτρυβλία, όπως αναφέρεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.2.13.3. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες Θ1-Θ3.



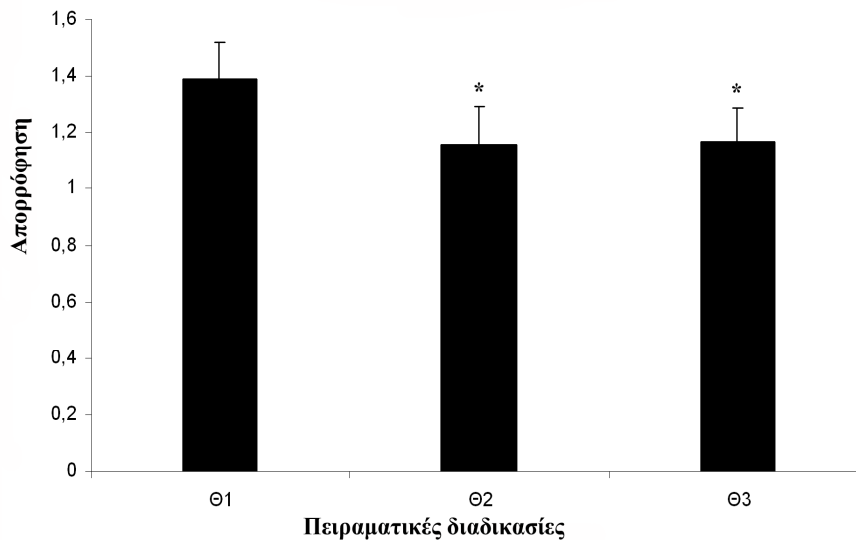
Γράφημα 4.20. Τιμές απορρόφησης των LMS κυττάρων μετά από 48 ώρες επώσης στις 3 πειραματικές διαδικασίες (2x300 λεπτά έκθεσης). Θ1: Έλεγχος; Θ2: Έκθεση DMEM σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x300min; Θ3: Προσθήκη SnMNA σε συγκέντρωση 10^{-18} M και έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x300min. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την Θ1, $p < 0.05$. ^aΣτατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των Θ2 και Θ3, $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Το γράφημα αυτό αντιστοιχεί στις τιμές απορρόφησης που λήφθηκαν για όλες τις πειραματικές διαδικασίες Θ1-Θ3 και για χρόνο έκθεσης 2x300min στα LMS κύτταρα. Παρατηρούμε ότι στην πειραματική διαδικασία Θ2 όπου το DMEM με το σύμπλοκο SnMNA σε συγκέντρωση 10^{-18} M εκτέθηκε στις 22 συχνότητες συντονισμού παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση (11.3%) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου Θ1 ($p < 0.001$). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην ομάδα Θ3 όπου υπήρξε και στατιστικά σημαντική μείωση κατά 5.5% ($p < 0.05$). Ανάμεσα στις δύο ομάδες Θ2 και Θ3 παρατηρήθηκε επίσης σημαντική διαφορά ($p < 0.05$).

Πίνακας 4.9	
% μεταβολή σε σχέση με το Θ1	
Χρόνος έκθεσης →	2x300min
Πειραματική διαδικασία ↓	
Θ2	-11.3 ^{*,a}
Θ3	-5.5 ^{*,a}

Θ2: Έκθεση DMEM σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x300min; Θ3: Προσθήκη SnMNA σε συγκέντρωση 10^{-18} M και έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x300min. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την Θ1, $p < 0.05$.
^aΣτατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των Θ2 και Θ3, $p < 0.05$.

Ο Πίνακας 4.9 περιέχει τις ποσοστιαίες μεταβολές από το Γράφημα 4.20 για τις πειραματικές διαδικασίες Θ1-Θ3 και χρόνο έκθεσης του DMEM για 2x300min στα LMS κύτταρα.



Γράφημα 4.21. Τιμές απορρόφησης των MCF-7 κυττάρων μετά από 48 ώρες επώσης στις 3 πειραματικές διαδικασίες (2x300 λεπτά έκθεσης). Θ1: Έλεγχος; Θ2: Έκθεση DMEM σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x300min; Θ3: Προσθήκη SnMNA σε συγκέντρωση 10^{-18} M και έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x300min. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την Θ1, $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

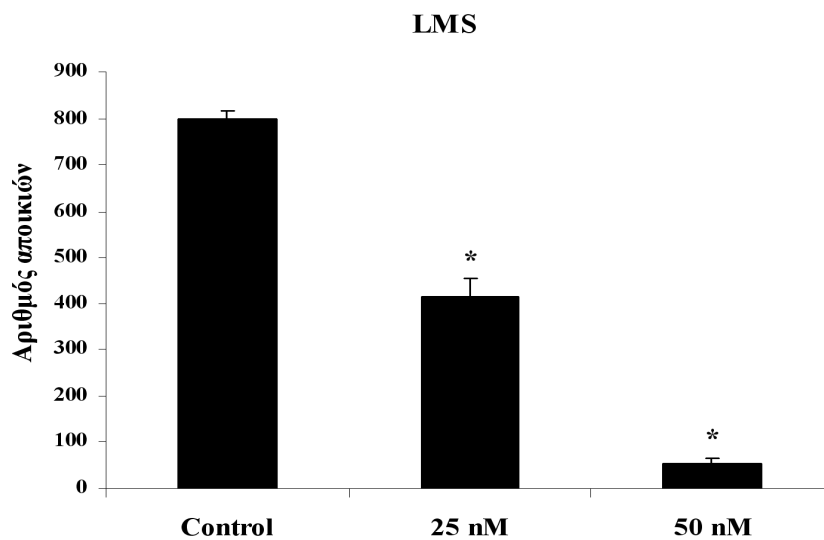
Το Γράφημα 4.21 αυτό αντιστοιχεί στις τιμές απορρόφησης που λήφθηκαν για όλες τις πειραματικές διαδικασίες Θ1-Θ3 και για χρόνο έκθεσης 2x300min στα MCF-7 κύτταρα. Όπως και στο προηγούμενο γράφημα έτσι και εδώ παρατηρούμε ότι στις πειραματικές διαδικασίες Θ2 και Θ3 παρατηρήθηκε σχεδόν ίδια μείωση, κατά 16% και 16.5% αντίστοιχα, σε σύγκριση με την Θ1 ($p < 0.001$).

Πίνακας 4.10	
% μεταβολή σε σχέση με το	
Θ1	
Χρόνος έκθεσης →	2x300min
Πειραματική διαδικασία ↓	
Θ2	-16*
Θ3	-16.5*

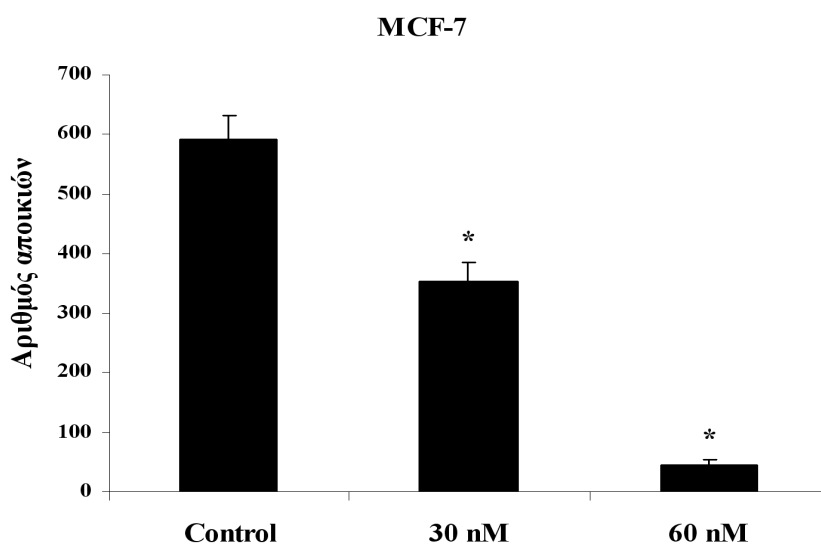
Θ2: Έκθεση DMEM σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x300min; Θ3: Προσθήκη SnMNA σε συγκέντρωση $10^{-18}M$ και έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x300min. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την Θ1, $p < 0.05$.

Ο Πίνακας 4.10 περιέχει τις ποσοστιαίες μεταβολές από το Γράφημα 4.21 για τις πειραματικές διαδικασίες Θ1-Θ3 και χρόνο έκθεσης του DMEM για 2x300min στα LMS κύτταρα.

4.3.3 Αποικίες



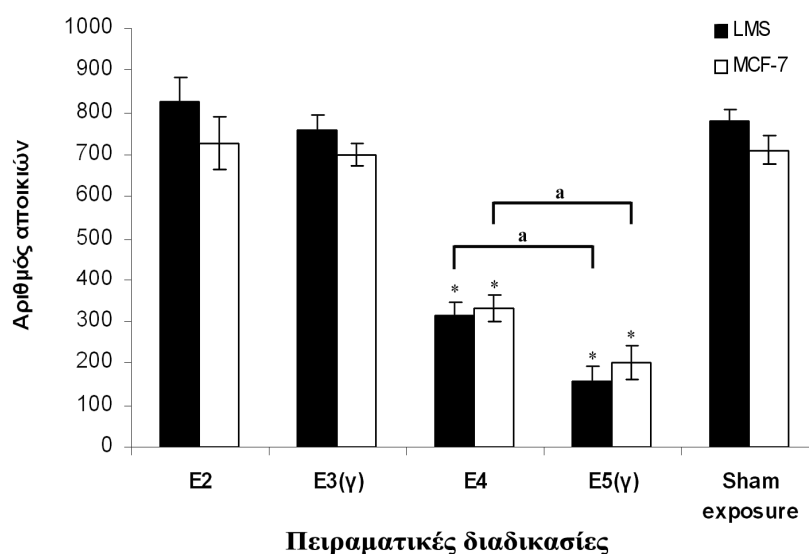
Γράφημα 4.22. Αριθμός αποικιών των LMS κυττάρων στο control και σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις του SnMNA. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το control, $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



Γράφημα 4.23. Αριθμός αποικιών των MCF-7 κυττάρων στο control και σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις του SnMNA. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το control, $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Το Γράφημα 4.22 αναπαριστά τον αριθμό των αποικιών των LMS κυττάρων στην ομάδα ελέγχου και σε δύο συγκεντρώσεις (25 και 50nM) του SnMNA. Παρατηρούμε ότι στη συγκέντρωση των 25nM υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού των αποικιών κατά 48.2% σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p<0.05$). Το ίδιο συμβαίνει και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση των 50nM, όπου παρατηρείται 86.9% μείωση σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p<0.05$).

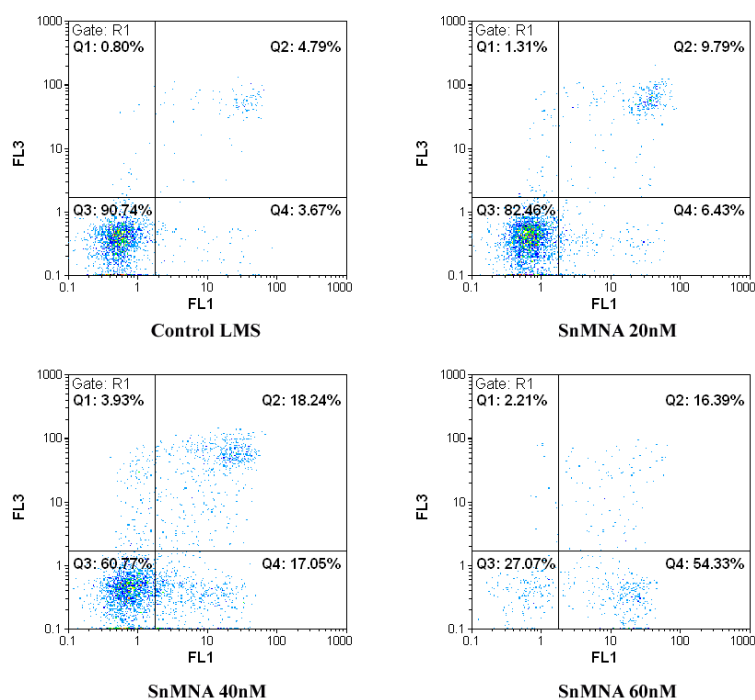
Στο Γράφημα 4.23 η ικανότητα ανάπτυξης των MCF-7 κυττάρων μειώνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του SnMNA. Έτσι στα 30nM και στα 60nM έχουμε στατιστικά σημαντικές μειώσεις του αριθμού των αποικιών κατά 40.5 και 87.2% αντίστοιχα ($p<0.05$).



Γράφημα 4.24. Αριθμός αποικιών των LMS και MCF-7 κυττάρων για τις πειραματικές διαδικασίες E2, E3(γ), E4, E5(γ) και sham exposure (2x300 λεπτά έκθεσης). E2: Τυφλό (εκτός επωαστή για 2x300min); E3(γ): Αναποτελεσματική συγκέντρωση του SnMNA- 10^{-18} M; E4: Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 2x300min; E5(γ): Συνέργεια (Συνδυασμός των E3(γ)+E4); Sham exposure: Έκθεση σε τυχαίες συχνότητες. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την E2, $p<0.05$. ^aΣτατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των E4 και E5(γ) και στις δύο κυτταρικές σειρές, $p<0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Στο Γράφημα 4.24 η ικανότητα ανάπτυξης των LMS και MCF-7 κυττάρων αναστέλλεται όταν εκτέθηκαν στις 22 ΗΜΓΣΣ για 2x300 λεπτά. Παρατηρούμε ότι στην ομάδα E4 υπάρχει σημαντική μείωση 62% ενώ στην ομάδα συνέργειας E5(γ) η μείωση ανέρχεται σε 81% ($p < 0.05$). Στην ομάδα sham exposure δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην ανάπτυξη των αποικιών και στις 2 κυτταρικές σειρές.

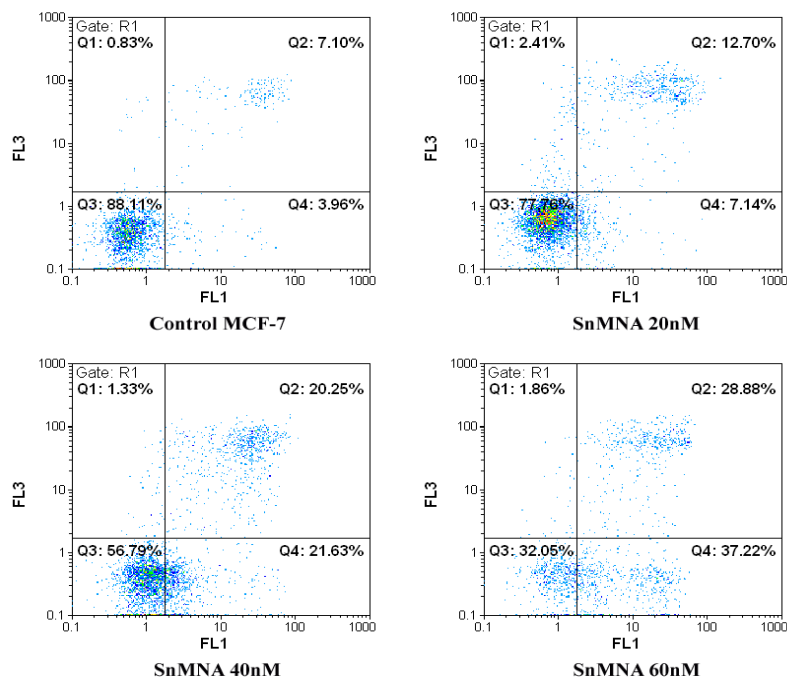
4.3.4 Κυτταρομετρία ροής - απόπτωση – νέκρωση



Εικόνα 4. Κυτταρομετρία ροής με χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά την 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του SnMNA.

Η Εικόνα 4 απεικονίζει τα κυτταρογραφήματα της ομάδας ελέγχου και του SnMNA σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις στα LMS κύτταρα. Όταν τα κύτταρα δεν έχουν υποστεί καμία μεταχείριση έπειτα από 48 ώρες επώασης το ποσοστό των ζώντων

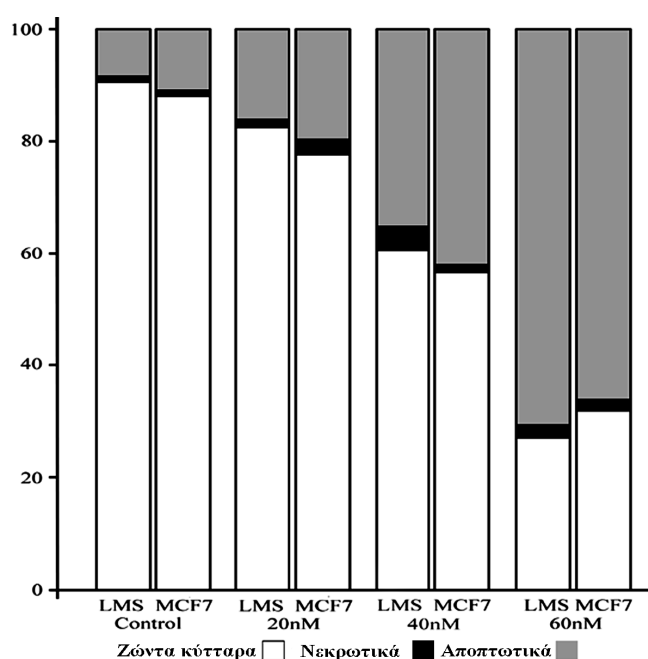
κυττάρων είναι 90.74%, των νεκρωτικών 0.80% και των αποπτωτικών (early and late apoptotic) είναι 8.46%. Στη συγκέντρωση των 20nM το ποσοστό των ζώντων κυττάρων μειώνεται στο 82.46% ενώ το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων αυξάνεται στο 16.22%. Το ποσοστό των νεκρωτικών κυττάρων παραμένει σχεδόν το ίδιο σε όλες τις συγκεντρώσεις. Στα 40 και 60nM το ποσοστό των ζώντων κυττάρων μειώνεται σημαντικά και τα αποπτωτικά κύτταρα αποτελούν πλέον το 35.29 και 70.72% αντίστοιχα. Το σύμπλοκο δηλαδή προκαλεί δόσοεξαρτώμενη κυτταροτοξικότητα στα LMS κύτταρα μέσω απόπτωσης.



Εικόνα 5. Κυτταρομέτρία ροής με χρώση των MCF-7 κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά την 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του SnMNA.

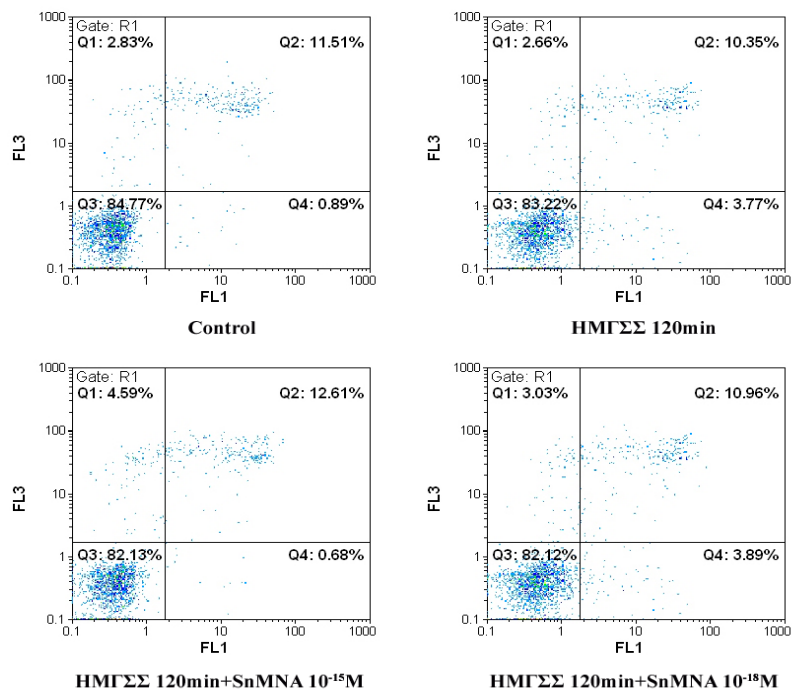
Η Εικόνα 5 απεικονίζει ότι και το προηγούμενο με τη διαφορά ότι σε αυτό η κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε στα MCF-7 κύτταρα. Τα κύτταρα της ομάδας

ελέγχου εμφάνισαν 88.11% ζώντα κύτταρα, 0.83% νεκρωτικά και 11.06% αποπτωτικά. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του SnMNA μειώνεται το ποσοστό των ζώντων, αυξάνεται των αποπτωτικών, ενώ των νεκρωτικών παραμένει σταθερό. Έτσι στα 20nM έχουμε 19.84% απόπτωση, ενώ στα 40 και 60nM αυξάνεται σημαντικά στα 41.88% και 66.1% αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το σύμπλοκο προκαλεί δόσοεξαρτώμενη κυτταροτοξικότητα στα MCF-7 κύτταρα μέσω απόπτωσης.



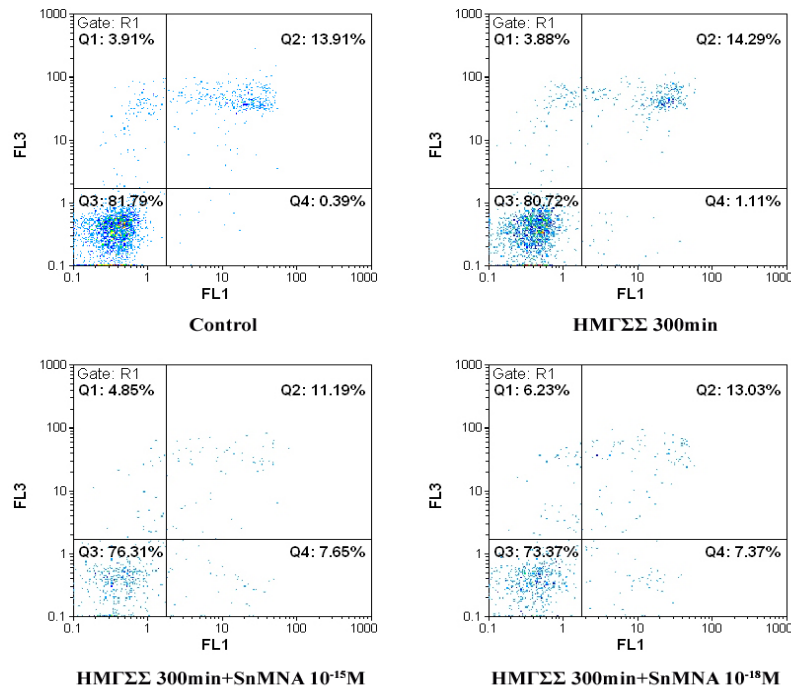
Γράφημα 4.25. Συγκεντρωτικό γράφημα των κυτταρομετριών ροής των LMS και MCF-7 κυττάρων μετά από 48ώρη επώασης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του SnMNA.

Το Γράφημα 4.25 είναι συγκεντρωτικό των Εικόνων 4 και 5, όπου απεικονίζεται ποσοτικοποιημένα το ποσοστό των ζώντων, νεκρωτικών και αποπτωτικών κυττάρων των δύο κυτταρικών σειρών LMS και MCF-7 στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις του SnMNA (20, 40 και 60nM). Παρατηρούμε ότι και στις δύο κυτταρικές σειρές το ποσοστό των νεκρωτικών κυττάρων παραμένει σταθερό ενώ το ποσοστό των αποπτωτικών αυξάνεται όσο αυξάνεται και η συγκέντρωση του SnMNA.



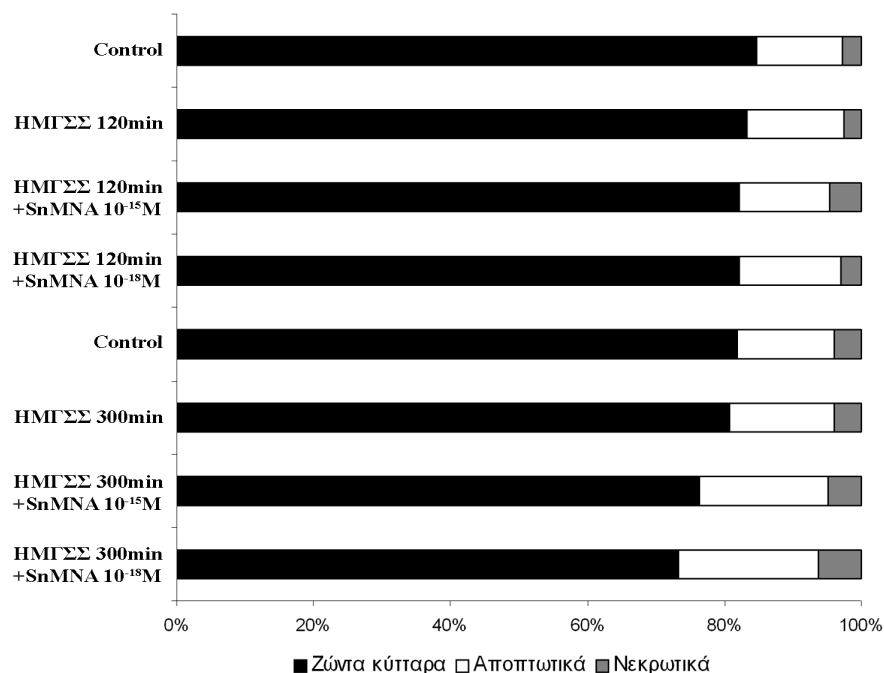
Εικόνα 6. Κυτταρομέτρία ροής με χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά την 2x120 λεπτά έκθεσης στις 22 ΗΜΓΣΣ..

Η Εικόνα 6 απεικονίζει τα κυτταρογραφήματα της ομάδας ελέγχου, την έκθεση των LMS κυττάρων στις 22 συχνότητες συντονισμού που προέκυψαν από το NMR φάσμα του SnMNA για 2x120min, την προσθήκη του SnMNA σε συγκέντρωση 10^{-15}M και ταυτόχρονη έκθεση σε ΗΜΓΣΣ και την προσθήκη του SnMNA σε συγκέντρωση 10^{-18}M και ταυτόχρονη έκθεση σε ΗΜΓΣΣ. Παρατηρούμε ότι η ομάδα ελέγχου αποτελείται από 84.77% ζώντα κύτταρα, 2.83% νεκρωτικά και 12.4% αποπτωτικά. Στις άλλες τρεις ομάδες παρατηρήθηκε αύξηση στο ποσοστό της απόπτωσης, το οποίο στην τελευταία περιγραφείσα ομάδα έφτασε το 14.85% (19.8% αύξηση).



Εικόνα 7. Κυτταρομέτρια ροής με χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά την 2x300 λεπτά έκθεσης στις 22 ΗΜΓΣΣ.

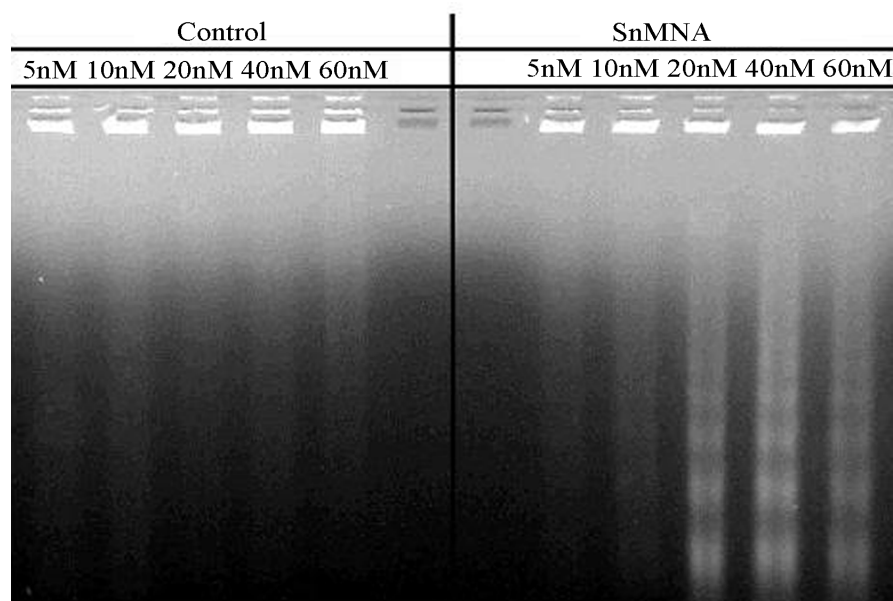
Η Εικόνα 7 είναι όπως και η Εικόνα 6 με τη διαφορά ότι ο χρόνος έκθεσης στις συχνότητες συντονισμού είναι 2x300min. Η ομάδα ελέγχου έχει 81.79% ζώντα κύτταρα, 3.91% νεκρωτικά και 14.3% αποπτωτικά κύτταρα. Η ομάδα έκθεσης στις συχνότητες συντονισμού για 2x300min δεν έχει αρκετά αυξημένο ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων που αντιστοιχεί σε 15.4% (7.7% αύξηση). Στις άλλες δύο ομάδες της «συνέργειας», με την προσθήκη του SnMNA σε συγκέντρωση $10^{-15}M$ και $10^{-18}M$ και την ταυτόχρονη έκθεση σε ΗΜΓΣΣ για 2x300min, το ποσοστό της απόπτωσης αυξήθηκε σημαντικά σε 18.84 και 20.40% αντίστοιχα, δηλαδή μια αντίστοιχη αύξηση του 31.7% και 42.7%. Παρατηρούμε ότι η έκθεση σε ΗΜΓΣΣ με ή χωρίς την προσθήκη του SnMNA σε αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις προκαλεί αύξηση στο ποσοστό της απόπτωσης, ειδικότερα όταν το SnMNA έχει προστεθεί σε συγκέντρωση $10^{-18} M$ όπου εμφανίζεται έντονα το φαινόμενο της συνέργειας.



Γράφημα 4.26. Συγκεντρωτικό γράφημα των κυτταρομετριών ροής των LMS κυττάρων μετά μετά την 2x120 και 2x300 λεπτά έκθεσης στις 22 ΗΜΓΣΣ.

Το Γράφημα 4.26 είναι συγκεντρωτικό των Εικόνων 6 και 7, όπου απεικονίζεται ποσοτικοποιημένα το ποσοστό των ζώντων, νεκρωτικών και αποπτωτικών LMS κυττάρων μετά από έκθεσή τους σε 22 συχνότητες συντονισμού για 2x300min με ή χωρίς την προσθήκη αναποτελεσματικών συγκεντρώσεων του SnMNA ($10^{-15}M$ και $10^{-18}M$). Παρατηρούμε ότι το ποσοστό των νεκρωτικών κυττάρων παραμένει σχεδόν σταθερό, ενώ το ποσοστό των αποπτωτικών αυξάνεται σημαντικά ειδικότερα στις ομάδες συνέργειας. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, συναντάμε το φαινόμενο της συνέργειας όπου η προσθήκη αναποτελεσματικών συγκεντρώσεων του SnMNA και η ταυτόχρονη έκθεση στις συχνότητες συντονισμού παρουσίασε μεγαλύτερη απόπτωση από το απόλυτο άθροισμα των ποσοστών απόπτωσης των επιμέρους ομάδων.

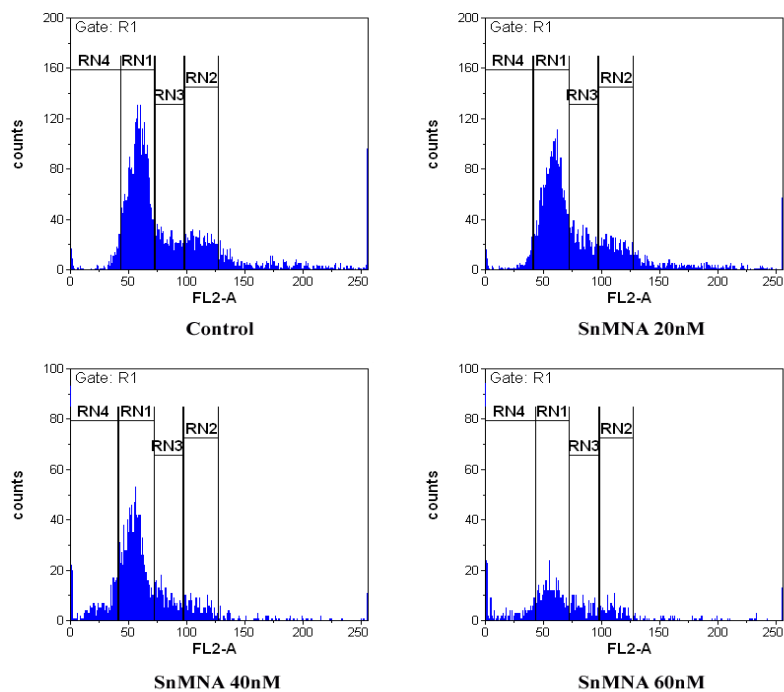
4.3.5 Προσδιορισμός κατακερματισμού του DNA – Ηλεκτροφόρηση DNA



Εικόνα 8. Κατακερματισμός του DNA των LMS κυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του SnMNA σε σύγκριση με τις σειρές ελέγχου (control).

Για να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής, ότι δηλαδή το SnMNA προκαλεί απόπτωση στις κυτταρικές σειρές και το ποσοστό της οποίας αυξάνεται όσο αυξάνεται και η συγκέντρωση του SnMNA (δοσοεξαρτώμενη), προχωρήσαμε στην ανάλυση του κατακερματισμού του DNA. Η Εικόνα 8 αποτελεί μια τυπική ηλεκτροφόρηση DNA. Τα πρώτα 5 φρεάτια συνιστούν την ομάδα ελέγχου στα οποία έχει προστεθεί ποσότητα διαλύτη (DMSO) αντίστοιχη με τα φρεάτια στα οποία έχει προστεθεί το SnMNA. Στα 5 τελευταία φρεάτια έχει προστεθεί το SnMNA σε συγκεντρώσεις 5, 10, 20, 40 και 60nM. Παρατηρούμε ότι από τη συγκέντρωση 20nM και άνω υπάρχει εμφανής κατακερματισμός «σπάσιμο» του DNA με την παρουσία μοτίβου σκάλας (τυπικό μοτίβο κατακερματισμένων ή συμπυκνωμένων πυρήνων). Τα δεδομένα αυτά συμπίπτουν με αυτά της κυτταρομετρίας ροής όπου σε συγκεντρώσεις των 20nM και μεγαλύτερες έχουμε αυξημένο ποσοστό απόπτωσης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

4.3.6 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου



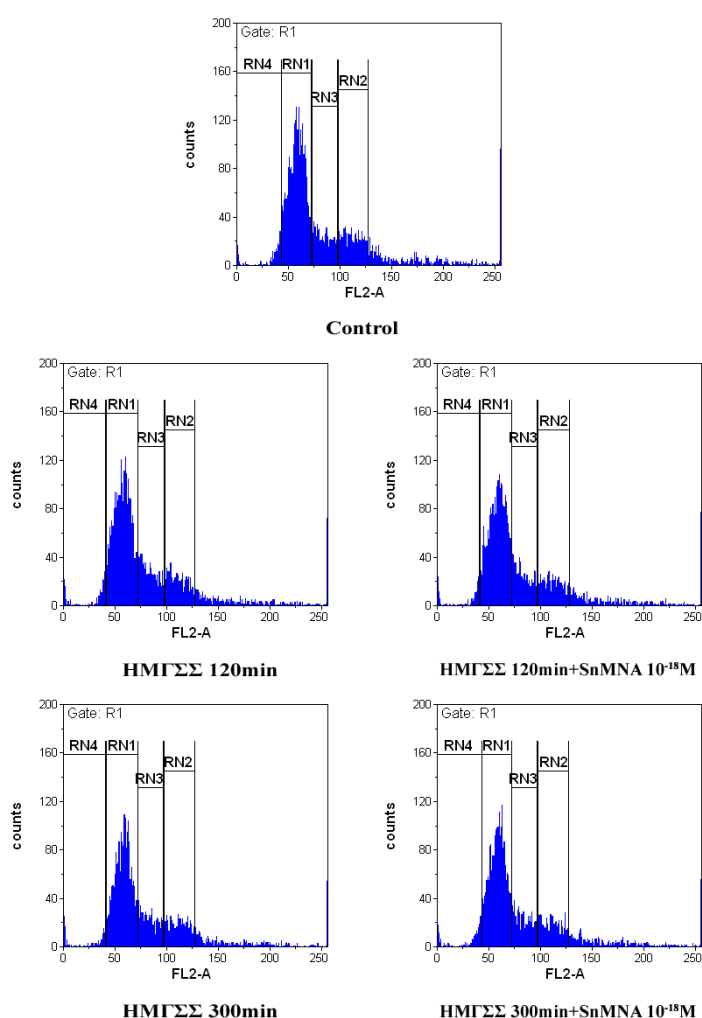
Εικόνα 9. Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των LMS κυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του SnMNA.

Η Εικόνα 9 απεικονίζει την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των LMS κυττάρων όταν προστίθεται το SnMNA σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Τα ποσοστά των κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου ανγράφονται στον Πίνακα 4.11.

Πίνακας 4.11. Ποσοστό % LMS κυττάρων σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου.

	G0/G1	S	G2/M	SubG1
Control	53.37	14.15	13.69	5.12
SnMNA 20nM	51.73	14.57	16.16	5.3
SnMNA 40nM	50.98	9.29	13.28	19.64
SnMNA 60nM	36.02	12.84	16	28.07

Παρατηρούμε ότι σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του SnMNA υπάρχει μια σημαντική μείωση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στην φάση G0/G1, μια μικρή μείωση στη φάση S, ενώ υπάρχει μικρή αύξηση στη φάση G2/M σε σύγκριση με το control. Η φάση subG1 υποδηλώνει το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων, το οποίο επιβεβαιώνει την απόπτωση που προκαλεί το SnMNA και επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής με τις χρώσεις Annexin και PI.



Εικόνα 10. Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των LMS κυττάρων μετά από έκθεση στις 22 ΗΜΓΣΣ για 2x120 και 2x300 λεπτά.

Η Εικόνα 10 αναπαριστά την κατανομή των κυττάρων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου ύστερα από έκθεση των κυττάρων στις 22 ΗΜΓΣΣ ή και ταυτόχρονη προσθήκη του SnMNA σε συγκέντρωση 10^{-18} Μ. Όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα το ποσοστό των κυττάρων στη φάση S δεν παρουσίασαν καμία αξιόλογη μεταβολή τόσο στη έκθεση στις ΗΜΓΣΣ για 2 και 5 ώρες όσο και στις ομάδες συνέργειας. Ωστόσο, μικρές αυξήσεις εμφανίστηκαν στη φάση G2/M σε όλες τις ομάδες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης μείωση εμφανίστηκε και στην φάση G0/G1, όπως έγινε και με το SnMNA. Τέλος, όπως αναφέρθηκε πριν για την φάση subG1, υπάρχει σημαντική αύξηση στις ομάδες EMF-120min και στην ομάδα συνέργειας EMF-300min+SnMNA 10^{-18} Μ. Αυτό επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής με τις χρώσεις Annexin και PI.

Πίνακας 4.12. Ποσοστό % LMS κυττάρων σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου.

	G0/G1	S	G2/M	SubG1
Control	53.37	14.15	13.69	5.12
ΗΜΓΣΣ 120min	53.105	13.715	16.97	6.18
ΗΜΓΣΣ 120min+SnMNA 10^{-18}Μ	51.865	13.77	16.705	5.46
ΗΜΓΣΣ 300min	51.76	15.07	16.46	5.04
ΗΜΓΣΣ 300min+SnMNA 10^{-18}Μ	52.16	14.24	15.78	6.77

4.4 *Ex vivo*

4.4.1 Αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης με τη χρήση του SnMNA

Το πείραμα της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης πραγματοποιήθηκε για να εξακριβώσουμε του κατά πόσον το σύμπλοκο SnMNA έχει την ικανότητα να αναστείλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, η οποία παρήχθη από τους δύο αιμοπεταλιακούς

αγωνιστές ADP και PAF καθώς και από τα LMS κύτταρα (100% αιμοπεταλιακή συσσώρευση). Όταν το SnMNA προστέθηκε στα αιμοπετάλια σε συγκέντρωση 25μM, εμφανίστηκε μια συσσώρευση 63%, 56% και 46% με ADP, PAF και LMS κύτταρα αντίστοιχα. Επιπλέον, όταν το SnMNA προστέθηκε σε συγκέντρωση 50μM τότε προκάλεσε αιμοπεταλιακή συσσώρευση 52%, 34% και 0% με ADP, PAF και LMS κύτταρα αντίστοιχα. Στην τελευταία συγκέντρωση παρατηρήθηκε μια σημαντική αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, ειδικότερα στην περίπτωση των LMS κυττάρων. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.13).

Πίνακας 4.13. Ποσοστό αιμοπεταλιακής συσσώρευσης σε 2 συγκεντρώσεις του SnMNA.

Συγκέντρωση του SnMNA (μM)	% Αιμοπεταλιακή συσσώρευση		
	ADP	PAF	LMS κύτταρα
25	63%	56%	46%
50	52%	34%	0%

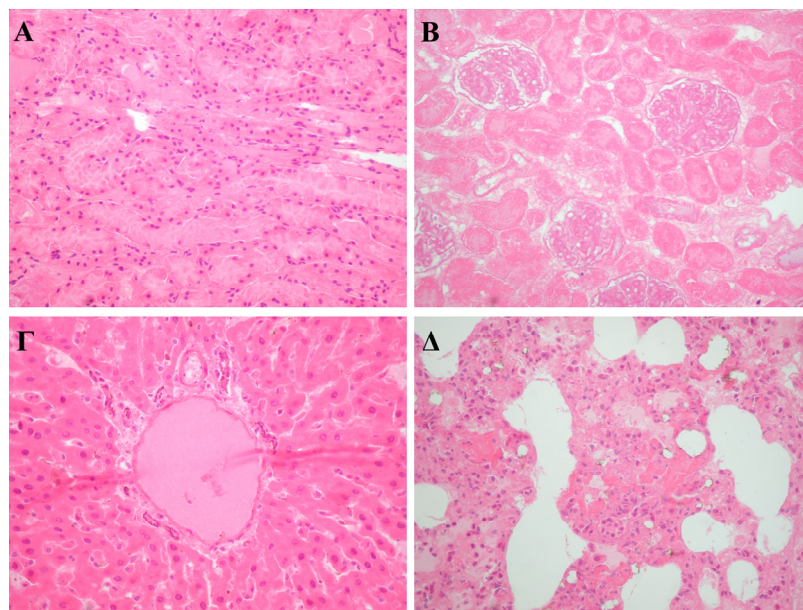
Αιμοπεταλιακοί αγωνιστές: ADP, PAF, και LMS κύτταρα προκάλεσαν 100% αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Προσθήκη του SnMNA σε συγκέντρωση 25 μM, παρουσίασε συσσώρευση κατά 63%, 56% και 46% με ADP, PAF και LMS κύτταρα αντίστοιχα. Προσθήκη 50 μM προκάλεσε μια αιμοπεταλιακή συσσώρευση κατά 52%, 34% και 0% με ADP, PAF και LMS κύτταρα αντίστοιχα.

4.5 In vivo

4.5.1 Τοξικότητα σε επίμους Wistar

4.5.1.1 Οξεία τοξικότητα

Η τοξικότητα του SnMNA έπειτα από μια εφάπαξ ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση προσδιορίστηκε στα πειραματόζωα Wistar βασιζόμενη στην κλινική εικόνα, στην απώλεια σωματικού βάρους και στα ιστολογικά ευρήματα. Τα κύρια όργανα που προσβλήθηκαν ήταν τα νεφρά και οι πνεύμονες, ενώ ο στόμαχος, το έντερο, ο εγκέφαλος η καρδιά και ο σπλήνας δεν παρουσίασαν καμία ιστοπαθολογική αλλοίωση. Δεν παρατηρήθηκε τοξικός θάνατος από την δόση στα πειραματόζωα των ομάδων OT1 και OT2, ενώ τα πειραματόζωα που ανήκαν στην ομάδα OT3 παρουσίασαν 60% θάνατο, το οποίο σημαίνει ότι η τιμή LD₅₀ (τιμή συγκέντρωσης που προκαλεί θάνατο στο 50% των πειραματόζωων) κυμαίνεται περίπου στα 80mg/Kg ΣΒ. Σε μικροσκοπική εξέταση των ιστών αναδείχτηκε ότι τα πειραματόζωα της ομάδας OT2 παρουσίασαν ενδοκυττάριο οίδημα και κενотоποίηση του επιθηλίου των νεφρικών σωληναρίων, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε μικρή απώλεια ΣΒ (1.7%) (Εικόνα 11Α) (Πίνακας 4.14). Ωστόσο, τα πειραματόζωα που ανήκαν στην ομάδα OT3 εμφάνισαν εκτεταμένη νέκρωση των σωληναρίων και σπειραμάτων των νεφρών και διάταση των κολποειδών και κενотоποίηση των ηπατοκυττάρων (Εικόνα 11Β, 11Γ). Στους πνεύμονες των πειραματόζωων της ομάδας OT3, παρατηρήθηκε ενδοκυψελιδικό οίδημα και τοπικά εναπόθεση ινίνης, ενώ παράλληλα υπήρξε μεγάλη μείωση ΣΒ (16.3%) (Εικόνα 11Δ) (Πίνακας 4.14).



Εικόνα 11. Αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες που απεικονίζουν την οξεία τοξικότητα από τις ομάδες OT1-OT3. Χρώση: Haematoxylin-eosin. (A): Βιοψία από το νεφρό των πειραματόζωων που ανήκαν στην OT2 (8 mg/kg ΣΒ); (B), (Γ) και (Δ): Βιοψίες από το νεφρό, ήπαρ και πνεύμονα αντίστοιχα, από πειραματόζωα που ανήκαν στην OT3 (80 mg/kg ΣΒ).

Πίνακας 4.14. Ιστολογικές αλλοιώσεις σε 3 δόσεις οξείας τοξικότητας.

Δόση (mg/kg ΣΒ)	Νεφρός	Ήπαρ	Πνεύμονας	ΔΣΒ% ^α	Θάνατος
OT4 (Control) (-) ^β	(-)	(-)	(-)	+2.4	0%
OT1 (0.8)	(-)	(-)	(-)	+1.2	0%
OT2 (8)	(+)	(-)	(-)	-1.7	0%
OT3 (80)	Συνολικά κατεστραμμένο	(+)	Οίδημα	-16.3	60%

Ο στόμαχος, το έντερο, ο εγκέφαλος, η καρδιά και ο σπλήνας δεν παρουσίασαν ιστολογικές αλλοιώσεις

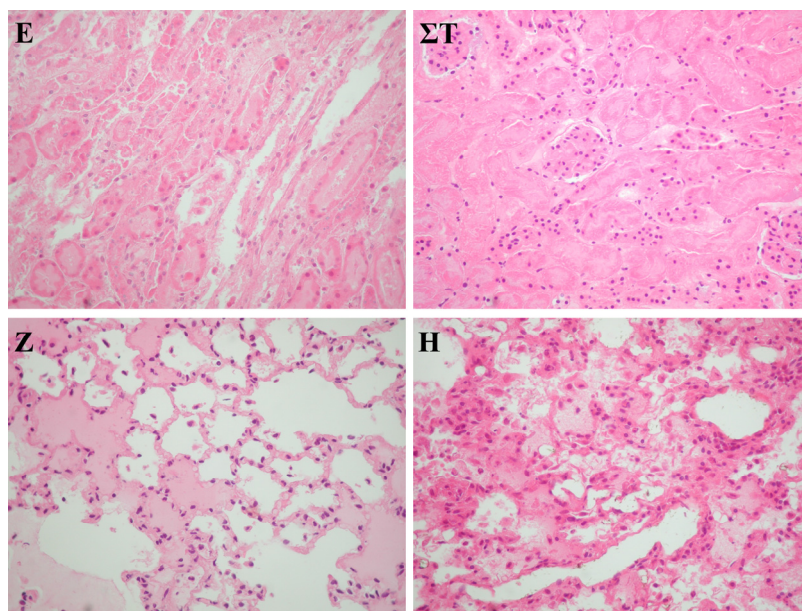
$$^{\alpha}\Delta\Sigma\text{B}\% = [(\text{Μέσο } \Sigma\text{B της ημέρας } \Pi - \text{Μέσο } \Sigma\text{B ημέρας } 0)/(\text{Μέσο } \Sigma\text{B ημέρας } 0)] * 100$$

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

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

4.5.1.2 Χρόνια τοξικότητα

Όπως και στα πειράματα οξείας τοξικότητας έτσι και εδώ η χρόνια τοξικότητα προσδιορίστηκε με βάση την κλινική εικόνα, την απώλεια σωματικού βάρους και τα ιστοπαθολογικά ευρήματα. Τα κύρια όργανα που προσβλήθηκαν ήταν τα νεφρά και οι πνεύμονες, ενώ το στομάχι, το έντερο, ο εγκέφαλος η καρδιά και η σπλήνα δεν παρουσίασαν καμία ιστοπαθολογική αλλοίωση. Τα πειραματόζωα που ανήκαν στις ομάδες XT1 (5.4mg/kg ΣΒ) και XT2 (8mg/kg ΣΒ) εμφάνισαν μεγαλύτερης έκτασης τοξικές επιδράσεις σε σύγκριση με τις ομάδες οξείας τοξικότητας OT1 και OT2.



Εικόνα 12. Αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες που απεικονίζουν την χρόνια τοξικότητα από τις ομάδες XT1 (5.4mg/kg ΣΒ) και XT2 (8mg/kg ΣΒ). Χρώση: Haematoxylin-eosin. (Α) και (Β): Βιοψίες από το νεφρό των πειραματόζωων που ανήκαν στην XT1 και XT2 αντίστοιχα; (Γ) και (Δ): Βιοψίες από τον πνεύμονα από τα πειραματόζωα που ανήκαν στις ομάδες XT1 και XT2.

Τα πειραματόζωα της ομάδας XT1 εμφάνισαν ήπιες ιστολογικές αλλοιώσεις και μια μικρή μείωση του ΣΒ κατά 4.15% (Πίνακας 4.15). Τα πειραματόζωα της ομάδας XT2 εμφάνισαν νέκρωση των επιθηλιακών κυττάρων των νεφρικών σωληναρίων (Εικόνα 12ΣΤ), διάσωση του αγγειώδους σπειράματος και επιπρόσθετα απολέπιση των πνευμονοκυττάρων και μεγάλη μείωση του ΣΒ κατά 12.3% (Πίνακας 4.15) (Εικόνα 12Η).

Πίνακας 4.15. Ιστολογικές αλλοιώσεις σε 2 δόσεις χρόνιας τοξικότητας.

Δόση (mg/kg ΣΒ)	Νεφρός	Ήπαρ	Πνεύμονας	ΔΣΒ% ^a	Θάνατος
XT3 (Control) (-) ^β	(-)	(-)	(-)	+3.7	0%
XT1 (4x5.4)	(+)	(-)	(+)	-4.1	0%
XT2 (4x8)	Συνολικά κατεστραμμένο	(-)	Οίδημα	-12.3	20%

Ο στόμαχος, το έντερο, ο εγκέφαλος, η καρδιά και ο σπλήνας δεν παρουσίασαν ιστολογικές αλλοιώσεις

^aΔΣΒ% = [(Μέσο ΣΒ της ημέρας Π – Μέσο ΣΒ ημέρας 0)/(Μέσο ΣΒ ημέρας 0)]*100

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

ΔΣΒ%: Ποσοστό αλλαγής Σωματικού Βάρους; XT1: Χρόνια τοξικότητα 1(4x5.4mg/kg ΣΒ); XT2: Χρόνια τοξικότητα 2(4x8mg/kg ΣΒ); XT3: Χρόνια τοξικότητα 3-ομάδα ελέγχου (control)

4.5.2 Αντικαρκινική δράση σε καρκινοπαθείς επίμυες Wistar με τη χρήση του SnMNA

Εκτός από την τοξικότητα του συμπλόκου (οξεία και χρόνια) εκτιμήθηκε και η αντικαρκινική δράση του SnMNA σε καρκινοπαθείς επίμυες Wistar. Με βάση τα αποτελέσματα της τοξικότητας επιλέχθηκε ως βέλτιστη δόση τα 4x5.4mg/kg ΣΒ για τη χορήγηση του SnMNA σε καρκινοπαθείς επίμυες Wistar. Ο MST των πειραματόζωων της ΟΕ ήταν 23.9±3.21 μέρες, ενώ οι απομονωμένοι όγκοι από τα πειραματόζωα της ΟΕ που

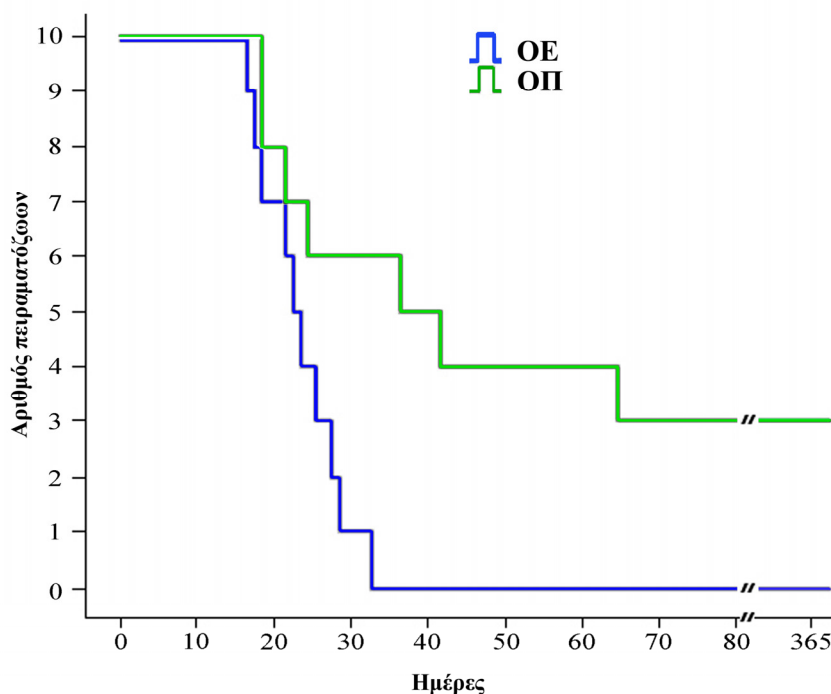
απεβίωσαν αντιπροσωπεύουν το $46\pm 5\%$ του συνολικού ΣΒ (Πίνακας 4.16). Το πρώτο πειραματόζωο από την ομάδα ελέγχου απεβίωσε στις 17 ημέρες ενώ το τελευταίο στις 33, ενώ στην ΟΠ ο πρώτος θάνατος παρατηρήθηκε στις 19 ημέρες και το τελευταίο πειραματόζωο απεβίωσε στις 65 ημέρες (δεν υπολογίστηκαν τα 3 πειραματόζωα που συνεχίζουν να ζουν) (Πίνακας 4.16). Επιπλέον, ο MST της ΟΠ ήταν 21.3 ± 2.87 μέρες για τα 4 από τα 10 πειραματόζωα (40%) στα οποία είτε ο όγκος τήχθηκε είτε υποχώρησε πολύ γρήγορα, ενώ ο MST της ΟΠ ήταν 48.0 ± 14.93 μέρες για τα πειραματόζωα με ψηλαφητούς όγκους (30% των πειραματόζωων της ΟΠ) (Γράφημα 4.27) (Εικόνα 13). Το τελευταίο αντιπροσωπεύει μια επιμήκυνση κατά 200% του χρόνου επιβίωσης σε σύγκριση με την ΟΕ ($p<0.05$), ενώ οι απομονωμένοι όγκοι αντιπροσωπεύουν το 20.5% του ΣΒ (Πίνακας 4.16). Ένας επιπλέον δείκτης που διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων είναι ο MTW, όπου η ΟΕ έχει μια τιμή $68.1\pm 6.7g$, ενώ η ΟΠ στατιστικά σημαντικά μικρότερο με τιμή $30.7\pm 4.6g$ ($p<0.05$). Η τιμή για τον δείκτη MTW στην ΟΠ προκύπτει από το μέσο όρο μόνο του 30% των πειραματόζωων λόγω του ότι μόνο αυτό το ποσοστό είχε ψηλαφητούς όγκους. Στο 40% τήχθηκε απότομα, ενώ το άλλο 30% εμφάνισε πλήρη ίαση (Πίνακας 4.16). Τέλος, ο δείκτης για το μέσο ρυθμό ανάπτυξης του όγκου λαμβάνει τιμές 2.85 ± 0.2 για την ΟΕ και στατιστικά μικρότερη 0.78 ± 0.12 για την ΟΠ ($p<0.05$) (Πίνακας 4.16). Για να διαπιστωθεί περαιτέρω εάν οι τηγμένοι όγκοι στο 40% των πειραματόζωων της ΟΠ ήταν ικανοί να δώσουν μια μετάσταση στα πειραματόζωα, πάρθηκε ένας μικρός όγκος από το νεκρωτικό υλικό με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης σύριγγας (5G) των 5ml και τοποθετήθηκε σε τρυβλίο που περιείχε 10ml DMEM. Πραγματοποιήθηκαν συνεχόμενες ανακαλλιέργειες του νεκρωτικού υλικού, στις οποίες διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχαν ζωντανά LMS κύτταρα ικανά να πολλαπλασιαστούν και κατά συνέπεια να δώσουν μια μετάσταση στα πειραματόζωα. Επιπροσθέτως, η νεκροψία των πειραματόζωων έδειξε ότι δεν υπήρξε πουθενά μετάσταση. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι το 30% των πειραματόζωων της ΟΠ

είχαν πλήρη υποχώρηση του όγκου και τα οποία θεραπεύτηκαν πλήρως και ζουν μέχρι σήμερα (Γράφημα 4.27).

Πίνακας 4.16. Μεταβολή στους δείκτες μεταξύ της ΟΠ και ΟΕ.

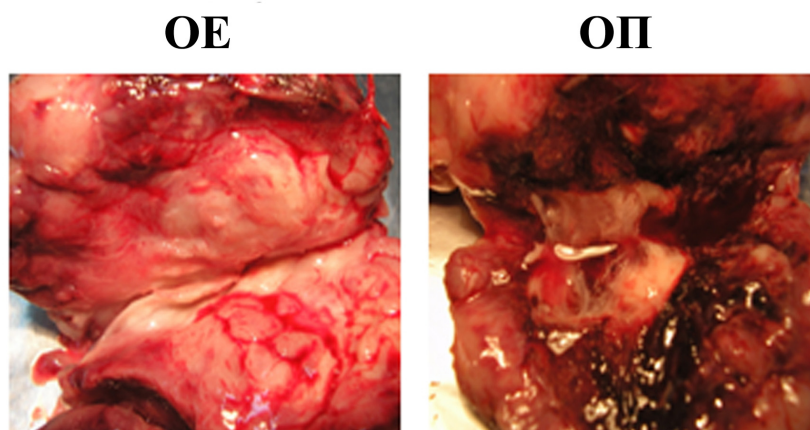
Δόση (mg/kg ΣΒ)	MST(ημέρες)	Median Min-Max(ημέρες)	MTW (g)	MTGR
ΟΕ (Control)	23.9±3.21	23.5 (17-33)	68.1±6.70	2.85±0.20
ΟΠ (4x5.4)	21.3±2.87 ^a	20.5 (19-25) ^a	M/Δ	M/Δ
	48.0±14.93 ^{β,*}	42 (37-65) ^β	30.7±4.60 ^{β,*}	0.68±0.12 ^{β,*}

^a 40% των πειραματόζωων με τηγμένους όγκους; ^β 30% των πειραματόζωων με ψηλαφητούς όγκους; M/Δ: Μη διαθέσιμο; * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ΟΕ, p<0.05. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μ.Ο±τ.α.; MST: Μέσος όρος επιβίωσης; MTW: μέσο βάρος όγκων; MTGR: Μέσος όρος ανάπτυξης όγκου; ΣΒ: Σωματικό Βάρος; ΟΕ: Ομάδα ελέγχου (control); ΟΠ: Ομάδα πειράματος (4x5.4mg/kg ΣΒ).



Γράφημα 4.27. Αναπαριστά την καμπύλη θανάτου των πειραματόζωων που ανήκουν στις ομάδες ΟΕ και ΟΠ. Ο MST για την ΟΕ ήταν 23.9±3.21 μέρες, ενώ για την ΟΠ ήταν 21.3±2.87 μέρες. Το 40% των

πειραματόζων της ΟΠ παρουσίασε 200% επιμήκυνση του χρόνου επιβίωσης συγκρινόμενο με το χρόνο επιβίωσης της ΟΕ ($p < 0.05$). Οι όγκοι τριών πειραματόζων (30%) της ΟΠ υποχώρησαν ολοκληρωτικά και τα πειραματόζωα θεραπεύτηκαν και ζουν ακόμη.



Εικόνα 13. Αντιπροσωπευτικές εικόνες όγκων από την ομάδα ελέγχου (ΟΕ) και την ομάδα πειράματος (ΟΠ-4x5.4mg/kg ΣΒ). Είναι εμφανής η τήξη του όγκου της ΟΠ σε όλη την έκτασή του.

4.5.3 Αντικαρκινική δράση σε καρκινοπαθείς επίμυες Wistar με τη χρήση συχνοτήτων συντονισμού από το φάσμα NMR του SnMNA

Μετά τη μελέτη δράσης των 22 ΗΜΓΣΣ στα κύτταρα (εύρεση κυτταροτοξικότητας, ποσοστό απόπτωσης) και στα αιμοπετάλια, μελετήθηκε η δράση των 22 συχνοτήτων συντονισμού σε καρκινοπαθείς επίμυες Wistar. Ο μέσος όρος επιβίωσης (MST) στα πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου (ΟΕ) ήταν 23.9 ± 3.21 (χρησιμοποιήθηκε η ίδια ομάδα ελέγχου όπως και στην παράγραφο 3.4.3), της ΟΠ1 ήταν 23.5 ± 4.53 , ενώ σχεδόν ίδιος είναι και της ομάδας της οποίας τα πειραματόζωα εκτέθηκαν σε 22 τυχαίες συχνοτήτες (ΟΠ4 – 23.3 ± 5.17) (Πίνακας 4.17). Αντίθετα, στις ομάδες ΟΠ2 και ΟΠ3 παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επιμήκυνση του MST σε σύγκριση με την ομάδα ΟΕ κατά 160% και 176% αντίστοιχα (38.1 ± 10.92 για την ΟΠ2 και 42.14 ± 12.92 για την ΟΠ3,

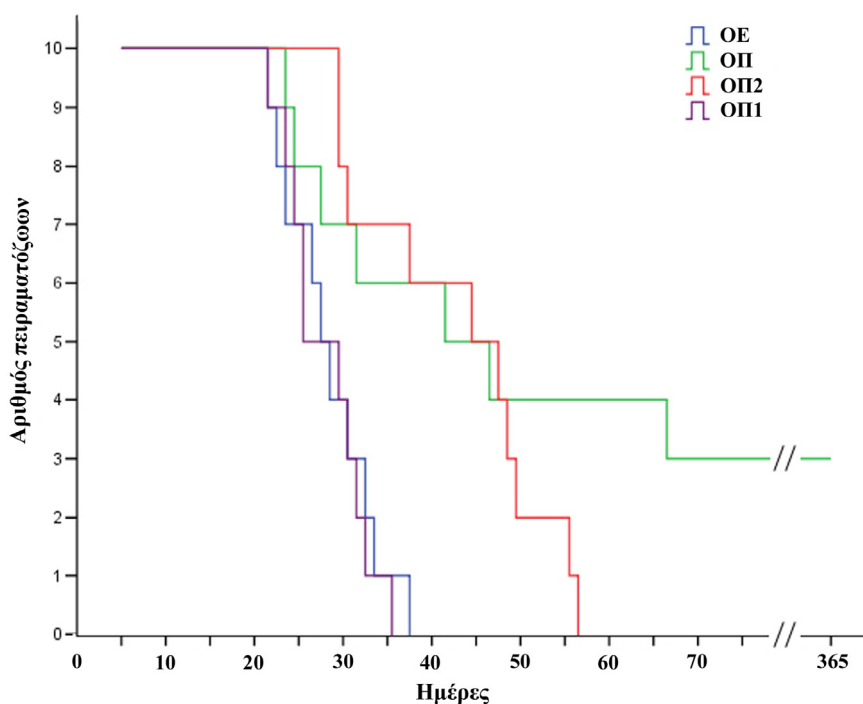
p<0.05) (Πίνακας 4.17). Πρέπει να τονιστεί ότι ο MST για την ΟΠ3 δεν περιλαμβάνει 3 πειραματόζωα τα οποία, στα οποία οι όγκοι τήχθηκαν εντελώς και ζουν μέχρι τώρα (Γράφημα 4.28). Ο Πίνακας 4.17 παρουσιάζει τους MST για όλες τις ομάδες και τον ελάχιστο-μέγιστο χρόνο επιβίωσης πειραματοζώων. Είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι ο MST της ΟΠ3 είναι σχεδόν ίδιος με την ΟΠ της παραγράφου 4.5.2 (42.14 έναντι 48 ημέρες), που σημαίνει ότι η χορήγηση αναποτελεσματικής συγκέντρωσης του SnMNA και η ταυτόχρονη έκθεση στις συχνότητες συντονισμού επέφερε παραπλήσια αποτελέσματα με αυτά που προκάλεσε από μόνο του το σύμπλοκο. Για άλλη μια φορά παρατηρείται το φαινόμενο της συνέργειας, όπου τα πειραματόζωα της ΟΠ3 είχαν σαφώς μεγαλύτερο MST σε σύγκριση με την ΟΠ2 (Γράφημα 4.29).

Πίνακας 4.17. Μεταβολή στους δείκτες μεταξύ των ΟΠ1, ΟΠ2, ΟΠ3 ΟΠ4, ΟΠ και ΟΕ.

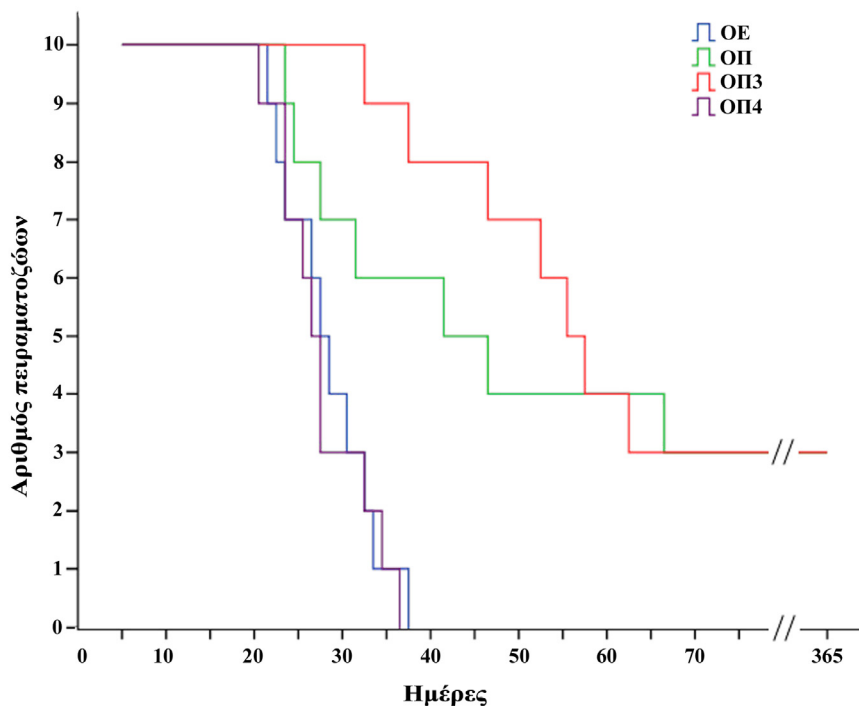
Ομάδα Πειράματος	MST(ημέρες)	Median Min-Max(ημέρες)	MTW (g)	MTGR
ΟΕ (Control)	23.9±3.21	23.5 (17-33)	68.1±6.70	2.85±0.20
ΟΠ1	23.5±4.53	23 (17-31)	68.7±5.91	3.02±0.61
ΟΠ2	38.1±10.92*	41.5 (22-52)	76.8±7.04*	2.2±0.72*
ΟΠ3	42.14±12.92 ^{a,*}	45 (25-58) ^a	75.9±15.53 ^a	1.98±0.75 ^{a,*}
ΟΠ4	23.3±5.17	22.5 (16-32)	67.9±4.69	3±0.65
ΟΠ (4x5.4mg/kg ΣΒ)	48.0±14.93 ^{b,*}	42 (37-65) ^b	30.7±4.60 ^{b,*}	0.78±0.12 ^{b,*}

* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ΟΠ1 p<0.05. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μ.Ο±τ.α.; ^aΥπολογίζεται μόνο το 70% των πειραματοζώων (30% επιβίωση); ^b30% των πειραματοζώων με ψηλαφητούς όγκους; MST: Μέσος όρος επιβίωσης; MTW: μέσο βάρος όγκων; MTGR: Μέσος όρος ανάπτυξης όγκου; ΣΒ: Σωματικό Βάρος; ΟΕ: Ομάδα ελέγχου (από Πίνακα 4.16); ΟΠ1: Ομάδα πειράματος 1(Αναποτελεσματική δόση SnMNA-4x5.4μg/kg ΣΒ); ΟΠ2: Ομάδα πειράματος 2(Έκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 5ώρες καθημερινά); ΟΠ3: Ομάδα πειράματος 3(Συνέργεια, ΟΠ1+ΟΠ2); ΟΠ4: Ομάδα πειράματος 4 (Sham exposure-έκθεση σε τυχαίες συχνότητες), ΟΠ: ομάδα πειράματος (από τον Πίνακα 4.16-4x5.4mg/kg ΣΒ).

Επίσης υπήρξαν σημαντικές αλλαγές στις παραμέτρους MTGR, MTW. Συγκεκριμένα, υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση των ΟΠ2 και ΟΠ3 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου για το MTGR ($p < 0.01$ και για τις δύο ομάδες), ενώ ο μέσος όρος βάρους των όγκων των ομάδων ΟΠ2 και ΟΠ3 ήταν αυξημένος ($p < 0.05$ για την ΟΠ2) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Στις ομάδες ΟΠ1 και ΟΠ4 δεν παρατηρήθηκε καμία σχεδόν μεταβολή στις προηγούμενες δύο παραμέτρους σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Πρέπει να τονιστεί ότι σε όλες τις μετρήσεις του Πίνακα 4.17, οι τιμές της ΟΠ3 περιλαμβάνει το 70% των πειραματοζώων γιατί 30% αυτών έχει επιβιώσει και έχει ιαθεί πλήρως.



Γράφημα 4.28. Αναπαριστά την καμπύλη θανάτου των πειραματοζώων που ανήκουν στις ομάδες ΟΕ: Ομάδα ελέγχου (από τον Πίνακα 4.16); ΟΠ1: Ομάδα πειράματος 1(Αναποτελεσματική δόση SnMNA-4x5.4μg/kg ΣΒ); ΟΠ2: Ομάδα πειράματος 2(Εκθεση σε 22 ΗΜΓΣΣ για 5ώρες καθημερινά); και ΟΠ: ομάδα πειράματος (από τον Πίνακα 4.16-4x5.4mg/kg ΣΒ). Ο MST για την ΟΠ1 ήταν 23.9 ± 3.21 ημέρες, για την ΟΠ1 ήταν 23.5 ± 4.53 , για την ΟΠ2 ήταν 38.1 ± 10.92 και για την ΟΠ ήταν 48 ± 14.93 ημέρες. Η ΟΠ2 παρουσίασε 160% επιμήκυνση του χρόνου επιβίωσης συγκρινόμενο με το χρόνο επιβίωσης της ΟΕ ($p < 0.05$).

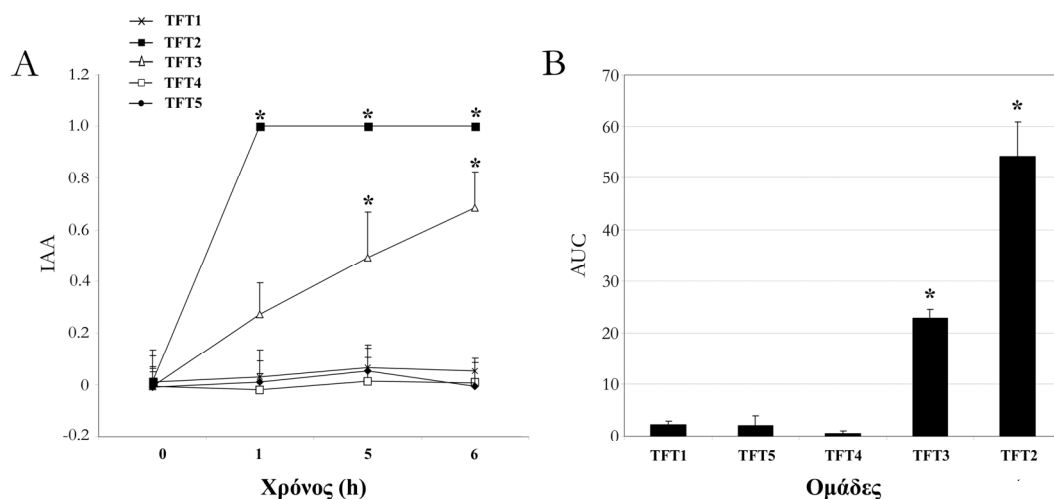


Γράφημα 4.29. Αναπαριστά την καμπύλη θανάτου των πειραματόζωων που ανήκουν στις ομάδες OE: Ομάδα ελέγχου (από τον Πίνακα 4.16); OP3: Ομάδα πειράματος 3(Συνέργεια, OP1+OP2); OP4: Ομάδα πειράματος 4 (Sham exposure-έκθεση σε τυχαίες συχνότητες) και OP: ομάδα πειράματος (από τον Πίνακα 4.16-4x5.4mg/kg ΣΒ). Ο MST για την OE ήταν 23.9 ± 3.21 ημέρες, για την OP3 ήταν 42.14 ± 12.92 , για την OP4 ήταν 23.3 ± 5.17 και για την OP ήταν 48 ± 14.93 ημέρες. Η OP3 παρουσίασε 176% επιμήκυνση του χρόνου επιβίωσης συγκρινόμενο με το χρόνο επιβίωσης της OE ($p < 0.05$), ενώ το 30% των πειραματόζωων της συνεχίζει να ζει.

4.5.4 Tail Flick Test

Σε αυτή την ενότητα θα γίνει σχολιασμός των αποτελεσμάτων μετά τη χορήγηση μορφίνης και την έκθεση πειραματόζωων σε 36 συχνότητες συντονισμού που προέκυψαν από το NMR φάσμα της μορφίνης. Τα αποτελέσματα προήλθαν από δύο αναλγητικά τεστ το Tail Flick Test και το Hot Plate Test.

Ο μέσος όρος του χρόνου απόκρισης για τα πειραματόζωα στις 0 ώρες ήταν ο ίδιος σε όλες τις ομάδες (TFT1-TFT5). Επιπροσθέτως, η χορήγηση 10mg/kg ΣΒ μορφίνης στα πειραματόζωα της ομάδας TFT2 αύξησε τον χρόνο απόκρισης σε όλες τις χρονικές περιόδους (1, 5 και 6h) πέραν του μέγιστου επιτρεπτού χρόνου των 15sec (Γράφημα 4.29A).



Γράφημα 4.29. (Α) Αναπαριστά το δείκτη αναλγητικής δραστηριότητας (IAA), (Β) Αναπαριστά το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (AUC). TFT1: Ομάδα ελέγχου; TFT2: Χορήγηση 10mg/kg ΣΒ μορφίνης; TFT3: Έκθεση σε 36 ΗΓΜΓΣΣ; TFT4: Χορήγηση 1mg/kg ΣΒ naloxone και έκθεση σε 36 ΗΜΓΣΣ; TFT5: Sham exposure-έκθεση σε 36 τυχαίες συχνότητες. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την TFT1, $p < 0.05$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως M.O. \pm τ.α.

Τα πειραματόζωα της ομάδας TFT3, τα οποία εκτέθηκαν στις 36 συχνότητες συντονισμού της μορφίνης αύξησαν κατά 56% και 99% το χρόνο απόκρισης στις χρονικές περιόδους 1 και 5h αντίστοιχα ($p < 0.05$). Επιπλέον, ο χρόνος απόκρισης παρέμεινε αυξημένος ακόμη 1h πέραν της 5ωρης έκθεσης στις ΗΜΓΣΣ (χρονική περίοδος 6h). Τα πειραματόζωα της ομάδας TFT5 που εκτέθηκαν σε τυχαίες συχνότητες, δεν παρουσίασαν σημαντική αύξηση στο χρόνο απόκρισης σε καμία από τις επιλεγμένες χρονικές περιόδους. Επίσης, τα πειραματόζωα της ομάδας TFT4, στα οποία χορηγήθηκε 1mg/kg ΣΒ

naloxone και στη συνέχεια εκτέθηκαν στις ΗΜΓΣΣ, δεν παρουσίασαν επίσης καμία αλλαγή στο μέσο χρόνο απόκρισης. Η αναλγητική επίδραση στα πειραματόζωα της ομάδας TFT3 ήταν σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με αυτή της ομάδας TFT1 ($p < 0.05$), αλλά όχι τόσο δυνατή όσο στα πειραματόζωα της ομάδας TFT2 (Γράφημα 4.29B). Ανάλυση των χρόνων απόκρισης των tail flick tests έδειξαν ότι υπήρχαν σημαντικές επιδράσεις όταν τα πειραματόζωα εκτέθηκαν στις συχνότητες συντονισμού της μορφίνης (Γράφημα 4.29A,B). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι 36 συχνότητες συντονισμού που προέκυψαν από το NMR φάσμα της μορφίνης εμφάνισαν αναλγητική επίδραση που αντιστοιχεί περίπου στο 50% της επίδρασης που προκαλεί αυτούσια η μορφίνη (Γράφημα 4.29B). Η αναλγητική επίδραση της ομάδας TFT3 είναι σταθερά αυξημένο ακόμη και 1h μετά από το τέλος της έκθεσης των πειραματοζώων (6h, $p < 0.05$). Με το tail flick test ωστόσο επαληθεύτηκε ότι ούτε η έκθεση σε τυχαίες συχνότητες (TFT5), ούτε η αρχική χορήγηση 1mg/kg ΣB naloxone και στη συνέχεια η έκθεση σε 36 ΗΜΓΣΣ οδήγησαν σε οποιαδήποτε σημαντική αναλγητική επίδραση (Πίνακας 4.18) (Γράφημα 4.29A,B).

Πίνακας 4.18. Χρόνοι απόκρισης (σε sec) των ομάδων TFT1-TFT5 στα 4 χρονικά σημεία

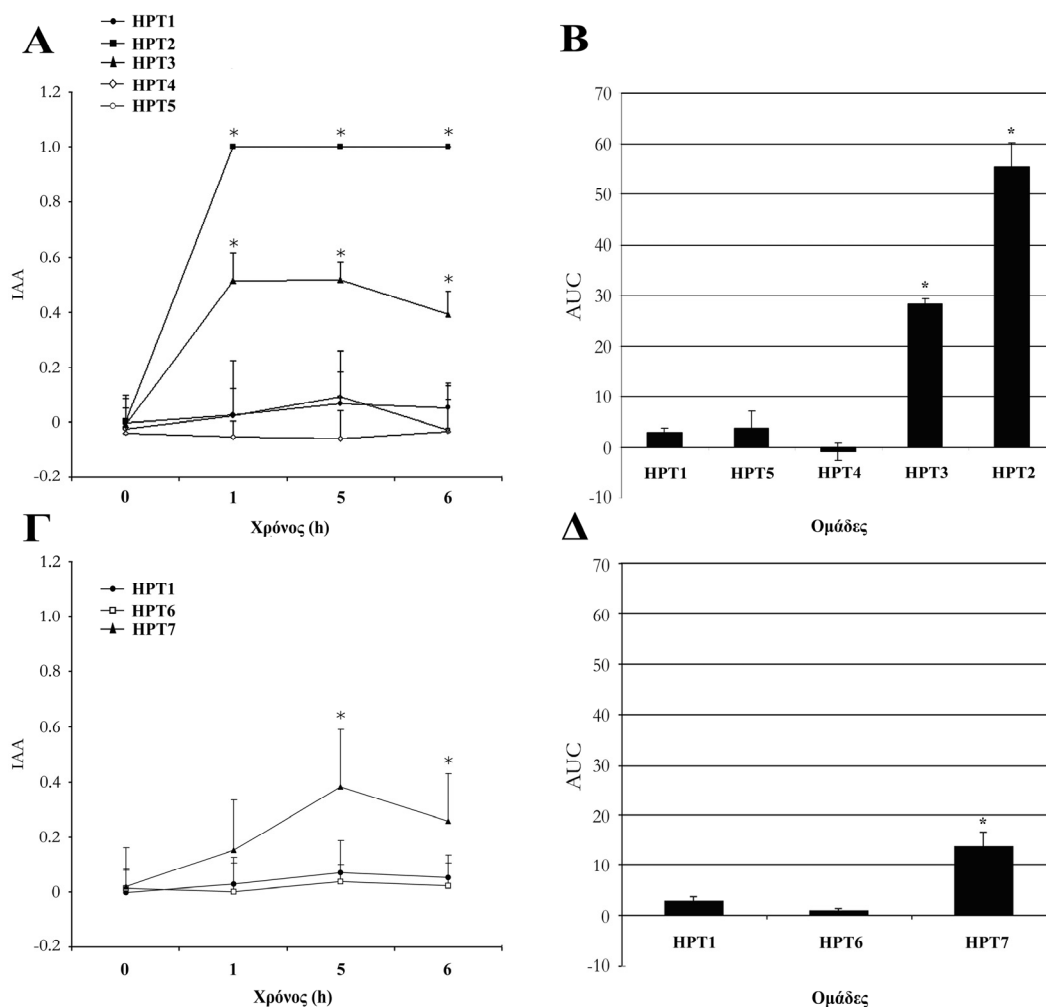
Ομάδες	0h	1h	5h	6h
TFT1	5.2±0.5	5.4±0.6	5.8±0.7	5.6±0.5
TFT2	5.3±1.2	>15.00*	>15.00*	>15.00*
TFT3	5.1±1.2	7.8±1.2	10.0±1.7*	11.9±1.4*
TFT4	5.0±0.5	4.8±0.6	4.9±0.8	5.2±1.0
TFT5	5.0±0.8	5.2±1.2	5.6±1.0	5.0±1.1

TFT1: Ομάδα ελέγχου; TFT2: Χορήγηση 10mg/kg ΣB μορφίνης; TFT3: Έκθεση σε 36 ΗΜΓΣΣ; TFT4: Χορήγηση 1mg/kg ΣB naloxone και έκθεση σε 36 ΗΜΓΣΣ; TFT5: Sham exposure-έκθεση σε 36 τυχαίες συχνότητες. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την TFT1, $p < 0.05$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως M.O.±τ.α.

4.5.5 Hot Plate Test

Ο μέσος όρος του χρόνου απόκρισης για τα πειραματόζωα στις 0 ώρες ήταν ο ίδιος σε όλες τις ομάδες (HPT1-HPT7). Επιπροσθέτως, η χορήγηση 10mg/kg ΣΒ μορφίνης στα πειραματόζωα της ομάδας HPT2 αύξησε το χρόνο απόκρισης σε όλες τις χρονικές περιόδους (1, 5 και 6h) πέραν του μέγιστου επιτρεπτού χρόνου των 40sec (Γράφημα 4.30A). Τα πειραματόζωα της ομάδας HPT3, τα οποία εκτέθηκαν στις 36 συχνότητες συντονισμού της μορφίνης αύξησαν σημαντικά το χρόνο απόκρισης σε όλες τις χρονικές περιόδους ($p < 0.05$). Σε αυτή την ομάδα η μεγαλύτερη αύξηση του χρόνου απόκρισης εμφανίστηκε 1h μετά την έκθεση στις ΗΜΓΣΣ ($p < 0.05$) (Γράφημα 4.30A). Επιπλέον, ο χρόνος απόκρισης αυξήθηκε κατά 62% στην 1h έκθεσης και παρέμεινε αυξημένος (49%) ακόμη και 1h πέραν της 5ωρης έκθεσης στις ΗΜΓΣΣ (χρονική περίοδος 6h). Όταν στα πειραματόζωα της HPT4 χορηγήθηκε naloxone 1mg/kg ΣΒ και μετά ακολούθησε η έκθεση σε ΗΜΓΣΣ, δεν παρατηρήθηκε κάποια αύξηση στο χρόνο απόκρισης. Η έκθεση των πειραματόζωων της ομάδας HPT3 στις συχνότητες συντονισμού της μορφίνης προκάλεσε παρόμοια αλλά ασθενέστερες αναλγητικές επιδράσεις σε σύγκριση με αυτές των πειραματόζωων της ομάδας HPT2 (Γράφημα 4.30A,B). Τα AUCs από το hot plate test αποκαλύπτουν ότι το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα της μορφίνης προκάλεσε το ήμισυ της επίδρασης που προκάλεσε η χορήγηση 10mg/kg ΣΒ (Γράφημα 4.30B). Επιπλέον, τα πειραματόζωα της ομάδας HPT4 δεν εμφάνισαν καμία σημαντική διαφορά στο χρόνο απόκρισης σε όλες τις χρονικές περιόδους (Πίνακας 4.19) και κατά συνέπεια στους αναλγητικούς δείκτες (Γράφημα 4.30A,B). Τα πειραματόζωα της ομάδας TFT5 που εκτέθηκαν σε ηλεκτρομαγνητικό φάσμα τυχαίων συχνοτήτων δεν παρουσίασαν αλλαγές στο χρόνο απόκρισης όπως φαίνεται στον Πίνακας 4.19 και καμία αναλγητική επίδραση όπως φαίνεται στο Γράφημα 4.30A,B. Επίσης, όταν στα πειραματόζωα της ομάδας HPT6 χορηγήθηκε μορφίνη 0.1mg/kg ΣΒ, δεν υπήρξε καμία αναλγητική δράση σε όλες τις

χρονικές περιόδους (Γράφημα 4.30Γ) και αυτό παρατηρείτε και από τις καμπύλες AUC στο Γράφημα 4.30Δ. Τέλος, τα πειραματόζωα της ομάδας HPT7 αύξησαν σημαντικά το χρόνο απόκρισης σε όλες τις χρονικές περιόδους και μάλιστα στις 5h έκθεσης είχαμε 65% αύξηση, η οποία διατηρήθηκε (50%) και 1h μετά την έκθεση ($p < 0.05$) (Γράφημα 4.30Γ) (Πίνακας 4.19).



Γράφημα 4.30. (Α, Γ) Αναπαριστούν το δείκτη αναλγητικής δραστηριότητας (ΙΑΑ), (Β, Δ) Αναπαριστούν το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (AUC). HPT1: Ομάδα ελέγχου; HPT2: Χορήγηση 10mg/kg ΣΒ μορφίνης; HPT3: Έκθεση σε 36 ΗΓΜΓΣΣ; HPT4: Χορήγηση 1mg/kg ΣΒ naloxone και έκθεση σε 36 ΗΜΓΣΣ; HPT5: Sham exposure-έκθεση σε 36 τυχαίες συχνότητες; HPT6: Χορήγηση 0.1mg/kg ΣΒ μορφίνης; HPT7: Συνέργεια-HPT3+HPT6. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την TFT1, $p < 0.05$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μ.Ο.±τ.α.

Πίνακας 4.19. Χρόνοι απόκρισης (σε sec) των ομάδων HPT1-HPT7 στα 4 χρονικά σημεία

Ομάδες	0h	1h	5h	6h
HPT1	18.3±1.9	18.9±2.1	19.9±2.5	19.5±1.8
HPT2	18.5±2.1	>40*	>40*	>40*
HPT3	17.8±1.9	29.3±4.0*	29.5±4.4*	26.7±4.3*
HPT4	17.4±1.1	17.1±1.2	16.9±2.2	17.5±2.5
HPT5	17.7±2.7	18.7±4.4	20.2±3.7	17.6±3.7
HPT6	18.3±1.4	18.1±2.3	18.9±1.3	18.6±1.8
HPT7	18.8±3.1	21.7±4.0*	26.7±4.5*	24.0±3.7*

HPT1: Ομάδα ελέγχου; HPT2: Χορήγηση 10mg/kg ΣΒ μορφίνης; HPT3: Έκθεση σε 36 ΗΓΜΓΣΣ; HPT4: Χορήγηση 1mg/kg ΣΒ naloxone και έκθεση σε 36 ΗΜΓΣΣ; HPT5: Sham exposure-έκθεση σε 36 τυχαίες συχνότητες; HPT6: Χορήγηση 0.1mg/kg ΣΒ μορφίνης; HPT7: Συνέργεια-HPT3+HPT6. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την TFT1, $p<0.05$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μ.Ο.±τ.α.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε πολλούς τύπους καρκίνου, η χημειοθεραπεία, αποτελεί ακόμη την καλύτερη θεραπεία, παρά τις παράπλευρες δυσμενείς επιδράσεις που έχει καθώς επίσης και τη μικρή διάρκεια απόκρισης. Ωστόσο, η χημειοθεραπεία εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ως μια βοηθητική θεραπεία, που συνδυαζόμενη με άλλες θεραπείες όπως ακτινοθεραπεία ή χειρουργική αντιμετώπιση, ενισχύει την απόκρισή της (Einhorn et al. 2003; Savarese and Cognetti 2003). Συνεπώς, η παρασκευή των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων αναπαριστά μια ερευνητική περιοχή για την ανάπτυξη νέων παραγόντων που θα κατέχουν μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση και ταυτόχρονα λιγότερες παράπλευρες επιδράσεις.

Έχει αναφερθεί ότι τα οργανοκασιτερικά(IV), και ειδικότερα τα τρι-οργανοκασιτερικά σύμπλοκα παρουσίασαν επιδράσεις σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές (Syng-ai et al. 2002; Balas et al. 2008; Hadjikakou et al. 2008; Mendes et al. 2008). Τα δικά μας *in vitro* και *in vivo* πειράματα επιβεβαιώνουν την αποτελεσματικότητα του συμπλόκου SnMNA ως ένα εν δυνάμει αντικαρκινικό παράγοντα. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν οι κυτταροτοξικές επιδράσεις του SnMNA σε δύο καρκινικές σειρές (LMS και MCF-7) καθώς και σε μια φυσιολογική σειρά (MRC-5). Βάσει των αποτελεσμάτων της κυτταροτοξικότητας με τις δύο μεθόδους (Trypan Blue Exclusion Assay και MTT Assay), παρατηρήσαμε ότι το SnMNA παρουσίασε ισχυρή κυτταροτοξική δράση έναντι των LMS και MCF-7 κυττάρων με τις IC₅₀ τιμές να είναι στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες σε σύγκριση με αυτές του χημειοθεραπευτικού cisplatin. Επίσης, το σύμπλοκο έδειξε ότι έχει την ικανότητα να αναστείλει κατά 87% περίπου τη δημιουργία αποικιών τόσο στα LMS όσο και στα MCF-7 κύτταρα όταν αυτό προστέθηκε σε συγκεντρώσεις 50 και 60 nM, αντίστοιχα.

Η απόκριση των κυττάρων στη θεραπεία με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες συντελείται μέσω της διαδικασίας της απόπτωσης. Ωστόσο, δεν υπάρχει μόνο ένας μηχανισμός μέσω του οποίου τα φάρμακα επάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Αυτό μπορεί να συμβεί μέσω της απόπτωσης ή της νέκρωσης των κυττάρων (Houghton 1999; Wu and Bonavida 2009). Έχει βρεθεί ότι τα οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα προκαλούν αποπτωτικό θάνατο μέσω διαφόρων αποπτωτικών μονοπατιών. Για παράδειγμα, ο Koch et al., αναφέρει ότι τα δι-οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα $\text{Me}_2\text{SnCl}_2 \cdot \text{L}^1$ (OTC-1), $\text{Et}_2\text{SnCl}_2 \cdot \text{L}^2$ (OTC-2) and ${}^n\text{Bu}_2\text{SnCl}_2 \cdot \text{L}^2$ (OTC-3) έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν την ακολουθία του κυτταρικού κύκλου και να επάγουν χρωμοσωμικές μεταβολές και ανταλλαγές των αδελφών χρωματίδων κυρίως στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα αυξάνοντας τόσο τα επίπεδα της p53 όσο και της p21 (Koch et al. 2008). Επίσης, το οργανοκασσιτερικό σύμπλοκο με τρία αιθυλικές ομάδες (triethyltin(IV)) lupinylsulfide hydrochloride (IST-FS 29) επάγει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-8 πιθανόν μέσω μιας διαδικασίας εξαρτώμενης από την p53 πρωτεΐνη (Barbieri et al. 2001). Το σύμπλοκο $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_6\text{CuSn}_2\text{Cl}_5$ επάγει επίσης την απόπτωση στην κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος SY5Y, συνοδευόμενη από τα μειωμένα επίπεδα της Bcl-2 πρωτεΐνης, την υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bak και την αύξηση των επιπέδων της caspase-3 (Chauhan et al. 2007). Απόπτωση προκάλεσαν και τα σύμπλοκα $(\text{Bu}_2\text{Sn})_2\text{TPPS}$ και $(\text{Bu}_3\text{Sn})_4\text{TPPS}$ σε ανθρώπινα κύτταρα μελανώματος (Costa et al. 2006). Στην παρούσα μελέτη το SnMNA φαίνεται ότι δρα μέσω του αποπτωτικού μηχανισμού τόσο στα LMS όσο και στα MCF-7 κύτταρα. Ειδικότερα, μετά την προσθήκη του SnMNA σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές, παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού της απόπτωσης σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου. Συγκεκριμένα, όταν το σύμπλοκο προστέθηκε σε συγκέντρωση 60nM τότε το ποσοστό της απόπτωσης ανήλθε σε 70.72% για τα LMS και 66.1% για τα MCF-7 κύτταρα. Η

επιβεβαίωση του αποπτωτικού θανάτου έγινε από την ανάλυση κατακερματισμού του DNA στην οποία εμφανίστηκε το «σπάσιμο» του DNA με την παρουσία μοτίβου σκάλας (τυπικό μοτίβο κατακερματισμένων ή συμπυκνωμένων πυρήνων).

Η τοξικότητα των τρι-οργανοασιτερικών συμπλόκων είναι πολύ γνωστή και διαδεδομένη από τότε που ανακάλυψαν ότι προκαλεί νευροτοξικότητα τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους (Besser et al. 1987; Ehman et al. 2007; Baken et al. 2007). Έχει βρεθεί ότι τα τρι-οργανοασιτερικά σύμπλοκα επηρεάζουν το κεντρικό και περιφερειακό νευρικό σύστημα μέσω της αναστολής της δραστηριότητας της Ca^{2+} -ATPase στον εγκέφαλο, αλληλεπιδρώντας με την καλμοδουλίνη (Yallapragada et al. 1991). Επιπροσθέτως, ο Barbieri et al., αναφέρει ότι η εκ στόματος χορήγηση του συμπλόκου triethyltin(IV)lupinysulfide hydrochloride (IST-FS 29) στα CDI ποντίκια, προκαλεί ελαφρά φλεγμονώδεις αλλοιώσεις του εντερικού βλεννογόνου και κενотоποίηση της λευκής ουσίας του εγκεφάλου, ενώ ο Snoeij αναφέρει ότι τα σύμπλοκα trimethyltin chloride και triethyltin chloride είναι ιδιαίτερα νεροτοξικά (Snoeij et al. 1985; Barbieri et al. 2002).

Στη δική μας μελέτη τα πειραματόζωα που τους χορηγήθηκε το SnMNA παρουσίασαν τοξικότητα στα νεφρά και στους πνεύμονες. Αυτή η τοξικότητα παρατηρήθηκε στα πειραματόζωα της ομάδας OT3 (οξεία τοξικότητα), στα οποία χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 80 mg/kg ΣΒ του SnMNA σε μία δόση. Σε αυτή τη δόση υπήρξε ολική νέκρωση του νεφρικού παρεγχύματος, ενώ στους πνεύμονες παρατηρήθηκε ενδοκυψελιδικό οίδημα και τοπικά εναπόθεση ινικής, ενώ παράλληλα υπήρξε μεγάλη μείωση ΣΒ (16.3%). Αυτή η δόση αντιστοιχεί στην LD_{50} τιμή, λόγω του ότι υπήρξε 60% θάνατος των πειραματοζώων. Παρόμοιες βλάβες παρατηρήθηκαν στην ομάδα XT2 όπου τα πειραματόζωα έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά 32 mg/kg ΣΒ σε 4 επαναλαμβανόμενες δόσεις, ενώ η απώλεια βάρους ανήλθε σε 12.3%.

Αν και υπάρχουν αρκετές αναφορές για την τοξικότητα των οργανοκασσιτερικών συμπλόκων, ωστόσο υπάρχουν περιορισμένες αναφορές για την αντικαρκινική τους δράση σε αντίστοιχα πειραματικά μοντέλα (Syng-Ai et al. 2001; Syng-ai et al. 2002; Höti et al. 2004; Sen and Chaudhuri 2009). Προκαταρκτικά *in vivo* πειράματα ενός οργανοκασσιτερικού συμπλόκου έδειξαν ότι ήταν ικανό να επιφέρει μια δόσο-εξαρτώμενη και συνάμα σημαντική μείωση του μεγέθους το όγκου, έως και 46%, χωρίς αξιοσημείωτη τοξικότητα σε καρκινοπαθή ποντίκια (P388 λευχαιμικά κύτταρα) (Barbieri et al. 2000), ενώ συνεχόμενες χορηγήσεις του συμπλόκου IST-FS 29 οδήγησαν σε σημαντική βελτίωση της αντικαρκινικής δράσης έναντι των όγκων B16F10 και 3LL (Barbieri et al. 2002). Επίσης ο Koch et al., ανφέρει πρόσφατα ότι τα δι-οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα OTC-1, OTC-2 and OTC-3 αύξησαν σημαντικά την αντικαρκινική τους δράση και την επιβίωση των καρκινοπαθών ποντικών με Dalton's Lymphoma (Koch et al. 2009).

Ωστόσο, το σύμπλοκο SnMNA εμφανίζει ισχυρές αντικαρκινικές δράσεις, επιμηκύνοντας σημαντικά το μέσο χρόνο επιβίωσης (MST) ($p < 0.05$) των καρκινοπαθών πειραματόζωων, μειώνοντας κατά πολύ τη μάζα του όγκου στο 30% των πειραματόζωων και μειώνοντας το μέσο ρυθμό ανάπτυξης του όγκου (MTGR) ($p < 0.05$). Το θεραπευτικό σχήμα που θα ακολουθηθεί σε κάθε περίπτωση είναι πολύ σημαντικό τόσο στον προσδιορισμό της τοξικότητας όσο και των αντικαρκινικών ιδιοτήτων. Ο διαχωρισμός της δόσης σε μικρότερες και η πολλαπλή χορήγηση αυτών οδηγεί στην υψηλότερη συγκέντρωση του φαρμάκου και στην αύξηση της αποτελεσματικότητάς του (Eikenberry 2009). Έτσι, η χορήγηση των 21.6 mg/kg ΣΒ του SnMNA, πραγματοποιήθηκε σε 4 επαναλαμβανόμενες δόσεις ανά 3 ημέρες των 5.4 mg/kg ΣΒ. Εκτός της μείωσης του μεγέθους των όγκων και την επιμήκυνσης του MST, το θεραπευτικό αυτό σχήμα οδήγησε σε πλήρη ίαση του 30% των πειραματόζωων, χωρίς μετέπειτα εξέλιξη της νόσου. Επίσης, από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην ικανότητα αναστολής της συσσώρευσης των

αιμοπεταλίων, το SnMNA παρουσίασε αναστολή κατά 50%, 70% και 100% όταν τα αιμοπετάλια επώαστηκαν με το ADP, PAF και LMS κύτταρα, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα των ιστολογικών μελετών στα καρκινοπαθή πειραματόζωα έδειξαν ότι δεν υπήρξαν καθόλου μεταστάσεις στην ΟΠ, σε σύγκριση με την ΟΕ όπου παρατηρήθηκαν μεταστάσεις στο 40% των πειραματοζώων. Βασιζόμενοι, στα *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo* αποτελέσματα το σύμπλοκο SnMNA μπορεί να λειτουργήσει εξαιρετικά ως ένας αντικαρκινικός και αντιμεταστατικός παράγοντας.

Τα δεδομένα που προέκυψαν από όλες τις πειραματικές διαδικασίες του συμπλόκου SnMNA, μας δίνει τη δυνατότητα να αποκτήσουμε μια εικόνα για τον τρόπο δράσης του συμπλόκου αυτού, αν και χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για την εύρεση του ακριβούς μηχανισμού δράσης του. Σε αυτό το σύμπλοκο βασίστηκε το μεγαλύτερο μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής, οπότε είναι κατανοητός ο λόγος που μελετήθηκε εκτενώς.

Τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία αποτελούνται από ένα αχανές φάσμα συχνοτήτων, θεωρητικά από το 0 έως το άπειρο, με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά γνωρίσματα και ιδιότητες, γεγονός που τα καθιστά σημαντικό αντικείμενο έρευνας. Οι περισσότερες έρευνες που διεξάγονται στο χώρο των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων αφορούν την επίδραση των υψηλών (σε MHz ή GHz) ή των πολύ χαμηλών συχνοτήτων (50 ή 60Hz), στην υγεία των ανθρώπων, τις πιθανές βλάβες που προκαλούν ή και τα οφέλη που προσκομίζουμε από αυτά. Εκτός από τις καθαρά ερευνητικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και πολλές επιδημιολογικές μελέτες. Ωστόσο, τόσο στη μία κατηγορία όσο και στην άλλη υπάρχουν αντιφατικές απόψεις. Πιο συγκεκριμένα, η έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία υψηλών συχνοτήτων (π.χ. αυτές που χρησιμοποιεί η κινητή τηλεφωνία) έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει βλάβες στο DNA (Gandhi et al. 2005; Zhang et al. 2006), ορμονικές αλλαγές (Forgacs et al. 2006), αύξηση του κινδύνου για κακοήθεις όγκους του εγκεφάλου (Lonn et al. 2004;

Hardell et al. 2005) κ.ά. Ωστόσο, υπάρχουν και οι μελέτες πάνω στο ίδιο φάσμα συχνοτήτων που αναφέρουν ότι δεν υπάρχει βλάβη στις έλικες του DNA (Li L et al. 2001; Gatta et al. 2003; Sakuma et al. 2006; Stronati et al. 2006).

Αυτή η αντιφατικότητα απόψεων υπάρχει και στα αποτελέσματα των μελετών μετά από έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία πολύ χαμηλών συχνοτήτων (όπως 50 ή 60Hz). Έτσι, από τη μια μεριά υπάρχουν αποτελέσματα που υποδεικνύουν βλάβη στο DNA και χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Ivanecits et al. 2005; Yokus et al. 2005; Winker et al. 2005; Delimaris et al. 2006) και συσχέτιση με εμφάνιση παιδικής λευχαιμίας (Repacholi et al. 1999; Greenland et al. 2000), ενώ από την άλλη υπάρχουν μελέτες που παρουσιάζουν ότι η έκθεση σε αυτά τα πεδία λειτουργεί ως μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA (Chow et al. 2000; Robison et al. 2002), μειώνει την ανάπτυξη των όγκων, προκαλεί απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα και αυξάνει το μέσο όρο επιβίωσης καρκινοπαθών πειραματόζωων (Tofani et al. 2001; Tofani et al. 2002).

Οι μεγάλες αυτές διαφορές στις μελέτες οφείλονται κατά ένα μεγάλο μέρος στην ανομοιογένεια των τεχνικών που χρησιμοποιούνται όπως επίσης και στις παραλλαγές μεταξύ των ίδιων πειραματικών διαδικασιών. Επιπροσθέτως, όπως αναφέρει και ο Phillips et al. σε μια πρόσφατη ανασκόπηση, είναι πολύ δύσκολο να γίνει εκτίμηση των διαφορών στις μεθοδολογίες μεταξύ των μελετών (Phillips et al. 2009). Ο ίδιος αναφέρει ότι ακόμη και προσπάθεια να γίνει από κάποιον ερευνητή ή ομάδα να επαναλάβει μια πειραματική διαδικασία ενός άλλου ερευνητή ή ομάδας πιθανόν να μην εξάγει το ίδιο αποτέλεσμα. Αυτό συνέβη στην περίπτωση όπου ο Malyapa et al. (Malyapa et al. 1998) προσπάθησε να επαναλάβει τη δουλειά των Lai και Singh (Lai and Singh 1995) χωρίς επιτυχία. Αυτό έγινε γιατί ακόμη και τότε τα πειραματικά πρωτόκολλα διέφεραν μεταξύ τους.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή δεν χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτρομαγνητικά πεδία πολύ υψηλών ή πολύ χαμηλών συχνοτήτων (900 MHz, 2450 MHz, 50Hz, 60Hz κ.ά.)

όπως έγινε στις άλλες μελέτες. Όπως περιγράφεται αναλυτικά στη μεθοδολογία οι συχνότητες που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τα NMR φάσματα του SnMNA και της μορφίνης, που αποτελούν το ενεργειακό αποτύπωμα τους. Αυτό διαφοροποιεί την παρούσα διδακτορική διατριβή σε σύγκριση με τις άλλες μελέτες.

Μετά την πλήρη μελέτη του συμπλόκου και γνωρίζοντας αρκετά για τον τρόπο δράσης του, εξήχθησαν οι συχνότητες συντονισμού του από το NMR φάσμα του SnMNA και εκτέμθηκαν στις καρκινικές κυτταρικές σειρές LMS και MCF-7 και στη φυσιολογική κυτταρική σειρά MRC-5 για 2x(45, 120 και 300) λεπτά. Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας έδειξε ότι το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα συχνοτήτων συντονισμού του SnMNA είχε την ικανότητα να αυξήσει σημαντικά τον κυτταρικό θάνατο στις καρκινικές σειρές έως και 29% (στα LMS κύτταρα και με χρόνο έκθεσης 2x300 λεπτών) ($p < 0.05$), ενώ παράλληλα περιορίσε την κυτταροτοξικότητα στις φυσιολογικές ινοβλάστες στο 6.6% σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου αυξήθηκε πολύ περισσότερο όταν προστέθηκε το SnMNA σε μη δραστική συγκέντρωση (10^{-18} M) και ταυτόχρονα εκτέμθηκε το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα αυτού. Η κυτταροτοξικότητα έφτασε το 50.6% και 37.6% στα LMS και MCF-7 αντίστοιχα ($p < 0.05$) ενώ στις ινοβλάστες υπήρξε κυτταρικός θάνατος σε ποσοστό 14.3%. Παρατηρούμε λοιπόν ότι εμφανίζεται το φαινόμενο της συνέργειας και σε μεγαλύτερο βαθμό στην κυτταρική σειρά LMS. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η συνεργιστική δράση του συμπλόκου σε συγκέντρωση 10^{-18} M και ταυτόχρονη έκθεση στις συχνότητες συντονισμού για 2x300 λεπτά, είναι ίδια με τη κυτταροτοξική δράση που προκαλεί το SnMNA σε συγκέντρωση 40nM (IC_{50}). Η σημαντικότητα της συνέργειας θα γίνει πιο εύκολα αντιληπτή στα αποτελέσματα των *in vivo* πειραμάτων. Πρέπει να τονιστεί ότι ενώ οι συχνότητες συντονισμού από το NMR φάσμα παρουσίασαν τα προαναφερθέντα αποτελέσματα, οι συχνότητες από το IR φάσμα

δεν είχαν σχεδόν καμία επίδραση, όπως συνέβη και στην περίπτωση της εκπομπής τυχαίων φασμάτων.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, δεν υπάρχει ένας αποδεδειγμένος μηχανισμός(οί) επίδρασης των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων στη βλάβη και στην επιδιόρθωση του DNA. Αυτό όμως δεν μειώνει την αξιοπιστία των προτεινόμενων μηχανισμών δράσης που μπορούν να αξιολογήσουν τα παρατηρούμενα αποτελέσματα. Επιπλέον τα φάσματα του συντονισμού έχουν εξειδικευμένη βιολογική επίδραση. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι το φαινόμενο του συντονισμού είναι σημαντική παράμετρος αποτελεσματικής δράσης.

Ένας πιθανός μηχανισμός για την επίδραση των ραδιοφωνικών συχνοτήτων στο DNA είναι η βλάβη που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες. Έπειτα από μελέτες που έδειξαν ότι δύο εκκαθαριστές των ελευθέρων ριζών (μελατονίνη και N-tert-butyl- α -phenylnitron) εμπόδισαν τη βλάβη του DNA σε εγκεφαλικά κύτταρα ποντικού ύστερα από έκθεση σε ραδιοφωνικές συχνότητες, οι συγγραφείς υπέθεσαν ότι αυτή η βλάβη προήλθε από την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Jajte et al. 2001; Lai et al. 2004). Επιπροσθέτως, αποτελέσματα κάποιων μελετών εμφανίστηκαν να συμφωνούν ότι η έκθεση σε ραδιοφωνικές συχνότητες οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (Oktem et al. 2005; Yariktas et al. 2005; Ozguner et al. 2006). Υπάρχουν ωστόσο πειράματα που προτείνουν ότι τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία επιδρούν τουλάχιστον σε κάποια από τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που επηρεάζονται από τον εστέρα φορβόλης. Ένα αρχικό σημείο που σχετίζει τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία με τη μεταγωγή σήματος των κυττάρων είναι μια αύξηση στη ροή των ιόντων ασβεστίου (Walleczek 1992). Ο Liburdy αναφέρει ότι υπήρξε αύξηση της ροής ιόντων Ca^{2+} όταν λεμφοκύτταρα εκτέθηκαν σε ένα ημιτονοειδές μαγνητικό πεδίο (Liburdy 1992), ενώ και σε μια άλλη δημοσίευση αναφέρεται σε παρόμοια αλλαγή (Karabakhtsian et al. 1994).

Στην πειραματική διαδικασία που εκτέμφθηκαν οι 22 ΗΜΓΣΣ μόνο στο θρεπτικό υλικό (DMEM) για 2x300 λεπτά, περιέχοντας ή μη το SnMNA σε συγκέντρωση 10^{-18} M, παρατηρήθηκε ότι υπήρξε αύξηση της κυτταροτοξικότητας. Στα LMS κύτταρα η κυτταροτοξικότητα αυξήθηκε κατά 5.5% στην ομάδα Θ3 και κατά 11.3% στην ομάδα Θ2 σε σύγκριση με την ομάδα Θ1 ($p<0.05$; $p<0.001$). Τα ίδιο μοτίβο επαναλήφθηκε και στα MCF-7 κύτταρα όπου παρατηρήθηκε αύξηση της κυτταροτοξικότητας κατά 16 και 16.5% για τις ομάδες Θ2 και Θ3, αντίστοιχα, σε σύγκριση με την ομάδα Θ1 ($p<0.001$; $p<0.001$). Τα πειραματικά αυτά αποτελέσματα μας αποδεικνύουν ότι η κυτταροτοξικότητα που οφείλεται στις 22 ΗΜΓΣΣ που χρησιμοποιήθηκαν δεν οφείλεται στις ελεύθερες ρίζες και τις βλάβες που προκαλούν αυτές.

Αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι η έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία αυξάνουν σημαντικά το ποσοστό της απόπτωσης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Tofani et al. 2001; Tofani et al. 2002; Lantow et al. 2006). Σύμφωνα με την κυτταρομετρία ροής και τον κατακερματισμό του DNA, το SnMNA δρα αποπτωτικά ήδη από την συγκέντρωση των 20nM, ενώ στα 60nM η απόπτωση φθάνει το 71% (για τα LMS). Όταν τα LMS κύτταρα εκτέθηκαν στις ΗΜΓΣΣ για 120 και 300 min υπήρξε μια μικρή αύξηση της τάξης των 13.9% και 7.7% αντίστοιχα. Στις ομάδες της συνέργειας παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση 31.7% και 42.7% όταν στα LMS κύτταρα προστέθηκε το SnMNA (10^{-18} M) και ταυτόχρονα εκτέμφθηκε το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα αυτού για 2x120 και 2x300 λεπτά, αντίστοιχα ($p<0.05$). Παρατηρούμε λοιπόν ότι οι ΗΜΓΣΣ αύξησαν την απόπτωση στα LMS κύτταρα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και στις δυο χρονικές περιόδους έκθεσης (2x120 και 2x300 λεπτά), ενώ το ποσοστό της αύξησης στις ομάδες της συνέργειας έφθασε στα επίπεδα απόπτωσης του SnMNA. Αυτό είναι πολύ σημαντικό αποτέλεσμα, γιατί το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα επάγει εν μέρει τον ίδιο μηχανισμό θανάτωσης των κυττάρων (απόπτωση) όπως γίνεται και με το ίδιο το σύμπλοκο. Από τις

μελέτες που υπάρχουν δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου που να αναφέρονται μεταβολές, αλλά αυτές παρατηρούνται σε όλες τις φάσεις (Liu et al. 2003; Wolf et al. 2005; Lantow et al. 2006; Buttiglione et al. 2007; Focke et al. 2010). Τα πειραματικά δεδομένα που προκύπτουν από την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου στα LMS κύτταρα, μετά από προσθήκη του SnMNA δείχνουν ότι τα κύτταρα βρίσκονται στην φάση G2/M (G2/M phase arrest), ενώ το ποσοστό στην φάση S παραμένει σχεδόν σταθερό. Το ίδιο μοτίβο επαναλήφθηκε όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν στις 22 ΗΜΓΣΣ ή και ταυτόχρονα προστέθηκε το SnMNA (10^{-18} M). Παρατηρούμε λοιπόν ότι οι ΗΜΓΣΣ του SnMNA είχαν την ικανότητα να επιφέρουν τις ίδιες αλλαγές στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου όπως αυτό έγινε με το ίδιο το SnMNA.

Οι μελέτες που αναφέρονται σε βλάβες στο DNA ύστερα από έκθεση των κυττάρων, πειραματοζώων ή και ανθρώπων σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία υψηλών και πολύ χαμηλών συχνοτήτων, δεν αναφέρουν σχεδόν καθόλου αλλαγές σε βιοχημικές παραμέτρους, αναλύσεις αίματος ή μελέτες τοξικότητας. Υπάρχουν λίγες δημοσιευμένες μελέτες που αναφέρουν ότι η έκθεση σε μαγνητικά πεδία πολύ χαμηλών συχνοτήτων δεν εμφανίζουν τοξικότητα. Συγκεκριμένα, δεν παρουσιάστηκαν μορφολογικές αλλαγές με βάση την ιστολογική εικόνα, διαφορές στις αναλύσεις αίματος με εξαίρεση μια σημαντική αύξηση των επιπέδων της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης που επιβεβαιώνει τη απουσία της ηπατικής νέκρωσης κατά την ιστολογική εξέταση (Tofani et al. 2001; Tofani et al. 2002). Για το SnMNA πραγματοποιήθηκαν τοξικολογικές μελέτες που έδειξαν ότι το σύμπλοκο προκαλεί νεφροτοξικότητα και αιμορραγικό οίδημα στους πνεύμονες στην ομάδα OT3 και XT2. Ωστόσο, δεν πραγματοποιήθηκε μελέτη τοξικότητας για τις ΗΜΓΣΣ μιας και η βιβλιογραφία δεν αναφέρει τέτοιου είδους επιδράσεις.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, υπάρχουν επιδημιολογικές μελέτες που σχετίζουν την έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία διαφόρων συχνοτήτων με την εμφάνιση καρκίνου και

ειδικότερα παιδικής λευχαιμίας (London et al. 1991; Greenland et al. 2000). Οι περισσότερες μελέτες σε πειραματόζωα δεν αναφέρουν κάποια επίδραση των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων ικανή να οδηγήσει σε ανάπτυξη όγκων. Από τα δεδομένα που εξάγονται βάσει των επιδημιολογικών μελετών οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι ο αναγκαίος χρόνος έκθεσης για να παρατηρήσουμε κάποιο αρνητικό αποτέλεσμα είναι τουλάχιστον 5 χρόνια. Αυτό όμως είναι αδύνατον να συμβεί σε επίπεδο πειραματόζωων διότι τα ποντίκια και οι αρουραίοι δεν επιζούν περισσότερο από 2 χρόνια περίπου σε φυσιολογικές καταστάσεις. Κατανοούμε λοιπόν ότι τα πειραματόζωα θα καταλήξουν πολύ πριν την ευκαιρία να αναπτύξουν όγκους (Johansson 2009). Αυτό βέβαια εξαρτάται και από το πόσο γρήγορα μπορούν να αναπτύξουν όγκους μιας και τα 2 χρόνια επιβίωσης των πειραματόζωων θα πρέπει να συγκριθούν με τα χρόνια επιβίωσης του ανθρώπου. Φαίνεται λοιπόν προφανές ότι οποιοδήποτε αρνητικό αποτέλεσμα από την χρόνια έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία διαφόρων συχνοτήτων θα παρουσιαστεί μόνο από τις επιδημιολογικές μελέτες. Δύο προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι η έκθεση καρκινοπαθών πειραματόζωων σε μαγνητικά πεδία πολύ χαμηλών συχνοτήτων επιφέρει σημαντική μείωση στους όγκους ($p < 0.01$), αναστολή της ανάπτυξης των όγκων καθώς και επιμήκυνση του χρόνου επιβίωσης (Tofani et al. 2001; Tofani et al. 2002). Προηγούμενες δικές μας μελέτες έχουν δείξει ότι η έκθεση των καρκινοπαθών πειραματόζωων σε συχνότητες συντονισμού προκαλούν σημαντική επιμήκυνση στο MST σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου καθώς και σημαντική μείωση του μεγέθους των όγκων μέχρι και πλήρη εξαφάνιση αυτών (Avdikos et al. 2007). Το SnMNA χορηγούμενο στα πειραματόζωα της ΟΠ (4x5.4 mg/kg ΣΒ) εμφάνισε στατιστικά σημαντική επιμήκυνση του MST κατά 200% σε σύγκριση με την ΟΕ ($p < 0.05$), σημαντική μείωση των όγκων και τέλος ίαση στο 30% των πειραματόζωων. Αντίστοιχα, όταν τα καρκινοπαθή πειραματόζωα των ΟΠ2 και ΟΠ3 εκτέθηκαν στις 22 ΗΜΓΣΣ εμφάνισαν σημαντική επιμήκυνση του MST κατά 160 και

176% αντίστοιχα, μείωση του μεγέθους των όγκων και το πιο σημαντικό αποτέλεσμα είναι ότι στο 30% των πειραματόζωων της ΟΠ3 υποχώρησαν εντελώς οι όγκοι και τα πειραματόζωα δεν εμφάνισαν ξανά τη νόσο. Το αποτέλεσμα αυτό μας υποδεικνύει για άλλη μια φορά ότι η συνέργεια παρουσιάζει εξαιρετικά αποτελέσματα που σε πολλές πειραματικές διαδικασίες προσομοιάζουν τη δράση του SnMNA. Εκτός του φαινομένου της συνέργειας σημαντικά αποτελέσματα παρουσίασε και η έκθεση μόνο στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

Στο δεύτερο κομμάτι της παρούσας διδακτορικής διατριβής παρουσιάστηκε η επίδραση των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων συχνοτήτων συντονισμού, προερχόμενων από το NMR φάσμα της μορφίνης, στην αναλγησία φυσιολογικών επίμυων Wistar. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της μορφίνης σε ποντίκια επιφέρει σημαντικά αναλγητικά αποτελέσματα, που αξιολογήθηκαν με δύο διαφορετικά τεστ, το Tail flick test ή το Hot plate test. Η έκθεση των πειραματόζωων στις ΗΜΓΣΣ της μορφίνης οδήγησε σε παρόμοια αναλγητικά αποτελέσματα όπως η μορφίνη. Σε αντίθεση, η έκθεση των πειραματόζωων σε 36 τυχαίες συχνότητες δεν εμφάνισαν αναλγητικές επιδράσεις στα πειραματόζωα. Αυτό σημαίνει ότι οι αναλγητικές επιδράσεις είναι εξειδικευμένες στο φάσμα συχνοτήτων συντονισμού της μορφίνης. Αυτός ο εξειδικευμένος τύπος φάσματος έχει εφαρμοστεί σε προηγούμενες μελέτες μας που εκθέσαμε κύτταρα και ζώα στο NMR φάσμα άλλων δραστικών ουσιών, όπως ο NGF που προκάλεσε τη διαφοροποίηση των PC12 κυττάρων. Τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία συχνοτήτων συντονισμού που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις μελέτες μας δεν παρουσίασαν διαφοροποίηση στην θερμοκρασία και επομένως τα αποτελέσματα δεν οφείλονται σε θερμικές επιδράσεις (thermal effects). Μια μελέτη του Endler et al., αναφέρει ότι η ηλεκτρονική εκπομπή της θυροξίνης σε βατράχους προκαλεί σχεδόν το ίδιο αποτέλεσμα που προκαλεί η ίδια η θυροξίνη στους βατράχους (Endler et al. 1995). Επίσης,

έχει επίσηςδειχτεί ότι τα ηλεκτρομαγνητικά φάσματα προερχόμενα από το phorbol myristate acetate που εκπέμφθηκαν ηλεκτρονικά προκάλεσαν την παραγωγή ελευθέρων ριζών σε ανθρώπινα ουδετερόφιλα όπως προκλήθηκε και με την προσθήκη της ίδιας της ουσίας (Thomas et al. 2005). Η χορήγηση της ναλοξόνης, ως ενός μη εκλεκτικού ανταγωνιστή των υποδοχέων των οπιούχων (van Dorp et al. 2007), ανέστειλε τόσο της αναλγητικές επιδράσεις της μορφίνης όσο και του NMR φάσματος αυτής. Βάσει αυτού του δεδομένου εξαγάγουμε το συμπέρασμα ότι οι αναλγητικές επιδράσεις του NMR φάσματος της μορφίνης πιθανόν να ασκήθηκαν μέσω άμεσης ή έμμεσης ενεργοποίησης των μ-οπιούχων υποδοχέων. Επίσης, ότι οι αναλγητικές επιδράσεις του φάσματος της μορφίνης δεν μπορούν να οφείλονται στις αναλγητικές επιδράσεις λόγω στρες μετά την έκθεση στα ηλεκτρομαγνητικά πεδία αυτή η άποψη επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα που έδειξαν ότι η έκθεση σε τυχαία φάσματα δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην αναλγησία σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Πάρα πολλοί ερευνητές ανά τον κόσμο ασχολούνται με τις επιδράσεις των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων υψηλών ή πολύ χαμηλών συχνοτήτων σε κύτταρα, πειραματόζωα και ανθρώπους. Ωστόσο, υπάρχουν πολλά αντιφατικά αποτελέσματα όσον αφορά τις βλάβες που προκαλούν τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία. Αυτό όπως ήδη αναφέρθηκε (Phillips et al. 2009) οφείλεται στις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται κάθε φορά, ή ακόμη και σε διαφορές ανάμεσα στις ίδιες μεθόδους. Ένα άλλο σημαντικό πρόβλημα είναι ότι για τις επιδράσεις της χρόνιας έκθεσης σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία διαθέτουμε μόνο από τις επιδημιολογικές και όχι από αμιγώς ερευνητικές μελέτες. Τέλος, ο μηχανισμός δράσης παρ' όλες τις προσπάθειες που έχουν γίνει, αν και προτείνονται κάποιοι μηχανισμοί, δεν είναι ακόμη γνωστός. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή δεν χρησιμοποιήθηκαν τυχαίες συχνότητες αλλά συχνότητες συντονισμού από τα NMR φάσματα τόσο του συμπλόκου SnMNA όσο και της μορφίνης.

Συνολικά, συμπεραίνουμε ότι το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα συχνοτήτων συντονισμού, προερχόμενο από το NMR φάσμα, έχει την ικανότητα να προκαλέσει παραπλήσια αποτελέσματα σε σύγκριση με τα αποτελέσματα των ίδιων βιολογικά δραστικών ουσιών. Επίσης, σε όλα τα πειράματα παρατηρήθηκε το φαινόμενο της συνέργειας, όπου η ταυτόχρονη έκθεση στις ΗΜΓΣΣ και η προσθήκη των βιολογικά δραστικών μορίων σε μη δραστικές συγκεντρώσεις εμφάνισε πολύ καλύτερα αποτελέσματα από το επιμέρους άθροισμα αυτών.

Είναι πιθανό ότι μέσω της εκπομπής των ΗΜΓΣΣ να μεταφέρεται η κατάλληλη «πληροφορία» του εκάστοτε μορίου (ενεργειακό αποτύπωμα) η οποία μπορεί να αναπαραγάγει παραπλήσια αποτελέσματα όπως το αρχικό μόριο. Η λήψη του NMR φάσματος οποιουδήποτε βιολογικά δραστικού μορίου και η χρησιμοποίηση των συχνοτήτων συντονισμού αυτού δίνει τη δυνατότητα προσομοίωσης της δράσης του τουλάχιστον σε πολύ μεγάλο βαθμό και χωρίς την εμφάνιση ανεπιθύμητων παρενεργειών.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

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

1. Το SnMNA παρουσιάζει ισχυρή κυτταροτοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα, ενώ είναι σημαντικά πιο ισχυρό από το cisplatin.
2. Το SnMNA δρα μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης και μάλιστα είναι δοσοεξαρτώμενο.
3. Στα πειραματόζωα το SnMNA χορηγούμενο σε χαμηλές δόσεις προκαλεί ήπια νεφροτοξικότητα.
4. Παρουσιάζει πολύ καλές αντικαρκινικές ιδιότητες ενώ ταυτόχρονα είναι και πολύ καλός αντιμεταστατικός παράγοντας.
5. Οι ηλεκτρομαγνητικές συχνότητες συντονισμού (ΗΜΓΣΣ) του SnMNA εμφανίζουν ισχυρή κυτταροτοξική δράση στις καρκινικές σειρές.
6. Οι ΗΜΓΣΣ προκαλούν επίσης απόπτωση, μιμούμενες δηλαδή το μηχανισμό δράσης του ίδιου του συμπλόκου.
7. Στα καρκινοπαθή πειραματόζωα οι ΗΜΓΣΣ δρουν το ίδιο καλά όπως το ίδιο το SnMNA.
8. Οι ΗΜΓΣΣ της μορφίνης προκαλούν αναλγησία σε μεγάλο βαθμό, η οποία αναστέλλεται από την ναλοξόνη.
9. Εμφανίζεται το φαινόμενο της συνέργειας σε αρκετές πειραματικές διαδικασίες.

10. Μέσω των ΗΜΓΣΣ μεταφέρεται η κατάλληλη «πληροφορία» του εκάστοτε μορίου (ενεργειακό αποτύπωμα) η οποία μπορεί να αναπαραγάγει παραπλήσια αποτελέσματα όπως το αρχικό μόριο.
11. Μετατρέποντας τα NMR φάσματα σε ΗΜΓΣΣ μπορούμε να πετύχουμε επιθυμητά αποτελέσματα χωρίς παράπλευρες επιδράσεις.
12. Μόνο τα φάσματα συντονισμού μπορούν να δώσουν τα αντίστοιχα αποτελέσματα. Γι' αυτό το λόγο οι συχνότητες από το IR φάσμα δεν εμφάνισαν καμία σχεδόν δράση.
13. Χημειοθεραπευτικά μπορούν να δίνονται μέσω ΗΜΓΣΣ και με το φαινόμενο της συνέργειας να πετύχουμε τα επιθυμητά αποτελέσματα χωρίς τις παρενέργειες.

7. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

«Αλληλεπίδραση βιολογικά δραστικών ουσιών με ηλεκτρομαγνητικά πεδία. Πειραματική μελέτη»

Η επίδραση των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων στα βιολογικά συστήματα έχουν αποδειχθεί μέσω ενός μεγάλου αριθμού μελετών και πιο συγκεκριμένα από επιδημιολογικές μελέτες. Ένα σημαντικό βήμα στην έρευνα των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων είναι να αποδειχθεί ο μηχανισμός με τον οποίο αυτά μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στα ζώντα συστήματα.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η επίδραση του φάσματος συντονισμού του SnMNA συμπλόκου σε *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo* μοντέλα και η πιθανή εμφάνιση του φαινομένου της συνέργειας των δράσεων του συμπλόκου και του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος συντονισμού αυτού. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση του φάσματος συντονισμού της μορφίνης σε *in vivo* μοντέλα στην αύξηση της αναλγητικής ικανότητας σε επίμυες Wistar.

Τα *in vitro* πειράματα έδειξαν ότι το SnMNA παρουσιάζει ισχυρή κυτταροτοξική δράση (200 φορές ισχυρότερη από την πλατίνα) στα LMS και MCF-7 κύτταρα και οδηγεί τα κύτταρα σε αποπτωτικό θάνατο. Σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του SnMNA αυξάνεται το ποσοστό της απόπτωσης με το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων να βρίσκεται στη φάση G2/M. Τα *in vivo* πειράματα έδειξαν ότι προκαλεί νεφροτοξικότητα με ολική νέκρωση των σωληναρίων και των σπειραμάτων των νεφρών στην εφάπαξ δόση

των 80mg/kg ΣΒ, ενώ στη χορήγηση 4x5.4mg/kg ΣΒ (χρόνια τοξικότητα) εμφανίστηκε ήπια τοξικότητα. Επίσης, αύξησε (4x5.4mg/kg ΣΒ) το μέσο χρόνο επιβίωσης των καρκινοπαθών πειραματόζωων της ομάδας πειράματος κατά 200%, ενώ το 30% αυτών επιβίωσε. Παράλληλα, το SnMNA λειτούργησε και ως αντιμεταστατικός παράγοντας βάσει των αποτελεσμάτων της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

Από το NMR φάσμα του SnMNA προέκυψαν 22 συχνότητες συντονισμού. Η έκθεση των LMS και MCF-7 κυττάρων σε αυτές τις συχνότητες οδήγησε σε αύξηση της κυτταροτοξικότητας, ενώ στην περίπτωση της συνέργειας η δράση αυτή ήταν ανάλογη της δράσης του συμπλόκου. Η έκθεση στις συχνότητες προκάλεσε απόπτωση αντίστοιχη του συμπλόκου, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό των εκτιθέμενων κυττάρων βρίσκεται στη φάση G2/M. Επίσης, δεν προκάλεσε τοξικότητα στους φυσιολογικούς επίμυες Wistar, ενώ επιμήκυνε το μέσο χρόνο επιβίωσης στους καρκινοπαθείς επίμυες και το 30% αυτών επιβίωσε.

Η έκθεση των πειραματόζωων για 5 ώρες στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα 36 συχνοτήτων συντονισμού της μορφίνης οδήγησε σε αύξηση της αναλγησίας στο ήμισυ αυτής που προκαλεί η χορήγηση της μορφίνης σε δόση 10mg/kg ΣΒ.

Είναι πιθανό ότι μέσω της εκπομπής των ΗΜΓΣΣ να μεταφέρεται η κατάλληλη «πληροφορία» του εκάστοτε μορίου (ενεργειακό αποτύπωμα) η οποία μπορεί να αναπαραγάγει παραπλήσια αποτελέσματα όπως το αρχικό μόριο. Η λήψη του NMR φάσματος οποιουδήποτε βιολογικά δραστικού μορίου και η χρησιμοποίηση των συχνοτήτων συντονισμού αυτού δίνει τη δυνατότητα προσομοίωσης της δράσης του τουλάχιστον σε πολύ μεγάλο βαθμό και χωρίς την εμφάνιση ανεπιθύμητων παρενεργειών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ

«Interactions of biologically active substances with electromagnetic fields. Experimental study»

The effects of electromagnetic fields (EMFs) have been proved by a large number of studies and specifically from epidemiological studies. A major “breakthrough” in EMFs research is to establish the mechanism by which EMFs cause alterations on biological systems.

In this PhD thesis, the effects of the resonant electromagnetic spectrum of the SnMNA complex on *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models and the possible synergistic phenomenon of the complex activity and its EMFs spectrum were studied. Furthermore, the effects of morphine’s resonant electromagnetic spectrum as analgesic in a series of *in vivo* experiments were studied.

In vitro studies showed that SnMNA complex presented potent cytotoxic activity (200 times more potent than of cisplatin) on LMS and MCF-7 cells and let both cell lines to apoptosis. The percentage of apoptotic cells was increasing as the concentrations of SnMNA were increasing, while cells presented growth arrest at G2/M phase of cell cycle. *In vivo* studies showed that SnMNA complex caused total necrosis of tubules and glomeruli in kidneys and dilatation of sinusoids and vacuolation of liver hepatocytes at a single dose of 80mg/kg BW, while chronic administration (4 repeated times) of 5.4mg/kg BW presented mild toxicity. Moreover, SnMNA administration at 4x5.4mg/kg BW prolonged the Mean Survival Time (MST) at about 200% while 30% of these animals were cured. Data from aggregometer analysis revealed that SnMNA complex could also act as an antiplatelet agent, indicating its possible antimetastatic effects.

Twenty seven resonant-electromagnetic frequencies (r-EMFs) were selected from the transformation of chemical shifts (in ppm) of NMR spectrum of SnMNA complex. Exposure of LMS and MCF-7 cells on these r-EMFs increased the cytotoxic activity, while the cytotoxic activity of the complex and its EMFs (synergy) was similar to that of SnMNA complex. Also, exposure of LMS cells to the r-EMFs caused apoptosis similar to that caused by complex, while cells presented growth arrest at G2/M phase of cell cycle. Exposure of tumor-bearing Wistar rats to r-EMFs prolonged the MST and 30% were cured, while no toxic effects were presented.

Exposure of rats on 36 r-EMFs, derived from morphine's NMR spectrum, increased by 50% the index of analgesic activity similar to that of morphine's administration (10mg/kg BW).

The latter indicates that the appropriate "information" of biologically active substance could be transferred by exposure of various targets to its resonant electromagnetic fields (energy fingerprint). This exposure can cause similar effects compared to those caused by the biological active substances. Concluding, the NMR spectrum and so the r-EMFS of active substances can be used to cause similar effects as those of the initial substances without any side effect.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Aaron RK, Ciombor DM, 1993. Therapeutic effects of electromagnetic fields in stimulation of connective tissue repair. *J Cell Biochem* 52: 42–46.
- 2) Abdellah MA, Hadjidakou SK, Hadjiliadis N et al, 2009. Synthesis, characterization, and biological studies of organotin(IV) derivatives with o- or p-hydroxybenzoic acids. *Bioinorg Chem Appl* 542979.
- 3) Aitken RJ, Bennetts LE, Sawyer D et al., 2005. Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *Int J Androl* 28: 171–179.
- 4) Ames BN, 1989. Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutat Res* 214: 41–46.
- 5) Arvidsson U, Riedl M, Chakrabarti S et al., 1995. Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *J Neurosci* 15: 3328-3341.
- 6) Athanasiou A, Karkambounas S, Batistatou A et al., 2007. The Effect of Pulsed Electromagnetic Fields on Secondary Skin Wound Healing: An Experimental Study. *Bioelectromagnetics* 28: 362-368.
- 7) Avdikos A, Karkabounas S, Metsios A et al., 2007. Anticancer effects on leiomyosarcoma-bearing Wistar rats after electromagnetic radiation of resonant radiofrequencies. *Hell J Nucl Med* 10: 95-101.
- 8) Baken KA, Arkusz J, Pennings JL et al., 2007. In vitro immunotoxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) studied by toxicogenomics. *Toxicology* 237: 35-48.

- 9) Balas VI, Hadjikakou SK, Hadjiliadis N et al., 2008. Crystal structure and antitumor activity of the novel zwitterionic complex of tri-nbutyltin(IV) with 2-thiobarbituric acid. *Bioinorg Chem Appl* 654137.
- 10) Barbieri F, Viale M, Sparatore F et al., 2000. Cytotoxicity in vitro and preliminary antitumor activity in vivo of a novel organotin compound. *Anticancer Res* 20: 977 – 980.
- 11) Barbieri F, Sparatore F, Cagnoli M et al., 2001. Antiproliferative activity and interactions with cell-cycle related proteins of the organotin compound triethyltin(IV) lupinylsulfide hydrochloride. *Chem Biol Interact* 134: 27-39.
- 12) Barbieri F, Viale M, Sparatore F et al., 2002. Antitumor activity of a new orally active organotin compound: a preliminary study in murine tumor models. *Anticancer Drugs* 13: 599-604.
- 13) Bassett CA, 1982. Pulsing electromagnetic fields: a new method to modify cell behavior in calcified and noncalcified tissues. *Calcif Tissue Int* 34 :1-8.
- 14) Besser R, Krämer G, Thümler R et al., 1987. Acute trimethyltin limbic-cerebellar syndrome. *Neurology* 37: 945-950.
- 15) Blank M, Soo L, 2003. Electromagnetic acceleration of the Belousov-Zhabotinski reaction. *Bioelectrochemistry* 61: 93–97.
- 16) Blank M, Goodman R, 2008. A mechanism for stimulation of biosynthesis by electromagnetic fields: charge transfer in DNA and base pair separation. *J Cell Physiol* 214: 20–26.
- 17) Boscol P, Di Sciascio MB, D’Ostilio S et al., 2001. Effects of electromagnetic fields produced by radiotelevision broadcasting stations on the immune system of women. *Sci Total Environ* 273: 1–10.

- 18) Brown WH, Foote CS, Iverson BL et al., 2009. Infrared Spectroscopy. In Brown WH, Foote CS, Iverson BL et al., (eds): Organic Chemistry 5th Edition. BROOKS/COLE CENGAGE Learning, pp 456-476.
- 19) Bulten EJ and Budding HA, 1985. US Patent Publ. US 4547320.
- 20) Buttiglione M, Roca L, Montemurno E et al., 2007. Radiofrequency radiation (900 MHz) induces Egr-1 gene expression and affects cell-cycle control in human neuroblastoma cells. *J Cell Physiol* 213: 759-767.
- 21) Cardarelli N and Kanakkanatt SV, 1987. US Patent Publ. US 4634693.
- 22) Cerutti PA, 1985. Peroxidant states and tumor promotion. *Science* 227: 375–381.
- 23) Charalabopoulos K, Karkabounas S, Ioachim E et al., 2002. Antitumour and toxic effects on Wistar rats of two new platinum complexes. *Eur J Clin Invest* 32: 129-33.
- 24) Chasapis CT, Hadjikakou SK, Garoufis A et al., 2004. Organotin(IV) derivatives of L-cysteine and their in vitro anti-tumor properties. *Bioinorg Chem Appl* 2: 43-54.
- 25) Chauhan M, Banerjee K, Arjmand F, 2007. DNA binding studies of novel copper(II) complexes containing L-tryptophan as chiral auxiliary: in vitro antitumor activity of Cu-Sn₂ complex in human neuroblastoma cells. *Inorg Chem* 46: 3072-3082.
- 26) Chow K, Tung WL, 2000. Magnetic field exposure enhances DNA repair through the induction of DnaK/J synthesis. *FEBS Lett* 478: 133–136.
- 27) Cookson MR, Slamon ND, Pentreath VW, 1998. Glutathione modifies the toxicity of triethyltin and trimethyltin in C6 glioma cells. *Arch Toxicol* 72: 197-202.
- 28) Costa MA, Pellerito L, Izzo V et al., 2006. Diorganotin(IV) and triorganotin(IV) complexes of meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porphine induce apoptosis in A375 human melanoma cells. *Cancer Lett* 238: 284-294.
- 29) Davies AG, Smith PJ, 1980. *Adv Inorg Chem Radiochem* 23: 1-77.

- 30) Delimaris J, Tsilimigaki S, Messini-Nicolaki N et al., 2006. Effects of pulsed electric fields on DNA of human lymphocytes. *Cell Biol Toxicol* 22: 409–415.
- 31) Diem E, Schwarz C, Adlkofer F et al., 2005. Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800-MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells in vitro. *Mutat Res* 583:178–183.
- 32) Drake S, Swerdlow NM, Levere TH, 1999. Essays on Galileo and the history and philosophy of science. University of Toronto Press. pp. 41–42. ISBN 9780802075857.
- 33) Eastman A, 1990. Alkylating and platinum-based agents. *Curr Opin Oncol* 2: 1109-1114.
- 34) Ehman KD, Phillips PM, McDaniel KL et al., 2007. Evaluation of developmental neurotoxicity of organotins via drinking water in rats: dimethyl tin. *Neurotoxicol Teratol* 29: 622-633.
- 35) Eikenberry S, 2009. A tumor cord model for doxorubicin delivery and dose optimization in solid tumors. *Theor Biol Med Model* 6: 16.
- 36) Einhorn N, Tropé C, Ridderheim M et al., 2003. A systematic overview of radiation therapy effects in cervical cancer (cervix uteri). *Acta Oncol* 42: 546-556.
- 37) Endler PC, Pongratz W, Smith CW et al., 1995. Non-molecular information transfer from thyroxine to frogs with regard to homeopathic toxicology. *Vet Hum Toxicol* 37: 259-260.
- 38) Erogul O, Oztas E, Yildirim I et al., 2006. Effects of electromagnetic radiation from a cellular phone on human sperm motility: an in vitro study. *Arch Med Res* 37: 840–843.
- 39) Evangelou A, Kalpouzos G, Karkabounas S et al., 1997. Dose-related preventive and therapeutic effects of antioxidants-anticarcinogens on experimentally induced malignant tumors in Wistar rats. *Cancer Lett* 115: 105-111.

- 40) Fesenko EE, Makar VR, Novoselova EG et al., 1999. Microwaves and cellular immunity. I. Effect of whole body microwave irradiation on tumor necrosis factor production in mouse cells. *Bioelectrochem Bioenerg* 49: 29–35.
- 41) Focke F, Schuermann D, Kuster N et al., 2010. DNA fragmentation in human fibroblasts under extremely low frequency electromagnetic field exposure. *Mutat Res* 683: 74-83.
- 42) Forgacs Z, Somosy Z, Kubinyi G et al., 2006. Effect of whole-body 1800MHz GSM-like microwave exposure on testicular steroidogenesis and histology in mice. *Reprod Toxicol* 22: 111–117.
- 43) Friedman J, Kraus S, Hauptman Y et al., 2007. Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies. *Biochem J* 405: 559–568.
- 44) Frova A and Marenzana M, 2006. Thus spoke Galileo: the great scientist's ideas and their relevance to the present day. Oxford University Press. pp. 133–137. ISBN 9780198566250.
- 45) Gandhi G, Anita, 2005. Genetic damage in mobile phone users: some preliminary findings. *Indian J Hum Genet* 11: 99–104.
- 46) Gatta L, Pinto R, Ubaldi V et al., 2003. Effects of in vivo exposure to GSM-modulated 900MHz radiation on mouse peripheral lymphocytes. *Radiat Res* 160: 600–605.
- 47) Gerasimchuk N, Maher T, Durham P et al., 2007. Tin(IV) cyanoximates: synthesis, characterization, and cytotoxicity. *Inorg Chem* 46: 7268-7284.
- 48) Gielen M, 1994. Metal-Based Drugs. 1: 213.
- 49) Gielen M, 1995. Tin-based antitumor drugs: new developments. *Met Based Drugs* 2: 99-103.

- 50) Gielen M, Tiekink ERT, 2005. Tin compounds and their therapeutic potential. In: Gielen M and Tiekink ERT (Eds.), *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: The use of metals in medicine*. John Wiley & Sons, West Sussex, England, pp. 421-439.
- 51) Gobba F, Bargellini A, Bravo G et al., 2009. Natural killer cell activity decreases in workers occupationally exposed to extremely low frequency magnetic fields exceeding 1 microT. *Int J Immunopathol Pharmacol* 22: 1059-1066.
- 52) Grace KL, Revell WJ, Brookes M, 1998. The effects of pulsed electromagnetism on fresh fracture healing: osteochondral repair in the rat femoral groove. *Orthopedics* 21: 297-302.
- 53) Graham RB, 1998. The medical results of human exposure to radio frequency radiation. *Occupational and Environmental Health Laboratory Books (USAF) AFB TX* 78235-5000.
- 54) Greenland S, Sheppard AR, Kaune WT et al., 2000. A pooled analysis of magnetic fields, wire codes, and childhood leukemia. Childhood Leukemia-EMF Study Group. *Epidemiology* 11: 624-634.
- 55) Hadjidakou SK, Ozturk II, Xanthopoulou MN et al., 2008. Synthesis, structural characterization and biological study of new organotin(IV), silver(I) and antimony(III) complexes with thioamides. *J Inorg Biochem* 102: 1007-1015.
- 56) Hadjidakou SK, Abdellah MA, Hadjiliadis N et al., 2009. Synthesis, characterization, and biological studies of organotin(IV) derivatives with o- or p-hydroxybenzoic acids. *Bioinorg Chem Appl* 542979.
- 57) Han L, Lin H, Head M et al., 1998. Application of magnetic fields-induced heat shock protein 70 for presurgical cytoprotection. *J Cell Biochem* 78: 371-379.

- 58) Hardell L, Näsman Å, Pålsson A et al., 1999. Use of cellular telephones and the risk for brain tumours: a case-control study. *Int J Oncol* 15: 113–116.
- 59) Hardell L, Carlberg M, Mild KH, 2005. Case-control study on cellular and cordless telephones and the risk for acoustic neuroma or meningioma in patients diagnosed 2000–2003. *Neuroepidemiology* 25: 120–128.
- 60) Hart RW, Setlow RB, 1974. Correlation between deoxyribonucleic acid excision repair and life span in a number of mammalian species. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 71: 2169–2173.
- 61) Hashimoto T, Saito Y, Yamada K et al., 2006. Enhancement of morphine analgesic effect with induction of mu-opioid receptor endocytosis in rats. *Anesthesiology* 105: 574-580.
- 62) Helleday T, Loc J, van Gent DC et al., 2007. DNA doublestrand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair* 6: 923–935.
- 63) Hook GJ, Zhang P, Lagroye I et al., 2004. Measurement of DNA damage and apoptosis in molt-4 cells after in vitro exposure to radiofrequency radiation. *Radiat Res* 161: 193–200.
- 64) Höti N, Zhu DE, Song Z et al., 2004. p53-dependent apoptotic mechanism of a new designer bimetallic compound tri-phenyl tin benzimidazolethiol copper chloride (TPT-CuCl₂): in vivo studies in Wistar rats as well as in vitro studies in human cervical cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 22-33.
- 65) Houghton JA, 1999. Apoptosis and drug response. *Curr Opin Oncol* 11: 475-481.
- 66) Iconomidou VA, Chryssikos GD, Gionis V et al., 2001. "Soft"-cuticle protein secondary structure as revealed by FT-Raman, ATR FT-IR and CD spectroscopy. *Insect Biochem Molec Biol* 31: 877-855.

- 67) Islamov BI, Balabanova RM, Funticov VA et al., 2002. Effect of bioresonance therapy on antioxidant system in lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Bull Exp Biol Med* 134: 248–250.
- 68) Ivancsits S, Diem E, Pilger A et al., 2002. Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts. *Mutat Res* 519: 1–13.
- 69) Ivancsits S, Pilger A, Diem E et al., 2005. Cell typespecific genotoxic effects of intermittent extremely low-frequency electromagnetic fields. *Mutat Res* 583: 184–188.
- 70) Jajte J, Zmyslony M, Palus J et al., 2001. Protective effect of melatonin against in vitro iron ions and 7mT50Hz magnetic field-induced DNA damage in rat lymphocytes. *Mutat Res* 483: 57–64.
- 71) Johansson O, 2009. Disturbance of the immune system by electromagnetic fields-A potentially underlying cause for cellular damage and tissue repair reduction which could lead to disease and impairment. *Pathophysiology* 16: 157-177.
- 72) Karabakhtsian R, Broude N, Shalts N et al., 1994. Calcium is necessary in the cell response to EM fields. *FEBS Lett* 349: 1-6.
- 73) Karabetsos E, 2000. Measurements' report of electromagnetic radiation levels emitted from the device Multi Channel Dynamic Exciter 100 v. 1 Report of EEAE: MIA EEΠ 2, Karabetsos E, ed, Bulletin no 2, National Center of Physics Research "Dimokritos" publ, Athens, Greece.
- 74) Keeler J, 2005. NMR and energy levels. In Keeler J (ed): *Understanding NMR spectroscopy*. West Sussex: John Willey and Sons Ltd, pp 1-19.
- 75) Kheifets LI, Afifi AA, Buffler PA et al., 1995. Occupational electric and magnetic field exposure and brain cancer: a meta-analysis. *J Occup Environ Med* 37: 1327-41.

- 76) Koch B, Baul TS, Chatterjee A, 2008. Cell proliferation inhibition and antitumor activity of novel alkyl series of diorganotin(IV) compounds. *J Appl Toxicol* 28: 430-438.
- 77) Koch B, Basu Baul TS, Chatterjee A, 2009. p53-dependent antiproliferative and antitumor effect of novel alkyl series of diorganotin(IV) compounds. *Invest New Drugs* 27: 319-326.
- 78) Kyros L, Kourkoumelis N, Kubicki M et al., 2010. Structural properties, cytotoxicity, and anti-inflammatory activity of silver(I) complexes with tris(p-tolyl)phosphine and 5-chloro-2-mercaptobenzothiazole. *Bioinorg Chem Appl* 386860.
- 79) Lai H, Singh NP, 1995. Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics* 16: 207-210.
- 80) Lai H, Singh NP, 1997. Melatonin and a spin-trap compound block radiofrequency electromagnetic radiation-induced DNA strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics* 18: 446-454.
- 81) Lai H, Singh NP, 2004. Magnetic-field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat. *Environ Health Perspect* 112: 687-694.
- 82) Lai H, Singh NP, 2005. Effects of microwaves and a temporally incoherent magnetic field on single and double DNA strand breaks in rat brain cells. *Electromag Biol Med* 24: 23-29.
- 83) Lantow M, Viergutz T, Weiss DG et al., 2006. Comparative study of cell cycle kinetics and induction of apoptosis or necrosis after exposure of human mono mac 6 cells to radiofrequency radiation. *Radiat Res* 166: 539-543.
- 84) Lazarczyk M, Matyja E, Lipkowski AW, 2010. A comparative study of morphine stimulation and biphalin inhibition of human glioblastoma T98G cell proliferation in vitro. *Peptides* 31: 1606-1612.

- 85) Leszczynski D, Joenväärä S, Reivinen J et al., 2002. Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects. *Differentiation* 70: 120–129.
- 86) Li H, Mitchell JR, Hasty P, 2008. DNA double-strand breaks: a potential causative factor for mammalian aging. *Mech Aging Dev* 129: 416–424.
- 87) Li L, Bisht KS, LaGroye I et al., 2001. Measurement of DNA damage in mammalian cells exposed in vitro to radiofrequency fields at sars of 3–5 W/kg. *Radiat Res* 156: 328–332.
- 88) Li Y, Yue H, Xing Y et al., 2010. Oxymatrine inhibits development of morphine-induced tolerance associated with decreased expression of P-glycoprotein in rats. *Integr Cancer Ther* 9: 213-218.
- 89) Liasko R, Kabanos TA, Karkabounas S et al., 1998. Beneficial effects of a vanadium complex with cysteine, administered at low doses on benzo[a]pyrene-induced leiomyosarcomas in Wistar rats. *Anticancer Res* 18: 3609-3613.
- 90) Liburdy RP, 1992. Calcium signaling in lymphocytes and ELF fields. Evidence for an electric field metric and a site of interaction involving the calcium ion channel. *FEBS Lett* 301: 53-59.
- 91) Lieber MR, 1998. Pathological and physiological double-strand breaks: roles in cancer, aging, and the immune system. *Am J Pathol* 153: 1323–1332.
- 92) Lin X, Wang YJ, Li Q et al., 2009. Chronic high-dose morphine treatment promotes SH-SY5Y cell apoptosis via c-Jun N-terminal kinase-mediated activation of mitochondria-dependent pathway. *FEBS J* 276: 2022-2036.

- 93) Liu Y, Hong R, Yu YM et al., 2003. Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on apoptosis and cell cycle of mouse brain and liver cells. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 21: 339-341.
- 94) London SJ, Thomas DC, Bowman JD et al., 1991. Exposure to residential electric and magnetic fields and risk of childhood leukemia. *Am J Epidemiol* 134: 923-937.
- 95) Lonn S, Ahlbom A, Hall P et al., 2004. Mobile phone use and the risk of acoustic neuroma. *Epidemiology* 15: 653–659.
- 96) Maeda S, 1995. Safety and Environmental effects, in: Patai S (ed), *The Chemistry of Germanium, Tin and Lead Compounds*, Vol. 1, J. Wiley&Sons.
- 97) Malyapa RS, Ahern EW, Straube WL et al., 1997. Measurement of DNA damage after exposure to electromagnetic radiation in the cellular phone communication frequency band (835.62 and 847.74 MHz). *Radiat Res* 148: 618–627.
- 98) Malyapa RS, Bi C, Ahern EW et al., 1998. Detection of DNA damage by the alkaline comet assay after exposure to low-dose gamma radiation. *Radiat Res* 149: 396–400.
- 99) Markova E, Hillert L, Malmgren L et al., 2005. Microwaves from GSM mobile telephones affect 53BP1 and gamma-H2AX foci in human lymphocytes from hypersensitive and healthy persons. *Environ Health Perspect* 113: 1172–1177.
- 100) McNamee JP, Bellier PV, Gajda GB et al., 2003. No evidence for genotoxic effects from 24 h exposure of human leukocytes to 1.9 GHz radiofrequency fields. *Radiat Res* 159: 693–697.
- 101) Mendes IC, Moreira JP, Ardisson JD et al., 2008. Organotin(IV) complexes of 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones: antimicrobial and cytotoxic effects. *Eur J Med Chem* 43: 1454-1461.
- 102) Minami K, Hasegawa M, Ito H et al., 2009. Morphine, oxycodone, and fentanyl exhibit different analgesic profiles in mouse pain models. *J Pharmacol Sci* 111: 60-72.

- 103) Nikolova T, Czyz J, Rolletschek A et al., 2005. Electromagnetic fields affect transcript levels of apoptosis-related genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells. *FASEB J* 19: 1686–1688.
- 104) Oktem F, Ozguner F, Mollaoglu H et al., 2005. Oxidative damage in the kidney induced by 900-MHz-emitted mobile phone: protection by melatonin. *Arch Med Res* 36: 350–355.
- 105) Onishi Y, Azuma Y, Sato Y et al., 1993. Topoisomerase inhibitors induce apoptosis in thymocytes. *Biochem Biophys Acta* 1175: 147–154.
- 106) Oral B, Guney M, Ozguner F et al., 2006. Endometrial apoptosis induced by a 900-MHz mobile phone: preventive effects of vitamins E and C. *Adv Ther* 23: 957–973.
- 107) Ozguner M, Koyu A, Cesur G et al., 2005. Biological and morphological effects on the reproductive organ of rats after exposure to electromagnetic field. *Saudi Med J* 26: 405–410.
- 108) Ozguner F, Bardak Y, Comlekci S, 2006. Protective effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester against retinal oxidative stress in long term use of mobile phone: a comparative study. *Mol Cell Biochem* 282: 83–88.
- 109) Paul M and Monk S, 2004. *Physical Chemistry*. John Wiley and Sons. p. 435. ISBN 9780471491804.
- 110) Pellerito L, Nagy L, 2002. Organotin(IV)(n+) complexes formed with biologically active ligands: equilibrium and structural studies, and some biological aspects. *Coordin Chem Rev* 224: 111-150.
- 111) Perez-Rebolledo A, Ayala JD, de Lima GM et al., 2005. Structural studies and cytotoxic activity of N(4)-phenyl-2-benzoylpyridine thiosemicarbazone Sn(IV) complexes. *Eur J Med Chem* 40: 467-472.

- 112) Phillips JL, Ivaschuk O, Ishida-Jones T et al., 1998. DNA damage in Molt-4 T-lymphoblastoid cells exposed to cellular telephone radiofrequency fields *in vitro*. *Bioelectrochem Bioenerg* 45: 103–110.
- 113) Phillips JL, Singh NP, Lai H, 2009. Electromagnetic fields and DNA damage. *Pathophysiology* 16: 79-88.
- 114) Prigent P, Blanpied C, Aten J et al., 1993. A safe and rapid method for analyzing apoptosis-induced fragmentation of DNA extracted from tissues or cultured cells. *J Immunol Methods* 160: 139–140.
- 115) Rabi II, Zacharias JR, Millman S et al., 1992. Milestones in magnetic resonance: a new method of measuring nuclear magnetic moment. 1938. *J Magn Reson Imagin.* 2: 131-133.
- 116) Repacholi MH, Greenebaum B, 1999. Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: health effects and research needs. *Bioelectromagnetics* 20: 133-60.
- 117) Robison JG, Pendleton AR, Monson KO et al., 2002. Decreased DNA repair rates and protection from heat induced apoptosis mediated by electromagnetic field exposure. *Bioelectromagnetics* 23: 106–112.
- 118) Roti Roti JL, Malyapa RS, Bisht KS et al., 2001. Straube, Neoplastic transformation in C3H10T(1/2) cells after exposure to 835.62MHz FDMA and 847.74MHz CDMA radiations. *Radiat Res* 155: 239–247.
- 119) Sakuma N, Komatsubara Y, Takeda H et al., 2006. DNA strand breaks are not induced in human cells exposed to 2.1425 GHz band CW and W-CDMA modulated radiofrequency fields allocated to mobile radio base stations. *Bioelectromagnetics* 27: 51–57.

- 120) Sarkar S, Ali S, Behari J, 1994. Effect of low power microwave on the mouse genome: a direct DNA analysis. *Mutat Res* 320: 141–147.
- 121) Savarese A, Cognetti F, 2003. New drugs in the treatment of recurrent or metastatic cervical cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 48: 323-327.
- 122) Schiller PW, 2005. Opioid peptide-derived analgesics. *AAPS J* 7: E560-565.
- 123) Schindowski K, Leutner S, Muller WE et al., 2000. Age related changes of apoptotic cell death in human lymphocytes. *Neurobiol Aging* 21: 661–670.
- 124) Schmitz C, Keller E, Freuding T et al., 2004. 50-Hz magnetic field exposure influences DNA repair and mitochondrial DNA synthesis of distinct cell types in brain and kidney of adult mice. *Acta Neuropathol (Berl)* 107: 257–264.
- 125) Sen A, Chaudhuri TK, 2009. Synthesis and evaluation of dimethyl tin 4-cyclohexyl thiosemicarbazone as a novel antitumor agent. *Exp Oncol* 31: 22-26.
- 126) Simko M, Richard D, Kriehuber R et al., 2001. Micronucleus induction in Syrian hamster embryo cells following exposure to 50 Hz magnetic fields, benzo[a]pyrene TPA in vitro. *Mutat Res* 495: 43–50.
- 127) Simko M, 2007. Cell type specific redox status is responsible for diverse electromagnetic field effects. *Curr Med Chem* 14: 1141–1152.
- 128) Snoeij NJ, van Iersel AA, Penninks AH et al., 1985. Toxicity of triorganotin compounds: comparative in vivo studies with a series of trialkyltin compounds and triphenyltin chloride in male rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 81: 274-286.
- 129) Stronati L, Testa A, Villani P et al., 2004. Absence of genotoxicity in human blood cells exposed to 50 Hz magnetic fields as assessed by comet assay, chromosome aberration, micronucleus, and sister chromatid exchange analyses. *Bioelectromagnetics* 25: 41–48.

- 130) Stronati L, Testa A, Moquet J et al., 2006. 935MHz cellular phone radiation. An in vitro study of genotoxicity in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 82: 339–346.
- 131) Sun LX, Yao K, He JL et al., 2006. Effect of acute exposure to microwave from mobile phone on DNA damage and repair of cultured human lens epithelial cells in vitro. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 24: 465–467.
- 132) Syng-ai C, Basu Baul TS, Chatterjee A, 2001. Inhibition of cell proliferation and antitumor activity of a novel organotin compound. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 20: 333-342.
- 133) Syng-ai C, Basu Baul TS, Chatterjee A, 2002. Antiproliferative and cytotoxic effect of a novel organotin compound on mammalian cells both in vitro and in vivo. *Mutat Res* 513: 49-59.
- 134) Tao Q, Henderson A, 1999. EMF induces differentiation in HL-60 cells. *J Cell Biochem* 73: 212–217.
- 135) Taracha E, Mierzejewski P, Lehner M et al., 2009. Stress-opioid interactions: a comparison of morphine and methadone. *Pharmacol Rep* 61: 424-435.
- 136) Tegeder I, Grösch S, Schmidtko A et al., 2003. G protein-independent G1 cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: involvement of p53 phosphorylation. *Cancer Res* 63: 1846-1852.
- 137) Thomas Y, Sciff M, Belkadi L et al., 2000. Activation of human neutrophils by electronically transmitted phorbol-myristate acetate. *Med Hypotheses* 54: 33-39.
- 138) Tice RR, Hook GG, Donner M et al., 2002. Genotoxicity of radiofrequency signals. I. Investigation of DNA damage and micronuclei induction in cultured human blood cells. *Bioelectromagnetics* 23: 113–126.
- 139) Tofani S, Barone D, Cintonino M et al., 2001. Static and ELF magnetic fields induce tumor growth inhibition and apoptosis. *Bioelectromagnetics* 22: 419–428.

- 140) Tofani S, Cintorino M, Barone D et al., 2002. Increased mouse survival, tumor growth inhibition and decreased immunoreactive P53 after exposure to magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 23: 230–238.
- 141) Tuschl H, Novak W, Molla-Djafari H, 2006. In vitro effects of GSM modulated radiofrequency fields on human immune cells. *Bioelectromagnetics* 27: 188-196.
- 142) van Dorp EL, Yassen A, Dahan A, 2007. Naloxone treatment in opioid addiction: the risks and benefits. *Expert Opin Drug Saf* 6: 125-132.
- 143) Verschaeve L, Heikkinen P, Verheyen G et al., 2006. Investigation of co-genotoxic effects of radiofrequency electromagnetic fields in vivo. *Radiat Res* 165: 598–607.
- 144) Vijayalaxmi BZ, Leal M, Szilagyi TJ et al., 2000. Primary DNA damage in human blood lymphocytes exposed in vitro to 2450MHz radiofrequency radiation. *Radiat Res* 153: 479–486.
- 145) Walker JL, Evans JM, Resing P et al., 1994. Enhancement of functional recovery following a crush lesion to the rat sciatic nerve by exposure to pulsed electromagnetic fields. *Exp Neurol* 125: 302–305.
- 146) Walker PR, Smith C, Youdale T et al., 1991. Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res* 51: 1078–1085.
- 147) Walleczek J, 1992. Electromagnetic field effects on cells of the immune system: the role of calcium signaling. *FASEB J* 6: 3177-3185.
- 148) Ward JF, 1990. The yield of DNA double strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review. *Int J Radiat Biol* 57: 1141–1150.
- 149) Wei Y, Xiaolin H, Tao S, 2008. Effects of extremely low-frequency-pulsed electromagnetic field on different-derived osteoblast-like cells. *Electromagn Biol Med* 27: 298-311.

- 150) Weinberg S, 1995. *The Quantum Theory of Fields*. Cambridge University Press. pp. 15–17. ISBN 0-521-55001-7.
- 151) Winker R, Ivancsits S, Pilger A et al., 2005. Chromosomal damage in human diploid fibroblasts by intermittent exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields. *Mutat Res* 585: 43–49.
- 152) Wolf FI, Torsello A, Tedesco B et al., 2005. 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: possible involvement of a redox mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1743: 120–129.
- 153) Wu K, Bonavida B, 2009. The activated NF-kappaB-Snail-RKIP circuitry in cancer regulates both the metastatic cascade and resistance to apoptosis by cytotoxic drugs. *Crit Rev Immunol* 29: 241-254.
- 154) Xanthopoulou MN, Hadjikakou SK, Hadjiliadis N et al., 2003a. Synthesis, structural characterization and in vitro cytotoxicity of organotin(IV) derivatives of heterocyclic thioamides, 2- mercaptobenzothiazole, 5-chloro-2-mercaptobenzothiazole, 3-methyl-2-mercaptobenzothiazole and 2-mercaptonicotinic acid. *J Inorg Biochem* 96: 425-434.
- 155) Xanthopoulou MN, Hadjikakou SK, Hadjiliadis N et al., 2003b. Synthesis of a novel triphenyltin(IV) derivative of 2-mercaptonicotinic acid with potent cytotoxicity in vitro. *Bioinorg Chem Appl* 1: 227-231.
- 156) Xanthopoulou MN, Hadjikakou SK, Hadjiliadis N et al., 2008. Biological studies of new organotin(IV) complexes of thioamide ligands. *Eur J Med Chem* 43: 327-335.
- 157) Yallapragada PR, Vig PJ, Kodavanti PR et al., 1991. In vivo effects of triorganotins on calmodulin activity in rat brain. *J Toxicol Environ Health* 34: 229-237.

- 158) Yarıktas M, Doner F, Ozguner F et al., 2005. Nitric oxide level in the nasal and sinus mucosa after exposure to electromagnetic field. *Otolaryngol. Head Neck Surg* 132: 713–716.
- 159) Yokus B, Cakir DU, Akdag MZ et al., 2005. Oxidative DNA damage in rats exposed to extremely low frequency electro magnetic fields. *Free Radic Res* 39: 317–323.
- 160) Zeni O, Romano M, Perrotta A et al., 2005. Evaluation of genotoxic effects in human peripheral blood leukocytes following an acute in vitro exposure to 900MHz radiofrequency fields. *Bioelectromagnetics* 26: 258–265.
- 161) Zhang DY, Xu ZP, Chiang H et al., 2006. Effects of GSM 1800MHz radiofrequency electromagnetic fields on DNA damage in Chinese hamster lung cells. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 40: 149–152.
- 162) Zmyslony M, Palus J, Jajte J et al., 2000. DNA damage in rat lymphocytes treated in vitro with iron cations and exposed to 7 mT magnetic fields (static or 50 Hz). *Mutat Res* 453: 89–96.

9. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ - ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχει δημοσιευτεί σε διεθνή περιοδικά και έχει παρουσιαστεί σε εθνικά και διεθνή συνέδρια.

Δημοσιεύσεις (3):

1. **Ioannis I. Verginadis**, Spyridon Karkabounas, Yannis Simos, Evangelos Kontargiris, Sotiris K. Hadjikakou, Anna Batistatou, Angelos Evangelou, Konstantinos Charalabopoulos. **Anticancer and cytotoxic effects of a triorganotin compound with 2-mercapto-nicotinic acid in malignant cell lines and tumor bearing Wistar rats**. European Journal of Pharmaceutical Sciences (doi:10.1016/j.ejps.2010.11.015).
2. **Ioannis I. Verginadis**, Yannis V. Simos, Anastasia P. Velalopoulou, Athina N. Vadalouca, Spyridon Ch. Karkabounas, Vicky P. Kalfakakou and Angelos M. Evangelou. **Analgesic effect of the electromagnetic resonant frequencies derived from the NMR spectrum of morphine**. Bioelectromagnetics (*Submitted for publication*).
3. **I. I. Verginadis**, Y. Simos, S. Ch. Karkabounas, S. Hadjikakou, A. Batistatou, K. Havelas, K. Charalabopoulos and A. Evangelou. **Can NMR be used for cancer therapy? Anticancer effects of resonant EMRFs on *in vitro* and *in vivo* models**. Bioelectromagnetics (*Submitted for publication*).

Ανακοινώσεις σε εθνικά (2) και διεθνή (4) συνέδρια:

1. ***In vitro* αντικαρκινική δράση ενός συμπλόκου του Κασσίτερου με Μερκαπτονικοτινικό οξύ: συνέργεια δράσης με στατικό ηλεκτρομαγνητικό πεδίο χαμηλής έντασης. Ιωάννης Η. Βεργινάδης, Ιωάννης Ζελοβίτης, Αντώνιος Αυδίκος, Ιωάννης Σίμος, Μιχαήλ Μπάλλας, Σωτήριος Χατζηκακού, Κωνσταντίνος Χαβέλας, Γεώργιος Χατζηαϊβάζης, Χρύσα Αναστασιάδου, Άγγελος Μ. Ευαγγέλου και Σπυρίδων Χ. Καρκαμπούνας. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου και Στοχευμένης Θεραπείας, 25-27 Νοεμβρίου, 2007, Αθήνα.**
2. **Μίμηση αντικαρκινικής δράσης ενός συμπλόκου του κασσίτερου μέσω ηλεκτρομαγνητικών συχνοτήτων συντονισμού. Ιωάννης Βεργινάδης, Ιωάννης Σίμος, Σωτήριος Χατζηκακού, Κωνσταντίνος Χαβέλας, Άγγελος Ευαγγέλου και Σπυρίδων Καρκαμπούνας. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου και Στοχευμένης Θεραπείας, 27-29 Νοεμβρίου, 2008, Αθήνα.**
3. **Cytotoxic effects of a Sn- Mercaptonicotinic acid complex on Wistar rat leiomyosarcoma cells *in vitro* and simultaneous exposure at low intensity static electromagnetic fields: evidences of a synergy with static electromagnetic fields. Ioannis Verginadis, Ioannis Zelovitis, Antonios Avdikos, Telemachos Daskalou, Ioannis Toliopoulos, Ioannis Simos, Michalis Ballas, Sotiris Hadjidakou, Konstantinos Havelas, Georgios Hadziavazis, Angelos Evangelou, Konstantinos Charalabopoulos and Spyridon Karkabounas. 4th International Workshop on: Biological Effects of EMFs, 16-20 October, 2006, Crete, Greece.**
4. **The influence of organotin (IV) complexes with 2-mercaptopyrimidine upon the biological substrates. Y.A. Gracheva, M.N. Xanthopoulou, S.K. Hadjidakou, N. Kourkoumelis, I. Verginadis, S. Karkabounas, V.Y. Tyurin, E.R. Milaeva, N. Hadjiliadis. 2nd European Conference on Chemistry for Life Sciences, 4-8 September, 2007, Wroclaw, Poland.**

5. **Comparison of the Cytotoxic effects of a Sn-Mercaptonicotinic acid complex to the coherent electromagnetic resonant radiofrequency spectra of the same complex, on a rat leiomyosarcoma cell line.** Angelos Evangelou, *Ioannis Verginadis*, Antonios Avdikos, Ioannis Simos, Konstantinos Havelas, Andreas Zouridakis, Spyridon Karkabounas. 10th International Symposium on metal ions in Biology and Medicine, 19-22 May, 2008, Corsica, France.

6. **Analgesic effect exerted by exposure of Wistar rats to the NMR spectrum of morphine.** *Verginadis I.*, Simos Y., Velalopoulou A., Vadalouca A., Giotis Ch., Kalfakakou V., Karkabounas S. and Evangelou A. International Symposium of WIP – ALGOS, 18-21 June, 2009, Myconos, Greece.

Από τις παραπάνω συμμετοχές στα εθνικά και διεθνή συνέδρια κάποιες έχουν διακριθεί και βραβευτεί:

1. **ΕΠΙΑΙΝΟΣ** στην αναρτημένη εργασία: **Μίμηση αντικαρκινικής δράσης ενός συμπλόκου του κασσιτέρου μέσω ηλεκτρομαγνητικών συχνοτήτων συντονισμού.** *Ιωάννης Βεργινάδης*, Ιωάννης Σίμος, Σωτήριος Χατζηκακού, Κωνσταντίνος Χαβέλας, Άγγελος Ευαγγέλου και Σπυρίδων Καρκαμπούνας. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου και Στοχευμένης Θεραπείας, 27-29 Νοεμβρίου, 2008, Αθήνα

2. **1^ο ΒΡΑΒΕΙΟ ΚΑΛΥΤΕΡΗΣ ΠΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ** δόθηκε στην εργασία: **Analgesic effect exerted by exposure of Wistar rats to the NMR spectrum of morphine.** *Verginadis I.*, Simos Y., Velalopoulou A., Vadalouca A., Giotis Ch., Kalfakakou V., Karkabounas S. and Evangelou A. International Symposium of WIP – ALGOS, 18-21 June, 2009, Myconos, Greece.

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

Δημοσιεύσεις (2):

1. Spyridon Karkabounas, Konstantinos Havelas, Olga K. Kostoula, Patra Vezyraki, Antonios Avdikos, Jayne Binolis, George Hatziaivazis, Apostolos Metsios, *Ioannis Verginadis*, Angelos Evangelou. **Effects of low intensity static electromagnetic radiofrequency fields on leiomyosarcoma and smooth muscle cell lines**. Hellenic Journal of Nuclear Medicine; 9(3): 167-172, 2006.
2. Antonios Avdikos, Spyridon Karkabounas, Apostolos Metsios, Olga Kostoula, Konstantinos Havelas, Jane Binolis, *Ioannis Verginadis*, George Hatziaivazis, Ioannis Simos and Angelos M. Evangelou. **Anticancer effects on leiomyosarcoma-bearing wistar rats after electromagnetic radiation of resonant radiofrequencies**. Hellenic Journal of Nuclear Medicine; 10(2): 95-101, 2007.

Ανακοινώσεις σε εθνικά (1) και διεθνή (1) συνέδρια:

1. **Δράσεις στατικών ηλεκτρομαγνητικών πεδίων χαμηλής έντασης, σε λειομυοσαρκωματικά κύτταρα και καρκινοπαθείς επίμυες Wistar**. Σπυρίδων Χ. Καρκαμπούνας, Αντώνιος Αυδίκος, Όλγα Κωστούλα, Κωνσταντίνος Χαβέλας, *Ιωάννης Η. Βεργινάδης*, Γεώργιος Χατζηαβάζης, Παναγιώτης Βελτσίστας, Ιωάννης Ζελοβίτης, Ελένη Θεοδοσοπούλου, Απόστολος Μέτσιος και Άγγελος Μ. Ευαγγέλου. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου και Στοχευμένης Θεραπείας, 25-27 Νοεμβρίου, 2007, Αθήνα.

2. **Effects of low intensity static electromagnetic fields on leiomyosarcoma and smooth muscle cell lines.** Spyridon Karkabounas, Konstantinos Havelas, Olga K. Kostoula, Patra Vezyraki, Antonios Avdikos, Jayne Binolis, George Hatziavazis, Apostolos Metsios, *Ioannis Verginadis*, Angelos Evangelou. 4th International Workshop on: Biological Effects of EMFs, 16-20 October, 2006, Crete, Greece.