

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΡΑΠΙΔΑΚΗ ΕΙΡΗΝΗ

Κυτταρογενετικές μελέτες συσχέτισης
δομής και βιολογικής δράσης
νεοσυντεθειμένων στεροειδών εστέρων
Γονοτοξική και αντιλευχαιμική μελέτη του
δραστικότερου εστέρα



Η ΕΡΓΑΣΙΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ
ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΣΤΟ ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

2003-2004



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 3977/1

Ημερ. Εισ.: 04-11-2004

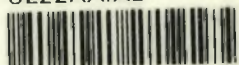
Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2004

ΚΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000075130

373
30-5-04

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΜΙΟΓΛΟΥ-ΚΑΛΟΥΠΤΣΗ – ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
2. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΟΥΡΕΤΑΣ – ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
3. ΖΑΦΕΙΡΟΥΛΑ ΙΑΚΩΒΙΔΟΥ-ΚΡΙΤΣΗ - ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Κατά τη χημειοθεραπεία του καρκίνου επιδιώκεται η πρόκληση σοβαρής βλάβης και η δυνατόν επιλεκτική επί των καρκινικών κυττάρων. είναι γνωστό ότι οι αλκυλιωτικοί παράγοντες προκαλούν μεταβολές στις βάσεις του DNA των νεοπλασματικών κυττάρων καθιστώντας αδύνατο τον περαιτέρω διπλασιασμό των κυττάρων και την επέκταση που προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού τους. Καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου, καθώς και καρκινικά κύτταρα πειραματικών όγκων αποτελούν συνήθη υλικά προκλινικών μελετών για την επίδραση αλκυλιωτικών παραγόντων αλλά και την απόδειξη της ικανότητας αντίστασης στη δράση των αλκυλιωτικών φαρμάκων επισκευάζοντας τις βλάβες στο DNA κυρίως με το μηχανισμό επιδιόρθωσης με εκτομή (D. Mourelatos & συν, 1982, 1983, 1986). Επισημαίνεται ότι η χημειοθεραπεία του καρκίνου συνοδεύεται συνήθως από ανεπιθύμητες παρενέργειες και πολλά αλκυλιωτικά φάρμακα είναι τα ίδια καρκινογόνα ή μεταλλαξιγόνα (Raposa, 1984). Καταβάλλετε ιδιαίτερη προσπάθεια για τη σύνθεση ουσιών που ως δυνητικά φάρμακα θα παρουσιάσουν αυξημένη αντινεοπλασματική δράση συνοδευόμενη με μειωμένη τοξικότητα.

Πολλές προσπάθειες σύνθεσης ουσιών με αντινεοπλασματική δράση και με μειωμένη τοξικότητα απέτυχαν και μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις ελαττώθηκε ο θεραπευτικός τους δείκτης (Πέτρου, 1989).

Ο αδυναμίες αυτές αποτελούν το ερέθισμα για τη σύνθεση τροποποιημένων στεροειδών εστέρων που ως φορείς μεταφέρουν στο στόχο, αποδεκτούς στην κλινική πράξη αλκυλιωτικούς παράγοντες. Μετά από συγκριτικές μελέτες δομής των νεοσυντεθειμένων στεροειδών εστέρων αποδείχτηκε ότι σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότερη βιολογική τους δράση παρουσίαζε προσθήκη καρβαμιδικής ομάδας (-NH-CO-) στο στεροειδικό δακτύλιο. Πιθανολογήθηκε ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η ύπαρξη της καρβαμιδικής ομάδας είναι απαραίτητη για την κυτταροστατική δράση του εστέρα. (Παπαγεωργίου 1983).

Εξαιτίας αυτής της παρατήρησης πρόσφατα σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν νέοι τροποποιημένοι στεροειδείς εστέρες με μουστάρδες αζώτου ως αλκυλιωτικά και με σκοπιμότητα την αποτελεσματικότερη και επιλεκτικότερη δράση επί των καρκινικών κυττάρων (V. Karayianni & συν, 2003, V. Karayianni & συν, 2002, Camoutsis C & συν, 2001).

Με τη συνεργασία των Εργαστηρίων Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών και Γενικής Βιολογίας της Ιατρικής του Α.Π.Θ. σε μια ευρύτερη ερευνητική προσπάθεια απόδειξης της σχέσης δομής και αντινεοπλασματικής δράσης τροποποιημένων στεροειδών εστέρων με μουστάρδες αζώτου εντάσσεται αυτή μας η προσπάθεια.

Οι νεοσυντεθειμένες ουσίες που μελετήθηκαν φέρουν:

α) τροποποιημένο τον στεροειδικό σκελετό. Οι τροποποιήσεις του στεροειδούς αποβλέπουν στην αυξημένη πρόσληψη από τα κύτταρα-στόχους του αλκυλιωτικού παράγοντα και μάλιστα αποσκοπούν στην καλύτερη πρόσδεση του αλκυλιωτικού στο DNA με σκοπό βέβαια όχι την τροποποίηση της μεταγραφικής του λειτουργίας, αλλά την πρόκληση βλαβών επί του DNA.,

β) βενζολικό δακτύλιο ο οποίος λόγω των δομών συντονισμού παρεμβαίνει στην υδρόλυση και την έκλυση του αλκυλιωτικού που ενισχύεται από την παρουσία του χλωρίου στο αλκυλιωτικό,

γ) ως αλκυλιωτικό μουστάρδα αζώτου, ένα ισχυρό αλκυλιωτικό παράγοντα.

Επίσης, δίνεται ιδιαίτερη σημασία στη φύση και την έκταση του ανθρακικού σκελετού των οξέων που ως υποκαταστάτες του βενζολικού δακτυλίου που επιτυγχάνουν την εστερική σύνδεση του αλκυλιωτικού με το στεροειδές τμήμα.

Κριτήρια της κυτταρογενετικής βλάβης αποτέλεσαν ο ευαίσθητος δείκτης γονοτοξικότητας, δηλαδή η συχνότητα των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs, sister Chromatid Exchanges) και ο αξιόπιστος δείκτης κυτταροστατικότητας, του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων (PRI, Prolifiration Rate Index). Χρωματιδιακές ανταλλαγές ορίζονται ανταλλαγές γενετικού υλικού, σε απόλυτα ομόλογες θέσεις, μεταξύ των αδερφών χρωματίδων που βρίσκονται στην αντιγραφική φάση S του κυτταρικού κύκλου. Ο προσδιορισμός της συχνότητας των χρωματιδιακών ανταλλαγών αποτελεί όχι μόνο μια εξαιρετικά ευαίσθητη αλλά και μια χρονικά σύντομη, σχετικά απλή και μικρού κόστους μέθοδο υπολογισμού των βλαβών του DNA ή και των επακόλουθων επιδιορθωτικών μηχανισμών.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν μελέτες σε καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου στην επαγωγή κυτταρογενετικής βλάβης των συγκεκριμένων νεοσυντεθειμένων τροποποιημένων στεροειδών εστέρων. Πιο αποτελεσματική απεδείχθη η ουσία 3β-υδροξυ-17β-ακεταμιδο-7α-αζα-Β-ομο-5-αδροστεν-7-ονη-*p*-*N,N*-δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινοφαινυλοξικός εστέρας ή AK433, της οποίας η κυτταρογενετική δράση επιβεβαιώθηκε, διευρύνοντας το εύρος των συγκεντρώσεων στο ίδιο πειραματικό υλικό. Υποθέσαμε ότι παρόμοια δράση θα πρέπει να ασκεί η ίδια ουσία και στα καρκινικά κύτταρα, εφόσον είναι αποδεκτό ότι αναπτύσσουν επιδιορθωτικούς μηχανισμούς παρόμοιους των φυσιολογικών κυττάρων. Για τον προσδιορισμό της αντινεοπλασματικής δράσης της ίδιας ουσίας σε *in vivo* συστήματα ενοφθαλμίστηκαν στην ενδοπεριτοναϊκή κοιλότητα DBA/2 ποντικών ασκίτικα κύτταρα λεμφοκυτταρικού τύπου P388 λευχαιμία και αξιολογήθηκαν οι ίδιες παράμετροι. Η συσχέτιση των *in vitro* και *in vivo* κυτταρογενετικών παρατηρήσεων με ογκολογικές παρατηρήσεις απορρέει από την περαιτέρω μελέτη του χρόνου επιβίωσης των καρκινοπαθών ποντικών μετά τη χορήγηση της AK433.

Η εργασία περιλαμβάνει Γενικό και Ειδικό μέρος. Για την πληρέστερη κατανόηση του μηχανισμού δράσης των αλκυλιωτικών ουσιών και της πρόκλησης αύξησης των SCEs και πτώσης του PRI, στο Γενικό μέρος επιχειρείται αναφορά στις ιδιότητες των αλκυλιωτικών παραγόντων, και σε αυτούς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Επίσης, γίνεται μία σύντομη αναφορά στους κυριότερους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA που κινητοποιούνται μετά την επίδραση βλαπτικών παραγόντων.

Το Ειδικό μέρος περιλαμβάνει το πειραματικό υλικό, τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν και το πρωτόκολλο των πειραμάτων. Ακολουθεί η έκθεση των αποτελεσμάτων, η στατιστική ανάλυση, η συζήτηση και η εξαγωγή συμπερασμάτων και τέλος αναφέρεται μέρος της σχετικής προσιτής βιβλιογραφίας.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ελευθερία Μιόγλου-Καλουπτσή για την στοργική της συμπαράσταση, τη συνεχή ενθάρρυνση και έμπειρη καθοδήγηση, το αδιάλειπτο ενδιαφέρον και τον πλούτο γνώσεων που μου μετέδωσε, καθώς και τις ατελείωτες ώρες που διέθεσε για την διόρθωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα για τη βοήθεια που μου προσέφερε με τη συμμετοχή του στη τριμελή επιτροπή καθώς και τον χρόνο που αφιέρωσε για τη μελέτη της διπλωματικής μου εργασίας.

Θερμά ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ζαφειρούλα Ιακωβίδου-Κρίτση για τη στοργική της συμπαράσταση, τη συνεχή ενθάρρυνση και έμπειρη

καθοδήγηση, το αδιάλειπτο ενδιαφέρον και τον πλούτο γνώσεων που μου μετέδωσε καθώς και τις ατελείωτες ώρες που διέθεσε για τη διόρθωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζω στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Διονύσιο Μουρελάτο για την αγάπη που μου ενέπνευσε προς την επιστήμη της Κυτταρογενετικής, για τη συνεχή και έμπειρη καθοδήγηση και ενθάρρυνση, το αδιάλειπτο ενδιαφέρον, καθώς και για τον πλούτο γνώσεων που απεκόμισα κατά τη συνεργασία μας σε όλες τις φάσεις της πειραματικής προσπάθειας από τις βαθιές γνώσεις του στο ερευνητικό πεδίο της Κυτταρογενετικής.

Ιδιαίτερα εκτιμώ την πολύτιμη βοήθεια και συμπαράσταση της κ. Πηνελόπης Χατζηθεοδωρίδου, στελέχους της ομάδας Κυτταρογενετικής του Εργαστηρίου, για την πολύτιμη εμπειρία της.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Αθανάσιο Παπαγεωργίου, Διευθυντή του Ερευνητικού Τμήματος του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου «Θεαγένειο» της Θεσσαλονίκης για τη χορήγηση του πειραματικού όγκου.

Θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω την ομάδα του Αναπληρωτή Καθηγητή της Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών του κ. Νικολαρόπουλου που συνέθεσαν και μας παραχώρησαν τις ουσίες ώστε να εκτιμηθεί η βιολογική τους δράση.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Διευθυντή του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Α.Π.Θ., Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Κώτση που μου επέτρεψε να πραγματοποιήσω στο Εργαστήριο τη διπλωματική μου εργασία. Θα ήταν παράληψή μου να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας για την αμέριστη συμπαράστασή τους και το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας σε όλη της διάρκεια από την κατάθεση μέχρι την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αλκυλιωτικοί Παράγοντες

Οι αλκυλιωτικές ουσίες είναι χημικοί παράγοντες οι οποίοι άμεσα ή έμμεσα προσφέρουν αλκυλιωτικές ομάδες με δημιουργία ομοιοπολικών συνδέσεων σε ουσίες αποδέκτες, σε ιόντα, μόρια ή σύμπλοκα.

Οι αλκυλιωτικές ομάδες ως ηλεκτρονιόφιλες ενώνονται με αρνητικά φορτισμένες ομάδες διαφόρων μορίων όπως για παράδειγμα με αμινικές, υδροξυλικές, σουλφυδρικές, καρβοξυτελικές, φωσφορικές, ιμιδαζολικές, αλκυλιώνοντας το οξυγόνο, το άζωτο και το θείο τους αντίστοιχα.

Ηλεκτρόνια μεταφέρονται από την πυρηνόφιλη αλκυλιούμενη ομάδα προς τον αλκυλιωτικό παράγοντα με αποτέλεσμα τη δημιουργία χημικού δεσμού.



όπου RX είναι ο αλκυλιωτικός παράγοντας και

Z⁻ είναι η αρνητικά φορτισμένη ομάδα του μορίου που αλκυλιώνεται

Σχήμα 1: Δημιουργία δεσμών κατά την αλκυλίωση

Η αλκυλιωτική ένωση παρουσιάζει βιολογική δράση όταν οι ουσίες-αποδέκτες αποτελούν συστατικά ενός βιολογικού συστήματος. Στα κυτταρικά στοιχεία που μπορούν να αλκυλιώνονται περιλαμβάνονται πρωτεΐνες νουκλεϊνικά οξέα και άλλες πολλές μικρομοριακές ουσίες. (Παπαγεωργίου, 1983 Brendel & Ruhland, 1984)

Το μεγάλο εύρος των ενδοκυττάρων ουσιών που μπορούν να αλκυλιωθούν είναι μη επιλεκτική διαδικασία και λαμβάνει χώρα με διαφορετική συχνότητα. που δεν εξαρτάται μόνο από τη δραστηριότητα αλλά και από το βαθμό πρόσβασης των αλκυλιωτικών παραγόντων.

Αν και το κυτταρικό DNA δεν είναι το μόριο που αλκυλιώνεται με τη μεγαλύτερη συχνότητα (Brendel & Ruhland, 1984), εν τούτοις οι αλκυλιώσεις στο DNA επιφέρουν γενετικές διαταραχές. Οι αλκυλιωτικές ουσίες εφόσον δρουν στο επίπεδο του DNA χαρακτηρίζονται ως μεταλλαξιγόνες ή τερατογόνες ή καρκινογόνες ή κυτταροτοξικές (Wheller & Alexander, 1969). Αξιοσημείωτο είναι ότι κύτταρα που έχουν τη δυνατότητα να επισκευάζουν βλάβες του DNA εμφανίζονται ανθίσταται περισσότερο στην επίδραση αλκυλιωτικών παραγόντων (Ewin & Kohn, 1977).

Η αλκυλίωση του DNA προκαλεί άτυπη αντιγραφή και/ή μεταγραφή του DNA με αποτέλεσμα διαταραχή βασικών λειτουργιών του κυττάρου, όπως ανάπτυξη διπλασιασμό, μίτωση και διαφοροποίηση. Σε αντίθεση, η αλκυλίωση μορίων μικρού μοριακού βάρους ελάχιστα εμποδίζει την επιβίωση των κυττάρων γιατί τα αλκυλιωμένα αυτά προϊόντα ταχύτατα είναι δυνατόν να αποβληθούν από το κύτταρο ή/και να αντικατασταθούν κατά τους ενδοκυττάρους βιοσυνθετικούς μηχανισμούς (Μπούτης, 1973 Παπαγεωργίου, 1983). Επιπρόσθετα, η αλκυλίωση ουσιών εκτός του DNA, όπως το RNA, συμπλόκων όπως τα ριβοσώματα ή και ενζύμων είναι

δευτερογενείς ή τριτογενείς μεταβολές που δεν έχουν άμεσο αντίκτυπο στο γενετικό υλικό, δρουν παροδικά και μπορούν να αντικατασταθούν.

Με βάση τον αριθμό των δραστικών ομάδων που εμπεριέχουν οι αλκυλιωτικές ουσίες κατατάσσονται σε μονολειτουργικές (μία δραστική ομάδα, monofunctional), διλειτουργικές (δύο δραστικές ομάδες, bifunctional) και πολυλειτουργικές (περισσότερες από μία δραστικές ομάδες, polyfunctional).

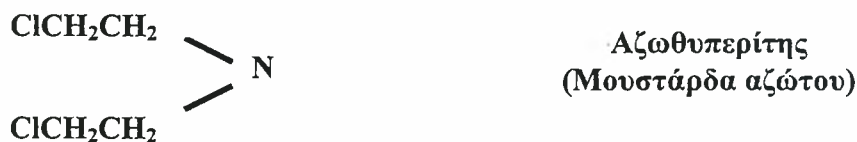
Οι μονοαλκυλιώσεις βάσεων δεοξυριβόζης και φωσφορικών ομάδων του DNA είναι οι απλούστερες βλάβες του DNA που μπορούν να προκληθούν και από τους μονο- και από τους πολυλειτουργικούς αλκυλιωτικούς παράγοντες. Όσον αναφορά την αλκυλίωση βάσεων μπορεί να οδηγήσει είτε στη διάνοιξη του δακτυλίου τους είτε σε αποπυρίνωση που προκύπτει μετά από αυτόματη υδρόλυση του N-γλυκοσυδικού δεσμού είτε δια μέσου ενζυμικής δραστηριότητας των DNA-γλυκοσυλασών. Οι διαδικασίες αυτές μπορεί να έχουν ως επακόλουθο την παραγωγή μονόκλωνων ρήξεων στο DNA (Brendel & Ruhland, 1984).

Οι δι- και οι πολύ-λειτουργικοί αλκυλιωτικοί παράγοντες δημιουργούν εσωτερικές ή εξωτερικές χιαστές συνδέσεις με βάσεις του DNA που μπορεί να είναι εσωτερικές ή εξωτερικές. Οι εξωτερικές χιαστές συνδέσεις αναπτύσσονται ανάμεσα στις βάσεις του ίδιου κλώνου του DNA ενώ οι εσωτερικές χιαστές συνδέσεις βάσεων ανάμεσα στους δύο αντιπαράλληλους κλώνους του DNA. Επιπρόσθετα, αναφέρεται η δημιουργία χιαστών συνδέσεων DNA - πρωτεϊνών.

Η δράση των μονο- και πολύ-λειτουργικών αλκυλιωτικών παραγόντων άμεσα αναστέλλει την αντιγραφή του DNA, αλλά καταστέλλεται και η σύνθεση του RNA και πρωτεϊνών. Η αναστολή της σύνθεσης του DNA πιθανώς προκαλείται από την παρεμπόδιση της έναρξης της αντιγραφής του DNA στα ρεπλικονια και από την ελάττωση του ρυθμού επιμήκυνσης των θυγατρικών κλώνων DNA. Στα θηλαστικά κύτταρα υπάρχουν ενδείξεις ότι οι δι-λειτουργικοί παράγοντες προκαλούν κυρίως αναστολή της έναρξης της αντιγραφής του DNA, ενώ οι μονολειτουργικοί παράγοντες μειώνουν το ρυθμό επιμήκυνσης του θυγατρικού κλώνου του DNA.

Αζωθυπερίτες:

Αζωθυπερίτες ονομάζονται οι ενώσεις που περιλαμβάνουν στο μόριό τους τη ρίζα της διχλωροδιαιθυλαμίνης:



Οι αζωθυπερίτες ανήκουν στην κατηγορία των διλειτουργικών αλκυλιωτικών ουσιών και άρχισαν να χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία των νεοπλασμάτων κατά τα τέλη του Β Παγκοσμίου Πολέμου. Ακόμη και σήμερα παράγωγα της ομάδας αυτής κατέχουν σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Οι χλωροαιθυλικές ρίζες των αζωθυπεριτών προσδίδουν στα μόρια αυτά μεγάλη χημική δραστηριότητα. Οι ηλεκτρονιόφιλες χλωροαιθυλικές ομάδες των αζωθυπεριτών αντιδρούν με πυρηνόφιλες ενώσεις και τις αλκυλιώνουν. Η χλωροαιθυλομάδα για να

μπορέσει να λάβει μέρος στην αντίδραση αλκυλίωσης πρέπει να μετατραπεί σε αιθυλενιμμόνιο που είναι χημικά εξαιρετικά δραστικό. Το αιθυλενιμμόνιο προέρχεται από την ενδομοριακή κυκλοποίηση της χλωροαιθυλικής ομάδας. Η κυκλοποίηση γίνεται αφού απελευθερώνεται το ιόν χλωρίου σε μια αντίδραση που είναι αμφίδρομη. Το αιθυλενιμμόνιο αντιδρά ταχύτατα με πολλά ανόργανα ιόντα και οργανικές ρίζες αφού πάρει τη μορφή του καρβοκατιόντος. (Μπούτης, 1973 Παπαγεωργίου, 1983)

Στο μόριο του DNA η κύρια αντίδραση για τους αζωθυπερίτες και για τις περισσότερες αλκυλιωτικές ουσίες λαμβάνει χώρα στη θέση N-7 της γουανίνης, (Σχήμα 2) (Brookes & Lawley, 1961 Lawley & Brookes, 1963 Lawley, 1966).

Υπάρχουν όμως και άλλες θέσεις στο μόριο του DNA που αποτελούν στόχους αλκυλιωτικών ουσιών, αλλά σε μικρότερο βαθμό από ότι το N-7 της γουανίνης. Αυτές είναι οι N-1, N-3 και O-6 της γουανίνης, οι N-1, N-3 και O-6 της αδενίνης, οι N-3 και O-2 της κυτοσίνης και οι N-3 και O-4 της θυμίνης (Singer, 1976 Kusmierek & Singer 1976 Παπαγεωργίου, 1983 Brendel & Ruhland, 1984).

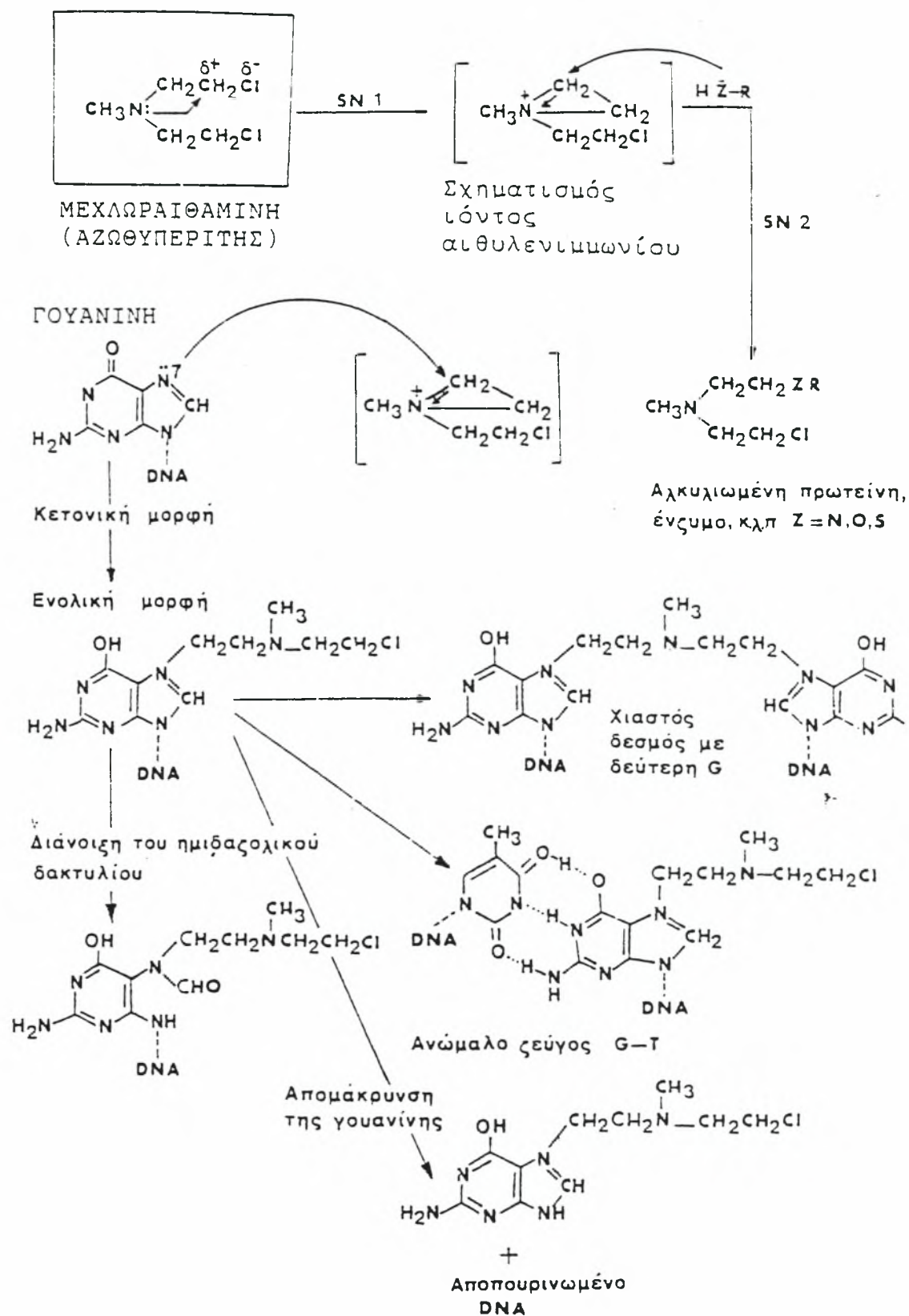
Οι μονοαλκυλίωσεις στο N-7 της γουανίνης δεν θεωρούνται μεταλλαξιγόνες σε αντίθεση με τις αντίστοιχες στο O-6 της γουανίνης, στο N-3 της αδενίνης και στο O-4 της θυμίνης που θεωρούνται δυνητικά μεταλλαξιγόνες (Brendel & Ruhland, 1984).

Οι προκλητές χιαστές συνδέσεις από πολυλειτουργικούς παράγοντες πιστεύεται ότι ευθύνονται για την αυξημένη κυτταροτοξική δράση σε σύγκριση με τους μονολειτουργικούς (Brendel & Ruhland, 1984). Η κυτταροτοξική δράση των αλκυλιωτικών ουσιών μπορεί να εμφανιστεί και σε κύτταρα με μικρό μιτωτικό δείκτη, αλλά είναι εντονότερη σε ταχύτατα πολλαπλασιαζόμενους ιστούς, γεγονός που αποτελεί κριτήριο για τη θεραπευτική χρησιμοποίηση των αλκυλιωτικών παραγόντων. Επιπλέον, οι αλκυλιωτικοί παράγοντες προκαλούν αλκυλίωση του DNA και σε κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία αλλά τα τοξικά φαινόμενα εμφανίζονται μόνο όταν τα κύτταρα δραστηριοποιούνται προς διαίρεση. Σε αυτού του είδους τα κύτταρα υπάρχει χρόνος ώστε να ενεργοποιηθούν οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA και να επισκευάσουν τις βλάβες πριν από την επόμενη κυτταρική διαίρεση, με αποτέλεσμα τη μείωση της κυτταροτοξικής δράσης των αλκυλιωτικών ουσιών (Παπαγεωργίου, 1983).

Παράγωγα του Αζωθυπερίτη:

Ο ελεύθερος δεσμός της αμίνης στους αζωθυπερίτες μπορεί να καταληφθεί με οποιαδήποτε ρίζα σχηματίζοντας ενώσεις που διαφέρουν σημαντικά τόσο στις φυσικές και στις χημικές ιδιότητές τους όσο και στις φαρμακολογικές. Η προσθήκη μιας συγκεκριμένης ομάδας μπορεί να επηρεάσει την ταχύτητα της αντίδρασης αλκυλίωσης και ως ένα βαθμό την εξειδίκευση της κυτταροστατικής δράσης. Έτσι, με την κατάλληλη προσθήκη μπορούν να παραχθούν ενώσεις με επιθυμητές και αποτελεσματικές δράσεις (Μπούτης, 1973).

Ένα παράγωγο του αζωθυπερίτη είναι και η χλωραμπουκίλη. Είναι ένα π-φαινυλοπαράγωγο του αζωθυπερίτη που επιδεικνύει μέγιστη κυτταροτοξικότητα κατά τη G2 ή τη μιτωτική φάση του κυτταρικού κύκλου (Littlefield & συν, 1979). Έχει παρατηρηθεί ότι κατά το μεταβολισμό της χλωραμπουκίλης (CLB), παράγονται πιο δραστικοί μεταβολίτες. Έχει την ιδιότητα να δρα βραδέως και επειδή παρουσιάζει



ΣΧΗΜΑ 2

Μηχανισμός δράσης των αλκυλιωτικών ουσιών.

(Παπαγεωργίου, 1983)

τοπική καυστική αντίδραση, ενδείκνυται η χορήγησή της από το στόμα και προτιμάται για βραδείας ανάπτυξης νεοπλασματικούς όγκους όπως οι χρόνιες λευχαιμίες (Μπούτης, 1973). Παρόλο που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του καρκίνου παρουσιάζονται εκτεταμένες παρενέργειες και απαιτείται η μειωμένη και με αποτελεσματικότερο τρόπο συνδυασμένη χορήγησή της. Το γεγονός αυτό έδωσε το έναυσμα για τη δημιουργία παραγώγων με αποτελεσματικότερη και κυρίως επιλεκτική δράση επί των καρκινικών κυττάρων.

Η πρόκληση της σχεδίασης και η σύνθεση ουσιών που περιείχαν στο μόριό τους στεροειδείς εστέρες συνδεδεμένους με αζωθυπερίτη βασίζεται στην παρατήρηση της αυξημένης παραγωγής υποδοχέων στεροειδών ορμονών τόσο κατά το μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά, όσο και κατά την ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκινικού ιστού.

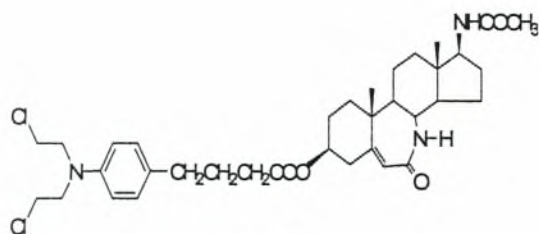
Τα στεροειδικά παράγωγα του αζωθυπερίτη ερευνήθηκαν μετά το 1950 από πολλούς ερευνητές με το σκεπτικό ότι η σύνδεση του στεροειδούς με τον αζωθυπερίτη θα προσέδιδε πλεονεκτήματα από φαρμακολογική άποψη. Θεωρητικά η βιολογική της δράση πιθανώς επιτυγχάνεται με τους παρακάτω μηχανισμούς:

1) Η εν μέρει λιπόφιλη φύση του παραγώγου εξαιτίας του στεροειδικού τμήματος πιθανώς θα διευκόλυνε επιλεκτικά κυρίως την ενδοκυττάρια μεταφορά του αζωθυπερίτη στο νεοπλασματικό κύτταρο-στόχο όπου μετά από πιθανή υδρόλυση του παραγώγου θα αύξανε την τοπική συγκέντρωση του αζωθυπερίτη.

2) Στεροειδή με ειδικές ορμονικές ιδιότητες, όπως ανδρογόνα και οιστρογόνα θα μπορούσαν να κατευθύνουν τον αζωθυπερίτη σε έναν ιστό στόχο με έκτοπη παραγωγή των ορμονών

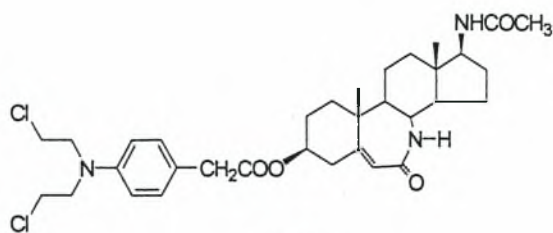
Βάση αυτών των στοιχείων αναμένεται βελτίωση της επιλεκτικής δράσης των φαρμάκων και πιθανώς ελάττωση της τοξικότητας και της γενικής προσβολής των φυσιολογικών ιστών του οργανισμού και αύξηση της αντινεοπλασματικής δράσης (Μπούτης 1973 Παπαγεωργίου 1983).

Αρχικά παρασκευάστηκαν παράγωγα όπου το στεροειδές ήταν απευθείας συνδεδεμένο με τον αζωθυπερίτη με N-C δεσμό. Αργότερα όμως συντέθηκαν ενώσεις όπου παρεμβάλλειτο φαινολοξικό οξύ ή θειοφαινόλη μεταξύ του αζωθυπερίτη και του στεροειδούς. Διαπιστώθηκε ότι είναι αδρανείς ενώσεις όπου το στεροειδές συνδέεται με τον αζωθυπερίτη με σταθερό δεσμό και δεν μπορεί εύκολα να διασπαστεί με αυτόματη ενζυματική υδρόλυση καθώς και ενώσεις με σταθερό δεσμό θείου. Αντίθετα αντινεοπλασματική δράση παρουσιάζουν ενώσεις που διασπώνται εύκολα όπως αυτές στις οποίες το στεροειδικό τμήμα συνδέεται έμμεσα με την αλκυλιωτική ομάδα με εστερικό δεσμό για παράδειγμα του π-φαινολοξικού οξέος. Ο εστερικός δεσμός λοιπόν αποτελεί προϋπόθεση για αντινεοπλασματική δράση αλκυλιωτικού και λαμβάνεται υπόψη στη σύνθεση στεροειδικών παραγώγων του αζωθυπερίτη (Μπούτης 1973 Παπαγεωργίου 1983 Catsoulacos, 1988).



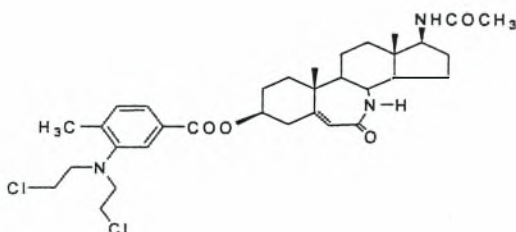
AK 427

3β-hydroxy-17β-acetamido-7α-aza-B-homo-5-androsten-7-one- *p*-*N,N*-bis(2-chloroethyl)aminophenyl butyrate
ΟυσΙΑ 1



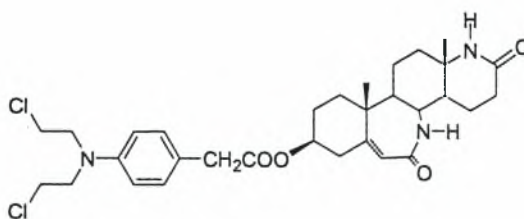
AK 433

3β-hydroxy-17β-acetamido-7α-aza-B-homo-5-androsten-7-one- *p*-*N,N*-bis(2-chloroethyl)aminophenyl acetate
ΟυσΙΑ 2



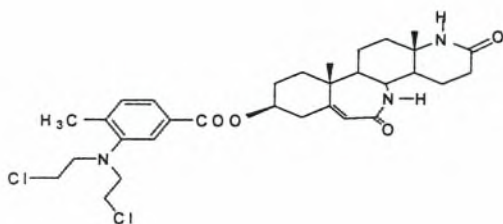
AK 431

3β-hydroxy-17β-acetamido-7α-aza-B-homo-5-androsten-7-one- *p*-methyl-*m*-*N,N*-bis(2-chloroethyl) aminobenzoate
ΟυσΙΑ 3



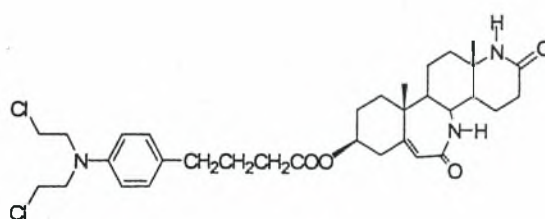
AK 409

3β-hydroxy-7α,17α-diaza-B,D-dihomo-5-androsten-7,17-dione-*p*-*N,N*-bis(2-chloroethyl)aminophenyl acetate
ΟυσΙΑ 5



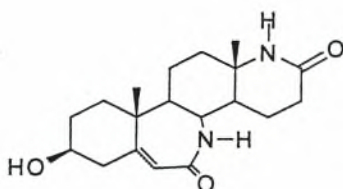
AK 407

3β-hydroxy-7α,17α-diaza-B,D-dihomo-5-androsten-7,17-dione-*p*-methyl-*m*-*N,N*-bis(2-chloroethyl) aminobenzoate
ΟυσΙΑ 4



AK 411

3β-hydroxy-7α,17α-diaza-B,D-dihomo-5-androsten-7,17-dione-*p*-*N,N*-bis(2-chloroethyl)aminophenyl butyrate
ΟυσΙΑ 6



AK 383

3β-hydroxy-7α,17α-diaza-B,D-dihomo-5-androsten-7,17-dione
ΟυσΙΑ 7

Πίνακας 1: Νεοσυντεθειμένοι τροποποιημένοι στεροειδείς εστέρες.

Επιδιόρθωση του DNA

Η ακρίβεια στη κληρονόμηση του DNA των κυττάρων και το σχετικά χαμηλό ποσοστό μεταλλάξεων και χρωμοσωμικών ατυπιών σε φυσιολογικά άτομα προϋδεάζει για την ύπαρξη κατάλληλων επιδιορθωτικών μηχανισμών οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση της σταθερότητας του DNA και τη συμπλήρωση της πιστότητας της αντιγραφής του DNA. Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί διαθέτουν όλα τα κύτταρα και έχουν την ικανότητα να κινητοποιούνται και να επιδιορθώνουν ένα μεγάλο μέρος των λαθών που συμβαίνουν με την επίδραση ορισμένων παραγόντων (χημικών, βιολογικών ή φυσικών). Οι ανεπιδιόρθωτες βλάβες εκδηλώνονται ως μεταλλάξεις ή χρωμοσωμικές ατυπίες ή ακόμη και με το θάνατο του κυττάρου. Στις βλάβες αυτές περιλαμβάνονται τροποποίηση του ζεύγους βάσεων, η θραύση στις απλές και στις διπλές νουκλεοτιδικές αλυσίδες, η χιαστή σύνδεση DNA-DNA εσωτερική ή εξωτερική, ή χιαστή σύνδεση του DNA με τις πρωτεΐνες. Αυτές τις μεταλλάξεις καλούνται να επιδιορθώσουν οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί ώστε να μην εγκατασταθούν και κληρονομηθούν.

Οι κύριοι μηχανισμοί επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA αναφέρονται:

1. Η φωτοεπιδιόρθωση (Photorepair ή Photoreactivation)
2. Η επιδιόρθωση SOS
3. Η επιδιόρθωση με εκτομή (Excision Repair)
4. Η μεταντιγραφική επιδιόρθωση (Post-replication repair)

Φωτοεπιδιόρθωση:

Η διαδικασία της επιδιόρθωσης λαμβάνει χώρα, με τη βοήθεια ενός ενζύμου που ονομάζεται φωτολύαση. Είναι η επαναφορά στη φυσιολογική μορφή των διμερών πυριμιδινών, που δημιουργούνται ανάμεσα σε γειτονικές πυριμιδίνες επί της μίας έλικας του DNA επαγόμενα από την έκθεση κυττάρων σε υπερϊώδη ακτινοβολία. (Carell Thomas & συν, 2001). Οι φωτολύασες έχουν βρεθεί στα βακτήρια, στις ζύμες και στα μαρσιποφόρα, όπως και στα κύτταρα του ανθρώπου (Sutherland B.M., 1974).

Οι φωτολύασες μελετήθηκαν ιδιαίτερα στο επίπεδο του κολοβακτηριδίου όπου αναγνωρίζουν τα διμερή θυμίνης και κυτοσίνης στο DNA. Απουσία φωτός προσκολλώνται σε αυτά, ενώ χρησιμοποιούν το φως (ακτινοβολία μήκους 350nm-450nm) για την εκτομή και την επιδιόρθωση (φωτοενεργοποίηση) (Carell Thomas & συν, 2001, Posnick L.M & Samson L.D., 2001).

Το πρωτεϊνικό τμήμα των διαφόρων φωτολυασών έχει σφαιρική διαμόρφωση και σε ένα θύλακο συνδέεται το συνένζυμο FAD ανάλογα με τον τύπο της φωτολύασης υπάρχει και ένα δεύτερο συνένζυμο που είναι είτε ένα μεθενυλτετραϋδροφολικό (MTHF) ή μία 8-υδροξυ-5-δεαζαριβοφλαβίνη. Απεδείχθη ότι οι φωτολύασες λειτουργούν με τον ίδιο μηχανισμό και έχουν κατάλληλη κατεύθυνση και πολικότητα ώστε να προσαρμόζονται στις βλάβες του DNA και να τις καταλύουν. (Carell Thomas & συν, 2001, Posnick L.M & Samson L.D., 2001)

Επιδιόρθωση SOS

Εκτός από τη φωτοεπιδιόρθωση που για πρώτη φορά έχει επισημανθεί στον μικροοργανισμό *E.Coli*, ανάμεσα στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς συγκαταλέγεται και η αντίδραση SOS, η οποία επίσης έχει ευρέως μελετηθεί. Ανάλογος τρόπος επιδιόρθωσης βεβαίως έχει διαπιστωθεί και σε άλλους οργανισμούς (Defais M.& Devoret R. 2001). Η διαδικασία αυτού του μηχανισμού είναι απλή. Τα διάσπαρτα SOS γονίδια χαρτογραφήθηκαν στο χρωμόσωμα και η έκφραση περισσότερων των δεκαπέντε βασίζεται στη συνεργασία δύο πρωτεϊνών των *lexA* και *recA*. Η πρωτεΐνη *lexA* είναι ένας καταστολέας που συνδέεται στη ρυθμιστική αλληλουχία (SOS box) $taCTGT(at)_4ACAGta$, με ατελής παλινδρομικής δομής και εντοπίζεται στην περιοχή operator. Ο καταστολέας αυτός συνδέεται στις operator περιοχές του *recA* γονιδίου καθώς και άλλων γονιδίων τα οποία ανήκουν το σύστημα SOS και καταστέλλει μερικώς ή ολικώς τη μεταγραφή τους. Τα SOS γονίδια ρυθμίζονται αρνητικά και φυσιολογικά εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα (Defais M.& Devoret R. 2001).

Κατά την απάντηση των SOS γονιδίων η κατασταλτική πρωτεΐνη *lexA* διασπάται. Στο μονόκλωνο τμήμα του DNA, που φέρει τη βλάβη δεσμεύεται η πρωτεΐνη *recA* και ως έναυσμα επάγει την έκφραση των SOS γονιδίων. Το σύμπλοκο μονόκλωνου τμήματος DNA - πρωτεΐνης *recA* αποκτά την ικανότητα να υδρολύει τον Ala-Gly πεπτιδικό δεσμό της πρωτεΐνης *lexA*, με αποτέλεσμα η *lexA* να καθίσταται ανίκανη να δεσμευτεί, και έτσι επάγεται η μεταγραφή πολλών γονιδίων που αποτελούν στοιχεία της επισκευής του DNA, πολυλειτουργική πρωτεΐνη *recA*. Έχει δραστηριότητα πρωτεάσης και μετέχει και στον ανασυνδυασμό του DNA. Μετά την διάσπαση της *lexA*, η *recA* αποσυνδέεται και απελευθερώνεται. Αποικοδόμηση αυτού του καταστολέα οδηγεί επίσης σε αυξημένη σύνθεση των SSB πρωτεϊνών και του συμπλόκου *uvrABC* το οποίο έχει δραστηριότητα πρωτεάσης και αφαιρεί τα διμερή θυμίνης (Stryer L, 1999). Μετά από συσσώρευση μονόκλωνων αλυσίδων DNA δίνεται το έναυσμα για την έναρξη της αντίδρασης SOS, αλλά ενεργοποιείται και σε περιπτώσεις πρόκλησης βλαβών του DNA ακόμη και στην περίπτωση αναστολής της αντιγραφής του. Έτσι στο κύτταρο προκαλείται η εμφάνιση μιας ειδικής πολυμεράσης, της πολυμεράση V. Η πολυμεράση αυτή στην προσπάθειά της να αποκαταστήσει το τμήμα του DNA όπου έχει προκληθεί η βλάβη, εισάγει τυχαία νουκλεοτίδια στο νεοσχηματιζόμενο κλώνο του DNA απέναντι από τα διμερή. Με τον τρόπο αυτό εισάγονται τις περισσότερες φορές λανθασμένα νουκλεοτίδια στο νεοσχηματιζόμενο κλώνο. Θεωρείται μάλιστα επείγουσα ανάγκη για επιδιόρθωση του DNA, ότι δείχνει μια ιδιαίτερη δραστηριότητα με αποτέλεσμα εισαγωγή και εγκατάσταση λανθασμένων νουκλεοτιδίων (Defais M.& Devoret R. 2001, Sayeedur Rahman M. & Zafri Humayun M. 2001). Κατά την επιδιόρθωση ή τον διπλασιασμό του DNA τα νέα λανθασμένα νουκλεοτίδια που ενσωματώθηκαν από της δράση αυτής της ειδικής DNA πολυμεράσης αναγνωρίζονται ως “φυσιολογικά” ζεύγη με αποτέλεσμα η πληροφορία που κωδικοποιείται από αυτά να είναι μεταλλαγμένη και να διαιωνίζεται σε όλα τα θυγατρικά κύτταρα.

Επιδιόρθωση με εκτομή:

Οι τρόποι επιδιόρθωσης με εκτομή σε αντίθεση με άλλους μηχανισμούς, δεν επιδιορθώνουν τις βάσεις που έχουν υποστεί τη βλάβη αλλά τις εκτέμνουν και τελικά τις αντικαθιστούν από νέες. Οι τρόποι επιδιόρθωσης με εκτομή διακρίνονται σε: α) Επιδιόρθωση εκτομής βάσης (Base excision repair, BER), β) Επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδικής περιοχής (Nucleotide excision repair, NER), γ) Επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων (Mismatch repair, MMR).

Κατά τη διαδικασία επιδιόρθωσης εκτομής βάσης αποπουρίνωσης ή άλλης τροποποίησης απαιτούνται πέντε κατηγορίες ενζύμων που με διαδοχικές αντιδράσεις φέρουν σε πέρας την επιδιόρθωση του DNA, περιλαμβάνοντας AP (αποπουρίνωση) θέσεις ή βάσεις οι οποίες έχουν υποστεί κάποια ζημιά. Η αφαίρεση της βάσης από το σκελετό του DNA δημιουργεί μία οπή επί του DNA. Αμέσως αφαιρείται ο παραμένον σακχαρο-φωσφορικός σκελετός του νουκλεοτιδίου από όπου λείπει η βάση. Επόμενο βήμα αποκατάστασης αποτελεί η εισαγωγή ενός νέου νουκλεοτιδίου στο κενό του DNA συμπληρωματικό με το αντίστοιχο της άθικτης μητρικής αλυσίδας. Τέλος, ακολουθεί η σύνδεση του νουκλεοτιδίου με την έλικα του DNA. Με αυτό τον ενζυμικό μηχανισμό επιδιόρθωσης μπορεί να αποκατασταθεί μεγάλος αριθμός βάσεων, οι οποίες έχουν υποστεί βλάβη.

Βέβαια, η τεράστια ποικιλία περιβαλλοντικών μεταλλαξιγόνων παραγόντων όπως χημικών ουσιών, που μπορούν να δημιουργηθούν μετά τη δράση ακτινοβολιών ή οξειδωτικών παραγόντων είναι δυνατό να προκαλέσουν πολλές βλάβες στο DNA που δεν μπορούν να επιδιορθωθούν όλες με εκτομή βάσης. Ένας διαφορετικός, περισσότερο ευέλικτος μηχανισμός είναι η επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίου (nucleotide excision repair, NER). Ο μηχανισμός αυτός αναγνωρίζει τη μη φυσιολογική δομή που αποκτούν περιοχές του DNA που έχουν υποστεί βλάβη και τις εκτέμνει.

Συνοψίζοντας ο μηχανισμός NER περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- ο Αναγνώριση της βλάβης
- ο Δέσμευση ενός πολλαπλού συμπλόκου πρωτεϊνών στην περιοχή της βλάβης
- ο Διπλή τομή στην έλικα σε μία έκταση εκατέρωθεν των νουκλεοτιδίων με βλάβη και αφαίρεση
- ο Αποκατάσταση του ελλείποντος τμήματος από μία επιδιορθωτική DNA πολυμεράση
- ο Σύνδεση των τμημάτων με λιγκάση

Η διαδικασία αυτή κατανοήθηκε καλύτερα μετά από τη μελέτη της στον μικροοργανισμό *E. Coli*. Τρεις πρωτεΐνες, τα προϊόντα των γονιδίων *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση της βλάβης και την εκτομή του DNA. Το μέχρι στιγμής ισχύον πρότυπο αποτελείται από δύο μόρια της πρωτεΐνης *UvrA* που με έναν ATP-εξαρτώμενο μηχανισμό, δημιουργούν ένα σύμπλοκο με ένα μόριο *UvrB*, ικανό να δεσμεύεται στο DNA όπου υπάρχει η βλάβη. Είναι πιθανό ότι το τμήμα του DNA με τη βλάβη αναγνωρίζεται είτε από την αλλαγή της διαμόρφωσης που αποκτά η διπλή έλικα σε αυτή τη περιοχή, είτε συνδέεται στο DNA σε ένα τυχαίο σημείο πλησίον της βλάβης και ολισθαίνει κατά μήκος του DNA προς τη βλάβη όπου και συνδέεται. Περαιτέρω υδρόλυση του ATP διευκολύνει την έκλυση της *UvrA* και την σταθερή δέσμευση της *UvrB* στην περιοχή της βλάβης. Το πρότυπο υποστηρίζεται και από την παρατήρηση της κάμψης του DNA.

Αμέσως, μετά η UvrC πρωτεΐνη συνδέεται με την UvrB, ενεργοποιώντας την UvrB πρωτεΐνη ώστε να υδρολύσει τον φωσφοδιεστερικό δεσμό περίπου τέσσερα περίπου νουκλεοτίδια από το σημείο της βλάβης της έλικας με φορά 3'—5'. Αν κατά την υδρόλυση προκύψει ένα ελεύθερο 3'-OH άκρο στην αλυσίδα, ο μηχανισμός επιδιόρθωσης συνεχίζεται. Με το ίδιο ενεργοποιημένο σύμπλοκο επιτυγχάνεται η υδρόλυση επτά περίπου νουκλεοτιδίων από το 5' άκρο της βλάβης.

Με την απομάκρυνση της πρωτεΐνης UvrC και της UvrB, η DNA πολυμεράση I ή II αναλαμβάνει την προσθήκη νουκλεοτιδίων προς αποκατάσταση της βλάβης. Τέλος με τη βοήθεια της λιγκάσης με έναν ATP εξαρτώμενο μηχανισμό συρράβονται τα δύο άκρα της νεοσυντεθειμένης αλυσίδας και επέρχεται αποκατάσταση της DNA αλυσίδας (Posnick L.M & Samson L.D., 2001).

Σε ανώτερους οργανισμούς, όπως για παράδειγμα στον άνθρωπο, η διαδικασία του μηχανισμού NER φαίνεται να είναι πολυπλοκότερη διαδικασία και πραγματοποιείται με τη συμμετοχή περισσότερων πρωτεϊνών, αν και σε βασικές γραμμές σε όλους τους οργανισμούς πιστεύεται ότι ακολουθείται η ίδια πορεία, είναι αξιοσημείωτο ότι στο επίπεδο του ανθρώπου μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που παίρνουν μέρος σε αυτές τις διαδικασίες είναι αιτία διαφόρων ασθενειών. Για παράδειγμα οι ασθένειες Xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne's syndrome (CS) και trichothiodystrophy (TTD) σχετίζονται με ελαττώματα στις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης (Gehrter D.T. & συν, 2003).

Ένας άλλος μηχανισμός, που χρησιμοποιείται άμεσα από τα κύτταρα για την επιδιόρθωση του γενετικού τους υλικού, είναι ο Mismatch repair (MMR). Λόγω της πιθανότητας τοποθέτησης μιας αταίριαστης βάσης απέναντι από την μητρική αλυσίδα κατά την αντιγραφή του DNA, η πιστότητα της αντιγραφής του DNA εκφράζεται ως ένα λάθος / 10 νουκλεοτίδια. Ο μηχανισμός αυτός αναγνωρίζει άμεσα τις λανθασμένες τοποθετημένες βάσεις και τις επιδιορθώνει προτού εγκατασταθούν ως μετάλλαξη. Βέβαια λάθη δε συμβαίνουν μόνο κατά την αντιγραφή του DNA, αλλά με μεγάλη συχνότητα τροποποιούνται χημικά καθ' όλο το χρόνο ζωής του κυττάρου οι βάσεις του DNA όπως σε περίπτωση απαμίνωσης της 5-μεθυλοκυτοσίνης προκύπτει θυμίνη, δημιουργώντας αταίριαστο ζεύγος με τη γουανίνη της άλλης έλικας.

Ο μηχανισμός αυτός όπως φυσικά και οι προηγούμενοι, έχει μελετηθεί στον μικροοργανισμό *E. Coli*. Κατά τη μελέτη του απομονώθηκαν τρεις πρωτεΐνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό επιδιόρθωσης, οι MutS, MutL και MutH. Η πρωτεΐνη MutS, αναγνωρίζει τις αταίριαστες βάσεις (καθώς και προσθήκες ή και ελλείψεις, έκτασης πέραν των τεσσάρων νουκλεοτιδίων) και προσδένεται σε αυτές, ενώ η δέσμευση του MutL σταθεροποιεί αυτή την σύνδεση. Το σύμπλοκο MutS – MutL ενεργοποιεί την πρωτεΐνη MutH, η οποία μεθυλιώνει μια βάση (Dam μεθυλίωση) στη φυσιολογική έλικα και τέμνει την νεοσυντεθειμένη απέναντι από τη μεθυλομάδα. Η εκτομή επιτυγχάνεται σε συνεργασία με την UvrD (Ελικάση II), η οποία ξετυλίγει την έλικα από την τομή προς την κατεύθυνση όπου αναγνωρίστηκε η περιοχή των αταίριαστων βάσεων. ώστε. Μία ειδική εξωνουκλεάση αναλαμβάνει την υδρόλυση ώστε να εκτέμνει τμήμα του DNA που εμπεριέχει την αταίριαστη βάση. Η εκτομή δημιουργεί μεγάλα κενά πολλών χιλιάδων βάσεων, τα οποία συμπληρώνονται με τη βοήθεια της επιδιορθωτικής DNA Πολυμεράσης III και τελικά συνδέονται με τη DNA λιγκάση (Posnick L.M & Samson L.D., 2001).

Μετααντιγραφική Επιδιόρθωση:

Αυτός ο μηχανισμός λειτουργεί μόνο όταν αρχίσει η αντιγραφή του DNA το οποίο έχει υποστεί βλάβες. Περιλαμβάνει ανασυνδυασμό και αντιγραφή του DNA και για αυτό καλείται επιδιόρθωση ανασυνδυασμού. Αρχικά οι λεπτομέρειες του μηχανισμού αυτού μελετήθηκαν σε μικρόβια. Οι Howard-Flanders (1981) μελέτησαν το DNA στο βακτηρίδιο *E. Coli*, στο οποίο δημιουργήθηκαν διμερή θυμίνης μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Αποδείχτηκε όμως ότι τέτοιου είδους επιδιόρθωση συμβαίνει και στα ζωικά κύτταρα (Davis 1975, Higgins 1976)

Σε κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, το DNA αντιγράφεται κανονικά κατά μήκος των τμημάτων εκείνων των πατρικών αλυσίδων-πρότυπων που δε φέρουν καμία βλάβη. Όταν η διχάλα αντιγραφής, δηλαδή το σημείο όπου οι δύο πατρικές αλυσίδες ξετυλίγονται και εκτίθονται στα ένζυμα αντιγραφής είναι αδύνατο κατά μήκος της ελαττωματικής περιοχής στη πατρική αλυσίδα. Έτσι η σύνθεση της μιας θυγατρικής αλυσίδας διακόπτεται για να ξαναρχίσει σε κάποιο σημείο μετά το διμερές. Το αποτέλεσμα είναι να δημιουργείται ένα “μετααντιγραφικό χάσμα” στη θυγατρική αλυσίδα.

Το χάσμα αυτό βρίσκεται απέναντι στο τμήμα του μονόκλωνου πατρικού DNA που περιέχει τη βλάβη. Το μετααντιγραφικό χάσμα, δεν μπορεί να επισκευαστεί με τη δράση της DNA πολυμεράσης γιατί το ομόλογο τμήμα της πατρικής αλυσίδας του DNA απέναντί του είναι ελαττωματικό και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο. Το πρόβλημα της επισκευής του μετααντιγραφικού χάσματος λύνεται με έναν μηχανισμό που περιλαμβάνει ανασυνδυασμό και παράλληλα προσφέρει τη δυνατότητα επιδιόρθωσης της βλάβης στην πατρική αλυσίδα του DNA με εκτομή.

Μια πρωτεΐνη η *recA* που έχει διπλή λειτουργία, είναι δηλαδή πρωτεάση και συγχρόνως ένζυμο ανασυνδυασμού του DNA προσδένεται στη μονόκλωνη ελαττωματική περιοχή του DNA και την ευθυγραμμίζει με την ομόλογη περιοχή της θυγατρικής αλυσίδας του δίκλωνου DNA που βρίσκεται απέναντι. Όταν επιτυγχάνεται το ζευγάρωμα των ομόλογων αλυσίδων, ένα άλλο ένζυμο προκαλεί τη ρήξη της πατρικής αλυσίδας του δίκλωνου DNA, το ελεύθερο άκρο της οποίας μεταφέρεται από την πρωτεΐνη *recA* μέσα στο χάσμα προκαλώντας έτσι χιαστή ανταλλαγή αλυσίδων. Το χάσμα που έχει δημιουργηθεί από τον ανασυνδυασμό, συμπληρώνεται με *de novo* επιδιορθωτική αντιγραφή χρησιμοποιώντας τη θυγατρική αλυσίδα ως πρότυπο. Η πρωτεΐνη *recA* αποδεσμεύεται και εφόσον τώρα υπάρχουν ορθές αλληλουχίες βάσεων στη θέση τους απέναντι από το διμερές μπορούν τα ένζυμα του μηχανισμού επιδιόρθωσης με εκτομή να διορθώσουν τη βλάβη. Η διαδικασία του ανασυνδυασμού ολοκληρώνεται με το κόψιμο των αλυσίδων του DNA στο σημείο του χάσματος από ένα ειδικό ένζυμο (Howard-Flanders 1981).

Τα διμερή που δεν απομακρύνονται με το μηχανισμό επιδιόρθωσης με εκτομή βαθμιαία στις επόμενες γενιές απαλείφονται από τα μόρια του DNA που συντίθενται από την έκθεση στην ακτινοβολία (Ganesan 1974). Οι μηχανισμοί μετααντιγραφικής επιδιόρθωσης με εκτομή αλληλοσυμπληρώνονται αποτελεσματικά.

Μετααντιγραφική Επιδιόρθωση στα Ζωικά Κύτταρα

Οι μηχανισμοί της μετααντιγραφικής επιδιόρθωσης, στα ζωικά κύτταρα δεν έχουν διευκρινιστεί επακριβώς.

Κατά μία άποψη (Lehman, 1974, Kihlman 1977) και στα ζωικά, όπως και στα προκαρυωτικά κύτταρα κατά τη μετααντιγραφική επιδιόρθωση σχηματίζονται μετααντιγραφικά χάσματα απέναντι από τη περιοχή της πατρικής αλυσίδας, όπου υπάρχει η βλάβη. Οι Davies και συν (1975) υπέθεσαν ότι υπάρχουν τα παρακάτω στάδια:

1. Αντιγραφή του DNA
2. Δημιουργία χασμάτων στις θυγατρικές αλυσίδες απέναντι από τα διμερή πυριμιδίνης
3. Σύγκλιση των θυγατρικών αλυσίδων
4. Συμπλήρωση των χασμάτων με de novo επιδιορθωτική αντιγραφή χρησιμοποιώντας των άλλη θυγατρική αλυσίδα ως πρότυπο
5. Επανατοποθέτηση στην αρχική τους θέση των πατρικών με τις θυγατρικές αλυσίδες.

Από άλλους ερευνητές προτάθηκαν και άλλοι μηχανισμοί όπου παρακάμπτονται τα διμερή χωρίς τη δημιουργία χασμάτων. Παρόλα αυτά, υποστηρίχθηκε ότι μόνο το 25% των χασμάτων συμπληρώνεται με αυτό το μηχανισμό. Πιθανώς κινητοποιούνται και άλλοι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί αποβλέπουν σε αυτή την αποκατάσταση.

Χρωματιδιακές Ανταλλαγές:

Ανίχνευση Χρωματιδιακών Ανταλλαγών:

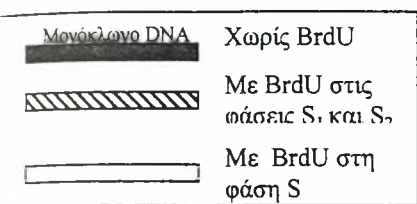
Λόγω της πληθώρας των περιβαλλοντικών παραγόντων που προκαλούν βλάβες στο DNA, κρίθηκε απαραίτητα η ανεύρεση ευαίσθητων μεθόδων για την ανίχνευση αυτών των βλαβών και τον έλεγχο κάθε παράγοντα που ενδεχομένως να είναι βλαπτικός. Για αυτόν τον έλεγχο έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι. Η μέθοδος **μελέτης των χρωματιδιακών ανταλλαγών (Sister Chromatid Exchanges, SCEs)**, η οποία ανήκει τις κυτταρογενετικές μεθόδους χαρακτηρίζεται ως πιο ευαίσθητη μέθοδος από τον προσδιορισμό χρωμοσωμικών ατυπιών.

Χρωματιδιακή ανταλλαγή είναι ανταλλαγή γενετικού υλικού σε απόλυτα ομόλογες θέσεις μεταξύ των αδερφών χρωματίδων. Συμβαίνει κατά τη διάρκεια του διπλασιασμού του DNA στη φάση S του κυτταρικού κύκλου πριν οι δύο αδερφές χρωματίδες αποχωριστούν προς τη δημιουργία δύο αυτοτελών χρωμοσωμάτων. Η δημιουργία των SCEs προϋποθέτει τη ρήξη των τεσσάρων αλυσίδων DNA από τις οποίες αποτελούνται οι αδερφές χρωματίδες, την ανταλλαγή αυτών των αλυσίδων μεταξύ των χρωματίδων και την επανασυγκόλληση των αλυσίδων αλλά στην καινούργια τους θέση (Tice & Schwartzman, 1982 Natarajan & Obe, 1986 Carrano & Natarajan, 1988)

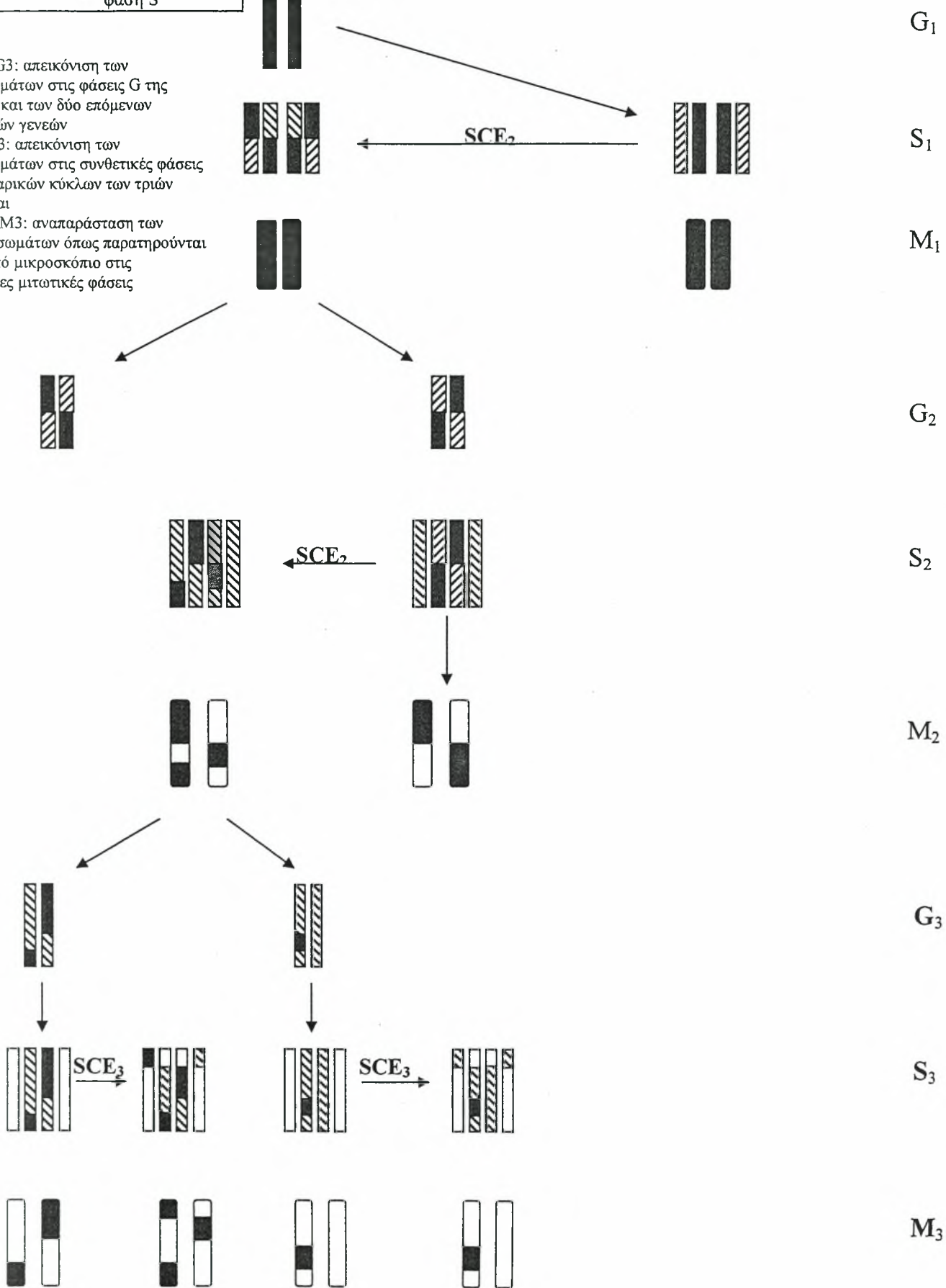
Οι SCEs που συμβαίνουν στην πρώτη συνθετική φάση S γίνονται αντιληπτές αφού τα κύτταρα περάσουν και τη συνθετική φάση S. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ημισυντηρητική φύση αναδιπλασιασμού του DNA, στην πολικότητά του η οποία καθορίζει την επανασυγκόλληση των τεσσάρων αλυσίδων του DNA κατά τη διαδικασία της ανταλλαγής και τέλος στην τυχαία κατανομή των αδερφών χρωματίδων στα θυγατρικά χρωμοσώματα. Έτσι το σύνολο των SCEs είναι ορατό μόνο στη μετάφαση της δεύτερης γενιάς, και συμπεριλαμβάνει το σύνολο των ανταλλαγών που έγιναν κατά τους δύο διαδοχικούς μιτωτικούς κύκλους κατά το στάδιο S (Tice RR & Schwartzman JB, 1982).

Η παρατήρηση των SCEs στο οπτικό μικροσκόπιο, προϋποθέτει την παρουσία BrdU στην καλλιέργεια και να είναι διαθέσιμη τουλάχιστον για δύο συνεχείς κύκλους διπλασιασμού του DNA (Mazrimas JA & Stetka DG, 1978 Tice RR & Schwartzman JB, 1982). Η BrdU, ανάλογο της θυμιδίνης, αντικαθιστά την ενσωμάτωση της θυμιδίνης κατά τον αναδιπλασιασμό του DNA. Έτσι με το πέρας δύο μιτωτικών διαιρέσεων η μία χρωματίδα θα είναι αντικατεστημένη από BrdU απλά ενώ η άλλη θα είναι αντικατεστημένη διπλά γεγονός που αποκαλύπτεται μετά από ειδική διαδικασία χρώσης Fluorencence Plus Giemsa.

Η διπλά αντικατεστημένη χρωματίδα φθορίζει ωχρά καθώς απορροφά μικρότερη ποσότητα χρωστικής Hoechst 33258 και βάφεται ασθενώς από την Giemsa. Αντίθετα, η απλά αντικατεστημένη εμφανίζεται σκουρόχρωμη καθώς έχει απορροφήσει μεγαλύτερη ποσότητα χρωστικής Hoechst 33258, συνεπώς αυξάνεται ο φθορισμός της, και μάλιστα βάφεται από τη χρωστική Giemsa πιο σκούρα. Επομένως τα χρωμοσώματα της 1^{ης} μιτωτικής διαίρεσης θα έχουν και τις δύο αδερφές χρωματίδες τους σκουρόχρωμες, τα χρωμοσώματα της 2^{ης} γενιάς θα φέρουν τη μία χρωματίδα σκουρόχρωμη και την άλλη ωχρή, ενώ οι μεταφάσεις των κυττάρων της 3^{ης} και μετέπειτα μιτωτικής διαίρεσης θα έχουν το μεγαλύτερο ποσοστό των χρωμοσωμάτων τους ωχρό. Σε περιοχές όπου υπάρχουν εναλλασσόμενες



Όπου
 G₁, G₂, G₃: απεικόνιση των χρωμοσωμάτων στις φάσεις G της πατρικής και των δύο επόμενων θυγατρικών γενεών
 S₁, S₂, S₃: απεικόνιση των χρωμοσωμάτων στις συνθετικές φάσεις των κυτταρικών κύκλων των τριών γενεών και
 M₁, M₂, M₃: αναπαράσταση των χρωματοσωμάτων όπως παρατηρούνται στο οπτικό μικροσκόπιο στις αντίστοιχες μιτωτικές φάσεις



περιοχές ωχρές και σκοτεινές εκεί υπάρχουν χρωματιδιακές ανταλλαγές. Η εναλλαγή περιοχών χρωμοσωμάτων σκουρόχρωμων-ωχρών εκτιμάται ως χρωματιδιακές ανταλλαγές. Η συχνότητα των SCEs αντανακλά όχι μόνο στην πρόκληση βλαβών αλλά και/ή στη μη ενζυμική επιδιόρθωση αυτών των βλαβών.

Καλλιέργειες Λεμφοκυττάρων:

Η φυτοαιμοσυγκολλητίνη, ως μιτοσιγόνο ουσία (PHA), επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (in vitro) σε κατάλληλο καλλιεργητικό υλικό (Nowell, 1960). Τα λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα ανθρώπου χρησιμοποιούνται συχνά σε κυτταρογενετικές μελέτες επειδή συγκεντρώνουν πολλά πλεονεκτήματα συγκριτικά με άλλους κυτταρικούς τύπους.

α) οι καλλιέργειες λεμφοκυττάρων από περιφερικό αίμα ανθρώπου αποτελούν προσιτό και άφθονο πειραματικό υλικό καθώς χωρίς ιδιαίτερες απαιτήσεις καθορίζονται οι πειραματικές συνθήκες: ο χρόνος προσθήκης των υπό μελέτη χημικών ουσιών, η διάρκεια της έκθεσης των κυττάρων στις ουσίες αυτές και η συγκέντρωσή τους είναι παράγοντες που μπορούν να ρυθμιστούν εύκολα

β) κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα λεμφοκύτταρα έχουν ελάχιστες χρωματιδιακές ανταλλαγές

γ) προσφέρονται για τη μελέτη βλαβών των χρωμοσωμάτων που προκαλούνται όχι μόνο in vitro αλλά και σε in vivo από την επίδραση γονοτοξικών παραγόντων

δ) από τα έμμορφα στοιχεία του αίματος μόνο τα T λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στο περιφερικό αίμα στη G₀ φάση του κυτταρικού κύκλου και μόνο αυτά μετά από διέγερση με φυτοαιμοσυγκολλητίνη αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται (Lambert και συν, 1984).

ε) είναι το μόνο προσιτό μέσο για την in vivo αξιολόγηση των προκαλούμενων χρωμοσωμικών βλαβών από διάφορα χημειοθεραπευτικά μέσα εφόσον τα λεμφοκύτταρα κυκλοφορούν σε όλους τους ιστούς του οργανισμού και ένα τουλάχιστον ποσοστό τους παρουσιάζει μακροβιότητα.

στ) διαθέτουν παρόμοιους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς με των καρκινικών κυττάρων

ζ) τα περιφερικά λεμφοκύτταρα καρκινοπαθών είναι δυνατό να τροποποιήσουν τους υποδοχείς τους και να μεταβάλλουν τη λειτουργία τους ή/και να υποστούν βλάβες του DNA τους και να εμφανίζουν αυξημένες SCEs

Σοβαρό μειονέκτημα είναι ότι σε in vitro μελέτες καλλιέργειας φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου δεν προσφέρεται για τη μελέτη της επίδρασης χημικών ουσιών που τα μεταβολικά τους προϊόντα είναι ισχυρότεροι παράγοντες. Σε αυτές τις περιπτώσεις αναπτύσσονται διάφορα συστήματα όπου προστίθενται οι μεταβολίτες τους είτε χρησιμοποιούνται in vivo συστήματα όπως είναι τα ασκικά καρκινικά κύτταρα του όγκου P388 που μεταμοσχεύονται και πολλαπλασιάζονται στην ενδοπεριτοναϊκή κοιλότητα DBA ποντικών.

SCEs: Ευαίσθητος Δείκτης Γονοτοξικής Βλάβης

Όπως προαναφέρθηκε οι SCEs αποτελούν μία πραγματικά εξαιρετικά ευαίσθητη κυτταρογενετική μέθοδο ανίχνευσης βλαβών στο DNA επαγόμενων άμεσα ή έμμεσα από ουσίες σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Είναι μία χρονικά σύντομη και μικρού κόστους μέθοδος και επιπλέον μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα εύρος in vivo ή/και in vitro πειραμάτων στο επίπεδο ακόμη και θηλαστικών καρκινικών κυττάρων ή καρκινικών σειρών.

Οι SCEs αποτελούν αντικείμενο έρευνας πολλών εργαστηρίων. Η μελέτη τους έχει ως στόχο την αναζήτηση λιγότερο τοξικών και περισσότερο αποτελεσματικών χημειοθεραπευτικών συνδυασμών, από εκείνους που σήμερα χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη, του ελέγχου της δράσης τους σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα in vitro ή/και in vivo με πειραματικούς καρκίνους σε πειραματόζωα (Κουράκης Α, 1983 Mourelatos D & συν, 1986 Mourelatos D & συν, 1987). Οι SCEs χρησιμεύουν στη βελτίωση, στην κατεύθυνση αλλά και στην εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της εφαρμογής χημειοθεραπευτικών σχημάτων που χρησιμοποιούνται σε καρκινοπαθείς, επίσης στην ταυτοποίηση της μεταλλαξιγόνους δράσεως διαφόρων ουσιών του περιβάλλοντος (Laliaris Th & συν, 1987), στην κατανόηση όχι μόνο των βλαβών του DNA υπό την επίδραση τοξικών παραγόντων στο κυτταρικό επίπεδο, αλλά και της λειτουργικότητας των επιδιορθωτικών μηχανισμών (Wolff S & συν, 1975). Συμβάλλουν επίσης και στην εκτίμηση των βιολογικών φαινομένων της μεταλλαξιγένεσης και της καρκινογένεσης. Η ανίχνευση κληρονομικών και επίκτητων νοσημάτων βασίζεται επίσης στην αξιολόγηση των SCEs.

Αυτόματες και Προκλητές SCEs:

Οι SCEs διακρίνονται σε αυτόματες, δηλαδή σε αυτές που εμφανίζονται χωρίς τη παρουσία κάποιου εμφανούς βλαπτικού παράγοντα, και σε προκλητές που οφείλονται σε γνωστό γονοτοξικό παράγοντα.

Είναι αποδεκτό πλέον ότι ο μέσος όρος των SCEs σε υγιή άτομα ανέρχεται σε $8,29 \pm 0,08$ SCE/κύτταρο (Bender & συν, 1988)

Επισημάνθηκε ότι η BrdU αν και είναι απαραίτητη για τη μελέτη των SCEs, σε αυξημένες συγκεντρώσεις 10μg/ml, προκαλεί αύξηση των SCEs οι οποίες μειώνονται ανάλογα με την μείωση της συγκέντρωσης. Η συγκέντρωση όμως που χρησιμοποιείται στα πειράματα καταμέτρησης των SCEs είναι πολύ μικρότερη από αυτήν που επηρεάζει ή προκαλεί ασήμαντη αύξηση (Crossen P. 1982).

Οι σημαντικότεροι συνήθεις παράγοντες που επηρεάζουν τη συχνότητα των χρωματιδιακών ανταλλαγών και λαμβάνονται υπόψη στη σχεδίαση των πειραμάτων από δότες ασθενείς είναι το κάπνισμα (Evans, 1982), το αλκοόλ (Butler & συν, 1981) οι ιογενείς λοιμώξεις (Crossen P. 1982) τα αντισυλληπτικά (Crossen P. 1982). Αντιπροσωπευτικά αναφέρεται ότι η έκθεση σε φυτοφάρμακα (A. Kourakis & συν, 1991), η έκθεση στη σκόνη από το ξύλο (D. Elavarasi & συν, 2002), καθώς και η χρήση ινδικής κάνναβης και ηρωίνης (N. Vassiliades & συν, 1991) αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που αυξάνουν τη συχνότητα των SCEs.

Η μελέτη των SCEs σε κύτταρα πασχόντων από διάφορα κληρονομικά νοσήματα με μεγάλο βαθμού αστάθεια του γονιδιώματος παρουσιάζει ιδιαίτερο

ενδιαφέρον και αποδεικνύει ανεπάρκεια των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA και σημαντικού βαθμού προδιάθεση για ανάπτυξη νεοπλασίας (D. Mourelatos, 1990).

SCEs : Βλάβες, Επιδιορθωτικοί Μηχανισμοί και Σύνθεση του DNA

Όπως προαναφέρθηκε οι SCEs φαίνεται ότι αποτελούν τον πιο ευαίσθητο κυτταρογενετικό δείκτη της επίδρασης μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων καθώς και καρκινογόνων ουσιών.

Η συχνότητα των SCEs εξαρτάται και από την ικανότητα των κυττάρων να επιδιορθώσει τις προκλητές βλάβες που έχει υποστεί το γενετικό του υλικό και μάλιστα πριν το διπλασιασμό του DNA. Θεωρητικά εάν τα κύτταρα καταφέρουν να επιδιορθώσουν όλες τις βλάβες του DNA τους πριν αυτά περάσουν στην φάση S του κυτταρικού κύκλου, τότε το κύτταρο δεν εμφανίζει καμία αύξηση στις SCEs. Αντίθετα, αν δεν επιδιορθωθούν μέσα σε δύο διαδοχικούς κυτταρικούς κύκλους μπορούν να συμβάλλουν στη διατήρηση των προκλητών SCEs στο χρονικό αυτό διάστημα (D. Mourelatos, 1996)

Επιχειρήματα ότι οι SCEs σχετίζονται με τη φάση S του κυτταρικού κύκλου όπου πραγματοποιείται η αντιγραφή του DNA, αποτελούν οι παρακάτω παρατηρήσεις: α) οι SCEs εμφανίζονται σε περιοχές δημιουργίας της αντιγραφικής διχάλας (Raposa T. 1982, Evans H. 1982) β) στα σημεία επαφής της ετεροχρωματίνης με την ευχρωματίνη (Raposa T. 1982) και γ) έχει αποδειχθεί ότι λεμφοκύτταρα ατόμων που πάσχουν από ασθένειες που σχετίζονται με ελαττωματική ή μειωμένη επιδιορθωτική ικανότητα παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο SCEs, γεγονός που αποδεικνύει ότι ο μηχανισμός δημιουργίας τους είναι άμεσα συνδεδεμένος με την αντιγραφή του DNA που περιέχει ανεπιδιόρθωτες βλάβες.

SCEs : μέσο εκτίμησης της πορείας, της αποτελεσματικότητας και της βελτίωσης της χημειοθεραπείας

Για να μελετηθεί η ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στα αντινεοπλασματικά φάρμακα *in vitro*, χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος Colony Forming Efficiency (CFE) η οποία δίνει πληροφορίες για την επιβίωση των κυττάρων στην παρουσία των κυτταροστατικών φαρμάκων μελφαλάνη (MP), *cis*- πλατίνη (PL), 1, 3- δις (2-χλωροαιθυλο)-1-νιτροζουρία (BCNU). Φάρμακα που επάγουν την μεγαλύτερη αύξηση της συχνότητας των SCEs στα καρκινικά κύτταρα, είχαν και τη μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση κατά την *in vitro* μέθοδο CFE.

Κατά τον προσδιορισμό των SCEs διαπιστώθηκε επαγόμενο ευρύ φάσμα των τιμών SCEs/μετάφαση σε ετερογενείς πληθυσμούς κυττάρων του όγκου που οφείλεται σε διαφορετική επίδραση του ίδιου του φαρμάκου. Δηλαδή στο σύνολό τους κύτταρα ηπατοκαρκινώματος εμφανίζονται είτε πολύ ευαίσθητα, είτε με ελαττωμένη ευαισθησία ή/και ακόμη ιδιαίτερα ανθεκτικά. Έτσι υποστηρίχθηκε ότι η μέθοδος των SCEs μπορεί να συμβάλλει στην απόδειξη της ευαισθησίας διαφόρων υποπληθυσμών ενός όγκου σε συγκεκριμένο αντινεοπλασματικό παράγοντα (Tofilon & συν, 1985).

Οι πληροφορίες αυτές μπορεί να είναι σημαντικές στην κλινική αντιμετώπιση του καρκίνου, εφόσον ο σχεδιασμός ενός θεραπευτικού σχήματος για την αντιμετώπιση καρκίνου που αποτελείται από πληθυσμό κυττάρων με την ίδια περίπου ευαισθησία σε ένα φάρμακο δεν είναι αποτελεσματικός και για όγκο όπου

παρουσιάζονται υποπληθυσμοί του ποικίλλουν ως προς την ευαισθησία τους στο ίδιο θεραπευτικό σχήμα. Μάλιστα προτείνεται ότι η μέθοδος των SCEs θα μπορούσε να αντικαταστήσει την εξαιρετικά χρονοβόρα αλλά αθροιστική μέθοδο CFE που εφαρμόζεται για δείγματα όγκων που λαμβάνονται με βιοψία.

Συγκρινόμενα, διαπιστώθηκε σχέση μεταξύ κυτταροτοξικότητας και επαγωγής των SCEs. Καρκινικές σειρές προερχόμενες από όγκους με τη μέθοδο CFE παρουσίαζαν αφενός τις υψηλότερες συχνότητες SCEs παρουσία φαρμάκου, αφετέρου το μικρότερο ποσοστό επιβίωσης. Η μέθοδος των SCEs προτάθηκε στην κλινική πράξη ως μέσο πρόβλεψης της ανταπόκρισης των όγκων του ανθρώπου στην αντινεοπλασματική δράση τέτοιων φαρμάκων για τα οποία αποδείχτηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της κυτταροτοξικής τους ικανότητας και της επαγωγής των SCEs. (Deen & συν.1986). Η ικανότητα των αλκυλιωτικών παραγόντων να αυξάνουν τις SCEs in vitro σχετίστηκε με την αντινεοπλασματική δραστηριότητά τους in vivo (Tofilon & συν 1985). Προτείνονται οι SCEs ότι μπορούν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν για την καθοδήγηση και τη βελτίωση της χημειοθεραπείας του καρκίνου (Mourelatos & συν. 1988, Deen & συν.1986).

Πολλά νεοπλασματικά κύτταρα ανθίσταται στα αλκυλιωτικά επιδιορθώνοντας τις προκλητές βλάβες του DNA. Αυτές ελαχιστοποιούνται όταν κινητοποιούνται οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του κυττάρου (Mourelatos & συν. 1982, 1983, 1986). Με το σκεπτικό αυτό χορηγήθηκαν τόσο in vitro όσο και in vivo διάφοροι αλκυλιωτικοί παράγοντες σε συνδυασμό με αναστολείς της επιδιόρθωσης βλαβών του DNA. Αποδείχτηκε στατιστικά σημαντική η συνεργική τους δράσης σε σχέση με την αντίστοιχη της μεμονωμένης χορήγησής τους. (D. Mourelatos & συν, 1988).

Μελέτη του μιτωτικού κύκλου ή του δείκτη ρυθμού πολλαπλασιασμού (Proliferation Rate Index, PRI)

Ακολουθώντας την ίδια τεχνική παράλληλα με τον ευαίσθητο δείκτη των SCEs αξιολογείται και ο δείκτης ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων (PRI) στα ίδια παρασκευάσματα. Στην περίπτωση του PRI απαιτείται καταμέτρηση τουλάχιστον 100 μεταφάσεων που βρίσκονται στην 1^η (M1), στη 2^η (M2) και στην 3^η και μετέπειτα (M3) μεταφάσεων. Ο υπολογισμός του μιτωτικού δείκτη εξάγεται από τον τύπο:

$$PRI = (M1 + 2 * M2 + 3 * M3) / M1 + M2 + M3$$

Η εκτίμηση του PRI συμβάλλει στον καθορισμό της κυτταροστατικής αλλά και συγχρόνως και της κυτταροτοξικής δράσης διαφόρων ουσιών (I. Ντόζη – Δ. Μουρελάτος, 1989)

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ SCEs ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

A. Υλικό

Για τις καλλιέργειες των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων λαμβάνετο περιφερικό αίμα από υγιείς εθελοντές αιμοδότες, οι οποίοι δεν κάπνιζαν, δεν έπαιρναν φάρμακα και δεν είχαν περάσει πρόσφατα κάποια λοίμωξη. Η λήψη του αίματος γινόταν στο τμήμα αιμοδοσίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ. Αμέσως μετά καταρτήθηκε το πρωτόκολλο της πειραματικής αυτής εργασίας. Στις καλλιέργειες των λεμφοκυττάρων μελετήθηκε η επίδραση των νεοσυνθετισμένων τροποποιημένων στεροειδών εστέρων στη συχνότητα των χρωματιδιακών ανταλλαγών και του δείκτη ρυθμού πολλαπλασιασμού των ουσιών:

B. Καλλιεργητικά υλικά και παρασκευή αντιδραστηρίων:

1) Heparin Leo

Στις σύριγγες για λήψη του αίματος, τοποθετούνται 2-3 σταγόνες ηπαρίνης, και με περιστροφικές κινήσεις επαλείφουν το εσωτερικό της σύριγγας

2) Καλλιεργητικό υλικό RPMI με φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA) (Biochrom)

3) Κολχικίνη (SIGMA)

Διαλύεται σε δισαπεσταγμένο-αποστειρωμένο νερό σε συγκέντρωση 50 µg/ml

4) 5-Βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU)

Διαλύεται σε δισαπεσταγμένο-αποστειρωμένο νερό με τελική συγκέντρωση 1µg/ml.

Η συγκέντρωση στο τελικό διάλυμα των 5ml είναι 5µg/ml

5) Τελική συγκέντρωση 0,4µM, 0,6µM, 1,0µM, 1,6µM και 2,0µM

6) Διάλυμα (0,075M) KCl

2,74g KCl διαλύονται σε 500ml δισαπεσταγμένου νερού και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για μια βδομάδα

7) Διάλυμα μονιμοποίησης (FIX)

Μείγμα οξικού οξέος : μεθανόλης 1 : 3. Παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρησιμοποίησή του

8) HOECHST 33258 (BISBENZIMIDE H 33258)

Διαλύεται σε δισαπεσταγμένο νερό με η τελική συγκέντρωση 1µg/ml.

Παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρησιμοποίησή του.

9) Ρυθμιστικό διάλυμα McLIVAINES pH 8,0

Για την παρασκευή του χρησιμοποιούνται:

- α) Διάλυμα Κιτρικού οξέος, 21,02g/l και
- β) Διάλυμα Μονόξινου Φωσφορικού Νατρίου, 35,6 g/l
σε αναλογία περίπου 15:85 αντίστοιχα

10) Διάλυμα χρωστικής GIEMSA (Merck)

3ml πυκνής χρωστικής Giemsa αραιώνεται σε όγκο 100ml με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα pH6,8. Το διάλυμα ετοιμάζεται λίγο πριν χρησιμοποιηθεί.

Γ. Τοποθέτηση και συγκομιδή των καλλιιεργειών

Από τη στιγμή της αιμοληψίας όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιούνται μέσα στο άσηπτο περιβάλλον ενός θαλάμου ρεύματος αέρος συνεχούς ροής.

Η πειραματική διαδικασία είναι:

- 1) Τοποθέτηση 11 σταγόνων πλήρους αίματος σε 5ml καλλιιεργητικού υλικού RPMI το οποίο περιέχει τη μιτοσιγόνο ουσία PHA.
- 2) Κάτω από ελάχιστο φωτισμό για την αποφυγή της φωτόλυσης, προσθήκη του διαλύματος BrdU σε τελική συγκέντρωση 5μg/ml.
- 3) Αμέσως μετά την προσθήκη του BrdU επιλέγονται διαφορετικές συγκεντρώσεις κάθε ουσίας. Οι τελικές συγκεντρώσεις κάθε ουσίας αναφέρονται στους Πίνακες 1, 2 και 3.
- 4) Κάλυψη των καλλιιεργειών και τοποθέτηση σε σκοτεινό επωαστικό κλίβανο 37° C για 72 ώρες. Το χρονικό διάστημα αυτό είναι επαρκές για να συμπληρώσουν τα κύτταρα δύο ή τρεις κυτταρικές διαιρέσεις.
- 5) 90 περίπου λεπτά πριν το τέλος της επώασης προσθήκη στις καλλιιεργειες 0,05ml διάλυμα κολχικίνης. Η κολχικίνης εμποδίζει τον πολυμερισμό των μικροσωληναρίων της μιτωτικής ατράκτου. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται ο τερματισμός της μίτωσης στο στάδιο της μετάφασης όπου τα χρωμοσώματα είναι ιδιαίτερα συμπυκνωμένα και κατάλληλα για παρατήρηση.
- 6) Μεταφορά καλλιιεργειών σε σωληνάρια φυγοκέντρου.
- 7) Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 2000 στροφές.
- 8) Απόρριψη του υπερκείμενου με παστεράκια και κατά σταγόνα προσθήκη επί του ιζήματος κάτω από συνεχή ανάδευση 5ml διαλύματος KCl (2,78g/500ml). Παραμονή για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπότονο αυτό διάλυμα χρησιμεύει για τη θραύση των κυτταρικών μεμβρανών και την απελευθέρωση των χρωμοσωμάτων
- 9) Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 2000 στροφές.
- 10) Απόρριψη του υπερκείμενου και προσθήκη 5ml διαλύματος FIX κατά σταγόνες υπό συνεχή ανάδευση.
- 11) Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 2000 στροφές
Η διεργασία αυτή επαναλαμβάνεται για δύο ακόμη φορές (προσθήκη διαλύματος FIX και φυγοκέντρηση).
- 12) Μετά το πέρας και της τρίτης πλύσης και την απόρριψη του υπερκείμενου προσθήκη 2-3 σταγόνων FIX επί του ιζήματος, ανάδευση και με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur επίστρωση σε σταγόνες, κρύες αντικειμενοφόρους που προηγουμένως εμβαπτισμένους σε αιθανόλη και διατηρούνται στο ψυγείο. Περίπου τρεις σταγόνες αρκούν για την επαρκή επίστρωση των υλικών στις αντικειμενοφόρους πλάκες. Οι πλάκες αφήνονται λίγα λεπτά στον αέρα για να στεγνώσουν.

Δ. Χρώση των καλλιιεργειών (Μέθοδος FPG, Fluorescence plus Giemsa)

- 1) Εμβάπτιση επιστρωμένων πλακών για 12 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα pH6,8 που περιέχει φθορίζουσα χρωστική Hoechst 33258.
- 2) Τοποθέτηση των πλακών σε μια επιφάνεια ώστε μετά την προσθήκη 2-3 σταγόνες ρυθμιστικού διαλύματος McLIVAINES pH 8,0 καλύπτονται με καλυπτρίδες.
- 3) Έκθεση για 75 λεπτά των αντικειμενοφόρων περίπου σε υπέρυθη ακτινοβολία (λυχνία ισχύος 300W και σε απόσταση 40 εκατοστών)
- 4) Αφαίρεση των καλυπτρίδων και χρώση με GIEMSA 3% για 8-10 λεπτά περίπου.
- 5) Πλύση των αντικειμενοφόρων με ελάχιστο νερό βρύσης και τοποθέτηση κάθετη σε διηθητικό χαρτί ώστε να στεγνώσουν τα παρασκευάσματα.

Ε. Παρατήρηση και μέτρηση των SCEs και του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων

Η παρατήρηση και η μελέτη των SCEs πραγματοποιείται στο οπτικό μικροσκόπιο με τη χρήση καταδυτικού φακού (μεγένθυση 10x100) και προσθήκη κεδρέλαιου. Για τη καλύτερη μελέτη των SCEs επιβάλλεται:

1. Ικανοποιητική χρώση των αδερφών χρωματίδων
2. Να μην υπάρχουν αλληλοεπικαλύψεις μεταξύ των χρωμοσωμάτων και
3. Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων να προέρχεται κατά προτίμηση από ένα μόνο κύτταρο

Ως μέτρο κυτταροστατικότητας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ο PRI.

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ SCEs ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΟΓΚΟ

P388

A. Υλικό

Χρησιμοποιήθηκαν DBA/2 ποντίκια από την αποικία του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του ΑΠΘ, ηλικίας 1-2 μηνών και μέσου βάρους 25 gr. Τα καρκινικά κύτταρα P388 προέρχονται από την ενδοπεριτοναϊκή κοιλότητα DBA/2 ποντικίου που παραχωρήθηκε από το ερευνητικό τμήμα του Θεαγενείου Ιατρικού Ινστιτούτου. Για τη διατήρηση του όγκου αφού θυσιαστεί το καρκινοπαθές ποντίκι αφαιρείται με προσοχή από την ενδοπεριτοναϊκή κοιλότητα υγρό, αραιώνεται 1:10 με φυσιολογικό ορό και ενοφθαλμίζεται στην ενδοπεριτοναϊκή κοιλότητα υγιών ποντικιών.

Στα κύτταρα του όγκου P388 (in vivo) μελετήθηκε η επίδραση των νεοσυντεθειμένων στεροειδών εστέρων στη συχνότητα των SCEs και του PRI.

B. Παρασκευή αντιδραστηρίου BrdU σε ενεργό άνθρακα

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι ίδια αυτά της in vitro μελέτης των SCEs (Βλ. Διάγραμμα 1). Η μόνη διαφορά είναι ότι η BrdU εισάγεται την 5^η μέρα του ενοφθαλμισμού (1mg/g bw) ενδοπεριτοναϊκά στα ποντίκια, προσροφημένη σε ενεργό άνθρακα. Η προσρόφηση του αντιδραστηρίου στον ενεργό άνθρακα επιτυγχάνει την αργή απελευθέρωση του BrdU με αποτέλεσμα να μην μεταβολίζεται αλλά να δεσμεύεται στο νεοσυντεθειμένο DNA και να επιτυγχάνεται ο χρωματισμός των χρωμοσωμάτων με την μέθοδο FPG ώστε να είναι εφικτή η παρατήρηση των SCEs στο οπτικό μικροσκόπιο.

Αρχικά παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα BrdU με συγκέντρωση 20mg/ml που αποστειρώνεται. Καθαρισμένος ενεργός άνθρακας που έχει ήδη αποστειρωθεί προστίθεται στο διάλυμα της BrdU (100mg/ml). Το εναιώρημα αναδεύεται για 2 ώρες προστατευμένο από το φως για την αποφυγή της φωτόλυσης της BrdU.

	In vitro	In vivo
Πειραματικό υλικό	Καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου	Καρκινικά κύτταρα λεμφοκυτταρικού τύπου P388
Καλλιεργητικό υλικό	5ml RPMI	Ενδοπεριτοναϊκή κοιλότητα DBA ποντικών
BrdU	Τελική συγκέντρωση 5μg/ml	1mg/g ΒΣ προσροφημένο σε ενεργό άνθρακα, 24h μετά τον ενοφθαλμισμό
Επώαση	37°C για 72h	48h
Προσθήκη κολχικίνης προ της συλλογής	Τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml	Ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 4μg/g ΒΣ

•ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

•ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ

•ΧΡΩΣΗ ΚΑΤΑ FLUORESCENCE PLUS GIEMSA

Διάγραμμα 1. Διαφορές της μεθοδολογίας μεταξύ των in vitro και in vivo πειραμάτων

Γ. Πειραματική διαδικασία

Μετά τη θανάτωση ποντικού με P388 λεμφοκυτταρική λευχαιμία από την ενδοπεριτοναϊκή κοιλότητά του (7 μέρες μετά τον ενοφθαλμισμό) λαμβάνεται με ηπαρινισμένη σύριγγα 1ml ασκιτικού υγρού το οποίο αραιώνεται σε 10ml φυσιολογικού διαλύματος NaCl 0,9%. Από αυτό το υλικό γίνεται έγχυση ενδοπεριτοναϊκά 0,5ml (υπολογίζεται ότι με τον τρόπο από μεταμοσχεύονται 5×10^6 ασκιτικών κυττάρων) στους υπό μελέτη ποντικών (Klein & Resesz, 1953). Τα πειραματόζωα μετά την ενδοπεριτοναϊκή έγχυση αναπτύσσουν τον όγκο σε διάστημα λίγων ημερών. Η όλη διαδικασία γίνεται υπό άσηπτες συνθήκες ενώ οι συνθήκες διαβίωσης και διατροφής των ποντικών διατηρούνται σταθερές όπως προ της μεταμόσχευσης. Συγκεκριμένα χορηγείται τυποποιημένη τροφή, νερό και η αίθουσα έχει σύστημα εξαερισμού. Υπάρχει επίσης 12ωρη ρύθμιση φωτός-σκότους.

Από τις νεοσυνθεθειμένες ουσίες ο 3β-υδροξυ-17β-ακεταμιδο-7α-αζα-Β-ομο-5-αδροστεν-7-ονη-*p-N,N*-δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινοφαινυλοξικός εστέρας, μετά την χορήγηση του οποίου παρατηρήθηκε in vitro η μεγαλύτερη αύξηση των SCEs και πτώση του PRI, χρησιμοποιήθηκε για το in vivo πείραμα. Ο εστέρας διαλύθηκε σε καλαμποκέλαιο για καλύτερη διάχυση στους ιστούς και πέντε μέρες μετά τη μεταμόσχευση του όγκου χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά στα ποντίκια σε συγκέντρωση 2μg/g bw. Μία ώρα μετά τη χορήγηση της ουσίας εισάγεται στα πειραματόζωα ενδοπεριτοναϊκά 1ml εναιωρήματος ενεργού άνθρακα-BrdU, ώστε η BrdU να βρίσκεται σε συγκέντρωση 1mg/g bw.

Τα κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν επί 48 ώρες και 2 ώρες πριν τη συλλογή τους χορηγείται ενδοπεριτοναϊκά 0,1ml διάλυμα κολχικίνης (1mg/ml). (Μουρελάτος & συν. 1988)

Τα πειραματόζωα θυσιάζονται με εξάρθρωση του αυχένα και λαμβάνεται με προσοχή μια ορισμένη ποσότητα υγρού από την ενδοπεριτοναϊκή κοιλότητα των ποντικών.

Αρχικά πραγματοποιείται πλύση των κυττάρων του όγκου με KCl και στη συνέχεια αφήνονται στο ίδιο διάλυμα για 25 λεπτά. Εν συνεχεία φυγοκεντρώνται και ακολουθεί η ίδια διαδικασία με αυτή που περιγράφηκε προηγουμένως κατά τη χρώση των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων.

Δ. Παρατήρηση και καταμέτρηση των SCEs και του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων

Για τη μελέτη των SCEs και του PRI εφαρμόζονται τα ίδια ακριβώς κριτήρια και ο ίδιος τρόπος μέτρηση που εφαρμόστηκε κατά την μελέτη των ίδιων παραμέτρων στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Η μόνη διαφορά είναι ότι ο υπολογισμός των SCEs γίνεται ανά 42 χρωματοσώματα, επειδή προέρχονται από ποντίκια όπου ο αριθμός των χρωμοσωμάτων ανά κύτταρο είναι 42.

Ε. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των κυτταρογενετικών μελετών IN VITRO και IN VIVO

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη των SCEs υπολογίστηκαν αρχικά οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις (STANDARD DEVIATION). Η σύγκριση της μέσης τιμής των SCEs των εξεταστέων με το control έγινε με το T-TEST, ενώ η σύγκριση των τιμών του PRI των εξεταστέων με το control πραγματοποιήθηκε με το χ^2 - TEST. Η αξιολόγηση του συνεργικού αποτελέσματος στην επαγωγή των SCEs και στη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων έγινε με το PAIRED T-TEST. Επίσης προσδιορίστηκε και ο συντελεστής συσχέτισης κατά PEARSON μεταξύ του PRI και των SCEs για να διαπιστωθεί αν η αύξηση των SCEs σχετίζεται κατά στατιστικά σημαντικό τρόπο με την πτώση του PRI.

3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΚ433 ΣΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΠΟΝΤΙΚΙΩΝ ΜΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΟΓΚΟ P388

A. Υλικά

Για τις μελέτες επιβίωσης χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια DBA/2 από την αποικία των πειραματόζων του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας του Ιατρικού Τμήματος ΑΠΘ ηλικίας 8-10 βδομάδων και μέσου σωματικού βάρους 25-30 gr. Στα πειραματόζωα έγινε μεταμόσχευση του ασκιτικού όγκου με ενδοπεριτοναϊκή έκχυση 5×10^6 περίπου κυττάρων και στη συνέχεια χορηγήθηκε εφάπαξ δόση (20 μ m/g bw) του νεοσυνθετιμένου στεροειδούς εστέρα 3 β -υδροξυ-17 β -ακεταμιδο-7 α -αζα-Β-ομο-5-αδροστεν-7-ονη-*p-N,N*-δισ (2-χλωροαιθυλ) αμινοφαινυλοξικού εστέρα (ΑΚ433). Ο σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη της *in vivo* αντινεοπλασματικής δράσης της ουσίας.

B. Αντιδραστήρια

Για αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα “3 β -υδροξυ-17 β -ακεταμιδο-7 α -αζα-Β-ομο-5-αδροστεν-7-ονη-*p-N,N*-δισ (2-χλωροαιθυλ) αμινοφαινυλοξικού εστέρα” συγκέντρωσης 20 μ m. Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε καλαμποκέλαιο ως μέσο διάλυσης.

Γ. Πειραματική διαδικασία

Για τη μελέτη επιβίωσης χρειάζονται δύο ομάδες πειραματοζώων.

Η πρώτη ομάδα αποτελεί την ομάδα ελέγχου στην οποία γίνεται η μεταμόσχευση του όγκου αλλά δεν χορηγείται κανένα φάρμακο και περιλαμβάνει 8 ποντίκια.

Στη δεύτερη ομάδα μετά τη μεταμόσχευση του όγκου χορηγείται εφάπαξ διάλυμα του εστέρα (20 μ m/g bw). Η ομάδα αυτή αποτελείται από 4 ποντίκια.

Στα πειραματόζωα με ενδοπεριτοναϊκή έκχυση και υπό άσηπτες συνθήκες η μεταμόσχευση του όγκου πραγματοποιήθηκε. Σε κάθε πειραματόζωο ο αριθμός των καρκινικών-ασκιτικών κυττάρων που μεταμοσχεύτηκαν υπολογίζεται σε 5×10^6 κύτταρα. Οι συνθήκες επιβίωσης των πειραματόζων ήταν ίδιες με αυτές που περιγράφονται παραπάνω στα πειράματα *in vivo*.

Ο έλεγχος για την επιβίωση των μυών γινόταν καθημερινά την ίδια ώρα.

Δ. Καταγραφή των αποτελεσμάτων

Με τη μελέτη αυτή και για να εκτιμηθεί *in vivo* η αντινεοπλασματική δράση της ουσίας 3β-υδροξυ-17β-ακεταμιδο-7α-αζα-Β-ομο-5-αδροστεν-7-ονη-*p-N,N*-δισ (2-χλωροαιθυλ) αμινοφαινυλοξικός εστέρας υπολογίστηκαν:

1. Η επιβίωση των πειραματόζων των μαρτύρων (Control) και των εξεταστέων (Experimental) σε ημέρες
2. Η επί % αύξηση της επιβίωσης της ομάδας των εξεταστέων συγκριτικά με τους μάρτυρες. Για τη στατιστική μελέτη των αποτελεσμάτων εφαρμόστηκε το Wilcoxon test.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το σύνολο των πειραμάτων στην παρούσα εργασία μπορούν να χωριστούν σε δύο ενότητες. Στην πρώτη ενότητα περιλαμβάνονται τα πειράματα στα οποία εξετάστηκε η πιθανή επαγωγή κυτταρογενετικής βλάβης και κυτταροστατικότητας από την ομάδα των νεοσυντεθειμένων τροποποιημένων στεροειδών εστέρων σε καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου.

Στη δεύτερη ενότητα περιλαμβάνονται πειράματα στα οποία εξετάστηκε η επαγωγή των SCEs και η μείωση του PRI που προκαλούν διάφορες συγκεντρώσεις της AK433 σε καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου *in vitro* (Πίνακας 3). Αναφέρονται πειράματα που εξετάστηκε σε ασκίτικα κύτταρα όγκου P388 από την ενδοπεριτοναϊκή κοιλότητα ποντικών *in vivo* η επαγωγή κυτταρογενετικής βλάβης και κυτταροστατικότητας από την πιο δραστική ένωση της παραπάνω ομάδας της 3β-υδροξυ-17β-ακεταμιδο-7α-αζα-B-ομο-5-αδροστεν-7-ονη-*p-N,N*-δισ(2-γλωροαιθυλ)αμινοφαινυλοξικός εστέρας (AK433) που διαπιστώθηκε σε καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου (Πίνακας 4). Τέλος εξετάστηκε η αντινεοπλασματική δράση του AK433 της επιβίωσης σε ποντίκια ενοφθαλμισμένα με όγκο P388 (Πίνακας 5).

Με βάση την αύξηση της συχνότητας των SCEs και την ελάττωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων εκτιμήθηκε η κυτταρογενετική και η κυτταροστατική βλάβη αντίστοιχα, στα κύτταρα *in vitro* και *in vivo*. Όσον αφορά την αντινεοπλασματική δράση *in vivo* ως παράμετροι για τον προσδιορισμό της χρησιμοποίηθηκε η αύξηση του χρόνου επιβίωσης των πειραματόζωων.

Ενότητα Α

Σε μοριακή βάση η σύγκριση της ικανότητας των νεοσυντεθειμένων ουσιών να προκαλούν κυτταρογενετική βλάβη και σε συγκεντρώσεις 0,4, 1,6 και 2,0μM (βλ. Πίνακα 1 και 2).

Οι ουσίες στο σύνολό τους προκάλεσαν στατιστικά σημαντική ($P<0,01$) αύξηση στη συχνότητα των SCEs σε όλες τις συγκεντρώσεις. Παρατηρήθηκαν δόσοεξαρτώμενες αυξήσεις στη συχνότητα των SCEs. Εξαρτώμενες από τις συγκεντρώσεις των ουσιών εμφανίζονται να είναι και οι τιμές του PRI καθώς όσο αυξάνεται η συγκέντρωση μειώνεται ο δείκτης ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων.

Η ουσία AK433 χαρακτηρίζεται ως η πιο δραστική καθώς παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αύξηση στη συχνότητα των SCEs σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Στη συγκέντρωση 0,4μM παρατηρείται σημαντικά στατιστική ($P<0,01$) αύξηση των SCEs ($23,17\pm 1,21$). Στη συγκέντρωση 1,6μM οι SCEs ανέρχονται σε $66,54\pm 2,66$ και διατηρούνται περίπου στα ίδια επίπεδα $66,44\pm 2,49$ και στη συγκέντρωση 2,0μM. Επίσης, παρατηρήθηκε και στατιστικά σημαντική μείωση ($P<0,001$) του PRI σε όλες τις συγκεντρώσεις, 0,4μM, 1,6 μM και 2,0μM με αντίστοιχη μείωση 1,49, 1,48 και 1,32.

Η ουσία AK383 που είναι μόνο ο στεροειδικός δακτύλιος, σε συγκέντρωση 1,6 και 2,0μM δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση στη συχνότητα των SCEs ούτε στατιστικά σημαντική μείωση στις τιμές του PRI.

Με κριτήρια την αύξηση της συχνότητας των SCEs και την πτώση του PRI, η σειρά δραστηριότητας των νεοσυνθεθειμένων ενώσεων είναι: AK433>AK431>AK427>AK409>AK411>AK407 (Πίνακας 2).

Λόγω του ότι η AK433 έχει τη μεγαλύτερη ικανότητα επαγωγής των SCEs και μείωσης του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων η ουσία αυτή επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη στα πειράματα που ακολούθησαν.

Πίνακας 1: Αύξηση της συχνότητας των SCEs και μείωση του PRI σε καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου μετά από έκθεση σε τροποποιημένους στεροειδικούς εστέρες με μουστάρδες αζώτου.

Ουσίες	Συγκέντρωση (μM)	SCEs/κύτταρο± S.E.	PRI
Control		4,56 ± 0,30	2,57
AK427	0,4	12,11 ± 0,74 ^b	1,82 ^c
AK433	0,4	23,17 ± 1,21 ^b	1,49 ^c
AK431	0,4	7,80 ± 0,54 ^b	2,06 ^c
AK407	0,4	4,74 ± 0,54	2,40
AK409	0,4	6,72 ± 0,64	2,53
AK411	0,4	7,07 ± 0,88	2,71
AK383	0,4	6,25 ± 0,95	2,49

^b Στατιστικά σημαντική αύξηση συγκριτικά με το control (P<0,01, με t test).

^c Στατιστικά σημαντική μείωση στο PRI συγκριτικά με το αντίστοιχο control (με χ² test, P<0,001)

Πίνακας 2: Αύξηση της συχνότητας των SCEs και μείωση του PRI σε καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου μετά από την επίδραση των τροποποιημένων στεροειδικών εστέρων με μουστάρδες αζώτου.

Ουσίες	Συγκέντρωση (μM)	SCEs ^a /κύτταρο ± S.E.	PRI ^a
Control		7,20 ± 0,30	2,23
AK427	1,6	31,83 ± 1,07 ^b	1,44 ^c
	2,0	37,60 ± 2,07 ^b	1,46 ^c
AK433	1,6	66,54 ± 2,66 ^b	1,48 ^c
	2,0	66,44 ± 2,49 ^b	1,32 ^c
AK431	1,6	54,60 ± 2,16 ^b	1,40 ^c
	2,0	51,93 ± 2,46 ^b	1,51 ^c
AK407	1,6	22,04 ± 1,61 ^b	1,73 ^c
	2,0	20,29 ± 1,79 ^b	1,96 ^c
AK409	1,6	32,06 ± 1,63 ^b	1,75 ^c
	2,0	40,04 ± 2,37 ^b	1,70 ^c
AK411	1,6	21,95 ± 1,07 ^b	1,75 ^c
	2,0	37,06 ± 1,70 ^b	1,72 ^c
AK383	1,6	8,64 ± 0,48	2,11
	2,0	10,32 ± 0,56	1,95

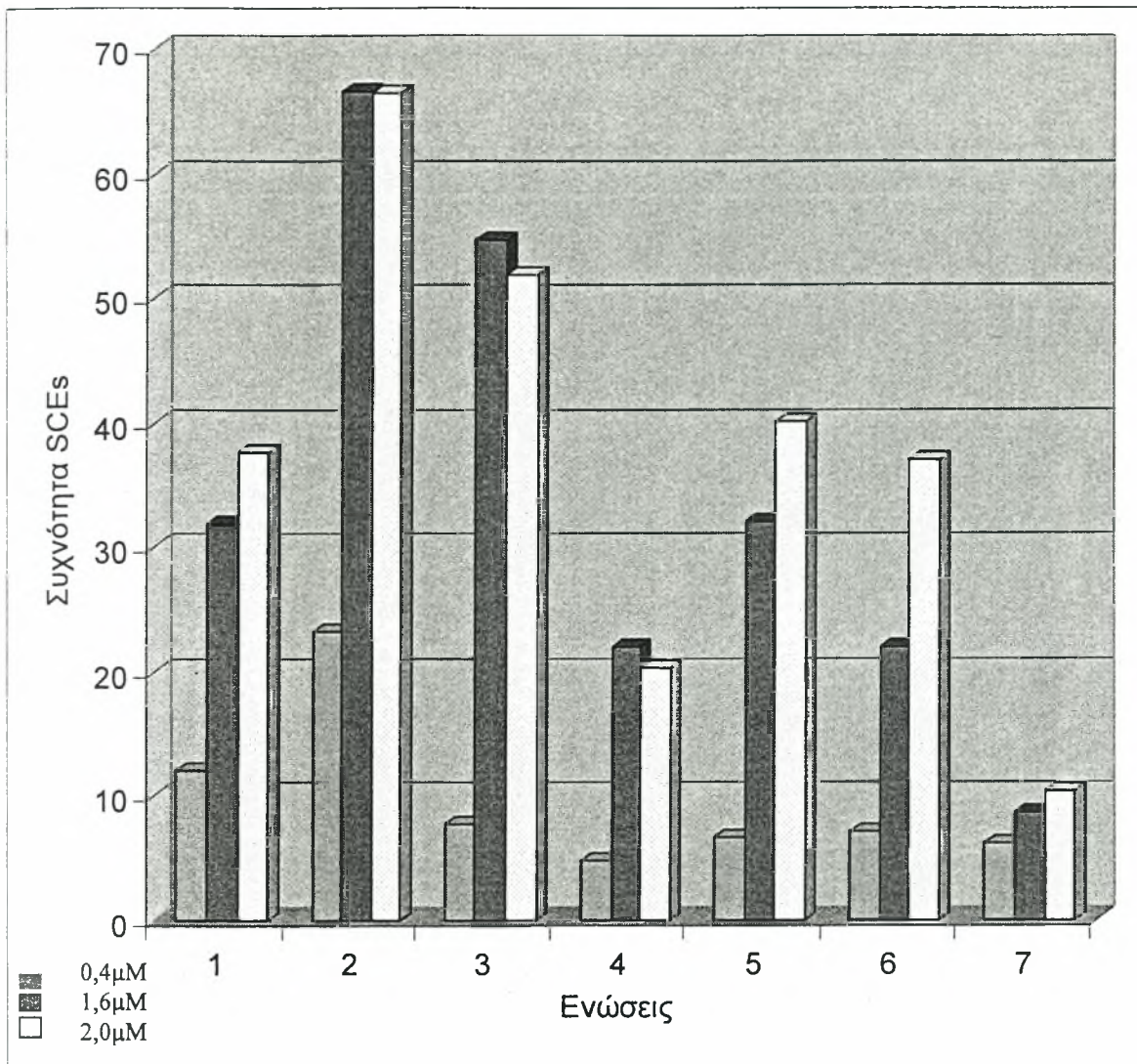
^a Για τον προσδιορισμό του Μ.Ο. των SCEs μελετήθηκαν 20-25 μεταφάσεις της 2^{ης} μιτωτικής διαίρεσης, ενώ για τον προσδιορισμό κάθε τιμής PRI μετρήθηκαν 100 τουλάχιστον μεταφάσεις.

^b Στατιστικά σημαντική αύξηση συγκριτικά με το control (P<0,01, με t test).

^c Στατιστικά σημαντική μείωση στο PRI συγκριτικά με το αντίστοιχο control (με χ² test, P<0,001)

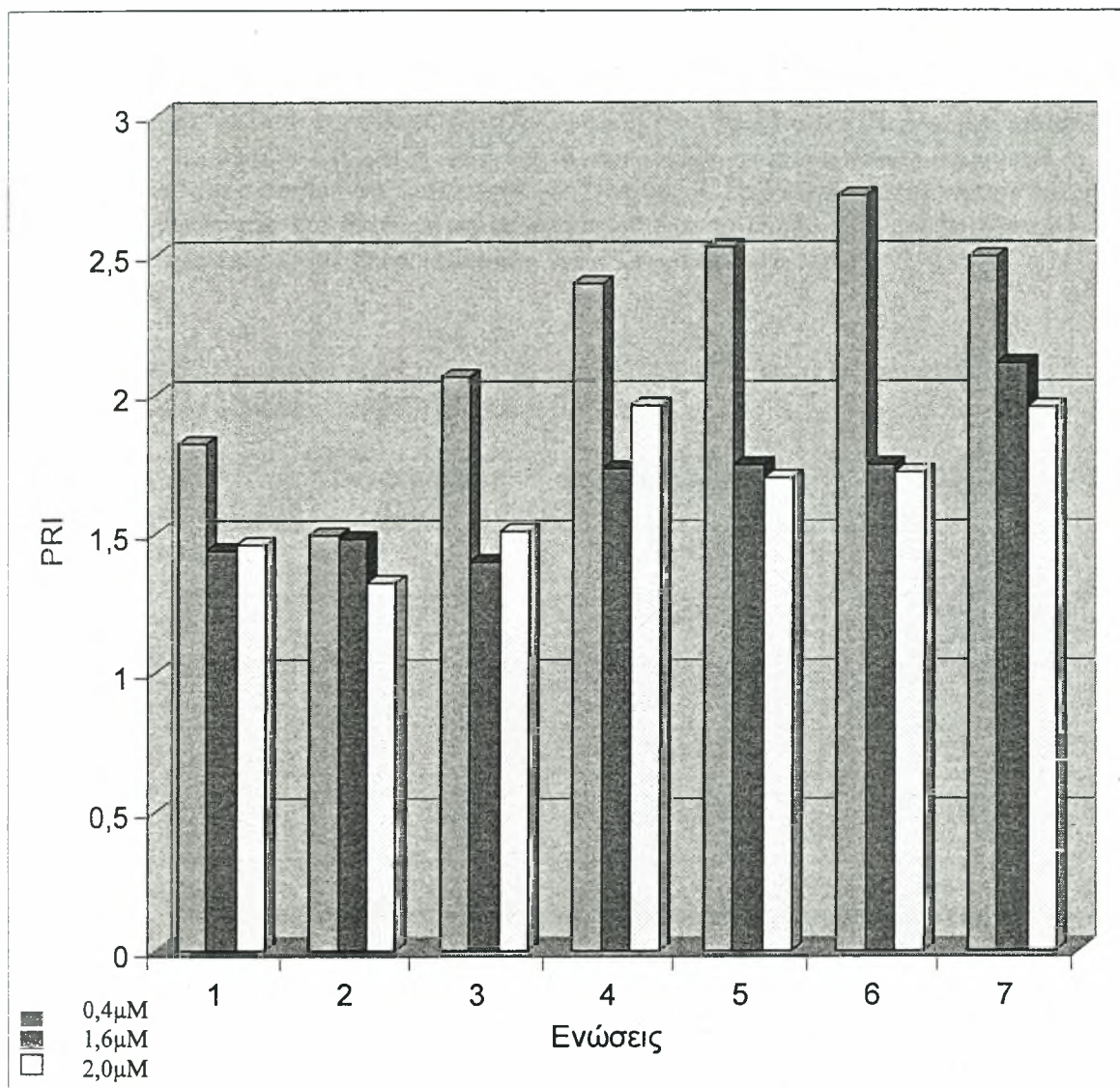
Συντελεστής συσχέτισης των SCEs με τις αντίστοιχες τιμές του PRI κατά Pearson r (r = -0,82, t = 6,54 και P<0,001)

Επίδραση των ενώσεων ΑΚ427-ΑΚ383 στη συχνότητα των SCEs σε καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου



Ραβδόγραμμα 1

Επίδραση των ενώσεων ΑΚ427-ΑΚ383 στο PRI σε καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου



Ραβδόγραμμα 2

Ενότητα Β:

Στην σειρά αυτή των πειραμάτων διευρύνθηκε μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων της ΑΚ433 στις καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου. Παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική ($P<0,001$) αύξηση στη συχνότητα των SCEs καθώς και σημαντική ($P<0,01$) πτώση στις τιμές του PRI. Για μια ακόμη μια φορά παρατηρήσαμε ότι η συχνότητα των SCEs αυξάνει καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της ουσίας στις καλλιέργειες (Πίνακας 3, Ραβδόγραμμα 3) ενώ οι τιμές του PRI μειώνονται και διατηρείται μειωμένη σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων, συγκριτικά πάντα με το control (Πίνακας 3, Ραβδόγραμμα 4).

Πίνακας 3: Κυτταρογεντική μελέτη της ουσίας ΑΚ433 σε καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου (in vitro)

Ουσία	Συγκέντρωση (μΜ)	SCEs/κύτταρο±S.E	PRI
Control		7,44±0,42	2,06
ΑΚ433	0,6	13,82±1,96 ^a	1,74 ^b
«	1,0	21,26±1,43 ^a	1,73 ^b
«	1,6	32,40±1,36 ^a	1,70 ^b
«	2,0	30,07±2,36 ^a	1,67 ^b

- Στατιστικά σημαντική αύξηση των SCEs σε σύγκριση με το control (με το t test $P<0,001$)
- Στατιστικά σημαντική μείωση του PRI σε σύγκριση με το control (με το χ^2 test $P<0,01$)

Επόμενο βήμα ήταν η πραγματοποίηση πειραμάτων για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας και της κυτταροστατικότητας in vivo όπου και χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά διάλυμα 2μm/g βάρους σώματος (bw) της ΑΚ433 σε ποντίκια DBA/2, ενοφθαλμισμένα με όγκο Ρ388. Επισημαίνεται ότι πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων για πιο τεκμηριωμένα αποτελέσματα όπου και παρατηρήθηκε σημαντική ($P<0,001$) αύξηση στη συχνότητα των χρωματιδιακών ανταλλαγών (Πίνακας 4, Ραβδόγραμμα 5 και 6), καθώς επίσης και σημαντική ($P<0,01$) μείωση του PRI (Πίνακας 4, Ραβδόγραμμα 7 και 8).

Πίνακας 4: Επαγωγή των SCEs και μείωση του PRI σε P388 ασκίτικα κύτταρα DBA/2 ποντικών υπό την επίδραση της ουσίας AK433 in vivo

Πείραμα 1 ^ο	SCEs/κύτταρο±S.E.	PRI
Control	11,97±0,94	2,16
2 ή AK433 (2μm/gbw)	27,62±1,48 ^a	1,29 ^c
Πείραμα 2 ^ο	SCEs/κύτταρο±S.E.	PRI
Control	8,76±0,89	1,62
2 ή AK433 (2μm/gbw)	15,50±0,95 ^b	1,25 ^d

a, b. Στατιστικά σημαντική αύξηση σε σύγκριση με το control (με το t test P<0,001)
 c, d. Στατιστικά σημαντική μείωση σε σύγκριση με το control (με το χ^2 test P<0,01)

Υπενθυμίζουμε ότι για τη συσχέτιση κυτταρογενετικών in vitro και in vivo ευρημάτων με ογκολογικές παρατηρήσεις χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά η AK433 σε ποντίκια DBA/2, ενοφθαλμισμένα με όγκο P388. Το θεραπευτικό σχήμα που επιλέχθηκε, περιλάμβανε την εφάπαξ δόση 20μm/g bw. Τα αποτελέσματα ήταν στατιστικά σημαντικά (P<0,01 με το Wilcoxon test). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα προηγούμενα κυτταρογενετικά αποτελέσματα επιβεβαιώνει και την αντινεοπλασματική δράση της ουσίας (Πίνακας 5, Ραβδόγραμμα 9).

Πίνακας 5: Μελέτη επιβίωσης DBA/2 ποντικών ενοφθαλμισμένων με ασκίτικα κύτταρα P388 λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας υπό την επίδραση της ουσίας AK433

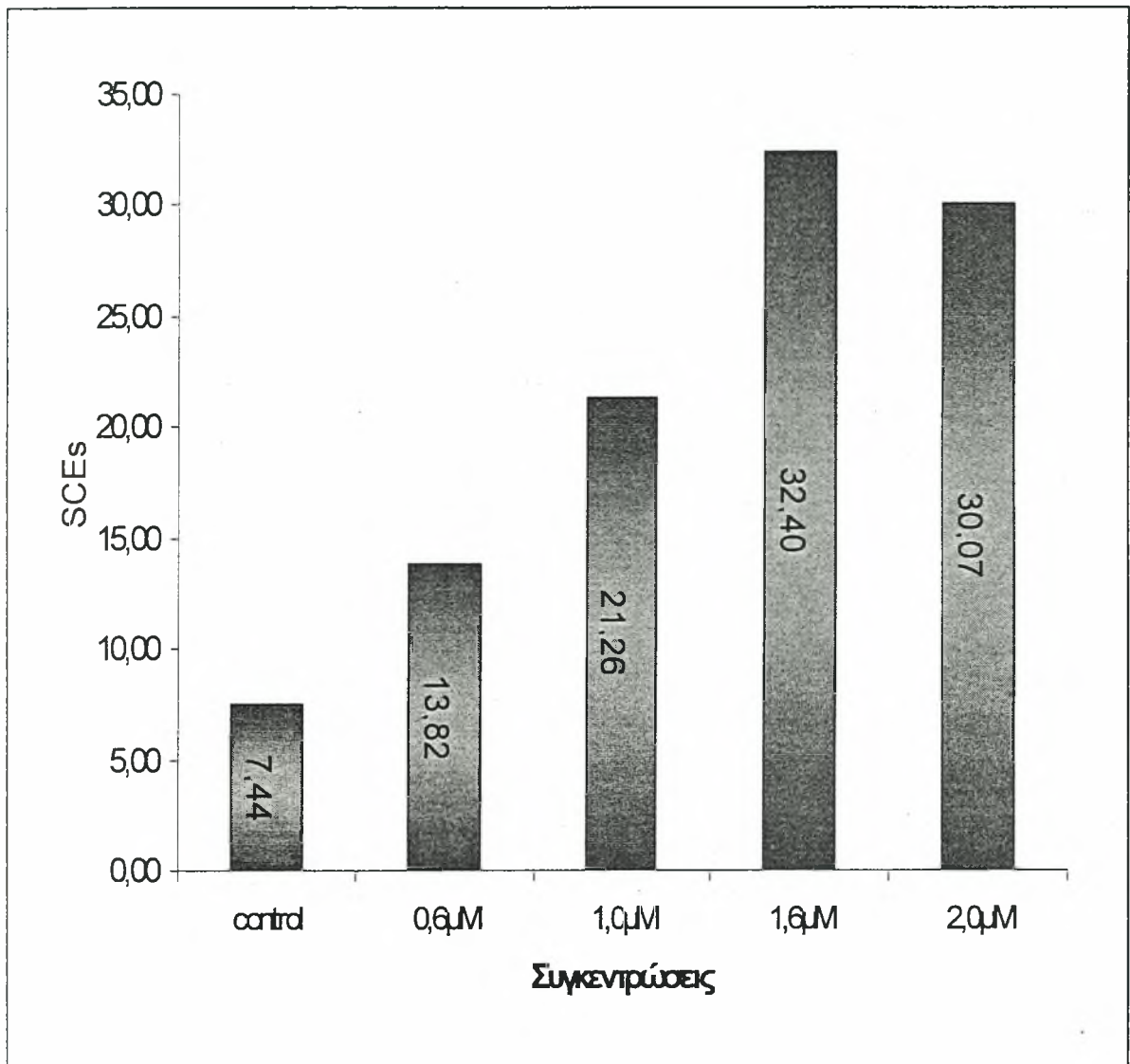
	MST ± S.E.*	T/C%**
Control	11,62±0,37	100%
2 ή AK433 (20μm/gbw)	15,00 ^a ±0,40	129,08% ^a

a. Στατιστικά σημαντική αύξηση σε σύγκριση με το control (Wilcoxon test P<0,001)

*MST = Μέσος χρόνος επιβίωσης σε μέρες

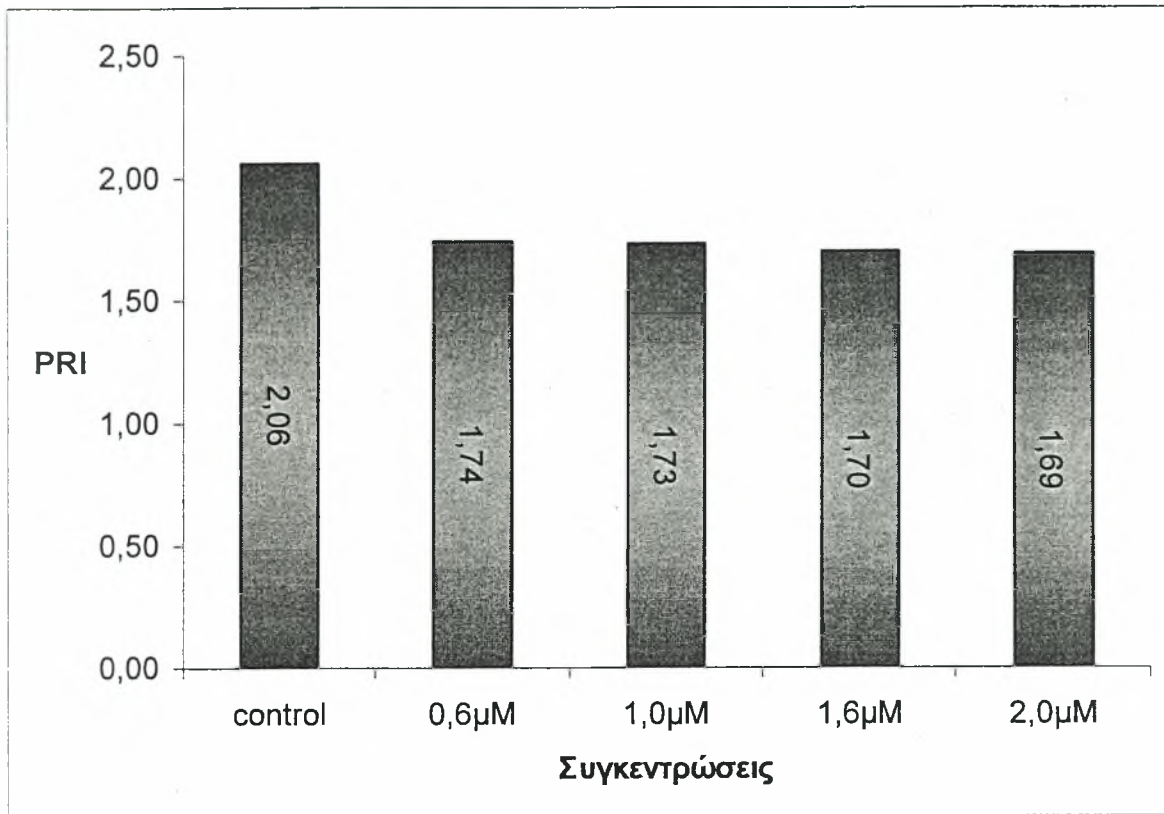
**T/C% = Εκατοστιαία αναλογία εξεταστέων προς μάρτυρες

Κυτταροτοξική δράση της ΑΚ433 σε καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου (in vitro)



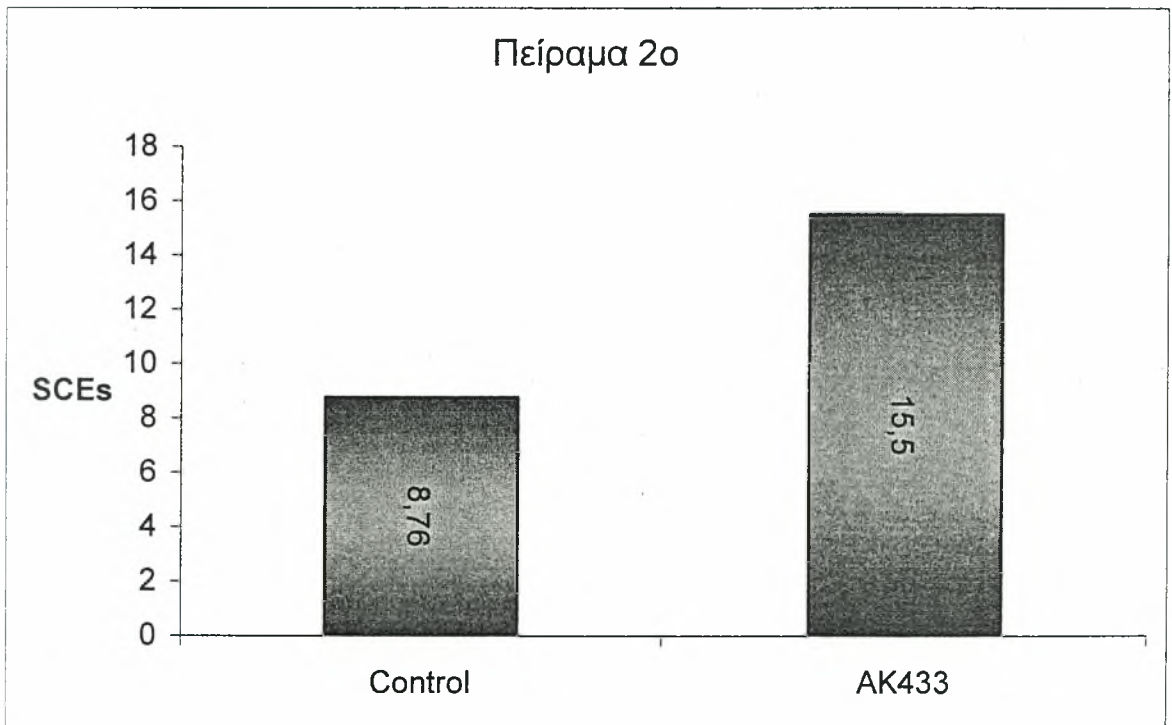
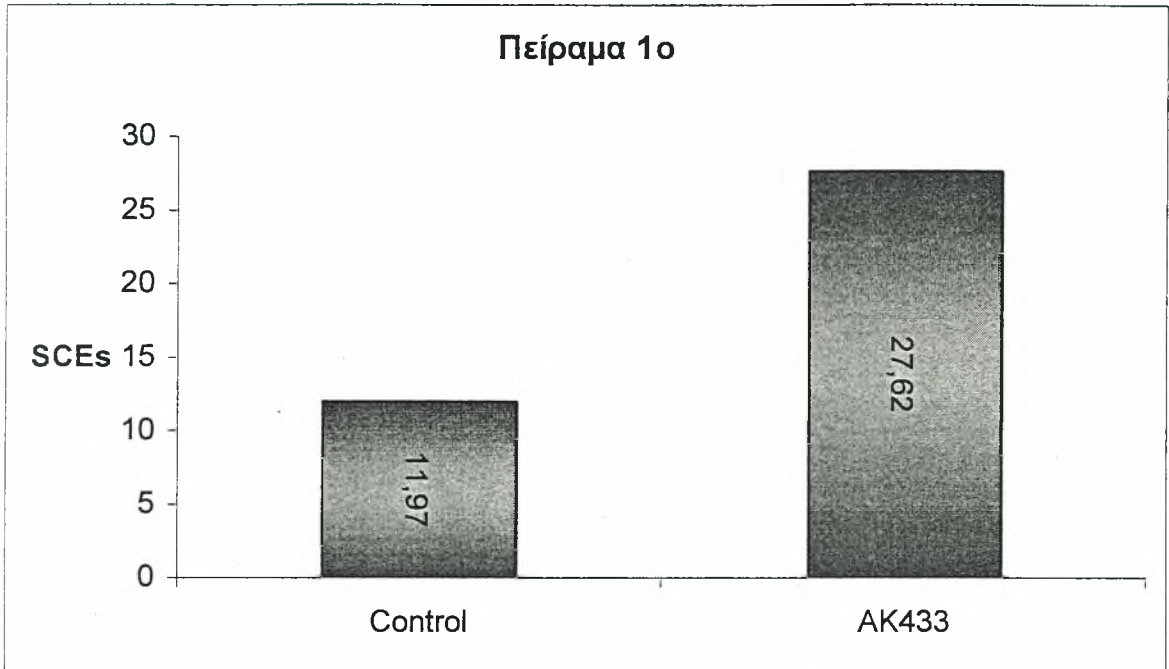
Ραβδόγραμμα 3

Κυτταροστατική δράση της ΑΚ433 σε καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου



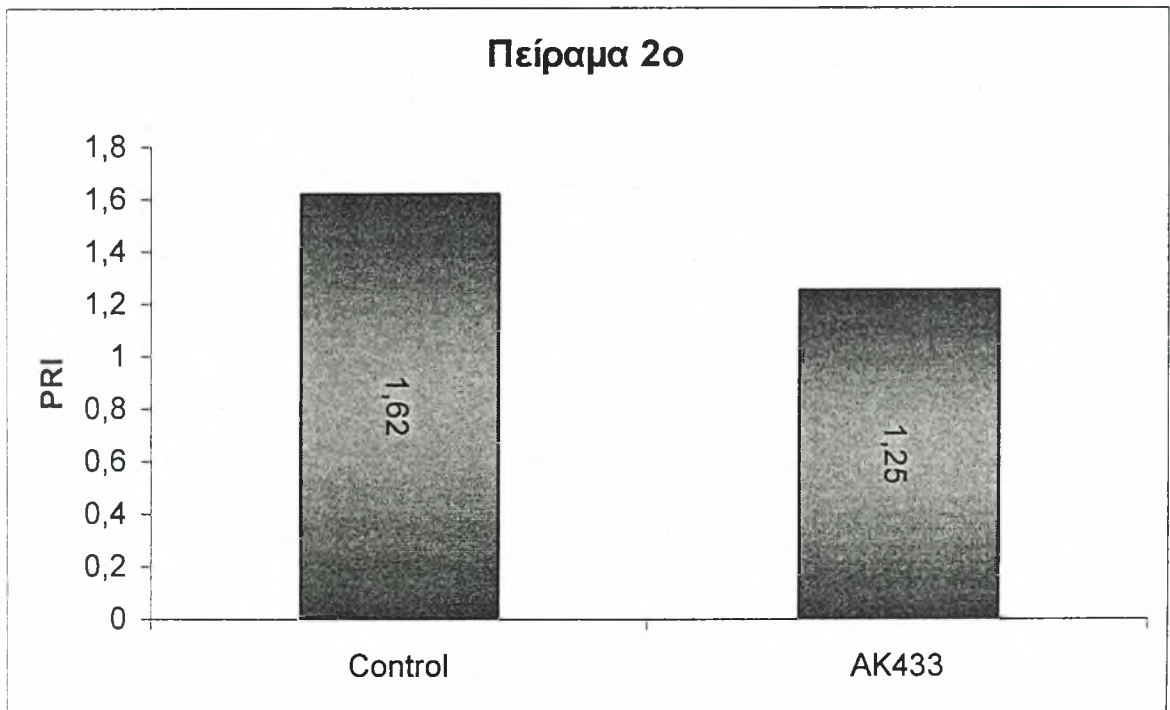
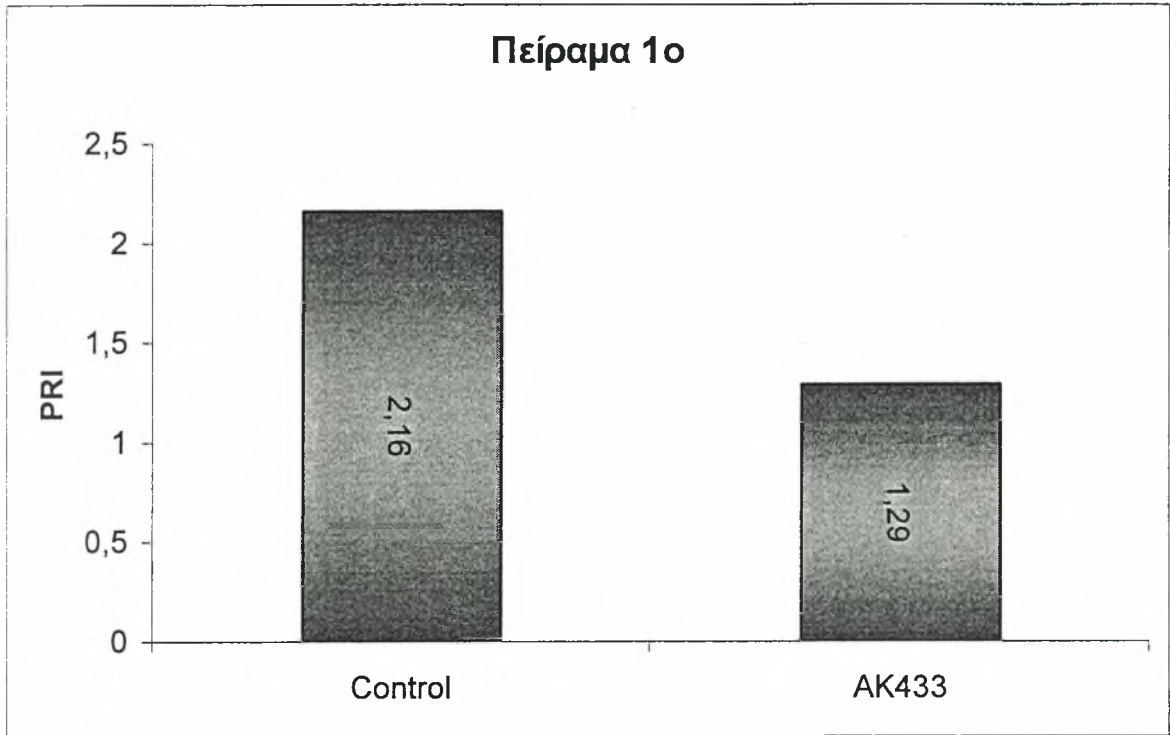
Ραβδόγραμμα 4

Κυτταροτοξική δράση της ΑΚ433 σε ασκίτικα κύτταρα όγκου P388 (2 πειράματα)



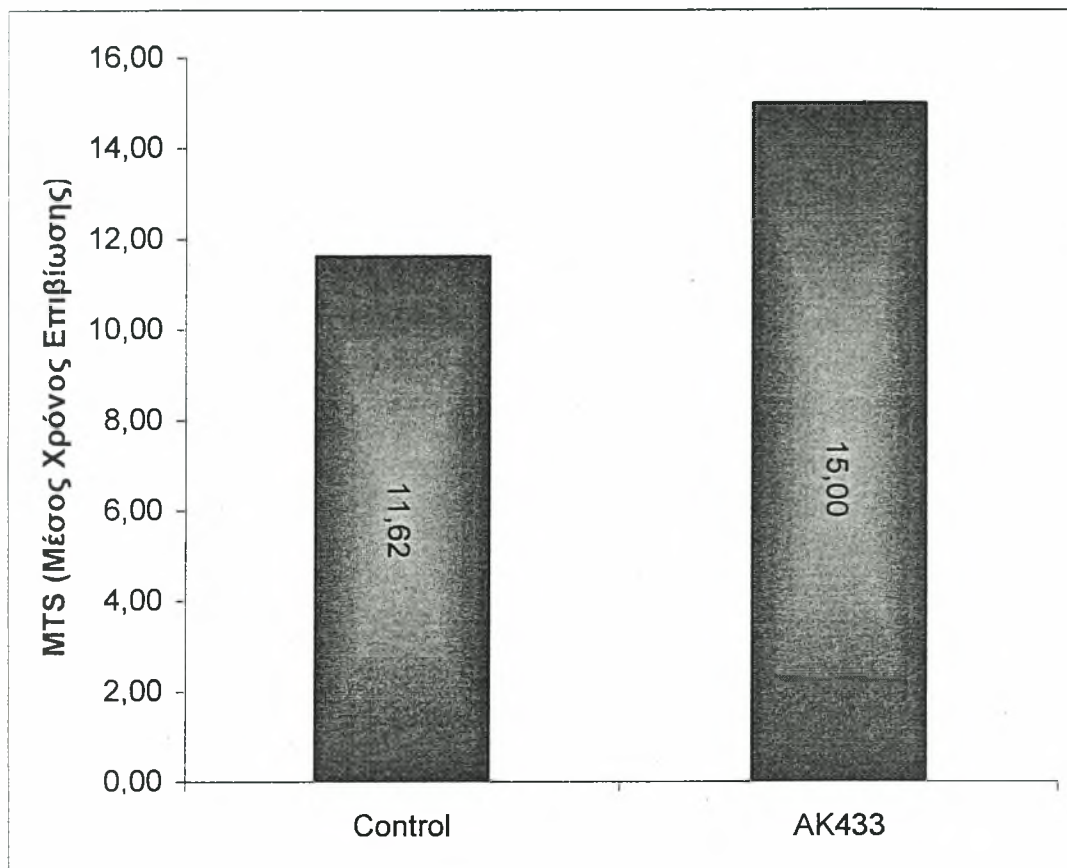
Ραβδόγραμμα 5 και 6

Κυτταροστατική δράση (PRI) σε ασκίτικα κύτταρα όγκου P388
(2 πειράματα)



Ραβδόγραμμα 7 και 8

Αντινεοπλασματική δράση της AK433 σε P388 ασκίτικα κύτταρα σε DBA/2 ποντίκια



Ραβδόγραμμα 9

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι στεροειδείς ορμόνες, λιποδιαλυτά μόρια, δεσμεύονται από κυτταροπλασματικούς υποδοχείς και ως πρωτεϊνικά τροποποιημένα σύμπλοκα στοχεύουν στο DNA όπου δεσμεύονται ως μεταγραφικοί παράγοντες. Παράλληλα επισημάνθηκε ότι έκτοπη παραγωγή υποδοχέων στεροειδών ανιχνεύτηκε κατά το μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά που διατηρείται και κατά την εξέλιξη του καρκίνου.

Αυτές οι παρατηρήσεις έδωσαν το έναυσμα για τη σχεδίαση και τη σύνθεση τροποποιημένων στεροειδών εστέρων με αλκυλιωτικούς παράγοντες για πιθανή αποτελεσματικότερη και επιλεκτική δράση επί των καρκινικών κυττάρων. Τα ήδη χρησιμοποιούμενα στην κλινική πράξη θεραπευτικά σχήματα που εμπεριέχουν αλκυλιωτικούς παράγοντες για την αντιμετώπιση του καρκίνου παρουσιάζουν εκτεταμένες παρενέργειες, γεγονός που απαιτεί μειωμένη αλλά και με αποτελεσματικότερο τρόπο χορήγησή τους.

Η τροποποίηση του στεροειδούς πιθανώς αυξάνει την πρόσληψη του αλκυλιωτικού από τα κύτταρα μέσω του στεροειδούς-φορέα και μάλιστα οι τροποποιήσεις αποσκοπούν στην καλύτερη πρόσδεση του αλκυλιωτικού επί του DNA με σκοπό βέβαια όχι τη τροποποίηση της μεταγραφικής του λειτουργίας που είναι πιθανή αλλά την πρόκληση βλαβών επί του DNA. Ως γνωστό οι μουστάρδες αζώτου είναι ισχυροί αλκυλιωτικοί παράγοντες. Στο σύνολό τους έχουν διαφορετική δομή, αλλά κοινό μηχανισμό δράσης. Έχουν την ικανότητά να προσθέτουν αλκυλιωτικές ομάδες σε θέσεις όπου υπάρχουν άτομα O, N, S και P επί του DNA τροποποιώντας τη δομή ή/και τη λειτουργία του προκαλώντας έτσι γονοτοξική δράση.

Γενικά, οι πλέον κοινές θέσεις αλκυλίωσης, είναι τα N-7, N-1 και O-6 της γουανίνης, τα N-1, N-3 και N-7 της αδενίνης, το N-3 της κυτοσίνης και O-4 της θυμιδίνης (N. Berger 1993). Η τροποποίηση στη θέση N-7 της γουανίνης με τη προσθήκη αλκυλιωτικής ομάδας, επειδή δεν αλλοιώνει το σχηματισμό ζευγών βάσεων του DNA δεν εκφράζεται σε κανένα επίπεδο. Αντίθετα αλκυλίωση του προκαλείται στις θέσεις N-3 της κυτοσίνης και O-6 της γουανίνης και O-4 της θυμίνης προκαλεί παρεμβολή μεταξύ των ζευγών βάσεων της αλυσίδας του DNA και έτσι επέρχεται τροποποίηση του DNA που εκφράζεται με αλλαγές της δομής του κατά τη διαδικασία του διπλασιασμού και της αντιγραφής το, γεγονός το οποίο εκφράζεται ως γονοτοξικότητα ή μεταλλαξιγένεση (N. Berger 1993).

Τροποποιημένοι στεροειδείς εστέρες με μουστάρδα αζώτου συγκρινόμενοι σε μοριακή βάση και σε σχέση με τη δράση επιμέρους συστατικών τους επάγουν χρωματιδιακές ανταλλαγές και μεταβάλλουν την κυτταροστατικότητα φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου (in vitro) (V Karayianni & συν, 2003).

Το σκεπτικό της σύνθεσης αυτών των ουσιών βασίστηκε στο ότι ένας τροποποιημένος στεροειδής φορέας έχει τη δυνατότητα να δρα σαν βιολογική “πλατφόρμα” για την πιο αποτελεσματική μεταφορά αλκυλιωτικού παράγοντα σε διαφοροποιημένους ιστούς-στόχους που διαθέτουν αντίστοιχους υποδοχείς ή ακόμη και επιλεκτικά σε αντίστοιχους καρκινικούς ή και σε καρκινικούς ιστούς που εμφανίζουν εκτοπική παραγωγή τέτοιων υποδοχέων. (Catsoulacos & συν. 1976). Οι τροποποιημένοι στεροειδείς εστέρες που μελετήσαμε διαθέτουν διευρυμένο τον Β δακτύλιο του στεροειδούς σε λακταμικό. Σε μια ευρύτερη προσπάθεια υποστηρίξαμε

ότι η ενσωματωμένη $-NHCO-$ ομάδα αντιδρά με ανάλογες ομάδες που εμπεριέχονται στα νουκλεϊνικά οξέα και τις πρωτεΐνες των χρωμοσωμάτων, με αποτέλεσμα την τοπική αύξηση του αλκυλιωτικού και την παράταση της γονοτοξικής δράσης του αλκυλιωτικού παράγοντα, όπως άλλωστε και είναι γενικά αποδεκτό (V. Karayianni & συν, 2003, 2002). Ο λακταμικός δακτύλιος βέβαια του ομο-αζα στεροειδή φορέα μπορεί να δεσμευθεί και σε άλλα κυτταρικά στοιχεία που εμπεριέχουν ανάλογες δομές, όπως ειδικά κυτταρικά ένζυμα, οπότε ως ανταγωνιστής ή ως αγωνιστής παρεμβαίνει αρνητικά σε ένα παρόμοιο μονοπάτι όπως μια ινδο-βενζο ή άλλη στεροειδική λακταμική ομάδα, με τις πρωτεϊνοκινάσες. Επιπλέον, η ενεργότητα αυτών των τροποποιημένων στεροειδών μπορεί να σχετίζεται και με μεταβολικά τους παράγωγα ή ακόμη και να υφίσταται περισσότερο ουσιαστική τροποποίηση, όπως για παράδειγμα αναφέρεται ότι αλληλεπιδρούν με μεμβρανικά ένζυμα, σχετίζονται με τη μιτοχονδριακή αναπνοή ή ακόμα και με την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Camoutsis & συν, 2003, Μα D & συν, 1989).

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα όπου διαπιστώθηκε ότι οι στεροειδείς ορμόνες έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς για την μεταφορά των αλκυλιωτικών παραγόντων σε ειδικούς ιστούς-στόχους. Οι περισσότεροι από τους στεροειδείς εστέρες αλκυλιωτικών παραγόντων δε φαίνεται να έχουν αποτελέσματα σε ποντίκια όπου μεταμοσχεύτηκαν λεμφοειδής όγκοι L1210 και λεμφοκυτταρική λευχαιμία P388. Σε αντίθεση οι νέοι ομο-αζα στεροειδείς εστέρες με την τροποποίηση εισαγωγής της λακτάμης στον A- ή -D δακτύλιο του στεροειδούς πυρήνα και από ένα εύκολα διασπώμενο εστερικό δεσμό, έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα σε αυτά τα λευχαιμικά συστήματα, όπως επίσης και σε στερεούς όγκους τρωκτικών συμπεριλαμβανομένου και αλλομοσχευμάτων του ανθρώπου.(Camoutsis C. & συν, 2003, V. Karayianni & συν, 2003)

Αν αναφερθούμε σε άλλα χαρακτηριστικά των ουσιών που μελετήσαμε οι εστέρες AK427, AK433 και AK431 σε σύγκριση με τις AK407, AK409 και AK411 διαφέρουν στον D δακτύλιο του στεροειδικού σκελετού. Συγκεκριμένα οι ουσίες AK427, AK433 και AK431 φέρουν την $-NHCOCH_3-$ ομάδα εξωκυκλικά τοποθετημένη στο D δακτύλιο ενώ οι AK407, AK409 και AK411 διαθέτουν διευρυμένο τον D δακτύλιο εξαιτίας της ενδοκυκλικής τοποθέτησης της ομάδος $-NHCO-$. Όπως διαφαίνεται στους Πίνακες 1 και 2, σύγκριση των ευρημάτων που προκύπτουν από τις ενώσεις AK427, AK433 και AK431 (1^η ομάδα) είναι δραστικότερες από τις ενώσεις AK407, AK409 και AK411 (2^η ομάδα). Αν λάβουμε υπόψη μας τον αλκυλιωτικό παράγοντα και το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας των οξέων (υποκαταστάτες του βενζολίου), θα μπορούσαμε να υποστηρίξουμε ότι το ακεταμίδιο στην 17-β θέση του στεροειδικού εστέρα πιθανώς συμβάλλει στην σημαντική πρόκληση βλαβών του DNA ή και στη μη επιδιόρθωσή του στα κύτταρα που εκφράζονται στο σύνολό τους με αύξηση της συχνότητας των SCEs έναντι του μάρτυρα και με μείωση του PRI. Μάλιστα, η αύξηση της συχνότητας των SCEs και η πτώση του PRI αυξάνονται γραμμικά ανάλογα με τη συγκέντρωση τους. (Πίνακας 1 & 2, Ραβδογράμματα 1 & 2)

Οι ενώσεις που μελετήσαμε, διαφέρουν και ως προς το αλκυλιωτικό τους τμήμα. Αυτές που φέρουν ως αλκυλιωτικό τη μουστάρδα του φαινυλοξικού, ουσίες AK433, AK409 (Σχήμα 1) αποδείχτηκαν δραστικότερες από τις αντίστοιχες που φέρουν τη μουστάρδα του φαινυλοβουτυρικού (χλωραμπουκίλη), ουσίες AK427 και AK411. Οι ουσίες AK427 και AK433 ενώ δεν παρουσιάζουν μεταξύ τους διαφορές στο στεροειδικό σκελετό, διαφέρουν στο μήκος του οξέος που ως υποκαταστάτες του βενζολίου μετέχει στη δημιουργία του εστερικού δεσμού με το στεροειδικό τμήμα και παρεμβαίνει ανάμεσα στο αλκυλιωτικό και στο στεροειδικό φορέα.

Συγκεκριμένα, η ένωση στην AK427 επιτυγχάνεται με φαινυλο-βουτυρικό σε αντίθεση με την ένωση AK433 όπου στην ένωση υπάρχει φαινυλ-οξικό. Κατά τη σύγκριση των δύο αυτών ουσιών παρατηρήθηκε ότι η ουσία AK433 είναι δραστικότερη από την AK427.

Τα ίδια αποτελέσματα παρατηρούνται κατά τη σύγκριση των ενώσεων AK409 και AK411 όπου η AK409 η οποία συνδέει τον αλκυλιωτικό παράγοντα και το στεροειδή δακτύλιο με φαινυλο-οξικό προσδίδει στον εστέρα σημαντικότερη βιολογική δράση.

Πιθανώς οι μεταβολίτες του φαινυλ-οξικού έχουν καλύτερη γονοτοξική δράση εφόσον παρουσιάζουν σημαντική αύξηση της συχνότητας των SCEs καθώς και κυτταροστατική δράση εξαιτίας της σημαντικής μείωσης του PRI.

Στο σύνολό τους οι ουσίες που μελετήσαμε AK433, AK427, AK431, AK407, AK409, AK411 επάγουν σημαντική αύξηση στη συχνότητα των SCEs που ακολουθείται από σημαντική μείωση του PRI σε φυσιολογικά λεμφοκύτταρα ανθρώπου ευρήματα που μας επιτρέπουν να τις χαρακτηρίσουμε ως δυνάμει αντινεοπλασματικές. Διευκρινίζεται ότι μετά τους υπολογισμούς των SCEs και του PRI στα *in vitro* πειράματα υπολογίστηκε (ο συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson $r=-0,82$, $t=6,54$, $P<0,001$).

Είναι αποδεκτό ότι τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν ανάλογους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς (D. Mourelatos, 1996). και έτσι ευρήματα επί των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων αντιστοιχούν σε πιθανά ευρήματα σε ορισμένους καρκινικούς ιστούς όπως η σχέση δραστηριότητας των ουσιών $AK433>AK431>AK427>AK409>AK411>AK407$ ή $2>3>1>5>6>4$

Τα θετικά αποτελέσματα της μελέτης των κυτταρογενετικών παραμέτρων του SCEs και PRI σε καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος ανθρώπου ενδείκνυνται για τη συνέχιση σε πειραματικούς όγκους για να διαπιστωθεί η δράση της AK433 σε *in vivo* συστήματα.. Είναι φανερό ότι όσο αυξημένο εμφανίζεται το επίπεδο των SCEs μετά την επίδραση μιας ουσίας τόσο αναμένεται να είναι αποτελεσματικότερη εφόσον οι SCEs οφείλονται όχι μόνο στην πρόκληση βλαβών αλλά και στην ανεπιδιόρθωτες βλάβες του (Deen F. & συν, 1986).

Πράγματι, από τα *in vivo* πειράματα όπου μελετήθηκε η συχνότητα των SCEs και η διακύμανση του PRI σε ασκικά κύτταρα όγκου P388 μετά την επίδραση της ουσίας AK433 η οποία χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε DBA/2 ποντίκια σε συγκέντρωση 2μm/g bw, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στη συχνότητα των SCEs η οποία ήταν παρόμοια με αυτή που προκλήθηκε *in vitro*, καθώς και σημαντική μείωση του PRI. Η *in vivo* δραστική συγκέντρωση προέκυψε από τις *in vitro* μελέτες όπου το καλύτερο κυτταρογενετικό εύρημα (αύξηση των SCEs και πτώση του PRI) προέκυψε στην συγκέντρωση των 2μM. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν για ακόμη μία φορά ότι οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί των φυσιολογικών κυττάρων είναι ανάλογοι με των καρκινικών και επιπρόσθετα ότι η μέθοδος των SCEs είναι εξαιρετικά ευαίσθητος δείκτης ανίχνευσης των ανεπιδιόρθωτων βλαβών και επισκευής του DNA που συμβαίνουν στο κύτταρο.

Τέλος, από τα αποτελέσματα των πειραμάτων επιβίωσης σε ποντίκια ενοφθαλμισμένα με όγκο P388 λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση σε δόση που προβλέφθηκε από κυτταρογενετικές παρατηρήσεις. Η δόση που επάγει αντινεοπλασματική δράση (20μm/g bw) είναι δέκα φορές μεγαλύτερη από εκείνη (2μm/g bw) που διπλασιάζει το επίπεδο των SCEs σε καρκινικά P388 κύτταρα *in vivo*. Γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ουσία αυτή είναι δυνάμει αντινεοπλασματική.

Επιπρόσθετα έχει βρεθεί θετική συσχέτιση μεταξύ της αύξησης των SCEs και της μείωσης του PRI των κυττάρων in vitro και in vivo (Πίνακες 2 & 3). Έχει διαπιστωθεί από άλλους ερευνητές (Morris & συν, 1984) ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της αύξησης των SCEs και την μείωσης του ρυθμού πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των πειραματόζων. Άρα αύξηση των SCEs που συνοδεύεται από πτώση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων, μπορεί να εκληφθεί ως μία ένδειξη κυτταροτοξικής δράσης.

Υποστηρίζεται επίσης ότι η αποτελεσματικότητα των αντινεοπλασματικών παραγόντων στο να επάγουν SCEs in vitro (Tofilon & συν, 1985) και in vivo (Mourelatos & συν, 1988) συσχετίζεται θετικά με την ανταπόκριση νεοπλασμάτων στην αντινεοπλασματική ενέργεια των παραγόντων αυτών in vivo και επίσης με την μέθοδο των SCEs μπορεί να προβλεφθεί η ευαισθησία των νεοπλασματικών κυττάρων στα πιθανώς αντινεοπλασματικά φάρμακα για τα οποία υπάρχει μεγάλη συσχέτιση μεταξύ της κυτταροτοξικής τους ικανότητας και της επαγωγής των SCEs (Deen & συν, 1986)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα των μελετών αυτής της εργασίας προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

1. Με κριτήρια την αύξηση της συχνότητας των SCEs και την πτώση του PRI, η σειρά δραστικότητας των νεοσυντιθέμενων ενώσεων είναι: AK433>AK431>AK427>AK409>AK411>AK407 ή 2>3>1>5>6>4.
2. Οι ενώσεις που φέρουν ως αλκυλιωτικό τη μoustάρδα του φαινυλοξικού (ενώσεις AK433&AK409) αποδείχτηκαν δραστικότερες από τις αντίστοιχες που περιέχουν χλωραμπουκίλη (ενώσεις AK427&AK411).
3. Η παρουσία της ομάδας -NHCO- στο στεροειδικό δακτύλιο D είναι απαραίτητη για την εκδήλωση κυτταρογενετικής δράσης, αλλά η εξωκυκλική τοποθέτησή της (ενώσεις AK427, AK433 & AK431) αποδείχτηκε περισσότερο δραστική συγκρινόμενη με την ενδοκυκλική (ενώσεις AK407, AK409 & AK411)
4. Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αύξησης της συχνότητας των SCEs και της πτώσης του PRI που επάγονται από τις νεοσυντιθέμενες ενώσεις σε καλλιέργεια φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου.
5. Παρόμοια κυτταρογενετική δράση της AK433 εμφανίζεται σε καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου και σε καρκινικά P388 κύτταρα
6. Στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της αύξησης των SCEs και της πτώσης του PRI αποδεικνύει αντικαρκινική δράση
7. Κυτταρογενετικές μελέτες (in vitro, in vivo) συνδυαζόμενες με ογκολογικές παρατηρήσεις (αυξημένη επιβίωση καρκινοπαθών P388 ποντικών) επιβεβαιώνουν την αντινεοπλασματική δράση της AK433

Α. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ο Ηλιόπουλος Π. Συμβολή στην εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της χημειοθεραπείας με κυτταρογενετικές μεθόδους, Διδακτορική Διατριβή. 1995
- ο Κουράκης Α.Σ. Συνεργική δράση αντινεοπλασματικών φαρμάκων με τις μεθυλοξανθίνες – Μελέτη των χρωματιδιακών ανταλλαγών – Διδακτορική Διατριβή. 1983
- ο Λαλιάρης Θ. Κυτταρογενετική μελέτη της δράσης της χλωροπρομαζίνης σε συνδυασμό με καφεΐνη και αντινεοπλασματικά φάρμακα σε φυσιολογικά κύτταρα του ανθρώπου *in vitro* και σε καρκινικά κύτταρα μυός *in vivo*, Διδακτορική Διατριβή. 1988
- ο Μουρελάτος Δ. Καρκίνος και Διατροφή. Ιατρική, 48, 75-78, 1985
- ο Μουρελάτος Δ. Στοιχεία εφαρμοσμένης γενετικής του ανθρώπου (University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 1990)
- ο Μπούτης Λ.Α. Ομο-αζα-στεροειδικά παράγωγα του φαινυλοξικού αζωθυπερίτου(Πειραματική μελέτη της κυτταροστατικής ενέργειας επί μεταμοσχεύσιμων όγκων) Διδακτορική διατριβή, 1973
- ο Μυλωνάκη-Χαραλάμπους Ε. Η *in vitro* και *in vivo* επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε λεμφοκύτταρα πνευμοκαρκινοπαθών και καρκινικά κύτταρα πειραματοζώων, Διδακτορική Διατριβή. 1997
- ο Ντόζη-Βασιλειάδου Ι., Μουρελάτος Δ. Κυτταρογενετικές μέθοδοι για τη βελτίωση και καθοδήγηση της χημειοθεραπείας. Σε «Εξελίξεις και προοπτικές στην έρευνα βελτίωσης του καρκίνου», Γ. Φουντζήλας, σελ. 137-154, (University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 1989
- ο Πέτρου Χ. Κυτταρογενετική και βιοχημική μελέτη σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα ανθρώπου και ποντικού για τη βελτίωση της χημειοθεραπείας, Διδακτορική Διατριβή. 1989
- ο Σπαντίδος Δ.Α. Μοριακή αντικύτταρική ογκολογία. Λιτσας, Αθήνα, 1992
- ο Παπαγεωργίου Α.Δ. Μελέτη του μηχανισμού δράσης τνός όμο-αζα-στεροειδικού παραγώγου του π-φαινυλοξικού αζωθυπερίτη (ASE) στα καρκινικά κύτταρα του EHRLICH. Διδακτορική Διατριβή, 1983.

B. ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alberts B., D. Bray, A. Johnson et al, Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Έκδοση 2000
- Bender R., Preston R.J., Leonard R.C. Pyatt B.E., Gooch P.C. & Shelby M.D. Chromosomal aberration and SCE frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large population sample. *Mut. Res.* 204, 421-433, 1988
- Berger N.A. Alkylating agents in : Principles and practice of Oncology V.T. Devita, S. Hellman, S.A. Rosenberg, J.B. Lippincott. Co 4th edit 1993
- Brian C. Beard, Samuel H. Wilson , and Michael J. Smerdon, Suppressed catalytic activity of base excision repair enzymes on rotationally positioned uracil in nucleosomes, *Brookhaven National Laboratory*, Upton, NY, and approved April 29, 2003
- Brendel M & Ruhland A. Relationships between functionality and genetic toxicology of selected DNA-damaging agents. *Mut. Res.* 133, 51-85, 1984
- Brookes P. & Lawley, P. D. The reaction of mono- and bifunctional alkylating agents with nucleic acids. *Biochem. J.* 80, 495-503, 1961
- Butler M.G. SCEs in 4 human races. *Mut. Res.* 91, 377-379, 1981
- Carrano A.V. & Natarajan A.T. Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mut. Res.* 204, 379-406, 1988
- Camoutsis C, Catsoulacos D, Karayianni V, Papageorgiou A, Mourelatos D, Mioglou E, Kristi Z, Nikolaropoulos S, Comparative study of sister chromatid exchange induction and antitumour effects by homo-aza-steroidal esters of {p-[bis(2-chloroethyl)amino]phenyl}butyric acid, *Cancer Detection* 25, (2001) pp. 558-564
- Catsoulacos P. Structure-antileukemic activity relationships of modified steroidal alkylating agents in R388 and L1210 murine leukemias. *Επιθεώρηση Κλινικής Φαρμακολογίας and Φαρμακοκινητικής*, International Edition 2, 45-50, 1988
- Camoutsis C, Catsoulacos D, Karayianni V, Papageorgiou A, Mourelatos D, Mioglou E, Kritsi Z, Nikolaropoulos S, Comparative study of sister chromatid exchange induction and antitumour effects by homo-aza-steroidal esters of [p-[bis(2-chloroethyl)amino]phenyl]butyric acid. *Cancer Detect Prev.* 25, 558-564, 2001

- Camoutsis Charalambos and T.P.Trafalis Dimitrios, An overview on the antileukemic potential of D-homo-aza- and respective 17B-acetamidosteroidal alkylating esters, *International New Drugs* 21:47-54, 2003
- Carell T., Burgdorf L.T., Kundu L.M and Cichon M. The mechanism of action of DNA photolyases, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001, 5:491-498
- Crossen P.E. SCE in lymphocytes. In "SCE" (Sandberg A.A., ed.) Vol 2, pp. 175-194, Alan R. Liss, Inc., New York, 1982
- Davis P.J. Evans W.e. and Perry J.M. Mitotic recombination induced by chemical and physical agents in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut. Res.* 29, 301-314, 1975
- Deen D. F., Kendall L.E, Marton L. J. and Tofilon P.J.: "Prediction of human tumor cell chemosensitivity using the SCE assay" *Cancer Res.* 46, 1599-1602. 1986
- Defais M. & Devoret R., *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, 2001
- Elavarasi D., Ramakrishnan V., Suramoniam T., Ramesh A., Cherian M. & Emmanuel C. Genotoxicity study in lymphocytes of workers in wooden furniture industry, *Current Science* Vol. 82, No 7, 2002
- Endo Y, Shimazu M, Fukusawa H Driedger PE, Kimura K, Tomioka N, Itai A, Shudo K: Synthesis computer modeling and biological evaluation of novel protein kinase C agonists based on a 7-membered lactam moiety. *Bioorg Med. Chem. Lett* 9: 173-178, 1999
- Evans H.J. "SCEs and disease states in man" In "SCE" (Wolff W. ed) 183-228, John Wiley and Sons, New York, 1982
- Ewig R.A.G. & Kohn K.W. DNA damage and repair in mouse leukemia L1210 cells treated with nitrogen mustard 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and other nitrosoureas. *Cancer Res.* 37, 2114-2122, 1977
- Ganesan A.K. Persistence of pyrimid dimers during post-replication repair in ultraviolet light-irradiated *E. coli* K. 12 *J. Mol. Biol.* 87, 103-119, 1974
- Gehrter D.T., Collons F.S., Ginsburg D., Αρχές Ιατρικής Γενετικής, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Έκδοση 2003

- Higgins N.P., Kato K. & Strauss B. A model for replication repair in mammalian cells. *J. Mol. Biol* 101, 417-425, 1976
- Howard-Flanders P. Inducible repair of DNA *Sci. Amer.* 245, 56-64, 1981
- Janion C, Some aspects of the SOS response system-A critical survey, *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 48 No. 3/2001, pag. 599-610
- Karayianni V, Mioglou E, Iakovidou Z, Mourelatos D et al, A new approach for evaluating in vivo anti-leukemic activity using the SCE assay- An application on three newly synthesised anti-tumour steroidal esters, *Mutat. Res.* 535 pp. 79-86, 2003
- Karayianni V, Papageorgiou A, Mioglou E, Iakovidou Z, Mourelatos D et al, 7-Keto hybrid steroidal esters of nitrogen mustardQ cytogenetic and antineoplastic effects, *Anti-Cancer Drugs* 13, pp. 637- 643, 2002
- Kourakis A. Mouratidou M., Kokkinos G., Barbouti A., Kotsis A., Mourelatos D. and Dozi-Vassiliades J. : « Frequencies of chromosomal aberrations in pesticide sprayers working in plastic green houses » *Mut. Res.* 279, 145-148, 1992
- Kusmierek J.T. & Singer B. Sites of alkylation of poly U by agents of varying carcinogenicity and stability of products. *Biochim. Biophys. Acta* 442, 420-431, 1976
- Lambert B. Sten M. & Hellgren D. Removal and persistence of SCE-inducing damage in human lymphocytes in vitro. In "SCEs" (Tice R.R. & Hollaender A. eds.) pp. 647-662, Plenum Press, New York, 1984
- Lawley P.D. Effects of some chemical mutagens and carcinogens on nucleic acids. *Progr. Nucl. Acid Res.* 5, 89-131, 1996
- Lawley P.D. & Brooks P. Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides. *Biochem. J.* 89, 127-144, 1963
- Lubert Stryer, Βιοχημεία I & II, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Έκδοση 1999
- Ma D, Wang G, Wang S, Kozikowski AP, Lewin NE, Blumberg PM: Synthesis and protein kinase C binding activity of benzolactam-V-7. *Bioorg Med Chem Lett* 9: 1371-1374, 1999

- Mourelatos D., Dozi-Vassiliades J. & Granitsas A. Antitumour alkylating agents act synergistically with methylxanthines on induction of SCE in human lymphocytes. *Mut. Res.* 104, 243-247, 1982
- Mourelatos D., Dozi-Vassiliades J., Tsigalidou-Balla V. & Granitsas A. Enhancement by methylxanthines of SCE frequency induced by cytostatics in normal and leukemic human lymphocytes. *Mut. Res.* 121, 147-152, 1983
- Mourelatos D., Kourakis A., Dozi-Vassiliades J., Tsiouris J. & Hatzigeorgiou P. Synergistic induction of SCEs in lymphocytes from normal subjects and from patients under cytostatic therapy by inhibitors of
- Mourelatos D., Kourakis A., Klouskas D.E., Hatzigeorgiou P., & Dozi-Vassiliades J. Enhancement of cytogenetic damage by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in human lymphocytes exposed to anti-neoplastics in vivo and in vitro. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 6, 485-492, 1986
- Mourelatos D., Dozi-Vassiliades J., Gourtsas C.: Enhancement of cytogenetic damage and of antineoplastic effect by caffeine in EAT cells treated with cyclophosphamide in vivo” *Cancer Res.* 48, 1129-1131, 1988
- Mourelatos D. “Chromosomes study as predictor of chemoresponse of tumours” Review. *The Cancer Journal* 9, No. 3, 136-141, 1996
- D. Mourelatos, Z. Iakovidou, E. Mioglou, E. Karapidaki, A. Koutsourea., A Arsenou, M. Fousteris and S. Nikolaropoulos SCEs and PRIs as indicators of structure-biological activity relationship of newly synthesized steroidal esters, *Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics, International Edition* 18, 52-54, 2004
- Natarajan A.T. & Obe G. How do in vivo mammalian assays compare to in vitro assays in their ability to detect mutagens? *Mut. Res.* 167, 189-201, 1986
- Papageorgiou A, Tsavdaridis D, Geromichalos GD, Camoutsis C, Karaberis E, Mourelatos D et al, A comparative study on cytogenetic and antineoplastic effects induced by two modified steroidal alkylating agents, *Cancer detection* 25, (2001) pp. 369-374
- Petrou C., Mourelatos D., Mioglou E., Dozi-Vassiliades J. and Catsoulacow P. «Effects of alkylating antineoplastic alone or in combination with 3-Aminobenzamide on genotoxicity antitumour activity and NAD levels in human lymphocytes in vitro and on Ehrlich Ascites Tumour cells in vivo» *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 10 : 321-331, 1990

- Posnick L.M, Samson L.D., DNA Repair, Encycloredia of Life Sciences, Nature Publishing Group, 2001
- Raposa T.: "SCEs and chemotherapy of non-cancerous and cancerous condition" In "Sister Chromatid Exchanges" A. Sandberg (ed) 576, Alan Liss, New York, 1982
- Singer B. O²-Alkylcytidine – A new major product of neutral aqueous reaction of cytidine with carcinogens. FEBS Lett. 63, 85-88, 1976
- Tice R.R. & Schavartzman J.B. SCE: A measure of DNA lesion persistence. In "SCE" (Sandberg, A.A., ed.) Vol. 2, 33-46, Alan R. Liss, Inc., New York, 1982
- Tofilon P.J. Basic I., Milas L.: Prediction of in vivo tumor response to chemotherapeutic agents by the in vitro Sister Chromatid Assay" Cancer Res. A5. 2025-2032. 1985
- Vassiliades N., Mourelatos D., Eliopoulos P., Kourakis A. and Dozi-Vassiliades J. : "Enhanced genotoxicity by mephalane and hyperthermia in hronic heroin addicts" Foresic sci. Inter 50: 269-276, 1991
- Wheller G.P. & Alexander J.A. Effects of nitrogen mustard and cyclophosphamide upon the synthesis of DNA in vivo and in cell-free preparations. Cancer Res. 29, 98-109, 1969
- Wolff S. Sister Chromatid Exchange. Ann Rev. Genet. 11, 183-201, 1977
- Wilson J. and Hunt T.: "Molecular Biology of the cell", Garland Publ. Inc., New York – London, 1989