



## Πτυχιακή εργασία

Μπάρδα Σοφία

---

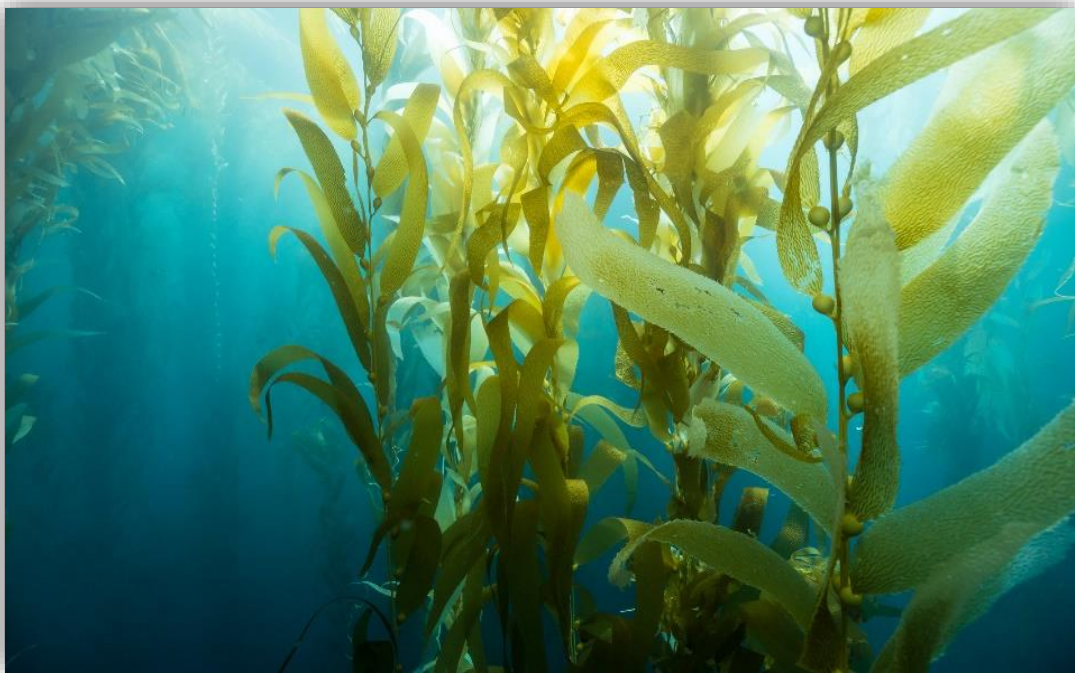
**Προσδιορισμός της επίδρασης εκχυλισμάτων από ελληνικά θαλάσσια  
φύκη και αγγειόσπερμα στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων του  
ήπατος (HepG2)**

---

---

**Assessment of the effects of extracts from Greek algae and  
angiosperm species on liver cancer cell growth (HepG2)**

---



**Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

**Σχολή Επιστημών Υγείας**

**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

---

## Τριμελής επιτροπή

---

Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αντώνιος Γιακουντής: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας – Γονιδιοματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Μόσιαλος: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Μπάρδα Σοφία**  
του Χρήστου

Λάρισα, Φεβρουάριος 2022

---

## Ευχαριστίες

---

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας, του τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστώ θερμά τον κύριο Στάγκο Δημήτριο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην διάρκεια των πειραμάτων καθώς και για τις γνώσεις που μου μετέφερε. Επίσης θέλω να τον ευχαριστήσω για την άριστη συνεργασία και κατανόηση όλους αυτούς τους μήνες.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Γιακουντή και τον κύριο Μόσιαλο που δέχτηκαν να αποτελούν μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Τέλος, ευχαριστώ την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαριάνθη Ζευγαρά για την συνεργασία που είχαμε και την προπτυχιακή φοιτήτρια Σταυρούλα Σαββίδη για τις πολύωρες αναμονές που περάσαμε παρέα.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αφιερώνεται στους γονείς μου, Δάφνη και Χρήστο, στον αδερφό μου Δημήτρη, για την ανιδιοτελή αγάπη και υποστήριξη που μου δίνουν όλα αυτά τα χρόνια, στον Γιάννη, για τις αμέτρητες στιγμές ευτυχίας που μου χαρίζει απλόχερα

*και σε όσους πίστεψαν σε εμένα!*

## Περίληψη

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις σοβαρότερες ασθένειες παγκοσμίως. Καταλαμβάνει τις πρώτες θέσεις σαν αιτία θανάτου, σε ηλικίες έως 70 ετών, ενώ τείνει να ξεπεράσει την καρδιαγγειακή νόσο ως πρόωρη αιτία θανάτου. Ο καρκίνος του ήπατος αποτελεί μία δύσκολα διαχειρίσιμη ασθένεια. Βρίσκεται στην έκτη θέση εμφάνισης, αλλά στην τρίτη θέση σε θνησιμότητα, παγκοσμίως. Ο λόγος που υπάρχει αυτή η σχετικά μεγάλη διαφορά είναι διότι ένας ασθενής με καρκίνο του ήπατος, δεν εμφανίζει συμπτώματα της ασθένειας στα πρώιμα στάδια αυτής, αλλά όταν η ασθένεια έχει φτάσει σε προχωρημένο στάδιο, και κατ' επέκταση είναι δύσκολη η ίασή της. Γι' αυτό τον λόγο, γίνεται αντιληπτό ότι η θεραπεία του ηπατικού καρκίνου δεν πρέπει να αναζητείται μόνο στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, αλλά στην πρόληψή του. Ένας τρόπος πρόληψης, πέρα από τις συνήθειες ενός υγιεινού τρόπου ζωής, είναι και η χημειοπροφύλαξη, δηλαδή η διακοπή ή/και αντιστροφή της καρκινογένεσης με την πρόσληψη παραγόντων συνθετικών ή φυσικών μέσω της διατροφής ή διατροφικών συμπληρωμάτων. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον από χημειοπροφυλακτική άποψη για τις βρωμοφαινόλες οι οποίες προέρχονται από θαλάσσια φύκη.

Στην παρούσα εργασία λοιπόν, εξετάστηκε η επίδραση 16 εκχυλισμάτων ελληνικών θαλάσσιων αγγειοσπέρμων (δύο εκχυλίσματα) και φυκών (14 εκχυλίσματα), στην αύξηση καρκινικών ηπατικών κυττάρων (HepG2). Η εκτίμηση της δράσης τους έγινε με την μέθοδο XTT. Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν πολλές μελέτες για τα εξεταζόμενα είδη φυκών στην επίδραση της αύξησης καρκινικών ηπατικών κυττάρων, η παρούσα έρευνα είναι ενδιαφέρουσα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα εκχυλίσματα ανέστειλαν την αύξηση των HepG2 κυττάρων με τις τιμές IC50 να κυμαίνονται από 0,23 mg/ml έως 9,7 mg/ml. Ισχυρότερη δράση εμφάνισαν τα αγγειόσπερμα *Cymodocea nodosa* (IC50 = 0,23 mg/ml), το *Ruppia maritima* (IC50 = 0,67 mg/ml), και τα φύκη *Padiva pavonica* (IC50 = 0,93 mg/ml), *Gracilaria bursa pastoris* (IC50 = 1,4 mg/ml), *Ulva rigida* (IC50 = 1,4 mg/ml), *Gigartina teedei* (IC50 = 1,5 mg/ml) και το *Ulva intestinalis* (IC50 = 1,6 mg/ml). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν την ύπαρξη χημειοπροφυλακτικής δράσης των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων, έναντι των καρκινικών ηπατικών κυττάρων HepG2. Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να διασαφηνιστούν οι μοριακοί μηχανισμοί αυτής της δράσης και τα βιοδραστικά συστατικά στα οποία οφείλεται.

## Abstract

Cancer is one of the most serious diseases in the world. It is considered one of the most important causes of death before the age of 70 years and tends to surpass cardiovascular disease as a premature cause of death. Liver cancer is a difficult disease to cure. Also, it is the sixth most commonly diagnosed cancer and the third leading cause of cancer death worldwide. The reason for this large difference is that a patient with liver cancer does not show symptoms of the disease in early stages, but the symptoms appear when the disease has reached in advanced stage, and therefore it is difficult to cure. So, for this reason, the treatment of liver cancer should not be searched only in chemotherapeutic drugs, but in his prevention. One way of prevention, beyond the habits of a healthy lifestyle, it is also the chemoprevention. Chemoprevention is the use of natural or synthetic chemical agents to reverse, suppress or prevent carcinogenesis. In recent years there have been intense research interest in the chemoprevention from bromophenols which derived from seaweed.

The aim of the present study was to examine the effect of 16 extracts of Greek marine angiosperms (2 extracts) and algae (14 extracts) on the growth of liver cancer cells. The experiments was performed using the XTT method. The present study is very interesting because there are not many studies about the effects of the algae species on the growth of liver cancer cells. The results showed that all extracts inhibited the growth of HepG2 cells with the IC<sub>50</sub> values ranging from 0.23 mg/ml to 9.7 mg/ml. The strongest action showed the angiosperms *Cymodocea nodosa* (IC<sub>50</sub> = 0,23 mg/ml) and *Ruppia maritima* (IC<sub>50</sub> = 0,67 mg/ml) and, also, the algae *Padiva pavonica* (IC<sub>50</sub> = 0,93 mg/ml), *Gracilaria bursa pastoris* (IC<sub>50</sub> = 1,4 mg/ml), *Ulva rigida* (IC<sub>50</sub> = 1,4 mg/ml), *Gigartina teedei* (IC<sub>50</sub> = 1,5 mg/ml) and *Ulva intestinalis* (IC<sub>50</sub> = 1,6 mg/ml). These results indicate that these extracts have chemopreventive effects against HepG2 liver cancer cells. However, further research is needed to elucidate the molecular mechanisms and the bioactive compounds accounting for the observed activity.

## Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες	3
<b>Περίληψη</b>	4
<b>Abstract</b>	5
Περιεχόμενα	6
<b>1. Εισαγωγή</b>	8
<b>1.1 Καρκίνος</b>	8
1.1.1. Γενικά στοιχεία	8
1.1.2. Ήπαρ	11
1.1.3. Καρκίνος του ήπατος	13
1.1.4. Ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2	16
<b>1.2. Χημειοπροφύλαξη</b>	17
1.2.1. Γενικά στοιχεία	17
1.2.2. Χημειοπροφύλαξη καρκίνου του ήπατος	19
<b>1.3 Βρωμοφαινόλες φυκών</b>	20
1.3.1. Γενικά στοιχεία	20
1.3.2. Βρωμοφαινόλες φυκών και προστασία από καρκινογένεση	23
<b>1.4. Είδη φυκών και αγγειοσπέρμων</b>	25
1.4.1. Γενικά στοιχεία	25
<b>Σκοπός του πειράματος</b>	36
<b>2. Υλικά &amp; Μέθοδοι</b>	37
<b>2.1. Υλικά</b>	37
2.1.1. Αντιδραστήρια και θρεπτικά υλικά	37
2.1.2. Εκχυλίσματα	38
<b>2.2. Μέθοδοι</b>	38
2.2.1. Ξεπάγωμα κυττάρων	38
2.2.2. Καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς	39

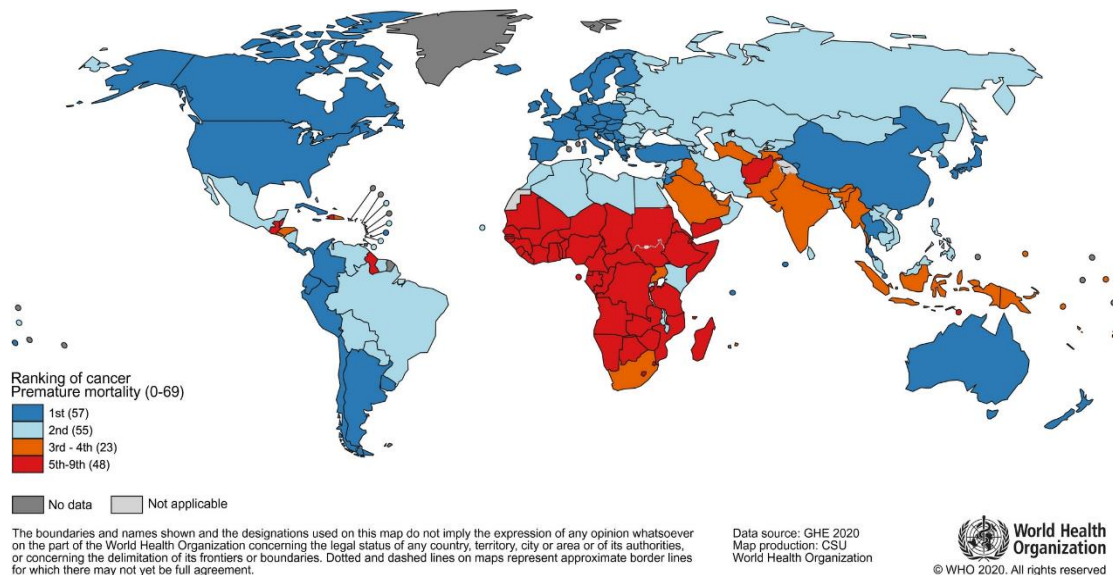
2.2.3 Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με την χρήση αιμοκυτταρομέτρου Neubauer	40
2.2.4. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με την μέθοδο ΧΤΤ	41
2.2.4.1. Αρχή της μεθόδου	41
2.2.4.2. Πειραματική διαδικασία	42
2.2.5. Επεξεργασία και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	44
<b>3. Αποτελέσματα</b>	45
<b>4. Συζήτηση</b>	55
<b>5. Βιβλιογραφία</b>	59
5.1. Ελληνική βιβλιογραφία	59
5.2. Ξένη βιβλιογραφία	59

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Καρκίνος

### 1.1.1. Γενικά στοιχεία

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις σοβαρότερες ασθένειες παγκοσμίως. Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας το 2019, ο καρκίνος θεωρείται είτε η πρώτη, είτε η δεύτερη αιτία θανάτου, σε ηλικίες κάτω των 70 ετών, στις περισσότερες χώρες παγκοσμίως (Sung et al., 2021) (εικόνα 1). Σύμφωνα με τα τωρινά δεδομένα, ο καρκίνος μπορεί να ξεπεράσει την καρδιαγγειακή νόσο, η οποία είναι η κύρια αιτία πρόωρου θανάτου στις περισσότερες χώρες κατά την διάρκεια του 21<sup>ου</sup> αιώνα (Bray et al., 2021).

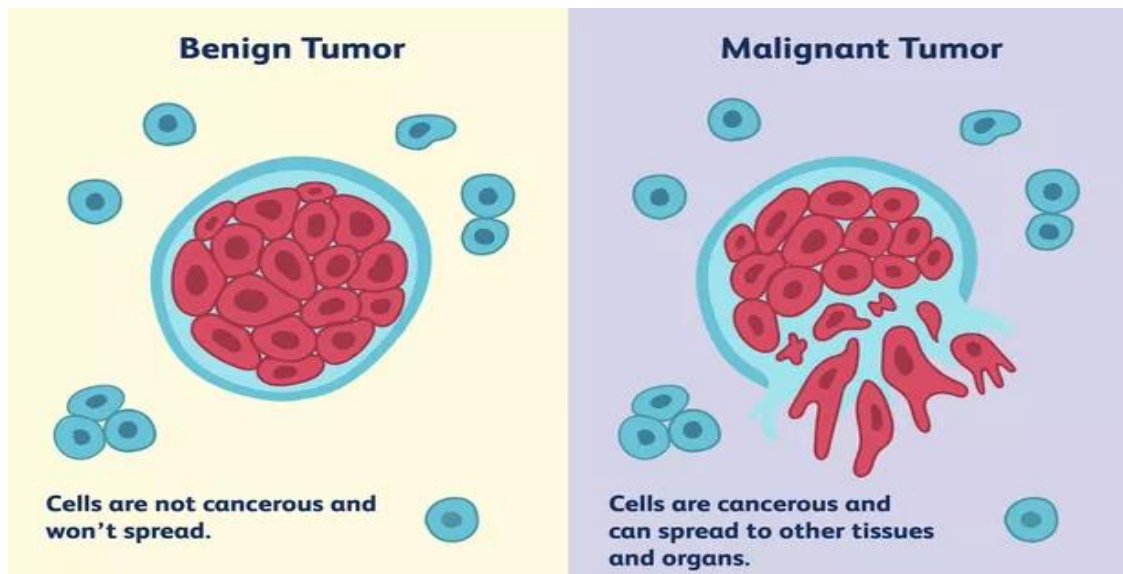


Εικόνα 1: Παγκόσμια κατάταξη του καρκίνου ως αιτία θανάτου.

Αρκετοί άνθρωποι συγχέουν τον καρκίνο με την ύπαρξη όγκου, δηλαδή ενός μη φυσιολογικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Η σύνδεση αυτή είναι λανθασμένη, διότι δεν είναι όλοι οι όγκοι καρκινικοί. Αντίθετα, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τους καλοήθεις και τους κακοήθεις. Ένας καλοήθης όγκος παραμένει περιορισμένος στην αρχική του θέση, δεν εισβάλλει σε διπλανούς ιστούς και ούτε εξαπλώνεται σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος. Επίσης, ένας καλοήθης όγκος αποτελείται από μη καρκινικά κύτταρα. Αντίθετα, ένας κακοήθης όγκος είναι ικανός να πραγματοποιήσει όλα τα παραπάνω και να προκαλέσει καρκίνο και σε αντίθεση με τον καλοήθη όγκο αποτελείται από καρκινικά κύτταρα. Η “μετακίνηση” ενός κακοήθη όγκου μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, είτε μέσω του λεμφικού συστήματος, και η “μετακίνηση” αυτή ονομάζεται



μετάσταση. Έτσι λοιπόν, μόνο οι κακοήθεις όγκοι μπορούν να δημιουργήσουν καρκίνο και η ικανότητά τους να κάνουν μεταστάσεις καθιστά την θεραπεία του καρκίνου αρκετά περίπλοκη (Cooper, 2000) (εικόνα 2).

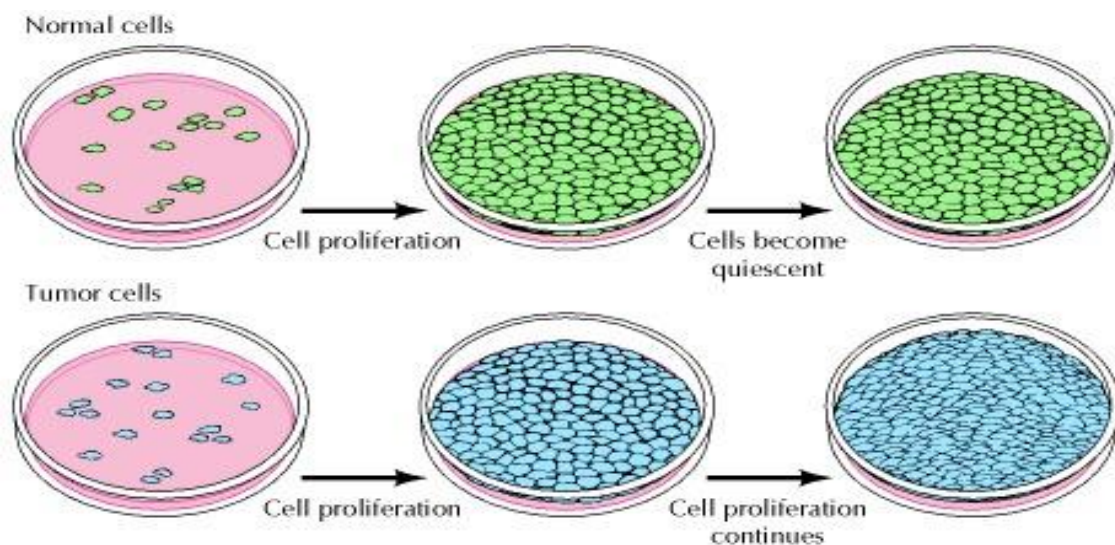


Εικόνα 2: Διαφορά μεταξύ ενός καλοήθη και ενός κακοήθη όγκου.

Πέρα από την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να μετακινούνται, υπάρχουν και κάποια άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά που τα κάνουν να ξεχωρίζουν από τα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτά είναι τα εξής (Cooper, 2000):

1. Ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός.

Τα φυσιολογικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ως απάντηση σε αυξητικούς παράγοντες, έως ότου φτάσουν σε μία συγκεκριμένη κυτταρική πυκνότητα. Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από την κυτταρική πυκνότητα, εφόσον υπάρχουν διαθέσιμοι αυξητικοί παράγοντες (εικόνα 3).



Εικόνα 3: Διαφορά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων.

## 2. Πολλαπλασιαστική αυτονομία.

Τα καρκινικά κύτταρα σε ορισμένες περιπτώσεις παράγουν αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι επάγουν τον δικό τους πολλαπλασιασμό. Από την άλλη, τα φυσιολογικά κύτταρα εξαρτώνται από εξωτερικούς αυξητικούς παράγοντες.

## 3. Νέο-αγγειογένεση.

Τα καρκινικά κύτταρα στην προσπάθειά τους να προμηθεύσουν με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, τον μεγάλο σε μέγεθος όγκο, αναπτύσσουν νέα αγγεία, κάτι το οποίο δεν είναι σε θέση να πραγματοποιήσουν τα φυσιολογικά κύτταρα.

Πώς ωστόσο δημιουργούνται τα καρκινικά κύτταρα και κατ' επέκταση οι κακοήθεις όγκοι; Η απάντηση βρίσκεται στις μεταλλάξεις (Martincorena and Campbell, 2016). Πιο συγκεκριμένα, ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελείται από κύτταρα. Ο κυτταρικός κύκλος όλων των φυσιολογικών κυττάρων βρίσκεται κάτω από έναν αυστηρό έλεγχο. Με τον όρο κυτταρικό κύκλο εννοούμε τον πολλαπλασιασμό, την διαίρεση και τέλος, την απόπτωση των κυττάρων. Ο έλεγχος αυτός βασίζεται στην λειτουργία και στις εντολές που δίνουν κάποια γονίδια. Όταν αυτά τα γονίδια μεταλλάσσονται ο κυτταρικός κύκλος των κυττάρων δεν μπορεί πλέον να ελεγχθεί, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, να καταστέλλεται η διαδικασία της απόπτωσης και έτσι, να δημιουργείται όγκος. Εάν ο όγκος και τα κύτταρα που τον αποτελούν πληρούν τα κριτήρια που αναφέρθηκαν παραπάνω τότε προκύπτει καρκίνος.

Οι δύο μεγάλες κατηγορίες γονιδίων που παίρνουν μέρος στον καρκίνο είναι τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια (Lee and Muller, 2010). Τα πρώτα γονίδια υπό την φυσιολογική τους μορφή ονομάζονται πρωτο-ογκογονίδια και ο ρόλος τους είναι να ελέγχουν και να προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Εάν όμως μεταλλαχθούν, προάγουν τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετατρέπονται σε ογκογονίδια (Torgy and Cooper, 1991). Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια από την άλλη, υπάρχουν φυσιολογικά στον οργανισμό και είναι πολύ χρήσιμα, καθώς ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο και εμποδίζουν την ανάπτυξη όγκου. Αυτό συμβαίνει με το να επιβραδύνουν την κυτταρική διαίρεση και να καθοδηγούν τα κύτταρα στην απόπτωση, όταν αυτό είναι αναγκαίο (Καραγιάννης, 2013). Ωστόσο, η έλλειψη αυτών των γονιδίων ή η αδρανοποίησή τους, λόγω μεταλλάξεων, οδηγεί στην δημιουργία όγκου (Kontomanolis et al., 2020). Μεταλλάξεις μπορεί να προκληθούν είτε αυτόματα από λάθη κατά την αντιγραφή του DNA, είτε από μεταλλαξιγόνους

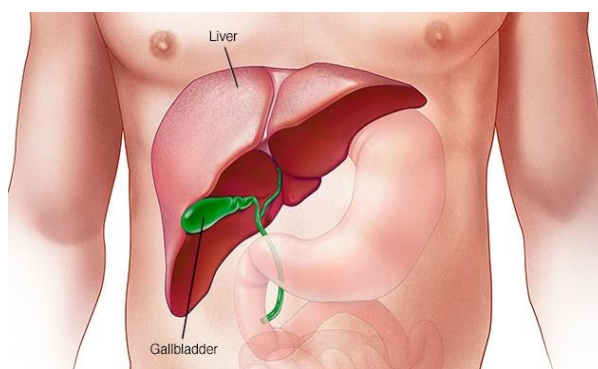
παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί είναι η ακτινοβολία, οι χημικές ουσίες και οι ογκογόνοι ιοί (Roomi et al., 2016). Κάθε παράγοντας δεν είναι μεταλλαξιγόνος από μόνος του, αλλά πρέπει να έρθει σε επαφή με τον ανθρώπινο οργανισμό, σε μία συγκεκριμένη δόση, για να προκαλέσει μεταλλάξεις (Calabrese and Kozumbo, 2021). Ωστόσο, και πάλι, μία μετάλλαξη δεν είναι αρκετή για να προκληθεί καρκίνος, αλλά πρέπει να συσσωρευτούν αρκετές μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό, με την πάροδο του χρόνου, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (πολυδιάστατο μοντέλο καρκινογένεσης) (Roomi et al., 2016).

Συνοψίζοντας λοιπόν και με βάση τα όσα αναφέρθηκαν σε αυτή την ενότητα, τα ορόσημα του καρκίνου είναι τα εξής έξι γεγονότα:

1) ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου, 2) αδρανοποίηση των καταστολέων διαίρεσης, 3) καταστολή της απόπτωσης, 4) επίτευξη πολλαπλασιαστικής αυτονομίας, 5) νέο-αγγειογένεση και 6) μετάσταση.

### 1.1.2. Ήπαρ

Πριν τον καρκίνο του ήπατος είναι σημαντικό να αναφερθούν κάποια βασικά χαρακτηριστικά του ήπατος. Το ήπαρ, ή αλλιώς συκώτι, είναι ένα όργανο ζωτικής σημασίας για τον ανθρώπινο οργανισμό (εικόνα 4).

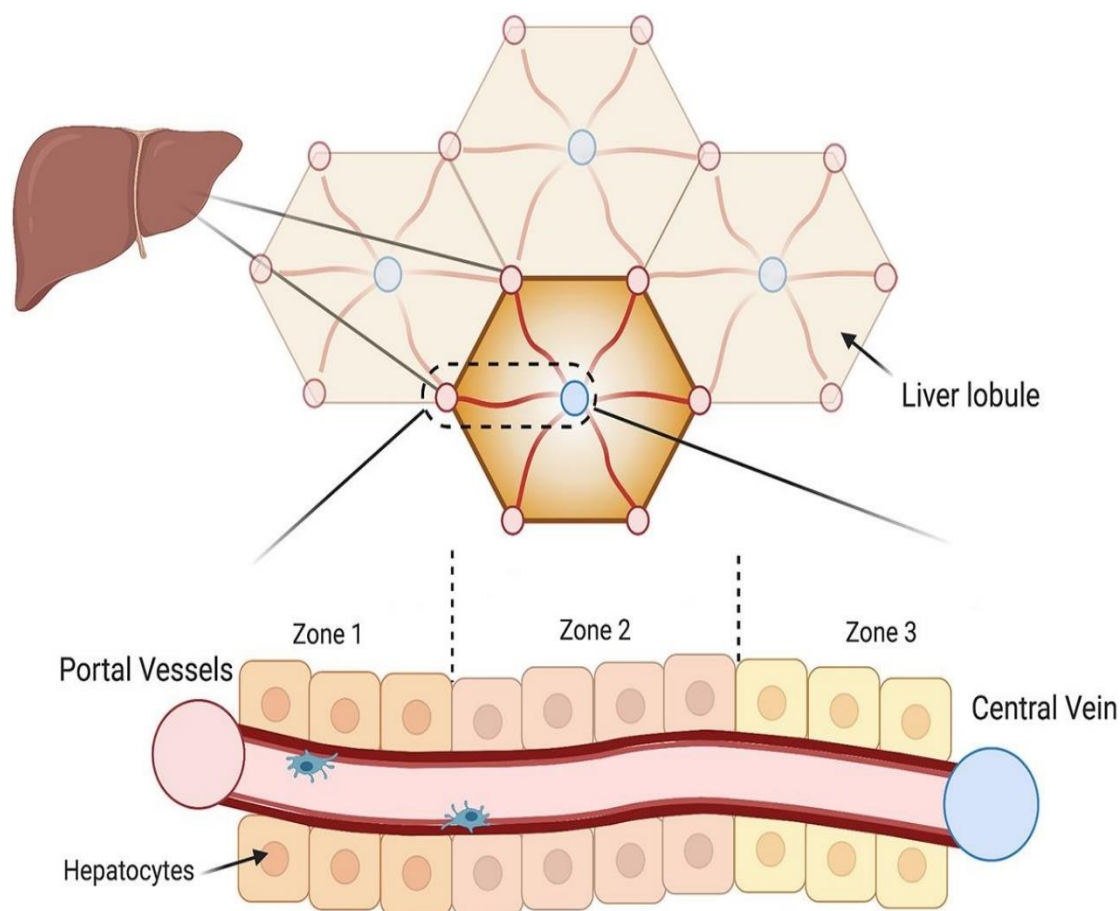


Εικόνα 4: Το ήπαρ και η χοληδόχος κύστη.

Ενδεικτικά κάποιες από τις βασικές του λειτουργίες είναι οι εξής: 1) σύνθεση αμινοξέων, 2) μεταβολισμός υδατανθράκων, πρωτεϊνών, λιπιδίων και ξενοβιοτικών ουσιών, 3) παραγωγή και έκκριση της χολής και 4) κατά το πρώτο τρίμηνο της εμβρυϊκής ζωής παράγει τα ερυθροκύτταρα.

Πρόκειται για το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου οργανισμού, καθώς ζυγίζει περίπου 1,5 kg. Δέχεται διπλή αιμάτωση, τόσο από την πυλαία φλέβα (75%), η οποία μαζί με το αίμα μεταφέρει θρεπτικά συστατικά από την γαστρεντερική οδό, όσο και από την ηπατική αρτηρία (25%), η οποία μεταφέρει οξυγονωμένο αίμα

(Σωτηρόπουλος, 2020). Ωστόσο, οξυγόνο στο ήπαρ μεταφέρεται και από τις δύο οδούς (Kleinman et al., 2018). Το αίμα από το ήπαρ εξέρχεται μέσω της κεντρικής φλέβας. Τα αγγεία που αιματώνουν το ήπαρ διαιρούνται σε πολλά τριχοειδή αγγεία και αυτά με την σειρά τους αιματώνουν τους λοβούς του ήπατος. Οι λοβοί είναι οι λειτουργικές μονάδες του ήπατος και αποτελούνται από εκατομμύρια ηπατικά κύτταρα (ηπατοκύτταρα), τα οποία είναι τα βασικά μεταβολικά κύτταρα του οργάνου (Kalra et al., 2021). Τα ηπατοκύτταρα διατάσσονται ακτινωτά γύρω από την κεντρική φλέβα σχηματίζοντας έτσι το εξαγωνικό λοβίο. Ανάλογα με την θέση των ηπατοκυττάρων στο λοβίο διαιρούνται σε τρεις ζώνες (εικόνα 5).



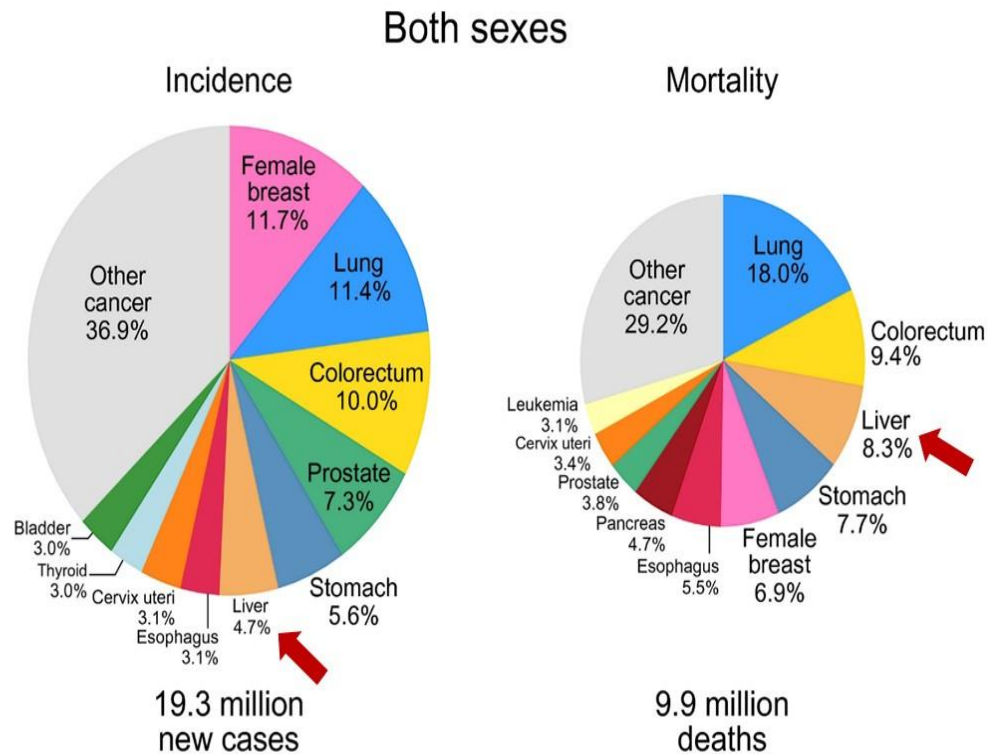
Εικόνα 5: Οι τρεις ζώνες των ηπατοκυττάρων.

Όπως βλέπουμε και στην παραπάνω εικόνα τα ηπατοκύτταρα χωρίζονται στην ζώνη 1, 2 και 3. Τα ηπατοκύτταρα της ζώνης 1 διαθέτουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε οξυγόνο και σε θρεπτικά συστατικά και παίρνουν μέρος σε μεταβολικές διεργασίες. Τα ηπατοκύτταρα της ζώνης 3 είναι φτωχά σε οξυγόνο και σε θρεπτικά συστατικά και παίρνουν μέρος σε διαδικασίες, όπως είναι η βιομετατροπή των φαρμάκων. Τα κύτταρα της ζώνης 2 βρίσκονται σε μία ενδιάμεση κατάσταση από αυτά της ζώνης 1 και 3 (Kalra et al., 2021).

Λόγω της μεγάλης αιμάτωσης του ήπατος και κατ' επέκταση της μεταφοράς τοξικών ουσιών σε αυτό, καθώς και της ενεργής συμμετοχής του στον μεταβολισμό, το ήπαρ συχνά γίνεται στόχος για διάφορες βλάβες, μία εκ των οποίων είναι ο καρκίνος.

### 1.1.3. Καρκίνος του ήπατος

Ο καρκίνος του ήπατος αποτελεί τον έκτο καρκίνο σε συχνότητα και τον τρίτο καρκίνο σε θνησιμότητα παγκοσμίως (Sung et al., 2021) (εικόνα 6).

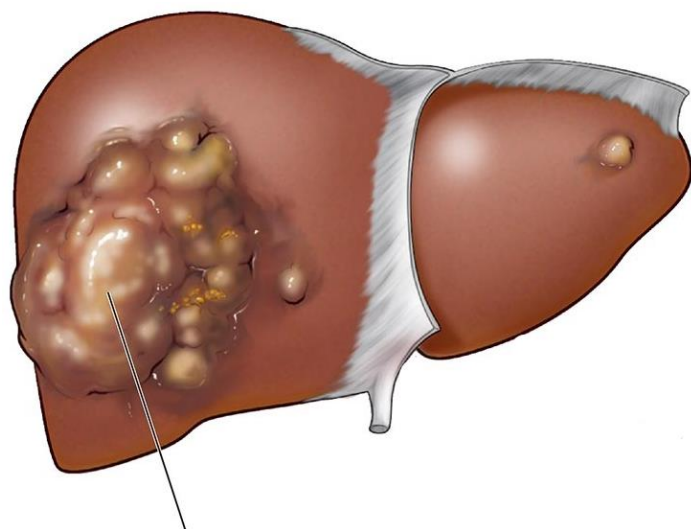


Εικόνα 6: Συχνότητα εμφάνισης και θνησιμότητας του ηπατικού καρκίνου.

Ο καρκίνος του ήπατος χωρίζεται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τον πρωτοπαθή και τον δευτεροπαθή. Πιο συγκεκριμένα, όταν ο καρκινικός όγκος εμφανίζεται αρχικά στο ήπαρ προκύπτει ένας πρωτοπαθής καρκίνος. Αντιθέτως, όταν ο καρκινικός όγκος μεταναστεύει στο ήπαρ από κάποιο άλλο όργανο, τότε προκύπτει ένας δευτεροπαθής καρκίνος (Sachdev, 2021). Οι δευτεροπαθείς ηπατικοί καρκίνοι είναι πιο συχνόι σε σχέση με τους πρωτοπαθείς, με τον καρκίνο του στήθους, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου να αποτελούν τις πιο συχνές αιτίες των μεταστάσεων (Watson et al., 2016).



Ο πιο συχνός πρωτοπαθής ηπατικός καρκίνος είναι το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) (Ananthakrishnan et al., 2006) (εικόνα 7), με συχνότητα 90-95%.



#### **Hepatocellular carcinoma**

Εικόνα 7: Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC).

Ο συγκεκριμένος καρκίνος οφείλεται σε μεταλλάξεις, οι οποίες συμβαίνουν στα ηπατοκύτταρα (Σωτηρόπουλος, 2020). Οι παράγοντες που είναι σε θέση να προκαλέσουν αυτές τις μεταλλάξεις είναι οι εξής: (London et al., 2006) 1) χρόνια λοίμωξη από τους ιούς της ηπατίτιδας B και C, 2) τρόφιμα μολυσμένα με αφλατοξίνες, 3) υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, 4) κάπνισμα, 5) διαβήτη τύπου 2 και 6) αυξημένο σωματικό βάρος

Ο δεύτερος πιο συχνός παγκρεατικός καρκίνος είναι το χολαγγειοκαρκίνωμα (iCCA). Οφείλεται σε μεταλλάξεις των χολαγγειοκυττάρων, δηλαδή των επιθηλιακών κυττάρων των χοληφόρων αγγείων, τα οποία παροχετεύουν χολή από το ήπαρ στο έντερο (Sia et al., 2017). Οι παράγοντες που προκαλούν αυτή την μορφή καρκίνου είναι και σε αυτή την περίπτωση, η χρόνια λοίμωξη με τους ιούς της ηπατίτιδας B και C, καθώς και η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (PSC), μία φλεγμονώδης νόσος των χοληφόρων αγγείων (Charman, 1999).

Παρ' όλο που ο καρκίνος του ήπατος είναι ο έκτος σε συχνότητα, αποτελεί ταυτόχρονα και τον τρίτο σε θνησιμότητα. Η διαφορά αυτή παρατηρείται, διότι οι περισσότεροι ασθενείς με ηπατικό καρκίνο εμφανίζουν συμπτώματα, όταν πλέον ο καρκίνος βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο και είναι δύσκολα διαχειρίσιμος (Anwanwan and Singh, 2020). Ωστόσο, όταν φτάσουν στο σημείο να εκδηλώσουν συμπτώματα, μερικά από αυτά είναι τα εξής: 1) κίρρωση, η οποία συχνά λανθασμένα

αποδίδεται σε άλλη ασθένεια (Φελέκουρας, 2013), 2) ανεπιθύμητη απώλεια βάρους, 3) πυρετός, 4) εμετός και 5) κόπωση.

Η διάγνωση του καρκίνου μπορεί να γίνει με κλινική εξέταση από έναν κατάλληλο γιατρό, ο οποίος θα ρωτήσει για τυχόν συμπτώματα και θα αναζητήσει τυχόν ψηλαφητό διογκωμένο ήπαρ. Επιπλέον, η εξέταση του ήπατος με υπερηχογράφημα, έτσι ώστε να μελετηθεί η ύπαρξη όγκων, είναι πολύ σημαντική. Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι στο 75% των περιπτώσεων με ηπατικό καρκίνο υπάρχουν διάσπαρτα ογκίδια κατά μήκος του ήπατος. Μία άλλη συμπληρωματική εξέταση, η οποία μπορεί να συνοδεύσει όλες τις παραπάνω, είναι η μέτρηση της α-εμβρυϊκής σφαιρίνης (AFP) στο αίμα. Η AFP παράγεται κατά την εμβρυϊκή ηλικία και, με την πάροδο του χρόνου, μετά τη γέννηση μειώνεται. Η μείωση αυτή οφείλεται στο ότι τα ώριμα ηπατοκύτταρα χάνουν την ικανότητα σύνθεσής της. Ωστόσο, μετά από μεταλλάξεις, τα καρκινικά ηπατοκύτταρα κερδίζουν ξανά την ικανότητα σύνθεσης της πρωτεΐνης (Wang and Wang, 2018). Η εξέταση αυτή δεν έχει διαγνωστική αξία, είναι απλά ένας δείκτης, και γι' αυτό τον λόγο πρέπει να γίνεται συμπληρωματικά με άλλες εξετάσεις. Τέλος, σαν διαγνωστική μέθοδος υπάρχει και η βιοψία, δηλαδή η λήψη ηπατικού ιστού με την χρήση μιας λεπτής βελόνας. Με αυτή την εξέταση ο γιατρός είναι σε θέση να ελέγξει αν πρόκειται για έναν πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή καρκινικό όγκο. Στα πλαίσια της βιοψίας ο γιατρός πρέπει να είναι πολύ προσεκτικός, διότι υπάρχει ο φόβος διασποράς καρκινικών κυττάρων, εάν αυτή δεν έχει ήδη συμβεί.

Εφόσον ο ηπατικός καρκίνος έχει διαγνωστεί, υπάρχουν οι παρακάτω θεραπευτικές επιλογές (Vogel et al., 2018; Villanueva, 2019) : 1) χειρουργική αφαίρεση του όγκο, 2) μεταμόσχευση οργάνου, 3) τοπική εκτομή (καταστροφή καρκινικών κυττάρων με χημικά ή φυσικά μέσα), 4) χημειοθεραπεία, 5) ακτινοθεραπεία και 6) συνδυασμός όλων των παραπάνω.

#### 1.1.4. Ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2

Για να επιτευχθεί εργαστηριακά η έρευνα διαφόρων ηπατικών νοσημάτων χρειάζονται τα κατάλληλα κύτταρα. Δεδομένου ότι τα κύτταρα, τα οποία προέρχονται απευθείας από έναν δότη, είναι πιο δύσκολα σε εργαστηριακούς χειρισμούς, έχει εφευρεθεί από το 1975 η καρκινική κυτταρική σειρά HepG2 (Donato et al., 2015) (εικόνα 8).



Εικόνα 8: Καρκινική κυτταρική σειρά HepG2 κάτω από το μικροσκόπιο.

Τα κύτταρα της συγκεκριμένης σειράς προέρχονται από ένα δεκαπεντάχρονο Καυκάσιο αγόρι το οποίο έπασχε από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Πρόκειται για μία αθάνατη κυτταρική σειρά, κάτι το οποίο είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στην έρευνα, δεδομένου ότι τα κύτταρα που προέρχονται από ασθενή δεν έχουν αυτό το πλεονέκτημα, γεγονός που καθιστά ακόμα πιο δύσκολο το πειραματικό κομμάτι. Η κυτταρική σειρά HepG2 δεν προκαλεί όγκο σε γυμνά ποντίκια (Donato et al., 2013) και είναι σε θέση να διεγερθεί εξαιτίας της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης. Ένα από τα χαρακτηριστικά αυτής την σειράς είναι ότι τα κύτταρα έχουν την τάση να προσκολλώνται στην φλάσκα που αναπτύσσονται και να δημιουργούν συσσωματώματα. Χρησιμοποιούνται ευρέως για μελέτες του ηπατικού μεταβολισμού και της τοξικότητας, που μπορεί να προκαλέσουν διάφορα ξενοβιοτικά (Fearn and Hirst, 2006).



## **1.2. Χημειοπροφύλαξη**

### **1.2.1 Γενικά στοιχεία**

Ο Ιπποκράτης πριν από 2.500 χρόνια είχε πει πως ‘‘Κάλλιο προλαμβάνειν παρά θεραπεύειν’’, και είχε απόλυτο δίκαιο. Σήμερα, μετά από 2.500 χρόνια είναι γνωστό πως πολλές ασθένειες μπορούν να αποφευχθούν τηρώντας μία υγιεινή διατροφή και άσκηση και απέχοντας από το κάπνισμα. Εκτός, ωστόσο, από υγιεινές συνήθειες που μπορεί κάποιος να ακολουθήσει στη ζωή του, υπάρχουν και πολλές τροφές ή διατροφικά συμπληρώματα, των οποίων η χρήση έχει αποδειχθεί ότι προφυλάσσει από διάφορες ασθένειες. Συγκεκριμένα η διακοπή ή η αντιστροφή της καρκινογένεσης με κατανάλωση φυσικών ή συνθετικών ουσιών μέσω της διατροφής ή διατροφικών συμπληρωμάτων ονομάζεται χημειοπροφύλαξη (Stagos et ., 2012).

Η χημειοπροφύλαξη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ασθένεια του καρκίνου. Μέχρι πρότινος η επιστημονική κοινότητα είχε στρέψει την προσοχή της στην δημιουργία φαρμάκων για την αντιμετώπιση του καρκίνου, όταν αυτός έχει ήδη εμφανιστεί. Είναι γνωστό όμως, ότι τα περισσότερα φάρμακα, τα οποία χρησιμοποιούνται στις χημειοθεραπείες είναι θανατηφόρα, τόσο για τα καρκινικά κύτταρα, όσο και για τα υγιή κύτταρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι χημειοθεραπείες να είναι μια δυσάρεστη κατάσταση για τον ασθενή. Έτσι λοιπόν, αν αναλογιστεί κανείς ότι ο καρκίνος είναι μία ασθένεια, στην οποία μεσολαβούν αρκετά χρόνια και αρκετές μεταλλάξεις μέχρι να εμφανιστεί, είναι περισσότερο χρήσιμο να δημιουργηθούν σκευάσματα, τα οποία στοχεύουν στον έλεγχο του καρκίνου προτού αυτός εμφανιστεί, παρά στην θεραπεία του, όταν αυτός βρίσκεται στα τελικά στάδια (Μπονόβας, 2007). Η χημειοπροφύλαξη λοιπόν είναι η απάντηση στο παραπάνω ζήτημα.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί, ότι οι χημειοπροφυλακτικές ουσίες χρησιμοποιούνται κατά κανόνα, για την πρόληψη του καρκίνου και όχι για την θεραπεία αυτού, με μερικές εξαιρέσεις, όπως είναι τα ρετινοειδή. Επιπλέον, ακόμα και να χρησιμοποιεί κάποιος χημειοπροφυλακτικές ουσίες δεν σημαίνει ότι είναι 100% προστατευμένος από την εμφάνιση του καρκίνου.

Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για την χημειοπροφύλαξη από τον καρκίνο μπορεί να είναι είτε συνθετικές, και να έχουν παραχθεί στο εργαστήριο, είτε να είναι φυσικές και να προέρχονται από τη φύση. Ένα παράδειγμα συνθετικής ουσίας είναι η ταμοξιφαίνη, η οποία χρησιμοποιείται για την πρόληψη του καρκίνου του μαστού (Pruthi et al., 2015), ενώ, ένα παράδειγμα φυσικής ουσίας είναι το λυκοπένιο,

το οποίο βρίσκεται σε διάφορα λαχανικά και φρούτα, όπως είναι η ντομάτα, και χρησιμοποιείται για την πρόληψη διαφόρων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων του προστάτη και του παχέος εντέρου (Ko and Moon, 2015).

Παρ' όλα αυτά, όλες οι χημειοπροφυλακτικές στρατηγικές, είτε περιλαμβάνουν φυσικές ουσίες, είτε συνθετικές, χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες. Αυτές είναι οι εξής (Martinez – Poveda et al., 2019):

#### 1. Πρωτογενής χημειοπροφύλαξη.

Αφορά υγιή άτομα και σχετίζεται με διατροφικά συμπληρώματα ή κάποιες διατροφικές συστάσεις, οι οποίες θα μπορέσουν να αποτρέψουν την εμφάνιση ενός καρκίνου. Παράδειγμα αποτελεί η βιταμίνη C, η οποία είναι σε θέση να μειώσει τις μεταλλάξεις του DNA, οι οποίες οφείλονται στο οξειδωτικό στρες του ανθρώπου (Lee et al., 2003).

#### 2. Δευτερογενής χημειοπροφύλαξη.

Αφορά άτομα τα οποία έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου λόγω κάποιων ανθυγιεινών συνηθειών ή λόγω κάποιας γενετικής προδιάθεσης. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται οι προαγωγείς των ενζύμων επιδιόρθωσης του DNA, όπως είναι το νικοτιναμίδιο (Surjana et al., 2010).

#### 3. Τριτογενής χημειοπροφύλαξη

Απευθύνεται σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο και στόχο έχει την βελτίωση της ποιότητας ζωής, καθώς επίσης και της βελτιστοποίησης της θεραπείας τους. Η d – λιμονίνη ανήκει σε αυτή την κατηγορία λόγω της ικανότητάς της να επάγει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα (Jia et al., 2012).

Με βάση τους τρεις παραπάνω παράγοντες χημειοπροφύλαξης ο πιο σημαντικός είναι ο πρωτογενής, διότι όπως προείπαμε είναι προτιμότερη η πρόληψη από την θεραπεία. Ωστόσο, υπάρχουν τρία σημαντικά κριτήρια, τα οποία πρέπει να ληφθούν υπόψιν κατά τον σχεδιασμό ενός νέου πρωτογενή χημειοπροφυλακτικού παράγοντα. Αυτά είναι τα ακόλουθα (Μπονόβας, 2007): 1) επειδή απευθύνεται σε σχετικά υγιή πληθυσμό πρέπει το παρασκεύασμα να έχει χαμηλή τοξικότητα για να μην δημιουργηθεί κάποιο πρόβλημα, 2) ο πληθυσμός, ο οποίος έχει επιλεγεί, να μην πρέπει να είναι υγιής, αλλά ταυτόχρονα πρέπει να έχει αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό και 3) το σκεύασμα, το οποίο θα παραχθεί, να είναι αποτελεσματικό απέναντι στην εμφάνιση του καρκίνου. Εάν πληρούνται τα παραπάνω κριτήρια τότε η παρασκευή της ουσίας θα είναι επιτυχής.

### 1.2.2. Χημειοπροφύλαξη καρκίνου του ήπατος

Με βάση τα αίτια εμφάνισης του εκάστοτε καρκίνου παράγονται και διαφορετικές χημειοπροφυλακτικές ουσίες. Παραπάνω, αναφέραμε ότι ένας από τους λόγους εμφάνισης του καρκίνου του ήπατος είναι η μόλυνση με τους ιούς της ηπατίτιδας Β και C. Έτσι λοιπόν, ένας τρόπος χημειοπροφύλαξης από αυτό το αίτιο είναι ο προληπτικός εμβολιασμός ενάντια σε αυτούς τους ιούς. Όσον αφορά τον ιό της ηπατίτιδας Β, το εμβόλιο έχει ήδη εφευρεθεί, και μελέτες έδειξαν, ότι ο εμβολιασμός οδηγεί σε μείωση της μόλυνσης από τον ιό στο 1/10. Επιπλέον, σε εμβολιασμένα παιδιά ηλικίας έξι έως και δεκατέσσερα χρόνων μειώθηκε σημαντικά η εμφάνιση καρκίνου του ήπατος (Chang, 2011). Από την άλλη, δυστυχώς, ακόμα δεν υπάρχει εμβόλιο έναντι της ηπατίτιδας C. Έτσι λοιπόν, ένας άλλος τρόπος χημειοπροφύλαξης από αυτή είναι η χρήση ιντερφερόνης. Ωστόσο, στοιχεία μιας έρευνας δείχνουν, ότι χρειάζεται περαιτέρω έρευνα, διότι η χρήση ιντερφερόνης οδηγεί στην εμφάνιση κίρρωσης, κάτι το οποίο αποτελεί επίσης παράγοντας εμφάνισης ηπατικού καρκίνου (Testino and Borro, 2013).

Ένα τρίτο αίτιο εμφάνισης ηπατικού καρκίνου είναι η μόλυνση του οργανισμού με αφλατοξίνες, οι οποίες προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Πρόκειται για τοξίνες, οι οποίες παράγονται στα τρόφιμα κάτω από κατάλληλες συνθήκες, από τους μύκητες *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*. Είναι γνωστό πλέον ότι η ύπαρξη και των αφλατοξινών και του ιού της ηπατίτιδας Β στον ανθρώπινο οργανισμό, αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου έως και 30 φορές, σε σχέση με την ύπαρξη μόνο των αφλατοξινών (Magnussen and Parsi, 2013). Ένας τρόπος χημειοπροφύλαξης από τις αφλατοξίνες είναι η χρήση της χλωροφυλλίνης, η οποία συνδέεται με τις καρκινογόνες αφλατοξίνες και μειώνει την βιοδιαθεσιμότητά τους στον οργανισμό (Egner et al., 2003).

Επιπλέον, και ο ρόλος των φυτικών πολυφαινόλων στη χημειοπροφύλαξη από τον ηπατικό καρκίνο έχει μελετηθεί με πολύ σημαντικά αποτελέσματα (Stagos et al., 2012). Ένα παράδειγμα φυτικών πολυφαινόλων αποτελεί η κερκετίνη, η οποία βρίσκεται σε πολλά φρούτα και λαχανικά, όπως είναι το κρεμμύδι και τα μήλα. Έχει βρεθεί ότι η κερκετίνη είναι σε θέση να μειώσει τα ηπατικά καρκινικά κύτταρα με το να αναστέλλει τους μηχανισμούς επιβίωσης και να προάγει του μηχανισμούς απόπτωσής τους (Stagos et al., 2012).

Τελευταίο αλλά εξίσου σημαντικό, αποτελεί το παράδειγμα της κάρναβης, η οποία έχει αποδειχθεί ότι βοηθάει στην μείωση των καρκινικών ηπατικών κύτταρων

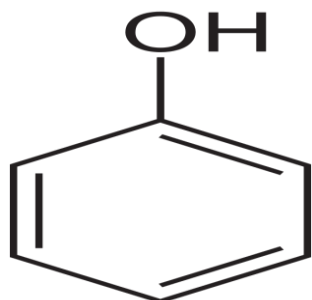
σε ποντίκια, μέσω της επαγωγής της απόπτωσης των κυττάρων (El Moneim Hussein et al., 2014).

### 1.3. Βρωμοφαινόλες φυκών

#### 1.3.1. Γενικά στοιχεία

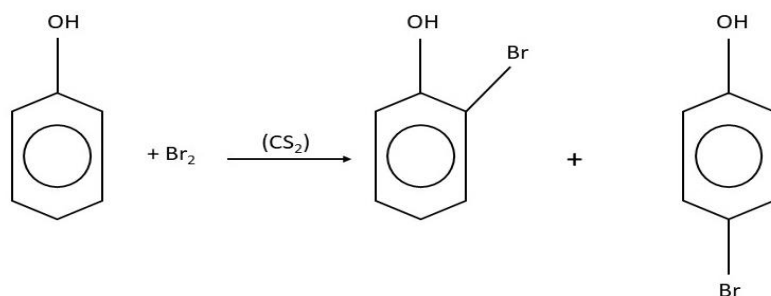
Τα τελευταία χρόνια έχει ανακαλυφθεί πως οι βρωμοφαινόλες των φυκών έχουν πολλές θετικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Πρώτα απ' όλα, ας γίνει κατανοητή η χημική προέλευσή τους.

Οι βρωμοφαινόλες προέρχονται από μία φαινόλη, δηλαδή έναν αρωματικό δακτύλιο, στον οποίο βρίσκεται απευθείας συνδεδεμένη μία υδροξυλομάδα (-OH) (εικόνα 9).



Εικόνα 9: Μοριακή απεικόνιση της φαινόλης.

Η σημαντικότερη χημική αντίδραση της φαινόλης είναι αυτή της ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Μία τέτοια αντίδραση είναι η βρωμίωση, δηλαδή η προσθήκη ομάδας βρωμίου (Br) στον αρωματικό δακτύλιο. Η ομάδα του υδροξυλίου είναι ένας πολύ ισχυρός ενεργοποιητής και κατευθύνει την αντίδραση προσθήκης βρωμίου σε θέσεις -όρθο και -πάρα του αρωματικού δακτυλίου. Η αντίδραση σταματάει όταν το Br έχει εισαχθεί σε θέσεις -όρθο, -μέτα και -πάρα. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η αντίδραση βρωμίωσης της φαινόλης και η παραγωγή τόσο -όρθο προϊόντος, όσο και -μέτα προϊόντος. (εικόνα 10).

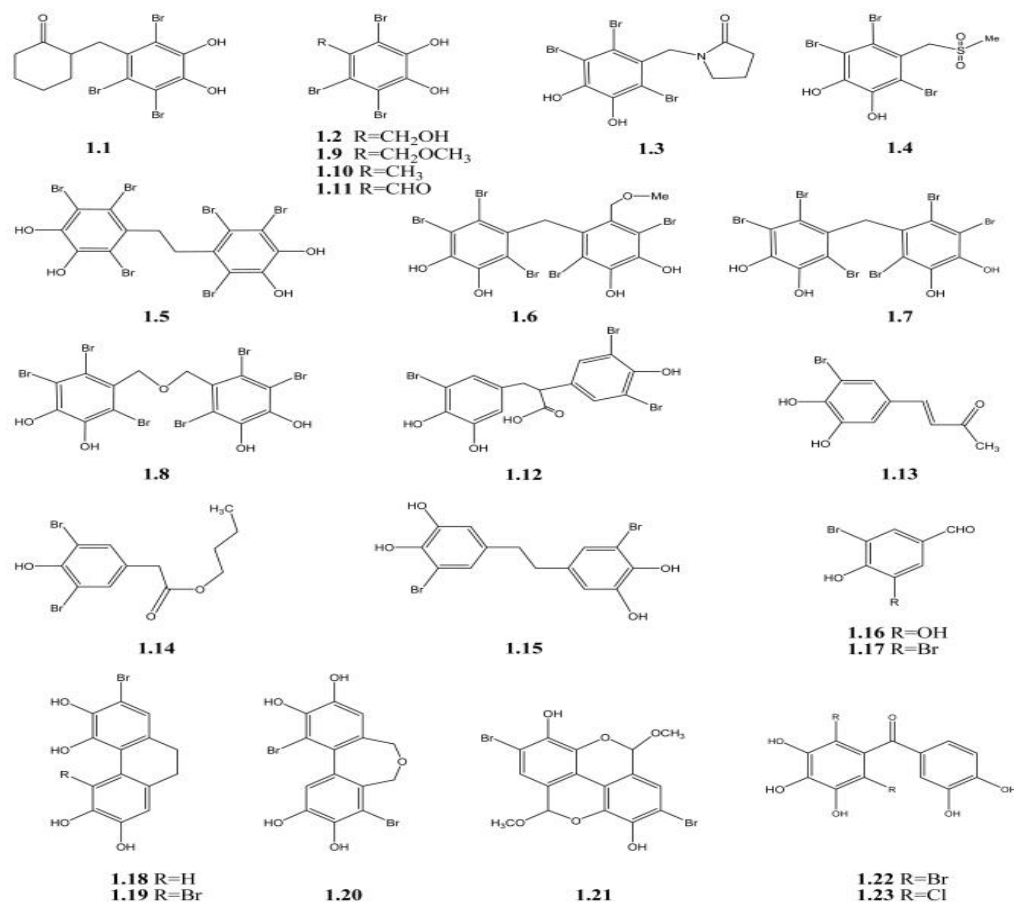


Εικόνα 10: Αντίδραση βρωμίωσης της φαινόλης.

Στην φύση ωστόσο, οι βρωμοφαινόλες δεν βρίσκονται σε τόσο απλή μορφή, αλλά έχουν περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους, υποκαταστάτες βρωμίου, ή και πρόσθετων ομάδων, καθώς και υδροξυλικών ομάδων. Η προέλευσή τους είναι από τα θαλάσσια φύκη. Αρχικά απομονώθηκαν από τα κόκκινα φύκη (Katsui et al., 1967), ενώ στην συνέχεια βρέθηκαν και σε πράσινα φύκη (Sun et al., 1983), αλλά και σε καφέ άλγη (Chung et al., 2003). Πέρα από τα φύκη έχουν βρεθεί και σε άλλους θαλάσσιους οργανισμούς, όπως είναι τα σφουγγάρια (Liu et al., 2004) και τα ασκίδια (Lindsay et al., 1998). Οι βρωμοφαινόλες είναι θαλάσσιοι δευτερογενής μεταβολίτες και πιστεύεται ότι η λειτουργία τους είναι η χημική άμυνα, καθώς και η λειτουργία τους ως αποτρεπτικών παραγόντων άλλων θαλάσσιων οργανισμών (Dong et al., 2020). Τα τελευταία χρόνια η επιστήμη έχει στραφεί αρκετά στις βρωμοφαινόλες και έχει βρεθεί ότι έχουν αρκετές θεραπευτικές ιδιότητες μερικές από τις οποίες είναι οι παρακάτω:

### 1. Αντιοξειδωτική ικανότητα.

Όλο και περισσότερα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι βρωμοφαινόλες έχουν αντιοξειδωτική δράση. Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται μόρια βρωμοφαινολών με αντιοξειδωτική δράση (εικόνα 11).

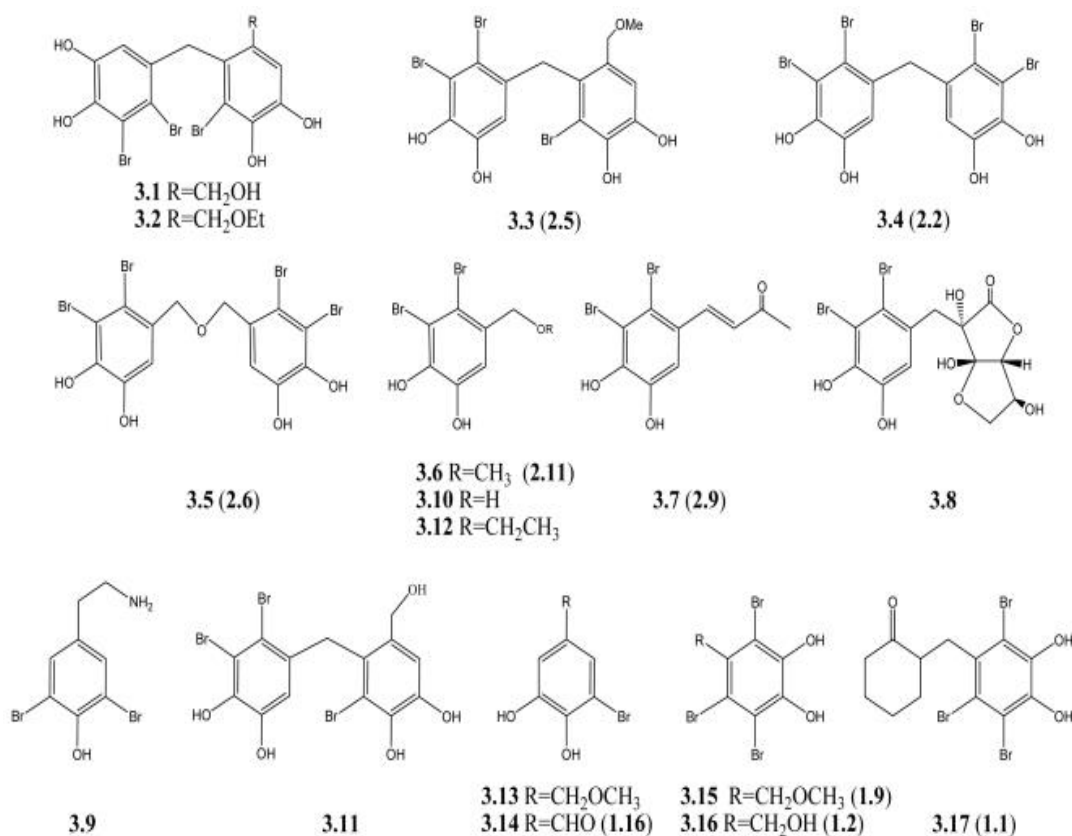


Εικόνα 11: Μόρια βρωμοφαινολών με αντιοξειδωτική δράση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα ερευνών βρέθηκε ότι το μόριο 1.2 της παραπάνω εικόνας έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με το μόριο 1.11 της ίδιας εικόνας. Αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των βρωμοφαινολών ίσως εξαρτάται από τον αριθμό των υδροξυλικών ομάδων που διαθέτουν (Duan et al., 2007). Αυτή η άποψη γίνεται περισσότερο αποδεκτή δεδομένου ότι οι ενώσεις 1.18 και 1.19 της εικόνας 11, έχουν την μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα και διαθέτουν και οι δύο από τέσσερις υδροξυλικές ομάδες. Από την άλλη, η ένωση 1.17, η οποία διαθέτει μόνο μία υδροξυλική ομάδα, έχει την μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Επιπλέον, μετά από σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ενώσεων 1.5 και 1.15 (6 ομάδες βρωμίου και 2 ομάδες βρωμίου αντίστοιχα), φαίνεται ότι ο βαθμός βρωμίωσης δεν είναι κάποιος καθοριστικός παράγοντας της ικανότητας των μορίων (Liu et al., 2011).

## 2. Αντιμικροβιακή ικανότητα.

Δεδομένου ότι η ανοχή των βακτηρίων απέναντι στα φάρμακα αρχίζει ολοένα και περισσότερο να αυξάνεται, είναι σημαντική η ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών φαρμάκων. Στην παρακάτω εικόνα βρίσκονται οι βρωμοφαινόλες οι οποίες εμφάνισαν αντιμικροβιακή ικανότητα (εικόνα 12).



Εικόνα 12: Μόρια βρωμοφαινολών με αντιμικροβιακή ικανότητα.

Μελέτες έδειξαν ότι οι παραπάνω βρωμοφαινόλες είναι ικανές για αντιβακτηριακή δράση έναντι συγκεκριμένων βακτηρίων. Επιπρόσθετα εμφανίζουν αντιμυκητιακή ικανότητα κάτι το οποίο, είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για την προστασία των καλλιεργειών. Τέλος, ορισμένα από αυτά τα μόρια είναι ικανά να καταπολεμήσουν και διάφορους ιούς. Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι τα περισσότερα μόρια που εμφανίζουν αντιμικροβιακές δράσεις είναι σε μεγάλο βαθμό βρωμιωμένα, γεγονός που καταδεικνύει τη σημασία της βρωμίωσης σε αυτή την ικανότητά τους (Liu et al., 2011).

### 3. Αντιδιαβητική ικανότητα.

Ακόμη και αν υπάρχουν αρκετά διαβητικά φάρμακα, η ανακάλυψη νέων δεν θα πάψει ποτέ, όταν πρόκειται για μία πάθηση όπως είναι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2. Έτσι λοιπόν, δεδομένου ότι τα θαλάσσια φύκη χρησιμοποιούνταν για αρκετά χρόνια στην Κίνα, ως φάρμακο κατά του διαβήτη (Jarald et al., 2008), οι βρωμοφαινόλες τους έχουν εξεταστεί για πιθανή αντιδιαβητική δράση. Βρέθηκε λοιπόν ότι κάποιες βρωμοφαινόλες έχουν ικανότητα να αναστέλλουν τη φωσφατάση τυροσίνης 1B, καθώς και την α-γλυκοσιδάση. Η φωσφατάση τυροσίνης 1B παίρνει μέρος στη ρύθμιση του μονοπατιού σηματοδότησης της ινσουλίνης και οι παράγοντες που τη στοχεύουν θα μπορούσαν να είναι εν δυνάμει φάρμακα για τον διαβήτη. Η α-γλυκοσιδάση παίζει κεντρικό ρόλο στην πέψη των υδατανθράκων και αναστολείς αυτής θα μπορούσαν να είναι πιθανά αντιδιαβητικά φάρμακα. Και σε αυτή την περίπτωση φαίνεται ότι ο βαθμός βρωμίωσης των βρωμοφαινολών επηρεάζει θετικά την αντιδιαβητική ικανότητα (Liu et al., 2011).

Εκτός από τις παραπάνω ικανότητες των βρωμοφαινολών, υπάρχουν και οι εξής (Dong et al., 2020): 1) αντιφλεγμονώδης ικανότητα και 2) ικανότητα ενάντια στην νόσο του Parkinson και του Alzheimer.

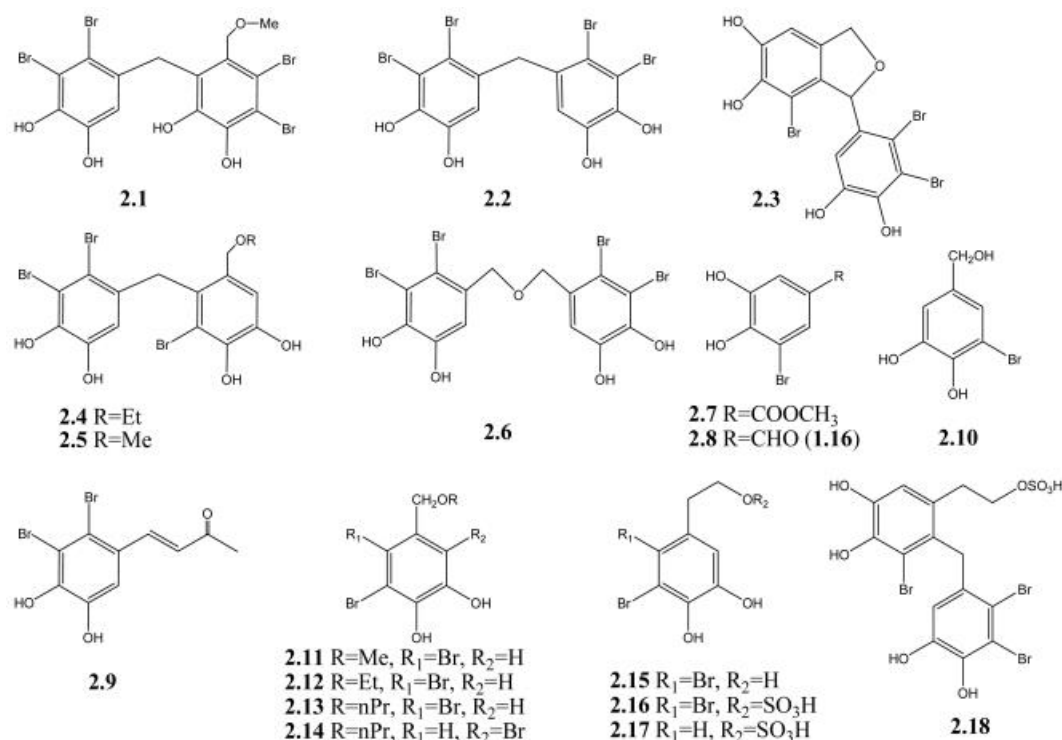
Ωστόσο, εκτός από όλες αυτές τις θετικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, δυστυχώς υπάρχουν και βρωμοφαινόλες, οι οποίες έχουν αρνητικές επιπτώσεις τόσο στον άνθρωπο [(ενδοκρινής διαταραχές) Ji et al., 2011], όσο και στο περιβάλλον [(περιβαλλοντική ρύπανση) A de Wit, 2002].

### **1.3.2. Βρωμοφαινόλες φυκών και προστασία από καρκινογένεση**

Μεταξύ των σημαντικών θετικών επιδράσεων των βρωμοφαινολών που αναφέρθηκαν προηγουμένως, υπάρχει και μία ακόμη αξιοσημείωτη επίδραση που πρέπει να αναφερθεί και αυτή είναι η αντικαρκινική ικανότητα των βρωμοφαινολών.



Στην ακόλουθη εικόνα φαίνονται τα μόρια βρωμοφαινολών, τα οποία εμφάνισαν αντικαρκινικές ιδιότητες (εικόνα 13).



Εικόνα 13: Μόρια βρωμοφαινολών με αντικαρκινικές ιδιότητες.

Τα μόρια 2.1 – 2.6 της παραπάνω εικόνας, απομονώθηκαν από καφέ φύκη και εμφάνισαν κυτταροτοξικότητα απέναντι σε μία μεγάλη ομάδα ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Liu et al., 2011). Έτσι λοιπόν, το συγκεκριμένο φύκος, από το οποίο απομονώθηκαν αυτά τα μόρια, φάνηκε ότι είναι σε θέση να αναστείλει την ανάπτυξη όγκων και να βελτιώσει το ανοσοποιητικό σύστημα (Shi et al., 2009). Οι βρωμοφαινόλες, που απομονώθηκαν από κόκκινα (2.7, 2.8, 2.9, 2.11, 2.12, 2.13 της εικόνας 13) και πράσινα φύκη (2.10 της εικόνας 13), είναι απλούστερες δομικά, ωστόσο και αυτές είναι σε θέση να εμφανίσουν αντικαρκινικές ιδιότητες, σε μία σειρά από ανθρώπινες καρκινικές σειρές. Η ένωση 2.14 της παραπάνω εικόνας είναι μία συνθετική ένωση, η οποία αναστέλλει τον καρκινικό πολλαπλασιασμό και επίσης, σταματά τον κυτταρικό κύκλο. Η έρευνα των Nagwa A. Shoeib et al., ισχυρίζεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο ο αριθμός και η θέση των υποκαταστατών βρωμίου στην αντικαρκινική ικανότητα (Shoeib et al., 2004).

Το σημαντικότερο πρόβλημα στην περίπτωση δημιουργίας αντικαρκινικών φαρμάκων είναι η τοξική επίδραση του φαρμάκου και στα υγιή κύτταρα, πέρα από τα καρκινικά. Έτσι, και στην περίπτωση των βρωμοφαινολών αυτό πρέπει να μελετηθεί ιδιαίτερα, καθώς έρευνες έχουν δείξει ότι εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα σε πνευμονικούς



ινοβλάστες (Lijun et al., 2005). Αυτό μπορεί να βελτιωθεί με την τροποποίηση των ήδη φυσικών βρωμοφαινόλων και τη μετατροπή τους σε συνθετικές, με σκοπό την ύπαρξη μεγαλύτερης επιλεκτικότητας. Σίγουρα όμως, κανείς δεν μπορεί να αμφισβητήσει το ότι οι βρωμοφαινόλες είναι επάξια υποψήφιος για αντικαρκινικά φάρμακα, ωστόσο χρειάζεται περαιτέρω έρευνα.

#### **1.4. Είδη φυκών και αγγειοσπέρμων**

##### **1.4.1. Γενικά στοιχεία**

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 14 εκχυλίσματα θαλάσσιων φυκών και 2 θαλάσσιων αγγειοσπέρμων που συλλέχθηκαν από περιοχές του Αιγαίου πελάγους. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν τα παρακάτω είδη:

- *Gracilaria gracilis*.

Το φύκος *G. gracilis* έχει χόνδρινο, κυλινδρικό σχήμα και μωβ φύλλα, μήκους έως 500 mm, από τα οποία ένα ή περισσότερα προκύπτουν από μικρό, σαρκώδες και δισκοειδές στήριγμα. Η διακλάδωσή του είναι πολύ ακανόνιστη, αραιή ή άφθονη (κλαδιά σε διάμετρο 2 mm με μυτερές κορυφές). Έχει ενδοπαλιρροιακό ιστό από μεγάλα κύτταρα με λεπτό τοίχωμα και στενή εξωτερική φλοιώδη ζώνη μικρών άχρωμων κυττάρων. Συναντάται συνήθως σε βράχους και πέτρες, μεσοπαλιρροιακά και υποπαλιρροιακά, και ιδιαίτερα σε αμμώδεις ακτές. Έχει μια γενικά κοινή κατανομή.



Εικόνα 14: *Gracilaria gracilis*.

- *Gracilaria sp.*

Τα είδη του γένους *Gracilaria* είναι ροδοφύκη. Το γένος *Gracilaria* διακρίνεται για την οικονομική του σημασία ως αγρόφυτο, καθώς και για τη χρήση του ως τροφή για τον άνθρωπο και διάφορα είδη οστρακοειδών. Διάφορα είδη του γένους καλλιεργούνται μεταξύ της Ασίας, της Νότιας Αμερικής, της Αφρικής και της Ωκεανίας. Τα είδη του *Gracilaria* χρησιμοποιούνται ως τροφή στις κουζίνες των Φιλιππίνων, της Χαβάης, της Ιαπωνίας και της Κορέας. Στην ιαπωνική κουζίνα, ονομάζεται ογκονόρι. Οι πολυσακχαρίτες του γένους *Gracilaria* έχουν αποδειχθεί σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα ότι είναι ένας αποτελεσματικός προφυλακτικός παράγοντας κατά της ιογενούς λοίμωξης από ιαπωνική εγκεφαλίτιδα. Επίσης, θειικοί ολιγοσακχαρίτες από είδη *Gracilaria* φαίνεται να έχουν αντικές ιδιότητες.



Εικόνα 15: *Gracilaria sp.*

- *Ulva rigida*.

Το φύκος *U. rigida* αναπτύσσεται στα παράκτια ύδατα και στις εκβολές ποταμών. Απαντάται ευρέως στη Μεσόγειο, ιδιαίτερα στις ακτές της Ελλάδας. Αποτελείται από λεπτούς, πεπλατυσμένους θαλάμους, τα κύτταρα των οποίων έχουν ομοιόμορφη δομή. Συχνά πληροί τις απαιτήσεις για χρήση ως «βιολογικός δείκτης» για την αξιολόγηση της ρύπανσης από μέταλλα στα παράκτια συστήματα, καθώς βιοσυσσωρεύει υψηλές συγκεντρώσεις ορυκτών που αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις μετάλλων στο θαλάσσιο περιβάλλον.

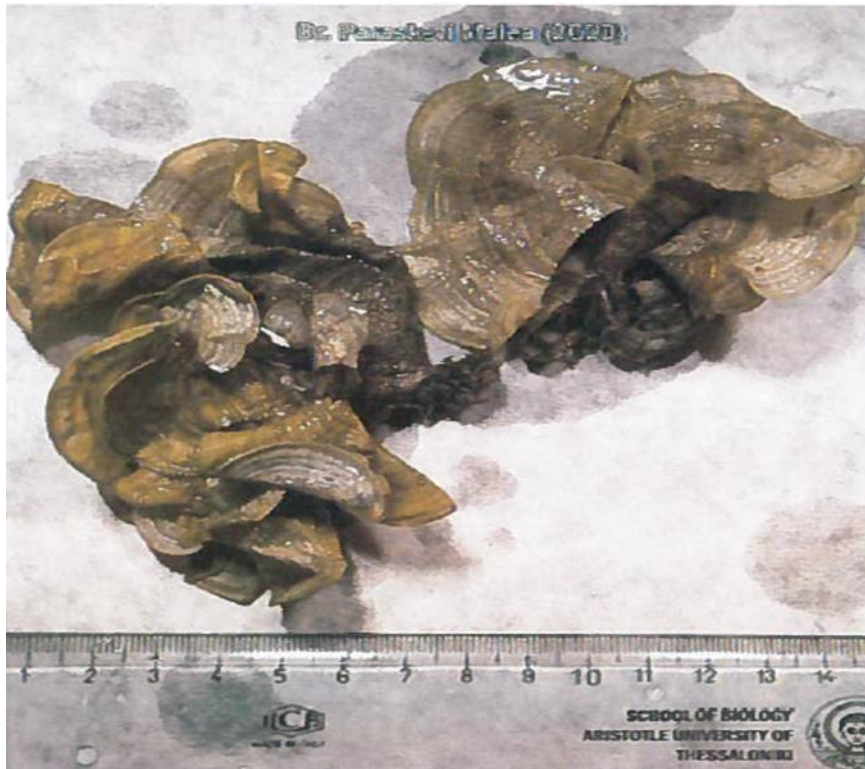


Εικόνα 16: *Ulva rigida*.

- *Padina pavonica*.

Το *P. pavonica* είναι ένα μικρό φαιοφύκος που αναπτύσσεται σε μία διάμετρο έως και 10 cm. Βρίσκεται στον Ινδικό Ωκεανό, τον Ειρηνικό Ωκεανό, τον Ατλαντικό Ωκεανό και τη Μεσόγειο θάλασσα. Συναντάται στην παράκτια ζώνη συνήθως με αργιλώδη, ιλύώδη ή αμμώδη ιζήματα. Άλλοι βιότοποι του περιλαμβάνουν βράχους και θραύσματα κοχυλιών, ρηγά λιβάδια υποπαραθαλάσσιων φυτών, ρίζες μαγκρόβιων και κοραλλιογενείς υφάλους σε παλιρροϊκά επίπεδα. Τα νεαρά φύλλα του είναι λεπτά, φυλλώδη και επίπεδα, με ολόκληρα περιθώρια. Τα παλαιότερα φύλλα είναι παχύτερα, κοίλα, σε σχήμα βεντάλιας ή σε σχήμα χωνιού, με λοβωτά περιθώρια. Η εξωτερική (κάτω) επιφάνεια έχει ομόκεντρες σειρές μικρών, λεπτών τριχών και έχει ζώνες λαδοπράσινου, ωχρού και σκούρου καφέ, ενώ η εσωτερική (άνω) επιφάνεια καλύπτεται με ένα λεπτό στρώμα λάσπης. Και οι δύο πλευρές είναι αραιά ασβεστοποιημένες και τα περιθώρια τείνουν να λυγίζουν προς τα μέσα. Οι λεπίδες του συνδέονται με βάση στήριξης.





Εικόνα 17: *Padina pavonica*.

- *Codium fragile*.

Το φύκος *C. fragile* εισήχθη τυχαία, πιθανώς σε πολλές περιπτώσεις μέσω της ναυτιλίας και μέσω στρειδιών που εισήχθησαν από τον Β. Ειρηνικό για καλλιέργεια, στη Μεσόγειο, και βρέθηκε για πρώτη φορά στη Γαλλία το 1946. Τώρα είναι ευρέως διαδεδομένο στη Μεσόγειο.



Εικόνα 18: *Codium fragile*.

- *Cystoseira barbata*.

Το *C. barbata* βρίσκεται στην άνω υποπαραθαλάσσια ζώνη, βάθους 0,2 m, σε ανοιχτές και προστατευμένες βραχώδεις ακτές, σε ημίκλειστες περιοχές και παράκτιες λιμνοθάλασσες.



Εικόνα 19: *Cystoseira barbata*.

- *Cystoseira amentacea*.

Το *C. amentacea* είναι το τυπικό είδος του γένους *Cystoseira*. Αναπτύσσεται σε εκτεθειμένες θέσεις, στην άνω υποπαραθαλάσσια ζώνη, κοντά στην επιφάνεια της θάλασσας.

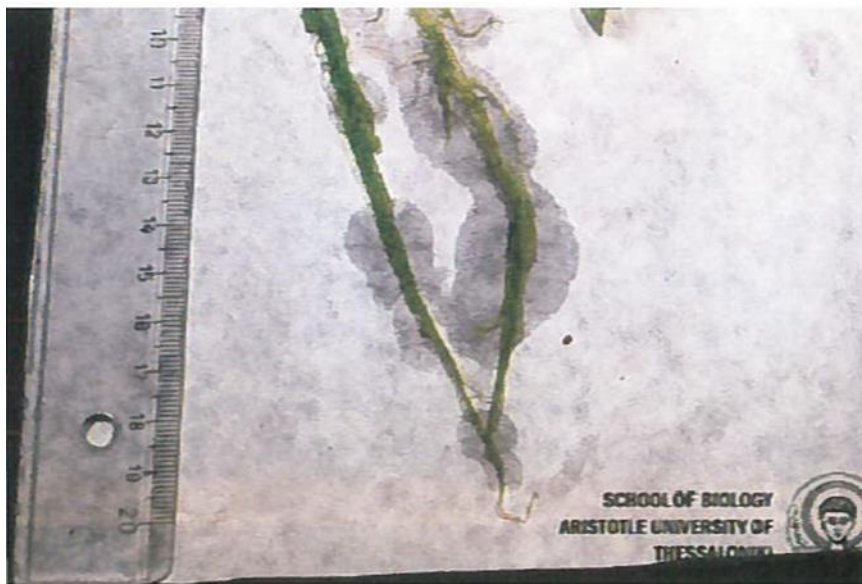


Εικόνα 20: *Cystoseira amentacea*.



- *Ulva intestinalis*.

Το *U. intestinalis* είναι ένα χλωροφύκος, κατανεμημένο σε όλο τον κόσμο και μπορεί να είναι αναπαραγωγικό όλες τις εποχές του χρόνου. Τα φύλλα του έχουν κλαδιά, είναι εντελώς σωληνοειδή και εκτείνονται σε πλάτος μέχρι το μέσο θαλλό, φτάνοντας τα 15 cm μήκος ή περισσότερο. Τα κύτταρα είναι ακανόνιστα διατεταγμένα και ο χλωροπλάστης έχει σχήμα ‘κουκούλας’ και τοποθετείται στη μία πλευρά του κυττάρου, με μόνο ένα πυρηνοειδή. Το είδος μπορεί να έχει μήκος 10-30 εκατοστά και πλάτος 6-18 χιλιοστά.



Εικόνα 21: *Ulva intestinalis*.

- *Colpomenia sinuosa*.

Το φύκος *Colpomenia sinuosa* που ονομάζεται κοινώς ο ‘κλέφτης των στρειδιών’ ή η ‘κολποειδής μπάλα’, είναι ένα είδος φαιοφυκών του γένους *Colpomenia*. Είναι το τυπικό είδος του γένους του. Είναι ευρέως διαδεδομένο σε ζεστά και εύκρατα νερά.



Εικόνα 22: *Colpomenia sinuosa*.

- *Cystoseira compressa*.

Το φύκος *C. compressa* μπορεί να βρεθεί στις ανώτερες περιοχές της παλίρροιας ζώνης, συνήθως σε μέρη που δεν εκτίθενται στον αέρα και όπου το ρεύμα δεν είναι ισχυρό. Είναι πολυετές είδος και απαντάται όλες τις εποχές του χρόνου, αν και σε ορισμένες εποχές χάνονται κλαδιά και παρατηρείται μείωση του πληθυσμού που μπορεί να είναι αποτέλεσμα της υποβάθμισης της ποιότητας του νερού στη Μεσόγειο. Αναπτύσσεται σε βραχώδη και αμμώδη υποστρώματα σε ρηγά νερά. Είναι ένα θαμνώδες φαιοφύκος, με στήριγμα που αποτελείται από μία ενιαία μονάδα. Το φύκος έχει δύο μορφές κλαδιών: μερικά πεπλατυσμένα, που δίνουν το όνομά στο είδος και άλλα πιο κυλινδρικά. Τα κυστίδια επίπλευσης βυθίζονται μέσα στους πλευρικούς κλάδους. Τα περισσότερα φύκη αυτού του είδους έχουν μήκος μεταξύ 15-30 cm, αλλά μπορούν να βρεθούν και μεγαλύτερα. Το χρώμα του φύκους έχει αποχρώσεις του ανοιχτού καφέ και του μπεζ, άλλοτε ομοιόμορφα κατανεμημένο και άλλοτε με στίγματα. Όταν στεγνώσει ο θαλλός αποκτά μία πιο σκούρα απόχρωση.



Εικόνα 23: *Cystoseira sompressa*.

- *Sargassum vulgare*.

Είναι ένα φαιοφύκος, που αναπτύσσεται σε κοραλλιογενείς υφάλους, βράχους και πέτρες με κύριο άξονα μήκους περίπου 40 cm, που επιπλέει όρθιο μέσω αέριων κύστεων σε προστατευμένες ή εκτεθειμένες θέσεις όλων των τροπικών και υποτροπικών ακτών από την υψηλή παλίρροια έως τις υποπαραθαλάσσιες ακτές.



Εικόνα 24: *Sargassum vulgare*.

- *Gigartina teedei*.

Το φύκος *G. teedei* βρίσκεται ευρέως διαδεδομένο στον Ατλαντικό Ωκεανό, τη Μεσόγειο Θάλασσα, τη Μαύρη Θάλασσα και τον Ινδικό Ωκεανό. Ο βιότοπος του είναι επιλιθικός σε προστατευμένες περιοχές και άνω υποπαραθαλάσσιος έως τουλάχιστον 3 μέτρα. Αναπτύσσεται σε βράχους ανάμεσα στα σημάδια της παλίρροιας κοντά στην άνω παλιρροιακή ζώνη. Είναι ένα μικρό ροδοφύκος, του οποίου τα φύλλα είναι χόνδρινα μεμβρανώδη, με χρώμα σκούρο βυσσινί έως κόκκινο μαύρο, που γίνονται κιτρινοπράσινα λόγω σήψης. Οι κύριοι άξονες του λόγω των πλατιών κλαδιών τους φτάνουν το 1 cm.

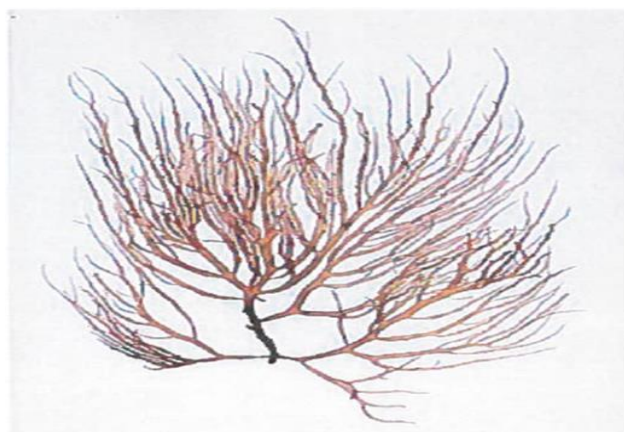


Εικόνα 25: *Gigartina teedei*.



- *Gracilaria bursa pastoris*.

Το φύκος *G. bursa-pastoris* εντοπίζεται κυρίως στον Ατλαντικό και τον Ειρηνικό Ωκεανό καθώς και στη Μεσόγειο Θάλασσα. Είναι γενικά διαδεδομένο σε ζεστά νερά. Είναι επιλιθικό και βρίσκεται σε προστατευμένες θέσεις στο ανώτερο υποπαραθαλάσσιο τμήμα, ενώ συχνά συνδέεται με περιοχές όπου υπάρχει εναπόθεση άμμου.



Εικόνα 26: *Gracilaria bursa pastoris*.

- *Gigartina pistillata*.

Το *G. pistillata* είναι ένα εδώδιμο ροδοφύκος που βρίσκεται τόσο στον Βορειοανατολικό όσο και στο Νοτιοανατολικό Ατλαντικό και στη Νοτιοανατολική Ασία και αποτελεί πηγή παραγενάνης η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων. Το *G. pistillata* αποτελεί το τυπικό είδος του γένους *Gigartina*, οι θάλλοι του είναι όρθιοι, ύψους έως 20 cm, με σκούρο κόκκινο ή κόκκινο-καφέ, χρώμα, χόνδρινοι, ελαστικοί, διχτομικά διακλαδισμένοι και προσκολλημένοι στο υπόστρωμα μέσω ενός μικρού δίσκου. Το *G. pistillata* μπορεί να δείξει μία σπάνια παρουσία ετεροσπορικών θαλλών (δηλαδή, παράγοντας τετρασπόρια και καρποσπόρια στους θαλλούς), παρόλο που έχει έναν ισομορφικό τριφασικό κύκλο ζωής.



Εικόνα 27: *Gigartina pistillata*.

- *Cymodocea nodosa*.

Το *C. nodosa* είναι ένα αγγειόσπερμο που περιορίζεται σε υποθαλάσσια ανάπτυξη και βρίσκεται σε ρηχά μέρη της Μεσογείου και σε ορισμένες γειτονικές περιοχές του Ατλαντικού Ωκεανού. Αναπτύσσεται σε βάθη έως και δεκαεννέα μέτρα, σε αμμώδη ιζήματα σε προστατευμένες τοποθεσίες και χρειάζεται καθαρά νερά για φωτοσύνθεση Έχει ανοιχτοπράσινα ή γκριζοπράσινα φύλλα. Τα φύλλα του είναι πολύ στενά αλλά μπορεί να έχουν μήκος έως και 40 cm. Κάθε φύλλο έχει επτά έως εννέα φλέβες που το διατρέχουν κατά μήκος του. Το φυτό παράγει ριζώματα που έχουν διάμετρο μόνο 1 mm και έχουν ουλές από φύλλα κατά διαστήματα. Τα δυσδιάκριτα λουλούδια που μοιάζουν με γρασίδι παράγονται μερικές φορές στο τέλος των μακριών στελεχών την άνοιξη όταν η θερμοκρασία του νερού αρχίζει να αυξάνεται μετά το χειμώνα. Η γύρη απελευθερώνεται στη θάλασσα και οι σπόροι παραμένουν αδρανείς μέχρι την επόμενη άνοιξη.



Εικόνα 28: *Cymodocea nodosa*.

- *Ruppia maritima*.

Το *R. maritima* είναι ένα αγγειόσπερμο που βρίσκεται σε όλο τον κόσμο. Είναι ένα ετήσιο ή πολυετές φυτό με λεπτό νήμα, που μοιάζει με γρασίδι, το οποίο αναπτύσσεται από ένα ρίζωμα στερεωμένο στα ρηχά στο υγρό υπόστρωμα. Παράγει μια μακρόστενη, ίσια ή χαλαρά κουλουριασμένη ταξιανθία με δύο μικροσκοπικά λουλούδια. Το φυτό συχνά αυτογονιμοποιείται, αλλά τα άνθη απελευθερώνουν και γύρη. Το φυτό αναπαράγεται επίσης αγενώς φυτρώνοντας από το ρίζωμά του για να σχηματίσει αποικίες.



Εικόνα 29: *Ruppia maritima*.

## Σκοπός του πειράματος

ήταν η μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων από ελληνικά θαλάσσια φύκη και αγγειόσπερμα, στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2). Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ΧΤΤ.

## 2.Υλικά & μέθοδοι

### 2.1. Υλικά

#### 2.1.1. Αντιδραστήρια και θρεπτικά υλικά

- Θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gibco BRL 41966). Είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο θρεπτικό μέσο το οποίο υποστηρίζει την ανάπτυξη κυτταρικών σειρών θηλαστικών.
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrom KG Seromed). Παρέχει στα κύτταρα τους απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες για την ανάπτυξή τους.
- Αντιβιοτικά πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη (antibiotic-antimitotic solution, Gibco). Χρησιμοποιούνται για την προφύλαξη των κυττάρων από βακτηριακή μόλυνση.
- PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline 1x) (Gibco). Χρησιμοποιείται για έκπλυση της φλάσκας από τυχόν υπολείμματα όταν αυτό είναι απαραίτητο.
- Τρυψίνη 0.25% (Gibco). Πρόκειται για ένα πρωτεολυτικό ένζυμο το οποίο χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των κυττάρων από την φλάσκα καλλιέργειας.
- Cell Proliferation kit II (XTT) (Sigma).

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δύο ειδών θρεπτικά μέσα DMEM. Το ένα χρησιμοποιήθηκε στο στάδιο ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων και το άλλο στο στάδιο προσθήκης των εκχυλισμάτων. Και τα δύο περιείχαν 250 ml DMEM και 2,5 ml pen / str. Η βασική διαφορά τους είναι ότι το πρώτο περιείχε και FBS 10%, ενώ το δεύτερο δεν περιείχε. Ο λόγος που γίνεται αυτό είναι διότι οι πρωτεΐνες του FBS μπορούν να αδρανοποιήσουν τις δραστικές ουσίες των εκχυλισμάτων, κάτι το οποίο δεν είναι επιθυμητό στο στάδιο προσθήκης των εκχυλισμάτων.

### 2.1.2. Εκχυλίσματα

Στον Πίνακα 1 φαίνονται τα είδη φυκών και αγγειοσπέρμων από τα οποία απομονώθηκαν τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Η απομόνωση των εκχυλισμάτων έγινε με χρήση 80% μεθανόλης.

Πίνακας 1: Είδη φυκών και αγγειοσπέρμων.

Είδη φυκών	Είδη αγγειοσπέρμων
<i>Gracilaria gracilis</i>	<i>Ruppia maritima</i>
<i>Gracilaria sp.</i>	<i>Cymodocea nodosa</i>
<i>Gracilaria bursa pastoris</i>	
<i>Ulva rigida</i>	
<i>Ulva intestinalis</i>	
<i>Codium fragile</i>	
<i>Colpomenia sinuosa</i>	
<i>Cystoseira amantacea</i>	
<i>Cystoseira barbata</i>	
<i>Cystoseira compressa</i>	
<i>Padina pavonica</i>	
<i>Sargasum vulgare</i>	
<i>Gigartina teedei</i>	
<i>Gigartina pistillata</i>	

### 2.2. Μέθοδοι

Οι παρακάτω μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για τα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2.

#### 2.2.1. Ξεπάγωμα κυττάρων.

Κατά την έναρξη των πειραμάτων είναι αναγκαίο το ξεπάγωμα των κυττάρων τα οποία βρίσκονται είτε στον καταψύκτη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , είτε στο υγρό άζωτο. Τα κύτταρα ξεπάγωσαν, αφού τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Εφόσον, ξεπάγωσαν, μεταφέρθηκαν σε falcon και εκεί τοποθετήθηκε 2 ml θρεπτικού υλικού με FBS. Μετά από ανάδευση με τον πιπεταδόρο, έτσι ώστε να γίνει καλή ανάμιξη των 2 υγρών, μεταφέρθηκαν σε μία φλάσκα μαζί με 5 ml θρεπτικού υλικού με FBS. Η φλάσκα τοποθετήθηκε στον κλίβανο ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  και  $5\% \text{CO}_2$ ). Είναι απαραίτητο, μετά από 24 h το υπάρχον θρεπτικό υλικό να πεταχτεί και να αντικατασταθεί από καινούργιο,

διότι, κατά την ψύξη των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε DMSO σαν αντιπηκτικό, το οποίο έχει τοξική δράση σε θερμοκρασία δωματίου για τα κύτταρα.

### **2.2.2. Καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς.**

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM το οποίο περιείχε 10% FBS και 1% διάλυμα πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης με συγκέντρωση 100 units/ml και 100 µg/ml, αντίστοιχα. Οι φλάσκες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν, είχαν χωρητικότητα 25 cm<sup>2</sup>. Όλες οι διεργασίες έλαβαν χώρα σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow). Όλα τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν επωάστηκαν για 10-15 min σε υδατόλουτρο στους 37 °C.

Μόλις τα κύτταρα κατέλαβαν το 75-80% της επιφάνειας της φλάσκας, αυτό ήταν σημάδι, ότι έπρεπε να γίνει split, δηλαδή ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Ο λόγος που γίνεται αυτό είναι διότι, εάν παρέμειναν στην ίδια φλάσκα θα αναπτύσσονταν σε απαγορευτικό βαθμό, καθώς θα κατελάμβαναν σχεδόν όλη την επιφάνεια της φλάσκας και έτσι λόγω απουσίας χώρου αλλά και θρεπτικών συστατικών θα πέθαιναν. Η διαδικασία λοιπόν του split περιλαμβάνει την διαδικασία της τρυψινοποίησης. Αρχικά, από την φλάσκα αφαιρέθηκε το υπάρχον θρεπτικό υλικό. Έπειτα, ξεπλύθηκε από υπολείμματα με 1 ml PBS. Στην συνέχεια, τοποθετήθηκε 0,5 ml τρυψίνης 1X και επωάστηκε στον κλίβανο (37 °C και 5% CO<sub>2</sub>) για 5 min. Η τρυψίνη είναι μία πρωτεάση, η οποία είναι ικανή να διασπά τόσο τις συνδέσεις των κυττάρων μεταξύ τους, όσο και με την επιφάνεια της φλάσκας. Μετά το πέρας των 5 min, τα κύτταρα ξεκόλλησαν με συνεχές χτύπημα στα πλαϊνά μέρη της φλάσκας. Η παρακολούθηση της φλάσκας στο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων επιβεβαίωσε την διάσπαση των κυττάρων καθώς τα κύτταρα εμφανίζονταν σε μορφή εναιωρήματος. Στην συνέχεια, στην φλάσκα τοποθετήθηκαν 6 ml θρεπτικού υλικού με FBS. Η διαδικασία αυτή έπρεπε να γίνει σχετικά γρήγορα, διότι η τρυψίνη μακροπρόθεσμα μπορεί να διασπάσει και τις πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων κάτι το οποίο δεν είναι επιθυμητό. Έπειτα, με την χρήση πιπεταδόρου ακολούθησε το λεγόμενο “σπάσιμο” των κυττάρων με σκοπό να διαχωριστούν πλήρως μεταξύ τους. Τέλος, σε νέες φλάσκες προστέθηκε η επιθυμητή ποσότητα των κυττάρων και συμπληρώθηκε με θρεπτικό υλικό με FBS, ώστε ο όγκος της φλάσκας να φτάσει τα 5 ml. Μετά από αυτή την διαδικασία, η φλάσκα επωάστηκε στον κλίβανο (37 °C και 5% CO<sub>2</sub>) για να χρησιμοποιηθεί σε επόμενο split ή στην μέθοδο XTT (3 μέρες μετά το split η φλάσκα ήταν έτοιμη για χρήση).



### 2.2.3. Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με την χρήση αιμοκυτταρομέτρου Neubauer.

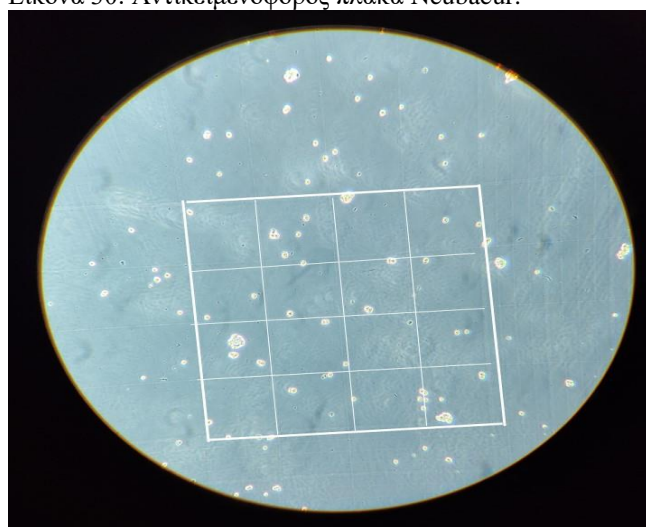
Η διαδικασία για τη μέτρηση των κυττάρων που χρειαζόταν σε κάποιο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας ήταν ήταν η εξής: αρχικά, από μία φλάσκα, στην οποία τα κύτταρα είχαν αναπτυχθεί και είχαν καλύψει το 75-80% πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της τρυψινοποίησης. Έπειτα, πάρθηκαν 2 ml κυτταρικού εναιωρήματος και 5 ml θρεπτικού υλικού με FBS και τοποθετήθηκαν σε ένα falcon. Μετά από ελαφριά ανάδευση με το χέρι μεταφέρθηκαν 10 μl από το διάλυμα σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer με σκοπό την μέτρηση των κυττάρων.

Το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer αποτελεί μία μέθοδο με την οποία είναι δυνατή η μέτρηση κυττάρων, όπως αιμοσφαίρια ή κύτταρα κυτταροκαλλιέργειας, τα οποία βρίσκονται σε εναιώρημα.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα (εικόνα 30) στην οποία όταν τοποθετηθούν 10 μl του δείγματος και η πλάκα μεταφερθεί στο ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων, προκύπτει η παρακάτω εικόνα (εικόνα 31).



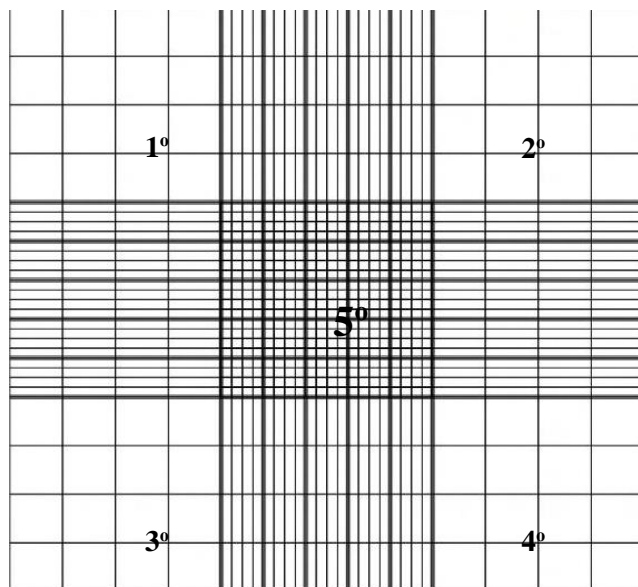
Εικόνα 30: Αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer.



Εικόνα 31 : Ηπατικά καρκινικά κύτταρα σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.



Στην παραπάνω εικόνα διακρίνεται ένα τετράγωνο, τα όρια του οποίου απεικονίζονται με παχιά λευκή γραμμή, μέσα στο οποίο υπάρχει ένας X αριθμός κυττάρων. Στην καλυπτίδα της πλάκας υπάρχουν 9 τέτοια τετράγωνα (εικόνα 32)



Εικόνα 32: Σχήμα στην επιφάνεια του αιμακυτταρομέτρου.

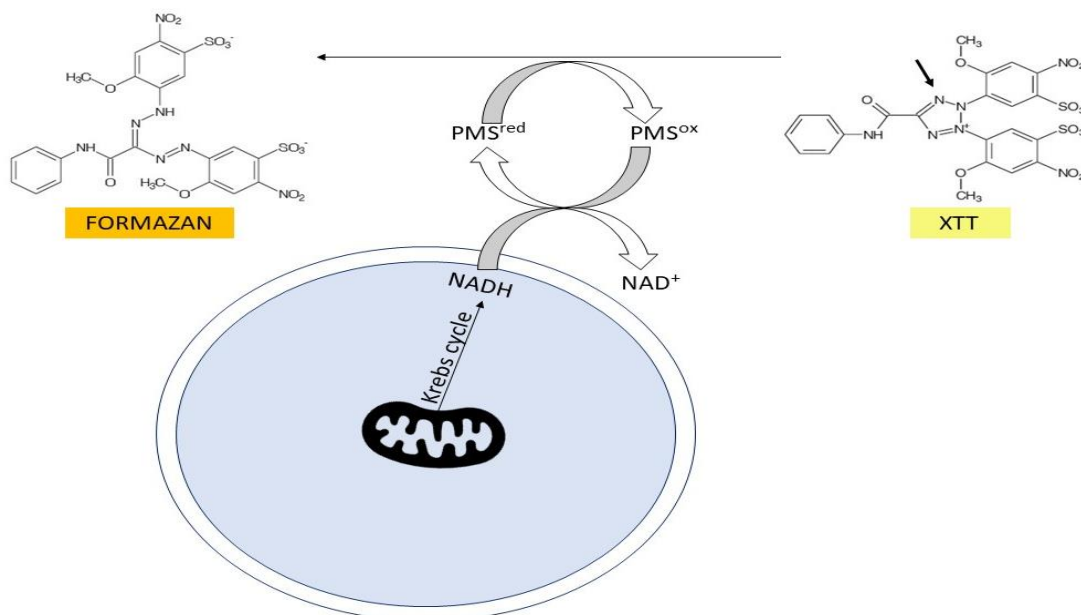
Για να μετρηθούν τα κύτταρα συνολικά μετράται ο αριθμός κυττάρων στο 1°, 2°, 3°, 4° και 5° τετράγωνο και έπειτα βρίσκεται ο μέσος όρος. Ο όγκος από κάθε τετραγωνάκι είναι ίσος με  $0,1 \text{ mm}^3$ , δηλαδή  $0,0001 \text{ cm}^3$ . Άρα, ισχύει ότι  $1 \text{ cm}^3 = 10^3 \text{ mm}^3$ . Επίσης, ισχύει ότι  $1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3$ . Άρα,  $1 \text{ ml} = 10^3 \text{ mm}^3$ . Έτσι, βγαίνει το συμπέρασμα ότι ο όγκος από κάθε τετραγωνάκι είναι ίσως με  $0,0001 \text{ ml}$ . Επομένως, εάν π.χ. ο μέσος όρος βγει 45 κύτταρα, τότε προκύπτει ότι υπάρχουν 45 κύτταρα σε όγκο  $0,0001 \text{ ml}$ . Ωστόσο, ο αριθμός των κυττάρων πρέπει να βρεθεί σε αναλογία με το  $1 \text{ ml}$  και έτσι πολλαπλασιάζεται το αποτέλεσμα με το  $10^4$ . Εφόσον, βρεθεί ο αριθμός των κυττάρων που υπάρχουν σε  $1 \text{ ml}$ , μπορεί εύκολα να βρεθεί ο όγκος του διαλύματος των κυττάρων που πρέπει να προστεθεί, ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων που απαιτείται κάθε φορά.

## 2.2.4. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με την μέθοδο ΧΤΤ.

### 2.2.4.1. Αρχή της μεθόδου.

Ο προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης έγινε με την μέθοδο ΧΤΤ. Η μέθοδος ΧΤΤ είναι μία αποτελεσματική φασματοφωτομετρική μέθοδος ποσοτικοποίησης η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της κυτταρικής ανάπτυξης. Βασίζεται στην παραγωγή ενός έγχρωμου προϊόντος, την φορμαζάνη, η οποία απορροφά στα  $450 \text{ nm}$ . Πιο συγκεκριμένα, το ΧΤΤ (χλωριούχο τετραζόλιο) είναι μία

άχρωμη ή ελαφρώς κίτρινη ένωση η οποία όταν αναχθεί προς φορμαζάνη γίνεται πορτοκαλί. Η αναγωγή αυτή προς φορμαζάνη γίνεται με την διάσπαση ενός θετικά φορτισμένου δακτυλίου τετραζόλης. Στην αντίδραση αυτή παίρνουν μέρος οι μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες. Πιο συγκεκριμένα, κατά την διάρκεια του κύκλου του Krebs, στα μιτοχόνδρια, παράγεται NADH το οποίο μπορεί να λειτουργήσει σαν φορέας ηλεκτρονίων και να χρησιμοποιηθεί στην αναγωγή του XTT. Ωστόσο, το αντιδραστήριο XTT έχει αρνητικό φορτίο και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μην μπορεί να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου. Γι' αυτό τον λόγο, οι μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη για να πραγματοποιηθεί αυτή η διαδικασία. Επιπλέον, εκτός από την ένωση XTT, η διαδικασία αυτή χρειάζεται και έναν δέκτη ηλεκτρονίων όπως είναι το PMS. Η δουλειά του PMS είναι να λαμβάνει τα ηλεκτρόνια από το NADH και με την σειρά του να τα δίνει στο XTT για να γίνει η αναγωγή του. Η όλη διαδικασία είναι χαρακτηριστικό ζωντανών και όχι νεκρών κυττάρων. Επομένως, εάν μειωθεί ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων θα μειωθούν οι μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες και, κατ' επέκταση, η ποσότητα της παραγόμενης φορμαζάνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα χαμηλότερες τιμές απορρόφησής της. Η όλη διαδικασία περιγράφεται στην παρακάτω εικόνα. (εικόνα 33).

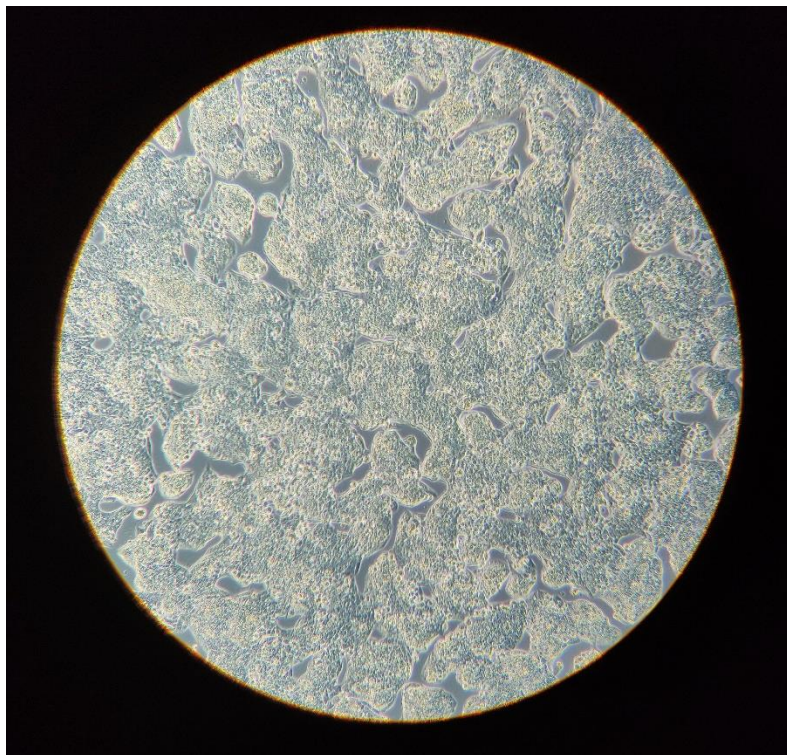


Εικόνα 33 : Αναγωγή του XTT προς formazan.

#### 2.2.4.2 Πειραματική διαδικασία.

Η πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης των κυττάρων με την χρήση XTT διαρκεί 3 μέρες. Την πρώτη μέρα πραγματοποιήθηκε η επιστροφή των κυττάρων σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (96 well plate). Ο αριθμός των

κυττάρων ήταν ίσος με 10.000 κύτταρα. Τα κύτταρα προήλθαν από μία φλάσκα, στην οποία είχαν αναπτυχθεί και είχαν καλύψει το 75-80% της επιφάνειάς της (εικόνα 34). Μαζί με τα κύτταρα, στην πλάκα τοποθετήθηκε και θρεπτικό υλικό με FBS 100 μl. Εφόσον, τοποθετήθηκαν και τα δύο στην πλάκα πραγματοποιήθηκε μία ελαφριά ανάδευση με το χέρι, μπρος-πίσω και διαγώνια και, έπειτα, η πλάκα επώαστηκε για 24 h στον κλίβανο με συνθήκες θερμοκρασίας 37 °C και CO<sub>2</sub> 5%. Η επώαση πραγματοποιείται για να προσκολληθούν τα κύτταρα στον πάτο της πλάκας.



Εικόνα 34: Κύτταρα τα οποία έχουν καλύψει το 80% της επιφάνειας της φλάσκας.

Μετά από 24 h το θρεπτικό υλικό της πλάκας αφαιρέθηκε. Την θέση του πήρε η προς εξέταση ουσία διαλυμένη σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (οι πρωτεΐνες του FBS μπορεί να συνδεθούν με την προς εξέταση ουσία και να την αδρανοποιήσουν κάτι το οποίο δεν είναι επιθυμητό) συνολικού όγκου 100 μl σε κάθε βοθρίο της πλάκας. Η προς εξέταση ουσία προστέθηκε σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις. Κάθε συγκέντρωση της ουσίας τοποθετήθηκε 3 φορές έτσι ώστε να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα. Επίσης, η προς εξέταση ουσία μπήκε και σε βοθρία της πλάκας όπου δεν υπήρχαν κύτταρα, διότι υπήρχε περίπτωση να απορροφά στα 450 nm. Εάν αυτό συνέβαινε, αφαιρούσαμε από την απορρόφηση των κυττάρων την απορρόφηση της ουσίας για να βρούμε το σωστό αποτέλεσμα. Η κάθε συγκέντρωση σε αυτή την φάση μπήκε 2 φορές. Τελευταίο αλλά εξίσου σημαντικό ήταν η προσθήκη controls, τα οποία περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό

χωρίς FBS. Έπειτα από αυτή την διαδικασία η πλάκα επώαστηκε στον κλίβανο (37 °C και 5% CO<sub>2</sub>) για 24 h.

Το τελευταίο βήμα της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε την τρίτη μέρα με την προσθήκη του αντιδραστηρίου XTT. Χρησιμοποιήθηκε το Cell Proliferation Kit II της εταιρίας Roche το οποίο περιείχε 2 αντιδραστήρια: το XTT labeling reagent και το Electron coupling reagent. Η συνολική ποσότητα των 2 αντιδραστηρίων που τοποθετήθηκε σε κάθε βοθρίο της πλάκας ήταν 50 μl, εκ των οποίων τα 49 μl προήλθαν από το XTT labeling reagent και το 1 μl από το Electron coupling reagent. Η παραπάνω διαδικασία πρέπει να γίνει σχετικά γρήγορα διότι τα 2 αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται στο σκοτάδι καθώς είναι φωτοευαίσθητα. Μετά την προσθήκη των 50 μl, η πλάκα επώαστηκε για 4 h στον κλίβανο (37 °C και 5% CO<sub>2</sub>). Έπειτα από την τετράωρη επώαση μετρήθηκε η απορρόφηση στα 450 nm σε φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό Gen5 (Biotek).

#### **2.2.5. Επεξεργασία και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.**

Η εξέταση του κάθε εκχυλίσματος έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων HepG2 υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα} - O.D. \text{ δείγματος}) / O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα}] \times 100$$

Στη συνέχεια έγιναν διαγράμματα συσχέτισης της % αναστολής της κυτταρικής αύξησης με τη συγκέντρωση των εκχυλισμάτων. Από τα διαγράμματα υπολογίστηκε το IC<sub>50</sub>, η συγκέντρωση όπου το εκχύλισμα αναστέλλει κατά 50% την αύξηση των κυττάρων. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο ANOVA με το πρόγραμμα SPSS 13.0.

### 3. Αποτελέσματα

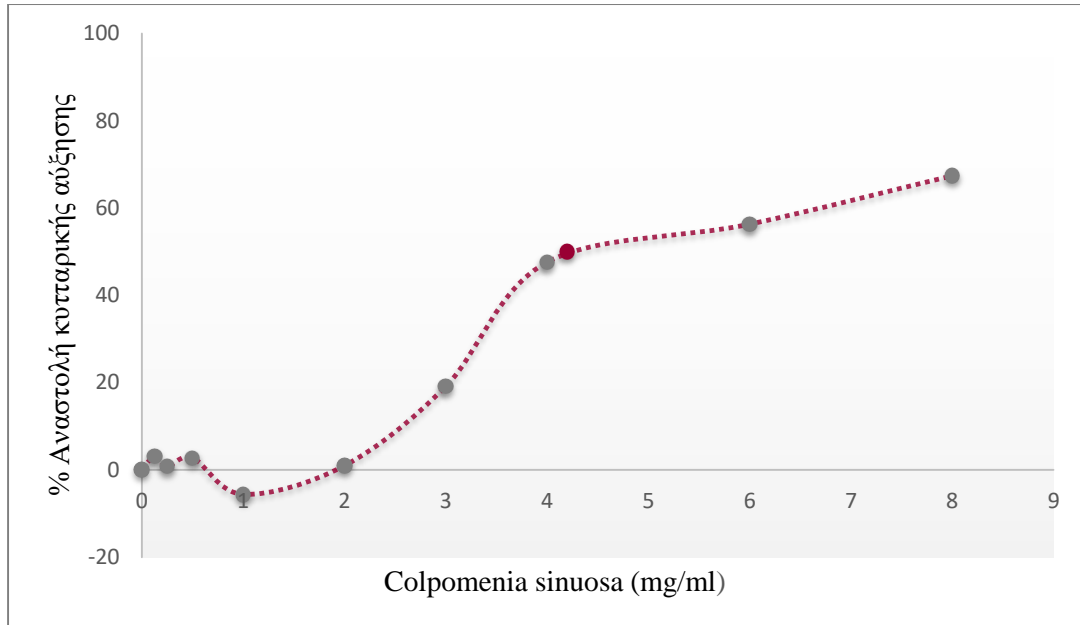
Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 14 εκχυλίσματα θαλάσσιων φυκών και 2 εκχυλίσματα θαλάσσιων αγγειοσπέρμων που συλλέχθηκαν από περιοχές του Αιγαίου πελάγους για την ικανότητά τους να αναστέλλουν την αύξηση των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2.

Ο προσδιορισμός της επίδρασης στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων έγινε με τη μέθοδο ΧΤΤ. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τα εκχυλίσματα σε διάφορες συγκεντρώσεις και για κάθε συγκέντρωση προσδιορίστηκε η % αναστολή στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων. Από τα διαγράμματα συσχέτισης της % αναστολής με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος προσδιορίστηκαν οι τιμές IC50 δηλαδή η συγκέντρωση του εκχυλίσματος όπου αναστέλλεται η αύξηση των κυττάρων κατά 50%. Όσο μικρότερη η τιμή IC50 τόσο πιο δραστικό είναι το εκχύλισμα.

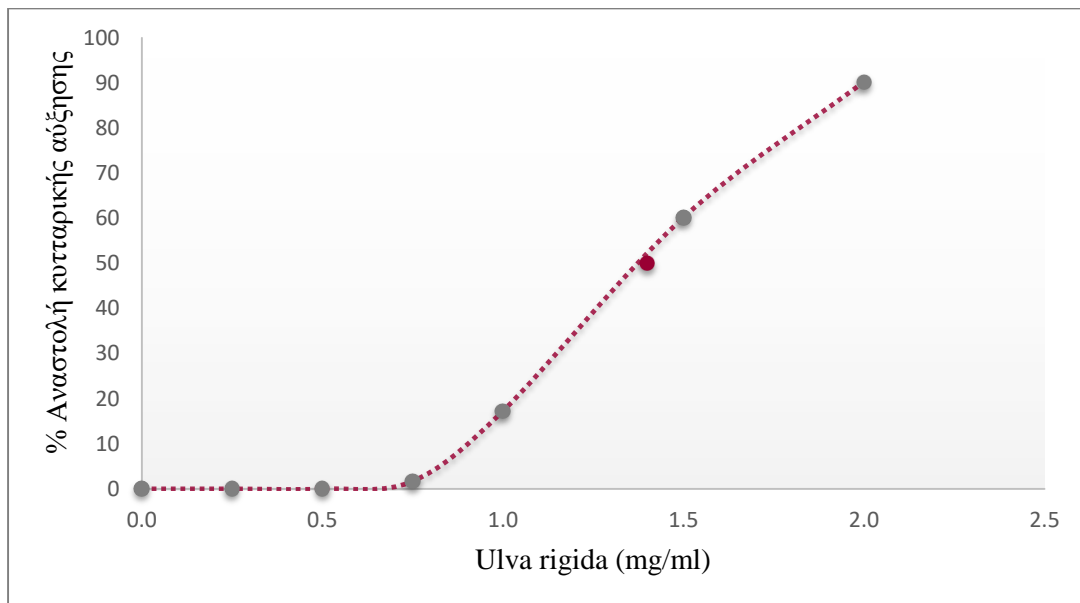
Στα διαγράμματα 1 – 16 φαίνεται η % αναστολή στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος. Στο διάγραμμα 17 φαίνονται συγκεντρωτικά οι τιμές IC50 όλων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.

Οι τιμές IC50 κυμαίνονται από 0,23 – 9,7 mg/ml. Τα πιο δραστικά εκχυλίσματα ήταν τα δύο αγγειόσπερμα, το *Cymodocea nodosa* (IC50: 0,23 mg/ml) και το *Ruppia maritima* (IC50: 0,67 mg/ml). Από τα φύκη τα 5 πιο δραστικά εκχυλίσματα ήταν τα *Padina pavonica* (IC50: 0,93 mg/ml), *Gracilaria bursa pastoris* (IC50: 1,4 mg/ml), *Ulva rigida* (IC50: 1,4 mg/ml), *Gigartina teedei* (IC50: 1,5 mg/ml) και *Ulva intestinalis* (IC50: 1,6 mg/ml).

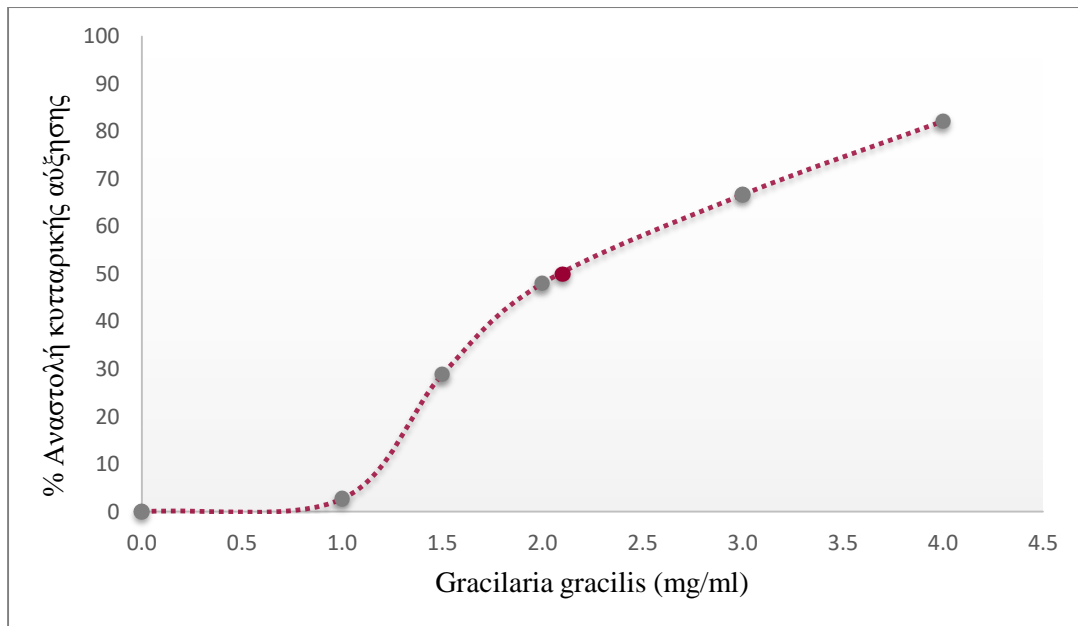




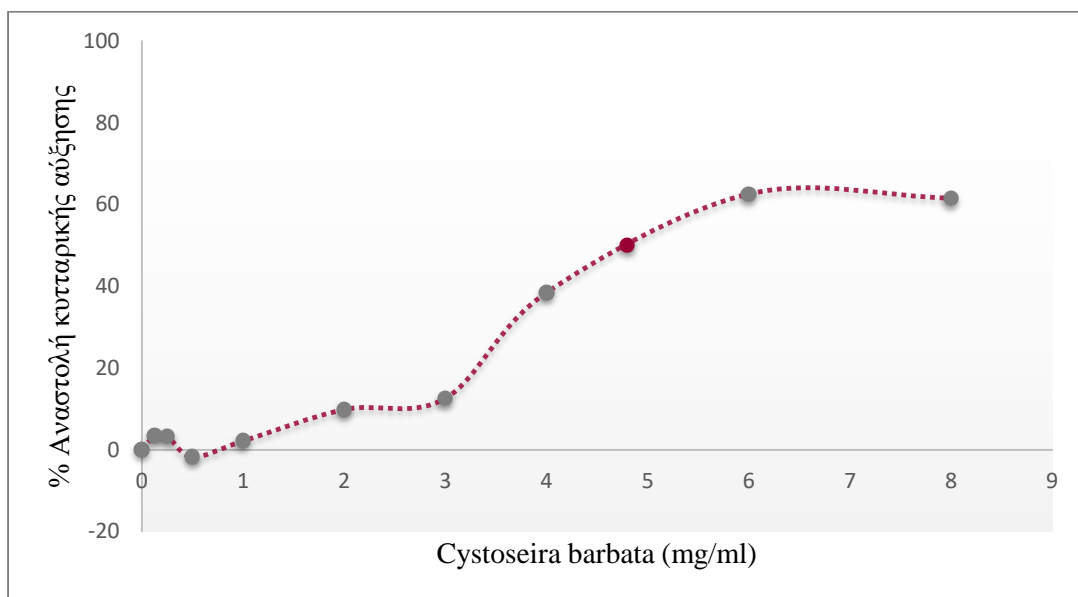
Διάγραμμα 1: Η % αναστολή βιωσιμότητας των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από το φύκος *Colpomenia sinuosa* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ΧΤΤ.



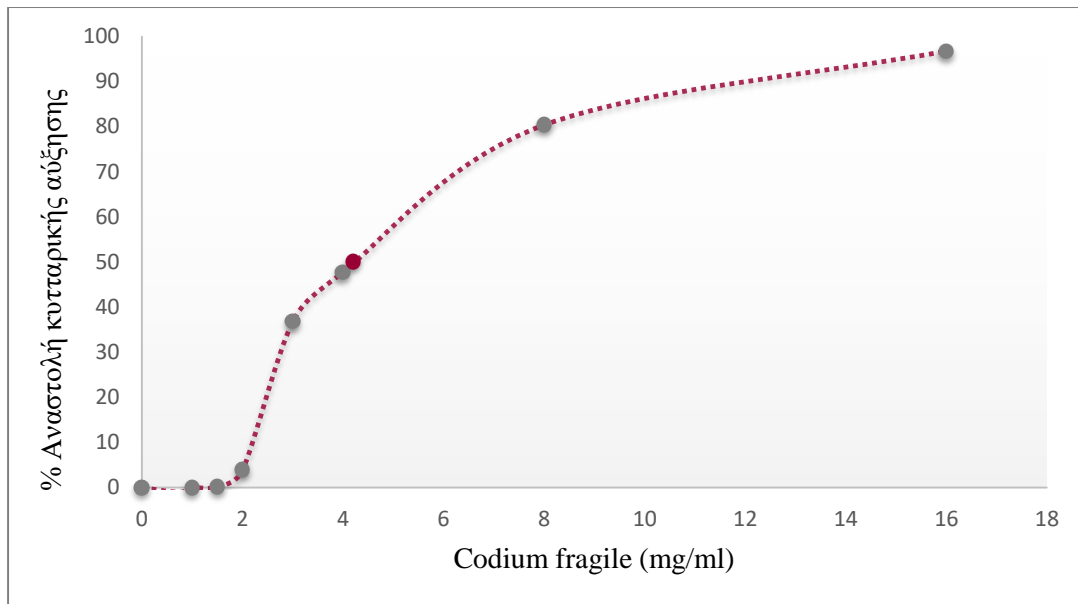
Διάγραμμα 2: Η % αναστολή βιωσιμότητας των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από το φύκος *Ulva rigida* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ΧΤΤ.



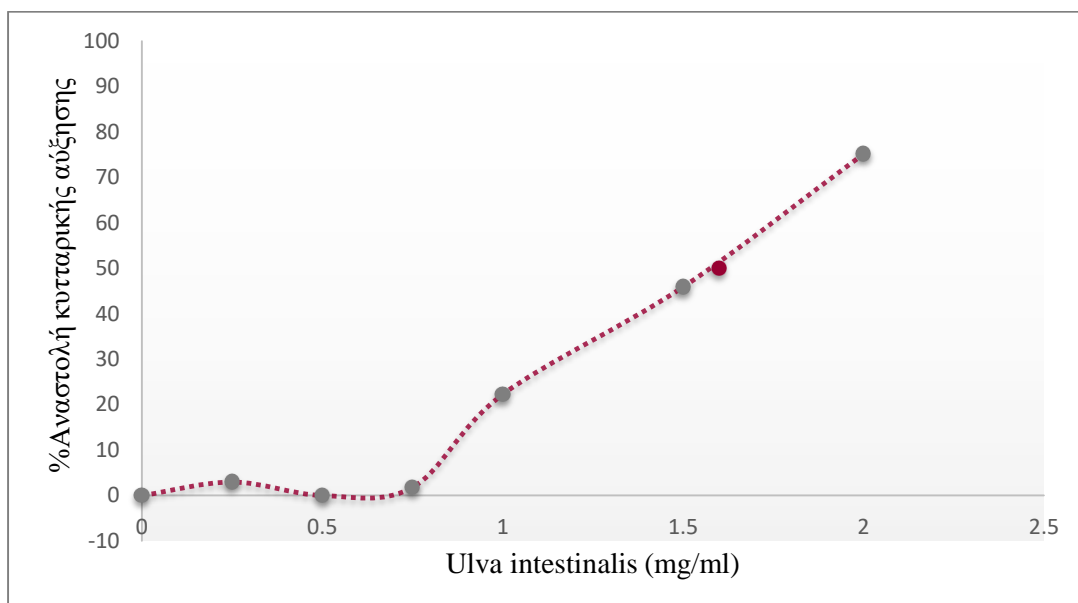
Διάγραμμα 3: Η % αναστολή βιωσιμότητας των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από το φύκος *Gracilaria gracilis* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ΧΤΤ.



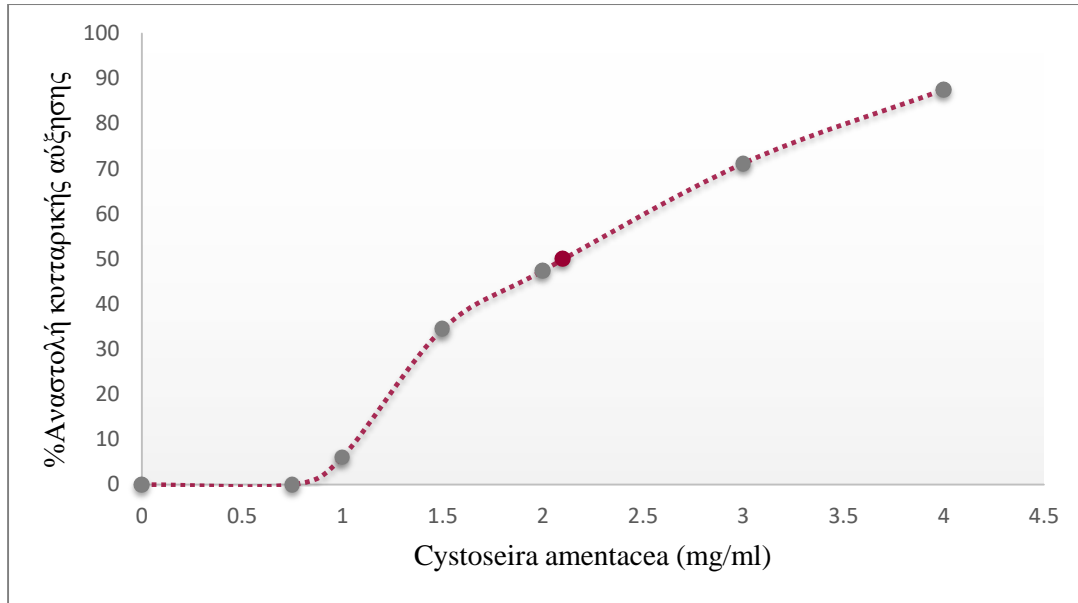
Διάγραμμα 4: Η % αναστολή βιωσιμότητας των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από το φύκος *Cystoseira barbata* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ΧΤΤ.



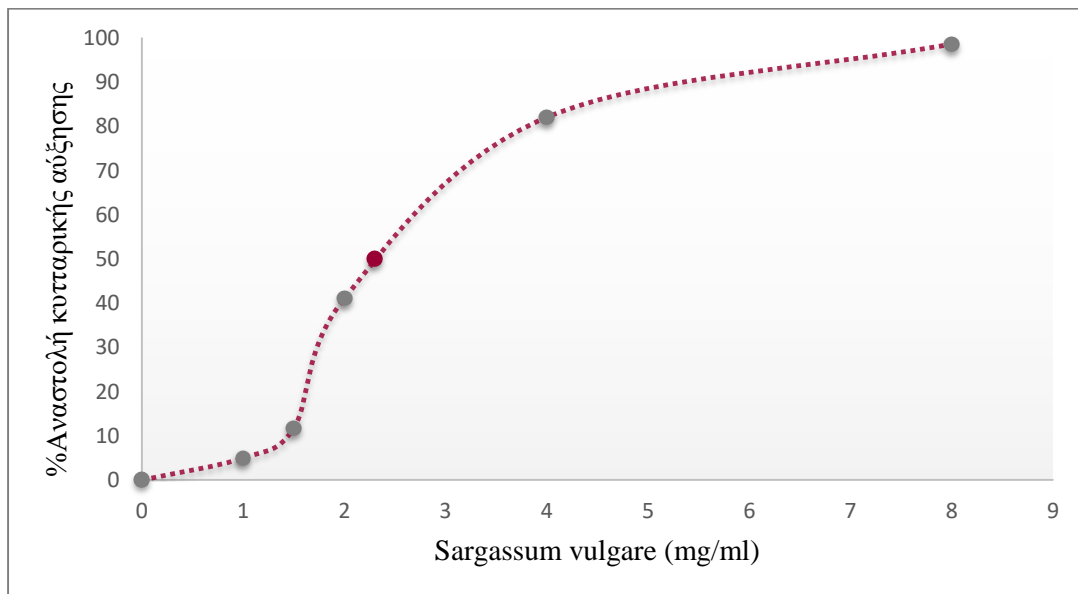
Διάγραμμα 5: Η % αναστολή βιωσιμότητας των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από το φύκος *Codium fragile* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT.



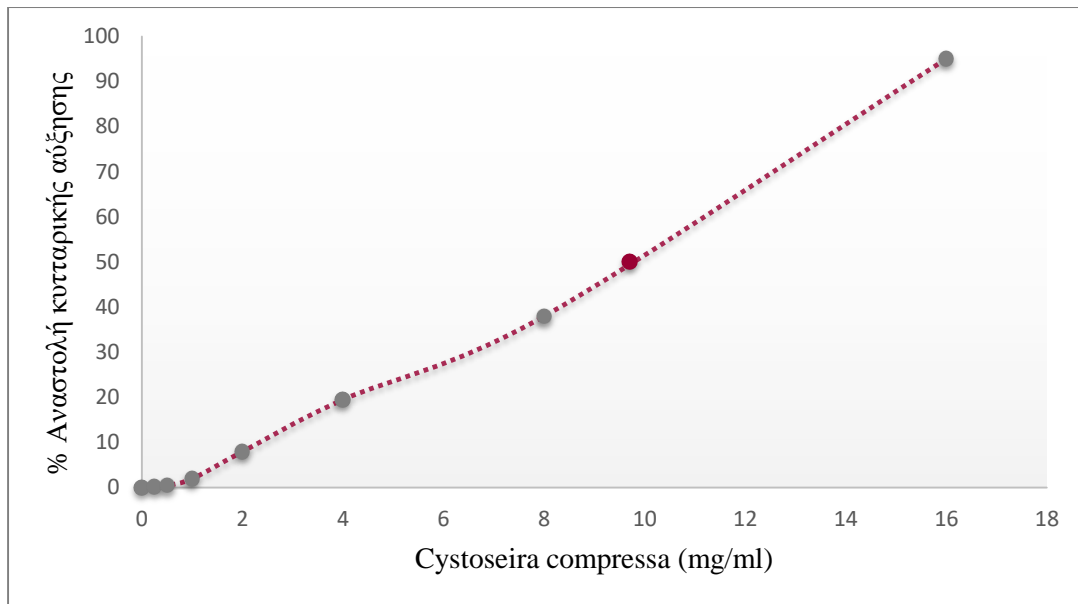
Διάγραμμα 6: Η % αναστολή βιωσιμότητας των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από το φύκος *Ulva intestinalis* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT.



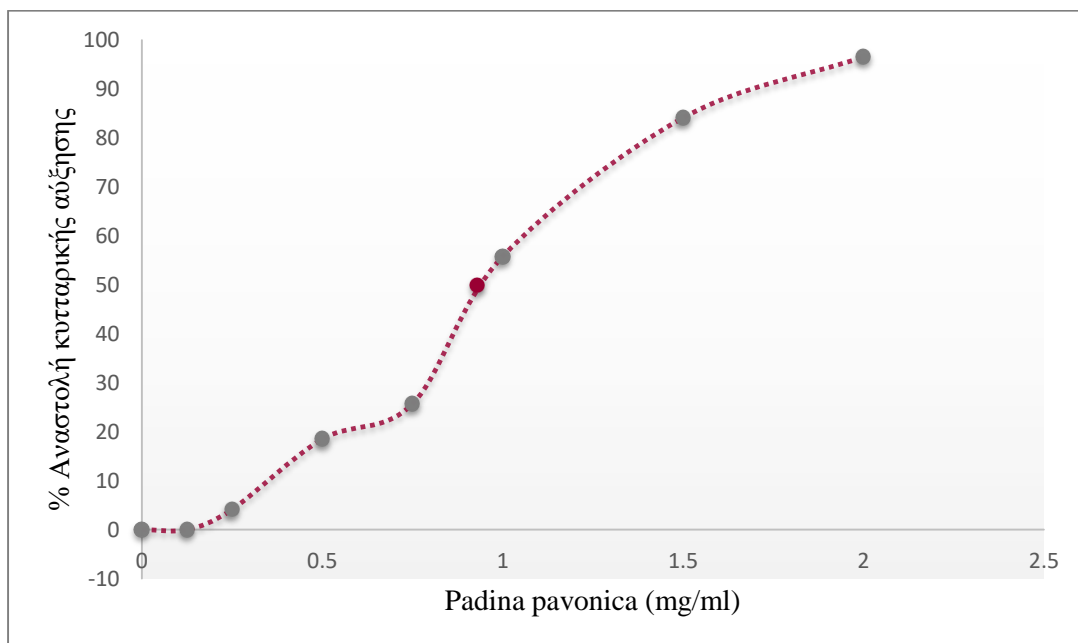
Διάγραμμα 7: Η % αναστολή βιωσιμότητας των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από το φύκος *Cystoseira amentacea* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ΧΤΤ.



Διάγραμμα 8: Η % αναστολή βιωσιμότητας των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από το φύκος *Sargassum vulgare* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ΧΤΤ.

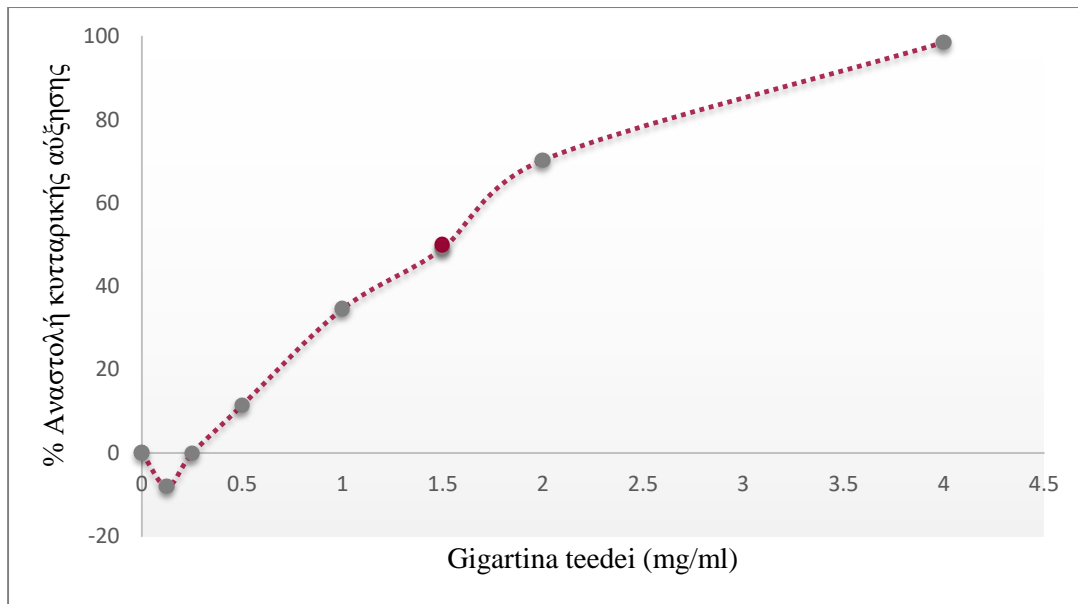


Διάγραμμα 9: Η % αναστολή βιωσιμότητας των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από το φύκος *Cystoseira compressa* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT.

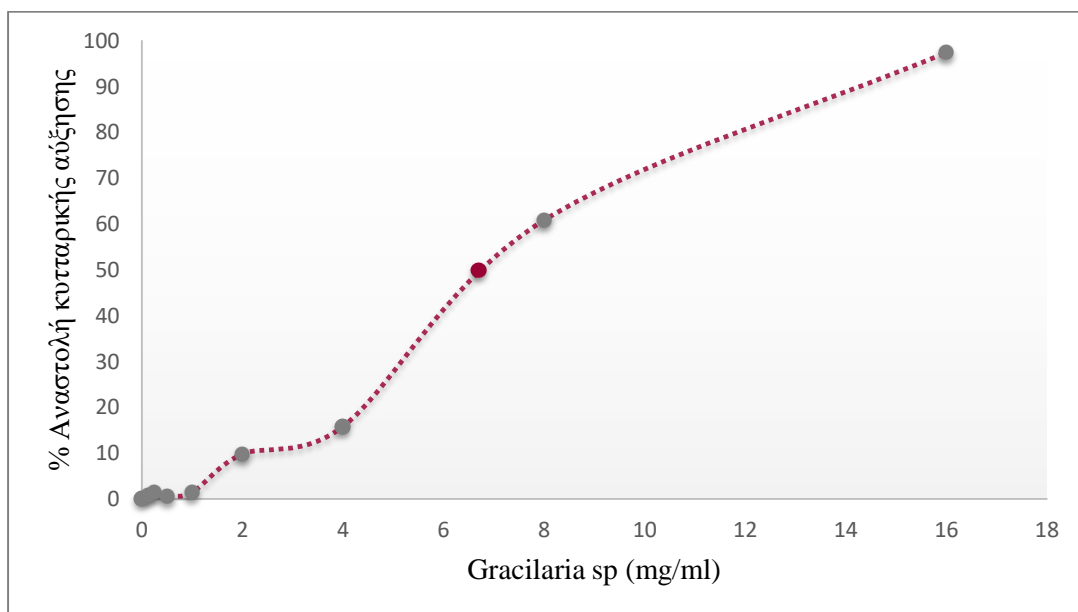


Διάγραμμα 10: Η % αναστολή βιωσιμότητας των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από το φύκος *Padina pavonica* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT.

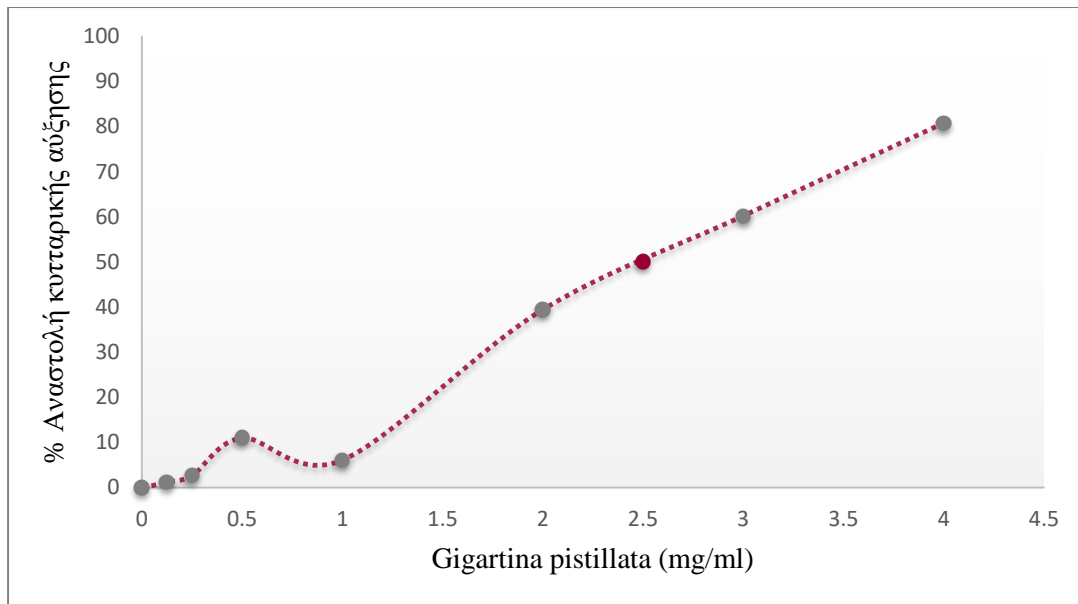




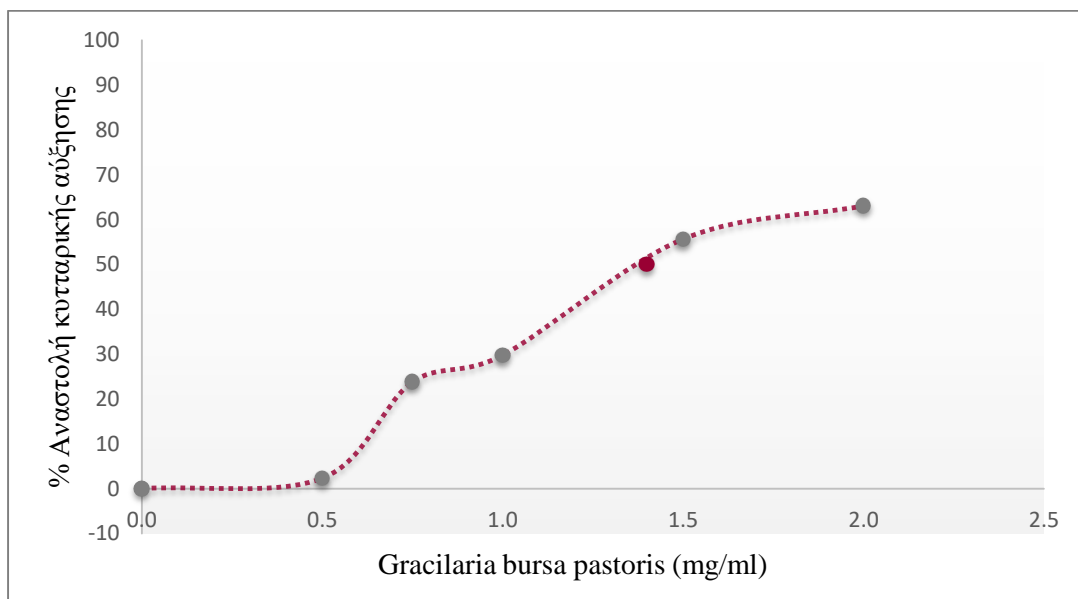
Διάγραμμα 11: Η % αναστολή βιωσιμότητας των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από το φύκος *Gigartina teedei* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ΧΤΤ.



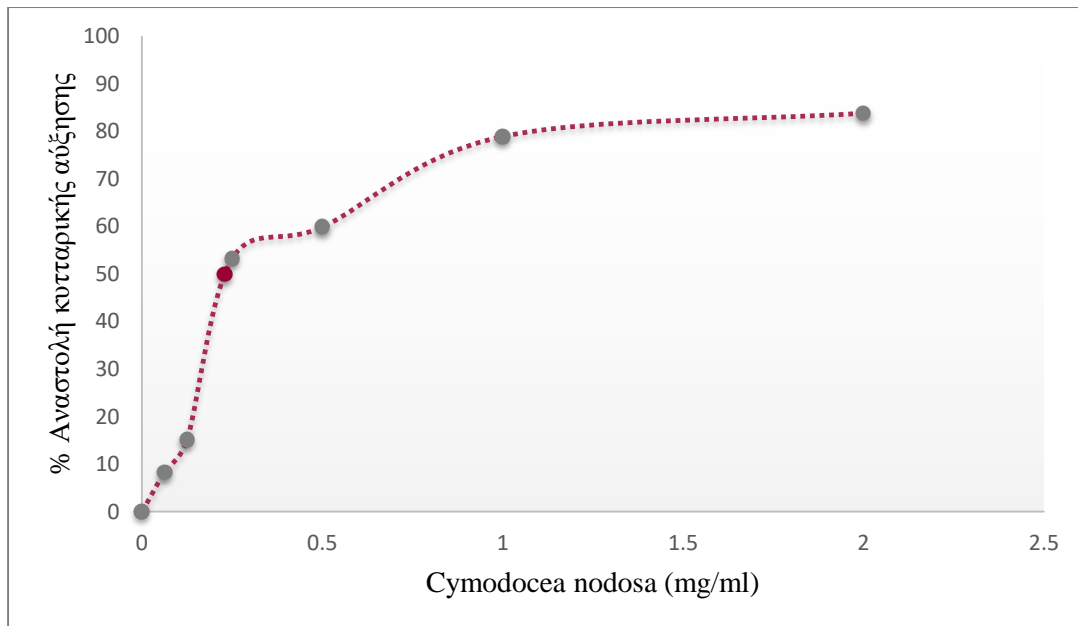
Διάγραμμα 12: Η % αναστολή βιωσιμότητας των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από το φύκος *Gracilaria sp* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ΧΤΤ.



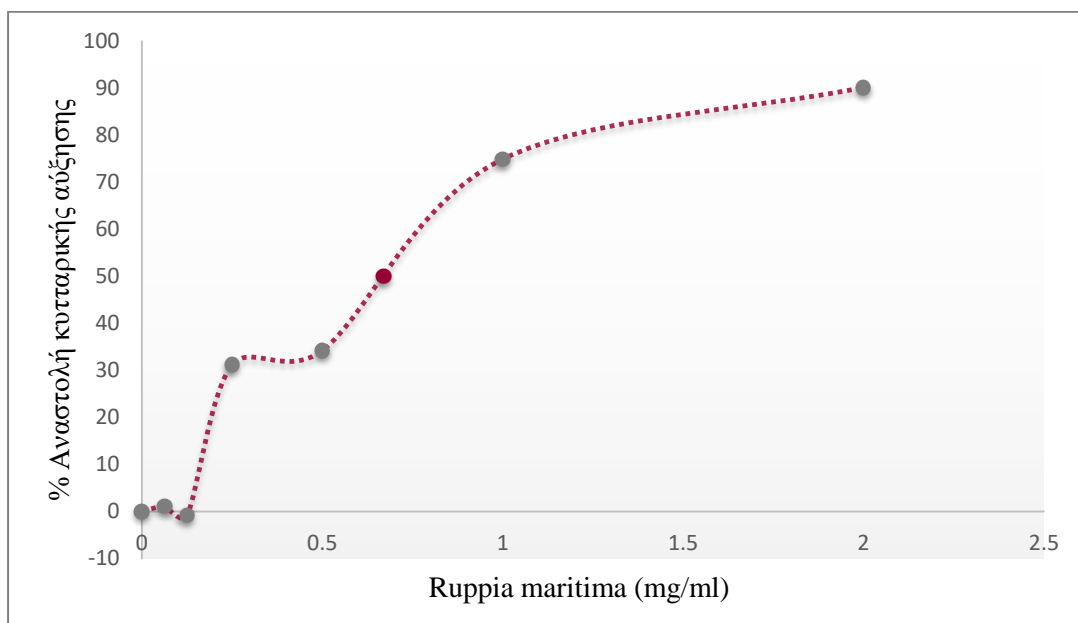
Διάγραμμα 13: Η % αναστολή βιωσιμότητας των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από το φύκος *Gigartina pistillata* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ΧΤΤ.



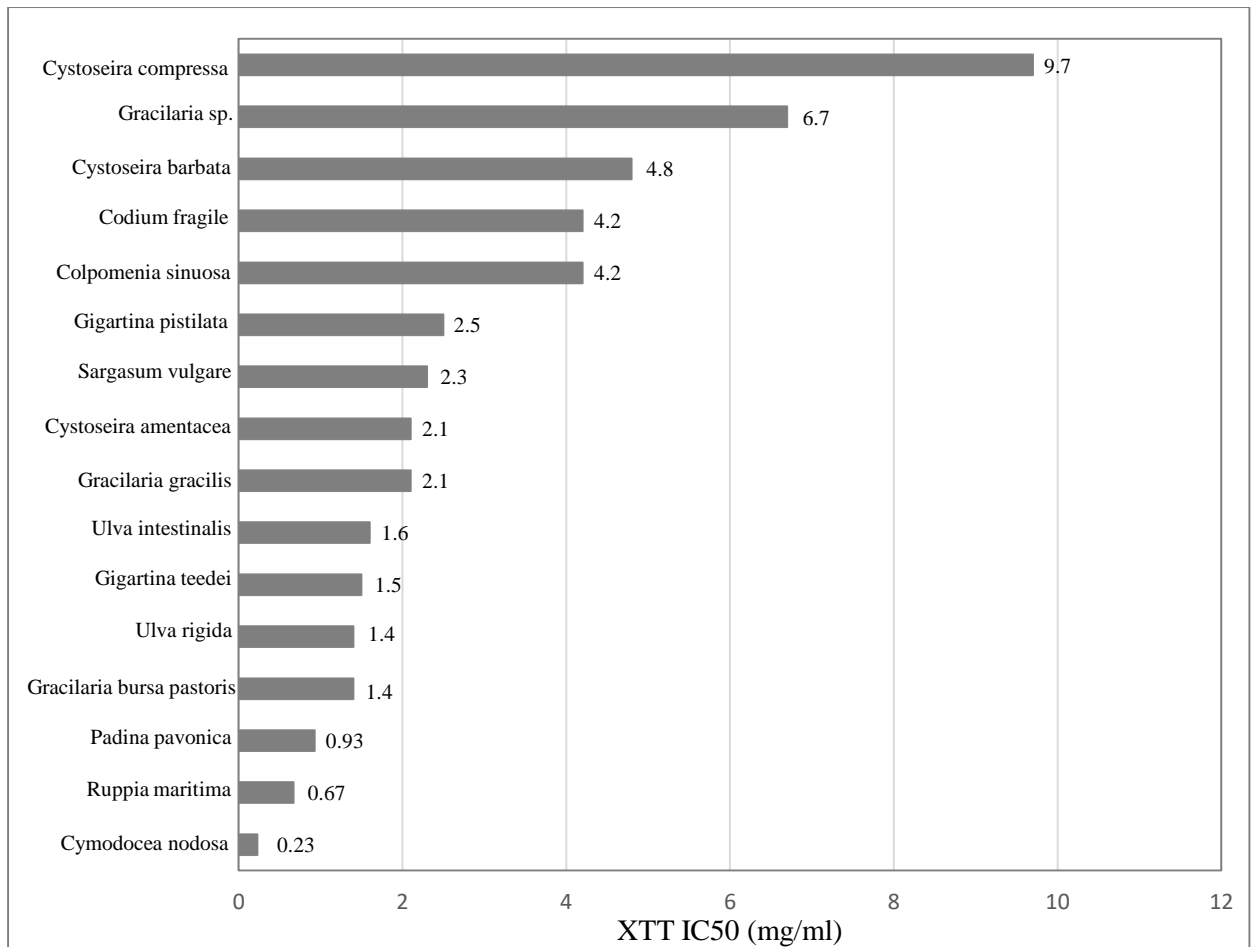
Διάγραμμα 14: Η % αναστολή βιωσιμότητας των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από το φύκος *Gracilaria bursa pastoris* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ΧΤΤ.



Διάγραμμα 15: Η % αναστολή βιωσιμότητας των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από το αγγειόσπερμο *Cymodocea nodosa* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ΧΤΤ.



Διάγραμμα 16: Η % αναστολή βιωσιμότητας των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από το αγγειόσπερμο *Ruppia maritima* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ΧΤΤ.



Διάγραμμα 17: Συγκενρωτικό διάγραμμα τιμών IC<sub>50</sub> της μεθόδου XTT για τον προσδιορισμό της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αύξηση των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2.

## 4. Συζήτηση

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις σοβαρότερες ασθένειες καθώς θεωρείται είτε η πρώτη, είτε η δεύτερη αιτία θανάτου στις περισσότερες χώρες παγκοσμίως (Sung et al., 2021). Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι καρκίνου, που διαφέρουν ως προς την πρόγνωση και την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Ο καρκίνος του ήπατος αποτελεί τον έκτο καρκίνο σε συχνότητα εμφάνισης και τον τρίτο σε θνησιμότητα παγκοσμίως (Sung et al., 2021). Το παράδοξο αυτής της διαφοράς βασίζεται στο γεγονός ότι οι περισσότεροι ασθενείς με καρκίνο του ήπατος δεν εμφανίζουν συμπτώματα στα αρχικά στάδια της νόσου. Αντιθέτως, εμφανίζουν συμπτώματα σε προχωρημένα στάδια, όταν πλέον ο καρκίνος είναι δύσκολα διαχειρίσιμος (Anwanwan and Singh, 2020). Έτσι λοιπόν, γίνεται αντιληπτό ότι η πρόληψη της ασθένειας έχει μεγαλύτερη σημασία από τη θεραπεία της. Ένας τρόπος πρόληψης του καρκίνου είναι με τη χημειοπροφύλαξη. Με τον όρο χημειοπροφύλαξη εννοούμε την διακοπή ή την αντιστροφή της καρκινογένεσης με την κατανάλωση φυσικών ή συνθετικών ουσιών (Stagos et al., 2012). Οι ουσίες, λοιπόν, που χρησιμοποιούνται για τη χημειοπροφύλαξη μπορεί να προέρχονται είτε από τη φύση, είτε να παράγονται στο εργαστήριο και να είναι συνθετικές. Όσον αφορά τον καρκίνο του ήπατος, οι χημειοπροφυλακτικές ουσίες παράγονται με σκοπό να στοχεύσουν στους παράγοντες εμφάνισης αυτού, όπως παραδείγματος χάριν είναι η μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας Β. Ένας τρόπος προφύλαξης από τον ιό είναι η χορήγηση εμβολίου. Όπως προαναφέρθηκε όμως, εκτός από συνθετικές ουσίες, υπάρχουν και οι φυσικές ουσίες χημειοπροφύλαξης.

Παράδειγμα φυσικών ουσιών με χημειοπροφυλακτική δράση αποτελούν οι βρωμοφαινόλες, οι οποίες προέρχονται από τα θαλάσσια φύκη. Παλαιότερες έρευνες έχουν βρει ότι οι βρωμοφαινόλες έχουν σημαντική αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση. Ωστόσο, εκτός από τις παραπάνω ιδιότητες είναι σημαντική και η αντικαρκινική τους δράση. Έτσι λοιπόν, με βάση τα όσα αναφέρθηκαν και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι ελληνικές θάλασσες διαθέτουν μεγάλη ποικιλία από θαλάσσια φύκη, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της επίδρασης εκχυλισμάτων, τα οποία προέρχονται από ελληνικά θαλάσσια φύκη και αγγειόσπερμα, στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2).

Στην παρούσα έρευνα εξετάστηκαν συνολικά 16 εκχυλίσματα. Τα 14 από αυτά προέρχονταν από θαλάσσια φύκη, ενώ τα 2 προέρχονταν από θαλάσσια αγγειόσπερμα. Όπως είδαμε και στα αποτελέσματα το εκχύλισμα με τη μεγαλύτερη αντικαρκινική δράση ήταν από το αγγειόσπερμο *Cymodocea nodosa*, με IC50 = 0,23 mg/ml. Ήταν αξιοσημείωτο ότι στην έρευνα των Kolsi et al. (2017) το ίδιο αγγειόσπερμο είχε σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα (IC50 = 1,22 mg/ml και 1,14 mg/ml στη μέθοδο DPPH και ABTS αντίστοιχα) που υποδηλώνει την ύπαρξη σε αυτό βιοδραστικών ουσιών. Είναι γνωστό ότι το οξειδωτικό στρες είναι ένας σημαντικός παράγοντας πρόκλησης καρκίνου (Saha et al., 2017) και είναι πιθανό ένας αντιοξειδωτικός παράγοντας να έχει και αντικαρκινική δράση. Επιπλέον, στη μελέτη των Kolsi et al. (2017) αναφέρθηκε ότι εκχύλισμα από το *Cymodocea nodosa* είχε και κυτταροτοξική δράση έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς του τραχήλου της μήτρας HeLa με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη η παρατηρούμενη δράση είχε αποδοθεί σε έναν θειικό πολυσακχαρίτη ο οποίος απομονώθηκε από το *Cymodocea nodosa*. Έτσι λοιπόν, επόμενο βήμα για το αγγειόσπερμο *Cymodocea nodosa* θα είναι να μελετηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί της αντικαρκινικής του δράσης και εάν αυτή οφείλεται στον πολυσακχαρίτη ή/και σε κάποιο άλλο συστατικό του.

Το δεύτερο εκχύλισμα με την καλύτερη αντικαρκινική δράση κατά σειρά ήταν το αγγειόσπερμο *Ruppia maritima* με IC50 = 0,67 mg/ml. Έχει βρεθεί ότι το συγκεκριμένο αγγειόσπερμο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε κιχωρικό οξύ και σε φλαβονοειδή (Enerstvedt et al., 2017). Έρευνες έχουν δείξει ότι τόσο το κιχωρικό οξύ, όσο και τα φλαβονοειδή έχουν ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες (Korustinskiene et al., 2020 & Jablonska – Trypuc et al., 2020). Έτσι λοιπόν, είναι πολύ πιθανόν η αντικαρκινική δράση του *Ruppia maritima* να οφείλεται σε αυτά τα συστατικά του.

Το τρίτο κατά σειρά εκχύλισμα, αλλά το πρώτο φύκος, με αντικαρκινικές ιδιότητες ήταν το *Padina pavonica* με IC50 = 0,93 mg/ml. Υπάρχουν και άλλες έρευνες, οι οποίες πιστοποιούν αυτά τα αποτελέσματα, όπως είναι η έρευνα των Al – Enazi et al. (2018), οι οποίοι βρήκαν ότι εκχύλισμα από το *Padina pavonica* ανέστειλε την αύξηση HepG2 κυττάρων με IC50 = 101 μg/ml. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε υπάρχει μία διαφορά στα αποτελέσματα του IC50. Αυτό, ίσως, μπορεί να δικαιολογηθεί λόγω των διαφορετικών μεθόδων κυτταροτοξικότητας που χρησιμοποιήθηκαν στις δύο έρευνες (MTT έναντι ΧΤΤ) και εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και ότι τα φύκη προέρχονταν από διαφορετικές περιοχές.



Είναι γνωστό ότι το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται ένα φύκος μπορεί να επηρεάσει τη χημική του σύσταση και άρα και τη βιοδραστικότητά του.

Το εκχύλισμα *Gracilaria bursa pastoris* ήταν το δεύτερο φύκος με την καλύτερη αντικαρκινική δραστηριότητα. Το IC<sub>50</sub> που προέκυψε από τα πειράματα ήταν ίσο με 1,4 mg/ml. Όπως και στην περίπτωση του *Cymodocea nodosa* έτσι και στο *Gracilaria bursa pastoris* υπάρχει έρευνα η οποία αναδεικνύει την αντιοξειδωτική του ικανότητα (Piao et al., 2014). Επομένως, και σε αυτή την περίπτωση φαίνεται να υπάρχουν βιοδραστικά συστατικά που μπορεί να έχουν ταυτόχρονα αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση.

Το *Ulva rigida* με IC<sub>50</sub> = 1,4 mg/ml ήταν το τρίτο ισχυρότερο φύκος όσον αφορά την αντικαρκινική δράση. Σύμφωνα με την έρευνα των Salem. et al. (2011), το ίδιο φύκος εμφάνισε αντικαρκινική δράση σε in vivo πείραμα όπου ελάττωσε την αύξηση όγκων σε ποντίκια.

Το *Ulva intestinalis* ήταν το πέμπτο πιο σημαντικό φύκος, όσον αφορά την αντικαρκινική του δράση. Το IC<sub>50</sub> το οποίο βρέθηκε από τα πειράματα ήταν 1,6 mg/ml. Η ύπαρξη αντικαρκινικής δράσης αυτού του φύκου επιβεβαιώνεται και από τη μελέτη των Nazarudin et al., (2020) οι οποίοι βρήκαν IC<sub>50</sub> ίσο με 23 μg/ml, όταν αυτό εκχύλισμά του εξετάστηκε στην καρκινική κυτταρική σειρά HepG2. Το IC<sub>50</sub> της δικής μας μελέτης ήταν πολύ μικρότερο σε σχέση με αυτό που βρέθηκε στη μελέτη των Nazarudin et al., (2020). Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται τόσο στη διαφορετική μέθοδο εξέτασης της κυτταροτοξικότητας (MTT έναντι ΧΤΤ), όσο και στη διαφορετική περιοχή συλλογής του φύκου (Μαλαισία έναντι Ελλάδας) ή στη διαφορετική μέθοδο παρασκευής του εκχυλίσματος.

Για το φύκος *Codium fragile* το IC<sub>50</sub> βρέθηκε ίσο με 4,2 mg/ml. Επίσης, στη μελέτη των Wang et al., (2021), εξετάστηκε η αντικαρκινική δράση ενός πολυσακχαρίτη που απομονώθηκε από το συγκεκριμένο φύκος και βρήκαν ότι ανέστειλε την ανάπτυξη καρκινικών όγκων πνεύμονα σε ποντίκια.

Επιπλέον, στο φύκος *Colpomenia sinuosa* βρέθηκε IC<sub>50</sub> ίσο με 4,2 mg/ml. Επίσης, γι' αυτό το φύκος έχει βρεθεί αντικαρκινική δράση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του τραχήλου της μήτρας (Hela), καρκίνου του μαστού (MCF-7) και του παχέος εντέρου (HCT – 116 και HT – 29). Από τις αναφερόμενες κυτταρικές σειρές το μικρότερο IC<sub>50</sub> βρέθηκε για την σειρά HCT – 116 και ήταν ίσο με 42,57 μg/ml (Monla

et al., 2020). Μάλιστα, σε μία άλλη έρευνα των Monla et al., (2022), βρέθηκε ότι εκχύλισμα (διαφορετικό από της προηγούμενης μελέτης τους) από το συγκεκριμένο φύκος προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο στην καρκινική κυτταρική σειρά παχέος εντέρου HCT – 116 με IC50 ίσο με 618,9 μg/ml. Είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι στην συγκεκριμένη έρευνα παρατήρησαν αύξηση της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στα κύτταρα HCT – 116 όταν αυτά επωάζονταν με το εκχύλισμα του φύκους. Έτσι, συμπεραίνουν, ότι το φύκος ίσως μπορεί να προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω οξειδωτικού στρες.

Επίσης, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν είδη φυκών που ανήκαν στο ίδιο γένος. Τέτοια παραδείγματα είναι το *Ulva rigida* (IC50 = 1,4 mg/ml) με το *Ulva intestinalis* (IC50 = 1,6 mg/ml) τα οποία είχαν παραπλήσιες τιμές IC50 που υποδηλώνει ότι ίσως οι ίδιες βιοδραστικές ουσίες των δύο φυκών ήταν υπεύθυνες για την παρατηρούμενη δράση. Επίσης, στο ίδιο γένος ανήκαν το *Cystoseira compressa* (IC50 = 9,7 mg/ml) με το *Cystoseira barbata* (IC50 = 4,8 mg/ml) και το *Cystoseira amentacea* (IC50 = 2,1 mg/ml) τα οποία όμως παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στις τιμές IC50. Από το γένος *Gracilaria* εξετάστηκαν το *Gracilaria gracilis* με IC50 = 2,1 mg/ml και το *Gracilaria bursa pastoris* με IC50 = 1,4 mg/ml. Τέλος, το *Gigartina pistillata* (IC50 = 2,5 mg/ml) εμφάνισε μικρότερη δράση κατά 1,6 φορές από το *Gigartina teedei* (IC50 = 1,5 mg/ml). Δεν γνωρίζουμε τους λόγους που ενώ ίδια φύκη ανήκαν στο ίδιο γένος διέφεραν ως προς την τιμή IC50, οπότε απαιτείται περαιτέρω έρευνα.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη για πρώτη φορά εξετάστηκαν για αντικαρκινική δράση έναντι του καρκίνου του ήπατος, εκχυλίσματα από τα είδη φυκών *Gracilaria gracilis*, *Gracilaria sp.*, *Gracilaria bursa pastoris*, *Ulva rigida*, *Codium fragile*, *Colpomenia sinuosa*, *Cystoseira amentacea*, *Cystoseira barbata*, *Cystoseira compressa*, *Sargasum vulgare*, *Gigartina teedei*, και *Gigartina pistillata* και των αγγειόσπερμων *Ruppia maritima* και *Cymodocea nodosa*. Ωστόσο, χρειάζονται περαιτέρω έρευνες με σκοπό να διασαφηνιστούν τα συστατικά, τα οποία προσδίδουν στα εκχυλίσματα την αντικαρκινική δράση, καθώς και να γίνουν γνωστοί οι μοριακοί μηχανισμοί αυτής της δράσης. Τα αποτελέσματα ωστόσο είναι ενθαρρυντικά και είναι δυνατό να προκύψει στο μέλλον κάποιο σκεύασμα από τα παραπάνω είδη φυκών και αγγειοσπέρμων το οποίο θα πληροί τα κριτήρια ενός χημειοπροφυλακτικού παράγοντα.

## 5. Βιβλιογραφία

### 5.1. Ελληνική Βιβλιογραφία

- Κωνσταντίνου. Α., (2008). Περγαμηνή. Λευκωσία: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κύπρου.
- Μπονόβας. Α. Σ., (2007). Χημειοπροφύλαξη στον καρκίνο: Μετα – ανάλυση κλινικών δοκιμών και επιδημιολογικών μελετών παρατήρησης. (Διδακτορική Διατριβή). Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

### 5.2. Ξένη Βιβλιογραφία

- Cooper. G. M. (2000). The Cell, A molecular approach, 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Sung. H., et al., (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3): 209-249.
- Bray. F., et al., (2021). The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*, 127(16): 3029-3030.
- Roomi. W. M., et al., (2015). Modulation of uPA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in human colorectal, pancreatic and hepatic carcinoma cell lines. *International Journal of Oncology*, 47(1): 370-376.
- Torry. D. and Cooper. G. M., (1991). Proto-Oncogenes in Development and Cancer. *American Journal of Reproductive Immunology*, 25(3): 129-132.
- Kontomanolis. E. N., et al., (2020). Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Research*, 40: 6009-6015.
- Roomi. W. M., et al., (2016). Vitamin C in Health: Scientific focus on its anti-cancer efficacy. *Cellular Medicine and Natural Health*.
- Calabrese. E. J., et al., (2021). Thresholds for carcinogens. *Chemico-Biological Interactions*, 341.
- Martincorena. I and Campbell. P. J., (2016). Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*, 349(6255): 1483-1489.
- Ananthakrishnan. A., Gogineni. V. and Saiean. K., (2006). Epidemiology of Primary and Secondary Liver Cancers. *Interventional Radiology*, 23(1): 47-63.

- Watson. J., Hydon. K. and Lodge. P., (2016). Primary and secondary liver tumours. *Sage Journals*, 9(8): 477-482.
- Kalra. A., et al., (2021). Physiology, Liver. *StatPearls*.
- Kleinman. E. R., et al., (2018). Walker's Pediatric Gastrointestinal Disease: Physiology, Diagnosis, Management. *PMPH USA*.
- Lee. P. H. Y. E. and Muller. J. W., (2010). Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(10).
- Sia. D., et al., (2017). Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology*, 152: 745-761.
- Chapman. R. W., (1999). Risk factors for biliary tract carcinogenesis. *Annals of Oncology*, 10: 308-311.
- Anwanwan. D., et al., (2020). Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochimica et Biophysica Acta – Reviews on Cancer*, 1873(1): 188314.
- Wang. X., Wang. Q., (2018). Alpha-Fetoprotein and Hepatocellular Carcinoma Immunity. *Gastroenterology and Hepatology*.
- Vogel. A., et al., (2018). Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up. *Annals of Oncology*, 29(4): 238-255.
- Villanueva. A. M. D., (2019). Hepatocellular Carcinoma. *The new England Journal of Medicine*, 380: 1450-1462.
- Donato. T. M., Tolosa. L. and Gomez-Lechon. J. M., (2015). Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods in Molecular Biology*, 1250: 77-93.
- Donato. T. M., Jover. R. and Gomez-Lechon. J. M., (2013). Hepatic cell lines for drug hepatotoxicity testing: limitations and strategies to upgrade their metabolic competence by gene engineering. *Current Drug Metabolism*, 14(9): 946-968.
- Fearn. A. R. and Hirst. H. B., (2006). Predicting oral drug absorption and hepatobiliary clearance: Human intestinal and hepatic in vitro cell models. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21(2): 168-178.
- Pruthi. S., Heisey. E. R. and Bevers. B. T., (2015). Chemoprevention for Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 22(10): 3230-3235.

- Ko. Y. E. and Moon. A., (2015). Natural Products for Chemoprevention of Breast Cancer. *Journal of Cancer Prevention*, 20(4): 223-231.
- Povenda. M. B., et al., (2019). The Mediterranean Diet, a Rich Source of Angiopreventive Compounds in Cancer. *Nutrients*, 11(9): 2036.
- Lee. W. K., et al., (2003). Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(6): 1074-1078.
- Surjana. D., Halliday. M. G. and Damian. L. D., (2010). Role of Nicotinamide in DNA Damage, Mutagenesis, and DNA Repair. *Journal of Nucleic Acids*.
- Jia. S. S., et al., (2012). Induction of apoptosis by D-limonene is mediated by inactivation of Akt in LS174T human colon cancer cells. *Oncology Reports*, :349-354.
- Chang. H. M., (2011). Hepatitis B virus and cancer prevention. *Recent results in cancer research*, 188: 75-84.
- Testino. G. and Borro. P., (2013). Chemoprevention of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus related cirrhosis. *World Journal of Hepatology*, 5(10): 521-527.
- Magnussen. A. and Parsi. A. M., (2013). Aflatoxins, hepatocellular carcinoma and public health. *World Journal of Gastroenterology*, 19(10): 1508-1512.
- Egner. A. P., Munoz. A. and Kensler. W. T., (2003). Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523-524: 209-216.
- Stagos. D., et al., (2012). Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. *Food and Chemican Toxicology*, 50(6): 2155-2170.
- El Moneim Hussein. A. N, et al., (2014). Protective and therapeutic effects of cannabis plant extract on liver cancer induced by dimethylnitrosamine in mice. *Alexandria Journal of Medicine*, 50(3): 241-251.
- Liu. M., Hansen. E. P. and Lin. X., (2011). Bromophenols in Marine Algae and Their Bioactivities. *Marine Drugs*, 9(7): 1273-1292.
- Dong. H., et al., (2020). Progress of Bromophenols in Marine Algae from 2011 to 2020: Structure, Bioactivities, and Applications. *Marine Drugs*, 18(8): 411.

- Shoeib. N., et al., (2004). In-vitro Cytotoxic Activities of the Major Bromophenols of the Red Alga *Polysiphonia lanosa* and Some Novel Synthetic Isomers. *Journal of Natural Products*, 67(9): 1445-1449.
- Schottenfeld, J. F. (2006). *Cancer Epidemiology and Prevention*. New York: Oxford University Press.
- Katsui. N., et al., (1967). 5,6-dibromoprotocatechualdehyde and 2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether: New dibromophenols from *rhodomela larix*. *Tetrahedron*, 23(3): 1185-1188.
- Sun. H. H., et al., (1983). Avrainvilleol, a brominated diphenylmethane derivative with feeding deterrent properties from the tropical green alga *avrainvillea longicaulis*. *Phytochemistry*, 22(3): 743-745.
- Chung. Y. H., et al., (2003). Seasonal Variations of Bromophenols in Brown Algae (*Padina arborescens*, *Sargassum siliquastrum*, and *Lobophora variegata*) Collected in Hong Kong. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9): 2619-2624.
- Duan. J. X., et al., (2007). Highly brominated mono- and bis-phenols from the marine red alga *Symphyclocladia latiuscula* with radical-scavenging activity. *Journal of natural products*, 70(7): 1210-1213.
- Shi D., et al., (2009). The antitumor effect of bromophenol derivatives in vitro and *Leathesia nana* extract in vivo. *Chemistry*, 27: 277-282.
- Lijun. H., et al., (2005). Isolation and pharmacological activities of bromophenols from *Rhodomela confervoides*. *Chemistry*, 23: 226-229.
- Liu. H., et al., (2004). Isolation and Characterization of Polybrominated Diphenyl Ethers as Inhibitors of Microtubule Assembly from the Marine Sponge *Phyllospongia dendyi* Collected at Palau. *Journal of natural products*, 67(3): 472-474.
- Lindsay. S. B., et al., (1998). Isolation of 2-(3'-Bromo-4'-hydroxyphenyl)ethanamine from the New Zealand Ascidian *Cnemidocarpa bicornuta*. *Journal of natural products*, 61(6): 857-858.
- Jarald. E., et al., (2008). Diabetes And Herbal Medicines. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 7(1): 97-106.



- Ji. K., et al., (2011). Genotoxicity of Several Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and Hydroxylated PBDEs, and Their Mechanisms of Toxicity. *Environmental Science and Technology*, 45(11): 5003-5008.
- A de Wit. C., (2002). An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere*, 46(5): 583-624.
- Berridge. V. M., et al., (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11: 127-152.
- Saha. K. S., et al., (2017). Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7): 1544.
- Kolsi A. B. R., et al., (2017). In vitro biological properties and health benefits of a novel sulfated polysaccharide isolated from *Cymodocea nodosa*. *Lipids in Health and Disease*, 16(1): 252.
- Kopustinskiene. M. D., et al., (2020). Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*, 12(2): 457.
- Trypuc – Jablonska. A., et al., (2020). Biological Activity of New Cichoric Acid–Metal Complexes in Bacterial Strains, Yeast-Like Fungi, and Human Cell Cultures In Vitro. *Nutrients*, 12(1): 154.
- Enerstvedt. K. K., et al., (2018). Characterization of Polyphenolic Content in the Aquatic Plants *Ruppia cirrhosa* and *Ruppia maritima* —A Source of Nutritional Natural Products. *Molecules*, 23(1): 16.
- Piao. J. M., et al., (2014). *Gracilaria bursa-pastoris* (Gmelin) Silva Extract Attenuates Ultraviolet B Radiation–Induced Oxidative Stress in Human Keratinocytes. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 33(1): 33-43.
- Nazarudin. F. M., et al., (2020). Chemical Composition and Evaluation of the  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory and Cytotoxic Properties of Marine Algae *Ulva intestinalis*, *Halimeda macroloba*, and *Sargassum ilicifolium*. *Evidence – based complementary and alternative medicine*.
- Salem. A. T. and Ibrahim. M. A., (2011). Anticancer activity of Egyptian marine alga *Ulva rigida*. *International Journal of Health Sciences*, 5: 6-8.

- Al- Enazi. M. N., et al., (2018). Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of *Laurencia catarinensis*, *Laurencia majuscula* and *Padina pavonica* extracts. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26: 44-52.
- Monla. A. R., et al., (2022). Fucoidan and Alginate from the Brown Algae *Colpomenia sinuosa* and Their Combination with Vitamin C Trigger Apoptosis in Colon Cancer. *Molecules*, 27(2): 358.
- Monla. A. R., et al., (2020). The Cytotoxic and Apoptotic Effects of the Brown Algae *Colpomenia sinuosa* are Mediated by the Generation of Reactive Oxygen Species. *Molecules*, 25(8): 1993.
- Wang. Y., et al., (2021). Intranasal Administration of *Codium fragile* Polysaccharide Elicits Anti-Cancer Immunity against Lewis Lung Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19): 10608.
- <https://www.algaebase.org/>
- <https://www.what-are-algae.com/>
- <https://www.lenntech.com/eutrophication-water-bodies/algae.htm>