



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ : ΑΓΓΕΛΟΣ Μ. ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ, ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΡΓΑΝΟΥ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ : ΙΩΑΝΝΗΣ ΤΣΑΓΓΑΡΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ.
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ : ΝΙΚΗ ΑΓΝΑΝΤΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ.

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΕΩΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ ΒΑΝΑΔΙΟΥ
ΜΕ ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ
ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ ΜΑΛΑΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΡΩΜΑΝ Ο. ΛΙΑΣΚΟ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2000



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200022





ΚΟΙΝΩΜΑΔΙ ΜΟΝΑΧΙΕΣ ΚΑΙ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΣΑΝ ΤΟΤΕ ΟΜΑΔΕΣ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΣΥΝΕΤΗΡΙΑΣ
ΣΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΦΟΡΟΝ ΣΥΝΕΤΗΡΙΑΣ
ΣΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΦΟΡΟΝ ΣΥΝΕΤΗΡΙΑΣ

ΣΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΦΟΡΟΝ ΣΥΝΕΤΗΡΙΑΣ
ΣΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΦΟΡΟΝ ΣΥΝΕΤΗΡΙΑΣ
ΣΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΦΟΡΟΝ ΣΥΝΕΤΗΡΙΑΣ

260/2002



ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΦΟΡΟΝ ΣΥΝΕΤΗΡΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΦΟΡΟΝ ΣΥΝΕΤΗΡΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΦΟΡΟΝ ΣΥΝΕΤΗΡΙΑΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΦΟΡΟΝ ΣΥΝΕΤΗΡΙΑΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΦΟΡΟΝ ΣΥΝΕΤΗΡΙΑΣ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής υπό της Ιατρικής Σχολής δεν υποδηλοί αποδοχή των γνωμών του συγγραφέως.

(Νόμος 5343/32, άρθρον 202, παρ. 2).

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΦΟΡΟΝ ΣΥΝΕΤΗΡΙΑΣ



Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

A. ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ (Επιβλέπων)
Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας
Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιον Ιωαννίνων

B. ΚΑΛΦΑΚΑΚΟΥ (Μέλος)
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας
Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιον Ιωαννίνων

B. ΜΑΪΠΑ (Μέλος)
Επίκουρος Καθηγήτρια Υγιεινής
Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιον Ιωαννίνων



Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ν. ΑΓΝΑΝΤΗ

Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας
Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιον Ιωαννίνων

Ι. ΤΣΑΓΓΑΡΗΣ

Καθηγητής Χημείας
Χημικό Τμήμα - Πανεπιστήμιον Ιωαννίνων

Δ. ΓΛΑΡΟΣ

Καθηγητής Ιατρικής
Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιον Ιωαννίνων

Ν. ΠΑΥΛΙΔΗΣ

Καθηγητής Ογκολογίας - Παθολογίας
Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιον Ιωαννίνων

Α. ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ (Επιβλέπων)

Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας
Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιον Ιωαννίνων

Β. ΚΑΛΦΑΚΑΚΟΥ (Μέλος)

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας
Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιον Ιωαννίνων

Β. ΜΑΪΠΑ (Μέλος)

Επίκουρος Καθηγήτρια Υγιεινής
Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιον Ιωαννίνων





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΛΙΤΕΛΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΣΥΝΕΔΡΙΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ
του κ. ΡΩΜΑΝ ΛΙΑΣΚΟ ,ΒΙΟΛΟΓΟΥ.

Συνεδρίασε σήμερα 14/6/2000 και ώρα 9 π.μ στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, η Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή, της διδακτορικής διατριβής του Ρώμαν Λιασκό, με τίτλο:
" ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ ΒΑΝΑΔΙΟΥ ΜΕ ΨΕΥΔΟΠΕΠΤΙΔΙΑ ΜΕ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ, ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ ΤΩΝ ΜΑΛΑΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ".

Στην Συνεδρίαση ήταν παρόντες οι κ.κ.:

κ.Ιωάννης Τσαγγάρης, Καθηγητής Χημικού Τμήματος Παν/μίου Ιωαννίνων

κ.Νικόλαος Παυλίδης, Καθηγητής Ογκολογίας-Παθολογίας, Παν/μίου Ιωαννίνων

κ.Αγγελος Ευαγγέλου, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικού Τμήματος, Παν/μίου Ιωαννίνων, επιβλέπων

κα.Βασιλική Καλφακάκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικού Τμήματος Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος τριμελούς

κα.Βασιλική Μάϊπα ,Επίκουρη Καθηγήτρια Υγιεινής, Ιατρικού Τμήματος Τμήματος Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος τριμελούς

Απουσίαζε, λόγω υποχρεώσεων, η κ. Νίκη Αγκάντη, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και ο κ. Δημήτριος Γλάρος, Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.



Ο κ. Λιασκό παρουσιάζει την διδακτορική του διατριβή , αναλύει τα δεδομένα της μελέτης και τα συμπεράσματα της έρευνας.

Εν συνεχεία υποβάλλονται ερωτήσεις από την Εξεταστική Επιτροπή.


Αποχωρεί ο υποψήφιος και η Επιτροπή σύμφωνα με τον νόμο, κρίνει την πρωτοτυπία και την συμβολή της διατριβής στην επιστήμη, ως και την επίδοση του υποψηφίου.

Η Επιτροπή αφού συζήτησε και εξέτασε τα δεδομένα αποδέχεται την διδακτορική διατριβή ομόφωνα και απονέμει τον τίτλο του διδάκτορα του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στον κ. Ρωμάν Λιασκό με τον βαθμό "ΑΡΙΣΤΑ".


Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ



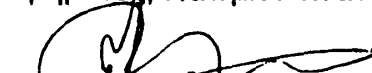
κ.Ιωάννης Τσαγγάρης, Καθηγητής Χημικού Τμήματος Παν/μίου Ιωαννίνων



κ.Νικόλαος Παυλίδης, Καθηγητής Ογκολογίας-Παθολογίας, Παν/μίου Ιωαννίνων



κ.Άγγελος Ευαγγέλου, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικού Τμήματος, Παν/μίου Ιωαννίνων, επιβλέπων



κα Βασιλική Καλφακάκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικού Τμήματος Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος τριμελούς



κα.Βασιλική Μάϊπα ,Επίκουρη Καθηγήτρια Υγιεινής, Ιατρικού Τμήματος Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος τριμελούς



Στεγνή η θεωρία, φίλε μου, -

Αλλά το Δένδρο της Ζωής αιώνια πρασινίζει.

Γκαίτε.



ΠΙΝΑΞ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	3
1. ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ	3
1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	3
1.2. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΩΝ ΚΑΚΟΗΘΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΙΩΝ	4
1.3. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	5
1.3.1. Κυτταρικό επίπεδο: από την επενέργεια καρκινογόνου έως της εκδήλωσης του κακοήθους φαινοτύπου	5
1.3.2. Επίπεδο ιστού. Ογκοποίηση και συμπεριφορά του όγκου	13
1.3.3. Επίπεδο οργανισμού. Μηχανισμοί αντίστασης και επιρροή του νέοπλασματος στην γενική φυσιολογική κατάσταση του πάσχοντος	19
1.3.4. Ελεύθερες ρίζες	27
1.4. ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΔΙΑ ΠΟΛΥΚΥΚΛΙΚΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ	29
1.5. ΛΕΙΟΜΥΟΣΑΡΚΩΜΑΤΑ	30
1.6. ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΜΟΡΙΑ	33
1.6.1. Μέταλλα	33
1.6.2. Οργανικά αντιοξειδωτικά μόρια	35
1.7. ΣΥΝΟΨΙΣ	36
2. ΒΑΝΑΔΙΟ ΩΣ ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΟ	37
2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	37
2.2. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΒΑΝΑΔΙΟΥ	37
2.3. ΒΑΝΑΔΙΟ ΣΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ	41
2.3.1. Γενική αναφορά	41
2.3.2. In vitro μελέτες	43
2.3.3. Κυτταρικές επιδράσεις	45
2.3.4. Οι φυσιολογικές δράσεις του βαναδίου σε επίπεδο οργανισμού	52
2.3.5. Το βανάδιο ως εργαλείο μελέτης βιολογικών συστημάτων	54
2.4. ΣΥΝΟΨΙΣ	55
3. ΒΑΝΑΔΙΟ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	57
3.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	57
3.2. ΣΥΝΟΨΙΣ	62



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	64
1. ΑΙΤΙΟΛΟΓΗΣΗ	64
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	65
2.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΤΥΧΟΥΣ ΕΞ ΑΥΤΩΝ	65
2.1.1. Παρασκευή	65
2.1.2. Φυσικο-χημική μελέτη της VCys	65
2.1.2.1. EPR-μέθοδος	66
2.1.2.2. Μελέτη της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των συμπλόκων	66
2.2. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ	67
2.3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ	68
2.3.1. Πειράματα αναστολής καρκίνου	68
2.3.1.1. Γενικές πληροφορίες	68
2.3.1.2. Πείραμα επιλογής συμπλόκου και σχήματος χορήγησης	68
2.3.1.3. Αναλυτική μελέτη της VCys	69
2.3.2. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας των ενώσεων βαναδίου in vitro	70
2.3.3. Μελέτες τοξικότητας	71
2.3.3.1. Καθορισμός της LD ₅₀ της VCys	71
2.3.3.2. Μελέτη χρονίας τοξικότητας	71
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
3.1. ΠΕΙΡΑΜΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ	73
3.2. ΦΥΣΙΚΟ-ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ VCys	75
3.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ IN VITRO ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΟΣ	78
3.4. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΕΩΣ ΤΗΣ VCys	79
3.5. LD ₅₀ ΤΗΣ VCys	82
3.6. ΠΕΙΡΑΜΑ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΟΣ	83
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	85
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	95
ΠΕΡΙΛΗΨΙΣ	96
ABSTRACT	99
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	103
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	114



ΕΙΣΑΓΩΓΗ.

Η μεγάλη αύξηση των κακοήθων νόσων κατά τα τελευταία χρόνια, σε συνδυασμό με την δυνατότητα μη αποτελεσματικής ριζικής αντιμετώπισής των, έχει καταστήσει τις παθήσεις αυτές ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα της εποχής μας. Εκ παραλλήλου, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, με προέχοντα τα χημικά καρκινογόνα, ενοχοποιούνται για ένα μεγάλο ποσοστό πρόκλησης κακοήθων παθήσεων.

Στα πλαίσια αυτά η μελέτη της φυσιοπαθολογίας της κακοήθους διαδικασίας και των μεθόδων προστασίας των κυττάρων από την κακοήθη εξαλλαγή, όσον και της αντιμετώπισής της όταν αυτή επισυμβεί, είναι ένα από τα επιτακτικά καθήκοντα της βιοϊατρικής έρευνας.

Κατά την αναζήτηση νέων αποτελεσματικών προσεγγίσεων πρόληψης και θεραπείας καρκίνου ανεκαλύφθη η αντικαρκινογόνος δράση του βαναδίου (Tompson et al., 1984), η οποία επεβεβαιώθη αργότερα επί ευρέος φάσματος πειραματικών όγκων. Το βανάδιο, σε σύγκριση με τα άλλα χημειοθεραπευτικά μέσα, διαθέτει ωρισμένα πλεονεκτήματα:

1. Οι δράσεις του εκτυλίσσονται είτε στο κυτταρόπλασμα, είτε εγγύς της κυτταρικής μεμβράνης και όχι ειδικευμένα στον πυρήνα. Ως εκ τούτου, το μέταλλο μπορεί να φθάσει ευκολότερα προς εκείνο το σημείο, όπου πιθανότατα εκδηλώνονται οι αντικαρκινικές του ιδιότητες.

2. Η τοξικότητα του βαναδίου για τα θηλαστικά είναι μετρίου βαθμού, αντιθέτως, π.χ. από τις ενώσεις λευκόχρυσου.

3. Η πλούσια χημεία του ιχνοστοιχείου παρέχει δυνατότητες συμπλοκοποίησης, μέσω της οποίας μπορεί αποτελεσματικώς να ρυθμίζεται η απορρόφηση και η διακίνησή του.

4. Οι πολλαπλές βιοχημικές και συστημικές δράσεις του μετάλλου αυτού παρέχουν την δυνατότητα μελέτης των μηχανισμών που καθοδηγούν τις λειτουργίες των κακοήθων κυττάρων.

Καίτοι η συμπλοκοποίηση βαναδίου με οργανικά μόρια έχει επιτυχώς εφαρμοσθεί επί του διαβήτη (Lazaro et al. 1989, Schechter et al. 1992), τα πράγματα διαφέρουν στο πεδίο της έρευνας κατά του καρκίνου. Τα σύμπλοκα βαναδίου εναντίον πειραματικού καρκίνου δεν έχουν επαρκώς μελετηθεί, και οι μελέτες που έχουν γίνει (Djordjevic and Wampler, 1985) δεν κατέληξαν σε πολύ αισιόδοξα συμπεράσματα (Djordjevic, 1995).

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν με βάση τις βιοχημικές ιδιότητες του βαναδίου να προσκομισθούν στοιχεία της φυσιολογίας της κακοήθειας σε συστηματικό κυρίως επίπεδο και παράλληλα να αποτιμηθούν ως αντικαρκινογόνα φάρμακα δύο νεοπαρασκευασμένα σύμπλοκα βαναδίου με την L-κυστεΐνη και με την 2-μερκαπτοπροπιονύλ-γλυκίνη. Οι θειώλες αυτές έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, επιπλέον η κυστεΐνη προλαμβάνει εμφάνιση πειραματικού καρκίνου όταν χορηγείται παράλληλα με το βενζο(α)πυρένιο (Kallistratos et al., 1982).

Οι ενώσεις βαναδίου εδοκιμάστησαν σε χαμηλές σχετικά συγκεντρώσεις (~ 10 φορές μικρότερες από αυτές των Djordjevic and Wampler) επί πειραματικών λειομυοσαρκωμάτων, τα οποία, όντας σαρκώματα μαλακών μορίων, ανήκουν σε επιθετικούς και φαρμακοανθεκτικούς όγκους.

Το σύμπλοκο, που ανέδειξε σημαντική αντικαρκινογόνο ισχύ, ετέθη υπό σφαιρική μελέτη με στόχο:



1. Να ταυτοποιηθεί η κρισιτάμενη σε υδατικό διάλυμα μορφή και να προσδιορισθούν μερικές από τις φυσικο-χημικές ιδιότητές της, οι οποίες έχουν πιθανώς σχέση με την αντικαρκινογόνο δράση (ισθίνος βαναδίου, ολική αντιοξειδωτική ικανότητα).

2. Να συγκριθεί η *in vitro* κυτταροτοξικότητα του συμπλόκου με αυτήν του ανόργανου άλατος βαναδίου.

3. Να εκτιμηθεί η *in vivo* αντικαρκινογόνος ισχύς της ένωσης σε αντιπαράθεση προς τις συνιστώσες της.

4. Να προσδιορισθεί το εύρος επιτρεπτών δόσεων υπό συνθήκες εφ'άπαξ και χρόνιας χορήγησης του συμπλόκου.

Η σύνθεση των συμπλόκων και η μελέτη φυσικο-χημικών ιδιοτήτων τους πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία του Εργαστηρίου Φυσιολογίας με το Εργαστήριο Ανοργάνου Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων (υπεύθυνος Θ. Καμπανός, Αναπλ. καθηγητής). Οι ιστοπαθολογικές εξετάσεις έγιναν στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομίας Παν/μίου Ιωαννίνων (υπεύθυνος Δ. Στεφάνου, Αναπλ. καθηγητής), ενώ η λοιπή εργασία έλαβε χώραν στο Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας (διευθυντής και επιβλέπων Α. Ευαγγέλου, Αναπλ. καθηγητής).

Θα ήθελα να αποδώσω βαθειά ευγνωμοσύνη εις όσους συνέβαλον στην επιτέλεση του παρόντος έργου, ιδιαίτερα δε:

- στα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον κ. Ευαγγέλου, την κ-α Καλφακάκου και την κ-α Μάϊπα, των οποίων η βοήθεια υπήρξε για μένα κυριολεκτικά ανεκτίμητη καθ' όλη την διάρκεια της παραμονής μου στην Ελλάδα,

- στον Γ.Καλπούζο και Σ. Καρκαμπούνα ως πλησιέστατους συνεργάτες και φίλους,

- στον Χ. Θωμά για την ουσιαστική βοήθειά του στα πειράματα προσδιορισμού ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και *in vitro* κυτταροτοξικότητας,

- σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, εκ μέρους του οποίου δεν συνάντησα, παρά κατανόηση και βοήθεια,

- στους κκ. Θ. Καμπανό και Α. Τασιόπουλο για την θεωρητική και πρακτική βοήθεια, όσον αφορά στο χημικό τμήμα της διατριβής,

- στον κ. Δ. Στεφάνου και την κ-α Α. Νόννη για την βοήθεια στις ιστοπαθολογικές εξετάσεις και τις σχετικές θεωρητικές πληροφορίες,

- στο Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την ευγενώς χορηγηθείσα υποτροφία.



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.

1. ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ.

1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.

Ως νεόπλασμα ορίζεται μια ανώμαλη μάζα ιστού, της οποίας η ανάπτυξη υπερβαίνει εκείνη των κανονικών ιστών, δεν συντονίζεται με αυτούς και συνεχίζεται κατόπιν απομάκρυνσης του γενεσιουργού παράγοντος (Willis, 1952). Είναι προφανές, ότι το υπόβαθρον αυτής της διαδικασίας αποτελούν μέχρι ενός μεγάλου βαθμού ανεξέλεγκτες αυξητικές διεργασίες κυττάρων ωρισμένης περιοχής του σώματος.

Αντικρύζοντας αδρώς μερικά μορφοφυσιολογικά χαρακτηριστικά των νεοπλασμάτων, μπορούμε να δώσωμε μια πρώτη υποδιαίρεσή των. Από την ιστολογική άποψη κάθε όγκος συνίσταται από το νεοπλασματικό και αγγειοσυνδετικό παρέγχυμα. Το τελευταίο παίζει τροφικό ρόλο (Robbins, 1989). Έπειτα, προεξέχουσας κυρίως της βιολογικής τους συμπεριφοράς, διακρίνονται *καλοήθη* και *κακοήθη* νεοπλάσματα.

Ο ορισμός ενός νεοπλάσματος ως καλοήθους σχετίζεται με τις εξής ιδιότητες: ο όγκος είναι ευπερίγραπτος, παρουσιάζει πολλάκις ινώδη κάψα, αναπτύσσεται αργά, προοδευτικά και τοπικά, απωθώντας τους πέριξ ιστούς. Η αρχιτεκτονική δομή του ομοιάζει προς αυτή της προέλευσής του, ενώ τα κύτταρα είναι ιστολογικώς διαφοροποιημένα, ομοιόμορφα, χωρίς άτυπους χαρακτήρες. Τα καλοήθη νεοπλάσματα δεν χορηγούν μεταστάσεις.

Αντιθέτως, οι κακοήθεις όγκοι δεν είναι ευπερίγραπτοι, δεν περιβάλλονται από πλήρη κάψα, αυξάνονται προοδευτικά ή και ραγδαία. Ομοιάζουν λίγο προς τους ιστούς προέλευσής των, τα δε κύτταρα είναι αδιαφοροποίητα, ποικίλου μεγέθους, με άφθονες μιτώσεις (Austin Gresham, 1992). Το πλέον ουσιώδες όμως γνώρισμα των κακοήθων νεοπλασμάτων αποτελεί η πάντοτε διηθητική ως προς τους πέριξ ιστούς ανάπτυξή τους, καθώς και η μετανάστευση και η εγκατάσταση νεοπλαστικών κυττάρων σε απομακρυσμένα μέρη του σώματος, ήτοι η λεγόμενη μετάσταση.

Εδώ πρέπει να γίνει μνεία ωρισμένων νεοπλασμάτων που καταλαμβάνουν ενδιάμεση θέση, των λεγόμενων *ημικακοήθων*, τα οποία γενικώς παρουσιάζουν καλοήθη ιστολογικό χαρακτήρα, αλλά είναι ικανά για τοπική υποτροπή (Παπαχαράλαμπος 1981, Παπαδημητρίου 1988). Η έννοια, όμως, της υποτροπής συνδέεται στενά με την χειρουργική επέμβαση και, ως εκ τούτου, είναι, σαφώς, δευτερογενής.

Όλα τα νεοπλάσματα μπορούν να διαιρεθούν και βάσει του ιστού προέλευσης σε αυτά της *επιθηλιακής* και *μεσεγχυματικής* προέλευσης. Η περαιτέρω ταξινόμηση ερείζεται επί της ομοιότητας με ώριμους κανονικούς ιστούς (Ackerman, 1996). Τα νεοπλάσματα της μεσεγχυματικής προέλευσης λέγονται και όγκοι μαλακών μορίων, τα δε κακοήθη εξ αυτών - *σαρκώματα*.

Η ικανότητα των νεοπλαστικών κυττάρων να διασπείρονται από την πρωτοπαθή εστία σε απομακρυσμένες θέσεις και να αναπτύσσονται εκεί είναι η ειδοποιός διαφορά και, ταυτόχρονα, η πιο ανεπιθύμητη ιδιότητα των κακοήθων όγκων (Fidler, 1990). Η διαδικασία αυτή επιτρέπει η ανάπτυξη της νεοπλαστικής μάζας να προσεγγίσει την εκθετική καμπύλη, δεν είναι δε διόλου παράξενο ότι οι περισσότεροι θάνατοι από καρκίνο οφείλονται στην παρουσία ανθεκτικών μεταστάσεων (Killian et al., 1989).



1.2. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΩΝ ΚΑΚΟΗΘΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΙΩΝ.

Μονίμως το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας παραμένει εστραμμένο στα αίτια των, κατά πρώτο λόγο, κακοήθων νεοπλασμάτων. Πολλοί παράγοντες θεωρούνται με ασθενή σημασία υπεύθυνοι (αυξάνουν δηλαδή την πιθανότητα εμφάνισης) για την φυσικά απαντώμενη κακοήγη μετατροπή φυσιολογικών κυττάρων οι σημαντικότεροι δε εξ αυτών αναφέρονται κατωτέρω:

1. Ακτινοβολία. Όλες οι ιονίζουσες ακτινοβολίες (σωματιδιακές α και ηλεκτρομαγνητικές γ και χ) είναι καρκινογόνοι (Fajardo, 1986). Έκθεση σε ατομικές εκρήξεις και ιατρογενείς - επαγγελματικές ακτινοβολίες έχει άμεση και ισχυρή συσχέτιση με την εκδήλωση λευχαιμίας, σαρκωμάτων και άλλων κακοήθων νεοπλασμάτων (Kato et al. 1982, Kohn et al. 1984).

2. Διατροφή. Ενοχοποιείται για την ανάπτυξη 30-50% καρκίνων αμφοτέρων των φύλων (Doll 1980, Newell 1981). Ενίοτε η ύπαρξη καρκινογόνων ουσιών σε τροφές είναι αποτέλεσμα παρασκευής ή συντήρησης των τελευταίων (Kallistratos et al., 1984). Πειράματα επί ζώων ανέδειξαν τα εξής τροφικά συστατικά ως καρκινογόνα:

a) υδραζίνες αμανιταρίων (Toth, 1972),

b) μερικά αλκαλοειδή της πυρρολιζιδίνης φυτών (McLean, 1970).

c) εκχυλίσματα της γκοσσυπόλης των βαμβακελαίων (Haroz et al., 1980).

d) θειοκυανούχα παράγωγα της μουστάρδας (Dunnick, 1982).

e) προϊόντα πυρόλυσης του καβουρδισμένου καφέ, όπως η μεθυλογλυομάλτωση (Sugimura et al., 1983), επίσης η καφεΐνη (Armuth et al., 1981) και η θεοβρωμίνη (Renner et al., 1982) είναι μεταλλαξιογόνα, η δε κατανάλωση του καφέ μπορεί να συσχετισθεί επιδημιολογικώς με τον καρκίνο του παγκρέατος και της ουροδόχου κύστεως (Trichopoulos et al., 1981).

f) οι νιτροζαμίνες, προϊόντα αντίδρασης αμινών με τα εν χρήσει ως συντηρητικά νιτρικά άλατα (Newell 1981, 1983).

g) πλούσιες σε κρέας και ψάρια δίαιτες ως προς τον καρκίνο του μαστού (Armstrong et al. 1975, Vorherr 1980).

h) το κάπνισμα ως προς την εκδήλωση καρκίνου του λάρυγγα, των πνευμόνων, του οισοφάγου, της στοματικής κοιλότητας και της ουροδόχου κύστεως (USA Department of Health and Human Services, 1982).

3. Χημικοί παράγοντες. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: άμεσα καρκινογόνα, που επιδρούν ευθέως σε κυτταρικά στοιχεία, και έμμεσα, που απαιτούν επί τούτω μεταβολική προαγωγή (Robbins, 1989). Η δεύτερη κατηγορία υπερβαίνει κατά πολύ σε αριθμό την πρώτη (Kalrouzos, 1996).

4. Κληρονομική προδιάθεση του ατόμου, η οποία ευρέθη να έχει σχέση με την ανάπτυξη νεοπλασμάτων γενικώς (Knudson, 1981) και ειδικά όγκων μαλακών μορίων (Tucker and Fraumeni 1982, Nilbert et al. 1990, Sreekantiah et al. 1991, Enzinger and Weiss 1995).

5. Ανοσοανεπάρκεια και ανοσοκαταστολή, παθολογική ή με θεραπευτικούς σκοπούς είναι γνωστόν ότι προκαλούν είτε προωθούν μια ποικιλία τύπων καρκίνου, ιδίως σαρκωμάτων (Enzinger and Weiss, 1995).

6. Τραυματισμός φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη σαρκωμάτων, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις το τραύμα απλώς επιστά την προσοχή στο υποκείμενο νεόπλασμα (Enzinger and Weiss 1995, Ackerman 1996).

7. Ογκογόνοι ιοί μετά την ανακάλυψη του ιού σαρκώματος πτηνών το 1909 καταλαμβάνουν όλο και πιο τιμητική θέση μεταξύ των αιτιών του καρκίνου (Stryer,

1995). Κάτωθι αναφέρονται τρεις σημαντικότεροι καρκινογόνοι DNA-ιοί ανθρώπινης προέλευσης:

a) ο ιός Epstein-Barr (EBV) εισέρχεται στην διαδικασία εκδήλωσης του λεμφώματος Burkitt και του καρκινώματος ρινοφάρυγγος (Dillner et al., 1988),

b) ο ιός της ηπατίτιδος Β (HBV) θεωρείται υπεύθυνος για τον καρκίνο ήπατος,

c) ο ιός του παπιλλώματος (HPV) εμπλέκεται στον σχηματισμό καλοήθων επιθηλιακών νεοπλασμάτων, ενώ υπάρχουν ενδείξεις περί συμμετοχής του σε συγκεκριμένους καρκίνους (Ostrow et al. 1987, Bonfiglio et al. 1988).

1.3. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.

1.3.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ: ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΕΝΕΡΓΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΟΥ ΕΩΣ ΤΗΣ ΕΚΔΗΛΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΚΟΗΘΟΥΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ.

Πολλά είναι τα στοιχεία του κυτταρικού περιβάλλοντος που μπορούν να προξενήσουν πρόσκαιρη κυτταρική μετατροπή. Η κακοήθης, όμως, μετατροπή θεωρείται, ως γνωστόν, μη αντιστρέψιμος. Τούτο υπαινίσσεται μόνιμες αλλαγές του γονιδιώματος. Πράγματι, αν κοιτάξουμε προσεκτικά την λίστα των καρκινογόνων παραγόντων, θα αντιληφθούμε ευκόλως ότι έχουν μια κοινή ιδιότητα: να σχετίζονται άμεσα με, ή να προκαλούν συνθήκες αλλοίωσης των δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων. Άλλωστε και διάφορες πυρηνικές ατυπίες (Paracharalambus, 1981), χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Sharma et al., 1996) των μεταλλαγμένων κυττάρων ενισχύουν επαρκέστατα αυτή την υπόθεση. Έχει δε βρεθεί, τέλος, ότι το μεταλλακτικό δυναμικό μιας ουσίας σχετίζεται με την ικανότητα πρόκλησης καρκίνου (Hesketh, 1995, introduction).

Με ποιόν τρόπο οι καρκινογόνοι παράγοντες επηρεάζουν το DNA; Κάποτε με άμεση φυσική διαδικασία (όπως π.χ. η ακτινοβολία), πολύ δε συχνότερα έμμεσα. Ήδη επεσημάνθη ο διαφασικός μηχανισμός καρκινογένεσης των περισσότερων χημικών καρκινογόνων, τα οποία απαιτούν προκαταρκτική μεταβολική μετατροπή σε ενεργό μορφή. Σήμερα πιστεύεται ότι και ο ρόλος μερικών προκαλούντων καρκίνων ιών (π.χ. οι ιοί της ηπατίτιδος) συνίσταται στην εγκατάσταση ωρισμένων συνθηκών, που συμβάλλουν είτε στην πρωτογενή αλλοίωση του DNA (δηλαδή προγενετικώς), είτε στην επιτυχή εκδήλωση, επιβίωση και συντονισμό κυττάρων με ήδη μεταλλαγθέν DNA (επιγενετικώς) (Ullrich et al., 1994). Από τις καταστάσεις που παρακινούν αλλαγές του γονιδιώματος πρέπει να μνημονευθούν μόνιμες φλεγμονές και νεκρώσεις, γενικά ο,τιδήποτε προκαλεί έντονο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς ένας, έστω και πολύ μικρός, κίνδυνος αλλαγής του γενετικού υλικού ενέχεται στην διαίρεση καθ'εαυτήν. Αντίστροφα, τα κύτταρα με μειωμένη ικανότητα επιδιόρθωσης μιτωτικών αλλοιώσεων DNA είναι πλέον μετατρέψιμα σε καρκινικά (Hesketh, 1995).

Εδώ αξίζει να γίνει μια διευκρίνιση. Στην καρκινογένεση υπό την γενική έννοια δύνανται να διακριθούν δύο φάσεις (Pitot, 1986). Η φάση της έναρξης (initiation) σημασιοδοτείται από ένα φάσμα γεγονότων που ολοκληρώνονται στην νεοπλασματική μεταμόρφωση σωματικού κυττάρου. Η δεύτερη φάση, εκείνη της προώθησης (promotion), έχει ως αποτέλεσμα την συντήρηση καρκινικών κυττάρων και την συγκρότηση αυτών σε ιστολογικώς διακεκριμένη μορφή - όγκο. Θα δούμε παρακάτω ότι, αν ληφθεί με την αυστηρώς χρονική σημασία, η διαίρεση αυτή δεν είναι αληθής. Εν τούτοις και ως προς την επενέργεια έμμεσων καρκινογόνων σε DNA, το στάδιο εισαγωγής της ουσίας στο κύτταρο πολλακώς ονομάζεται έναρξη, ενώ κάποια

διευκόλυνση της μετατροπής σε ενεργό μορφή - προώθηση. Αυτή την διάζευξη θα την αντιμετωπίσουμε λεπτομερέστερα όταν μιλήσουμε για την χημική καρκινογένεση.

Τα γονίδια, που υπό κατάλληλες συνθήκες μπορούν, μεταμορφωμένα, να οδηγήσουν σε κακοήγη μετατροπή, λέγονται ογκογονίδια. Υποστηρίζεται ότι διαδραματίζουν τον κεντρικό ρόλο στην εκδήλωση του κακοήθους φαινοτύπου (Baltimore 1986, Hesketh 1995). Πλέον σημαντικό όμως είναι το γεγονός ότι στο υγιές κύτταρο προϋπάρχει στενώς ομόλογο προς τα ογκογονίδια γενετικό υλικό, τα λεγόμενα πρωτοογκογονίδια (Pillai, 1992). Τούτο έγινε αντιληπτό μετά την ταυτοποίηση του γονιδιώματος μερικών ρετροϊών: το υπεύθυνο για την κακοήθεια RNA κατάγεται από γονίδια κυττάρων ξενιστών (Stryer, 1995). Ενίοτε η μεταμόρφωση πρωτοογκογονιδίου σε ογκογονίδιο συμβαίνει χωρίς να μεσολαβεί μετάλλαξη στο εν λόγω πρωτοογκογονίδιο, αλλά σε διάφορα γονίδια που ρυθμίζουν την έκφρασή του (Hesketh, 1995).

Όπως και όλα τα άλλα γονίδια, τα ογκογονίδια ασκούν τη δραστηριότητά των μέσω των κωδικοποιημένων υπ'αυτών πρωτεϊνών (ογκοπρωτεΐνες). Οι μεταβολές των ογκογονιδίων συνδέονται με τις αντίστοιχες μεταβολές των επιπέδων των ογκοπρωτεϊνών (Sakorafas et al., 1995). Οι τελευταίες, καταλαμβάνοντας διάφορες κυτταρικές θέσεις, διέπουν, πιστεύεται, όλο το φάσμα κακοήθων κυτταρικών ιδιοτήτων, εν συνεχεία δε τις μακροεκδηλώσεις του καρκίνου. Θα εξετάσουμε αυτή την διαδικασία προσεκτικότερα παρακάτω.

Έχει ήδη αναφερθεί η συμμετοχή μερικών RNA-ιών στην καρκινογένεση. Μεταξύ των γονιδίων, που κωδικοποιούν τις κλασικές ιϊκές πρωτεΐνες: την αντίστροφη μεταγραφάση, τις καψικές και δεματικές πρωτεΐνες κλπ., οι ρετροϊοί περιέχουν αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, οι οποίες επιταχύνουν πολλαπλασίως την διαίρεση των κυττάρων ξενιστών (Martin, 1970). Τούτο αποτελεί σημαντικό βήμα στην αναπαραγωγή του ιού, καθώς οι RNA-ιοί είναι, γενικώς, ήπιοι, εξέρχονται δε από το κύτταρο πολλές φορές χωρίς να επιφέρουν λύση του ξενιστή. Εισαγόμενοι σε κατάλληλα κύτταρα αυτοί οι ρετροϊοί οδηγούν στην ταχεία και οριστική καρκινογένεση (Bishop, 1985), αντιστρόφως δε, κατόπιν αφαιρέσεως των ογκογονιδίων η ανάπτυξη του ιού παρεμποδίζεται πλήρως. Οι εκφραζόμενες, όμως, κατά την ιϊκή εισβολή ογκοπρωτεΐνες απεδείχθησαν είτε παρόμοιες (Der et al. 1982, Collett et al. 1981), είτε σχεδόν ταυτόσημες (Waterfield et al., 1983) με κάποιες κανονικές κυτταρικές πρωτεΐνες. Μερικοί DNA-ιοί είναι επίσης ισχυρώς καρκινογόνοι, αλλά η προέλευσή των από κυτταρικά πρωτοογκογονίδια δεν έχει αποδειχθεί (Hesketh, 1995).

Σήμερα πιστεύεται ότι ο προεξέχων μηχανισμός της καρκινογένεσης υπό των ρετροϊών συνίσταται στην επιρροή του ιϊκού γονιδιώματος επί της έκφρασης πρωτοογκογονιδίων του ξενιστή και συντελείται μ'έναν από τους ακόλουθους τρόπους (Kung et al. 1991):

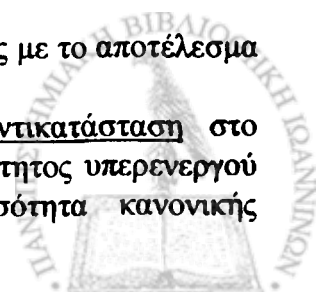
1) Θραύση του πρωτοογκογονιδίου δια εισαγωγής εντός του ιϊκού γενετικού υλικού (ενθετική μετάλλαξη).

2) Επαγωγή του πρωτοογκογονιδίου από έναν γειτονικώς εντεθειμένο ιϊκό ενισχυτή (cis - ενεργοποίηση).

3) Ρύθμιση της μεταγραφής του πρωτοογκογονιδίου μέσω μιας ιϊκής πρωτεΐνης (trans - ενεργοποίηση).

4) Ανταλλαγή μεταξύ του ιϊκού και του κυτταρικού γονιδιώματος με το αποτέλεσμα το πρωτοογκογονίδιο να υποπίπτει του ιϊκού ελέγχου.

Εκτός από την παρεμβολή ιού, απαλειφή ή τοπική αντικατάσταση στο πρωτοογκογονίδιο οδηγεί συνήθως στην παραγωγή κανονικής ποσότητας υπερενεργού πρωτεΐνης. Ο αναδιπλασιασμός του επιφέρει υπέρμετρη ποσότητα κανονικής



ογκοπρωτεΐνης, ενώ χρωμοσωμικός ανασυνδυασμός επίσης δύναται να απελευθερώσει το πρωτοογκογονίδιο από τον ρυθμιστικό έλεγχο. Όλα τα ως άνω φαινόμενα μπορούν να συνεπιφέρουν κακοήγη μετατροπή μέσω διαφορετικών οδών (Hesketh, 1995).

Γνωρίζουμε τον ηυξημένο πολλαπλασιασμό ως την κυριωτέρα συνιστώσα της συμπεριφοράς των καρκινικών κυττάρων. Υπό κανονικές συνθήκες τα ευρισκόμενα εν ηρεμία σωματικά κύτταρα παρακινούνται προς διαίρεσιν υπό των αυξητικών ή μιτωτικών παραγόντων, των οποίων η δράση διακρίνεται σε: μεταβολικές αποκρίσεις (εισροή Na^+ , Ca^{2+} , γλυκόζης, αμινοξέων, φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, γλυκόλυση) και σε παράλληλη μεταγραφή έως 100 γονιδίων (Almendral et al. 1988, Zipfel et al. 1989). Αμφότερες οι οδοί ολοκληρώνονται στο πέρασμα του κυττάρου στην φάση αναδιπλασιασμού του DNA. Πάρα πολλά ογκογονίδια σχετίζονται μ'αυτή την διαδικασία, όπως φαίνεται από τον ακόλουθο πίνακα :

Πίναξ 1. Λειτουργική ταξινόμηση επιλεγμένων ογκοπρωτεϊνών (Hunter, 1991).

- 1) Μιμητές αυξητικών παραγόντων (π.χ. αυξητικού παράγοντος αιμοπεταλίων).
- 2) Τυροσινοκινάσες.
 - 2.1) Συνδεδεμένες με υποδοχείς (π.χ. με τους υποδοχείς του επιδερμικού αυξητικού παράγοντος).
 - 2.2) Ανεξάρτητες από τους υποδοχείς πλασματικές τυροσινοκινάσες.
 - 2.3) Ανεξάρτητες από τους υποδοχείς μεμβρανικές τυροσινοκινάσες.
- 3) Υποδοχείς δίχως την δραστηριότητα τυροσινοκινασών.
- 4) Μεμβρανικές G-πρωτεΐνες και πρωτεΐνες δεσμεύουσες τη GTP (προϊόντα της οικογένειας των ογκογονιδίων ras).
- 5) Κυτταροπλασματικές σερινοκινάσες (ογκογονίδια c-mos, c-raf).
- 6) Μικτές πρωτεϊνοκινάσες (π.χ. σερινο-, θρεονινο-, τυροσινο-κινάσες).
- 7) Διάφοροι κυτταροπλασματικοί ρυθμιστές.
- 8) Ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (κυκλίνη D1).
- 9) Πυρηνικές ογκοπρωτεΐνες, παράγοντες μεταγραφής κλπ. (ογκογονίδια c-myc, c-fos, c-jun κ.ο.κ.).
- 10) Ένζυμα ελέγχου της σωστής μεταγραφής.
- 11) Πρωτεΐνες με εντόπιση στις μεμβράνες μιτοχονδρίων.
- 12) Άγνωστες λειτουργίες.

Οι ογκοπρωτεΐνες της πρώτης κλάσεως λειτουργούν ως αυτοεκκρινόμενοι αυξητικοί παράγοντες και ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό μέσω ομαλών κυτταροπλασματικών υποδοχέων και, κατά τα άλλα, ομαλού κυτταρικού κύκλου, αν και η σηματοδότησή των διαφέρει σε λεπτομέρειες εκείνης των κανονικών αυξητικών παραγόντων. Εκτός αυτής της εξωκυτταρικής σηματοδότησης, διαταραχή κατ'αρχήν οιαδήποτε μετέχοντος στον κυτταρικό κύκλο γονιδίου δύναται να ενεργοποιήσει την περαιτέρω διαδικασία. Επί παραδείγματι, υπερδραστητικότητα των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων οδηγεί στην μόνιμη ενεργοποίηση του επόμενου κρίκου - μιας σηματομεταβιβαστικής πρωτεΐνης και παρακάτω της πρωτεΐνης της οικογένειας RAS, η οποία συνεπάγεται ενεργοποίηση σερινο- και θρεονινοκινασών. Η δε συνεχώς

γενικευόμενη φωσφορυλίωση της σερίνης, εμπλέκοντας και άλλες ογκοπρωτεΐνες, ολοκληρώνεται τελικά στην κυτταρική διαίρεση (Crews et al., 1992).

Μαζί με την οδό θετικής σηματοδότησης της κυτταρικής αύξησης και διαίρεσης, στο κύτταρο υπάρχει σύστημα αρνητικού ελέγχου των ανωτέρω διαδικασιών. Μερικά γονίδια δύνανται να επηρεαστούν από εξωτερικά σήματα, και οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν αναστέλλουν την βιοσύνθεση, κατά πρώτο λόγο του DNA. Σε πολλά κακοήθη κύτταρα η οδός αυτή απενεργοποιείται, με αποτέλεσμα να διαφεύγει το νεόπλασμα της δραστικής επιρροής του περιβάλλοντος (Weinberg, 1996).

Κατ'ουσίαν, η αυτόνομος παρακίνηση υπό των κακοήθων κυττάρων του πολλαπλασιασμού των ιδίων θεωρείται ότι αποτελεί μία των κρίσιμων και πρωτεύουσών ιδιοτήτων του νεοπλασματος. Εάν συνοψίσουμε, δύο παραλλαγές διαφαίνονται καθαρά: ενίσχυση της αυξητικής σηματοδότησης, η οποία προέρχεται από κανονικούς εξωκυτταρικούς παράγοντες, και υποκατάσταση της εξωκυτταρικής παρακίνησης υπό αυτοεκρινόμενων μιμητών. Μια κατεύθυνση θεραπείας του καρκίνου συνίσταται στην εξουδετέρωση των μιμητών μέσω αντισωμάτων ή στην κατάληψη των υποδοχέων από ειδικούς ανταγωνιστές (Walsh et al., 1991).

Αξίζει να επισημανθεί και μια άλλη προσέγγιση στο θέμα τούτο. Η κυτταρική διαφοροποίηση είναι αυτή που σχετίζεται αρνητικά με τον πολλαπλασιασμό. Αν και η καταστολή του πολλαπλασιασμού δεν συνεπάγεται αυτόματα την διαφοροποίηση, φαίνεται να ισχύει το αντίθετο. Η γνώση των μοριακών βάσεων της ομαλής ανάπτυξης και των μηχανισμών που διαζευγνύουν την αύξηση και την διαφοροποίηση κατέστησε δυνατόν να κατασταλεί ο κακοήθης φαινότυπος, έτι και αν συμβεί η μεταμόρφωση (Sachs, 1990). Παρακίνηση της διαφοροποίησης πολλές φορές εξουδετερώνει την έκφραση γενετικών διαταραχών κακοήθους φύσεως, η παρακίνηση δε αυτή δεν απαιτεί την πλήρη αποκατάσταση ελέγχου της αύξησης και, τέλος, δεν συνεπάγεται απαραίτητα παρέμβαση στο γονιδίωμα.

Εξετάζοντας τα κατά την διαφοροποίησιν μοριακά φαινόμενα, κατέληξαν στην αναγνώριση του ρόλου μερικών κυτταρικών ρυθμιστών (αρ. 7, 8 στον πίνακα 1). Της τελικής διαφοροποίησης προηγείται συγκράτηση του κυττάρου στην φάση ηρεμίας μέσω αναστολής της σύνθεσης του DNA, η οποία επιτυγχάνεται δραστικώς δι' αναστολής της κυκλινοεξαρτωμένης κινάσης - cdk (Marks et al., 1996). Υπάρχουν διάφορες κυκλίνες που σχετίζονται με τις cdk. Η δραστικότητα του συμπλέγματος κυκλίνη-cdk εξαρτάται από την γενική φωσφορυλιωτική κατάσταση του κυττάρου: εξωγενείς αυξητικοί παράγοντες επιδρούν μέσω της ενδοκυτταρικής ακολουθίας κινασών, της οποίας αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση πυρηνικών πρωτεϊνών (βλ. επίσης παρακάτω) και αύξηση μεταγραφής των γονιδίων για κυκλίνες, cdk και άλλων (Leake, 1996). Οι κυκλίνες, εν τέλει, απελευθερώνουν την μετάφραση ενός συνόλου πρωτεϊνών, αναγκαίων για το πέρασμα του κυττάρου στην S-φάση (του αναδιπλασιασμού του DNA).

Από την άποψη της δυνατότητας δραστικής αναστολής κρίσιμο σημείο καταλαμβάνουν οι κυκλίνες των D και E τύπων. Η D-κυκλίνη αναστέλλει την RB-πρωτεΐνη, που έχει γενική ανασταλτική δράση επί του κυτταρικού κύκλου. Ο έλεγχος του συμπλέγματος D-κυκλίνη - cdk διαμεσολαβείται από πρωτεΐνες p15 και p16. Η E-κυκλίνη - cdk επενεργεί άμεσα σε παράγοντες μεταγραφής και καταστέλλεται από την ακολουθία p53-p21 (Weinberg, 1996).

Μια ποικιλία διαμεμβρανικών μεταβιβαστικών υποδοχέων μπορούν επίσης, εν περιπτώσει μεταλλάξεως, να καταστήσουν κακοήθεις ωρισμένες καλλιέργειες κυττάρων (De Vivo et al., 1992). Στις περιπτώσεις γενικά των διαμεμβρανικών, μεμβρανικών και κυτταροπλασματικών ενζύμων ο πλέον διαδεδομένος παθολογικός μηχανισμός φαίνεται να είναι ο εξής (Hesketh, 1995): λόγω ενθετικής μετάλλαξης ή απώλειας ενός τμήματος

του υπεύθυνου γονιδίου η ενζυμική πρωτεΐνη χάνει το μέρος όπου προσδέονται τα ρυθμιστικά μόρια, και, τοιουτοτρόπως, το άθικτο λειτουργικό κέντρο καθίσταται μονίμως ενεργόν.

Οι πυρηνικές ογκοπρωτεΐνες, ληφθεισών υπ' όψιν των *in vitro* μελετών, φαίνεται να αποτελούν παράγοντες μεταγραφής εναρκτήριων κωδονίων πολλών άλλων γονιδίων, που έχουν σχέση με την κυτταρική διαίρεση. Η δραστηριότητά τους αυτή μπορεί να ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης (Hunter and Karin, 1992).

Εκδήλωση του κακοήθους φαινοτύπου δι' ογκογονιδίων εξαρτάται από τον ιστολογικό τύπο κυττάρου. Δηλαδή υπερέκφραση κάποιων συνόλων ογκοπρωτεϊνών συσχετίζεται με ωρισμένους τύπους καρκίνου (Fearon and Vogelstein, 1990). Είναι, όμως, δύσκολο να αποφασισθεί εάν τούτο συνιστά το πρωτεύον αίτιο ή συνοδευτικό φαινόμενο, με άλλα λόγια οι συνδυασμοί των εν ενεργεία ογκογονιδίων μπορεί να αντανακλούν ιδιαιτερότητες του κυτταρικού κύκλου διαφόρων τύπων κυττάρων (Murray, 1991).

Πριν εγκαταλείψωμε το ζήτημα του κακοήθους πολλαπλασιασμού, θα προσέξωμε ακόμη ένα σχετιζόμενο φαινόμενο. Και να ενεργήσουν αυξητικοί παράγοντες επί κυττάρου, το κανονικό σωματικό κύτταρο διαθέτει ενδογενείς μηχανισμούς αρνητικής ρύθμισης. Ως παράγων αρνητικής ρύθμισης της αύξησης πρέπει να αναφερθεί η πρωτεΐνη p53, που διέπει επίσης και τον αυτόματο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση), του οποίου ένας αναστολέας (Bcl-2), παρών σε κακοήθη κύτταρα, έχει ταυτοποιηθεί (Merlino, 1994). Η απόπτωση αποτελεί μια γενετικώς προγραμματισμένη διαδικασία, κατά την οποία ένα πολύπλοκο σύνολο σηματοδοτικών αντιδράσεων ακολουθείται από ρήξεως λυσοσωμάτων, συρρίκνωση των μιτοχονδρίων και του πυρήνος (Rapp, 1997). Επέρχεται συνήθως κατόπιν γενετικής αλλοίωσης του κυττάρου. Η φυσική απόπτωση απαντάται συχνότερα στα πρώιμα στάδια της κακοήθειας, ενώ κατόπιν ελλείπει. Τούτο είναι εξακριβωμένο, για παράδειγμα, ως προς τα σαρκώματα μαλακών μορίων (Nakanishi et al., 1997). Τα κακοήθη κύτταρα πιθανότατα αποφεύγουν τον κυτταρικό θάνατο μέσω ειδικών αναστολέων και φαίνεται η αποφυγή της απόπτωσης είναι απαραίτητη προς σταθεροποίηση της κακοήθειας.

Υπάρχει και άλλο ενδογενές πρόγραμμα που ρυθμίζει τον αριθμό κυτταρικών διαίρεσεων, καθώς είναι γνωστόν ότι μετά από 50-60 διαιρέσεις οι καλλιέργειες ομαλών ανθρώπινων κυττάρων σταματούν την αύξηση και επιδεικνύουν προοδευτικώς σημεία γήρατος (Weinberg, 1996). Για να αναπτυχθεί σταθερή κακοήθεια και να γίνουν τα νεοπλαστικά κύτταρα δυνητικώς αθάνατα, το πρόγραμμα τούτο χρειάζεται να αποφευχθεί. Ένας τρόπος αυτής της αποφυγής συζητείται κάτωθι.

Ο αναδιπλασιασμός του DNA, ως γνωστόν, συντελείται με διαφορετικό τρόπο για τις δύο έλικες. Ενώ στην κατεύθυνση 5'-3' προχωρεί ευθέως, η άλλη έλιξ συντίθεται τμηματικώς και κάθε κομμάτι απαιτεί παρουσία μιάς μικρής RNA-αλυσίδας, από την οποία ξεκινώντας λειτουργεί η DNA-μεταγραφάση. Η RNA-αλυσίδα σχηματίζεται βάσει της μητρικής έλικος. Για να συντεθεί όμως το τελευταίο τμήμα, στην μητρική έλικα μέσω ένος ενζύμου, της *τελομεράσης*, προστίθενται επιπλέον νουκλεοτίδια που αποτελούν τελομερές. Τα τελομερή μετά χρησιμεύουν ως πρότυπο για την σύνθεση του RNA- τμήματος (Georgatsou, 1993).

Είναι σαφές ότι χωρίς την δραστηριότητα των τελομερασών εκάστη κυτταρική διαίρεση θα συνωδεύετο από απώλεια του γενετικού υλικού που αντιπροσωπεύεται από το τελευταίο κομμάτι. Εν συνεχεία ο επίμονος πολλαπλασιασμός θα οδηγούσε στον προοδευτικό εκφυλισμό του γονιδιώματος και θα καθιστούσε τα κύτταρα μη βιώσιμα. Οι τελομεράσες, ενώ ενεργούν στα εμβρυικά, είναι κατεσταλμένες στα σωματικά κύτταρα. Περαιτέρω, η δραστηριότητα των τελομερασών διεπιστώθη στην πλειοψηφία των επιθετικών καρκίνων (Sharma et al., 1996). Οι συγγραφείς νομίζουν ότι οι

ενεργοποιημένες τελομεράσες συμβάλλουν στην άρση του αυτόματου κυτταρικού θανάτου και στην επακόλουθη κακοήθη αθανασία.

Η απόπτωση και ο περιορισμός διαδοχικών διαιρέσεων λόγω κατεσταλμένων τελομερασών φαίνεται να αποτελούν ανεξάρτητους αντνεοπλαστικούς μηχανισμούς, καθώς μια πρόσφατη μελέτη (Milas et al., 1998) δείχνει ότι στα κύτταρα του σαρκόματος το επίπεδο δραστηριότητας των τελομερασών δεν συσχετίζεται με το μεταλλακτικό καθεστώς του p53. Αμφότερες οι ανωμαλίες συμβάλλουν επομένως από κοινού στην παθογένεση της ανωτέρω κακοηθείας.

Εκτός από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, άλλες σημαντικές, ρυθμιζόμενες υπό πρωτοογκογονιδίων, ιδιότητες των κυττάρων διέπουν, κατόπιν διαταραχής, την χαρακτηριστική κακοήθη συμπεριφορά:

- α) Μετάδοση πληροφοριών από την πέριξ θεμέλια ουσία εντός του κυττάρου.
- β) Συντονισμός της κυτταρικής κίνησης μ' αυτές τις πληροφορίες.
- γ) Έκκριση υπό του κυττάρου λυτικών ενζύμων.
- δ) Προσκόλληση στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία.
- ε) Αποκόλληση από τα γειτονικά κύτταρα.

Τα ως άνω έχουν ιδιαίτερη σημασία για την διήθηση και την μετανάστευση των κακοήθων κυττάρων. Εν τούτοις, είναι χαρακτηριστική η στροφή που έχει υποστεί η έρευνα σ' αυτόν τον τομέα. Πάει καιρός αφ' ότου διεπιστώθη επιρροή πολλών ογκογονιδίων στην διαδικασία της μετάστασης. Παραδείγματος χάριν, τα γονίδια οικογενειών *myc*, *ras*, *neu* και άλλων επάγουν την μεταστατική διαδικασία, ενώ εκείνα των *fos*, *jun* και άλλα - την καταστέλλουν (Hesketh, 1995). Προς περισσότερη, όμως, κατανόηση χρειάστηκε να υποδιαιρεθεί το μεταστατικό φαινόμενο σε στοιχειωδέστερα μέρη.

Οι καντερίνες (cadherins) αποτελούν μια πολυγονιδιακή οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών, δια των οποίων πραγματοποιούνται η διακυτταρική προσκόλληση και η αγκυροβόληση, επάγεται η κυτταροσκελετική σηματοδότηση, ελέγχονται κάποιες μορφογενετικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της μυογένεσης (Takeichi, 1991). Μία των αιτιών της απουσίας αλληλοπροσκόλλησης των κακοήθων κυττάρων είναι η ανεπαρκής έκφραση της E-καντερίνης, η οποία εξηκριβώθη σε 53% των περιπτώσεων του πρωτογενούς καρκίνου μαστού (Oka et al., 1993). Κακοήθη κύτταρα, στα οποία παρέχεται η δυνατότητα να συγκρατούν την E-καντερίνη στην κυτταρική επιφάνεια (π.χ. αν εισαχθεί το αντίστοιχο DNA), χάνουν την ικανότητα προς διήθησιν.

Ακόμα και αν μεταδοθούν σήματα από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, οι αντιδράσεις αγκυροβόλησης απαιτούν την αντίστοιχη κινητική προσαρμογή του κυττάρου, στην οποία διαμεσολαβεί ο κυτταρικός σκελετός. Υπερφωσφορυλίωσή του υπό μερικών τυροσινοκινασών καθιστά το κύτταρο εύπλαστο, ανίκανο να ολοκληρώσει τις διαδικασίες συντονισμού τοποθεσίας (Stryer, 1995).

Οι ιντεγκρίνες (integrins) είναι μια άλλη οικογένεια πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφανείας, δια των οποίων καθορίζεται η προσκόλληση ενός κυττάρου στο άλλο είτε στην θεμέλια ουσία (Hynes 1992, Pigott and Power 1993), καθώς επίσης η κίνηση και η αύξηση στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Είναι ετεροδιμερείς, καθώς έχουν ταυτοποιηθεί 11 α- και 6 β-υπομονάδες, εκ των οποίων συναρμολογούνται. Η τέτοια σύσταση καθορίζει την εκλεκτικότητα διαφόρων ιντεγκρινών προς διάφορα συστατικά της θεμέλιας ουσίας. Πολλοί καρκίνοι συνοδεύονται από λεπτές μεταβολές επιπέδων διαφόρων ιντεγκρινών: κάποιες αυξάνονται, ενώ άλλες ελαττώνονται (Natali et al. 1992, Waleh et al. 1994, Chan et al. 1991, Albeda et al. 1990, Hodivala et al. 1994). Το συνολικό αποτέλεσμα τούτου είναι αφ' ενός απώλεια της ομαλής προσκόλλησης, αφ' ετέρου τα κακοήθη κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να διασχίζουν, μέσω εκλεκτικής προσκόλλησης, τις βασικές μεμβράνες αγγείων και να κινούνται στην

θεμέλια ουσία ωρισμένων οργάνων, τα οποία, τοιουτοτρόπως, γίνονται στόχοι μετάστασης. Επί παραδείγματι, υψηλή έκφραση της ιντεγκρίνης $\alpha_3\beta_3$, η οποία δεσμεύεται προς την φμπρονεκτίνη, καθορίζει σχετικώς υψηλή πιθανότητα μετάστασης στο ήπαρ (Jiang, 1998). Παρ'ότι ουδεμία ιντεγκρίνη έχει αποδειχθεί ογκοκατασταλτική, τα ιντεγκρινοεξαρτώμενα φαινόμενα εμβαθύνουν κατά πολύ την κατανόησή μας, όσον αφορά στη διήθηση και τη μετάσταση (Heino, 1996).

Η ενεργός αποδόμηση του γύρω ιστού συνιστά αναγκαία συνθήκη της ευκινησίας των καρκινικών κυττάρων, πραγματοποιείται δε μέσω διαφόρων πρωτεολυτικών ενζύμων (Liotta 1986,1989). Κατά πρώτο λόγο τα κακοήθη κύτταρα εκκρίνουν ενεργοποιητές του πλασμινογόνου τύπου πρωτεϊνάσης της σερίνης (Dano et al.,1985), το οποίο, αφού μετατραπεί σε πλασμίνη, ενεργοποιεί, κατά περιστροφήν, τις μεταλλοπρωτεϊνάσες, που και αυτές συντίθενται υπέρμετρα από τα κακοήθη κύτταρα. Καταστολή των ενεργοποιητών πλασμινογόνου σταματάει την διηθητικότητα κακοήθων κυττάρων (Blasi, 1993). Έκκριση και ενεργοποίηση υπό της πλασμίνης διαφόρων μεταλλοπρωτεϊνάσων, όπως των πρωτεϊνάσων της κυστεϊνης (Rozhin et al. 1989, Maciewicz et al. 1989), του ασπαρτικού (Liaudet et al.,1994), της ηπαρινάσης (Nakajima et al.,1983), της ζελατινάσης (Yamagata et al.,1989), της στρομελυσίνης (Matrisian et al.,1986) και άλλων ακολουθείται από ευρεία αποδόμηση της πέριξ θεμέλιας ουσίας, πράγμα που επιτρέπει ανεμπόδιστη προέλαση των καρκινικών κυττάρων εις βάθος του υγιούς ιστού.

Παρατηρητέον ότι στα κανονικώς πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα υπάρχουν πρωτεΐνες επιφανείας (κινάσες διφωσφορικού νουκλεοσίτη, NDP) που αποτρέπουν την μετανάστευση (Keim et al.,1992). Εισαγωγή του DNA των αντίστοιχων γονιδίων αναστέλλει την πρωτογενή ογκοποίηση και την μετάσταση *in vivo* (Leone et al.,1993). Ουσιαστικά, μπορεί κανείς να μιλήσει εν τη περιπτώσει ταύτη για *αντιογκογονίδια*. Είναι γονίδια ρυθμιστές της κυτταρικής διαίρεσης, αύξησης και διαφοροποίησης, των οποίων απώλεια συνεπάγεται κακοήθη μεταμόρφωση (Klein, 1987), ενώ δεδομένης ήδη μιας κυτταρικής μεταμόρφωσης η επανεισαγωγή των στο γονιδίωμα αναστέλλει την εξέλιξη του κακοήθους κυττάρου (Miller et al.,1991). Εκτός των NDP έχουν περιγραφεί άλλα δύο ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα οποία εμνημονεύσαμε και παραπάνω: το p53 και το RB ή γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Bauknecth et al.,1988). Η RB-πρωτεΐνη ελέγχει την κυτταρική διαίρεση μέσω αναστολής ειδικών προωθητών της κυτταρικής αύξησης (Leake, 1996), ενώ το p53 αναστέλλει την αναπαραγωγή κυττάρων με βλάβες γονιδιώματος (Leake, 1996), αποτελώντας έτσι ανασταλτικό της αύξησης όγκου παράγοντα (Merlino, 1994).

Αξίζει όμως να προσέξει κανείς ότι η έννοια του αντιογκογονιδίου ουδόλως δύναται να τεθεί σε *αντίθεση* προς ταύτην του ογκογονιδίου, εάν διατηρήσωμε την ως άνω δεδομένη σημασία του όρου. Οι ανωτέρω συγγραφείς ισχυρίζονται ότι μετάλλαξη των p53 και RB γονιδίων συνεπάγεται ταχεία καρκινογένεση, καθώς και ο Hesketh (Hesketh, 1995) τα αντιλαμβάνεται ως ογκογονίδια. Το αντιογκογονίδιο, συμφώνως προς τούτη την αντίληψη, πρέπει να νοηθεί ως ογκογονίδιο, το οποίο καταλαμβάνει τέτοια σημαντική θέση στο ρυθμιστικό δίκτυο, ώστε η επαγωγή του, σε περίπτωση που είναι *κανονικό*, οδηγεί στην καταστολή της κακοήθους ανάπτυξης. Άλλοι ερευνητές (Weinberg, 1996) τείνουν να αποδίδουν την ονομασία «ογκογονίδιο» σε γονίδια προωθητές της κυτταρικής αύξησης, ενώ τον όρο «ογκοκατασταλτικό γονίδιο» (*tumor suppressor gene*) χρησιμοποιούν για την αλυσίδα του αρνητικού ελέγχου. Τούτο δεν συνιστά παρά διαφορά ορολογίας, αρκεί να θυμάται κανείς ότι τα αντιογκογονίδια εμπλέκονται εξ'ίσου στην *in vivo* καρκινογένεση.

Άλλες σημαντικές ιδιότητες κακοήθων κυττάρων μπορούν, στην ουσία, έστω και αδρώς, να εξαχθούν από τα παραπάνω. Από την στιγμή που υπάρχει έκφραση

μεταλλαγμένων γονιδίων, όπως συμβαίνει στα καρκινικά κύτταρα, οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες επιφανείας καθίστανται στόχοι του ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι προκύπτει η *αντιγονικότητα*, που διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην επιβίωση των κακοήθων κυττάρων, για την οποία θα μιλήσουμε παρακάτω.

Ένας πληθυσμός νεοπλαστικών κυττάρων αποτελεί ιδιαίτερο σύστημα, του οποίου το καθεστώς διαφέρει ριζικά από άλλους πληθυσμούς σωματικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται συνεχώς, αφ'ετέρου εξοβελίζονται έντονα λόγω δυσμενών συνθηκών του περιβάλλοντος και ανοσοποιητικής αντίστασης, συναγωνιζόμενα με όλα τα άλλα είδη κυττάρων για ζωτικό χώρο. Τετοια κατάσταση μας θυμίζει πολύ τις ουσιαστικές συνθήκες της δαρβινικής εξέλιξης. Και πράγματι, εφαρμογή της εξελικτικής προσέγγισης στα κακοήθη φαινόμενα υπήρξε γόνιμη (Hellman, 1997). Η κυριώτερη συνέπεια των εξελικτικών διαδικασιών είναι η ηυξημένη ανθεκτικότητα των νεοπλαστικών κυττάρων σε διάφορων ειδών εξωτερικές πιέσεις, ειδικότερα δε η *πολυφαρμακευτική αντοχή*. Παρ'ότι τα κακοήθη κύτταρα είναι τρωτά πλειότερον των κανονικών κυττάρων, εν τούτοις αναπτύσσουν ειδικούς μηχανισμούς καταστολής της πρόσληψης και της μεταφοράς χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Εξ'αιτίας τούτου οι αποτελεσματικές δόσεις είναι επιβλαβείς και για τα υγιή κύτταρα (Bashir et al., 1993), πράγμα που παρακωλύει αρκετά την εφαρμογή της κυτταροτοξικής στρατηγικής. Τρία μέλη του μεταφορικού συστήματος έχουν ειδικά συσχετισθεί με την πολυφαρμακευτική αντοχή: η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη, η σχετιζόμενη με την πολυφαρμακευτική αντοχή πρωτεΐνη (multidrug resistance-associated protein) και η σχετιζόμενη με την φαρμακευτική αντίσταση του πνευμονικού παρεγχύματος πρωτεΐνη (lung resistance-related protein ή LPR). Η τελευταία, παραδείγματος χάριν, εντοπίζεται στα πρωτεϊνικά σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων και επηρεάζει την πυρηνοπλασματική μεταφορά φαρμάκων. Η προστατευτική δράση της LPR επεκτείνεται πέραν των δύο πρώτων πρωτεϊνών, καθώς συμπεριλαμβάνει και τις ενώσεις λευκόχρυσου (Izquierdo et al., 1996). Πολλοί συγγραφείς καταλήγουν, όπως και ο Sachs (Sachs, 1990), στην θετική εκτίμηση ελέγχου της φαινοτυπικής κακοήθειας ως εναλλακτικής προσέγγισης.

Όσον αφορά στις *μεταβολικές τροποποιήσεις*, είναι σαφές ότι η συνεχής διαίρεση και ευκινησία των κακοήθων κυττάρων απαιτεί αντίστοιχες ενεργητικές προσαρμογές. Η συμβολή των αυξητικών παραγόντων συνίσταται στην παρακίνηση της εισόδου θρεπτικών συστατικών εντός του κυττάρου (Zipfel et al. 1989, Guyton 1994), η οποία είσοδος όμως δεν ολοκληρώνεται στην αποθήκευσή τους, αλλά συνεπιφέρει τις περαιτέρω μεταβολικές αντιδράσεις με τον τελικό στόχο την παραγωγή DNA, RNA και πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου τα κακοήθη κύτταρα δεν έχουν επαρκείς ποσότητες αποθηκευμένων θρεπτικών ουσιών, όπως το γλυκογόνο, και καθίστανται επιπλέον ευάλωτα σε διάφορων ειδών θεραπευτική αγωγή, συμπεριλαμβανομένης της χημειοθεραπείας (Bashir et al., 1993). Άλλωστε η δραστηκώτατη προσαρμογή των στην ανοσοποιητική και φαρμακευτική πίεση εξουδετερώνει κατά πολύ το μειονέκτημα τούτο.

Μια εξήγηση της φαρμακευτικής αντοχής εκ μεταβολικής σκοπιάς παρέχουν οι γλουταθειον-S-τρανσφεράσες (GSTs). Παρουσιάζονται ως οικογένεια ενζύμων που εμπλέκεται στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ενώσεων (Mannervik et al., 1985). Υπάρχουν τουλάχιστον 4 κλάσεις των ανθρώπινων GSTs (α, μ, π και θ), εκάστη των οποίων ειδικεύεται στην επικόλληση της ανηγμένης γλουταθειόνης επί μίαν ποικιλία ηλεκτρόφιλων και υδρόφοβων ουσιών, μετατρέποντας αυτές σε πλέον διαλυτή και ευκολότερα αποβαλλόμενη μορφή (Mannervik et al., 1992). Εν τούτοις, η GSTπ βρέθηκε αυξημένη σ'ένα ευρύ φάσμα κακοήθων νεοπλασμάτων (Hirata et al., 1992). Πιστεύεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αντοχής κατόπιν υποβολής σε φαρμακευτική πίεση (McLellan and Hayes, 1987). Από άλλης πλευράς,

αυξημένη έκφραση της GSTπ στην πλειοψηφία των πρωτοπαθών όγκων είναι παρούσα και προτού υποστεί ο ασθενής χημειοθεραπεία (Volm et al.,1992), οπότε εδώ μιλάμε για τον πρώιμο κακοήθη φαινότυπο και όχι για αποτέλεσμα μακράς κλωνοποίησης. Εξαιρέσει αποτελεί το αδενοκαρκίνωμα προστάτου, στο οποίο η έκφραση της GSTπ είναι λίαν ηλαττωμένη και τούτο συμπεριλαμβάνεται στον φαινότυπο της εν λόγω κακοηθείας (Moskaluk et al.,1997).

Έντονη χρήση ενέργειας εκ μέρους των κακοήθων κυττάρων οδηγεί στον ανώμαλο μεταβολισμό της γλυκόζης, ειδικότερα σε υπεροχή της αναερόβιας οξείδωσης, με αποτέλεσμα την ιδιαίτερη ευαισθησία του νεοπλάσματος στην στέρηση από ουσίες που προσφέρουν ενέργεια (Karczmar et al.,1992). Τέλος, η συνεχής αποδεματοποίηση του DNA προς αναδιπλασιασμόν αυτού, όπως συμβαίνει στα κακοήθη κύτταρα, παρέχει στα μόρια, που έχουν συγγένεια με δεοξυριβονουκλεϊνικά οξέα, τη δυνατότητα να παρέμβουν ενεργώς (Stewart et al.,1994), αφού τη βάση της χημειοθεραπείας αποτελούν μόρια-συζευκτές του DNA. Γενικά, μια βιοχημική συνέπεια της κακοηθείας είναι αύξηση της συνολικής ποσότητας του DNA και RNA, η οποία μορφολογικώς εκδηλώνεται συχνά με αύξηση του πυρήνος εις βάρος του πρωτοπλάσματος (Nonpi, 1997).

Αφού έχουμε αναλύσει τις στοιχειώδεις φαινοτυπικές ιδιότητες των κακοήθων κυττάρων, μπορούμε να συμπεράνωμε ότι όλες τους συνδέονται με γενετικές ανωμαλίες. Αυτό το γεγονός υποδεικνύει τις αρμόζουσες κατευθύνσεις θεραπείας, όπως την φαρμακευτική παρέμβαση στον κυτταρικό κύκλο, εξειδικευμένη καταστολή της έκφρασης μεταλλαγμένων γονιδίων, παραγωγή ειδικών αντισωμάτων. Από άλλης όψεως, η ευκολία, με την οποία μπορεί να εισαχθεί γενετικό υλικό εντός του σωματικού κυττάρου, καθιστά δυνατή την εισαγωγή επιλεγμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Gutierrez et al.,1992).

1.3.2. ΕΠΙΠΕΔΟ ΙΣΤΟΥ . ΟΓΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ.

Μεμονωμένα κακοήθη κύτταρα δεν είναι δυνατόν να προξενήσουν τα ίδια οιαδήποτε παθολογική κατάσταση. Απαιτείται μετάβαση σε άλλο επίπεδο, όπου η επίμονη ανάπτυξη των μεταλλαγμένων κυττάρων θα οδηγήσει στην διαμόρφωση νεοπλαστικής μάζας, η οποία διαθέτει άλλες, ήδη επικίνδυνες, ιδιότητες. Και οι ιδιότητες των μεμονωμένων κυττάρων προσεγγίζονται, κατόπιν τούτου, από άλλη σκοπιά, π.χ. διεξάγεται λόγος για την διασπορά κακοήθων κυττάρων και όχι απλώς για την ευκινησία τους.

Έχει επισημανθεί (σελ. 5) η αντίληψη της παθολογικής ανάπτυξης ως εκτυλισσόμενη σε δύο στάδια, εκείνα της έναρξης και της προώθησης. Εν τούτοις, αυτά, κατά τη γνώμη μας, αντανακλούν διαφορά φυσιολογικού επιπέδου μάλλον, παρά την χρονική ακολουθία. Βέβαια, οι βασικές ιδιότητες των νεοπλαστικών κυττάρων, όπως ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός, η απουσία συντονισμού με το κυτταρικό περιβάλλον κλπ., διέπουν, αθροιζόμενα στο χώρο, την χαρακτηριστική συμπεριφορά του όγκου (Tsakralidis, 1981). Από άλλης όμως πλευράς, οι έρευνες με κυτταρικά σφαιρίδια έδειξαν την μεγάλη επιρροή του μικροπεριβάλλοντος επί των βιολογικών εκδηλώσεων των κακοήθων κυττάρων (Mueller-Klieser, 1987). Εντός μιας περιοχής του όγκου υπάρχει πολύπλοκη εικόνα πρηνούς πολλαπλασιασμού και αγγειογένεσης, κυτταρικής ετερογένειας κ.ο.κ. Δηλαδή, αυστηρά μιλώντας, δεν ευσταθεί ο ισχυρισμός ότι τα κακοήθη κύτταρα, κατόπιν πολλαπλασιασμού, αναπτύσσουν όγκο, ή, αλλιώς, ένα πλήρως διαμορφωμένο καρκινικό φαινότυπο δεν απαντάται απουσία όγκου και αντιστρόφως.

Ούτε η καθοριστική για ανάπτυξη καρκίνου γονιδιακή μετάλλαξη συμβαίνει εφ'άπαξ. Κάποτε μπορούμε να περιορίσωμε χρονικώς την γονιδιακή μετάλλαξη, η φαινοτυπική, όμως, κακοήθεια, όπως θα δούμε παρακάτω, είναι αναπόσπαστα δεμένη και αναπτύσσεται συντονισμένα με τις αλλοιώσεις του εκάστοτε κυτταρικού περιβάλλοντος. Συχνότερα δε (στις περιπτώσεις της φυσικής καρκινογένεσης) η στιγμή της οριστικής γενετικής μεταμόρφωσης τελεί υπό ερώτησιν. Έτσι, είναι γνωστό ότι η μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδος Β συνεπάγεται κίνδυνο καρκίνου (Ullrich et al., 1994), αλλά είναι ασαφές πότε ακριβώς το προκαρκινικό στάδιο (φλεγμονές, νεκρώσεις, αποκαταστάσεις του λειτουργικού ιστού) επιφέρουν τη μη αντιστρέψιμη μεταλλαγή και πόσος χρόνος μεσολαβεί μέχρις ότου γίνει δυνατή οποιαδήποτε διάγνωση.

Τα ως άνω θα υποστηριχθούν επαρκώς αν επισκοπήσωμε την διαδικασία ογκοποίησης. Είναι γνωστό ότι του σταθερώς κακοήθους όγκου προηγείται περίοδος ανώμαλης ανάπτυξης του αντίστοιχου ιστού. Ως εκ τούτου τίθεται το ζήτημα σταδιοποίησης της καρκινογένεσης, το οποίο διηρευνήθη περισσότερο από την ιστολογική άποψη. Ήδη έχομε επανειλημμένως ομιλήσει περί του ιού της ηπατίτιδος Β (HBV) σχετικώς προς το ηπατικό καρκίνωμα. Μελέτες επί διαγονιδιακών μυών (Ullrich et al., 1994) έχουν εξακριβώσει ότι του κακοήθους καρκινώματος προϋπάρχουν προοδευτικές αλλαγές του ήπατος, αρχίζοντας από προνεοπλαστικές βλάβες, ακολουθούμενες υπό καλοήθους αδενώματος. Επιγενετικά συμβάντα, κατά τους μελετητές, μάλλον υπερτερούν στην ανάπτυξη του καρκίνου ανθρώπου.

Πρέπει να παρατηρηθεί εδώ η μεγάλη γενική χρησιμότητα των διαγονιδιακών ποντικίων στην έρευνα της πολυβηματικής διαδικασίας της καρκινογένεσης (Breuer, 1991), ειδικότερα στην κατανόηση λεπτομερειών της έκφρασης ογκογονιδίων.

Όταν χρησιμοποιείται ένα συγκεκριμένο μοντέλο καρκινογένεσης με δεδομένο καρκινογόνο, του οποίου οι ιδιότητες είναι γνωστές, π.χ. το μοντέλο καρκίνου του δέρματος μυών, η λεπτομερής επιτομή της διαδικασίας παρουσιάζεται ως εξής (DiGiovanni, 1992):

I. Έναρξη.

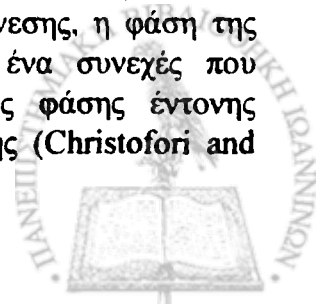
- 1) Διακίνηση και προαγωγή του καρκινογόνου.
- 2) Γενετικές αλλαγές υπό την επίδραση του ενεργού καρκινογόνου (στην περίπτωση του καρκίνου του δέρματος το γονίδιο-στόχος είναι c-Ha-ras).

II. Προώθηση.

- 3) Κλωνοποίηση και εξάπλωση των μεταλλαγμένων κυττάρων.
- 4) Προνεοπλασματικές βλάβες του πέριξ ιστού.
- 5) Χρόνια υπερπλασία που χαρακτηρίζεται από αυξημένο πολλαπλασιασμό των επιδερμικών κυττάρων.
- 6) Μετατροπή σε καλοήθες θήλωμα δι' επιγενετικών μηχανισμών, που εσωκλείουν την ενεργοποίηση κυτταρικών υποδοχέων, της πρωτεϊνικής κινάσης C.
- 7) Περαιτέρω ανάπτυξη και επιλογή στο κυτταρικό επίπεδο με συγκράτηση και συσσώρευση επιπρόσθετων γενετικών αλλαγών.
- 8) Μετάβαση στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα.

Έκαστο στάδιο διακρίνεται όχι μόνον ιστολογικώς, αλλά και από φυσιολογικής απόψεως, εμπλέκονται διαφορετικοί μηχανισμοί με διακεκριμένους αναστολείς αυτών.

Όταν δεν χρησιμοποιείται συγκεκριμένο μοντέλο καρκινογένεσης, η φάση της έναρξης στερείται ακριβούς χρονικής εντόπισης. Παρατηρείται ένα συνεχές που εξαπλώνεται από τον υγιή ιστό δια της υπερπλασίας και της φάσης έντονης αγγειογένεσης έως του σταθερού όγκου και έπειτα της μετάστασης (Christofori and Hanahan, 1994).



Ομαλοί τοπικοί αυξητικοί παράγοντες, σε περίπτωση που συντίθενται σε κατάλληλη θέση, μπορούν να λειτουργήσουν ως επιπρόσθετοι επαγωγείς όγκου, π.χ. το γαστρικό πεπτίδιο (GRP) για τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονος (Minna, 1988). Και αντιθέτως, οι νεοπλασματικοί αυξητικοί παράγοντες επιδρούν σε μη νεοπλασματικά κύτταρα, προκαλώντας ινοπλασία και νεοαγγειογένεση (Marks, 1987).

Σε κάθε στάδιο οι μορφοφυσιολογικές ιδιότητες του περιβάλλοντος ιστού, του όγκου και αυτές των κυττάρων, που τον απαρτίζουν, έχουν αμοιβαία εξάρτηση. Εδώ πάλιν αντιμετωπίζουμε, κατά πρώτον, τις προϋποθέσεις εξέλιξης των καρκινικών κυττάρων. Είναι μεγάλης σημασίας το γεγονός ότι τα καρκινώματα απαιτούν γενικώς μίαν εκτεταμένη σειρά γενετικών αλλοιώσεων για την εμφάνιση και την επιτυχή ανάπτυξη των (Vogelstein and Kinzler 1993, Schweckheimer and Cavanaugh 1993). Οι προοδευτικές μεταβολές συνδέονται ουσιαστικά με τις εναρκτικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες των μεταμορφωμένων κυττάρων (Mitelman, 1991), των οποίων συνέπεια είναι η γενετική αστάθεια (Nowell, 1976), ενώ η μειωμένη ικανότητα δραστηκής διόρθωσης του DNA στα κακοήθη κύτταρα συνεπάγεται επιβίωση των ειδών με τις περαιτέρω αλλαγές (Hellman, 1997).

Όλα αυτά συγκροτούν το πλαίσιο της μεταβλητότητας, καθώς ο ίδιος ο όγκος και ο γύρω ιστός, μαζί με την ανοσοποιητική πίεση, προσφέρουν το πλαίσιο της επιλογής (selection) (Hellman, 1997). Περίπλοκο σύστημα τροφοδότησης και δυνάμει θανατηφόρων συμβάντων παρακινεί την εξέλιξη των κακοήθων κυττάρων και την εξάπλωση νέων κλώνων με μεγαλύτερη βιωσιμότητα, του οποίου συνέπεια είναι ο γενετικός πολυμορφισμός του όγκου (Nowell, 1976). Οι κυριώτεροι εξελικτικοί παράγοντες είναι η παρακίνηση της αγγειογένεσης, η προστασία από τον αυτόνομο κυτταρικό θάνατο και η αποφυγή της ανοσοποιητικής απόκρισης (Tomlinson and Bodmer, 1997). Εν τούτοις, τα κακοήθη κύτταρα, προσαρμοζόμενα στα ανωτέρω, ακολουθούν γενετικές στρατηγικές πάλης κατ'αλλήλων (Tomlinson, 1997). Ο Tomlinson επισημαίνει επίσης ότι ο πολυμορφισμός δεν συμβάλλει απαραίτητα θετικά στην κακοήθεια, αλλά η εξέλιξη του όγκου δύναται να λάβει κάπως συμβιωτική κατεύθυνση.

Ο ανωτέρω παρατεθειμένος μηχανισμός κλωνοποίησης πιστεύεται να διέπει την συζευγμένη μακροπρόθεσμη ανάπτυξη των ιδιοτήτων των μεμονωμένων κακοήθων κυττάρων αφ'ενός και της νεοπλαστικής μάζας ως συνόλου αφ'ετέρου. Με την τελευταία θα ασχοληθούμε ευθύς παρακάτω.

Οι βασικότερες, από παθοφυσιολογικής απόψεως, συνιστώσες της βιολογικής συμπεριφοράς του όγκου είναι οι εξής:

1. Τοπική ανάπτυξη.
2. Επέκταση.
 - 2.1. Τοπική διήθηση.
 - 2.2. Μετάσταση.
 - 2.2.1. Λεμφική.
 - 2.2.2. Αιματογενής.
 - 2.3. Εμφύτευση.

Η ταχύτητα της τοπικής ανάπτυξης εξαρτάται από πολλά στοιχεία (Tsakraklidis, 1981), όπως την αναλογία των πολλαπλασιαζόμενων και των εν ηρεμία κυττάρων, την διάρκεια του μιτωτικού κύκλου και το ποσοστό των απολεσθέντων κυττάρων. Τα ως άνω, κατά σειρά, σχετίζονται τόσο με τον γονότυπο των νεοπλαστικών κυττάρων, όσο και με συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος: την διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών, την δραστηκότητα των αμυντικών δυνάμεων κλπ. Τέλος, υπάρχει και η συνεχής απομάκρυνση κυττάρων, που κείται στη βάση της μεταστατικής διαδικασίας. Αν ληφθεί

υπ' όψιν το γεγονός ότι παρατεταμένη ανάπτυξη του νεοπλάσματος μεταβάλλει την κατάσταση του περιβάλλοντος ιστού, πράγμα που παλίνδρομα επηρεάζει τις ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, γίνεται σαφές ότι ο ρυθμός της αύξησης δεν είναι σταθερός καθ' όλη την διάρκεια της ζωής του όγκου (Tsakraklidis, 1981).

Ένα ουσιαστικής φύσης αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του νεοπλάσματος με τον περιβάλλοντα ιστό είναι η αγγειογένεση, χωρίς την οποία η περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου δεν είναι δυνατή. Κλινικώς, το «προφίλ» ρυθμιστών αγγειογένεσης έχει ανεξάρτητη προγνωστική αξία (Gasparini, 1996). Στους άμεσους επαγωγείς αγγειογένεσης αναφέρονται ο αγγειοενδοθηλιακός αυξητικός παράγων (vascular endothelial growth factor ή VEGF) και ο αυξητικός παράγων ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor ή bFGF), στους δε αναστολείς - η αγγειοστατινή και η ενδοστατινή. Την σημαντικότερη πηγή και φορέα των ως άνω παραγόντων αποτελούν τα αιμοπετάλια: κατά την προσκόλλησή τους στην εσωτερική πλευρά των αγγείων και συνακόλουθη συσσώρευση τα ενεργοποιούμενα αιμοπετάλια απελευθερώνουν τους αυξητικούς παράγοντες και η διαδικασία αυτή σταματά κατόπιν διάλυσης του μικροθρόμβου.

Τα κακοήθη κύτταρα παρακινούν την αγγειογένεση με διάφορους τρόπους: εκκρίνοντας τα ίδια τους VEGF και bFGF και επάγοντας την δραστηριότητα των αιμοπεταλίων. Η αυξημένη ενεργοποίηση αιμοπεταλίων εντός των αγγείων του όγκου προκύπτει από εξής λόγους (Pinedo et al., 1998):

- α) Μειωμένη κυκλοφορία του αίματος στον όγκο.
- β) Έκκριση υπό κακοήθων κυττάρων του αυξητικού παράγοντος αγγειοδιαπερατότητας (vascular permeability factor ή VPF). Αύξηση της αγγειοδιαπερατότητας εκθέτει τις πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας στα αιμοπετάλια, επιφέροντας συσσώρευση των τελευταίων.
- γ) Στον όγκο υπάρχει αυξημένη ποσότητα παραγόντων που είναι υπεύθυνα για την προσκόλληση αιμοπεταλίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Στο σύνολό της όμως η αγγειογένεση αποτελεί περίπλοκη διαδικασία που εσωκλείει πολλά βήματα. Εκτός από τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων συμπεριλαμβάνονται σ' αυτήν η μετανάστευσή των και η αποδόμηση της περιβάλλουσας θεμέλιας ουσίας (βλ. όσον αφορά στην μετάσταση).

Από πρώτη ματιά θα μπορούσε να φανεί ότι τα φαινόμενα της διήθησης και της μετάστασης, που θα επισκοπήσουμε παρακάτω, έχουν την ίδια κυτταρική βάση, εφ' όσον παίζουν τον ρόλο τους η ηυξημένη κινητικότητα, η ηλαττωμένη συγκολλητικότητα, η ενεργός αποδόμηση του γύρω ιστού. Εν τω μεταξύ, η μέχρις ενός βαθμού διηθητική ανάπτυξη του όγκου αποτελεί αναγκαία αλλά όχι και ικανή συνθήκη του υψηλού μεταστατικού δυναμικού: όλοι οι μεταστατικοί όγκοι αποκαλύπτουν την διηθητικότητα, αλλά δεν είναι όλοι οι διηθητικοί όγκοι μεταστατικοί (Hesketh, 1995). Άλλωστε, αν και ένας ελάχιστος βαθμός διηθητικότητας είναι απαραίτητος για την μετανάστευση, η σχέση διόλου δεν είναι ανάλογη. Ως γνωστόν, η τοπική διήθηση μπορεί να είναι πολύ μικρή, παραλλήλως με μία πολύ υψηλή μεταστατικότητα, όπως στην περίπτωση του κακοήθους μελανώματος. Στην άλλη άκρη της κλίμακος ευρίσκονται όγκοι που προξενούν τεράστιες βλάβες του ιστού ξενιστή, διασπείρονται δε σχετικά αργά, π.χ. τα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα (Varani, 1987).

Ο Varani επιστά την προσοχή στις λεπτομέρειες που είναι κοινές στα κακοήθη νεοπλάσματα, ανεξάρτητα από την εκάστοτε αναλογία της διηθητικότητας και της μεταστατικότητας. Η δε απουσία μονοσήμαντης συνάρτησης μεταξύ των δύο μπορεί να εξηγηθεί τόσο εκ του φαινοτύπου των νεοπλαστικών κυττάρων, όσο και από τις ιδιότητες της θεμέλιας ουσίας του ιστού ξενιστή. Παραπάνω συζητήθηκε ότι ένα πλαίσιο διάκρισης των μηχανισμών που αντιστοιχούν στην διήθηση και την μετάσταση

προσφέρουν, όπως φαίνεται, οι ιντεγκρίνες. Εκτός τούτου, αν τα κακοήθη κύτταρα παράγουν μεγάλες ποσότητες της θεμέλιας ουσίας, είτε επάγουν την παραγωγή της από τα κύτταρα του ιστού ξενιστή, το μεταστατικό δυναμικό μειώνεται κατά πολύ, χωρίς να θίγεται σημαντικά η διηθητικότητα (Varani, 1987). Γενικά, η διήθηση είναι ευκολότερη σε χαλαρούς ιστούς, ενώ η μετάσταση δεν παρουσιάζει τόσο στενή εξάρτηση απ'αυτή την παράμετρο (Tsakraklidis, 1981).

Η μετάσταση, στην ουσία, είναι μια διαδοχική σειρά γεγονότων, (Weis 1985, Kerber 1990) της οποίας η διήθηση αποτελεί μόνον ένα βήμα. Της διαμόρφωσης ενός δευτερογενούς όγκου προηγούνται: εγκατάληψη της πρωτοπαθούς εστίας, διήθησις του περιβάλλοντος ιστού, εισχώρηση στην λεμφική ή αιματική κυκλοφορία, εγκατάσταση σε απομακρυσμένο σημείο, σχηματισμός αποικίας δια πολλαπλασιασμού και, τέλος, εξαγγείωση (Price 1990, Papadimitriou et al. 1995). Η μεταστατική διαδικασία αποτελεί ακόμη έναν σπουδαίο παράγοντα εξέλιξης του κακοήθους φαινοτύπου, καθώς τα κύτταρα των δευτερευόντων όγκων διαφέρουν σε πολλά σημεία εκείνων της πρωτοπαθούς εστίας. Ειδικότερα ο μετεστημένος υποπληθυσμός διαθέτει αυξημένες δυνατότητες περαιτέρω διασποράς (Nowell 1986, Kerber 1990).

Εξετάζοντας τα φαινόμενα, που εν συνόλω ισοδυναμούν με την μετάσταση, παρατηρούμε ευκόλως ότι οι συνθήκες εκάστου μεμονωμένου βήματος αποτελούν απαραίτητες προϋποθέσεις επιτυχίας της όλης διαδικασίας, όπου οι φυσιολογικοί παράμετροι του μικροπεριβάλλοντος παίζουν οπωσδήποτε μελετητέο ρόλο. Φαίνεται κάθε κύτταρο να έχει ένα σύνολο πρωτεϊνών επιφανείας, το οποίο καθορίζει την εκλεκτική συγγένειά του με τον ιστό προέλευσης. Αποκαθήλωση και μετανάστευση του καρκινικού κυττάρου προϋποθέτει απελευθέρωση από τις 'συνθήκες ενοικίασης', εν τούτοις δε η απελευθέρωση αυτή πιθανόν ποτέ δεν είναι πλήρης. Τα κακοήθη κύτταρα διατηρούν ωρισμένη συγγένεια με τον ιστό ξενιστή και με τους ιστούς που μεθίστανται. Έτσι μπορούν να εξηγηθούν διαφορές στο βαθμό κακοήθειας και η ασυμμετρία των μεταστάσεων (Ruoslahti, 1996). Βέβαια, η τελευταία εξαρτάται πολύ και από την αρχιτεκτονική του κυκλοφορικού συστήματος (Tsakraklidis, 1981).

Στο παρακάτω ιεραρχικό σχήμα θα παραστήσωμε πώς οι στοιχειώδεις φαινοτυπικές ιδιότητες των κακοήθων κυττάρων, για τις οποίες ομιλήσαμε προηγουμένως (καντερίνες, αυτοεκκρινόμενοι αυξητικοί παράγοντες κλπ.), ενσωματώνονται σ'ένα ευρύτερο πλαίσιο συνθηκών προκειμένου να επιτευχθεί το τελικό αποτέλεσμα.

Μετάσταση.

1. Αγγειογένεση. Υπόκειται της αύξησης του πρωτογενούς όγκου, σχετίζεται με την πυκνότητά του (Srivastava et al., 1986). Αυξάνει την πιθανότητα να εισέλθουν τα νεοπλαστικά κύτταρα στην κυκλοφορία. Επιπλέον τα νέα αγγεία είναι περισσότερο διαπερατά για μεθιστάμενα κύτταρα. Στην διαδικασία αυτή συμβάλλει μια ομάδα αυτοεκκρινόμενων παραγόντων (Denijn and Ruiter, 1993).

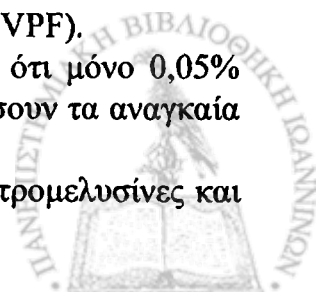
1.1. Πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων (VEGF και άλλα).

1.2. Αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας (πρωτεάσες της σερίνης, μεταλλοπρωτεϊνάσες).

1.3. Μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (αγγειογενίνη, VPF).

2. Τοπική διήθηση. Αποτελεί πολύπλοκη διαδικασία. Σημειωτέον ότι μόνο 0,05% των κινούμενων κακοήθων κυττάρων είναι γενετικώς ικανά να εκτελέσουν τα αναγκαία κατωτέρω βήματα (Nicolson, 1991).

2.1. Πρωτεόλυση της θεμέλιας ουσίας από τις κολλαγονάσες, στρομελυσίνες και ζελατινάσες (βλ. άνω, σελ. 11).



2.2. Μειωμένη συγκολλητικότητα (καντερίνες, βλ. άνω, σελ. 10-11).

2.3. Μετακίνηση δια ψευδοποδίων (Condeelis, 1993).

2.4. Κατευθυνόμενη μετακίνηση.

2.4.1. Αυτοεκκρινόμενοι παράγοντες κινητικότητας, π.χ. ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγων διασποράς ή HGF/SF (Gherardi and Stoker, 1991), ινσουλινοειδής αυξητικός παράγων II ή IGF-II (El-Badry et al., 1990), αυτοταξίνη ή ATX (Stracke et al., 1992).

2.4.2. Πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας που επάγουν την χημειόταξη και την απόταξη, όπως η φιμπρονεκτίνη (McCarthy and Furcht, 1984), κολλαγόνο τύπου I (Tchao, 1982) και IV (Klominek et al., 1993) και άλλα.

2.4.3. Αυξητικοί παράγοντες του ιστού ξενιστή των μεταστάσεων, που είναι και εκλεκτικές προς ωρισμένα νεοπλάσματα, π.χ. οι αυξητικοί παράγοντες του οστίτη ιστού για το προστατικό καρκίνωμα (Chackal-Roy et al., 1989). Μεταξύ των άνω ο ινσουλινοειδής αυξητικός παράγων I ή IGF-I (Stracke et al., 1988), η ιντερλευκίνη-8 ή IL-8 (Wang et al., 1990) και η ισταμίνη (Tilly et al., 1990).

3. Κυκλοφορία στο αίμα, κατά την οποία τα κακοήθη κύτταρα συχνά περιβάλλονται από αιμοπετάλια (Ruoslahti, 1996), χρησιμοποιώντας τα ως μηχανική προστασία από επιθέσεις του ανοσοποιητικού και επωφελούμενα από τους αυξητικούς παράγοντες αιμοπεταλίων.

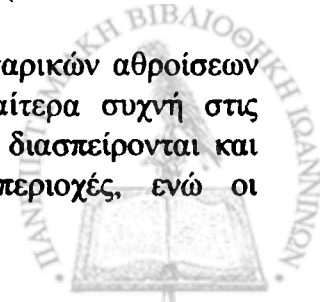
4. Κυτταρική προσκόλληση στις μεμβράνες αγγείων και στα κύτταρα του ιστού ξενιστή των μεταστάσεων. Μεσολαβείται από τις ιντεγκρίνες (Damen et al., 1995), ειδικότερα από τις $\alpha_v\beta_3$ και $\alpha_v\beta_1$ ιντεγκρίνες για την συγκράτηση στα οστά (Liparis et al. 1996, Matsuura et al. 1996).

5. Ανάπτυξη του δευτερογενούς όγκου απαιτεί πολύπλοκη αλληλεπίδραση των κακοήθων κυττάρων με τον ιστό ξενιστή. Αυτό το γεγονός μπορεί επίσης να εξηγήσει την μεταστατική ασυμμετρία πολλών νεοπλασμάτων (Hart and Fidler 1980, Nicolson 1988). Για παράδειγμα τα μεθιστάμενα στα οστά κακοήθη κύτταρα δύνανται να επηρεάζουν δραστικώς τον ιστό τούτο, παρακινώντας είτε την οστεόλυση υπό των οστεοκλαστών, είτε την οστεογένεση υπό των οστεοβλαστών (Gleave et al., 1991).

Αν και η διαδοχή στοιχειωδών γεγονότων, τα οποία διέπουν την μετάσταση, είναι αρκετά γνωστή, εν τούτοις το πρόβλημα είναι πώς τα καρκινικά κύτταρα θέτουν εμπρός την όλη διαδικασία, η οποία συνίσταται ως επί το πλείστον από φυσιολογικά βήματα, και αποφεύγουν την ρύθμιση ανωτέρου επιπέδου. Το δε σημαντικότερο είναι να βρεθεί ένας τρόπος επανάκαμψης δραστικού ελέγχου.

Πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι τα κύτταρα του πρωτογενούς όγκου επωφελούνται συχνά, προκειμένου να μεθίστανται, από συστηματικά φυσιολογικά σήματα και διαδικασίες. Ένα καλό μοντέλο της μετάστασης αποτελεί η ορθοτοπική μεταμόσχευση ανθρώπινων κακοήθων κυττάρων σε άτριχα αθυμικά ποντίκια. Επ' αυτού του μοντέλου διεπιστώθη (Fidler, 1991) ότι η φλεγμονή και η αποκατάσταση εξ' αιτίας ιστικής βλάβης διευκολύνουν τον πολλαπλασιασμό όχι μόνο των ομαλών, αλλά και των κακοήθων κυττάρων. Αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης επιδεικνύουν τα κακοήθη κύτταρα του παχέως εντέρου στους ηπατεκτομηθέντες άτριχους μυς, ενώ η νεφρεκτομή ευνοεί ταχύρρυθμο πολλαπλασιασμό των κακοήθων κυττάρων του νεφρού (πάντα τούτα στον Fidler, 1991).

Τέλος, η διασπορά δι' εμφυτεύσεως σημαίνει απόσπαση κυτταρικών αθροίσεων από την επιφάνεια του όγκου με μηχανικά μέσα και είναι ιδιαίτερα συχνή στις ουρογόνες κοιλότητες (Tsakraklidis, 1981). Τα καρκινικά κύτταρα διασπείρονται και κατόπιν χειρουργικής επέμβασης, εντίθενται στις γειτονικές περιοχές, ενώ οι



διαδικασίες της μετεγχειρητικής αποκατάστασης παρακινούν τον πολλαπλασιασμό τους - ακολουθία γεγονότων που συχνά υπόκειται της υποτροπής (Sugarbaker et al., 1989).

Μέσω των ως άνω διαδικασιών η νεοπλαστική μάζα αναπτύσσεται επιθετικά, επιφέροντας με την πάροδο του χρόνου προοδευτική φυσιολογική αποδιοργάνωση του πάσχοντος. Η επέκταση δια της λέμφου είναι πλέον τοπική, ενώ οι απομακρυσμένες μεταστάσεις εμφανίζονται μέσω της αιματογενούς διασποράς και έχουν εξαιρετική σημασία για την πρόγνωση και την θεραπεία (Tsakraklidis 1981, βλ. επίσης παρακάτω στην σταδιοποίηση των σαρκωμάτων μαλακών μορίων).

1.3.3. ΕΠΙΠΕΔΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ . ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΡΡΟΗ ΤΟΥ ΝΕΟ - ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΓΕΝΙΚΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΑΡΡΩΣΤΟΥ.

Οι ιδιότητες του όγκου είδαμε ότι πρέπει να κατανοηθούν σε συνάρτηση με το μικροπεριβάλλον του. Όμως, και σήματα ανωτέρων επιπέδων δύνανται να επηρεάσουν δραστικώς την πορεία της νόσου. Ο μεταβολισμός και η ανάπτυξη ενός ευρέως φάσματος ιστών παρουσιάζει στενή εξάρτησιν από ορμονικών επιρροών. Επομένως, ωρισμένα είδη καρκίνου, προερχόμενα από ιστούς στόχους, επιδέχονται ορμονικής ρύθμισης. Στις παρακάτω σελίδες θα εκθέσωμε τις βασικές έννοιες αυτής της προσέγγισης, τιθεμένου ως παραδείγματος του προστατικού καρκινώματος.

Είναι εμπειρικός γνωστόν ότι μερικά νεοπλάσματα αναστέλλονται συνεπεία χορήγησης εξωγενών ορμονών ή στέρησης ενδογενών τοιούτων κατόπιν επέμβασης. Η ορμονική ύφεση φθάνει μέχρι και πλήρους εξαλείψεως των μεταστάσεων και σημαντικής μείωσης του πρωτοπαθούς όγκου. Την ορμονοεξάρτηση παρουσιάζουν, κατά πρωτο λόγο, ο καρκίνος του προστάτη, του μαστού και του ενδομητρίου, κατά δεύτερον λόγο - ο καρκίνος της ωοθήκης, του νεφρού, του θυρεοειδούς και το κακόηθες μελάνωμα, καθώς και τα κακοήθη λεμφώματα και οι λευχαιμίες (Primikirijs, 1981).

Σαφώς, ο καθιερωμένος τρόπος δράσεως των ορμονών συνίσταται στην ρυθμιστική μάλλον, παρά στην κυτταροτοξική παρέμβαση στον μεταβολισμό και την ανάπτυξη του ευαίσθητου κυττάρου. Ως εκ τούτου ο χρόνος της ανταπόκρισης και η διάρκειά της καθορίζονται από την σταθερά χρόνου επίδρασης μιας ορμόνης. Η επίδραση αυτή εκκινείται από σχηματισμό συμπλόκου της ορμόνης και του αντίστοιχου κυτταρικού υποδοχέα, και γενικώς πιστεύεται ότι η παρουσία και η ακεραιότητα των υποδοχέων είναι απαραίτητη προϋπόθεση της ορμονικής επί κυττάρου δράσεως (Friedman et al., 1978). Η συγκράτηση, εν μέρει ή πλήρως, των ομαλών ορμονικών υποδοχέων υπό του κακοήθους κυττάρου υπόκειται της επιτυχούς ορμονικής θεραπείας, ενώ αντίθετα, αν η κακοήθης εξαλλαγή οδηγεί στην απώλεια των υποδοχέων, τότε το κύτταρο διαφεύγει οιοδήποτε ορμονικού ελέγχου (McGuire, 1975).

Παροχή ή καταστολή των ανδρογόνων (Escher and Kaufman, 1961), των οιστρογόνων (McGuire, 1975), των προγεστινών (Holland and Frei, 1973), της θυρεοειδικής ορμόνης (Primikirijs, 1981), της ταμοξιφένης (Mouridsen et al., 1978) έχει ευεργετική δράση επί νεοπλασμάτων των ανταποκρινόμενων ιστών. Οι εν λόγω ορμόνες είτε επηρεάζουν κατ'ευθείαν τα κύτταρα στόχους, είτε ρυθμίζουν μακροπρόθεσμα την λειτουργία της υπόφυσης.

Εκτός των αναφερθέντων, τα κορτικοστεροειδή χρησιμοποιούνται εκτενώς κατά των συμπαγών όγκων, καθώς και των κακοήθων λεμφωμάτων, της λευχαιμίας και του πολλαπλού μυελώματος (Primikirijs, 1981). Ο μηχανισμός της δράσης τους οφείλεται είτε στην καταστολή της έκκρισης οιστρογόνων και ανδρογόνων από τα επινεφρίδια

μέσω της υπόφυσης, είτε στην άμεση ογκολυτική δράση, είτε σε μια γενική αντιφλεγμονώδη δράση επί του φυσιολογικού περιβάλλοντος ιστού.

Σημειωτέον ότι τα πλέον ορμονοανταποκρινόμενα νεοπλάσματα είναι παραλλήλως ευαίσθητα στους ομαλούς αυξητικούς παράγοντες και μεθίστανται, κατά κανόνα, στις πλούσιες ως προς αυτούς περιοχές. Ούτως, το ορμονοεξαρτώμενο καρκίνωμα του μαστού έχει την τάση να αποδίδει μεταστάσεις στα οστά, όπου μια ποικιλία αυξητικών παραγόντων προωθεί την ανάπτυξή τους (Guise et al., 1993). Αγωγή των πασχόντων από μεταστατικό καρκίνωμα μαστού με αντιοιστρογόνα επηρεάζει και τις οστικές μεταστάσεις, ελέγχοντας την τοπική προώθηση από π.χ. τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα, τον ινσουλινοειδή αυξητικό παράγοντα, την ιντερλευκίνη κλπ. (Harvey, 1997).

Ο πλέον ανταποκρινόμενος στην ορμονική θεραπεία καρκίνος είναι εκείνος του προστάτη. Εκ παλαιών είναι γνωστόν ότι ο προστάτης αποτελεί ανδρογονοεξαρτώμενο όργανο και ότι η καλοήθης προστατική υπερπλασία δεν αναπτύσσεται στους ευνουχισμένους (Denung and Wolf, 1939). Η οδός της επίδρασης της τεστοστερόνης στον προστάτη είναι η εξής (Gupta and Path, 1982): δίοδος από την μεμβράνη των προστατικών κυττάρων και αναγωγή της σε 5 α -διϋδροτεστοστερόνη, σύζευξη με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες υψηλής συγγένειας και δίοδος υπό αυτή την μορφή στον πυρήνα, σύνδεση με την χρωματίνη και διευκόλυνση της RNA-μεταγραφής, περαιτέρω μεταβολισμός και έξοδος εκ του κυττάρου.

Οι έρευνες των πλασματικών επιπέδων τεστοστερόνης ανέδειξαν απουσία διαφοράς μεταξύ υγιών και πασχόντων από αδένωμα ή καρκίνωμα του προστάτου (Habib et al., 1976), ενώ εντός του νεοπλαστικού ιστού ευρέθη σε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό υπό μορφήν του πλέον ενεργού της μεταβολίτη (Hammond, 1978). Αλλαγές της σχετικής ισχύος των μεταβολικών οδών της τεστοστερόνης στα κύτταρα του προστατικού καρκινώματος ενδεχομένως οδηγεί στην κακοήθη εξαλλαγή με προωθητή την τεστοστερόνη (Gupta and Path, 1982).

Στην επίδραση των στεροειδών ορμονών επί των κυττάρων στόχων εξαιρετικό ρόλο παίζουν οι σχετικοί υποδοχείς (Guyton, 1994) μεταφέροντας τα στεροειδή προς τον πυρήνα και προστατεύοντάς τα από ενζυματικές προσβολές, ενεργώντας μόνοι τους ή σε συνάρτηση με στεροειδή ως βιοσυνθετικοί παράγοντες. Οι υποδοχείς ανδρογόνων υφίστανται στα νεοπλαστικά κύτταρα του προστάτη και, ανεξάρτητα από την αιτιολογική τους σημασία, προσφέρουν ένα πλαίσιο χειρισμού του προστατικού καρκινώματος (de Voogt, 1982). Εκ των άνω εξηγείται επαρκώς η υψηλή ανταπόκριση του καρκίνου του προστάτη στην χορήγηση οιστρογόνων (McGuire, 1975) και στην ορχιεκτομή (Holland and Frei, 1973).

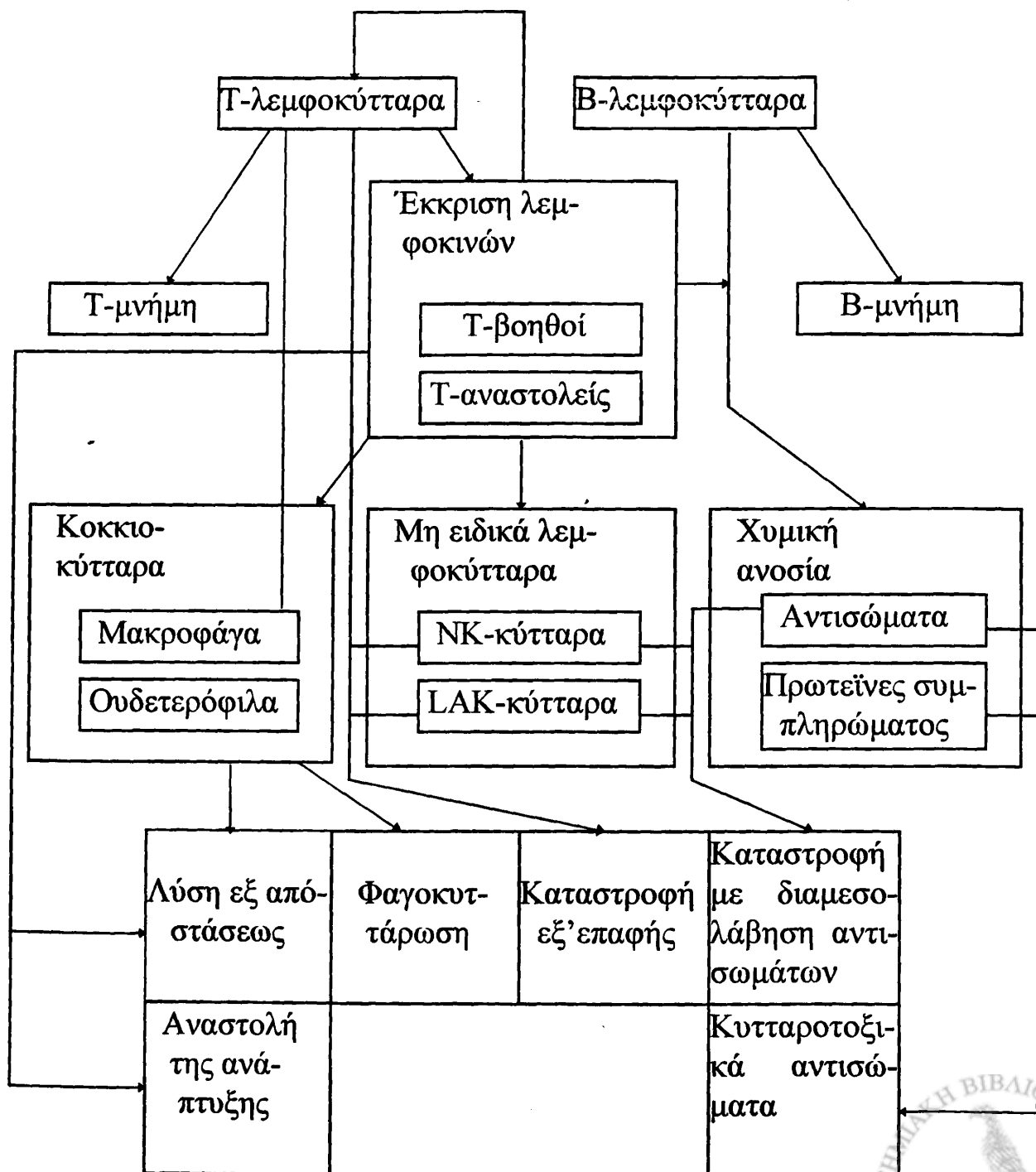
Άλλωστε, παρ'όλο που ο πρωτογενής όγκος ελέγχεται αρκετά καλά από την στέρηση ανδρογόνων μέσω της ορχιεκτομής, η νεοπλασία τούτη επιφέρει προοδευτικές οστικές παθήσεις (Geller, 1991) εξ'αιτίας της τάσης να μεθίσταται στα οστά, μια περιοχή εμπλουτισμένη με αυξητικούς παράγοντες (Adami, 1997). Έτσι, μπορούμε να πούμε ότι η ορμονική ανταπόκριση μερικών κακοηθειών έχει διττή σημασία: αφ'ενός μεν παρουσιάζεται η δυνατότητα ορμονικής καταστολής, αφ'ετέρου δε τα ορμονοεξαρτώμενα νεοπλάσματα εκμεταλλεύονται τα ορμονικά σήματα προς ταχύτερη ανάπτυξη.

Τα κακοήθη κύτταρα, εφ'όσον είναι μεταλλαγμένα, εκφράζουν πρωτεΐνες - αντιγόνα στην επιφάνειά των και καθίστανται στόχοι του ανοσοποιητικού συστήματος. Εκ της αναγνώρισης ιογενούς φύσεως πολλών καρκίνων η ανοσολογική προσέγγιση αποκτά όλο και μεγαλύτερη σημασία (Tsakraklidis, 1981), και δεν χωρεί αμφιβολία ότι η ανοσολογική πίεση, μαζί με την αποφυγή της εκ μέρους των μεταλλαγμένων

κυττάρων, αποτελεί τον κύριο άξονα της αλληλεπίδρασης 'οργανισμός - νεόπλασμα'. Οι παρακάτω σελίδες είναι αφιερωμένες στο εν λόγω θέμα.

Η θεωρία ότι ο κυριώτερος στόχος του ανοσοποιητικού συστήματος είναι απομάκρυνση των παθολογικώς μεταλλαγμένων κυττάρων ανέρχεται στον Burnet (Burnet, 1965). Ως γνωστόν, το φαινόμενο της ανοσίας διαιρείται σε χυμική και κυτταρική τοιαύτη, ακόμη δε σε ειδική και μη ειδική. Όλα τα υποσυστήματα λειτουργούν από κοινού συμβάλλοντας στην τελική απαλοιφή των μεταλλαγμένων κυττάρων, όπως καθίσταται φανερόν εκ του κατωτέρω σχήματος 1.

Σχήμα 1. Τρόποι αντίδρασης του ανοσοποιητικού κατά των νεοπλαστικών κυττάρων.



Είναι από καιρού γνωστόν ότι όλοι οι παρακάτω μηχανισμοί λαμβάνουν μέρος στην καταπολέμηση του καρκίνου. Τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα έχουν τη δυνατότητα να επιτεθούν κατ'ευθείαν επί κυττάρων στόχων, αναγνωρίζοντας αντιγόνα επιφανείας (Wybran et al., 1974), ενώ τα ειδικά αντισώματα, με τη βοήθεια των πρωτεϊνών συμπληρώματος, προκαλούν θάνατο κακοήθων κυττάρων δια λύσεως (Irie et al., 1974). Εξ'ίσου σημαντική είναι η καταστροφή νεοπλαστικών στοιχείων εκ μέρους μη ειδικών λεμφοκυττάρων προηγούμενης της ενδιάμεσης φόρτωσης με μη τοξικά αντισώματα (Klippel, 1982).

Οι λεμφοκίνες παίζουν τον μείζονα συντονιστικό ρόλο στην ολοκληρωμένη ανοσοποιητική αντίδραση, κινητοποιώντας χημειοτακτικά τα φαγοκύτταρα, ενεργοποιώντας τους λεμφοκινεοεξαρτώμενους φονείς (lymphokine-activated killers ή LAK) (Herberman, 1987) και ρυθμίζοντας την δραστηριότητα των μακροφάγων μέσω προαγωγής του μεταβολισμού των και της φαγοκυττάρωσης υπ'αυτών (παράγων ενεργοποίησης μακροφάγων ή MAF), καθώς και μέσω αναστολής της κινητικότητάς των (παράγων αναστολής μακροφάγων ή MIF) (Evans, 1972). Συν τοις άλλοις, μια λεμφοκίνη, η γ-ιντερφερόνη, αναστέλλει αποτελεσματικά, με μεσολάβηση των ιντερφερονεξαρτώμενων πρωτεϊνών ή VIP (virus-inhibitory proteins), τον αναδιπλασιασμό του ιϊκού DNA. Ανάπτυξη μερικών μη ιογενών κακοηθειών επίσης μπορεί να επιβραδυνθεί (Moisiadi et al., 1983). Οι λεμφοκίνες ταυτοποιούνται εντός μιάς ευρύτερης οικογένειας, εκείνης των κυτοκινών, η δε ειδοποιός διαφορά τους είναι το ότι εκκρίνονται από T-βοηθούς.

Από τις κυτοκίνες ειδική μνεία αξίζει ο παράγων νέκρωσης όγκων ή TNF (tumour necrosis factor), που παλαιότερα επιστεύετο ότι παράγεται υπό ενεργοποιηθέντων μακροφάγων (εξ ου και η κατάταξη στις κυτοκίνες), εν συνεχεία δε κατέστη σαφές η συμβολή του στην κυτταροτοξικότητα λεμφοκυττάρων επίσης. Μέσω του TNF καθιερωμένως εξηγείται η ογκολυτική δραστηριότητα των μακροφάγων, ήτις συναρτάται με (Old, 1988):

- α) αιμορραγική νέκρωση και υποχώρηση όγκου,
- β) καταστολή της αύξησης κακοήθων κυττάρων, τόσο με κυτταροτοξική, όσο και με κυτταροστατική συνιστώσα,
- γ) συνεργική δράση του TNF και της ιντερφερόνης.

Εν τούτοις, παράλληλα με αυτές τις μελέτες είχε γίνει εξ'ίσου σαφές ότι τα κακοήθη κύτταρα διαθέτουν ένα πλήθος μηχανισμών αποφυγής των ως άνω αμυντικών αντιδράσεων. Οι σημαντικότεροι αυτών είναι οι εξής (Klippel, 1982):

- 1) Τροποποίηση των αντιγόνων επιφανείας.
- 2) Καταστολή του ανοσοποιητικού, πιθανώς των μακροφάγων.
- 3) Επικάλυψη των νεοπλαστικών κυττάρων με μη τοξικά αντισώματα, πράγμα που δυσκολεύει την επίθεση των T-λεμφοκυττάρων.
- 4) Φόρτωση των τοξικών αντισωμάτων και T-λεμφοκυττάρων με περιπλανώμενα αντιγόνα.

5) Σε περίπτωση που η ποσότητα των αντινεοπλαστικών λεμφοκυττάρων είναι μικρή, οι κυτταροτοξικές αντιδράσεις επιβροθούν μάλλον την αύξηση όγκου, παρά την αναστέλλουν.

Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι η αποτελεσματικότητα της ανοσοποιητικής αντίδρασης ευρίσκεται σε αρνητική σχέση με την προοδευτική ανάπτυξη της νόσου (Ershler and Longo, 1997). Εκ τούτου συνάγεται πως στα όψιμα στάδια, όταν η αντίδραση αυτή γενικεύεται με παρεμβολή των κοκκιοκυττάρων και έντονη παραγωγή αντισωμάτων, η σκοπευόμενη καταστολή του όγκου είναι πλέον πολύ δύσκολο να επιτευχθεί, λόγω έντονου πολλαπλασιασμού των νεοπλαστικών κυττάρων,

ανεπτυγμένης κακοηθείας των και των ανωτέρω μηχανισμών αποφυγής. Γι' αυτό τα φυσικά επίπεδα αντισωμάτων αντανακλούν το εκάστοτε στάδιο της πάθησης (stage) και σχετίζονται συνήθως αρνητικά με την πρόγνωση (Ablin et al., 1979).

Στα τελευταία έτη των αντικαρκινικών ερευνών έχει γίνει αντιληπτή η σημασία της κυτταρικής ανοσίας (cell-mediated immunity) στα πρώιμα στάδια του καρκίνου. Τρεις τύποι λεμφοκυττάρων κατέχουν την κεντρική θέση σ' αυτή τη διαδικασία:

1) Οι φυσικοί φονείς (natural killer cells ή NK), είναι ικανοί προς καταστροφήν αλλογενών κακοήθων κυττάρων εκ πρώτης επαφής.

2) Τα T-κύτταρα σφραγίζουν την επέμβαση της ειδικής ανοσίας και, όπως έχει ειπωθεί, συντονίζουν όλες τις περαιτέρω αντιδράσεις.

3) Σημαντική βοήθεια μετά την επιστράτευση του ανοσοποιητικού μέσω λεμφοκινών προσφέρουν τα λεμφοκινοεξαρτώμενα κύτταρα (lymphokine-activated killers ή LAK).

Κατωτέρω θα ασχοληθούμε με αυτούς τους τύπους εκτενέστερα.

Τα NK-κύτταρα προέρχονται από μεγάλα κοκκίωδη λεμφοκύτταρα και αποτελούν τουλάχιστον το 4% των περιφερικών λεμφοκυττάρων του αίματος. Προκαλούν κυτταρόλυση απουσία της έκφρασης αντιγόνου μέσω του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC I ή II) στα κύτταρα στόχους (Trincheri, 1989). Γενικώς, τα NK-κύτταρα είναι ανίκανα να λύσουν αυτοπροερχόμενα νεοπλαστικά κύτταρα χωρίς προαγωγή, αλλά η επώαση όλων των περιφερικών λεμφοκυττάρων του αίματος με την ιντερλευκίνη 2 οδηγεί στην εμφάνιση κλώνων, που μπορούν να προξενούν κυτταρόλυση σ' ένα ευρύ φάσμα κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των αυτοπροερχόμενων νεοπλαστικών τοιούτων (Trincheri et al., 1984). Τοιουτοτρόπως, όλα τα NK-κύτταρα παρουσιάζουν και την LAK-δραστηριότητα, ενώ το αντίθετο δεν ισχύει. Ο μηχανισμός της κυτταρόλυσης ενέχει 4 φάσεις (Ortaldo and Hiserodt, 1989): προσκόλληση, αναγνώριση, μετάδοση του θανατηφόρου σήματος, αποχώρηση.

Τα υπεύθυνα για την προσκόλληση μόρια δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί, αλλά οι μετέπειτα διεργασίες περιλαμβάνουν αύξηση του μεταβολισμού των φωσφοϊνοσιτιδίων, απελευθέρωση ασβεστίου που ακολουθείται από συσσώρευση των λυτικών κυστιδίων στην πλευρά της προσκόλλησης και εξωκύτωση του περιεχομένου τους - περφορινών, πρωτεϊνών κλπ. (Robertson and Ritz, 1990). Οι περφορίνες προκαλούν διάνοιξη καναλιών στην μεμβράνη του κυττάρου στόχου με αποτέλεσμα την ωσμωτική λύση, ενώ και διαλυτοί παράγοντες, εκκρινόμενοι από τα NK και LAK κύτταρα, π.χ. οι κυτοκίνες (Pertussia, 1991), μερικά μέλη της οικογένειας TNF (tumor necrosis factors) (Squier and Cohen, 1994), δύνανται να επιφέρουν θάνατο είτε απόπτωση.

Η παρουσία πολλών ειδών καρκίνου, αν και όχι όλων, συνοδεύεται από μειωμένη φυσική κυτταροτοξικότητα (Morita et al. 1990, Chuang et al. 1990, Tsutsi et al. 1992), ενώ συχνά και η πρόοδος της νόσου συσχετίζεται με αυτήν (Tsutsi et al., 1992). Όπου διεξήχθησαν ποσοτικές μελέτες, διεπιστώθη μια μειωμένη λυτική ικανότητα των φυσικών φονέων, χωρίς να θίγεται ο απόλυτος αριθμός τους (Le Fever and Funahashi, 1991). Δικαιολογημένο να διερωτηθεί κανείς, αν η ανωτέρω εκφύλιση της NK και LAK δραστηριότητας αποτελεί αιτία εμφάνισης και προόδου των συσχετιζόμενων καρκίνων ή δευτερογενές φαινόμενο, διότι προηγουμένως είδαμε το ανεπτυγμένο κακοήθες νεόπλασμα να μπορεί να αναστέλλει δραστικώς την κυτταρική άμινα, ενώ στα όψιμα στάδια συντείνει αρνητικά και ο υποσιτισμός (Villa et al., 1991).

Αρκετές, λοιπόν, έρευνες επί κινδυνευόντων υπό του καρκίνου ατόμων - οικογενειακός καρκίνος (Hersey et al. 1979, Strayer et al. 1984), κίρρωση του ήπατος (Nakajuma et al., 1987) - ανέδειξαν ότι το γεγονός και η ταχύτης εμφάνισης καρκίνου διαδέχεται την ηλαττωμένη δραστηριότητα των περιφερικών λεμφοκυττάρων του

αιματος. Όσον αφορά στον εγκατεστημένο καρκίνο, φαίνεται ότι η ανάπτυξη των αιματογενών μεταστάσεων συνάπτεται στενά αντιστρόφως ανάλογα με την ενεργητικότητα των NK- και LAK-κυττάρων (Schantz and Ordonez 1993, Pross and Lotzova, 1993). Τούτο συμβαίνει πιθανότατα επειδή η NK και LAK ικανότητα των διηθούντων τον όγκο λεμφοκυττάρων (tumor infiltrating lymphocytes ή TILs) και των λεμφοκυττάρων επιχωρίων λεμφαδένων (lymph node lymphocytes ή LNLs) είναι σεσημασμένως μειωμένη σε σύγκριση με αυτήν της περιφερικής κυκλοφορίας (ως προς την NK των TILs - Moy et al. 1985, LAK των TILs - Pisani et al. 1989, NK των LNLs - Kumazawa and Hess 1991, LAK των LNLs - Karimine et al. 1994).

Είναι τεκμηριωμένο ότι πολλές κακοήθειες, ιδίως οι προκεχωρημένες τοιαύτες, εκκρίνουν παράγοντες που επηρεάζουν την NK και LAK δραστηριότητα λεμφοκυττάρων (Guillou et al. 1989, Settano et al. 1990). Κατανοητόν ότι τα εγγύς λεμφοκύτταρα, όπως είναι τα TILs και LNLs, κατά πρώτο λόγο υποπίπτουν στον κατασταλτικό έλεγχο. Οι αλλαγές του μοριακού επιπέδου που υπόκεινται της καταστολής δεν έχουν ακόμη διασαφηνισθεί. Απώλεια όμως της Z-αλύσεως του T-υποδοχέα, καθώς και μειωμένη δραστηριότητα της p56 τυροσινοκινάσης έχει περιστασιακά διαπιστωθεί (Finke et al., 1993). Συν τοις άνω, μεταβολές επιπέδων διαφόρων άλλων παραγόντων, όπως της προσταγλανδίνης-E2 (Baxevanis et al., 1993), κυτοκινών (Synderman et al., 1991), που εξαρτώνται από την γενική ένταση της ανοσολογικής απόκρισης, μπορούν να τροποποιήσουν σημαντικά την κυτταροτοξικότητα των NK και LAK-λεμφοκυττάρων.

Η ανοσοκατασταλτική επί της κυτταρικής ανοσίας δραση της προσταγλανδίνης E2 (PGE2) και της ισταμίνης διαμεσολαβείται από το cAMP και τις ενδιάμεσες μορφές οξυγόνου (Uotila, 1996). Σύνδεση της PGE2 και της ισταμίνης με μια υποκατηγορία των αντίστοιχων υποδοχέων επιφέρει αύξηση του επιπέδου cAMP στους T-βοηθούς. Το αυξημένο cAMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνοκινάση A και αυτή ελαττώνει την έκκριση της ιντερλευκίνης 2 και της γ-ιντερφερόνης (βλ. το παρακάτω σχήμα).

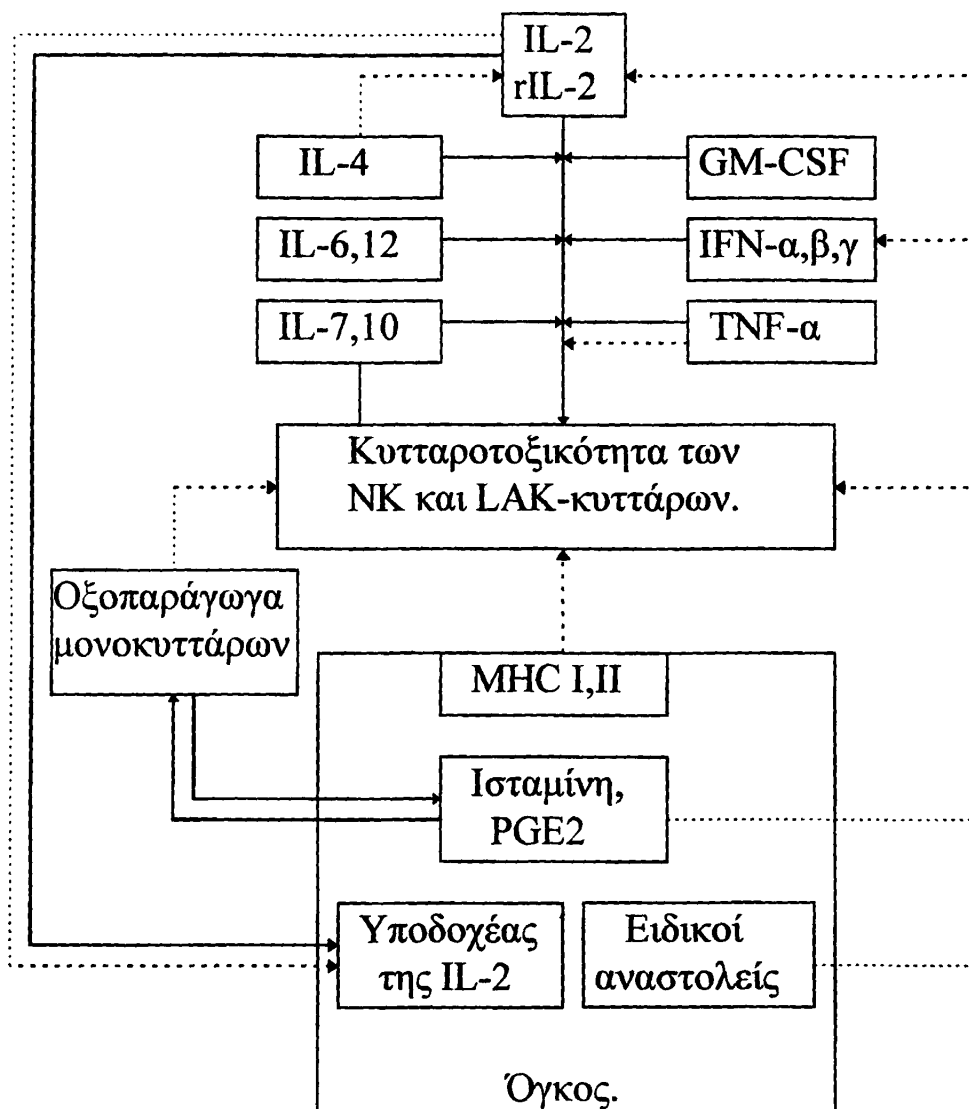
Τα μονοκύτταρα και ιστιοκύτταρα υπό την επήρεια της ισταμίνης εκκρίνουν μεγάλη ποσότητα ελεύθερων οξοπαράγωγων, πράγμα που έχει θετική σημασία τοπικά, αλλά οι καρκινοπαθείς έχουν αυξημένο επίπεδο της ισταμίνης στο ολικό αίμα. Η απόπτωση των NK-κυττάρων είναι ένα αποτέλεσμα του γενικού, προκαλούμενου με αυτόν τον τρόπο, οξειδωτικού στρες. Εκτός τούτου η υπεροξοανιονική ρίζα είναι ισχυρός ενεργοποιητής της κυκλοοξυγονάσης 2, η οποία επάγει την δημιουργία της PGE2 από μερικά κακοήθη κύτταρα.

Υπάρχουν μερικές ενδείξεις ορμονικών επιρροών στην φυσική κυτταροτοξικότητα *in vivo*. Πιθανώς η αγωγή με την ταμοξιφένη αναστέλλει την ετερόπλευρη εμφάνιση του καρκίνου του μαστού και παρατείνει την επιβίωση ασθενών μέσω επαγωγής των NK-κυττάρων (Mallmann and Krebs, 1991). Άλλοι βιολογικοί ρυθμιστές της NK και LAK δραστηριότητας εκτίθενται στο κατωτέρω σχήμα.

Αξιοπαρατήρητον ότι μια ποικιλία νεοπλαστικών κυττάρων αναπτύσσει υποδοχείς για την ιντερλευκίνη 2 και άλλες λεμφοκίνες (Weidmann et al. 1992, McMillan et al. 1993), πράγμα, το οποίο μπορεί να έχει διάφορα αποτελέσματα (και αυξητικά και κατασταλτικά).



Σχήμα 2. Άμεση ρύθμιση της κυτταροτοξικότητας των φυσικών και λεμφοκινοεξαρτωμένων φονέων (το περιεχόμενον ελήφθη από τους Brittenden et al., 1996, καθώς και από τις προηγούμενες παραγράφους).



IL - ιντερλευκίνη, IFN - ιντερφερόνη, TNF - παράγων νέκρωσης όγκων, GM-CSF - παράγων ενεργοποίησης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων, MHC - μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας, r - ανασυνδυασμένος. → - ενεργοποίηση, ⊘ - αναστολή.

Όμως, παρ'όλο που η σπουδαιότητα των φυσικών φονέων στην αντίσταση κατά του καρκίνου καθίσταται εκτός αμφισβήτησης, η προεξέχουσα σημασία των Τ-βοηθών παραμένει άθικτη. Τα NK-κύτταρα δεν μπορούν να ανθίστανται στα ενδογενή νεοπλάσματα, ενώ όλα τα LAK-κύτταρα απαιτούν ενεργοποίηση μέσω λεμφοκινών, οι οποίες εκκρίνονται από Τ-βοηθούς. Πρέπει να ανατρέξουμε σ'αυτά προκειμένου να εντοπίσουμε την χρονική στιγμή που ο οργανισμός λαμβάνει σήμα κινδύνου.

Τα Τ-λεμφοκύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους ετεροδιμερείς υποδοχείς, των οποίων η λειτουργία είναι αναγνώριση πεπτιδικών προϊόντων πρωτεολυτικής αποδόμησης (Townsend et al.,1985). Τα τελευταία οδηγούνται στην επιφάνεια των κυττάρων διεγερτών της ανοσίας με τις προαναφερθείσες MHC-πρωτεΐνες. Ο τύπος I μεταφέρει αντιγόνα από το ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ ο τύπος II - από τα ενδοσωμάτια και έπειτα αντιδρούν με διαφορετικούς τύπους Τ-κυττάρων. Κατά συνέπεια, η MHC-I προκαλεί απόκριση κατά των ενδοκυτταρικών παρασίτων, ενώ η

MHC-II - κατά των εξωκυτταρικών μικροοργανισμών. Οι μηχανισμοί δέσμευσης αντιγόνων υπό των MHC έχουν διερευνηθεί αρκετά έντονα (Falk et al., 1991).

Η ανοσολογική απόκριση, πέραν του τρόπου και της δόσης χορήγησης αντιγόνου, εξαρτάται από πολλά συμβεβηκότα: μόνο τα ειδικά κύτταρα ανοσοδιεγερτές (κάτα κύριο λόγο τα μακροφάγα και ιστιοκύτταρα) μπορούν να ενεργοποιήσουν τα T-κύτταρα, ενώ η πλειοψηφία των υπολοίπων αποτυγχάνουν, πιθανότατα επειδή δεν διαθέτουν κάποιες γειτονικές της MHC πρωτεΐνες που μεταδίδουν βοηθητικά σήματα (Linsley et al., 1990).

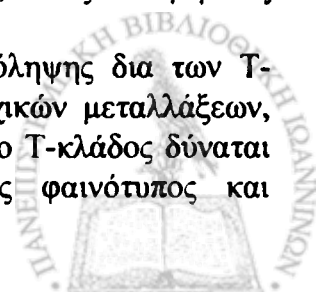
Οι T-βοηθοί παρακινούν την μετατροπή των B-λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα. Τα αντινεοπλαστικά αντισώματα όμως, που εκκρίνονται απ' αυτούς, δεν είναι απόλυτα ειδικά, εφ' όσον ανευρίσκονται και σε κανονικούς ιστούς, επιπλέον δε αναγνωρίζουν μόνο τα αντιγόνα επιφανείας. Εν τούτοις οι T-φονείς δύνανται να επιτεθούν στα κύτταρα στόχους, αναγνωρίζοντας πρωτεΐνες της κυτοζόλης, του πυρήνα, ακόμη και του μιτοχονδρίου και, συν τοις άλλοις, όχι μόνο μεταλλαγμένες πρωτεΐνες, αλλά και ομαλές που εκκρίνονται σε υπέρμετρη ποσότητα (van der Bruggen and van der Eynde, 1992). Τούτο καθίσταται δυνατόν εξ' αιτίας της συνεχούς ενδοκυτταρικής πρωτεόλυσης και περαιτέρω έκθεσης αντιγονικού πεπτιδίου μέσω των MHC. Από άλλης πλευράς, ένας συχνός μηχανισμός καρκινογένεσης (βλ. την παρουσίαση των ογκογονιδίων) συνίσταται στην υπερπαραγωγή μιας αυξητικής πρωτεΐνης.

Μιλώντας γενικά, η δραστηριότητα της ειδικής ανοσίας κατά του καρκίνου εξαρτάται θετικώς από το φυσικό επίπεδο απόκρισης του ατόμου και την αντιγονικότητα του νεοπλάσματος. Ασθενής ανοσοποιητική απάντηση μπορεί, όπως είπαμε προηγουμένως, αντί να αναστείλει, να προωθήσει την ανάπτυξή του (η λεγόμενη θεωρία ανοσοπροαγωγής - βλ. Prehn and Larpe, 1971). Ακόμα και ένα ισχυρό ανοσοποιητικό σύστημα πολλές φορές προωθεί έναν όγκο με χαμηλή αντιγονικότητα. Έτσι εξηγείται κατά πολλούς η ταχύτερη ανάπτυξη πολλών κακοηθειών σε νέους ανθρώπους (Ershler and Longo, 1997).

Είναι γεγονός ότι οι αυξανόμενοι in vivo όγκοι σπανιώτατα διηθούνται από T-λεμφοκύτταρα και ως εκ τούτου ο καρκινοπροστατευτικός ρόλος πολλές φορές αποδίδεται σε άλλους τύπους λευκών αιμοσφαιρίων (εωσινόφιλα, μακροφάγα και φυσικούς φονείς). Τα NK-κύτταρα μπορούν να είναι πράγματι πολύ σημαντικά στην βραχυπρόθεσμη προστασία, δεν πρέπει όμως να ξεχνάμε ότι η T-ανοσία επανενεργοποιείται και έτσι αποτελεί θεμέλιο της μακροπρόθεσμης αντίστασης (Stern and Stanley, 1994).

Η υπόθεση περί μελετητέας συμμετοχής των T-λεμφοκυττάρων όχι μόνο στην καταπολέμηση, αλλά και στην πρόληψη καρκίνου ενισχύεται από τις εξής παρατηρήσεις. Η τεχνητή ανοσοκαταστολή αυξάνει τις περιπτώσεις καρκινογένεσης, και επιπλέον η συχνότητα ωρισμένων τύπων καρκίνου αυξάνεται δραματικά, ενώ κάποιων άλλων πολύ λιγότερο (Sheil, 1984). Η εξήγηση που δόθηκε προσέγραφε στις ανοσοκατασταλτικές ουσίες, που είναι ταυτόχρονα και μεταλλαξιογόνοι, εκλεκτική συγγένεια προς διαφόρους ιστούς. Υπάρχει όμως και άλλη παραλλαγή, ιδιαίτερα αν θυμηθούμε την συμμετοχή των σε αρκετές κακοήθειες, οι οποίες επίσης συσχετίζονται στενά με την ανοσοκαταστολή (Stern and Stanley, 1994). Εφ' όσον οι καρκινογόνοι αυτοί ιοί παρουσιάζουν συγγένεια με συγκεκριμένους τύπους ιστών, το ως άνω γεγονός μπορεί να προκύπτει αιτιωδώς από αναστολή της T-ανοσίας.

Και πέραν της ιϊκής καρκινογένεσης η παραδοχή της πρόληψης δια των T-λεμφοκυττάρων φαίνεται εφικτή εν όψει πολλών συνήθως διαδοχικών μεταλλάξεων, που απαιτούνται για πλήρη κακοήγη μετατροπή. Τοιουτοτρόπως, ο T-κλάδος δύναται να ευαισθητοποιηθεί πολύ πριν αναπτυχθεί άρτιος κακοήθης φαινότυπος και διακρίσιμος όγκος.



Καθώς οι μηχανισμοί αντίστασης κατά του καρκίνου αποτυγχάνουν, ο καρκίνος αναπτύσσεται, συνεπιφέροντας πολλά και διάφορα κλινικά συμπτώματα και διαταραχές, ανάλογα με τον τύπο του (Tsakraklidis, 1981): π.χ. αναιμία στους πάσχοντες από καρκίνο του γαστρεντερικού σωλήνος, που εξηγείται με χρόνια απώλεια αίματος. Πολλοί καρκινοπαθείς αποθνήσκουν εξ' αιτίας επιπλοκών (πίεση του ουρητήρα, ραγδαία αιμορραγία και λοιμώξεις).

Η καρκινοματώδης καχεξία είναι το κλασικό αίτιο θανάτου, αλλά ο μηχανισμός της σκοτεινός. Οι μεγάλες ανάγκες του κακοήθους κυττάρου σε θρεπτικές ουσίες αποτελούν, όπως φαίνεται, αναγκαία, όχι όμως και μοναδική συνιστώσα της πραγματικά υπάρχουσας καχεξίας. Διεπιστώθη ότι αυτή μεταδίδεται με το πλάσμα σε υγιή πειραματόζωα και επομένως καθορίζεται από κάποιους διαλυτούς παράγοντες (Illig et al., 1992). Δεν αποκλείεται οι ουσίες αυτές να έχουν όχι μόνο γενική τοξική επίδραση, αλλά να επηρεάζουν εκλεκτικά τα κανονικά κύτταρα, μεταβάλλοντας έτσι την αναλογία της πρόσληψης θρεπτικών συστατικών μεταξύ του κανονικού και του νεοπλαστικού ιστού. Όντως, αυτό που συχνά ανιχνεύεται στους καρκινοπαθείς, είναι η υπεργλυκαιμία, οφειλόμενη σε αντίσταση των περιφερικών ιστών στην δράση της ινσουλίνης, η οποία αντίσταση ελαττώνεται κατόπιν εκτομής του νεοπλάσματος (Sakorafas and Tsiotou, 1997).

Η ανωτέρω εκτεθειμένη διαδικασία εμφάνισης και προόδου του καρκίνου σε κάθε στάδιο της επηρεάζεται από πολλές συνθήκες. Διαρκές στρες πρέπει να αναφερθεί ως αναμφισβήτως συμβάλλον στην καρκινογένεση και την ανάπτυξη του καρκίνου. Πτώση του συναισθηματικού επιπέδου μπορεί να έχει βιοχημικές συνέπειες (Cholst, 1996), κυρίως την στροφή ενός κυττάρου προς τον αναερόβιο μεταβολισμό παρουσία διαθέσιμου οξυγόνου (το λεγόμενο Warburg effect που είναι παρόν εν δυνάμει σε όλα τα κακοήθη κύτταρα). Από άλλης πλευράς, το οξυγόνο, που δεν καταναλώνεται και η συγκέντρωσή του αυξάνεται, είναι τοξικό και προξενεί βλάβες του DNA. Μεσώ αυτών των μεταλλάξεων το κύτταρο τείνει να προσεγγίσει τον φαινότυπο αναερόβιου μικροβίου, δηλαδή να γίνει δυνητικώς αθάνατο και διασπειρόμενο. Αρνητική ως προς την προστασία κατά του καρκίνου επίδραση του στρες επί του ανοσοποιητικού συστήματος είναι επίσης αναμφισβήτητη (Post-White, 1996).

1.3.4. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ.

Αναφέραμε προ ολίγου το αδέσμευτο οξυγόνο ως επιβλαβές για το DNA. Αυτό συμβαίνει διότι κατά την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου προς το νερό παράγονται ως ενδιάμεσα προϊόντα ελεύθερες ρίζες - άτομα ή μόρια που φέρουν στην εξωτερική στοιβάδα ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Οι ενώσεις αυτές είναι πολύ δραστηρές και η φυσιολογική σημασία των επεκτείνεται πέραν των άμεσων αντιδράσεων με το DNA.

Σε συνάρτηση από το αν το αδέσμευτο ηλεκτρόνιο προκύπτει μέσω αφαίρεσης ή πρόσθεσης, οι ελεύθερες ρίζες διακρίνονται αντίστοιχα σε οξειδωτικές και αναγωγικές (ανιονικές). Οι πηγές παραγωγής τους (Zirotiannis, 1994) μπορούν να υποδιαιρεθούν σε εξωγενείς και ενδογενείς:

Εξωγενείς:

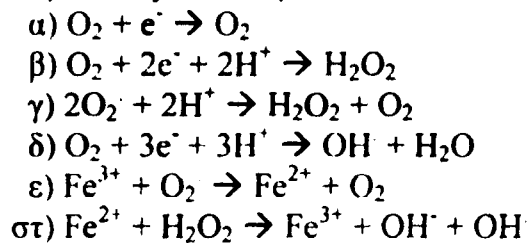
- α) ατμοσφαιρική ρύπανση,
- β) ιονίζουσα ακτινοβολία,
- γ) καύση οργανικών ουσιών,
- δ) φάρμακα, αναισθητικά, διαλύτες.

Ενδογενείς:

- α) μιτοχόνδρια,
- β) NADPH-οξειδάση,
- γ) ξανθοοξειδάση,
- δ) προσταγλανδινωσυνθετάση,
- ε) μικροσωμικές οξειδάσες.

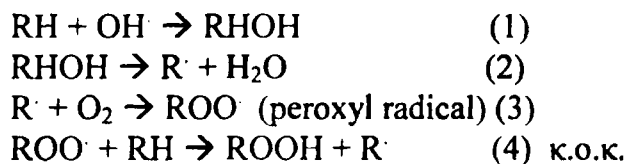


Η δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών καθορίζεται από την τάση τους να δημιουργήσουν ζεύγος ηλεκτρονίων. Επιπλέον συχνά προκαλούν αλυσιδωτές αντιδράσεις με παραγωγή καινούργιων ριζών έως ότου η αλυσίδα διακόπτεται με συνδυασμό δύο τέτοιων (Vigo-Pelfrey, 1990). Μερικές ενεργές ρίζες και δραστικές μορφές οξυγόνου παρουσιάζονται παρακάτω:



Από πλέον σύνθετες ρίζες που προκύπτουν βιολογικά αξίζει να αναφερθούν οι αλκοξυλικές (RHO \cdot), φαινοξυλικές (C₆H₅O \cdot) και αλκυλικές (RC \cdot).

Οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου και άλλες είναι εξαιρετικώς ενεργοί, καθώς παρουσία μοριακού οξυγόνου προξενούν αλυσιδωτή υπεροξειδωση πάρα πολλών βιομορίων (π.χ. η λιπούπεροξειδωση, Esterbauer, 1982) συμφώνως προς το ακόλουθο σχήμα:



Διάφορες βιολογικές διεργασίες εξυπηρετούνται υπό των ελευθέρων ριζών, μεταξύ των οποίων είναι η κυτταρική αναπνοή και ο μεταβολισμός των λιπιδίων. Σημειωτέος ρόλος αποδίδεται σ'αυτές κατά την ανοσοποιητική αντίσταση. Οι τοπικώς εκκρινόμενες από μακροφάγα ελεύθερες ρίζες επάγουν την παραγωγή αντιφλεγμονωδών ουσιών, διευκολύνουν την καταστροφή εισβολέων, διεγείρουν την φαγοκυττάρωση (Guyton, 1994), μετέχουν στην μεταφορά σημάτων προς τα λεμφοκύτταρα (Lowe et al., 1998).

Οι κυτταρολυτική δράση προκύπτει ως αποτέλεσμα προοδευτικής καταστροφής μεμβρανών και DNA, και τα μορφώματα που τοποθετούνται εγγύτερα προς την πηγή παραγωγής των ελευθέρων ριζών επηρεάζονται πρότερα. Ούτως, υπάρχουν ενδείξεις συμμετοχής ελευθέρων ριζών στην καταστροφή νεοπλαστικών κυττάρων υπό του TNF (αυξημένος συνολικός δείκτης της λιπούπεροξειδωσης που είναι η μαλονική διαλδεΐδη, Matthews et al., 1988). Εν τούτοις, τα πρώτα σημεία παραγωγής ριζών στο κύτταρο είναι το μιτοχόνδριο (αναπνοή) και οι μεμβράνες (αραχιδονικός μεταβολισμός). Μπορούμε να παρατηρήσωμε ταυτόχρονα ότι το πρώτο βήμα της TNF-τοξικότητας συνίσταται στην συρρίκνωση μιτοχονδρίων.

Μέσα στην περιοχή φλεγμονής, όπου η συγκέντρωσή τους είναι σχετικά μεγάλη, οι ελεύθερες ρίζες πιστεύεται να εκτελούν ανοσοκατασταλτικό ρόλο (El-Hag et al. 1986, El-Hag and Clark 1987), επηρεάζοντας τα λεμφοκύτταρα, κατά πάσα πιθανότητα με τοξικό τρόπο, πράγμα που σαφώς αποτελεί περίπτωση της παλίνδρομης ρύθμισης. Υπό ομαλές συνθήκες η δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών περιορίζεται στα πλαίσια του ωφελίμου με αντιοξειδωτικά συστήματα, για τα οποία θα μιλήσωμε παρακάτω. Σε περίπτωση αποτυχίας των συστημάτων αυτών και καθώς το οξειδωτικό στρες γενικεύεται, το καταστροφικό δυναμικό των ελευθέρων ριζών στρέφεται κατά των κανονικών κυττάρων, επάγοντας την παθολογική εξέλιξη. Ένα υποδειγματικό αποτέλεσμα (απόπτωση των NK-κυττάρων) έχομε δει προηγουμένως (σελ. 25).

Η υπόθεση περί της συμμετοχής των ελευθέρων ριζών στα βασικά στάδια της καρκινογένεσης βρίσκει σήμερα όλο και περισσότερο έδαφος (Halliwell and Gutteridge 1989, Trush et al. 1991). Εν πρώτοις, πολλά καρκινογόνα, π.χ. η υδραζίνη (McRae et

al.,1979), παράγουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που μπορούν άμεσα να επιτεθούν στο DNA. Κατά δεύτερο λόγο, η οξειδωση, όπως στην περίπτωση του βενζοπυρενίου, αποτελεί κρίσιμο βήμα στην εξάσκηση της καρκινογόνου ισχύος. Διάφορα αντιοξειδωτικά μόρια διακόπτουν την καρκινογένεση, ελέγχοντας τον μεταβολισμό καρκινογόνων (Clemens, 1991).

Στο στάδιο της προώθησης η συμβολή των ελευθέρων ριζών ενισχύεται από τα εξής δεδομένα (Kensler et al.,1986):

- 1) Δράση πολλών αντιοξειδωτικών παραγόντων ως αντιπροωθητών.
- 2) Ρύθμιση υπό των προωθητών των αντιοξειδωτικών συστημάτων.
- 3) Πολλοί προωθητές όγκων παράγουν ελεύθερες ρίζες.

Παράλληλα προς τα ανωτέρω, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να επηρεάζουν το καθεστώς φωσφορυλίωσης του κυττάρου, προκαλώντας έτσι την έκφραση των πρωτοογκογονιδίων (Muelmatter et al. 1988, Halliwell and Gutteridge 1989).

Αν θυμηθούμε ότι το στάδιο της προώθησης ουσιαστικά συνίσταται στην συσσώρευση μεταλλάξεων και παροχή κατάλληλων συνθηκών προκειμένου να εκδηλωθεί ο κακοήθης φαινότυπος, ο ρόλος των ελευθέρων ριζών διαφαίνεται ακόμη καθαρότερα. Αυξημένος βασικός ρυθμός μεταλλάξεων αποτελεί μάλλον απaráβλεπτη προϋπόθεση εμφάνισης καρκίνου και σε τούτο συμβάλλουν οι ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, καταστροφή των γειτονικών κυττάρων δύναται να απελευθερώσει το μεταλλαγμένο κύτταρο από τον έλεγχο του περιβάλλοντος και έτσι να το προωθήσει στην κακοήθη κατεύθυνση. Η τοπική διήθηση των επιβιωσάντων νεοπλαστικών κυττάρων λογικά επίσης πρέπει να αυξάνεται. Μια πολύ έμμεση απόδειξη των άνω συνάγεται από την εξής ακολουθία. Ως προς την *in vitro* ευαισθητοποίηση λεμφοκυττάρων με την ιντερλευκίνη 2 έχει υποτεθεί ότι την μεγαλύτερη δραστηριότητα έχουν οι κλώνοι με μέτρια παραγωγή του TNF (Brittenden et al.,1996) λόγω ελάσσονος τοξικότητας δια τον πέριξ ιστό. Αφ'ετέρου ο TNF σχετίζεται, καθώς εδείχθη προ ολίγου, με την δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών.

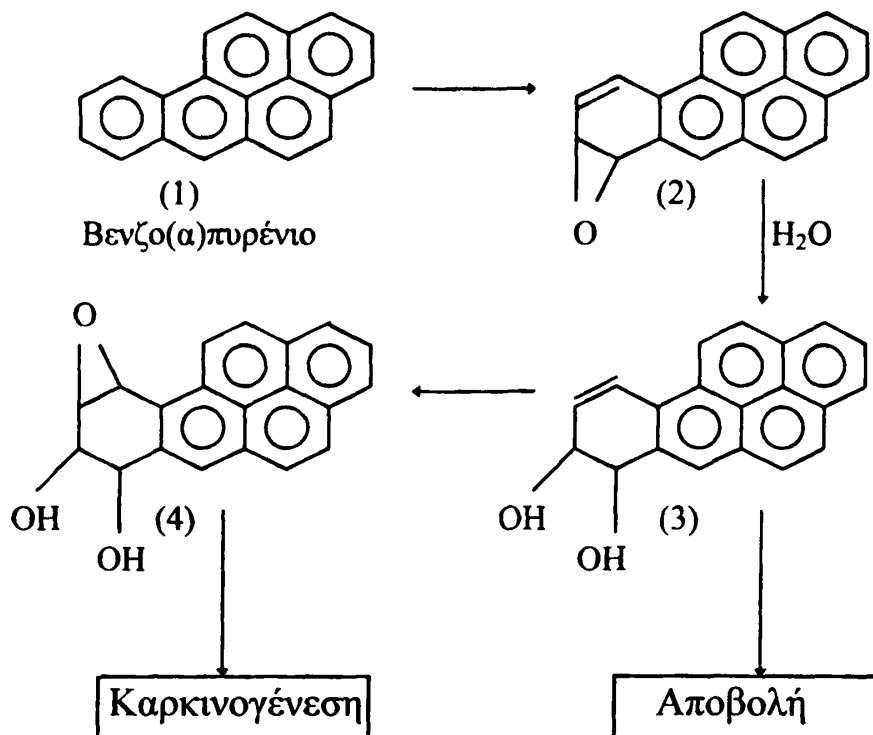
1.4. ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΔΙΑ ΠΟΛΥΚΥΚΛΙΚΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ.

Μεταξύ των πλέον ισχυρών καρκινογόνων είναι μερικοί πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ), είς εξ αυτών - το βενζο(α)πυρένιο (B(a)P) - εχρησιμοποιήθη στο πειραματικό μέρος της διατριβής ως μοντέλο. Οφείλομε, συνεπώς, να εκθέσωμε τις λεπτομέρειες αυτής της χημικής διαδικασίας. Άλλωστε οι ΠΑΥ είναι προϊόντα ημιτελούς καύσεως οργανικών υλών (άνθραξ, πετρέλαιο, καπνός) και ως εκ τούτου πιθανότατα αποτελούν μία σημαντική φυσική και περιβαλλοντική αιτία πρόκλησης καρκίνου. Οι κυριώτεροι καρκινογόνοι ΠΑΥ είναι τα 7,12-διμεθυλοβενζο(α)ανθρακένιο, διβενζο(α,h)ανθρακένιο, βενζο(α)πυρένιο, 3-μεθυλοχολανθρένιο (Καίρουζος, 1996).

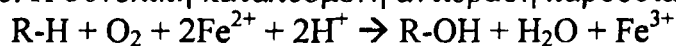
Αρχικώς υπεστηρίχθη ότι η μεταλλαξιογόνος δράση των ΠΑΥ συντελείται με άμεσο τρόπο και καθορίζεται από υψηλή ηλεκτρονική πυκνότητα σε μια ορθο-θέση (Daudel, 1966). Αργότερα όμως κατέστη φανερή η πολύπλοκη μεταβολική προεπεξεργασία (βλ. σχ. 3), της οποίας σκοπός μεν είναι απομάκρυνση της ένωσης, μερικό δε αποτέλεσμα - μετατροπή αυτής εις ενεργό μορφή (Morrison and Boyd, 1988). Η ένωση (4) είναι εκείνη που έχει την υψηλότερη συγγένεια με τα νουκλεϊνικά οξέα, προσβάλλει νουκλεοτιδικές βάσεις και τις εμποδίζει να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου στη διπλή έλικα του DNA. Αποτέλεσμα είναι η πρόκληση μεταλλάξεων, των

οποίων ο ρυθμός συναρτάται προς την εκάστοτε ποσότητα του τοπικώς χορηγούμενου καρκινογόνου.

Σχήμα 3. In vivo μεταβολισμός του Β(α)Ρ.



Σημειωτέον ότι η απαιτούμενη προς ενεργοποίηση υδροξυλίωση επιτελείται από το κυτόχρωμα P-450, το οποίο είναι ένα ένζυμο κυρίως του μικροσωμικού κλάσματος του ενδοπλασματικού δικτύου, βρίσκεται όμως και στον πυρήνα (Robins, 1989). Υδροξυλιώνει πλήθος ξενοβιοτικών κατόπιν εισχωρήσεώς των στο κύτταρο. Η απαραίτητη δε επί τούτω μεταφορά ηλεκτρονίων εξασφαλίζεται από το σίδηρο του συνενζύμου. Η συνολική καταλυόμενη αντίδραση παρουσιάζεται ως εξής:



Στις μεταβολιζόμενες μ' αυτόν τον τρόπο ουσίες ανήκουν το βενζοπυρένιο, άλλοι αρωματικοί υδρογονάνθρακες, η ανιλίνη, η μορφίνη κ.α. (Mayes, 1991).

1.5. ΛΕΙΟΜΥΟΣΑΡΚΩΜΑΤΑ.

Το μοντέλο χημικής καρκινογένεσης, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, παράγει το λειομυοσάρκωμα, ένα ειδικό νεόπλασμα, που είναι κακοήθης περίπτωση όγκου λείων μυϊκών ινών, υπαγόμενη στην ευρύτερη κλάση των σαρκωμάτων μαλακών μορίων (ΣΜΜ), διαφοροποιείται δε σε τρεις κατηγορίες: α) λειομυοσάρκωμα των εν τω βάθει μαλακών μορίων, β) λειομυοσάρκωμα του δέρματος και του υποδορίου ιστού, γ) λειομυοσάρκωμα αγγειακής προέλευσης (βλ. την ταξινόμηση των όγκων μαλακών μορίων στους Enzinger and Weiss, 1995).

Οι λείες μυϊκές ίνες κατανομούνται ευρέως σε όλο το ανθρώπινο σώμα, αποτελώντας το τοίχωμα του γαστρεντερικού, του ουρογεννητικού, του αναπνευστικού σωλήνος και των αγγείων, ενώ είναι παρούσες και σε διάφορα άλλα σημεία, όπως στο δέρμα, στην ίριδα του οφθαλμού κλπ. Σε σχήμα οι λείες μυϊκές ίνες είναι ατρακτοειδείς, με ένα κεντρικώς τοποθετημένο κυλινδρικό πυρήνα. Οι κυτταρικές μεμβράνες τους εφάπτονται σε πολλά σημεία, σχηματίζοντας έτσι ένα λειτουργικό συγκύτιο (Guyton,

1994). Στο κυτταρόπλασμα υπάρχουν ινίδια τριών τύπων: τα της μυοσίνης και της ακτίνης, που αποτελούν την μυοσυσταλτική συσκευή, και τα ινίδια που σχηματίζουν τον κυτταροσκελετό (Hashimoto et al., 1960).

Τα λειομυοσαρκώματα είναι, γενικώς, επιθετικοί όγκοι, ανθιστάμενοι σε διάφορες θεραπείες. Επί παραδείγματι τα σαρκώματα της μήτρας αποτελούν τις πλέον θανατηφόρες γυναικολογικές κακοήθειες, ενώ η πλειοψηφία αυτών είναι λειομυοσαρκώματα (Hacker, 1994). Μεθίστανται, ως επί το πλείστον, στο ήπαρ και τους πνεύμονες (Shmookler et al., 1983), ακολουθούμενα από το δέρμα, τα μαλακά μόρια και τα οστά. Πρόκειται κυρίως για αιματογενείς μεταστάσεις, καίτοι οι επιχώριοι λεμφαδένες προσβάλλονται επίσης (Ackerman 1996, Enzinger and Weiss 1995). Τα εν τω βάθει λειομυοσαρκώματα αναδεικνύουν γενικώς χειρότερη πρόγνωση (Konomoto et al., 1998).

Κατά τα τελευταία έτη οι υποκείμενες των σαρκωμάτων μοριακές αλλοιώσεις ετέθησαν υπό έντονο μελέτην. Υπερέκφραση της 53-kDa πρωτεΐνης, προϊόντος του γονιδίου p53 διηκριβώθη σε ~55% των ΣΜΜ, ενώ στα ~23% ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις του (Yoo et al., 1997). Θεωρείται ότι διάφορες αλλοιώσεις του p53 είναι η πλέον συχνή περίπτωση μοριακής ανωμαλίας των ΣΜΜ (Pollock et al., 1998). Η ανοσοθετικότητα ως προς το p53 αυξάνεται με τον βαθμό κακοήθειας, οι δε μεταλλάξεις του γονιδίου παρατηρούνται στα σαρκώματα μυογενούς προέλευσης (Wurl et al., 1996). Γενικά, τα λειομυοσαρκώματα αποτελούν μάλλον την πιο συσχετιζόμενη προς το p53 υποκατηγορία των ΣΜΜ (Soini et al. 1992, Andreasson et al. 1993, Stratton et al. 1990, Dei Tos et al. 1993).

Στην ουσία η υπερέκφραση και η μετάλλαξη του p53 είναι έννοιες σχεδόν ταυτόσημου εύρους. Υπό κανονικές συνθήκες η κωδικοποιημένη υπό του p53 πρωτεΐνη δεν ανευρίσκεται με ιστοχημικές τεχνικές, μια μετάλλαξη του όμως όχι μόνον αλλάζει τις λειτουργικές ιδιότητες, αλλά και αυξάνει την περίοδο ημιζωής, καθιστώντας ωσαύτως εφικτή την ανοσοϊστοχημική ανάλυση (O'Reilly et al., 1997).

Αν και ανωμαλίες του p53 είναι σταθερά παρούσες στα ΣΜΜ γενικώς και στα λειομυοσαρκώματα ειδικότερα, η σχέση τους προς την περαιτέρω βιολογική συμπεριφορά των όγκων είναι αμφιλεγόμενη. Μερικοί αναφέρουν απουσία οιασδήποτε προγνωστικής αξίας του p53-καθεστώτος ως αποτέλεσμα των μελετών τους (O'Reilly et al. 1997, Nakanishi et al. 1997), ενώ σε μια άλλη εργασία υπεστηρίχθη ότι η επιβίωση ασθενών με εν τω βάθει λειομυοσαρκώματα είναι κατά πολύ χειρότερη παρουσία μεταλλάξεων του p53 (Konomoto et al., 1998). Εισαγωγή όμως του 'άγριου' τύπου (wild type) του p53 εντός κυττάρων λειομυοσαρκώματος με δεδομένη μετάλλαξη του p53 μειώνει τον πολλαπλασιασμό, συγκρατώντας τα κύτταρα ξενιστές στην G₁-φάση (Pollock et al., 1998).

Για την επιτυχή διάγνωση οιασδήποτε τύπου καρκίνου σπουδαίο ρόλο παίζει ο ιστολογικός χαρακτήρας, καθ'όσον επ'αυτού βασίζεται η αποδεκτή ταξινόμηση. Η κατάταξη του αντιμετωπιζόμενου νεοπλασματος έχει, βεβαίως, μια προγνωστική αξία, αφού η επιθετικότητά του εξαρτάται εν πολλοίς από τον ιστό προέλευσης. Εν τούτοις, η ταυτοποίηση του ιστολογικού τύπου δεν αποτελεί επαρκές τεκμήριο για την κλινική πορεία της νόσου. Δι'αυτό προετάθησαν διάφορα συστήματα βαθμοποίησης (grading) του βαθμού κακοήθειας, βασισόμενα σε μερικές ιστολογικές παραμέτρους, ιδιαιτέρως προς επίτευξιν ακριβούς πρόγνωσης.

Ως προς τα σαρκώματα εν προκειμένω δύνανται να αναφερθούν τα εξής:



Πίναξ 2. Συστήματα καθορισμού του βαθμού
κακοήθειας των σαρκωμάτων.

I. <u>Broders et al., 1939.</u>	II. <u>Markhede et al., 1982 (4 βαθμοί).</u>
1) Βαθμός κυτταροβρίθειας.	1) Βαθμός κυτταροβρίθειας.
2) Κυτταρικός πολυμορφισμός.	2) Κυτταρικός πολυμορφισμός.
3) Μιτωτική δραστηριότητα.	3) Μιτωτική δραστηριότητα.
4) Βαθμός νέκρωσης.	
5) Διηθητική ανάπτυξη.	
III. <u>Costa et al., 1984 (3 βαθμοί).</u>	IV. <u>Trojani et al., 1984 (9 βαθμοί).</u>
1) Ιστολογική διάγνωση.	1) Κυτταρική διαφοροποίηση.
2) Βαθμός κυτταροβρίθειας.	2) Μιτωτικός δείκτης.
3) Κυτταρικός πολυμορφισμός.	3) Βαθμός νέκρωσης.
4) Μιτωτική αναλογία.	
5) Βαθμός νέκρωσης.	

Το τροποποιημένο σύστημα IV (Coindre et al., 1986) εφηυρόσθη και στην παρούσα μελέτη.

Ενώ ο ιστολογικός βαθμός κακοήθειας απεικονίζει τις επιθετικές ικανότητες του όγκου, μεγάλη προγνωστική σημασία έχουν επίσης και άλλες πληροφορίες, οι οποίες, συνδυασμένες με τον βαθμό κακοήθειας, δίδουν την σταδιοποίηση της νόσου.

Πίναξ 3. Συστήματα σταδιοποίησης των σαρκωμάτων.

I. <u>Hadju, 1979 (6 στάδια).</u>
1) Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας.
2) Βάθος του πρωτοπαθούς όγκου.
3) Έκταση του πρωτοπαθούς όγκου.
II. <u>Enneking et al., 1981 (3 στάδια).</u>
1) Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας.
2) Παρουσία μεταστάσεων.
III. <u>Beahrs et al., 1992 (4 στάδια).</u>
1) Έκταση του πρωτοπαθούς όγκου.
2) Μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες.
3) Απομακρυσμένες μεταστάσεις.
4) Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας.

Καθώς βλέπομε, οι διαστάσεις του όγκου, η παρουσία μεταστάσεων και ο βαθμός κακοήθειας αποτελούν κρίσιμα για την εκτίμηση της κλινικής κατάστασης μεγέθη.



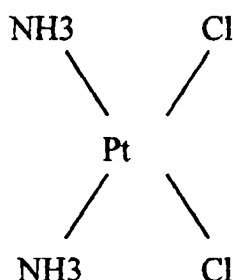
1.6. ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΜΟΡΙΑ .

Τηρώντας την πειραματική προσέγγιση της παρούσης διατριβής, θα παρουσιάσουμε δύο κατηγορίες αντικαρκινογόνων ουσιών: μέταλλα και οργανικά μόρια με αντιοξειδωτικές ικανότητες. Μιλώντας γενικά, στην αντικαρκινογόνο δράση πρέπει να διακρίνουμε την *καρκινοπροστατευτική* και την *καρκινοθεραπευτική* συνιστώσα. Έτσι, για παράδειγμα, χημικές ουσίες, που παρεμποδίζουν τον μεταβολισμό ενός συγκεκριμένου καρκινογόνου, μπορούν να μην είναι διόλου χρήσιμες στα αργότερα στάδια. Όμως, παρ'όλο που οι δύο αυτές συνιστώσες δεν ταυτίζονται, δύναται κανείς να υποθέσει αρκετά στενή συσχέτιση μεταξύ των και τούτο δια τον λόγον ότι οι γενικοί μηχανισμοί καρκινογένεσης (μεταλλάξεις, κλωνοποίηση), οι οποίοι ενισχύονται μέγιστα υπό των καρκινογόνων, υπάρχουν και πριν και μετά την επίδραση των τελευταίων, συμβάλλοντας στην επιτυχή ανάπτυξη του καρκίνου καθ'έκαστο στάδιο.

Αντικαρκινογόνος δράση μερικών ουσιών ενίοτε παρουσιάζεται ως ειδικό αποτέλεσμα τοπικών συνθηκών (ικανότητα πρόσληψης, εντόπιση ευαίσθητων καρκινογόνων). Ωσαύτως το δια του στόματος χορηγούμενο ασβέστιο αναστέλλει την εμφάνιση του καρκίνου παχέος εντέρου (Plessas et al., 1990) επειδή, συνδεδεμένο με τα χολικά και λιπαρά οξέα, μειώνει την μιτογόνο τους δράση. Υπάρχουν όμως και ενώσεις με πιο γενική δράση, οι οποίες εκτίθενται κάτωθι.

1.6.1. ΜΕΤΑΛΛΑ.

Μεταξύ των πλέον δραστικών αντικαρκινογόνων ουσιών κατατάσσεται ο *cis*-διαμμινο-διχλωρο-λευκόχρυσος (*cis*-DDP) και μερικά παράγωγά του (Stewart et al., 1994):



Συντόμως έγινε κατανοητόν ότι της αντικαρκινογόνου ισχύος του φαρμάκου υπόκεινται αντιδράσεις με το DNA, εφ'όσον ο *cis*-DDP παρουσίαζε τις εξής βιολογικές ιδιότητες (Farell, 1989):

- α) νηματώδης ανάπτυξη στα βακτήρια,
 - β) λυσογένεια,
 - γ) καρκινογένεση,
 - δ) αδρανοποίηση ιών,
 - ε) απενεργοποίηση των DNA-βακτηριοφάγων,
 - στ) συσχέτιση της αντικαρκινογόνου και αντιβακτηριακής δράσεως,
- που συμπληρώνονται από τις ακόλουθες βιοχημικές (Farell, 1989):

- α) εκλεκτική αναστολή της σύνθεσης του DNA,
- β) αδρανοποίηση του υποστρώματος της DNA-πολυμεράσης,
- γ) εκλεκτική συγγένεια με το DNA,
- δ) ομοιόμορφος τρόπος σύνδεσης με το DNA διαφορετικών συμπλόκων του *cis*-DDP.



Σήμερα γνωρίζουμε ότι η ισχυρή κυτταροτοξικότητα του cis-DDP προκύπτει ως αποτέλεσμα ανώμαλων διασταυρωτών και κυκλικών διασυνδέσεων των χρωμοσωμάτων. Η τέτοια επίδραση της ένωσης οδηγεί στην καταστολή της σύνθεσης και της μεταγραφής του DNA (Bergstrom et al., 1997). Τα εν πολλαπλασιασμό κύτταρα, λόγω αποδεματοποίησης του γενετικού υλικού, επηρεάζονται κατά πρώτο λόγο.

Υπάρχουν και μερικά ειδικότερα, προκαλούμενα υπό του cis-DDP, φαινόμενα που σχετίζονται με κακοήθειες:

1) Επαγωγή της απόπτωσης κακοήθων κυττάρων *in vitro* (Barry et al. 1990, Eastman 1990, Miyashita and Reed 1993).

2) Ενδείξεις αναστολής της δραστηριότητας των τελομερασών στον άνθρωπο (Burger et al., 1997).

Η σημαντικότερη αρνητική πλευρά του cis-DDP είναι η υψηλή του τοξικότητα για τα κανονικά κύτταρα, πράγμα που περιορίζει μεγάλως τις δραστικές συγκεντρώσεις.

Ένα άλλο μεταλλικό στοιχείο, που χρησιμοποιήθηκε στη θεραπεία του καρκίνου από το 1912 (Delbet, 1912), είναι το *σελήνιο*. Υπό τη μορφή του σεληνώδους νατρίου έχει τόσο θεραπευτική (Von Euler, 1956), όσο και προληπτική (Clark, 1985) σημασία. Έγιναν επίσης επιτυχείς προσπάθειες συνδυασμένης αγωγής με βιταμίνες C, E και Se (Kallistratos et al., 1992) και με τα παραπάνω συν τη 2-μερκαπτοπροπιονυλ-γλυκίνη (Kalrouzos, 1996).

Έχουν διατυπωθεί ωρισμένες υποθέσεις περί του μηχανισμού δράσεως του σεληνίου:

1) Αποτελεσματική οξειδωση των σουλφυδρυλικών ομάδων, που απαιτείται για την σωστή διαίρεση κυττάρων (Broghammer et al., 1978).

2) Ενίσχυση της δραστηριότητας λεμφοκυττάρων και της σύνθεσης κυτοκινών (Kiremidjian-Schumacher et al., 1987).

3) Εξασφάλιση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, η οποία αποτρέπει τον σχηματισμό υπεροξειδίων και ελευθέρων ριζών από ακόρεστα λιπαρά οξέα (Le Boeuf et al., 1985).

Σημαντική κυτταροτοξικότητα εμφανίζουν ακόμα τα μέταλλα της IIIA ομάδας, εντός της οποίας διακρίνεται η αντικαρκινογόνος ισχύς του *γαλλίου*. Οι πλέον εν χρήσει μορφές του είναι οι συνδυασμοί με το νάτριο και το χλώριο. Ποικίλες *in vitro* δράσεις του γαλλίου επί νεοπλαστικών κυττάρων έχουν διαπιστωθεί:

1. Ανασταλτική επιρροή στην δραστηριότητα των εξής ενζύμων:

α) DNA-πολυμεράση β και δ (Adamson et al., 1975).

β) ATP-άση (Anghileri and Robert, 1982),

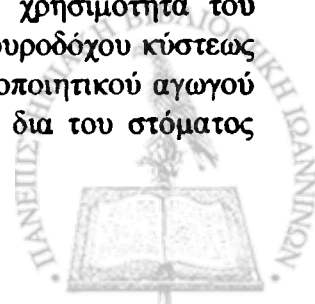
γ) αναγωγή νουκλεοτιδίων (Chitambar et al., 1988),

δ) τυροσινοφωσφατάση πρωτεϊνών κακοήθων κυττάρων (Berggren et al., 1993).

2. Αναστολή της Na^+/K^+ -μεταφοράς (Bara et al., 1992).

3. Κυτταροστατική και κυτταροτοξική επίδραση (Rasey et al., 1982).

Η αύξηση μιας ποικιλίας κακοηθειών αναστέλλεται σφοδρά *in vivo* υπό την επίρεια του μετάλλου (Adamson et al. 1975, Collery et al. 1992). Η δραστικότητα του χλωριούχου γαλλίου ήτο κατά πολύ ισχυρότερη στην εκθετική φάση της νεοπλαστικής αύξησης (Carpentier et al., 1987). Σε κλινικές μελέτες απεδείχθη χρησιμότητα του χορηγούμενου ενδοφλεβιώς γαλλίου κατά των καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστεως (Seligman and Crawford, 1991) και γενικότερα των όγκων του ουροποιητικού αγωγού (Seidman et al., 1991), των λεμφωμάτων (Warrell et al., 1987), ενώ δια του στόματος εφηρμόσθη προς ενίσχυσιν του λευκόχρυσου (Collery et al., 1994).



Το νατριούχο γάλλιο επηρεάζει την συγκράτηση δομικών στοιχείων στα οστά και μπορεί να μειώσει την απόδόμησή των. Χρησιμοποιείται κατά των οστικών μεταστάσεων και για να μειωθεί η κακοήθης υπερασβεστιαμία (Wartell, 1997).

Από άλλα μέταλλα, των οποίων η αντικαρκινογόνος δράση είναι γνωστή, θα αναφέρουμε το κοβάλτιο, που αναστέλλει την καρκινογένεση υπό του μεθυλοχολανθρενίου (Haleem and Cloverhill, 1980), και το βανάδιο στο κεφάλαιο 3.

1.6.2. ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ.

Ακόρεστες οργανικές ενώσεις, όπως το *cis*-ακονιτικό, το λινολεϊκό, το λινολικό και άλλα οξέα, είναι φυσιολογικοί αναστολείς περιβαλλοντικών καρκινογόνων (Kallistratos et al., 1982). Ιδιαίτερη μνείαν αξίζουν οι βιταμίνες *C* και *E*. Το ασκορβικό οξύ έχει ευρέος φάσματος δράση επί πειραματικών όγκων: από την πλήρη εξαφάνιση έως της αύξησης κακοήθειας (Kallistratos et al., 1984), ενώ διαιτητικώς προλαμβάνει την εμφάνιση καρκίνου στον οισοφάγο και στο στομάχι (Kolonel et al., 1981). Η αντικαρκινογόνος δράση του ασκορβικού μπορεί να εξηγηθεί με τους εξής τρόπους:

1. Έλεγχος των μεταλλάξεων δι'εκκαθαρισμού των ελευθέρων ριζών, κατά τον οποίον το ασκορβικό οξειδώνεται προς το δεϋδροασκορβικό.

2. Καταστολή των σχετικών με τον μεταβολισμό ξеноβιοτικών ενζύμων, όπως του P-450 (Zannoni et al., 1978).

3. Γενική ενισχυτική δράση στο ανοσοποιητικό, στην αποκατάσταση ιστών κλπ.

Φαίνεται ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα της βιταμίνης *C* εκπληροί τον καρκινοπροστατευτικό της ρόλο αν επιτευχθούν αρκετά υψηλά επίπεδα στο αίμα (Kalrouzos, 1996), πράγμα που ευρίσκεται εν συμφωνία με τις γενικές γνώσεις περί της αποτελεσματικότητας των αντιοξειδωτικών.

Η βιταμίνη *E* επηρεάζει αρνητικά αρκετά είδη καρκίνου, ενώ οι επιδημιολογικές μελέτες (Knekt et al., 1988) συσχετίζουν αυξημένη κατανάλωσή της με μειωμένη πιθανότητα εκδήλωσης κακοήθειας.

Σημαντική καρκινοπροληπτική ισχύ κατέχουν επίσης οι θειόλες: *L*-κυστεΐνη, αναχθείσα γλουταθειόνη, μερκαπτοηλεκτρικό οξύ, βισμούθειόλη *I*, διϋδροθειτόλη όταν χορηγούνται παράλληλα με τα καρκινογόνα (Kallistratos et al., 1982). Οι πλέον υποσχόμενες μεταξύ των θειολών δείχνουν η *L*-κυστεΐνη και η 2-μερκαπτοπροπιονυλ-γλυκίνη (2-MPG). Η κυστεΐνη είναι άμεσος πρόδρομος της αναχθείσης γλουταθειόνης, της οποίας η προεξέχουσα σημασία στην αποτοξική δραστηριότητα είναι υπεράνω πάσης αμφιβολίας. Η 2-MPG αποτελεί ισχυρόν εκκαθαριστή πολλών ελευθέρων ριζών (Saer et al., 1990) και μπορεί να εμπλέκεται στις σχετικές αντιδράσεις, προστατεύοντας κυτταρικές δομές από οξείδωση σουλφυδρικών ομάδων (Loesche et al. 1988, Bergmann et al. 1988, Sofis 1992). Ιδιότητες αμφοτέρων των ουσιών καθορίζουν την βιολογική δραστηριότητά τους, που είναι παρόμοια προς την αναχθείσα γλουταθειόνη, π.χ. οι τρεις αυτές θειόλες αναστέλλουν την *in vitro* συσσώρευση αιμοπεταλίων (Karkabounas et al., αδημοσίευτα).

Προσφάτως ισχυρά αντιμεταλλαξιογόνα με αντιοξειδωτικές ικανότητες ανεκαλύφθησαν στη ρίγανη και στο θυμάρι, εταυτοποιήθησαν δε ως γαλαγγίνη, κουερκετίνη (Kanazawa et al., 1995) και λουτεολίνη (Kazuyasu et al., 1995). Η δράση τους, όμως, διεπιστώθη μόνο επί ενός συγκεκριμένου διαιτητικού καρκινογόνου, όπερ 3-αμινο-1-μεθυλο-5H-πυριδο-(4,3-b)-ινδόλη.



1.7. ΣΥΝΟΨΙΣ.

Όπως προκύπτει από την παραπάνω έκθεση, η εμφάνιση του καρκίνου συναρτάται φυσικά με την οντογενετική εξέλιξη πολυκυττάρων οργανισμών. Συμβίωση των απαρτιζόντων τον οργανισμό κυττάρων απαιτεί απαγόρευση ωρισμένων τρόπων συμπεριφοράς, ήτις επιτυγχάνεται με διάφορα συστήματα ελέγχου, που είναι ενσωματωμένα στο γονιδίωμα. Από άλλης όψεως, υπό την επίδραση ευρέος φάσματος μικροπαραγόντων υπάρχει ένας σταθερά παρών ρυθμός μεταλλάξεων των σωματικών κυττάρων.

Συσσωρεύοντας μεταλλάξεις μερικά κύτταρα του σώματος, ει μη αποθνήσκοντα κατά την διάρκεια της διαδικασίας ταύτης, αργά ή γρήγορα παρακάμπτουν τα γενετικά φράγματα, γινόμενα νεοπλαστικά. Η ποσότητα των απαραίτητων επί τούτω μεταλλάξεων μπορεί να ποικίλλει, καθώς η γονιδιακή ρύθμιση του φαινοτύπου είναι πολύπλοκο ιεραρχικό σύστημα. Η προοδευτική αυτή γενετική αλλοίωση συντελείται και μετά την εμφάνιση παθολογικής εικόνας, συνεισφέροντας στην αύξηση του βαθμού κακοηθείας και βοηθώντας στο να υπερνικήσουν επιτυχώς τα καρκινικά κύτταρα τις δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος. Την βιολογική βαρύτητα στις περαιτέρω μεταμορφώσεις την παρέχει ο μηχανισμός της κλωνοποίησης.

Από κλινικής σκοπιάς μπορούμε να διακρίνωμε μερικές ουσιώδεις ποιοτικές αναβάσεις του κακοήθους φαινοτύπου:

1. Ανεξέλεγκτος και κατόπιν αυτοελεγχόμενος, δυνάμει επ'άπειρον, πολλαπλασιασμός (υπερπλασία).

2. Αλλοίωση της τυπικής κυτταρικής μορφής λόγω μειωμένης ευαισθησίας προς τα γειτονικά κύτταρα (ινοπλασία).

3. Ενεργός επεκτατική συμπεριφορά έναντι του περιβάλλοντος (διηθητικός και μεθιστάμενος καρκίνος).

4. Πολυμορφισμός λόγω μονίμως παρούσης γενετικής ασταθείας ως συνέπεια αλλαγής πυρηνικών πρωτεϊνών, π.χ. των τελομερασών.

5. Ανθεκτικότητα προς τους τοξικούς παράγοντες και το ανοσοποιητικό.

Τα διάφορα είδη καρκίνου προσδιορίζονται, στο πλαίσιο των πρώτων αιτιολογικών παραγόντων, από τον ιστό προέλευσης και το συγκεκριμένο σύνολο γενετικών αλλοιώσεων που έχουν. Στα επόμενα όμως φυσιολογικά επίπεδα οι διαφορετικές αιτιώδεις ακολουθίες συγκλίνουν σε γενικότερα φαινόμενα, όπως οι ακολουθίες φωσφορυλίωσης, τάση προς τον αναερόβιο μεταβολισμό κ.ο.κ.

Έτσι, οι θεραπείες που στοχεύουν τις πρωτογενείς αλλοιώσεις (π.χ. η ανοσοθεραπεία) μπορούν μεν να είναι πολύ δραστικές, αλλά με περιορισμένο πεδίο εφαρμογής. Οι δε ρυθμίζοντες τις γενικότερες διαδικασίες τρόποι θεραπευτικής αντιμετώπισης χρησιμοποιούνται ευρύτατα, περιορισμένη όμως είναι η ισχύς των.



2. ΒΑΝΑΔΙΟ ΩΣ ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΟ.

2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.

Το Βανάδιο ανεκαλύφθη το 1831 από τον σουηδό χημικό N.G. Selfström σε λυωμένα προϊόντα μεταλλευμάτων σιδήρου, ονομάσθη δε «vanadin» προς τιμήν της Vanadis, της βορειογερμανικής θεότητας της ομορφιάς. Ανήκει στα ευρέως διανεμημένα μέταλλα: η μέση συγκέντρωση στον φλοιό της γης είναι 100 p.p.m. ό,τι εγγίζει τις συγκεντρώσεις του χαλκού, μολύβδου, ψευδαργύρου και κασσιτέρου. Εξ' αιτίας ευρείας χρήσης του βαναδίου σε βιομηχανική παραγωγή, όπου εισέρχεται ως καταλύτης, η συγκέντρωση τούτου στην ατμόσφαιρα τείνει προς αύξησιν (Hudson, 1964).

Οι φυσιολογικές επιδράσεις του βαναδίου έγιναν αντικείμενο μελέτης αρκετά νωρίς, όταν ο J. Priestly το 1876 ανέφερε τις συνέπειες παροχής βαναδίου σε διάφορα ζώα. Αργότερα ο Lyonnett (Lyonnett, 1899) διεπίστωσε την θεραπευτική δράση του ορθοβαναδικού νατρίου επί διαβητικών ασθενών. Στο πέρασμα των αιώνων το βανάδιο ευρέως εχρησιμοποιείτο στη Γαλλία κατά της αναιμίας, φυματίωσης, χρονίου ρευματισμού και διαβήτη (Hudson, 1964).

Έπειτα για πολλά χρόνια η συσχέτιση του βαναδίου με την φυσιολογία και παθοφυσιολογία δεν έτρεφε εκτίμησης, έως ότου στις αρχές της δεκαετίας του 80 επήλθε η 'αναγέννηση'. Επανήλθαν στο προσκήνιο οι αντιδιαβητικές ιδιότητες του βαναδίου (Shechter et al, Dubyak et al. 1980, Degani et al. 1981), ανεκαλύφθη η αντικαρκινογόνος του δράση (Thompson et al., 1984), ευρέθη επίσης να επηρεάζει ολόκληρη σειρά ενζυμικών συστημάτων, π.χ. Na^+/K^+ ATP-άση (Schwartz et al., 1980) κτλ. Από τότε και στο εξής η διερεύνηση της βιολογικής σημασίας αυτού του ιχνοστοιχείου θεωρείται υποσχόμενη. Η βιβλιογραφία η αφιερωμένη στο βανάδιο συνεχώς αυξάνεται και ήδη το 1988 ξεπερνά 100 δημοσιεύματα ανά έτος (D. Chasteen, 1990). Παρ' όλο που είναι νωρίς να μιλάει κανείς για μια ολοκληρωμένη άποψη, έχουν επιτευχθεί όμως σημαντικά αποτελέσματα σε διάφορα πεδία, να δια φωτίσει τα οποία είναι στόχος του παρόντος κεφαλαίου.

2.2. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΒΑΝΑΔΙΟΥ.

Η χημεία του βαναδίου παρουσιάζεται πολύπλοκη, καθώς οι οξειδωτικές βαθμίδες του ποικίλλουν από -1 έως +5, επιπλέον δε, όπως θα δούμε αργότερα, σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις τείνει να πολυμερίζεται, πράγμα που επίσης επηρεάζει τις χημικές του ιδιότητες. Όταν πρόκειται για το υφιστάμενο σε υδατικό διάλυμα βανάδιο, ως κύριοι παράγοντες πρέπει να προσεχθούν το pH και η συγκέντρωση, σημασία έχει επίσης το εκάστοτε γεωμετρικό σχήμα της ένωσης. Επειδή επί ωρισμένων βιολογικών συστημάτων οι δράσεις του V(V) και V(IV) είναι πανομοιότυπες, τίθεται το ζήτημα του χημικού υποβάθρου αυτής της ομοιότητας, και η τελευταία θα μπορούσε να εξηγηθεί από ομοιότητες των τριδιάστατων δομών μερικών ενώσεων V(V) και V(IV) (Chasteen, 1983).

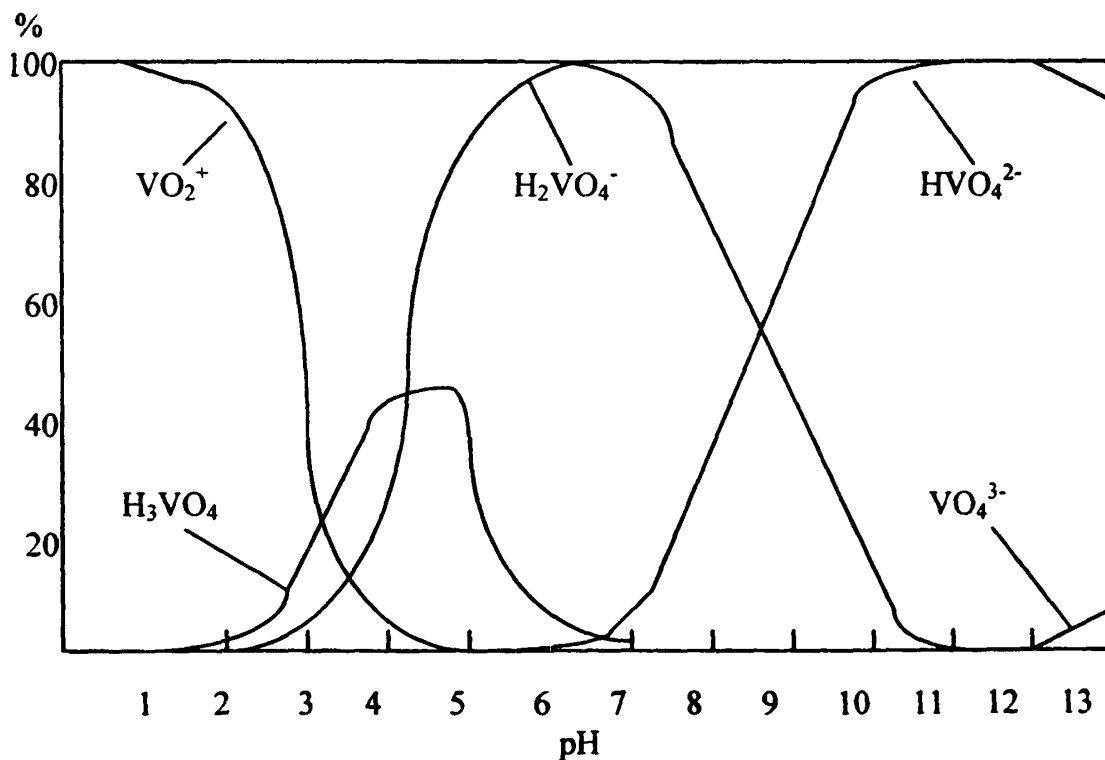
Σε σχέση προς τα βιολογικά συστήματα οι σημαντικές οξειδωτικές βαθμίδες του βαναδίου είναι +3, +4 και +5. Αναμφιβόλως, το V(III) διαδραματίζει κάποιο ρόλο σε κατώτερους εκπροσώπους του ζωϊκού βασιλείου, όπερ μαρτυρείται από την παρουσία του στους σκώληκες και τις βαναδοκύστες των φρύνων, καθώς και από την αναγωγή των βαναδικών (ενώσεων του V(V)) σε V(IV) και V(III) από *Pseudomonas vanadiumreductans* παρουσία H_2 , CO και οργανικών δοτών ηλεκτρονίων (Yukova et al., 1993). Επιπλέον, τα ασκίδια συσσωρεύουν στα εξειδικευμένα κύτταρα του αίματος,

τα λεγόμενα βαναδοκύτταρα, εξαιρετικά υψηλές ποσότητες βαναδίου (έως 1M), εξ ου περίπου 90% ευρίσκεται στην οξειδωτική βαθμίδα +3 (Tullius et al., 1980).

Η ύπαρξη και η σπουδαιότητα του V(III) στα κύτταρα πτηνών και θηλαστικών τελούν υπό ερώτησιν, ενώ ευρέως έχουν μελετηθεί V(IV) και V(V). Πάντως, in vitro μελέτες προσφέρουν ενδείξεις, ότι η ενδοκυτταρική κατανομή του εξωγενούς βαναδίου μεταξύ των βαθμίδων +3 και +4 μπορεί να αποτελεί σταθερή κατάσταση, καθώς ο ρυθμός αναγωγής οξυγόνου υπό του V(III) αναστέλλεται σημαντικά κάτω από την ενδοκυτταρική τιμή του pH = 6,0 (Stem et al., 1992). Πιστεύεται ότι στα εξωτερικά υγρά του σώματος και pH = 4 - 8 το βανάδιο υφίσταται σε ισορροπία $\text{HVO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{VO}_4^-$, όπου η οξειδωτική του βαθμίδα είναι +5 (Nechay, 1984), ενώ εντός του κυττάρου, όπου εισάγεται μέσω ενός μεταφορέα ανιόντος, ανάγεται ταχέως έως το V(IV), πιθανώς από τη γλουταθειόνη (Degani et al. 1981, Chasteen et al. 1986). Το V(IV) (είτε το λεγόμενο βαναδύλιο) υφίσταται υπό μορφήν κατιόντος VO^{2+} και είναι παραπλήσιο προς πολλά δισθενή μέταλλα, οία Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , αφ'ετέρου δε τα βαναδικά (HVO_4^{2-} , H_2VO_4^-) σαφώς αποτελούν ανάλογα των φωσφορικών ενώσεων. Πολλά φαινόμενα επίδρασης του βαναδίου στα ενζυμικά συστήματα μπορούν να εξηγηθούν υπό το φως των παραπάνω (Chasteen, 1990).

Σε υδατικό διάλυμα με ολική συγκέντρωση βαναδίου 10μM το V(V) υπάρχει στη μονομερή κατάσταση. Οι δεσπόζουσες μορφές σε συνάρτηση προς το pH παρουσιάζονται στο σχήμα 4.

Σχήμα 4. Οι μορφές του V(V) ως συνάρτηση του pH.
Ολική V-συγκέντρωση είναι 10μM.
(Chasteen, 1990).

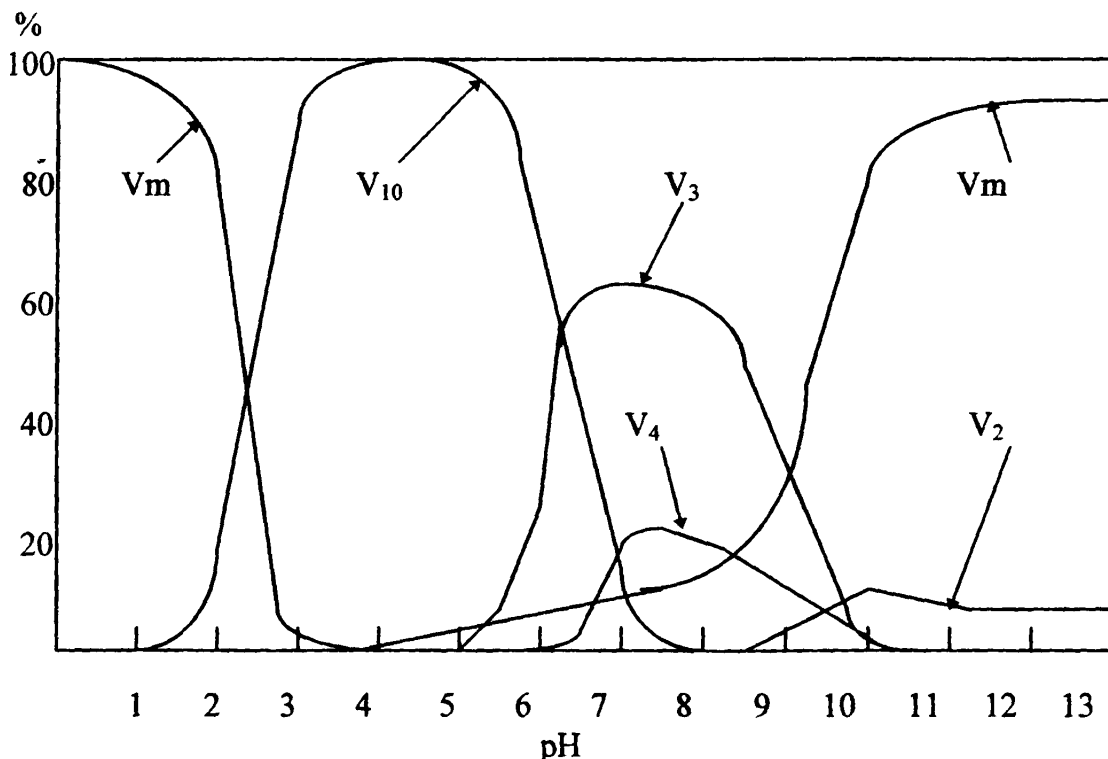


Αυτό το διάγραμμα αληθεύει σε γενικές γραμμές για τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις βαναδίου, καθώς δεν ξεπερνούν 1μM (Simons, 1979). Παρατηρήτεον ότι στο διάστημα pH = 6 - 12 οι μοναδικές υφιστάμενες ενώσεις είναι H_2VO_4^- και HVO_4^{2-} , οι οποίες έχουν προαναφερθεί.

Σε συγκεντρώσεις επιπέδου mM το βανάδιο σχηματίζει μια ποικιλία πολυμερών, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 5. Στις κατοπινές έρευνες ανεδείχθη ότι το V_3 δεν υπάρχει στο διάλυμα. Ουσιαστικά η καμπύλη συγκέντρωσης που απεδίδετο στο V_3 αντιστοιχεί σ' ένα μίγμα V_1 , V_2 και V_4 . Όπως προκύπτει από το παραπάνω σχήμα, σε $pH = 5,5$, που παρατηρείται σε πολλά κυστίδια των ευκαριωτικών κυττάρων, το δεκαβαναδικό πολυμερές αποτελεί το κυρίαρχο είδος. Η δομή του δεκαβαναδικού έχει προσδιορισθεί και είναι συνεπτυγμένο στον χώρο πολυμερές (Howarth and Jarrold, 1984).

Ένα από τα ουσιαστικότερα γνωρίσματα των βαναδικών ενώσεων είναι, προφανώς, ο παραλληλισμός με τα ανιόντα φωσφόρου. Έτσι, σε υδατικά διαλύματα και φυσιολογικό εύρος pH παρουσία βαναδίου και φωσφόρου σχηματίζονται μεικτοί ανυδρίτες τύπων $HVPO_7^{3-}/H_2VPO_7^{2-}$, $HVP_2O_{10}^{4-}/H_2VO_2(P_2O_7)_2^{5-}$ (Gresser et al., 1986). Περαιτέρω, η αναλογία των βαναδικών και φωσφορικών επεκτείνεται στα δι- και τριφωσφορικά: η μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP) συγκεντρώνει μονο- και διβαναδικά, όπου τα τελευταία μπαίνουν στη θέση των φωσφορικών καταλοίπων, οι δε προκύπτουσες ενώσεις είναι ανάλογες με τα ADP και ATP.

Σχήμα 5. Οι μορφές του $V(V)$ ως συνάρτηση του pH .
Ολική V -συγκέντρωση είναι 10mM
(Chasteen, 1990).



V_m - σύνολο μονοβαναδικών ειδών. V_n - σύνολο ειδών που κατέχουν n άτομα βαναδίου, $n = 2, 3, 4, 10$.

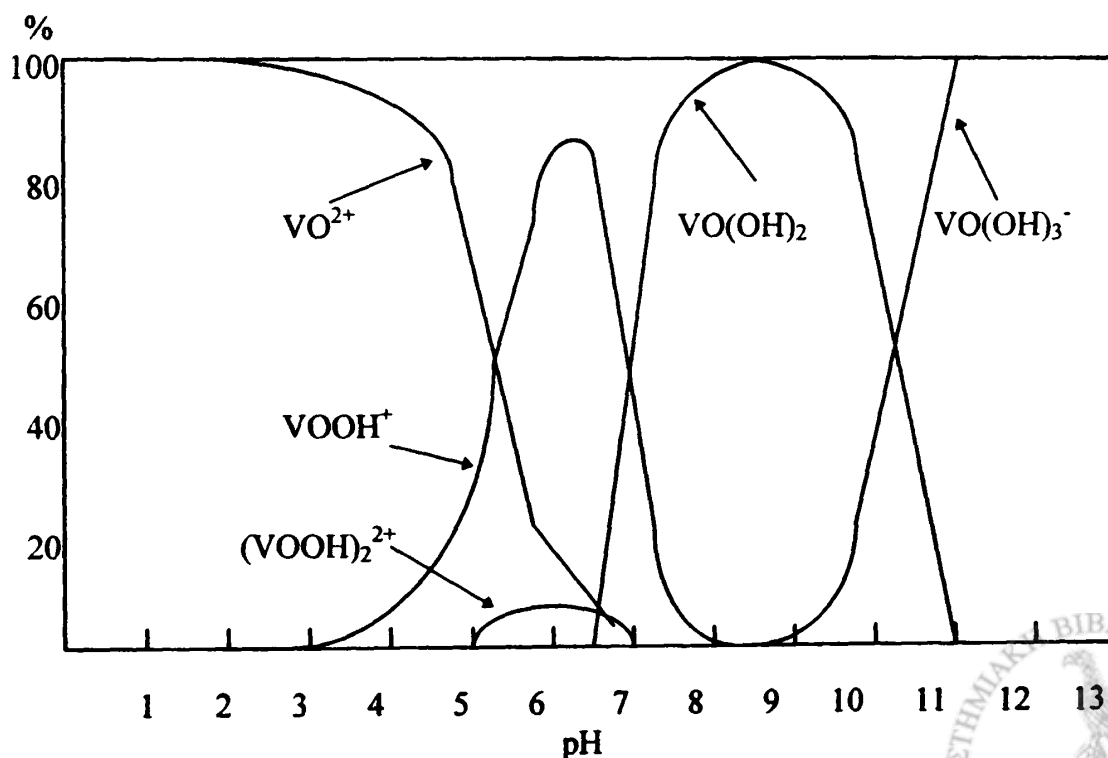
Οι σταθερές σχηματισμού σε $pH = 7$ συγκρίνονται με αυτές των βαναδοφωσφορικών ανυδριτών (Tracey et al., 1988). Η ομοιότητα των βαναδικών και φωσφορικών διατηρεί την ισχύ της και στο πεδίο των βιολογικών επιδράσεων του βαναδίου, για τις οποίες θα διεξαχθεί λόγος παρακάτω. Εκτός των φωσφοδεσμευτικών ουσιών τα βαναδικά μπορούν να εντάσσονται σε κιτρικά, σουξινικά, γλυκόλες και κατεχόλες (Boyd and Kustin, 1984).

Το ιόν βαναδυλίου, VO^{2+} , προκύπτει κατά μείζονα λόγο, μέσω αναγωγής των βαναδικών υπό γλουταθειόνης, κατεχολών και άλλων κυτταρικών παραγόντων. Τα σύμπλοκα βαναδυλίου εμελετήθησαν λεπτομερώς από τον Chasteen (Chasteen, 1981). Μερικά από αυτά έχουν τριγωνική διπυραμιδική μορφή, η οποία ομοιάζει προς τοιαύτη κάποιων βαναδικών. Με αυτή την γεωμετρία το βαναδύλιο απαντάται συνήθως μόνο στα σύμπλοκα με πρωτεΐνες, τα οποία γενικώς είναι πολύ ισχυρά (σταθερές σχηματισμού επιπέδου 10^9M^{-1}). Εκτός από πρωτεΐνες στα σύμπλοκα βαναδυλίου δύνανται να εισαχθούν και άλλα υποκατάστατα, όπως κιτρικό, ATP, πυροφωσφορικά, κατεχόλες και ελεύθερα αμινοξέα.

Το διάγραμμα δεσποζουσών μορφών του βαναδυλίου σε συνάρτηση προς το pH και χαμηλές φυσιολογικές συγκεντρώσεις αναφέρεται στο σχήμα 6. Παρατηρητέον ότι σε $\text{pH} > 2,3$ το ιόν βαναδυλίου τείνει να μετατρέπεται σε βαναδικό μέσω αέριας οξειδωσης. Όταν όμως το VO^{2+} είναι συμπλοκοποιημένο, η οξειδωση, ως επί το πλείστον, δεν έχει θέση.

Εκτός από τις μεμονωμένως ληφθείσες ιδιότητες του V(IV) και V(V), ένα μεγάλο μέρος της βιολογικής σημασίας αυτού του ιχνοστοιχείου οφείλεται πιθανότατα στην ευκολία αλληλομετατροπής των δύο ειδών με αλλαγή σθένους (ας θυμηθούμε τον βιολογικό ρόλο του σιδήρου, που σχετίζεται με την μετατροπή $\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$). Παραδείγματος χάριν, υπάρχουν όλο και περισσότερες ενδείξεις ότι παρουσία δραστικών μορφών οξυγόνου (όπως υπεροξείδιο υδρογόνου, H_2O_2) το βανάδιο ή λειτουργεί ως έναυσμα, ή εμπλέκεται σε αλυσιδωτές αντιδράσεις με παραγωγή ελευθέρων ριζών (π.χ. Darg and Fridovich 1984, Liochev and Fridovich 1987, Uckun et al. 1992). Αυτή η δυνατότητα των ενώσεων βαναδίου, όπως θα δούμε παρακάτω, έχει συσχετισθεί με πολλές από τις βιολογικές επιδράσεις του.

Σχήμα 6. Ειδοποίηση του V(IV) ως συνάρτηση του pH.
Ολική V-συγκέντρωση είναι $10 \mu\text{M}$ (Chasteen, 1983).



Συνοψίζοντας, μπορεί κανείς να πει ότι η ποικιλομορφία των βιολογικών φαινομένων, στα οποία δύναται να λάβει ενεργό μέρος το βανάδιο, εμφανίζεται ως κανονική συνέπεια των πολύπλοκων αυτού χημικών ιδιοτήτων. Από άλλης πλευράς, τούτο αποτελεί πηγή ωρισμένων ερμηνευτικών δυσκολιών, καθώς πολλάκις για μια ενιαία, από βιολογικής απόψεως, επίδραση ενοχοποιούνται πολλοί, ενίοτε ριζικώς διαφορετικοί, χημικοί μηχανισμοί.

2.3. ΤΟ ΒΑΝΑΔΙΟ ΣΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ.

2.3.1. ΓΕΝΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ.

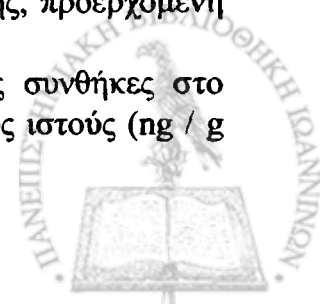
Οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις του βαναδίου στους ιστούς των θηλαστικών δεν υπερβαίνουν $1\mu\text{M}$ (Nechay, 1984). Το δε απαραίτητον του ιχνοστοιχείου τούτου έγινε τις τελευταίες δεκαετίες αντικείμενο διχογνωμιών. Μεταξύ των 1971-1974 διάφορες ερευνητικές ομάδες οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα για την αναγκαιότητα του βαναδίου καθ'όσον βρήκαν ότι οι επίμυες με δίαιτα χαμηλής, σε σύγκριση προς την ομάδα ελέγχου, περιεκτικότητας βαναδίου παρουσίασαν μειωμένη αύξηση βάρους, υψηλότερα επίπεδα σιδήρου στο πλάσμα και στα οστά και υψηλότερο αιματοκρίτη (Strasia, 1971). Τα κοτόπουλα υπό παρόμοιες συνθήκες αργούσαν στην ανάπτυξη πτερυγών, ουράς και οστών, ενώ η χοληστερόλη του πλάσματος υφίστατο σημαντικές ταλαντεύσεις (Hopkins and Mohr 1971, 1974, Nielsen and Ollerich 1973). Αντιστρόφως, η προσθήκη του βαναδίου επέφερε θετική αυξητική απόκριση (Schwarz and Milne, 1971).

Εν τούτοις τα αποτελέσματα αυτά δεν θεωρήθηκαν ευσταθή, καθώς στις περαιτέρω έρευνες (Nielsen et al. 1976, 1977, 1978, 1980) ουδεμία επίπτωση ανευρέθη στέρησης βαναδίου επί της θνησιμότητας κατά τον τοκετό, της σωματικής αύξησης και εξωτερικής εμφάνισης, του αιματοκρίτη, της χοληστερόλης του πλάσματος και των φωσφολιπιδίων του ήπατος πειραματοζώων. Οι απομένουσες ενδείξεις περί θετικής επίδρασης προσθηκών του μετάλλου, όπως και γενικά η υψηλή φαρμακευτική δραστηριότητά του, δεν μπορούν όμως να συσχετισθούν με την αναγκαιότητα του ιχνοστοιχείου, ισχυρίσθησαν στις κατοπινές αναφορές (Nielsen 1985, Nechay et al. 1986).

Έπειτα ο Uthus (Uthus and Nielsen 1988) διεπίστωσε ότι στέρηση βαναδίου (2ng V / g τροφής) οδηγούσε στην αύξηση του θυρεοειδούς και μείωση της σωματικής ανάπτυξης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Στο πείραμά του όμως η τροφή των πειραματοζώων της ομάδας ελέγχου περιελάμβανε μεγάλη ποσότητα βαναδίου (1mg V / g τροφής), πράγμα που καθιστά δυσχερή κάποια ερμηνεία.

Η διακίνηση του βαναδίου εντός του σώματος επίσης απέλαβε προσοχής. Απορροφάται γαστρεντερικώς ή δια του δέρματος, το ποσοστό απορρόφησης εκτιμάται από τους μεν ως λιγότερο των 5% (Nielsen 1988, Byrne and Kosta 1978, Conklin et al. 1982), από τους δε ως 14-30% (Wiegmann et al., 1982), 39% (Bodgen et al., 1982). Πιθανώς, οι παράγοντες όπως στερεότητα της τροφής, διαιτητικοί συνδυασμοί, καθώς και χημική μορφή της εισαγόμενης ένωσης επηρεάζουν σημαντικά την απορρόφηση. Εντός του κυκλοφορικού συστήματος 90% του βαναδίου ευρίσκεται στο πλάσμα. Ενώ η κύρια μορφή του είναι V(V) , εν τούτοις υπάρχει μια τάση αναγωγής, προερχόμενη απ' το ασκορβικό και τις κατεχολαμίνες (Chasteen et al., 1986).

Πολύ λίγη ποσότητα του βαναδίου συγκρατείται υπό ομαλές συνθήκες στο σώμα. Παρακάτω αναφέρεται η περιεκτικότητά του στους ανθρώπινους ιστούς (ng / g υγρού βάρους):



λίπος και μυς -	0,55
καρδία -	1,10
πνεύμων -	2,10
νεφρός -	3,00
θυρεοειδής -	3,10
ήπαρ -	7,50 (Byrne and Kosta, 1978).

Διεπιστώθη ακόμη ότι η ηυξημένη παροχή (από 0,1 προς 25 $\mu\text{g/g}$) ανεβάζει το ηπατικό βανάδιο από 10 έως 55 ng/g υγρού βάρους (Bodgen et al., 1982).

Η απέκκριση του βαναδίου δια ούρων υπερβαίνει πενταπλασίως περίπου αυτήν δια των περιττωμάτων (Wiegmann et al. 1982). Στα ούρα η πλειοψηφία του ευρίσκεται υπό μορφήν χαμηλού μοριακού βάρους συμπλόκων του V(IV) (Chasteen et al., 1986).

Στην δεκαετία του 80, λόγω ηυξημένης συγκέντρωσης του μετάλλου στην ατμόσφαιρα και στα ύδατα, διεξήχθησαν αρκετές τοξικολογικές μελέτες, στις οποίες θα επιστήσωμε περισσότερη προσοχή, εφ'όσον λαμβάνουν χώρα στο πειραματικό μέρος.

Οι τοξικές επιδράσεις εμελετήθησαν σε διάφορες πειραματικές διατάξεις. Ούτως, ως μεταβαναδικό αμμωνίου (NH_4VO_3) 20 mg V/kg βάρους εχορηγήθησαν σε μύς υποδοριώς (Cheng-i-Wei, Al Bayati et al., 1982). Τα πειραματόζωα ανέδειξαν υψλό ρυθμό θανάτου εντός των πρώτων τριών ημερών (θνησιμότης 45-73%) με την τάση προς διόγκωση ήπατος και σπλήνος, ισχυρές νεκρώσεις λεμφικών ιστών, πνευμονικές αιμορραγίες και οξεία νεφρική σωληνιακή νέκρωση. Η τοξικότητα του διαλύματος ($\text{pH} = 7,8$) εμειώθη κατά πολύ μετά την οξειδωσή του έως $\text{pH} = 6,1$ (μείωση της θνησιμότητος από 68 μέχρι 20%), καίτοι τα κλινικά συμπτώματα παρέμεναν ακόμη ισχυρα, ενώ η 15-λεπτη ζέση κατέβαλε τον ρυθμό θανάτου μέχρι μηδενός, αναστέλλοντας ταυτόχρονα την ισχύ των κλινικών συμπτωμάτων. Ληφθέντος υπ'όψιν του πίνακος χημικών μορφών του V(V) συναρτήσεται προς το pH , συνάγεται το συμπέρασμα ότι το δεκαβαναδικό ιόν είναι ολιγότερο τοξικό από τα άλλα, μικρώτερα πολυμερή. Κατ'επέκτασιν και η ζέση φαίνεται να έχει σχέση με αλλαγή ειδών βαναδικών ενώσεων που υφίστανται στο διάλυμα. Η ειδοποιός δομή του V(V) ιόντος είναι, τοιουτοτρόπως, σημαντική ως προς την πρόκληση τοξικότητας.

Η εφ'άπαξ χορήγηση τετρασθενούς και πεντασθενούς βαναδίου ενδοπεριτοναϊκώς και δια του στόματος εφηρμόσθη στην εργασία του Llobet (Llobet and Domingo, 1984). Καθωρίσθησαν οι τιμές της LD_{50} ως εξής (mg/kg):

		<u>μύες</u>	<u>επίμυες</u>
NaVO_3	από του στόματος	74,6	98,0
NaVO_3	ενδοπεριτοναϊκώς	35,9	18,4
$\text{VOSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	από του στόματος	467,2	448,0
$\text{VOSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	ενδοπεριτοναϊκώς	113,0	74,1

Η πλειοψηφία των θανάτων επήλθε κατά την διάρκεια του πρώτου 24-ώρου, τα κλινικά και φυσικά συμπτώματα περιελάμβαναν: αρρυθμίαν αναπνοής, διάρροια, αταξία και παράλυση των οπισθίων ποδών. Τα σημάδια αυτά παρέρχονταν, ως επί το πλείστον, εντός 48 ωρών, γεγονός το οποίον υποδεικνύει ταχεία αποβολή του βαναδίου.

Εν συνεχεία εμελετήθησαν επιπτώσεις χρόνιας παροχής του μεταβαναδικού νατρίου (NaVO_3) επί αρρένων επιμυών κατά την διάρκεια 3 μηνών σε συγκεντρώσεις 0, 5, 10 και 50 p.p.m. (Domingo and Llobet et al., 1985). Το βανάδιο συνεσωρεύετο δοσοεξαρτωμένως στους νεφρούς και τον σπλήνα, οι οποίοι και εξεδήλωσαν στην ιστοπαθολογική εξέταση μέτριες βλάβες. Η εμφάνιση, συμπεριφορά, πρόσληψη τροφής και ύδατος, το βάρος και η θνησιμότης των υπό αγωγήν επιμυών όλων των ομάδων

ουδολώς επηρεάσθη. Γενικεύοντας, το βανάδιο ανήκει σε μέταλλα μέτριας τοξικότητας, η οποία είναι θετικώς ανάλογη προς το σθένος, με τοξικότερη την πεντασθενή μορφή (Nechay et al., 1986), που είναι, πλέον, υψηλώς τοξική με την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση (Llobet and Domingo, 1984).

Εν τω μεταξύ, όσον εμφανέστερη γινόταν η φαρμακευτική χρησιμότητα του βαναδίου, υπήρξαν προσπάθειες να ελαττωθεί η τοξικότητα. Ετέθη υπό δοκιμασίαν η μέθοδος παράλληλης χορήγησης χηλικών παραγόντων, εφ'όσον το βανάδιο διαθέτει ευρείες δυνατότητες συμπλοκοποίησης. V(IV) και V(V) δόθηκαν εν συνδυασμώ με:

desferrioxamine B (desferal),
Na₃Ca-diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA),
(Hansen et al., 1982).

Na₂Ca-ethylenediaminetetraacetate (EDTA),
Na₃Ca-diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA),
L-cysteine,
4,5-dihydroxy-1,3-benzene-disulfonic acid (Tiron),
deferoxamine mesylate (deferoxamine),
ascorbic acid ,

(Domingo, Llobet et al., 1986).

4,5-dihydroxy-1,3-benzene- disulfonic acid (Tiron),
επί ζώων με πειραματικό διαβήτη (Llobet et al., 1992).

Ευρέθη ότι τα desferal και DTPA, χορηγούμενα 24 ώρες μετά την έγχυση βαναδίου, μειώνουν σημαντικά το δεσμευόμενο στους νεφρούς, το ήπαρ και τους πνεύμονες βανάδιο (επί 20 - 26%) , ενώ αυξάνεται η απέκκρισή του. Ως προς την δραστηκότητα στην επιβίωση πειραματοζώων κατόπιν ένεσης μεγάλων δόσεων βαναδίου οι δεσμευτικοί παράγοντες συνετάχθησαν ως εξής:

Ascorbic acid,
Tiron και Deferoxamine,
L-cysteine,
EDTA, DTPA και ομάδα ελέγχου.

Αργότερα ο Llobet et al.(1992), εφαρμόζοντας συνδυαστική αγωγή Tiron + V επαλήθευσε τα προηγούμενα, αφού βρήκε μειωμένη συσσώρευση του μετάλλου στα σημαντικά όργανα (ήπαρ, νεφροί, καρδιά, οστά, μυς), ενώ η ευεργετική δράση του βαναδίου επί της ισορροπίας της γλυκόζης δεν μετεβλήθη.

2.3.2. IN VITRO ΜΕΛΕΤΕΣ.

Τα πλέον ευθέα πειράματα προς εξερεύνησιν της βιολογικής σημασίας του βαναδίου προκύπτουν in vitro, καθώς οι ενδοκυτταρικές μετατροπές του σ'αυτή την περίπτωση δεν αποτελούν σοβαρό πρόβλημα. Σήμερα γνωρίζουμε ότι το βανάδιο και, ιδίως, το V(V) έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει πολλά ενζυμικά συστήματα. Επιστημονικό ενδιαφέρον σ'αυτή την περιοχή εγκατέστη αφ'ότου ανεκαλύφθη η ανασταλτική δράση του επί της Na⁺/K⁺ ATP-άσης (Cantley et al., 1977). Κάτωθι αναφέρεται πίναξ αναστολής διαφόρων ενζύμων, όπου η ικανότητα αναστολής βαίνει μειούμενη εκ των άνω (από τον Chasteen, 1990):



Πίναξ 4. Αναστολή ενζύμων υπό των V(IV) και V(V). Ικανότης αναστολής βαίνει μειούμενη εκ των άνω (Chasteen, 1990).

<u>Ενζυμο:</u>	<u>Μορφή βαναδίου:</u>
Staphylococcal nuclease	Ca ²⁺ /VO ²⁺ -thymidine 3-phosphate.
K ⁺ -p-nitrophenolphosphatase	V(IV) & V(V),
Phosphofructokinase 1	DecaV(V),
Acid phosphatase	V(V),
Alkaline phosphatase	V(V),
Dynein ATP-ase	V(V),
Myosin ATP-ase	V(V),
Adenylate kinase	DecaV(V),
Na ⁺ /K ⁺ ATP-ase	V(IV) & V(V),
Mg ²⁺ ATP-ase	V(V),
Ca ²⁺ /Mg ²⁺ ATP-ase	V(V),
DPG-dependent phospho- glyceratemutase	V(V),
Ca ²⁺ ATP-ase	V(V),
Ribonuclease	V(IV) & V(V)-uridine,
Ca ²⁺ uptake	V(V),
6-phosphofructokinase 2	DecaV(V),
Transducin GTP-ase	DecaV(V).

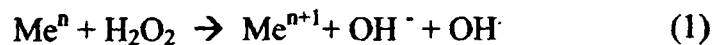
Όπως διαφαίνεται από τον πίνακα, το πεντασθενές βανάδιο είναι πιο ισχυρός αναστολέας. Ο μηχανισμός της αναστολής θεωρείται γνωστός, τουλάχιστον εκεί, όπου διαμεσολαβεί ένα φωσφοπρωτεϊνικό στάδιο στον καταλυτικό κύκλο του ενζύμου, το οποίο συνίσταται στην δέσμευση φωσφορικού από το ενεργό κέντρο δια μεσου ενός ασπαρτικού καταλοίπου. Το βαναδικό, που έχει τρίγωνο διπυραμιδική μορφή, καταλαμβάνει το ενεργό κέντρο, λειτουργώντας ως μη δραστικό ανάλογο. Άλλωστε, δεν είναι σαφές, αν το δεκαβαναδικό ιόν ασκεί την αναστολή με παρόμοιο τρόπο.

Ως προς την προώθηση υπό του βαναδίου διαφόρων χημικών αντιδράσεων, οι *in vitro* μελέτες παρέχουν πολύ λιγώτερα δεδομένα. Διεπιστώθη ότι επάγει την αδενυλική κυκλάση (Johnson, 1982), επίσης σε απομονωμένες κυτταρικές μεμβράνες ενεργοποιεί την αποφωσφορυλίωση ιστονών, την σχετιζόμενη με φωσφοτυροσινικά κατάλοιπα (Swarup et al., 1983). Οι μεμονωμένοι ινσουλινοϋποδοχείς των μικροσωμικών μεμβρανών υπόκεινται, αντίθετα, σε αυτοφωσφορυλίωση παρουσία βαναδίου (Gherzi et al., 1988). Διότι ειδικά σ' αυτή την περιοχή οι μη κυτταρικές μελέτες είναι ιδιαίτερα φτωχές, θα αγγίξουμε τούτο το θέμα λεπτομερέστερα αργότερα.

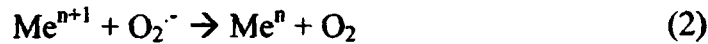
Διαφωτιστική, από γενικής απόψεως, είναι η εξαρτώμενη απ' το βανάδιο NADH-οξειδωση, η οποία δύναται να προαχθεί παρουσία μεμβρανικών πρωτεϊνών (Vijaya et al. 1984, Coulombe et al. 1987), όπου το NADH μπορεί να αντικατασταθεί από NADPH. Στον μηχανισμό της V-κατάλυσης εισέρχονται οι αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών, οι εκκινούμενες από το υπεροξειδίο υδρογόνου. Εφ' όσον οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται ενεργώς σε διαδικασίες καρκινογέννησης, απόπτωσης αφ' ενός, και αφ' ετέρου το βανάδιο σχετίζεται με τα ίδια φαινόμενα, θα παρουσιάσω με ευθύς αμέσως τον εν λόγω μηχανισμό.



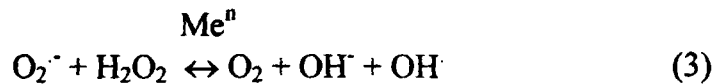
Ευρέως γνωστή είναι η αντίδραση Fenton:



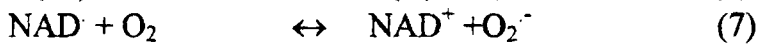
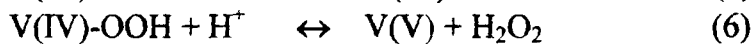
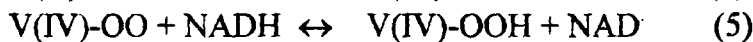
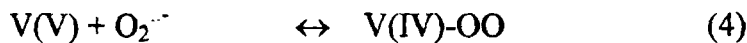
η οποία, αθροισμένη με την παρακάτω:



οδηγεί στην καταλυτική αντίδραση του Haber-Weiss:



Επί τη βάσει των παραπάνω και υποτιθεμένης της εναρκτικής αυτοοξειδωσης του NADH με παραγωγή της πρώτης O_2^- -ρίζας, προτάθηκε η εξής αλυσίδα:



(Dart and Fridovich, 1984),

και, επεκτείνοντας για το αρχικό στάδιο με το βαναδύλιο:



(Liochev and Fridovich, 1985).

Τα παραγόμενα σ' αυτές τις αντιδράσεις προϊόντα, όπως οι ελεύθερες ρίζες και το υπεροξειδίο υδρογόνου, αποτελούν ισχυρούς τοξικούς παράγοντες. Υπετέθη ότι η ως άνω αλυσίδα είναι, τουλάχιστον εν μέρει, υπεύθυνη για την ανάπτυξη τοξικών φαινομένων κατά την χορήγηση βαναδίου, ενισχύει δε, από άλλης πλευράς, το τυχόν υπάρχον οξειδωτικό στρες.

2.3.3. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ.

Ευρύτατο είναι το πεδίο των μεταβολικών διαδικασιών που μπορεί να τροποποιηθούν υπό την επήρεια του βαναδίου. Αναφέροντας επί βραχέος την αναστολή της ATP-εξαρτωμένης αποσύνθεσης πρωτεϊνών στα δικτυοκύτταρα (Tanaka et al., 1984), την αύξηση του πηλίκου χοληστερόλη / φωσφολιπίδια στον εγκέφαλο υπό την επίδραση εξωγενούς βαναδίου (Catalan et al., 1987) και επισημαίνοντας ότι η αναλογία των βαναδικών και φωσφορικών εξακολουθεί να είναι παρούσα, προβαίνομε σε συζήτηση των φαινομένων, όπου επικεντρώθηκαν μεγαλύτερες επιστημονικές προσπάθειες.

Η ινσουλινομιμητική δράση του βαναδίου, η οποία υπήρξε αποφασιστική ως προς την επανάκαμψη ενδιαφέροντος στην φυσιολογική σημασία του ιχνοστοιχείου, ανακαλύφθη πρωτίστως επί κυτταρικών καλλιιεργειών (Shechter and Karlsh, Dubyak

and Kleinzeller, 1980). Το εξωγενώς προστιθέμενο βανάδιο διεγείρει την απορρόφηση εξόζης, την οξείδωση γλυκόζης, την λιπογένεση (Shechter and Ron, 1986), αναστέλλει δε την λιπόλυση (Degani et al., 1981), δηλαδή ασκεί δεδηλωμένες δράσεις της ινσουλίνης. Χορηγούμενο υπό μορφήν του βαναδικού ιόντος VO_4^{3-} το μέταλλο, εν τούτοις, ανάγεται ενδοκυτταρικώς σε VO^{2+} , σχηματίζοντας ένωση με την ανηγμένη γλουταθειόνη, δια της οποίας αποτρέπεται η επανοξειδωσή του. Οι ως άνω επιδράσεις του ιχνοστοιχείου παρατηρούνται υπό το εύρος συγκεντρώσεων σημαντικά μικρότερο εκείνων, που απαιτούνται για την αναστολή της Na^+/K^+ ATP-άσης (0,05 - 0,2 mM). Συνοπτικώς, το βανάδιο μιμείται σχεδόν όλες τις κυτταρικές δράσεις της ινσουλίνης, όπως απεικονίζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίναξ 5, από: Tsatsoulis, Evangelou et al., 1994):

Πίναξ 5. Ινσουλινομιμητικές in vitro δράσεις του βαναδίου.

Δράση	Κατεύθυνση	Ιστός στόχος	Αναφορές
Μεταφορά της εξόζης	+	ΓΜΚ	Dubyak and Kleinzeller, 1980. Dlouha et al., 1981.
Λιπογένεση	+	ΛΚ	Shechter and Ron, 1986).
Οξείδωση της γλυκόζης	+	ΛΚ	Shechter and Karlish, 1980.
Λιπόλυση	-	ΛΚ	Degani et al., 1981.
Συνθετάση γλυκογόνου	+	ΓΜΚ	Tamura et al., 1984.
Μιτογόνο δράση	+	ΛΚ	Tolman et al., 1979.
Αντικατάσταση των υποδοχέων IGF-II	+	Διάφοροι	Hori, Oka 1980. Canalis, 1985. Smith, 1983.
Απορρόφ. K^+ Ca^{2+}/Mg^{2+}	+	ΛΚ	Kodad et al., 1986.
ΑΤΡ-άση	-	ΚΜΚ	Werdan et al. 1982.
Ροή ασβεστίου	+	Μεμβράνες	Delfert and McDonald, 1985.
		ΛΚ	Gausen et al., 1981.

«+» - διέγερση ή ενίσχυση, «-» - αναστολή, ΓΜΚ - γραμμωτά μυϊκά κύτταρα, ΛΚ - λιποκύτταρα επιμυών, ΚΜΚ - καρδιακά μυϊκά κύτταρα, IGF-II - ινσουλινοειδής αυξητικός παράγων II.

Η ινσουλίνη και το βανάδιο δεν παροσιάζουν προσθετική δράση, αλλά είναι ευαίσθητοι προς τους ίδιους καταστολείς (βλ. επίσης παρακάτω).

Η ινσουλινομιμητική δράση του βαναδίου αποτελεί ένα επί μέρους φαινόμενο της κυτταρικής μετατροπής, στην οποία σπουδαίο ρόλο παίζει η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών. Σε σχέση με την τελευταία οι πολλαπλές επιδράσεις του βαναδίου επί κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης υπήρξαν τομέας έντονων αναζητήσεων.

Οι κινάσες της τυροσίνης έχουν ιδιαίτερη σημασία στο σύστημα πρωτεϊνοκινάσων / πρωτεϊνοφωσφατασών, το οποίο δια μέσου φωσφορυλίωσης /

αποφωσφορυλίωσης πρωτεϊνών ρυθμίζει την έναρξη της μιτωτικής διαίρεσης, της διαφοροποίησης και της κυτταρικής μεταμόρφωσης. Βρέθηκε ότι το βανάδιο, εισαγόμενο στο κύτταρο, οδηγεί σε μια σημαντική αύξηση του επιπέδου φωσφοτυροσινικών καταλοίπων, αναστέλλοντας τις τυροσινικές φωσφατάσες (Gentleman et al.1987, Klarlund et al.1988). Η τυροσινική υπερφωσφορυλίωση των κυτταρικών πρωτεϊνών έχει ως επακόλουθο διάφορες μεταβολές των φυσιολογικών τους ιδιοτήτων, οι οποίες ολοκληρώνονται στην παρακίνηση κυτταρικής διαφοροποίησης, έκφραση των πρωτοογκογονιδίων και πρόσκαιρη κυτταρική μετατροπή (Itkes et al.,1990). Όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό, η επίδραση του βαναδίου φαίνεται να μην είναι ομογενής: πολλές κυτταρικές καλλιέργειες, όπως ανθρώπινοι ινοβλάστες (Carpenter, 1980) και λεμφοκύτταρα (Marini et al.,1987), μερικές κυτταρικές σειρές ποντικών (Tojo et al.,1987) και πληθυσμοί θυμοκυττάρων (Ramanadham and Kern, 1983) ανταποκρίνονται σ' αυτό με μια αύξηση της DNA-σύνθεσης και του ρυθμού κυτταρικής διαίρεσης. Απ'εναντίας, επί εντόνως πολλαπλασιαζόμενων καλλιεργειών το βανάδιο απεδείχθη κυτταροτοξικό (Cruz et al.,1995).

Παρεμπιπτόντως, στο κυτταρικό επίπεδο πρέπει να γίνει διάκριση μεταξύ της φωσφορυλιωτικής και ινσουλινομιμητικής επίδρασης του βαναδίου και της ιδιότητάς του να αναστέλλει *in vitro* την Na^+/K^+ ATP-άση (Schechter and Karlish 1980, Dubyak and Kleinzeller 1980), επειδή οι δραστικές για την αναστολή του ενζύμου συγκεντρώσεις είναι πολύ μεγαλύτερες. Γενικά, στην πορεία της έρευνας κατέστη σαφές ότι η παραπάνω αναστολή, που προεκάλεσε εν καιρώ της έμπνευση στους επιστημονικούς κύκλους, έχει λιγώτερη σημασία απ'ό,τι ανεμένετο.

Η κυτταρική διαφοροποίηση επίσης επηρεάζεται σημαντικά από προκαλούμενες μέσω βαναδίου μεταβολές της ισορροπίας των κινασών / φωσφατασών της τυροσίνης. Παράδειγματος χάριν, καλλιέργειες καλοηθών ερυθρολευχαιμικών κυττάρων σταματάνε την διαφοροποίηση (English et al.,1983), ενώ στα κύτταρα φαιοχρωμοκυττώματος και νευροβλαστώματος, αντιθέτως, προωθείται εμφάνιση και επιμήκυνση αξόνων (Rogers et al.,1994). Η ερευνητική ομάδα του Rogers, συγκρίνοντας την επενέργεια του βαναδίου με αυτή του αυξητικού παράγοντος νεύρου, καταλήγει στο συμπέρασμα ότι πραγματοποιούνται μέσω διαφορετικών οδών και η υποκίνηση από το V θα μπορούσε όντως να σχετίζεται αιτιωδώς με την αναστολή των τυροσινοφωσφατασών.

Τέλος, υπάρχουν πρόσφατες ενδείξεις ότι στην κυτταρική διαφοροποίηση το βανάδιο ενδέχεται να συνεργεί με τις ελεύθερες ρίζες. Οι τελευταίες παράγονται υπό του οξειδωτικού στρες και καταστρέφουν το DNA και τις κυτταρικές μεμβράνες, λειτουργώντας ως προωθητές όγκων (βλ. στο κεφάλαιο 1). Ταυτόχρονα μετέχουν στην κυτταρική σηματοδότηση δια της τυροσινικής φωσφορυλίωσης, ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C και παραγωγής της G-πρωτεΐνης, προϊόντος του ογκογονιδίου $p21^{ras}$ (Uckun et al.1992, Lander et al.1993,1995). Αφ'ετέρου η τυροσινική φωσφορυλίωση αποτελεί σημαντικό βήμα στην ενεργοποίηση των B και T-κυττάρων (Lane et al.,1991). Στα σημεία φλεγμονής τα υπεροξειδία σηματοδοτούν το ανοσοποιητικό μέσω αυτού του μηχανισμού (El-Hag et al. 1986, El-Hag and Clark 1987). Παρουσία, λοιπόν, 50μM βαναδικού η φωσφοτυροσινική απόκριση των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων σε διέγερση υπό ελευθέρων ριζών υπέστη μεγάλη αύξηση, παράλληλα με την αναστολή της τυροσινοφωσφατάσης (Lowe et al.,1998). Αύξηση της τυροσινικής φωσφορυλίωσης υπήρχε, άλλωστε, και χωρίς το μέταλλο, ήταν, όμως, μικρή λόγω ταυτόχρονης επαγωγής της τυροσινοφωσφατάσης. Εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι ελεύθερες ρίζες επενεργούν σε αμφοτέρες τις πλευρές του ζεύγους (την τυροσινοκινάση και την τυροσινοφωσφατάση), ενώ το βανάδιο, υπό μορφήν του

βαναδοϋπεροξειδίου V(V)-OOH, διαπερνά ευκόλως την κυτταρική μεμβράνη και αναστέλλοντας την τυροσινική φωσφατάση, κάμπτει την ισορροπία, προάγοντας και την σηματοδότηση. Σαφώς, οι αναφερθείσες διαφοροποιητικές ικανότητες του βαναδίου, όσο του ανοσοποιητικού, τόσο και των νεοπλαστικών κυττάρων, μπορούν να συσχετισθούν με την αντικαρκινογόνο δράση του ιχνοστοιχείου, περί της οποίας λόγος στο κεφάλαιο 3.

Η ανασταλτική του βαναδίου δράση επί της πρωτεϊνοτυροσινοφωσφατάσης φαίνεται να διαφέρει αυτής των άλλων αναστολέων του ενζύμου, όπως π.χ. H_2O_2 (Hecht and Zick, 1992). Η συνολική όμως υπερφωσφορυλίωση πρωτεϊνών του κυττάρου μπορεί να εκλύεται υπό των βαναδικών ενώσεων και με άλλον τρόπο. Εφ'όσον το βανάδιο αποτελεί ινσουλινομιμητική ουσία, και η ινσουλίνη, κατά σειρά, λειτουργεί διεγείροντας τις πρωτεϊνοκινάσες, το γεγονός της φωσφορυλίωσης ηρευνήθη εν σχέσει με αυτήν την ομοιότητα.

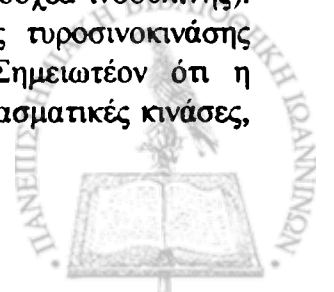
Ολίγα λόγια πρέπει να ειπωθούν εδώ σχετικά με τους μηχανισμούς, δια των οποίων διαμεσολαβούνται οι ποικιλότητες κυτταρικές δράσεις της ινσουλίνης. Τα παρακάτω βασίζονται στην επισκόπηση του J.Olefsky (Olefsky, 1990). Είναι γνωστό ότι ο υποδοχέας ινσουλίνης αποτελείται από δύο πρωτεϊνικές υπομονάδες, που σχηματίζουν μέσω δισουλφιδικού δεσμού ένα τετραμερές σύστημα, συνδεδεμένο με την κυτταρική μεμβράνη (Σχήμα 7).

Η α-υπομονάδα διατάσσεται στον εξωκυττάρω χώρο και διαθέτει σημείο δέσμευσης ινσουλίνης, η β-υπομονάδα διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, γεγονός που επιτρέπει να την αντιληφθούμε ως συνισταμένη εκ τριών τμημάτων: εξωκυτταρικού, μεμβρανικού και κυτταροπλασματικού. Το κυτταροπλασματικό τμήμα ενέχει διάφορες λειτουργικές περιοχές: ευαίσθητες προς δέσμευση ινσουλίνης, σημεία αυτοφωσφορυλίωσης, δραστήρια ως τυροσινοκινάση διαφόρων υποστρωμάτων περιοχή και, πιθανότατα, περιοχές της μη φωσφορυλιωτικής σηματοδότησης (ενεργοποίηση των G-πρωτεϊνών και της φωσφολιπάσης). Παρόμοια δομή έχουν μερικοί άλλοι ορμονοϋποδοχείς, όπως αυτοί του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF), αυξητικού παράγοντα αιμοπεταλίων (PDGF), ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντος (IGF-I) και των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL).

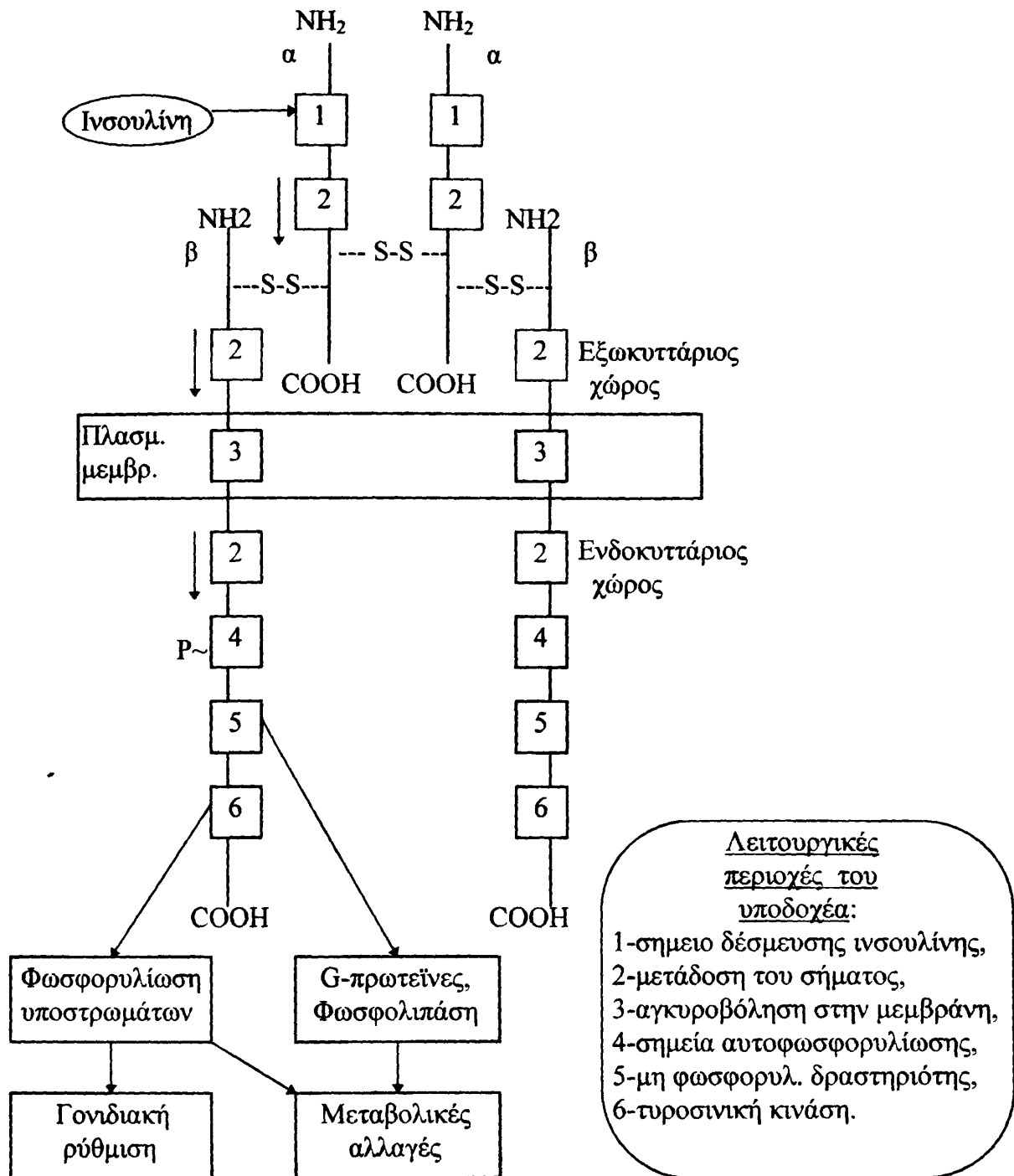
Μετά την δέσμευση ινσουλίνης οι περιοχές 2, πλούσιες σε κυστεΐνη, υφίστανται αντιστρέψιμη χωρική τροποποίηση, δια της οποίας μεταδίδεται το σήμα. Η περιοχή 2 του ενδοκυτταρικού τμήματος λειτουργεί ως εσωτερική τυροσινοκινάση, επιφέροντας την αυτοφωσφορυλίωση της περιοχής 4. Η τελευταία είναι αναγκαία τουλάχιστον για μερικές από τις περαιτέρω επιδράσεις του υποδοχέα, π.χ. μεταφορά γλυκόζης.

Κατόπιν δέσμευσης μορίου ινσουλίνης ο υποδοχέας υφίσταται ενδοκυττάρωση και η περαιτέρω πορεία του μπορεί να είναι διαφορετική: ένα μέρος καταβολίζεται, άλλο συγκρατείται εντός του κυττάρου, το δε περισσότερο ανακυκλώνεται. Υπάρχουν στο μόριο του υποδοχέα και άλλες λειτουργικές περιοχές, οι οποίες προσδιορίζουν την ενδοκυττάρωση, την ύστερη πορεία του και τροποποιούν αποτελεσματικά την απόδοση των ανωτέρω περιοχών (την συγγένεια προς την ινσουλίνη, ισχύν της μιτωτικής σηματοδότησης κ.ο.κ.).

Η αντίληψη των εν λόγω υποδοχέων ως σύνθετων μορφωμάτων με διάφορους λειτουργικούς τομείς επιτρέπει να εξηγηθεί επιτυχώς η μερική επικάλυψη των λειτουργικών τους πεδίων (όπως του IGF-I υποδοχέα και του υποδοχέα ινσουλίνης). Αναμφιβόλως, η δραστηριότητα του ινσουλινοκινάσης ως τυροσινοκινάσης παίζει κεντρικό ρόλο στην σηματοδότηση μέσω ινσουλίνης. Σημειωτέον ότι η τυροσινοκινάση του υποδοχέα μπορεί να διεγείρει άλλες κυτταροπλασματικές κινάσες, π.χ. την κινάση της σερίνης.



Σχήμα 7. Λειτουργική δομή του ινσουλινικού υποδοχέως.



Επιστρέφοντας στο κύριο θέμα, αναφέρουμε την φωσφορυλίωση ινσουλινικών υποδοχέων σε λιποκύτταρα υπό την επίρεια του βαναδίου, ενώ ουδεμία προσθετική δράση βαναδίου και ινσουλίνης επί της γλυκογονοσυνθετάσης ήτο παρούσα (Tamura et al., 1983). Χορήγηση βαναδίου επιφέρει ενδοκυτταρική συσσώρευση της πρωτεΐνης pp15, ενός σημαντικού προϊόντος της τυροσινοκινάσης του ινσουλινικού υποδοχέως (Bernier et al., 1988). Συμφώνως προς τους συγγραφείς, η κινητική της πρόσληψης της 2-δεοξυγλυκόζης, η φωσφορυλίωση των ινσουλινικών υποδοχέων και αύξηση του επιπέδου της pp15 μαρτυρούν την ινσουλινική οδό της δράσης του βαναδίου.

Υστερα βρέθηκε ότι τα επίπεδα των πολυφωσφοϊνοσιτιδίων υφίστανται αύξηση με προσθήκη του μετάλλου (Paris and Poussegur, 1987). Ο κύκλος των πολύφωσφοϊνοσιτιδίων, τα οποία αποτελούν προϊόντα διάσπασης των φωσφολιπιδίων,

εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες, όπως τα φαινόμενα έκκρισης, η αποπόλωση των νευρικών κυττάρων, η φαγοκυττάρωση εκ μέρους των λευκών αιμοσφαιρίων και η αντιδραση συσώρευσης και έκλυσης των αιμοπεταλίων (Lloyd et al. 1972, 1973). Η απελευθέρωση των πολύφωσφοϊνοσιτιδίων οδηγεί στις ανωτέρω αποκρίσεις μέσω παραγωγής του αραχιδονικού οξέως, διευκόλυνσης της εισόδου ασβεστίου και, σημαντικώτερον για μας, μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνοκινάσης C (Karkabounas, 1990). Φαίνεται όντως να υπάρχει αιτιώδης σχέση μεταξύ της παραγωγής των πολυφωσφοϊνοσιτιδίων και του τελικού φωσφορυλιωτικού αποτελέσματος (Zick and Sagi-Eisenberg, 1990). Η δε αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου μπορεί να μεταβάλλει το ενδοκυτταρικό αναγωγικό δυναμικό, ίσως εξ' αιτίας εξάντλησης της γλουταθειόνης, οδηγώντας σε ενίσχυση της ευθείας αναστολής της τυροσινικής φωσφατάσης από το βαναδίο (Huckle and East, 1994).

Η πρωτεϊνοκινάση C, σε συνάρτηση με τα φωσφοϊνοσιτιδία και την κινητοποίηση ασβεστίου, φωσφορυλιώνει είτε τις πρωτεΐνες των ογκογονιδίων, είτε, μέσω φωσφορυλίωσης, αυξάνει την έκφραση των ίδιων των ογκογονιδίων (Tamura et al. 1986, Ryder and Gordon 1987). Η τέτοια επίδραση, όπως ειπώθηκε πριν, είναι ευαίσθητη προς τις δραστικές μορφές οξυγόνου. Εν τούτοις ανεκαλύφθη ότι η επαγωγή από το V σε περίπτωση μερικών γονιδίων (ογκογονίδιο c-jun) υπόκειται στην ρύθμιση μέσω οξειδοαναγωγικών παραγόντων, ενώ σε περίπτωση κάποιων άλλων όχι (ακτίνη και ογκογονίδιο c-Ha-ras), πράγμα που υποδηλώνει διαφορές μηχανισμού, τόσο μάλλον, όσο ούτε η ινσουλίνη, ούτε ο επιδερμικός αυξητικός παράγων επηρέαζαν τα επίπεδα των πρωτεϊνών των εν λόγω γονιδίων (Yin et al., 1992). Άλλες μελέτες (Bosch et al. 1990, Weinstock and Messina, 1992) επίσης υποδεικνύουν ότι, τουλάχιστον εν μέρει, οι ενδοκυτταρικοί στόχοι και ο τρόπος επενέργειας του βαναδίου και της ινσουλίνης είναι διαφορετικοί. Ειδικά στο απομονωμένο ήπαρ επιμύων το βαναδίο μεν ραγδαίως ηύξησε την ηπατική γλυκόζη, αλλά τούτο υπήρξε αποτέλεσμα γλυκογονολυτικής διαδικασίας και ανεστελλετο υπό ινσουλίνης και απουσία Ca^{2+} (Roden et al., 1993).

Πέραν της μεταβολής πρωτεϊνικών επιπέδων δι' αλλαγής της εκφράσεως γονιδίων, οι κυτταρικές αποκρίσεις κάλλιστα μπορούν να διέπονται από την φωσφορυλίωση των ήδη υφισταμένων πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, προσκόλληση φωσφορικών επί των πρωτεϊνών του κυτταρικού σκελετού μεταβάλλει τις ιδιότητες του τελευταίου με αποτέλεσμα την αύξηση της μεμβρανικής πλαστικότητας, πράγμα που αποτελεί αναγκαίο βήμα στην μιτωτική διαίρεση και, ειδικώτερα, στην εκδήλωση του νεοπλαστικού φαινοτύπου (Strayer, 1995). Σε μια άλλη ενδιαφέρουσα εργασία (Augicchio et al., 1995) εξηκριβώθη πως η αυξητική δράση του βαναδίου επί οιστραδιολανταποκρινόμενων κυττάρων διαδραματίζεται σε δύο στάδια : κατά πρώτον επιφέρεται η τυροσινική φωσφορυλίωση των υποδοχέων οιστραδιόλης και επιδερμικού αυξητικού παράγοντος, η εκλεκτική δεσμευτική τους ικανότητα επαυξάνεται. Κατόπιν τούτου η δραστηριοποίηση των υποδοχέων ακολουθείται από γενικής αυξήσεως της τυροσινικής φωσφορυλίωσης και επέρχεται η κυτταρική διαφοροποίηση. Τούτη η εργασία μας υποδηλώνει έναν τρόπο δράσης, ο οποίος θεωρείται αρκετά τυπικός για την έκλυση ορμονοειδών μεταβολών υπό του βαναδίου.

Συγκεφαλαιώνοντας, δυνάμεθα να πούμε ότι οι προκαλούμενες υπό του βαναδίου κυτταρικές μεταβολές συνδέονται στενά με την τυροσινική φωσφορυλίωση. Το μέταλλο αυξάνει το επίπεδο των φωσφορυλιωμένων προϊόντων μέσω διαφορετικών οδών, παρουσιάζοντας ως προς τους άλλους καθιερωμένους παράγοντες (ινσουλίνη, οιστραδιόλη, EGF) μια περίπλοκη εικόνα ομοιοτήτων και διαφορών. Πολλά σημεία της ινσουλινικής οδού ανταποκρίνονται στην παρουσία βαναδίου, υποβάλλοντας την υπόθεση ευθείας και εκλεκτικής φωσφορυλίωσης κυτταρικών υποστρωμάτων από τις

πρωτεϊνικές κινάσες. Οι έμμεση φωσφορυλίωση δι' αναστολής φωσφατασών φέρει πλέον γενικό χαρακτήρα, ευθύνεται πιθανώς τόσο για την διέγερση της ινσουλινικής οδού (μέσω φωσφορυλίωσης ινσουλινικών υποδοχέων), όσο και για άλλα φαινόμενα (καθώς έμμεσα μπορούν να φωσφορυλιωθούν προϊόντα που δεν έχουν σχέση με την σηματοδότηση ινσουλίνης). Όλο το σύστημα παρουσιάζει αρκετή ευαισθησία στις αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως NADH (Yin et al., 1992), N-acetylcysteine και quercetin (Huckle and Earp, 1994).

Πολλά όμως στο θέμα των μηχανισμών που μεσολαβούν στο φαινόμενο της κυτταρικής μετατροπής αποτελούν ακόμη λίθο προσκόμματος. Η φωσφορυλίωση ποικίλων κυτταροπλασματικών υποστρωμάτων συνοδεύει, όπως έχομε δει, διάφορες κυτταρικές διαδικασίες. Από άλλης πλευράς, ορμονική δράση ενός μεγάλου αριθμού ουσιών παραλληλίζεται από παρόμοια γεγονότα. Για να συγκρίνωμε λεπτομερέστερα την επίδραση του βαναδίου με αυτές, απαιτείται η γνώση των εκάστοτε φωσφορυλιούμενων υποστρωμάτων και της φυσιολογικής σημασίας των, η οποία γνώση παραμένει προς στιγμήν κατά πολύ ελλιπής (Olefsky, 1990).

Οι ευρείες χημικές δυνατότητες του βαναδίου καθορίζουν επιδράσεις και σε άλλα κυτταρικά φαινόμενα. Η κυτταρική και ενδοκυτταρική κινητικότητα τροποποιείται, επηρεαζόμενη από το μέταλλο: αυτή του σπέρματος και των χρωμοσωμάτων καταστέλλεται, πιθανότατα λόγω αναστολής των εμπλεκόμενων ATP-άσων, ενώ η κίνηση των κυστιδίων διεγείρεται (Nechay et al., 1986).

Δοθείσης της αναστολής διαφόρων ενζύμων από το V δεν εκπλήσσει το γεγονός της πολλαπλής επιρροής του ιχνοστοιχείου στην μεμβρανική μεταφορά. Εκτός από την ινσουλινομιμητική δράση στην διακίνηση και τον μεταβολισμό της γλυκόζης, επηρεάζονται οι κυτταροπλασματικές συγκεντρώσεις ασβεστίου: αυξάνονται στα γραμμωτά μυϊκά κύτταρα (Erdmann, 1980) και στα ερυθροκύτταρα (Varecka and Carafoli, 1982), ενώ στα κύτταρα της νευροϋπόφυσης αναστέλλεται η εκροή του (DiPolo et al., 1979). Όσον αφορά τουλάχιστον τα ερυθροκύτταρα, ο μηχανισμός της εν λόγω επίδρασης πιστεύεται να περιλαμβάνει μείωση της δραστηριότητας της Ca^{2+} ATP-άσης, η οποία εξωθεί τα ιόντα ασβεστίου προς τα έξω.

Η ικανότητα του βαναδίου να αναστέλλει την Na^+/K^+ ATP-άση, η οποία λειτουργεί ως αντλία των ανωτέρω ιόντων, βεβαίως μπορεί να προκαλεί μια αλλαγή των συγκεντρώσεών τους in vivo. Στην εργασία, όμως, των Varecka and Carafoli παρατηρήθη μεγάλη εκροή του K^+ , πέραν, δηλαδή, απ' ότι θα περίμενε κανείς υπό το φως της αναστολής της αντλίας (Varecka and Carafoli, 1982). Σ' αυτή την περίπτωση είναι εύλογο να υποτεθεί ότι η έξοδος καλίου αντισταθμίζει ηλεκτροδυναμικά την ενδοκυτταρική συσσώρευση ασβεστίου. Πράγματι, έπειτα υπεστηρίχθη πως η αύξηση της μεμβρανικής διαπερατότητας για το κάλιο οφείλεται στην διάνοιξη δυμαμικο-εξαρτωμένων καναλιών (Furhmann et al., 1985).

Το βανάδιο επίσης διεγείρει την διακίνηση χλωρίου, χωρίς να επηρεάζει αυτήν του νατρίου, στο επιθήλιο του παχέως εντέρου κουνελιών (Hatch et al., 1983). Η μεταφορά της αλανίνης προς αμφότερες τις κατευθύνσεις στον γαστρεντερικό σωλήνα υφίσταται αλλαγές: επιταχύνεται μεν με χαμηλές συγκεντρώσεις βαναδίου, ενώ επιβραδύνεται με υψηλές (Hajjar et al., 1987). Βαίνει παράλληλη μια μείωση της δραστηριότητας της Na^+/K^+ ATP-άσης στις βασικές μεμβράνες. Άλλωστε, μεταβολές συγκεντρώσεων διαφόρων ουσιών μπορούν να προκληθούν και με αύξηση της παθητικής διαπερατότητας, εφ' όσον διαφορετικά κύτταρα, ίσου του βαθμού αναστολής της Na^+/K^+ ATP-άσης, παρουσιάζουν διαφορές απόκρισης της διαπερατότητας ως προς την αγωγή με το βανάδιο.

Συγκεκριμένα, καλλιέργειες του νευροβλαστώματος μετά την επώαση με το πεντασθενές μέταλλο απελευθερώνουν τους μεταβολίτες της μεθυλοχολίνης, πράγμα

που δεν συμβαίνει στα επιθηλιακά κύτταρα. Ταυτόχρονα τα επίπεδα αναστολής της Na^+/K^+ ATP-άσης ήσαν στατιστικώς ομοιογενή (Montero et al., 1981). Το βανάδιο μπορεί να αυξάνει την παθητική διαπερατότητα είτε συνδεδεμένο με πρωτεϊνικά μόρια της μεμβράνης, είτε θίγοντας την διακίνηση μεμβρανικών λιπιδίων. Η τελευταία εκδοχή μας παραπέμπει, για μία ακόμη φορά, στην σύζευξη του βαναδίου με τις ελεύθερες ρίζες, αρκεί να θυμηθούμε την λιποϋπεροξειδωση αφ' ενός και τον ρόλο του μετάλλου στις αντιδράσεις υπεροξειδίων αφ' ετέρου (βλ. στο κεφάλαιο 1).

Από τις οξειδοαναγωγικές επιδράσεις του βαναδίου μένει να αναφέρωμε ότι η εισαγωγή του στο κύτταρο ελαττώνει κατά πολύ την οξειδωτική απομεθυλίωση του υποστρώματος από το κυτόχρωμα P-450. Αυτό το φαινόμενο εκλείπει με προαγωγή των πειραματοζώων με ασκορβικό οξύ, ενώ το θειϊκό βαναδύλιο είχε πολύ λιγότερη δράση (Heide et al., 1983). Θα μπορούσε να συμπεράνει κανείς ότι το βανάδιο είναι ισχυρός τροποποιητής του συνόλου των οξειδοαναγωγικών κυτταρικών αντιδράσεων. Εκτός τούτου, ειδικά το κυτόχρωμα P-450, όπως εδείχθη προηγουμένως, λαμβάνει ενεργό μέρος στον μεταβολισμό των πολυκυκλικών υδρογονανθράκων, γεγονός που μπορεί να χρησιμεύσει άμεσα στην εξήγηση της αντικαρκινογόνου δράσεως των βαναδικών ενώσεων.

2.3.4. ΟΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΒΑΝΑΔΙΟΥ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ.

Έχει αναφερθεί επίδραση του βαναδίου στην καρδιά (Erdmann, 1980), το οποίο ενίοτε προκαλεί θετική, άλλοτε αρνητική ινότροπο δράση, σε εξάρτηση από βιολογικό είδος και ποσότητα ιχνοστοιχείου. Εν τούτοις, η δράση αυτή δεν επηρέαζε την μεταφορά Na^+/K^+ , εξ ου συνάγεται ότι η αναστολή της Na^+/K^+ ATP-άσης δεν είναι ο πρωτεύων αιτιώδης παράγων αυτού του φαινομένου. Εν συνεχεία διεπιστώθη ότι το βανάδιο δεν έχει καμμία επίπτωση στην προκαλούμενη υπό άλλων αναστολέων της Na^+/K^+ ATP-άσης τοξικότητα, όπως την τοξικότητα της ouabain, (MacDonald et al., 1988). Τροποποιώντας την διαπερατότητα των καναλιών ασβεστίου, βρήκαν ότι υπάρχει σχέση με την αύξηση της καρδιακής απόδοσης υπό την επίρεια του μετάλλου (Sundet et al., 1984). Ενοχοποιήθηκε η επαγωγή υπό του βαναδίου της καρδιακής πρωτεϊνοκινάσης C, η οποία μεγεθύνει την Ca^{2+} -συσσώρευση δια μέσου του φωσφοϊνοσιτιδικού συστήματος (Catalan et al., 1982).

Όπως είναι εύλογο να υποθέσει κανείς, σε μέγιστο βαθμό επηρεάζεται απ' το βανάδιο ο νεφρός. Με παροχή βαναδίου ανακλύπεται ισχυρό αγγειοσυσταλτικό φαινόμενο (Nechay, 1984), συνοδευόμενο από μεγάλη διούρηση, το οποίο μπορεί να μειωθεί με τροποποίηση της συγκέντρωσης ασβεστίου στο διάλυμα διήθησης (Benabe et al., 1984). Αναστέλλεται επίσης η επίδραση επί νεφρού της βαζοπρεσσίνης (Steffan et al., 1981), καθώς και έκκριση ρενίνης (Churchill and Churchill, 1980). Με τις παραπάνω επιδράσεις συσχετίζεται η αναστολή της Na^+/K^+ ATP-άσης, εφ' όσον η μεταφορά αυτών των ιόντων επιρρέπει μεταβολών, επηρεαζόμενη απ' το βανάδιο (Churchill and Churchill, 1980).

Στις παρακάτω σελίδες θα μας δοθεί η ευκαιρία να μιλήσωμε για την ινσουλινομιμητική δράση του βαναδίου, αυτή τη φορά στο επίπεδο της θεραπευτικής αντιμετώπισης του διαβήτη. Η ινσουλίνη, με τον τρόπο που συζητήθηκε προηγουμένως, προάγει, ως γνωστόν, την διακίνηση θρεπτικών συστατικών προς την περιφέρεια, τον μεταβολισμό υδατανθράκων, την αποθήκευση γλυκογόνου και λίπους, την σύνθεση πρωτεϊνών, την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων (Guyton, 1994). Στο μέγιστο βαθμό ανταποκρίνεται στην ινσουλίνη το ήπαρ, ολιγώτερον οι μυς και ο λιπώδης ιστός, ανεξάρτητος δε ίσταται ο εγκέφαλος. Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί

μια κατάσταση διαταραχής της εν λόγω μεταβολικής πορείας, που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία, εξάντληση γλυκογόνου, λίπους και πρωτεϊνών στους ιστούς-στόχους, ανώμαλο μεταβολισμό λιπών. Η παθολογική αυτή εικόνα μπορεί να προξηνηθεί με δύο τρόπους (Flier, 1983): αφ' ενός μεν εξ' αιτίας ανεπαρκούς έκκρισης ινσουλίνης υπό των β-κυττάρων των νησιδίων Langerhans (ινσουλινεξαρτώμενος διαβήτης, τύπος I), αφ' ετέρου δε λόγω μειωμένης ανταπόκρισης των κυττάρων-στόχων προς την ορμόνη (ινσουλιανεξάρτητος διαβήτης, τύπος II).

Ένα καθιερωμένο μοντέλο ινσουλινοεξαρτώμενου διαβήτη είναι η στρεπτοζοτοσινοπροκεκλημένη διαταραχή της παραγωγής ινσουλίνης. Χρησιμοποιώντας τούτο με παράλληλη παροχή βαναδικού νατρίου, η ερευνητική ομάδα του Heyliger (Heyliger et al., 1985) επέτυχε την ομαλοποίηση της γλυκόζης του αίματος εντός τεσσάρων ημερών. Οι διαταραχές των ιστών λόγω χρόνιας υπεργλυκαιμίας υποχωρούν υπό την επήρεια του ιχνοστοιχείου : π.χ. ρυθμίζεται η ικανότητα δέσμευσης της ινσουλίνης από το ήπαρ, τα ένζυμα του μεταβολισμού υδατανθράκων αποκαθίστανται, επανέρχεται στην κανονική η συγκέντρωση γλυκογόνου (Briehard et al., 1988). Ταυτόχρονα η δράση του βαναδίου ως αυξητικού παράγοντος είναι κατά πολύ ηπιωτέρα εκείνης της ινσουλίνης.

Προεβλήθη ο ισχυρισμός ότι η εξομάλυνση της γλυκόζης του αίματος οφείλεται στην προκαλούμενη από το βανάδιο ανορεξία και, τοιουτοτρόπως, το μέταλλο δεν έχει ινσουλινομιμητικές ιδιότητες (Malabu et al., 1994). Απεκρούσθη όμως ευθύς αμέσως από άλλες ερευνητικές ομάδες (McNeill et al. 1994, Domingo et al. 1994): εν πρώτοις, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν από τους Malabu et al. ήσαν πολύ μικρές, έπειτα η ελάττωση της γλυκόζης στο αίμα λόγω μειωμένης πρόσληψης τροφής είναι ποιοτικώς διαφορετική, καθώς δεν συνεπιφέρει καμμία περιφερική μεταβολική βελτίωση.

Βεβαίως, η ινσουλινομιμητική δράση του βαναδίου εκτυλίσσεται κατά πρώτο λόγο στο κυτταρικό επίπεδο. Εν τούτοις μπορεί να επισημανθεί ένας επιπρόσθετος λόγος διατήρησης της ευγλυκαιμίας στα διαβητικά ζώα. Το V(V), όπως συζητήθηκε πριν, είναι πολύ ισχυρότερος του V(IV) αναστολέας της Na^+/K^+ ATP-άσης. Το γεγονός ενδοκυτταρικής μετατροπής του V(V) σε V(IV) πιθανώς είναι η αιτία της απουσίας αναστολής του ενζύμου υπό σχετικά μικρών ποσοτήτων εξωγενούς V(V) σε μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων. Τα β-κύτταρα, όμως, των νησιδίων Langerhans αποτελούν εξαίρεση - οι αλλαγές διακίνησης των ιόντων σ' αυτά μπορούν να οδηγήσουν σε μια έκκριση ινσουλίνης (Fagin et al., 1987).

Προσπάθειες θεραπευτικής αντιμετώπισης του II τύπου διαβήτη έγιναν επί τεσσάρων γενετικών μοντέλων τρωκτικών (ob/ob και db/db μυσ, BB και fa/fa επίμυς), τα οποία αναπτύσσουν περιφερική ινσουλιναντοχή στο επίπεδο του υποδοχέως και χαρακτηρίζονται από υπεργλυκαιμία, υπερινσουλιναίμια και παχυσαρκία. Απεδείχθη ότι παροχή από του στόματος βαναδικών αλάτων οδηγεί σε ευεργετικά αποτελέσματα ως προς την συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα και την ομοιοστασία της (Briehard et al. 1989, Ramanadham et al. 1989, Briehard et al. 1990, Meyerovitch et al. 1991). Αυτό το αποτέλεσμα είναι ουσιαστικής φύσεως, εφ' όσον συνωδεύετο από αντίστοιχη αύξηση των δεικτών χρησιμοποίησης γλυκόζης. Η συνολική επιστημονική άποψη διέπεται από ένα κλίμα μεγάλων προσδοκιών, που ανατίθενται στην θεραπεία μέσω βαναδίου (Matsumoto, 1994).

Πριν αφήσωμε τις ινσουλινομιμητικές ιδιότητες του μετάλλου, θα αναφέρωμε τις προσπάθειες σύζευξης βαναδίου με οργανικά μόρια στα πλαίσια της καταπολέμησης του διαβήτη, μία εκ των οποίων ήδη παρουσιάστηκε στη σελ. 43, με σκοπό πάντα να διευκολυνθεί η απορρόφηση, να μειωθεί η τοξικότητα και, εν τέλει, να αυξηθούν οι δραστικές συγκεντρώσεις. Εκτός του τiron το βανάδιο είχε συνδεθεί με την κυστεΐνη

(Lazaro et al., 1989), την 3-υδροξυ-2-μεθυλ-4-πυρόνη (McNeill et al., 1992) και άλλες οργανικές συνιστώσες (Schechter et al., 1992). Το αναμενόμενο αποτέλεσμα επετεύχθη, αναδεικνύοντας έτσι μίαν υποσχόμενη κατεύθυνση έρευνας. Το βανάδιο εχορηγήθη και σε μίγμα με H_2O_2 (Posner et al., 1990). Εξαιρετικώς δραστικά υπεροξοπαράγωγα του V(V) έχουν ταυτοποιηθεί (Shaver et al., 1993).

Υπάρχουν τεκμήρια ότι το βανάδιο σχετίζεται και με άλλες παθολογικές καταστάσεις. Το περιεχόμενο στα μαλλιά, στο ολικό αίμα και στο πλάσμα μέταλλο παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις στους επιρρεπείς καταθλιπτικών ψυχώσεων (Naylor et al., 1987). Τούτο ενδεχομένως συνδέεται με τις χαρακτηριστικές κατά την κατάθλιψη διαταραχές της μεταφοράς νατρίου και με την δραστηριότητα της Na^+/K^+ ATP-άσης, καθ'όσον η παροχή λιθίου αίρει αυτό το φαινόμενο (Campbell et al., 1988). Το βανάδιο επίσης προκαλεί αγγειοσύσπαση, αυξάνοντας την αρτηριακή πίεση και την περιφερική αντίσταση (Steffan et al., 1981), χωρίς να επηρεάζει άμεσα τις κεντρικές αρτηρίες (Hom et al., 1982). Εκτός αυτού υπάρχει, βέβαια, και η αντικαρκινογόνος δράση του ιχνοστοιχείου, αλλά αυτή θα γίνει αντικείμενο λεπτομερούς συζήτησης στο κεφάλαιο 3.

2.3.5. ΤΟ ΒΑΝΑΔΙΟ ΩΣ ΕΡΓΑΛΕΙΟ ΜΕΛΕΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ.

Οι μεγάλες δυνατότητες ένταξης του βαναδίου σε βιολογικές δομές και διαδικασίες καθορίζουν την ευρεία **χρήση** του στην μελέτη των βιολογικών φαινομένων:

α) Οι πρωτεϊνικές δομές μπορούν να μελετηθούν αποτελεσματικά δια συμπλοκοποίησης με βαναδύλιο. Το EPR-φάσμα των βαναδυλπρωτεϊνικών συμπλόκων είναι ευαίσθητο στην διάταξη του πρωτεϊνικού τμήματος (Chasteen, 1981).

β) Η συμμετοχή διαφόρων ATP-ασών σε ποικίλες φυσιολογικές διαδικασίες δύναται να εξακριβωθεί τιθεμένου του βαναδίου ως τροποποιητού πειραματικών συνθηκών (Thevenod and Schulz, 1989).

γ) Παρομοίως, η σημασία των φωσφορυλιωτικών συστημάτων ερευνάται δια χρήσεως βαναδίου ως δεδηλωμένου αναστολέως της τυροσινοφωσφατάσης (Lowe et al., 1996).

Η ίδια όμως η ποικλομορφία βιολογικών επιδράσεων του μετάλλου, διεπόμενη από την πολύπλοκη αυτού χημεία, είναι δυνατόν να αποβεί πηγή **προβλημάτων** (Chasteen, 1990):

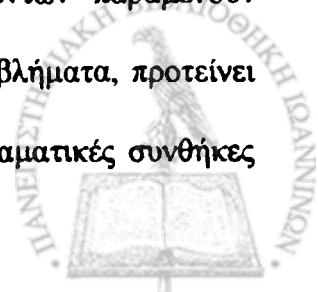
α) Η αλληλομετατροπή των V(V) και V(IV)-ενώσεων κατά τη διάρκεια του πειράματος, επαγόμενη από της αέριας οξειδωσης και αναγωγής εκ μέρους της γλουταθειόνης και των κατεχολών, δυσκολεύει τον ακριβή προσδιορισμό ενεργών πειραματικών παραγόντων.

β) Η σύνδεση του βαναδίου με διάφορα κυτταρικά συστατικά μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την δραστική συγκέντρωσή του, πράγμα που παρεμποδίζει την ακριβή μελέτη κινητικής.

γ) Όταν παρατηρείται μια επίδραση του βαναδίου, ιδιαίτερος επίδραση κυτταρικού επιπέδου, είναι δύσκολο να τεκμηριωθεί η οξειδωτική βαθμίδα της δραστικής ένωσης, κατ'επέκτασιν και οι κυτταρικοί στόχοι των οξοβαναδικών ιόντων παραμένουν ασαφείς.

Ο Chasteen (Chasteen, 1990), λογιζόμενος τα ανωτέρω προβλήματα, προτείνει τις εξής **στρατηγικές επίλυσής των**:

α) Πρέπει να λαμβάνεται υπ'όψιν η αναμενόμενη υπό τις πειραματικές συνθήκες χημική μορφή του μετάλλου.



β) Να μη χρησιμοποιούνται μίγματα βαναδίου και άλλων ουσιών, εκτός εάν τούτο διέπεται από ειδικής σκοποθεσίας.

γ) Προς έλεγχο της εν χρήσει χημικής μορφής να εφίσταται η προσοχή στο χρώμα του διαλύματος (το ορθοβαναδικό δίνει διαφανές διάλυμα, η αναγωγή προς το βαναδύλιο μετατρέπει το χρώμα σε γαλάζιο, ο πολυμερισμός στο δεκαβαναδικό καθιστά το διάλυμα κιτρινο-πορτοκαλί).

δ) Κατά την ερμηνεία των τελικών, προκαλούμενων υπό του βαναδίου φυσιολογικών μεταβολών, να αποδίδεται η πρέπουσα βαρύτητα στην πολλαπλότητα των υπολανθανουσών μοριακών φαινομένων.

Το όφελος της τελευταίας συνταγής θα ανακύψει καταφανώς στο κεφάλαιο 3, όπου η υφιστάμενη ποικιλία των σχετικών θεωρητικών υποθέσεων παρακωλύει όχι μόνο την ερμηνεία, αλλά, ως έναν βαθμό, και την αποτελεσματικότητα της περαιτέρω έρευνας.

2.4. ΣΥΝΟΨΙΣ.

Είναι δύσκολο να παραβλεφθεί σήμερα η σημασία του βαναδίου ως βιολογικός ενεργού ιχνοστοιχείου. Οι επιδράσεις του παρουσιάζουν ένα επιστημονικό πεδίο ευρύ και διαρκώς εξελισσόμενο, που μπορεί να μας προσφέρει και αξιόλογες κλινικές εφαρμογές, και λεπτομερέστερη κατανόηση του χημικού υποβάθρου των επηρεαζόμενων βιολογικών διαδικασιών, καθώς και να χρησιμεύσει ως εργαλείο της βιολογικής έρευνας. Ο συνολικός πίνακας των δράσεων των ενώσεων βαναδίου (εξηρημένης της αντικαρκινογόνου δράσεως) προβάλλεται στην ακόλουθη σελίδα.

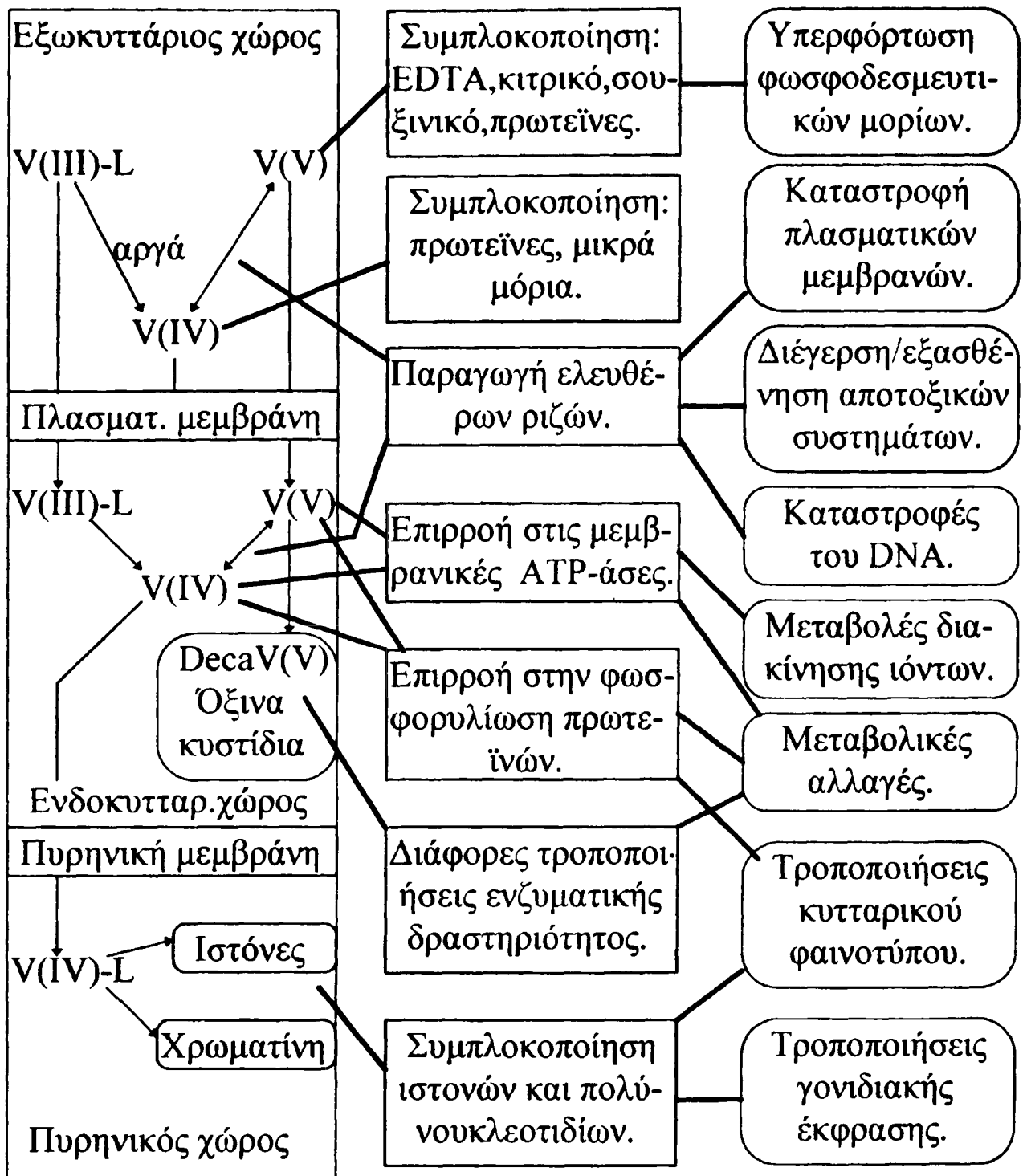
Διακρίνονται τρεις συμπαγείς ενότητες:

- 1) Δέσμευση διαφόρων βιομορίων.
- 2) Συσχετισμός με τις ελεύθερες ρίζες.
- 3) Ορμονοειδής ενεργοποίηση κυττάρων.

Η πρώτη ενότητα μπορεί να ειπωθεί και από κάπως διαφορετική σκοπιά: οι χημικές ιδιότητες του βαναδίου επιτρέπουν να το χρησιμοποιήσωμε και ως καθαρά δομικό στοιχείο προς σύνθεσιν νέων ενώσεων με ζητούμενες βιοχημικές παραμέτρους.



Σχήμα 8. Οι βιολογικές δράσεις του βαναδίου.



Αριστερή στήλη: διακίνηση στο χώρο.

Μεσαία στήλη: χημικά φαινόμενα.

Δεξιά στήλη: φυσιολογικά αποτελέσματα.

$V(III)-L, V(IV)-L$ - κατάλληλα σύμπλοκα (π.χ. $V(IV)-L = \text{vanadocene dichloride}$, βλ. παρακάτω στο κεφ.3).



3. ΒΑΝΑΔΙΟ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.

3.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ.

Στις αρχές της δεκαετίας του 80' δύο γεγονότα καθώρισαν την εφαρμογή του βαναδίου επί κακοηθείας. Εν πρώτοις, η ινσουλινοειδής επιρροή του στην σύνθεση του DNA, χωρίς μονοσήμαντη αυξητική δράση (βλ. στο κεφάλαιο 2). Κατά δεύτερον δε λόγω, το τετρασθενές βανάδιο παρουσιάζει χημικές ομοιότητες με τον λευκόχρυσο και έτσι θα μπορούσε να κατασκευασθεί μια ένωση παραπλήσια προς το cis-DDP (βλ. στο κεφάλαιο 1).

Η πρώτη αναφορά στο βανάδιο ως αντικαρκινικό παράγοντα έγινε το 1979 (Korff-Maier and Korff, 1979). Το δομημένο με την μορφή του cis-DDP διχλωροβαναδοκένιο (vanadocsen dichloride) ανέδειξε χημειοθεραπευτικές ιδιότητες κατά των μεταμοσχευμένων σε μύες όγκων εξ'ασκτικών κυττάρων. Μελέτη της ενδοκυτταρικής κατανομής της ένωσης, η οποία πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρονική φασματοσκοπία (electron energy loss spectroscopy), έδειξε το βανάδιο να συσσωρεύεται στην πυρηνική ετεροχρωματίνη και, κατ'ελάχισονα λόγο, στους πυρηνίσκους και στα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα (Korff-Maier and Korff, 1983). Έτσι το διχλωροβαναδοκένιο φαίνεται να επιδρά με το DNA, ομοίως προς τον λευκόχρυσο, καίτοι ο συγκεκριμένος χημικός μηχανισμός είναι μάλλον διαφορετικός.

Εν συνεχεία στη φάση προώθησης εφημερίστη το θειϊκό βαναδύλιο στην συγκέντρωση 25 p.p.m. κατά του πειραματικού καρκίνου μαστού (Thompson et al., 1984). Αρχίζοντας μιαν εβδομάδα μετά την έγχυση της 1-μεθυλο-1-νιτροζουρίας το ιχνοστοιχείο χορηγείτο με πόσιμον ύδωρ στην πειραματική ομάδα, παρακάμπτοντας έτσι τη φάση της έναρξης. Ένα σημαντικό προληπτικό αποτέλεσμα επετεύχθη ως προς: α) τό ποσοστό εμφάνισης (92% έναντι των 100% της ομάδος ελέγχου), β) τον χρόνο εμφάνισης, γ) την πολλαπλότητα εστιών του καρκίνου. Τα πειραματόζωα της ομάδος πρόληψης δεν παρουσίασαν καμμία διαφορά με άθικτους επίμυς ως προς την κατανάλωση τροφής, το βάρος και τον αιματοκρίτη.

Την επόμενη χρονιά δημοσιεύτηκε μια μελέτη αντικαρκινογόνου δράσεως *περοξοσυμπλόκων του V(V)* (Djordjevic and Wampler, 1985). Το μοντέλο καρκίνου παρήγετο με εβδομαδιαία ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 10^5 λευχαιμικών τριχωτών κυττάρων (L1210 murine leukaemia cells) στους μυς (και έτσι η αντικαρκινογόνος δράση μπορεί να θεωρηθεί χημειοθεραπευτική), ενώ εδοκιμάσθησαν 14 μορφές περοξο-V(V)-συμπλόκων των γενικών τύπων $M_4[O\{VO(O_2)_2\}_2]$, $M_3[VO(O_2)_2C_2O_4]$ και $M[VO(O_2)L]$ (όπου το L = malate, citrate, iminodiacetate, nitrilotriacetate και EDTA). Σημαντική αντικαρκινογόνος ισχύς είχε ορισθεί ως $\geq 25\%$ παράταση της επιβίωσης πειραματοζώων συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, στην οποία η εισαγωγή λευχαιμικών κυττάρων γινόταν χωρίς παράλληλη χορήγηση συμπλόκου. Την ως άνω ορισθείσαν ισχύον απεκάλυψαν σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις οι εξής ενώσεις:

	παράταση επιβίωσης, %	βέλτιστος συγκέντρωση, mg/kg
$(NH_4)_4[O\{VO(O_2)_2\}_2]$	39	4,5
$(NH_4)_3[VO(O_2)_2C_2O_4]2H_2O$	32	10,1
$NH_4[VO(O_2)Malato]H_2O$	29	11,5
$K_3[VO(O_2)_2C_2O_4]2H_2O$	25	7,8

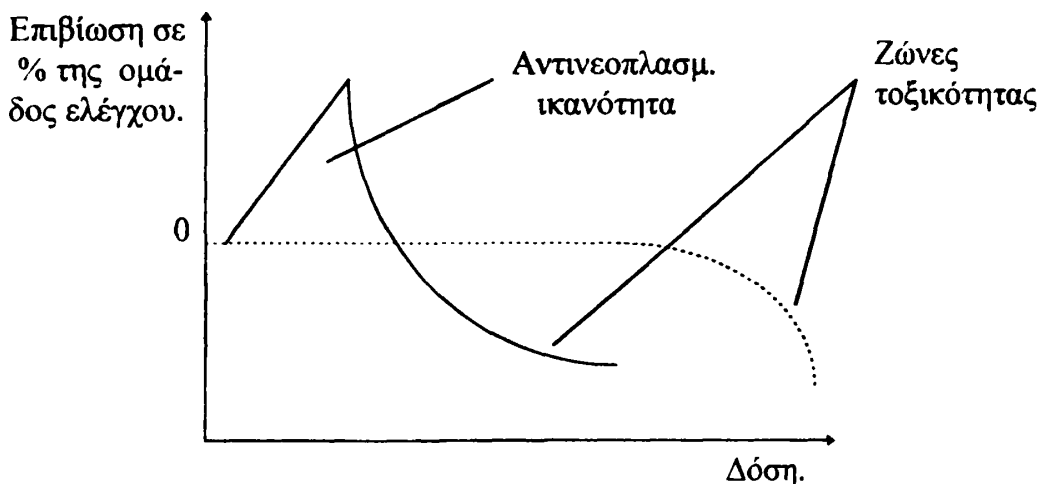
Η τοξικότητα των περοξοβαναδικών επίσης εξηριάτο στενώς από την χημική δομή της ένωσης και από τον τύπο του ετεροσυμπλόκου. Το ισχυρώς συμπλοκοποιημένο περοξοβανάδιο ήταν λιγώτερο τοξικό, ενώ το κατιόν αμμωνίου



φαίνεται να αυξάνει την γενική βιολογική δραστηριότητα. Αυτό που θα έχει σημασία στην συζήτηση των θεωρητικών βάσεων είναι η συγκεκριμένη συνάρτηση μεταξύ της αντινεοπλασματικής και της τοξικής επιδράσεως των περοξοβαναδικών συμπλόκων. Η τοξικότητα των ενώσεων με αντικαρκινογόνο ισχύ επήρχετο σημαντικώς ενωρίτερον εν σχέσει με εκείνη των βιολογικώς αδιάφορων ενώσεων, ούτως ώστε οι συναρτώμενες προς την συγκέντρωση καμπύλες επιβίωσης δύνανται να παρασταθούν σχηματικά όπως στο σχήμα της επόμενης σελίδος.

Σημειωτέον ότι η χημική ιδιοτυπία των περοξοβαναδικών συμπλόκων συνίσταται στην ικανότητα να οξειδούται η περοξοομάδα προς την ρίζα υπεροξειδίου δεδομένου ενός κατάλληλου ετεροσυμπλόκου. Το γεγονός ότι η τοξικότητα των ενεργών συμπλόκων επέρχεται ευθύς μετά το διάστημα δραστηκών συγκεντρώσεων ενισχύει την άποψη περί της ρίζας υπεροξειδίου ως ενεργού μορφής. Ταυτοχρόνως, δεν στερείται ενδιαφέροντος η διαπίστωση ότι τα περοξοβαναδικά αποτελούν τις πλέον ισχυρές, από την άποψη της μίμησης ινσουλίνης, ενώσεις βαναδίου (Posner et al., 1994).

Σχήμα 9. Δύο τυπικές καμπύλες της βιολογικής δραστηριότητας των περοξοβαναδικών ενώσεων. (σχηματικώς από: Djordjevic and Wampler, 1985).



Κατά του καρκίνου παχέος εντέρου, που προκύπτει μετά την έκθεση μυών στην 1,2-διμεθυλοϋδραζίνη (DMH), παροχή βαναδικού (10 και 20 p.p.m. εις πόσιμον ύδωρ) ουδεμίαν επίπτωσην είχε επί της επιθετικότητας, της συχνότητας είτε του ιστολογικού χαρακτήρος των όγκων (Kingsnorth et al., 1986), αν και η επαγόμενη υπό της DMH ραγδαία σύνθεση του RNA υπέστη αναστολή 11% κατά προσέγγισιν, ενώ παρατηρήθη αύξηση των κατάλοιπων θυμιδίνης από 210 έως 550%.

Η αύξηση του μεταμοσχευμένου λεμφώματος αναστέλλεται μετά την χορήγηση του μονοβαναδικού αμμωνίου και τούτο συνωδεύετο με τροποποίηση της εικόνας της βιομετατροπής (Sardar et al., 1993). Η ίδια ερευνητική ομάδα (Chakraborty and Chatterjee, 1994) στα κατ'επανάληψιν πειράματα επεβεβαίωσε τα προηγούμενα - 0,25 $\mu\text{g V(V) / kg}$ βάρους σώματος / ημέρα παρέτειναν την επιβίωση τόσο στο θεραπευτικό, όσο και στο προληπτικό σχήμα - και βρήκε μεταβολή μερικών δεικτών του όγκου: αύξηση της ερυθροποιητίνης (Epo) και μείωση της γ -γλουταμυλοτρανσπεπτιδάσης (GGT). Η Epo αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό ερυθροειδών προγεννητόρων (erythroid progenitors and precursors) και τους παρακινεί να μετατραπούν σε ερυθροκύτταρα (Spivack, 1986), ενώ η GGT είναι ισχυρός θετικός δείκτης του νεοπλασματος (Baik et al., 1991) και των πρώιμων σταδίων της διαφοροποίησης (Takahashi and Zeydel, 1982).

Εάν δε η χορηγούμενη ποσότητα βαναδίου αυξηθεί δεκαπλασίως (έως και 2,5 μg / kg / ημέρα), το αποτέλεσμα αντιστρέφεται: παρατηρείται σημαντική επιτάχυνση του πολλαπλασιασμού με παράλληλη αύξηση μερικών ηπατικών ενζύμων, όπως της γλουταθειον-S-τρανσφεράσης, της UDP-γλουκουρονυλοτρανσφεράσης και του κυτοχρώματος p-450 (Chakraborty et al., 1995). Ανεύρεση ηυξημένων επιπέδων των τελευταίων ενζύμων στο ήπαρ αποτελεί δείκτη απομακρυσμένου νεοπλασματος, πράγμα που εξηγείται από φυσιολογικές και τροφικές μεταβολές στον οργανισμό του ξενιστή (Herzfeld and Greengard, 1977). Οι συγγραφείς Chakraborty et al., 1995 υποστηρίζουν τον διασπαστικό ρόλο του βαναδίου: η αναστολή του όγκου σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις οφείλεται εις άγνωστους μηχανισμούς, ενώ, καθώς το επίπεδο του μετάλλου υπερβεί ένα ωρισμένο όριο, παραβλάπτονται διάφορες ρυθμιστικές διαδικασίες. Το τελευταίο γεγονός αντανakλάται εμμέσως στην δραστηριότητα των ως άνω αποτοξικών ενζύμων. Πρέπει να σημειωθεί βέβαια ότι τα δοσολογικά όρια της ευεργετικής δράσης του V έχουν ισχύ ως προς τον συγκεκριμένο καρκίνο μόνον, εφ' όσον π.χ. στην εργασία των Djordjevic and Wampler, 1985 χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις επιπέδου 10 mg / kg και αμέσως παρακάτω θα δούμε σημαντικό αποτέλεσμα με 100 μg / kg .

Η επίδραση του μονοβαναδικού αμμωνίου στην προκαλούμενη υπό της διαιθυλονιτροζαμίνης ηπατική καρκινογένεση έχει μελετηθεί από τους Bishayee and Chatterjee. Στο πρώτο πείραμα (Bishayee and Chatterjee, 1995a) οι προσθήκες βαναδίου στο πόσιμον ύδωρ επιπέδων 0,2 και 0,5 p.p.m. (περίπου 100 μg / kg / ημέρα) άρχισαν 4 εβδομάδες προ της προσβολής με το καρκινογόνο. Είχον δε ευεργετικά αποτελέσματα, τα οποία διεκρίνοντο στατιστικώς (στην ομάδα με 0,5 p.p.m.) στην ιστοπαθολογική εξέταση κατά την 16-ην εβδομάδα μετά την έναρξη της καρκινογένεσης. Συγκεκριμένα οι τιμές των εξής παραμέτρων παρουσίασαν μια μείωση κατόπιν της αγωγής με V:

1. Απόλυτος μέσος όγκος υπερπλασματικών ογκιδίων.
2. Μέσος όγκος των υπερπλασματικών ογκιδίων ως ποσοστό του όγκου ήπατος.
3. Μέγεθος της εστιακής περιοχής προνεοπλασματικών βλαβών.
4. Αριθμός μετηλλαγμένων κυττάρων εντός εστιακής περιοχής.
5. Εκατοστιαία τιμή του κατελημμένου υπό εστιών ήπατος.

Στο επόμενο πείραμα (Bishayee and Chatterjee, 1995b) η αγωγή με το βανάδιο διαφοροποιήθηκε ως: α) προληπτική της έναρξης (4 εβδομάδες προ της ενέσεως καρκινογόνου έως της στιγμής της ενέσεως και μόνο), β) προληπτική της προώθησης (1 εβδομάδα μετά την ένεση έως της σφαγής των πειραματοζώων στην 16-την εβδομάδα) και γ) συνδυασμός των αμφοτέρων. Η γ-ομάδα ανέδειξε σαφέστατη βελτίωση σύμφωνα με τις ως άνω παραμέτρους συν τη δραστηριότητα της GGT, η α-ομάδα περιστασιακά μόνο διεκρίνετο στατιστικώς από την ομάδα ελέγχου, ενώ η β-ομάδα παρουσίασε μη σημαντική ελάττωση. Ταυτόχρονα, το αποτέλεσμα στην γ-ομάδα ήταν περισσότερο από προσθετικό ως προς τις επιδράσεις κατά την έναρξη και την προώθηση.

Εκ των άνω, και λαμβάνοντας υπ' όψιν την GGT ως θετικό δείκτη των προνεοπλασματικών ηπατοκυττάρων, οι συγγραφείς συνήγαγον ότι το βανάδιο επιδρά κατά πρώτο λόγο στη φάση της έναρξης και δευτερευόντως μόνον στο στάδιο της προώθησης. Δυνάμεθα όμως, κατά τη γνώμη μας, να αντιτάξωμε σ' αυτήν την άποψη, κατόπιν εξέτασης της εργασίας, τις εξής παρατηρήσεις. Εν πρώτοις, από την έλλειψη στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων στην β-ομάδα δεν μπορούμε να συμπεράνομε πολλά, εφ' όσον τα υπό εξέτασιν πληθυσμιακά δείγματα ήσαν ολιγάριθμα (10-12 ζώα). Οι τιμές της β-ομάδας παρουσίαζαν σταθερή μείωση συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ενώ διεκρίνοντο ολίγον από την α-ομάδα (την προληπτική της έναρξης). Οπότε θα μπορούσε κανείς να είναι σχεδόν βέβαιος ότι, αν ο αριθμός του δείγματος μεγάλωνε, θα υπήρχαν διαφορές και στην πρόληψη της προώθησης. Εν δευτέρως, η λίγο μεγαλύτερη επιτυχία στην α-ομάδα θα μπορούσε να προκύψει λόγω παρατεταμένης δράσης του

βαναδίου, καθ' όσον συγκρατείται στο ήπαρ σε σχετικά υψηλό ποσοστό και για αόριστο διάστημα (η περιεκτικότητα του ηπατικού ιστού σε βαναδίο δεν είχε ερευνηθεί από τους Bishayee and Chatterjee).

Μελέτες επί κυτταρικών καλλιιεργειών αποδεικνύουν την ικανότητα των βαναδικών να αναστέλλουν στην συγκέντρωση $> 10^{-10}$ mol την διαμόρφωση αποικιών κακοήθων κυττάρων (Hanauske et al., 1987). Δια τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα οι συγκεντρώσεις ορθοβαναδικού επιπέδου 5-10 μM απεδείχθησαν ακόμη και τοξικές (Afshari et al., 1993). Διεφοροποιήθη η δράση του βαναδίου επί του πολλαπλασιασμού συμπαρουσία διαφόρων αυξητικών παραγόντων (Rijksen et al., 1993). Μαζί με ειδικευμένους τοιούτους (π.χ. ο αυξητικός παράγων αιμοπεταλίων) το μέταλλο επάγει τη διαίρεση, ενώ με πολυδύναμους - την αναστέλλει. Το βαναδικό ιόν εντός κυττάρου, πέραν των καθιερωμένων δράσεων αυτού, όπως εμπλοκή στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, μεταβολή του pH και επιπέδων ασβεστίου κλπ., δύναται να επηρεάζει την επαγόμενη από άλλους παράγοντες έκφραση πρωτοογκογονιδίων, λόγου χάριν του 'fos' στα χονδροκύτταρα (chondrocytes) (Conquer et al., 1994). Εν τούτοις, η έκφραση του 'fos' είναι απαραίτητη για την έναρξη της κυτταρικής διαίρεσης.

Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι οι περισσότερες ενδοκυτταρικές δράσεις του βαναδίου, συμπεριλαμβανομένων και των ινσουλινομιμητικών, λαμβάνουν χώρα υπό μορφήν V(V), π.χ. η δευτερογενής ενεργοποίηση της πρωτεϊνοκινάσης της κυτοζόλης (δευτερογενής επειδή προκύπτει μέσω αναστολής των τυροσινοφωσφατασών) (Elberg et al., 1994). Υπό ομαλές συνθήκες ~98% του βαναδίου στο κύτταρο έχει την οξειδωτική βαθμίδα +4, αλλά οιοσδήποτε παράγων (π.χ. H_2O_2) συμβάλλει στην, έστω και τοπική, μετατροπή V(IV) \rightarrow V(V) απελευθερώνει την βιοδραστικότητα του μετάλλου. Εκ των άνω συνεπάγεται ότι σε περίπτωση συμβολής ελευθέρων ριζών οι μορφές V(IV) και V(V) θα πρέπει να είναι κάπως ισοδύναμα ως προς τις αντινεοπλαστικές ιδιότητές. Από άλλης δε πλευράς, τα εντόνως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, όπως τα κακοήθη, έχουν φυσικοχημικές συνθήκες (μειωμένο pH, περισσότερη περιεκτικότητα σε νερό, υψηλότερα επίπεδα H_2O_2) που ευνοούν την δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών και την μεταβολή σθένους του βαναδίου.

Και όντως, σε μια σύνθετη μελέτη (Cruz et al., 1995) τα αναφερθέντα βρήκαν υποστήριξη. Διηρευνήθησαν επιδράσεις βαναδίου επί:

- α) κανονικών χονδροκυττάρων, εν ηρεμία ή πολλαπλασιαζομένων,
- β) μιας ποικιλίας κακοήθων κυττάρων,
- γ) φαρμακοανθεκτικών κακοήθων κυττάρων,
- δ) κυττάρων MDAY-D2 συμπαγών όγκων, επί των οποίων εδοκιμάστησαν:
 - δ1) ορθοβαναδικό,
 - δ2) θειϊκό βαναδύλιο,
 - δ3) περοξοβαναδικό,
- ε) κυττάρων MDAY-D2 παρουσία ή απουσία H_2O_2 .
- στ) μεταμοσχευμένων MDAY-D2 συμπαγών όγκων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κυτταροτοξικότητα του βαναδίου (με 48-ωρη επώαση) εξεδηλούτο σφόδρα εις το διάστημα συγκεντρώσεων 5 - 10 μM , φθάνοντας στο μέγιστο με 50 μM . Τούτο αληθεύει, ανεξάρτητα από τον ρυθμό διαίρεσης, για τα κανονικά εν πολλαπλασιασμού κύτταρα και για όλα τα κακοήθη κύτταρα, φαρμακοανθεκτικά ή μη. Επιπλέον, η κυτταροτοξικότητα δεν εξηρτάτο από τον εκάστοτε βαθμό φαρμακευτικής αντοχής, πράγμα που υπαινίσσεται μηχανισμό διαφορετικό από εκείνον της σύζευξης του DNA. Και οι τρεις τεθειμμένες στο δ) ενώσεις ήσαν εξ' ίσου δραστικές. Ταυτόχρονη δε εφαρμογή του βαναδικού και του υπεροξειδίου του υδρογόνου, σε συγκεντρώσεις που από μόνες τους ουδέν αποτέλεσμα επιφέρουν, ολοκληρώνεται σε ~95% θάνατο των MDAY-D2 κυττάρων. Υποδόρια

χορήγηση 0,5 mg / ζώο / ημέρα του βαναδικού στους μυς με μεταμοσχευμένους MDAY-D2 όγκους στην 15η ημέρα συνωδεύετο από εξαφάνιση όγκου σε 4 εκ 15 πειραματοζώων, ενώ στους υπόλοιπους η αύξηση όγκου ανεστέλλετο τουλάχιστον κατά 85%. Οι μορφολογικές αλλαγές κατά την επίδραση του βαναδίου περιελάμβαναν στρογγυλοποίηση και συρρίκνωση του κυττάρου, συμπύκνωση της χρωματίνης, εικόνα που είναι χαρακτηριστική για την απόπτωση.

Η ιδιότυπος ογκοκατασταλτική δράση του V (αναστολή του καρκίνου σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, παρακίνηση αυτού σε μεγαλύτερες, πάλιν αναστολή στο επίπεδο mM και ευθύς αμέσως η επάνοδος τοξικότητας) μπορούν να εξηγηθούν κάπως πρόχειρα από τις παρακάτω παρατηρήσεις, λαμβανομένου υπ' όψιν του γεγονότος ενίσχυσης υπό του βαναδίου της δραστηριότητας της GST σε μια ποικιλία ιστών μη καρκινοπαθών επιμύων (Bishayee and Chatterjee, 1993). Η αύξηση της GST σ' αυτή την περίπτωση δεν αποτελεί δείκτη νεοπλασματος, αλλά του αποτοξινωτικού συστήματος, το οποίο σχετίζεται αδιαμφισβήτητα με την αναστολή καρκίνου. Σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις το βανάδιο ενδεχομένως ενισχύει μόνο την αποτοξινωτική δραστηριότητα. Όταν όμως οι συγκεντρώσεις αυξηθούν, το μέταλλο, μη όντας ακόμα τοξικό, ενισχύει τις ελεύθερες ρίζες εντός των καρκινικών κυττάρων, οι οποίες βοηθούν στην απαραίτητη προς πολλαπλασιασμό φωσφορυλίωση διαφόρων υποστρωμάτων. Εάν δε τα επίπεδα του ιχνοστοιχείου αυξηθούν ακόμη περισσότερο, ο ίδιος συνδυασμός βαναδίου με ελεύθερες ρίζες λειτουργεί πλέον καταστροφικώς, τόσο μάλλον δια τα κακοήθη κύτταρα, όσον αυτά παρουσιάζουν επί τούτω ευμενείς συνθήκες.

Προτού ακόμα ξεκινήσει η έντονος διερεύνηση της αντικαρκινογόνου δράσεως του βαναδίου, είχαν μελετηθεί συγκριτικώς οι συγκεντρώσεις διαφόρων ιχνοστοιχείων σε ομαλό και νεοπλαστικό ιστό του μαστού του ανθρώπου (Rizk and Sky-Peck, 1984). Παραλλήλως προς το ασβέστιο, το χαλκό, τον ψευδάργυρο, το σελήνιο και το ρουβίδιο ευρέθη σημαντικά αυξημένο και το βανάδιο ($1,34 \pm 0,76$ $\mu\text{g/g}$ ξηρού βάρους στον νεοπλαστικό ιστό έναντι $0,78 \pm 0,46$ του υγιούς, $p = 0,004$). Θα ήταν πολύ δύσκολο να εξηγηθεί το ειλημμένο 'προφίλ' αυξήσεως, τουλάχιστον όσον αφορά στην συμβολή, είτε αντίθετα την παρεμπόδιση, της κακοήθειας, διότι ξέρομε ότι η διαμεμβρανική μεταφορά των κακοήθων κυττάρων είναι σημαντικά μεταλλαγμένη. Οι ουσίες που προσλαμβάνονται υπέρμετρα από τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να υπηρετούν διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες, είτε να συσσωρεύονται κατά συμβεβηκός μόνον, οπότε η επίδρασή τους να αποδειχθεί και επιβλαβής.

Αξιοπαρατήρητον ότι το βανιάδύλιο, αν συντεθεί με μερικά παράγωγα της χλωροφύλλης, όπως τα rheophorbide (Iwai et al., 1989) και chlorine e6Na (Iwai et al., 1990), χάριν σ' αυτές τις ουσίες αποκτά μεγάλη συγγένεια προς τον όγκο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ογκοπαραστατικό στοιχείο σε περίπτωση χρήσης ραδιενεργού μετάλλου. Το εάν μπορούν να φανούν εν προκειμένω οι αντικαρκινογόνοι ιδιότητες του βαναδίου, παραμένει υπό ερώτησιν.

Για να έχωμε πλήρη εικόνα των αφορούμενων στην αντικαρκινογόνο δράση του βαναδίου δεδομένων ας θυμηθούμε ακόμη δύο εργασίες, τις οποίες ήδη αναφέραμε. Η μεν πρώτη διεπίστωσε ότι στα κύτταρα του φαιοχρωμοκυτώματος και του νευροβλαστώματος η αύξηση της τυροσινικής φωσφορυλίωσης μετά την παροχή βαναδίου ολοκληρούται στην κυτταρική διαφοροποίηση (Rogers et al., 1994).

Η δε άλλη προσέγγιση μπορεί να συμβάλει στην εξήγηση της αναστολής καρκίνου υπό το φως των κλασικών ινσουλινομιμητικών ιδιοτήτων του ιχνοστοιχείου (Karczmar et al., 1992). Σύμφωνα με την τελευταία, οξεία χορήγηση ινσουλίνης ακολουθείται από πολύ σημαντική ελάττωση του επιπέδου ATP ιδιαιτέρως στα κύτταρα του σαρκόματος *in vivo*. Ουσιαστικά η τέτοια πειραματική διαδικασία δημιουργεί μειωμένη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα, ενώ φεύγει η γλυκόζη κατά

προτεραιότητα στο ήπαρ. Η προκαλούμενη στέρηση από ενεργητικά υποστρώματα επηρεάζει αρνητικά εν πρώτοις τα κακοήθη κύτταρα, εφόσον έχουν ανεπάρκεια γλυκογόνου και υπεροχή της αναερόβιας οξειδωσης. Εξάλλου εκείνη η γλυκόζη που, ταυτόχρονα με την χορήγηση ινσουλίνης, αρχίζει να μπαίνει στα κύτταρα μπορεί να αποθηκεύεται στα ομαλά, ενώ δεν υφίσταται την ίδια πορεία στα καρκινικά κύτταρα.

Ιδιαίτερη βαρύτητα σ' αυτό το θέμα μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός της μη ινσουλινικής οδού σηματοδότησης βαναδίου. Η ανάπτυξη υπό γραμμωτών μυών των καρκινοπαθών αντίστασης προς την ινσουλίνη, η οποία ομοιάζει προς τον διαβήτη τύπου II (Sakorafas and Tsiotou, 1997), καθιστά αυτή την υπόθεση οπωσδήποτε μελετητέα.

3.2. ΣΥΝΟΨΙΣ.

Βάσει των προηγηθέντων δυνάμεθα να διατυπώσωμε ωρισμένες υποθέσεις περί του μηχανισμού δράσεως του βαναδίου. Δια όλες τις κάτωθι παραλλαγές ισχύουν, κατά τη γνώμη μας, οι εξής προτάσεις: (α) Η πλέον δραστική μορφή του βαναδίου είναι το $V(V)$, (β) Στην ενδοκυτταρική μετατροπή $V(IV) \rightarrow V(V)$ ουσιαστικό ρόλο παίζουν οι ελεύθερες ρίζες και (γ) Το εκκρεμές $V(IV) \leftrightarrow V(V)$ με συμμετοχή των ελευθέρων ριζών από μόνο του έχει σημαντικές βιολογικές συνέπειες, ειδικότερα την περαιτέρω παραγωγή των ριζών.

1. Στο κυτταρικό επίπεδο η πιθανή δράση του βαναδίου θα μπορούσε να θεμελιωθεί επί των ακόλουθων διαπιστώσεων: (δ) Τα κακοήθη κύτταρα συσσωρεύουν βανάδιο σε υψηλότερο ποσοστό και (ε) Τα κακοήθη κύτταρα διακρίνονται από αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών και εξησθενημένη αντιοξειδωτική άμυνα. Διαφαίνονται οι εκδοχές:

1.1. Η προκαλούμενη υπό του V φωσφορυλίωση πρωτεϊνών στα κακοήθη κύτταρα λαμβάνει για άγνωστους λόγους μια δυσμενή στροφή (π.χ. επαγωγή των γονιδίων απόπτωσης, καταστολή των ογκογονιδίων και παρακίνηση της διαφοροποίησης), τούτο δε συμβαίνει κατά τον πολλαπλασιασμό.

1.2. Η αλληλεπίδραση του βαναδίου με ελεύθερες ρίζες προκαλεί ισχυρό οξειδωτικό στρες εντός του νεοπλασματικού κυττάρου, ακολουθείσας της απόπτωσης ή της νέκρωσης, ενώ στα ομαλά κύτταρα η κατάσταση διατηρείται στα όρια του επιτρεπτού.

1.3. Στα κανονικά κύτταρα η ενεργοποίηση αποτοξινωτικών συστημάτων με μικρές ποσότητες μετάλλου συντείνει στην αναστολή της καρκινογέννησης. Η διαφοροποιητική επίδρασή του θα μπορούσε να αφορά και στον περιβάλλοντα ιστό, μειώνοντας την ινοπλασία και την αγγειογένεση.

2. Στο επίπεδο του όγκου το εκκρεμές $V(IV) \leftrightarrow V(V)$ ενδεχομένως προκαλεί μεμβρανικές διαταραχές, καθώς η παρουσία των ελευθέρων ριζών είναι σ' αυτή την περιοχή επίσης αισθητή.

3. Στο επίπεδο οργανισμού η αντικαρκινογόνος δράση πιθανώς οφείλεται στην:

3.1. Χρόνια υπογλυκαιμία ως συνέπεια των ινσουλινομιμητικών ιδιοτήτων, στην οποία ιδιαίτερος ευαίσθητα είναι τα κακοήθη κύτταρα.

3.2. Αποτελεσματική αντιμετώπιση καχεξίας μέσω παρακίνησης της εισόδου γλυκόζης στους γραμμωτούς μύς.

3.3. Επιδράσεις επί ανοσοποιητικού, η φύση των οποίων παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστη.

Είναι γεγονός ότι όλες αυτές οι υποθέσεις δεν έχουν προς το παρόν επαληθευθεί επαρκώς, εκάστη εξ αυτών δεν εξηγεί το σύνολο των δεδομένων. Πολλές είναι αλληλοσύμβατες, ενδεχομένως να ισχύουν ταυτόχρονα. Εάν υπάρχουν πολλοί

διακεκριμένοι μηχανισμοί αναστολής καρκίνου, τότε το ποιός μηχανισμός ίσταται εν ενεργεία θα πρέπει να καθορίζεται από την δραστική συγκέντρωση.

Την πλέον ελκυστική και τεκμηριωμένη υπόθεση εργασίας, η οποία και ακολουθήθηκε, αποτελεί η εικασία περί του οξειδωτικού στρες ως κυριώτερου τρόπου δράσεως του V σε ωρισμένες συγκεντρώσεις. Η καταστροφική αυτή τάση θα έπρεπε να περιορίζεται κατά την διακίνηση του μετάλλου, ενώ, αντιθέτως, να φθάσει στο μέγιστο στο σημείο προορισμού - στον όγκο.



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.

I. ΑΙΤΙΟΛΟΓΗΣΗ.

Η από του στόματος χορήγηση βαναδίου ως αντικαρκινογόνου παράγοντος προσκρούει στις δυσκολίες απορρόφησης και ενέχει κίνδυνο τοξικότητας, εκδηλούμενο πρωτίστως με διάρροια, αφυδάτωση και γαστρεντερικές διαταραχές. Επιπλέον, η υπόθεση εργασίας συνίστατο στην άποψη ότι η δράση του βαναδίου πραγματοποιείται μέσω οξειδωτικού στρες, το οποίο δεν θα έπρεπε να γενικεύεται. Κατά συνέπεια, καταλήξαμε στις προσπάθειες σύνδεσης του βαναδίου με αντιοξειδωτικά οργανικά μόρια, τα οποία, καθ'όσον είναι συμπλοκοποιημένα με το ιχνοστοιχείο, προστατεύουν τον οργανισμό από τα ολέθρια επακόλουθα της αλληλομετατροπής $V(IV) \leftrightarrow V(V)$, παρεμποδίζουν την εξασθένηση των ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων, π.χ. της αναχθείσης γλουταθειόνης, και μειώνουν την γενική τοξικότητα του μετάλλου. Χρησιμότητα αυτής της προσέγγισης ανέκλυψεν επαρκώς στις μελέτες της ινσουλινομιμητικής δράσεως βαναδίου. Ως οργανικές συνιστώσες των συμπλόκων επελέγησαν η L-κυστεΐνη (Cys) και η 2-μερκαπτοπροπιονυλ-γλυκίνη (MPG) που συνδέθηκαν με $V(III)$, σε αντίθεση προς το θειικό βαναδύλιο (IV) (VSO_4), το οποίο εχρησίμευσε ως θεραπευτικός έλεγχος.

Η δοσολογία των συμπλόκων καθωρίσθη ως 0,5 mg V / kg / ημέρα, και έτσι ήταν σημαντικώς χαμηλότερη από αυτήν που χρησιμοποιήθηκε στους Djordjevic and Wampler, 1985.

Το πειραματικό μοντέλο καρκίνου απετέλεσε προκαλούμενο υπό του βενζο(α)πυρενίου λειομυοσάρκωμα. Ο όγκος ούτος είναι επιθετικός, φαρμακοανθεκτικός, ο δε μυϊκός ιστός ανταποκρινόμενος στην ινσουλίνη. Εξάλλου η υποδόρια εντόπιση επιτρέπει να εξακριβωθεί ευκολώτερον η στιγμή εμφάνισης του όγκου δια ψηλαφήσεως.

Οι ενώσεις βαναδίου που είχαν αποδειχθεί δραστικές, εδοκιμάσθησαν επί μιας σειράς κακοήθων κυττάρων (HeLa), προκειμένου να εξακριβωθεί εάν η παρατηρηθείσα στο συστηματικό επίπεδο διαφορά τους εξακολουθεί να υφίσταται σε συνθήκες απομονωμένου κυττάρου.

Η συμπληρωματική τοξικολογική μελέτη περιελάμβανε, εκτός από τον καθορισμό της LD_{50} , πείραμα χρόνιας τοξικότητας, εφ'όσον κατά την παρατεταμένη χορήγηση βαναδίου θα μπορούσαν να εκδηλωθούν συσσωρευτικά φαινόμενα.

Τα παρασκευασμένα σύμπλοκα υπέστησαν εξέταση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, προκειμένου να ταυτοποιηθεί η ενεργός μορφή και να υποστηριχθεί αν η συμπλοκοποίηση επιτυγχάνει τον σκοπό της.



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.

2.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΤΥΧΟΥΣ ΕΞ ΑΥΤΩΝ.

2.1.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ.

Πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο ανοργάνου χημείας Χημικού τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η σύνθεση των συμπλόκων έγινε σε αδρανή ατμόσφαιρα με χρήση της τεχνικής του Schlenk.

1. $[V^{III}(HCys)_3] \cdot 1/2MeOH$ (VCys) : Σε αναμειγνύμενο διάλυμα χλωριούχου V(III) (1 g, 6,35 mmol) σε μεθανόλη (40 ml) προσετέθη εφ'άπαξ στερεά κυστεΐνη $[H_2Cys]$ (2,31 g, 19,07 mmol). Παρελεύσει ~3 ωρών το πράσινο χρώμα του διαλύματος άλλαξε σε καφέ-πράσινο (olive-green), η κυστεΐνη διελύθη πλήρως και ελήφθη μαυρο-πράσινο (brown-green) καθίζημα. Τούτο διηθήθηκε, πλύθηκε με διαιθυλαιθέρα (2x10 ml) και αφυδατώθηκε σε κενό. Η περιεκτικότητα βαναδίου απετέλεσε το 11,89% του συμπλόκου.

2. $[V^{III}(HMPG)(H_2MPG)]$ (VMPG) : Ακολουθήθηκαν οι ίδιες διαδικασίες, εξηρημένων των εξής λεπτομερειών:

α) Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το νερό.

β) Ετέθησαν δύο ισότιμα (equivalents) της H_3MPG .

γ) Ο διαλύτης απεσύρθη με ξήρανση και το συμπαγές καθίζημα εκονιορτοποιήθη με νιτρομεθάνιο.

Η περιεκτικότητα βαναδίου απετέλεσε το 12,60% του συμπλόκου.

3. $[V^{IV}O(HCys)_2] \cdot 2CH_3OH$: Σε αναμειγνύμενο διάλυμα $[VOCl_2(thf)_2]$ (0,6 g, 2,13 mmol) σε μεθανόλη (~ 10 ml) προσετέθη εφ'άπαξ στερεά κυστεΐνη (0,516 g, 4,25 mmol). Παρελεύσει 3 ωρών και κατόπιν πλήρους διαλύσεως της κυστεΐνης το κυανούν χρώμα του διαλύματος μετεβλήθη ελαφρώς σε βαθύ κυανούν. Ηκολούθησε διήθηση, και πρόσθεση του διαιθυλαιθέρα (~ 20 ml) οδήγησε σε διαμόρφωση ωχροκυανού (pale blue) προϊόντος.

Η περιεκτικότητα βαναδίου απετέλεσε το 13,75% του συμπλόκου.

Το σύμπλοκο (3) υπετέθη πιθανό προϊόν οξειδωσης του (1) στο υδατικό διάλυμα και απετέλεσε βάση της συγκριτικής μελέτης της VCys.

2.1.2. ΦΥΣΙΚΟ-ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ VCys.

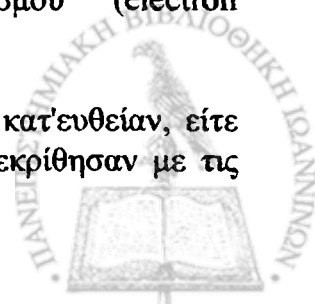
Περιελάμβανε:

1. Προσδιορισμό των ηλεκτρονικών φασμάτων ορατού υπεριώδους (UV-Vis electronic spectra).

2. Φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (electron paramagnetic resonance, EPR) συνεχούς κύματος.

3. Μελέτη της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Οι πρώτες δύο παράμετροι ελήφθησαν από διάλυμα VCys είτε κατ'ευθείαν, είτε κατόπιν έκθεσής του στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Εν συνεχεία δε συνεκρίθησαν με τις αντίστοιχες τιμές διαλύματος (3).



2.1.2.1. EPR - ΜΕΘΟΔΟΣ.

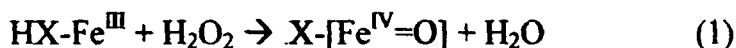
Βασίζεται στην εφαρμογή μαγνητικού πεδίου συνεχούς κύματος (cw-EPR) επί της υπό εξέταση ενώσεως και είναι αποτελεσματική σε περίπτωση εκδήλωσης εκ μέρους της ένωσης παραμαγνητικών ιδιοτήτων. Οι τροχιακοί τύποι του βαναδιού σε διαφορετικές οξειδωτικές βαθμίδες είναι οι εξής: V(V) - $3d^0$, V(IV) - $3d^1$, V(III) - $3d^2$. Ενώ το V(V) είναι διαμαγνητικό, οι άλλες δύο μορφές εμφανίζουν παραμαγνητισμό με σαφώς διακεκριμένες μαγνητικές ροπές. Σημειωτέον ότι λεπτομερώς με EPR-φάσματα μπορεί να ερευνηθεί μόνο το V(IV) που έχει ένα ασύζευκτο d-ηλεκτρόνιο στην $3d$ τροχιά.

Οι θεμελιώδεις παράμετροι που υπολογίζονται από τα EPR-φάσματα είναι οι τρεις βασικές τιμές του τελεστή g (g_x , g_y , g_z), οι οποίες εκφράζουν την αλληλεπίδραση του πυρήνος ^{51}V με το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο, και οι τιμές του τελεστή A (A_x , A_y , A_z) για την αλληλεπίδραση του ασύζευκτου d-ηλεκτρονίου του V(IV) με τον πυρήνα ^{51}V . Τυπικώς, οι ενώσεις του οξοβαναδιού (IV) έχουν έναν ισχυρό άξονα συμμετρίας, όστις ορίζεται από τον δεσμό $\text{V}=\text{O}$, οπότε το $g = (g_{\perp}, g_{\perp}, g_{\parallel})$ και το $A = (A_{\perp}, A_{\perp}, A_{\parallel})$. Από τις τιμές A_z και g_z είναι δυνατόν να προκύψουν μερικά υποθετικά συμπεράσματα περί του περιβάλλοντος ένταξης του $\text{V}=\text{O}$ στο ισημερινό ως προς τον άξονα συμμετρίας πεδίο.

Τα cw-EPR φάσματα εμετρήθησαν στο H_2O με Bruker ER 200D X-band (9,41 GHz) φασματομέτρο.

2.1.2.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΟΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ.

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (total antioxidant status) των συμπλόκων βαναδιού εμετρήθη κατά τη μέθοδο της εταιρείας Randox. Αυτή βασίζεται στην αντίδραση του 2,2-azinodi-[3-ethylbenzothiazoline sulfonate] (ABTS) με υπεροξειδίο υδρογόνου με παραγωγή ελευθέρων ριζών, η οποία καταλύεται υπό μιας περοξειδάσης, μετμυοσφαιρίνης (metmyoglobin, HX- Fe^{III}) συμφώνως προς τα κάτωθι:



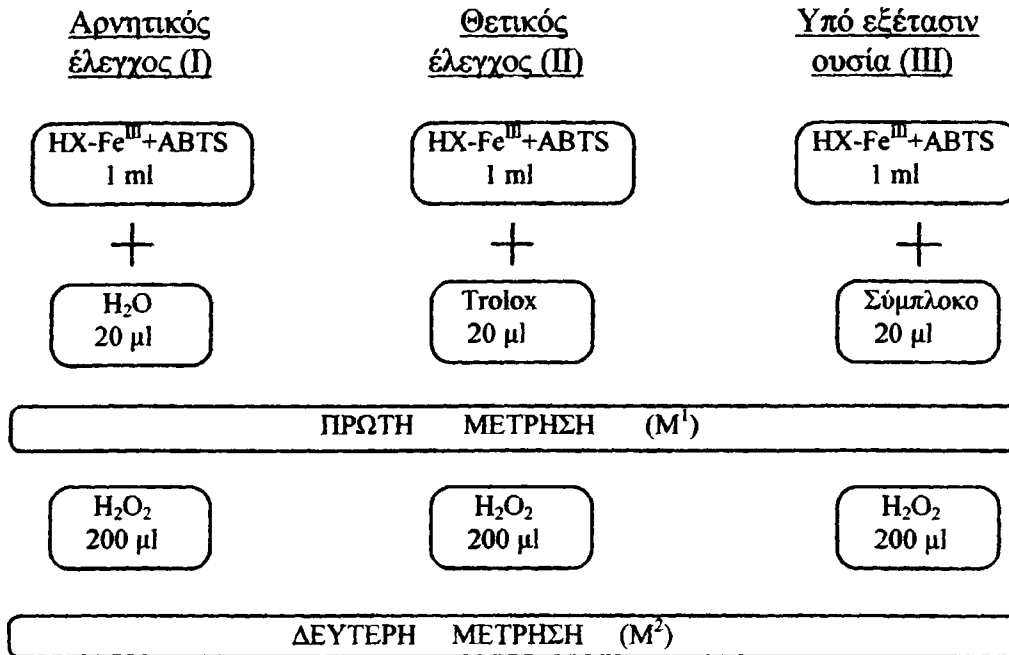
Η ABTS-ρίζα έχει σχετικά σταθερό πράσινο-κυανούν χρώμα, το οποίο μετράται υπό 600 nm στο φασματοφωτόμετρο. Προστιθεμένων διαφόρων αντιοξειδωτικών η αντίδραση αναστέλλεται σε βαθμό ανάλογο προς την συγκέντρωσή των.

Τον αρνητικό έλεγχο αποτελούσαν τιμές της ως άνω αντίδρασης άνευ επιπροσθέτων στοιχείων. Ως θετικός έλεγχος ετίθετο το Trolox, μια πρότυπος αντιοξειδωτική ουσία. Έτσι η πειραματική διάταξη παρίσταται με τον ακόλουθο τρόπο:

Δεδομένης της υπόθεσης ότι η αναστολή της ρίζας (δηλαδή η διαφορά μεταξύ του ΔM απουσία οιοδήποτε αντιοξειδωτικού και του ΔM τθέντος ενός αντιοξειδωτικού A, ήτοι $\Delta M_i - \Delta M_A$) συσχετίζεται γραμμικώς με την συγκέντρωση A, καθίσταται εφικτόν να εκφρασθεί, βοήθεια απλών αναλογιών, η αντιοξειδωτική ικανότητα (F) της υπό εξέταση ένωσης (III) ως συγκέντρωση του Trolox που αντιστοιχεί σε 1 mmol της (III), βλ. στην επόμενη σελίδα.



Σχήμα 10. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο Randox C^o.



Η έκφραση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ml του Trolox πραγματοποιείται συμφώνως προς τον ακολουθούντα τύπο:

$$F(\text{mmol / l}) = \frac{C_{II} \times C_0 \times \Delta M_I - \Delta M_{III}}{C_{III} \times \Delta M_I - \Delta M_{II}}$$

όπου: $\Delta M_I - M^2_I - M^1_I$.

$\Delta M_{II} - M^2_{II} - M^1_{II}$.

$\Delta M_{III} - M^2_{III} - M^1_{III}$.

C_0 - συγκέντρωση της υπό εξέτασιν ουσίας, κατά συνθήκην ίση 1 mmol / l.

C_{II} - συγκέντρωση του Trolox στην παραλλαγή (II).

C_{III} - συγκέντρωση της υπό εξέτασιν ουσίας στην παραλλαγή (III).

Η τεθειμένη στον ως άνω τύπο τιμή M_2 αντιστοιχεί στην χρονική στιγμή 3 λεπτών από την πρόσθεση του υποστρώματος (H₂O₂). Κατ'ουσίαν όμως, η συγκέντρωση της ABTS-ρίζας καταγράφεται συνεχώς, οπότε καθίσταται δυνατόν να συμπεριληφθούν στην ανάλυση και τα χρονικά διαστήματα πλήρους αναστολής σχηματισμού της ρίζας (lag-period), τα οποία έχουν επίσης εξαιρετική σημασία.

Η γραμμική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης και της αναστολής της ρίζας, και, κατ'επέκτασιν, ο προαναφερόμενος τύπος, προεικάσαμε να ισχύουν στο διάστημα συγκεντρώσεων 1 - 2 mmol / l (στο πείραμά μας $C_{II} = 1,6$ mmol / l, $C_{III} = 1,5$ mmol / l).

2.2. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ.

Οι προκληθέντες όγκοι, καθώς και μερικά όργανα (πνεύμονες, ήπαρ, νεφροί, στόμαχος, έντερα, σπλήν) υπεβλήθησαν σε ιστολογική εξέταση για να προσδιορισθούν:

- ο ιστολογικός τύπος των όγκων,
- ο ιστολογικός βαθμός κακοήθειας,
- παρουσία μεταστάσεων.
- ιστικές βλάβες στα ζώα των τοξικολογικών πειραμάτων.



Επί τούτω όλα τα υλικά εμονιμοποιήθησαν τουλάχιστον 48 ώρες σε 10% διάλυμα φορμόλης, αφυδατώθησαν και ενεκλείσθησαν σε κύβους παραφίνης. Έπειτα ελήφθησαν τομές πάχους 5 μm, οι οποίες εχρωματίσθησαν με αιματοξυλίνη-ηωσίνη.

2.3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ.

2.3.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.

2.3.1.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ.

Α. Πειραματόζωα - θήλειες επίμυες Wistar με κανονικό διαιτολόγιο.

Β. Καρκινογένεση - επραγματοποιείται παρελεύσει 5 μηνών από την γέννηση με υποδόρια έγχυση βενζο(α)πυρενίου (10,08 mg / ζώο), διαλυμένου σε 1 ml τρικαπρυλίνης, στην περιοχή της δεξιάς ωμοπλάτης (ραχιαίως).

Γ. Παρακολούθηση των πειραματοζώων - αφορούσε στην ημερήσια κατανάλωση τροφής και ύδατος, βάρος και εξωτερική όψη. Επίσης μέσω ψηλάφησης εταυτοποιείται η χρονική στιγμή εμφάνισης νεοπλασίας (παρουσία συμπαγούς υποδορίου ογκιδίου στην θέση της έγχυσης). Μετά τον θάνατο οι επίμυες υπεβλήθησαν σε νεκροψία και νεκροτομή, συνετηρήθησαν δε ο όγκος μαζί με τα προαναφερθέντα (βλ. στο 2.2.) όργανα προκειμένης της ιστοπαθολογικής εξέτασης.

Δ. Δοσολογία και χορήγηση διαλυμάτων - παρεσκευάζοντο καθ'ημέραν και εχορηγούνται σε πόσιμον ύδωρ σε δόσεις 0,5 mg V / kg / ημέρα. Σε περίπτωση που εδίδετο μόνον η οργανική συνιστώσα (όπως η κυστεΐνη στο 2.3.1.3), η ποσότητά της ήταν ισομοριακή προς εκείνη που περιελάμβανε το αντίστοιχο σύμπλοκο. Τιοιουτρόπως, η δοσολογία των ενώσεων απετέλεσε:

VMPG - 3,97 mg / kg / day.

VCys - 4,21 mg / kg / day.

VSIf - 2,48 mg / kg / day.

Cys - 3,71 mg / kg / day.

2.3.1.2. ΠΕΙΡΑΜΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ.

Η διαίρεση σε ομάδες έγινε ως εξής:

1. Ομάδα ελέγχου [B(a)P], n=16 (16 πειραματόζωα) - υπέστησαν καρκινογένεση χωρίς επιπρόσθετη αγωγή.

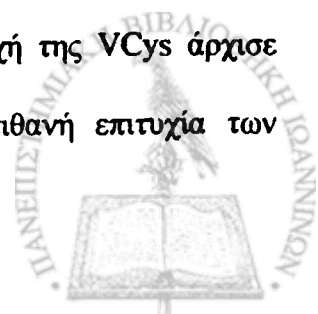
2. Ομάδα πρόληψης με VMPG [VMPG+B(a)P], n=16 - η χορήγηση της VMPG άρχισε 15 ημέρες προ της καρκινογένεσης με βενζοπυρένιο και διήρκεσε έως τον θάνατο των πειραματοζώων.

3. Ομάδα θεραπείας με VMPG [B(a)P+VMPG], n=17 - η χορήγηση της VMPG ξεκίνησε 3 μήνες μετά από την έγχυση βενζοπυρενίου, όταν ο κακοήθης φαινότυπος είχε εκδηλωθεί και ο όγκος μπορούσε να ψηλαφηθεί. Διήρκεσε έως τον θάνατο.

4. Ομάδα πρόληψης με VCys [VCys+B(a)P], n=15 - η χορήγηση της VCys άρχισε όπως στο (2) και διήρκεσε έως τον θάνατο.

5. Ομάδα θεραπείας με VCys [B(a)P+VCys], n=17 - η παροχή της VCys άρχισε όπως στο (3) και ακολουθήθηκε μέχρι θανάτου των πειραματοζώων.

Δια να εκτιμηθεί η πρόοδος της νόσου, καθώς και η πιθανή επιτυχία των θεραπευτικών σχημάτων, επελέγησαν οι εξής παράμετροι:



1) Ποσοστό εμφάνισης θανατηφόρου καρκίνου (αριθμός πειραματοζώων που εμφάνισαν όγκο και απεβίωσαν εξ'αιτίας τούτου, διηρημένος δια συνολικού αριθμού πειραματοζώων στην ομάδα, επί τοις εκατόν): $[n \text{ (με όγκο)} / N] \times 100\%$.

2) Χρονικό διάστημα επιβίωσης από την ημέρα έγχυσης καρκινογόνου μέχρι την ημέρα θανάτου.

3) Βάρος του όγκου ως ποσοστό του συνολικού βάρους την ημέρα του θανάτου. Από πλέον σύνθετες παραμέτρους ελήφθη υπόψιν:

4) Ρυθμός θανάτου, ο οποίος αποτελεί συνάρτηση του ποσοστού ζώντων στην ομάδα πειραματοζώων από τον χρόνο: $[n \text{ (ζώντων)} / N] \times 100\% = f(t)$.

Πρέπει να παρατηρήσωμεν ότι οι τιμές του διαστήματος επιβίωσης δεν υπέκειντο στην ομαλή κατανομή και ως εκ τούτου η ευθεία εφαρμογή της t-δοκιμασίας ήταν αδύνατη. Προς αποφυγήν αυτής της δυσκολίας ακολουθήθηκε η εξής στρατηγική: α) εφηρημόσθη το μη παραμετρικό κριτήριο του van der Varden και β) ο ρυθμός θανάτου, εκτός από την παραστατική χρησιμότητα, επέτρεπε να συγκριθούν με την t-δοκιμασία τα ποσοστά ζώντων πειραματοζώων σε διαφορετικές ομάδες ανά χρονικές στιγμές, εφόσον το τελευταίο αυτό μέγεθος κατανέμεται ομαλώς. Ληφθέντων ομού των ως άνω ελέγχων επετύχαμε, κατά τη γνώμη μας, μίαν αντικειμενικήν εκτίμηση.

2.3.1.3. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ VCys.

Για να συγκριθεί η δραστηριότητα της VCys με αυτήν των μεμονωμένων συνιστωσών, επεχειρήθη αναλυτικό πείραμα, όπου ετέθησαν οι εξής ομάδες:

1. Ομάδα ελέγχου $[B(a)P]$, $n=19$ - καρκινογένεση άνευ θεραπείας.

2. Θεραπεία με Cys $[B(a)P+Cys]$, $n=21$ - χορήγηση κυστεΐνης, αρχίζοντας από τη στιγμή εμφάνισης όγκου (80 - 100 ημέρες μετά από την καρκινογένεση) έως της ημέρας θανάτου.

3. Θεραπεία με VSIf $[B(a)P+VSIf]$, $n=20$ - χορήγηση VSIf όπως στο (2).

4. Θεραπεία με VCys $[B(a)P+VCys]$, $n=21$ - χορήγηση VCys όπως στο (2) και (3).

Προκειμένου να εκτιμηθεί διεξοδικότερα το θεραπευτικό αποτέλεσμα, καθώς και ωρισμένες θεωρητικές υποθέσεις, εκτός από τις παραμέτρους του (2.2.1.2.) εισήχθησαν:

5) Μέση ταχύτητα ποσοστιαίας αύξησης όγκου (% / ημέρα), η οποία υπελογίζετο ως βάρος του όγκου σε ποσοστό του βάρους σώματος διηρημένο δια του διαστήματος επιβίωσης. Καθώς μας ενδιέφερε το συνολικό θεραπευτικό αποτέλεσμα, δεν λάβαμε υπόψιν το αναμφισβήτητο γεγονός ότι η ταχύτητα αύξησης όγκου δεν είναι σταθερή καθ'όλη την διάρκεια της νόσου.

6) Αντικαρκινογόνος ισχύς της ένωσης, προς καθορισμόν της οποίας πρέπει να προσδιορισθεί ένα ενδιάμεσο μέγεθος, η καρκινογόνος ισχύς του B(a)P στην εκάστοτε ομάδα, σύμφωνα με τον τύπο: $KI[B(a)P] = \text{ποσοστό εμφάνισης θανατηφόρου καρκίνου}(\%) / \text{διάστημα επιβίωσης των αποθανόντων από τον καρκίνο (ημέρες)}$. Αντικαρκινογόνος ισχύς (AI) λοιπόν μιας ένωσης i σε αφηρημένες μονάδες ίσον: $AI_i = \{KI[B(a)P]_{\text{ομάδος ελέγχου}} - KI[B(a)P]_{\text{ομάδος με i}}\} \times 100$.

7) Αποτελέσματα ιστολογικής εξέτασης:

7.1) Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας.

7.2) Παρουσία μεταστάσεων.



2.3.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΟΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΒΑΝΑΔΙΟΥ ΙΝ VITRO.

Έγινε επί HeLa - μιάς σειράς καταγομένων εξ επιθηλίου τραχήλου μήτρας κακοήθων κυττάρων. Εφηρμόσθη η κλασική μέθοδος αποκλεισμού δια χρώσεως (dye exclusion method) με την χρωστική Trypan blue.

Τα κύτταρα

- Ανετράφησαν σε DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) με προσθήκη 10% FCS (fetal calf serum).
- Εσπάρησαν σε τριβλία διαμέτρου 53 mm, 250 χιλ. ανά έν, σε 5 ml θρεπτικού υλικού.
- Μετά από 24 ώρες, καθώς είχε συντελεσθεί η προσκόλληση των HeLa στο ταπήτιο του τριβλίου, προσετέθησαν 100 μl διαλύματος βαναδίου σε PBS (phosphate buffer saline) είτε ως βαναδοκυστεΐνη (VC), είτε ως θειϊκό βαναδύλιο (VS), με διάφορες τελικές συγκεντρώσεις (από 0 έως 1 mM).
- Παρελεύσει άλλων 24 ωρών το παλαιό διάλυμα απεσύρθη, τα δε κύτταρα πλύθηκαν με PBS, θρυψινοποιήθηκαν και διαχωρίστηκαν από το διάλυμα με φυγοκέντρηση (2000 g, 3 min).
- Προσετέθη μίγμα 1 ml του Trypan blue με PBS (1: 1).
- Σε 5 λεπτά τα κύτταρα υπεβλήθησαν σε κυτταρομετρία.

Καθώς το εν λόγω πείραμα ήτο αρκούντως διαρκές, τα αποθανόντα κύτταρα ως επί το πλείστον διελύοντο προτού συμβεί κυτταρομετρία (ιδίως τούτο έγινε σαφές με υψηλές συγκεντρώσεις βαναδίου, όπου τα ανευρεθέντα κύτταρα - νεκρά και ζωντανά - ήσαν ελάχιστα). Ούτως, ο αριθμός νεκρών κυττάρων παρουσίαζε ελάχιστη μεταβλητότητα καθ'όλη την κλίμακα συγκεντρώσεων και αντιστοιχούσε μάλλον στην χρονική απόσταση της πλειοψηφίας των θανατηφόρων συμβάντων από την στιγμή κυτταρομετρίας. Αντιθέτως, ο αριθμός των επιβιωσάντων HeLa παρουσίαζε καλώς ερμηνευόμενη κάμψη παραλλήλως προς την αύξηση συγκεντρώσεων βαναδίου, εθεωρήθη δε ως εκ τούτου δεικτικός της κυτταροτοξικότητας.

Οι κατ'αρχάς ληφθείσες τιμές αντιστοιχούσαν σε αριθμούς ανευρεθέντων στο κυτταρομετρικό πεδίο κυττάρων (επί της πλάκας του Bauer). Με αυτή την μορφή τα αποτελέσματα έχουν καταχωρηθεί στο αντίστοιχο παράρτημα, καθώς και εκτεθεί στο αντίστοιχο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων (βλ. σελ. 114). Το πέρασμα από την πρωταρχική αυτή τιμή προς την αναφερόμενη στον αριθμό κυττάρων ανά τριβλίο συντελείται ως εξής:

$$B = 10000 \cdot V \cdot A,$$

όπου B - αριθμός κυττάρων ανά τριβλίο,

A - αριθμός κυττάρων ανά κυτταρομετρικό πεδίο,

V - τελικός όγκος εναιωρήματος (ml), κατά σύμπτωση ίσος προς 1 ml.

Όποτε ο ανωτέρω τύπος απλοποιείται προς τον κάτωθι:

$$B = 10000 \cdot A$$

Όλες οι δοκιμασίες έγιναν τουλάχιστον επί 4 τριβλίων εκάστη, ωρισμένες από αυτές επανελήφθησαν, όπου τούτο εκρίθη αναγκαίον λόγω μεγάλης τυπικής απόκλισης.



2.3.3. ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΟΣ.

2.3.3.1. ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ LD₅₀ ΤΗΣ VCys.

Στο προσεγγιστικό πείραμα οξείας τοξικότητας οι συναρτώμενες προς τη δοσολογία αναλογίες αποβιωσάντων πειραματοζώων ήσαν:

250 mg/kg - 0/3, 350 mg/kg - 1/3, 450 mg/kg - 3/3.

Εξ ου δικαιολογούνται οι εφαρμοσθείσες στο κυρίως πείραμα δόσεις.

Έκαστος άρρην Wistar επίμυς (3 - 4 μηνών, 170 - 225 g σωματικού βάρους), όστις εχρησιμοποιήθη στο πείραμα, υπέστη ενδοπεριτοναϊκή ένεση 1 ml δισαπεσταγμένου ύδατος που περιείχε την VCys σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η διαίρεση σε ομάδες έγινε ως εξής:

	αριθμός δείγματος	δόση VCys (mg/kg)
1 ομάδα -	10	280
2 ομάδα -	10	320
3 ομάδα -	10	360
4 ομάδα -	10	400

Τα υπό εξέταση πειραματόζωα παρηκολουθήθησαν επί 14 ημέρες, κατεγράφησαν οι ώρες θανάτου και τα παθολογικά συμπτώματα. Μετά την λήξη του ως άνω χρονικού διαστήματος οι επίμυς εφονεύθησαν και εγένοντο ιστοπαθολογικές εξετάσεις ήπατος, σπλήνος, νεφρών και πνευμόνων.

Η τιμή της LD₅₀ και το διάστημα εμπιστοσύνης αυτής καθωρίσθη κατά την μέθοδο Spearman-Kerber.

Ας σημειωθεί ότι δεν κρίθηκε απαραίτητο να τεθεί στο κυρίως πείραμα μια ομάδα ελέγχου που θα ενίετο μόνο με τον διαλύτη, εφ'όσον στην προσεγγιστική δοκιμασία τα τρία υφιστάμενα τοιαύτη διαδικασία ζώα ουδεμία διαταραχή εξεδήλωσαν.

2.3.3.2. ΜΕΛΕΤΗ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΟΣ.

Άρρενες Wistar επίμυες 1,5 μηνός, σωματικού βάρους 53 - 73 g, αριθμώ 27, απετέλεσαν τρεις ομάδες, στις οποίες εχορηγείτο είτε πόσιμον ύδωρ, είτε το VSIf σε πόσιμον ύδωρ, είτε η VCys σε πόσιμον ύδωρ ως ακολούθως:

	Ένωσις	Αριθμός δείγματος	Δόσις V, mg/kg/day
1 ομάδα	έλεγχος	9	-
2 ομάδα	VSIf	9	16,8
3 ομάδα	VCys	9	16,8

Τα πειραματόζωα παρατηρούντο κατά την διάρκεια 9 εβδομάδων από την έναρξη της αγωγής ως προς τη λήψη τροφής και ύδατος, το βάρος των και την τυχόν εκδήλωση παθολογικών συμπτωμάτων. Παρελεύσει του χρόνου τούτου εφονεύθησαν δια θωρακοτομής και αφαιμάξης εκ της καρδιάς. Το αίμα εστάλη για τις τυπικές στην προκειμένη περίπτωση αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις. Ως ανεξάρτητο κριτήριο τοξικής βλάβης χρησιμοποιήθηκε η ιστολογική εικόνα των νεφρών, του ήπατος, του σπλήνος και των πνευμόνων.

Η κατανάλωση όμως του ύδατος υφίστατο τυχαίες διακυμάνσεις και επιπλέον παρουσιαζόταν συστηματική διαφορά μεταξύ των ομάδων, ακριβέστερον η κατανάλωση της ομάδος ελέγχου ήταν περισσότερη αυτής της ομάδος με VCys και η τελευταία -

περισσότερη από αυτήν της ομάδος με VSif. Για να ισορροπώνται οι ημερήσιες δόσεις, οι συγκεντρώσεις των παρασκευαζόμενων διαλυμάτων υφίσταντο διόρθωση καθ'εκάστην, λαμβανομένου υπόψιν του μέσου όρου του καταναλισκόμενου ύδατος από την αρχή του πειράματος μέχρι της εν λόγω ημέρας, ούτως ώστε η χορηγούμενη συγκέντρωση να παραμένει πάντοτε γύρω στα 16,8 mg V / kg / ημέρα. Έτσι, στο τέλος του πειράματος διεπιστώθησαν οι μέσες καταναλισκόμενες ανά ημέρα δόσεις βαναδίου και απετέλεσαν (mg / kg):

$$\begin{array}{ccc} \frac{\text{VCys}}{16,82 \pm 0,66} & \frac{\text{VSif}}{16,81 \pm 0,57} & p > 0,98. \end{array}$$



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

3.1. ΠΕΙΡΑΜΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ.

Η καρκινογένεση με υποδόρια έγχυση βενζοπυρενίου από την μακρόχρονο πείρα του Εργαστηρίου συνεπάγεται εμφάνιση όγκου σε >98% της ομάδος ελέγχου. Πάντες προκύψαντες στα πειράματα αναστολής καρκίνου νεοπλασίες ανήκαν στον τύπο του λειομυοσαρκώματος.

Στην ομάδα θεραπείας με VCys [B(a)P+VCys] τρία πειραματόζωα εξεδήλωσαν ψηλαφητά μορφώματα, ταυτόσημα με εκείνα στις άλλες ομάδες, μετά την έναρξη όμως της θεραπείας τούτα, αντί να αναπτυχθούν περαιτέρω, παρέμεινον επί ένα διάστημα σταθερά και έπειτα διελύθησαν βαθμηδόν. Τα εν λόγω πειραματόζωα έφθασαν μέχρι βαθέος γήρατος χωρίς καμμίαν εμφανή διαταραχή και έχουν θεωρηθεί ίσες. Ούτως, τα ποσοστά εμφάνισης θανατηφόρου καρκίνου απετέλεσαν:

1) Ποσοστά εμφάνισης θανατηφόρου καρκίνου καθ'εκάστην ομάδα.

<u>Ομάδα</u>	<u>%</u>
B(a)P	100,0
VMPG+B(a)P	100,0
B(a)P+VMPG	100,0
VCys+B(a)P	100,0
B(a)P+VCys	82,4

Οι πρώτοι θάνατοι επήρχοντο κατά τις 113-152 ημέρες μετά από την ένεση καρκινογόνου.

2) Μέσοι όροι του διαστήματος επιβίωσης

αναφέρονται στην παρακάτω σελίδα. Έλεγχος της Ho - υποθέσεως με το κριτήριο του van der Varden (3η στήλη) ανέδειξε την υψηλή πιθανότητα να διακρίνεται η ομάδα θεραπείας με VCys από την ομάδα ελέγχου ($p < 0,01$), καθώς και από τις άλλες ομάδες ($p < 0,05$).

<u>Ομάδα</u>	<u>Ημέρες</u>	<u>Διαφορά με την ομάδα ελέγχου</u>
B(a)P	171,8	
VMPG+B(a)P	188,1	p=0,06
B(a)P+VMPG	195,5	p=0,07
VCys+B(a)P	180,7	
B(a)P+VCys	335,5	p<0,01.

Όσον αφορά στο ποσοστιαίο βάρος του όγκου την ημέρα θανάτου των πειραματοζώων, οι μέσοι όροι, όπως διαφαίνεται εκ του κάτωθι πίνακος, δεν διεκρίνοντο στατιστικώς:

3) Βάρος του όγκου ως ποσοστό του συνολικού βάρους

<u>Ομάδα</u>	<u>Μέσος όρος</u>	<u>Τυπική απόκλιση</u>	<u>Διάστημα εμπιστοσύνης</u>
B(a)P	47,6	5,48	2,69
VMPG+B(a)P	48,5	11,89	6,46
B(a)P+VMPG	46,9	9,92	5,20
VCys+B(a)P	48,0	7,56	5,24
B(a)P+VCys	45,6	10,61	7,86



Ας σημειωθεί ότι, απουσία σημαντικής μεταβολής των μέσων όρων, τα θεραπευτικά σχήματα επηρέασαν την τυπική απόκλιση του δείγματος, πράγμα, όπως θα δούμε αργότερα, επαναλήψιμο.

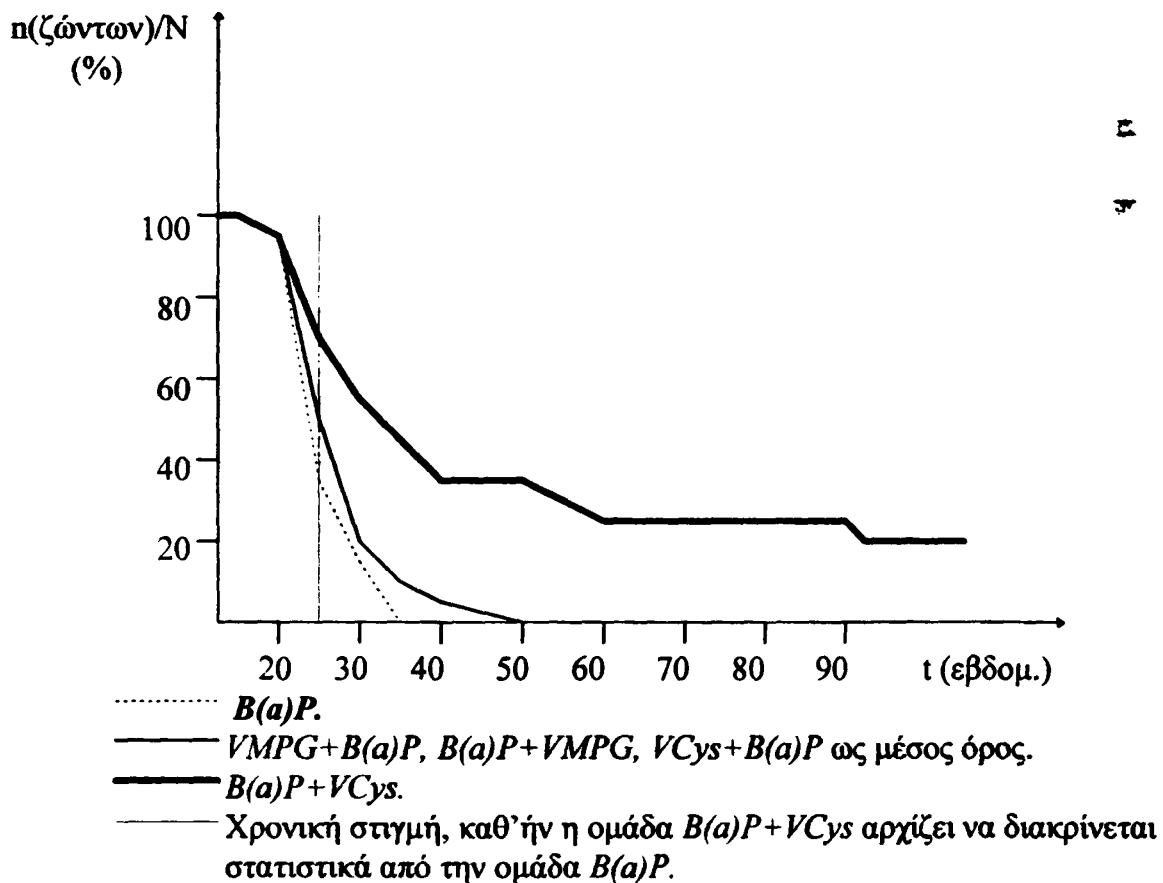
Τα αφορώντα στην επιβίωση και το ποσοστιαίο βάρος όγκου αναλυτικά δεδομένα εκτίθενται στον πίνακα 1 των παραρτημάτων.

4) Ρυθμός θανάτου ως ποσοστό ζώντων πειραματοζώων σε συνάρτηση με τον χρόνο.

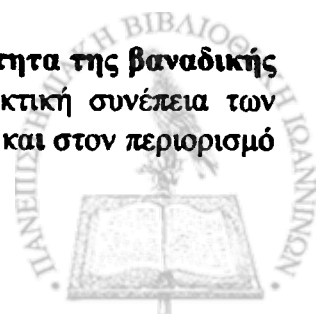
Όπως φαίνεται από το κατωτέρω σχήμα, παράταση επιβίωσης στην ομάδα θεραπείας με VCys υπήρξεν εμφανέστατη. Αρχίζοντας από την 24ην εβδομάδα και ύστερον η διαφορά μεταξύ των ομάδων $B(a)P+VCys$ και $B(a)P$ ήτο στατιστικώς σημαντική ($p < 0,05$, t-δοκιμασία). Η χρονική αυτή στιγμή επισημαίνεται με μια κάθετο γραμμή στο σχήμα.

Η καμπύλη επιβίωσης έχει τυπική σιγμοειδή μορφή με δύο επίπεδες περιοχές στην αρχή και στο τέλος της. Ραγδαίες μεταβολές επισυμβαίνουν στο διάστημα 30-90% του κάθετου άξονος και η ενδεχόμενη θεραπευτική δράση δύναται να εντοπισθεί εδώ αποτελεσματικώς, ενώ η σύγκριση αμφοτέρων των περιοχών 'πλατώ' απαιτεί πολλαπλάσιο αριθμό πειραματοζώων.

Σχήμα 11. Ρυθμός θανάτου ως ποσοστό ζώντων σε συνάρτηση προς τον χρόνο.



Από τα ως άνω καθίσταται φανερή η θεραπευτική δραστηριότητα της βαναδικής κυστεΐνης σε δόση 0,5 mg (V) / kg / ημέρα. Η δε άμεση πρακτική συνέπεια των αποτελεσμάτων συνίστατο στην επικέντρωση του πλαισίου εργασίας και στον περιορισμό της περαιτέρω πειραματικής βασάνου στην VCys.



3.2. ΦΥΣΙΚΟ-ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ VCys.

1) Φάσματα του ορατού υπεριώδους [λ_{\max} , nm(ϵ , $M^{-1}cm^{-1}$)].

<u>$[V^{III}(HCys)_3] \cdot 1/2MeOH$ (1)</u>		<u>$[V^{IV}O(HCys)_2] \cdot 2CH_3OH$ (3)</u>	
<u>Νερό</u>	<u>Μεθανόλη</u>	<u>Νερό</u>	<u>Μεθανόλη</u>
430(108)	383(1600)	758(19)	781(18)
239(1700)	253(2500)	629sh(11)	592(10)
195(6500)	200(5900)	195(4600)	203(3700)

Όταν διάλυμα μεθανόλης του συμπλόκου (1) εκτίθεται επί ~32 ώρες σε αέρα, τα ηλεκτρονικά του φάσματα γίνονται ταυτόσημα με εκείνα του συμπλόκου (3).

2) Φάσματα ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού συνεχούς κύματος (cwEPR-spectra).

Τα σύμπλοκα (1) και (2) είχαν μαγνητική ροπή 2,70 και 2,75 μ_B αντιστοίχως, πράγμα χαρακτηριστικό για το $3d^2$ σύστημα του V, ενώ η μαγνητική ροπή του συμπλόκου (3) απετέλεσε 1,68 μ_B εν συμφωνία με το spin του μοναδικού ηλεκτρονίου της 3d τροχιάς. Υδατικό διάλυμα του (1) εξετέθη σε ατμοσφαιρικό οξυγόνο επί 30' και τα cwEPR-φάσματα του (1) και του (3) συνέστησαν:

<u>$[V^{III}(HCys)_3] \cdot 1/2MeOH$</u> <u>30' σε O₂ του αέρος</u>		<u>$[V^{IV}O(HCys)_2] \cdot 2CH_3OH$</u>	
<u>A(cm⁻¹x10⁴)</u>	<u>g(x,y,z)</u>	<u>A(cm⁻¹x10⁴)</u>	<u>g(x,y,z)</u>
A _x = 64	g _x = 1,983	A _x = 58	g _x = 1,970
A _y = 66	g _y = 1,983	A _y = 63	g _y = 1,980
A _z = 171	g _z = 1,945	A _z = 167	g _z = 1,947

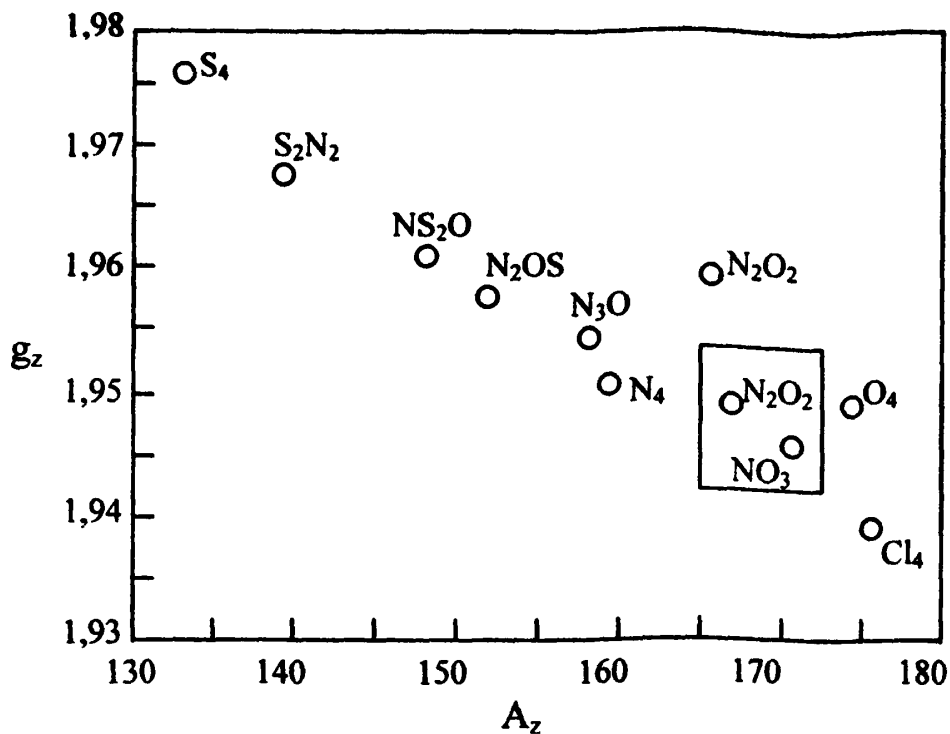
Ευκόλως δυνάμεθα να αντιληφθούμε την ομοιότητα των φασμάτων για (1) και (3), πράγμα που παρέχει ισχυρή ένδειξη ότι η μορφή (1) - $V^{III}Cys_3$ - τείνει υπό την επίδραση της αέριας οξείδωσης προς την (3) - $V^{IV}Cys_2$ - και ευρίσκεται εν συμφωνία με τα αποτελέσματα της εξέτασης των φασμάτων ορατού υπεριώδους.

Επειτα, οι τιμές A_z και g_z αποκαλύπτουν μιαν εμπειρική εξάρτησιν από το περιβάλλον ένταξης του V(IV). Κατά συνέπειαν, μπορούμε να συμπεράνομε αντιστρόφως, από τις πρώτες προς το τελευταίο. Στον κάτωθι πίνακα συσχέτισης A_z-g_z τίθενται τα χαρακτηριστικά για το εκάστοτε περιβάλλον ένταξης σημεία (Tasiopoulos et al., 1998).

Οι τιμές A_z και g_z των (1) και (3) εμπίπτουν στο μικρό τετράγωνο του σχήματος. Τοιουτοτρόπως, στις παραπάνω ενώσεις το περιβάλλον ένταξης του V=O στο ισημερινό πεδίο, μετά την οξείδωση, πιθανώς είναι είτε N₂O₂, είτε NO₃. Το σύμπλοκο (1) συμπίπτει περισσότερο με το NO₃, ένω το (3) - με το N₂O₂.



Σχήμα 12. Το περιβάλλον ένταξης επί τον πίνακα συσχέτισης A_z - g_z (Tasiopoulos et al., 1998).



3) Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των ενώσεων βαναδίου.

Πίναξ 6. Αναλυτικά αποτελέσματα της μελέτης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των ενώσεων βαναδίου.

Ενώσις.	M_1 (απουσία του υποστρώματος)	M_2 (3 λεπτά από την πρόσθεση του υποστρώματος)	Περίοδος πλήρους αναστολής της ρίζας (δευτερόλεπτα)
-(1)	0,089	0,430	0,0
Trolox(1).	0,093	0,251	101,5
Cys (διάλυμα ηλικίας 4-5 ωρών).	0,087	0,445	0,0
VSif.	0,086	0,329	7,2
VCys (διάλυμα ηλικίας 4-5 ωρών).	0,086	0,311	55,2
-(2)	0,081	0,426	0,0
Trolox(2).	0,084	0,257	103,2
Cys (φρέσκο διάλυμα).	0,082	0,358	36,0
VCys (φρέσκο διάλυμα).	0,081	0,303	38,4
VMPG (φρέσκο διάλυμα).	0,080	0,293	7,2

(-) - λευκό δείγμα, αντίδραση χωρίς αντιοξειδωτικό.

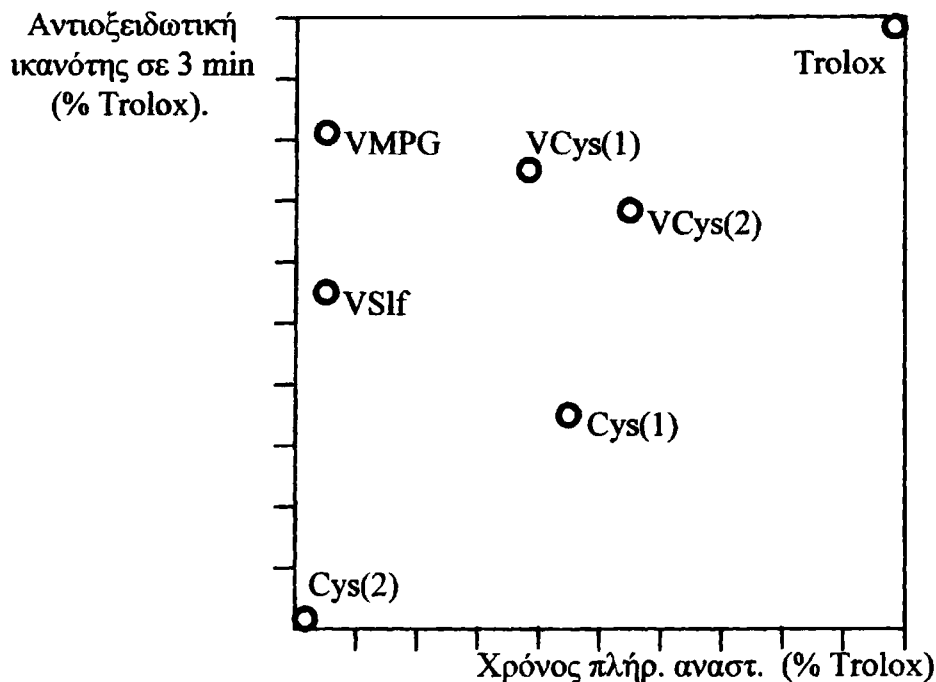


Μετά την εφαρμογή του αναφερθέντος στο αντίστοιχο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων τύπου, εκφράζοντας επίσης την περίοδο πλήρους αναστολής σε % προς το Trolox, τα αποτελέσματα παίρνουν τις εξής τιμές:

<u>Ένωση.</u>	<u>F (μετά από 3 λεπτά).</u>	<u>Περίοδος πλήρους αναστολής (% του Trolox).</u>
Cys (φρέσκο διάλυμα)	0,43	35,3
Cys (μετά από 4-5 ώρες)	-0,10	0,0
VSif	0,57	7,1
VCys (φρέσκο διάλυμα)	0,76	37,7
VCys (μετά από 4-5 ώρες)	0,68	54,1
VMPG (φρέσκο διάλυμα)	0,82	7,1

και μπορούν να αναπαρασταθούν γραφικώς ως προς τις δύο αυτές συντεταγμένες:

Σχήμα 13. Αναστολή της ABTS-ρίζας επί τοις 100% του Trolox.



(1) - φρέσκο διάλυμα, (2) - παρελεύσει 4-5 ωρών.

(οικογένεια ισοδραστικών καμπυλών μπορεί να θεωρηθεί $y = -x + \text{const.}$).

Έτσι η αντιοξειδωτική ικανότητα της Cys απόλλεται πλήρως εάν το διάλυμα αφηθεί για μερικές ώρες, ενώ οι ικανότητες της VCys παραμένουν σταθερές. Η VMPG αποδεικνύεται στα 3 λεπτά ισχυρότερη της VCys. Μια μέσης τάξεως αναστολή της ρίζας ανέδειξε το θειϊκό βαναδύλιο, ενώ από την άποψη της περιόδου πλήρους αναστολής δεσπόζει η VCys. Ουδεμία ένωση όμως δύναται να συγκριθεί με το Trolox.



3.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ IN VITRO ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΟΣ.

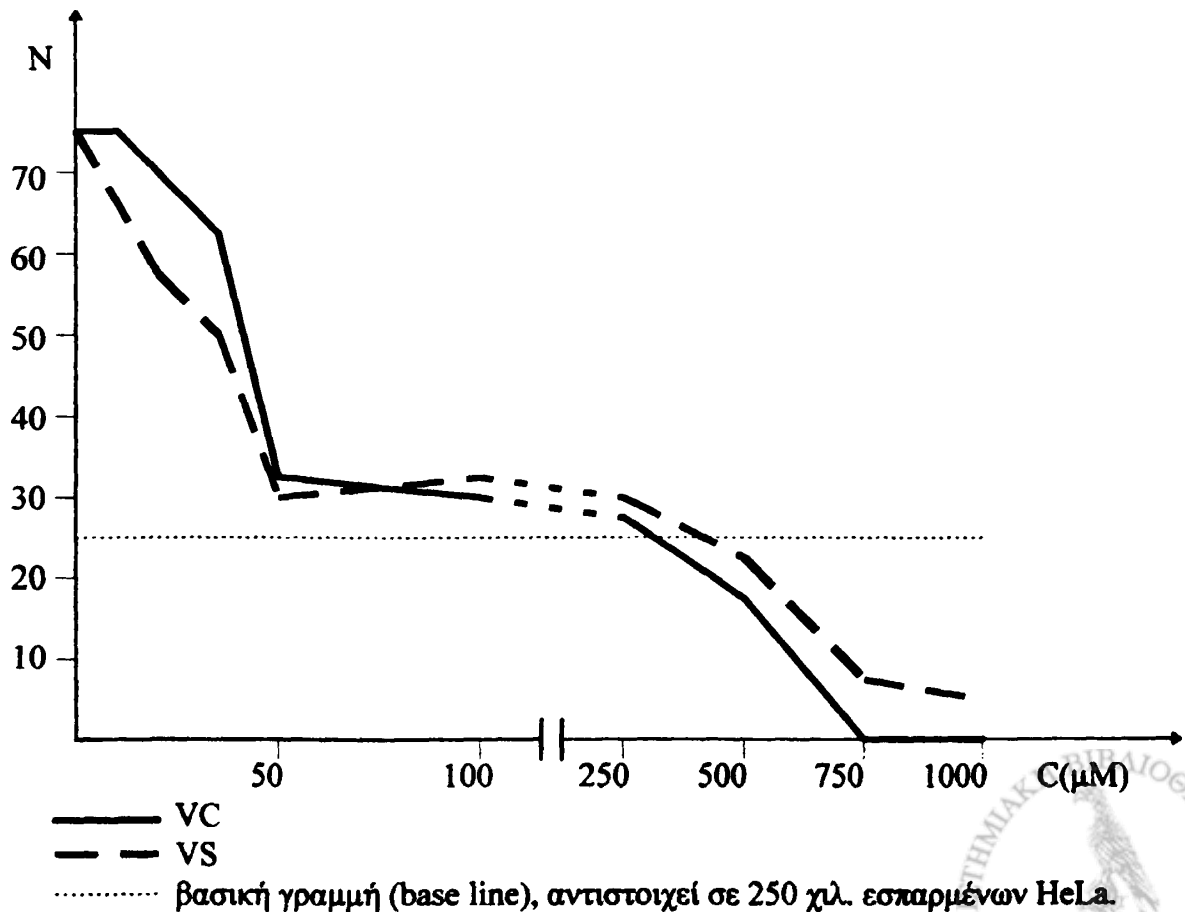
Πίναξ 7. Αριθμός των επιβιωσάντων HeLa ανά κυτταρομετρικό πεδίο της πλάκας του Bauer.

Συγκέντρωση (μM).	Μέσος όρος και διάστημα εμπιστοσύνης.		Πιθανότητα της Ho.
	VSIf	VCys	
0	75,59 ± 10,58		
10	67,44 ± 6,92	74,81 ± 7,85	
20	57,31 ± 5,57	70,75 ± 8,78	p<0,05
35	50,88 ± 6,39	63,81 ± 4,91	p<0,01
50	31,19 ± 1,80	31,69 ± 3,65	
100	31,70 ± 2,46	30,28 ± 2,55	
250	29,31 ± 6,38	28,56 ± 5,40	
500	23,44 ± 2,52	16,63 ± 3,65	p<0,01
750	8,06 ± 1,75	0,56 ± 0,40	p<0,001
1000	6,00 ± 1,28	0,06 ± 0,12	p<0,001

Σημείωση. Η έκφραση της συγκέντρωσης σε μM αφορά στο καθαρό βανάδιο.

Στον άνωθι πίνακα παρατίθενται τα συγκριτικά αποτελέσματα της 24-ώρου εκθέσεως των HeLa σε διάφορες συγκεντρώσεις VSIf και VCys, τα οποία παρουσιάζονται επίσης γραφικώς παρακάτω.

Σχήμα 14. Μέσος όρος του αριθμού ζωντανών κυττάρων ανά κυτταρομετρικό πεδίο (N) ως συνάρτηση της συγκέντρωσης βαναδίου (C).



Διαφαίνεται, λοιπόν, με στατιστική σημαντικότητα ότι στο διάστημα χαμηλών συγκεντρώσεων (10-35 μM) το θειϊκό βαναδύλιο υπερτερεί, μειώνοντας δραστηκότερα τον αριθμό κακοήθων κυττάρων *in vitro*. Δεδομένου ότι εσπάρησαν 250000 κύτταρα ανά τριβλίο (πράγμα που θα οδηγούσε, με πλήρη παύση του πολλαπλασιασμού, στην εμφάνιση 25 κυττάρων εντός του κυτταρομετρικού πεδίου - πολύ λιγότερο, απ'όσα παρατηρήθησαν πράγματι), θα πρέπει να ερμηνεύσωμε τούτη την δράση μάλλον ως κυτταροστατική.

Απ'εναντίας, τα εκτυλισσόμενα από 250 μM και ανωτέρω συμβάντα αναφέρονται σαφώς στην κυτταροτοξική επενέργεια των ενώσεων, καθώς ο αριθμός των ανευρεθέντων κυττάρων τοποθετείται κάτω του αριθμού σπαρθέντων. Εμμέσως τούτο αποδεικνυται εκ του γεγονότος ότι στο μεσοδιάστημα μεταξύ των κυτταροστατικών και κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων οι καμπύλες αριθμού ζωντανών κυττάρων βαίνουν παραλλήλως και εγγύς της βασικής γραμμής αριθμού σπαρθέντων τοιούτων (βλ. το σχήμα). Και εκ των αποτελεσμάτων προκύπτει με υψηλού βαθμού στατιστική επίρρωση ότι η βαναδοκυστεΐνη είναι πλέον κυτταροτοξική *in vitro*. Το διάστημα δε κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων αρχίζει περίπου από 0,5 mM (για επώαση 24 ωρών).

3.4. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΕΩΣ ΤΗΣ VCys.

Περιπτώσεις ίασεως έχουν παρατηρηθεί στις ομάδες VSIf (3 ζώα) και VCys (2 ζώα). Συνεπώς, τα ποσοστά εμφάνισης θανατηφόρου καρκίνου ήσαν:

1) Ποσοστά εμφάνισης θανατηφόρου καρκίνου καθ'εκάστην ομάδα:

<u>Ομάδα</u>	<u>%</u>
<i>B(a)P</i>	100,0
<i>B(a)P+Cys</i>	100,0
<i>B(a)P+VSIf</i>	85,0
<i>B(a)P+VCys</i>	90,5

Οι μέσοι όροι του διαστήματος επιβίωσης απετέλεσαν:

2) Μέσοι όροι του διαστήματος επιβίωσης καθ'εκάστην ομάδα.

<u>Ομάδα</u>	<u>Διάστημα επιβίωσης (ημέρες)</u>
<i>B(a)P</i>	204,4
<i>B(a)P+Cys</i>	256,8
<i>B(a)P+VSIf</i>	343,6
<i>B(a)P+VCys</i>	365,6

Εφαρμογή του μη παραμετρικού κριτηρίου του van der Varden εξηκρίβωσεν ότι όλες οι ομάδες θεραπείας διακρίνονται από την ομάδα ελέγχου: VCys - $p < 0,01$, VSIf και Cys - $p < 0,05$, ενώ η επιβίωση στην ομάδα της VCys ήταν εκτενέστερη από αυτήν της Cys - $p < 0,05$. Το γεγονός ότι οι ουρές των καμπυλών του ρυθμού θανάτου στις περίπτωση της VCys και του VSIf συμπίπτουν (βλ. στο παρακάτω σχήμα), δεν επέτρεπε να υποστηριχθούν στατιστικώς οι διαφορές του διαστήματος επιβίωσης (τα ζώα που θεραπεύτηκαν στην ομάδα του VSIf ζούσαν μάλιστα περισσότερο από τα αντίστοιχα της VCys). Εν τούτοις, τούτο πιθανότατα να οφείλεται είτε σε τυχαίους παράγοντες, είτε σε νομοτέλειες που δεν έχουν σχέση με την θεραπευτική αντιμετώπιση καρκίνου. Εάν οι συμπίπτουσες ουρές αφαιρεθούν από την στατιστική επεξεργασία (δεν θα ληφθούν

υπόψιν οι ημερομηνίες θανάτου των αποθανόντων άνευ καρκίνου ζώων), η διαφορά μεταξύ της VCys και του VSIf γίνεται στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$).

Το συνολικό βάρος των πειραματοζώων (το του σώματος συν τω του όγκου) δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές καθ'ομάδα. οι διαφορές του ποσοστιαίου βάρους του όγκου επίσης δεν ήσαν στατιστικώς αποδεδειγμένες (η μεγαλύτερη διαφορά, αυτή μεταξύ της ομάδος ελέγχου και της VCys συνάπτεται με την πιθανότητα σφάλματος κατά την λήψη της Ηι-υποθέσεως ίσων ~ 8%). Ταυτοχρόνως στην ομάδα ελέγχου η τυπική απόκλιση ήτο σημειωτέως μικρότερη.

3) Βάρος του όγκου σε ποσοστό του συνολικού.

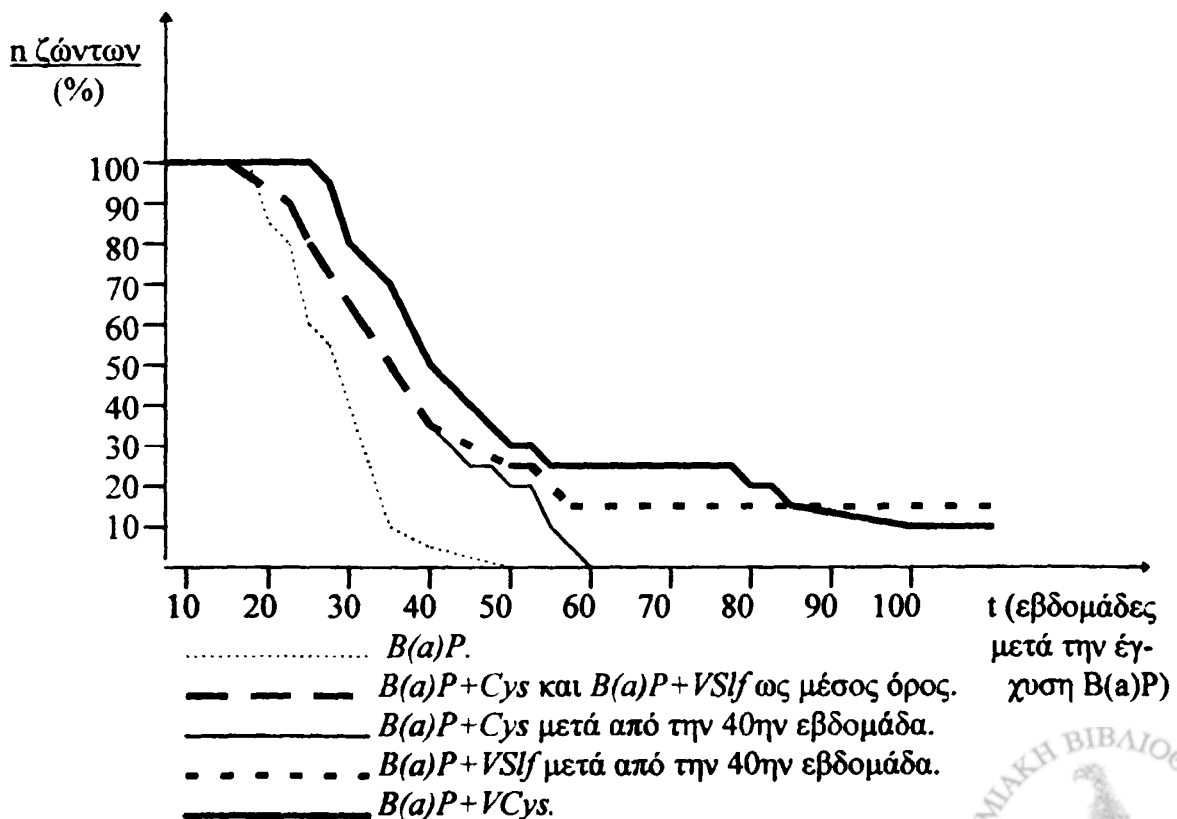
Ομάδα	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	Διάστημα εμπιστοσύνης
B(a)P	47,8	8,25	4,32
B(a)P+Cys	40,0	15,55	7,87
B(a)P+VSIf	43,0	12,67	6,21
B(a)P+VCys	39,5	15,60	7,21

Οι αναλυτικές τιμές των διαστημάτων επιβίωσης, του συνολικού βάρους σώματος και του ποσοστιαίου βάρους όγκου ευρίσκονται στον πίνακα 2 των παραρτημάτων.

Σύγκριση των ποσοστών ζώντων πειραματοζώων ανά χρονικές στιγμές αποδεικνύει την σημαντική παράταση του προσδοκίμου επιβίωσης στις ομάδες θεραπείας, ιδίως στην VCys. Η διαφοράς αυτές γίνονται αισθητές κατά το χρονικό διάστημα εντόνου πτώσεως των καμπυλών, όπως μπορεί να δει κανείς στο κάτωθι σχήμα, όπου αναπαρίστανται

4) Οι παρατηρηθέντες σε διάφορες ομάδες ρυθμοί θανάτου.

Σχήμα 15. Ρυθμός θανάτου ως ποσοστό ζώντων σε συνάρτηση με τον χρόνο.



Αρχίζοντας από την 22^η εβδομάδα μετά την έγχυση καρκινογόνου και στο εξής το ποσοστό ζώντων στην ομάδα της VCys διακρίνεται στατιστικά από αυτό της ομάδος



ελέγχου, ενώ στις ομάδες του VSIf και της Cys η στιγμή αυτή επέρχεται την 30^η και 34^η εβδομάδα αντιστοίχως. Η ομάδα της VCys διακρίνεται αξιόπιστα από τις ομάδες του VSIf και της Cys κατά το χρονικό διάστημα 23-35 εβδομάδων. Κατά το χρονικό διάστημα 0 - 40 εβδομάδες οι καμπύλες θνησιμότητας του VSIf και της Cys δεν εμφάνισαν καμμία διαφορά μεταξύ των, ούτως ώστε δια λόγους παραστατικής ευκρίνειας συνενώθηκαν σε μία.

Συγκρίνοντας τις επιπρόσθετες πληροφορίες, οι οποίες παρέχονται από την εξέταση του ρυθμού θανάτου, δυνάμεθα να συμπεράνομε ότι αλληλοσυμπληρώνονται με το αποτέλεσμα της σύγκρισης του διαστήματος επιβίωσης με το κριτήριο van der Varden.

5) Η μέση ταχύτητα αύξησης όγκου συσχετίζεται καλώς με τις άλλες παραμέτρους αντικαρκινογόνου δράσεως, όπως το διάστημα επιβίωσης ή η αντικαρκινογόνος ισχύς των ενώσεων (βλ. παρακάτω). Συγκεκριμένα, οι τιμές των πειραματικών ομάδων απετέλεσαν:

	Μέση ταχύτης αύξησης όγκου (% βάρος σώματος / ημέρα)
<i>B(a)P</i>	0,234 ± 0,067
<i>B(a)P+Cys</i>	0,186 ± 0,092
<i>B(a)P+VSIf</i>	0,187 ± 0,082
<i>B(a)P+VCys</i>	0,147 ± 0,077

Καθώς η τυπική απόκλιση του δείκτη ταχύτητας ήταν μεγάλη (πράγμα ευνόητο, διότι συνίσταται ουσιαστικά από δύο δείκτες - το ποσοστιαίο βάρος όγκου και διάστημα επιβίωσης), από στατιστική άποψη διακρίνεται μόνον η ομάδα της VCys από αυτήν του ελέγχου ($p < 0,05$). Λαμβανομένου, όμως, υπ' όψιν ότι οι διαφορές μεταξύ των ομάδων ως προς την μέση ταχύτητα συμφωνούν καλά με την εικόνα διαφορών όσον αφορά στα υπόλοιπα μεγέθη, μπορούμε να μιλήσωμε για μια ένδειξη, ότι αυτό που υπόκειται στην ευεργετική δράση των υπό μελέτην ενώσεων είναι, κατά πάσα πιθανότητα, η επιβράδυνση του ρυθμού αύξησης της ογκικής μάζας.

6) Η αντικαρκινογόνος ισχύς των χορηγούμενων ενώσεων επί τη βάσει του ποσοστού εμφάνισης θανατηφόρου καρκίνου και του μέσου διαστήματος επιβίωσης, όπως ωρίσθη παραπάνω, στη σελ. 69, απετέλεσαν:

Ομάδα	Αντικαρκινογόνος ισχύς (αφηρημ. μονάδες)
<i>B(a)P</i>	0
<i>B(a)P+Cys</i>	10
<i>B(a)R+VSIf</i>	15
<i>B(a)P+VCys</i>	21

Η παράμετρος της αντικαρκινογόνου ισχύος είναι ένα τυχάιο μέγεθος (καθώς αποτελεί απλή μαθηματική συνάρτηση τοιούτων). Η τιμή για την VCys δεν διακρίνεται στατιστικώς από το άθροισμα τιμών για το VSIf και την Cys, ενώ και οι τρεις ενώσεις διαθέτουν μίαν αντικαρκινογόνον ισχύν αποδεδειγμένως διαφορετική του μηδενός. Η αντικαρκινογόνος ισχύς της VCys υπερέχει με στατιστική σημαντικότητα ταύτης της Cys, ενώ η διαφορά της VCys από το VSIf δεν επιτρέπει εξαγωγή συμπερασμάτων.



7) Τα αποτελέσματα ιστολογικής εξέτασης.

Τα σχήματα θεραπευτικής αγωγής δεν ήταν δυνατόν να διακριθούν βάσει του βαθμού κακοήθειας: σχεδόν όλα τα ζώα, ανεξαρτήτως της ομάδος, στην οποία ανήκαν, είχαν, με ελάχιστες εξαιρέσεις, βαθμό κακοήθειας III.

Τα πειραματικά μας λειομυοσαρκώματα απέδιδον μεταστάσεις στην συντριπτική πλειοψηφία στον πνεύμονα, καθώς το όργανο τούτο ετοποθετείτο εγγύτερον προς το σημείο της ένεσης. Υπήρχον, επίσης, ελάχιστες περιπτώσεις μετάστασης στο ήπαρ. Το δε ποσοστό πειρπτώσεων μεταστάσεως ισούτο:

	<u>Ποσοστό περιπτώσεων μεταστάσεως</u>	
<i>B(a)P</i>	50,0 %	
<i>B(a)P+Cys</i>	46,2 %	
<i>B(a)P+VSIf</i>	54,5 %	
<i>B(a)P+VCys</i>	8,3 %	<i>p</i> <0,01

Ούτως, διαπιστώνεται ότι η χορήγηση της VCys αναστέλλει την εμφάνιση μεταστάσεων κατά τα 83,4 % σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ ουδεμία παρόμοια επίδραση μπορεί να αποδοθεί στο VSIf ή στην κυστεΐνη.

3.5. LD₅₀ ΤΗΣ VCys.

Όλοι οι παρατηρημένοι μετά την έγχυση της VCys θάνατοι επήλθον κατά τα πρώτα δύο εικοσιτετράωρα: 70,8% - κατά το πρώτο και 29,2% - κατά το δεύτερο. Τα συμπτώματα περιελάμβανον αταξία, συστολή των οπισθίων ποδών και αρρυθμία αναπνοής και ήσαν ίδια με τα παρατηρηθέντα κατά τον προσδιορισμό της LD₅₀ ενώσεων V(IV) και V(V) (βλ. στο κεφάλαιο 2 τα όσα αφορούν στην τοξικότητα).

Ο αριθμός αποβιωσάντων στις ομάδες απετέλεσε:

<u>Ομάδα</u>	<u>Δόσις (mg/kg)</u>	<u>Αριθμός πειραματοζώων</u>	<u>Αριθμός αποβιωσάντων</u>
1	280	10	2
2	320	10	5
3	360	10	7
4	400	10	10

Κατόπιν εφαρμογής του κριτηρίου Spearman-Kerber προέκυψε:

$$LD_{50} \text{ της VCys} = 324 \pm 24,6 \text{ mg/kg,}$$

ενώ από την σχετική βιβλιογραφία γνωρίζομε ότι η LD₅₀ του θειϊκού βαναδυλίου (VSIf) αποτελεί 74,1 ± 14,9 mg/kg (Llobet and Domingo, 1984). Ωστε οι τιμές αυτές διαφέρουν ~ 4,4 φορές. Εφ'όσον το δραστικό τμήμα των ενώσεων είναι το άτομο βαναδίου (καθώς η εικόνα που παρατηρήθηκε ήταν χαρακτηριστική για την τοξικότητα του V), ενδιαφέρει να καθορίσωμε τις εκάστοτε δόσεις V, που προκαλούν θάνατο σε 50% των πειραματοζώων. Η περιεκτικότητα σε V του VSIf αποτελεί 20,99%, της VCys - 11,89%, οπότε:

$$LD_{50} \text{ του V ως VCys} = 38,52 \text{ mg/kg.}$$

$$LD_{50} \text{ του V ως VSIf} = 15,55 \text{ mg/kg.}$$

Έπεται ότι το βανάδιο είναι ~ 2,5 φορές ολιγότερο τοξικό, όταν δίδεται υπό μορφήν της VCys.



3.6. ΠΕΙΡΑΜΑ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΟΣ.

Καθ'όλες τις 10 εβδομάδες, που διήρκεσε το πείραμα (την πρώτη προκαταρκτική και τις 9 επόμενες, καθ'άς εδίδετο το βανάδιο) τα εξεταζόμενα πειραματόζωα δεν εξεδήλωσαν καμμία διαφορά στην κατανάλωση τροφής, απώσης συγχρόνως οιασδήποτε εμφανούς διαταραχής συμπεριφοράς ή εξωτερικής όψεως. Οι μετά θάνατον εξετάσεις αίματος ήταν χαρακτηριστικά των επιμύων και δεν έχουν παράσχει κάποιον λόγο για στατιστική διάκριση.

Όμως, οι μέσοι όροι του βάρους σώματος των πειραματόζωων (βλ. στον παρακάτω πίνακα) διέφερον περιστασιακά με στατιστική σημαντικότητα. Ήδη στο τέλος της πρώτης εβδομάδος αγωγής τα πειραματόζωα της ομάδος VCys είχαν περισσότερο βάρος σε σύγκριση με εκείνα της ομάδος ελέγχου ($p < 0,05$). Μολονότι εν συνεχεία η διαφορά αυτή ουδέποτε επανεμφανίσθηκε αποδεδειγμένη με t-δοκιμασία, εν συνόλω μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι, καθ'όλες τις 9 εβδομάδες χορήγησης, ο μέσος όρος της ομάδος VCys υπερτερούσε, έστω και λίγο, αυτού της ομάδος ελέγχου. Εφαρμογή του μη παραμετρικού κριτηρίου προσήμων (όπου ελέγχεται το κλάσμα θετικών και αρνητικών προσήμων των διαφορών, που προκύπτουν από κατά ζεύγη μετρήσεις) επιτρέπει να ισχυρισθούμε ότι η χορήγηση της VCys ολοκληρώθη στην αύξηση του σωματικού βάρους. Θα πρέπει, ωστόσο να είμαστε αρκετά επιφυλακτικοί σ'αυτό το σημείο, δεδομένου ότι η ελάχιστη διαφορά αυτή είναι παρούσα ήδη κατά την εναρκτήρια εβδομάδα του πειράματος, ώστε δεν αποκλείεται διόλου οι ελαφρώς ηυξημένες τιμές στην ομάδα της VCys να αντανακλούν την τυχαία τούτη ανομοιογένεια, που προέκυψε κατά την διαμόρφωση των πειραματικών ομάδων.

Εκ της 6^{ης} εβδομάδος και ύστερον, το μέσο βάρος στην ομάδα του VSIf γίνεται μικρότερο των υπολοίπων. Την 7^η παρατηρείται σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) με την ομάδα της VCys, ενώ κατά το τέλος της 9^{ης} η ομάδα του θειϊκού βαναδυλίου διακρίνεται και από την VCys ($p < 0,01$), και από την ομάδα ελέγχου ($p < 0,05$). Συνεπώς, η δεδομένη δοσολογία του VSIf κατά το δεδομένο χρονικό διάστημα προκαλεί ήπια απώλεια σωματικού βάρους, αρχίζοντάς από την 9^η εβδομάδα.

Πίναξ 8. Μέσοι όροι σωματικού βάρους στις ομάδες του πειράματος χρόνιας τοξικότητας.

Εβδομάδες	Ομάδες		
	Έλεγχος	VSIf	VCys
0	62,7 ± 4,12	63,9 ± 3,51	62,9 ± 3,90
1	79,2 ± 4,08	83,9 ± 4,33	85,2 ± 3,14 ^a
2	97,0 ± 5,80	100,7 ± 4,57	100,0 ± 3,98
3	109,8 ± 5,96	114,4 ± 4,51	117,4 ± 4,82
4	123,3 ± 7,92	127,4 ± 4,86	127,1 ± 5,53
5	137,8 ± 6,29	138,4 ± 5,31	137,3 ± 4,25
6	147,6 ± 6,62	143,2 ± 6,70	150,7 ± 4,02
7	156,4 ± 6,17	149,7 ± 8,47	159,9 ± 2,41 ^b
8	156,7 ± 6,78	150,9 ± 8,96	159,3 ± 4,41
9	168,1 ± 7,35 ^b	153,4 ± 11,25	170,8 ± 3,00 ^b

a - στατιστικώς σημαντική διαφορά με την ομάδα ελέγχου, $p < 0,05$.

b - στατιστικώς σημαντική διαφορά με την ομάδα VSIf, $p < 0,05$, $p < 0,01$.



Η ιστολογική εικόνα του ήπατος και των νεφρών ήταν κανονικής φύσεως, χωρίς φλεγμονή και νεκρώσεις. Τα πειραματόζωα όλων των ομάδων έπασχον από περιβρογχική φλεγμονή ίσης έντασης, πράγμα που οφείλεται μάλλον στις συνθήκες διαβίωσης στο εκτροφείο. Στην ομάδα της VCys 5 ζώα από 9 εμφάνισαν ήπια διάταση των κεντρικών φλεβών του ήπατος (VSI_f - 0/9, η ομάδα ελέγχου - 1/9). Το γεγονός αυτό, εν όψει του κανονικού ηπατικού ιστού, δεν μπορεί, προφανώς, να θεωρηθεί εκδήλωση τοξικότητας και ως εκ τούτου, καθώς και ελλείπει σχετικών δεδομένων, απέχουμε ερμηνείας αυτού του φαινομένου.

Θα συνοψίσουμε, λέγοντας ότι η κατά 9 εβδομάδες χορήγηση 16,8 mg / kg / ημέρα V, είτε υπό μορφήν VCys, είτε ως VSI_f, δεν επηρέασε σοβαρά την κατάσταση των πειραματόζωων, παρεκτός της ήπιας απίσχανσης των επιμύων της ομάδος VSI_f και της ελαφριάς αύξησης σωματικού βάρους στην ομάδα VCys.



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως προέκυψε από το πείραμα επιλογής συμπλόκου, **δραστικό σύμπλοκο απεδείχθη η VCys, χορηγούμενη θεραπευτικώς σε δόση 0,5 mg V / kg βάρους σώματος.** Οι λόγοι, δια, τους οποίους δεν εμφάνισε αντικαρκινογόνο δράση η VMPG, δεν ερευνήθηκαν συστηματικώς εκ μέρους μας. Χωρίς να εισέλθουμε σε άλλες λεπτομέρειες, θα θέλαμε να επιστήσουμε την προσοχή επί μερικών μόνο γεγονότων, όπως η δυσδιαλυτότητα της VMPG και η μικρή περίοδος πλήρους αναστολής της ABTS-ρίζας (7,2 δευτερόλεπτα). Η περίοδος αυτή ισούται προς εκείνη του VSIf και δυνάμεθα να υποθέσωμεν ότι οφείλεται στις αμφότερες περιπτώσεις στο άτομο βαναδίου. Η αντιοξειδωτική ικανότης του μορίου μερκαπτοπροπιονυλ-γλυκίνης δεν απόλλυται βέβαια, ανεπιστρεπτί, εφόσον στα 3 λεπτά το διάλυμα της VMPG περιέχει την μικρότερη συγκέντρωση της ρίζας, λανθάνει όμως το πρώτο λεπτό, καθ' όν η καμπύλη απορρόφησης ομοιάζει εξαιρετικά προς αυτήν του VSIf. Τούτο μπορεί να θεωρηθεί ένδειξη μη ενεργούς κατάστασης της MPG στο σύμπλοκο.

Από άλλης πλευράς, **η αντιοξειδωτική ικανότητα του V(IV), που είδαμε στο πείραμά μας, πιθανότατα δεν είναι γνήσια.** Το υπόστρωμα της μετμοσφαιρίνης, H_2O_2 , γνωρίζομεν ότι αντιδρά εντόνως με το V(IV), οξειδώνοντάς το σε V(V) και παράγοντας την ρίζα υδροξυλίου (βλ. στο κεφάλαιο 2). Εν τούτοις, η κανονική πορεία της αντίδρασης που οδηγεί στην ABTS-ρίζα συνίσταται στην απόδοση ηλεκτρονίου από την μετμοσφαιρίνη στο υπεροξείδιο υδρογόνου και μετά από το ABTS στην μετμοσφαιρίνη. Οι μειωμένες τιμές απορρόφησης οφείλονται μάλλον στην μερική αντικατάσταση της μετμοσφαιρίνης εκ μέρους του V(IV), παρά στην αναστολή της ίδιας της ρίζας.

Επανακάμπτοντες στην VMPG, θα μπορούσαμε να προβάλουμε την υπόθεση ότι το πρώτο βήμα της αντίδρασης αποτελείται από την μετατροπή V(IV) \rightarrow V(V) υπό την επίδραση του H_2O_2 . Τότε το σύμπλοκο υφίσταται διάσπαση και η απελευθερωμένη πλέον μερκαπτοπροπιονυλική γλυκίνη αναστέλλει τη ρίζα. Εάν αληθεύει τούτο, έπεται ότι η συμπλοκοποίηση του βαναδίου με MPG δεν προστατεύει το περιβάλλον από τη συνέργεια του V(IV) με το υπεροξείδιο υδρογόνου. Αυτός μπορεί να είναι ο λόγος που το σύμπλοκο VMPG δεν ανέδειξε σημαντική δράση στην αντιμετώπιση του πειραματικού μας καρκίνου. Επιπλέον, η χρονική στιγμή 3 λεπτών στη μέθοδο προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας θεωρείται υπό πολλών ερευνητών ότι πρέπει να συμπληρώνεται με την τιμή της περιόδου πλήρους αναστολής (Cao and Prior, 1998). Το αίτημα αυτό γίνεται επιτακτικό όταν οι κινητικές αναστολής των υπό εξέταση αντιοξειδωτικών και του Trolox διαφέρουν, όταν δηλαδή οι γωνίες κλίσεως των καμπυλών απορρόφησης είναι διαφορετικές. Και από αυτή την άποψη η σύζευξη του V με την MPG μειονεκτεί, καθώς απενεργοποιεί την τελευταία. Συνεπώς η εμφάνιση των ελευθέρων ριζών λαμβάνει χώρα σημαντικώς ενωρίτερον.

Απ'εναντίας, **το σύμπλοκο της VCys δεν μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα της κυστεΐνης, ούτε κατ'ελάχιστον, και, επιπλέον, της προσδίδει μια σχετική σταθερότητα, εφόσον παρελεύσει 5 ωρών η ουσία.** διέτηρησε όλες τις ιδιότητές της, ενώ η ελεύθερη κυστεΐνη ωξειδώθη εξ' ολοκλήρου. Έτσι, στην γενική κυκλοφορία το μόριο κυστεΐνης, εν όσω συζευγνύεται με το άτομο βαναδίου, πρέπει λογικά να αποτρέπει αποτελεσματικώτατα την παραγωγή ελευθέρων ριζών υπό αυτού.

Ένα άλλο αποτέλεσμα του πειράματος, πολύ πιο δύσκολο εξηγήσιμο, είναι η **απουσία αντικαρκινογόνου δράσεως του προληπτικού σχήματος της VCys σε συγκέντρωση 0,5 mg / kg / ημέρα.** Από την σχετική βιβλιογραφία γνωρίζομε ότι πρώτα ανεκαλύφθη ακριβώς η προληπτική σημασία του V (Thompson et al., 1984). Μερικοί ερευνητές υποστηρίζουν μάλιστα την άποψη περί της προληπτικής δράσης ως

πρωτογενούς (Bishayee and Chatterjee, 1995b). Αναφέραμε στο κεφάλαιο 3 τους λόγους, δια τους οποίους η άποψη αυτή δεν μας φαίνεται οριστικώς θεμελιωμένη, παραμένει γεγονός όμως ότι η προληπτική δράση απλών ενώσεων βαναδίου έχει πολλάκις εξακριβωθεί. Το μονοβαναδικό αμμώνιο σε συγκέντρωση 0,5 p.p.m. (~85 $\mu\text{g V / kg / \eta\mu\epsilon\rho\alpha}$) και το θειϊκό βαναδύλιο σε συγκέντρωση 25 p.p.m. (~857 $\mu\text{g V / kg / \eta\mu\epsilon\rho\alpha}$) (αντιστοιχώς Bishayee and Chatterjee, 1995b και Thompson et al., 1984) αναδεικνύουν σαφείς αντικαρκινογόνους ιδιότητες κατά την πρόληψη, ενώ ουδέν ίχνος τοιούτο επεσημάνθη ως προς την VCys σε συγκέντρωση 500 $\mu\text{g / kg / \eta\mu\epsilon\rho\alpha}$.

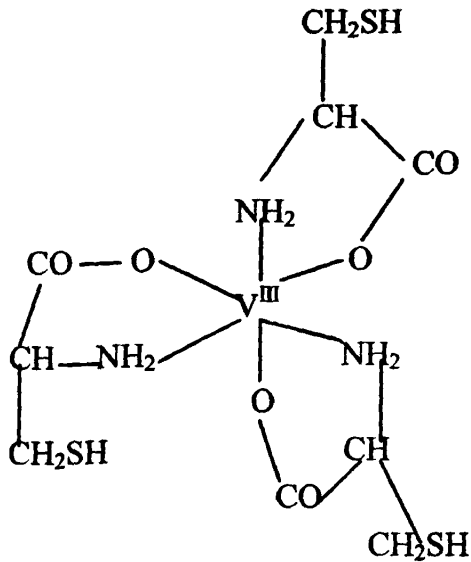
Οφείλομε να ομολογήσωμε ότι προς το παρόν δεν διαθέτομε πειστική εξήγηση του γεγονότος αυτού. Θα αρκεστούμε να σημειώσωμε πως η υπόθεσή μας συνίστατο στο ότι το βανάδιο ασκεί την θεραπευτική δράση μέσω κυτταροτοξικότητας και την τελευταία μέσω παραγωγής ελευθέρων ριζών. Από την άλλη πλευρά είναι φανερό ότι ο μηχανισμός της προληπτικής δράσης είναι διαφορετικός. Η Djordjevic, που προέβαλε την υπόθεση αυτή, έχει επίσης παρατηρήσει (Djordjevic, 1995) ότι η δυσκολία εύρεσης σωστής δοσολογίας διαφόρων ενώσεων βαναδίου αποτελεί το κυριώτερο πρόβλημα στον τομέα τούτο. Προφανώς, η συμπλοκοποίηση του V με την κυστεΐνη αλλάζει την σταθερά χρόνου παραγωγής ελευθέρων ριζών, αλλάζει πιθανώς και την διακίνηση του μετάλλου, και όλα αυτά, ομού της επιλεγμένης συγκέντρωσης, κάλλιστα μπορούν να έχουν σημασία όταν στη θέση ενός κακοήθους κυττάρου με πλήρως εκδεδηλωμένο φαινότυπο απαντάται ένα καρκινικό κύτταρο στη φάση προώθησης. Οι γνώσεις μας όμως περί του τρόπου δράσης του βαναδίου κατά την προώθηση, καθώς και περί λεπτομερειακών αποκρίσεων κυττάρων σε διάφορα στάδια καρκινογένεσης στο οξειδωτικό στρες, δεν είναι επαρκείς στο βαθμό, ο οποίος θα επέτρεπε να υποστηρίξωμε μίαν ανεπτυγμένη άποψη.

Σε συνάφεια με τα απροσδόκητα αποτελέσματα στην ομάδα πρόληψης αξίζει ίσως να θυμηθούμε την ικανότητα των σαρκωμάτων να αναπτύσσουν αντίσταση προς φαρμακευτικούς παράγοντες - πράγμα που έχει ήδη επισημανθεί. Στην αντιμετώπιση αυτού του είδους νεοπλασμάτων η ανάγκη νέων φαρμάκων είναι συνεχώς αισθητή ένεκεν συχνής αποτυχίας καθιερωμένων χημειοθεραπευτικών παραγόντων, εκ των οποίων μόνον οι doxorubicin και ifosfamide έχουν ποσοστό ανταπόκρισης άνω των 20% (Keohan and Taub, 1997). Τούτο εν πολλοίς οφείλεται στο φαινόμενο της πολυφαρμακευτικής αντοχής, το οποίο αίρει τις συνήθως αποτελεσματικές δοσολογίες, συνδυασμούς και χρονικά όρια (Elias, 1994). Η δε αντοχή κακοήθων όγκων προς το βανάδιο αποτελεί τελείως ανεξερεύνητο θέμα - πράγμα ευνόητο, καθώς η εφαρμογή του στοιχείου τούτου ευρίσκεται ακόμη στο πειραματικό στάδιο. Έτσι είναι πιθανόν η παρατεταμένη χορήγηση βαναδίου (~3,5 μήνες περισσότερο) στην ομάδα πρόληψης να δημιουργεί ανθεκτικότητα προς την χορηγούμενη μορφή του. Είναι δε γνωστόν ότι οι κακοήθεις όγκοι, κατόπιν προσαρμογής των σε μια δυσμενή συνθήκη, αναπτύσσονται ραγδαίως, πολλάκις ταχύτερον σε σύγκριση με τις περιπτώσεις, όπου η συνθήκη αυτή απουσιάζει (π.χ. η ανοσοπροαγωγή των κακοηθειών). Οπότε το πιθανολογούμενο προληπτικό αποτέλεσμα του βαναδίου θα μπορούσε να συγκαλυφθεί από την ύστερη ταχεία αύξηση ως συνέπεια ανάπτυξης αντοχής. Τούτο είναι όντως πιθανόν, καθώς ένας διαπεπιστωμένος μηχανισμός φαρμακευτικής αντοχής των σαρκωμάτων είναι η δραστηριοποίηση του συστήματος γλουταθειόνης (Colvin, 1997), το οποίο όμως ανταποκρίνεται άμεσα σε εξωγενή στοιχεία μετάπτωσης και στο βανάδιο ειδικότερα (βλ. στο γενικό μέρος).



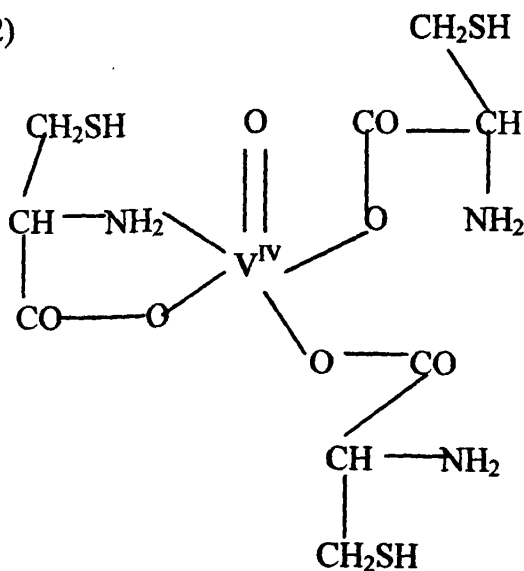
Σχήμα 16. Οι πιθανές μορφές της VCys στο υδατικό διάλυμα.

(1)



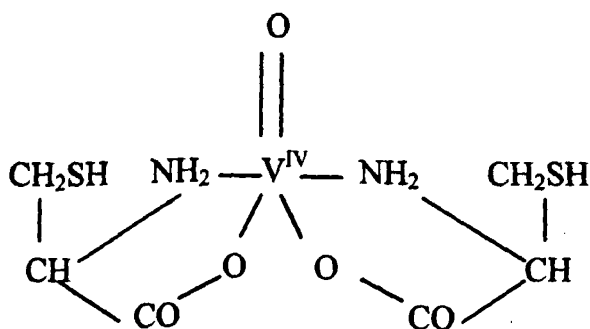
Η μορφή αυτή είναι πιθανή απουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου, οπότε το βανάδιο διατηρεί την οξειδωτική βαθμίδα +3.

(2)



Το περιβάλλον ένταξης αυτής της υποθετικής ένωσης είναι NO_3 , ενώ το σθένος βαναδίου - 4. Διατηρούνται και τα τρία μόρια κυστεΐνης.

(3)



Το περιβάλλον ένταξης - N_2O_2 . Αυτή η μορφή αντιστοιχεί, κατά πάσα πιθανότητα, στο συντεθειμένο εκ των προτέρων σύμπλοκο (3).



Οι μελέτες της συμπεριφοράς της VCys στο υδατικό διάλυμα αποδεικνύουν την οξειδωση του βαναδίου προς την βαθμίδα +4. Κατά την διαδικασία αυτή σχηματίζεται ο άξων συμμετρίας $V=O$ και το περιβάλλον ένταξης του βαναδίου στο ισημερινό πεδίο πλησιάζει προς N_2O_2 ή NO_3 . Δεδομένου ότι το σύμπλοκο (3), του οποίου τα EPR-φάσματα ομοιάζουν προς εκείνα της VCys κατόπιν έκθεσης στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο, συνετέθη με δυο μόρια, κυστεΐνης, δύνανται να προβληθούν ωρισμένες υποθετικές μορφές της VCys (βλ. στην προηγούμενη σελίδα).

Εκ των αποτελεσμάτων λοιπόν της έρευνάς μας θα μπορούσε να υποθεθεί ότι μετά την οξειδωση $V(III) \rightarrow V(IV)$ η VCys είτε διατηρεί όλα τα μόρια της κυστεΐνης (περιβάλλον ένταξης NO_3), είτε αποβάλλει ένα (περιβάλλον ένταξης N_2O_2). Ενδεχομένως, παρελεύσει ενός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος, αμφότερες οι μορφές συνυπάρχουν στο διάλυμα.

Ενθυμούμενοι δε τα αποτελέσματα της μελέτης αντιοξειδωτικής ικανότητας, μπορούμε να υποστηρίξωμεν ότι η περαιτέρω οξειδωση του βαναδίου προς το $V(V)$, τουλάχιστον κατά την διάρκεια μερικών ωρών εκ στιγμής παρασκευής διαλύματος, δεν έχει θέση. Διότι σ' αυτή την περίπτωση θα υπήρχε περαιτέρω αποβολή της κυστεΐνης, η οποία, ούσα ελεύθερη, οξειδώνεται πλήρως, καθώς συνάγεται εκ των αποτελεσμάτων μας. Εφόσον το αντιοξειδωτικό δυναμικό της VCys υπό αυτές τις συνθήκες ουδόλως μειώθη, συμπεραίνομε την απουσία της αποβολής κυστεΐνης και, κατ' επέκτασιν, την σταθερότητα του $V(IV)$.

Από εδώ προκύπτει ένα συμπέρασμα, συγκεκριμένα ότι η VCys έχει πολύ λιγότερη ευαισθησία στην οξειδωση αμφοτέρων των συνιστωσών της. Επομένως, ενόσω δεν παύει υφιστάμενο το σύμπλοκο, οι τοξικές επιδράσεις του βαναδίου πρέπει να ελαττώνονται σημαντικά. Είναι αυτονόητο ότι η τοξικότητα ενός μετάλλου συνάπτεται, κατά πρώτο λόγο, με τον απορροφούμενο εκ του γαστρεντερικού σωλήνος και τον υφιστάμενο στην γενική κυκλοφορία τοιούτο. Ώστε, εάν η περίοδος ημιζωής του συμπλόκου εξασφαλίζει την παρουσία 'του σ' αυτά τα σημεία υπό την συμπλοκοποιημένη μορφή, διανοίγεται ο δρόμος προς αύξηση δόσεων, ανάλογη προς τη μείωση τοξικότητας. Από άλλης όψεως, εάν το σύμπλοκο διασπάται μετά την άφιξή του στους περιφερειακούς ιστούς, οι δραστικές συγκεντρώσεις δεν θα αυξηθούν.

Προκειμένου να εξακριβώσωμε σε ποία σχέση ευρίσκεται η δραστικότητα της VCys με αυτές του ανόργανου άλατος βαναδίου και της κυστεΐνης, διεξήχθη η αναλυτική μελέτη του συμπλόκου. Τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί υποδεικνύουν, κατά τη γνώμη μας, ότι οι αντικαρκινογόνοι ιδιότητες της VCys είναι περίπου προσθετικές ως προς τις ιδιότητες του VSIf και της Cys (η αντικαρκινογόνος ισχύς της VCys = 21, του VSIf = 15 και της Cys = 10), τουλάχιστον η διαφορά τους δεν έχει αποδειχθεί στατιστικά. Τούτο, βέβαια, δεν σημαίνει οπωσδήποτε ότι η δράση εκάστης συνιστώσας του συμπλόκου εκτυλίσσεται ανεξάρτητα και δεν υπάρχει κανενός είδους συνέργεια ή διαφορά μηχανισμού.

Εν συνεχεία, η παράταση επιβίωσης στην ομάδα της VCys είναι πολύ πιθανόν να οφείλεται, εν μέρει τουλάχιστον, στην αποτελεσματική αναστολή μεταστατικής διαδικασίας. Είναι γεγονός, ότι, απύσης οιασδήποτε χειρουργικής επέμβασης στο πειραματικό μας πρωτόκολλο, η σχετική σημασία μεταστάσεων στην εξέλιξη της νόσου μειώνεται σημαντικά. Ουσιαστικά, στους πρώτους αποθανόντες της ομάδος ελέγχου οι μεταστάσεις δεν ανευρίσκονται επίσης - τα πειραματόζωα αποβιώνουν εξ αιτίας ραγδαίας ανάπτυξης του πρωτοπαθούς όγκου, ο οποίος φθάνει 50% του συνολικού βάρους, επιφέροντας καχεξία και καρδιακή ανεπάρκεια. Παρ' όλα αυτά, δεν μπορούμε να αρνηθούμε στην μετάσταση μια, έστω και σχετική, σημασία σ' εκείνον τον υποπληθυσμό που ο όγκος αναπτύσσεται βραδύτερα.

Τα δεδομένα που διαθέτουμε δεν επιτρέπουν επίσης να αποφανθούμε επιστάμενα εάν η απουσία μεταστάσεων στην μετά θάνατον παθολογική εικόνα οφείλεται στην πρόληψη ή στην εξαφάνιση ήδη υφιστάμενων τοιούτων. Πάντως, στην ομάδα ελέγχου υπήρχεν εμφανής χρονική ασυμμετρία παρουσίας μεταστάσεων (βλ. τον πίνακα των παραρτημάτων), δηλαδή η πιθανότητά της μειώνεται όσο μειώνεται το διάστημα επιβίωσης. Αφού λοιπόν διαπιστώνεται ενά εκτενές χρονικό διάστημα χορήγησης βαναδίου, καθ'όν οι μεταστάσεις δεν εμφανίζονται στην ομάδα ελέγχου, παρά σε ελάχιστο βαθμό και καθώς έχουμε ισχυρές ενδείξεις ότι η δράση του βαναδίου ως αντικαρκινογόνου παράγοντος είναι πλέον παρούσα κατά το διάστημα τούτο (η θνησιμότητα στις ομάδες VCys και ελέγχου παρουσιάζει μέγιστες διαφορές), **κλίνουμε να αποδώσωμε στην VCys την προληπτική μεταστάσεων δράση.**

Συζητώντας τους πιθανούς μηχανισμούς της αναστολής καρκίνου υπό των εξεταζόμενων ενώσεων, υπενθυμίζομε την υπόθεση μας ότι η αντικαρκινογόνος ισχύς του βαναδίου ανακύπτει ως αποτέλεσμα της εμπλοκής του στις αντιδράσεις ελευθέρων ριζών και της παραγωγής εν συνεχεία υπ'αυτού οξειδωτικού στρες. Τα ως άνω βασίζονται κυρίως επί:

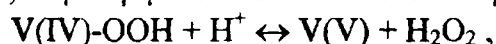
α) της χημείας του V, καθώς γνωρίζομε την ικανότητα μετατροπής $V(IV) \leftrightarrow V(V)$ (Darr and Fridovich 1984, Liochev and Fridovich 1985),

β) της τοξικότητας του V που επέρχεται ευθύς μετά από τις δραστικές συγκεντρώσεις (Djordjevic and Wampler, 1985),

γ) της συνέργειας του V με το H_2O_2 στην πρόκληση κυτταροτοξικότητας (Cruz et al. 1995).

Ας συζητήσωμε αυτό το σημείο διεξοδικότερα.

Τα κακοήθη κύτταρα, όπως ήδη έχουμε επισημάνει στο κεφάλαιο 3, αποδεικνύονται πλέον τρωτά απέναντι στο οξειδωτικό στρες, εφόσον εκ προοιμίου τελούν υπό ευνοούσες την παραγωγή ελευθέρων ριζών συνθήκες (Djordjevic, 1995), ειδικότερα έχουν μειωμένο pH, καθώς και συνεχή παραγωγή και αυξημένη συγκέντρωση του υπεροξειδίου υδρογόνου. Το μεν πρώτο περιστατικό υποβοηθεί την αντίδραση του V(V) με το ανιόν υπεροξειδίου, συγκεκριμένα στο στάδιο επανάκαμψης:



ενώ το δεύτερο προάγει την αντίδραση Fenton:



Θεωρείται ότι το ανιόν υπεροξειδίου συνάπτεται με το πεντασθενές βανάδιο λόγω ευκολίας σχηματισμού της περοξυλο-ρίζας $V(IV)\text{-OO}\cdot$, απ'εναντίας, η δραστικότητα του V(IV) καταλύεται υπό του H_2O_2 . Παραδείγματος χάριν η εξαρτωμένη από βανάδιο NADH-οξείδωση προωθείται υπό του H_2O_2 σε περίπτωση του V(IV), αλλά όχι και του V(V) (Keller et al., 1989).

Βεβαίως, η δραστηριότητα του V, εκτός της NAD(P)H-οξείδωσης, μπορεί να συνεπιφέρει οξείδωση πλείστων υποστρωμάτων, μεταξύ των οποίων τα λιπίδια και νουκλεϊνικά οξέα. Έκθεση του DNA σολωμού σε μίγματα υπεροξειδίου υδρογόνου με διάφορα στοιχεία μετάπτωσης ακολουθήθηκε από οξειδωτικές αλλοιώσεις και ρήξεις της DNA-αλυσίδος, ενώ μια σημαντική θέση στην παραγωγή του φαινομένου αποδόθηκε στο V(III) (Lloyd et al. 1997, 1998). Η δραστική μορφή οξυγόνου στις ανωτέρω περιπτώσεις είναι η ρίζα υδροξυλίου $OH\cdot$. Αξιοσημείωτον επίσης ότι η βελτίστη συγκέντρωση του V(III) - 150 μM - ήταν μικρότερη σχεδόν όλων των άλλων μετάλλων.

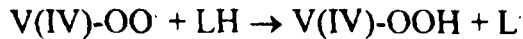
Στις τυπικές κυτταρικές συνθήκες υπάρχουν πολλά NADPH-εξαρτώμενα ένζυμα, τα οποία ανάγουν το V(V) προς το V(IV) ανεξάρτητα από το $O_2\cdot^-$: η αναγωγή της γλουταθειόνης, η λιποϊκή αφυδρογονάση, η $NADP^+$ -οξειδοαναγωγή φερρεδοξίνης (Shi and Dalal, 1991). Η μη συμμετοχή του ανιόντος υπεροξειδίου διαπιστώνεται σε

παρόμοιες περιπτώσεις από την ουδετερότητα της δισμουτάσης υπεροξειδίου. Έτσι σχεδόν όλο το βανάδιο εντός κυττάρου είναι τετρασθενές και στην κατάσταση αυτή όποιαδήποτε, έστω και τοπική, παραγωγή του υπεροξειδίου υδρογόνου εκκλύει την ρίζα υδροξυλίου που είναι σε μέγιστο βαθμό τοξική για το DNA.

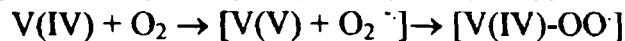
Ακόμη δε σημαντικότερα γεγονότα είναι δυνατόν να συμβούν στην διαδικασία της λιπούπεροξειδωσης (Byczkowski and Kulkarni, 1992). Μια, τυπική περίπτωση έναρξης της λιπούπεροξειδωσης πραγματοποιείται και αυτή δια μέσου του OH[·] (αναφέρεται στο κεφ. 1):



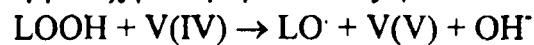
Εξίσου καλά η απόσπαση ατόμου υδρογόνου από το λιπίδιο μπορεί να γίνει με διαμεσολάβηση της περοξοβαναδυλικής ρίζας:



Η περοξοβαναδυλική ρίζα όμως δύναται να σχηματισθεί επί βραχέος από το V(IV) και μοριακό οξυγόνο, μπαίνοντας ευθύς στην αλληλεπίδραση με το λιπίδιο:



Εκ των παραπάνω βλέπουμε πως η λιπούπεροξειδωση είναι δυνατόν να εκκινηθεί από το V(IV) και O₂ χωρίς να προϋπάρχει μια ρίζα. Όταν δε στο περιβάλλον του βαναδίου ήδη ευρίσκονται κάποια προϊόντα λιπούπεροξειδωσης, για την περαιτέρω παραγωγή ριζών δεν χρειάζεται καν συμμετοχή του μοριακού οξυγόνου:



Τα ανωτέρω αποτελέσματα των Byczkowski and Kulkarni προέκυψαν *in vitro* σε συγκεντρώσεις βαναδίου 1mM, οι οποίες είναι ουσιαστικά πολύ μεγάλες για άφοβη επέκτασή των προς ωλοκληρωμένα ζωντανά συστήματα. Το ερώτημα συνίσταται στο αν οι ενδοκυττάρια συγκεντρώσεις βαναδίου που επετεύχθησαν στο πείραμά μας και είναι εκατοντάδες φορές λιγότερες, καθορίζουν τα ίδια γεγονότα, και αν τα γεγονότα αυτά επαρκούν για την εξήγηση της παράτασης επιβίωσης που παρατηρήσαμε. Υπάρχουν ενδείξεις ότι χορήγηση 1,2 mM βαναδικού σε πόσιμο διάλυμα οδηγεί στους επίμυς σε μια, εικόνα οξειδωτικού στρες (Oster et al., 1993), αλλά η συγκέντρωση αυτή είναι πάλι 10 φορές μεγαλύτερη από την δική μας.

Γενικώς, μια συνεχής αύξηση της δραστηριότητας ελευθέρων ριζών εντός φυσιολογικού κυττάρου επιφέρει την διαίρεση, έπειτα την απόπτωση και, εάν αυξηθεί περαιτέρω, την νέκρωση. Στα δε καρκινικά κύτταρα το βασικό επίπεδο των ελευθέρων ριζών είναι αυτό της διαίρεσης ή και της απόπτωσης (η τελευταία όμως συμβαίνει σπανίως, διότι το πρόγραμμα τούτο στο νεοπλαστικό κύτταρο έχει θιχθεί (βλ. στο κεφ. 1). Σε καταλλήλως επιλεγμένες, λοιπόν, ίσες συγκεντρώσεις οξειδωτικών παραγόντων οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να ωθήσουν το φυσιολογικό κύτταρο προς τη διαίρεση μόνον, ενώ το κακοήθες - προς την νέκρωση. Επ'αυτής λοιπόν της ασυμμετρίας, όσον και επί του γεγονότος διπλασίας συσσώρευσης του βαναδίου στον κακοήθη ιστό (Rizk and Sky-Peck, 1984), θα μπορούσε να βασισθεί το παρατηρηθέν θεραπευτικό αποτέλεσμα του μετάλλου. Σαφώς, οι έρευνες που έχουμε αποπειραθεί δεν συνηγορούν με τρόπον αποφασιστικό ούτε υπέρ ούτε κατά της υπόθεσης αυτής, θα μπορούσαν όμως να βοηθήσουν να κάνουμε ωρισμένους ισχυρισμούς στα πλαίσιά της.

Αντίθετα από το βανάδιο, η κυστεΐνη είναι αρκετά ισχυρός εκκαθαριστής ελευθέρων ριζών και υποστηρίζει το αντιοξειδωτικό δυναμικό του κυττάρου. Η αντιοξειδωτική της ικανότητα θα ήταν δυνατόν να επιφέρει ένα ευεργετικό αποτέλεσμα με τους εξής τρόπους:

α) δημιουργώντας εντός του κακοήθους κυττάρου υψηλό αναγωγικό επίπεδο που παρεμποδίζει την απαραίτητη προς διαίρεσιν φωσφορυλίωση,



β) ενισχύοντας την δραστηριότητα των αποτοξινωτικών συστημάτων, π.χ. αυτού της γλουταθειόνης.

γ) αναστέλλοντας την συσσώρευση αιμοπεταλίων (Karkabounas et al., 1991, 1996), καθώς η τελευταία διαδικασία παίζει, όπως φαίνεται, έναν ρόλο στην αγγειογένεση του όγκου (Pinedo et al., 1998).

Το πρόβλημα που εγείρεται μετά τρόπον φυσικού, όταν πραγματευόμαστε την ερμηνεία της δράσεως του συμπλόκου, είναι να συμβιβάσουμε τις πιθανολογούμενες οξειδωτικές επενέργειες βαναδίου με τον χαρακτηρισμό της κυστεΐνης ως αντιοξειδωτικού μορίου. Συγκεκριμένα, η συμπλοκοποίηση του βαναδίου με την κυστεΐνη θα μπορούσε να αλλάξει τον τρόπο δράσεως του μετάλλου, αίροντας την οξειδωτική της συνιστώσα. Για να ελέγξωμε αυτό το ενδεχόμενο, μελετήσαμε την ολική πρωτεϊνική φωσφορυλίωση στα HeLa μετά την 16-ωρο επώαση με 50 μM βαναδίου ως VSIf ή VCys.

Σχήμα 17. Ολική φωσφορυλίωση πρωτεϊνών στα HeLa με τη μέθοδο Western Blot. (Liasko et al., αδημοσίευτα).

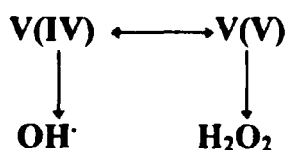


- 1 - 0 μM V (έλεγχος).
- 2 - 50 μM V ως VSIf.
- 3 - 50 μM V ως VCys.

Ούτως διεπιστώθη, ότι η προβαλλόμενες εικόνες φωσφορυλίωσης των VSIf και VCys ομοιάζουν μεταξύ των και είναι παραπλήσιες προς εκείνη του προκύπτει έπειτα από χορήγηση του υπεροξειδίου υδρογόνου, πράγμα, άλλωστε, γνωστό, όσον αφορά στο θειϊκό βαναδύλιο. Ο βαθμός φωσφορυλίωσης είναι εντονότερος στην περίπτωση του VSIf, και τούτο ευρίσκεται εν συμφωνία προς τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικής μελέτης μας (στο διάστημα χαμηλών συγκεντρώσεων το VSIf επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των HeLa ισχυρότερα). Η εικόνα, λοιπόν, της μετάδοσης σήματος της VCys εξακολουθεί να είναι παρόμοια προς αυτήν του H_2O_2 , πράγμα που αποτελεί ένδειξη ενδοκυττάριου οξειδωτικού στρες.

Εκτός των ανωτέρω, μια συγκεκριμένη δόση αντιοξειδωτικής ουσίας ενίοτε έχει παράδοξη δράση επί της παραγωγής ελευθέρων ριζών, ιδίως παρουσία μορίων που

μπορούν να οξειδώνονται και να ανάγονται κατ'επανάληψιν. Ενώ σε αρκούντως υψηλές δόσεις η παρουσία αντιοξειδωτικού προλαβαίνει πλήρως την παραγωγή ελευθέρων ριζών, μια χαμηλότερη δόση, αντίθετα, όχι μόνο την επιτρέπει, αλλά και επαναφέρει το οξειδωθέν μόριο στην αναχθείσα μορφή, συμβάλλοντας έτσι στην δημιουργία ενός είδους εκκρεμούς. Στην περίπτωση ειδικώς του βαναδίου:



ένα αναγωγικό μέσο, εάν είναι σε υψηλή συγκέντρωση, μπορεί να καταστείλει το εκκρεμές, συγκρατώντας το μέταλλο στην βαθμίδα +4, εξουδετερώνοντας ταυτόχρονα τις επιβλαβείς ιδιότητές του, μέσω εκκαθαρισμού τον τελικού προϊόντος της αντίδρασης Fenton (ρίζα υδροξυλίου). Μια δε μέτρια συγκέντρωση αναγωγικού μέσου προωθεί το εκκρεμές, ενώ αδυνατεί να εξουδετερώσει αποτελεσματικώς τις βλαβερές συνέπειές του.

Γενικότερα, η δράση ενός μεμονωμένου αντιοξειδωτικού εξαρτάται από την συνολική αντιοξειδωτική στάθμη του κυττάρου, την αρτιότητα ολόκληρου του συστήματος αντιοξειδωτικής προστασίας. Σ'ένα κακόηθες κύτταρο, όπου το αντιοξειδωτικό καθεστώς ήδη έχει διαταραχθεί, μια ουσία με αναγωγικές ιδιότητες μπορεί κάλλιστα να προξενεί περαιτέρω οξειδωτική ανισορροπία, καθώς παράγει ένα ενδιάμεσο ενεργό προϊόν που χρειάζεται εξουδετέρωση, η οποία ελλείπει στο κακόηθες κύτταρο (όπως, π.χ. το NADPH μετατρέπει το ανιόν υπεροξειδίου σε υπεροξειδίο υδρογόνου, το οποίο εν συνεχεία εξαλείφεται από την καταλάση, η δραστηριότητα της οποίας, όμως, είναι στα καρκινικά κύτταρα σεσημασμένως μικρότερη).

Οι ως άνω παρατηρήσεις αποκτούν περισσότερη βαρύτητα υπό το φως της μελέτης κυτταροτοξικής επίδρασης των VCys και VSIf. Προφανώς, είναι οι *in vitro* διαφορές των ενώσεων μετά από 0,5 mM και άνω, που σχετίζονται με τα *in vivo* πειράματα (έστω και για τον απλό λόγο ότι και στα δυο φαινόμενα υπερτερεί η VCys). Η σημαντική διαφορά των εφηρμοσθέντων *in vitro* συγκεντρώσεων και της *in vivo* δοσολογίας δεν πρέπει να μας απασχολεί ιδιαίτερα. Εν πρώτοις, η χρόνια χορήγηση θα έπρεπε να συνεπιφέρει κάποια συσσώρευση μετάλλου σε πλειοψηφία ιστών. Για παράδειγμα, χορήγηση σε επίμυς 1,2 mM διαλύματος V κατά την διάρκεια 3-ών εβδομάδων συνεπάγεται τουλάχιστον 88-πλάσια συσσώρευση του μετάλλου στο ήπαρ (Oster et al., 1993). Κατά δεύτερον δε λόγον, ο ουδός τοξικότητας στα *in vitro* πειράματα πέφτει δραματικά με την αύξηση του χρόνου έκθεσης. Η συγκέντρωση που απαιτείται για την ολοκληρωτική εξαφάνιση των κυττάρων μειώνεται 20-πλάσια με αναδιπλασιασμό του χρόνου έκθεσης, είναι δηλαδή 50 μM V για, 48-ωρο επώαση (Cruz et al., 1995) και τούτο έχει επαληθευθεί στις συνθήκες της κυτταροκαλλιέργειάς μας.

Το γεγονός της ποσοτικής προσθετικής θεραπευτικής δράσης της VCys στο αναλυτικό πείραμα υπαινίσσεται ότι αυτή αποτελείται από τη δράση του V συν ταύτη της Cys. Δεν φαίνεται παραδεκτό όμως η κυστεΐνη να ασκεί αντιοξειδωτική δραστηριότητα στο κακόηθες κύτταρο από κοινού με το βανάδιο και δια τούτου να προκύπτει αντικαρκινικό αποτέλεσμα. Οι συνολικές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών, που απαιτούνται για τη συγκράτηση του ενδοκυττάρου αντιοξειδωτικού δυναμικού σ'ένα σταθερώς υψηλό επίπεδο, είναι πολλαπλάσιες των χρησιμοποιηθεισών εκ μέρους μας. Παραδείγματος χάριν, ένας συνδυασμός ασκορβικού, α-τοκοφερόλης, σεληνίου και μερκαπτοπροπιονυλ-γλυκίνης αναστέλλει την προκαλούμενη με χορήγηση του B(a)P

λιπούπεροξειδωση σε επίμυς σε δόσεις αντίστοιχα 2 g, 0,42 g, 2 mg και 15 mg ανά ημέρα (Kalrouzos, 1996), ενώ η δόση της Cys στο πείραμά μας ήταν μόνο 3,71 mg / kg / ημέρα.

Πολλά θα μπορούσαν να υποθεθούν με ευλογοφάνεια και χωρίς πειραματική υποστήριξη στο σημείο τούτο. Λόγου χάριν ότι οι τελικές δράσεις αμφοτέρων των συνιστωσών του συμπλόκου διαδραματίζονται ως ένα μεγάλο βαθμό σε διαφορετικά σημεία του χώρου. Υπέρ αυτού συνηγορεί και η αυξημένη πρόσληψη του βαναδίου εκ μέρους των κακοήθων κυττάρων. Ενδεχομένως το σύμπλοκο διασπάται σε μεγάλο ποσοστό πριν φθάσει στο κύτταρο, οπότε η κυστεΐνη ασκεί την δράση της αμέσως, π.χ. δι' αναστολής της αγγειογένεσης του όγκου είτε ενίσχυσης της αποτοξινωτικής δραστηριότητας στο επίπεδο του οργανισμού, ενώ το βανάδιο κατευθύνεται εντός του καρκινικού κυττάρου. Πρέπει γενικά να παρατηρήσουμε ότι η κυστεΐνη, όντας ένα φευγαλέο μόριο, και να φθάσει στο κύτταρο συμπλοκοποιημένη με βανάδιο, οξειδώνεται γρήγορα και η δραστηριότητά της εκλείπει, ενώ το ιόν VO^{2+} είναι δραστήριο ενόσω παραμένει εντός του κυττάρου.

Από άλλης πλευράς και εν όψει αυτού που είπαμε προ ολίγου για τις ιδιαιτερότητες κακοήθων κυττάρων, φαίνεται πιθανόν η κυστεΐνη να παίζει διαφορετικό ρόλο στο φυσιολογικό και στο κακοήθες περιβάλλον. Γνωρίζουμε ότι τα μικρά αντιοξειδωτικά μόρια., όπως το ασκορβικό, αποδυναμώνουν τις τοξικές εκδηλώσεις βαναδίου (Domingo et al., 1986) και η συμπλοκοποίηση αυξάνει την απορρόφησή του. Έτσι, στο επίπεδο του οργανισμού η κυστεΐνη θα επιδρούσε ως αντιοξειδωτικός προστατευτικός παράγων και, πιθανώς, η επίδραση αυτή θα ήταν και ισχυρότερη από εκείνη της μόνης κυστεΐνης, λόγω μειωμένης οξείδωσης στο σύμπλοκο. Μια αντιοξειδωτική ενίσχυση στην γενική κυκλοφορία θα μπορούσε: α) να υποστηρίξει το ανοσοποιητικό, ελαττώνοντας το χαρακτηριστικό για τους καρκινοπαθείς γενικό οξειδωτικό στρες, β) να στερήσει τα μεθιστάμενα κακοήθη κύτταρα από την προστασία αιμοπεταλίων (βλ. κεφ. 1). Έτσι και η παράτηρημένη απουσία μεταστάσεων στην ομάδα της VCys λαμβάνει μια λογική εξήγηση.

Σε περίπτωση, αντιθέτως, που το βανάδιο οξειδώνεται τοπικά προς το V(V), τα μικρά αντιοξειδωτικά μόρια, είναι σε θέση να το ανάγουν χωρίς διαμεσολάβηση ενζύμων σε V(IV). Αυτή η διαδικασία καθ'εαυτήν ήδη μπορεί να ενέχει παραγωγή ελευθέρων ριζών. Τούτο υπεστηρίχθη για το ασκορβικό οξύ και πεντασθενές βανάδιο παρουσία φωσφορικού (Ding et al., 1994). Όταν σ' αυτό το μίγμα προστεθεί το υπεροξείδιο υδρογόνου, εκλύεται η ρίζα υδροξυλίου, οι δε απαιτούμενες συγκεντρώσεις ασκορβικού είναι σχετικά χαμηλές. Οπότε, σε συνθήκες αντιοξειδωτικής αστάθειας εντός όγκου και κακοήθους κυττάρου, η κυστεΐνη θα την ενίσχυε, παράγοντας ενδιάμεσα ενεργά προϊόντα και επανανάγοντας το βανάδιο. Τα πειράματα πάντως επί HeLa κυττάρων παρέχουν ένδειξη ότι τα πλεονεκτήματα του συμπλόκου διατηρούνται στο κυτταρικό επίπεδο, και, επομένως, η κυστεΐνη είτε λειτουργεί από κοινού με το βανάδιο μ' έναν τρόπο τοξικό για τα κακοήθη κύτταρα, είτε προάγει την μεταφορά του μετάλλου, αυξάνοντας έτσι τις ενδοκυττάριας συγκεντρώσεις του.

Οι τοξικολογικές μελέτες της παρούσας διατριβής ερμηνεύονται καλά στα πλαίσια της θεραπευτικής αρχής συμπλοκοποίησης μετάλλων σε τοξικές δόσεις. Στο πείραμα οξείας τοξικότητας η παρατηρηθείσα τοξική επίδραση της VCys οφείλεται αδιαμφισβήτητα στο βανάδιο. Η LD_{50} της L-κυστεΐνης αποτελεί περίπου 1,5 gr / kg, ενώ η κεχορηγημένη στο σύμπλοκο ποσότητα κυστεΐνης συνέστησε ~285 mg / kg. Συνάγεται επομένως από τα αποτελέσματά μας, ότι οι θεραπευτικές δόσεις του συμπλόκου, σε σχέση με το VSI, μπορούν να αυξηθούν, ως προς το V, ~2,5 φορές αφόβως, τουλάχιστον όταν πρόκειται για βραχυπρόθεσμο θεραπεία. Η συμπλοκοποίηση του βαναδίου πρέπει να παραμένει ισχυρή κατά τα πρώτα 24-ωρα, καθιστώντας το μέταλλο ως έναν μεγάλο βαθμό μη ενεργό, έως ότου τούτο αποβληθεί ή

διασκορπισθεί σε περιφερειακούς ιστούς και η συγκέντρωσή του να πέσει κάτω του ορίου που θα προκαλούσε σοβαρές τοξικές αντιδράσεις. Η συμπλοκοποίηση αυτή, εύλογο να υποθέσει κανείς, θα επωφελούσε μεγάλως κατά τις σύντομες εξ εφόδου θεραπείες καρκίνου (όπως στον Cruz et al., 1995).

Όταν όμως εφαρμόζεται χρόνια χορήγηση, τα αποτελέσματα του πειράματος LD₅₀ δεν είναι καθοριστικά και αυτό για δυο προφανείς λόγους: το σύμπλοκο μπορεί να είναι βραχύβιο σε σύγκριση με τον χρόνο εκδήλωσης τοξικότητας, έπειτα δε η διακίνηση του μετάλλου μπορεί να αλλάξει σημαντικά υπό την επήρεια της οργανικής συνιστώσας. Το ότι η 9-εβδομαδιαία χορήγηση αμφοτέρων των μορφών βαναδίου σε δόσεις έως και 16,8 mg / kg / ημέρα ουδεμίαν εμφανή τοξικότητα επιφέρει, επιτρέπει να προσανατολισθούμε στην ανεύρεση βελτίστης δοσολογίας εντός του πλαισίου αυτού. Η απώλεια σωματικού βάρους στην ομάδα του VSIf εξηγείται επαρκώς από την προγενέστερη παρατήρηση γαστρεντερικών διαταραχών, διάρροιας και αφυδάτωσης κατά τη λήψη ανόργανων αλάτων βαναδίου (Tsatsoulis et al., 1994). Η δε αντίθετη τάση στην ομάδα της VCys πιθανότατα προκύπτει ως αποτέλεσμα μεταβολισμού της κυστεΐνης.

Επισκοπώντας εν συνόλω τα ανωτέρω θα μπορούσαμε να προβάλλουμε το συμπέρασμα ότι η συμπλοκοποίηση του βαναδίου με την κυστεΐνη αυξάνει την αντικαρκινογόνο ισχύ του, ενώ η τοξικότητα του ιχνοστοιχείου, αντιθέτως, μειώνεται. Οι βιολογικής σημασίας επιδράσεις του βαναδίου υφίστανται, πιθανόν, μετατόπιση, οι αιτίες της οποίας θα πρέπει να αναζητηθούν τόσο στην κινητική του συμπλόκου, όσο και στην αλληλεπίδρασή του με το ειδικό περιβάλλον του κακοήθους κυττάρου.

Στο σημείο τούτο η πορεία των ερευνών μας έχει αποπερατωθεί, ενώ επί τη βάσει των ως άνω μελετηθέντων διανοίγονται πολλές νέες ελκυστικές δυνατότητες. Ασφαλώς, ο αναγνώστης βεβαιώθηκε ως προς το πόσο πολύπλοκη και σχεδόν απέραντη είναι η προβληματική και πως η συμβολή μας είναι ελάχιστη σε σύγκριση με αυτήν. Ελπίζουμε όμως ότι το παρόν έργο, εκτός των θεωρητικών και πρακτικών συμπερασμάτων του, θέτει σοβαρά ερωτήματα που απαιτούν περαιτέρω έρευνα δια να απαντηθούν ουσιαστικώς.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.

Βάσει των μελετών που έχουν εκτεθεί στην παρούσα διατριβή, θα μπορούσαν να συναχθούν τα εξής συμπεράσματα:

1. Το σύμπλοκο βαναδίου (III) με την L-κυστεΐνη κατέχει μίαν αντικαρκινογόνο δράση, έναντι του προκεκλημένου υπό B(a)P λειομυοσαρκώματος, μεγαλύτερη από αυτές των συνιστωσών της, η οποία εκδηλώνεται

1.1. Στην παράταση επιβίωσης των πειραματοζώων.

1.2. Στην σχεδόν πλήρη αναστολή εμφάνισης μεταστάσεων.

2. Τουλάχιστον ένα σημαντικό μέρος της αντικαρκινογόνου ισχύος της VCys οφείλεται σε αντιδράσεις κυτταρικού επιπέδου, καθώς η τοξικότητα της VCys για τα HeLa κύτταρα ήτο κατά πολύ ισχυρότερη από αυτήν του VSIf.

3. Καίτοι το μεν άτομο βαναδίου του συμπλόκου υφίσταται στο υδατικό διάλυμα ραγδαία οξείδωση προς το V(IV), εν τούτοις τα μόρια κυστεΐνης φαίνεται να συγκρατούνται συμπλοκοποιημένα, σ' αυτή δε την κατάσταση το βανάδιο και οι κυστεΐνες προστατεύουν αλλήλους αποτελεσματικώς από την περαιτέρω οξείδωση.

4. Κατά συνέπειαν, η VCys κατέχει μίαν εκσεσημασμένην αντιοξειδωτικήν ικανότητα έναντι της ABTS-ρίζας, αντιθέτως από το VSIf και την Cys. Η σταθερότης αυτή του συμπλόκου και οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες πιθανώς έχουν σχέση με την παρατηρημένη αναστολή μεταστάσεων.

5. Οι τοξικολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι ένα μεγάλο φάσμα δυνητικών θεραπευτικών σχημάτων με την VCys μπορεί να εφαρμοσθεί, καθώς το σύμπλοκο

5.1. Είναι περίπου 2,5 φορές ολιγότερο τοξικό από το VSIf κατά την εφ'άπαξ χορήγηση μεγάλων δόσεων.

5.2. Συνεπιφέρει ολιγότερες παρενέργειες κατά την χρόνια χορήγηση (συγκεκριμένα, δεν συνεπάγεται απώλεια βάρους).

6. Με αφειτηρία τα ανωτέρω διανοίγεται ένα πεδίο έρευνας, όπου η VCys θα ηδύνατο

6.1. Να εξετασθεί λεπτομερέστερα με σκοπό την κλινική πλέον εφαρμογή της.

6.2. Να τεθεί ως εργαλείο μελέτης, προκειμένου να κατανοήσωμε βαθύτερα εκείνα τα σημεία στην διαδικασία της κακοήθους εξαλλαγής που επηρεάζει.



ΠΕΡΙΛΗΨΙΣ.

Το βανάδιο ανήκει σε ιχνοστοιχεία με εκτεταμένες βιολογικές δράσεις, εκ των οποίων αξίζει να μνημονευθούν η αναστολή φωσφατασών, λόγω αναλογίας του V(V) με το ανιόν φωσφόρου, με συνακόλουθο μεταβολή γονιδιακής έκφρασης, καθώς και οι ινσουλινομιμητική και αντικαρκινογόνος δράσεις του μετάλλου. Η συμπλοκοποίηση βαναδίου, όπως αποδεικνύει η αντιδιαβητική έρευνα, μπορεί να αυξήσει την δοσολογία σημαντικώς, δίχως να μεταβληθεί η βιοδραστικότητα του ιχνοστοιχείου. Στα πλαίσια, όμως, αντιμετώπισης καρκίνου τα σύμπλοκα βαναδίου δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς.

1. Δύο καινούρια σύμπλοκα τρισθενούς βαναδίου με την L-κυστεΐνη (VCys) και με την 2-μερκαπτοπροπιονύλ-γλυκίνη (VMPG) εδοκιμάστησαν από θεραπευτικής και προληπτικής απόψεων επί πειραματικών λειομυοσαρκωμάτων Wistar επιμύων. Οι όγκοι προεκλήθησαν σε όλα τα πειραματόζωα στην ηλικία 5 μηνών με υποδόρια έγχυση 10,08 mg βενζο(α)πυρενίου στην περιοχή της διξιάς ωμοπλάτης, ενώ ο διαχωρισμός καθ' ομάδες έγινε ως εξής:

- ομάδα ελέγχου - καμμία επιπρόσθετος αγωγή,
- πρόληψη με VMPG - χορήγηση VMPG (0,5 mg V / kg / ημέρα), αρχίζοντας 2 εβδομάδες πριν την έγχυση καρκινογόνου και έως του θανάτου των πειραματοζώων,
- πρόληψη με VCys - χορήγηση VCys όπως στο (β),
- θεραπεία με VMPG - χορήγηση VMPG (0,5 mg V / kg / ημέρα), αρχίζοντας 3 μήνες μετά την έγχυση καρκινογόνου και έως του θανάτου των πειραματοζώων,
- θεραπεία με VCys - χορήγηση VCys όπως στο (δ).

Η ομάδα θεραπείας με VCys ανέδειξε 3 περιπτώσεις *ιάσεως*, ενώ, όσον αφορά στα υπόλοιπα πειραματόζωα αυτής της ομάδος, το μέσο διάστημα επιβιώσής των (335,5 ημέρες) ήταν σημαντικώς παρατεταμένο σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (171,8 , $p < 0,01$) και με τις άλλες ομάδες (188,1 , $p < 0,05$), οι οποίες δεν έδειξαν σημαντική διαφορά ως προς την ομάδα ελέγχου.

2. Εξέταση των ηλεκτρονικών φασμάτων ορατού υπεριώδους (UV-vis electronic spectra) και φασμάτων ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού συνεχούς κύματος (cwEPR-spectra) της VCys κατόπιν έκθεσης του διαλύματος σε O_2 του αέρος έδωσε τις εξής τιμές:

UV-vis	cwEPR	
μεθανόλη, 32 ώρες σε O_2	ύδωρ, 30'' σε O_2	
$[\lambda_{max}, nm(\epsilon, M^{-1}cm^{-1})]$	$A(cm^{-1} \times 10^4)$	$g(x,y,z)$
781(18)	$A_x = 64$	$g_x = 1,983$
592(10)	$A_y = 66$	$g_y = 1,983$
203(3700)	$A_z = 171$	$g_z = 1,945$

Τα ως άνω φάσματα είναι σχεδόν ταυτόσημα με εκείνα ενός πρότυπου συμπλόκου V(IV) με κυστεΐνη και παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι το άτομο βαναδίου εντός του συμπλόκου οξειδούται προς την βαθμίδα +4, ενώ το περιβάλλον ένταξής του είναι πιθανότατα ή N_2O_2 ή NO_3 .

3. Ο προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας της VCys και των μεμονωμένων συνιστωσών της (V(IV) ως θειϊκού βαναδυλίου - VSIf και κυστεΐνης - Cys) με την μέθοδο εταιρείας Randox C^o (ABTS radical cation photometric assay) ανέδειξε την VCys ως έχουσα αντιοξειδωτική ικανότητα σεσημασμένης σταθερότητας:

Ουσίες σε υδατικό διάλυμα.	Χρόνος από στιγμής παρασκευής, min.	Ολική αντιοξ. ικανότητα, mM Trolox.	Περίοδος πλήρους αναστολής, % Trolox.
Cys	10	0,43	35,3
Cys	300	0,00	0,0
VCys	10	0,76	37,7
VCys	300	0,68	54,1
VSIf	10	0,00	0,0

4. 24-ωρος επώαση HeLa κυττάρων με διάφορες συγκεντρώσεις VCys και VSIf έδωσε τα κάτωθι αποτελέσματα:

Συγκέντρωση (μM).	Αριθμός επιβιωσάντων HeLa σε κυτταρομετρικό πεδίο Bauer.		Πιθανότητα της H ₀ .
	VSIf	VCys	
0	75,59 ± 10,58		
10	67,44 ± 6,92	74,81 ± 7,85	
20	57,31 ± 5,57	70,75 ± 8,78	p<0,05
35	50,88 ± 6,39	63,81 ± 4,91	p<0,01
50	31,19 ± 1,80	31,69 ± 3,65	
100	31,70 ± 2,46	30,28 ± 2,55	
250	29,31 ± 6,38	28,56 ± 5,40	
500	23,44 ± 2,52	16,63 ± 3,65	p<0,01
750	8,06 ± 1,75	0,56 ± 0,40	p<0,001
1000	6,00 ± 1,28	0,06 ± 0,12	p<0,001

Σημείωση. Η έκφραση της συγκέντρωσης σε μM αφορά στο καθαρό βανάδιο.

Εξ ού προκύπτει ότι οι κυτταροτοξικές δράσεις των ενώσεων εκδηλώνονται στο διάστημα συγκεντρώσεων 0,5 - 1 mM, με την VCys να είναι πλέον αποτελεσματική.

5. Η *in vivo* καρκινοθεραπευτική ικανότητα της VCys αντιπαρατέθη προς αυτές του VSIf και της Cys σ'ένα πείραμα μεθοδικώς παρόμοιο προς το (1) και απεδείχθη κατά προσέγγισιν προσθετική προς τις συνιστώσες της, όπως διαφαίνεται από τις τιμές του δείκτη αντικαρκινογόνου ισχύος, προς καθορισμόν του οποίου πρέπει να προσδιορισθεί ένα ενδιάμεσο μέγεθος, η καρκινογόνος ισχύς του B(a)P στην εκάστοτε ομάδα, σύμφωνα με τον τύπο: $KI[B(a)P] = \text{ποσοστό εμφάνισης θανατηφόρου καρκίνου (\%)} / \text{διάστημα επιβίωσης των αποθανόντων από καρκίνο (ημέρες)}$. Αντικαρκινογόνος ισχύς (AI) λοιπόν μιας ένωσης *i* σε αφηρημένες μονάδες ίσον: $AI_i = \{KI[B(a)P]_{\text{ομάδος ελέγχου}} - KI[B(a)P]_{\text{ομάδος με } i}\} \times 100$.

Με την αντικαρκινογόνο ισχύ των ενώσεων συσχετίζεται η μέση ταχύτητα αύξησης όγκου (ΤΑΟ), εκπεφρασμένη ως προσαύξηση του ποσοστιαίου βάρους όγκου ανά ημέρα:

Ομάδα	AI (αφηρημ. μονάδες)	ΤΑΟ (% / ημέρα)
Ελέγχου	0	0,234 ± 0,067
Cys	10	0,186 ± 0,092
VSIf	15	0,187 ± 0,082
VCys	21	0,147 ± 0,077



2. Επιπλέον, η χορήγηση VCys ανέστειλε την εμφάνιση μεταστάσεων σε μετά θάνατον ιστοπαθολογικές εξετάσεις κατά 83,4% ($p < 0,01$) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ ουδεμία τέτοια επίδραση μπορεί να αποδοθεί σε VSIf ή Cys.

6. Μελέτη της in vivo οξείας τοξικότητας της VCys μαρτυρούν ότι το σύμπλοκο είναι κατά πολύ λιγώτερο τοξικό για Wistar επίμυς από το VSIf. Η LD_{50} (VCys) απετέλεσεν $324 \pm 24,6$ mg / kg (από βιβλιογραφία, LD_{50} (VSIf) = $74,1 \pm 14,9$ mg / kg), εξ ου, λαμβάνοντας υπ'όψιν την περιεκτικότητα σε V, άγεται το συμπέρασμα ότι οι δόσεις βαναδίου ως VCys μπορούν να είναι ~2,5 φορές υψηλότερες σε σύγκριση με VSIf, όταν πρόκειται για εφ'άπαξ χορήγηση.

7. Χορήγηση των VCys και VSIf σε ημερήσιες δόσεις 16,8 mg / kg / ημέρα κατά την διάρκεια 9 εβδομάδων δεν επέφερε σε επίμυς καμμία σημαντική αλλοίωση της συμπεριφοράς, της εξωτερικής όψεως, των αιματολογικών και βιοχημικών εξετάσεων, καθώς και της ιστολογικής εικόνας ήπατος, νεφρών και πνευμόνων.

Τα αποτελέσματα των ως άνω ερευνών υποδεικνύουν, κατά τη γνώμη μας, την VCys ως αποτελεσματικό σε χαμηλές δόσεις αντικαρκινογόνο παράγοντα, του οποίου περαιτέρω μελέτη δύναται να αποβεί χρήσιμος τόσο στον τομέα κλινικής εφαρμογής, όσο και στην βασική έρευνα.



ANTITUMOR EFFECTS OF ORGANIC COMPLEXES OF VANADIUM.

R. LIASKO, Lab. of Exp. Physiology, Faculty of Medicine, University of Ioannina.

INTRODUCION.

Vanadium (V) is a trace metal, possessing significant antitumor effects on experimental cancer and antiproliferative effects on malignant cell lines cultures. Organic complexes of V, mainly with aminoacids and peptides, have also been proved usefull in antidiabetic studies, whereas they have not been widely investigated against cancer.

In the present study the effects of two V(III) complexes - with N-2-mercaptopropionyl-glycine (VMPG) and mainly L-cysteine (VCys) - on HeLa cell line cultures and tumor bearing Wistar rats are investigated. The study was performed particularly as a comparison to the inorganic salt Vanadyl Sulfate (VSlf) and pure L-cysteine (Cys).

MATERIALS AND METHODS.

PREPARATION OF THE COMPLEXES.

VCys. One portion of solid cysteine [H_2Cys] (2,31 g, 19,07 mmol) was added to a stirred solution of vanadium(III) chloride (1,00 g, 6,35 mmol) in methanol (40 ml). After being stired for ~3 h the green color of the solution changed to olive-green, the cysteine was dissolved completely and the brown-green precipitate was formed. The solid was filtered off, washed with diethyl-ether (2×10 ml) and dried in vacuo. Yield - 1,10 g (40%); vanadium calculated - 11,83%, vanadium found - 11,79%.

VMPG. The same procedure as for the previous complex was followed, except that (a) water was used as a solvent, (b) two equivalents of H3MPG were used and (c) the solvent was evaporated to dryness and the green solid was triturated with nitromethane. Yield - 2,00 g (77%); vanadium calculated - 12,43%, vanadium found - 12,60%.

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE COMPLEXES.

Investigation of which included determination of UV-vis electronic spectra and cw-EPR spectra with or without exposure to atmospheric oxygen. Total antioxidant capacity (TAC) of the substances, mentioned above, dissolved in tap water was also estimated, in vitro, by the ABTS radical cation photometric assay (Radox C^o) and results were expressed in mM of Trolox having antioxidant capacity equivalent to 1mM of the substance under investigation.

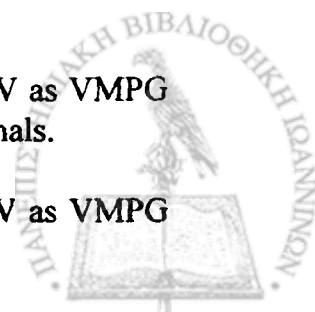
ANTIPROLIFERATIVE EFFECT ON HeLa CELLS.

HeLa cells, cultured in DMEM with 10% fetal calf serum, were incubated for 24 h with 0,01 to 1 mM V as VSlf or VCys. Antiproliferative effects of V compounds were estimated by the dye exclusion method with Trypan blue and cytometry of surviving cells.

PILOT STUDY ON ANIMALS.

Male Wistar rats, 5 months old, injected sc by 10,08 mg of Benzo(a)pyrene [B(a)P] per animal, were randomized into 5 groups as follows:

1. Control. Without any special treatment.
2. Prevention with VMPG. Administration of 0,5 mg / kg b.w. / day V as VMPG orally, starting 2 weeks before the B(a)P-injection till the death of the animals.
3. Prevention with VCys. Administration of VCys as in (2).
4. Treatment with VMPG. Administration of 0,5 mg / kg b.w. / day V as VMPG orally, begun 3 months after the B(a)P-injection.



5. Treatment with VCys. Administration of VCys as in (4).

Animals were followed-up till death, then autopsy and necrotomy were performed, tumors and vital organs were carefully excised, weighted and submitted to histologic examination. Antitumor effect of the various treatments was evaluated by the number of surviving animals and the mean survival time in each group.

COMPARATIVE STUDY OF VCys.

This was methodologically similar to the previous, except that only the therapeutical effects of VCys, VSIf and Cys were investigated. Antitumor effects of the compounds have also been evaluated by histology of tumors, death rate, tumor growth rate and anticarcinogenic potency (AP). The last index was calculated as follows:

$$AP_i = CP[B(a)P]_c - CP[B(a)P]_i, \text{ where}$$

$$CP[B(a)P]_i = \frac{\text{percentage of tumor induction}}{\text{mean survival time}}$$

$CP[B(a)P]_i$ - carcinogenic potency of B(a)P in the i-group.

c - control group.

ACUTE TOXICITY OF VCys.

Was estimated by determination of LD_{50} of VCys in Wistar rats, which has been then compared with the known values for the LD_{50} of VSIf. The animals were divided into 4 groups, 10 per each, and then administered with i.p. injections of VCys, diluted in ddH₂O, at concentrations 280, 320, 360 and 400 mg / kg b.w. The LD_{50} value was calculated in accordance to the method of Spearman-Kerber.

SUBACUTE TOXICITY OF VSIf AND VCys.

The study was performed by the per os administration of 18,6 mg / kg b.w. / day of V, either as VSIf or VCys for 9 weeks. Then the animals were sacrificed and typical in this case haematological, biochemical and histological tests were applied.

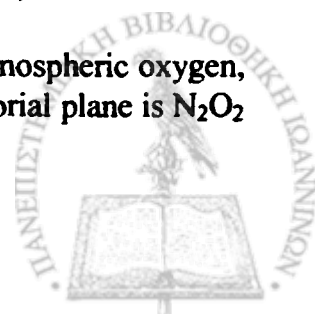
RESULTS.

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE COMPLEXES.

The VCys complex has a magnetic moment of 2,70 $\mu\beta$, as expected for a d^2 system. When the complex is dissolved in water and exposed to air, its UV-vis and cw-EPR spectra are as follows:

UV-vis	cw-EPR	
methanol, 32 h in O ₂	water, 30 s in O ₂	
$[\lambda_{\text{max}}, \text{nm} (\epsilon, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})]$	$A (\text{cm}^{-1} \times 10^4)$	$g (x,y,z)$
781(18)	$A_x = 64$	$g_x = 1,983$
592(10)	$A_y = 66$	$g_y = 1,983$
203(3700)	$A_z = 171$	$g_z = 1,945$

These spectra suggest that the VCys complex, in the presence of atmospheric oxygen, is oxidized to $V^{IV}O^{2+}$ and its coordination environment in the equatorial plane is N_2O_2 or NO_3 .



TAC and LAG-time of substances tested was found as following:

Substances (in solution)	Time from preparation (min)	TAC (mM of Trolox)	LAG-time (% of Trolox)
Cys	10	0,43	35,3
Cys	300	0,00	0,0
VCys	10	0,76	37,7
VCys	300	0,68	54,1
VSIf	10	0,00	0,0

VCys possess a high TAC and LAG-time in water preparations, which is not abolished 5 h after solution preparation, in contrast to VSIf, which does not exhibit any antioxidant capacity.

ANTIPROLIFERATIVE EFFECT ON HeLa CELLS.

The results revealed that both substances (VCys and VSIf) exhibit their toxic effects at concentrations 0,5 - 1 mM, with VCys to be more potent:

Concentration (μ M).	Number of surviving HeLa cells in Bauer field.		Significance.
	VSIf	VCys	
0	75,59 \pm 10,58		
10	67,44 \pm 6,92	74,81 \pm 7,85	
20	57,31 \pm 5,57	70,75 \pm 8,78	p<0,05
35	50,88 \pm 6,39	63,81 \pm 4,91	p<0,01
50	31,19 \pm 1,80	31,69 \pm 3,65	
100	31,70 \pm 2,46	30,28 \pm 2,55	
250	29,31 \pm 6,38	28,56 \pm 5,40	
500	23,44 \pm 2,52	16,63 \pm 3,65	p<0,01
750	8,06 \pm 1,75	0,56 \pm 0,40	p<0,001
1000	6,00 \pm 1,28	0,06 \pm 0,12	p<0,001

Expression of concentration in μ M concerns to pure V.

PILOT STUDY ON ANIMALS.

From the treatments applied, it was the therapy with VCys, which led to a decrease of tumor induction (82,4%), while the mean survival time in this group (335,5 d) also was significantly prolonged in comparison to the control (171,8 d, p<0,01), as well as to the other groups (188,1 d, p<0,05), which did not exert significant difference compared to the control.

COMPARATIVE STUDY OF VCys.

Histology revealed that B(a)P induced the development of soft tissue malignant tumors (leiomyosarcomas) at the site of injection.

There was a significant prolongation of mean survival time of animals treated by VCys (243 \pm 21 d), VSIf (218 \pm 28 d), and Cys (220 \pm 31d) in comparison to control (172 \pm 19 d). Survival of animals treated by the VCys was however significantly prolonged compared to that of the other groups of treatment (p<0,05).

Tumor growth rate (% of body weight / day) in the group of VCys (0,147 \pm 0,077) was also significantly lower than that of the control group (0,234 \pm 0,067). Anticarcinogenic potency of Cys, VSIf and VCys was found 10, 15 and 21 units respectively. There was also a significant (p<0,01) reduction (to 16,6%) in the number

of animals bearing lung metastases in the VCys group, compared to the control, while no difference in the histological grade of tumors was found amongst groups.

ACUTE TOXICITY OF VCys.

The LD50 of VCys was found to be $324 \pm 24,6$ mg / kg, while the LD50 of VSIf is equal to $74,1 \pm 14,9$ mg / kg. Taking into consideration the contents of the compounds in V, it can be asserted, that the VCys is ~2,5 times less toxic concerning acute administration.

SUBACUTE TOXICITY OF VSIf AND VCys.

Administration of either VCys or VSIf, as described above, showed no alterations in hematology, biochemistry and in histology of vital organs, compared to the control group. There was only a very slight increase in body weight in VCys-treated group and, in contrast, a slight loss of body weight in the VSIf group.

DISCUSSION.

Results of our study revealed that the VCys complex possess more potent antiproliferative and antitumor effect than VSIf against soft tissue malignant tumors, which are considered resistance to chemotherapy and radiation, being simultaneously less toxic in rats. The latter may be due to its relatively high and stable in water solution antioxidant capacity.

Antitumor effects of vanadium on cell and animal malignancies can be attributed to a variety of its biological effects, such as increased intracellular concentrations in malignant tumors, inhibition phosphatases, DNA-polymerases and nucleotid transferases. The oxidizing effects of V, induced through its participation to free radical reactions, taking place mainly in malignant cells, may also be involved.

Experimental results as above may indicate the VCys either in the treatment of human malignancies, or as a tool for further experimental anticancer research.

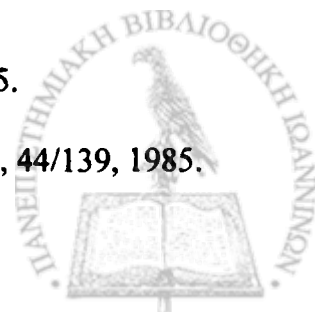


ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

- Ablin R., Soanes W. and Gonder M.: *Urol. Int.*, 34/339, 1979.
- Ackerman's *Surg. Pathol.*, 8th ed., C.V. Mosby Co, St. Louis-Toronto-Washington, 1996.
- Adami S.: *Cancer*, 80(Suppl. 8)/1674, 1997.
- Adamson R., Canellos G. and Sieber S.: *Cancer Chemother. Rep.*, 59/599, 1975.
- Afshari C., Kodama S., Bivins H. et al.: *Cancer Res.*, 53/1777, 1993.
- Albeda S. et al.: *Cancer Res.*, 50/6757, 1990.
- Almendral J. et al.: *Mol. Cell Biol.*, 8/2140, 1988.
- Andreasson A., Oyjord T., Hovig E. et al.: *Cancer Res.*, 53/468, 1993.
- Anghileri L. and Robert J.: *J. Nucl. Med. Allied Sci.*, 26/113, 1982.
- Armstrong B., and Doll R.: *Int. J. Cancer*, 16/617, 1975.
- Armuth V. and Berenblum I.: *Carcinogenesis*, 2/977, 1981.
- Auricchio F., Di Domenico M., Migliaccio A. et al.: *Cell Gr. and Differ.*, 6(2)/105, 1995.
- Austin Gresham G.: *Colour Atlas of Gen. Pathol.*, 2nd ed., Wolfe Publ., London, 1992.
- Baik J., Griffiths S., Giuli G., Manson M., Siegrist S.: *Carcinogenesis*, 12/1035, 1991.
- Baltimore D.: *Cell Biophys.*, 9/17, 1986.
- Bara M., Guet-Bara A., Durlach J. and Collery Ph.: *Trace Elem. Med.*, 9/117, 1992.
- Barry M., Behnke C. and Eastman A.: *Biochem. Pharmacol.*, 40(10)/2353, 1990.
- Bashir I., Sikora K., Foster C.: *Cell Biol. Int.*, 17(10)/907, 1993.
- Bauknecht T., Rung M., Schwall M. et al.: *Gynecol. Oncol.*, 20/147, 1988.
- Baxevanis C., Reclos G., Gritzapis A., Dedousis G., Missitzis I., Papamichail M.: *Cancer*, 72/491, 1993.
- Beahrs O., Henson D., Hutter R. et al.: *Manual for Staging of Cancer*, 3rd ed., Philadelphia, 1992.
- Benabe J., Cruz-Soto M., Martinez-Maldonado M.: *Am. J. Phys.*, 246/317, 1984.
- Berggren M., Burns L., Abraham R., Powis G.: *Cancer Res.*, 53/1862, 1993.
- Bergmann I., Siepman I., Kleiert P. et al.: *Folia Heamatol.*, 115(5)/455, 1988.
- Bergstrom P., Johnson A., Cavallin-Stahl E., Bergenheim T. and Henriksson R.: *Eur. J. Cancer*, 33(1)/153, 1997.
- Bernier M., Laird D., Lane M.: *J. Biol. Chem.*, 263(27)/13626, 1988.
- Bishayee A. and Chatterjee M.: *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.*, 19(3)/83, 1993.
- Bishayee A. and Chatterjee M.: *Anticancer Res.*, 15(2)/455, 1995a.
- Bishayee A. and Chatterjee M.: *Br. J. Cancer*, 71(6)/1214, 1995b.
- Bishop M.: *Cell*, 42/23, 1985.
- Blasi F.: *BioEssays*, 15/105, 1993.
- Bodgen J., Higashino H., Lavenhar M., Bauman J., Kemp F., Aviv A.: *J. Nutr.*, 112/2279, 1982.
- Bonfiglio T., Stoler N.: *Hum. Pathol.*, 19/621, 1988.
- Bosch F., Hatzoglou M., Park E., Hanson R.: *J. Biol. Chem.*, 265(23)/13677, 1990.
- Boyd D., Kustin K.: *Adv. in Inorg. Biochem.*, 6/312, 1984.
- Breuer M.: *Radiat. Envir. Biophys.*, 30(3)/181, 1991.
- Brichard S., Assimacopoulos-Jeannet F., Jeanrenand B.: *Endocrinol.*, 131/311, 1992.
- Brichard S., Bailey C., Henguin J.: *Diabetes*, 39/1326, 1990.
- Brichard S., Poltier A., Henguin J.: *Endocrinol.*, 125/2510, 1989.
- Brittenden J., Heys S., Ross J., Eremin O.: *Cancer*, 77(7)/1226, 1996.
- Broders A., Hargrave R. and Meyerding H.: *Surg. Gynecol. Obstet.*, 69/267, 1939.
- Broghammer W., McConnell K., Grimaldi P., Blotcky A.: *Cancer*, 41/1462, 1978.
- Burger A., Double J. and Newell D.: *Eur. J. Cancer*, 33(4)/638, 1997.



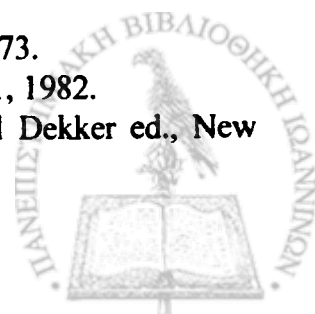
- Burnet F.: *Br. Med. J.*, i: 338, 1965.
- Byczkowski J. and Kulkarni A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1125/134, 1992.
- Byrne A., Kosta L.: *Sci. Total Environ.*, 10/17, 1978.
- Campbell C., Peet M., Ward N.: *Biol. Psych.*, 24/775, 1988.
- Cantley L., Josephson L., Warner R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 252/7421, 1977.
- Cao G. and Prior R.: *Clin. Chem.*, 44(6)/1309, 1998.
- Carpenter G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 102/1115, 1980.
- Carpentier Y., Liautaud-Roger F., Labbe F. et al.: *Anticancer Res.*, 7/745, 1987.
- Catalan R., Martinez A., Aragones M., Godoy J., Robles A., Miguel B.: *Biochem. Med.*, 28/353, 1982.
- Catalan R., Martinez A., Aragones M., Robles A., Miguel B.: *Life Sci.*, 40/799, 1987.
- Chackal-Roy M., Niemeyer C., Moore M., Zetter B.: *J. Clin. Invest.*, 84/43, 1989.
- Chakraborty A. and Chatterjee M.: *Neoplasma*, 41(5)/291, 1994.
- Chakraborty A., Rumi G., Krishna R. et al.: *Oncol.*, 52/310, 1995.
- Chan B. et al.: *Sci.*, 251/1600, 1991.
- Chasteen N.: *Biol. Magnetic Resonance*, Vol. 3, Berliner and Reuben ed., Plenum Press, NY, 1981.
- Chasteen N.: *Struct. and Bonding*, 53/104, 1983.
- Chasteen N., Grady J., Hoolway C.: *Inorg. Chem.*, 25/2754, 1986.
- Chasteen N., Lord E., Thompson H.: *Frontiers in Bioinorganic Chemistry*, ed. VCH Verlagsgesellschaft, 1986.
- Cheng-i W., Al-Bayati M., Culbertson M., Rosenblatt L., Hansen L.: *J. of Toxicol. and Environ. Health*, 10/673, 1982.
- Cherzi R., Caratti C., Andraghetti G., Bertoni S., Montmuro A., Sesti G., Cordera R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 152/1474, 1988.
- Chitambar C., Matthaeus W., Antholine W. et al.: *Blood*, 72/1930, 1988.
- Cholst S.: *Med. Hypoth.*, 46(2)/101, 1996.
- Christofori G., Hanahan D.: *Semin. Cancer Biol.*, 5(1)/3, 1994.
- Chuang W., Liu H., Chang W.: *Cancer*, 65/926, 1990.
- Churchhill P., Churchill M.: *J. Pharm. Exp. Ther.*, 213/144, 1980.
- Clark L.: *Fed Proc.*, 44/2584, 1985.
- Clemens M.: *Klin. Wochenschr.*, 69(21-23)/1123, 1991.
- Coindre J., Trojani M., Contesso G. et al.: *Cancer*, 58/306, 1986.
- Collery Ph., Anghileri L., Morel M. et al.: *Metal Ions in Biol. and Med.*, Vol. 2, Ed. Anastassopoulou, Paris, 1992.
- Collery Ph., Millart H., Kleisbauer J. et al.: *Anticancer Res.*, 14/2299, 1994.
- Collett M. et al.: *Nature*, 285/167, 1981.
- Colvin O.: *Semin. Oncol.*, 24(5)/580, 1997.
- Condeelis J.: *Annu. Rev. Physiol.*, 9/411, 1993.
- Conklin A., Skinner S., Felten T., Sanders C. *Toxicol. Lett.*:11/199, 1982.
- Conquer J., Grima D. and Cruz T.: *Ann. New York Acad. Sci.*, 732/447, 1994.
- Costa J., Wesley R., Glatstein E., Rosenberg S.: *Cancer*, 53/530, 1984.
- Coulombe R., Briskin D., Keller R., Thornley W., Sharma R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 255/267, 1987.
- Crews C. et al.: *Sci.*, 258/478, 1992.
- Cruz T., Morgan A. and Min W.: *Mol. Cell Biochem.*, 153/161, 1995.
- Danen E., van Muijen G., Ruiter D.: *Cancer Surv.*, 24/43, 1995.
- Dano K., Andreasen P., Grondahl-Hansen J. et al.: *Adv. Cancer Res.*, 44/139, 1985.
- Darr D., Fridovich I.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 232/562, 1984.



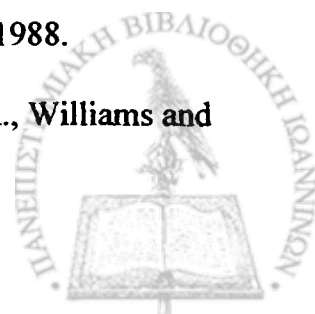
- Daudel P. and Daudel R.: *Chem. Carcinogenesis and Molec. Biol.*, Intersci., New York, 1966.
- Degani H., Gochin M., Karlsh S., Schechter Y.: *Biochem.*, 20/5795, 1981.
- Dei-Tos A., Doglioni C., Laurino L., Barbareschi M. and Fletcher C.: *Histopathol.*, 22/45, 1993.
- Delbet P.: *Bull. Assoc. Franc. Etud. Cancer*, 5/121, 1912.
- Denijn M. and Ruiter D.: *Melanoma Res.*, 3/5, 1993.
- Denung C. and Wolf J.: *J. Urol.*, 42/566, 1939.
- Der C. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79/3637, 1982.
- De Vivo et al.: *J. Biol. Chem.*, 267/18263, 1992.
- Djordjevic C.: In: *Metal ion in biol. systems*, ed: Sigel H. and Sigel A., p. 596-616, Marcel-Decker, New York, 1995.
- Djordjevic C. and Wampler G.: *J. Inorg. Biochem.*, 25/51, 1985.
- DiGiovanni J.: *Pharmacol. Therap.*, 54(1)/63, 1992.
- Dillner J., Kallin B.: *Adv. Cancer Res.*, 50/95, 1988.
- Ding M., Gannett P., Rojanasakul Y., Liu K. and Shi X.: *J. Inorg. Biochem.*, 55(2)/101, 1994.
- DiPolo R., Rojas H., Beauge L.: *Nature*, 281/228, 1979.
- Doll R.: *Cancer*, 45/2475, 1980.
- Domingo J., Gomez M., Sanchez D., Llobet J., Keen C.: *Diabetes*, 43/1267, 1994.
- Domingo J., Llobet J., Tomas J., Corbella J.: *J. of Applied Toxicol.*, 5(6)/418, 1985.
- Domingo J., Llobet J., Tomas J., Corbella J.: *J. of Applied Toxicol.*, 6(5)/337, 1986.
- Dubyak G., Klienzeller A.: *J. Biol. Chem.*, 255/5306, 1980.
- Dunnick J.: *Fundam. Appl. Toxicol.*, 2/114, 1982.
- Eastman A.: *Cancer Cell*, 2/275, 1990.
- El-Badry O., Minniti C., Kohn E. et al.: *Cell Gr. Differ.*, 1/325, 1990.
- Elberg G., Li J. and Shechter Y.: *J. Biol. Chem.*, 269(13)/9521, 1994.
- El-Hag A., Lipsky P., Bennett M., Clark R.: *J. Immunol.*, 136/3420, 1986.
- El-Hag A., Clark R.: *J. Immunol.*, 139/2406, 1987.
- Elias A.: *Semin. Oncol.*, 21(4,S7)/76, 1994.
- English L., Macara I., Cantley L.: *J. Cell Biol.*, 97/1299, 1983.
- Enneking W., Spanier S. and Malawar M.: *Cancer*, 47/1005, 1981.
- Enzinger F. and Weiss S.: *Soft Tissue Tumors*. 3rd ed., Mosby-Year Book, St. Louis, Missouri, 1995.
- Erdmann E.: *Basic Res. Cardiol.*, 75/411, 1980.
- Ershler W. and Longo D.: *Cancer*, 80(7)/1284, 1997.
- Escher G. and Kaufman R.: *Med. Clin. North Am.*, 45(3)/613, 1961.
- Esterbaner H.: In: *Free Rad., Lipid Peroxid. and Cancer*, Acad. Pr., London, 1982.
- Evans R.: *Transplant.*, 14/468, 1972.
- Fagin J. et al.: *Diabetes*, 36/1448, 1987.
- Fajardo L.: *New concept in neoplasia as applied to Diagnostic Pathology*. Williams and Wilkins, Baltimore, p.97-102, 1986.
- Falk K., Rotzschke O., Stevanovic S., Jung G., Rammensee H.: *Nature*, 351/290, 1991.
- Farrell N.: *Transition metal compl. as drugs and chemother. Agents*, 1st ed., ch. 2.4.1., kluwer publ., London, 1989.
- Fearon E. and Vogelstein B.: *Cell*, 61/759, 1990.
- Fidler I.: *Cancer Res.*, 50/6130, 1990.
- Fidler I.: *Acta Oncologica.*, 30(6)/668, 1991.
- Finke J., Zea A., Stanley J., Longo D. et al.: *Cancer Res.*, 53/5613, 1993.
- Flier J. *Annu. Rev. Med.*, 34/145, 1983.



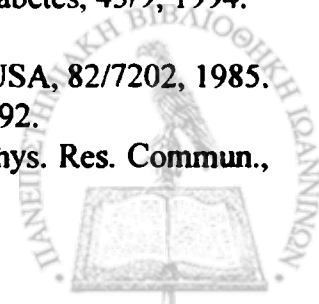
- Friedman M., Hoffman P., Jones H.: *Cancer Treat. Rev.*, 5/185, 1978.
- Fuhrmann G., Schwarz W., Kersten R., Sdun H.: *Biochem. Biophys. Acta*, 20/223, 1985.
- Gasparini G.: *Eur. J. Cancer*, 14/2485, 1996.
- Geller J.: *J. Androl.*, 12/364, 1991.
- Gentleman S., Reid T., Martensen T.: *Exp. Eye Res.*, 44/587, 1987.
- Georgatsou I.: Εισαγωγή στη Βιοχημεία. Εκδ. Γιαχούδη-Γιαγιούλη, Θεσσαλ., 1993.
- Gherardi E. and Stoker M.: *Cancer Cell.*, 3/227, 1991.
- Gleave M., Hsieh J., Gao C., vonEschenbach A., Chung L.: *Cancer Res.*, 51/5753, 1991.
- Gresser M., Tracey A., Parkinson K.: *J. Am. Chem. Soc.*, 108/6229, 1986.
- Guillou P., Ramsden S., Sommers S., Sedman P.: *Br. J. Cancer*, 59/515, 1989.
- Guise T., Yoneda T., Yates A., Mundy G.: *J. Clin. Endocrinol.*, 77/40, 1993.
- Gupta D. and Path F.: In: *Prostate Cancer*, ch. 19, Ed. Jacobi G. and Hohenfellner R., Williams and Wilkins, Baltimore/London, 1982.
- Gutierrez A. et al.: *Lancet*, 339/715, 1992.
- Guyton A. Ιατρ. Φυσιολ., Εκδ. «Γρηγ. Παρισσιανός», 1992.
- Habib F., Lee I., Stich S. and Smith P.: *J. Endocrinol.*, 71/99, 1976.
- Hacker N.: In: *Pract. Gynecol. Oncol.*, ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1994.
- Hadju S.: *Pathol. of Soft Tissue Tumors*, Philadelphia, 1979.
- Hajjar J., Fucci J., Rowe W., Tomicic T.: *Proc. of Soc. for Exp. Biol. and Med.*: 184/403, 1987.
- Haleem I. and Cloverhill F.: In: *Metal ion in biol. systems*, ch. 3, ed. Sigel H. and Sigel A., Marcel Decker, New York, 1995.
- Halliwell B. and Gutteridge J.: *Free rad. in biol. and med.*, 2nd ed., Oxford Univ. Pr., New York, 1989.
- Hammond G.: *J. Endocrinol.*, 78/7, 1978.
- Hanauske U., Hanauske A., Marshal M. et al.: *Int. J. Cell Clon.*, 5/170, 1987.
- Hansen T., Aaseth J., Alexander J.: *Arch. Toxicol.*, 50/195, 1982.
- Haroz R., Thomasson J.: *Toxicol. Lett. Suppl.*, 6/72, 1980.
- Hart I., Fidler I.: *Cancer Res.*, 40/2281, 1980.
- Harvey J.: *Cancer*, 80(Suppl. 8)/1646, 1997.
- Hashimoto H., Komori A., Kosaka M. et al.: *J. Jpn. Obstet. Gynecol. Soc.*, 7/115, 1960.
- Hatch M., Freel R., Goldner A., Earnest D.: *Biochem. Biophys. Acta*, 732/699, 1983.
- Hecht D., Zick Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 188(2)/773, 1992.
- Heide M., Legrum W., Netter K., Furhmann G.: *Toxicol.*, 26/63, 1983.
- Heino J.: *Int. J. Cancer.*, 65(6)/717, 1996.
- Hellman S.: *Cancer*, 79(12)/2275, 1997.
- Herberman R.: *Immunol. Today.*, 8/178, 1987.
- Hersey P., Edwards A., Honeyman M., McCarthy W.: *Br. J. Cancer*, 40/113, 1979.
- Herzfeld A. and Greengard O.: *Cancer Res.*, 37/231, 1977.
- Hesketh R.: *The Oncogenes*, facts book. Acad. Press Lim., San Diego, 1995.
- Heyliger C., Tahiliani A., McNeill J.: *Sci.(Washing.DC)*, 227/1474, 1985.
- Hirata S., Odajima T., Kohama G., Ishigaki S., Niitsu Y.: *Cancer*, 70/2381, 1992.
- Hodivala K. et al.: *Oncogene*, 9/943, 1994.
- Holland J. and Frei E.: *Princ. of endocr. ther.*, ch.14, Philadelphia, 1973.
- Hom G., Chelly J., Jandhyala B.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 169/401, 1982.
- Hopkins L., Mohr H.: *Newer Trace Elements in Nutrition*, Marcel Dekker ed., New York, 1971.
- Hopkins L., Mohr H.: *Fed. Proc.*, 33/1773, 1974.
- Howarth O., Jarrold M.: *J. Chem. Soc. Dalton*, p.503, 1984.



- Huckle W., Earp H.: *Biochem.*, 33(6)/1518, 1994.
- Hudson T.: *Vanadium Toxicol. and Biol. Signif.*, Elsevier Publishing C., Amsterdam, London, New York, 1964.
- Hunter T.: *Cell*, 64/249, 1991.
- Hunter T. and Karin M.: *Cell*, 70/375, 1992.
- Hynes R.: *Cell*, 69/11, 1992.
- Illig K., Maronian N. and Peacock J.: *J. Surv. Res.*, 52(4)/353, 1992.
- Irie K., Irie R. and Morton D.: *Sci.*, 186/454, 1974.
- Itkes A., Imamova L., Alexandrova N. et al., *Exp. Cell Res.*, 188(1)/169, 1990.
- Iwai K., Ido T., Iwata R., Kawamura M.: *Nucl. Med. Biol.*, 16(8)/783, 1989.
- Iwai K., Kimura S., Ido T., Iwata R.: *Nucl. Med. Biol.*, 17(8)/775, 1990.
- Izquierdo M., Scheffer G., Flens M., Schoemaker R., Rome L., Schepper R.: *Cytotechnol.*, 19(3)/191, 1996.
- Jiang W.: *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, 5/375, 1998.
- Johnson R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 218/68, 1982.
- Kaliss N.: *Cancer Res.*, 18/992, 1958.
- Kallistratos G., Donos A., Evangelou A., Fasske E.: *Naturwissenschaften*, 71/160, 1984.
- Kallistratos G., Evangelou A., Agnanti N. et al.: *Materia Med. Greca*, 20(5)/430, 1992.
- Kallistratos G., Evangelou A. and Donos A.: *Εξωγενείς καρκινογόνοι παράγοντες*, Πρακτ. Συνεδρίου, Αθήναι, μάρτιος, 1984.
- Kallistratos G., Fasske E., Donos A., Evangelou A.: *Chimica Chronica*, 13/173, 1984.
- Kallistratos G., Fasske E., Donos A., Kalfakakou V. and Evangelou A.: *Materia Med. Greca*, 10(3)/288, 1982.
- Kalpouzos G.: *Διδακτ. διατριβή, Παν/μιον Ιωαννίνων, Ιωάννινα*, 1996.
- Kanazawa K., Kawasaki H., Kazuyasu S., Ashida H.: *J. Agric. Food Chem.*, 43/404, 1995.
- Karczmar G., Arbeit J., Toy B., Speder A., Weiner M.: *Cancer Res.*, 52(1)/71, 1992.
- Karimine N., Arinaga S., Inoue H. et al.: *Clin. Exp. Immunol.*, 96/484, 1994.
- Karkabounas S.: *Διδακτορική διατριβή, Ioannina Univ.*, 1990.
- Karkabounas S., Evangelou A., Tsukatos D., Sofis G. and Kallistratos G.: *Pathol. Clin.*, 6(3)/163, 1991.
- Karkabounas S., Sofis G. and Evangelou A.: *Επιθεώρ. Κλιν. Φαρμακολ. Φαρμακοκιν.*, 84/91, 1996.
- Kato H., Scaull W.: *Radiatr. Res.*, 90/395, 1982.
- Kazuyasu S., Kazuki K. and Ashida H.: *J. Agric. Food Chem.*, 43/410, 1995.
- Keim D. et al.: *J. Clin. Invest.*, 89/919, 1992.
- Keller R., Coulombe R., Sharma R., Grover T., Piette L.: *Free Rad. Biol. Med.*, 6(1)/15, 1989.
- Kensler T., Taffe B.: *Adv. Free Rad. Biol. Med.*, 2/347, 1986.
- Keohan M. and Taub R.: *Semin. Oncol.*, 24(5)/580, 1997.
- Kerber R.: *Adv. Cancer Res.*, 87/132, 1990.
- Killion J., Fidler I.: *Semin. Oncol.*, 16/106, 1989.
- Kingsnorth A., La Muraglia G., Ross J. and Malt R.: *Br. J. Cancer*, 53(5)/683, 1986.
- Kiremidjian-Schumacher L. and Stotzky G.: *Envir. Res.*, 42/277, 1987.
- Klarlund J., Latini S., Forchhammer: *Biochem. Biophys. Acta*, 971/112, 1988.
- Klein G.: *Sci.*, 238/1539, 1987.
- Klippel K.: In: *Prostate Cancer*, ch. 18, Ed. Jacobi G. and Hohenfellner R., Williams and Wilkins, Baltimore/London, 1982.
- Klominek J., Robert K. and Sundquist K.: *Cancer Res.*, 53/4376, 1993.
- Knekt P., Aromaa A., Maatela J. et al.: *Am. J. Epidemiol.*, 127/28, 1988.



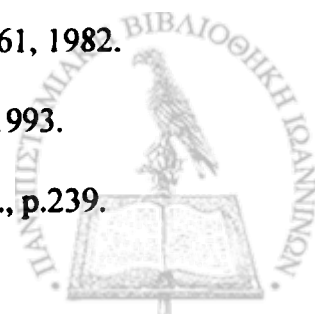
- Knudson A.: Genetics and Cancer. Cancer achievements, challenges and prospects for the 1980s. New York, Stratton eds., Vol. 1, p.381-388, 1981.
- Kohn H., Fry M. Et al.: Eng. J. Med., 310/504, 1984.
- Kolonel L., Nomura A., Hirobata T.: Am. J. Clin. Nutr., 34/2478, 1981.
- Konomoto T., Fukuda T., Hayashi K., Kumazawa J., Tsuneyoshi M.: Hum. Pathol., 29(1)/74, 1998.
- Kopf-Maier P. and Kopf H.: Z. Naturforsch., 84b/805, 1979.
- Kopf-Maier P. and Kopf D.: Chem. Biol. Interact., 44/317, 1983.
- Kumasawa H., Hess M.: Oncol., 48/372, 1991.
- Kung H. et al.: Curr. Top. Microbiol. Immunol., 171/1, 1991.
- Lander H., Levine D., Novogrodsky A.: J. Biochem., 291/281, 1993.
- Lander H., Ogiste J., Teng K., Novogrodsky A.: J. Biol. Chem., 270/21195, 1995.
- Lane P., Ledbetter J., McConnell F., Draves K., Deans J., Schieven G., Clarke E.: J. Immunol., 146/715, 1991.
- Lazaro R., Cross G., McNeill J., Serrano J.: Complexed Vanadium for the Treat. of Diab. Mellitus, Eur. Patent EP 3052 64, 1 March 1989.
- Leake R.: Ann. New-York Acad. Sci., 784/252, 1996.
- LeBoeuf R. and Hoekstra W.: Fed. Proc., 44/2563, 1985.
- LeFever A., Funahashi A.: Cancer Res., 51/5596, 1991.
- Leone A. et al.: Oncogene, 8/855, 1993.
- Liapis H., Flath A., Kitazawa S.: Diagn. Mol. Pathol., 5/127, 1996.
- Liaudet E. et al.: Oncogene, 9/1145, 1994.
- Linsley P., Clark E. and Ledbeller J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87/5031, 1990.
- Liochev S. and Fridovich I.: J. Free Rad. in Biol. and Med., 1/287, 1985.
- Liochev S. and Fridovich I.: Arch. Biochem. Biophys., 255/274, 1987.
- Liochev S. and Fridovich I.: Arch. Biochem. Biophys., 279/1, 1990.
- Liotta L.: Cancer Res., 46/1, 1986.
- Liotta L. and Stetler-Stevenson W.: Natl. Cancer Inst., 81/556, 1989.
- Llobet J., Domingo J.: Toxicol. Lett., 23/227, 1984.
- Llobet J., Gomez M., Sanchez D., Domingo J., Corbella J., Keen C.: Metal Ions in Biology and Medicine, vol.2, Anastassopoulou et al. ed., Paris, p.329, 1992.
- Lloyd D., Phillips D., Carmichael P.: Chem. Res. Toxicol., 10(4)/393, 1997.
- Lloyd D., Carmichael P., Phillips D.: Chem. Res. Toxicol., 11(5)/420, 1998.
- Lloyd J., Nishizava E., Haldar J., Mustard J.: Br. J. Haematol., 23/571, 1972.
- Lloyd J., Nishizava E., Haldar J., Mustard J.: Br. J. Haematol., 24/589, 1973a.
- Lloyd J., Nishizava E., Haldar J., Mustard J.: Br. J. Haematol., 25/77, 1973b.
- Loesche W., Breddin K., Pescarmora G. et al.: Folia Haematol., 115(1-2)/185, 1988.
- Lowe G., Hulley C., Rhodes E., Young A., Bilton R.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 245/17, 1998.
- Lowe G., Slupsky D., Galvani D., Edwards S.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 220/484, 1996.
- Lyonnet M.: Presse Medicale, 1/191, 1899.
- Maciewicz R. et al.: Int. J. Cancer, 43/478, 1989.
- Malabu U., Dryden S., McCarthy H., Kilpatrick A., Williams G.: Diabetes, 43/9, 1994.
- Mallmarn P. and Krebs D.: Zentralbl. Gynakol., 113/685, 1991.
- Mannervik B., Alin P., Guthenberg C. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82/7202, 1985.
- Mannervik B., Awasthi Y., Board P. et al.: J. Biochem., 282/305, 1992.
- Marini M., Zunica G., Bagnara G., Frencheschi C.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 142/836, 1987.
- Markhede G., Angervall L. and Stener B.: Cancer, 49/1721, 1982.



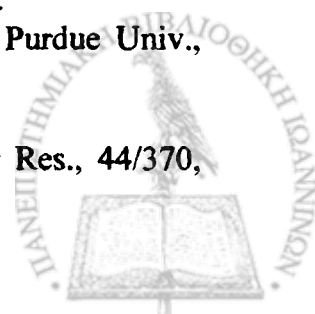
- Marks F.: *Pathol. Res. Pract.*, 182/831, 1987.
- Marks P., Richon V., Rifkind R.: *Int. J. Haematol.*, 63(1)/1, 1996.
- Martin G.: *Nature*, 227/1021, 1970.
- Matrisian L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83/9413, 1986.
- Matsumoto J.: *Med. Hypotheses*, 43(3)/177, 1994.
- Matsuura N., Puzon-McLaughlin W., Irie A. et al.: *Am. J. Pathol.*, 148/55, 1996.
- Matthews N., Neale M., Fiera R., Jackson S., Stark J.: In: *TNF/Cachectin and related cytokines*, p.20-25, 1988.
- Mayes P.: In: *Harper's Biochem.*, 22nd ed., California, 1991.
- McCarthy J. and Furcht L.: *J. Cell Biol.*, 98/1474, 1984.
- McDonald E., Lihtamo H., Hellevuo K., Komulainen H.: *Biol. Trace Elem. Res.*, 16(3)/177, 1988.
- McGuire W.: *Cancer*, 36/638, 1975.
- McLean B.: *Pharmac. Rev.*, 22/429, 1970.
- McLellan L. and Hayes J.: *J. Biochem.*, 245/399, 1987.
- McMillan D., Kernohan N., Heys S., Eremin O.: *Br. J. Cancer*, 67(Suppl. 20)/51, 1993.
- McNeill J., Battell M., Cam M., Dai S., Thompson K., Yuen V.: *Diabetes*, 43/1268, 1994.
- McNeill J., Yuen V., Hoveyda H., Orving C.: *J. Med. Chem.*, 35/1489, 1992.
- McRae W., Stich H.: *Mutat. Res.*, 68/351, 1979.
- Merlino G.: *Semin. Cancer Biol.*, 5(1)/13, 1994.
- Meyerovitch J., Rothenberg P., Schechter Y., Bonner-Weir S., Kahn C.: *J. Clin. Invest.*, 87/1286, 1991.
- Milas M., Yu D., Sun D., Pollock R.: *Clin. Cancer Res.*, 4/1573, 1998.
- Miller W., Dmitrovsky E.: *Curr. Opin. Oncol.*, 3/65, 1991.
- Mirra J.: *Lung Cancer*, 4/6, 1988.
- Mitelman F.: *Catalog of chrom. aberrat. in cancer*, 4th ed., Wiley-Liss, New York, 1991.
- Miyashita T. and Reed J.: *Blood*, 81/151, 1993.
- Moisiadi S., Manakhova L., Gutman N.: *Voprosy Virusologii*, (3)/295, 1983.
- Montero M., Guerri C., Grisolia S.: *Life Sciences*, 28(6)/641, 1981.
- Morita T., Tokue A., Minato N.: *Cancer Immunol. Immunother.*, 32/191, 1990.
- Morrison and Boyd : *Οργ. Χημεία*, 4-η εκδ., Παν/μιον Ιωαννίνων, 1988.
- Moskaluk C., Duray P., Cowan K., Linehan M., Merino M.: *Cancer*, 79(8)/1595, 1997.
- Mouridsen H., Palshof T., Petterson J., Battersby L.: *Cancer Treat. Rev.*, 5/131, 1978.
- Moy P., Holmes E., Golub S.: *Cancer Res.*, 45/57, 1985.
- Mueller-Klieser W.: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 113(2)/101, 1987.
- Muelmatter D., Larsson R. and Cerutti P.: *Carcinogenesis*, 9/239, 1988.
- Murray K.: In: *Harper's Biochem.*, 22nd ed., California, 1991.
- Nakajima M., Irimura T., Di Ferrante D. et al.: *Sci.*, 220/611, 1983.
- Nakajuma H., Mizushima M., Kanai K.: *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 17/327, 1987.
- Nakanishi H., Ohsawa M., Naka N., Uchida A. et al.: *Oncol.*, 54/238, 1997.
- Natali P. et al.: *Br. J. Cancer*, 66/318, 1992.
- Naylor G., Corrigan F., Smith A., Conenly P., Ward N.: *Br. J. of Psych.*, p.656, 1987.
- Nechay B.: *Ann. Rev. Toxicol.*, 24/501, 1984.
- Nechay B., Nanninga L., Nechay P.: *Fed. Proc.*, 45/123, 1986.
- Newell G.: *Cancer Bull.*, 33/33, 1981.
- Newell G.: *Cancer*, 51/2420, 1983.
- Nowell P.: *Sci.*, 194/23, 1976.
- Nicolson G.: *Cancer Metast. Rev.*, 7/143, 1988.
- Nicolson G.: *BioEssays*, 13/337, 1991.



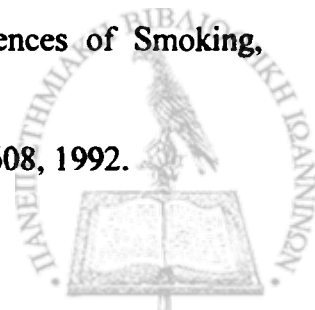
- Nielsen F.: *Advances in Nutritional Research*, Vol.3, Plenum ed., New York, 1980.
- Nielsen F.: *J. Nutr.*, 115/1239, 1985.
- Nielsen F.: *Trace Minerals in Foods*, Marcel Dekker ed., New York, 1988.
- Nielsen F., Myron D.: *Fed. Proc.*, 35/683, 1976.
- Nielsen F., Myron D., Uthus E.: *Trace Element Metabolism in Man and Animals*, ed. Techn. Univ. of Munchen, 1978.
- Nielsen F., Ollerich D.: *Fed. Proc.*, 32/929, 1973.
- Nielsen F., Uthus E.: *Fed. Proc.*, 36/1123, 1977.
- Nilbert M., Mandahl N., Heim S. et al.: *Cancer Genet. Cytogenet.*, 48/217, 1990.
- Nonni A.: *Διδακτ. διατριβή, Παν/μιον Ιωαννίνων, Ιωάννινα*, 1997.
- Nowell P.: *Cancer Res.*, 46/2203, 1986.
- Oka H. et al.: *Cancer Res.*, 53/1696, 1993.
- Old L.: In: *TNF/Cachectin and Related Cytokines*, p.7-19, 1988.
- Olefsky J. *Diabetes*, 39/1009, 1990.
- O'Reilly P., Raab S., Niemann T., Rodgers J. and Robinson R.: *Mod. Pathol.*, 10(2)/91; 1997.
- Ortaldo J., Hiserodt J.: *Curr. Opin. Immunol.*, 2/39, 1989.
- Oster M., Llobet J., Domingo J., German J., Keen C.: *Toxicol.*, 83/115, 1993.
- Ostrow R., Faras A.: *Cancer Metast. Rev.*, 6/383, 1987.
- Papadimitriou K.: *Γεν. Παθ. και Παθ. Ανατ., Ιατρ. Εκδ. Λίτσας, Αθήναι*, 1988.
- Papadimitriou K., Hadgiannakis M.: *Ιατρική*, 67/150, 1995.
- Papaharalampus N.: *Κλιν. Ογκολογία, Εθν. Συμβ. Ογκολογίας, Αθήναι*, 1981.
- Paris A., Pussegur J.: *J. Biol. Chem.*, 262/1970, 1987.
- Pertussia B.: *Curr. Opin. Immunol.*, 3/49, 1991.
- Pigott R. and Power C.: *The Adhesion Molec. Facts Book*, Acad. Press, London, 1993.
- Pillai R.: *Eur. J. Surg. Oncol.*, 18/417, 1992.
- Pinedo H., Verheul H., d'Amato R., Folkman J.: *Lancet*, 352/1775, 1998.
- Pisani R., Kco C., Wolt L., McKean D.: *Am. J. Clin. Pathol.*, 92/435, 1989.
- Pitot H.: *Fundamentals of Oncology*, 3rd ed., New York, M. Dekker, 1986.
- Plessas C., Karaiannakos P., Kouroupis M. et al.: *Επιθεώρ. Κλιν. Φαρμακολ. Φαρμακοκιν.*, 8(3)/167, 1990.
- Pollock R., Lang A., Ge T. et al.: *Clin. Cancer Res.*, 4/1985, 1998.
- Posner B., Faure R., Burgess J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 269(6)/4596, 1994.
- Posner B., Shaver A., Fantus I.: In *New Antidiab. Drugs*, Smith-Gordon, Chapt. 8, London, 1990.
- Post-White J.: *Semin. Oncol.Nursing*, 12(2)/89, 1996.
- Prehn R. and Lappe M.: *Transplant. Rev.*, 7/26, 1971.
- Price J.: *Cancer.*, 66/1313, 1990.
- Primikiriou N.: *Κλιν. Ογκολογία, Εθν. Συμβ. Ογκολογίας, Αθήναι*, 1981.
- Pross H., Lotzova E.: *Natur. Immunol.*, 12/279, 1993.
- Ramanadham M., Kern M.: *Molec. Cell Biochem.*, 51/67, 1983.
- Ramanadham S., Brownsey R., Cross G., Mongold J., McNeill J. *Metabolism*, 38/1022, 1989.
- Rapp U.: *Cancer*, 33(S5)/33, 1997.
- Rasey J., Nelson N. and Larson S.: *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 18/661, 1982.
- Renner H., Munzner R.: *Mutat. Res.*, 103/275, 1982.
- Rijksen G., Voller M. and van Zoelen E.: *J. Cell Physiol.*, 514/393, 1993.
- Rizk S. and Sky-Peck H.: *Cancer Res.*, 44/5390, 1984.
- Robbins W.: *Pathologic basis of disease*, Saunders Internat. Ed, 4th ed., p.239.
- Robertson M., Ritz J.: *Blood*, 76/2421, 1990.



- Roden M., Liener K., Furusinn C. et al.: *Diabetologia*, 36/602, 1993.
- Rogers M., Buensuceso C., Montague F., Mahadevan L.: *Neurosci.*, 60(2)/479, 1994.
- Rozhin J. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164/556, 1989.
- Ruoslahti R.: How cancer spread, *Am. Sci. J.*, Sept. 1996.
- Ryder J., Gordon J.: *Molec. Cell Biol.*, 7/1139, 1987.
- Sachs L.: *Cancer Detect. Prevent.*, 14(5)/539, 1990.
- Saer G., Banister W. and Banister J.: In: *Glutathione: Metabol. and Physiol. Funct.*, CRC Pr., USA, 1990.
- Sakorafas G. and Tsiotou A.: *Ιατρική*, 72(3)/270, 1997.
- Sakorafas G., Glynatsis M.: *Ιατρική*, 67(6)/563, 1995.
- Sardar S., Mondal A. and Chatterjee M.: *Neoplasma*, 40(1)/27, 1993.
- Schantz S., Ordonez N.: *Natur. Immunol. Cell Growth. Regul.*, 10/278, 1993.
- Schechter Y.: *Diabetes*, 39/1, 1990.
- Schechter Y., Karlish S.: *Nature*, 284/556, 1980.
- Schechter Y., Ron A.: *J. Biol. Chem.*, 261/14951, 1986.
- Schechter Y., Shishera A., Lazaro R., Libman J., Shanzer A.: *Biochem.*, 31/2063, 1992.
- Schwartz A. et al.: *Basic Res. Cardiol.*, 75/444, 1980.
- Schwarz K., Milne D.: *Science*, 174/426, 1971.
- Schweckheimer K. and Cavanaugh W.: *Clin. Invest.*, 7/488, 1993.
- Seidman A., Scher H., Heinemann M. et al.: *Cancer*, 68/2561, 1991.
- Seligman P. and Crawford E.: *Proc. ASCO*, 10/168, 1991.
- Sharma H., Maltese J., Zhu X., Kaiser H., Narayanan R.: *Anticancer Res.*, 16(1)/511, 1996.
- Shaver A., Hall D., Lum B., Posner B.: *Inorg. Chem.*, 32/3109, 1993.
- Sheil A.: *Br. Med. J.*: 288/659, 1984.
- Shi X. and Dalal N.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 289(2)/355, 1991.
- Shmookler B. and Lauer D.: *Am. J. Surg. Pathol.*, 7/269, 1983.
- Serrano R., Yiangou Y., Solano R., Sachs J., Pena J.: *J. Immunol.*, 145/3516, 1990.
- Simons T.: *Nature*, 281/337, 1979.
- Sofis G.: *Διδακτ. διατριβή, Παν/μιον Ιωαννίνων*, 1992.
- Soini Y., Vahakangast K., Nuorva K. et al.: *J. Pathol.*, 168/29, 1992.
- Spivack J.: *Int. J. Cell Clon.*, 4/139, 1986.
- Squier M., Cohen J.: *Curr. Opin. Immunol.*, 1/447, 1994.
- Sreekantaian C., Davis J.: *Cancer Genet. Cytogenet.*, 54/115, 1991.
- Srivastava A., Laidler P., Hughes L., Woodcock J., Shedden E.: *Eur. Cancer J. Clin. Oncol.*, 22/1205, 1986.
- Stauss H. and Beverley P.: In: *Human Papiilomaviruses and Cervical Cancer*, ch. 8, Ed.: Stern P. and Stanley M., Oxford Univ. Pr., 1994.
- Steffan R., Pamnani M., Cloush D., Muldon S., Haddy F.: *Hypertension*, 3/1173, 1981.
- Stern A., Davinson A., Wu Q., Moon J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 299(1)/125, 1992.
- Stewart D., Matshela J., Eapen L. et al.: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 28/531, 1994.
- Stracke M., Kohn E., Aznavoorian S. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 153/1076, 1988.
- Stracke M., Krutzsch H., Unsworth et al.: *J. Biol. Chem.*, 267/2524, 1992.
- Strasia C.: *Vanadium: Essetiality and Toxicity in the Laboratory Rat*, Purdue Univ., 1971.
- Stratton M., Moss S., Warren W. et al.: *Oncogene*, 5/1297, 1990.
- Strayer D., Carter W., Mayberry S., Pequignot E., Brodsky I.: *Cancer Res.*, 44/370, 1984.
- Stryer L.: *Βιοχημεία, Παν. Εκδ. Κρήτης, Ηράκλειον*, 1995.



- Sugarbaker P., Cunliffe W., Belliveau J., de Bruijn E., Graves T., Mullins R., Schlag P.: *Semin. Oncol.*, 16(4 Suppl. 6)/83, 1989.
- Sugimura T. and Sato S.: *Cancer Res. Suppl.*, 43/2415, 1983.
- Sundet W., Wang B., Hakumaki M., Goetz K.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 175/185, 1984.
- Synderman C., Heao D., Johnson J., d'Amico F., Barnes L., Whiteside T.: *Arch. Otolaryng. Head Neck Syrg.*, 117/899, 1991.
- Synderman R. and Pike M.: *Sci.*, 192/370, 1976.
- Swarup G., Cohen S., Garbers D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 107/1104, 1983.
- Takahashi S. and Zeydel M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 214/260, 1982.
- Takeichi M.: *Sci.*, 251/1451, 1991.
- Tamura S., Brown T., Dubler R., Lamer J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 113/80, 1983.
- Tamura S., Simon E., Niemann H., Snoek G., Bauer H.: *Molec. Cell Biol.*, 6/4745, 1986.
- Tanaka K., Waxman L., Goldberg G.: *J. Biol. Chem.*, 259/2803, 1984.
- Tasiopoulos A., Deligiannakis Y., Evangelou A., Tsangaris J., Kabanos T.:
????????????
- Tchao R.: *Cell Motil.*, 2/333, 1982.
- Thevenod F., Schulz I.: *Am. J. Phys.*, 255/G429, 1988.
- Thompson H., Chasteen N., Meeker L.: *Carcinogenesis*, 5/849, 1984.
- Tilly B., Tertoolen L., Remorie et al.: *J. Cell Biol.*, 110/1211, 1990.
- Tojo A., Kasuga M., Urabe A., Takaku F.: *Exp. Cell Res.*, 171/16, 1987.
- Tomlinson I.: *Cancer*, 33(9)/1495, 1997.
- Tomlinson I. and Bodmer W.: *Br. J. Cancer*, 75/157, 1997.
- Toth B.: *Int. J. Cancer.*, 9/109, 1972.
- Townsend A., Gotch F. and Davey J.: *Cell*, 42/457, 1985.
- Tracey A., Gresser M., Liu S.: *J. Am. Chem. Soc.*, 110/5869, 1988.
- Trichopoulos D. et al.: *Int. J. Cancer*, 28/691, 1981.
- Trincheri G.: *Adv. Immunol.*, 47/187, 1989.
- Trincheri G., Matsumoto-Kobayashi M., Clark S., Seehra J., London L., Perussia B.: *J. Exp. Med.*, 160/1147, 1984.
- Trojani L., Contesso G., Goindre J. et al.: *Int. J. Cancer*, 33/37, 1984.
- Trush M., Kensler T.: *Free Rad. Biol. Med.*, 10/201, 1991.
- Tsakraklidis V.: *Κλιν. Ογκολογία, Εθν. Συμβ. Ογκολογίας, Αθήναι*, 1981.
- Tsatsoulis A., Evangelou A., Manousakis G., Kabanos T.: *Επιθεώρηση κλιν. φαρμακ. και φαρμακοκινητικής*, 12/123, 1994.
- Tsutsi S., Morita M., Kuwano H., Matsuda H., Mori M., Okamura S. et al.: *J. Surg. Oncol.*, 49/176, 1992.
- Tucker M. and Fraumeni J.: *Soft tissue. Cancer Epidemiol. and Prevent.*, ed. WB Saunders, Philadelphia, 1982.
- Uckun F., Tuel-Ahlgren L., Song C., Waddick K., Myers D., Kirihara J., Ledbetter J., Schieven G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89/9005, 1992.
- Ullrich S., Zeng Z., Jay G.: *Semin. Cancer Biol.*, 5(1)/61, 1994.
- Uotila P.: *Cancer Immunol. Immunother.*, 43(1)/1, 1996.
- USA Departm. Health and Hum. Service, *The Health Consequences of Smoking*, Cancer. Washington, 82/50179, 1982.
- Uthus E., Nielsen F.: *FASEB J.*, 2A/841, 1988.
- Van der Bruggen P. and van der Eynde B.: *Curr. Opin. Immunol.*, 4/608, 1992.
- Varani J.: *Revisiones Sobre Biol. Cell.*, 12/1, 1987.
- Varecka L., Carafoli E.: *J. Biol. Chem.*, 257/7414, 1982.



- Vigo-Pelfrey C.: Membr. Lipid Oxidat., Vol. 1, CRC Pr., Florida, 1990.
- Vijaya S., Crane F., Ramasarman T.: Molec. and Cell Biochem., 62/175, 1984.
- Villa M., Ferrario E., Bergamasco E., Bozzetti F., Cozzaglio L., Clerici E.: Br. J. Cancer, 63/1010, 1991.
- Vleminckx K. et al.: Cancer Res., 54/873, 1994.
- Vogelstein B. and Kinzler K.: Trends Genet., 8/138, 1993.
- Volm M., Mattern J., Efferth T., Pommerenke E.: Anticancer Res., 12/1063, 1992.
- Von Euler V., Hasselquist H. and Von Euler B.: Arkiv. Kemi., 9/583, 1956.
- Vorhert H.: Klin. Wochenschr., 58/167, 1980.
- Waleh N. et al.: Cancer Res., 54/838, 1994.
- Walsh J., Karnes W., Cuttitta F., Walker A.: West. J. Med., 155(2)/152, 1991.
- Wang J., Taraboletti G., Matsushima K., van Damme J., Mantovani A.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 169/165, 1990.
- Warrell R.: Cancer, 80(Suppl. 8)/1680, 1997.
- Warrell R., Danieau L., Coonley C. and Atkins C.: Cancer Treat. Rep., 71/47, 1987.
- Waterfield M. et al.: Nature, 304/35, 1983.
- Weidmann E., Sacchi M., Plaisance S. et al.: Cancer Res., 52/5963, 1992.
- Weinberg E.: How cancer arise. Am. Sci. J., Sept., 1996.
- Weinstock R., Messina J.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 189(2)/931, 1992.
- Weiss L.: Principle of metast., Orlando FL, Acad. Pr., 1985.
- Wiegmann T., Day H., Patak R.: J. Toxicol. Environ. Health, 10/233, 1982.
- Willis R.: The spread of tumors in the human body, Betterworth and Co, London, p.65.
- Willsky G., White D., McCabe B.: J. Biol. Chem., 259/13273, 1984.
- Wurl P., Taubert H., Bache M. et al.: Int. J. Cancer, 69/317, 1996.
- Wybran J., Hellstrom I., Hellstrom K. and Fudenberg H.: Int. J. Cancer, 13/515, 1974.
- Yamagata S. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 158/228, 1989.
- Yin X., Davison A., Tsang S.: Mol. Cell Biochem., 115(1)/85, 1992.
- Yoo J., Lee H., Kang C. et al.: Arch. Pathol. Lab. Med., 121/395, 1997.
- Yukova N., Saveljeva N., Lyalikova N.: Mikrobiologia, 62/597, 1993.
- Zick Y., Sagi-Eisenberg R.: Biochem., 29(44)/10240, 1990.
- Zipfel et al.: Mol. Cell Biol., 9/1041, 1989.
- Zannoni N., Sato P. and Rikans L.: In: Nutr. and drug interrelat., Acad. Pr., New York, 1978.
- Ziroiannis P.: Πρακτ. 3-ου Πανελλ. Συνεδρ. περί του PAF, p.39-59, 1994.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.

1. ΠΕΙΡΑΜΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ.
ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟ-
ΣΤΙΑΙΑ ΒΑΡΗ ΟΓΚΟΥ.

N ^ο	B(a)P		VMPG+BaP		BaP+VMPG		VCys+BaP		BaP+VCys	
	<u>ΔΕ</u>	<u>ΒΟ</u>	<u>ΔΕ</u>	<u>ΒΟ</u>	<u>ΔΕ</u>	<u>ΒΟ</u>	<u>ΔΕ</u>	<u>ΒΟ</u>	<u>ΔΕ</u>	<u>ΒΟ</u>
1	120	45	152	47	113	43	126	37	113	-
2	144	53	162	64	140	39	142	-	142	-
3	145	51	165	36	146	-	149	38	169	54
4	152	34	168	65	163	71	152	-	170	44
5	158	48	172	37	169	51	155	55	172	48
6	158	50	172	35	169	30	160	49	184	42
7	167	52	175	49	170	53	162	46	196	-
8	168	50	177	42	172	40	172	53	196	58
9	170	46	179	63	175	52	179	48	218	48
10	171	49	181	40	179	46	184	58	249	25
11	184	46	188	50	180	43	184	-	279	-
12	184	57	191	-	188	56	191	-	357	-
13	193	52	213	-	205	-	197	-	420	-
14	194	43	219	38	226	52	220	-	634	-
15	213	45	237	65	284	-	338	-	723	-
16	227	41	258	-	320	40			728	-
17					324	41			754	-

ΔΕ - διάστημα επιβίωσης (ημέρες), ΒΟ - βάρος όγκου (%).



2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ VCys.
ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ, ΒΑΡΗ ΣΩΜΑ-
ΤΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΣΤΙΑΙΑ ΒΑΡΗ ΟΓΚΟΥ.

N ^ο	B(a)P				B(a)P+Cys			
	ΔΕ	ΒΣ	ΒΟ	ΠΜ	ΔΕ	ΒΣ	ΒΟ	ΠΜ
1	128	-	-		123	232	30.2	
2	146	-	-		154	-	-	
3	146	395	57.2	-	155	389	43.4	
4	151	-	-		170	362	51.9	
5	168	473	53.7	-	177	259	25.5	
6	172	351	27.1	-	185	380	59.7	
7	176	417	41.7	-	204	247	13.4	
8	193	462	52.4	-	208	258	52.7	
9	204	400	46.0	+	209	280	41.4	
10	204	275	46.5	+	231	309	-	
11	204	256	46.5	+	257	-	-	
12	215	407	57.2	-	258	-	-	
13	222	-	-		270	379	59.9	
14	235	282	46.8	+	270	401	54.9	
15	252	331	51.7	-	293	213	27.2	
16	252	350	57.7	+	310	341	50.1	
17	267	261	45.2	+	341	-	-	
18	345	297	40.1	+	373	-	-	
19					378	247	31.6	
20					404	-	-	
21					412	344	18.3	
-								
N ^ο	B(a)P+VSif				B(a)P+VCys			
	ΔΕ	ΒΣ	ΒΟ	ΠΜ	ΔΕ	ΒΣ	ΒΟ	ΠΜ
1	153	454	59.5		192	227	23.8	
2	161	259	24.7		205	497	51.5	
3	167	259	40.9		205	240	36.7	
4	168	272	26.1		206	431	61.3	
5	182	319	52.7		222	249	17.7	
6	207	274	48.2	-	241	480	57.5	-
7	220	342	44.4	+	245	288	45.1	-
8	229	268	23.5	+	256	-	-	-
9	230	286	51.4	+	264	290	50.7	-
10	246	532	57.3	-	266	364	49.5	-
11	274	279	50.2	+	273	428	41.6	-
12	277	-	-	+	294	287	52.3	-
13	297	342	55.6	-	319	225	20.0	-
14	346	364	39.8	+	330	270	46.3	-
15	352	394	50.5	-	341	347	50.4	-
16	389	253	21.7	-	385	337	48.7	+
17	398	342	41.2		551	201	17.9	
18	813		-		593	247	28.7	-
19	862		-		690	194	10.8	
20	900		-		774		-	
21					825		-	

ΔΕ - διάστημα επιβίωσης (ημέρες), ΒΣ - βάρος σώματος (g),
ΒΟ - βάρος όγκου (%), ΠΜ - παρουσία μεταστάσεων.



3. ΠΕΙΡΑΜΑ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΟΣ.
ΑΥΞΗΣΗ ΒΑΡΟΥΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ.

ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ.
Εβδομάδες.

Ν ^ο	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>
1	60	80	93	106	115	140	146	157	157	165
2	58	74	85	104	108	133	139	150	148	161
3	63	81	96	108	115	139	152	157	161	174
4	53	73	88	97	116	123	133	142	142	155
5	61	80	99	114	124	137	144	156	153	167
6	70	89	99	110	124	132	146	153	154	159
7	73	87	115	130	149	158	168	176	179	193
8	67	79	104	113	132	144	156	164	162	174
9	59	70	94	106	127	134	144	153	154	165

ΟΜΑΔΑ ΜΕ VSif.
Εβδομάδες.

Ν ^ο	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>
1	59	82	102	109	119	136	140	147	146	153
2	62	82	99	114	122	136	143	154	154	161
3	73	96	113	125	137	149	157	165	170	176
4	60	81	101	116	131	136	142	145	142	140
5	64	91	107	116	131	139	144	152	144	156
6	65	86	98	111	132	144	148	157	153	161
7	66	80	94	106	121	131	138	142	151	149
8	56	73	89	108	118	125	122	122	127	117
9	70	84	103	125	136	150	155	163	171	168

ΟΜΑΔΑ ΜΕ VCys.
Εβδομάδες.

Ν ^ο	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>
1	53	76	94	104	115	128	148	159	160	166
2	61	86	102	125	128	137	144	155	160	169
3	65	88	108	122	127	137	156	166	170	175
4	56	80	89	108	116	133	140	158	159	169
5	62	90	100	124	128	148	157	162	166	180
6	61	84	97	116	122	143	158	165	164	174
7	70	89	105	120	139	143	152	158	154	169
8	70	90	106	123	138	137	148	157	151	168
9	68	94	99	115	131	130	153	159	150	167



4. ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΣ ΤΩΝ ΒΑΝΑΔΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΕΠΙ HeLa-ΚΥΤΤΑΡΩΝ.

Σημείωσις. N - αριθμός νεκρών κυττάρων ανά κυτταρομετρικό πεδίο Bauer.

Z - αριθμός ζωντανών κυττάρων ανά κυτταρομετρικό πεδίο Bauer.

VS - θειϊκό βαναδύλιο.

VC - βαναδική κυστεΐνη.

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	2	83	1	56	0	72	1	67
	2	0	41	1	31	1	35	1	35
	3	2	37	0	40	1	31	1	39
Control 0 μM	4	0	76	1	57	4	52	2	57
	5	5	95	4	83	0	64	3	99
	6	3	119	5	133	4	87	4	87
	7	2	96	3	93	0	103	2	112
	8	3	102	4	129	3	110	5	98

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	0	56	0	45	1	61	2	56
	2	1	44	2	46	1	47	1	56
	3	1	58	3	57	3	78	1	57
VS 10 μM	4	1	36	3	42	0	34	1	40
	5	5	74	4	95	5	102	3	78
	6	5	85	5	106	4	77	6	80
	7	6	83	3	68	3	87	3	80
	8	6	90	5	76	3	74	2	90

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	1	47	2	58	5	74	0	61
	2	1	50	3	55	2	66	4	59
	3	2	60	2	55	1	46	4	54
VC 10 μM	4	5	49	0	45	5	54	7	66
	5	1	81	4	89	3	98	0	88
	6	3	108	0	99	2	103	3	93
	7	1	57	5	111	2	77	6	122
	8	4	87	5	106	1	76	1	100

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
VS 20 μM	1	5	78	3	77	1	66	2	64
	2	2	49	1	44	6	42	0	43
	3	2	69	5	55	1	53	2	54
	4	2	62	1	51	2	61	2	49

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	0	69	2	62	4	68	2	75
VC	2	3	105	3	105	2	103	3	63
20 μ M	3	8	67	5	68	9	54	3	63
	4	2	66	2	52	2	63	3	49

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	6	69	2	72	2	62	4	34
VS	2	2	51	2	59	3	58	4	70
35 μ M	3	1	34	3	46	5	34	2	39
	4	1	41	3	52	3	44	2	49

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	2	50	2	55	2	48	0	72
VC	2	9	65	6	66	3	80	2	69
35 μ M	3	2	62	5	68	4	73	3	45
	4	4	73	3	58	4	67	7	70

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	1	28	2	32	2	37	1	35
VS	2	0	36	1	30	1	29	0	28
50 μ M	3	3	26	3	28	2	32	1	30
	4	5	31	3	38	1	27	1	32

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	0	24	0	33	3	26	3	36
VC	2	2	28	2	24	3	29	1	33
50 μ M	3	5	43	5	50	2	37	2	36
	4	3	31	2	22	0	28	3	27

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	4	24	4	35	5	27	5	39
VS	2	5	18	2	29	3	34	3	32
100 μ M	3	3	30	2	33	3	29	2	44
	4	3	27	5	29	3	33	4	37
	5	3	37	6	32	3	33	1	32



ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	3	35	2	44	4	37	4	33
	2	6	30	4	27	2	21	2	32
	3	4	22	5	21	4	11	6	27
VC	4	8	22	4	24	8	26	6	24
100 μM	5	4	39	2	40	2	33	3	34
	6	3	27	2	36	5	34	3	30
	7	3	32	3	35	1	48	1	27
	8	1	32	5	28	2	28	4	30

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	9	29	9	34	11	21	12	13
VS	2	6	50	3	49	6	54	6	41
250 μM	3	7	17	7	9	6	21	12	21
	4	20	18	12	24	19	27	13	24

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	6	19	7	23	6	29	4	21
VC	2	19	57	8	45	9	40	14	27
250 μM	3	11	27	12	19	9	33	12	25
	4	8	22	5	14	11	23	5	33

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	17	26	7	21	7	26	7	25
VS	2	3	27	3	33	5	31	8	26
500 μM	3	23	25	8	20	12	19	17	20
	4	8	15	22	23	9	24	7	14

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	11	17	15	22	8	26	7	21
VC	2	3	10	2	3	10	3	7	10
500 μM	3	3	23	3	19	4	28	7	14
	4	9	13	2	20	2	15	5	22

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	0	4	1	8	2	7	0	2
VS	2	6	4	1	12	1	10	1	7
750 μM	3	5	11	1	6	5	8	8	13
	4	2	10	1	15	8	7	2	5

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	1	1	3	3	1	1	2	1
VC	2	2	1	0	1	0	0	1	0
750 μ M	3	0	0	4	0	2	0	1	1
	4	0	0	1	0	0	0	0	0

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	3	9	4	5	1	3	3	4
VS	2	1	7	2	12	0	8	4	8
1000 μ M	3	5	6	0	8	4	4	0	2
	4	2	5	4	6	3	3	3	6

ΔΙΑΤΑΞΙΣ	ΤΡΙΒΑΙΟ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ							
		1		2		3		4	
		N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
	1	3	0	5	0	4	1	1	0
VC	2	1	0	0	0	0	0	1	0
1000 μ M	3	0	0	1	0	0	0	1	0
	4	0	0	1	0	1	0	2	0

