ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΖΕΥΓΑΡΑ ΜΑΡΙΑΝΘΗ

Λάρισα 2022

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΦΥΚΗ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΣΠΕΡΜΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ.

DETERMINATION OF THE EFFECT OF EXTRACTS FROM GREEK MARINE ALGAE SPECIES AND ANGIOSPERMS ON THE GROWTH OF INTESTINAL CANCER CELLS

Το παρόν τεύχος αποτελεί τη διπλωματική διατριβή της σπουδάστριας Μαριάνθης Ζευγαρά, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού κύκλου σπουδών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων): Επίκουρος καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστήμιου Θεσσαλίας.

Ψαρρά Άννα-Μαρία: Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Γιακουντής Αντώνιος: Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Στους γονείς μου που με

ενθάρρυναν και πίστεψαν σε εμένα.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την περάτωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Δημήτριο Στάγκο, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστήμιου Θεσσαλίας, πρωτίστως για την ευκαιρία που μου έδωσε για να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, με την καθοδήγηση και τη βοήθεια του, κατά την εκπόνηση της μελέτης, καθώς και την άριστη συνεργασία προσφέροντας μου νέες και πολύτιμες γνώσεις.

Επίσης, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Άννα-Μαρία Ψαρρά και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αντώνιο Γιακουντή για τις διορθώσεις και τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή.

Θέλω να ευχαριστήσω επίσης τη φοιτήτρια Σοφία Μπάρδα για την άριστη συνεργασία κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα την οικογένεια μου, κυρίως τους γονείς μου Νικόλαο και Ξανθή που είναι πάντα κοντά μου, σε όλη τη διάρκεια της ζωής μου και μου προσφέρουν άπλετη αγάπη, κατανόηση, την αμέριστη ηθική συμπαράσταση, εμψύχωση, υπομονή, παρότρυνση και στήριξη σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου σε οτιδήποτε και αν επιχειρώ. Χωρίς την παραίνεση των οποίων δεν θα είχα επιχειρήσει αυτή τη δύσκολη και ενδιαφέρουσα προσπάθεια

Θα ήταν αγνωμοσύνη να μην ευχαριστήσω τον σύντροφο μου Αλέξανδρο για τη συνεχή ενθάρρυνση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΕΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ LS174 ΑΠΟ ΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΩ ΦΥΚΗ ΜΕ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ XXT.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η επίδραση εκχυλισμάτων των θαλάσσιων φυκιών *Gracilaria gracilis*, *Gracilaria sp*., *Gracilaria bursa pastoris*, *Ulva rigida*, *Ulva intestinalis*, *Codium fragile*, *Colpomenia sinuosa*, Cystoseira amentacea, *Cystoseira barbata*, *Cystoseira compressa*, *Padina pavonica*, *Sargasum vulgare*, *Gigartina teedei* και *Gigartina pistillata* και των αγγειόσπερμων *Ruppia maritima* και *Cymodocea nodosa* στην αύξηση καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου LS174. Η επίδραση στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων εξετάστηκε με τη μέθοδο XXT. Για κάθε εκχύλισμα έγιναν διαγράμματα της % αναστολής της κυτταρικής αύξησης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος, από τα οποία στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι τιμές IC_{50}, δηλαδή η συγκέντρωση όπου το εκχύλισμα αναστέλλει κατά 50% την κυτταρική αύξηση. Όσο πιο μικρή τιμή έχει το IC_{50}, τόσο πιο ισχυρή η δράση του εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα εκχυλίσματα μπορούσαν να αναστείλουν την αύξηση των καρκινικών κυττάρων με τιμές του IC_{50} που κυμαίνονταν από 0,83mg/m-5,6 mg/mL. Δηλαδή, το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν του αγγειόσπερμου *Cymodocea nodosa* και το πιο ασθενές του φύκους *Gracilaria sp*.

Από τα φύκη τα 5 πιο δραστικά εκχυλίσματα με τη μικρότερη τιμή IC_{50} ήταν τα *Ulva intestinalis* (IC_{50}:1,25mg/mL), *Gracilaria bursa pastoris* (IC_{50}:1,3mg/mL), *Gigartina teedei* (IC_{50}:1,35mg/mL) και *Padina pavonica* (IC_{50}:1,4mg/mL) και Ulva rigida (IC_{50}:2,2mg/mL). Μεταξύ των τριών ειδών του γένους Gracilaria υπήρχε μεγάλη διαφορά ανάμεσα στη δράση του πιο ισχυρού με το πιο ασθενές που έφτανε τις 4,3 φορές. Συγκεκριμένα η σειρά δραστικότητά τους ήταν: *Gracilaria bursa pastoris* (IC_{50}:1,3mg/mL)>*Gracilaria gracilis* (IC_{50}:2,3mg/mL)>*Gracilaria sp*. (IC_{50}:5,6mg/mL). Μεταξύ των ειδών του γένους Ulva, πιο δραστικό (όπως και μεταξύ όλων των φυκών) ήταν το *Ulva intestinalis* (IC_{50}:1,25mg/mL) από το *Ulva rigida* (IC_{50}:2,2mg/mL). Από τα δύο είδη του γένους Gigartina, πιο δραστικό ήταν το *Gigartina teedei* (IC_{50}:1,35mg/mL) από το *Gigartina pistillata* (IC_{50}:2,2mg/mL). Ενώ στα τρία είδη του γένους Cystoseira η σειρά δραστικότητας ήταν *Cystoseira amentacea* (IC_{50}: 3,1mg/mL)>*Cystoseira compressa* (IC_{50}:5,2mg/mL) = *Cystoseira barbata* (IC_{50}:5,3mg/mL).

Όσον αφορά τη δραστικότητα των δύο αγγειόσπερμων, όπως αναφέρθηκε το *Cymodocea nodosa* έδειξε την πιο ισχυρή μεταξύ όλων των εξετασθέντων εκχυλισμάτων, ενώ και το εκχύλισμα του *Ruppia maritima* είχε την 6^{η} πιο ισχυρή δράση μεταξύ όλων των εκχυλισμάτων με τιμή IC_{50}: 1,7 mg/mL.

Λέξεις κλειδιά: Φύκη, Καρκίνος παχέος εντέρου, Βρωμοφαινόλες, καρκινική κυτταρική σειρά LS174, Αγγειόσπερμα, εκχυλίσματα

ABSTRACT

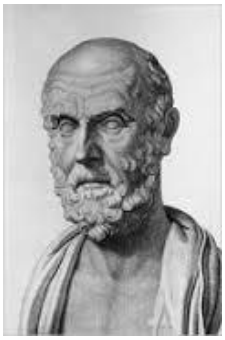
The aim of the present study was the effect of extracts of the macroalgae species *Gracilaria gracilis, Gracilaria sp., Gracilaria bursa pastoris, Ulva rigida, Ulva intestinalis, Codium fragile, Colpomenia sinuosa, Cystoseira amentacea, Cystoseira barbata, Cystoseira compressa, Padina pavonica, Sargasum vulgare, Cystoseira teedei,* and *Gigartina pistillata* and the angiosperms *Ruppia maritima* and *Cymodocea nodosa* on LS174 colon cancer cell growth. The effect on the growth of cancer cells was examined by the XXT assay. For each extract, diagrams of the percentage inhibition of cell growth as a function of the concentration of the extract were plotted, from which the IC50 values were calculated, that is, the extract's concentration inhibited cell growth by 50%. The lower the value of IC50, the stronger the effect of the extract.

The results showed that all extracts inhibited the growth of cancer cells with IC50 values ranging from 0.83 to 5.6 mg/mL. That is, the most potent extract was the angiosperm *Cymodocea nodosa* and the weakest the extract from the alga *Gracilaria sp.*

From the algae, the 5 most potent extracts with the lowest IC50 value were *Ulva intestinalis* (IC50: 1.25 mg/mL), *Gracilaria bursa pastoris* (IC50: 1.3 mg/mL), *Gigartina teedei* (IC50: 1.35 mg/mL) and *Padina pavonica* (IC50: 1.4 mg/mL) and *Ulva rigida* (IC50: 2.2 mg/mL). Between the three species of the genus Gracilaria, there was a big difference between the activity of the strongest and the weakest, that reached 4.3-fold times. Specifically, their order of activity was: *Gracilaria bursa pastoris* (IC50: 1.3 mg / mL)>*Gracilaria gracilis* (IC50: 2.3 mg / mL)>*Gracilaria sp*. (IC50: 5.6 mg / mL). Among the species of the genus Ulva, the most potent (as among all algae species) was *Ulva intestinalis* (IC50: 1.25 mg / mL) than *Ulva rigida* (IC50: 2.2 mg / mL). Of the two species of the genus Gigartina, *Gigartina teedei* (IC50: 1.35 mg / mL) was more potent than *Gigartina pistillata* (IC50: 2.2 mg / mL). While in the three species of the genus Cystoseira the order of activity was *Cystoseira amentacea* (IC50: 3.1 mg / mL)>*Cystoseira compressa* (IC50: 5.2 mg / mL) = *Cystoseira barbata* (IC50: 5.3 mg / mL).

Regarding the activity of the two angiosperms, as mentioned *Cymodocea nodosa* showed the strongest among all the examined extracts, while the extract of *Ruppia maritima* had the 6th strongest activity among all the extracts with IC50 value of 1.7 mg/mL.

Keywords: algae, colon cancer, bromophenols, LS174 cancer cell line, angiosperms, extracts.



«Η τροφή μπορεί να είναι φάρμακο για τον άνθρωπο και το φάρμακο μπορεί να αναζητηθεί στην τροφή»

Ιπποκράτης, 460-377 π.χ.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Προέλευση της λέξης Καρκίνος, αποδίδεται στον Έλληνα ιατρό Ιπποκράτη, που έμεινε στην ιστορία ως «πατέρας της ιατρικής». Ο Ιπποκράτης χρησιμοποίησε τους όρους «καρκίνος» και «καρκίνωμα» για να περιγράψει διάφορους όγκους που εμφάνιζαν εσωτερικά ή εξωτερικά έλκη και διογκώσεις.

Το κύτταρο πρέπει να διαιρείται όταν χρειάζονται νέα κύτταρα αυτού του είδους και να σταματά να διαιρείται όταν δεν χρειάζονται. Ωστόσο όταν ένα κύτταρο υποστεί μια γενετική τροποποίηση που του επιτρέπει να επιβιώνει και να διαιρείται, ενώ δεν θα έπρεπε, θα συμβεί μια δυνητικά καταστροφική απώλεια του ελέγχου του ιστού και συνεπώς ολόκληρου του οργανισμού, μπορεί να διαταραχθεί από έναν συνεχώς αυξανόμενο κλώνο ανώμαλων κυττάρων. Στην περίπτωση που χαρακτηρίζεται ως καλοήθης συνήθως μπορεί να αφαιρεθεί με χειρουργική επέμβαση. Ένας όγκος είναι καρκινικός μόνο αν τα κύτταρα του έχουν την ικανότητα να διεισδύουν στους περιβάλλοντες ιστούς. Στην περίπτωση που χαρακτηριστεί ως κακοήθης, τα κακοήθη καρκινικά κύτταρα με τη διεισδυτική ικανότητα μπορεί να εγκαταλείψουν τον πρωτοπαθή όγκο, να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος ή στα λεμφαγγεία και να σχηματίσουν δευτεροπαθείς όγκους, ή αλλιώς μεταστάσεις, σε άλλες θέσεις του σώματος. Για να μετατραπεί ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό χρειάζονται περισσότερες από μία μεταλλάξεις. (Alberts B. et. al., 2006)

1.2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες θνησιμότητας στον σύγχρονο κόσμο. Βρίσκεται στην τρίτη θέση μετά τον καρκίνο του πνεύμονα στους άντρες και τον καρκίνο του μαστού στις γυναίκες. Στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό αποτελεί σήμερα τη δεύτερη, κατά συχνότητα, ομάδα αιτιών θανάτου ηλικίας 35-64 ετών. 137.000 άνθρωποι ετησίως προσβάλλονται από τον καρκίνο του παχέος εντέρου και οι περισσότεροι μπορούν να χειρουργηθούν, όμως το 50% θα υποτροπιάσει. Όσον αφορά τη χώρα μας, ανησυχία προκαλεί το γεγονός ότι μεγάλος αριθμός Ελλήνων ηλικίας άνω των 45 ετών έχουν πολύποδα στο παχύ έντερο, η ύπαρξη του οποίου, όπως είναι γνωστό, ευθύνεται για το 90% των περιπτώσεων της νόσου. Κατά κανόνα η θεραπευτική αντιμετώπιση είναι χειρουργική. Ορισμένες φορές η χειρουργική θεραπεία συνδυάζεται ή ακολουθείται από χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία. (Ασανάκη και συν., 2008)

1.3. ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Το παχύ έντερο αποτελείται από 4 τμήματα: το ανιόν, το εγκάρσιο, το κατιόν και το σιγμοειδές. Ο καρκίνος μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιοδήποτε από τα τέσσερα

τμήματα του εντέρου και μπορεί να έχει διαφορετικά συμπτώματα ανάλογα με τον εντοπισμό του. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου φαίνεται ότι αναπτύσσεται επί μακρό χρονικό διάστημα. Σήμερα γνωρίζουμε ότι οι περισσότεροι καρκίνοι του παχέος εντέρου ξεκινούν σαν πολύποδες, που είναι γνωστοί και σαν αδενώματα. Με τα χρόνια μπορεί να εξελιχθούν σε καρκίνο. Τα κύτταρα από τον όγκο μπορούν να κυκλοφορήσουν με την κυκλοφορία του αίματος ή του λεμφικού συστήματος σε άλλα σημεία του σώματος. Εκεί μπορούν να δημιουργήσουν αποικιακούς όγκους, οι οποίοι ονομάζονται μεταστάσεις. (Σάμπαλης Γ., 2012)

1.4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ο τρίτος πιο συχνά απαντώμενος καρκίνος σε άντρες και γυναίκες. (Δοξάκης και συν., 2010)

Μπορεί η θνησιμότητα από τον καρκίνο του παχέος εντέρου να πέφτει διαρκώς τα τελευταία 20 χρόνια. Αυτό όμως οφείλεται στο ότι τα νέα περιστατικά είναι λιγότερα, διαγιγνώσκονται νωρίτερα και οι θεραπείες έχουν βελτιωθεί κατά πολύ. Η 5-ετής επιβίωση είναι 90% για τους ασθενείς που ο καρκίνος τους εντοπίζεται και αντιμετωπίζεται σε αρχικά στάδια πριν να εξαπλωθεί, όμως μόνο περίπου το 40% του καρκίνου του παχέος εντέρου εντοπίζεται σε αρχικά στάδια. Για αυτό είναι πολύ σημαντικό να γίνεται έγκαιρη διάγνωση. (Σάμπαλης Γ., 2012)

Κύριο επιδημιολογικό χαρακτηριστικό της νόσου αποτελεί η ευρεία διακύμανση της επίπτωσης της μεταξύ των διαφόρων χωρών, που εκτείνεται από 3,4-35,8 περιπτώσεις ανά 100.000 σε πληθυσμό. Η μέση επίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου παγκοσμίως είναι 16,6 περιπτώσεις ανά 100.000 σε πληθυσμό για τους άντρες και 14,7 περιπτώσεις ανά 100.000 σε πληθυσμό για τις γυναίκες. Η Ελλάδα καταλαμβάνει τη χαμηλότερη θέση στην επίπτωση και θνησιμότητα του καρκίνου του παχέος εντέρου ανάμεσα στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης: η επίπτωση ανέρχεται σε 15,2 και η θνησιμότητα σε 8,4 περιπτώσεις ανά 100.000 σε πληθυσμό.

Η επίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου στους άντρες και στις γυναίκες ποικίλει στις διάφορες χώρες. Στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι ίδια και για τα δύο φύλα, ενώ στις περισσότερες χώρες, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας, είναι μεγαλύτερη στους άντρες, κυρίως όσον αφορά τον καρκίνο του ορθού: αναλογία ανδρών-γυναικών 1,3:1,0. Οι μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ γυναικών και ανδρών παρατηρούνται κάτω από την ηλικία των 59 ετών, πιθανόν εξαιτίας της ανασταλτικής δράσης των γυναικείων ορμονών στην καρκινογένεση. Σήμερα, ο καρκίνος του παχέος εντέρου αντιπροσωπεύει το 70% του συνόλου των κολο-ορθικών καρκίνων, ενώ ο καρκίνος του ορθού μόλις το 30%. (Ξυδάκης Ε., 2012)

1.5. ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Τα καρκινώματα του παχέος εντέρου εντοπίζονται κυρίως στο σιγμοειδές και το ορθό. Η μακροσκοπική τους εικόνα είναι ποικίλη και εξαρτάται από τον τύπο του καρκινώματος και το χρόνο της διάγνωσης. Αναγνωρίζονται πρωτίστως δύο τύποι, ο εξωφυτικός και ο πινακειοειδής, με τον πρώτο συχνότερο στο δεξιό κόλον. (Hamilton SR., 2010)

Το καρκίνωμα του παχέος εντέρου, ορίζεται από την Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ), ως το επιθηλιακό νεόπλασμα του παχέος εντέρου, το οποίο διηθεί την βλεννογόνια μυϊκή στοιβάδα. Αποτελείται κυρίως από αδενικούς σχηματισμούς διαφόρου μεγέθους και σχήματος που καλύπτονται από ένα ή περισσότερους στοίχους κυττάρων με ή χωρίς παραγωγή βλέννας. Ο τύπος και το ποσοστό των αδενικών σχηματισμών, καθώς και η ατυπία των κυττάρων που τους επενδύουν, καθορίζουν το βαθμό διαφοροποίησης. (Williams G. et. al., 2007)

1.6. ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι ισχυρότεροι προγνωστικοί δείκτες, δηλαδή τα βιολογικά, αντικειμενικά μετρήσιμα χαρακτηριστικά, που παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την έκβαση του Κ.Π.Ε. είναι η πλήρης εξαίρεση και η ανατομική επέκταση του όγκου. Από την πληθώρα των μοριακών και ανοσοϊστοχημικών δεικτών, κανείς δεν έχει υιοθετηθεί στην κλινική πράξη.

Η τοπική επέκταση της νόσου στο τοίχωμα του εντέρου (T), οι μεταστάσεις στους επιχώριους Λεμφαδένες (N), οι μακρινές Μεταστάσεις (M) και η Αγγειακή Διασπορά (V), όπως διαγιγνώσκονται και καταγράφονται στην ιστοπαθολογική μελέτη του εξαιρεθέντος νεοπλάσματος, είναι τα ευρήματα που καθορίζουν την πρόγνωση και τη θεραπεία της νόσου, σταδιοποιώντας την. (Williams G. et. al, 2007)

Προγνωστικοί δείκτες με μικρότερη ισχύ είναι η διαφοροποίηση του όγκου, η απόσταση του από το περιφερικό εγχειρητικό όριο, η επέκταση του υπολειπόμενου καρκινώματος μετά από θεραπεία (ypTNM), ο ιστολογικός τύπος, ο τύπος της διηθητικής παρυφής του νεοπλάσματος και οι ιστολογικές αλλοιώσεις που υποδηλώνουν υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H). Η τελευταία συσχετίζεται με βελτίωση της επιβίωσης ανά συγκεκριμένο στάδιο της νόσου. (Williams G. et. al. 2007)

Προβλεπτικοί δείκτες, ήτοι βιολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία σχετίζονται με την ωφέλεια από τη θεραπεία, για τον Κ.Π.Ε., είναι κυρίως η MSI-H και η έλλειψη μεταλλάξεων στο γονίδιο K-RAS. Τόσο η διάγνωση της MSI-H, όσο και η αναζήτηση μεταλλάξεων γίνεται από τη μελέτη δειγμάτων του νεοπλάσματος. (Williams G. et al, 2007)

1.7. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου έχει επιβεβαιωθεί ότι δεν είναι μεταδοτική νόσος. Μερικοί άνθρωποι έχουν περισσότερες πιθανότητες από άλλους να αναπτύξουν καρκίνο του παχέος εντέρου. Οι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο ενός ασθενούς να αναπτύξει τον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι: η υψηλή περιεκτικότητα των τροφών σε λίπος, το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου παχέος εντέρου ή πολυπόδων, η παρουσία πολυπόδων στο ίδιο άτομο στο παχύ έντερο, καθώς και η χρόνια ελκώδης κολίτιδα (νόσος Crohn). (Γλεντής Π., 2012)

Ο κίνδυνος εμφάνισης μιας νόσου υπολογίζεται με βάση της ύπαρξης των παραγόντων κινδύνου, συνθηκών οι οποίες αποδεδειγμένα αυξάνουν τις πιθανότητες κάποιου να νοσήσει από μια δεδομένη ασθένεια.

Ειδικά για τον καρκίνο του εντέρου υπάρχουν διάφοροι παράγοντες κινδύνου όπως:

- Δίαιτα και Διατροφή. Η θεωρία ότι οι διαιτητικοί παράγοντες σχετίζονται με τον ορθοκολικό καρκίνο, βασίζεται σε επιδημιολογικές μελέτες που δείχνουν ότι η θνησιμότητα αυξάνει σε πληθυσμούς που καταναλώνουν πολλές θερμίδες, πολλές πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης, κορεσμένα λίπη και ελάχιστες φυτικές ίνες. Το αλκοόλ αποτελεί έναν ακόμα παράγοντα προδιάθεσης, χωρίς αυτό να είναι καθολικά παραδεκτό.
- Προσωπικό ιστορικό ορθοκολικού ή άλλου είδους καρκίνου ή πολύποδα. Οι γυναίκες που έχουν καρκίνο των ωοθηκών, του ενδομητρίου ή του μαστού έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να αναπτύξουν και ορθοκολικό καρκίνο. Ακόμα γενετικοί παράγοντες (οικογενειακό ιστορικό ορθοκολικού καρκίνου ή πολύποδα). Περίπου 25% των ασθενών έχουν οικογενειακό ιστορικό νόσου.

- Ηλικία. Ο κίνδυνος για την εμφάνιση του ορθοκολικού καρκίνου αυξάνει με την ηλικία. Άτομα ηλικίας των 55 ετών και άνω έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν ορθοκολικό καρκίνο.
- Καθιστική ζωή. Η έλλειψη της σωματικής άσκησης επηρεάζει την κινητικότητα του εντέρου, έτσι ώστε να αυξάνεται ο κίνδυνος για τον ορθοκολικό καρκίνο. (Σάμπαλης Γ., 2012).

1.8. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Στις περισσότερες κακοήθειες ο προληπτικός έλεγχος θεωρείται "δευτερογενής πρόληψη". Ανιχνεύει καρκίνους σε πρώιμα στάδια, αλλά δεν προλαμβάνει τη νόσο. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, ο προληπτικός έλεγχος μπορεί να θεωρηθεί και "πρωτογενής πρόληψη", ανιχνεύοντας προκαρκινικούς πολύποδες και μπορεί να σταματήσει την εξέλιξη της νόσου.

Θα πρέπει να συμβουλευθούν ειδικό γιατρό για το πότε θα ξεκινήσουν τους προληπτικούς ελέγχους. Ο ειδικός γιατρός θα συστήσει μία ή περισσότερες από τις παρακάτω εξετάσεις, ανάλογα με την ηλικία, τους επιβαρυντικούς παράγοντες και τυχόν σημεία ή συμπτώματα.

- Εξέταση κοπράνων για ίχνη αίματος, που δεν φαίνονται με γυμνό μάτι. Πολύποδες ή μικροί καρκίνοι που αιμορραγούν ελάχιστα και η εξέταση αποκαλύπτει αυτό το πρώιμο σημάδι.
- Δακτυλική εξέταση από γιατρό, ο οποίος μπορεί να αισθανθεί τυχόν ανώμαλους σχηματισμούς, ή να δει αίμα που κρυβόταν εσωτερικά.
- Σιγμοειδοσκόπηση ή κολονοσκόπηση, όπου με εύκαμπτο μακρύ όργανο με οπτικές ίνες, ελέγχεται όλο ή μέρος του παχέος εντέρου υπό άμεση όραση.
- Βαριούχος υποκλυσμός διπλής αντίθεσης, δηλαδή ακτινογραφίες του παχέος εντέρου με χρήση σκιαγραφικού υγρού.

Η περαιτέρω διερεύνηση ύποπτων αποτελεσμάτων μπορεί να απαιτήσει και άλλες εξετάσεις, όπως αξονική και μαγνητική τομογραφία, σπινθηρογράφημα κ.ά. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και η ανάγκη για επιπρόσθετες εξετάσεις αποτελούν διαδικασία που γίνεται από τον ειδικό γιατρό και εξατομικεύεται για κάθε περίπτωση. (Παππής Χαρ., 2003).

1.9. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Ο όρος χημειοπροφύλαξη εισήχθηκε για πρώτη φορά από τον Sporn. Χημειοπροφύλαξη ή χημειοπροστασία, ορίζεται ως η πρόληψη, η αναστολή ή η αντίστροφη της καρκινογενετικής διαδικασίας με τη χορήγηση ενός ή περισσότερων χημικών ουσιών, είτε με τη μορφή φαρμάκου είτε μέσω της διατροφής με τα φυσικά συστατικά των τροφίμων.

Σκοπός της χημειοπροφύλαξης είναι η ελάπτωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου με τη χρήση ουσιών φυσικής ή συνθετικής προέλευσης (Sporn M.B. et. al., 1976). Πρέπει να σημειωθεί ότι η χημειοπροφύλαξη διαφέρει από την πρόληψη, μιας και η πρόληψη αναφέρεται στην αλλαγή των συνηθειών του ατόμου (καλύτερη διατροφή, άσκηση, αποφυγή καπνίσματος). Από την άλλη η χημειοπροφύλαξη αναφέρεται στη χρήση χαπιών ή συμπληρωμάτων διατροφής, τα οποία περιέχουν ενεργά συστατικά διατροφικών πηγών (όπως φρούτα και λαχανικά) (Κωνσταντίνου Α., 2008).

Η καλύτερη κατανόηση των επιμέρους σταδίων της καρκινογενετικής διαδικασίας και των μηχανισμών που τη διέπουν, έδειξαν πως υπάρχουν στάδια που μπορούν να προληφθούν. Σήμερα η χημειοπροστασία θεωρείται μια πολύ σημαντική προσέγγιση

για την πρόληψη του καρκίνου, πρωτίστως μέσω των φυσικών συστατικών της διατροφής (Shukla et. al., 2004).

Η στρατηγική χημειοπροστασίας του καρκίνου έχει διπλό στόχο: την αρχική πρόληψη του καρκίνου πριν την εμφάνιση του (primary prevention), την έγκαιρη ανίχνευση, αναστροφή και την περαιτέρω αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (secondary prevention) (De Flora et. al., 2001 & Smith et. al., 2005).

Η παρεμπόδιση της καρκινογένεσης μπορεί να επιτευχθεί, μέσω των τριών προσεγγίσεων:

α) Μείωση της έκθεσης σε περιβαλλοντικά καρκινογόνα, μέσω ελέγχου του εργασιακού περιβάλλοντος και ενθάρρυνσης της αλλαγής του τρόπου ζωής.

β) Εντοπισμός των πληθυσμιακών ομάδων που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου εξαιτίας γενετικών ή περιβαλλοντικών παραγόντων, με αποτέλεσμα να γίνονται σε αυτούς συχνές κλινικές εξετάσεις.

γ) Χημειοπροστασία με διαιτητικά ή συνθετικά μέσα.

Από τις παραπάνω προσεγγίσεις η τελευταία θεωρείται πολύ σημαντική, διότι οι δυο πρώτες απαιτούν ακριβή γνώση των αιτιολογικών παραγόντων που οδηγούν στην καρκινογένεση (Shereiqi et. al., 2000).

Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες

Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες διαχωρίζονται ανάλογα με το στάδιο της καρκινογενετικής διαδικασίας στο οποίο δρουν. Έχουν πλειοτροπική δράση, δρώντας με ποικίλους μηχανισμούς και αλληλεπιδρώντας ποικιλοτρόπως με τους καρκινογόνους παράγοντες. Οι μηχανισμοί δράσης τους επηρεάζονται από διαφόρους παράγοντες όπως η συγκέντρωση τους, η βιοδιαθεσιμότητα τους, ο τρόπος εισαγωγής τους στον οργανισμό κ.ά. (De Flora & Ferguson., 2005, Kelloff et. al., 2005).

Ο Wattenberg το 1985 έκανε την πρώτη ταξινόμηση των χημειοπροστατευτικών παραγόντων στηριζόμενος στα αποτελέσματα των in vivo δοκιμών σε πειραματόζωα. Ωστόσο, στην πορεία πολλές μελέτες έχουν εμπλουτίσει την αρχική αυτή ταξινόμηση.

Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες ταξινομούνται σε τρείς κατηγορίες:

1) Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου.
2) Παράγοντες παρεμπόδισης του καρκινογόνου που αναστέλλουν την πρώτη φάση της καρκινογένεσης.
3) Παράγοντες παρεμπόδισης ή καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης που αναστέλλουν την προαγωγή, καθώς και την πρόοδο της καρκινογένεσης. (Wattenberg L.W., 1985)

Α. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου

Περιλαμβάνονται παράγοντες με προστατευτική δράση πριν την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας. Αναστέλλοντας τον σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη σε όξινο περιβάλλον. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι φυτικές πολυφαινόλες (φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, γαλλικό οξύ κ.ά.), τα αναγωγικά οξέα (ασκορβικό οξύ), διάφορα αμινοξέα και σουλφυδρυλικές ενώσεις.

Το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) για παράδειγμα, ελαπώνει το σχηματισμό της νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες ή νιτρώδη στο όξινο περιβάλλον του

στομάχου και οδηγεί σε ελάπωση όγκων του πνεύμονα σε ποντικούς (Mirvish 1981, Hartman & Shankel 1990, Κουρέτας 2003).

Β. Παράγοντες παρεμπόδισης του καρκινογόνου

Οι παράγοντες παρεμπόδισης του καρκινογόνου που δρουν στην πρώτη φάση της καρκινογένεσης είναι οι εξής:

1) Αναστολείς του κυτοχρώματος P450.
   Τα ένζυμα της φάσης Ι του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών με κυρίαρχο ρόλο τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, μετατρέπουν προ-καρκινογόνα σε καρκινογόνα. Οι ουσίες που μπορούν να αναστείλουν τη δράση των ενζύμων του P450 ίσως παρεμποδίζουν την καρκινογένεση.
2) Επαγωγείς των ενζύμων της φάσης ΙΙ του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών.
   Οι αντιδράσεις της φάσης ΙΙ του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών αυξάνουν τη διαλυτότητα και την απέκκριση των ξενοβιοτικών ουσιών. Οι ουσίες που επάγουν τα ένζυμα της φάσης ΙΙ (π.χ. την τρανσφεράση της γλουταθειόνης-GST) συμβάλουν στην απομάκρυνση καρκινογόνων ουσών.
3) Εξουδετερωτές των ηλεκτρονιόφιλων ουσιών και των ελεύθερων ριζών.
   Τα περισσότερα καρκινογόνα μεταβολίζονται σε δραστικές ηλεκτρονιόφιλες μορφές που αντιδρούν με το DNA σχηματίζοντας ομοιοπολικές ενώσεις δημιουργώντας μεταλλάξεις. Η εξουδετέρωση αυτών αποτελεί βασικό μηχανισμό χημειοπροφυλακτικής δράσης.
4) Επαγωγείς των ενζύμων αποκατάστασης των βλαβών του DNA.
   Είναι ένζυμα ή φυσικές ουσίες που είτε άμεσα είτε έμμεσα, εμπλέκονται στους μηχανισμούς αποκατάστασης των βλαβών του DNA.

Γ. Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης.

Στους παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης κατά τους Morse και Stoner απαρτίζονται οι:

1) Αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμινών.
Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων και η νεοπλασματική εξαλλαγή σχετίζεται με τη συγκέντρωση των πολυαμινών, η οποία συχνά εμφανίζεται αυξημένη στους καρκινικούς ιστούς. Υπάρχουν παράγοντες που εμφανίζουν ανασταλτική δράση ως προς το μεταβολισμό των πολυαμινών.
2) Επαγωγείς της τελικής διαφοροποίησης.
Χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων είναι η μη διαφοροποίηση τους. Ορισμένοι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, όπως η βιταμίνη Α, προκαλούν διαφοροποίηση των καρκινικών με αποτέλεσμα την αναστολή της καρκινογένεσης. (Huang et. al., 1986, Sani et. al., 1990)
3) Ρυθμιστές των μονοπατιών της μεταγωγής σήματος.
Τα ενδιάμεσα μονοπάτια της μεταγωγής σήματος μπορεί να διαθέτουν στόχους χημειοπροφύλαξης με σκοπό την ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα φλαβονοειδή που αναστέλλουν τη δράση της PKC, συμβάλλοντας έτσι στην καταστολή της καρκινογενετικής διαδικασίας. (Kelloff G.J. et. al., 1997)
4) Ρυθμιστές της δράσης των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων.
Μέσω της ρύθμισης της δραστικότητας των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων που επεμβαίνουν στους υποδοχείς της κυτταροπλασματικής και της πυρηνικής μεμβράνης, πραγματοποιείται μία πιο άμεση αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της καρκινογένεσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα αντι-οιστρογόνα, όπως η ταμοξιφαίνη, που

συνδέονται με τους πυρηνικούς υποδοχείς των οιστρογόνων αναστέλλοντας τη σύνδεση, καθώς και την προαγωγική δράση των οιστρογόνων σε πολλούς ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους. (Jordan V.C., 1992)

5) Αναστολείς της δράσης των ογκογονιδίων.

Η ανασταλτική δράση των χημειοπροφυλακτικών παραγόντων έναντι των ογκογονιδίων εστιάζοντας στο ογκογονίδιο Ras, όπου η ενεργοποίηση του προϋποθέτει τη φαρνεσυλίωσή του. Η ουσία D-λιμονίνη που περιέχεται στο κίτρο (είδος που ανήκει στα εσπεριδοειδή), αναστέλλει την πρόοδο των όγκων του μαστού αρουραίων, στους οποίους χορηγήθηκαν χημικά καρκινογόνα (Elson et. al., 1998).

6) Επαγωγείς της διακυτταρικής επικοινωνίας.

Οι χασμοσύνδεσμοι (gapjunctions) είναι πόροι ή κανάλια στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων, όπου τα κύτταρα επικοινωνούν με τα γειτονικά τους κύτταρα και αναστέλλονται στους όγκους. Το ρετινοϊκό οξύ και το β-καροτένιο είναι ουσίες που προάγουν την διακυτταρική επικοινωνία, μέσω αυτών των χασμοσυνδέσμων που δρουν ανασταλτικά στην καρκινογένεση. (Zhang et. al., 1991, Κουρέτας Δ., 2003)

7) Αποκατάσταση της ανοσολογικής απόκρισης.

Οι περισσότεροι χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως η βιταμίνη Ε, η οποία σε κάποιες δόσεις αυξάνει την παραγωγή των αντισωμάτων. Επίσης, το ρετινοϊκό οξύ συμβάλει στην αυξημένη κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων (natural killers) (Hill D.L. et. al., 1992).

8) Επαγωγείς της απόπτωσης.

Η απόπτωση είναι απαραίτητη διαδικασία για την εξάλειψη των ανεπιθύμητων κυττάρων, καθώς και για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών (Νακοπούλου Λ. και συν., 1997).

Η διαταραχή της ομοιόστασης μπορεί να προκαλέσει σοβαρές παρενέργειες, όπως η καρκινογένεση. Το τριοξείδιο του αρσενικού είναι ένας επαγωγέας απόπτωσης, δηλαδή επάγει την απόπτωση στα λευχαιμικά κύτταρα, ενεργώντας άμεσα στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, εξαλείφοντας το δυναμικό αυτής και οδηγώντας στην αναστολή της έκφρασης του Bcl-2 και την αύξηση της έκφρασης της κασπάσης-3 (Zhu J. et. al., 2002).

9) Ρυθμιστές της μεθυλίωσης του DNA.

Η υπομεθυλίωση του DNA προκαλεί σημαντικές αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Πολλές είναι οι ουσίες που αναστέλλουν την καρκινογένεση, λειτουργώντας ως δότες των μεθυλομάδων (Wainfain E. et. al., 1992).

10) Αναστολείς της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης.

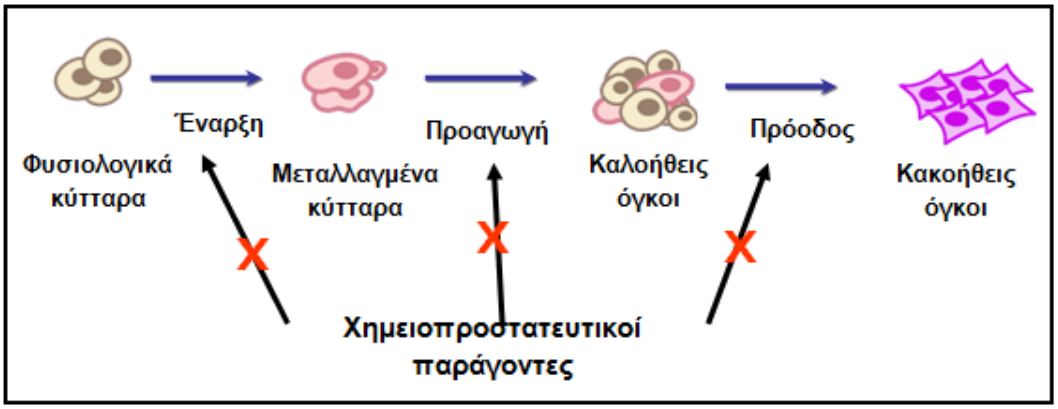
Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν και ένζυμα, που συντελούν στη λύση της βασικής μεμβράνης ως αποτέλεσμα τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων.

Σε αυτά συγκαταλέγονται πρωτεάσες, όπως η κολλαγενάση, η υαλουρονιδάση και οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου. Η χημειοπροστατευτική δράση των αναστολέων των πρωτεασών οφείλεται, σε ορισμένο ποσοστό, στην αναστολή λύσης της βασικής μεμβράνης (Kennedy A.R., 1998).

11) Αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος.

Ανάμεσα στα πολλά γεγονότα που συμβαίνουν κατά την προαγωγική φάση της πειραματικά προκαλούμενης καρκινογένεσης, είναι και η αύξηση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, που συμμετέχει σημαντικά στην παρατηρούμενη φλεγμονώδη αντίδραση.

Οι κυκλοοξυγενάσες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες και θρομβοξάνια. Στην αντίθετη περίπτωση οι λιποξυγενάσες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε λευκοτριένια και υδροξύ-εικοσιτετρανοϊκά οξέα (Κουρέτας Δ., 2003).
Κατά τη διάρκεια των διεργασιών αυτών, παράγονται πολλά είδη ελεύθερων ριζών.
Οι αναστολείς των κυκλοοξυγενασών (αντιφλεγμονώδη φάρμακα και φυτικές πολυφαινόλες) αναστέλλουν την καρκινογένεση (Reddy B.S. et. al., 1987).
Τέλος, οι αναστολείς της λιποξυγενάσης, όπως η βιταμίνη Ε, αναστέλλουν τη φάση προαγωγής της διαδικασίας της καρκινογένεσης στην επιδερμίδα ποντικών. (Huang M.T. et. al., 1991)



Εικόνα 1: *Απεικόνιση του πολυσταδιακού μοντέλου της καρκινογένεσης και της δράσης των χημειοπροστατευτικών παραγόντων.*

1.10. ΒΡΩΜΟΦΑΙΝΟΛΕΣ

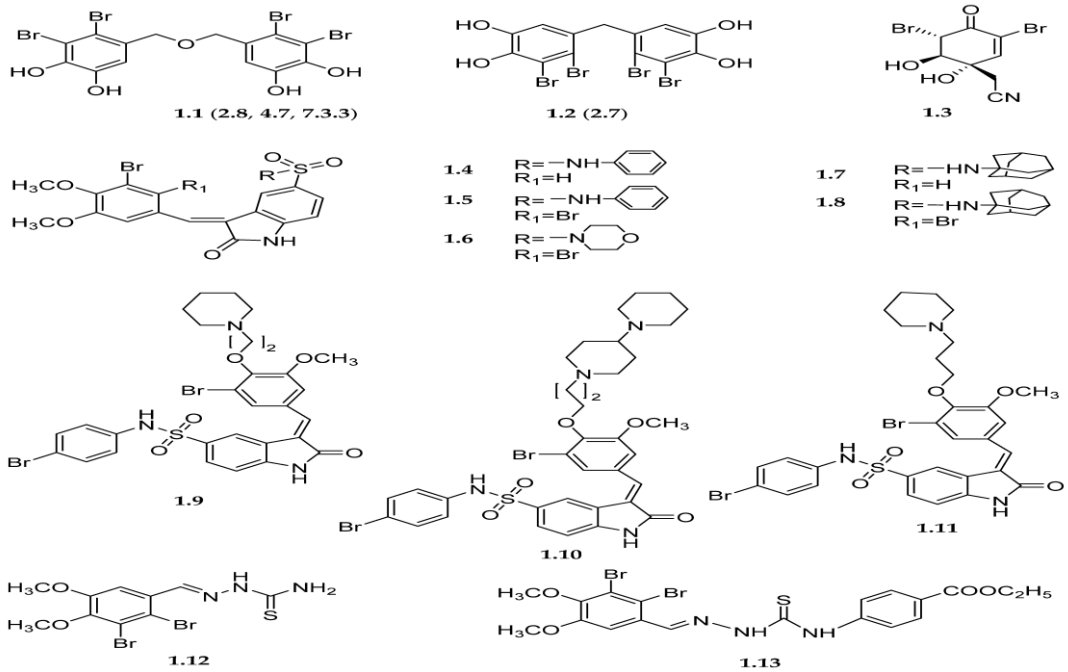
1.10.1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

Οι βρωμοφαινόλες είναι μια ομάδα ενώσεων με ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις που απομονώνονται από θαλάσσια φύκια. Δομικά περιλαμβάνουν έναν ή περισσότερους δακτυλίους βενζολίου και περιέχουν διαφορετικούς αριθμούς υδροξυλίου, βρωμίου ή άλλων ομάδων. Οι πρώτες BPs (βρωμοφαινόλες) απομονώθηκαν από το κόκκινο φύκι Rhodomela larix το 1967. Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός BPs απομονώθηκε από διάφορα είδη θαλάσσιων φυκιών.

1.10.2. ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Τα τελευταία χρόνια, πολλές BPs (βρωμοφαινόλες) με αντικαρκινική δράση έχουν απομονωθεί από θαλάσσιες πηγές, ενώ μερικές από αυτές μπορούν να αναπτυχθούν ως νέοι αντικαρκινικοί παράγοντες. BPs που απομονώθηκαν από τα θαλάσσια φύκια Leathesianana και Rhodomela confervoides είναι καλοί υποψήφιοι ως αντικαρκινικοί παράγοντες μέσω της αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων. Ειδικότερα η BP 1.1 (Εικόνα 2) αναφέρθηκε ότι είναι κυτταροτοξική για την κυτταρική σειρά πολλών τύπων καρκίνων, ανάμεσα τους και ο καρκίνος του παχέος εντέρου (Liu M., 2012). Συγκεκριμένα μπόρεσε να προκαλέσει μιτοχονδριακή απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα και να αναστείλει τη δραστηριότητα της τοποϊσομεράσης, αλληλεπιδρώντας με τα μόρια του DNA αντί να συνδέεται άμεσα με τις

τοποϊσομεράσες. Η ένωση αυτή όπως και η 1.2 (Εικόνα 2) εμφάνισε ισχυρή αντι-αγγειογενετική δράση. Παράλληλα η ένωση 1.2 μπόρεσε να αναστείλει την ανάπτυξη πολλών καρκινικών κυττάρων in vitro (Wu N., 2015).



Εικόνα 2: Χημικές δομές BP με αντικαρκινική δράση

Αν και οι παραπάνω BPs έδειξαν μεγάλη κυτταροτοξικότητα, η εκλεκτικότητά τους δεν είναι ξεκάθαρη και οι επιδράσεις τους στα φυσιολογικά κύτταρα πρέπει ακόμα να διερευνηθούν. Επιπλέον, οι μηχανισμοί των αντικαρκινικών τους επιδράσεων δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως και η σχέση δομής-δραστικότητας πρέπει επίσης να εξηγηθεί περαιτέρω. Όλα αυτά είναι σημαντικά προκειμένου να βρεθούν νέες και ασφαλείς ενώσεις ως υποψήφιες αντικαρκινικές ουσίες.

1.10.3. ΛΟΙΠΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Παράλληλα με τις αντικαρκινικές ιδιότητες, οι βρωμοφαινόλες έχουν μια σειρά από άλλες ιδιότητες που έχουν μεγάλη αξία για τον οργανισμό. Σημαντική θεωρείται η αντιοξειδωτική τους δράση. Η αντιοξειδωτική τους φαίνεται να έχει στενή σχέση με τον αριθμό των υδροξυλομάδων στο μόριο. Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ότι οι BPs είναι ένας από τους πιθανούς υποψήφιους για την πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με προσβολή ελεύθερων ριζών, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης κ.α. Άλλη μια ιδιότητα την οποία έχουν οι βρωμοφαινόλες είναι η αντιμικροβιακή τους δράση. Έχει αναφερθεί ότι διάφορες BPs από τα θαλάσσια φύκια διαθέτουν πολλά υποσχόμενη αντιβακτηριδιακή δράση. Πρόσφατα οι BPs που απομονώθηκαν από θαλάσσια φύκια έχουν αναφερθεί ότι είναι πιθανοί αντιδιαβητικοί παράγοντες, που δρουν ως αναστολείς PTP1B (μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης), καθώς και ως αναστολείς της αλφα-γλυκοσιδάσης (ένζυμο που παίζει κεντρικό ρόλο στην πέψη των υδατανθράκων και αποτελεί στόχο για αντιδιαβητικά φάρμακα). Τέλος, υπάρχουν κι άλλες δράσεις όπως η αναστολή έναντι της θρομβίνης γεγονός που

καθιστά τις βρωμοφαινόλες ελκυστικό στόχο για τη θεραπεία μιας ποικιλίας καρδιαγγειακών παθήσεων. Επίσης, ορισμένες BPs έχουν δείξει αντιφλεγμονώδη δράση. Όμως δεν έχουν όλες οι BPs ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία. Ορισμένες όπως η 2,4,6-τριβρωμοφαινόλη που χρησιμοποιείται ως μυκητοκτόνο, είναι ύποπτες ότι έχουν αρνητικό αντίκτυπο στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων. Ακόμα υπάρχουν άλλες BPs που δρουν ως ενδοκρινικοί διαταράκτες, αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και έχουν τοξική δράση (Ming Liu et. al., 2011).

1.11 . ΕΙΔΗ ΦΥΚΩΝ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΣΠΕΡΜΩΝ ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΤΗΚΑΝ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 14 εκχυλίσματα θαλάσσιων φυκών και 2 θαλάσσιων αγγειόσπερμων που συλλέχτηκαν 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 3. *Gracilaria gracilis*.

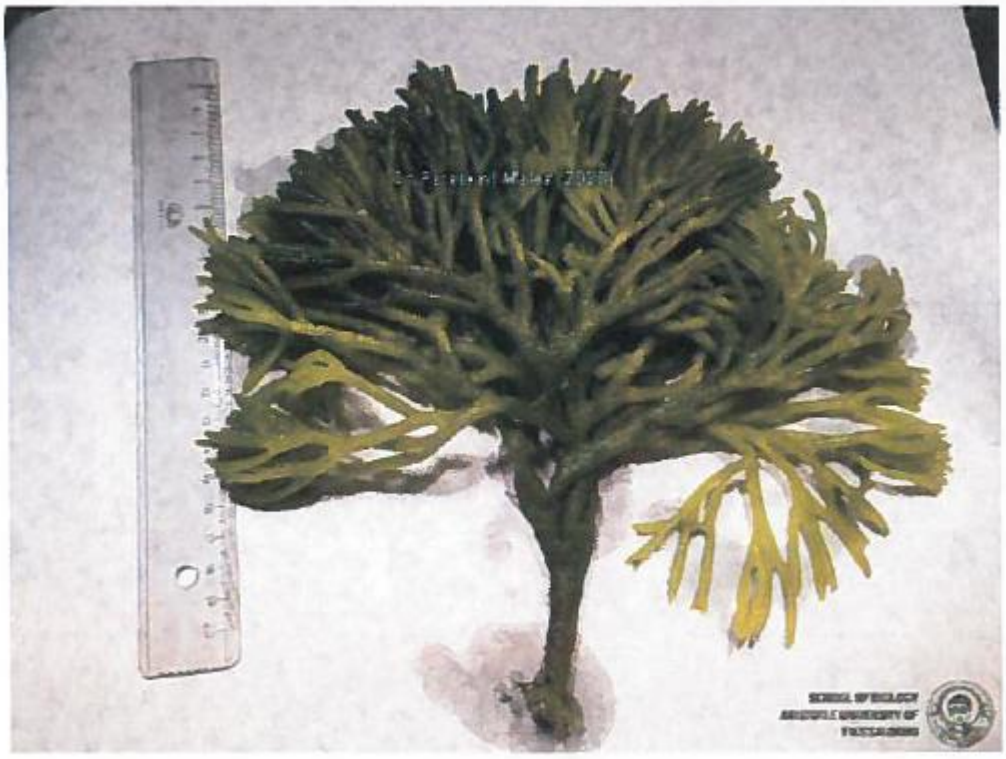
Ulva rigida. Το φύκος *U. rigida* αναπτύσσεται στα παράκτια ύδατα και στις εκβολές ποταμών. Απαντάται ευρέως στη Μεσόγειο, ιδιαίτερα στις ακτές της Ελλάδας. Αποτελείται από λεπτούς, πεπλατυσμένους θαλάμους, τα κύτταρα των οποίων έχουν ομοιόμορφη δομή. Συχνά πληρεί τις απαιτήσεις για χρήση ως «βιολογικός 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 4. *Ulva rigida*.

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 5. *Colpomenia sinuosa*.

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 6. *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 7. *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 8. *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 πυρηνοειδές. Το είδος μπορεί να έχει μήκος 10-30 εκατοστά και πλάτος 6-18 χιλιοστά.

Εικόνα 9. *Ulva intestinalis*.

Cystoseira compressa. Το φύκος *C. compressa* μπορεί να βρεθεί στις ανώτερες περιοχές της παλιρροιακής 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 ρηχά 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 10. *Cystoseira compressa*.

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 11. *Sargassum vulgare*.

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, ιλυώδη ή αμμώδη ιζήματα. Άλλοι βιότοποι του περιλαμβάνουν βράχους και θραύσματα κοχυλιών, ρηχά 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.

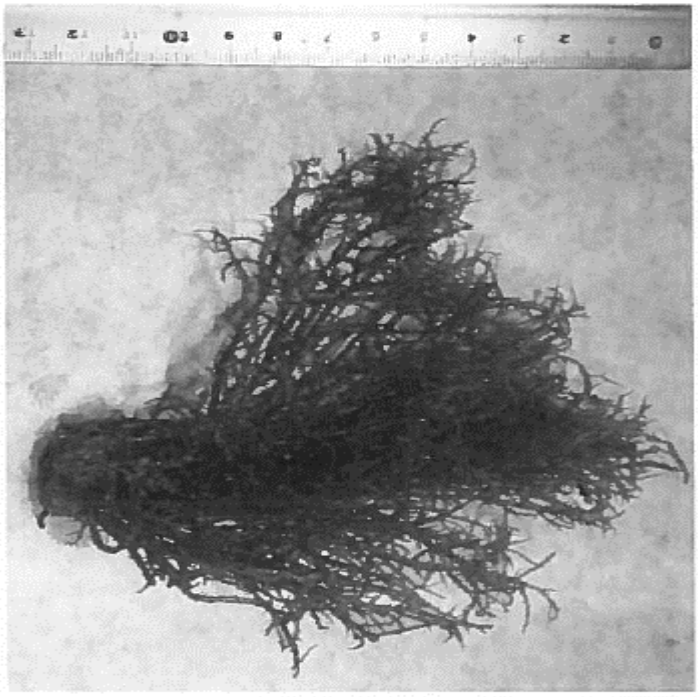
Εικόνα 12. *Padina pavonica.*

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.

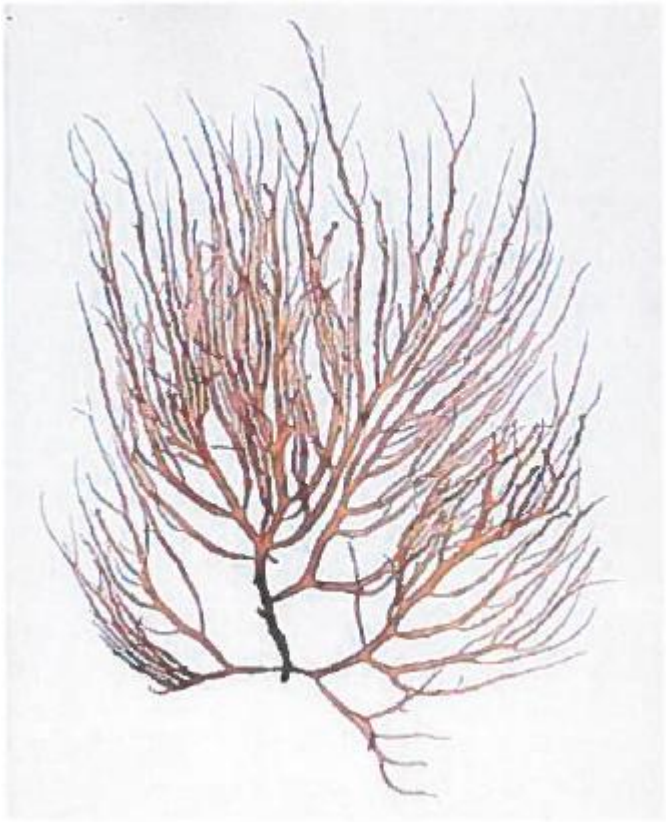
Εικόνα 13. *Gigartina teedei.*

Gracilaria sp. Τα είδη του γένους Gracilaria είναι ροδοφύκη. Το γένος Gracilaria διακρίνεται για την οικονομική του σημασία ως αγαρόφυτο, 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, θειϊκοί ολιγοσακχαρίτες από είδη Gracilaria φαίνεται να έχουν αντιικές ιδιότητες.



Εικόνα 14. *Gracilaria* sp.

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 15. *Gracilaria bursa pastoris*.

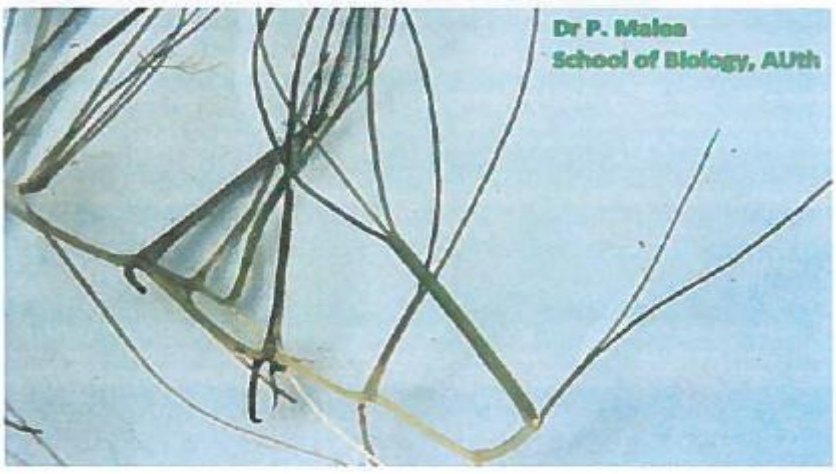
Gigartina pistillata. Το *G. pistillata* είναι ένα εδώδιμο ροδοφύκος που βρίσκεται τόσο στον Βορειοανατολικό όσο και στο Νοτιοανατολικό Ατλαντικό και στη Νοτιοανατολική Ασία, αποτελεί πηγή καραγενάνης, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων. Το *G. pistillata* αποτελεί το τυπικό είδος του γένους Gigartina, οι θάλλοι του είναι όρθιοι, ύψους έως 20 cm, με σκούρο κόκκινο ή κόκκινο-καφέ, χρώμα, χόνδρινοι, ελαστικοί, διχοτομικά 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 16. *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 17. *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 αυτό γονιμοποιείται, αλλά τα άνθη απελευθερώνουν και γύρη. Το φυτό αναπαράγεται επίσης αγενώς φυτρώνοντας από το ρίζωμά του για να σχηματίσει αποικίες.



Εικόνα 18. *Ruppia maritima*.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστεί η επίδραση των εκχυλισμάτων των φυκιών του Αιγαίου πελάγους, στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (LS174) με τη μέθοδο XTT.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Χρησιμοποιήθηκαν χημικά αντιδραστήρια αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, προϊόντα των εταιριών Merck (Γερμανία) και Sigma (Η.Π.Α.).

2.2. ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 14 εκχυλίσματα θαλάσσιων φυκών και 2 εκχυλίσματα θαλάσσιων αγγειόσπερμων που συλλέχθηκαν από περιοχές του Αιγαίου πελάγους. Τα είδη των προαναφερθέντων φυκών και αγγειόπερμων που εξετάστηκαν φαίνονται στον Πίνακα 1. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των εκχυλισμάτων ήταν 80% μεθανόλη.

ΕΙΔΗ ΦΥΚΩΝ
Gracilaria gracilis
Gracilaria sp.
Gracilaria bursa pastoris
Ulva rigida
Ulva intestinalis
Codium fragile
Colpomenia sinuosa
Cystoseira amentacea
Cystoseira barbata
Cystoseira compressa
Padina pavonica
Sargasum vulgare
Gigartina teedei
Gigartina pistillata
ΕΙΔΗ ΑΓΓΕΙΟΣΠΕΡΜΩΝ
Ruppia maritime
Cymodocea nodosa

Πίνακας 1. Είδη θαλάσσιων φυκών και αγγειόσπερμων από τα οποία απομονώθηκαν τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα.

2.3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ LS174

Τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου της καρκινικής σειράς LS174, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό που αποτελείται από:

- ✓ DMEM Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, PAN-Biotech)
- ✓ (5 mL) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS (Biochrom KG Seromed).
- ✓ 1% διάλυμα πενικιλίνης [(100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml)] (Gibco).

Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάστηκαν σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C και 5% CO_2. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό υλικό έως ότου η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με κύτταρα. Έπειτα ακολούθησε η ανακαλλιέργεια των κυττάρων (split), αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 500 μL τρυψίνης 0,25% κάνοντας επώαση για 4 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης. Τέλος, έγινε επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό (5mL) με 10% FBS.

Οι χειρισμοί των κυττάρων γινόταν σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

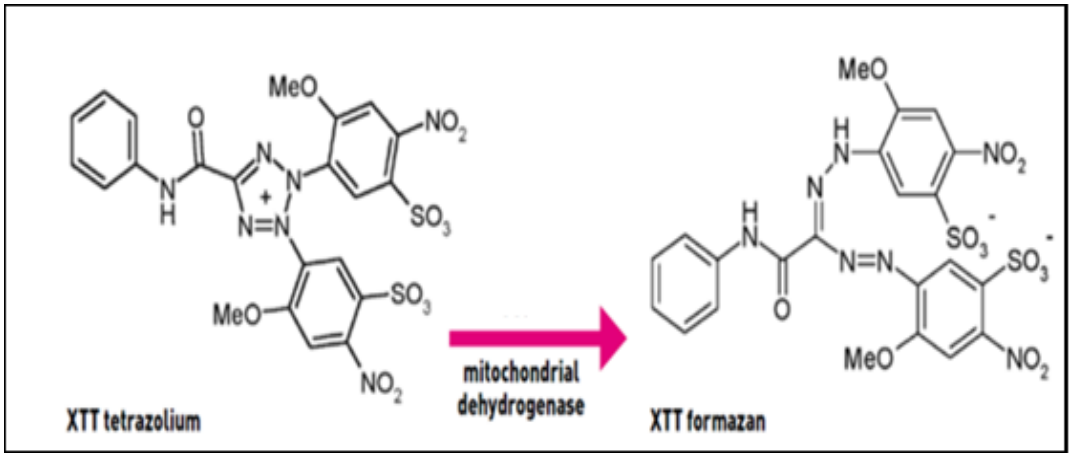
2.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ XTT

Ο προσδιορισμός της επίδρασης των εκχυλισμάτων των φυκών στην αύξηση της καρκινικής κυτταρικής σειράς LS174 πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του XTT cell proliferation kit της εταιρείας Roche. Πρόκειται για μια χρωματομετρική μέθοδο για την ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας, δηλαδή ανιχνεύει τις μεταβολικές δραστηριότητες των ζωντανών κυττάρων. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων (ένζυμα) στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Τα μιτοχονδριακά αυτά ένζυμα αδρανοποιούνται αμέσως μετά το θάνατο των κυττάρων, έτσι αυτή η μετατροπή συμβαίνει μόνο σε ζωντανά κύτταρα και συνεπώς η ποσότητα της φορμαζάνης που παράγεται είναι ανάλογη των ζώντων κυττάρων στο δείγμα.

Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή, χρώματος έντονο πορτοκαλί, απορροφάται στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομέτρηση με Elisa reader. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση. Μπορούμε έτσι να ελέγξουμε τη δράση των εκχυλισμάτων που εφαρμόσαμε.

Η μέθοδος βιωσιμότητας των κυττάρων με το XTT kit assay είναι μια πολύ καλή λύση ποσοτικοποίησης του πολλαπλασιασμού και ζωτικότητας των κυττάρων χωρίς τη χρήση ραδιενεργών ισοτόπων. Γενικά τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι:

- Η ευκολία στη χρήση, δεν απαιτούνται επιπλέον αντιδραστήρια ή πλύσιμο των κυττάρων.
- Είναι διαδικασία ενός βήματος, έχουμε αποτελέσματα μέσα σε 2-5ώρες.
- Η μεγάλη ευαισθησία, μπορούμε να πάρουμε αποτελέσματα και με μικρή ποσότητα κυττάρων.
- Η ακρίβεια, γιατί η απορρόφηση είναι ανάλογη με τον αριθμό των κυττάρων.
- Η ασφάλεια, γιατί δεν χρειάζονται ραδιενεργά ισότοπα.



Εικόνα 19. Μετατροπή του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων (ένζυμα) στον μεταβολίτη φορμαζάνη.

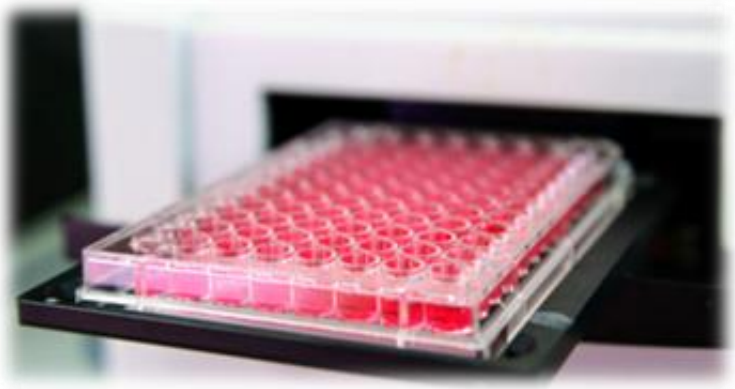
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γινόταν μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, προσθέτονταν 10.000 κύτταρα/θέση σε ένα «πιάτο» με 96 θέσεις (96-well plate). Στα κύτταρα προσθέτονταν θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες στους 37^0C και σε 5% CO_2 προκειμένου να προσκολληθούν στις φλάσκες καλλιέργειας. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρούνταν και ακολουθούσε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων των φυκών σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS, αποφεύγοντας την αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με τις εξεταζόμενες ουσίες. Τα κύτταρα στα οποία είχαμε προσθέσει τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη εκχυλισμάτων επωάζονταν για 24 ώρες. Μετά την επώαση προσθέτονταν 50 μL από τα αντιδραστήρια XTT σε κάθε θέση του 96-well plate και ακολουθούσε επώαση για 4 ώρες. Σημειώνεται ότι το αντιδραστήριο XTT πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων A και B από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των A και B, γίνεται πάντα πριν τη χρησιμοποίησή του. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι εκχύλισμα. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν μόνο το θρεπτικό υλικό, τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα και XTT, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιοριζόταν η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). 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 LS174 υπολογίστηκε από τον τύπο:

% αναστολή = [(O.D. αρνητικού μάρτυρα – O.D. δείγματος)/O.D. αρνητικού μάρτυρα] X 100

Στη συνέχεια έγιναν διαγράμματα συσχέτισης της % αναστολής της κυτταρικής αύξησης με τη συγκέντρωση των εκχυλισμάτων. Από τα διαγράμματα υπολογίστηκε το IC50, 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.



Εικόνα 20. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός με ELISA plate reader.

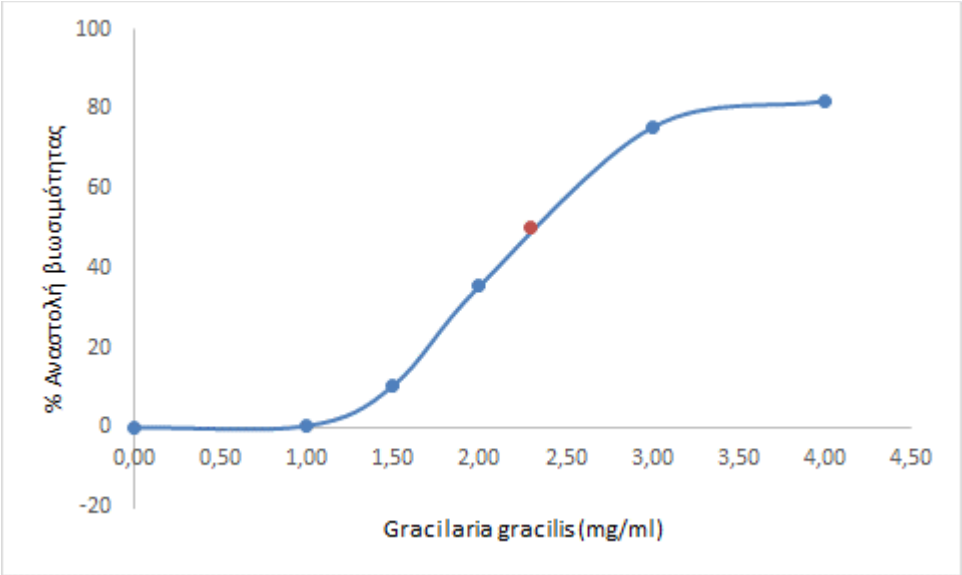
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 14 εκχυλίσματα θαλάσσιων φυκών και 2 εκχυλίσματα θαλάσσιων αγγειόσπερμων που συλλέχθηκαν από περιοχές του Αιγαίου πελάγους για την ικανότητά τους να αναστέλλουν την αύξηση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου LS174.

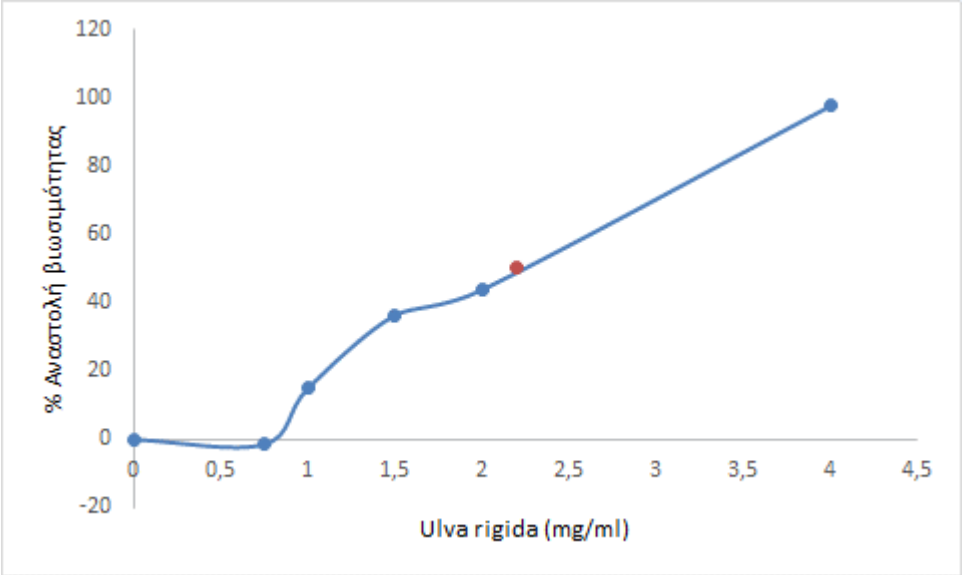
Ο προσδιορισμός της επίδρασης στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων έγινε με τη μέθοδο XTT. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τα εκχυλίσματα σε διάφορες συγκεντρώσεις και για κάθε συγκέντρωση προσδιορίστηκε η % αναστολή στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων. Από τα διαγράμματα συσχέτισης της % αναστολής με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος προσδιορίστηκαν οι τιμές IC_{50} δηλαδή η συγκέντρωση του εκχυλίσματος, όπου αναστέλλεται η αύξηση των κυττάρων κατά 50%. Όσο μικρότερη η τιμή IC_{50} 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 IC_{50} όλων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.

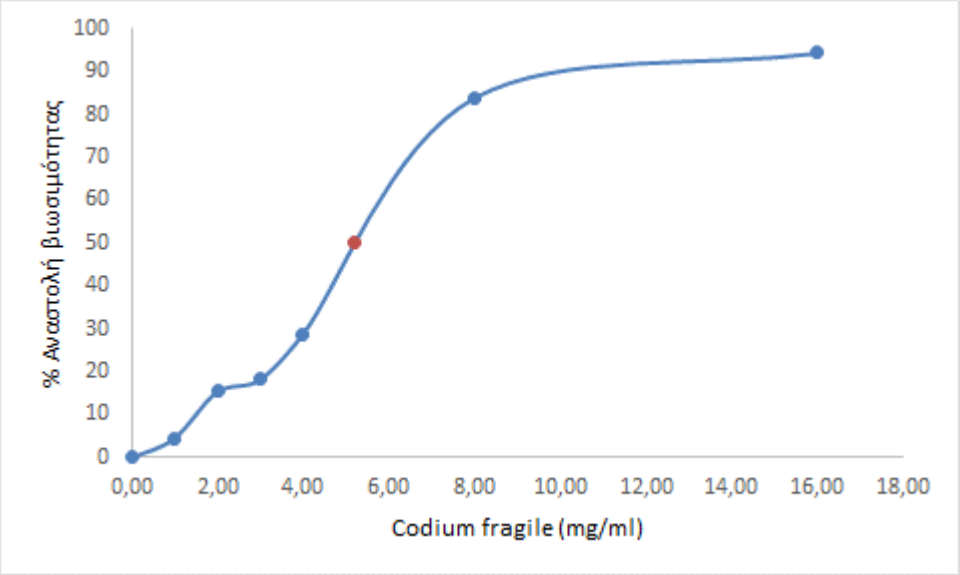
Οι τιμές IC50 κυμαίνονται από 0,83 – 5,6 mg/ml. Τα 5 πιο δραστικά εκχυλίσματα ήταν τα *Cymodocea nodosa* (IC_{50}: 0,83mg/ml), *Ulva intestinalis* (IC_{50}: 1,25 mg/ml), *Gracilaria bursa pastoris* (IC_{50}: 1,3 mg/ml), *Gigartina teedei* (IC_{50}: 1,35 mg/ml), *Padina pavonica* (IC_{50}: 1,4 mg/ml). Το εκχύλισμα με τη μικρότερη δράση ήταν το *Gracilaria sp.* (IC_{50}: 5,6mg/ml).



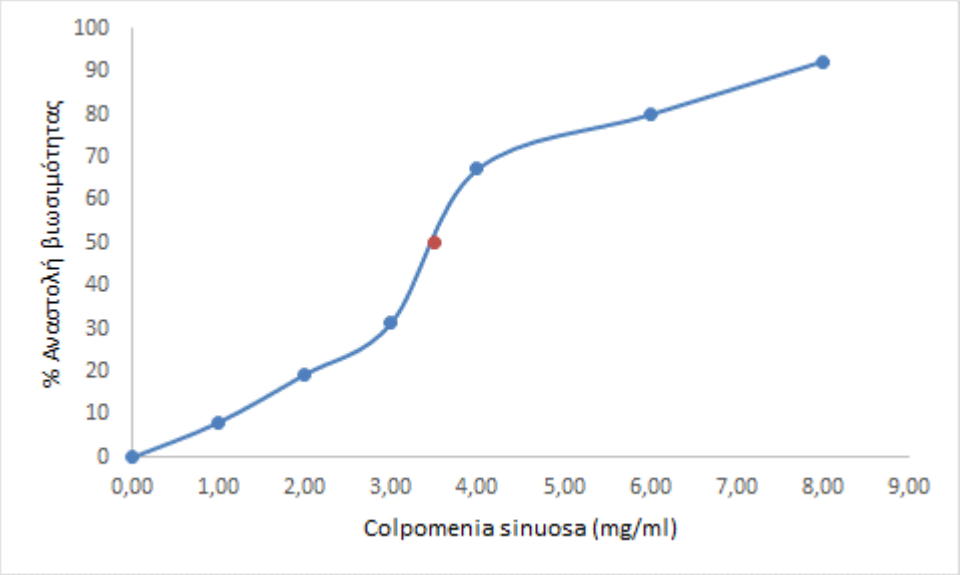
Διάγραμμα 1. Η % αναστολή βιωσιμότητας των εντερικών καρκινικών κυττάρων LS174 από το φύκος *Gracilaria gracilis* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT. Οι τιμές προέκυψαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση αντιπροσωπεύονταν τρεις φορές.



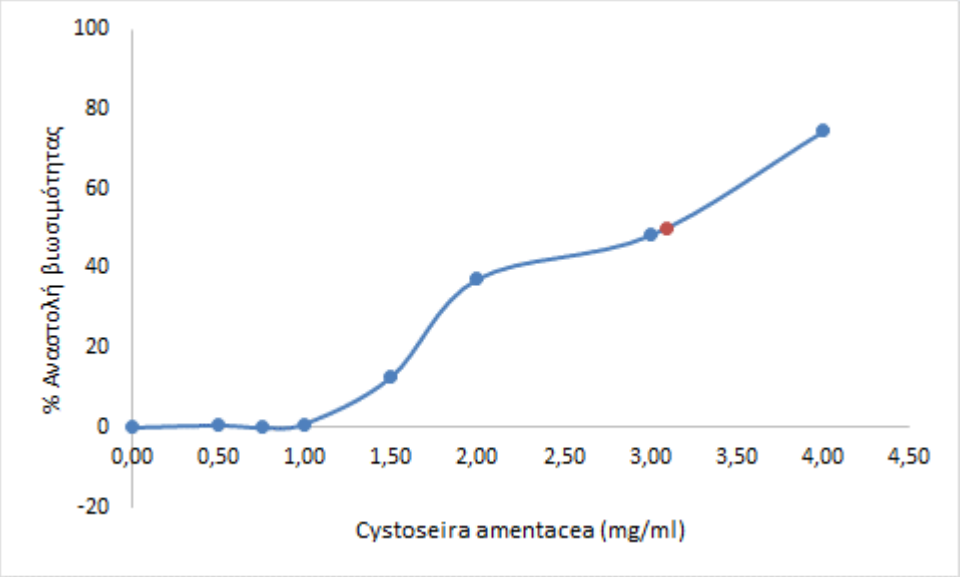
Διάγραμμα 2. Η % αναστολή βιωσιμότητας των εντερικών καρκινικών κυττάρων LS174 από το φύκος *Ulva rigida* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT. Οι τιμές προέκυψαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση αντιπροσωπεύονταν τρεις φορές.



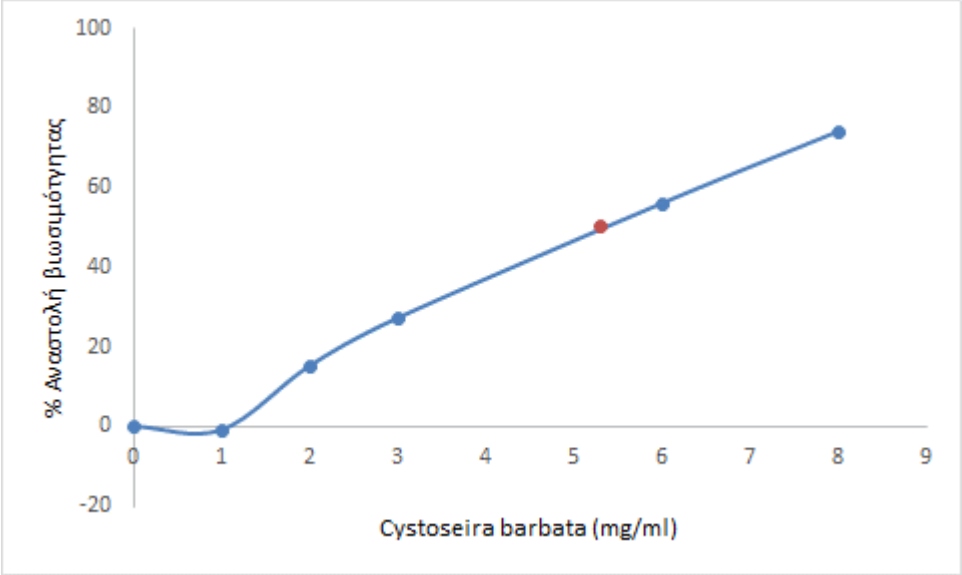
Διάγραμμα 3. Η % αναστολή βιωσιμότητας των εντερικών καρκινικών κυττάρων LS174 από το φύκος *Codium fragile* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT. Οι τιμές προέκυψαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση αντιπροσωπεύονταν τρεις φορές.



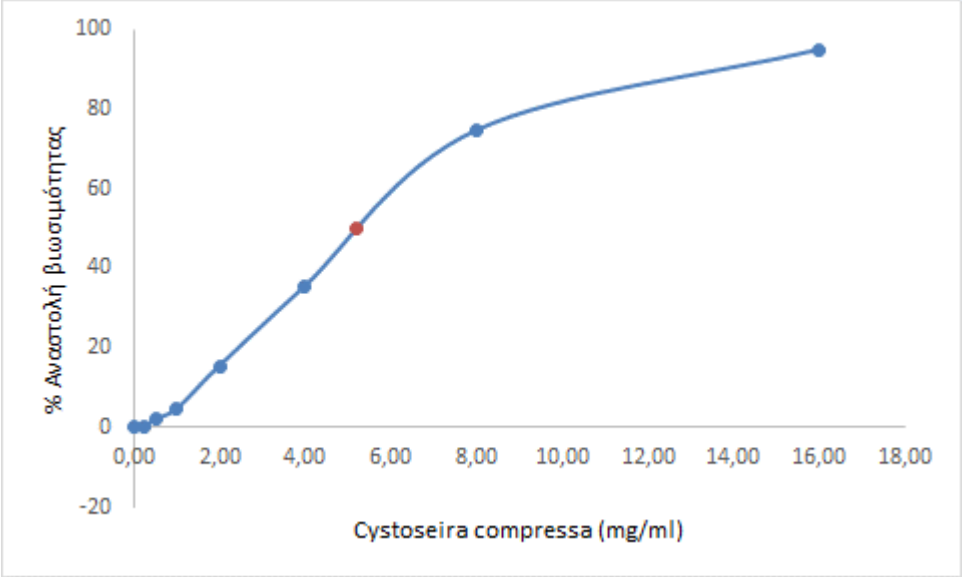
Διάγραμμα 4. Η % αναστολή βιωσιμότητας των εντερικών καρκινικών κυττάρων LS174 από το φύκος *Colpomenia sinuosa* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT. Οι τιμές προέκυψαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση αντιπροσωπεύονταν τρεις φορές.



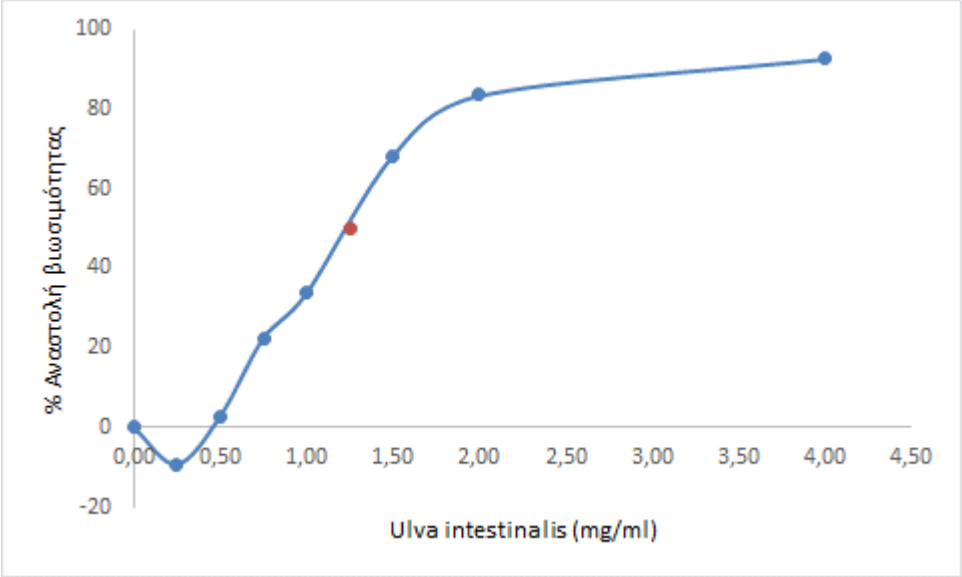
Διάγραμμα 5. Η % αναστολή βιωσιμότητας των εντερικών καρκινικών κυττάρων LS174 από το φύκος *Cystoseira amentacea* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT. Οι τιμές προέκυψαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση αντιπροσωπεύονταν τρεις φορές.



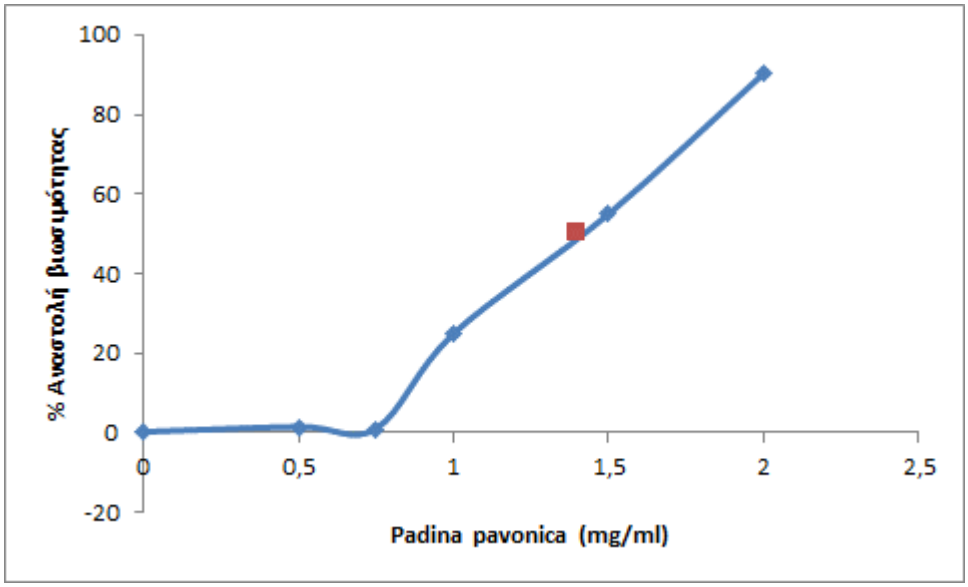
Διάγραμμα 6. Η % αναστολή βιωσιμότητας των εντερικών καρκινικών κυττάρων LS174 από το φύκος *Cystoseira barbata* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT. Οι τιμές προέκυψαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση αντιπροσωπεύονταν τρεις φορές.



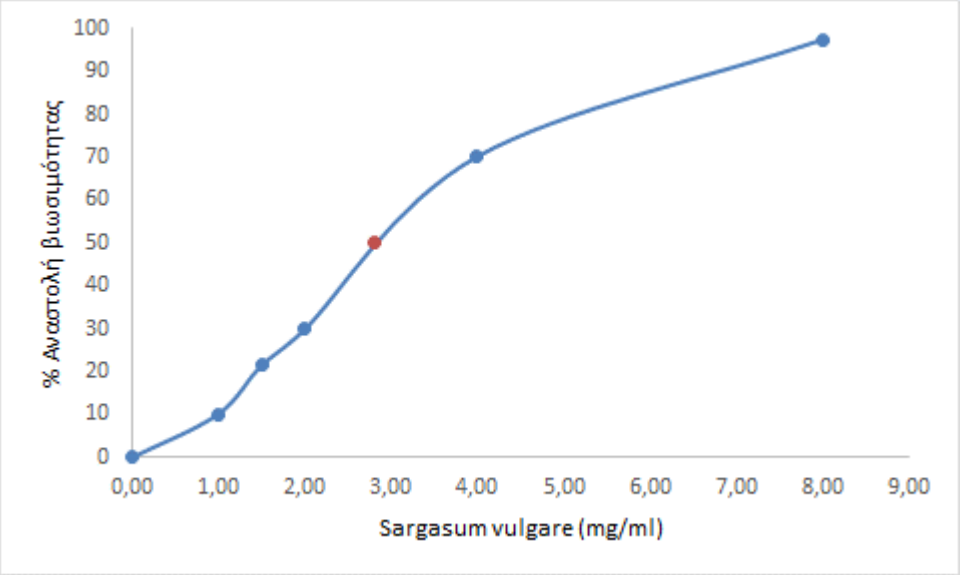
Διάγραμμα 7. Η % αναστολή βιωσιμότητας των εντερικών καρκινικών κυττάρων LS174 από το φύκος *Cystoseira compressa* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT. Οι τιμές προέκυψαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση αντιπροσωπεύονταν τρεις φορές.



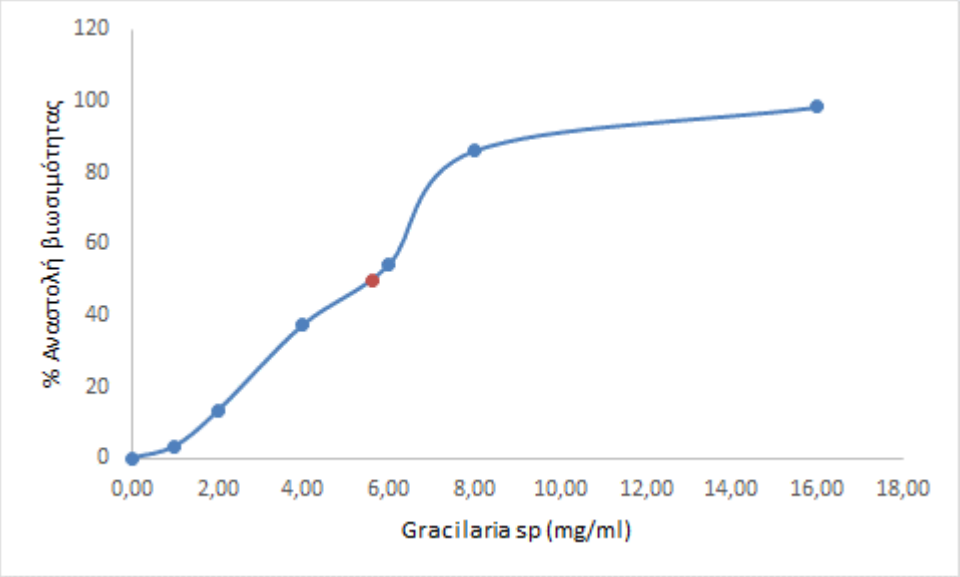
Διάγραμμα 8. Η % αναστολή βιωσιμότητας των εντερικών καρκινικών κυττάρων LS174 από το φύκος *Ulva intestinalis* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT. Οι τιμές προέκυψαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση αντιπροσωπεύονταν τρεις φορές.



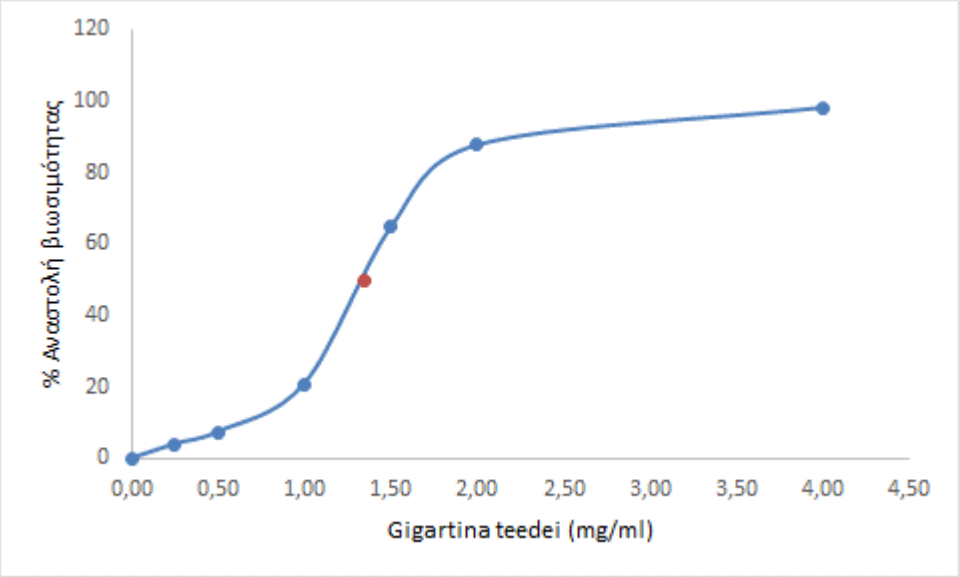
Διάγραμμα 9. Η % αναστολή βιωσιμότητας των εντερικών καρκινικών κυττάρων LS174 από το φύκος *Padina pavonica* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT. Οι τιμές προέκυψαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση αντιπροσωπεύονταν τρεις φορές.



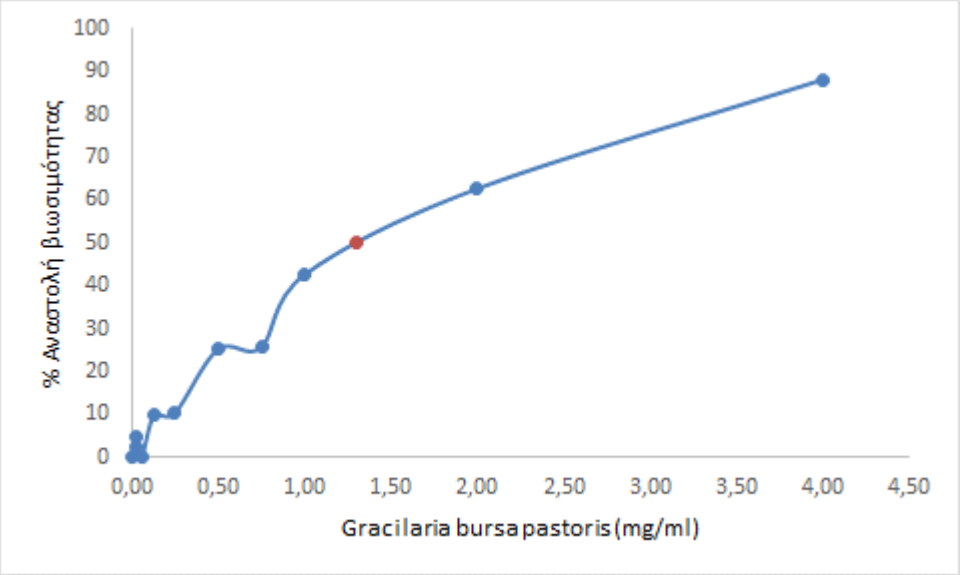
Διάγραμμα 10. Η % αναστολή βιωσιμότητας των εντερικών καρκινικών κυττάρων LS174 από το φύκος *Sargasum vulgare* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT. Οι τιμές προέκυψαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση αντιπροσωπεύονταν τρεις φορές.



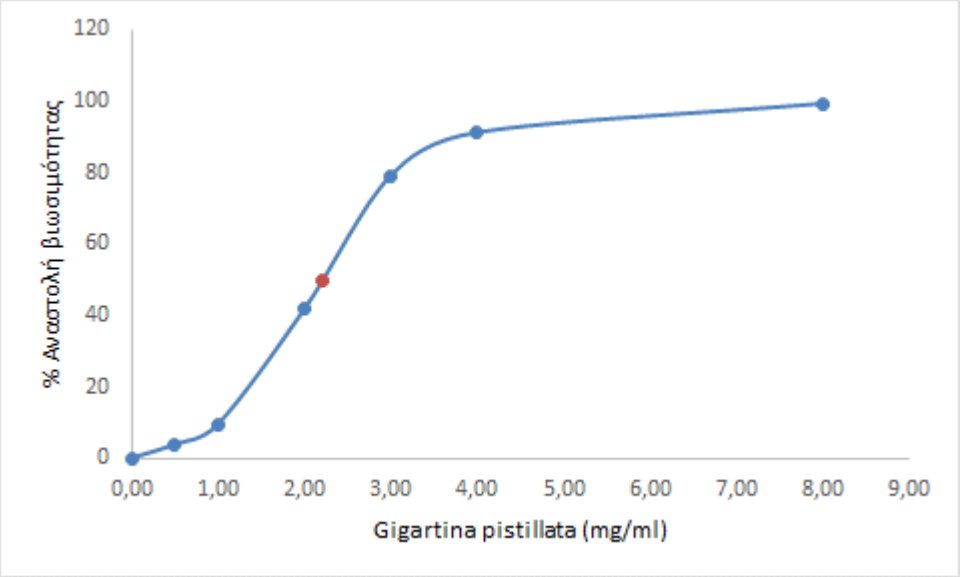
Διάγραμμα 11. Η % αναστολή βιωσιμότητας των εντερικών καρκινικών κυττάρων LS174 από το φύκος *Gracilaria sp.* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT. Οι τιμές προέκυψαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση αντιπροσωπεύονταν τρεις φορές.



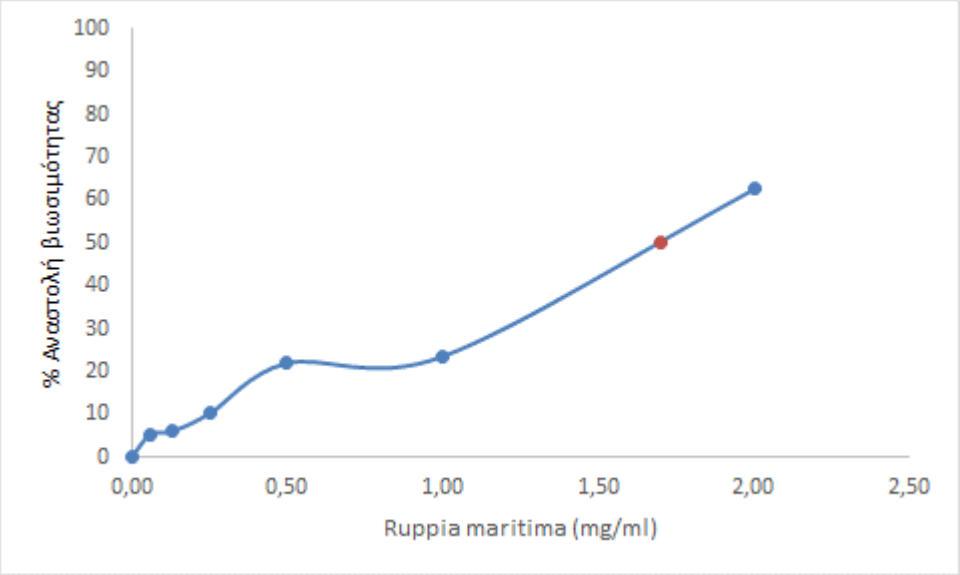
Διάγραμμα 12. Η % αναστολή βιωσιμότητας των εντερικών καρκινικών κυττάρων LS174 από το φύκος *Gigartina teedei* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT. Οι τιμές προέκυψαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση αντιπροσωπεύονταν τρεις φορές.



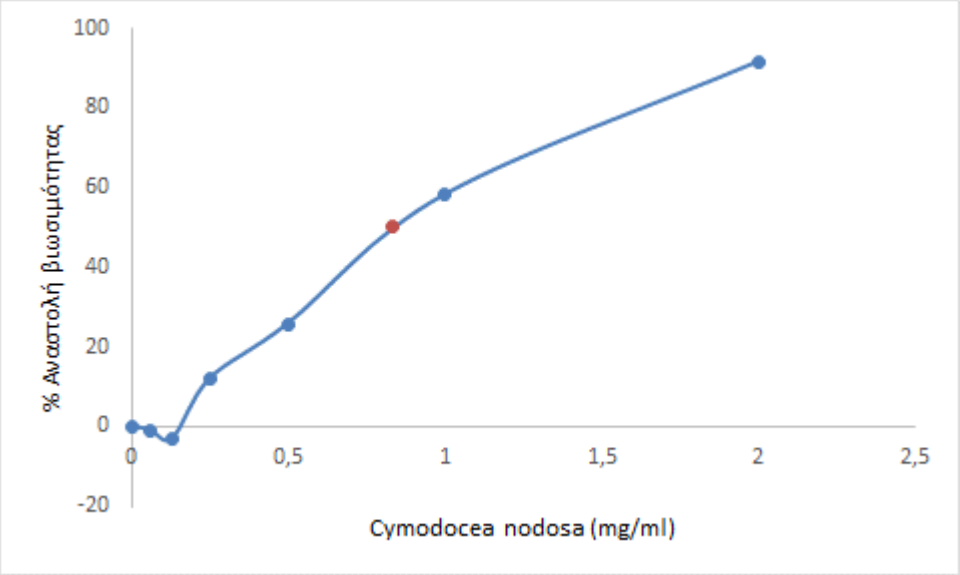
Διάγραμμα 13. Η % αναστολή βιωσιμότητας των εντερικών καρκινικών κυττάρων LS174 από το φύκος *Gracilaria bursa pastoris* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT. Οι τιμές προέκυψαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση αντιπροσωπεύονταν τρεις φορές.



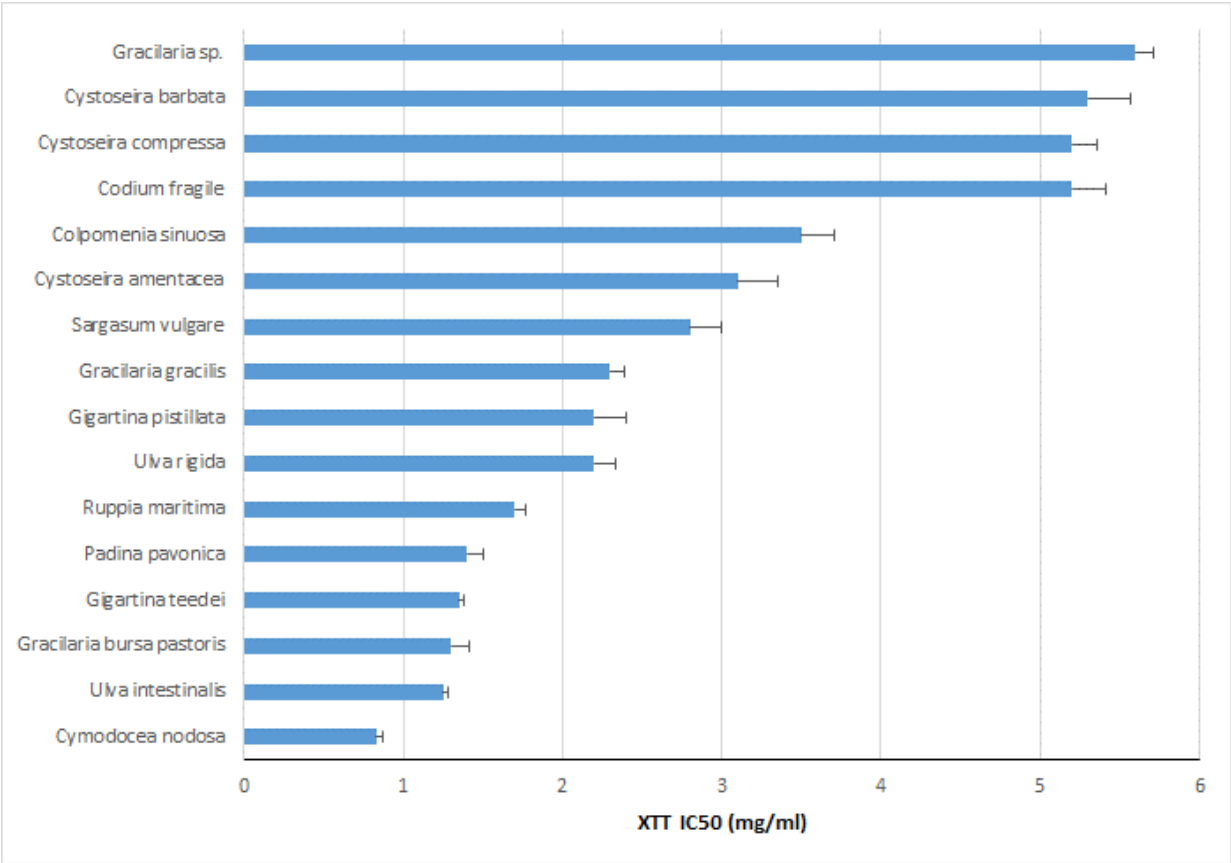
Διάγραμμα 14. Η % αναστολή βιωσιμότητας των εντερικών καρκινικών κυττάρων LS174 από το φύκος *Gigartina pistillata*. όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT. Οι τιμές προέκυψαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση αντιπροσωπεύονταν τρεις φορές.



Διάγραμμα 15. Η % αναστολή βιωσιμότητας των εντερικών καρκινικών κυττάρων LS174 από το αγγειόσπερμο *Ruppia maritima* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT. Οι τιμές προέκυψαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση αντιπροσωπεύονταν τρεις φορές.



Διάγραμμα 16. Η % αναστολή βιωσιμότητας των εντερικών καρκινικών κυττάρων LS174 από το αγγειόσπερμο *Cymodocea nodosa* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT. Οι τιμές προέκυψαν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση αντιπροσωπεύονταν τρεις φορές.



Διάγραμμα 17. Συγκεντρωτικό διάγραμμα τιμών IC_{50} της μεθόδου XTT για τον προσδιορισμό της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων LS174.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος είναι μια γενετική ασθένεια που μπορεί να επηρεάσει οποιοδήποτε μέρος του σώματος. Σημαντικό χαρακτηριστικό του αποτελεί η ταχεία δημιουργία μη φυσιολογικών κυττάρων που αναπτύσσονται, εξαιτίας της απορρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, τα οποία πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και στη συνέχεια εισβάλουν σε παρακείμενα μέρη του σώματος καθώς εξαπλώνονται σε άλλα όργανα. Αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως, με περίπου 10 εκατομμύρια θανάτους, ετησίως. Είναι ηλικιοεξαρτώμενη νόσος με το 90% των περιστατικών να παρουσιάζονται μετά την ηλικία των 50 χρόνων. Υπάρχουν πάνω από 200 τύποι καρκίνου. Οι πιο συχνοί καρκίνοι διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων χωρών, δείχνοντας πως περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση αυτής της ασθένειας.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου βρίσκεται τρίτος στην κατάταξη των διαφόρων τύπων καρκίνου, αλλά δεύτερος ως προς τη θνησιμότητα. Επίσης, έχει υψηλές πιθανότητες ίασης, όταν ανιχνεύεται έγκαιρα και φυσικά αντιμετωπίζεται με τις βέλτιστες πρακτικές. Επιπλέον, μία από τις σημαντικότερες σύγχρονες στρατηγικές αντιμετώπισης του καρκίνου θεωρείται η πρόληψή του όπως, μέσω της χημειοπροφύλαξης που γίνεται με τη χορήγηση φυτοχημικών συστατικών είτε με τη δίαιτα είτε με τη μορφή συμπληρωμάτων διατροφής. Τα αποτελέσματα και οι μηχανισμοί της χημειοπροφυλακτικής δράσης σε πειραματόζωα και ανθρώπους, έχουν γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας τα τελευταία χρόνια και ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στην χημειοπροστατευτική δράση των βρωμοφαινολών. Οι βρωμοφαινόλες είναι μια ομάδα με ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις που απομονώνονται από θαλάσσια φύκη (Liu et. al., 2012), τα οποία έχουν σημαντικές αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιβακτηριακές, καρδιοπροστατευτικές και αντιδιαβητικές ιδιότητες (Liu et. al., 2011). Οι βρωμοφαινόλες ασκούν την αντικαρκινική τους δράση με διάφορους μηχανισμούς, όπως δρώντας σε ενδιάμεσα μονοπάτια της μεταγωγής σήματος με σκοπό τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την καταστολή της καρκινογενετικής διαδικασίας (Kellof. J. et. al., 1997).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η επίδραση εκχυλισμάτων των θαλάσσιων φυκιών *Gracilaria gracilis*, *Gracilaria sp*., *Gracilaria bursa pastoris*, *Ulva rigida*, *Ulva intestinalis*, *Codium fragile*, *Colpomenia sinuosa*, Cystoseira amentacea, *Cystoseira barbata*, *Cystoseira compressa*, *Padina pavonica*, *Sargasum vulgare*, *Gigartina teedei*, και *Gigartina pistillata* και των αγγειόσπερμων *Ruppia maritima* και *Cymodocea nodosa* στην αύξηση καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου LS174. Η επίδραση στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων εξετάστηκε με τη μέθοδο XXT. Για κάθε εκχύλισμα έγιναν διαγράμματα της % αναστολής της κυτταρικής αύξησης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος, από τα οποία στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι τιμές IC_{50}, δηλαδή η συγκέντρωση όπου το εκχύλισμα αναστέλλει κατά 50% την κυτταρική αύξηση. Όσο πιο μικρή τιμή έχει το IC_{50}, τόσο πιο ισχυρή η δράση του εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα εκχυλίσματα μπορούσαν να αναστείλουν την αύξηση των καρκινικών κυττάρων με τιμές του IC_{50} που κυμαίνονταν από 0,83mg/m-5,6 mg/mL. Δηλαδή, το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν του αγγειόσπερμου *Cymodocea nodosa* και το πιο ασθενές του φύκους *Gracilaria sp*.

Από τα φύκη τα 5 πιο δραστικά εκχυλίσματα με τη μικρότερη τιμή IC_{50} ήταν τα *Ulva intestinalis* (IC_{50}:1,25mg/mL), *Gracilaria bursa pastoris* (IC_{50}:1,3mg/mL), *Gigartina teedei* (IC_{50}:1,35mg/mL) και *Padina pavonica* (IC_{50}:1,4mg/mL) και Ulva rigida (IC_{50}:2,2mg/mL). Μεταξύ των τριών ειδών του γένους Gracilaria υπήρχε μεγάλη διαφορά ανάμεσα στη δράση του πιο ισχυρού με το πιο ασθενές που έφτανε τις 4,3 φορές. Συγκεκριμένα η σειρά δραστικότητά τους ήταν: *Gracilaria bursa pastoris* (IC_{50}:1,3mg/mL)>*Gracilaria gracilis* (IC_{50}:2,3mg/mL)>*Gracilaria sp*.

(IC_{50}:5,6mg/mL). Μεταξύ των ειδών του γένους Ulva, πιο δραστικό (όπως και μεταξύ όλων των φυκών) ήταν το *Ulva intestinalis* (IC_{50}:1,25mg/mL) από το *Ulva rigida* (IC_{50}:2,2mg/mL). Από τα δύο είδη του γένους Gigartina, πιο δραστικό ήταν το *Gigartina teedei* (IC_{50}:1,35mg/mL) από το *Gigartina pistillata* (IC_{50}:2,2mg/mL). Ενώ στα τρία είδη του γένους Cystoseira η σειρά δραστικότητας ήταν *Cystoseira amentacea* (IC_{50}: 3,1mg/mL)>*Cystoseira compressa* (IC_{50}:5,2mg/mL) = *Cystoseira barbata* (IC_{50}:5,3mg/mL).

Όσον αφορά τη δραστικότητα των δύο αγγειόσπερμων, όπως αναφέρθηκε το *Cymodocea nodosa* έδειξε την πιο ισχυρή μεταξύ όλων των εξετασθέντων εκχυλισμάτων, ενώ και το εκχύλισμα του *Ruppia maritima* είχε την $6^{η}$ πιο ισχυρή δράση μεταξύ όλων των εκχυλισμάτων με τιμή IC_{50}: 1,7 mg/mL.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που εξέτασε την πιθανή αντικαρκινική δράση έναντι καρκίνου του παχέος εντέρου από εκχυλίσματα των φυκών *Gracilaria gracilis*, *Gracilaria sp.*, *Gracilaria bursa pastoris*, *Ulva rigida*, *Ulva intestinalis*, *Codium fragile*, *Cystoseira amentacea*, *Cystoseira barbata*, *Cystoseira compressa*, *Padina pavonica*, *Sargasum vulgare*, και *Gigartina teedei*, καθώς και των αγγειόσπερμων *Ruppia maritima* και *Cymodocea nodosa*. Μόνο εκχυλίσματα από τα φύκη *Coplomenia sinuosa* και *Gigartina pistillata* είχαν εξεταστεί προηγουμένως για αντικαρκινική δράση κατά του καρκίνου του παχέος εντέρου. Συγκεκριμένα, εκχύλισμα από το φύκος *Colpomenia sinuosa* ανέστειλε την αύξηση καρκινικών εντερικών κυττάρων HT29 και HCT-116 μετά από 24 ώρες επώαση με τιμή IC50 περίπου 0,08mg/mL στη μέθοδο κυτταροτοξικότητας MTT (Monla et. al., 2020). Επίσης, το εκχύλισμα μείωσε τη μετακίνηση των κυττάρων HCT-116 υποδηλώνοντας αντιμεταστατική δράση, ενώ προκάλεσε σταμάτημα των κυττάρων στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου δείχνοντας ότι δρα μέσω μοριακών μηχανισμών υπεύθυνων για το πέρασμα από τη φάση G1 στην S (Monla et. al., 2020). Επίσης, στην ίδια μελέτη φάνηκε ότι το εκχύλισμα επάγει απόπτωση στα κύτταρα HCT-116 μέσω αύξησης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης p21 και μείωση της αντι-αποπτωτικής Bcl2, καθώς και μέσω προ-οξειδωτικής δράσης (Monla et. al., 2020). Επιπλέον, από την ίδια ερευνητική ομάδα δείχτηκε ότι δύο πολυσακχαρίτες, η φουκοϊδάνη και η αλγινάτη, που απομονώθηκαν από το φύκος *Colpomenia sinuosa* ανέστειλαν την αύξηση καρκινικών εντερικών κυττάρων HCT-116 με τιμές IC50 0,62 και 0,69 mg/ml, αντίστοιχα (Monla et. al., 2022). Και σε αυτή την περίπτωση οι δύο πολυσακχαρίτες έδρασαν στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου, ενώ προκάλεσαν στα κύτταρα οξειδωτικό στρες (Monla et. al., 2022). Επιπλέον, καραγενάνες που απομονώθηκαν από το φύκος *Gigartina pistillata* ανέστειλαν την αύξηση καρκινικών εντερικών κυττάρων HT29, HCT116, SW480 και SW620 με τιμές IC50 από 0,15 έως 0,7 μg/ml (Cotas et. al., 2020).

Σε άλλες μελέτες εκχυλίσματα από ορισμένα από τα είδη φυκών που εξετάστηκαν έχουν αναφερθεί να ασκούν αντικαρκινική δράση έναντι άλλων τύπων καρκίνου εκτός του εντέρου. Για παράδειγμα, πολυσακχαρίτες από το είδος *Codium fragile* ανέστειλαν τη διήθηση των κυττάρων του καρκινώματος Lewis στους πνεύμονες (Yuhua Wang et. al., 2021). Επίσης, εκχύλισμα από το φύκος *Ulva intestinalis* ανέστειλε την αύξηση καρκινικών ηπατικών κυττάρων $HepG_2$ με IC_{50}: 23,2 μg/ml. (Nazarudin et. al., 2020).

Βέβαια για να εξακριβωθεί η αντικαρκινική δράση των εξετασθέντων ειδών φυκών απαιτούνται και άλλες μελέτες που θα διερευνήσουν τους μηχανισμούς δράσης τους, καθώς και τα επίπεδα ανεκτικότητάς τους από τον ανθρώπινο οργανισμό.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alberts Bruce, Dennis Bray, Karel Hopkin et. al., Introduccion a la Biologia Celular, 2006
- Ασανάκη Ασπασία, Μάτη Ευαγγελία, 2008, Καρκίνος του παχέος εντέρου.
- Σάμπαλης Χ. Γ., 2012. Καρκίνος Παχέος Εντέρου.
- Δοξάκης Ανεστάκης, Αθηνά Διμοσιάρη, Τζελέπης Δημήτριος, Δάκης Κωνσταντίνος, Ιακωβίδου-Κυρίτση Ζαφιρούλα, Colon Cancer: An epidemiological study in Nothern Greece, 2010.
- Hamilton S. R et al: Carcinoma of Colon and rectum στο WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Lyon, France: IARC Press; 2010:132-146
- Williams G, Quirke P, Shepherd, 2007 Dataset for Colorectal Cancer
- Παναγιώτης Γλέντης, 2011, Καρκίνος Παχέος Εντέρου και Ορθού.
- Παπτής Χαρίλαος, 2003, Καρκίνος του παχέος εντέρου.
- Sporn M. B., 1976 Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. Cancer research 2699-2702.
- Steward W., Brown K., 2013, Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. British journal of cancer 1-7
- Κωνσταντίνου Α., 2008, Νέες εξελίξεις στην πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου.
- Shukla Y, Kumar Pal, 2004, Dietary cancer chemoprevention: An overview. Inter J Jum Gen, 4: 265-276.
- Surch Y, 2003, Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev Cancer, 3:768-800.
- De Flora S., Izzotti A., D' Agostini F., Balansky R. M., Noonan D., Albini A., 2001, Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. Mutat Res. 480-481:9-22.
- Smith JJ., Tully P., Padberg R. M., 2005, *Chemoprevention: A primary cancer precention strategy*. Sem Oncol Nurs, 21: 243-251.
- Shereiqi I., Reddy P., Brenner D. E., 2000, *Chemoprevention: general perspective*. Crit Rev Oncol Hem, 33: 157-167.
- De Flora S., Ferguson L., 2005, *Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents*. Mut Res, 591: 8-15.
- Wattenberg L. W., 1985, Chemoprevention of cancer Cancer Res, 45:1-8.
- Κουρέτας Δ., 2003, *Βιοχημική Τοξικολογία*.
- Hartman P.E., Shankel D.M., 1990, *Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules,* Environ Mol Mutagen, 15: 145-182.
- Mirvish S.S., 1981, Ascorbic acid inhibition of N-nitroso compound formation in chemical, food and biological systems. In: Inhibition of tumor induction and development.
- Huang MT., Lysz T., Ferraro T., Abidi TF., Laskin JD., Conney AH., 1991, Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis, Cancer Res. 51:813-819
- Kelloff G.J., Boone C.W., Steele V.E., Ray JR, Sigman C.C., 1997, Inhibition of chemical carcinogenesis. In: Chemical induction of cancer modulation and combination of effects.
- Jordan V.C., 1992, The strategic use of antiestrogens to control the development and growth of breast cancer. *Cancer.* 977-982.
- Elson C., Maltzman T., Boston J., Tanner M., Gould M., 1998, Anti-carcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 9:331-332.

- Zhang L., Cooney R., Bertram J., 1991, Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis.* 12:2109-2114.
- Hill D., Grubbs C., 1992, Retinoids and cancer prevention. 12:161-181.
- Νακοπούλου Λ, Μιχαλοπούλου Α., 1997, ΄΄Απόπτωση, καρκίνος και θεραπεία.΄΄, Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής 11:6-14.
- Zhu J., Chen Z., Lallemand-Breitenbach V., de The H., 2002, How acute promyelocytic leukaemia revived arsenic., Nature Reviews Cancer 2:705-713.
- Wainfain E, Poirier A., 1992, Methyl groups in carcinogenesis: effects of DNA methylation and gene expression Cancer Res, 52: 2071-2077.
- Kennedy AR., 1998, Chemopreventive agents: protease inhibitors. Pharmacol, Ther. 78:167-209.
- Reddy B., Maruyama H, Kelloff G., 1987, Dose-related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development. *Cancer Res.* 47:5340-5346.
- Huang M., Lysz T, Ferraro T, Abidi T., Laskin J., Conney A., 1991, Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res.* 51:813-819.
- Ning Wu, Jiao Luo, Bo Jiang, Lijun Wang, Shuaiyu Wang, Changhui Wang, Changqing Fu, Jian Li, Dayong Shi, 2015, Marine Bromophenol Bis (2,3-Dibromo-4,5-dihydroxyphenyl)-methane inhibits the Proliferation, Migration, and invasion of Hepatocellular Carcinoma Cells via Modulating β1-Integrin/FAK Signaling.
- Hui Dong, Songtao Dong, Poul Erik Hansen, Dimitrios Stagos, Xiukun Lin, Ming Liu, 2020, Progress of Bromophenols in Marine Algae from 2011 to 2020: Structure, Bioactivities, and Applications.
- Yuhua Wang, Eun-Koung An, So-Jung Kim, Sang Guan You, Jun-O Jin, 2021, Intranasal Administration of Codium fragile Polysaccharide Elicits Anti-Cancer Immunity against Lewis Lung Carcinoma.
- Joao Cotas, Vanda Marques, Marta B. Afonso, Cecilia M. P. Rodrigues, Leonel Pereira, 2020, Antitumour Potential of Gigartina pistillata Carrageenans against Colorectal Cancer Stem Cell-Enriched Tumourspheres.
- Reem Al Monla, Zeina Dassouki, Nouha Sari-Chmayssem, Hiba Mawlawi, Hala Gali-Muhtasib, 2022, Fucoidan and Alginate from the Brown Algae Colpomenia sinuosa and their Combination with Vitamin C Trigger Apoptosis in Colon Cancer.
- Muhammad Farhan Nazarudin, Azizul Isha, Siti Nurulhuda Mastuki, Nooraini Mohd. Ain, Natrah Fatin MohdIkhsan, Atifa Zainal Abidin, Mohammed Aliyu-Paiko, 2020, Chemical Composition and Evaluation of the α-Glucosidase Inhibitory and Cytotoxic Properties of Marine Algae Ulva intestinalis, Halimeda macroloba, and Sargassum ilicifolium.
- Reem Al Monla, Zeina Dassouki, Achraf Kouzayha, Yahya Salma, Hala Gali-Muhtasib, Hiba Mawlawi, 2020, The Cytotoxic and Apoptotic Effects of the Brown Algae Colpomenia sinuosa are Mediated by the Generation of Reactive Oxygen Species.