



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ, ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΕΣ ΚΑΙ
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ ΚΑΣΣΙΤΕΡΟΥ ΜΕ
ΟΡΓΑΝΙΚΟΥΣ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΕΣ ΣΕ IN VITRO, EX VIVO ΚΑΙ IN
VIVO ΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ**

ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ Κ. ΜΕΤΣΙΟΣ
Βιολόγος

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)»

Στους γονείς μου, Κωνσταντίνο και Πανάγιω

Στην αδερφή μου, Αφέντω

Στην οικογένεια μου, Άννα και Κωνσταντίνο

Πρόλογος

Τα μέταλλα και οι μεταλλικές ενώσεις χρησιμοποιούνται στην ιατρική από την αρχαιότητα.

Τα μέταλλα που έχουν μέχρι τώρα δείξει δραστικότητα έναντι διαφόρων παθήσεων είναι, το αρσενικό, το αντιμόνιο, το βισμούθιο, ο χρυσός, το βανάδιο, το σίδηρο, το ρόδιο, το τιτάνιο, το γάλιο ο κασσίτερος, η πλατίνα κ.α.

Το εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής σχολής του Παν/μιου Ιωαννίνων έχει ήδη μελετήσει τις αντικαρκινικές ιδιότητες πολλών συμπλόκων ενώσεων των μεταλλικών ιόντων όπως του Βαναδίου, του Χρυσού, του Αντιμονίου, του Σεληνίου, και του Αργύρου. Γνωρίζοντας λοιπόν τη δράση πολλών συμπλόκων ενώσεων και θέλοντας να συνεχιστεί ερευνητική παράδοση του εργαστηρίου Φυσιολογίας, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας του Χημικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, συντέθηκαν και μελετήθηκαν οι δράσεις νέων οργανομεταλλικών ενώσεων του κασσιτέρου. Τα πρώτα αποτελέσματα αυτής της μελέτης ήταν πολύ ενθαρρυντικά και δημοσιεύτηκαν στα διεθνή περιοδικά του κλάδου της Ιατρικής και Βιοανόργανης Χημείας. Για το λόγο αυτό η έρευνα συνεχίστηκε με σκοπό την περαιτέρω επιστημονική επιβεβαίωση. Η δραστικότητα των νέων αυτών συμπλόκων συγκρίθηκε με τις ήδη υπάρχουσες ενώσεις του λευκόχρυσου, αλλά και με ενώσεις του χρυσού, και του αντιμονίου, καθώς και με τη δράση τους στους υγιείς ινοβλάστες, στις ίδιες κυτταρικές σειρές.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στην παρούσα διδακτορική διατριβή, την οποία ολοκληρώνοντας, δεν μπορώ παρά να κοιτάξω πίσω την όλη πορεία της και τους ανθρώπους που την επηρέασαν. Θα ήθελα λοιπόν να

τους ευχαριστήσω για τη βοήθεια, τη συμπαράσταση και την γνώση που τόσο απλόχερα μου πρόσφεραν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Άγγελο Ευαγγέλου για την επίβλεψη, τη βοήθεια και την κατανόηση που έδειξε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής μου.

Παράλληλα θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Σπύρο Καρκαμπούνα, Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τις υποδείξεις, παρατηρήσεις και τη συνεχή βοήθεια του.

Ένα θερμότατο ευχαριστώ στον κ. Κων/νο Χαραλαμπόπουλο Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τις υποδείξεις και παραινέσεις καθώς για την εμπιστοσύνη και την υποστήριξη στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Ευχαριστώ πολύ την κ. Πατρώνα Βεζυράκη, Επίκουρη Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τις πολύ χρήσιμες συμβουλές της.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας κ. Σωτήριο Χατζηκακού για τη βοήθεια, τη συνεργασιμότητα και την εμπιστοσύνη που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ευχαριστώ ακόμη την κ. Μπατιστάτου Άννα Αναπληρώτρια καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την συνεργασία και τη βοήθεια στη ιστολογική μελέτη.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Πέσχο Λέκτορα του Εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τη βοήθεια, τη συμπαράσταση και της πολύ χρήσιμες συμβουλές του.

Θα επιθυμούσα επίσης να ευχαριστήσω την κ. Ξανθοπούλου Μαριάννα Χημικό, Λέκτορα του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου Αθηνών για την πολύτιμη συνεργασία της σε θέματα της αρμοδιοτητάς της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστήριου Φυσιολογίας η οποία βοήθησε έμμεσα ή άμεσα για την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας και ιδιαίτερα τους υποψήφιους διδάκτορες Ιωάννη Βεργινάδη, Βιολόγο – Βιοτεχνολόγο, Γιάννη Σίμο, Κλινικό Διαιτολόγο-Διατροφολόγο, Ηλία Καραγκούνη Μοριακό Βιολόγο και την Αναστασία Βελαλοπούλου Βιολόγο – Βιοτεχνολόγο. Ακόμη ευχαριστώ τις Γραμματείς και τα μέλη Ε.Τ.Ε.Π. και Ε.Ε.Δ.Ι.Π. (Γούλα Ευτυχία, Τζίμα Χριστίνα, Γκάλκο Νικόλαο και Γρήβα Παναγιώτη), του Εργαστηρίου μας, για την συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος ευχαριστώ τους γονείς μου για την συμπαράσταση και είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων για όσα μου έχουν προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια. Θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για όλες τις θυσίες που έχουν κάνει ώστε να μου δώσουν την δυνατότητα να ασχοληθώ κατά τρόπο απερίσπαστο, με κάτι τόσο συναρπαστικό όσο η αναζήτηση της γνώσης.

Πίνακας περιεχομένων

1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση	1
1.1 Οργανομεταλλικά σύμπλοκα για την θεραπεία του καρκίνου	1
1.2 Κασσίτερος (Sn)	2
1.3. Οργανοκασσιτερική βιολογική χημεία	3
1.4 Μηχανισμός δράσης των οργανοκασσιτερικών συμπλόκων	4
1.5 Ο Λευκόχρυσος	8
1.6 Καρκίνος και αιμοπετάλια	9
1.7 Καρκινικά κύτταρα στην κυκλοφορία του αίματος	11
1.8 Αιμοπεταλιακή Μετάσταση	12
2. Σκοπός της εργασίας	17
2.1 Σχεδιασμός της μελέτης	18
3. Υλικά και μέθοδοι	21
3.1 Χημικά και αντιδραστήρια	21
3.2 Σύμπλοκα του κασσιτέρου της μελέτης	22
3.3 Μέθοδοι	25
3.4 Πειράματα in vitro	25
3.5 Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας με τη χρήση χρωστικής Trypan Blue	30
3.6 Ικανότητα σχηματισμού αποικιών	31
3.7 Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη χρήση MTT	32
3.8 Κυτταρομετρία ροής	33
3.9. Πειράματα ex-vivo	34
3.10 Πειράματα in Vivo	40
4. Αποτελέσματα	43
4.1 Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας και κυτταροτοξικότητας (Trypan Blue Exclusive Assay)	43
4.2 Ικανότητα ανάπτυξης αποικιών	49
4.3 Έλεγχος κυτταρικής πολλαπλασιαστικότητας (MTT)	53
4.4 Κυτταρομετρία ροής	63
4.5 Έλεγχος αιμοπεταλιακής συσσώρευσης	66
4.6 In vivo μελέτη	75
5. Συζήτηση	85
6. Συμπεράσματα	93
7. Περίληψεις	95
8. Βιβλιογραφία	101
9. Συντμήσεις	111
10. Δημοσιεύσεις	113

1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

1.1 Οργανομεταλλικά σύμπλοκα για την θεραπεία του καρκίνου

Είναι γνωστό ότι οι οργανομεταλλικές ενώσεις χρησιμοποιούνται ήδη για τη θεραπεία πολλών νοσημάτων με εξαιρετικά αποτελέσματα όπως ο Χρυσός (Auranofin) για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα [1] και το cis-platin για διάφορους τύπους νεοπλασματικών νοσημάτων όπως καρκίνος του πνεύμονα [2] κ.α.

Μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί οι αντικαρκινικές ιδιότητες πολλών συμπλόκων ενώσεων των μεταλλικών ιόντων όπως του Σεληνίου, [3], του Βαναδίου, [4], του Αργύρου, [5] του Αντιμονίου [5] και του Χρυσού [6]. Πολλές μελέτες υπάρχουν επίσης στη βιβλιογραφία και για το Τιτάνιο [7] και για το Αλουμίνιο [8]. Μερικές από αυτές προχώρησαν στην κλινική μελέτη ενώ άλλες ήδη χορηγούνται στην θεραπεία του καρκίνου, όπως ενώσεις πλατίνας και συγκεκριμένα η cis-platin.

Η cis-platin συντέθηκε για πρώτη φορά το 1845 εντελώς τυχαία και στη συνέχεια, το 1964 διαπιστώθηκε η κυτταροτοξική της δράση [9]. Την ίδια χρονιά, ο Rosenberg ανακάλυψε ότι οι ενώσεις πλατίνας μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια και για την θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου [10, 11] και το 1979 εγκρίθηκε επισήμως ως χημειοθεραπευτικό σχήμα. Κύριο μειονέκτημα της cis-platin είναι ότι ο οργανισμός αποκτά ανοχή μετά από τη συνεχή χορήγηση της ουσίας για μακρύ χρονικό διάστημα [12].

Βέβαια η έρευνα συνεχίζεται και καινούριες ενώσεις πλατίνας βρίσκονται σε όλα τα στάδια των μελετών ανά τον κόσμο. Γενικότερα οι οργανομεταλλικές ενώσεις βρίσκονται σε μελέτη για τις πολύ καλές ιδιότητες που παρουσιάζουν στην θεραπεία των νεοπλαστικών νόσων [13].

1.2 Κασσίτερος (Sn)

Ο κασσίτερος απαντάται στους ιστούς και τις ρίζες των φυτών [14, 15]. Διάφορες κατηγορίες λαχανικών βρέθηκαν να περιέχουν κασσίτερο σε συγκέντρωση 0.2-9.92 ppm [14, 15]. Παρόλο που μέχρι σήμερα ο κασσίτερος θεωρείται σημαντικός για τα φυτά, οι βιολογικές ιδιότητες του κασσιτέρου ως βασικού θρεπτικού μέσου για τα φυτά δεν έχουν ξεκάθαρα αποδειχθεί. Η ύπαρξη μικρής ποσότητας κασσιτέρου στα φύλλα δέντρων υποδηλώνει μια μακρά πορεία μεταφοράς από το χώμα προς τα φύλλα. Αυτού του είδους η πορεία επιβάλλει την παρουσία διαλυτής ένωσης κασσιτέρου. Οι οργανομεταλλικές διαλυτές ενώσεις κασσιτέρου είναι συνήθως τοξικές και για τα φυτά, συγκρινόμενες με οργανικές ενώσεις. Επομένως η ένωση που είναι υπεύθυνη για αυτή τη μεταφορά αναμένεται να είναι κάποια οργανική διαλυτή ένωση, όπως απέδειξε η ομάδα του Curtin, πραγματοποιώντας πειράματα σε κωνοφόρα δέντρα [16].

Συγκεντρώσεις κασσιτέρου βρέθηκαν στους ιστούς των ζώων και κυρίως των θαλάσσιων ζώων. Ισχυροί συσσωρευτές κασσιτέρου είναι τα echinodermata (800ppm) και τα Gastropoda (250-500ppm) [17,15]. Ο ρόλος που παίζει ο κασσίτερος στους οργανισμούς αυτούς είναι μέχρι στιγμής άγνωστος. Για τα ζώα της ξηράς πολύ λίγες έρευνες έχουν γίνει. Οι μοναδικές αναλυτικές εργασίες που υπάρχουν έχουν γίνει από τον Cardarelli και την ομάδα του και πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια και κουνέλια [18, 19].

Το ανθρώπινο αίμα περιέχει 14μg κασσιτέρου ανά 100γρ και βρίσκεται συγκεντρωμένος στα ερυθροκύτταρα. Αναλύσεις των ανθρώπινων ιστών από τον H. Teraoka, [20] έδειξαν υψηλά ποσοστά συγκεντρώσεων κασσιτέρου στον ομφάλιο λώρο (9.9 ppm). Τα υψηλότερα επίπεδα κασσιτέρου, όμως βρίσκονται στο θύμο

αδένα, όπου μετατρέπεται σε αντικαρκινικό παράγοντα, από εκεί εισχωρεί στο λεμφικό σύστημα, γεγονός που σχετίζεται με το ανοσοποιητικό σύστημα και την αντικαρκινική δράση. Τόπος συσσώρευσης του ξενοβιωτικού κασσίτερου στο ανθρώπινο σώμα είναι κυρίως τα οστά, τα λεμφογάγγλια και οι πνεύμονες. Ξενοβιωτικός κασσίτερος δεν βρέθηκε στον εγκέφαλο, ούτε στους ιστούς των εμβρύων, λόγω της δύσκολης διέλευσης του από τον πλακούντα, με εξαίρεση τις περιπτώσεις δηλητηρίασης από οργανοκασσιτερικές ενώσεις [21, 15].

1.3 Οργανοκασσιτερική βιολογική χημεία.

Οι βιολογικές ιδιότητες των οργανοκασσιτερικών ενώσεων έχουν ερευνηθεί εκτεταμένα. Αν και η πρώτη οργανοκασσιτερική ένωση μελετήθηκε το 1929, δεν συνεχίστηκε η συστηματική μελέτη παρόμοιων ενώσεων, με αποτέλεσμα μόνο 1500 περίπου οργανοκασσιτερικές ενώσεις να μελετηθούν σε διάφορα είδη καρκίνων μέχρι το τέλος του 1981 [22]. Όμως τα τελευταία χρόνια έχει ξεκινήσει πάλι η συστηματική μελέτη των αντικαρκινικών τους ιδιοτήτων.

Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως είναι η χρήση τους ως αντιμυκητιακά, παρασιτοκτόνα, και γενικότερα εμποδίζουν την εξάπλωση των μικροοργανισμών. Δεν πρέπει να παραλείψουμε και το γνωστό σε εμάς καλαΐσμα, την επικάλυψη δηλαδή με κασσίτερο του εσωτερικού των χάλκινων σκευών μαγειρικής για την εξουδετέρωση των επιβλαβών τοξινών. Η πρώτη οργανοκασσιτερική ένωση ανακαλύφθηκε το 1849 από τον Edward Frankland. Το 1852, ο Lowich περιέγραψε μία αντίδραση αλκυλίων με κασσίτερο και νάτριο, παράγοντας αλκυλικές κασσιτερικές ενώσεις. Το 1903 συντέθηκαν οργανοκασσιτερικές ενώσεις με αντιδράσεις Grignard [23]. Η πρώτη

οργανοκασσιτερική ένωση με αντικαρκινικές ιδιότητες χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1929, με αποτέλεσμα σε λιγότερο από 50 χρόνια να εξεταστούν περισσότερες από 1500 οργανοκασσιτερικές ενώσεις [22]. Το 1963 ο Furst ανακάλυψε ότι η σύνδεση των μετάλλων παίζει σημαντικό ρόλο στη θεραπεία κακοηθών όγκων [22, 15]. Το 1972 ο Brown διαπίστωσε ότι η ουσία $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_3\text{COO})$ προκαλεί επιβράδυνση στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων στα ποντίκια [9]. Το 1973 ο Atsushi παρατήρησε την μεγάλη συσχέτιση του κασσιτέρου με τον καρκίνο, τα αποτελέσματά τους επιβεβαιώθηκαν και ο κασσίτερος χρησιμοποιήθηκε ως παράγοντας για τη θεραπεία των μεταστάσεων του καρκίνου [22]. Το 1985, ο Gielen δημοσίευσε μία σειρά από άρθρα, όπου αποδεικνύουν τις αντικαρκινικές ιδιότητες του κασσιτέρου [24, 15].

1.4 Μηχανισμός δράσης των οργανοκασσιτερικών συμπλόκων

Δυστυχώς ο μηχανισμός δράσης των οργανοκασσιτερικών ενώσεων είναι μέχρι στιγμής άγνωστος. Παρόλο αυτά είναι ευρέως γνωστό ότι πολλά φάρμακα αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων με την σύνδεσή τους σε νουκλεοτιδικές βάσεις της έλικας του DNA ή αλληλεπιδρούν με τα μεταλλοένζυμα, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του καρκίνου [25]. Πειράματα που έχουν γίνει προβλέπουν ότι οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες των νουκλεοτιδίων [26]. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έχουν δείξει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση ανασταλτικών ενζύμων με σύμπλοκα κασσιτέρου και με την αντικαρκινική τους ιδιότητα [27]. Για παράδειγμα, η λιποοξυγονάση που είναι ένα ένζυμο το οποίο συμμετέχει στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος [27]. Συγκεκριμένα, καταλύει την οξειδωση του αραχιδονικού

οξέος σε λευκοτριένια και προσταγλανδίνες [28]. Οι προσταγλανδίνες συνεισφέρουν στην δημιουργία όγκων και δρουν ως αγγειογενετικοί παράγοντες [24]. Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός των συμπλόκων έγκειται στο γεγονός ότι υπάρχει αλληλεπίδραση των βαρέων μετάλλων με τις σουλφυδρικές ομάδες των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να προκληθεί μετουσίωση στη δομή της πρωτεΐνης, και να οδηγήσει στο κυτταρικό θάνατο [24]

Επίσης, πειράματα έχουν δείξει ότι σύμπλοκα μετάλλων μπορεί να παίξουν σημαντικό ρόλο στην μεταφορά ουσιών μέσα από μεμβράνες, επηρεάζοντας έτσι τις κινητικές και θερμοδυναμικές αλληλεπιδράσεις με την μεμβράνη του κυττάρου [29, 30].

Στις οργανομεταλλικές ενώσεις η υψηλή δραστηριότητα τους σχετίστηκε με τους τύπους των δομών που ήταν ανάλογες με τη δομή του αντικαρκινικού φαρμάκου cis-platin, στο οποίο η επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία γύρω από το άτομο του λευκοχρύσου συνδέεται με την αντικαρκινική δραστηριότητα. Έτσι διοργανοκασσιτερικά ανάλογα του cis-platin [31, 32], carboplatin [33] και paraplatin [34, 15] παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν ως προς την αντικαρκινική δράση in vitro, έναντι καλλιιεργειών καρκινικών κυττάρων MCF7 και WIDR εμφανίζει ID₅₀ 63 και 121 ng/ml αντίστοιχα, ενώ οι τιμές ID₅₀ του cis-platin για τα ίδια είδη είναι 699 και 967 ng/ml αντίστοιχα [33, 15].

Από τα παραπάνω αποτελέσματα οι μελετητές των οργανοκασσιτερικών ενώσεων οδηγήθηκαν στον συμπέρασμα ότι η δραστηριότητα των οργανοκασσιτερικών ενώσεων με γενικό τύπο R₂SnX₂L₂ τρεις παράγοντες εμπλέκονται στη συσχέτιση δομής δράσης, η οργανική ομάδα R, το αλογονίδιο X και το άτομο του υποκαταστάτη L.

Οι Penninks και Seinen πρότειναν ότι υπάρχει μια καθοριστική συσχέτιση μεταξύ κυτταροτοξικότητας και λιποφιλίας για ενώσεις του τύπου R_2SnX_2 , $R_2SnX_2L_2$ και R_3SnX , όπου οι ισχυρά υδρόφιλες ή οι ισχυρά υδρόφοβες ενώσεις παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα ενώ αντίθετα ενώσεις με ενδιάμεση λιποφιλία είναι οι περισσότερες τοξικές [21]. Η βιολογική δράση ενός συγκεκριμένου φαρμάκου είναι συνάρτηση υδροφοβικών, στερικών και ηλεκτρονιακών παραγόντων, σύμφωνα με τον τύπο που εισήγαγε ο Hanch [35]. Πολλές βιβλιογραφικές αναφορές που μελετούν ένα πλήθος οργανοκασσιτερικών ενώσεων τα τελευταία χρόνια επιβεβαίωσαν την ανάγκη ισορροπίας μεταξύ υδατοδιαλυτότητας-λιποφιλίας για καλύτερη αντικαρκινική δραστηριότητα [36, 37, 15].

Οργανοκασσιτερικές ενώσεις με βιολογικά μόρια όπως αμινοξέα, διπεπτίδια και τριπεπτίδια, πουρινικές βάσεις (αδενίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη) και στεροειδή εμφανίζουν, επίσης, δραστηριότητα *in vivo*. Το decaphenylstanocene βρέθηκε δραστικό κατά του κακοήθους όγκου στα ποντίκια, έχοντας χαμηλή τιμή LD_{50} . Σύμπλοκα του κασσιτέρου με βιολογικά σημαντικά μόρια, όπως η αδενίνη [38], η glycylglycine, με διάφορα αμινοξέα, όπως η ιστιδίνη [39], το 2-mercaptoethanesulphate και η 6-mercaptopurine [40] βρέθηκαν να έχουν αντικαρκινική δράση *in vitro* και μερικές από αυτές και *in vivo* [14]. Παράγωγα οργανοκασσιτερικών ενώσεων με βάσεις Schiff βρέθηκαν να έχουν αντικαρκινική δράση έναντι του καρκίνου του σαρκόματος 180 στα ποντίκια. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η ένωση dihalobis(benzoyl-acetonato)tin.

Τα οργανοκασσιτερικά παράγωγα των στεροειδών (τεστοστερόνη, χοληστερόλη, χολικό οξύ και δεοξυχολικό οξύ) δοκιμάσθηκαν ως αντικαρκινικά σε πειράματα *in vivo* και παρουσίασαν μεγάλη δραστηριότητα. Την μεγαλύτερη δραστηριότητα εμφάνισε η ένωση triphenil cholesteryl ether [41, 42] στον καρκίνο του

μαστού, όπως επίσης και τα διοργανοκασσιτερικά παράγωγα του iminodiacetic acid έναντι λευχαιμίας P388 και L1210 στα ποντίκια.

Μεγάλο πρόβλημα στην παρασκευή οργανοκασσιτερικών ενώσεων δραστικών έναντι του καρκίνου είναι η μικρή υδατοδιαλυτότητα τους. Αυτό αναγκάζει τους ερευνητές να χρησιμοποιούν οργανικούς διαλύτες ή να χρησιμοποιούν τεχνικές καθαρισμού για την χορήγηση τους στον καρκινικό σώμα. Προκειμένου να αυξηθεί η διαλυτότητα των ενώσεων αυτών στο νερό, έγινε αντικατάσταση των ατόμων υδρογόνου των φαινυλικών ομάδων από υδρόξυ-ομάδες [43, 44], καθώς και την παρασκευή παραγώγων των ενώσεων αυτών με φθόριο [45] οδήγησε σε μεγαλύτερη υδατοδιαλυτότητα αλλά και μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι των καρκινικών σειρών που δοκιμάστηκαν σε σύγκριση με το cis-platin.

Τα δεδομένα λοιπόν της βιβλιογραφίας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο μηχανισμός της αντικαρκινικής δράσης των οργανοκασσιτερικών ενώσεων μπορεί να διαφέρει από αυτόν του cis-platin [46]. Ένας από τους μηχανισμούς που έχουν προταθεί τα τελευταία χρόνια περιλαμβάνει επιδράσεις οργανοκασσιτερικών ενώσεων στις κυτταρικές μεμβράνες, γεγονός που οδηγεί στη διάρρηξη τους, λόγω επιτάχυνσης των διαδικασιών ανταλλαγής ιόντων και της αναστολής της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης [29, 30]. Επίσης η επίδραση των ενώσεων αυτών σε άλλες διαδικασίες του κυττάρου, όπως η υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων (ελαϊκού, λινελαϊκού, λινολενικού, αραχιδονικού), η αναστολή ενζύμων που σχετίζονται με βασικές λειτουργίες των κυττάρων και η διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος [41, 47]. Γι' αυτό και τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει επικεντρωθεί στη μελέτη τέτοιων συστημάτων.

1.5 Ο Λευκόχρυσος

Η χρησιμοποίηση του Λευκόχρυσου ως ενός ισχυρού κυτταροστατικού φαρμάκου στην θεραπεία των όγκων των μαλακών μορίων [2] και κατόπιν των σαρκωμάτων διαμόρφωσε μια ολόκληρη κατεύθυνση στην έρευνα της χημειοθεραπείας του καρκίνου. Επίσης η χρησιμοποίηση του Χρυσού ως θεραπευτικού παράγοντα στην ρευματοειδή αρθρίτιδα έδειξε ότι οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις του προέκυπταν μέσω ενός κυτταροστατικού μηχανισμού που μείωνε εκλεκτικά τον πολλαπλασιασμό [1], την διαφοροποίηση και την ωρίμανση των μονοπύρηνων λεμφοκυττάρων. Η εν το βάθει διερεύνηση των δράσεων των ενώσεων του λευκόχρυσου σε μια σειρά μοντέλων διά των οποίων μελετούνται οι αλληλεπιδράσεις των ενώσεων του λευκόχρυσου με το DNA, δείχνει ότι ο λευκόχρυσος παρεμβάλλεται στο εσωτερικό της διπλής αλυσίδας του DNA με αποτέλεσμα να εμποδίζει την δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων, να αυξάνει την ευθραυστότητα του μορίου, να εμποδίζει την αντιγραφή και την μεταγραφή του, όπως επίσης να εμποδίζει και τις αναδιπλώσεις που είναι απαραίτητες για την μετακίνηση των χρωματοσωμάτων κατά την μιτωτική διαίρεση. Ωστόσο τόσο ο λευκόχρυσος, όσο και ο χρυσός φαίνεται να μην είναι σε θέση να δημιουργήσουν πολλές ενδοκυττάρια μεταβολές στην κυτταρική μεμβράνη, οπότε τουλάχιστον ο λευκόχρυσος αποτέλεσε, τρόπον τινά, έναν εξειδικευμένο παράγοντα δια του οποίου μπορούμε να πλήξουμε απ' ευθείας το γενετικό υλικό, παρακάμπτοντας τους διάφορους μεταβολισμούς του κυττάρου. Η πολύ υψηλή και γενικευμένη σε όλα τα συστήματα κυτταροτοξικότητα των ενώσεων του λευκόχρυσου αποτέλεσε ένα σημαντικό φράγμα στην κλινική του χρήση και στην περαιτέρω εξέλιξη των φαρμάκων που τον χρησιμοποιούσαν ως βάση τους. Περί τις αρχές της δεκαετίας του 1980 είχε ήδη τεθεί με σαφήνεια ο προβληματισμός ότι η έρευνα έπρεπε να στραφεί και σε άλλα μέταλλα, όπως

το Κασσίτερο και τον Αργυρο, τα οποία ίσως θα είχαν τις δράσεις του λευκόχρυσου αλλά όχι τις παρενέργειές του. Ήδη το 1985 και μετά αναδύονται στην διεθνή βιβλιογραφία σταδιακά αρκετά άρθρα που εστιάζονται στην δημιουργία κυτταροτοξικών αντικαρκινικών ενώσεων με βάση τον Κασσίτερο, ενώ ταυτοχρόνως κάνουν την εμφάνισή τους και οι πρώτες σχετικές πατέντες. Ένας επιστήμονας το έργο του οποίου κυριάρχησε στην εικοσαετία που μεσολάβησε από τότε μέχρι σήμερα είναι ο Giellen, ο οποίος μελέτησε σύμπλοκα του Κασσιτέρου με υδροξυ-βενζοϊκό οξύ. Τα σύμπλοκα αυτά ήσαν επιτυχημένα καθόσον παρουσίαζαν ισχυρές αντικαρκινικές δράσεις.

Από την προκαταρκτική μελέτη μας προέκυψε η υπόθεση ότι ο πρώτος και θεμελιωδέστερος στόχος του Κασσιτέρου στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων, σε αντιδιαστολή με τον Λευκόχρυσο, δεν αντιπροσωπεύεται από το DNA, αλλά μάλλον από κάποιες πρωτεΐνες, ενδεχομένως ενζυμικού χαρακτήρα, οι οποίες είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων που κυβερνούν την διαδικασία αναπαραγωγής του γενετικού υλικού. Έχοντας υπ' όψιν αυτήν την υπόθεση αυτή το Εργαστήριο της Βιοανόργανης Χημείας και το Εργαστήριο της Φυσιολογίας μελέτησαν από κοινού την δυνατότητα ανάπτυξης μιας σειράς συμπλόκων ενώσεων του Κασσιτέρου, τα οποία θα είχαν θεωρητικά την δυνατότητα να αλληλεπιδράσουν με ορισμένα κρίσιμα ενζυμικά συστήματα των καρκινικών κυττάρων των οποίων η αναστολή θα ωθούσε τα ανώμαλα αυτά κύτταρα προς την απόπτωση με μια εκλεκτικότητα [28].

1.6 Καρκίνος και αιμοπετάλια

Το 1971, ο Folkman [48] ισχυρίστηκε ότι η ανάπτυξη ενός όγκου εξαρτάται από το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχουσες ανωμαλίες και διετύπωσε τη θεωρία της αγγειογένεσης. Η αγγειογένεση είναι μια πολύπλοκα

οργανωμένη διαδικασία που κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης συνεισφέρει στη δημιουργία του αγγειακού δικτύου και αργότερα κατά την ενήλικη ζωή συμμετέχει στους μηχανισμούς επούλωσης των πληγών, στην αναπαραγωγή (μεταβολές του ενδομητρίου κατά τον καταμήνιο κύκλο των γυναικών και την εμφύτευση του εμβρύου κατά την εγκυμοσύνη) και στην ανάπτυξη. Έτσι θα μπορούσε κάποιος να πει ότι η αγγειογένεση είναι η διαδικασία σχηματισμού νεόπλαστων αγγείων από ήδη υπάρχοντα αγγεία σαν απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα. Ο κυριότερος παράγοντας που επάγει την αγγειογένεση είναι η υποξία. Μέσω ενός μηχανισμού γονιδιακής έκφρασης που σημαντικό ρόλο παίζει η πρωτεΐνη Von-Hippel Lindau (VHL) στα υποξικά καρκινικά κύτταρα αυξάνονται τα επίπεδα του παράγοντα που προκαλείται από την υποξία, του HIF-1a (Hypoxia Inducible Factor) που οδηγεί τελικά σε μεταγραφική υπερέκφραση πολλών γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων επάγουν την αγγειογένεση. Ο σημαντικότερος και καλύτερα μελετημένος είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας αύξησης α (vascular endothelium growth factor A, VEGF-A), ενώ δεν μπορεί να αγνοηθεί ο ρόλος και δεκάδων άλλων παραγόντων, όπως ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (platelet derived growth factor, PDGF). Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από αγγειογένεση γιατί ο όγκος θέλει να τροφοδοτηθεί με ιχνοστοιχεία και πρωτεΐνες. Η πλήρης αγγείωση του όγκου αποτελεί προϋπόθεση για την εξάπλωση του. Η συγκεκριμένη υπόθεση υποστηρίχτηκε στη συνέχεια με κλινικές έρευνες. Ρυθμιστές του σχηματισμού όγκου που επάγουν την αγγειογένεση είναι ο VEGF και ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (Basic fibroblast growth factor, bFGF), ενώ η αγγειοστατίνη και η ενδοστατίνη είναι αρνητικοί ρυθμιστές. Στο τέλος του 19^{ου} αιώνα, διαταραχές στο σύστημα πήξης παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με καρκίνο και συγκεκριμένα διαπιστώθηκε αυξημένος αριθμός αιμοπεταλίων, υψηλή ροή των

αιμοπεταλίων και υψηλή συγκέντρωση στο αίμα προϊόντων διάσπασης του ινώδους. Μελέτες που έχουν γίνει, έχουν αποδείξει ότι η θρομβοκυττάρωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης καρκίνου [49].

Το 1865 ο καθηγητής Armand Trousseau έκανε γνωστή τη σχέση μεταξύ των διαταραχών της αιμόστασης και του καρκίνου. Ο ίδιος περιέγραψε 182 περιπτώσεις πρώιμων σταδίων θρομβοφλεβίτιδας και έδωσε ιδιαίτερη σημασία στην σχέση κακοήθων ευρημάτων, όπως είναι ο σχηματισμός φλεβικού και αρτηριακού μικροθρόμβου, πλούσιων σε αιμοπετάλια. Επίσης, με ανάλογες μελέτες επιβεβαιώθηκε ότι υπάρχει αυξημένος κίνδυνος θρόμβωσης σε ασθενείς με καρκίνο. Οι πηκτικοί παράγοντες και ο σχηματισμός ινιδίων μεταξύ των αιμοπεταλίων οδηγούν στη μετάσταση και στην εξάπλωση του καρκίνου [50].

Η νέκρωση του αρχικού όγκου ίσως σχετίζεται με την απελευθέρωση καρκινικών κυττάρων στη κυκλοφορία. Όταν ο όγκος υφίσταται νέκρωση, τα καρκινικά κύτταρα αποκολλούνται από το σημείο επαφής και απελευθερώνονται στη κυκλοφορία του αίματος [51]

1.7 Καρκινικά κύτταρα στην κυκλοφορία του αίματος

Η απελευθέρωση των καρκινικών κυττάρων είναι ευθέως ανάλογη με την πυκνότητα των αγγείων στα αρχικά στάδια του καρκίνου [52]. Η ακεραιότητα των αιματικών αγγείων επηρεάζει την διαδικασία της μετάστασης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το άθικτο ενδοθήλιο αποτελεί ένα σημαντικό εμπόδιο στην εξάπλωση των καρκινικών αγγείων. Η παρουσία καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος δεν αποτελεί απαραίτητα δείκτη μετάστασης. Όταν τα καρκινικά κύτταρα αποκολληθούν από το σημείο προσκόλλησης, η εναπόθεσή τους σε άλλο σημείο θα

εξαρτηθεί από πολλούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα αλλαγές στην ηλεκτροστατικότητα μεταξύ καρκινικών κυττάρων και ενδοθηλίου [51]. Τα αιμοπετάλια προωθούν την μετάσταση ελευθερώνοντας καρκινικούς αυξητικούς παράγοντες, όπως είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF). Ο βασικός ινοβλαστικός παράγοντας αύξησης (bFGF) και ο εκ των αιμοπεταλίων εξορμούμενος παράγοντας αύξησης (PDGF) [24, 51]. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) είναι ένας χημειοτακτικός παράγοντας για τα ενδοθηλιακά κύτταρα, που εκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα του μαστού και η συγκέντρωσή του στους ιστούς σχετίζεται με την πρόγνωση του καρκίνου. Ο VEGF έχει βρεθεί ότι απελευθερώνεται, *in vitro*, από τα αιμοπετάλια όταν αυτά διεγείρονται από την θρομβίνη [53]. Η συσσώρευση των καρκινικών κυττάρων γίνεται μετά τις πρώτες δεκαπέντε μέρες αφότου έγινε η έγχυση των καρκινικών κυττάρων [51].

1.8 Αιμοπεταλιακή Μετάσταση

Ίσως ένας από τους πηκτικούς παράγοντες, για παράδειγμα ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4, επηρεάζει την μετάσταση εμποδίζοντας την αντιθρομβωτική δραστηριότητα της ηπαρίνης ενώ διατηρεί συγχρόνως σε υψηλά επίπεδα την συγκέντρωση των λιπιδίων στο αίμα.

Μία άλλη πιθανή λειτουργία των αιμοπεταλίων στην εξάπλωση της μετάστασης ίσως επιτυγχάνεται με την επικοινωνία των καρκινικών κυττάρων με το αγγειακό ενδοθήλιο [54].

Τα καρκινικά κύτταρα έχει πλέον αποδειχθεί ότι συσσωρεύουν αιμοπετάλια και αυτή η ικανότητα τους συνδέεται με την ενδεχόμενη μετάστασή τους, δίνοντας έτσι την πιθανότητα στο καρκινικό κύτταρο να επιβιώσει μέσα στον οργανισμό. Όταν

το καρκινικό κύτταρο καλύπτεται από τα αιμοπετάλια, αποκτά την δυνατότητα να εισβάλλει στον οργανισμό, χωρίς να γίνει αντιληπτό από το ανοσοποιητικό σύστημα.

Έχει αποδειχθεί ότι τα αιμοπετάλια προστατεύουν τα καρκινικά κύτταρα από το TNF-a. Επιπλέον, διευκολύνουν την προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων στον αγγειακό ενδοθήλιο και την απελευθέρωση μεγάλων αριθμών παραγόντων τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα καρκινικά κύτταρα για την ανάπτυξή τους. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να διεγείρουν την απελευθέρωση των αιμοπεταλιακών κοκκίων που συνεπάγεται απελευθέρωση προ-συσσωρευτικών παραγόντων. Το ADP και η θρομβοξάνη A2 είναι τέτοιοι παράγοντες. Η θρομβοξάνη A2 διεγείρει την συσσώρευση αιμοπεταλίων που επάγονται από την μουρίνη, κυρίως μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων της θρομβοξάνης [50]. Επιπλέον η ισορροπία μεταξύ της ενδογενούς προστακυκλίνης και της θρομβοξάνης A2 ίσως επηρεάζει την μοίρα των καρκινικών κυττάρων. Με σκοπό να ελεγχθεί η αιμόσταση στον οργανισμό, η προστακυκλίνη αλληλεπιδρά με τους ρυθμιστές συμπεριλαμβανομένου και του μονοξειδίου του αζώτου [50].

Ο PAF συμμετέχει στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, αυξάνει την προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων στο αγγειακό επιθήλιο, βελτιώνει την έκφραση ογκογονιδίων, και συνεισφέρει στην ανάπτυξη του όγκου μέσω της ενεργοποίησης της κινητικότητας των κυττάρων και διεγείροντας επιπλέον την διαδικασία της αγγειογένεσης [55]. Η διαδικασία TCIPA διεγείρεται επίσης από πρωτεΐνάσες της σερίνης, την θρομβίνη, την πρωτεΐνάση της κυστεΐνης, την καθεψίνη B, τα προπηκτικά του καρκίνου και τις μεταλλοπρωτεΐνάσες (MPPs). Η θρομβίνη είναι το κύριο ένζυμο σε αυτό τον καταρράκτη διαδικασιών γιατί είναι ο κυριότερος ενεργοποιητής της αιμοπεταλιακής διαδικασίας που δρα μέσω ενεργοποιημένων πρωτεϊνικών υποδοχέων [50].

Στους όγκους παρατηρείται μειωμένη αιματική ροή και αυτό πιθανόν να οφείλεται στην αυξημένη ενδιάμεση πίεση. Η αντοχή των καρκινικών αγγείων στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων πιθανόν να εμποδίζεται από την στάση του αίματος, την έκθεση των υπενδοθηλιακών πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας, για παράδειγμα του κολλαγόνου και από ενεργοποίηση πρωτεϊνών (όπως ο παράγοντας von Willebrand). Πιθανόν, η αυξημένη ικανότητα των αιμοπεταλίων να δεσμεύονται στο αγγειακό δίκτυο των όγκων να ρυθμίζεται από τα καρκινικά κύτταρα, τα οποία διαφοροποιούνται διαφορετικά αναλόγως του είδος του καρκινικού κυττάρου. Συμπερασματικά, η αγγειογένεση δεν εξαρτάται μόνο από τα ενδοθηλιακά και καρκινικά κύτταρα αλλά και από την αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων και ενδοθηλίου [49]. Η ανάπτυξη του όγκου και η μετάστασή του εξαρτάται τελικά από παράγοντες που διεγείρουν την δημιουργία αγγείων (αγγειογένεση) [56].

Η εναπόθεση των αιμοπεταλίων σε φυσιολογικό ενδοθήλιο εμποδίζεται από την ηπαρίνη και από την σύνθεση των προστακυκλινών του ενδοθηλίου. Οι προστακυκλίνες δεν εμποδίζουν μόνο την προσκόλληση των αιμοπεταλίων αλλά αναστέλλουν και την συσσώρευσή τους. Όταν εντοπιστεί από τον οργανισμό κάποια ρήξη του ενδοθηλίου, τότε όλοι οι παραπάνω μηχανισμοί αναστέλλονται.

Τα αιμοπετάλια έχει αποδειχτεί ότι διεγείρουν άμεσα τα καρκινικά κύτταρα. Αυτές οι αντιδράσεις μετριάζονται από προϊόντα της απελευθέρωσης των αιμοπεταλίων, όπως είναι ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4, η β-θρομβοσφαιρίνη και η βασική αιμοπεταλιακή πρωτεΐνη, που χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό μετάφρασης, και επιπλέον από τον αιμοπεταλιακό αυξητικό παράγοντα, ο οποίος είναι απαραίτητος για την διέγερση της βιοσύνθεσης του γενετικού υλικού και για την κυτταρική διαίρεση [51]. Τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στα καρκινικά αγγεία, σχηματίζουν μικρο-θρόμβους και απελευθερώνουν κοκκία τα οποία περιέχουν

πιθανούς ενεργοποιητές της αγγειογένεσης όπως ο VEGF, ο εκ των αιμοπεταλίων εξορμούμενος ενδοθηλιακός παράγοντας αύξησης, μαζί με αναστολείς όπως οι θρομβοσποντίνες και ο παράγοντας 4 των αιμοπεταλίων [49]. Ο Brock και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι ο VEGF μπορεί να επάγει τα ενδοθηλιακά κύτταρα να απελευθερώσουν τον παράγοντα von Willebrand, ο οποίος συμμετέχει στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων [49].

2. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη οργανοκασσιτερικών ενώσεων με βιολογικά ενεργούς υποκαταστάτες. Η μελέτη της σχέσης μεταξύ δομής και δραστηριότητας των ενώσεων αυτών έγινε με σκοπό να διευκρινιστούν οι παράγοντες που πιθανά συμβάλλουν στη βιολογική δράση ώστε τελικά να παρασκευαστούν νέα αντικαρκινικά φάρμακα με βάση τον κασσίτερο, με διαφορετικά χαρακτηριστικά από τα είδη γνωστά αντικαρκινικά φάρμακα με βάση τα μέταλλα. Για να έχει ένα φάρμακο ισχυρή θεραπευτική δράση κατά ενός ή περισσότερων ειδών καρκίνου, θα πρέπει να έχει ικανοποιητική δραστηριότητα, χαμηλή τοξικότητα καθώς και αντιμεταστατική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων.

Έχοντας σαν οδηγό τις παρατηρήσεις αυτές επιλέχθηκε μια σειρά οργανικών υποκαταστατών και έγινε προσπάθεια ώστε να δημιουργηθεί μια σειρά συμπλόκων, ενώσεων του Κασσιτέρου, των οποίων τις βιολογικές δράσεις θα μελετηθούν *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo* μοντέλων του καρκίνου. Από την μελέτη που πραγματοποιήθηκε επιλέχθηκαν, οι θειόνες οι οποίες, ως υποκαταστάτες, συγκεντρώνουν, μεταξύ των άλλων και τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

1^{ov}) Είναι μόρια με αξιόλογες αντιοξειδωτικές ιδιότητες [57].

2^{ov}) Μερικές από αυτές, όπως οι 6-μερκαπτοπουρίνες έχουν εκτεταμένα μελετηθεί ως αντικαρκινικά φάρμακα και χρησιμοποιούνται στην τρέχουσα κλινική πράξη ως αντιμεταβολίτες στην θεραπεία του καρκίνου [38, 57].

3^{ov}) Το σύμπλοκο του Λευκόχρυσου με πυριδινοθειόνη αποτελεί έναν αντικαρκινικό παράγοντα που βρίσκεται στο στάδιο των κλινικών μελετών.

Στόχος της συνεργασίας των Εργαστηρίων Φυσιολογίας, και Βιοανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων ήταν ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η δοκιμή

συμπλόκων ενώσεων του Κασσιτέρου οι οποίες αποσκοπούσαν στην στόχευση αυστηρά συγκεκριμένων ενζυμικών συστημάτων στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων, τα οποία παίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στον μεταβολισμό του καρκινικού κυττάρου, ενώ από την άλλη πλευρά εκφράζονται με έναν εξειδικευμένο τρόπο κυρίως στα καρκινικά κύτταρα. Έτσι επιλέχθηκαν ως πεδία των φαρμακολογικών στόχων αφ' ενός μεν ο ενεργειακός μεταβολισμός των καρκινικών κυττάρων και αφ' ετέρου ο μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος. Η επιλογή αυτή έγινε για τους εξής λόγους :

1^{ov}) Διότι ο ενεργειακός μεταβολισμός των καρκινικών κυττάρων παρουσιάζει προβλήματα στον συντονισμό του γλυκολυτικού και αναπνευστικού σκέλους του.

2^{ov}) Διότι τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν διαφορετικά ένζυμα στην αραχιδονική οδό

3^{ov}) Διότι υπάρχουν δεδομένα ότι ο ενεργειακός μεταβολισμός του καρκινικού κυττάρου ενεργοποιείται και/ή καταστέλλεται από συγκεκριμένους αραχιδονικούς μεταβολίτες.

4^{ov}) Διότι τα αντιοξειδωτικά μόρια φαίνεται ότι παίζουν κάποιο ρόλο στην ροή του κυτταρικού κύκλου και ότι, εν γένει ο λόγος οξειδωσης προς αναγωγή αποτελεί ένα είδος διακόπτη για την μετακίνηση του κυττάρου από το σημείο G0 της G1 φάσεως προς την φάση S της σύνθεσης του DNA.

2.1 Σχεδιασμός της μελέτης

Έχοντας στον συνολικό μας συλλογισμό υπ' όψιν τις ανωτέρω προκείμενες υποθέσεις σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν οι ακόλουθες ουσίες οι οποίες κατόπιν μπήκαν στο στάδιο των βιολογικών δοκιμασιών.:

(1) Διμέθυλο κασσίτερος δις (5-χλώρο-2-μερκάπτοβενζοθειαζόλιο)

(2) Διβούτυλο κασσίτερος δις (5-χλώρο-2-μερκάπτοβενζοθειαζόλιο)

(3) Διφαίνυλο κασσίτερος δις (5-χλώρο-2-μερκάπτοβενζοθειαζόλιο)

(4) Τριφαίνυλο κασσίτερος δις (5-χλώρο-2-μερκαπτοβενζοθειαζόλιο)

(5) Τριφαινύλ κασσίτερος 2-μερκαπτοβενζοξαζόλιο

(6) Τριφαινύλ κασσίτερος 2-μερκαπτοβενζοθειαζόλιο,

Τα βιολογικά μοντέλα που επιλέχθηκαν για την μελέτη των δράσεων των εν λόγω ουσιών ήσαν τα εξής :

1^{ov}) Τα καρκινικά κύτταρα του λειομυοσαρκώματος LMS του επίμυος Wistar, όπως επίσης τα κύτταρα του MCF7 μαστού ανθρώπου. Σύγκριση με τα αποτελέσματα των καρκινικών σειρών που μελετήθηκαν θα πραγματοποιηθεί με τη προσθήκη της ουσίας cis-platin. Η δράση των ανωτέρω ουσιών θα μελετηθεί και ως προς στους υγιείς ινοβλάστες.

2^{ov}) Το ενζυμικό σύστημα της 5-λιποξυγονάσης και άλλων ενζύμων σχετιζομένων με την αραχιδονική οδό.

3^{ov}) Το μοντέλο συσσώρευσης αιμοπεταλίων ανθρώπου ex vivo με διεγέρτες καρκινικά κύτταρα λειομυοσαρκώματος επίμυος Wistar.

4^{ov}) Το μοντέλο ανάπτυξης νεοπλασματικής νόσου σε επίμυες Wistar με ενοφθαλμισμό καρκινικών κυττάρων λειομυοσαρκώματος συγγενούς επίμυος Wistar.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Χημικά και αντιδραστήρια

Για την παρούσα, μελέτη πέραν των πρωτοκόλλων που ακολουθήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν το παρακάτω χημικά και βιολογικά αντιδραστήρια καθώς και ο εξοπλισμός του εργαστηρίου μας, τα οποία ήταν:

1. Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM), Low glucose (1gr/lt), PAA
2. Phosphate Buffer Saline (PBS), P4417, Sigma
3. Trypsin-EDTA, 0.05%/0.02% in D-PBS, L11-004, PAA
4. Penicillin-Streptomycin, P11-010, PAA
5. L-glutamine, 200mM, M11-004, PAA
6. Fetal bovine serum (FBS), A15-101, PAA
7. MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, approx. 97.5% TLC), M5655, Sigma
8. Trypan blue, powder, cell culture tested T6146, Sigma
9. Giemsa Stain Modified Solution. Cd 32884 Sigma
10. Dimethylsulfoxid, 60153, Riedel-de Haen
11. Annexin V-FITV, 556420, BD PharmingenTM
12. Propidium Iodide solution, P4864, Sigma
13. Calcium Buffer solution
14. Σύριγγα με βελόνα BD Plastipak, Becton Dickinson S.A. (2,5ml, 5ml, 10ml)
15. Ράμματα V7, Johnson & Johnson Hellas.
16. Τρικαπριλίνη, Glyceryl trioctanoate T9126, Sigma

17. Multiskan Spectrum, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

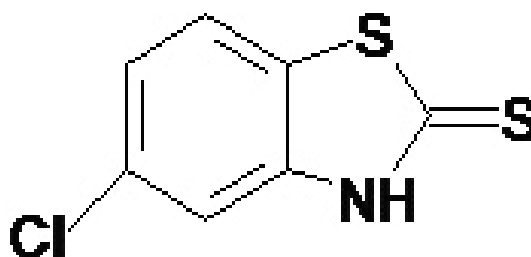
18. Κυτταρόμετρο: CyFlow[®]ML, Partec, Munster, Germany.

19. Συσσωρευόμετρο: CA – 500 της εταιρίας CHRONOLOG.

3.2 Σύμπλοκα του κασσιτέρου της μελέτης

Τα σύμπλοκα του κασσιτέρου που μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι τα παρακάτω:

Υποκαταστάτης CBZT



Ο υποκαταστάτης είναι ένα θειοαμίδιο $C_7H_4CLNS_2$ (CBZT) 5-χλώρο-2-μερκάπτοβενζοθειαζόλιο, (υποκαταστάτης). Επιλέχθηκε από μία σειρά υποκαταστατών με σκοπό τη μελέτη των παραγόμενων από αυτό, συμπλόκων του κασσιτέρου. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις φαίνεται να έχει και ο ίδιος αντικαρκινική δράση.

Χημικός τύπος και ονοματολογία των συμπλόκων:

CBZT2: $(CH_3)_2Sn(cbzt)_2$ Διμέθυλο κασσίτερος δις (5-χλώρο-2-μερκάπτοβενζοθειαζόλιο)

CBZT3: $(C_4H_9)_2Sn(cbzt)_2$ Διβούτυλο κασσίτερος δις (5-χλώρο-2-μερκάπτοβενζοθειαζόλιο)

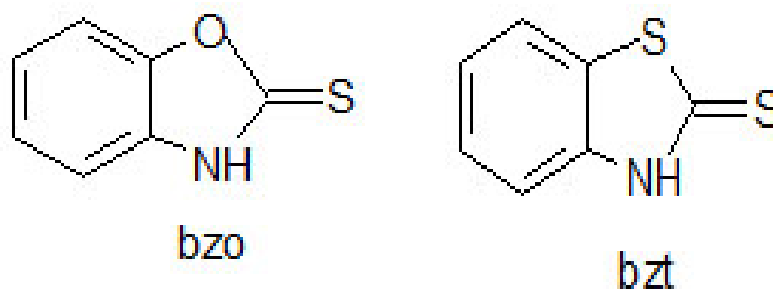
CBZT4: $(C_6H_5)_2Sn(cbzt)_2$ Διφαινύλο κασσίτερος δις (5-χλώρο-2-μερκάπτοβενζοθειαζόλιο)

CBZT5: $(C_6H_5)_3Sn(cbzt)$ Τριφαινύλο κασσίτερος δις (5-χλώρο-2-μερκάπτοβενζοθειαζόλιο)

Τα παραπάνω σύμπλοκα έχουν όλα τον ίδιο υποκαταστάτη, αυτό που αλλάζει είναι οι ομάδες αλκυλίων ή αρυλίων του κασσιτέρου οι οποίες μπορεί να είναι τα μεθύλια, τα βουτύλια και τα φαινύλια. Η διαφοροποίηση των ομάδων ένταξης μεταβάλλει τη λιποφιλία προσδίδοντας παραπάνω δραστικότητα στα σύμπλοκα που προκύπτουν από αυτές τις ομάδες. [28].

Υποκαταστάτες BZO και BZT

Επίσης δοκιμάστηκαν τα σύμπλοκα του τριφαινυλοκασσιτέρου με τους υποκαταστάτες BZO και BZT ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση του υποκαταστάτη:



Από αυτούς προέκυψαν τα παρακάτω σύμπλοκα με τα οποία θα διεξαχθεί και συγκριτική κυτταρική μελέτη.

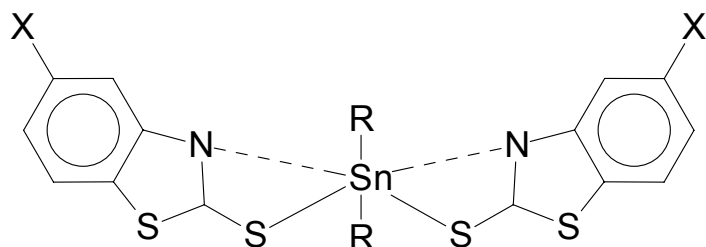
BZO5: $(C_6H_5)_3Sn(bzo)$ (Τριφαινύλ κασσίτερος 2-μερκαπτοβενζοξαζόλιο).

BZT5: $(C_6H_5)_3Sn(bzt)$ (Τριφαινύλ κασσίτερος 2-μερκαπτοβενζοθειαζόλιο).

Οι δομές στο χώρο των συμπλόκων είναι οκταεδρικές η τριγωνικής δυπυραμίδας.

Οκταεδρική

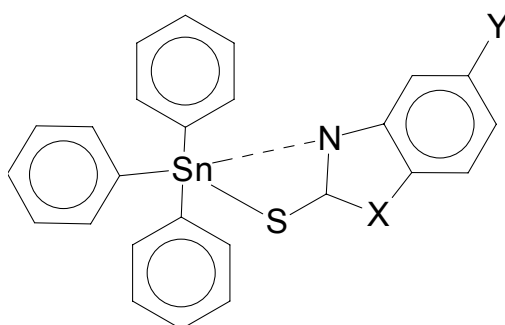
(A)



Οκταεδρική είναι η μοριακή δομή στο χώρο των συμπλόκων CBZT2, CBZT3 και CBZT4.

Τριγωνική Διπυραμίδα

(B)



Τριγωνική Διπυραμίδα είναι η μοριακή δομή στο χώρο των συμπλόκων BZO5, BZT5 και CBZT5

3.3 Μέθοδοι

Για τη μελέτη των συμπλόκων του κασσιτέρου σε κυτταρικό επίπεδο και σε πειραματόζωα αποφασίστηκαν τα εξής:

1. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των έξι συμπλόκων και του υποκαταστάτη CBZT με τη μέθοδο Trypan Blue
2. Επιλέχθηκαν τα τρία πιο τοξικά στα κακοήθη κύτταρα και έγινε έλεγχος σχηματισμού αποικιών μετά τη χορήγηση των συμπλόκων στα κακοήθη κύτταρα.
3. Ακολούθησε μελέτη με τη μέθοδο MTT για τον υπολογισμό της IC50 στα τρία πιο τοξικά σύμπλοκα στα κακοήθη κύτταρα καθώς και σε υγιείς ινοβλάστες και σύγκριση με την cis-platin που χρησιμοποιήτε ήδη ως χημιοθεραπευτικό.
4. Από αυτά επιλέχθηκαν τα δύο ισχυρότερα για να μελετηθούν με κυτταρομετρία ροής
5. Εν συνεχεία τα σύμπλοκα αυτά μελετήθηκαν ως προς την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.
6. Τέλος το ισχυρότερο από αυτά να δοκιμάστηκε σε πειραματόζωα με κακοήθη όγκο και να έγινε μελέτη τοξικότητας στους επίμυες Wistar.

3.4 Πειράματα in vitro

Χημική καρκινογένεση

Στο εργαστήριό μας έχει αναπτυχθεί ένα in vivo μοντέλο πειραματικής χημικής καρκινογένεσης βασιζόμενο στην εφ' άπαξ έγχυση μιας μεγάλης ποσότητα B[α]P σε επίμυες Wistar, οι οποίοι μέσω καταλλήλων σχημάτων αναπαραγωγής

παρουσιάζουν μεγάλη γενετική ομοιομορφία και συνεπώς αντιδρούν κατά πανομοιότυπο τρόπο στην χορήγηση του καρκινογόνου παράγοντα. Έτσι η bolus έγχυση 10,08 mgr B[a]P s.c ανά επίμυα σε πειραματόζωα ηλικίας 2 μηνών και βάρους κυμαινόμενου μεταξύ 100-130 gr, έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός μονήρους συμπαγούς όγκου, ταχείας αναπτύξεως και υψηλής ιστολογικής ομοιογένειας. Τα πειραματόζωα αναπτύσσουν όγκους σε ποσοστό κυμαινόμενο μεταξύ 97-100% της ομάδας, ενώ τα εν λόγω νεοπλάσματα, από την ιστολογική πλευρά, είναι σχεδόν εξ ολοκλήρου κυτταροβριθή λειομυοσαρκώματα χαμηλής διαφοροποίησης, υψηλής διηθητικότητας και ταχείας αναπτύξεως. Σπανιότερα είναι δυνατόν να έχουμε την ανάπτυξη ινοσαρκωμάτων, ραβδομυοσαρκωμάτων, αδιαφοροποίητων σαρκωμάτων και μικτών όγκων. [58, 59].

Δημιουργία κυτταρικής σειράς:

Για τη πραγματοποίηση των πειραμάτων κυτταροτοξικότητας τα συμπλοκά μας δοκιμάστηκαν αρχικά σε κύτταρα λειομυοσαρκωματικά τα οποία χρησιμοποιούνται κατά κόρων στο εργαστήριο Φυσιολογίας. Επίσης χρησιμοποιήσαμε κύτταρα αδενοκαρκινώματος μαστού MCF7.

Τα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα του επίμυος Wistar που χρησιμοποιήθηκαν για την *in vitro* και *in vivo* μελέτη των δράσεων του συμπλόκου παρήχθησαν ως εξής: Από μία ομάδα συγγενών πειραματοζώων η οποία ανήκει στην 7^η γενεά ομομικτικής αναπαραγωγής ελήφθησαν 3 αρσενικά και 3 θηλυκά ζώα στα οποία χορηγήθηκε κατόπιν αναισθητοποίησης ποσότητα B[a]P (βενζοπυρένιο) με την ίδια τεχνική που περιγράφηκε παραπάνω [60, 61]. Μετά την παρέλευση 110-135 ημερών όλα τα ζώα ανέπτυξαν όγκους, οι οποίοι στην πλειοψηφία τους χαρακτηρίστηκαν ιστολογικά ως λειομυοσαρκώματα 4/6, ενώ σε ένα από τα πειραματόζωα αναπτύχθηκε ινοσάρκωμα

πτωχό σε κύτταρα και στο τελευταίο ένα ραβδομυοσάρκωμα. Οι βιοψίες σε όλα τα ζώα έγιναν κατόπιν αναισθητοποίησης με διαιθυλικό αιθέρα και τα κακοήθη κύτταρα ελήφθησαν με βιοπτική βελόνα. Από τους όγκους των ζώων που είχαν χαρακτηριστεί ως λειομυοσαρκώματα ελήφθησαν (κάτω από άσηπτες συνθήκες και κατόπιν αναισθητοποίησης με κεταμίνη – μιδαζολάμη) τεμάχια μεγέθους 0,5 cm² τα οποία ετέθησαν αμέσως σε ψυχρό διάλυμα Ringer.

Σύμφωνα με το τροποποιημένο πρωτόκολλο της κ. Βεζυράκη από τη βασική μέθοδο του Freshnes [62]. Κατόπιν τα ιστοτεμάχια κατατμήθηκαν περαιτέρω ώστε να προκύψουν τεμαχίδια μεγέθους περί το 1 mm² τα οποία ελήφθησαν άσηπτα από το Ringer και ετέθησαν σε 20 ml διαλύματος θρυψίνης 0.25%. Η επώαση των τεμαχίων γινόταν υπό ήπια ανάδευση και ανά 15 min λαμβανόταν το υπερκείμενο το οποίο τίθετο σε άσηπτους πλαστικούς σωλήνες (falcon) για περαιτέρω επεξεργασία (φυγοκέντρηση – τέλος 1^{ου} κύκλου θρυψινισμού). Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προσθέταμε 1 ml Fetal Bovine Serum (FBS) για να σταματήσουμε τη δράση της θρυψίνης και κατόπιν ξεκινούσαμε τη φυγοκέντρηση. Το ίδιο χρονικό διάστημα πριν περάσουμε στο 2^ο κύκλο θρυψινισμού προκειμένου τα τεμαχίδια του όγκου να παραμείνουν βιώσιμα προσθέταμε 10 ml DMEM ώστε η δράση της θρυψίνης να ανασταλεί. Ταυτοχρόνως οι προηγούμενοι δοκιμαστικοί σωλήνες που περιείχαν το ελαιώδη των δια θρυψινισμού εκ του όγκου αποκολληθέντων καρκινικών κυττάρων φυγοκεντρούντο στις 1200 rpm για 5 min ώστε τα αιωρούμενα καρκινικά κύτταρα να καταπέσουν στον πυθμένα. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης απορρίπταμε το υπερκείμενο, προσθέταμε 10 ml PBS επανααιωρούσαμε τα κύτταρα με ήπιες αναρροφητικές κινήσεις της πιπέτας και τα επαναφυγοκεντρούσαμε στις ίδιες συνθήκες. Απορρίπταμε ξανά το υπερκείμενο, προσθέταμε 10 ml DMEM με 10% FBS και κατόπιν πραγματοποιούσαμε σπορά του νέου ελαιώδη ώστε 1 ml

αυτού να τίθεται σε τρυβλίο Petri με 9 ml DMEM με 10% FBS (τελικός όγκος καλλιέργειας 10 ml). Τα κύτταρα επωάζονταν σε επωαστή (37°C, 95% O₂, 5% CO₂) και ελέγχονταν οπτικά μία φορά την ημέρα. Όταν δημιουργούσαν πλήρες ταπήτιο γινόταν έκπλυση με 10 ml PBS, αποκόλληση των κυττάρων με 1 ml διαλύματος θρυψίνης και επανασπορά σε καινούργια τρυβλία ώστε να έχουμε μεγάλους αριθμούς νεοπλασματικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά λαμβάνονταν από τα τρυβλία φυγοκεντρούντο, ετίθεντο σε διάλυμα FBS και DMSO (αναλογία 9:1) και κατόπιν φυλάσσονταν εντός κρυοσωληναρίων σε υγρό άζωτο για την επαναχρησιμοποίησή τους. Ο έλεγχος της φύσης των εν λόγω κυττάρων έγινε με δύο τρόπους:

- Με τυπικό μικροσκοπικό έλεγχο
- Με βιολογική δοκιμασία

Η βιολογική δοκιμασία της νεοπλασματικής φύσης των εν λόγω κυττάρων γινόταν ως εξής: Από πρόσφατες κυτταροκαλλιέργειες των οποίων τα κύτταρα ήταν σε μεγάλο ποσοστό βιώσιμα γινόταν λήψη μεγάλων αριθμών κυττάρων τα οποία ενοφθαλμιζόνταν σε επίμυες Wistar που ανήκαν στην ομομικτική σειρά ζώων από τους οποίους είχε γίνει η λήψη του αρχικού όγκου. Πριν τον ενοφθαλμισμό κάθε ένα από τα ζώα – λήπτες αναισθητοποιείτο με κεταμίνη – μιδαζολάμη και υποβαλλόταν σε χειρουργική τομή κατά πρώτο σκοπό. Το μήκος της τομής ήταν περίπου 2 cm. Οι υποδόριοι ιστοί παρεκτοπίζονταν μέσω απόθησης με λαβίδα και κατόπιν η αποκαλυφθείσα μυϊκή στοιβάδα τραυματιζόταν με ήπιους νυγμούς ώστε να προκαλείται μικρή τοπική αιμορραγία. Επί της δημιουργηθείσας μικρής πληγής γινόταν εναπόθεση των καρκινικών κυττάρων (4 – 8 x 10⁶ κύτταρα / ml διαλύματος Hank). Αποφεύγαμε να χρησιμοποιήσουμε DMEM διότι σε ορισμένα πειράματα δεν είχαμε επιτυχή ενοφθαλμισμό των κυττάρων. Μετά τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων γινόταν σφικτή συρραφή της τομής. Τόσο η διάνοιξη της τομής, όσο και η σύγκλιση

της γινόταν υπό άσηπτες συνθήκες. Όταν είχαμε επιτυχή ενοφθαλμισμό των καρκινικών κυττάρων ακολουθούσε ταχεία ανάπτυξη όγκου στην περιοχή του ενοφθαλμισμού (10 – 20 ημέρες). Από τους αναπτυχθέντες όγκους γινόταν κατόπιν αναισθητοποίησης λήψη δείγματος με βιοπτική βελόνη και ιστοπαθολογικός έλεγχος των κυττάρων. Σε όλες τις περιπτώσεις το αποτέλεσμα της βιοψίας ήταν θετικό για λειομυοσάρκωμα. Επίσης τα επιτυχώς ενοφθαλμισμένα με καρκινικά κύτταρα ζώα ανέπτυξαν όλα τα χαρακτηριστικά της νεοπλασματικής νόσου τόσο σε τοπικό όσο και σε συστηματικό επίπεδο (τοπική αύξηση όγκου, νεοαγγειογένεση, διήθηση παρακείμενων ιστών, αιματογενή διασπορά, διήθηση λεμφαδένων, απομακρυσμένη μετάσταση, απίσχυαση, αναιμία, θάνατος). Οι όγκοι κατά τη στιγμή του θανάτου είχαν μέγεθος που προσέγγιζε από 38 – 45 % της συνολικής μάζας του σώματος.

Κυτταρική καλλιέργεια

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν λειομυοσαρκωματικά κύτταρα επίμυος Wistar (LMS cells-leiomyosarcomatic cells), ανθρώπινα αδενοκαρκινικά κύτταρα μαστού (MCF-7) και φυσιολογικοί ινοβλάστες από πνεύμονα εμβρύου (MRC-5), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις συγκριτικές μελέτες. Τα LMS, MCF-7 και τα MRC5 κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM), Low glucose (1gr/lit), με την προσθήκη 10% εμβρυϊκού βοδινού ορού (Fetal Bovine Serum), 1% πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης και 0.5% L-γλουταμίνης ενώ για τους φυσιολογικούς ινοβλάστες προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό επιπλέον 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και 1% L-γλουταμίνη. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂.

3.5 Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας με τη χρήση χρωστικής Trypan Blue

Ο έλεγχος βιωσιμότητας των LMS κυττάρων μετά την προσθήκη των ουσιών πραγματοποιήθηκε σε πολυτρυβλία των 24 φρεατίων. Από ένα αρχικό τρυβλίο που διατηρούνται τα κύτταρα, αναρροφάται το θρεπτικό και προστίθεται 10 ml PBS για πλύση των κυττάρων. Στη συνέχεια αναρροφάται το PBS και προστίθεται 1 ml θρυψίνη για να αποκολληθούν τα κύτταρα. Για να επιταχυνθεί η αποκόλληση τοποθετείται το τρυβλίο για περίπου τρία λεπτά στον επωαστή. Προστίθενται 10 ml DMEM, ανάδευση των κυττάρων και τοποθέτηση τους σε falcon 15ml. Τα κύτταρα αναδεύονται ήπια και 11 μl τοποθετούνται σε πλάκα NeuBauer και πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Γίνεται υπολογισμός του συνολικού αριθμού των κυττάρων καθώς και της ποσότητας που απαιτείται για την προσθήκη 20000 κυττάρων σε κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου. Ο τελικός όγκος του κάθε φρεατίου συμπληρώνεται με θρεπτικό υλικό στο 1 ml. Το πολυτρυβλίο τοποθετείται για 24 ώρες στον επωαστή.

Μετά την πάροδο των 24 ωρών γίνεται η προσθήκη των ουσιών. Από ένα αρχικό διάλυμα υπολογίζονται οι ποσότητες που πρέπει να προστεθούν σε κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση σε τελικό όγκο 1 ml. Το πολυτρυβλίο τοποθετείται στον επωαστή και πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων στο επιθυμητό χρονικό διάστημα (48 ώρες).

Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται με την τεχνική χρώσης Trypan Blue. Αφού γίνει αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων με PBS τα κύτταρα αποκολλούνται με προσθήκη 0,25 ml θρυψίνης. Έπειτα, προστίθενται 0,25 ml PBS και 0,5 ml Trypan Blue και τα κύτταρα επωάζονται για 5

λεπτά σε συνθήκες δωματίου. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται με χρήση πλάκας NeuBauer. Τα κύτταρα που επιβίωσαν από τη κυτταροτοξική δράση των ουσιών που δοκιμάστηκαν είναι αρνητικά στη χρώση. Το ποσοστό της βιωσιμότητας των κυττάρων στα φρεάτια δοκιμής της ουσίας εκφράζεται σε εκατοστιαίες μονάδες συγκρινόμενο με το αντίστοιχο ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων των φρεατίων ελέγχου.

3.6 Ικανότητα σχηματισμού αποικιών.

Από ένα αρχικό τρυβλίο που διατηρούνται τα κύτταρα, αναρροφάται το θρεπτικό και προστίθεται 10 ml PBS για πλύση των κυττάρων. Στη συνέχεια αναρροφάται το PBS και προστίθεται 1 ml θρυψίνη για να αποκολληθούν τα κύτταρα. Για να επιταχυνθεί η αποκόλληση τοποθετείται το τρυβλίο για περίπου τρία λεπτά στον επωαστή. Προστίθενται 10 ml DMEM, ανάδευση των κυττάρων και τοποθέτηση τους σε falcon 15ml. Τα κύτταρα αναδεύονται ήπια και 11 μl τοποθετούνται σε πλάκα NeuBauer και πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Γίνεται υπολογισμός του συνολικού αριθμού των κυττάρων καθώς και της ποσότητας που απαιτείται για την προσθήκη 20000 κυττάρων σε κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου. Ο τελικός όγκος του κάθε φρεατίου συμπληρώνεται με θρεπτικό υλικό στο 1 ml. Το πολυτρυβλίο τοποθετείται για 24 ώρες στον επωαστή.

Μετά την πάροδο των 24 ωρών γίνεται η προσθήκη των ουσιών. Από ένα αρχικό διάλυμα υπολογίζονται οι ποσότητες που πρέπει να προστεθούν σε κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση σε τελικό όγκο 1 ml. Οι συγκεντρώσεις είναι λίγο μικρότερες, ίσες και λίγο μεγαλύτερες από την IC50 που προέκυψε από το προηγούμενο πείραμα. Το πολυτρυβλίο τοποθετείται στον

επωαστή και πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων στο επιθυμητό χρονικό διάστημα (24-48 ώρες).

Αφού μετρηθούν, γίνεται σπορά μικρής ποσότητας, 5000 κυττάρων περίπου ή όλων των κυττάρων του φρεατίου, σε τρυβλία των 10ml και συμπληρώνουμε θρεπτικό υγρό. Αφήνουμε τα κύτταρα να αναπτυχθούν στον επωαστικό θάλαμο μέχρι να σχηματισθούν οι αποικίες, 10 ημέρες περίπου, ανανεώνοντας το θρεπτικό υλικό τους σε κάθε τέσσερις με πέντε ημέρες περίπου.

Στο πέρας του 10ημέρου γίνεται αναρρόφηση του υπάρχοντος θρεπτικού. Πλύση του τρυβλίου με 10ml PBS.

Προσθήκη 10ml μίγματος Μεθανόλης- Οξικού οξέος 3:1.

Τοποθέτηση του τρυβλίου στους -18°C για 10 min. Αναρρόφηση του μίγματος και τοποθέτηση του τρυβλίου σε θερμοκρασία δωματίου ανοιχτό μέχρι να στεγνώσει τελείως. Προσθήκη 10ml χρωστικής Giemsa αραιωμένη με θερμό νερό βρύσης σε αναλογία 1:10. Μετά από 30 min αναρρόφηση της χρωστικής και προσεκτικό πλύσιμο του τρυβλίου με νερό βρύσης. Αφού στεγνώσει τελείως γίνεται μέτρηση των αποικιών με γυμνό μάτι.

3.7 Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη χρήση MTT

Η μέθοδος αυτή είναι η πλέον ακριβής για τον προσδιορισμό των κατά 50% κυτταρικών θανάτων (IC50) που οφείλεται σε χορήγηση ενός κυτταροτοξικού σκευάσματος χημικής ή φυσικής προέλευσης.

Πραγματοποιείται σπορά 5000 κυττάρων σε ένα πολυτριβλίο 96 φρεατίων. Μετά από επώαση 24 ωρών σε επωαστικό θάλαμο σε συνθήκες 37°C και 5% CO_2 πραγματοποιείται η προσθήκη των υπό μελέτη ουσιών στις επιθυμητές

συγκεντρώσεις. Τα κύτταρα επωάζονται για άλλες 48 ώρες. Ακολουθεί η προσθήκη 50μl MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole)) assay) (5mg/ml), και νέα επώαση για 4 ώρες. Με προσοχή αφαιρείται το υπερκείμενο διάλυμα και η διάλυση των κρυστάλλων που σχηματιστήκαν στο ταπήτιο του πολυτρυβλίου γίνεται με την προσθήκη 200μl DMSO και ήπια ανάδευση με τη χρήση πολυπιπέτας. Η απορρόφηση σε κάθε φρεάτιο του πολυτριβλίου και για κάθε συγκέντρωση ουσίας πραγματοποιείται στα 570nm (background absorbance measured at 690 nm) με τη χρήση ενός φασατοφωτόμετρου (Multiscan Spectrum, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

3.8 Κυτταρομετρία ροής

Πραγματοποιείται σπορά 60.000 κυττάρων σε πολυτρυβλίο έξι φρεατίων. Τα κύτταρα διατηρούνται σε επωαστικό θάλαμο σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂. Με την πάροδο 24 ωρών, πραγματοποιείται η προσθήκη των ουσιών στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Μετά από 48 ώρες το θρεπτικό υλικό συλλέγεται από το κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου σε σωλήνες Falcon 15ml. Γίνεται πλύση με 2 ml PBS το οποίο και συλλέγεται στα αντίστοιχα Falcon. Προστίθενται 0.3 ml Trypsin σε κάθε φρεάτιο και τα πολυτρυβλία επωάζονται στους 37 °C για περίπου 5 λεπτά έως ότου αποκολληθούν τα κύτταρα. Προστίθενται 2 ml PBS και τα κύτταρα αναδεύονται ήπια με τη χρήση πιπέτας. Αφού αποκολληθούν πλήρως τα κύτταρα συλλέγονται στα αντίστοιχα Falcon. Πραγματοποιείται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με χρήση πλάκας NeuBauer. Τα Falcon φυγοκεντρούνται στις 3.500 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Επαναιωρούνται τα κυτταρικά ιζήματα σε

δ/μα Calcium Buffer 1x και με τους κατάλληλους υπολογισμούς λαμβάνονται και τοποθετούνται σε erpendorf 100.000 κύτταρα σε 100μL Calcium Buffer 1x.

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

3.9. Πειράματα ex-vivo

Πειράματα δράσης συμπλόκου επί της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων ανθρώπου ex vivo.

Αιμοληψία- Εξαγωγή αιμοπεταλίων

Για την πραγματοποίηση των ακόλουθων πειραμάτων συσσώρευσης αιμοπεταλίων χρησιμοποιήθηκαν υγιείς εθελοντές οι οποίοι δεν έκαναν χρήση καμίας φαρμακευτικής ουσίας. Καθημερινά λαμβάνονταν αίμα από έναν εθελοντή. Λόγω της μικρής χρονικής διάρκειας διατήρησης των αιμοπεταλίων εκτός του φυσιολογικού τους περιβάλλοντος, τελούνταν και δεύτερη αιμοληψία την ίδια μέρα από τον ίδιο εθελοντή για την επιτυχή διεκπεραίωση των πειραμάτων.

Αρχικά λαμβάνονται 10ml αίματος με κατάλληλη αποστειρωμένη βελόνα και τα τοποθετούσαμε σε πλαστικά σωληνάρια χωρητικότητας 10ml, τα οποία περιείχαν αντιπηκτικό. Ακολουθούσε ήπια ανάδευση των δειγμάτων για την καλή ανάμειξη του περιεχομένου τους και τοποθέτησή τους στην φυγόκεντρο για τον διαχωρισμό του

πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος (PRP, Plasma Rich Platelets). Η φυγοκέντρηση τελούνταν στις 900gpm και διαρκούσε 20 λεπτά. Μέσω της φυγοκέντρησης το περιεχόμενο των πλαστικών σωληναρίων διαχωρίζονταν σε τρεις φάσεις, όπου η άνω, κιτρινωπού χρώματος φάση περιείχε το PRP. Με αυτόματη πιπέτα λαμβάνονταν με προσοχή το PRP, τοποθετούνταν σε πλαστικό Falcon χωρητικότητας 10ml και διατηρούνταν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 36-37° C (θερμοκρασία σώματος). Ακολουθούσε δεύτερη φυγοκέντρηση του εναπομείναντος περιεχομένου των σωληναρίων για την εξαγωγή του φτωχού σε αιμοπετάλια πλάσματος (Plasma Poor Platelets), το οποίο χρησιμοποιούνταν για την σωστή ρύθμιση του συσσωρευόμετρου. Η φυγοκέντρηση αυτή τελούνταν στις 3100gpm και διαρκούσε 20 λεπτά. Η άνω φάση του περιεχομένου των σωληναρίων που προέκυπτε, περιείχε το PPP, το οποίο λαμβάνονταν με αυτόματη πιπέτα και τοποθετούνταν σε ένα erpendorf.

Αιμοπεταλιακή Συσσώρευση και αναστολή της

Για την μελέτη των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων ενεργοποίησης και συσσώρευσης χρησιμοποιήθηκε το Συσσωρευόμετρο CA – 500 της εταιρίας CHRONOLOG. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει ένα ηλεκτρονικό συσσωρευόμετρο με χαρακτηριστικά οπτικού φασματοφωτόμετρου και φθορισμόμετρου υπεριώδους (UV). Το οπτικό σύστημα είναι διπλής ακτίνας (double beam). Η περιοχή στην οποία βρίσκονται οι σχισμές υποδοχής των κυψελίδων είναι αυτοθερμαινόμενη με κλίμακα θερμοκρασίας από θερμοκρασία δωματίου μέχρι 40 °C. Η περιοχή αυτή κλείνει στεγανά ώστε το οπτικό σύστημα να απομονώνεται πλήρως από το εξωτερικό περιβάλλον τόσο οπτικά όσο και θερμικά. Μέσα σε στον μικρό αυτό θάλαμο υπάρχουν δύο σχισμές και συγκεκριμένα η σχισμή στην οποία τίθεται η κυψελίδα με το PRP (κυψελίδα συσσώρευσης) για τις δοκιμές (παρουσία και του μαγνήτη

ανάδευσης) και μία δεύτερη σχισμή στην οποία τίθεται το PPP για τη ρύθμιση (calibration) του ύψους της συσσώρευσης. Κάτω από τη σχισμή της κυψελίδας συσσώρευσης υπάρχει σύστημα περιστροφής, που περιδινεί το μαγνήτη συσσώρευσης ώστε τα αιμοπετάλια να κινούνται κυκλικά με ρυθμιζόμενες ταχύτητες από 100 έως 3.000 rpm (rotation stress). Κατά τη λειτουργία της συσκευής στο ορατό (οπτική συσσωρευομετρία), μία δέσμη λευκού φωτός περνά μέσα από την κυψελίδα και όταν υπάρχουν σ' αυτή αιμοπετάλια μη συσσωρευμένα λόγω του φαινομένου Tyndall η οπτική διαπερατότητα είναι αυξημένη. Όσο περισσότερα είναι τα αιμοπετάλια του δείγματος τόσο πιο μειωμένη είναι η οπτική διαπερατότητα. Η καταγραφή της θολερότητας αυτής αντιστοιχεί όπως προαναφέραμε στο σημείο μηδέν του αιμοπεταλιογραφήματος (συσσώρευση 0%) (εικόνα). Όταν τα αιμοπετάλια στο περιστρεφόμενο PRP αρχίζουν κατόπιν προσθήκης ενός διεγέρτη να συσσωρεύονται τότε καθώς ο αριθμός τους μειώνεται στο εναιώρημα η δίοδος του φωτός γίνεται ευχερέστερη. Αν προκύψει πλήρης συσσώρευση όλων των αιμοπεταλίων η δίοδος του φωτός είναι πλήρης και αυτό αντιστοιχεί στο σημείο 100 του αιμοπεταλιογραφήματος (συσσώρευση 100%). Οι αιμοπεταλιακοί θρόμβοι που μετακινούνται μέσα στην κυψελίδα περνώντας στιγμιαία από τη διερχόμενη ακτίνα, κόβουν το φως πράγμα το οποίο καταγράφεται από τον αισθητήρα σαν μία κάθετη γραμμή. Έτσι το αιμοπεταλιογράφημα έχει την εικόνα μιας σιγμοειδούς καμπύλης με πριονωτή γραμμή. Αν κάποιος αναστολέας αποτρέπει σε ένα ποσοστό την αιμοπεταλιακή συσσώρευση η καμπύλη συσσώρευσης πέφτει πιο χαμηλά από την ένδειξη του 100%. Με τον τρόπο αυτό, βάζοντας διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις ενός παράγοντα που αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση είμαστε σε θέση να βρούμε την αντιστοιχία μεταξύ δόσης παράγοντα και αντισυσσωρευτικού αποτελέσματος με πολλή μεγάλη ακρίβεια και

επαναληψιμότητα. Χρησιμοποιώντας το όργανο φθορισμομετρικά μπορεί να διεξαχθεί η παρακολούθηση μερικών κρίσιμων βιοχημικών βημάτων της αιμοπεταλιακής λειτουργίας όπως είναι η παραγωγή υπεροξειδίου και η είσοδος του ιονισμένου ασβεστίου. Ουσιαστικά όλες οι φθορίζουσες ουσίες που μετακινούνται από ή προς το εσωτερικό των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια της συσσώρευσης είναι δυνατόν να καταγραφούν μέσω της φθορισμομετρικής λειτουργίας του συσσωρευομέτρου. Τέλος μέσω ενός άλλου τρόπου λειτουργίας που καταγράφει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων όσο και των υπολοίπων στοιχείων του αίματος είμαστε σε θέση να παρατηρήσουμε τα στιγμιότυπα της πλήρους συσσώρευσης του ολικού αίματος. Σημειωτέον ότι όλα τα είδη κυττάρων (καρκινικά κύτταρα, πολυμορφοπύρρηνα λευκά, λεμφοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα, μυοκαρδιοκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα), που είναι σε θέση να συσσωρευτούν μπορούν να μελετηθούν δυναμικά με τη μέθοδο της συσσωρευομετρίας. Το σύστημα CA – 500 της CHRONOLOG περιέχει εκτός του συσσωρευομέτρου, μία μονάδα στην οποία είναι εγκατεστημένα τα κυκλώματα τα εξειδικευμένα για την συσσωρευομετρία το οποίο τροφοδοτείται με καλώδιο οπτικών ινών από το τερματικό (θάλαμος συσσώρευσης). Το όλο σύστημα ελέγχεται από υπολογιστή με κατάλληλο λογισμικό περιβάλλον

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων συσσώρευσης – και αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων ανθρώπου χρησιμοποιήθηκαν 10 υγιείς εθελοντές ($25 \pm 2,5$ 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 20 ml αίματος την εβδομάδα χρησιμοποιώντας ως αντιπηκτικό, κιτρικά (1 ml διαλύματος κιτρικών / 9 ml αίματος). Το αίμα κατόπιν φυγοκεντρούταν στις 900 rpm επί 10 min, για το διαχωρισμό του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος (PRP), το οποίο συλλεγόταν σε

πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες από νεοπρένιο (ώστε τα αιμοπετάλια να μην ενεργοποιούνται) και φυλασσόταν στους 37°C για τις δοκιμασίες συσσώρευσης. Το εναπομείναν δείγμα αίματος φυγοκεντρούντο στις 3100 rpm επί 15 min για το διαχωρισμό του φτωχού σε αιμοπετάλια πλάσματος (PPP), το οποίο κατόπιν χρησιμοποιούταν για τη ρύθμιση (calibration) του συσσωρευόμετρου. Για την πραγματοποίηση κάθε δοκιμής λαμβάνονταν μία κυλινδρική κυψελίδα συσσώρευσης όγκου 0,5 ml, θέταμε 450 µl PRP, έναν μικρό πλαστικοποιημένο μαγνήτη για την ανάδευση του πλάσματος και την τοποθετούσαμε στη σχισμή του συσσωρευόμετρου. Κατόπιν ρυθμίζονταν την ταχύτητα περιστροφής του μαγνήτη στις 1500 rpm ώστε το PRP να αναδύεται ισχυρά προσομοιάζοντας τις συνθήκες της στροβιλώδους αιματικής ροής στην οποία η αιμοπεταλιακή συσσώρευση συμβαίνει αυθόρμητα. Χρησιμοποιώντας την κυψελίδα με το PRP (θολερό δείγμα) ρυθμίζονταν η γραφίδα στο σημείο μηδέν το οποίο αντιστοιχεί σε μηδενική αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Κατόπιν στη δεύτερη σχισμή του συσσωρευόμετρου εισάγονταν μια κυψελίδα στην οποία είχε τεθεί ίση ποσότητα (450 µl) PPP και ρυθμίζονταν τη θέση της γραφίδας στο σημείο 100, το οποίο αντιστοιχεί σε μέγιστη, μη αντιστρεπτή αιμοπεταλιακή συσσώρευση (συσσώρευση 100%). Μετά από τη ρύθμιση (calibration) της συσκευής και με το PPP γινόταν έναρξη των πειραμάτων συσσώρευσης κατ' αρχάς με τις συσσωρεύσεις ελέγχου. Αυτές γίνονταν ως εξής: Εφόσον παρασκευαζόταν μία κυψελίδα με τη προσθήκη των 450 µl του PRP και την είσοδο του μαγνήτη ανάδευσης, προσθέτονταν στην κυψελίδα μία ποσότητα ενός καταλλήλου διεγέρτη ώστε τα αιμοπετάλια να διεγερθούν και να συσσωρευτούν κατά μη αντιστρεπτό τρόπο. Αυτό ήταν το τυφλό για την αιμοπεταλιακή διέγερση για το συγκεκριμένο διεγέρτη. Για την πραγματοποίηση της διέγερσης των αιμοπεταλίων με καρκινικά κύτταρα χορηγούνταν αντί ενός κλασικού διεγέρτη των τριών οδών (ADP, PAF),

ένας αριθμός καρκινικών κυττάρων από 500.000 έως 1.500.000, ανάλογα με το στόχο του πειράματος. Οι συσσωρεύσεις αυτές χρησίμευαν και ως συσσωρεύσεις ελέγχου για τα πειράματα αναστολής της συσσωρευτικής δράσης των καρκινικών κυττάρων. Προκειμένου να ελεγχθεί αν το σύμπλοκο του Κασσιτέρου είχε αντισυσσωρευτική δράση ετίθεντο στην κυψελίδα 450 μl PRP και κατόπιν τοποθετούντο εκεί μία κατάλληλη ποσότητα διαλύματος συμπλόκου Κασσιτέρου. Αφήνονταν τα αιμοπετάλια να επωαστούν επί 2 – 3 min στην κυψελίδα του συσσωρευόμετρου κατόπιν καλής ανάμειξής τους με το σύμπλοκο. Μετά την επώαση τοποθετούνταν η έτοιμη κυψελίδα στη σχισμή του συσσωρευόμετρου και διεγείρονταν τα αιμοπετάλια με τον εκάστοτε αγωνιστή (ADP, PAF και LMS καρκινικά κύτταρα). Αν το σύμπλοκο του Κασσιτέρου ασκούσε ανασταλτικές δράσεις τότε τα αιμοπετάλια δεν συσσωρεύονταν ή συσσωρεύονταν ελάχιστα. Με διαδοχικές επαναλήψεις της διαδικασίας αυτής προσδιορίζονταν την συγκέντρωση της ουσίας που προκαλούσε 50% αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης ($IC_{50}PLT$) καθώς και την ελάχιστη συγκέντρωσή της που προκαλούσε πλήρη αιμοπεταλιακή αναστολή (MIC). Η έμφαση σ' αυτά τα πειράματα δόθηκε στην αναστολή που προκαλούσε το σύμπλοκο στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση που δημιουργούταν από καρκινικά κύτταρα. Αυτό έγινε επειδή η συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τα καρκινικά κύτταρα αποτελεί ένα πολύ σημαντικό βήμα της μεταστατικής διαδικασίας κατά την αιματογενή διασπορά του καρκίνου [53, 54, 9]. Ο θρόμβος ο οποίος σχηματίζεται με κέντρο ένα συσσωμάτωμα καρκινικών κυττάρων καλυπτόμενο από ένα στρώμα συσσωρευμένων και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων κάποια στιγμή κατά τη διέλευσή του από το δίκτυο των τριχοειδών αγγείων σταματά εκεί σχηματίζοντας ένα έμβολο. Αν σταθεροποιηθεί τα καρκινικά κύτταρα είναι σε θέση να διεγερθούν από τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της θρόμβωσης

και κατόπιν να διηθήσουν το αιμοπεταλιακό στρώμα και να εισβάλουν στον παρακείμενο ιστό διηθώντας επίσης το μονόστοιβο λεπτό τριχοειδικό ενδοθήλιο [63, 64, 65]. Σταθεροποιούμενα στο εσωτερικό του ιστού αρχίζουν πλέον και σχηματίζουν μια μεταστατική αποικία. Φάρμακα που θα ήταν σε θέση να αναστείλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση ή και την παραγωγή αιμοπεταλιοδιεγερτικών προστανοειδών εκ μέρους των καρκινικών κυττάρων μπορούν εν δυνάμει να περιορίσουν ή και να αναστείλουν εξ ολοκλήρου την αιματογενή μεταστατική διασπορά.

3.10 Πειράματα in Vivo

Τοξικότητα

Για την μελέτη της τοξικότητας χρησιμοποιήθηκε το εξής σχήμα χορήγησης του συμπλόκου του Κασσιτέρου.

Σε πεντάδες πειραματόζων ενιόταν μια εφ' άπαξ δόση συμπλόκου ενδοπεριτοναϊκά και τα ζώα παρακολουθούνταν επί μακρόν. Στην επόμενη πεντάδα ζώων ενιόταν μια δεκαπλάσια δόση της προηγούμενης κ.ο.κ. Πραγματοποιούνταν δηλαδή μια λογαριθμική αύξηση της δόσης. Οι δόσεις που μελετήθηκαν ήταν 0.8 mg, 8 mg, 80 mg ουσίας/ml διαλύτη/κίλο βάρους πειραματόζωο. Η χορήγηση ήταν πάντα ενδοπεριτοναϊκή. Αν προέκυπτε θάνατος των πειραματόζων γινόταν νεκροψία-νεκροτομή, μονιμοποίηση των σπλάχνων σε φορμαλδεΰδη 8% και ιστοπαθολογικός τους έλεγχος.

Έλεγχος των αντικαρκινικών δράσεων του συμπλόκου σε καρκινοπαθείς επίμυες Wistar.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτών χρησιμοποιήσαμε ένα μοντέλο δημιουργίας κακοήθων όγκων σε θήλιες επίμυες Wistar.

Το μοντέλο του ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν λειομυοσαρκωματικά κύτταρα επίμυος Wistar (LMS cells-leiomyosarcomatic cells). Τα LMS κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM), Low glucose (1g/l), με την προσθήκη 10% εμβρυϊκού βοδινού ορού (Fetal Bovine Serum), 1% πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης και 0.5% L-γλουταμίνης. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂.

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 40 θήλιες επίμυες Wistar ηλικίας 120 έως 150 ημερών και βάρους από 190-260 g. Τα πειραματόζωα μετά τον ενοφθαλμισμό με κύτταρα LMS χωρίστηκαν σε 3 ομάδες, τις κάτωθι:

A. Ομάδα ελέγχου 10 επίμυες ηλικίας 120-150 ημερών και βάρους 190-260g.

B. Ομάδα πειράματος 1: 15 επίμυες 150 ημερών και 230-260g B.Σ και

Γ. Ομάδα πειράματος 2: 15 επίμυες 120 ημερών και 190-240g B.Σ.

Στις ομάδες 1 και 2 άρχισε η χορήγηση του συμπλόκου CBZT5 αμέσως μετά τον εντοπισμό με ψηλάφηση εμφάνισης του όγκου (περίπου 10±3 ημέρες από τον ενοφθαλμισμό) με δύο σχήματα χορήγησης όπως περιγράφεται παρακάτω:

Στο μοντέλο του ενοφθαλμισμού δοκιμάστηκαν δύο σχήματα χορήγησης του συμπλόκου σε συνολική δόση 8 mg/kg B.Σ: Στο πρώτο σχήμα (ομάδα πειραματισμού 1) χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 0.5 mg / 1ml διαλύτη /πειραματόζωο , ανά 5 ημέρες επί 20 ημέρες(4 δόσεις), τό δεύτερο σχήμα (ομάδα πειραματισμού 2) χορηγήθηκαν 0.7 mg / 1ml διαλύτη / πειραματόζωο , κάθε 10 ημέρες για 30 ημέρες(3 δόσεις). Στην

ομάδα ελέγχου χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά 1 ml τρικαπριλίνη ανά 5ήμερο επί 20 ημέρες.

Τα ζώα όλων των ομάδων τοποθετήθηκαν σε κλωβούς ανά 3 στο χώρο του εκτροφείου πειραματοζώων, με σταθερή θερμοκρασία $19\pm 1^{\circ}\text{C}$ και φωτοπεριόδικότητα 12 ωρών ημέρας και 12 ωρών νύχτας και ετρέφοντο με την κλασσικά τροφή (pellets) και νερό ύδρευσης ad libidum.

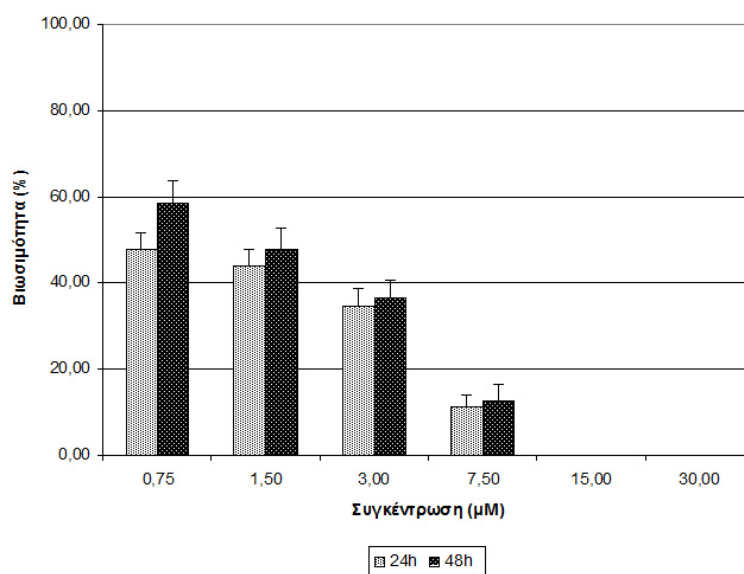
Τα ζώα παρακολουθούνταν καθημερινά εγίνετο συχνός καθαρισμός των κλωβών και καταγράφονταν οι ημέρες επιβίωσης τους (από την ημέρα ενοφθαλμισμού των LMS).

Αμέσως μετά το θάνατο κάθε ζώου, εγίνετο ζύγιση, προσεκτική αφαίρεση, ζύγιση του όγκου και μονιμοποίηση σε 8% φορμόλη, αφαίρεση των σπλάχνων (πνεύμονες, ήπαρ, σπλήνα, νεφροί, καρδιά, στόμαχος) και μονιμοποίηση τους σε 8% φορμόλη. Οι όγκοι και τα σπλάχνα προωθούνταν για ιστολογική εξέταση και έλεγχο μεταστάσεων.

4. Αποτελέσματα

4.1 Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας και κυτταροτοξικότητας (Trypan Blue Exclusive Assay)

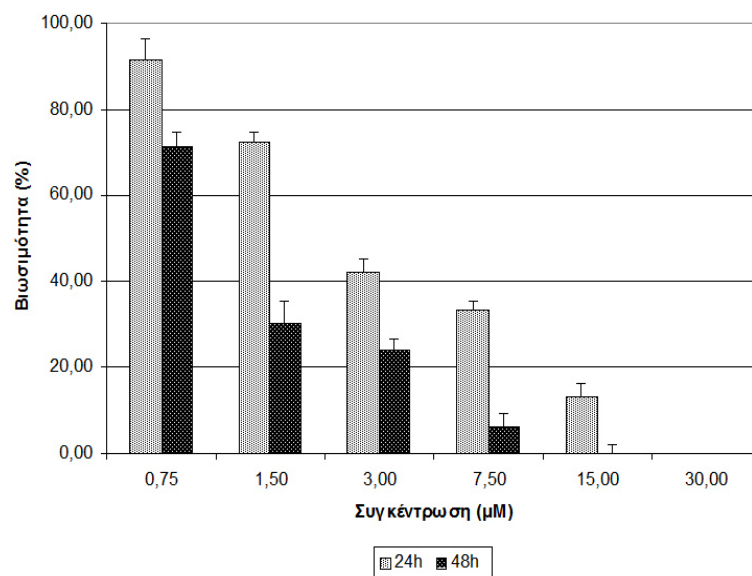
Σύμπλοκο BZO5 (Τριφαινύλ κασσίτερος 2 μερκαπτοβενζοξαζόλιο)



Γράφημα 1. Κυτταρική βιωσιμότητα LMS κυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι \pm τ.α..

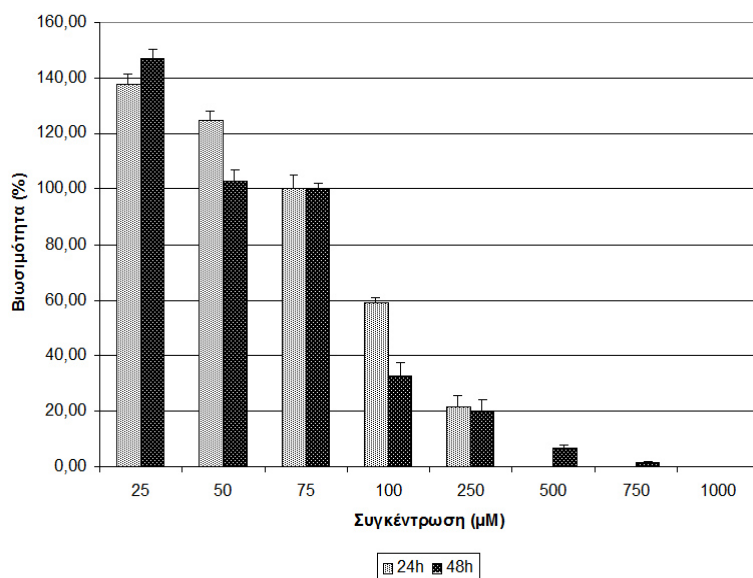
Γράφημα 1. Φαίνεται η δράση της ουσίας BZO5 στην ανάπτυξη των κυττάρων της σειράς LMS. Οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν από 0.75μM μέχρι και 30μM. Η επώαση των κυττάρων μετά την προσθήκη της ουσίας έγινε για 24 και 48 ώρες. Παρατηρούμε ότι το BZO511 εμφανίζει ισχυρή κυτταροτοξική δράση από τη συγκέντρωση των 0.75 μM τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες επώασης, ενώ πάνω από τη συγκέντρωση των 7.5 μM η κυτταροτοξικότητα του είναι 100%.

Σύμπλοκο BZT5 (Τριφαινύλ κασσίτερος 2 μερκαπτοβενζοθειαζόλιο)



Γράφημα 2. Κυτταρική βιωσιμότητα LMS κυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι ± τ.α.

Υποκαταστάτης: 5χλώρο 2 μερκάπτοβενζοθειαζόλιο (CBZT)



Γράφημα 3. Κυτταρική βιωσιμότητα LMS κυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποκαταστάτη του συμπλόκου. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι ± τ.α.

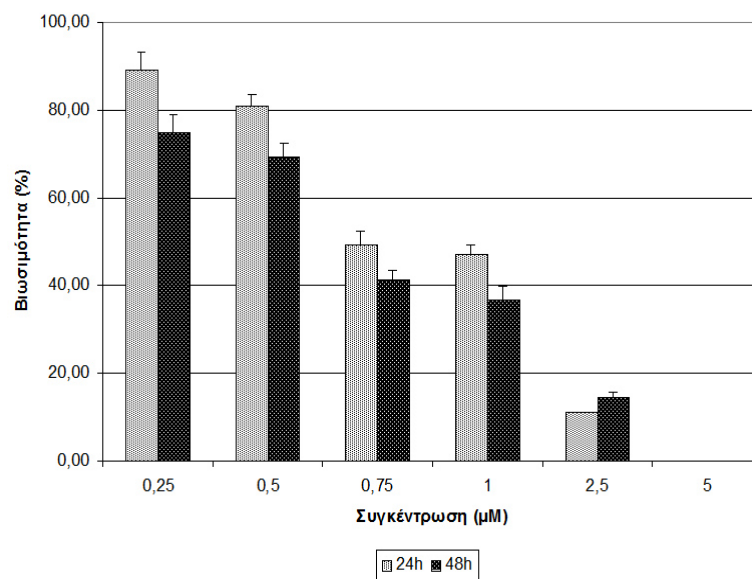
Στο Γράφημα 2 φαίνεται η δράση της ουσίας BZT5 στην ανάπτυξη των κυττάρων της σειράς LMS. Οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν από 0.75 μ M μέχρι και 30 μ M. Η επώαση των κυττάρων μετά την προσθήκη της ουσίας έγινε για 24 και 48 ώρες. Παρατηρούμε ότι το BZT511 εμφανίζει ισχυρή κυτταροτοξική δράση στις 48 ώρες επώασης, από τη συγκέντρωση 1.5 μ M και για τις 24 ώρες από τη συγκέντρωση 3 μ M ενώ πάνω από 15 μ M η κυτταροτοξικότητα του είναι 100%.

Στο γράφημα 3. Φαίνεται η δράση της ουσίας CBZT (υποκαταστάτη) στην ανάπτυξη των κυττάρων της σειράς LMS. Οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν από 25 μ M μέχρι και 1000 μ M. Η επώαση των κυττάρων μετά την προσθήκη της ουσίας έγινε για 24 και 48 ώρες. Παρατηρούμε ότι στη συγκέντρωση 25 μ M ο υποκαταστάτης όχι μόνο δεν ασκεί σημαντική κυτταροτοξική δράση αλλά διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις 24 ώρες επώασης. Σημαντική κυτταροτοξική δράση καταγράφεται από συγκεντρώσεις των 50 μ M και άνω και πλήρη κυτταροτοξική δράση (100%) από συγκεντρώσεις άνω των 750 μ M.

Στο γράφημα 4. Φαίνεται η δράση της ουσίας CBZT2 στην ανάπτυξη των κυττάρων της σειράς LMS. Οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν από 0.25 μ M μέχρι και 5 μ M. Η επώαση των κυττάρων μετά την προσθήκη της ουσίας έγινε για 24 και 48 ώρες. Το σύμπλοκο αυτό εμφανίζει σημαντική κυτταροτοξική δράση από συγκεντρώσεις άνω των 2.5 μ M.

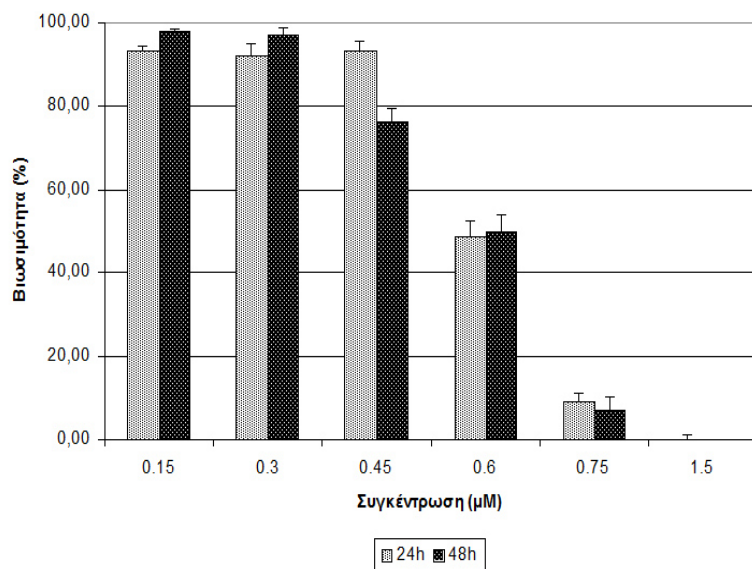
Στο γράφημα 5. Φαίνεται η δράση της ουσίας CBZT3 στην ανάπτυξη των κυττάρων της σειράς LMS. Οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν από 0.15 μ M μέχρι και 1.5 μ M. Η επώαση των κυττάρων μετά την προσθήκη της ουσίας έγινε για 24 και 48 ώρες. Παρατηρούμε ότι το CBZT3 εμφανίζει ισχυρή κυτταροτοξική δράση στις 24 και 48 ώρες επώασης, από τη συγκέντρωση 0.45 μ M ενώ πάνω από 0.75 μ M η κυτταροτοξικότητα του είναι 100%.

Σύμπλοκο CBZT2 Διβούτυλο κασσίτερος δις (5χλώρο 2 μερκάπτοβενζοθειαζόλιο)



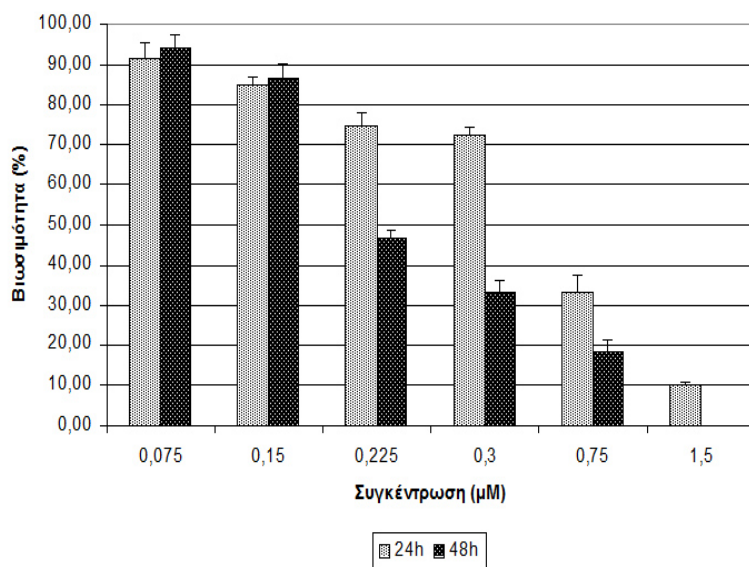
Γράφημα 4. Κυτταρική βιωσιμότητα LMS κυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι ± τ.α.

Σύμπλοκο CBZT3 Διφαινύλο κασσίτερος δις (5χλώρο 2 μερκάπτοβενζοθειαζόλιο)



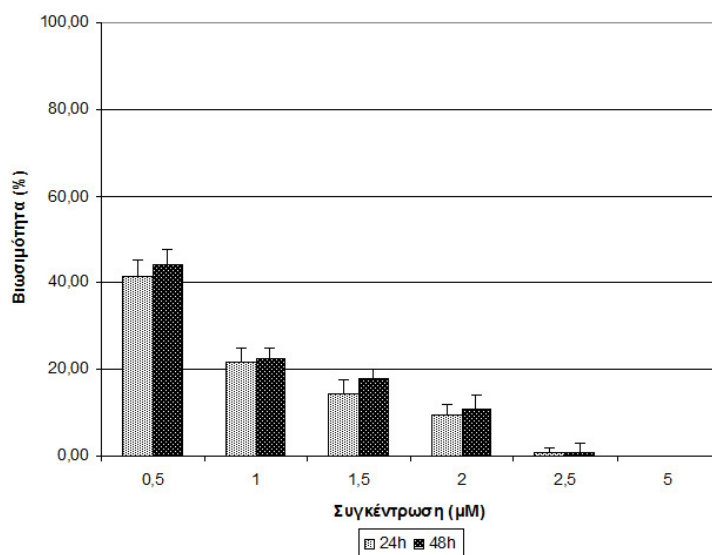
Γράφημα 5. Κυτταρική βιωσιμότητα LMS κυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι ± τ.α.

Σύμπλοκο CBZT4 Τριφαίνυλο κασσίτερος δις (5χλώρο 2 μερκαπτοβενζοθειαζόλιο)



Γράφημα 6. Κυτταρική βιωσιμότητα LMS κυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι ± τ.α.

Σύμπλοκο CBZT5 τριφαίνυλο κασσίτερος (δισ- 5 χλώρο- 2-μερκαπτοβενζοθειαζόλιο)



Γράφημα 7. Κυτταρική βιωσιμότητα LMS κυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι ± τ.α.

Στο γράφημα 6. Φαίνεται η δράση της ουσίας CBZT4 στην ανάπτυξη των κυττάρων της σειράς LMS. Οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν από 0.75μM μέχρι και 15μM. Η επώαση των κυττάρων μετά την προσθήκη της ουσίας έγινε για 24 και 48 ώρες.

Παρατηρούμε ότι το CBZT4 εμφανίζει ισχυρή κυτταροτοξική δράση στις 24 και 48 ώρες επώασης, από τη συγκέντρωση 2.25 μM ενώ πάνω από 7.5 μM η κυτταροτοξικότητα του είναι 100%.

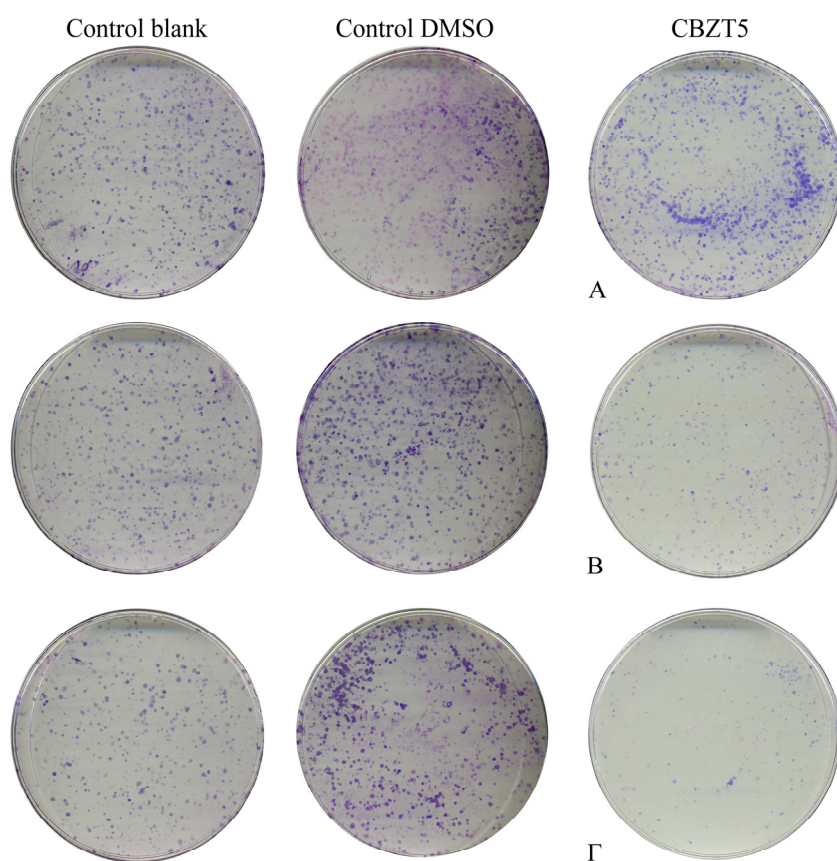
Στο γράφημα 7. Φαίνεται η δράση της ουσίας CBZT5 στην ανάπτυξη των κυττάρων της σειράς LMS. Οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν από 0.5μM μέχρι και 5μM. Η επώαση των κυττάρων μετά την προσθήκη της ουσίας έγινε για 24 και 48 ώρες. Παρατηρούμε ότι το CBZT511 εμφανίζει ισχυρή κυτταροτοξική δράση στις 24 και 48 ώρες επώασης, από τη συγκέντρωση 0.5 μM ενώ πάνω από 2.5 μM η κυτταροτοξικότητα του είναι 100%.

Δράση των συμπλόκων στη σειρά καρκινικών κυττάρων LMS σε 24 και 48 ώρες. Στην συγκριτική αλληλουχία που ακολουθεί συμπεριλαμβάνεται και σύμπλοκο του Au με τον ίδιο υποκαταστάτη οπού έγινε από εμάς για να διαπιστωθεί και η δράση του μετάλλου(6). Η σειρά που προκύπτει με βάση την δραστηριότητα (μέσος όρος IC₅₀) είναι:

CBZT4 (0.3–0.5 μM) > CBZT5 (0.5–0.8 μM) ≥ CBZT3 (0.6–0.8 μM) > BZT5 (1.5–3.0 μM) > BZO5 (1.3–3 μM) > CBZT2 (5–7.5 μM) > CBZT (100.0–250.0 μM).

4.2 Ικανότητα ανάπτυξης αποικιών

Η ικανότητα ανάπτυξης αποικιών των κυττάρων LMS που επιβίωσαν μετά την προσθήκη των τριών ουσιών CBZT3, CBZT4 και CBZT5 στις ίδιες συγκεντρώσεις με το προηγούμενο πείραμα, φαίνεται στα παρακάτω σχήματα.

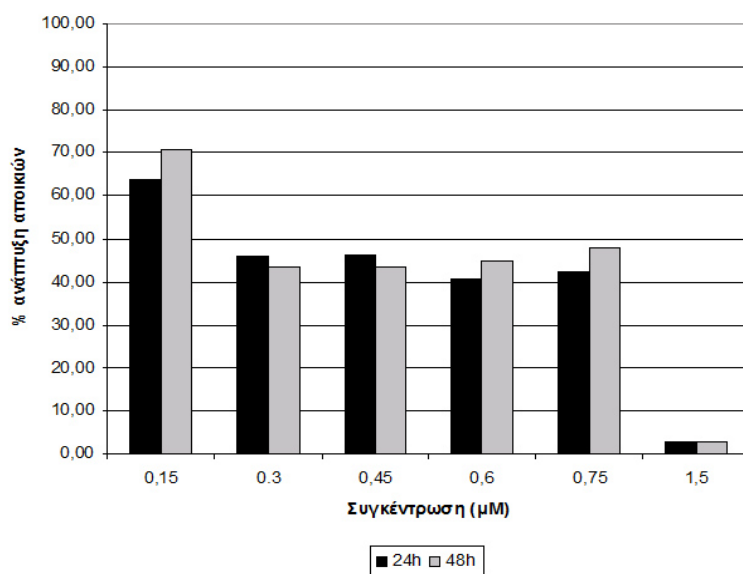


Εικόνα 1. Φαίνεται η ανάπτυξη αποικιών των κυττάρων LMS που επιβίωσαν μετά την έκθεσή τους στο DMSO και οι αποικίες που αναπτύχθηκαν χωρίς προσθήκη ουσιών. Στο σύμπλοκο, CBZT5 φαίνεται ότι μετά την προσθήκη του συμπλόκου σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεν παρουσιάζεται καμία ανάπτυξη. Α) 0.5μM, Β)1μM, Γ) 1.5μM.

Όπως λοιπόν προκύπτει από τα αποτελέσματα (γραφήματα 8, 9 και 10) τα κύτταρα τα όποια επιβίωναν μετά την προσθήκη των ουσιών έχαναν την δυνατότητα αναδιπλασιασμού και σχηματισμού αποικιών σε σύγκριση με το control, τα κύτταρα του οποίου τους είχε χορηγηθεί ουσία.

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι και τα κύτταρα που κατάφεραν να επιβιώσουν έχασαν τη δυνατότητα του συνεχούς και ανεξέλεγκτου διπλασιασμού που είναι και το χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Δεν συνέβη αυτό όμως στα κύτταρα που επώαστηκαν με ανάλογες ποσότητες DMSO όπου συνέχισαν να διπλασιάζονται κανονικά (Εικόνα 1).

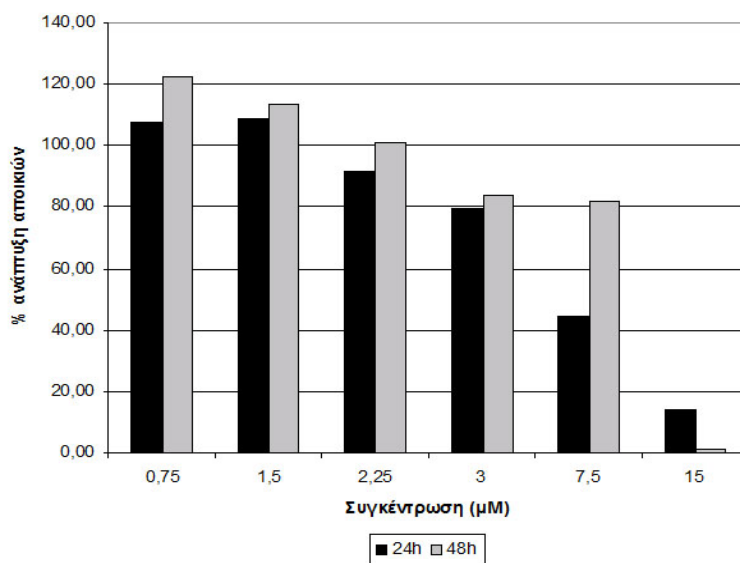
Αποικίες: CBZT3-LMS



Γράφημα 8. Ανάπτυξη αποικιών των κυττάρων LMS σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου CBZT3 σε σχέση με το control.

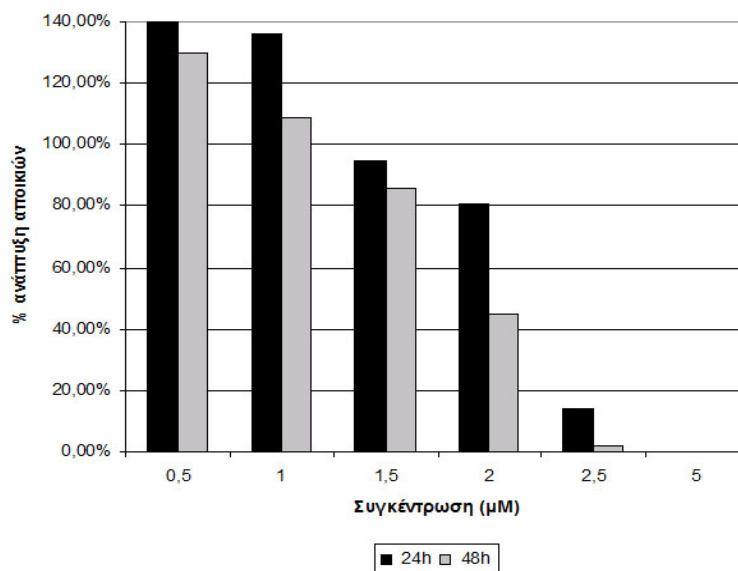
Στο γράφημα 8. Φαίνεται η ανάπτυξη αποικιών των κυττάρων LMS που επιβίωσαν μετά την έκθεσή τους στο σύμπλοκο , CBZT3 σε συγκεντρώσεις από 0.15μM μέχρι και 1.5μM, μετά την επώαση των κυττάρων για 24 και 48 ώρες. Παρατηρούμε ότι μέχρι την συγκέντρωση των 15 μM τα κύτταρα που επιβίωσαν διατηρούν την ικανότητα τους να αναπτύσσουν αποικίες αν και μειωμένη, ανάλογα με τη συγκέντρωση του συμπλόκου.

Αποικίες: CBZT4-LMS



Γράφημα 9. Ανάπτυξη αποικιών των κυττάρων LMS σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου CBZT4 σε σχέση με το control.

Αποικίες: CBZT5-LMS



Γράφημα 10. Ανάπτυξη αποικιών των κυττάρων LMS σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου CBZT5 σε σχέση με το control.

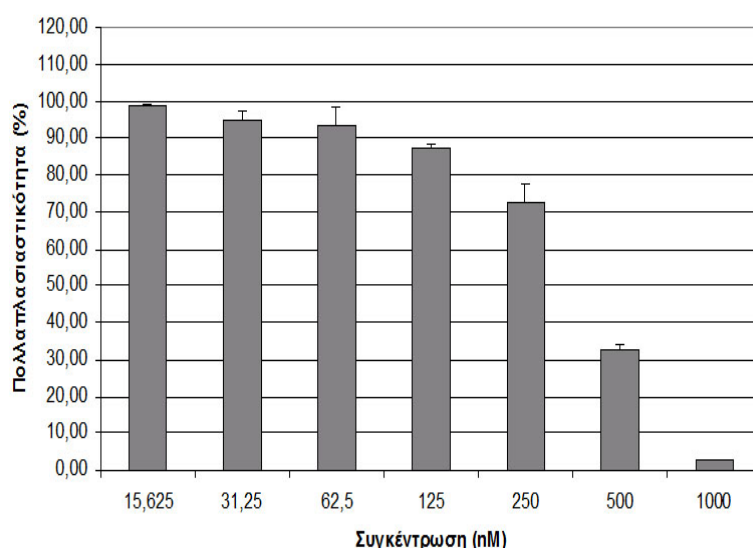
Στο γράφημα 9. Φαίνεται η δράση της ουσίας CBZT4 στην ανάπτυξη των αποικιών μετά την επώαση των κυττάρων για 24 και 48 ώρες. Οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν από 0.75μM μέχρι και 15μM. Παρατηρούμε ότι μέχρι την συγκέντρωση των 3 μM τα κύτταρα που επιβίωσαν διατηρούν σημαντικά την ικανότητα τους να αναπτύσσουν αποικίες, η οποία μειώνεται από τη συγκέντρωση των 7,5 μM και άνω.

Στο γράφημα 10. Φαίνεται η δράση της ουσίας CBZT5 στην ανάπτυξη των αποικιών μετά την επώαση των κυττάρων για 24 και 48 ώρες. Οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν από 0.5μM μέχρι και 5μM. Παρατηρούμε ότι μέχρι την συγκέντρωση των 2 μM τα κύτταρα που επιβίωσαν διατηρούν σημαντικά την ικανότητα τους να αναπτύσσουν αποικίες, η οποία μειώνεται από τη συγκέντρωση των 2.5 μM και άνω.

4.3 Έλεγχος κυτταρικής πολλαπλασιαστικότητας (MTT)

Δεδομένου ότι η MTT είναι μέθοδος που γενικώς θεωρείται πιο ακριβής και πιο αξιόπιστη για τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από την χρώση με Trypan Blue επιλέχθηκε για να τεκμηριωθούν καλύτερα οι αντιπολλαπλασιαστικές επιδράσεις των υπό μελέτη συμπλόκων. Επίσης για να προσδιοριστεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η IC₅₀ των συμπλόκων. Τα αποτελέσματα της μελέτης με MTT φαίνονται στα διαγράμματα και τους πίνακες που ακολουθούν:

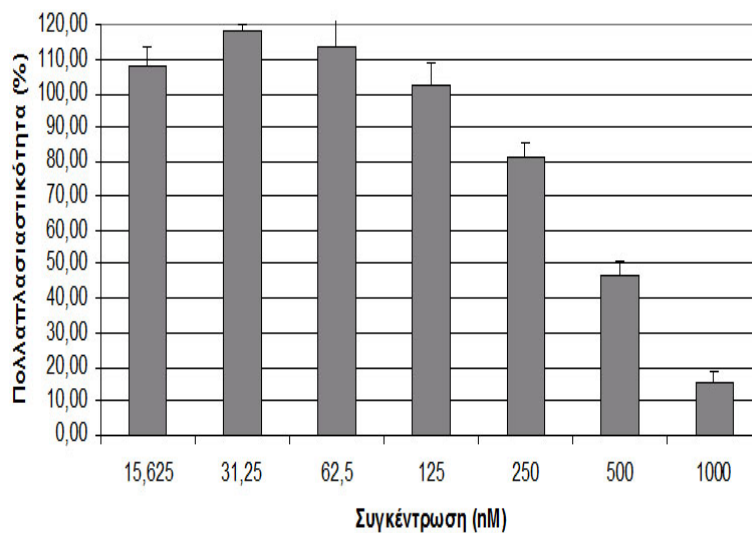
CBZT3 – Κύτταρα LMS



Γράφημα 11. Πολλαπλασιαστικότητα κυττάρων LMS σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου CBZT3.

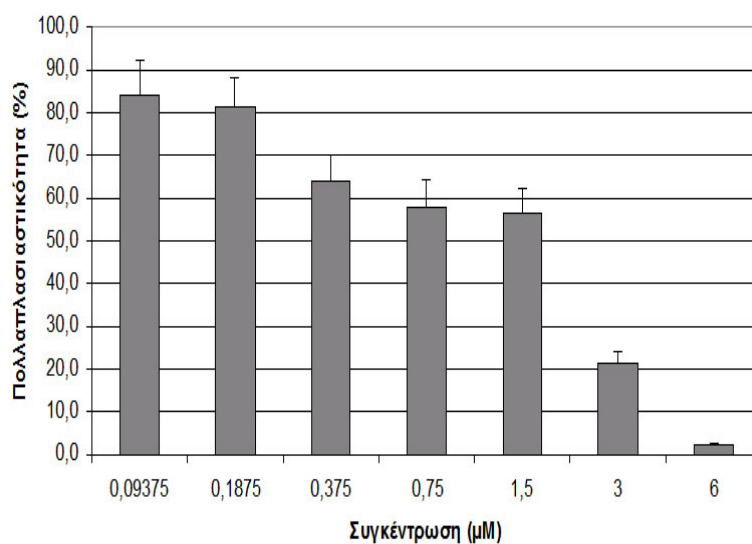
Στο γράφημα 11. Φαίνεται τη δράση του συμπλόκου CBZT 3 στα καρκινικά κύτταρα LMS. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του συμπλόκου τόσο μειώνεται η βιωσιμότητα των κυττάρων. Η IC₅₀ του συμπλόκου στα LMS είναι 267nM.

CBZT3 – Κύτταρα MCF7



Γράφημα 12. Πολλαπλασιαστικότητα κυττάρων MCF7 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου CBZT3.

CBZT4 – Κύτταρα LMS



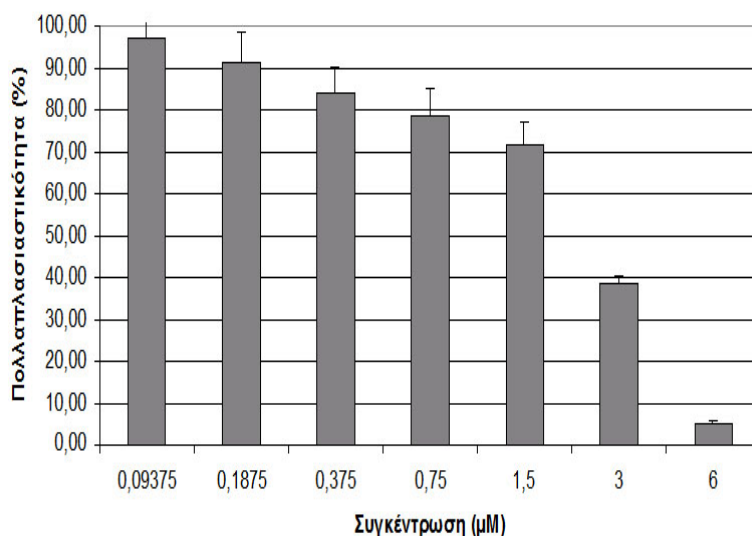
Γράφημα 13. Πολλαπλασιαστικότητα κυττάρων LMS σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου CBZT4.

Στο γράφημα 12. Φαίνεται τη δράση του συμπλόκου CBZT 3 στα καρκινικά κύτταρα MCF7. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του συμπλόκου τόσο μειώνετε η βιωσιμότητα των κυττάρων. Η IC50 του συμπλόκου στα MCF7 είναι 457nM.

Στο γράφημα 13. Φαίνεται τη δράση του συμπλόκου CBZT4 στα καρκινικά κύτταρα LMS. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του συμπλόκου τόσο μειώνετε η βιωσιμότητα των κυττάρων. Η IC50 του συμπλόκου στα LMS είναι 1,70μM.

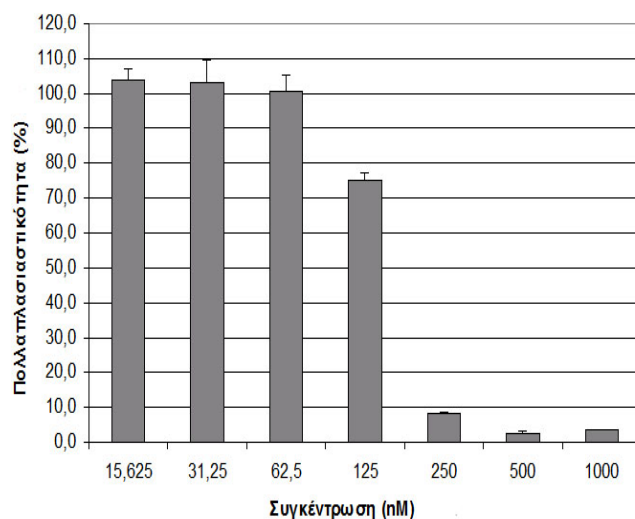
Στο γράφημα 14. Φαίνεται η δράση του συμπλόκου CBZT 4 στα καρκινικά κύτταρα MCF7. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του συμπλόκου τόσο μειώνετε η βιωσιμότητα των κυττάρων. Η IC50 του συμπλόκου στα MCF7 είναι 2.40μM.

CBZT4 – Κύτταρα MCF7



Γράφημα 14. Πολλαπλασιαστικότητα κυττάρων MCF7 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου CBZT4.

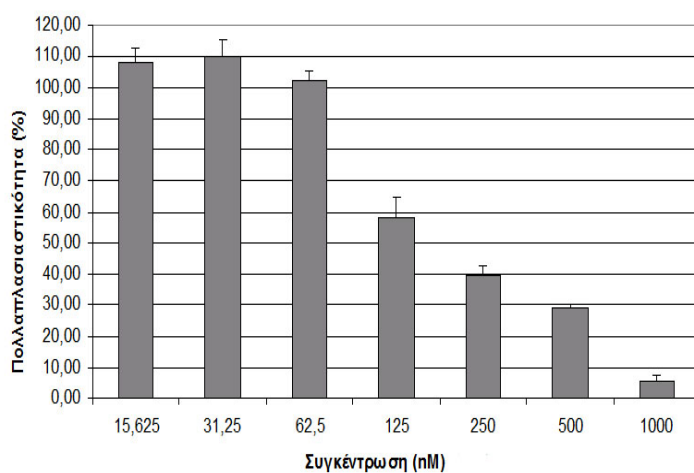
CBZT5 – Κύτταρα LMS



Γράφημα 15. Πολλαπλασιαστικότητα κυττάρων LMS σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου CBZT5.

Στο γράφημα 15. Φαίνεται η δράση του συμπλόκου CBZT 5 στα καρκινικά κύτταρα LMS. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του συμπλόκου τόσο μειώνεται η βιωσιμότητα των κυττάρων. Η IC50 του συμπλόκου στα LMS είναι 0.140nM.

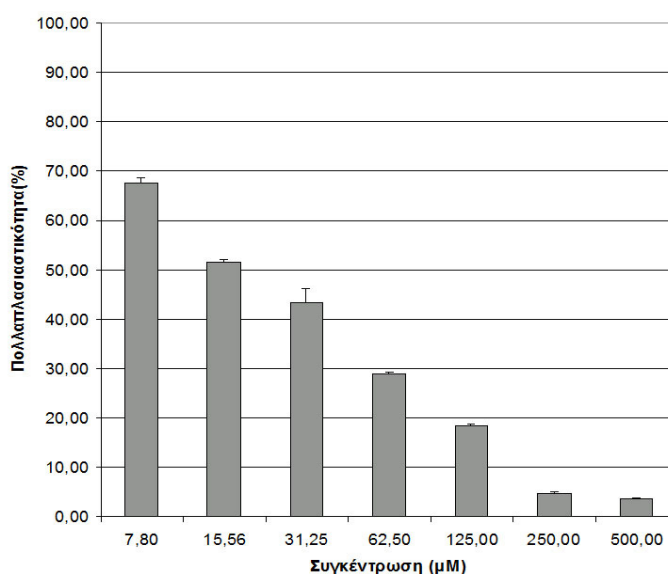
CBZT5 – Κύτταρα MCF7



Γράφημα 16. Πολλαπλασιαστικότητα κυττάρων MCF7 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου CBZT5.

Στο γράφημα 16. Φαίνεται η δράση του συμπλόκου CBZT 4 στα καρκινικά κύτταρα MCF7. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του συμπλόκου τόσο μειώνετε η βιωσιμότητα των κυττάρων. Η IC50 του συμπλόκου στα MCF7 είναι 0.234nM

Cis-platin-Κύτταρα LMS

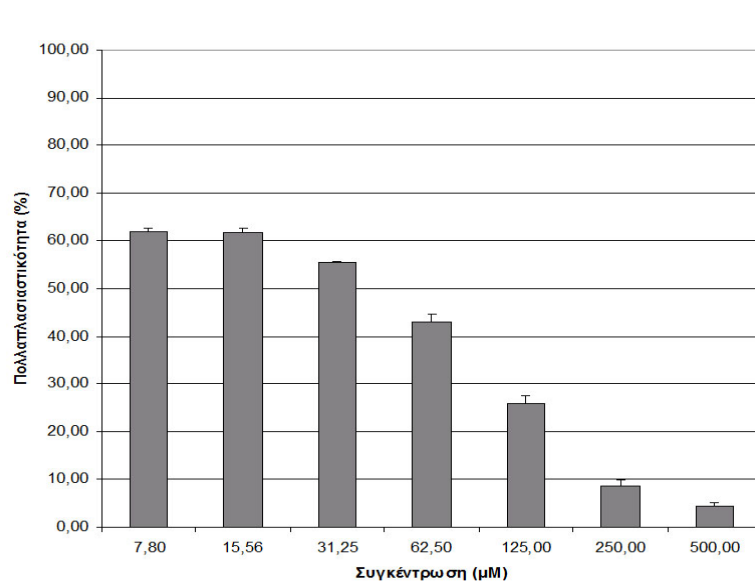


Γράφημα 17. Πολλαπλασιαστικότητα κυττάρων LMS σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του cis-platin.

Στο γράφημα 17. Φαίνεται δράση του cis-platin στα καρκινικά κύτταρα LMS. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του συμπλόκου τόσο μειώνετε η βιωσιμότητα των κυττάρων. Η IC50 του συμπλόκου στα LMS είναι 32.78μM.

Στο γράφημα 18. Φαίνεται η δράση του cis-platin στα καρκινικά κύτταρα MCF7. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του συμπλόκου τόσο μειώνετε η βιωσιμότητα των κυττάρων. Η IC50 του συμπλόκου στα MCF7 είναι 36.40μM.

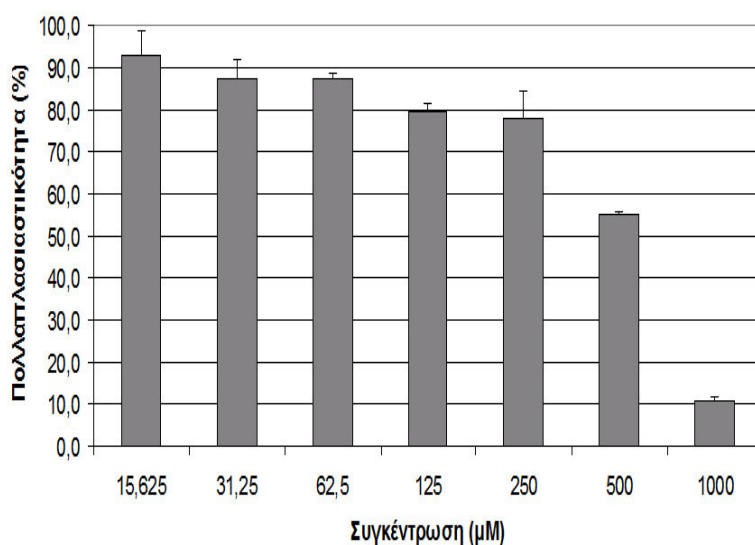
Cis-platin-κύτταρα MCF 7



Γράφημα 18. Πολλαπλασιαστικότητα κυττάρων MCF7 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του cis-platin.

Έλεγχος κυτταροτοξικότητας υγιών ινοβλαστών

CBZT5- Κύτταρα MRC5



Γράφημα 19. Πολλαπλασιαστικότητα κυττάρων MRC5 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του cis-platin.

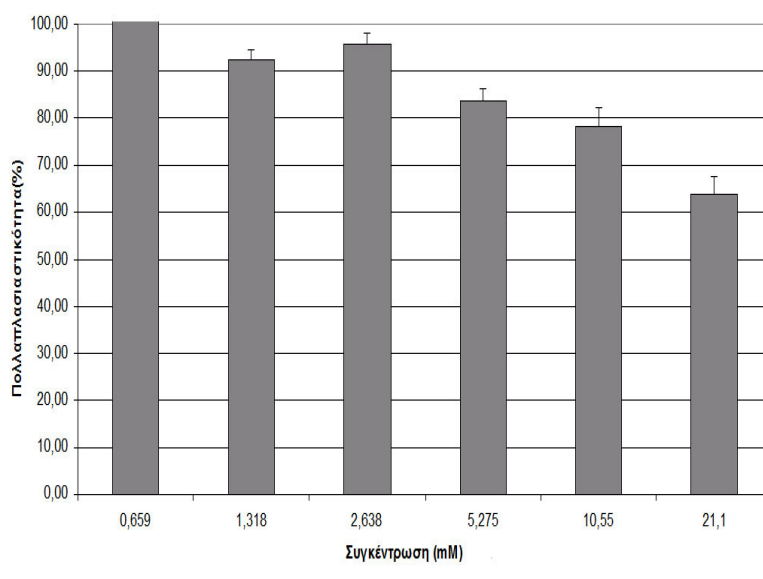
Σε αυτό το σημείο της μελέτης διερευνήθηκε η δράση του πιο ισχυρού κυτταροτοξικά συμπλόκου ως προς τα κύτταρα των υγιών ινοβλαστών MRC5, με σκοπό την εξακρίβωση της δράσης του μέχρι τώρα καλύτερου συμπλόκου, CBZT5 στα υγιή κύτταρα.

Στο γράφημα 19. Φαίνεται η δράση του CBZT5 στα κύτταρα υγιών ινοβλαστών MRC5. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του συμπλόκου τόσο μειώνεται η βιωσιμότητα των κυττάρων. Η IC50 του συμπλόκου στα κύτταρα MRC5 είναι 600μM.

Έλεγχος διαλυτών

Θεωρήθηκε σωστό να διερευνηθεί η δράση του διαλύτη DMSO για να επιβεβαιώσουμε ότι η δράση των συμπλόκων που μελετήσαμε δεν οφείλεται στον διαλύτη που είναι διαλυμένα όλα τα υπό μελέτη σύμπλοκα.

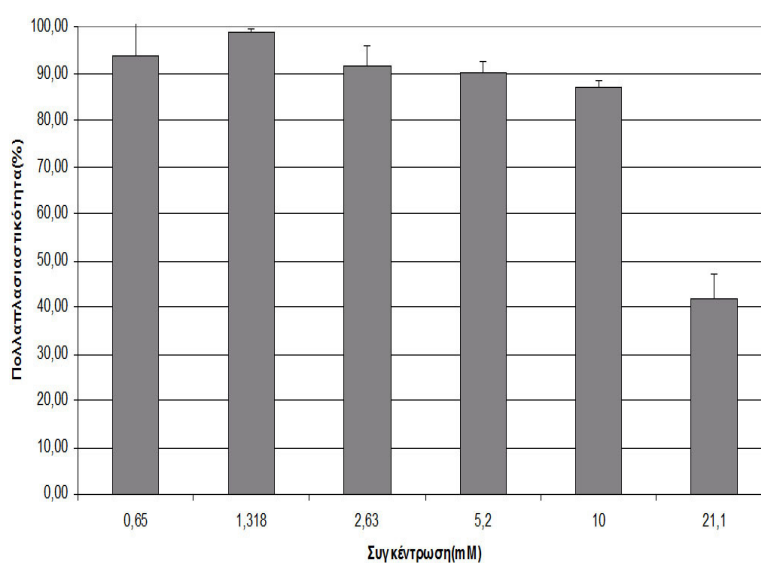
DMSO- κύτταρα LMS



Γράφημα 20. Πολλαπλασιαστικότητα κυττάρων LMS σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του διαλύτη DMSO.

Από το γράφημα 20, φαίνεται ότι ο διαλύτης DMSO που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα μας, στις ίδιες συγκεντρώσεις, δεν έχει σχεδόν καμία δράση επί των κυττάρων LMS που μελετήθηκαν.

DMSO-κύτταρα MCF7



Γράφημα 21. Πολλαπλασιαστικότητα κυττάρων MCF7 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του διαλύτη DMSO.

Από το γράφημα 21, φαίνεται ότι ο διαλύτης DMSO που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα μας, στις ίδιες συγκεντρώσεις, δεν έχει σχεδόν καμία δράση επί των κυττάρων MCF7 που μελετήθηκαν.

Πίνακας 2. Κυτταροτοξική δράση των συγκεντρώσεων των συμπλόκων του κασσιτέρου και της Cis-Platin που προκαλούν 50% αναστολή του πολλαπλασιασμού των LMS και MCF7 κυττάρων, καθώς και στη σειρά των υγείων ινοβλαστών MRC5.

	IC50-LMS	IC50-MCF7	Κυτταροτοξικότητα % στα MRC5
CBZT3	0.267μM	0.457μM	0
CBZT4	1.7μM*	2.4μM*	0
CBZT5	0.143μM	0.234μM	0
Cis-Platin	32.78μM	36.40μM	30% και 36%

**Στην διάρκεια της παραπάνω μελέτης των συμπλόκων, διαπιστώθηκε ο κατακριμνησμός του συμπλόκου CBZT4. Λόγω του σχηματισμού του ιζήματος καθώς επίσης και της δυσκολίας στην σύνθεσης και στον καθαρισμό (μικρή απόδοση) του συμπλόκου αυτού και κατόπιν συνεννόηση με το εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας, αποφασίστηκε η διακοπή της περαιτέρω μελέτης το εν λόγω συμπλόκου.*

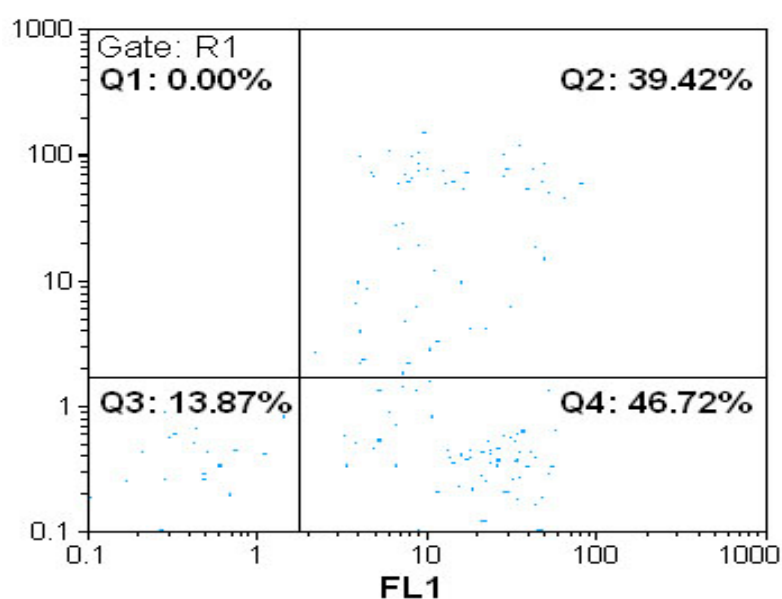
Από τον πίνακα 2. διαπιστώνεται ότι όλα τα σύμπλοκα του κασσιτέρου είναι πολύ ισχυρότερα από τη Cis-Platin, σε συγκεντρώσεις IC50 δεν έχουν κυτταροτοξικότητα στα MRC5 σε αντίθεση με την Cis-Platin η οποία σε συγκεντρώσεις IC50 εμφανίζει σημαντική κυτταροτοξική δράση στους υγείς ινοβλάστες.

Από τα αποτελέσματα του MTT φαίνεται ότι με βάση το ακριβές IC50 των ουσιών που χρησιμοποιήσαμε. (ο κατά 50%, κυτταρικός θάνατος- πίνακας 3) πιο δραστικά σύμπλοκα είναι τα: CBZT3, CBZT5 με IC50 0.267μM αντίστοιχα στα LMS και 0.457μM στα MCF7 και 0.123μM στα LMS και 0.254μM στα MCF7. Επίσης συγκρίνοντας την δράση της cis-platin στις ίδιες κυτταρικές σειρές που δοκιμάστηκαν

τα υπό μελέτη σύμπλοκα, αυτό που προέκυψε είναι ότι η IC₅₀ της cis-platin είναι πολύ μεγαλύτερη. Συγκεκριμένα η IC₅₀ της cis-platin είναι 32.8μM για τα LMS και 37.5μM για τα MCF7. Όσον αφορά στην κυτταροτοξικότητα στη σειρά MRC5 (υγείων ινοβλαστών), παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει θνησιμότητα στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν οι οποίες ήταν ανάλογες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στα κακοήθη κύτταρα (LMS & MCF7) σε αντίθεση με τη cis-platin η οποία εμφανίζει σημαντική κυτταροτοξικότητα. Και από αυτή τη μελέτη προκύπτει η πολύ χαμηλή τοξικότητα των συμπλόκων του κασσιτέρου έναντι των υγείων ινοβλαστών (MRC5).

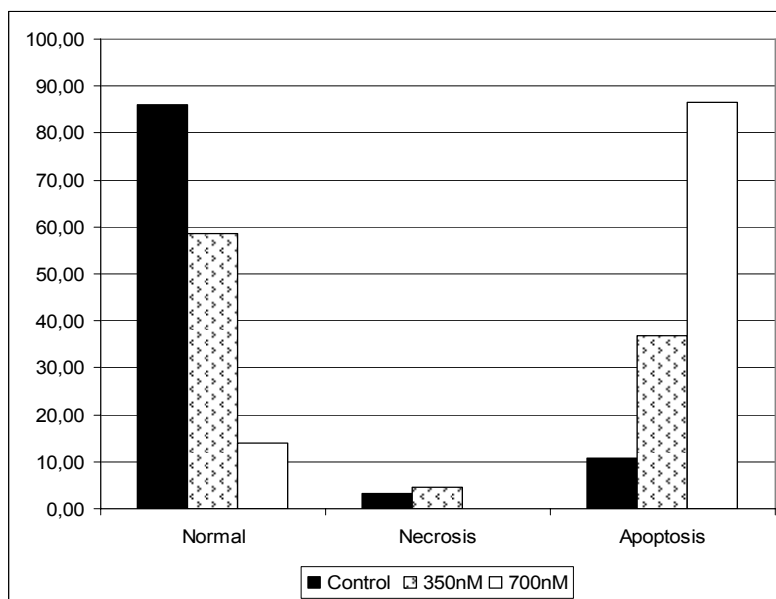
4.4 Κυτταρομετρία ροής

Από τα αποτελέσματα που αναβρέθηκαν στην κυτταρομετρία ροής μπορεί να λεχθεί ότι το σύμπλοκο το CBZT 3 και το CBZT5 οδηγεί τα κύτταρα σε θάνατο αποπτωτικό. Όπως φαίνεται από την εικόνα του κυτταρόμετρου (εικόνα2) μετά την πειραματική διαδικασία η τελική μέτρηση δείχνει κυτταρικό θάνατο με απόπτωση, σε αντίθεση με την ένδειξη νέκρωσης, όπου είναι σχεδόν ανύπαρκτη. Εφόσον λοιπόν το φαινόμενο είναι επαναλήψιμο, είναι αντιληπτό ότι ο θάνατος είναι κυρίως αποπτωτικός.

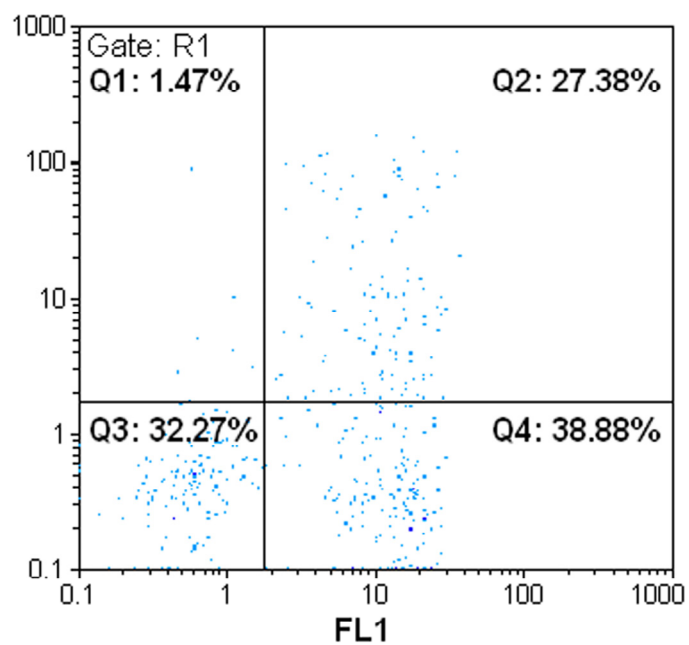


Εικόνα 2. Από το κυτταρομέτρου φαίνεται ότι μετά τη χορήγηση 0.700 μM του συμπλόκου CBZT3 τα κύτταρα οδηγούνται σε θάνατο αποπτωτικό, ενώ δεν υπάρχει ένδειξη του νεκρωτικού θανάτου των κυττάρων.

CBZT3

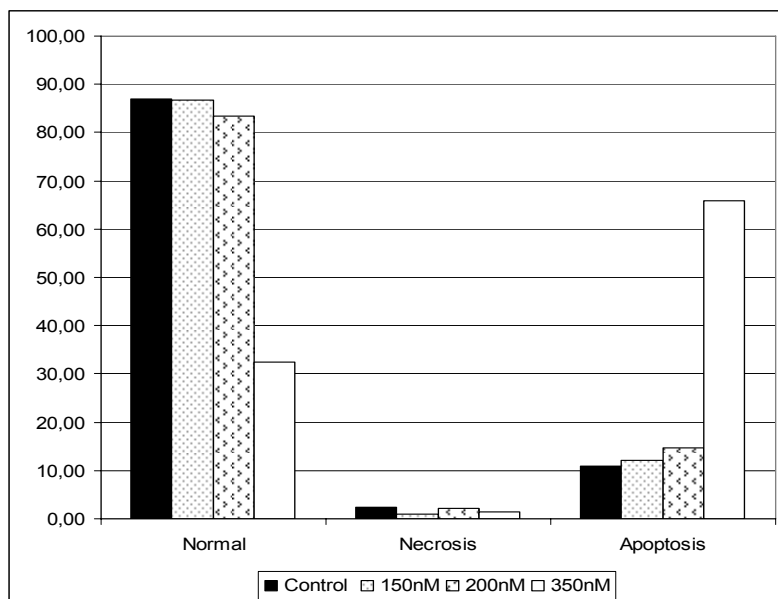


Γράφημα 22. Απεικονίζεται ο τύπος του κυτταρικού θανάτου που προκαλεί το συμπλόκο σε συγκεντρώσεις ίση, λίγο μεγαλύτερη και διπλάσια της IC50.



Εικόνα 3. Από το κυτταρομέτρο φαίνεται ότι μετά τη χορήγηση 0.350 μ M του συμπλόκου CBZT5 τα κύτταρα οδηγούνται σε θάνατο αποπτωτικό, ενώ υπάρχει και μία μικρή ένδειξη του νεκρωτικού θανάτου των κυττάρων.

CBZT5



Γράφημα 23. Απεικονίζεται ο τύπος του κυτταρικού θανάτου που προκαλεί το συμπλόκο CBZT5 σε συγκεντρώσεις ίση, λίγο μεγαλύτερη και διπλάσια της IC50.

Πίνακας 3. Απεικόνιση % της δράσης των ουσιών στα κύτταρα LMS μετά τη χορήγηση των συμπλόκων CBZT3 και CBZT5. Οι συγκεντρώσεις των συμπλόκων είναι οι διπλάσιες των IC50 που προέκυπτε για το κάθε σύμπλοκο αναλογικά.

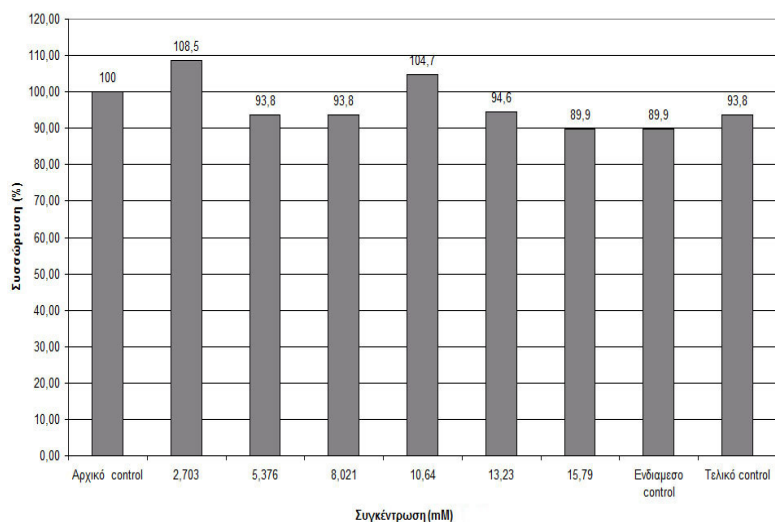
Σύμπλοκο	Νέκρωση	Ζώντα	Απόπτωση
CBZT3	0.00%	13.87%	86.14%
CBZT5	1.47%	32.27%	66.26%

4.5 Έλεγχος αιμοπεταλιακής συσσώρευσης

Τα αποτελέσματα της δράσης των συμπλόκων που μελετήθηκαν στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων του ανθρώπου με αγωνιστές το ADP, PAF & λειομυοσαρκωματικά κύτταρα (LMS) φαίνεται στα ακόλουθα διαγράμματα:

Πρώτα διενεργήθηκε ο έλεγχος του διαλύτη. Κατά πόσο το DMSO επηρεάζει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

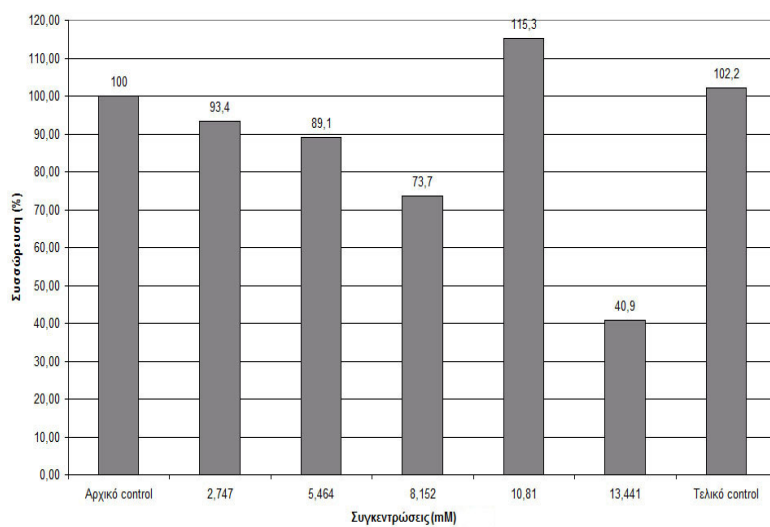
Control - ADP



Γράφημα 24. Αναστολή Συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή συσσώρευσης το ADP σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του διαλύτη DMSO.

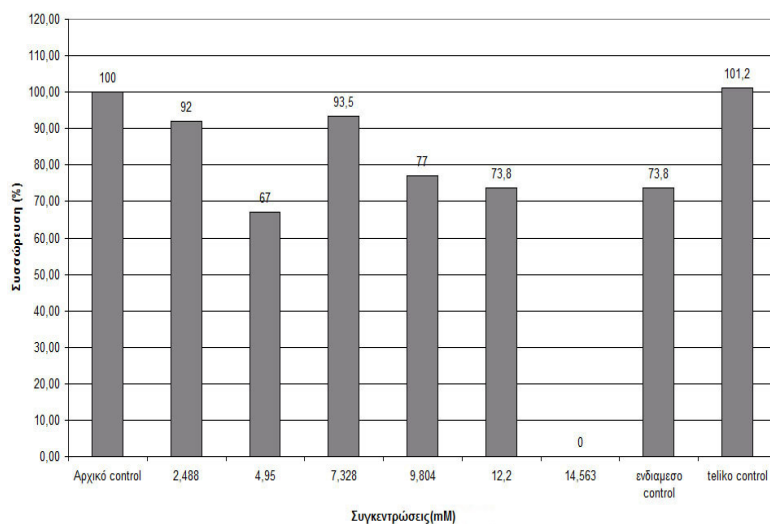
Από το παραπάνω γράφημα φαίνεται ότι το DMSO δεν αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από το ADP.

Control – PAF



Γράφημα 25. Αναστολή Συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή συσσώρευσης το PAF σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του διαλύτη DMSO.

Control - LMS

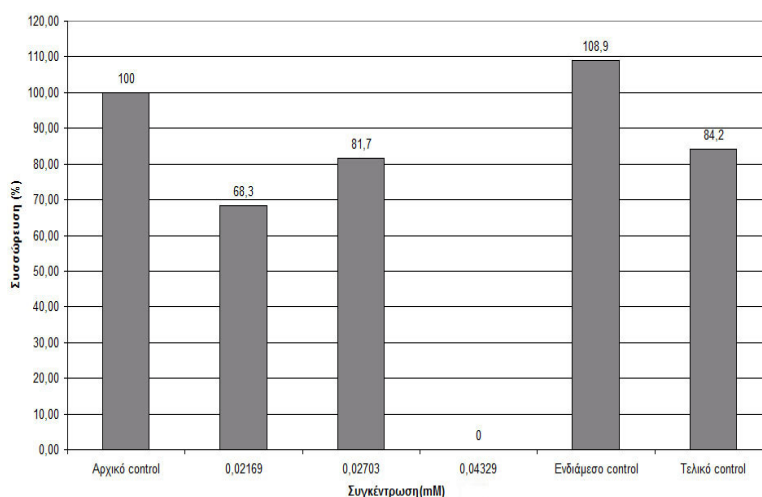


Γράφημα 26. Αναστολή Συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή συσσώρευσης τα LMS σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του διαλύτη DMSO.

Από το γράφημα 25 φαίνεται ότι το DMSO δεν αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από τον PAF. Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 11mM υπάρχει μείωση της συσσώρευσης κατά 50% περίπου.

Από το γράφημα 26 φαίνεται ότι το DMSO αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από τα LMS σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 12.2mM. ενώ σε συγκεντρώσεις πάνω από 14.56 μ M η αναστολή είναι πλήρης (100%).

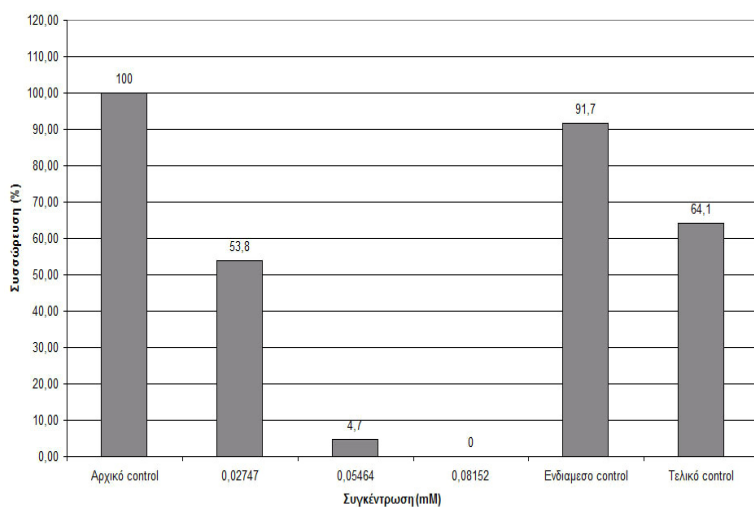
CBZT3 – ADP



Γράφημα 27. Αναστολή Συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή συσσώρευσης το ADP σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του συμπλόκου CBZT3.

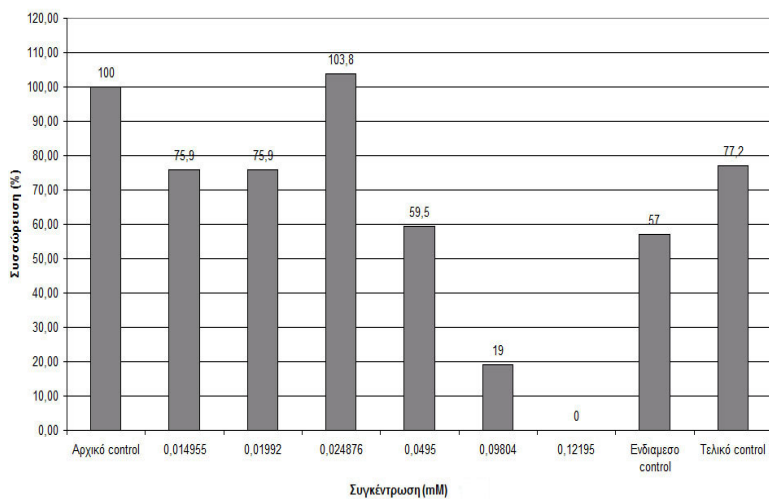
Από το γράφημα 27 φαίνεται ότι η CBZT3 αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από το ADP κατά 50% σε συγκέντρωση 0.0325mM ενώ σε συγκεντρώσεις πάνω από 0.043 mM η αναστολή είναι πλήρης (100%)

CBZT3 – PAF



Γράφημα 28. Αναστολή Συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή συσσώρευσης τον PAF σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του συμπλόκου CBZT3.

CBZT3 – LMS

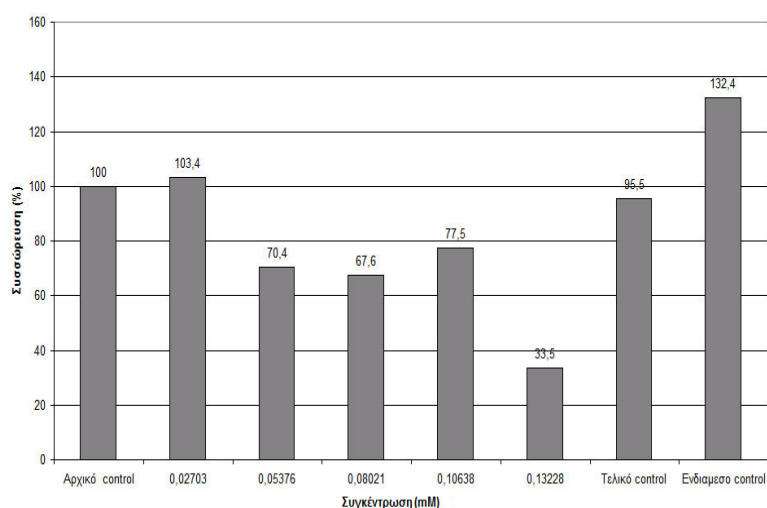


Γράφημα 29. Αναστολή Συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή συσσώρευσης τα LMS σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του συμπλόκου CBZT3.

Από το γράφημα 28 φαίνεται ότι η CBZT5 αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από το ADP κατά 50% σε συγκέντρωση 0.0305mM ενώ σε συγκεντρώσεις πάνω από 0.0816mM η αναστολή είναι πλήρης (100%).

Από το γράφημα 29 φαίνεται ότι η CBZT3 αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από τα καρκινικά κύτταρα LMS κατά 50% σε συγκέντρωση 0.00537mM ενώ σε συγκεντρώσεις πάνω από 0.12mM η αναστολή είναι πλήρης (100%).

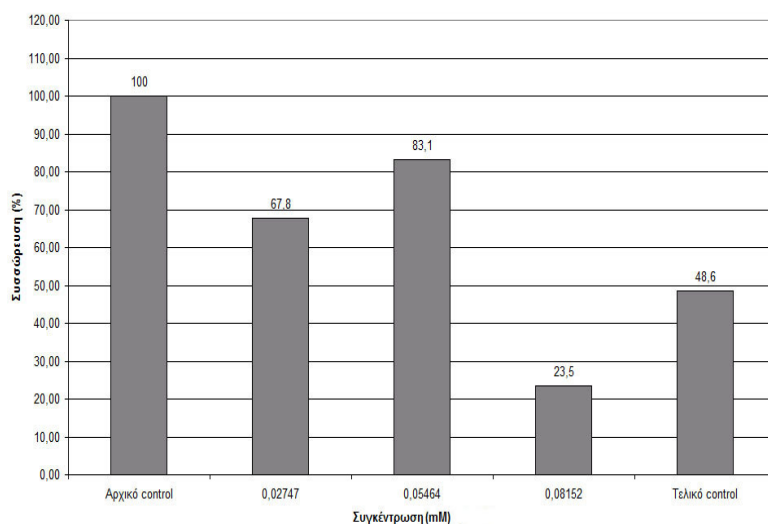
CBZT5– ADP



Γράφημα 30. Αναστολή Συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή συσσώρευσης το ADP σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του συμπλόκου CBZT5.

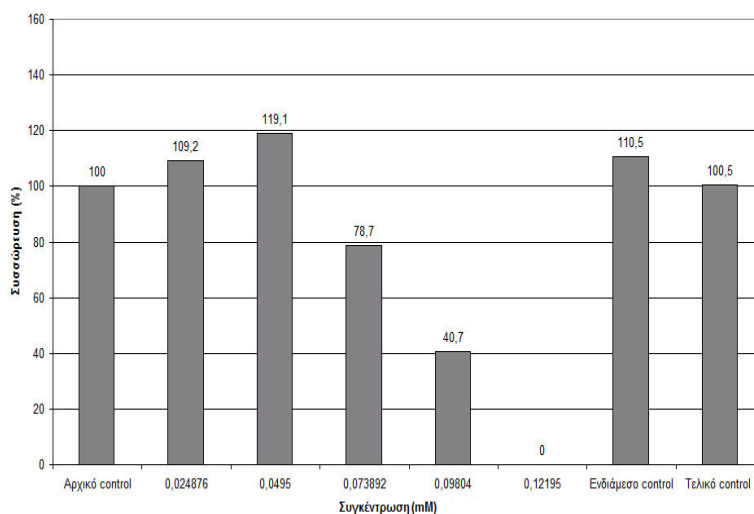
Από το γράφημα 30 φαίνεται ότι η CBZT5 αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από τον ADP κατά 50% σε συγκέντρωση 0.108mM ενώ στις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν δεν φαίνεται να έχει πλήρη αναστολή (100%)..

CBZT5 – PAF



Γράφημα 31. Αναστολή Συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή συσσώρευσης το PAF σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του συμπλόκου CBZT5.

CBZT5 – LMS



Γράφημα 32. Αναστολή Συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή συσσώρευσης τα LMS σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του συμπλόκου CBZT5.

Από το γράφημα 31 φαίνεται ότι η CBZT5 αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από το PAF κατά 50% σε συγκέντρωση 0.0549 mM ενώ στις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν δεν φαίνεται να έχει πλήρη αναστολή (100%).

Από το διάγραμμα 32 φαίνεται ότι η CBZT5 αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από τα κύτταρα LMS κατά 50% σε συγκέντρωση 0.0898mM ενώ σε συγκεντρώσεις πάνω από 0.12mM η αναστολή είναι πλήρης (100%).

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις των συμπλόκων που αναστέλλουν κατά 50% (IC50) την συσσώρευση των αιμοπεταλίων από ADP, PAF & LMS.

	Αγωνιστής ADP- IC50 (mM)	Αγωνιστής PAF- IC50(mM)	Αγωνιστής LMS- IC50(mM)
Σύμπλοκα			
CBZT3	0.0325mM	0.0305mM	0.00537mM
CBZT5	0.108mM	0.0549 mM	0.0898mM
Cis-Platin	Δεν αναστέλλει τη συσσώρευση	Δεν αναστέλλει τη συσσώρευση	Δεν αναστέλλει τη συσσώρευση

Πίνακας 5. Ποσότητες σε gr των συμπλόκων, που αναστέλλουν κατά 50% (IC50) την συσσώρευση των αιμοπεταλίων προκλειτή από ADP, PAF & LMS.

	Αγωνιστής ADP- IC50 (g)	Αγωνιστής PAF- IC50(g)	Αγωνιστής LMS- IC50(g)
Σύμπλοκα			
CBZT3	9.533μg	25.915μg	1.704μg
CBZT5	27.506μg	13.755μg	1.478μg

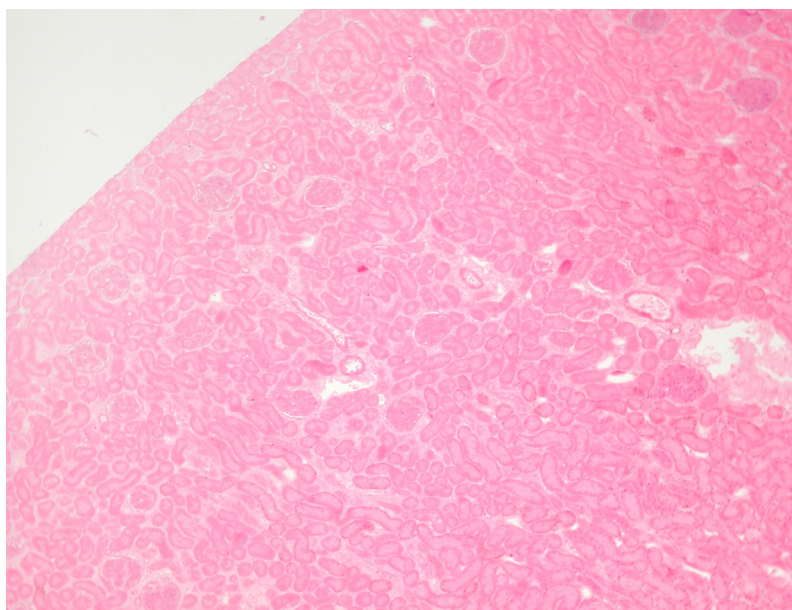
Από τη μελέτη συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του ανθρώπου προκύπτει ότι οι ουσίες που μελετήθηκαν είχαν αντιαιμοπεταλιακή δράση τόσο στην συσσώρευση που προκαλείται από φυσιολογικούς αγωνιστές όσο και από κακοήγη σαρκωματικά κύτταρα (LMS). Αυτό υποδεικνύει ότι τα σύμπλοκα που δοκιμάστηκαν έχουν πιθανώς και αντιμεταστατικές ιδιότητες .

Αντιθέτως η cis-platin που όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία αλλά και από αδημοσίευτες μετρήσεις του εργαστηρίου μας, όχι μόνο δεν έχει αντιαιμοπεταλιακές δράσεις, αλλά διεγείρει τα αιμοπετάλια και ενοχοποιείται για θρομβώσεις σε καρκινοπαθείς [66].

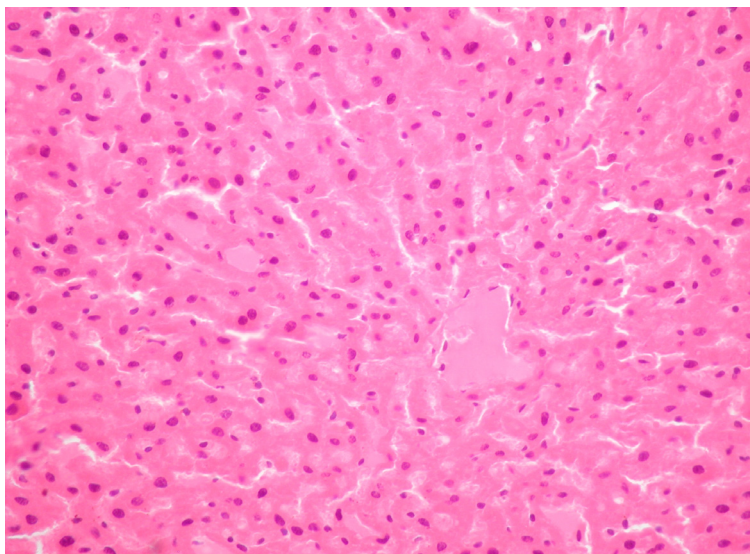
4.6 In vivo μελέτη

Τοξικότητα στα Πειραματόζωα

Από τη μελέτη τοξικότητας των ζώων προέκυψε ότι: ξεκινώντας από τη μεγαλύτερη δόση που χορηγήθηκε, δηλαδή 80 mgf ουσίας / ml διαλύτη / κιλό βάρους και τα πέντε πειραματόζωα που συμμετείχαν στο πείραμα αποβίωσαν εντός 24ώρου. Αφού διενεργήθηκε νεκροψία-νεκροτομή διαπιστώθηκε έντονη τοξικότητα στους νεφρούς. Ορισμένα πειραματόζωα παρουσίασαν τοξικότητα και στο ήπαρ (εικόνα 4α και 4β). Σε τρία ζώα χορηγήθηκαν 40 mgf ουσίας/ml διαλύτη/κιλό βάρους. Παρουσίασαν τοξικότητα σε νεφρούς και ήπαρ όπως τα προηγούμενα.

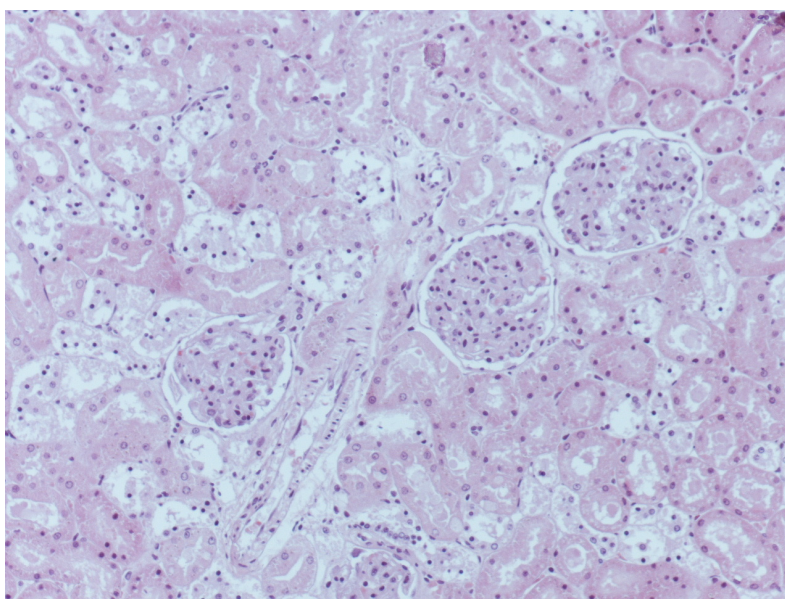


Εικόνα 4α. Τοξικότητα στους νεφρούς (αιματοξυλίνη-ηωσίνη X100). Αναγνωρίζεται νέκρωση των κυττάρων των ουροφόρων σωληναρίων και των σπειραμάτων.



Εικόνα 4β. Τοξικότητα στο ήπαρ (αιματοξυλίνη-ηωσίνη X 200). Αναγνωρίζεται διάταξη των κολλοειδών και νέκρωση των ηπατοκυττάρων γύρω από την κεντρική φλέβα.

Τα πειραματόζωα που τους χορηγήθηκε η δόση των 8mg/ ουσίας/ κιλό βάρους σώματος δεν παρουσίασαν καμία τοξικότητα. Μετά τον θάνατο των πέντε επιμύων ο παθολογοανατομικός έλεγχος αποκάλυψε πολύ ήπια τοξικότητα στους νεφρούς σε δύο από αυτούς (εικόνα 5).



Εικόνα 5. Ελάχιστη τοξικότητα στους νεφρούς (αιματοξυλίνη-ηωσίνη X200). Αναγνωρίζεται οίδημα των κυττάρων των ουροφόρων σωληναρίων.

Η κατανάλωση τροφής, νερού και η απέκκριση ούρων και κοπράνων, ήταν σε φυσιολογικά επίπεδα στα πειραματόζωα της ομάδας που συμμετείχε στο πείραμα καθώς και στην ομάδα έλεγχου. Επίσης στα πειραματόζωα διεξαγόταν θερμομέτρηση και παρατήρηση κινητικότητας. Η παραπάνω μετρήσεις διεξάγονταν καθημερινά και την ίδια πάντα ώρα σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Πίνακας 6. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η κατανάλωση τροφής, νερού και η απέκκριση ούρων και κοπράνων(αναγωγή σε εβδομάδες).

Ομάδα πειράματος	Νερό (ml)	Τροφή (gr)	Ούρα (ml)	Κόπρανα (gr)
1η εβδομάδα	16.73±3.69	7.63±3.76	5.89±1.57	2.40±0.84
2η εβδομάδα	21.11±2.56	12.86±1.64	8.72±1.72	3.16±0.54
3η εβδομάδα	20.63±2.86	12.50±1.68	9.29±1.16	2.81±0.37

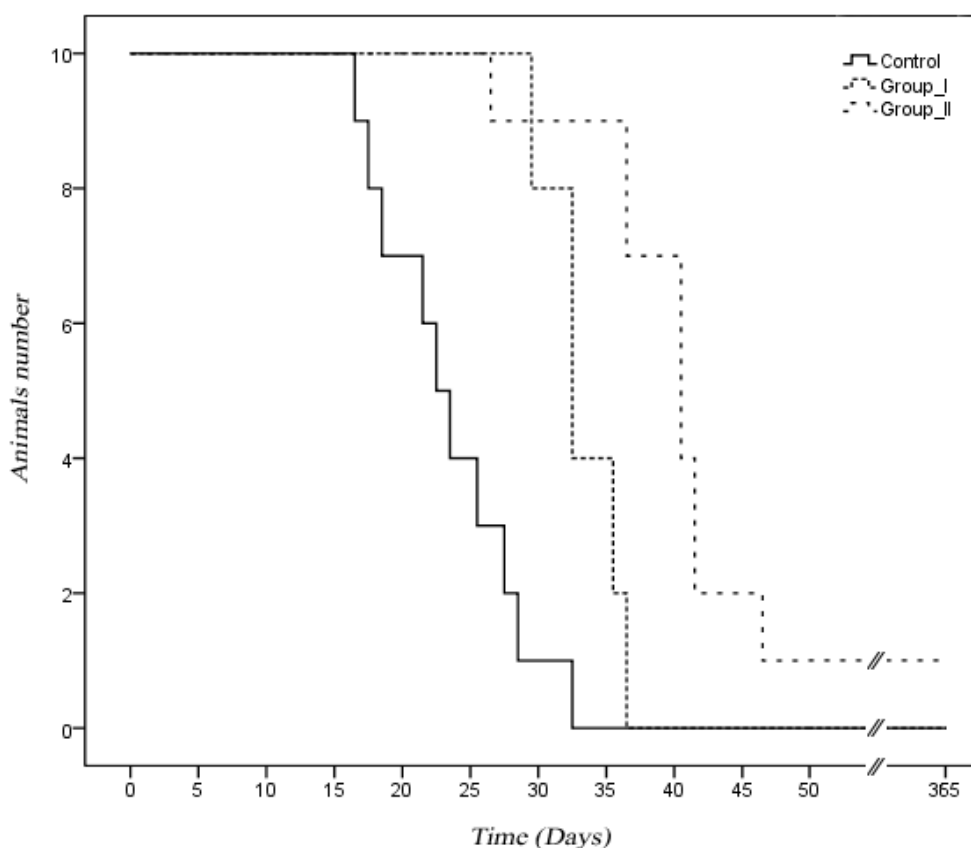
Ομάδα Ελέγχου	Νερό (ml)	Τροφή (gr)	Ούρα (ml)	Κόπρανα (gr)
1η εβδομάδα	17.21±2.70	7.91±2.34	4.5±1.87	1.61±0.80
2η εβδομάδα	20.13±5.57	9.31±2.77	5.74±3.44	1.91±0.92
3η εβδομάδα	20.18±3.83	11.93±1.62	7.63±3.03	2.78±0.96

Καρκινογένεση

Από τα αποτελέσματα της δράσης του πιο δραστικού συμπλόκου σε επίμυες Wistar με σαρκώματα διαπιστώνεται παράταση ως προς το προσδόκιμο επιβίωσης των πειραματόζωων με λειομυοσάρκωμα, στα οποία χορηγήθηκε το σύμπλοκο CBZT5. Από την καμπύλη ρυθμού θανάτου, (σχήμα) φαίνεται ότι τα πειραματόζωα στα οποία τους χορηγήθηκε το σύμπλοκο CBZT5 σε συνολική δόση 8mg/Kg Β.Σ,

εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης από τα πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου (επίμυες με λείομυοσαρκώμα που δεν χορηγήθηκε κανένα θεραπευτικό σχήμα). Διαπιστώνεται επίσης ότι η χορήγηση του συμπλόκου με βάση το θεραπευτικό σχήμα 2 εμφάνισαν προσδόκιμο επιβίωσης μεγαλύτερο από τα πειραματόζωα που τους χορηγήθηκε το σχήμα 1. (Σχήμα επιβίωσης). Ο ρυθμός ανάπτυξης των όγκων (βάρος όγκου σε γραμ. δια του χρόνου επιβίωσης σε ημέρες , gr/ημ.) βρέθηκε σημαντικά χαμηλότερος στα ζώα που έλαβαν αγωγή με το σύμπλοκο CBZT5 σε σύγκριση με αυτόν της ομάδας ελέγχου (πίνακας 7).

Σχήμα 1: Καμπύλη ρυθμού θανάτου των πειραματοζώων της ομάδας ελέγχου και των ομάδων 1 και 2 χορήγησης του συμπλόκου CBZT5.



Πίνακας 7. Μέσος χρόνος επιβίωσης και μέσος όρος ανάπτυξης όγκων της ομάδας ελέγχου των πειραματοζώων με σάρκωμα και των ομάδων 1(σχήμα 1) και 2(σχήμα 2) με αγωγή με το σύμπλοκο CBZT5.

Ομάδες	Μέσος χρόνος επιβίωσης (ημέρες) MT +/-SD	Βάρος πειραματοζώων (gr)	Βάρος όγκου πειραματοζώων (gr)	Ρυθμός ανάπτυξης όγκου (g/ημέρα) MT+/- SD
Ελέγχου	23±3.3	190.0±8.9	68.1±5.3	2.96±0.4
Ομάδα 1	33.8±2.7**	327.2±34.6**	111.4±32.2*	3.30±0.9
Ομάδα 2	39.2±6.8**	338.4±74.3**	128.5±45.4*	3.26±0.9

* Στατιστικά σημαντικά διαφορετικό από την Ομάδα Ελέγχου, $p < 0.05$

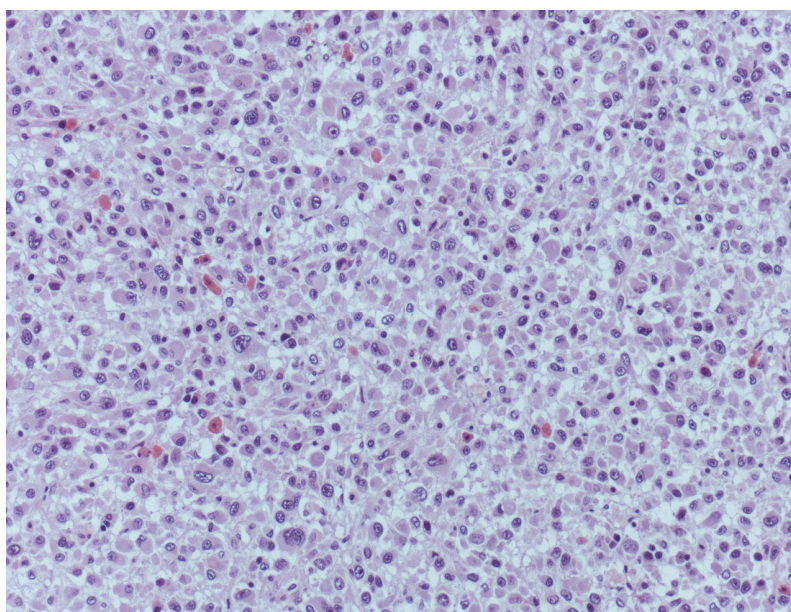
** Στατιστικά σημαντικά διαφορετικό από την Ομάδα Ελέγχου, $p < 0.01$

Ιστολογική μελέτη

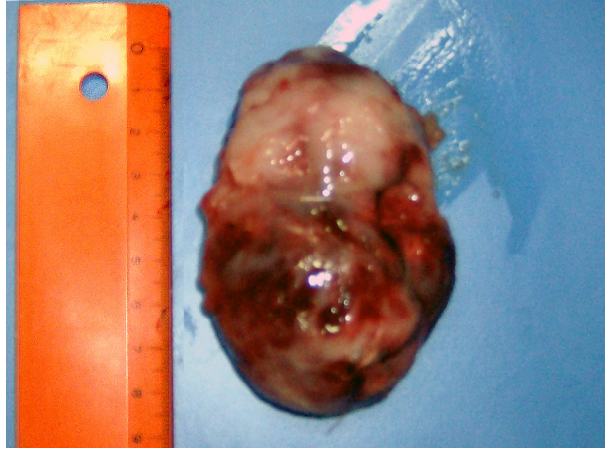
Στις παρακάτω φωτογραφίες απεικονίζονται τα λειομυοσαρκώματα (μακροσκοπικά και μικροσκοπικά) που αναπτύχθηκαν κατόπιν της έγχυσης των LMS κυττάρων στα πειραματόζωα, πριν και μετά την χορήγηση (σχήμα 1 και 2) του συμπλόκου CBZT5



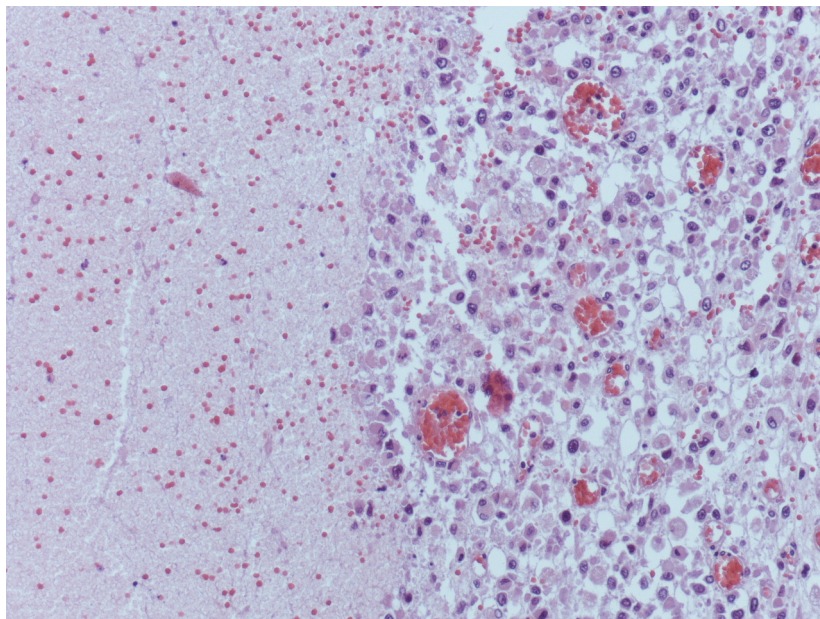
Εικόνα 6α. Λειομυοσάρκωμα μετά από έγχυση κυττάρων LMS σε πειραματόζωο.



Εικόνα 6β. Μικροσκοπική εικόνα λειομυοσρκώματος (αιματοξυλίνη-ηωσίνη X 200).



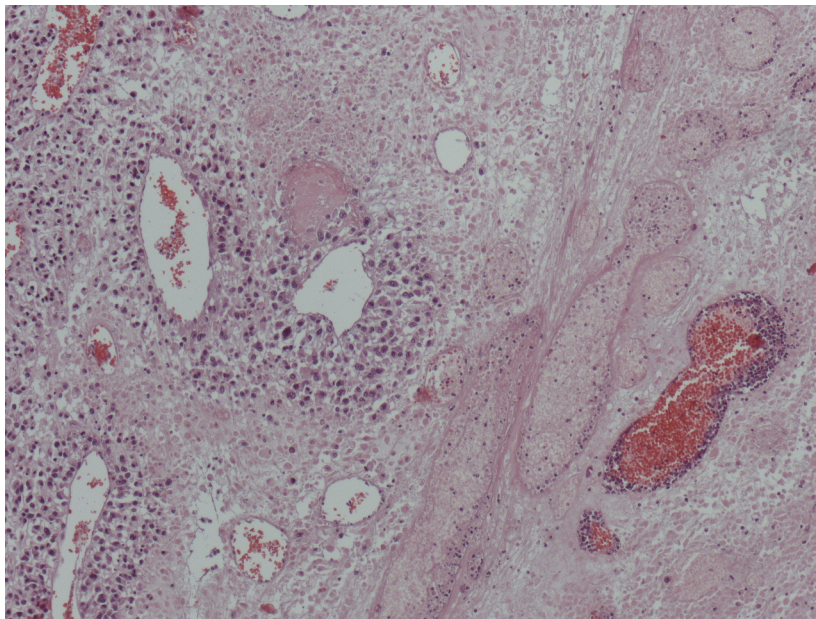
Εικόνα 7α. Λειομυοσάρκωμα μετά από έγχυση κυττάρων LMS σε πειραματόζωο και χορήγηση του συμπλόκου CBZT5, θεραπευτικό σχήμα 1.



Εικόνα 7β. Μικροσκοπική εικόνα λειομυοσρκώματος (αιματοξυλίνη-ηωσίνη X 200). Στο δεξί ήμισυ της εικόνας αναγνωρίζεται περιοχή νέκρωσης.



Εικόνα 8α. Λειομυοσάρκωμα μετά από έγχυση κυττάρων LMS σε πειραματόζωο και χορήγηση του συμπλόκου CBZT5, θεραπευτικό σχήμα 2.



Εικόνα 8β. Μικροσκοπική εικόνα λειομυοσρκώματος (αιματοξυλίνη-ηωσίνη X 200). Η νέκρωση είναι εκτεταμένη. Αναγνωρίζονται μόνο λίγα ζώντα νεοπλασματικά κύτταρα, γύρω από αγγεία.

Επίσης από τον ιστολογικό έλεγχο των σπλάχνων των πειραματόζωων ελέγχου της μελέτης διαπιστώθηκε ότι οι μεταστάσεις αφορούσαν κυρίως τους νεφρούς και το ήπαρ.

Πίνακας 8. Ο αριθμός των ζώων με μεταστάσεις φαίνεται στον πίνακα

	Αριθμός ζώων	Αριθμός ζώων με μετάσταση	Ποσοστό
Ομάδα ελέγχου	10	4	40%
Ομάδα πειράματος 1. (σχήμα 1).	15	0	0%
Ομάδα πειράματος 2. (σχήμα 2).	15	0	0%

Από τον έλεγχο του αριθμού των ζώων με μεταστάσεις προέκυψε ότι το 40% των ζώων της ομάδας ελέγχου εμφάνισαν μεταστατικές εστίες σε όργανα των σπλάχνων ενώ σε κανένα ζώο των ομάδων πειραματισμού δεν διαπιστώθηκαν μεταστάσεις.

5. Συζήτηση

Ολοκληρώνοντας τη μελέτη της παρούσας διατριβής προκύπτουν τα εξής δεδομένα:

Από τις ουσίες που δοκιμάστηκαν αυτές που είχαν την καλύτερη δράση είναι αυτές που είχαν IC 50 θνησιμότητας κυττάρων σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (CBZT3 και CBZT5), και δεν προκαλούσαν ή προκαλούσαν ελάχιστη, θνησιμότητα στα υγιή κύτταρα που μελετήθηκαν, όπως έδειξαν οι μελέτες στους υγιείς ινοβλάστες. Το παραπάνω επιβεβαιώνεται με το δεδομένο ότι το ισχυρότερο σύμπλοκο CBZT5 δεν εμφάνισε τοξικότητα στους επίμυες Wistar σε θεραπευτικές δόσεις.

Η σύγκριση της δράσης των ουσιών με το cisplatin αποδεικνύει ότι τα σύμπλοκα αυτά είναι πολύ ισχυρότερα και πολύ λιγότερο τοξικά από την cis-platin η οποία ήδη χρησιμοποιείται κατά των νεοπλασιών μεταξύ των οποίων και τα σαρκώματα [67] που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Από την παρούσα μελέτη και τα βιβλιογραφικά δεδομένα προκύπτει η δυνατότητα να συγκρίνουμε την δράση συμπλόκων του κασσιτέρου με διαφορετικούς οργανικούς υποκαταστάτες καθώς και άλλων μετάλλων (όπως π.χ Au) με τους ίδιους υποκαταστάτες όπως και τα αντίστοιχα σύμπλοκα με την cis-platin. Από τη σύγκριση προέκυψε ότι τα σύμπλοκα του κασσιτέρου είχαν ισχυρότερες κυτταροτοξικές δράσεις από σύμπλοκα άλλων αντικαρκινικών μετάλλων με τους ίδιους υποκαταστάτες. Το παραπάνω υποδεικνύει ότι ο κασσίτερος είναι ισχυρότερος από τον Au, πράγμα το οποίο έχει επισημανθεί και σε άλλες μελέτες μας [6].

Από όλες τις δικές μας μετρήσεις αλλά και από τη βιβλιογραφία [28] προκύπτει ότι η δράση του πιο ισχυρού συμπλόκου, CBZT5, οφείλεται κυρίως στον κασσίτερο, στη δομή του συμπλόκου και κατά ένα μικρό μέρος στον υποκαταστάτη.

Αυτό φαίνεται από τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε και ως προς τον υποκαταστάτη 5-χλώρο- 2 -μερκάπτοβενζοθειαζόλιο (CBZT) και έδειξε ότι ο υποκαταστάτης ασκεί μια πολύ μικρή αντιπολλαπλασιαστική δράση στη σειρά LMS η οποία είναι και το σημείο αναφοράς μας, σε υψηλές συγκεντρώσεις οι οποίες δεν χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα με τα σύμπλοκα (διάγραμμα 3).

Ακόμη, σύμφωνα με τον Hubert, [68], η δομή όλων των βιολογικά δραστικών ενώσεων χαρακτηρίζεται από τη διαθεσιμότητα μιας μονάδας ένταξης στον κασσίτερο (τριγωνικής διπυραμίδας (σχήμα 1) η τετραγωνικής πυραμίδας και από την ύπαρξη σταθερών χημικών δεσμών του υποκαταστάτη με τον κασσίτερο που έχουν σαν συνέπεια μικρή διάσπαση λόγω υδρόλυσης. Στην περίπτωση των ενώσεων που μελετήθηκαν στη διατριβή αυτή οι γενικές αρχές, ακολουθούνται. Έτσι η ένωση CBZT5 με δομή τριγωνικής διπυραμίδας και η διαθέσιμη μονάδα ένταξης στον κασσίτερο, είναι πιο δραστική από τις αντίστοιχες ενώσεις CBZT2 και CBZT3. Η μεγάλη δράση της ένωσης CBZT4 με οκταεδρική γεωμετρία στην οποία ο κασσίτερος δεν διαθέτει μονάδα ένταξης ελεύθερη αποδίδεται στην δημιουργία ελευθέρων ριζών οι οποίες είναι εντοπισμένες στον υποκαταστάτη όπως έδειξαν οι μετρήσεις φασματοσκοπίας ηλεκτρονίων παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) [27]. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα σύμπλοκα με μεγαλύτερο αριθμό υποκαταστατών να είναι πιο δραστικά. Αυτό σε συνδυασμό με την επιπλέον σταθεροποίηση των ριζών που προσδίδουν οι φαινολικοί υποκαταστάτες του κασσιτέρου σε αντίθεση με τη μικρή σταθεροποίηση της διβούτυλο ή της διμέθυλο ομάδας έχει σαν αποτέλεσμα το σύνολο της ένωσης να έχει μεγάλη δράση.

Το σύνολο των τριών προαναφερθέντων στοιχείων οπού απαρτίζουν ουσιαστικά το σύμπλοκο είναι και η αιτία της τόσο σημαντικής δράσης. Το παραπάνω ενισχύεται από το γεγονός ότι άλλα σύμπλοκα μετάλλων (Au & An) με

τον ίδιο υποκαταστάτη (CBZT) έχουν ασθενέστερη δράση από το CBZT5. Επιπλέον όλα τα σύμπλοκα του κασσιτέρου που μελετήθηκαν διαπιστώθηκε ότι έχουν αρκετά ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση από την cis-platin.(πίνακας IC50).

Είναι γνωστό ότι τα οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα έχουν αντιογκικές δράσεις [69], αν και ο ακριβής μηχανισμός των συμπλόκων αυτών δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός. Από τα ερευνητικά δεδομένα [70] έχουν προκύψει ενδείξεις ότι οι αντικαρκινικές δράσεις των συμπλόκων του κασσιτέρου δεν ασκούνται μέσω βλαβών του DNA σε φυσιολογικές συνθήκες (pH).

Έχει αναφερθεί [71] ότι τα σύμπλοκα του κασσιτέρου αναστέλλουν *in vitro* την αντίδραση λινολεϊκού- λιποξυγονάσης η οποία είναι το ένζυμο που καταλύει τον καταβολισμό του αραχιδονικού οξέως σε λευκοτριένια και προσταγλανδίνες οι οποίες συμβάλουν στην αύξηση και την επιβίωση των κακοήθων όγκων λειτουργώντας σαν αγγειογενετικοί παράγοντες [72]. Αυτό θα μπορούσε εφόσον λειτουργούσε και *in vivo* να αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς με τους οποίους τα σύμπλοκα του κασσιτέρου λειτουργούν ως αντικαρκινικά. Η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τα LMS κύτταρα που διαπιστώθηκε στη παρούσα μελέτη είναι ενδεικτική ότι τα σύμπλοκα του κασσιτέρου αναστέλλουν πιθανώς την δραστηριότητα της λιποξυγονάσης και της κυκλοξυγονάσης οι οποίες δραστηριοποιούνται κατά τις διαδικασίες συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Η ιδιότητα αυτή των συμπλόκων του κασσιτέρου που μελετήθηκε σε πρόσφατη ερευνά μας [28], υποδηλώνει επίσης τη δυνατότητα τους να λειτουργήσουν ως αντιφλεγμονώδεις ενώσεις δεδομένου ότι η κυκλοξυγονάση κυρίως αλλά και η λιποξυγονάση αποτελούν ένζυμα στόχους της αντιφλεγμονωδών ουσιών όπως πχ της ασπιρίνης των αναστολέων της COX 1 & 2 και των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών (NSAIDS).

Τα σύμπλοκα του κασσιτέρου ως λιποδιαλυτά συσσωρεύονται κυρίως στη λιποειδή κυτταρική διπλοστιβάδα των κυττάρων και πιθανώς προκαλούν οξειδωτικές στρές σε κυτταρικό επίπεδο όπως φαίνεται από την πρόκληση λιπιδικής υπεροξειδωσης με την παρουσία των συμπλόκων αυτών. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι οργανικά σύμπλοκα του κασσιτέρου όπως αυτά της παρούσας μελέτης προκαλούν *in vitro* μη ενζυμική υπεροξειδωση του λινολεϊκού οξέος [27]. Με τέτοια δράση στα λιποειδή της κυτταρικής μεμβράνης θα μπορούσε να οδηγήσει στην οξειδωτική καταστροφή της και κατά συνέπεια στην καταστροφή του κυττάρου. Είναι πιθανό ο μηχανισμός αυτός να ερμηνεύει τα αποτελέσματα μας που λήφθηκαν από την κυτταρομετρία ροής σύμφωνα με τα οποία ένα μικρό ποσοστό των κακοήθων κυττάρων οδηγείται σε νέκρωση (πίνακας 2).

Είναι επίσης γνωστό ότι οι βλάβες της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να ενεργοποιήσουν αποπτωτικές κυτταρικές διαδικασίες [73]. Η αυξημένη απόπτωση των LMS κυττάρων που καταγράφηκε στην κυτταρομετρία ροής από το ισχυρότερο σύμπλοκο που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή το CBZT5, θα μπορούσε να οφείλεται στην ενεργοποίηση κάποιου αποπτωτικού μηχανισμού που προκλήθηκε από βαριές οξειδωτικές βλάβες της κυτταρικής μεμβράνης. Τα παραπάνω δεν αποκλείουν την πιθανότητα κάποιος από τους μηχανισμούς της απόπτωσης να ενεργοποιείται από τα σύμπλοκα του κασσιτέρου που μελετήθηκαν.

Από τον έλεγχο της δράσης των συμπλόκων στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση προέκυψε ότι, η αντιαιμοπεταλιακή δράση των ουσιών αυτών ήταν ιδιαίτερα σημαντική με φυσιολογικούς αγωνιστές της συσσώρευσης (ADP & PAF). Εν τούτοις τόσο το CBZT3 όσο και το CBZT5 παρουσίασαν σημαντικότερη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή τα καρκινικά κύτταρα LMS.

Η αντισυσσωρευτική δράση των συμπλόκων αυτών πιθανότατα οφείλεται στην δέσμευση που προκαλούν στο ενεργό κέντρο της λιποξυγονάσης με συνέπεια την αδρανοποίησή της [27]. Είναι γνωστό ότι τα κακοήθη κύτταρα στην αιματική κυκλοφορία παράγουν ουσίες που προκαλούν αιμοπεταλιακή συσσώρευση ενεργοποιώντας τον καταρράκτη αραχιδονικού οξέος- λιποξυγονάσης, σχηματίζοντας έτσι ένα περίβλημα με αιμοπετάλια το οποίο τα βοηθά να διαφεύγουν από την ανοσολογική επιτήρηση (την αναγνώριση από τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος) και ταυτόχρονα να προσφύονται στο τοίχωμα των αγγείων και να μεθίστανται [74]. Επομένως αντικαρκινικές ουσίες οι οποίες αναστέλλουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από κακοήθη κύτταρα είναι πολύ πιθανό τόσο να επιτρέπουν στο ανοσολογικό σύστημα να αναγνωρίζει τα μεταλλαγμένα κύτταρα όσο και να δυσχεραίνουν την πρόσφυσή τους και τη μετάσταση.

Τα αιμοπετάλια έχει αποδειχτεί ότι διεγείρουν άμεσα τα καρκινικά κύτταρα. Αυτές οι αντιδράσεις μετριάζονται από προϊόντα της απελευθέρωσης των αιμοπεταλίων, όπως είναι ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4, η β-θρομβοσφαιρίνη και η βασική αιμοπεταλιακή πρωτεΐνη, που χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό μετάφρασης, και επιπλέον από τον αιμοπεταλιακό αυξητικό παράγοντα, ο οποίος είναι απαραίτητος για την διέγερση της βιοσύνθεσης του γενετικού υλικού και για την κυτταρική διαίρεση [51]. Τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στα καρκινικά αγγεία, σχηματίζουν μικρο-θρόμβους και απελευθερώνουν κοκκία τα οποία περιέχουν πιθανούς ενεργοποιητές της αγγειογένεσης όπως ο VEGF, ο εκ των αιμοπεταλίων εξορμούμενος ενδοθηλιακός παράγοντας αύξησης, μαζί με αναστολείς όπως οι θρομβοσποντίνες και ο παράγοντας 4 των αιμοπεταλίων [49]. Ο Brock και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι ο VEGF μπορεί να επάγει τα ενδοθηλιακά κύτταρα να

απελευθερώσουν τον παράγοντα von Willebrand, ο οποίος συμμετέχει στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων [49].

Συμπερασματικά τα σύμπλοκα CBZT3 και CBZT5 διαθέτουν *in vitro*, εκτός από την πολύ ισχυρή κυτταροτοξική δράση έναντι των καρκινικών σειρών που μελετήθηκαν και σημαντική αντιμεταστατική δράση. Αυτό φαίνεται να συμφωνεί και με το εύρημά μας ότι *in vivo*, κανένα από τα ζώα των ομάδων πειραματισμού 1 και 2 δεν εμφάνιζε σπλαχνικές μεταστάσεις σε αντίθεση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου στα οποία στο 40% καταγράφηκαν σπλαχνικές μεταστάσεις. Το εύρημα αυτό ενισχύει τα δεδομένα που προέκυψαν από την μελέτη αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με LMS από CBZT5 ότι πιθανώς τα σύμπλοκα που μελετήθηκαν έχουν και αντιμεταστατική δράση.

Και οι δύο ομάδες πειραματοζώων που τους χορηγήθηκε το σύμπλοκο CBZT5 είχαν στατιστικά σημαντική μεγαλύτερη επιβίωση από την ομάδα ελέγχου. Δεν διαπιστώθηκε όμως στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων πειραματισμού 1 και 2 όσον αφορά στην επιβίωση των πειραματοζώων ($p=0.12$).

Εντούτοις σε ένα πειραματοζώο της ομάδας 2 διαπιστώθηκε πλήρης υποχώρηση του όγκου και επιβίωση επ' αόριστον (6.06%). Το παραπάνω είναι μια ένδειξη ότι το σχήμα 2 είναι ίσως αποτελεσματικότερο του σχήματος 1 δηλαδή ότι οι χρόνοι χορήγησης του συμπλόκου αλλά και η ποσότητα κάθε δόσης έχουν κάποια σημασία.

Ακόμη διαπιστώθηκε ότι η ταχύτητα ανάπτυξης των όγκων ήταν σημαντικά μικρότερη στις ομάδες των ζώων που χορηγήθηκε το σύμπλοκο CBZT5 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τα παραπάνω δεδομένα ενισχύουν το ότι το σύμπλοκο CBZT5 διαθέτει και *in vivo* ικανοποιητική αντικαρκινική δράση και εάν αυτό

συνδυαστεί με την χαμηλή τοξικότητα σε θεραπευτικές δόσεις που διαπιστώθηκε στη παρούσα μελέτη το καθιστούν μία ισχυρή υποψήφια νέα αντικαρκινική ουσία.

Το δεδομένο ότι το σύμπλοκο αυτό του κασσιτέρου έχει ισχυρότερες κυτταροτοξικές και αντιμεταστατικές δράσεις από τη cis-platin και παράλληλα στερείται των παρενεργειών και της τοξικότητας των ενώσεων της πλατίνας ενισχύει ακόμα περισσότερο την παραπάνω θέση.

6. Συμπεράσματα

Από τη παρούσα μελέτη προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

1. Επιβεβαιώθηκε ότι ο κασσίτερος έχει σημαντικές αντικαρκινικές δράσεις ισχυρότερες από την πλατίνα.
2. Διαπιστώθηκε ότι από τα έξι οργανικά σύμπλοκα του κασσιτέρου που μελετήθηκαν τα ισχυρότερα είναι ο Διφαίνυλο κασσίτερος δις (5χλώρο-2-μερκάπτοβενζοθειαζόλιο) $(C_4H_9)_2Sn(CBZT3)$ και ο Τριφαίνυλο-κασσίτερος-δις-5χλώρο-2-μερκάπτοβενζοθειαζόλιο $(C_6H_5)_3Sn(CBZT5)$.
3. Τα ισχυρά αυτά σύμπλοκα διαθέτουν επίσης αντιμεταστατικές δράσεις όπως υποδεικνύεται από τη σημαντική αναστολή που ασκούν στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται κυρίως από λειομυοσαρκωματικά κύτταρα και την πλήρη απουσία μεταστάσεων στα πειραματόζωα με λειομύοσαρκωμα που χορηγήθηκε το σύμπλοκο $(C_6H_5)_3Sn(CBZT5)$ καθώς επίσης και αντιφλεγμονώδεις δράσεις αναστέλλοντας την κυκλο- και λιποξυγονάση *in vitro*.
4. Τα σύμπλοκα που μελετήθηκαν έχουν ισχυρότερες δράσεις από σύμπλοκα άλλων αντικαρκινικών μετάλλων με τον ίδιο υποκαταστάτη όπως αυτά του Au και του An.
5. Το σύμπλοκο $(C_6H_5)_3Sn(CBZT5)$ σε θεραπευτικές δόσεις στερείται τοξικών επιδράσεων σε αντίθεση με την υψηλή τοξικότητα που εμφανίζουν τα σύμπλοκα της πλατίνας.
6. Προέκυψαν ενδείξεις ότι η αντικαρκινική δράση των συμπλόκων του κασσιτέρου δεν ασκείται μέσω άμεσης δράσης στο DNA αλλά η κυτταροτοξική και αποπτωτική δράση τους, οφείλεται πιθανώς στην οξειδωση των λιποειδών της κυτταρικής μεμβράνης και στην δομή τριγωνικής διπυραμίδας και οκταέδρου που διαθέτουν.

7. Το σύμπλοκο $(C_6H_5)_3Sn(CBZT5)$ λόγω των κυτταροτοξικών, και των αντιμεταστατικών δρασεών του και της χαμηλής τοξικότητας που διαθέτει θα μπορούσε μετά από περισσότερες μελέτες να αποτελέσει τον διάδοχο των συμπλόκων της πλατίνας στην αγωγή των κακοήθων νόσων.

7. Περιλήψεις

Οι πρώτες οργανοκασσιτερικές ενώσεις συντέθηκαν 1849 ενώ οι αντικαρκινικές ιδιότητες τέτοιων ενώσεων μελετούνταν ήδη από το 1929.

Στην παρούσα διδακτορική μελετήθηκαν σύμπλοκα του κασσιτέρου με θειοαμίδια όσον αφορά στις αντικαρκινικές αντιαιμοπεταλιακές-αντιμεταστατικές τους ιδιότητες. Τα σύμπλοκα που μελετήθηκαν ήταν οι εξής λιποδιαλυτές ενώσεις, $(C_6H_5)_3Sn(BZO5)$, $(C_6H_5)_3Sn(BZT5)$, $(CH_3)_2Sn(CBZT2)$, $(C_4H_9)_2Sn(CBZT3)$, $(C_6H_5)_2Sn(CBZT4)$ και $(C_6H_5)_3Sn(CBZT5)$.

Η κυτταροτοξική δράση των συμπλόκων αυτών μελετήθηκε σε σειρά λειομυοσαρκωματικών κυττάρων LMS η οποία απομονώθηκε από επίμυες Wistar που ανέπτυξαν όγκους μετά από υποδόρια έγχυση βενζοπυρενίου και σε κύτταρα καρκίνου του μαστού (MCF7). Επίσης μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα των συμπλόκων στη σειρά υγιών ινοβλαστών MRC5.

Στα κύτταρα LMS μελετήθηκε επίσης η κυτταροτοξική δράση του υποκαταστάτη των συμπλόκων CBZT3 και CBZT5, 5χλώρο 2 μερκάπτοβενζοθειαζόλιο (CBZT).

Οι κυτταρικές μελέτες περιελάμβαναν εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας των συμπλόκων τόσο με την χρώση Trypan Blue όσο και με τη μέθοδο MTT, καθώς και με την ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων.

Η μελέτη της νέκρωσης ή της απόπτωσης που προκαλείται στα κύτταρα LMS από τα σύμπλοκα CBZT3 & CBZT5 έγινε με κυτταρομετρία ροής. Επίσης μελετήθηκε η ικανότητα των συμπλόκων να αναστέλλουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται τόσο από φυσιολογικούς αγωνιστές (PAF, ADP) όσο και από λειομυοσαρκωματικά κύτταρα.

Το σύμπλοκο CBZT5 μελετήθηκε επίσης ως προς την τοξικότητα του σε 15 επίμυες Wistar με ενδοπεριτονεϊκή έγχυση (i.p) 0.8mg, 8mg & 80mg/kg B.Σ.

Η *in vivo* κυτταροτοξική δράση του συμπλόκου CBZT5 μελετήθηκε σε 40 θήλεα Wistar τα οποία ανέπτυξαν όγκους με ενοφθαλμισμό 1.5 έως 2.0×10^6 LMS.

Τα ζώα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες:

Την ομάδα ελέγχου (10 Ζώα), την ομάδα πειραματισμού 1, (15 ζώα) και 2, (15 Ζώα) στις οποίες χορηγήθηκε το σύμπλοκο CBZT5 i.p σε συνολική δόση 8mg/kg B.Σ., διαιρεμένη σε 4 δόσεις ανά 5νήμερο στην ομάδα 1 και σε 3 δόσεις ανά 10ήμερο στην ομάδα 2.

Στις ομάδες αυτές μελετήθηκε ο χρόνος επιβίωσης των πειραματοζώων, η ταχύτητα ανάπτυξης του όγκου, ο αριθμός των ζώων με μεταστάσεις και έγινε ιστολογικός έλεγχος των όγκων.

Από τις κυτταρικές μελέτες διαπιστώθηκε ότι: τα ισχυρότερα σύμπλοκα ως προς την κυτταροτοξική τους δράση ήταν τα CBZT3 και CBZT5 με IC₅₀ 0.264μM και 0.140μM αντίστοιχα. Από την κυτταρομετρία ροής φάνηκε ότι η δράση τους οφείλεται κατά 13% σε νέκρωση και κατά 85% σε απόπτωση για το CBZT3 και σε 18% σε νέκρωση και 60% σε απόπτωση για το CBZT5. Τα παραπάνω σύμπλοκα δεν εμφάνισαν κυτταροτοξική δράση στους υγιείς ινοβλάστες (MRC5) σε συγκεντρώσεις IC₅₀. Ο υποκαταστάτης CBZT εμφάνισε επίσης ασθενή κυτταροτοξική δράση σε σχέση με τα οργανοκασσιτερικά σύμπλοκα που ο ίδιος σχηματίζει στα LMS (IC₅₀ 87.5μM).

Τα σύμπλοκα CBZT3 και CBZT5 εμφάνισαν επίσης ισχυρή αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κυρίως προκαλούμενης από τα LMS (IC₅₀ του CBZT3 0.00537mM και IC₅₀ του CBZT5 0.0898mM).

Το σύμπλοκο CBZT5 εμφάνισε ισχυρή ανασταλτική δράση στα ζώα με λειομυοσάρκωμα όπως φαίνεται από την σημαντική παράταση της επιβίωσης των ζώων των ομάδων πειραματισμού σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0,01$) την μείωση της ταχύτητας ανάπτυξης του όγκου ($p < 0,05$) και την πρόληψη εμφάνισης μεταστάσεων στις ομάδες πειραματισμού 1 και 2 (0%) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (40%). Η κυτταροτοξικές δράσεις των συμπλόκων αυτών μπορεί να αποδοθούν τόσο στην οξειδωτική τους δράση στα λιποειδή των κυτταρικών μεμβρανών όσο και στη δομή τους και την πιθανή αντιφλεγμονώδη δράση τους.

Συμπερασματικά τα οργανικά σύμπλοκα του κασσιτέρου με θειοαμιδικούς υποκαταστάτες και ιδιαίτερα ο τριφαίνυλο κασσίτερος δις- (5χλώρο 2-μερκάπτοβενζοθειαζόλιο) $(C_6H_5)_3Sn(CBZT5)$, διαθέτουν ισχυρή κυτταροτοξική και αντιμεταστατική δράση *in vitro*, *ex vivo* & *in vivo*, η οποία σε συνδιασμό με την χαμηλή τοξικότητα τους τα καθιστά πιθανούς διαδόχους άλλων αντικαρκινικών οργανομεταλλικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται στη σύγχρονη χημειοθεραπευτική αγωγή.

ABSTRACT

Antiinflammatory, antiplatelet and Anticancer effects of complexes of Tin with organic ligands in vitro, ex vivo and in vivo chemical and biological models.

Apostolos K Metsios Biologist

Laboratory of Physiology, Faculty of Medicine, University of Ioannina, 45110-Greece.

The organotin compounds were firstly composed in 1849, whereas their anticancer effects are studied since 1929.

In the present dissertation newly synthesized complex of Sn with thioamides, were studied for their anticancer and antiplatelet- antimetastatic effects. The complex used for the study were the following, fat soluble substances: $(C_6H_5)_3Sn(BZO5)$, $(C_6H_5)_3Sn(BZT5)$, $(CH_3)_2Sn(CBZT 2)$, $(C_4H_9)_2Sn(CBZT3)$, $(C_6H_5)_2Sn(CBZT4)$ και $(C_6H_5)_3Sn(CBZT5)$.

The cytotoxic effects of the above complexes were studied on a leiomyosarcoma cell line (LMS), which was isolated from tumors of Wistar rats induced by injection of benzo(a)pyrene, and on a human breast cancer cell line (MCF7). The cytotoxicity of these complexes was also studied on a healthy human fibroblast line, MRC5.

On LMS cells, the cytotoxicity of the ligand of the complex CBZT3 and CBZT5, 5-chloro-2-mercaptobenzo-thiazol (CBZT), was also studied.

Cytotoxicity of the complexes on the malignant cell lines (LMS, MCF7) and MRC5 was estimated by Trypan Blue staining as well as by the MTT method and cell

ability to form colonies. The necrotic and apoptotic effects of the complexes CBZT3 and CBZT5 on LMS cell lines were estimated by the flow cytometry.

The ability of the complexes to inhibit aggregation of human platelets induced by physiological agonists (ADP and PAF) as well as by leiomyosarcoma cells was also estimated.

The toxicity of the complex CBZT5 was estimated in 15 Wistar rats, by intraperitoneal infusion of 0,8mg, 8mg and 80mg /kg B.W. of the substance.

The cytotoxicity (anticancer) effects of the CBZT5 complex, was studied in 40 female Wistar rats which developed sarcomas by inoculation of 1.5 to 2.0×10^6 LMS. Animals as above were randomly separated in three groups.

1. The control group of animals (CG)
2. The experimental-1 group (EG-1) and
3. The experimental-2 group (EG-2), of 15 animals each.

In both experimental groups CBZT5 was i.p administered at a total dose of 8 mg/kg B.W., divide in 4 doses, each every 5 days, in EG-1 and in 3 dose each every 10 days in EG-2.

In the animal groups, the survival time, the tumor growth rate, and the numbers of animals bearing metastases were studied, as well as the histology of the tumors.

From cellular studies were found the following:

- The more potent complexes were CBZT3 and CBZT5, possessing an IC₅₀: 0.264μM and 0.140μM respectively.
- Flow cytometry of LMS revealed that CBZT3 induced 13% necrosis and 85% apoptosis wherears CBZT5, 18% and 60% apoptosis.
- Both, CBZT3 and CBZT5 did not manifest any cytotoxicity on MRC5 fibroblasts, at IC₅₀ concentrations.

- The ligand CBZT manifested a slight cytotoxicity on LMS (IC₅₀ 87.5 μM)
- Both, CBZT3 and CBZT5 complexes, exerted a significant inhibition of human platelet aggregation mainly induced by LMS cells, (IC₅₀ CBZT3 0.00537 mM and IC₅₀ CBZT5 0.0898 mM).
- Wistar rats treated with the complex CBZT5 (EG-1 and EG-2) manifest a significant prolongation of survival, (p < 0.0001) and complete absence (0%) of metastases compared with the control group in which 40% of the animals were found with metastasis. All the above findings indicate a potent anticancer and antimetastatic effect of CBZT5, in vitro and in vivo.

Cytotoxic effect of Sn complexes with thioamides as these of the present study on malignant cell lines and tumor-bearing animals may be due either to their oxidative effects on membrane lipids and/or their structure as well as their possible anti-inflammatory action.

In conclusion, the organic complexes of Sn with thioamides, mainly the triphenyl- Sn- bis-(5-chloro-2-mercaptobenzothiol) (C₆H₅)₃Sn(CBZT 5) possess potent cytotoxic and antimetastatic effects in vitro, ex vivo and in vivo, which in relation to its low toxicity may introduce them as possible successors of other organometallic compounds used nowadays in cancer chemotherapy.

8. Βιβλιογραφία

1. Chircorian A, Barrios AM. Inhibition of lysosomal cysteine proteases by chrysotherapeutic compounds: a possible mechanism for the antiarthritic activity of Au(I). *Bioorg Med Chem Lett*. 2004 Oct 18;14(20):5113-6.
2. Levy A, Malouf G, Besse B, Massard C, Soria JC. [Molecular targeted therapies in small-cell lung cancer.] *Bull Cancer*. 2010 .
3. Charalabopoulos K, Kotsalos A, Batistatou A et al Serum and tissue selenium levels in gastric cancer patients and correlation with CEA. *Anticancer Res*. 2009; Aug 29(8):3465-7.
4. Evangelou M.A. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* Volume 42, Issue 3, June 2002, Pages 249-265.
5. Hadjikakou SK, Ozturk II, Xanthopoulou MN, Zachariadis PC, Zartilas S, Karkabounas S, Hadjiliadis N. Synthesis, structural characterization and biological study of new organotin(IV), silver(I) and antimony(III) complexes with thioamides. *J Inorg Biochem*. 2008 102(5-6):1007-15. 2008.
6. Kouroulis KN, Hadjikakou SK, Kourkoumelis N, Kubicki M, Male L, Hursthouse M, Skoulika S, Metsios AK, Tyurin VY, Dolganov AV, Milaeva ER, Hadjiliadis N. Synthesis, structural characterization and in vitro cytotoxicity of new Au(III) and Au(I) complexes with thioamides. *Dalton Trans*. 2009 Dec 21;(47):10446-56. Epub 2009 Oct 13.
7. F Caruso, M Rossi - *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2004 *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, Volume 4, Number 1, January 2004 , pp. 49-60(12).

8. Bachor R, Flotte TJ, Scholz M, Dretler S, Hasan T. Comparison of intravenous and intravesical administration of chloro-aluminum sulfonated phthalocyanine for photodynamic treatment in a rat bladder cancer model. *J Urology* 1992 May;147(5):1404-10.
9. Liu X, Shen H, Zhu H, Cui K, Gou S. In vitro cytotoxicity study on platinum (II) complexes with epoxysuccinates as leaving groups *Bioorg Med Chem Lett.* 2007 17(14):3831-4.
10. Saxena A.K, Huber F, Organotin compounds and cancer chemotherapy. *Coord. Chem. Reviws*, 95 (1989) 109.
11. Katsarou E, Charalambopoulos C, Hadjiliadis N, Ternary Complexes of cis-(NH₃)₂PtCl₂ (cis-DDP) With Guanosine (guo), Cytidine (cyd) and the Aminoacids Glycine (gly), L-Alanine (ala), L-2-Aminobutyric Acid (2-aba), L-Norvaline (nval) and L-Norleucine (nleu). *Met Based Drugs.* 1997;4(6):339-43.
12. David S. Hsu, Bala S. Balakumaran, Chaitanya R. Acharya, Vanja Vlahovic, Kelli S. Walters, Katherine Garman, Carey Anders, Richard F. Riedel, Johnathan Lancaster, David Harpole, Holly K. Dressman, Joseph R. Nevins, Phillip G. Febbo, Anil Potti. Pharmacogenomic Strategies Provide a Rational Approach to the Treatment of Cisplatin-Resistant Patients With Advanced Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 25, No 28, 2007: pp. 4350-4357
13. Zhang Xin Christiana and Lipard J Stephen, New metal complexes as potential therapeutics, *Current opinion in Chemical Biology*, 2003 7: 481-189.
14. Tsangaris J.M, Williams D.R. Tin in pharmacy and nutrition. *Appl. Organomet. Chem.* 6 (1992) 3-18

15. Ξανθοπούλου Μαριάννα, Διδακτορική Διατριβή. Εφαρμογές των θειοαμιδίων στην βιοϊατρική. Σύνθεση και μελέτη νέων οργανοκασσιτερικών (IV) ενώσεων των θειοαμιδίων με πιθανή βιολογική δράση. Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων 2006, Ιωάννινα.
16. Curtin G.C. King H.D, and Moiser E.L. Movement of elements into the atmosphere from coniferous trees in subalpine forest of Colorado and Idaho. *J. Geochem Explor*, 3 (1974) 245
17. Webb D.A. Studies on the ultimate composition of biological material. II. Spectrographic analyses of marine invertebrates with special reference to the chemical composition of their environment. *Sci. Proc. Royal Dublin Soc.* (1973) 21
18. Cardarelli N.F, Tinas a Vital Nutrient: Implications in Cancer Prophylaxis and other Physiological Processes. CRC Pres, Boca Raton, FL, 1985
19. Sherman L.R, Bilgicer K.I, Cardarelli N.F, Analyses of tin in mouse and human *organs* *J. Nutrit Growth and Cancer*, 2 (1985) 107
20. Teraoka H. Distribution of 24 elements I the internal organs of normal males and metallic workers in Japan. *Arch. Environ Health*, 36 (1981) 55
21. Tsangaris J.M, *Epitheorese Klinikes Farmakologias Kai Farmakokinetikes*, International Edition, 6 (1992) 69-81.
22. Saxena Ak, “Organotin Compounds And Cancer Chemotherapy”, *Coordination Chemistry Reviews* 1989; 95;109-123.
23. Pettinari C, “Special Issue: Recent Advances in Organotin Chemistry”, *J Organometal Chem* 2006; 691;1435–1436.
24. Xanthopoulou MN, Hadjidakou SK, Hadjiliadis N, Kubicki M, Skoulika S, Bakas T, Baril M, Butler IS., “Synthesis, Structural Characterization, and

- Biological Studies of Six- and Five-Coordinate Organotin(IV) Complexes with the Thioamides 2-Mercaptobenzothiazole, 5-Chloro-2-mercaptobenzothiazole and 2-Mercaptobenzoxazole”, *Inorg Chem.* 2007 19;46(4):1187-95.
25. Yang Z, Bakas T, Sanchez-Diaz A, Charalampopoulos C, Tsangaris J, Hadjiliadis N., Interaction of Et₂SnCl₂ with 5'-IMP and 5'-GMP. *J Inorg Biochem.* 1998 72(3-4):133-40.
26. Tabassum S, Pettinari C, “Chemical and biotechnological developments in organotin cancer chemotherapy”, *J Organometal Chem* 691 2006; 1761–1766.
27. Xanthopoulou MN, Hadjikakou SK, Hadjiliadis N, Kubicki M, Karkabounas S, Charalabopoulos K, Kourkoumelis N, Bakas T, Synthesis and characterization of a new chloro-di-phenyltin(IV) complex with 2-mercaptopyridine-3-carboxylic acid: Study of its influence upon the catalytic oxidation of linoleic acid to hydroperoxylinoleic acid by the enzyme lipoxygenase, *J Organometal Chem* 2006;691(8):1780–1789.
28. Xanthopoulou MN, Hadjikakou SK, Hadjiliadis N, Milaeva ER, Gracheva JA, Tyurin VY, Kourkoumelis N, Christoforidis KC, Metsios AK, Karkabounas S, Charalabopoulos K., “Biological studies of new organotin(IV) complexes of thioamide ligands”, *Eur J Med Chem.* 2008 43(2):327-35.
29. Bluden S.J., Chapman A., Organotin Compounds, in *Organometallic Compounds in the Environment*, P.J. Craig (ed), Wiley, 1986
30. Attar K. Analytical methods for speciation of organotins in the environment *Applied Organometallic Chemistry.* 10 (1996) 317
31. Ross M, Gielen M, Lelieveld P, de Vos D. *Anticancer Res.*, 10, 5b (1990) 1379.

32. Ross M, Gi Melen M, Lelieveld P, de Vos D, Cytotoxic activity of di-n-butyltin(IV)(X-A-B-Y) compounds related to salicylic acid against human tumour cells. *Anticancer Res.* 11, (1991) 1089-91
33. Gielen M, Willem R, Cytotoxic activity of bis-[di-n-butyl(4-aminosalicylato)tin] oxide, NSC: 628561, bis-[diphenyl(4-aminosalicylato)tin] oxide, NSC: 628562, and some related compounds, against a series of human tumour cell lines. *Anticancer Res.* 12 (1992) 257-268.
34. Girasolo M.A, Pizzino T, Mansueto C, Valle G, Stocco G.C. *Appl. Organometal. Chem.* 14 (2000) 197-211
35. Hanch C, Leo A.J. *Substituent Constants For Correlation Analysis in Chemistry And Biology*, Wiley NY, 1979.
36. Piro V.S, Di Simone F, Madonia G, Silvestry A, The interaction of organotins with native DNA. *Appl. Organomet. Chem.* 6 (1992) 537.
37. Kemmer M, Gielen M, Biesemans M, Willem R Synthesis, Characterization and In Vitro Antitumour Activity of Di-n-Butyl, Tri-n-Butyl and Triphenyltin 3,6-Dioxaheptanoates and 3,6,9-Trioxadecanoates, *Met.-Based Drugs*, 5 (1998) 189-196.
38. Brandalise SR, Pinheiro VR, Aguiar SS, et al. Benefits of the intermittent use of 6-mercaptopurine and methotrexate in maintenance treatment for low-risk acute lymphoblastic leukemia in children: randomized trial from the Brazilian Childhood Cooperative Group--protocol ALL-99. *J Clin Oncol.* 2010; 28(11): 1911-1918.
39. Giuseppina I. Togna, Anna Rita Togna, Matteo Franconi and Luciano Caprino "Cisplatin Triggers Platelet Actination" *Thrombosis Research* 99 (2000) 503-509.

40. Huber F, Roge G, Carl L. Atassi J. Studies on the anti-tumour activity of di- and tri-organotin(IV) complexes of amino acids and related compounds, of 2-mercaptoethanesulphonate, and of purine-6-thiol Chem. Soc Dalton Trans. (1985) 523
41. Sergent O, Morel I, Cillard J, in Metal Ions in Biological Systems, A. Sigel, H. Sigel (ed), M. Dekker NY36(1999) 251-287
42. Cardarelli N.F, Cardarelli B.M, Libby E.P, Dobbins E. Organotin implications in anticarcinogenesis. Effects of several organotins on tumor growth rate in mice. Aust. J. Exp. Boil. Med. Sci., 62, (1984) 209.
43. Gielen M Review: Organotin compounds and their therapeutic potential: a report from the Organometallic Chemistry Department of the Free University of Brussels. Appl. Organometal. Chem., 16 (2002) 481-494.
44. Gielen M. Tin-based antitumour drugs. Coordination Chem. Reviews 151 (1996) 41-51
45. Gielen M. E.R.T. Tiekink, ⁵⁰Sn Tin Compounds and Their Therapeutic Potential, in M. Gielen, E.R.T. Tiekink (ed), Metallotherapeutic Drugs and Metal-based Diagnostic Agents. The Use of Metals in Medicine 2005, Wiley.
46. Pellerito L, Nagy L, Spectroscopic Properties of Inorganic and Organometallic Compounds. Coordination Chem. Reviews, 224 (2001) 111-150
47. Petrosyan V.S. Gracheva Yu. A, Tyurin V. Yu, Grigoriev E.V, Milaeva E.R, Pellerito L, Effect of Organotin Compounds and Their Complexes with Phosphatidylcholine on Peroxide Oxidation of Lipid Structural Fragments. Russian J. Organic Chemistry 39 (2003) 353-356.
48. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med. 1971 Nov 18;285(21):1182-6.

49. Pinedo HM, Verheul HM, D'Amato RJ, Folkman J, "Involvement of platelets in tumour angiogenesis?" *Lancet*. 1998 28;352(9142):1775-7.
50. Jurasz P, Alonso-Escolano D, Radomski MW., "Platelet-cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation", *Br J Pharmacol*. 2004 Dec;143(7):819-26.
51. Mehta P. "Potential Role of Platelets in the Pathogenesis of Tumor Metastasis", *Blood*. 1984 (1):55-63.
52. Lomberk G. Angiogenesis. *Pancreatology*. 2010 10(2-3):112-113
53. Verheul HM, Hoekman K, Luykx-de Bakker S, Eekman CA, Folman CC, Broxterman HJ, Pinedo HM "Platelet: Transporter of Vascular Endothelial Growth Factor", *Clin Cancer Res*. 1997 3(12 Pt 1):2187-90.
54. Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. "Antimetastatic effects associated with platelet reduction", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968 Sep;61(1):46-52.
55. Mathonnet M, Descottes B, Valleix D, Truffinet V, Labrousse F, Denizot Y., "Platelet-activating factor in cirrhotic liver and hepatocellular Carcinoma", *World J Gastroenterol*. 2006 12(17):2773-8.
56. Tsuchiya R, Tatsuki Y, Kitao S, Furuichi M, Neo S, Hisasue M, Yamada T, Kobayashi K, "Characterization of Canine Platelet Activation Induced by Platelet Activating Factor (PAF)", *J Vet Med Sci*. 2008 70(2):181-3.
57. Li GX, Liu ZQ. Captopril and 6-mercaptopurine: whose SH possesses higher antioxidant ability? *Eur J Med Chem*. 2009 44(12):4841-7.
58. Kallistratos G, Fasske E, Karkabounas S, Charalabopoulos K. Prolongation of the survival time of tumor bearing Wistar rats through a simultaneous oral administration of vitamins C & E and selenium with glutathione. *Progr Clin Biol Res* 1989; 259:377-389.

59. Kallistratos G, Evangelou A, Agnantis N, Fasske E, Karkabounas S, Donos A. Enhancement of the antineoplastic effect of anticarcinogens on benzo(a)pyrene treated rats, in relation to their number and biological activity. *Cancer Lett* 1994; 82:153-165.
60. Liasko R, Kabanos TA, Karkabounas S, Malamas M, Tasiopoulos AJ, Stefanou D, Collery P, Evangelou A. Beneficial effects of a vanadium complex with cysteine, administered at low doses on benzo(alpha)pyrene-induced leiomyosarcomas in Wistar rats. *Anticancer Res.* 1998 18(5A):3609-13.
61. Stefanou DG, Nonni AV, Kalpouzou G, Evangelou A, Agnantis NJ. Immunophenotype, ras oncogenes and p53 onco-suppressor gene in benzo(a)pyrene induced malignant soft tissue tumours in Wistar rats. *In Vivo.* 1998 Sep-Oct;12(5):511-21. PMID: 9827359
62. Freshness I.N. *Culture of animal cells*, 3rd Edition PP 11, 131-132 Wiles Liss New Yourk. 1994.
63. Saxena Ak., "Organotin Compounds And Cancer Chemotherapy", *Coordination Chemistry Reviews* 1989; 95:109-123.
64. Xanthopoulou MN, Hadjikakou SK, Hadjiliadis N, Schürmann M, Jurkschat K, Binolis J, Karkabounas S, Charalabopoulos K., "Synthesis of a Novel Triphenyltin(IV) Derivative of 2- Mercaptonicotinic Acid with Potent Cytotoxicity in vitro", *Bioinorg Chem Appl.* 2003:227-31.
65. Katsarou E, Charalambopoulos C, Hadjiliadis N. "Ternary Complexes of cis-(NH₃)₂PtCl₂ (cis-DDP) With Guanosine (guo), Cytidine (cyd) and the Aminoacids Glycine (gly), L-Alanine (ala), L-2-Aminobutyric Acid (2-aba),

- L-Norvaline (nval) and L-Norleucine (nleu).” *Met Based Drugs*. 1997;4(6):339-43.
66. Togna G.I, Togna AR, Franconi M, Caprino L. Cisplatin Triggers platelet activation. *Thrombosis Research*. 99 (2000). 503-509
67. Soh S, Uchida T, Mukai N, Rokkaku S, Koshiha K.[Leiomyosarcoma of the prostate: response to treatment with cisplatin, etoposide and methotrexate chemotherapy: a case report] *Hinyokika Kyo*. 1994 Jan; 40(1):83-5. Japanese.
68. F. Hubert, D. Thomas, A. Cavalier and J. Gouranton Structural and biochemical observations on specialized membranes of the filter chamber", a water-shunting complex in sap-sucking homopteran insects. *Biology of the Cell* (1989) 66, (155–163) (Printed in Great Britain)
69. Gielen M, Biesemans M, de Vos D, Willem R. Synthesis, characterization and in vitro antitumor activity of di- and triorganotin derivatives of polyoxa- and biologically relevant carboxylic acids *J. Inorganic Biochemistry*. 79 (2000) 139-145
70. Ghys L, Biesemans M, Gielen M, Garoufis A, Hadjiliadis N, Willem R. Matri J.C. Multinuclear 1D and 2D NMR investigations on the interaction between the pyrimidic nucleotides 5'-CMP, 5'-dCMP, and 5'-UMP and diethyltin dichloride in aqueous medium. *European J. Inorganic Chemistry*. (2000) 513-522.
71. M.S. Rose, Evidence for histidine in the triethyltin-binding site of rat haemoglobin. *BiochemJ*.111(1969) 129-137.
72. Zha S, Yegnasudramanian V, Nelson W.G, Isaacs W.B, De Marzo A.M. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett*.215 (2004) 1-20.

73. Ansari KI, Kasiri S, Grant JD, Mandal SS. Apoptosis and anti-tumour activities of manganese(III)-salen and -salphen complexes. Dalton Transaction. 2009 Oct 28; (40):8525-31.
74. Varon D, Shai E. Role of platelet-derived microparticles in angiogenesis and tumor progression. Discov Med. 2009 8(43):237-41.
75. Barbieri R, Ruisi G, Atassi G. The antitumor activity and the structure of bis(adeninato-N⁹) (diphenyltin(IV)). J. Inorg. Biochem. 41 (1991) 25-30

9. Συντμήσεις

AA: αραχιδονικό οξύ (arachidonic acid)

ADP: διφωσφορική αδενοσίνη (adenosine diphosphate)

ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate)

B[a]P: (βενζοπυρένιο)

BZO: Τριφαινύλ κασσίτερος 2 μερκαπτοβενζοξαζόλιο

BZT: Τριφαινύλ κασσίτερος 2 μερκαπτοβενζοθειαζόλιο

CBZT: 5χλώρο 2 μερκάπτοβενζοθειαζόλιο (υποκαταστάτης)

CBZT2: Διμέθυλο κασσίτερος δις (5χλώρο 2 μερκάπτοβενζοθειαζόλιο

CBZT3: Διβούτυλο κασσίτερος δις (5χλώρο 2 μερκάπτοβενζοθειαζόλιο

CBZT4: Διφαινυλοκασσίτερος δις (5χλώρο 2 μερκάπτοβενζοθειαζόλιο

CBZT5: τριφαινυλο κασσίτερος δις- 5 χλώρο- 2- μερκαπτοβενζοθειαζόλιο

DMEM: θρεπτικό υλικό (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DMSO: διμέθυλ-σουλφοξείδιο

FBS: εμβρυικός βοδινός ορός (foetal bovine serum)

LMS: λυομειοσαρκωματικά κύτταρα

MCF7: ανθρώπινα αδenoκαρκινικά κύτταρα μαστού.

MRC5: φυσιολογικοί ινοβλάστες από πνεύμονα εμβρύου.

PAF: παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (platelet activating factor)

PBS: αλατούχο διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffered saline)

PPP: πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (plasma poor in platelets)

PRP: πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (plasma rich in platelets)

TCIPA: tumour cell induced platelet aggregation

TXA2: θρομβοξάνη A2

TNF- α : παράγοντας νέκρωσης όγκων α

VEGF: αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular endothelial growth factor)

vWF: παράγοντας von Willebrand (Von Willebrand factor)

10. Δημοσιεύσεις

Xanthopoulou MN, Hadjikakou SK, Hadjiliadis N, Milaeva ER, Gracheva JA, Tyurin VY, Kourkoumelis N, Christoforidis KC, **Metsios AK**, Karkabounas S, Charalabopoulos K Biological studies of new organotin(IV) complexes of thioamide ligands..Eur J Med Chem. 2008 Feb;43(2):327-35. Epub 2007 Apr 10.

Balas VI, Hadjikakou SK, Hadjiliadis N, Kourkoumelis N, Light ME, Hursthouse M, **Metsios AK**, Karkabounas S. Crystal Structure and Antitumor Activity of the Novel Zwitterionic Complex of tri-n-Butyltin(IV) with 2-Thiobarbituric Acid. Bioinorg Chem Appl. 2008:654137.

