



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

## **Ο ρόλος της κυκλοξυγενάσης στην πειραματική καρκινογένεση**

**ΑΝΤΩΝΙΟΣ - ΔΗΜΟΣΘΕΝΗΣ Κ. ΚΑΛΚΙΝΗΣ  
ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

## **Ο ρόλος της κυκλοξυγενάσης στην πειραματική καρκινογένεση**

**ΑΝΤΩΝΙΟΣ - ΔΗΜΟΣΘΕΝΗΣ Κ. ΚΑΛΚΙΝΗΣ  
ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014**



« Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού τμήματος)»



Ημερομηνία αίτησης του κ. Καλκίνη Αντώνιου: 4-2-2010

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 677<sup>α</sup>/9-2-2010

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Καρκαμπούνας Σπυρίδων Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ανωγειανάκης Γεώργιος Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 10-3-2010

«Ο ρόλος της κυκλοοξυγενάσης στην πειραματική καρκινογένεση».

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ** : 763<sup>α</sup>/10-4-2014

<b>Ανωγειανάκης Γεώργιος</b>	Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
<b>Ευαγγέλου Άγγελος</b>	Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Καλφακάκου Βασιλική</b>	Καθηγήτρια Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Κουτσονικόλας Δημήτριος</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
<b>Γιαγκούρας Ιωάννης</b>	Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
<b>Καρκαμπούνας Σπυρίδων</b>	Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Πέσχος Δημήτριος</b>	Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην κυτταρική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 9-5-2014

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Ανδρέας Φωτόπουλος**

Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής

Η Γραμματέας του Τμήματος



**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ**





Στους γονείς μου και στον αδελφό μου



# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η κυριότερη αιτία θανάτου είναι ο καρκίνος και ακολουθούν οι καρδιαγγειακές παθήσεις. Ανάμεσα στις κατηγορίες των αντικαρκινικών φαρμάκων που έχουν δοκιμαστεί, τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη κατέχουν πρωτεύοντα ρόλο ενώ τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σαφές ότι η δίαιτα παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Ωστόσο, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ δίαιτας και μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων συνεχίζουν να είναι ουσιαστικά αχαρτογράφητες, αν και σημαντική πρόοδος έχει γίνει στον τομέα αυτό τα τελευταία χρόνια

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η θεραπευτική δράση των αναστολέων της κυκλοοξυγενάσης (COX), σε πειραματικό μοντέλο καρκίνου με επίμυες, καθώς υποστηρίζεται ότι οι αναστολείς της κυκλοοξυγενάσης (είτε μόνοι τους, είτε σε συνδυασμό με την ασπιρίνη) έχουν έμμεση αντιογκογόνο και αντιαγγειογόνο δράση. Έγινε επίσης προσπάθεια να χαρτογραφηθεί, έστω αδρά, ο ρόλος της διατροφής στον καρκίνο, καθώς και να ανιχνευτεί ο τυχόν ρόλος των ογκογονιδίων p53, και Bcl-2.

Θεωρώ υποχρέωση μου να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους για την πολύτιμη συμβολή τους στην εκπόνηση αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Κατ' αρχήν θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της παρούσας διατριβής, καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Άγγελο Ευαγγέλου για την πολύτιμη συμβολή του στη διαμόρφωση της παρούσας διατριβής αλλά και για την παραχώρηση των πειραματόζων καθώς και των εγκαταστάσεων του Πειραματικού Εργαστηρίου της Φυσιολογίας, όπου πραγματοποιήθηκε μεγάλο μέρος του πειραματικού σκέλους της διατριβής.

Επίσης ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Ανωγειανάκη, Καθηγητή της Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τη συνδρομή του στο πειραματικό σκέλος της διατριβής, ο οποίος με την επιστημονική του ακτινοβολία αποτελεί οδηγό για εμάς τους νεαρότερους επιστήμονες και μάλιστα οι συμβουλές του ήταν πολύτιμες κατά την εξέλιξη της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ, επίσης, το τρίτο μέλος της τριμελούς επιτροπής επίκουρο καθηγητή του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Σπυρίδωνα Καρκαμπούνα για τις χρήσιμες συμβουλές και κατευθύνσεις που μου έδωσε καθ' όλη τη διάρκεια τόσο του πειραματικού μέρους, όσο και της συγγραφής της πειραματικής αυτής μελέτης.

Τέλος, όσον αφορά τους συναδέλφους ιατρούς και το προσωπικό των Εργαστηρίων όπου εργάστηκα, δηλαδή τόσο του Εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων όσο και του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, τους ευχαριστώ όλους από βάθους καρδιάς για την Αμέριστη συμπαράστασή τους, Ιδιαίτερα ευχαριστώ συναδέλφους ιατρούς Δρ. Χρήστο Πιτσαλίδη, Δρ. Στράτο Θεοφιλογιαννάκο και Δρ. Αντωνία Ανωγειανάκη για την βοήθεια που μου παρείχαν σε όλη τη διάρκεια εκτέλεσης των πειραμάτων και τις συμβουλές τους. Επίσης, ιδιαίτερα ευχαριστώ τη συνάδελφο κ. Βασιλική Κεφαλά, πρώην ΕΔΤΠ του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για την πολύτιμη βοήθεια της κατά την πειραματικό μέρος της εργασίας καθώς και τις κυρίες Κατερίνα Καλαμπαλίκη για την υποστήριξή της στο πειραματικό μέρος και Γεωργία Χιτζίδου για την υποστήριξή της στο συγγραφικό έργο. Τέλος ευχαριστώ την Διευρωπαϊκή Ένωση για την Εκπαίδευση στη Βιοϊατρική Τεχνολογία για την Τεχνική Υποστήριξη και την παροχή Τεχνογνωσίας ιδιαίτερα στη σήμανση των Πειραματόζων.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Κεφάλαιο	Σελίδα
<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>		1
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>		3
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>		7
Σκοπός της διατριβής		15
Περιγραφή Γενικού Μέρους		16
Περιγραφή Ειδικού Μέρους		17
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>		19
<b>ΤΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b>		21
<b>Η ΠΡΟΚΛΗΤΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΩΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΛΕΙΟ</b>		25
Πειραματόζωα: Οι επίμυες στην πειραματική καρκινογένεση		25
Χημικά Καρκινογόνα		28
Η πειραματική καρκινογένεση με χορήγηση 1,2-διμέθυλυδραζίνης (DMH)		30
Η πειραματική καρκινογένεση με χορήγηση 7,12-διμεθυλοβενζ-(α)- ανθρακένιου (DMBA)		31
Μηχανισμός δράσης των Χημικών Καρκινογόνων και παθογένεση		32
Ο ρόλος της απενεργοποίησης του p53 και ο ρόλος της Bcl-2 στην απόπτωση		33
<b>ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ</b>		35
Γενικά		35
Ο ρόλος του λίπους της διατροφής στην καρκινογένεση		37
Ο ρόλος των πρωτεϊνών της διατροφής στην καρκινογένεση		39
Ο ρόλος των φυτικών ινών της διατροφής στην καρκινογένεση		40

<b>Ο ρόλος των ανόργανων στοιχείων της διατροφής στην καρκινογένεση</b>	<b>42</b>
Ο ρόλος του Σεληνίου στην καρκινογένεση	42
Ο ρόλος του Ασβεστίου στην καρκινογένεση	44
Ο ρόλος του Σιδήρου στην καρκινογένεση	44
Η Σχέση $K^+/Na^+$ και ο ρόλος της στην καρκινογένεση	45
Ο ρόλος των βιταμινών στην καρκινογένεση	46
<b>ΑΣΠΙΡΙΝΗ, ΜΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ (ΜΣΑΦ – NSAIDs) ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ</b>	<b>47</b>
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>53</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>55</b>
<b>Δίαιτα, Celecoxib και DMBA</b>	<b>57</b>
<b>Ασπιρίνη, Celecoxib και DMBA</b>	<b>73</b>
<b>P53 και Bcl</b>	<b>79</b>
Απομόνωση του DNA	79
Ταυτοποίηση του p53	79
Ταυτοποίηση του Bcl-2	80
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>83</b>
<b>Πρώτο πειραματικό πρωτόκολλο: Δίαιτα, Celecoxib και DMBA</b>	<b>83</b>
<b>Δεύτερο πειραματικό πρωτόκολλο: Ασπιρίνη, Celecoxib και DMBA</b>	<b>95</b>
<b>Αποτελέσματα της διερεύνησης για το p53</b>	<b>97</b>
<b>Αποτελέσματα της διερεύνησης για το Bcl-2</b>	<b>97</b>

<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>99</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>105</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>109</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>112</b>





## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κυριότερη αιτία θανάτου είναι ο καρκίνος και ακολουθούν οι καρδιαγγειακές παθήσεις<sup>1</sup>. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (U.S.A.), ένας (1) στους δύο (2) άνδρες και μία (1) στις τρεις (3) γυναίκες, θα προσβληθούν από καρκίνο κατά τη διάρκεια της ζωής τους (1)<sup>2</sup>.

Όσον αφορά τον καρκίνο, οι μελέτες ταξινομούνται σε τρεις μεγάλες ομάδες:

- I) τις αιτιολογικές
- II) τις επιδημιολογικές και
- III) τις θεραπευτικές

<sup>1</sup><http://www.onco.gr/documents/Papadaku.pdf>

<sup>2</sup> Τα στοιχεία προέρχονται από την SEER Cancer Statistics Review, 1973-1996. Bethesda, MD: National Cancer Institute 1999. Οι Ετήσιοι Στατιστικοί Πίνακες για την Αξιολόγηση του Καρκίνου Αξιολόγηση (CSR) περιέχουν στατιστικά στοιχεία για τη συχνότητα εμφάνισης, τη θνησιμότητα, τον επιπολασμό και την επιβίωση από το 1975 μέχρι το πιο πρόσφατο έτος για το οποίο υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία. Η έκθεση αυτή δημοσιεύεται από την Εποπτεύουσα Αρχή του Προγράμματος Ερευνών του Εθνικού Ινστιτούτου για τον Καρκίνο των ΗΠΑ. Ο σκοπός των CSR ορίζεται από την έκθεση προς την Επιτροπή Πιστώσεων της Γερουσίας των ΗΠΑ στην οποία έγινε η πρόταση πως το Αμερικανικό κοινό οφείλει να ενημερώνεται τακτικά για την κατάσταση της μάχης εναντίον του καρκίνου. Το πρόγραμμα SEER που συντάσσει τους πίνακες CSR είναι μια έγκυρη πηγή πληροφοριών σχετικά με την επίπτωση του καρκίνου και την επιβίωση (όσον αφορά στις ΗΠΑ). Το πρόγραμμα SEER συλλέγει και δημοσιεύει στατιστικές αυτές από πληθυσμιακά μητρώα που καλύπτουν το 26% του πληθυσμού των ΗΠΑ. Τα 17 μητρώα που παρακολουθεί το πρόγραμμα SEER συλλέγουν συστηματικά δεδομένα σχετικά με τα δημογραφικά στοιχεία του ασθενούς, το κύριο σημείο εμφάνισης του όγκου, τη μορφολογία του όγκου, την έκταση της νόσου, την πορεία της αρχικής θεραπείας και καταγράφουν ενεργά τη ζωτική κατάσταση των ασθενών με καρκίνο.

- I) Οι αιτιολογικές μελέτες, περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα μελετών όσον αφορά τα φυσικά αίτια πρόκλησης της νόσου και σε αυτές εμπεριέχονται τόσο πειραματικές όσο και κλινικές προσεγγίσεις της αιτιολογίας της νόσου. Μέχρι και το πρόσφατο ακόμη παρελθόν, οι αιτιολογικές μελέτες ήταν ιδιαίτερα περιορισμένες και κυρίως αφορούσαν την προσπάθεια αναγνώρισης των φυσικών, πρωτίστως, παραγόντων που προάγουν την καρκινογένεση. Ωστόσο, με την ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας, την πρόοδο που έχει σημειωθεί στην κλασσική αλλά κυρίως στη μοριακή γενετική, καθώς και την «έκρηξη» της γνώσης μας πάνω σε θέματα όπως η βιοχημεία, η φυσιολογία, η ανοσολογία κλπ, οι αιτιολογικές μελέτες έχουν μετατραπεί στην αιχμή του δόρατος της μάχης κατά του καρκίνου.
- II) Οι επιδημιολογικές μελέτες αφορούν τόσο την προσπάθεια κατανόησης και παρακολούθησης των τάσεων εμφάνισης της νόσου και κυρίως των επιπτώσεων της νόσου και της θνησιμότητας που αυτή προκαλεί, όσο και την αναγνώριση των παραγόντων εκείνων που είτε προκαλούν είτε αναστέλλουν την ανάπτυξη του καρκίνου.
- III) Οι θεραπευτικές μελέτες αφορούν την αναζήτηση θεραπευτικών μεθόδων αντιμετώπισης του καρκίνου. Ο ορισμός του πεδίου εφαρμογής τους ή καλύτερα του αντικειμένου και των μεθόδων τους, είναι πολύ δύσκολος εξ' αιτίας της πολυμορφικής μορφής της νόσου. Πράγματι, ο καρκίνος, ακόμη και αν έχει μία συγκεκριμένη αιτιολογία (π.χ. οφείλεται σε ένα συγκεκριμένο ογκογονίδιο) ή αίτιο πρόκλησης (π.χ. μία συγκεκριμένη καρκινογόνο ουσία), από τη στιγμή που θα προκληθεί, επιδρά στον ασθενούντα οργανισμό μέσω μιας ποικιλίας μεταβολικών και ρυθμιστικών κυκλωμάτων, οπότε και προκαλεί την υποστροφή υγείων κυττάρων σε πιο αρχέγονες τους μορφές. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα είναι συνήθως λιγότερο διαφοροποιημένα από τα υγιή. Με τον τρόπο αυτό ανοίγει μια ποικιλία μελλοντικών εξελικτικών πιθανοτήτων για τα καρκινικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό, στις θεραπευτικές μελέτες περιλαμβάνονται τόσο οι εργαστηριακές μελέτες, που αφορούν την αναζήτηση θεραπευτικών ή αντικαρκινικών, γενικά, ουσιών (δηλαδή μελέτες που σε κάποιο βαθμό αποτελούν συνέχεια των αιτιολογικών μελετών), όσο και

κλινικές μελέτες (δηλαδή μελέτες που σε κάποιο βαθμό θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως «πειραματικές» επιδημιολογικές μελέτες. Οι μελέτες αυτές «βασίζονται είτε στο άτομο είτε στην ομάδα και πλησιάζουν περισσότερο στα εργαστηριακά πειράματα, λόγω του ότι οι συνθήκες κάτω από τις οποίες διεξάγονται ελέγχονται από τον ερευνητή<sup>3</sup>» και μάλιστα πραγματοποιούνται σε ανθρώπους μόνο «αν υπάρχουν αποδείξεις ότι ο υπό μελέτη παράγοντας προστατεύει έναντι του καρκίνου<sup>4</sup>», ενώ «στην πράξη χρησιμοποιούνται μόνο για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας διαφόρων θεραπευτικών πρωτοκόλλων ή προληπτικών μέτρων<sup>5</sup>»).

Τόσο η επίπτωση του καρκίνου όσο και η θνησιμότητα από τον καρκίνο αυξάνονται θεαματικά με την πάροδο της ηλικίας (διάγραμμα 1). Η αύξηση αυτή είναι τόσο μεγάλη που περισσότερο από το ογδόντα τοις εκατό (80%) των διηθητικών καρκίνων συμβαίνει σε άτομα ηλικίας άνω των πενήντα πέντε ετών. Παράλληλα, έχει υπολογιστεί ότι ο χρόνος που απαιτείται έτσι ώστε τα υγιή κύτταρα να αποκτήσουν τις γενετικές μεταλλάξεις που οδηγούν στην ανάπτυξη του καρκίνου ανέρχεται σε δέκα χρόνια. Το γεγονός αυτό προκύπτει άμεσα από την προοδευτική αύξηση της επίπτωσης του καρκίνου και της θνητότητας από καρκίνο μετά τα δέκα πρώτα χρόνια της ζωής<sup>6</sup>, όπως φαίνεται

<sup>3</sup><http://www.onco.gr/documents/Papadaku.pdf>

<sup>4</sup><http://www.onco.gr/documents/Papadaku.pdf>

<sup>5</sup><http://www.onco.gr/documents/Papadaku.pdf>

<sup>6</sup>Centers for Disease Control and Prevention. The National Programme of Cancer Registries: At-A-Glance, 1998. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 1998 (Τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης των Ασθενειών - Εθνικό Πρόγραμμα κατά του Καρκίνου ή «Τι είναι τα Μητρώα Καρκίνου 'με μια ματιά'»: Τα δεδομένα που συλλέγονται από τα τοπικά μητρώα καρκίνου επιτρέπουν στους επαγγελματίες της δημόσιας υγείας να κατανοήσουν και να αντιμετωπίσουν το βάρος του καρκίνου πιο αποτελεσματικά. Τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης των Ασθενειών (Centers for Disease Control and Prevention ή CDC) παρέχουν υποστήριξη στις πολιτειακές υπηρεσίες Δημόσιας Υγείας ώστε να διατηρούν τα απαραίτητα μητρώα από όπου αντλούνται δεδομένα υψηλής ποιότητας. Οι παρακάτω ιστότοποι περιγράφουν αναλυτικά τις παραπάνω υπηρεσίες:

και στο διάγραμμα 1. Έτσι, τυχόν καρκίνοι που διαγιγνώσκονται σε ηλικία μικρότερη των πέντε (<5) ετών, θεωρείται ότι οφείλονται σε γενετικές μεταλλάξεις που είτε κληρονομήθηκαν, είτε έλαβαν χώρα στην ενδομήτρια ζωή. Για τους ίδιους λόγους, δηλαδή για το ότι ο χρόνος που απαιτείται για τα υγιή κύτταρα να αποκτήσουν τις γενετικές μεταλλάξεις που οδηγούν στην ανάπτυξη του καρκίνου ανέρχεται σε δέκα χρόνια, αλλά και επειδή δεν φαίνεται πως υπάρχει κάποιος μηχανισμός που να αντιστρατεύεται στις τυχόν καρκινικές μεταλλάξεις και ο οποίος να ενεργοποιείται μετά την Τρίτη ηλικία (δηλαδή τις ηλικίες >65 ετών), η μείωση της εμφάνισης καρκίνου, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 1, μετά την ηλικία των ογδόντα τεσσάρων ετών, θεωρείται ότι οφείλεται, στην πλημμελή διερεύνηση για διάγνωση, που γίνεται στα άτομα της λεγόμενης «τέταρτης ηλικίας».

Εκτός από τη σχέση της ηλικίας με την συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου, υπάρχει σοβαρή συσχέτιση της ηλικίας με τους τύπους των καρκίνων που εμφανίζονται καθώς και με τη συχνότητά τους. Αυτό προκύπτει από τις αλλαγές που παρατηρούνται στην κατάταξη των πιο κοινών θανατηφόρων καρκίνων στις διάφορες ηλικίες, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες (Landis SH και συν., 1999). Έτσι, μέχρι την ηλικία των δεκαεννέα ετών, τέσσερις μορφές θανατηφόρου καρκίνου είναι περισσότερο συχνές:

1. η λευχαιμία
2. ο καρκίνος του εγκεφάλου και του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) γενικότερα
3. ο καρκίνος των οστών και
4. ο καρκίνος του ενδοκρινικού συστήματος

---

<http://apps.nccd.cdc.gov/uscs/>

<http://www.cdc.gov/cancer/npcr/training/ccr.htm>

<http://www.cdc.gov/cancer/npcr/tools.htm#NPCRData>

[http://apps.nccd.cdc.gov/dcpc\\_Programs/default.aspx?NPID=3](http://apps.nccd.cdc.gov/dcpc_Programs/default.aspx?NPID=3)

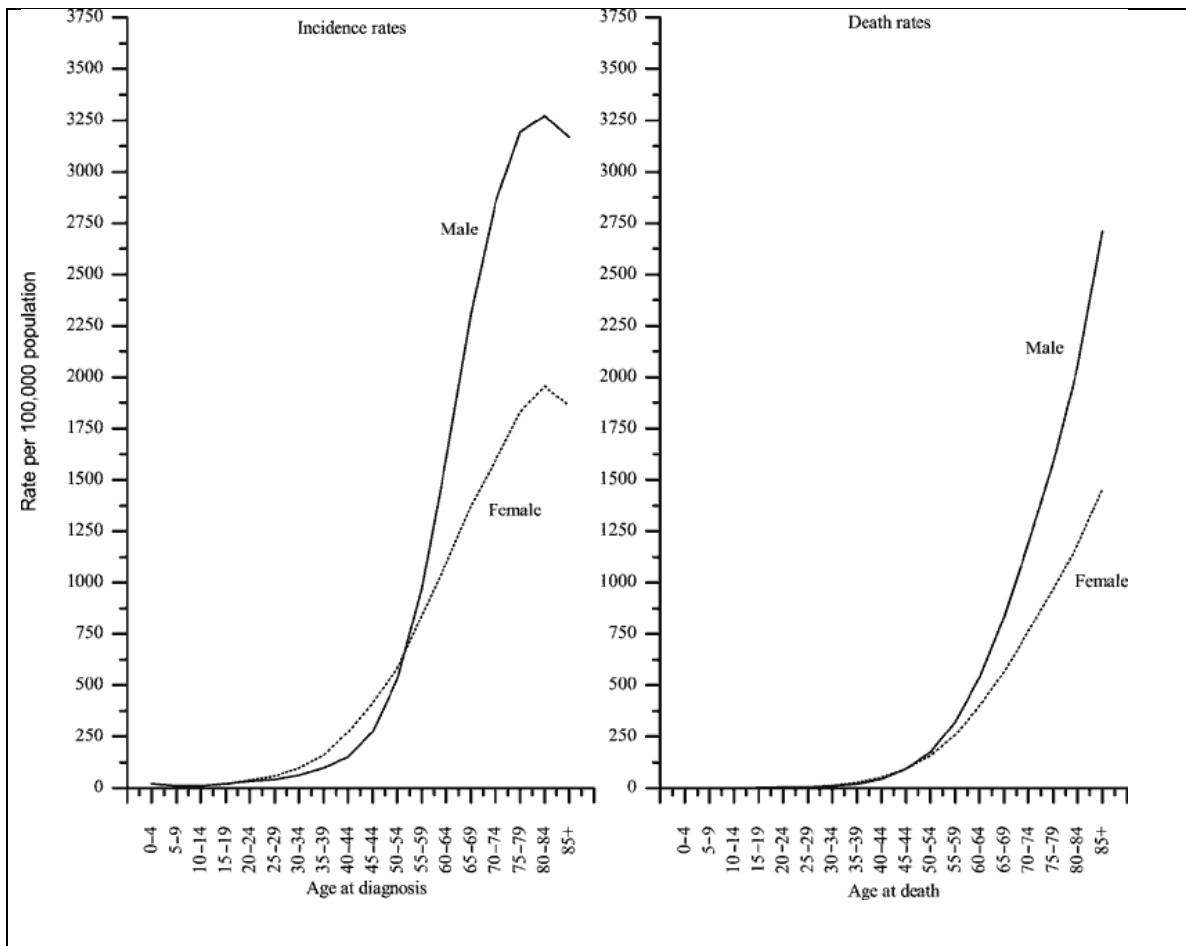
[http://www.cdc.gov/chronicdisease/resources/publications/aag/pdf/2011/cancer\\_2011\\_success\\_stories\\_508.pdf](http://www.cdc.gov/chronicdisease/resources/publications/aag/pdf/2011/cancer_2011_success_stories_508.pdf)

<http://www.cdc.gov/cancer/index.htm>

Πρέπει να σημειωθεί ότι η σειρά της συχνότητας εμφάνισης των παραπάνω καρκίνων διαφέρειελάχιστα μεταξύανδρώνκαι γυναικών.

Μετά την ηλικία των σαράντα(40) ετών, οι τέσσερις (4) πιο κοινέςμορφέςκαρκίνουείναι:

1. ο καρκίνος τωνπνευμόνων
2. ο καρκίνος του μαστού
3. ο καρκίνος του προστάτη και
4. ο καρκίνος του παχέοξεντέρου -ορθού



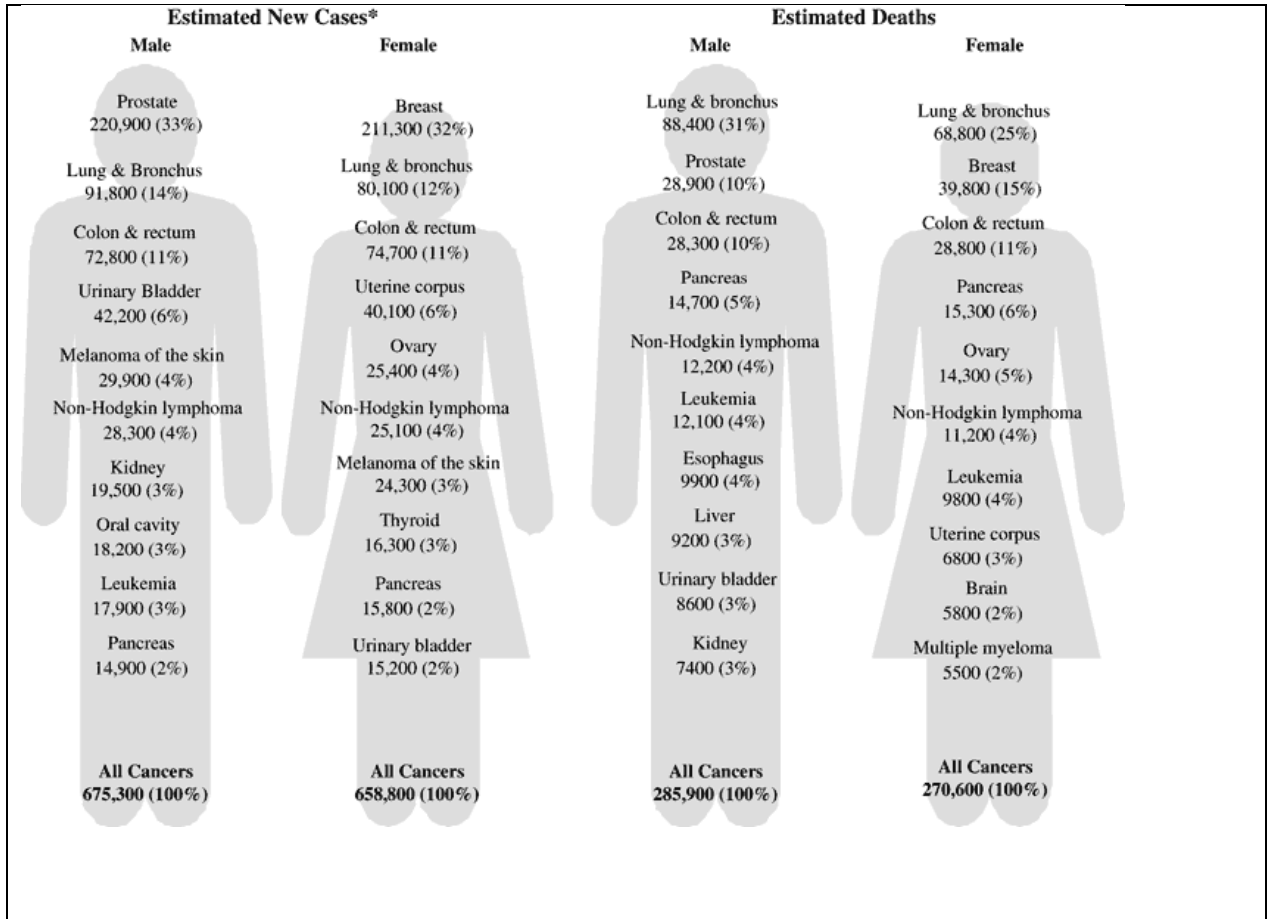
Διάγραμμα 1. Επίπτωση και θνησιμότητααπόκαρκίνο σε σχέση με την ηλικίαδιάγνωσης (από <http://www.onco.gr/documents/Papadaku.pdf>)

Ο βρογχικός καρκίνος και ο καρκίνος των πνευμόνωνείναι οι πιο κοινοίθανατηφόροικαρκίνοι και για τα δύοφύλα, ενώ ο καρκίνος του προστάτη (στους άνδρες) και του μαστού (στις γυναίκες) είναι οι δύο κυριότεροι καρκίνοι.

Τέσσερις(4) καρκίνοι, οι καρκίνος των πνευμόνων, του μαστού, του προστάτη και του παχέοςεντέρου, είναι υπεύθυνοι για περισσότερες από τις μισέςπεριπτώσειςδμηθικώνκαρκίνων και αποτελούν την αιτία θανάτου και στα δύοφύλα. Από τους παραπάνω καρκίνους, ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί το συχνότερο καρκίνο του γαστρεντερικού σωλήνα και είναι η δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα, στις ΗνωμένεςΠολιτείες της Αμερικής (U.S.A.), (βλέπε Πίνακα 1), αλλά και σε άλλες ανεπτυγμένες χώρες. Έχει υπολογιστεί ότι περίπου το δέκα τοις εκατό (10%) των καρκίνων του παχέος εντέρου εμφανίζονται σε ασθενείς με κάποια μορφή γενετικής προδιάθεσης, αν και στη πλειοψηφία τους είναι σποραδικοί. Για το υπόλοιπο ενενήντα τοις εκατό (90%), υπάρχουν ισχυρά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η πλειονότητα των περιστατικών του καρκίνου του παχέος εντέρου μπορεί να αποδοθεί σε περιβαλλοντολογικούς παράγοντες, γεγονός που σημαίνει ότι ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι μία δυνητικά προλήψιμη νόσος.

Οι τυχόν επιπτώσεις των διαφόρων διατροφικών παραγόντων στην επιδημιολογία του καρκίνου του παχέος εντέρου έχει μελετηθεί εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια και μάλιστα οι επιπτώσεις αυτές έχουν συσχετιστεί με την αύξηση ή την μείωση του κινδύνου ανάπτυξης ορθοκολικού καρκινώματος. Συγκεκριμένα έχει δειχτεί ότι η υψηλή περιεκτικότητα λίπους στην διατροφή, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για λίπη ζωικής προέλευσης και μάλιστα διατροφή που ταυτόχρονα είναι χαμηλή σε φυτικές ίνες, αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου.

Παράλληλα με τις ενδείξεις που έχουν εντοπιστεί για τις επιπτώσεις των διατροφικών παραγόντων στην επιδημιολογία του καρκίνου του παχέος εντέρου, πρόσφατες μελέτες, υποδεικνύουν ότι η τακτική χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ - NSAIDs) έχει προφυλακτική αξία στην περίπτωση των αδενωμάτων και καρκινωμάτων του παχέος εντέρου.



Πίνακας 1. Επίπτωση και θνησιμότητα σε άνδρες και γυναίκες από καρκίνο σε σχέση με τη θέση εντόπισης (από <http://www.onco.gr/documents/Papadaku.pdf>).





## Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η θεραπευτική δράση των αναστολέων της κυκλοοξυγενάσης (COX), σε πειραματικό μοντέλο καρκίνου με επίμυες. Όπως αναφέρθηκε, υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι οι αναστολείς της κυκλοοξυγενάσης, κατ' εξοχήν μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, έχουν έμμεση αντιογκογόνο και αντιαγγειογόνο δράσησε επίπεδο πειραμάτων σε ποντίκια. Παράλληλα το ίδιο πειραματικό μοντέλο, χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί η κυκλοοξυγενάση μόνη της, αλλά και σε συνδυασμό με την ασπιρίνη ως αντιφλεγμονώδες. Η ασπιρίνη επιλέγει επιπρόσθετα του εκλεκτικού αναστολέα της κυκλοοξυγενάσης-2, διότι έχουν παρατηρηθεί συνέργειες μεταξύ του αναστολέα της κυκλοοξυγενάσης και της ασπιρίνης. Τέλος, εξετάστηκε ο ρόλος της διατροφής στον καρκίνο.

Για την πειραματική πρόκληση του καρκίνου χρησιμοποιήθηκε η χορήγηση της ουσίας διμέθυλ(α)ανθρακένιο (DMBA) σε επίμυες που διατηρούνται στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου των Ιωαννίνων.

Επιπλέον έγινε προσπάθεια ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης των ογκογονιδίων p53, και Bcl-2.

**Η διατριβή αυτή χωρίζεται σε Γενικό και Ειδικό Μέρος.**

## **Γενικό Μέρος**

**Το Γενικό Μέρος αποτελείται από τέσσερα κεφάλαια.**

**Το πρώτο κεφάλαιο** έχει τίτλο «Το ερευνητικό υπόβαθρο της παρούσας μελέτης». Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται συνοπτική περιγραφή των βασικών χαρακτηριστικών της καρκινογένεσης με αναφορά στους τυχόν διαιτητικούς παράγοντες που εμπλέκονται σε αυτήν και ιδιαίτερα στην περιεκτικότητα των τροφών σε λίπος. Παράλληλα εξετάζεται η συμβολή των μη στεροειδών αντιφλεγμονώδων φαρμάκων, στην τυχόν καθυστέρηση ή και αναστολή της ανάπτυξης των κακοηθών και προ-κακοηθών αλλοιώσεων (DuBois RN, 2001).

**Το δεύτερο κεφάλαιο** έχει τίτλο «Η προκλητή καρκινογένεσης ερευνητικό εργαλείο». Στο κεφάλαιο αυτό αναφέρονται γενικά τα χαρακτηριστικά του επίμυ ως πειραματόζωου, παρουσιάζονται οι βασικές αρχές δράσης των χημικών καρκινογόνων, ενώ περιγράφονται αναλυτικότερα τα χαρακτηριστικά του μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πειραματική εργασία.

**Το τρίτο κεφάλαιο** έχει τίτλο «Διατροφή και Καρκίνος». Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται συνοπτική αναφορά των υπαρχόντων δεδομένων για το ρόλο του λίπους της διατροφής, των πρωτεϊνών, των φυτικών ινών, ανόργανων στοιχείων και βιταμινών της διατροφής στην παθογένεση των νεοπλασιών. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται σε δεδομένα που αφορούν στο παχύ έντερο, καθώς το παχύ έντερο έχει, παραδοσιακά, αποτελέσει τον κατεξοχήν στόχο των ερευνών για τη σχέση διατροφής και καρκίνου.

**Το τέταρτο κεφάλαιο** έχει τίτλο «Ασπιρίνη, Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη (ΜΣΑΦ – NSAIDs) και Καρκίνος». Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται σύντομη περιγραφή των στοιχείων που υπάρχουν για τη δράση της ασπιρίνης και άλλων μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών στην καρκινογένεση, τόσο από επιδημιολογικές, όσο και από πειραματικές μελέτες.

## **Ειδικό Μέρος**

**Το ειδικό μέρος αποτελείται από τρία κεφάλαια.**

**Το πρώτο κεφάλαιο** αναφέρεται στο υλικό και τις μεθόδους του πειράματος.

**Το δεύτερο κεφάλαιο** περιέχει αναλυτικά τα αποτελέσματα σύμφωνα με τα υπό εξέταση χαρακτηριστικά.

**Στο τρίτο κεφάλαιο** γίνεται η συζήτηση και η εξαγωγή συμπερασμάτων.



## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## ΤΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι επιδράσεις της δίαιτας, των μηστεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ - NSAIDs) ή του συνδυασμού τους, στην καρκινογένεση, συνεχίζουν να είναι ουσιαστικά αχαρτογράφητες, αν και σημαντική πρόοδος έχει γίνει στον τομέα αυτό τα τελευταία χρόνια. Πράγματι, κατά τα τελευταία είκοσι (20) τουλάχιστον χρόνια, οι υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος δίαιτες θεωρείται ότι αυξάνουν τον κίνδυνο διαφόρων καρκίνων, ιδιαίτερα του καρκίνου του μαστού, του καρκίνου του παχέος εντέρου, του καρκίνου του προστάτη, και πιθανώς του καρκίνου του παγκρέατος, των ωοθηκών αλλά και του ενδομητρίου (4, 5).

Οι πλούσιες σε λίπος δίαιτες, έχουν συνδεθεί τόσο επιδημιολογικά όσο και εργαστηριακά / πειραματικά με αυξημένο κίνδυνο καρκινογένεσης. Π.χ. πληθυσμοί που καταναλώνουν δίαιτες πλούσιες σε λιπαρά, εμφανίζουν υψηλότερη συχνότητα και μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας για τον καρκίνο του μαστού, τον καρκίνο του παχέος εντέρου και τον καρκίνο του προστάτη σε σύγκριση με πληθυσμούς που διατρέφονται με χαμηλές σε λιπαρά δίαιτες<sup>7</sup>. Την ίδια στιγμή υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις, αλλά όχι ακόμη επαρκείς, ότι ο κίνδυνος εμφάνισης του καρκίνου του μαστού καθώς και του καρκίνου του παχέος εντέρου, συσχετίζεται με τη συνολική πρόσληψη λίπους και όχι με το συγκεκριμένο είδος του λίπους που καταναλώνεται όπως, π.χ. τα κορεσμένα, τα μονοακόρεστα ή τα πολυακόρεστα λιπαρά (6). Ωστόσο, ακριβώς επειδή η διαιτητική πρόσληψη του λίπους σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την πρόσληψη θερμίδων, είναι ακόμα αμφίβολο το κατά πόσον η καθαυτή πρόσληψη λίπους ή η αυξημένη πρόσληψη θερμίδων, λόγω κατανάλωσης λίπους, είναι ο σημαντικότερος διατροφικός παράγοντας που επηρεάζει τον κίνδυνο εμφάνισης Καρκίνου (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16). Επιπλέον, οι

---

<sup>7</sup>[http://rex.nci.nih.gov/NCI\\_Pub\\_Interface/raterisk/risks76.html](http://rex.nci.nih.gov/NCI_Pub_Interface/raterisk/risks76.html), last visited

μηχανισμοί (κυτταρική διαίρεση, απόπτωση ή αγγειογένεση) με τους οποίους η διαίτα πιθανόν να επηρεάζει την καρκινογένεση, μας είναι ελάχιστα κατανοητοί (16, 17).

Εκτός όμως από τις παραπάνω μελέτες των επιπτώσεων της διατροφής στην καρκινογένεση και ιδιαίτερος μάλιστα της πλούσιας σε ζωικά λίπη διατροφής, έχουν μελετηθεί εκτεταμένα και τα μηΜΣΑΦ - NSAIDs, επειδή φαίνεται ότι καθυστερούν ή και αναστέλλουν την ανάπτυξη των κακοηθών και προκακοηθών αλλοιώσεων (18). Στην πραγματικότητα, ήδη πριν από τριάντα χρόνια, υπήρχαν κλινικές παρατηρήσεις που έδειχναν ότι η χρήση των ΜΣΑΦ - NSAIDs, οδηγούσε σε υποχώρηση των αδενωμάτων σε ασθενείς με οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση (19). Επίσης, πριν από σχεδόν είκοσι χρόνια, διάφορες κλινικές δοκιμές επιβεβαίωσαν τη σημαντική μείωση στο μέγεθος και στον αριθμό των αδενωμάτων σε ασθενείς που έπασχαν από οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση, όταν αυτοί εκτίθεντο σε αγωγή με sulindac (20). Τις αρχικές αυτές κλινικές παρατηρήσεις, ακολούθησε ένας μεγάλος αριθμός μελετών οι οποίες ολοκληρώθηκαν σε μία ποικιλία ζωικών και εργαστηριακών μοντέλων. Οι μελέτες αυτές, επιβεβαίωσαν την αντινεοπλασματική δράση των ΜΣΑΦ - NSAIDs (21), παρά το γεγονός ότι επίσης κατέστησαν σαφές (γεγονός που προκύπτει από όλες, ουσιαστικά, τις μελέτες που δημοσιεύθηκαν μέχρι σήμερα) ότι η χρήση μόνο των ΜΣΑΦ - NSAIDs, δεν εξαλείφει ή ελαττώνει όλους τους όγκους.

Τα ΜΣΑΦ - NSAIDs είναι γνωστό ότι αναστέλλουν τη δραστηριότητα του ενζύμου COX (22) καθώς και άλλες οδούς (23,24) που είναι γνωστό ότι προάγουν το νεοπλασματικό μετασχηματισμό των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2), ένα από τα δύο ισοένζυμα τα οποία καταλύουν τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλανδίνη G2 (PG2), είναι ένας πολλά υποσχόμενος φαρμακευτικός στόχος για την πρόληψη και τη θεραπεία πολλών μορφών καρκίνου.

Η δραστηριότητα της COX-2 φαίνεται να ενισχύεται από διάφορους πεπτιδικούς αυξητικούς παράγοντες, από διάφορες κυτοκίνες και από προαγωγείς της καρκινογένεσης, ενώ την ίδια στιγμή, φαίνεται να είναι υπό τον έλεγχο μιας



σειράς ογκογονιδίων όπως του HER-2/neu, v-Ha-ras, v-src, κλπ (25, 26, 27, 28). Είναι καλά γνωστό ότι τα μηστεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ-NSAIDs), συμπεριλαμβανομένου του σαλικυλικού οξέος, δρουν μέσω της αναστολής του ενζύμου COX, ενώ ένας σημαντικός αριθμός επιδημιολογικών και πειραματικών μελετών, φαίνεται να δικαιολογεί τη χρήση τους ως χημειοπροστατευτικούς παράγοντες στην περίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου (29, 30, 31).

Η εμπλοκή της COX-2 στον καρκίνο του μαστού δεν είναι τόσο καλά κατανοητή. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι και τα δύο μη εκλεκτικά ΜΣΑΦ - NSAIDs, καθώς και οι εκλεκτικοί αναστολείς της COX-2 μειώνουν τη συχνότητα και την πολλαπλότητα των θέσεων εμφάνισης κακοήθων και προκακοήθων αλλοιώσεων κατά την πειραματική καρκινογένεση του καρκίνου του μαστού.

Όπως και με τον καρκίνο του παχέος εντέρου, η διαίτα μπορεί να επιτείνει το χαρακτηριστικό αυτό αποτέλεσμα των μη εκλεκτικών ΜΣΑΦ - NSAIDs) ή των επιλεκτικών αναστολέων της COX-2 στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού. Η ουσίασελεκοξίμπη (Celecoxib), είναι ένα ΜΣΑΦ - NSAID το οποίο αναστέλλει εκλεκτικά την COX-2 και μάλιστα είναι ένας ισχυρός αντιφλεγμονώδης παράγοντας ο οποίος έχει λιγότερες παρενέργειες σε σύγκριση με τους μη εκλεκτικούς αναστολείς των ΜΣΑΦ - NSAIDs, που αναστέλλουν τόσο την κυκλοοξυγενάση-1 (COX-1) όσο και την COX-2 (32, 33, 34, 35, 36).



## Η ΠΡΟΚΛΗΤΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΩΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΛΕΙΟ

Η αυτόματη ανάπτυξη όγκων σε εργαστηριακά πειραματόζωα είναι εξαιρετικά σπάνια. Η χαμηλή συχνότητα αυτόματων καρκινωμάτων αλλά και ο τρόπος εμφάνισης τους, συνήθως τυχαίο εύρημα νεκροτομής, κάνει δύσκολη την ανάπτυξη στελεχών με υψηλή συχνότητα αυτόματης ανάπτυξης όγκων. Παρόλα αυτά έχει αποδειχτεί ότι είναι εφικτή η πρόκληση νεοπλασιών σε πειραματόζωα τόσο με τη χορήγηση χημικών καρκινογόνων όσο και με έκθεση σε ακτινοβολία (37).

### **Πειραματόζωα: Οι επίμυες στην πειραματική καρκινογένεση**

Οι επίμυες δεν επιλέγονται τυχαία, ως πειραματόζωα, στην πειραματική καρκινογένεση. Η επιλογή των επίμυων έγινε γιατί αποτελούν καλά καθορισμένα, εύκολα συντηρούμενα, φτηνά και σχετικά νοσοανθεκτικά πειραματόζωα, κατάλληλα για μεγάλη ποικιλία ερευνητικών πρωτοκόλλων. Ο εργαστηριακός επίμυς, *Rattus norvegicus*, είναι μέλος της οικογένειας Muridae. Στην αρχή του δεκάτου ογδόου (18<sup>ου</sup>) αιώνα πρωτοεμφανίστηκαν οι εξημερωμένοι επίμυες σε εκτροφεία και σε μονομαχίες με σκυλιά και άρχισαν να χρησιμοποιούνται σε επιστημονικά πειράματα στα μέσα του δεκάτου ενάτου (19<sup>ου</sup>) αιώνα. Σήμερα οι επίμυες, όπως και οι ποντικοί, είναι διαθέσιμοι σε διάφορες οικολογικές ποικιλίες και τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα στελέχη είναι οι επίμυες Sprague-Dawley, οι επίμυες Wistar και οι επίμυες LongEvans. Οι δύο πρώτες ποικιλίες είναι λευκές, οι επίμυες Sprague-Dawley με στενό κεφάλι και ουρά μακρύτερη από το σώμα, ενώ οι επίμυες Wistar έχουν φαρδύ κεφάλι και πιο κοντή ουρά. Τέλος οι επίμυες Long-Evans είναι μικρότεροι, με πιο σκούρες περιοχές στο τρίχωμα της κεφαλής και του πρόσθιου τμήματος του σώματος (38).

Το βάρος γέννησης τους είναι πέντε με έξι (5 – 6) γραμ. και φτάνει τα τετρακόσια πενήντα με πεντακόσια πενήντα (450 – 520) γραμ. στον άρρενα ενήλικα και τα διακόσια πενήντα με τριακόσια (250 – 300) γραμ. στο θήλυ. Ο απογαλακτισμός συμβαίνει στις τρεις εβδομάδες και η αναπαραγωγή ξεκινά μεταξύ της εξηκοστής πέμπτης και εκατοστής δεκάτης (65ης και 110<sup>ης</sup>) ημέρας, με τη μέγιστη διάρκεια ζωής να κυμαίνεται μεταξύ δύομισι και τρεισήμισι (2,5 και 3,5) ετών. Οι επίμυες συνήθως στεγάζονται σε μεταλλικά κλουβιά με πλέγμα που έχει ανοίγματα 1,6 εκατοστών. Αυτά πρέπει να παρέχουν διακόσια εξήντα (260) τετραγωνικά εκατοστά ανά ενήλικα και να έχουν ελάχιστο ύψος δεκαοκτώ (18) εκατοστών. Η θερμοκρασία δωματίου πρέπει να διατηρείται μεταξύ δεκαοκτώ και είκοσι επτά (18 και 27) βαθμών Κελσίου και η σχετική υγρασία μεταξύ σαράντα και εβδομήντα τοις εκατό (40% και 70%). Ο μέσος ενήλικας επίμυς [βάρους τριακοσίων (300) γραμμαρίων] καταναλώνει πέντε (5) γραμμάρια τροφής και δέκα με δώδεκα (10-12) κυβικά εκατοστά νερού ανά εκατό (100) γραμμάρια βάρους ημερησίως (39).

Οι παράγοντες που επηρεάζεται η συχνότητα του καρκίνου στον επίμυ, όπως και σε άλλα πειραματόζωα, είναι η ηλικία, το φύλο, το στέλεχος αλλά και οι περιβαλλοντολογικοί παράγοντες. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν η διατροφή (αριθμός θερμίδων, ποσό πρωτεϊνών, βιταμίνες κ.ά.), οι ορμόνες, η ανοσολογική κατάσταση και οι γενετικοί παράγοντες. Ο πιο συχνός όγκος του επίμυ είναι το ινοαδένωμα του μαστού, ακολουθούμενο από όγκους από διάμεσα κύτταρα του όρχεως, φαιοχρωμοκυτώματα, αδενώματα της υπόφυσης, πολύποδες του ενδομητρίου, μονοκυτταρική λευχαιμία και τα αδενώματα του θυρεοειδούς. Τα πρωτοπαθή νεοπλάσματα του πεπτικού σωλήνα είναι εξαιρετικά σπάνια. Ειδικότερα στο παχύ έντερο οι αναφορές νεοπλασιών είναι σποραδικές και συνήθως συμβαίνουν με συχνότητα μικρότερη του ένα τοις εκατό (1 %)(40, 41).

Αν και η αυτόματη καρκινογένεση είναι σπάνια, τα νεοπλάσματα που παρατηρούνται στον επίμυ παρουσιάζουν εξαιρετική ποικιλία και σχεδόν όλα έχουν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά και βιολογική συμπεριφορά με

αυτά του ανθρώπου. Ορισμένοι όγκοι παρουσιάζουν προοδευτική μετατροπή από υπερπλασία σε καλοήθεις υπερπλαστικές βλάβες και τελικά σε κακοήθειες, όπως και στον άνθρωπο. Ο άνθρωπος έχει δύο περιόδους μέγιστου κινδύνου για ανάπτυξη νεοπλασιών κατά τη διάρκεια της ζωής του, την παιδική ηλικία και το γήρας. Ο επίμυς παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά μετά από έκθεση στο κατάλληλο καρκινογόνο (στην πρώτη περίπτωση με προγεννητική έκθεση). Η σχέση μεταξύ της μέγιστης διάρκειας ζωής επίμυ και ανθρώπου είναι ένα προς τριάντα (1:30). Η μικρή μέγιστη διάρκεια ζωής του επίμυ, ελαττώνει τη διάρκεια των πειραμάτων καρκινογένεσης και κάνει έτσι δυνατή τη μελέτη πολλών γενεών μέσα σε μια ανθρώπινη γενεά, ενώ θετικά αποτελέσματα από πειράματα είναι συνήθως διαθέσιμα σε ένα χρόνο ή και λιγότερο. Παρόλο που ένα καρκινογόνο μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση όγκων σε όργανα που η αυτόματη καρκινογένεση είναι σπάνια για το συγκεκριμένο στέλεχος, η κύρια δράση των καρκινογόνων είναι να αυξήσουν τη συχνότητα εκείνων των τύπων των όγκων που εμφανίζονται αυτόματα και να μειώσουν τη λανθάνουσα περίοδο. Μία άλλη δράση των καρκινογόνων είναι η αύξηση της προόδου σε κακοήθεια στα όργανα εκείνα όπου η αυτόματη υπερπλασία και οι καλοήθεις όγκοι είναι συχνοί. Η βασική μορφολογία των νεοπλασμάτων είναι ίδια είτε αυτοί είναι πειραματικά προκληθέντες είτε όχι (42).

## **Χημικά Καρκινογόνα**

Η λίστα των χημικών ουσιών που έχει αποδειχτεί να έχουν καρκινογόνο δράση στα πειραματόζωα είναι εκπληκτικά μεγάλη, αν κανείς αναλογιστεί τη σπανιότητα των αυτόματων νεοπλασιών. Αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις (4) κατηγορίες :

### 1. Πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες

Η πρόκληση καρκινωμάτων τόσο στο λεπτό όσο και στο παχύ έντερο ποντικών μετά από χορήγηση μεθυλ-χλωρανθρακένιου και διβενζανθρακένιου, έχει αποδειχθεί από την αρχή της δεκαετίας του χίλια εννιακόσια σαράντα(1940) από τους Lorentz και Stewart. Παρά την αποτελεσματικότητά τους, η χρήση τους ήταν πάντα περιορισμένη, καθώς προτιμούνται πιο προβλέψιμα πειραματικά μοντέλα. Αξίζει πάντως να σημειωθεί ο πιθανός ρόλος τους στην καρκινογένεση των ανθρώπινων νεοπλασιών, λαμβάνοντας υπ' όψη τα επιδημιολογικά στοιχεία που ενοχοποιούν τα χολικά άλατα, τα στεροειδή καθώς και τα πιθανά προϊόντα τους, στην γένεση του καρκίνου του παχέος εντέρου στον άνθρωπο.

### 2. Αρωματικές αμίνες

Τα πρώτα βήματα στη μελέτη της καρκινογόνου δράσης των ουσιών της ομάδας αυτής έγιναν στην αρχή της δεκαετίας του χίλια εννιακόσια σαράντα(1940),όταν ο Bielsschowsky περιέγραψε τη πρόκληση νεοπλασμάτων του λεπτού εντέρου σε ποσοστό μέχρι πενήντα τοις εκατό(50%) μετά από του στόματος χορήγηση 2-ακέτυλ-ανινοφλουορενίου σε αρουραίους, με μικρότερο ποσοστό όγκων του παχέος εντέρου. Στο παρελθόν το 3,2'-διμεθυλ-4-άμινοδιφαινύλιο, ένα ισχυρό καρκινογόνο του παχέος εντέρου χορηγούμενο υποδορίως σε επίμυες, έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά συχνά σε πειραματικά μοντέλα.

### 3. Νιτροδοενώσεις

Ο Druckley πρώτος παρατήρησε την ανάπτυξη καρκινωμάτων στο παχύ έντερο επίμυων μετά από εφάπαξ ενδοφλέβια χορήγηση Ν-μέθυλο-N-νιτροζουρίας (43). Μετέπειτα εργασίες έχουν αποδείξει την ικανότητα των ισχυρών αυτών καρκινογόνων να προκαλούν εντερικούς όγκους μετά από του στόματος, ενδοπεριτοναϊκή, ή και τοπική (στο ορθό) χορήγηση. Η σημασία τους στην ανθρώπινη καρκινογένεση έχει επισημανθεί από τη δεκαετία του εξήντα ('60), καθώς οι ουσίες αυτές έχουν απομονωθεί σε διάφορα τρόφιμα, ενώ είναι γνωστό ότι μπορούν να σχηματιστούν στον οργανισμό και από πρόδρομες ενώσεις, είτε στο όξινο περιβάλλον του στομάχου, είτε υπό την καταλυτική δράση βακτηριδίων.

### 4. Ενώσεις σχετιζόμενες με τη συκασίνη

Η συκασίνη βρίσκεται στα φυτά της οικογένειας Cycadaceae τα οποία μοιάζουν με τα δέντρα της φτέρης. Ο Laqueur κάνοντας πειράματα σε επίμυες που τρέφονταν με τα φυτά αυτά, μελετώντας τη πιθανή τους συσχέτιση με τη πλάγια μυατροφική σκλήρυνση, παρατήρησε την ανάπτυξη όγκων του παχέος εντέρου σε μια μικρή μειοψηφία των πειραματόζωνων (JNatlCancerInst, 1963). Σε μετέπειτα μελέτες του ο Laqueur επιβεβαίωσε τις αρχικές του παρατηρήσεις και έδειξε ότι η συκασίνη (το β-γλυκοσίδιο της μεθυλαζοξυμεθανόλης) ήταν το μελετούμενο καρκινογόνο (44). Αργότερα ο Duckley και οι συνεργάτες του χρησιμοποιώντας εβδομαδιαίες υποδόριες ενέσεις της ουσίας 1,2-διμεθυλυδραζίνης (1,2-Dimethylhydrazine, DMH), μιας συγγενικής χημικά ουσίας στη συκασίνη, περιέγραψαν υψηλή συχνότητα ανάπτυξης εντερικών καρκινωμάτων σε επίμυες. Από τότε η 1,2-διμεθυλυδραζίνης (1,2-Dimethylhydrazine, DMH), αποτελεί το συχνότερα χρησιμοποιούμενο καρκινογόνο σε πειραματικά μοντέλα καρκινογένεσης στο έντερο σε επίμυες, ποντικούς και κρικητούς (Hamsters).

### **Η πειραματική καρκινογένεση με χορήγηση 1,2-διμεθυλυδραζίνης (DMH)**

Η DMH είναι πιθανότατα το ευρύτερα μελετημένο χημικό καρκινογόνο και η ικανότητα της ουσίας αυτής για τη πρόκληση καρκίνου εξαρτάται από το είδος και το στέλεχος του χρησιμοποιούμενου πειραματόζωου και σε μικρότερο βαθμό από την οδό χορήγησης και τη δόση.

Στον επίμυ το κύριο όργανο-στόχος είναι το κόλο και το ορθό ανεξάρτητα από την οδό χορήγησης. Σε πολύ μικρότερο βαθμό, χαμηλές από του στόματος δόσεις προκαλούν περιστασιακά επιπρόσθετους όγκους στο ήπαρ, ενώ σποραδικοί όγκοι του δωδεκαδάκτυλου, του ακουστικού πόρου, των νεφρών και του ήπατος έχουν αναφερθεί μετά από υποδόρια χορήγηση.

Η εκλεκτικότητα για πρόκληση ορθοκολικών καρκινωμάτων έχει επιβεβαιωθεί από μεγάλο αριθμό εργασιών και παρά την προαναφερθείσα σποραδική εμφάνιση όγκων σε άλλες θέσεις εκτός από το κόλο, η υποδόρια χορήγηση DMH σε επίμυες παραμένει το πιο αξιόπιστο μοντέλο πειραματικής καρκινογένεσης στο παχύ έντερο. Υποδόρια χορήγηση δέκα με είκοσι (10-20)grDMH ανά χιλιόγραμμο βάρους σώματος εβδομαδιαία, προκαλεί ένα ή περισσότερα αδενώματα και αδenoκαρκινώματα σε ποσοστό σχεδόν εκατό τοις εκατό (100%) των πειραματόζωων, σε αρουραίους, ποντικούς και κρικητούς(χάμστερ). Στη δόση αυτή οι απώλειες από οξεία τοξικότητα είναι αμελητέες. Η λανθάνουσα περίοδος, οριζόμενη ως το χρονικό διάστημα μεταξύ της πρώτης δόσης του καρκινογόνου και της εμφάνισης όγκων, είναι περίπου τέσσερις με έξι(4-6) μήνες.

Η διμεθυλυδραζίνη, όπως και οι μεταβολίτες της αζωξυμεθάνιο και αζωξυμεθανόλη, είναι ισχυρά καρκινογόνα ακόμη και με εφάπαξ χορήγηση με χαρακτηριστική επιμήκυνση της λανθάνουσας περιόδου.



## **Η πειραματική καρκινογένεση με χορήγηση 7,12-διμεθυλοβενζ-(α)-ανθρακένιου (DMBA)**

Το DMBA έχει χρησιμοποιηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα για την επαγωγή της καρκινογένεσης στον μαστικό αδένα του αρουραίου. Όντως, το DMBA που αποτελεί τη βάση σημαντικών μοντέλων καρκινογένεσης, θα πρέπει να σημειωθεί ότι μετά από την αρχική έκθεση των Huggins και συν (45), το DMBA προκαλεί στους αρουραίους όγκους του μαστού και μάλιστα η μέθοδος αυτή πρόκλησης καρκινογένεσης έχει αξιοποιηθεί ευρύτατα στη μελέτη του καρκίνου. Το συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο αποδείχτηκε πολύ χρήσιμο ως πρότυπο αυθόρμητης ογκογένεσης, κυρίως επειδή η ανάπτυξη και διάθεση των αιμοφόρων αγγείων και των λεμφαγγείων που περιβάλλουν τον επαγόμενο καρκινικό ιστό προσομοιώνουν πειστικά τον ανθρώπινο καρκίνο. Εκτός από το να χρησιμοποιηθεί ως εκλυτικός παράγοντας του μοντέλου του καρκίνου του μαστού, το DMBA, χρησιμοποιείται για να προκαλέσει, μεταξύ πολλών άλλων, καρκίνο του δέρματος σε μοντέλο καρκινογένεσης για τον ποντικό (46,47) καρκίνο του στόματος σε μοντέλο καρκινογένεσης για τους κρικητούς (48), αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος σε μοντέλο καρκινογένεσης για τον αρουραίο (49) και σε μοντέλο καρκινογένεσης για το σάρκωμα του αρουραίου (50). Τα μοντέλα αυτά, με τη σειρά τους, έχουν χρησιμοποιηθεί για να διευκρινιστούν:

1. οι ιδιότητες των φυτοχημικών που θα μπορούσαν να παίξουν κάποιο ρόλο στη χημειοαποτροπή του καρκίνου (51, 52),
2. ο ρόλος των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων ορισμένων ενώσεων στην πρόληψη του καρκίνου (53) και
3. ο ρόλος του θερμιδικού περιορισμού καθώς και του διαιτητικού λίπους, ο ρόλος των υδατανθράκων και των ινών (54) ή των διαφορετικών ορμονών και των αυξητικών παραγόντων (55) στην ογκογένεση.

## Μηχανισμός δράσης των Χημικών Καρκινογόνων και παθογένεση

Η πρόκληση όγκων από τα χημικά καρκινογόνα, προκαλεί μεταβολή στο κυτταρικό γονιδίωμα με τελικό αποτέλεσμα φαινοτυπικές αλλαγές, όπως απώλεια της διαφοροποίησης, ανάπτυξη διεισδυτικότητας ή ανώμαλης συμπεριφοράς πολλαπλασιασμού. Θεωρείται απίθανο ότι η καρκινογένεση είναι απλά αποτέλεσμα αύξησης του πολλαπλασιασμού και μάλιστα μια πολυσταδιακή διαδικασία είναι πιθανότερη. Η καρκινογόνος δράση των καρκινογόνων ενώσεων φαίνεται πως περιλαμβάνει τη μεθυλίωση του DNA. Ώρες, π.χ. μετά από ένεση διμεθυλυδραζίνης σε αρουραίους, μεθυλιωμένα μόρια νουκλεϊκών οξέων απαντώνται σε διάφορες θέσεις του παχέος εντέρου, αλλά το γεγονός αυτό δεν είναι αρκετό για να εξηγήσει την εκλεκτική δράση της 1,2-διμεθυλυδραζίνης (DMH) στο παχύ έντερο μια και σημαντικός αριθμός μεθυλίωσεων παρατηρείται τόσο στο ήπαρ όσο και στο νεφρό και τον ειλεό.

Η σχετικά ταχεία αντικατάσταση των κυττάρων του παχέος εντέρου έναντι του ήπατος μπορεί επίσης να παίζει κάποιο ρόλο. Παρόμοια υψηλοί ρυθμοί όμως παρατηρούνται τόσο στο στόμαχο όσο και στο λεπτό έντερο, όργανα στα οποία δεν προκαλούνται όγκοι μετά από χορήγηση διμεθυλυδραζίνης. Ωστόσο η επιδιόρθωση του DNA, μετρούμενη με την απομάκρυνση της Ο-μέθυλ-γουανίνης, συμβαίνει με αργότερο ρυθμό στο παχύ έντερο και παρόμοια μείωση της επάρκειας επιδιόρθωσης έχει παρατηρηθεί και σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνωμα. Ο σχηματισμός Ο-μέθυλ-γουανίνης επιτρέπει στη γουανίνη να δημιουργεί σύμπλοκα με τη θυμίνη, αντί της κυτοσίνης που αποτελεί το φυσιολογικό της τσίρι, και η δομική αυτή μεταβολή έχει συσχετιστεί με την καρκινογένεση διαφόρων ιστών.

Πιο πρόσφατα, μεταβολές της δραστηριότητας της πρωτεϊνικής κινάσης C και υπομεθυλίωση του γονιδίου p53 έχουν προταθεί ως πιθανοί μηχανισμοί δράσης(56, 57, 58, 59, 60) Συμπερασματικά, η χημική καρκινογένεση σε πειραματόζωα φαίνεται να αποτελεί πολυσταδιακή διαδικασία όπου το αρχικό στάδιο χαρακτηρίζεται από γενικευμένη αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, και η υψηλή ευαισθησία του παχέος εντέρου μπορεί να σχετίζεται με ανεπαρκείς μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA

## **Ο ρόλος της απενεργοποίησης του p53 και ο ρόλος της Bcl-2 στην απόπτωση**

Το p53 έχει αναγνωριστεί πως παίζει ζωτικό ρόλο στην απόπτωση. Μαζί με τις κασπάσες, το αμυλοειδές πεπτιδίο-B, την οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 και των πρωτεϊνών του θερμικού σοκ, το P53 είναι μια από τις πιο σημαντικές πρωτεΐνες μεταξύ των πολλών παραγόντων (κυρίως πρωτεϊνών) που εμπλέκονται στην απόπτωση (61). Το P53 είναι σημαντικό γιατί ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο των πολυκύτταρων οργανισμών, λειτουργώντας έτσι κατασταλτικά στην ανάπτυξη των όγκων. Το p53 προκαλεί κυτταρικές αποκρίσεις που περιλαμβάνουν διακοπή του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση, την επιδιόρθωση του DNA και της διαφοροποίησης, μέσω της μεταγραφικής ενεργοποίησης ειδικών γονιδίων-στόχων που φέρουν p53 θέσεις σύνδεσης στο DNA που τα κωδικοποιεί. Δεδομένου του ρόλου που διαδραματίζει το p53 στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, τυχόν μετάλλαξη του p53 επιτρέπει στα ανώμαλα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται, με αποτέλεσμα την καρκινογένεση. Στην πραγματικότητα η απώλεια του γονιδίου p53 (μετάλλαξη του p53) συνδέεται με περίπου πενήντα έως πενήντα πέντε τοις εκατό (50-55%) των καρκίνων του ανθρώπου, με την αντίστοιχη συμμετοχή στην καρκινογένεση να κυμαίνεται από δέκα έως είκοσι τοις εκατό (10-20%) για τη λευχαιμία, τον καρκίνο του ήπατος, τον καρκίνο του μαστού και τον καρκίνο του προστάτη, σε περισσότερο από εξήντα τοις εκατό (60%) για τον καρκίνο των ωοθηκών, τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, τον καρκίνο του κόλου και τον καρκίνο του πνεύμονα (62). Όταν το γονίδιο p53 έχει υποστεί βλάβη, η καταστολή του όγκου είναι σχεδόν αδύνατη.

Η οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην απόπτωση και είναι στενά συνδεδεμένη με την δραστηριότητα του p53. Η οικογένεια Bcl-2 (Το «ακρωνύμιο» Bcl-2 σημαίνει «γονίδιο των B-κυττάρων - 2 για το λέμφωμα / λευχαιμία») αποτελείται από περίπου 15 μέλη μερικά από τα οποία άλλα είναι αντιαποπτωτικά, ενώ άλλα είναι προ-αποπτωτικά. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες αυτές εντοπίστηκε για πρώτη φορά, και ο

εντοπισμός του οφείλεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες αυτές συνδέονται με τη συμμετοχή των B-κυττάρων σε διάφορες κακοήθειες. Το συγκεκριμένο γονίδιο βρίσκεται στο χρωμοσωματικό τμήμα 18q21.3.

Με δεδομένα τα χαρακτηριστικά και της συμμετοχής του p53 στην καρκινογένεση (ιδιαίτερα στην καρκινογένεση του μαστού) και του ευρέως φάσματος των καρκινογόνων επιπτώσεων της χορήγησης της ουσίας 7,12-διμέθυλ(α)ανθρακένιο (DMBA) στη ράτσα Sprague-Dawley των αρουραίων και με σκοπό την καλύτερη κατανόηση του ρόλου του p53 στην φυσική ιστορία των επαγόμενων καρκίνων απότο DMBA, ένας από τους ελάχιστους στόχους της παρούσας μελέτης είναι να διερευνήσει το κατά πόσον το p53 ή η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 είναι πιθανοί στόχοι της ουσίας 7,12-διμέθυλ(α)ανθρακένιο (DMBA) κατά την επαγωγή του καρκίνου του μαστού στους αρουραίους ράτσας Sprague-Dawley.

## ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

### Γενικά

Ο ρόλος των διατροφικών συνηθειών στην πρόκληση και ανάπτυξη ενός σημαντικού αριθμού κακοηθών νεοπλασμάτων του ανθρώπου γίνεται ολοένα και πιο ξεκάθαρος. Διατροφές πλούσιες σε λίπος και φτωχές σε φυτικές ίνες, π.χ., έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου, του μαστού, του προστάτη, του ενδομητρίου, του παγκρέατος και άλλων οργάνων (63). Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει τόσο από πειραματικές εργασίες, όσο και από επιδημιολογικές μελέτες, με συχνότερες αναφορές στα καρκινώματα του παχέος εντέρου και του μαστού, που αναλογούν σε ένα ιδιαίτερα σημαντικό ποσοστό θανάτων από καρκίνο στις βιομηχανικές χώρες. Εκτός από τα κύρια συστατικά της διατροφής που δρουν ρυθμιστικά στη διαδικασία της καρκινογένεσης, η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων με υψηλή ευαισθησία και η αυξανόμενη χρήση πειραμάτων για τον έλεγχο της τυχόν μεταλλαξιόγону δράσης συνήθων (πλέον) διατροφικών παραγόντων, έχουν αποκαλύψει πλειάδα ουσιών που μπορούν να προκαλέσουν έναρξη της καρκινογένεσης (initiators) και υπάρχουν στη διατροφή σε μικροποσότητες. Παραδείγματα τέτοιων ουσιών περιλαμβάνουν τις N-νίτρωδο-ενώσεις, τους πολυκυκλικούς υδρογονάνθρακες, τις ετεροκυκλικές αμίνες, τις αφλατοξίνες, και τις μυκοτοξίνες (64, 65).

Εκτός όμως από την εισαγωγή στον οργανισμό καρκινογόνων ουσιών μέσω της διατροφής, οι διάφορες τροφές που καταναλώνουμε αποτελούν, παράλληλα, σημαντική πηγή φυσικών αντικαρκινικών ουσιών, δηλαδή, ουσιών που είτε αναστέλλουν το σχηματισμό των καρκινογόνων από πρόδρομες ουσίες κατά τον μεταβολισμό τους, είτε δρουν προστατευτικά ελαττώνοντας ή εξαλείφοντας τις ενέργειες των καρκινογόνων. Η αναγνώριση τέτοιων φυσικών αντικαρκινικών ουσιών και η διασαφήνιση του μηχανισμού δράσης

τους πιστεύεται ευρέως ότι αποτελεί μια πρακτική μορφή πρόληψης του καρκίνου.

Η πλειοψηφία των χημικών καρκινογόνων δρουν έμμεσα, μετά από ενζυματική ενεργοποίησή τους προς ηλεκτρόφιλα μόρια που στη συνέχεια αντιδρούν και μεταβάλλουν τη λειτουργία των μακρομορίων του πυρήνα και, κατά κύριο λόγο, του DNA. Οι οξειδάσες μικτής λειτουργίας του κυτοχρώματος P-450, που εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων, παίζουν κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση αυτή. Οι αντικαρκινικές ουσίες θεωρείται ότι ασκούν τις ενέργειες τους αναστέλλοντας τα ένζυμα ενεργοποίησης, ενισχύοντας τα ένζυμα ή συνένζυμα (cofactors) αποτοξικοποίησης και αλληλοεπιδρώντας με τα τελικά καρκινογόνα.

Ειδικότερα, ο καρκίνος του παχέος εντέρου έχει γίνει αντικείμενο πολλών επιδημιολογικών μελετών αλλά και πειραματικών ερευνών. Οι μεγάλες διαφορές στην κατανομή του καρκίνου που παρατηρούνται ανάμεσα σε διαφορετικά κράτη ή εθνικές ομάδες, ακόμα και αν αυτές κατοικούν μέσα στο ίδιο κράτος, καθώς και ανάμεσα σε διάφορες κοινωνικές ομάδες που, όμως, επιδεικνύουν διαφορετικές διατροφικές συμπεριφορές, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η πλούσια σε λίπος διατροφή και, ταυτόχρονα, φτωχή σε συγκεκριμένες φυτικές ίνες συνδέεται με υψηλή συχνότητα καρκίνου στον άνθρωπο, ενώ παράλληλα αναγνωρίσθηκε η σημασία μικρο-διατροφικών παραγόντων όπως τα άλατα του ασβεστίου και του σεληνίου, το φολικόξύ και οι βιταμίνες A, B, C, D και E. Πολλές από αυτές τις παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν σε πειραματικά μοντέλα σε επίμυες και ποντικούς. Οι έρευνες πάνω στους μηχανισμούς πρόκλησης του καρκίνου συνιστούν ότι η καρκινογένεση είναι φαινόμενο δοσοεξαρτώμενο αλλά και αναστρέψιμο, και περαιτέρω έρευνα απαιτείται για τη διασαφήνιση του τρόπου δράσης των προστατευτικών διατροφικών παραγόντων.

## Ο ρόλος του λίπους της διατροφής στην καρκινογένεση

Οι πρώτες ενδείξεις ότι το λίπος της διατροφής μπορεί να έχει επίδραση στην καρκινογένεση ήρθαν από πειραματικές μελέτες που έδειχναν ότι πειραματόζωα τρεφόμενα με δίαιτα πλούσια σε λίπος ανέπτυξαν καρκίνο του δέρματος και του μαστού σε υψηλότερες συχνότητες συγκρινόμενα με αυτά που τρέφονταν με δίαιτα φτωχή σε λίπος (66). Μετέπειτα μελέτες έχουν δείξει παρόμοια επίδραση στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου (67).

Τα ισχυρότερα επιδημιολογικά στοιχεία συσχέτισης διατροφικού λίπους και καρκίνου έρχονται από επιδημιολογικές συγκρίσεις ανάμεσα στον επιπολασμό του καρκίνου σε διάφορα κράτη. Οι συγκρίσεις αυτές δείχνουν πως υπάρχει μία ιδιαίτερα θετική συσχέτιση τόσο στη συχνότητα όσο και στη θνητότητα από τον καρκίνο, ιδιαίτερα τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Επιπλέον, ο τύπος και το ποσό του λίπους της διατροφής φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Π.χ., σε πειραματικά μοντέλα καρκινογένεσης του μαστού, με χορήγηση διμέθυλ-βενζανθρακένιου σε επίμυες, η προσθήκη μικροποσοτήτων πολυακόρεστων οξέων ή λινελαϊκού οξέος αυξάνει σημαντικά τη συχνότητα των όγκων με δόσοεξαρτώμενο μηχανισμό. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει και στην πειραματική καρκινογένεση του παχέος εντέρου, αν και η διαφορική επίδραση των κορεσμένων και των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων δεν είναι ξεκάθαρη.

Σε αντίθεση με το λινελαϊκό οξύ, ένα n-6 πολυακόρεστο οξύ που βρίσκεται στα φυτικά έλαια, η διατροφή που είναι πλούσια σε ιχθυέλαια, στα οποία το κύριο συστατικό είναι n-3 πολυακόρεστα οξέα, έχει ανασταλτική δράση στην καρκινογένεση τόσο στον καρκίνο του παχέος εντέρου, όσο και άλλων όγκων (μαστού, προστάτη)<sup>4</sup>. Ο μηχανισμός δράσης του λίπους της διατροφής στην καρκινογένεση δεν είναι απόλυτα γνωστός, αν και είναι αποδεκτό ότι δρα ως προαγωγέας, χωρίς να συμμετέχει στην έναρξη της καρκινογένεσης. Έτσι, η καρκινογόνος δράση του λίπους φαίνεται ότι σχετίζεται με τη διάρκεια της έκθεσης στην αντίστοιχη διατροφή. Τυχόν αλλαγές στη σύσταση των κυτταρικών μεμβρανών μπορεί να επηρεάζουν τη διακυτταρική επικοινωνία

και συνεπώς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (68, 69). Η αύξηση της δράσης της γουανυλκυκλάσης από τα n-6 λιπαρά οξέα έχει επίσης προταθεί ως πιθανός μηχανισμός.

Άλλοι ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στον συνολικό αριθμό θερμίδων που καταναλώνονται ημερησίως, αλλά σημαντικότερα στην ενεργειακή ισορροπία και την προστατευτική δράση της φυσικής άσκησης (70). Ειδικότερα στον καρκίνο του παχέος εντέρου έχει ενοχοποιηθεί η αύξηση έκκρισης χολικών οξέων σε πειραματόζωα τρέφονται με δίαιτες υψηλές σε λίπος (71). Πειραματικές μελέτες σε επίμους έχουν δείξει ότι έλαια με προστατευτική δράση στον καρκίνο του παχέος εντέρου, όπως το ιχθυέλαιο και το ελαιόλαδο, μειώνουν τη δράση του ενζύμου κυκλοοξυγενάση το οποίο φαίνεται να παίζει κεντρικό ρόλο στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου, ενώ το καλαμποκέλαιο και λίπη ζωικής προέλευσης που ενισχύουν την πειραματική καρκινογένεση στους επίμους αυξάνουν τα επίπεδα της κυκλοοξυγενάσης (72). Τέλος, το λίπος μπορεί να ασκεί καρκινογόνο μέσω παρεμπόδισης της κυτταρικής απόπτωσης, καθώς σε μοντέλα πειραματικής καρκινογένεσης σε επίμους διατροφή πλούσια σε λίπος (25% καλαμποκέλαιο) μείωσε σημαντικά τα αποπτωτικά σωμάτια με παράλληλη αύξηση του αριθμού των όγκων (73).



## **Ο ρόλος των πρωτεϊνών της διατροφής στην καρκινογένεση.**

Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν ότι υπάρχει σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των πρωτεϊνών της διατροφής, ιδιαίτερα των πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης, και του καρκίνου. Όπως και στην περίπτωση της περιεκτικότητας της διατροφής σε λίπος, τα ισχυρότερα επιδημιολογικά στοιχεία συσχέτισης της περιεκτικότητας της διατροφής σε πρωτεΐνες (ιδιαίτερα ζωικής προέλευσης) και του καρκίνου προέρχονται από επιδημιολογικές συγκρίσεις ανάμεσα στον επιπολασμό του καρκίνου σε διάφορα κράτη. Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες δείχνουν υψηλή ποσοστά συσχέτισης ανάμεσα στην κατανάλωση κρέατος και, ιδιαίτερα, του ολικού ποσού πρωτεΐνης που καταναλώνεται, τόσο με τη συχνότητα εμφάνισης όσο και με τη θνητότητα του καρκίνου, και μάλιστα του καρκίνου του παχέος εντέρου. Τα στοιχεία αυτά επιβεβαιώνονται και από πειραματικές μελέτες, μια μάλιστα από τις οποίες υποστηρίζει ότι η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη παρά η προέλευση της είναι ο καθοριστικός για την καρκινογένεση παράγοντας (74). Οι πιθανοί μηχανισμοί δράσης περιλαμβάνουν την τροποποίηση του μεταβολισμού των καρκινογόνων αλλά και την αύξηση της συγκέντρωσης στον εντερικό αυλό παραγόντων-προαγωγών της καρκινογένεσης όπως μεταβολίτες των λιπιδίων και αμμωνίας. Ειδικότερα, η πειραματική πρόκληση καρκινογένεσης του παχέος εντέρου, λόγω της δράσης της αμμωνίας, έχει αναφερθεί μετά από ενδο-ορθική έγχυση οξικού αμμωνίου σε επίμυες.

## **Ο ρόλος των φυτικών ινών της διατροφής στην καρκινογένεση**

Ο Burkitt το χίλια εννιακόσια εβδομήντα ένα (1971) πρότεινε ότι η υψηλή πρόσληψη φυτικών ινών στους Αφρικανικούς πληθυσμούς είναι υπεύθυνη για τα μικρά ποσοστά καρκίνου του παχέος εντέρου (75). Σε αρκετούς πληθυσμούς που καταναλώνουν διατροφές πλούσιες σε λίπος, οι φυτικές ίνες της διατροφής δρουν προστατευτικά ως προς τον κίνδυνο ανάπτυξης ορθοκολικού καρκινώματος. Οι φυτικές ίνες αποτελούν μια ετερογενή ομάδα υδρογονανθράκων, που είναι ανθεκτικές στην πέψη στον γαστρεντερικό σωλήνα, και περιλαμβάνουν την κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη, την πηκτίνη και μία μη-υδρογονανθρακική ουσία τη λιγνίνη (76, 77, 78). Η προστατευτική δράση των φυτικών ινών εξαρτάται τόσο από την περιεκτικότητα όσο και από την προέλευση τους. Η δράση αυτή μπορεί να οφείλεται στην απορρόφηση, αραίωση ή/και αναστολή του μεταβολισμού συν - καρκινογόνων, προαγωγών της καρκινογένεσης και πιθανών μεταλλαξιογόνων από τα συστατικά των φυτικών ινών.

Ένας μεγάλος αριθμός εργασιών, επιδημιολογικών και πειραματικών, έχει πραγματοποιηθεί την τελευταία εικοσαετία με αλληλοσυγκρουόμενα αποτελέσματα (79 – 91). Οι φυτικές ίνες επιδρούν ποικιλοτρόπως στη λειτουργία του γαστρεντερικού σωλήνα. Στην περίπτωση, π.χ., του ορθοκολικού καρκινώματος δεν είναι απόλυτα γνωστό ποιες από τις επιδράσεις αυτές έχουν σχέση με την παθογένεση του. Έτσι, η αύξηση του βάρους των κοπράνων και η ελάττωση του χρόνου διέλευσης τους από το γαστρεντερικό σωλήνα - δύο γεγονότα που σχετίζονται άμεσα με την κατανάλωση φυτικών ινών - δε φαίνεται να σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο καρκινογένεσης σε μια επιδημιολογική μελέτη Δανών και Φιλανδών ανδρών. Αντίθετα η αύξηση του όγκου των κοπράνων, και συνεπώς της αραίωσης του εντερικού περιεχομένου, έχει συσχετιστεί με χαμηλότερες συγκεντρώσεις χολικών οξέων στα κόπρανα και μικρότερη συχνότητα ορθοκολικού καρκινώματος.

Η σύνδεση των φυτικών ινών με τα χολικά οξέα και άλατα έχει επίσης προταθεί ως πιθανός μηχανισμός, αλλά η πειραματική χορήγηση χολεστυραμίνης (ρητίνης δεσμεύουσας χολικά οξέα) σε επίμυες που ελάμβαναν διάφορα καρκινογόνα αύξησε σημαντικά την συχνότητα καρκινογένεσης<sup>3</sup>. Οι φυτικές ίνες αυξάνουν τις ενεργειακές απώλειες από τα κόπρανα, και ο θερμιδικός περιορισμός αναστέλλει την πειραματική καρκινογένεση σε επίμυες και ποντικούς. Παρόμοια θετική συσχέτιση μεταξύ ενεργειακής πρόσληψης και συχνότητας του καρκίνου του παχέος εντέρου έχει βρεθεί σε επιδημιολογικές μελέτες (92). Οι φυτικές ίνες φέρουν στο παχύ έντερο, ανάμεσα σε άλλες ουσίες, λιπαρά οξέα μικράς αλύσου (προπιονικό, βουτυρικό, οξικό) που ελαττώνουν το εντερικό pH (93). Η ελάττωση αυτή του pH σχετίζεται με μειωμένη συχνότητα καρκίνου του παχέος εντέρου (94, 95).

Τα τελευταία χρόνια μεγάλη σημασία έχει δοθεί στον πιθανό ρόλο του βουτυρικού άλατος στην καρκινογένεση στο παχύ έντερο και τη δράση των φυτικών ινών (96, 97). Το βουτυρικό αποτελεί μία σημαντική πηγή ενέργειας των κολονοκυττάρων, και μελέτες σε καλλιέργειες κυττάρων έχουν δείξει ότι είναι αναστολέας της κυτταρικής ανάπτυξης και προαγωγέας δεικτών διαφοροποίησης, μέσω υπερακετυλίωσης της χρωματίνης(98). Η χορήγηση όμως βουτυρικού ήταν αναποτελεσματική στην πειραματική καρκινογένεση του παχέος εντέρου, ή αύξανε την ογκογένεση σε πειραματόζωα (99). Αν και πλέον υπάρχει γενική συμφωνία στον προστατευτικό ρόλο των λιγότερο ευπαθών σε βακτηριακή ζύμωση φυτικών ινών (πίτουρο σιταριού, κυτταρίνη) στην πειραματική καρκινογένεση του παχέος εντέρου, εξακολουθούν να υπάρχουν μεγάλες διαφωνίες ως προς το μηχανισμό δράσης. Σύμφωνα με μία άποψη (100) οι φυτικές ίνες που ζυμώνονται λιγότερο ασκούν την καρκινοπροστατευτική τους δράση επιτυγχάνοντας υψηλότερες συγκεντρώσεις βουτυρικού στην ορθοκολική περιοχή. Άλλοι όμως πιστεύουν ότι η δράση των λιγότερο ευπαθών στη ζύμωση ινών δεν σχετίζεται με το βουτυρικό, καθώς οι ίνες που ζυμώνονται περισσότερο (βρόμη, πηκτίνη) παράγουν περισσότερο βουτυρικό, το οποίο δεν έχει προστατευτική δράση στην πειραματική καρκινογένεση, αλλά μπορεί και να αυξάνει την συχνότητα ογκογένεσης

## **Ο ρόλος των ανόργανων στοιχείων της διατροφής στην καρκινογένεση**

Περίπου τριάντα (30) στοιχεία έχουν σχετιστεί με κάποιο τρόπο με την καρκινογένεση. Ορισμένες από αυτές τις συσχετίσεις είναι αποτέλεσμα επιδημιολογικών μελετών και αφορούν σε τοξική βιομηχανική έκθεση, άλλες είναι αποτέλεσμα πειραματικών μοντέλων της καρκινογένεσης και άλλες είναι αποτελεσμαίν vitro πειραμάτων σχετικών με τον καρκίνο. Τα σημαντικότερα στοιχεία, των οποίων η τυχόν μεταβολή της έκθεσης σε αυτά, θα μπορούσε να μεταβάλλει τον κίνδυνο ανάπτυξης ορθοκολικού καρκινώματος είναι το ασβέστιο, το σελήνιο, ο ψευδάργυρος, ο σίδηρος, το νάτριο, το κάλιο, και το φθόριο (101).

### **Ο ρόλος του Σεληνίου στην καρκινογένεση**

Η αντικαρκινογόνος δράση του σεληνίου ανακαλύφθηκε πρώτα από τον Schrauzer (102) το χίλια εννιακόσια εβδομήντα τρία (1973) όταν παρατήρησε ότι ο ορός καρκινοπαθών είχε μικρότερη ικανότητα να ανάγει το μπλε του μεθυλενίου σε σχέση με μη καρκινοπαθείς μάρτυρες, μια διαφορά που βρέθηκε να είναι διαφορά στις συγκεντρώσεις του ορού του αίματος σε σελήνιο. Το σελήνιο είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο, που σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να αντικαταστήσει το θείο σε ορισμένες οργανικές ενώσεις. Η κύρια φυσιολογική του λειτουργία στον άνθρωπο είναι η συμμετοχή του στο ένζυμο περοξειδάση της γλουταθειόνης, ένα σημαντικό αναγωγικό ένζυμο. Στις τροφές βρίσκεται κύρια στα δημητριακά, στα ψάρια, και σε μικρές ποσότητες στο κόκκινο κρέας, και το εύρος μεταξύ έλλειψης και τοξικότητας από σελήνιο είναι πολύ μεγάλο. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει τη διασύνδεση μεταξύ τυχόν χαμηλών επιπέδων σεληνίου και του καρκίνου (103, 104, 105) του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του προστάτη, του μαστού, των ωοθηκών και του τραχήλου της μήτρας. Η προστατευτική δράση του σεληνίου έναντι του καρκίνου έχει δειχτεί σε πειραματόζωα από πολλούς ερευνητές σε μοντέλα που βασίζονταν στη χορήγηση του καρκινογόνου διμεθυλυδραζίνη ή/και των μεταβολιτών της (106, 107, 108).

Ωστόσο, μερικά από τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά (109). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης του σεληνίου δεν είναι γνωστός, αλλά πιθανότατα περιλαμβάνει την αύξηση δραστηριότητας της περοξειδάσης της γλουταθειόνης, διάφορες μεταβολές της ηπατικής αίμης, μεταβολές στον μεταβολισμό των καρκινογόνων ουσιών και την κυτταροτοξική δράση στον εντερικό βλεννογόνο.

### **Ο ρόλος του Ασβεστίου στην καρκινογένεση**

Τα επιδημιολογικά στοιχεία που στηρίζουν την άποψη ότι η πρόσληψη ασβεστίου μειώνει τον κίνδυνο για ανάπτυξη καρκινωμάτων του γαστρεντερικού είναι περισσότερα από κάθε άλλο στοιχείο, με μόνη ίσως εξαίρεση το σελήνιο. Περιγραφικές μελέτες στη Σουηδία έδειξαν ότι μεταβολές στη συχνότητα του ορθοκολικού καρκινώματος είναι αντιστρόφως ανάλογες με την πρόσληψη γάλατος, και παρόμοια συμπεράσματα βγήκαν στην Ιαπωνία για τον καρκίνο του στομάχου. Ανάλογα ήταν και τα συμπεράσματα ανάμεσα στους Αντβεντιστές της έβδομης (7<sup>ης</sup>) Ημέρας, μια ομάδα με χαμηλό κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου το χίλια εννιακόσια ογδόντα πέντε (1985). Σε μια μελέτη μελλοντικής σύνδεσης (prospectivestudy) στο Σικάγο, η συχνότητα καρκίνου του παχέος εντέρου μετά από δεκαεννέα (19) χρόνια ήταν αντιστρόφως ανάλογη με τα ποσά ασβεστίου και βιταμίνης D στη διατροφή (110).

Σε άλλη μελέτη παραγόντων κινδύνου για ανάπτυξη υπερπλαστικών πολυπόδων το ασβέστιο της διατροφής είχε μαζί με τις φυτικές ίνες την ισχυρότερη προφυλακτική δράση (111). Τέλος, επιδημιολογική μελέτη στη Γαλλία υποστηρίζει ότι το είδος του γαλακτοκομικού προϊόντος, το γιαούρτι στη συγκεκριμένη περίπτωση, μπορεί να είναι ο καθοριστικός παράγοντας στην προφυλακτική αυτή δράση. Πρέπει πάντως να τονισθεί ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που θα μπορούσαν να εξηγήσουν την προστατευτική δράση του γάλατος, όπως η βιταμίνη A που συχνά προστίθεται στο γάλα, και η λακτόζη, που ελαττώνει το pH των κοπράνων. Αντίθετα με τις επιδημιολογικές μελέτες, τα στοιχεία από πειραματικές εργασίες είναι

αντικρουόμενα. Π.χ., χρησιμοποιώντας το πειραματικό μοντέλο της διμεθυλυδραζίνης, βρέθηκε ότι υπάρχει αύξηση στην πρόκληση καρκίνου στις ομάδες ποντικών που τρέφονταν με σκόνη γάλατος σε σχέση με άλλες πηγές πρωτεΐνης (112) παράλληλα με το γενικό συμπέρασμα ότι η διατροφή επηρεάζει την καρκινογένεση (113, 114). Ωστόσο, σε άλλες μελέτες, δε βρέθηκε να υπάρχει σημαντική διαφορά στη συχνότητα ογκογένεσης μεταξύ διατροφής με γάλα, συμπληρωμάτων ασβεστίου, και κοινής διατροφής (115). Καθώς στο πειραματικό αυτό μοντέλο οι ποσότητες ασβεστίου που χρησιμοποιήθηκαν είναι πολλαπλάσιες αυτών που ο άνθρωπος καταναλώνει και η σχέση ασβεστίου/φωσφόρου διαφορετική, τα αποτελέσματα δε θεωρούνται αξιόπιστα. Έχει επίσης δειχθεί ότι τα συμπληρώματα ασβεστίου και βιταμίνης D3 μειώνουν τη συχνότητα καρκινογένεσης σε επίμυες που τρέφονται με υψηλή σε λίπος διατροφή, όχι όμως και στην ομάδα με διατροφή χαμηλή σε λίπος(116). Διπλασιασμός του ασβεστίου της διατροφής έχει αναφερθεί πως ελάττωνε την πρόκληση ορθοκολικών όγκων μετά από εκτομή του λεπτού εντέρου (117).

Ο πιθανότερος μηχανισμός δράσης του ασβεστίου είναι η δέσμευση χολικών αλάτων και ελεύθερων λιπαρών οξέων προς σχηματισμό αδιάλυτων συμπλοκών, μια και αυτά στην ελεύθερη μορφή τους αποτελούν ερεθιστικούς παράγοντες και πιθανά καρκινογόνα του παχέος εντέρου (118). Σήμερα, το ασβέστιο θεωρείται από τους σημαντικότερους υπό μελέτη διατροφικούς παράγοντες στην προφύλαξη από τον καρκίνο του παχέος εντέρου.

### **Ο ρόλος του Σιδήρου στην καρκινογένεση**

Η έλλειψη σιδήρου δεν έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου. Αντίθετα η περίσσεια σιδήρου έχει συνδεθεί θετικά με την ανάπτυξη ορθοκολικού καρκινώματος, και μάλιστα η δέσμευση του υπό μορφή χηλικού δεσμού από το φυτικό οξύ των φυτικών ινών, έχει προταθεί ως πιθανός μηχανισμός της προστατευτικής δράσης των τελευταίων. Το ποσό του αποθηκευμένου σιδήρου, όπως και τα επίπεδα του σιδήρου της διατροφής συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου στο παχύ έντερο. Τα επιδημιολογικά αυτά στοιχεία έχουν επιβεβαιωθεί και από πειραματικές

εργασίες, όπου τα συμπληρώματα σιδήρου, χορηγούμενα από του στόματος ή παρεντερικά, αυξάνουν τη συχνότητα όγκων στο πειραματικό μοντέλο επίμου ή ποντικού/διμεθυλυδραζίνης.

Ο μηχανισμός με τον οποίο ασκεί τη δράση του ο σίδηρος σχετίζεται με το μεταβολισμό ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Αυξημένα ποσά σιδήρου στη διατροφή συνδέονται με σύνθεση υδροξυλιωριζών και άλλων οξειδωτικών ουσιών(119) και μείωση της δραστηριότητας της μαγγανικής υπεροξειδικής δισμουτάσης, ενός σημαντικού αντιοξειδωτικού ενζύμου των μιτοχονδρίων(120). Οι ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται έχουν τοξική δράση στο γονιδίωμα, προκαλώντας κατάτμηση της αλύσου του DNA και μεταλλάξεις.

### **Η Σχέση $K^+/Na^+$ και ο ρόλος της στην καρκινογένεση**

Παρατηρήσεις σε επιδημιολογικά στοιχεία στην Ιαπωνία, τη Γαλλία, τη Νορβηγία (121 – 128) και διακρατικές συσχετίσεις (129, 130), έχουν συνδέσει την υψηλή πρόσληψη νατρίου με αύξηση της θνητότητας από καρκίνο και την υψηλή πρόσληψη καλίου με μείωση της. Ο κοινός μηχανισμός που μπορεί να εξηγήσει τις παρατηρήσεις αυτές είναι ότι το άλας της διατροφής επηρεάζει την ενδοκυττάρια σχέση  $K^+/Na^+$ , και αύξηση της σχέσης αυτής δρα προστατευτικά στον καρκίνο, χωρίς όμως να είναι γνωστός ο μηχανισμός αυτής της σύνδεσης. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και στο πειραματικό μοντέλο καρκινογένεσης με χρήση διμεθυλυδραζίνης. Το υψηλό φυσικό υψόμετρο, η πρόσληψη φυτικών ινών και οι βιταμίνες Λ και C αυξάνουν τη σχέση  $K/Na$ , ενώ η ηλικία, το στρες, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της διατροφής και η χορήγηση διμεθυλυδραζίνης τη μειώνουν (131)

## **Ο ρόλος των βιταμινών στην καρκινογένεση**

Κατά το πρόσφατο παρελθόν, στην προσπάθεια κατανόησης του μηχανισμού με τον οποίο τα λαχανικά και τα φρούτα δρουν προστατευτικά ενάντια στην καρκινογένεση, μια σειρά βιταμινών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες που είναι άφθονες στα διατροφικά αυτά προϊόντα έχουν προταθεί ως πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες. Ανάμεσα τους βρίσκονται οι βιταμίνες A,C και E, που πιθανώς προφυλάσσουν, καταρχήν μέσω ελάττωσης των επιπέδων των οξειδωτικών προϊόντων που ανευρίσκονται στον εντερικό αυλό. Τα επιδημιολογικά στοιχεία που είναι σήμερα διαθέσιμα παρουσιάζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα, και η πλειοψηφία επεμβατικών μελετών με χρήση συμπληρωμάτων των ουσιών αυτών δεν έχει στηρίξει ξεκάθαρα την υποτιθέμενη προστατευτική τους δράση όπως φαίνεται από σειρά ανασκοπήσεων (132, 133, 134).

Το φυλικό οξύ έχει επίσης συνδεθεί με πιθανή προστατευτική δράση, ειδικά στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Σε πρόσφατη μελέτη πρόληψης επανεμφάνισης αδενωμάτων του παχέος εντέρου με χρήση διατροφικών συμπληρωμάτων, το φυλικό οξύ δεν παρουσίασε σαφή προστατευτική δράση(135, 136, 137). Αντίθετα, στο πειραματικό πρότυπο επίμου / διμεθυλυδραζίνης το φυλικό οξύ προφυλάσσει την ανάπτυξη μακροσκοπικών νεοπλασιών με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (138). Συμπερασματικά, τα στοιχεία που υπάρχουν σήμερα για τον πιθανό ρόλο των βιταμινών στην καρκινογένεση είναι αντιφατικά και οι δυσκολίες στην αναγνώριση και αποσαφήνιση αιτιολογικών σχέσεων των μικροδιατροφικών αυτών παραγόντων στην χημειοπροφύλαξη του καρκίνου είναι αναγνωρισμένες.



## **ΑΣΠΙΡΙΝΗ, ΜΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ (ΜΣΑΦ – NSAIDs) ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ**

Ο ιδανικός τρόπος εξάλειψης του καρκίνου είναι η πρόληψη, και το πρώτο βήμα για την πραγμάτωση αυτού του στόχου είναι η απομάκρυνση των αιτιολογικών παραγόντων. Ωστόσο, κάτι τέτοιο, ουσιαστικά, δεν είναι εφικτό καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις εμφάνισης της νόσου τα αίτια μας είναι άγνωστα. Στις περιπτώσεις εκείνες που η αιτία είναι γνωστή, η διαδικασία της καρκινογένεσης έχει ήδη ξεκινήσει και, επομένως, η πρόληψη αφορά την καταστολή της διαδικασίας της καρκινογένεσης.

Ένας άλλος λόγος για τον οποίο η πρόληψη είναι ιδιαίτερα δύσκολη υπόθεση είναι το γεγονός ότι στο φυσικό μας περιβάλλον υπάρχει ένας ιδιαίτερα μεγάλος αριθμός ουσιών η οποίες έχουν ενοχοποιηθεί ως καρκινογόνα (μέσω ειδικών μεταλλαξιογόνων δοκιμασιών), ενώ πολλές από αυτές τις ουσίες είτε βρίσκονται, φυσιολογικά στις τροφές, είτε προστίθενται σε αυτές κατά την παρασκευή τους. Η καρκινογόνος δράση των ουσιών αυτών στον άνθρωπο δεν είναι ξεκάθαρη, ενώ, ταυτόχρονα, η αφαίρεση τους από το περιβάλλον είναι εξαιρετικά δύσκολη. Η χημειοπροφύλαξη κατά του καρκίνου είναι ένας τρόπος ελέγχου της νόσου σύμφωνα κατά τον οποίο, η πρόληψη (του καρκίνου) επιτυγχάνεται με τη χορήγηση μίας ή περισσότερων χημικών ουσιών. Η χημειοπροφύλαξη, ως κλάδος της ογκολογίας, έχει αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία λόγω της υψηλής συχνότητας της εμφάνισης του καρκίνου στο Δυτικό κόσμο και της συνεχώς αυξανόμενης αναγνώρισης του γεγονότος ότι αφενός μεν πολλές μορφές καρκίνου οφείλονται στη μακροχρόνια έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες αλλά και, αφετέρου, της συνειδητοποίησης πως υπάρχουν ουσίες που μπορούν να προσφέρουν προστασία από τις καρκινογόνες ουσίες. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες αρχικά και πιο πρόσφατα η ασπιρίνη και άλλα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη αποτελούν τέτοιους, υποψήφιους, χημειοπροστατευτικούς παράγοντες (139).

Τα ΜΣΑΦ - NSAIDs είναι ουσίες που έχουν την ικανότητα να μειώνουν την παραγωγή προσταγλανδινών αναστέλλοντας το ένζυμο προσταγλανδινική ενδοπεροξειδική συνθετάση ή κυκλοοξυγενάση σε σχετικά χαμηλές δόσεις. Χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την αντιμετώπιση του πόνου που σχετίζεται με φλεγμονή, όπως αρθρίτιδες και άλλες διαταραχές του μυοσκελετικού συστήματος, δυσμηνόρροια, μετεγχειρητική αναλγησία κ.ά. Στον άνθρωπο υπάρχουν τουλάχιστο δύο ισομερή του ενζύμου κυκλοοξυγενάση, κυκλοοξυγενάση 1 και 2, και διαφέρουν στο ότι ενώ το πρώτο (COX-1) παράγεται με συνεχή έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου, η σύνθεση του δευτέρου (COX-2) προάγεται από μία ποικιλία παραγόντων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται διάφοροι αυξητικοί παράγοντες καθώς και οι κυτοκίνες. Η κλινική σημασία της διαφοράς αυτής έγκειται στο ότι η ασπιρίνη ενώ στην περίπτωση της κυκλοοξυγενάσης-1 αναστέλλει σχεδόν πλήρως την ενζυματική δράση της, στην κυκλοοξυγενάση-2 η ανασταλτική δράση της ασπιρίνης είναι μερική, καθώς αναστέλλει τον σχηματισμό της προσταγλανδίνης P<sub>GH2</sub>, αλλά διατηρεί τη δραστηριότητά της ως οξυγενάση (140).

Από την αρχή της δεκαετίας του ενενήντα ('90) μέχρι σήμερα έχουν γίνει αρκετές μελέτες, επιδημιολογικές και πειραματικές, που υποστηρίζουν την προστατευτική δράση της ασπιρίνης και των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών στην ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Σε μια ανασκόπηση της Paganini-Hill σε όλες σχεδόν τις επιδημιολογικές μελέτες η τακτική χρήση ασπιρίνης μείωνε τον κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου στο παχύ έντερο και στο ορθό περίπου στο ήμισυ (141). Η πρώτη από αυτές ανακοινώθηκε από τον Kune και συν. στην Μελβούρνη της Αυστραλίας και ανέφερε σχετικό κίνδυνο (relativerisk) στην ομάδα ασπιρίνης μηδέν κόμμα πενήντα τρία (0,53). Μετέπειτα μελέτες ανέφεραν παρόμοια ποσοστά μείωσης, ανεξαρτήτως φύλου, ενώ ανάμεσα τους υπάρχει αντίλογος για το ρόλο της δόσης της ασπιρίνης στη δράση αυτή. Ο Rosenberg, σε αντίθεση με την πρόσφατη τακτική χρήση ασπιρίνης και μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών, δε βρήκε προστατευτική δράση με παλαιά τακτική χρήση (ακόμη και αν διαρκούσε για αρκετά χρόνια), ή τη μη τακτική χρήση (142).

Παρόμοια ήταν τα συμπεράσματα σε ανασκοπικές μελέτες που αφορούν στην πολυποδίαση του παχέος εντέρου καθώς έχει πολλαπλώς διαπιστωθεί η στατιστικά σημαντική μείωση του κινδύνου για ανάπτυξη πολυπόδων σε όσους παίρνουν ασπιρίνη λιγότερο από δύο φορές τη μέρα, χωρίς τάση για περαιτέρω μείωση του κινδύνου με αυξανόμενη συχνότητα χορήγησης. Σε μια πολυκεντρική τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμασία ελέγχου της δράσης των αντιοξειδωτικών βιταμινών στην εμφάνιση πολυπόδων στο παχύ έντερο (PolypPreventionStudyI, USA, 1993), η «τακτική» χρήση ασπιρίνης προκαλούσε μείωση του κινδύνου στην ομάδα μαρτύρων κατά το ήμισυ. Τέλος αναφέρεται μία 35-50% μείωση του κινδύνου ανάπτυξης ασυμπτωματικών ορθοκολικών αδενωμάτων με χορήγηση ασπιρίνης, σε μια case-control δοκιμασία σε συμμετέχοντες ενός προγράμματος screening για ορθοκολικό καρκίνωμα (NottinghamFaecalOccultBloodScreeningProgram). Η προστατευτική δράση ήταν παρόμοια μεταξύ ασπιρίνης και άλλων NSAIDs και η χρήση για παραπάνω από 5 έτη συνδεόταν με τη μέγιστη προστασία (143).

Σε μία άλλη case-control μελέτη υποστηρίζεται η πρώιμη διάσπαση της αλληλουχίας αδένωμα-καρκίνωμα στο παχύ έντερο με τη χρήση ασπιρίνης και NSAIDs με μείωση του κινδύνου περίπου στο μισό (144). Τονίζεται και πάλι ότι η προστασία που προάγει η ασπιρίνη και άλλα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη είναι παρόμοια, ενώ μείωση του κινδύνου αναφέρεται ακόμη και αν η χρήση έχει σταματήσει ένα χρόνο πριν από τη διενέργεια διαγνωστικής κολonosκόπησης. Ωστόσο, σε άλλη, σπάνια, τυχαιοποιημένη μελέτη δοκιμασίας ασπιρίνης και placebo από τον Gann και συν. (PhysiciansHealthStudy), κατά την οποία χορηγήθηκε δόση αρκετή για την πρόληψη εμφράγματος του μυοκαρδίου (325 mg κάθε δεύτερη ημέρα), η χορήγηση ασπιρίνης δεν μείωσε τη συχνότητα ορθοκολικού καρκινώματος μετά από πέντε χρόνια τυχαιοποιημένης θεραπείας και παρακολούθησης (145). Η τυχαιοποιημένη χορήγηση σταμάτησε στα πέντε χρόνια, μετά από μείωση του κινδύνου για έμφραγμα του μυοκαρδίου στην ομάδα της ασπιρίνης κατά 44%, οπότε και δόθηκε η δυνατότητα στους συμμετέχοντες να διαλέξουν μεταξύ ασπιρίνης και placebo. Μετέπειτα ανασκόπηση της μελέτης αυτής με επιπλέον στοιχεία από την περαιτέρω παρακολούθηση των περιστατικών, τουλάχιστον μέχρι το χίλια εννιακόσια ενενήντα πέντε (1995),

ενίσχυσε τα αρχικά συμπεράσματα, παρά το ότι η ανασκόπηση τονίζεται ότι τα ευρήματα μπορεί να μην αντικατοπτρίζουν την αξία της ασπιρίνης ως χημειοπροστατευτικής ουσίας για τον καρκίνο, καθώς η περίοδος θεραπείας με ασπιρίνη ήταν περιορισμένη στα πέντε χρόνια και η δόση που χρησιμοποιήθηκε ήταν σχετικά μικρή (146).

Έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ότι υπάρχουν αναφορές για την προστατευτική αξία της ασπιρίνης σε ασθενείς που πάσχουν από οικογενή πολυποδίαση (familialadenomatouspolyposis ή FAP), μία γενετική νόσο που χαρακτηρίζεται από ανάπτυξη αδενωματωδών πολυπόδων σε όλο το μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα και μεταβιβάζεται με τον κυρίαρχο αυτοσωματικό χαρακτήρα. Οι πρώτες σχετικές παρατηρήσεις αφορούσαν στην πιθανή προστατευτική ενέργεια του μη στεροειδούς αντιφλεγμονώδους σουλινδάκης (sulindac) στους ασθενείς αυτούς και έγιναν το 1983 (147). Από τότε έχουν γίνει κι άλλες μελέτες, πολλές από τις οποίες είναι τυχαίοποιημένες, που υποστηρίζουν την προστατευτική δράση της σουλινδάκης, με μείωση του αριθμού των πολυπόδων κατά σαράντατέσσερα τοις εκατό (44%), και του μεγέθους τους κατά τριάνταπέντε τοις εκατό (35%). Πάντως η κατασταλτική δράση της σουλινδάκης δεν ήταν πλήρης σε κανένα ασθενή, γεγονός που συνιστά πιθανή την ανθεκτικότητα ορισμένων πολυπόδων στη δράση των μη-στεροειδών αντιφλεγμονωδών (148).

Σε πειραματικό επίπεδο έχουν γίνει αρκετές μελέτες που υποστηρίζουν τη χημειοπροστατευτική δράση των μη-στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (149 – 154). Στην ανασκόπηση των DuBois και Smalley αναφέρονται επιλεκτικά δεκατρείς (13) πειραματικές μελέτες των οποίων τα αποτελέσματα ενισχύουν την άποψη αυτή (140). Στις περισσότερες υπό εξέταση μελέτες ως καρκινογόνο χρησιμοποιήθηκε η διμεθυλυδραζίνη ή ο ενεργός μεταβολίτης της, το αζωξυμεθάνιο, ενώ ως πειραματόζωο χρησιμοποιήθηκε κυρίως ο επίμυς και περιστασιακά ο ποντικός. Αρχικά οι υπό μελέτη ουσίες ήταν η ινδομεθακίνη και η πιροξικάμη, των οποίων η χορήγηση σχετίστηκε τόσο με μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρκινωμάτων, όσο και μειωμένο μέγεθος όγκων. Μετέπειτα εργασίες με χορήγηση ιμπουπροφένης, σουλινδάκης, και πιο πρόσφατα ασπιρίνης έδειξαν

παρόμοια προστατευτική δράση με μείωση της συχνότητας και της πολλαπλότητας των όγκων. Σε ορισμένες από αυτές τις μελέτες η αποτελεσματικότητα της προστατευτικής δράσης των αντιφλεγμονωδών αυτών ουσιών στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου συσχετίστηκε με την ικανότητα τους να αναστέλλουν τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε εικοσανοειδή παράγωγα. Ακόμη, ο DuBois και συν. έδειξαν ότι τα επίπεδα του ενζύμου COX-2 είναι αυξημένα στα καρκινώματα του παχέος εντέρου που αναπτύσσονται μετά από χορήγηση αζώξυμεθανίου σε επίμυες (155). Στον ποντικό πολλαπλής εντερικής νεοπλασίας (multipleintestinalneoplasia, minmouse) η έκφραση του γονιδίου COX-2 είναι επίσης αυξημένη κατά την αρχική φάση ανάπτυξης εντερικών αδενωμάτων. Κατά πόσο αυτά τα ευρήματα σε πειραματικά μοντέλα προσομοιάζουν με τα γεγονότα που συμβαίνουν στην αυτόματη καρκινογένεση στον άνθρωπο δεν είναι γνωστό.

Οι περισσότεροι ερευνητές σήμερα συνδέουν την προστατευτική δράση της ασπιρίνης και των υπολοίπων μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών με τις αντιπαρασταγλανδινικές τους ιδιότητες. Το τελικό αποτέλεσμα της δράσης αυτής πιστεύεται ότι είναι η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος ή/και η αναστολή της σύνθεσης ενδογενών μεταλλαξιογόνων (156 – 159).



## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**





## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Όπως ήδη αναφέρθηκε στην εισαγωγή, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η θεραπευτική δράση των αναστολέων της COX, σε πειραματικό μοντέλο καρκίνου με επίμυες, διότι υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι οι αναστολείς της κυκλοοξυγενάσης, τα κατ' εξοχήν μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, αυτά, φάρμακα, έχουν έμμεση αντιογκογόνο και αντιαγγειογόνο δράση σε επίπεδο πειραμάτων σε ποντίκια. Παράλληλα το ίδιο πειραματικό μοντέλο, χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί η κυκλοοξυγενάση μόνη της, αλλά και σε συνδυασμό με την ασπιρίνη ως αντιφλεγμονώδες.

Η ασπιρίνη επελέγει ως προσθήκη στη χορήγηση του εκλεκτικού αναστολέα της κυκλοοξυγενάσης-2, διότι έχουν παρατηρηθεί συνέργειες μεταξύ του αναστολέα της κυκλοοξυγενάσης και της ασπιρίνης.

Παράλληλα με τις δύο αυτές «κύριες» ερευνητικές «γραμμές», εξετάστηκε και ο ρόλος της διατροφής στον καρκίνο.

Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων της παρούσης εργασίας έγιναν δύο μαζικά πειράματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν 480 συνολικά επίμυες (240 και 240 αντίστοιχα).

Τέλος, η διερεύνησή μας ολοκληρώθηκε με την χρησιμοποίηση του νεκροτομικού υλικού που προέκυψε από τα δύο μαζικά αυτά πειράματα για τον προσδιορισμό της δράσης των p53 και Bcl στο μοντέλο καρκινογένεσης που χρησιμοποιήθηκε.



## **Δίαιτα, Celecoxib και DMBA**

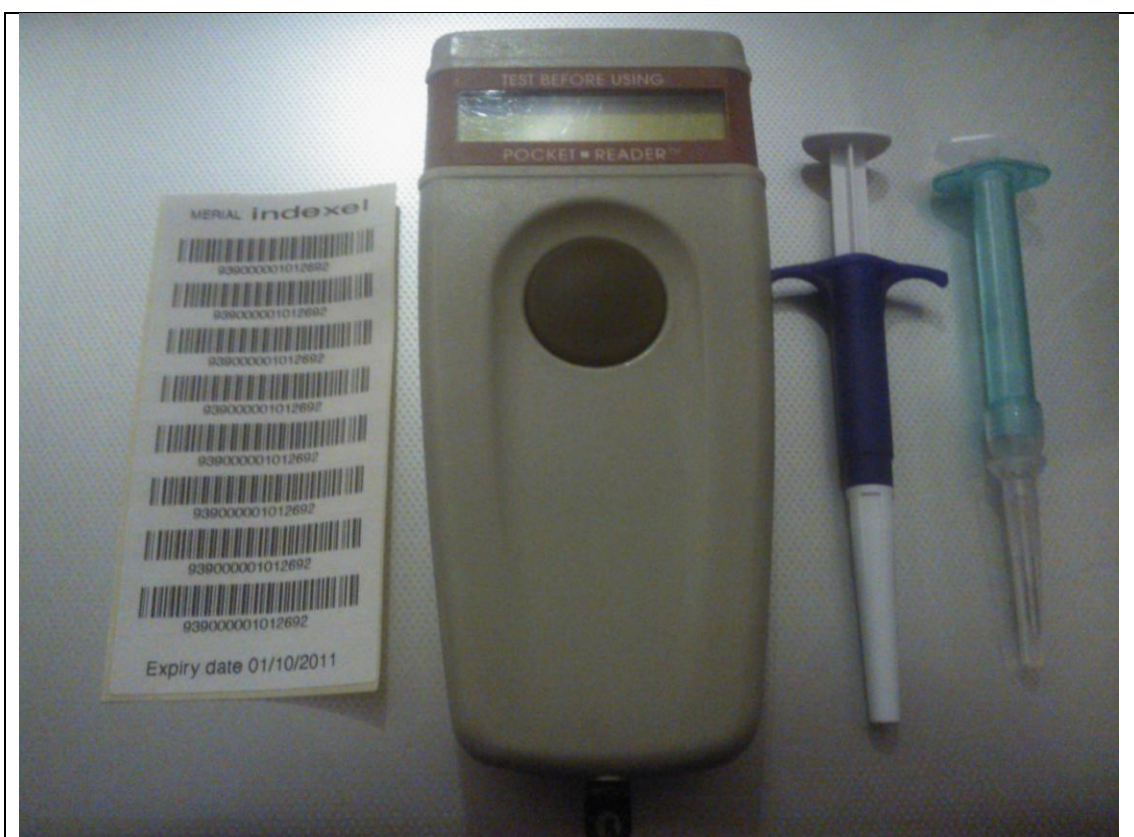
Το πρώτο πείραμα αφορούσε στη διερεύνηση της επίδρασης του εκλεκτικού αναστολέα της κυκλοοξυγενάσης-2 (Celebrex), και τριών ειδών διαίτας (υψηλής περιεκτικότητας σε ζωικά λίπη, κανονικής περιεκτικότητας και χαμηλής περιεκτικότητας) στην καρκινογένεση που προκλήθηκε με μία ή δύο (διπλή δόση) δόσεις DMBA.

Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές για τη φροντίδα και τη χρήση των πειραματόζων όπως αυτές καθορίζονται από την Ελληνική νομοθεσία.

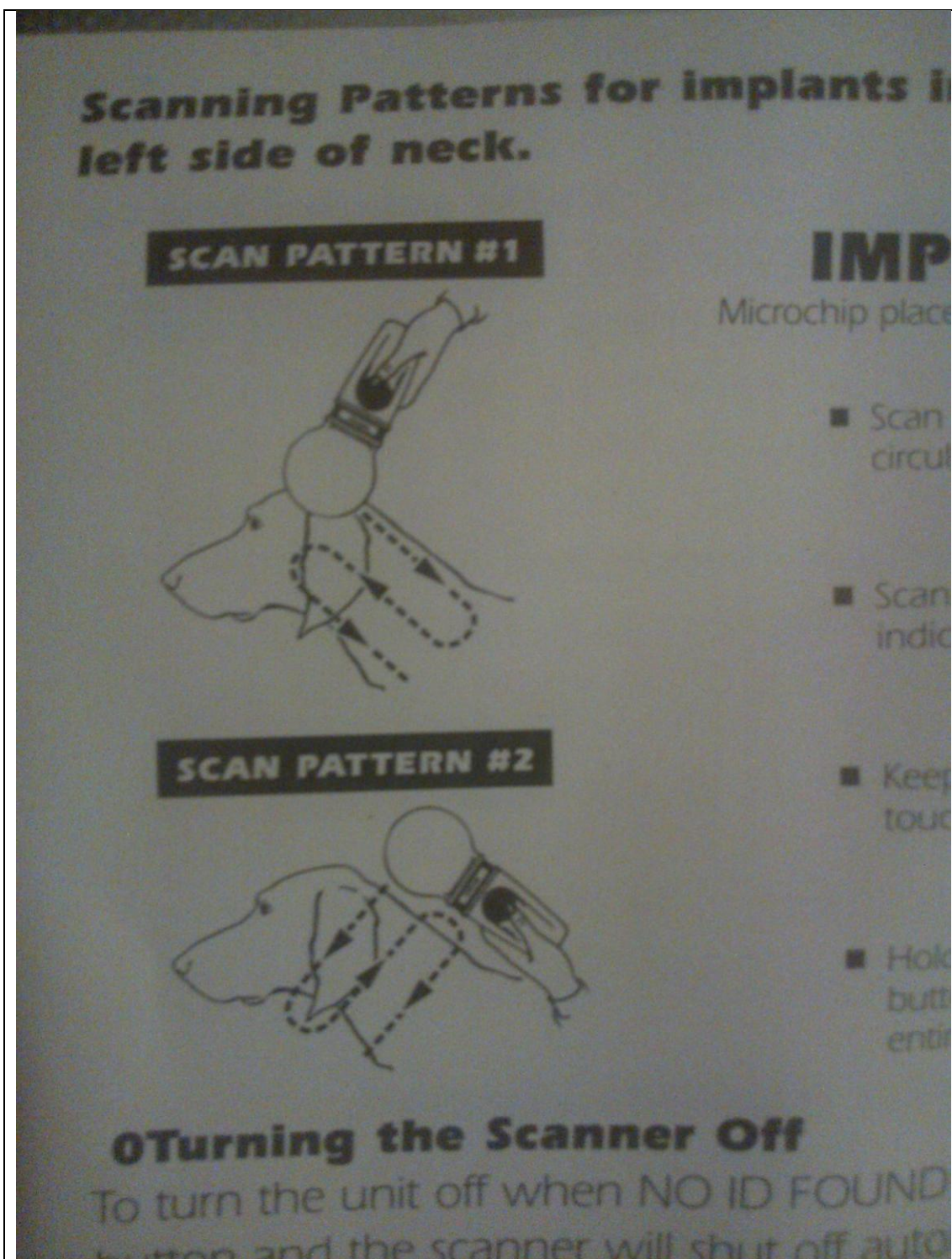
Όσον αφορά στη διατροφή, οι οδηγίες για την οργάνωση του περιεχομένου των τροφίμων έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία (160, 161, 162, 163, 164). Πειραματόζωα που ανήκαν στις ομάδες με τον περιορισμό στη διαίτα, τράφηκαν με το ισοδύναμο του 0,64 g τροφής για κάθε 1 g τροφής που καταναλώνονταν από τα πειραματόζωα που ήταν σε κανονική διατροφή. Το υπόλοιπο (0,36 g) συμπληρώνονταν από θερμιδικώς αδρανές υλικό (ίνες). Δηλαδή, τα πειραματόζωα που ήταν σε περιορισμένη, θερμιδικά, διατροφή κατανάλωναν 40% λιγότερη ενέργεια από ό,τι τα ζώα στην κανονική διατροφή. Κατά παρόμοιο τρόπο, τα πειραματόζωα που ανήκαν στις ομάδες που ήταν σε διαίτα υψηλής θερμιδικής περιεκτικότητας, κατανάλωναν 40% περισσότερες θερμίδες για κάθε 1 g τροφής σε σχέση με τα ταπειραματόζωα που τρέφονταν με κανονική διατροφή. Η αύξηση των θερμίδων, στη συγκεκριμένη περίπτωση, επιτεύχθηκε με την αύξηση του περιεχομένου σε λίπος της διαίτας εις βάρος των υδατανθράκων και των ινών που περιείχε η κανονική διαίτα. Κατά τα άλλα, η τροφή όλων των πειραματόζων περιείχε τις ίδιες ποσότητες πρωτεΐνης, βιταμινών και μετάλλων. Τέλος, στην τροφή των πειραματόζων που έλαβαν σελεκοξίμπη, αυτή προστέθηκε σε μία ημερήσια δόση των 1500 ppm.

Η οργάνωση των ομάδων έγινε σύμφωνα με τον πίνακα 2. Ειδικότερα, στο συγκεκριμένο θηλυκοί αρουραίοι Sprague-Dawley (SD) ηλικίας έξι εβδομάδων ανατράφηκαν σε παρτίδες των 20 έως 40 πειραματόζων. Όλα τα

πειραματόζωα προήλθαν από αποικία που δημιουργήθηκε από ζώα που είχαν αγοραστεί από το Ινστιτούτο Παστέρ στην Αθήνα. Κάθε πειραματόζωο σημάνθηκε με ετικέτα ταυτοποίησης ραδιοσυχνοτήτων (RFID) (μικροτσιπ) που τους εμφυτεύθηκε υποδορίως έτσι ώστε να είναι δυνατή και απολύτως ασφαλής η αναγνώρισή τους (εικόνες1 και 2). Τα πειραματόζωα, από τη στιγμή που έφευγαν από το εκτροφείο και εντάσσονταν στο πείραμα, στεγάζονταν (τέσσερα ζώα ανά κλωβό) για 10 ημέρες, ώστε να εγκλιματιστούν και να φτάσουν την ηλικία των 52 ημερών.



Εικόνα 1: Μηχάνημα αναγνώρισης ετικέτας ταυτοποίησης ραδιοσυχνοτήτων (RFID) (μικροτσιπ) που εμφυτεύθηκαν υποδορίως στα πειραματόζωά μας έτσι ώστε να είναι δυνατή και απολύτως ασφαλής η αναγνώρισή τους. Διακρίνονται στα δεξιά του μηχανήματος οι σύριγγες εμφύτευσης. Αριστερά του μηχανήματος φαίνονται οι ετικέτες με το barcode του ζώου που χρησιμοποιούνται για να συνδεθεί το ζώο με τον αντίστοιχο φάκελο παρακολούθησής του αλλά και για να ταυτοποιηθεί με το κλουβί στο οποίο ανήκει.



Εικόνα 2: Τρόποι «ανάγνωσης» της ετικέτας ταυτοποίησης ραδιοσυχνότητας, όπως αυτοί επιδεικνύονται στη σχετική συσκευασία RFID (μικροσίπ)

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2 Οργάνωση των πειραματόζων σε ομάδες και τύποι καρκίνου που παρατηρήθηκαν**

Αριθμός Πειραματόζου	ΔΟΣΗ	ΔΙΑΤΡΟΦΗ	CELEBREX	Πνεύμονας	Σάρκωμα	Μαστός	CANCER
1	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
2	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
3	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
4	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
5	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
6	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
7	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
8	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
9	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
10	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
11	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
12	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
13	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
14	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
15	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
16	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
17	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
18	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
19	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
20	ΔΙΠΛΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
21	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
22	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
23	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
24	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
25	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
26	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
27	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
28	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
29	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
30	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
31	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
32	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
33	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
34	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
35	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
36	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
37	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
38	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
39	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
40	ΔΙΠΛΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
41	ΔΙΠΛΗ	ΜΕΙΩΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
42	ΔΙΠΛΗ	ΜΕΙΩΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
43	ΔΙΠΛΗ	ΜΕΙΩΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ
44	ΔΙΠΛΗ	ΜΕΙΩΜΕΝΗ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ









189	MONH	AYEHMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
190	MONH	AYEHMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
191	MONH	AYEHMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
192	MONH	AYEHMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
193	MONH	AYEHMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
194	MONH	AYEHMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
195	MONH	AYEHMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
196	MONH	AYEHMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
197	MONH	AYEHMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
198	MONH	AYEHMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
199	MONH	AYEHMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
200	MONH	AYEHMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
201	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
202	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
203	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
204	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
205	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
206	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
207	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
208	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
209	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
210	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
211	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
212	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
213	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
214	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
215	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
216	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
217	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
218	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
219	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
220	MONH	KANONIKH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
221	MONH	MEIQMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
222	MONH	MEIQMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
223	MONH	MEIQMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
224	MONH	MEIQMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
225	MONH	MEIQMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
226	MONH	MEIQMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
227	MONH	MEIQMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
228	MONH	MEIQMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
229	MONH	MEIQMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
230	MONH	MEIQMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
231	MONH	MEIQMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
232	MONH	MEIQMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
233	MONH	MEIQMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
234	MONH	MEIQMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
235	MONH	MEIQMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI
236	MONH	MEIQMENH	NAI	OXI	OXI	OXI	OXI

237	ΜΟΝΗ	ΜΕΙΩΜΕΝΗ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
238	ΜΟΝΗ	ΜΕΙΩΜΕΝΗ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
239	ΜΟΝΗ	ΜΕΙΩΜΕΝΗ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
240	ΜΟΝΗ	ΜΕΙΩΜΕΝΗ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ

ΤοDMBA, (Sigma: D3254-5G/105K1312), διαλύθηκε σε σησαμέλαιο και η συγκέντρωση ρυθμίστηκε σε 40 mg / mL. Την 52η μέρα της ηλικίας των πειραματόζων τους χορηγήθηκε είτε μία απλή δόση (20 mg DMBA / kg ΒΣ διαλυμένο σε σησαμέλαιο) ή μία διπλή δόση (40 mg DMBA / kg ΒΣ διαλυμένο σε σησαμέλαιο) του καρκινογόνου. Η χορήγηση έγινε μέσω διασωλήνωσης του οισοφάγου. Συνολικά, 120 πειραματόζωα έλαβαν τη μονή δόση DMBA και 120 πειραματόζωα ζώα τη διπλή δόση. Μετά τη χορήγηση της DMBA τα ζώα (τυχαία σε κάθε κατηγορία ελέγχου, δηλαδή DMBA-μονής δόσης ή DMBA-διπλής δόσης) χωρίστηκαν σε 12 ομάδες των 20 ζώων η κάθε μια (4 ζώα ανά κλουβί, 5 κλουβιά ανά ομάδα), όπως αναφέρεται στον πίνακα 2

Η κατανάλωση τροφής και το σωματικό βάρος μετρήθηκαν καθημερινά και η γενική κατάσταση όλων των ζώων εξετάζονταν, για συμπτώματα ή σημεία τοξικότητας, δύο φορές την εβδομάδα. Ειδικότερα, μετά από την έκθεσή τους στο καρκινογόνο τα ζώα ψηλαφιούνταν δύο φορές την εβδομάδα επί 3 μήνες για να ανιχνευτεί η τυχόν ανάπτυξη όγκων.

Στο τέλος των 90 ημερών μετά τη χορήγηση DMBA τα πειραματόζωα, εφόσον είχαν επιβιώσει και δεν είχαν, στο μεταξύ, πεθάνει από λόγω τοξικότητας του χορηγούμενου DMBA ή από άλλους λόγους (πλην της καρκινογένεσης) θυσιάζονταν. Η θυσία των πειραματόζων γίνονταν με αναισθησία με αιθέρα. Σε όλα τα πειραματόζωα έγινε αυτοψία / νεκροψία για τον εντοπισμό τυχόν όγκων και, εφόσον ανευρίσκονταν όγκοι, ακολουθούσε ιστοπαθολογική εξέταση για να επιβεβαιωθεί η φύση τους. Η νεκροψία / νεκροτομή (εικόνες 3α έως 3γ και εικόνες 4α έως 4στ) περιλάμβανε τον πλήρη έλεγχο του σπλάχνων για παθολογικά ευρήματα που θα μπορούσαν να είναι είτε μεταστατικής προέλευσης ή το αποτέλεσμα των παρενεργειών της δράσης τηςDMBA.



Εικόνα 3α: Μακροσκοπική εξέταση θανατωθέντος πειραματόζωου πριν την νεκροτομή.



Εικόνα 3β: Μακροσκοπική εξέταση θανατωθέντος πειραματόζωου πριν την νεκροτομή.



Εικόνα 3γ: Μακροσκοπική εξέταση θανατωθέντος πειραματόζωου πριν την νεκροτομή.



Εικόνα 4α: Νεκροτομή θανατωθέντος πειραματόζωου



Εικόνα 4β: Νεκροτομή θανατωθέντος πειραματόζωου



Εικόνα 4γ: Νεκροτομή θανατωθέντος πειραματόζωου



Εικόνα 4δ: Νεκροτομή θανατωθέντος πειραματόζωου



Εικόνα 4ε: Νεκροτομή θανατωθέντος πειραματόζωου



Εικόνα 4στ: Νεκροτομή θανατωθέντος πειραματόζωου



Εικόνα 4ζ: Νεκροτομή θανατωθέντος πειραματόζωου

Όλοι οι όγκοι αποκόπηκαν και υπέστησαν επεξεργασία για ιστολογία. Στην περίπτωση αυτή, δείγματα των ιστών μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα 10% ουδέτερης φορμαλίνης και ακολούθησε η επεξεργασία ρουτίνας: αφυδάτωση



σε αύξουσα πυκνότητα αλκοόλης και κάθαρση με ξυλόλιο, που ακολουθήθηκε από ενσωμάτωση σε παραφίνη. Στη συνέχεια, τομές παραφίνης 2μηχρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη και ηωσίνη για την παρατήρησή τους με μικροσκόπιο.



### Ασπιρίνη, Celecoxib και DMBA

Όπως αναφέρθηκε στην αρχή του παρόντος κεφαλαίου, το ίδιο πειραματικό μοντέλο, χρησιμοποιήθηκε και στο δεύτερο πείραμα το οποίο έλαβε χώρα για να μελετηθεί η κυκλοοξυγενάση μόνη της, αλλά και σε συνδυασμό με την ασπιρίνη ως αντιφλεγμονώδες. Το πείραμα ακολούθησε το ίδιο πειραματικό μοντέλο που παρουσιάστηκε στην περίπτωση του ελέγχου των αλληλεπιδράσεων μεταξύ δίαιτας, Celecoxib και DMBA.

Η οργάνωση των ομάδων έγινε σύμφωνα με τον πίνακα 3

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 3 Οργάνωση των πειραματόζων σε ομάδες για τη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ Ασπιρίνης και Celecoxib</b>				
<b>Αριθμός πειραματόζωου</b>	<b>ΔΟΣΗ</b>	<b>ΔΙΑΤΡΟΦΗ</b>	<b>CANCER</b>	<b>CELEB+ASP</b>
1	2	3	0	1
2	2	3	0	1
3	2	3	0	1
4	2	3	0	1
5	2	3	1	1
6	2	3	1	1
7	2	3	1	1
8	2	3	1	1
9	2	3	1	1
10	2	3	0	0
11	2	3	0	0
12	2	3	0	0
13	2	3	0	0
14	2	3	0	0
15	2	3	0	0
16	2	3	0	0
17	2	3	0	0
18	2	3	0	0
19	2	3	0	0
20	2	3	0	0
21	2	2	0	0
22	2	2	1	1
23	2	2	1	1
24	2	2	1	1
25	2	2	1	1
26	2	2	1	0
27	2	2	1	0
28	2	2	1	0
29	2	2	1	0
30	2	2	1	0

31	2	2	1	0
32	2	2	0	0
33	2	2	0	0
34	2	2	0	0
35	2	2	0	0
36	2	2	0	0
37	2	2	0	0
38	2	2	0	0
39	2	2	0	0
40	2	2	0	0
41	2	1	1	0
42	2	1	1	0
43	2	1	1	0
44	2	1	1	0
45	2	1	1	0
46	2	1	0	0
47	2	1	0	0
48	2	1	0	0
49	2	1	0	0
50	2	1	0	0
51	2	1	0	0
52	2	1	0	0
53	2	1	0	0
54	2	1	0	0
55	2	1	0	0
56	2	1	0	0
57	2	1	0	0
58	2	1	0	0
59	2	1	0	0
60	2	1	0	0
61	1	3	0	1
62	1	3	0	1
63	1	3	0	1
64	1	3	0	1
65	1	3	0	1
66	1	3	1	0
67	1	3	1	0
68	1	3	1	0
69	1	3	1	0
70	1	3	1	0
71	1	3	0	0
72	1	3	0	0
73	1	3	0	0
74	1	3	0	0
75	1	3	0	0
76	1	3	0	0
77	1	3	0	0
78	1	3	0	0

79	1	3	0	0
80	1	3	0	0
81	1	2	1	0
82	1	2	1	0
83	1	2	1	0
84	1	2	1	0
85	1	2	1	0
86	1	2	1	0
87	1	2	1	0
88	1	2	1	0
89	1	2	0	0
90	1	2	0	0
91	1	2	0	0
92	1	2	0	0
93	1	2	0	0
94	1	2	0	0
95	1	2	0	0
96	1	2	0	0
97	1	2	0	0
98	1	2	0	0
99	1	2	0	0
100	1	2	0	0
101	1	1	1	0
102	1	1	1	0
103	1	1	0	0
104	1	1	0	0
105	1	1	0	0
106	1	1	0	0
107	1	1	0	0
108	1	1	0	0
109	1	1	0	0
110	1	1	0	0
111	1	1	0	0
112	1	1	0	0
113	1	1	0	0
114	1	1	0	0
115	1	1	0	0
116	1	1	0	0
117	1	1	0	0
118	1	1	0	0
119	1	1	0	0
120	1	1	0	0
121	2	3	1	0
122	2	3	1	0
123	2	3	1	0
124	2	3	1	0
125	2	3	1	0
126	2	3	1	0

127	2	3	1	0
128	2	3	0	0
129	2	3	0	0
130	2	3	0	1
131	2	3	0	1
132	2	3	0	1
133	2	3	0	1
134	2	3	0	1
135	2	3	0	1
136	2	3	0	1
137	2	3	0	1
138	2	3	0	1
139	2	3	0	1
140	2	3	0	1
141	2	2	1	0
142	2	2	1	0
143	2	2	1	0
144	2	2	0	1
145	2	2	0	1
146	2	2	0	1
147	2	2	0	1
148	2	2	0	1
149	2	2	0	1
150	2	2	0	1
151	2	2	0	1
152	2	2	0	1
153	2	2	0	1
154	2	2	0	1
155	2	2	0	1
156	2	2	0	1
157	2	2	0	1
158	2	2	0	1
159	2	2	0	1
160	2	2	0	1
161	2	1	1	0
162	2	1	0	1
163	2	1	0	1
164	2	1	0	1
165	2	1	0	1
166	2	1	0	1
167	2	1	0	1
168	2	1	0	1
169	2	1	0	1
170	2	1	0	1
171	2	1	0	1
172	2	1	0	1
173	2	1	0	1
174	2	1	0	1

175	2	1	0	1
176	2	1	0	1
177	2	1	0	1
178	2	1	0	1
179	2	1	0	1
180	2	1	0	1
181	1	3	1	0
182	1	3	1	1
183	1	3	1	1
184	1	3	0	0
185	1	3	0	0
186	1	3	0	0
187	1	3	0	0
188	1	3	0	1
189	1	3	0	1
190	1	3	0	1
191	1	3	0	1
192	1	3	0	1
193	1	3	0	1
194	1	3	0	1
195	1	3	0	1
196	1	3	0	1
197	1	3	0	1
198	1	3	0	1
199	1	3	0	1
200	1	3	0	1
201	1	2	0	1
202	1	2	0	1
203	1	2	0	1
204	1	2	0	1
205	1	2	0	1
206	1	2	0	1
207	1	2	0	1
208	1	2	0	1
209	1	2	0	1
210	1	2	0	1
211	1	2	0	1
212	1	2	0	1
213	1	2	0	1
214	1	2	0	1
215	1	2	0	1
216	1	2	0	1
217	1	2	0	1
218	1	2	0	1
219	1	2	0	1
220	1	2	0	1
221	1	1	0	1
222	1	1	0	1

223	1	1	0	1
224	1	1	0	1
225	1	1	0	1
226	1	1	0	1
227	1	1	0	1
228	1	1	0	1
229	1	1	0	1
230	1	1	0	1
231	1	1	0	1
232	1	1	0	1
233	1	1	0	1
234	1	1	0	1
235	1	1	0	1
236	1	1	0	1
237	1	1	0	1
238	1	1	0	1
239	1	1	0	1
240	1	1	0	1



## **p53 και Bcl**

### **Απομόνωση του DNA**

Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης το DNA του καρκινικού ιστού ελήφθη από τον ιστό των βιοψιών των όγκων. Ο ιστός αυτός είχε ήδη εγκλειστεί σε παραφίνη, καθώς τα δείγματα που μελετήθηκαν προέρχονταν από το πρώτο από τα δύο πειράματα που αποτέλεσαν τη ραχοκοκαλιά της παρούσας μελέτης. Η απόληψη του DNA του καρκινικού ιστού έγινε με τη χρήση του Kit ZR-25 (ZYMO RESEARCH Corp) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 17 δείγματα που επιλέχθηκαν τυχαία μεταξύ των βιοψιών των όγκων του αρχείου μας. Το DNA που συλλέχθηκε αραιώθηκε κατά 25 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης DNA ανά δείγμα,

### **Ταυτοποίηση του p53**

Η αντίδραση PCR έγινε τόσο για κάθε δείγμα όσο και για το θετικό μάρτυρα, με τη χρήση:

- a. 10 μl του εκχυλισμένου DNA ή cDNA ελέγχου,
- b. 0,2 μl πολυμεράσης DNA Taq (Promega) και
- c. 40.0 μl του Βασικού μίγματος.

Το Βασικό μίγμα περιείχε 250 μl προ αναμιγμένων «εναυσμάτων» ή «εκκινητών» διαλυμένων σε 750 μl ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο είχε βελτιστοποιηθεί για την αντίδραση PCR. Οι αλληλουχίες των εκκινητών για την ανίχνευση του p53 που περιέχονταν στο kit ήταν το 3' «ολίγο»: CTGAGGTCGTGAAGACGCTGC και το 5' ολίγο: CACATGTACTTGTAGTGGATAGTGG (X13058).

Κατά τη διάρκεια του επόμενου βήματος, οι αντιδράσεις PCR υποβλήθηκαν σε επαναλαμβανόμενη, κυκλική ανάλυση αλληλουχίας (cyclingsequencing) με το Kitp53 για αρουραίους (Maxim Biotech Inc). Το πρωτόκολλο θερμοκρασίας

της PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν: 1 κύκλος για 1 λεπτό σε 96°C, 35 κύκλοι κάθε μία αποτελούμενη από μετουσίωση (denaturation) στους 94°C για 1 λεπτό η κάθε μία, «ξεδίπλωμα» των αλύσεων (annealing) στους 58°C για 1 λεπτό και επέκτασή τους στους 72°C για 1 λεπτό, 1 κύκλο στους 72°C για 10 λεπτά και διατήρηση στους 4°C.

Ένα δέκατο από κάθε αντίδραση (δείγμα και το DNA ελέγχου και δείκτης μοριακού βάρους MW δείκτη κλίμακας 100 ζευγών βάσεων) τοποθετήθηκε σε πηκτή αγαρόζης, χαμηλού σημείου τήξεως, (Promega) 2% που περιείχε 0,5 pg/ml βρωμιούχο αιθίδιο και ηλεκτροφορήθηκαν στα 150 V / cm για 25 λεπτά. Υπό υπεριώδες φως, μία ζώνη 205 ζευγών βάσεων σε μέγεθος θεωρήθηκε ότι ήταν απόδειξη θετικού αποτελέσματος, δηλαδή της παρουσίας αλληλουχιών-στόχων στα δείγματα.

### **Ταυτοποίηση του Bcl-2**

Η αντίδραση PCR έγινε τόσο για κάθε δείγμα όσο και για το θετικό μάρτυρα, με τη χρήση

- a. 10 μl του εκχυλισμένου DNA ή cDNA ελέγχου,
- b. 0,2 μl πολυμεράσης DNA Taq (Promega) και
- c. 40.0 μl του Βασικού μίγματος.

Το Βασικό μίγμα περιείχε 250 μl προαναμιγμένων «εναυσμάτων» ή «εκκινητών» διαλυμένων σε 750 μl ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο είχε βελτιστοποιηθεί για την αντίδραση PCR. Οι αλληλουχίες των εκκινητών για την ανίχνευση του Bcl-2, που περιέχονταν στο kit, ήταν το 3' «ολίγο»: CAGCTGCACCTGACGCCCTTC και το 5' ολίγο: CCCAGCCTCCGTTATCCTGGA (L14680).

Κατά τη διάρκεια του επόμενου βήματος, οι αντιδράσεις PCR υποβλήθηκαν σε επαναλαμβανόμενη, κυκλική ανάλυση αλληλουχίας (cycling sequencing) με το Kitp53 για αρουραίους (Maxim Biotech Inc). Το πρωτόκολλο θερμοκρασίας της PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν: 1 κύκλος για 1 λεπτό σε 96°C, 35 κύκλοι

κάθε μία αποτελούμενη από μετουσίωση (denaturation) στους 94°C για 1 λεπτό η κάθε μία, «ξεδίπλωμα» των αλύσων (annealing) στους 58°C για 1 λεπτό και επέκτασή τους στους 72°C για 1 λεπτό, 1 κύκλο στους 72°C για 10 λεπτά και διατήρηση στους 4°C.

Ένα δέκατο από κάθε αντίδραση (δείγμα και το DNA ελέγχου και δείκτης μοριακού βάρους MW δείκτη κλίμακας 100 ζευγών βάσεων) τοποθετήθηκε σε πηκτή αγαρόζης, χαμηλού σημείου τήξεως, (Promega) 2% που περιείχε 0,5 ρg/ml βρωμιούχο αιθίδιο και ηλεκτροφορήθηκαν στα 150 V / cm για 25 λεπτά. Υπό υπεριώδες φως, μία ζώνη 235 ζευγών βάσεων σε μέγεθος θεωρήθηκε ότι ήταν απόδειξη θετικού αποτελέσματος, δηλαδή της παρουσίας αλληλουχιών-στόχων στα δείγματα.



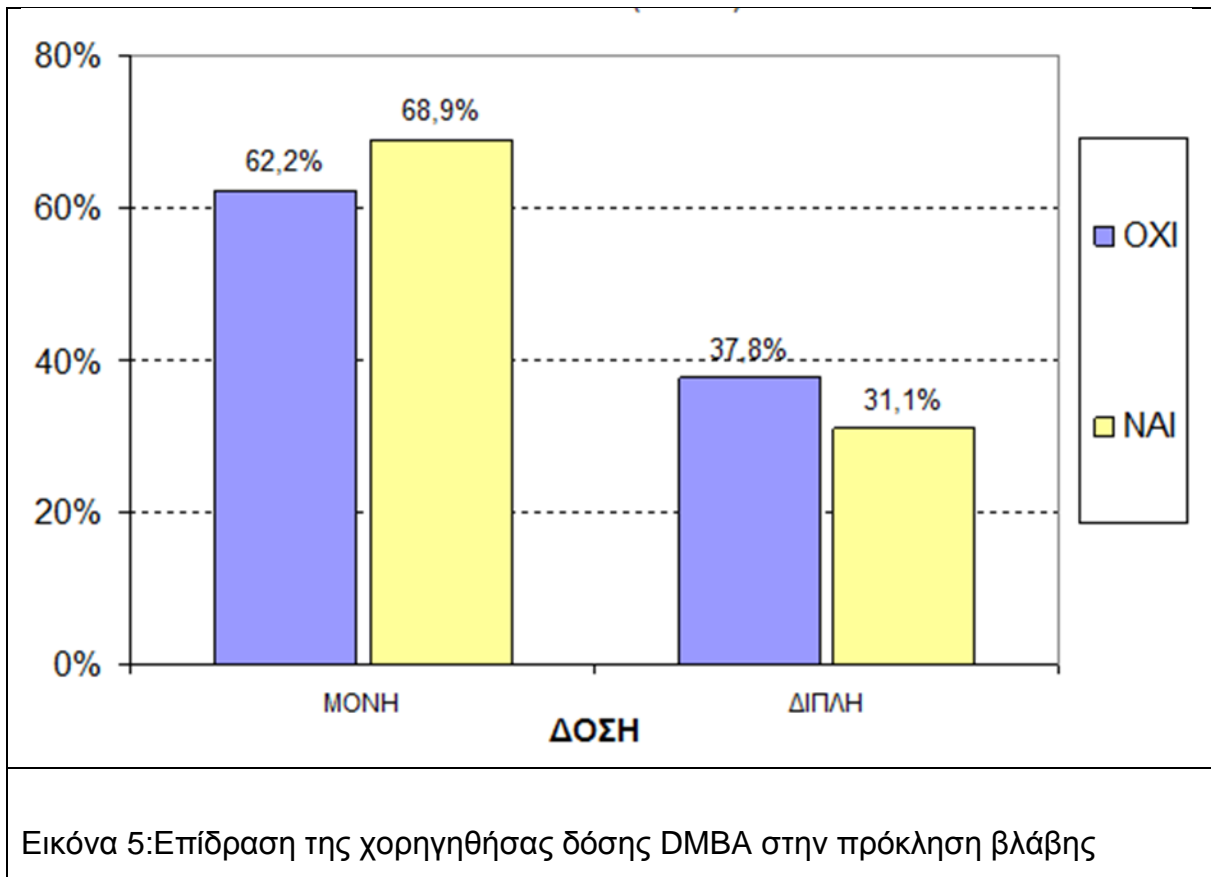
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Πρώτο πειραματικό πρωτόκολλο: Δίαιτα, Celecoxib και DMBA

Τα στοιχεία αξιολογήθηκαν στατιστικά με Chi - square test του Pearson. Τα αποτελέσματα και η στατιστική σημασία τους παρουσιάζονται στους Πίνακες 4 έως 9 και στις εικόνες 5 έως 8

Πίνακας 4: Επίδραση της χορηγηθείσας δόσης DMBA στην πρόκληση βλάβης					
			ΔΟΣΗ		Total
			ΜΟΝΗ	ΔΙΠΛΗ	
ΒΛΑΒΗ	ΟΧΙ	Count	56	34	90
		% within ΒΛΑΒΗ	62,2%	37,8%	100,0%
	ΝΑΙ	Count	31	14	45
		% within ΒΛΑΒΗ	68,9%	31,1%	100,0%
Total		Count	87	48	135
		% within ΒΛΑΒΗ	64,4%	35,6%	100,0%
χ <sup>2</sup> = 0,582    p = 0,446 > 0,05 (non-significant)					

Το μέγεθος της χορηγηθείσας δόσης DMBA δεν επηρεάζει, σε στατιστικώς σημαντικό επίπεδο, την πιθανότητα πρόκλησης βλάβης

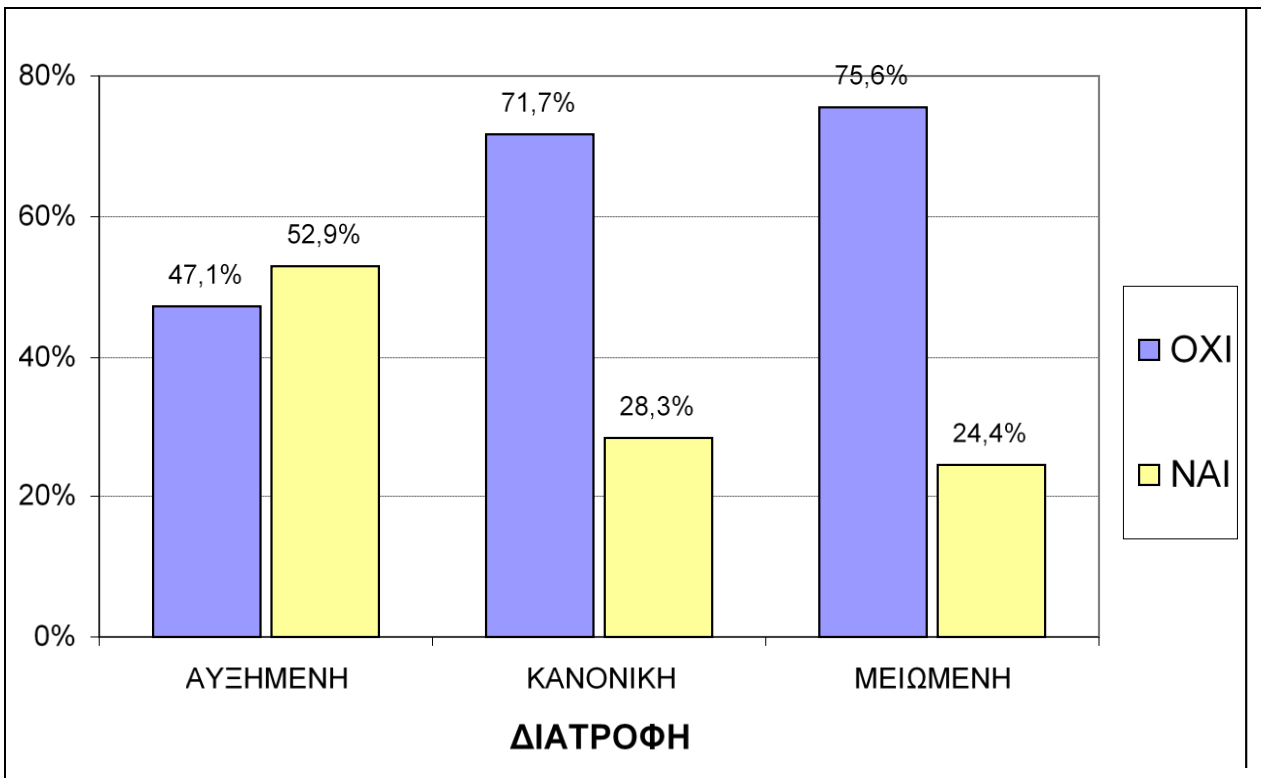


Πίνακας 5: Επίδραση της διατροφής στην πρόκληση βλάβης

		ΔΙΑΤΡΟΦΗ			Total	
		ΑΥΞΗΜΕΝΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	ΜΕΙΩΜΕΝΗ		
ΒΛΑΒΗ	ΟΧΙ	Count	16	43	31	90
		% within ΔΙΑΤΡΟΦΗ	47,1%	71,7%	75,6%	66,7%
	ΝΑΙ	Count	18	17	10	45
		% within ΔΙΑΤΡΟΦΗ	52,9%	28,3%	24,4%	33,3%
Total		Count	34	60	41	135
		% within ΔΙΑΤΡΟΦΗ	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

$\chi^2 = 8,033$     $p = 0,018 < 0,05$

Η πλούσια σε λιπαρά διατροφή σαφώς επηρεάζει, σε στατιστικώς σημαντικό επίπεδο, την πιθανότητα πρόκλησης βλάβης. Ωστόσο, η μείωση της περιεκτικότητας σε λιπαρά (από το επίπεδο που αντιστοιχεί στην «κανονική» διατροφή δεν βελτιώνει σημαντικά (είτε σε απόλυτες τιμές, είτε υπό την έννοια της στατιστικής σημαντικότητας) την πιθανότητα πρόκλησης βλάβης.



Εικόνα 6: Επίδραση της χορηγηθείσας δόσης DMBA στην πρόκληση βλάβης



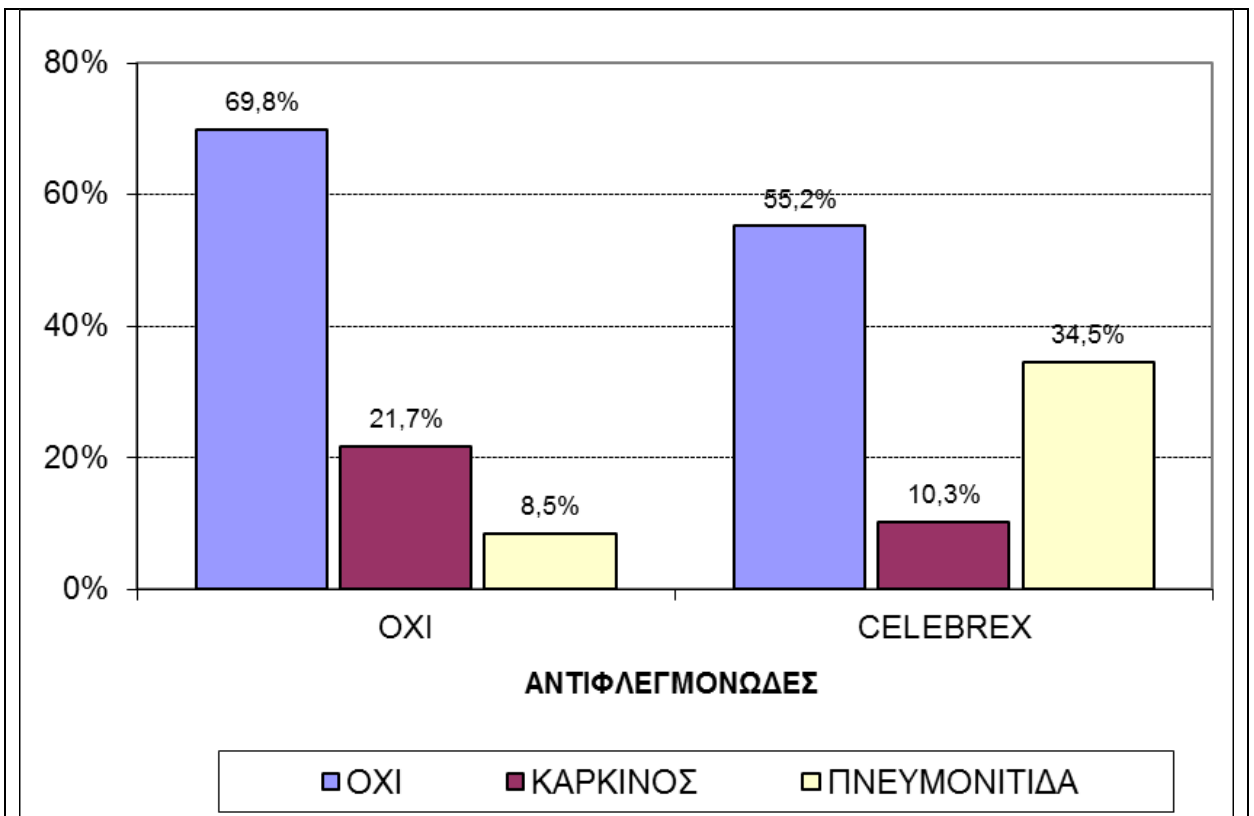
Πίνακας 6: Σύγκριση χορήγησης αντιφλεγμονώδους και αποτελέσματος					
		OUTCOME			Total
		ΧΩΡΙΣ ΣΥΜΠΤΩΜΑ	ΚΑΡΚΙΝΟΣ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΤΙΔΑ	
ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟ- ΝΩΔΕΣ	ΟΧΙ	74	23	9	106
		69,8%	21,7%	8,5%	100,0%
	CELEBREX	16	3	10	29
		55,2%	10,3%	34,5%	100,0%
Total		90	26	19	135
		66,7%	19,3%	14,1%	100,0%

$\chi^2 = 13.186$   $p = 0.001$

Παρατηρούμε ότι:

Το Celebrex ελαττώνει την εμφάνιση καρκίνου

Το Celebrex εμποδίζει την φλεγμονή των πνευμόνων να εξελιχθεί σε καρκίνο



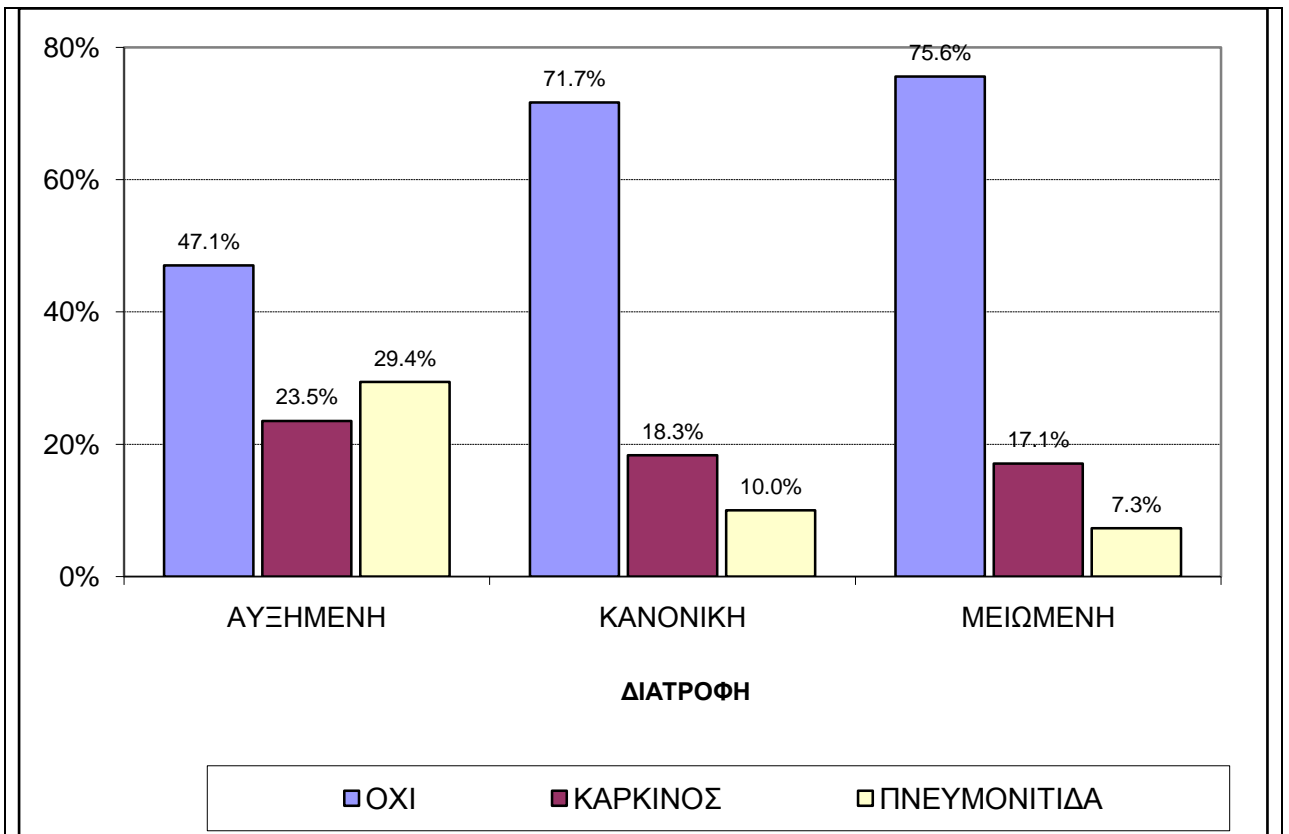
Εικόνα 7: Σύγκριση χορήγησης αντιφλεγμονώδους και αποτελέσματος

Πίνακας 7: Σύγκριση χορηγούμενης διατροφής και αποτελέσματος					
		OUTCOME			Total
		ΧΩΡΙΣ ΣΥΜΠΤΩΜΑ	ΚΑΡΚΙΝΟΣ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΤΙΔΑ	
ΔΙΑΤΡΟΦΗ	ΑΥΞΗΜΕΝΗ	16	8	10	34
		47,1%	23,5%	29,4%	100,0%
	ΚΑΝΟΝΙΚΗ	43	11	6	60
		71,7%	18,3%	10,0%	100,0%
	ΜΕΙΩΜΕΝΗ	31	7	3	41
		75,6%	17,1%	7,3%	100,0%
Total		90	26	19	135
		66,7%	19,3%	14,1%	100,0%

$\chi^2 = 10.849$   $p = 0.028 < 0.05$

Παρατηρούμε ότι:

Η αυξημένη σε λιπαρά διατροφή επιδεινώνει (αυξάνει) τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου ή φλεγμονής των πνευμόνων



Εικόνα 8: Σύγκριση χορηγούμενης διατροφής και αποτελέσματος

Πίνακας 8α: ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗ Κατηγοριοποίηση των μεταβλητών		
		Συχνότητα
ΔΙΑΤΡΟΦΗ	1 ΑΥΞΗΜΕΝΗ	34
	2 ΚΑΝΟΝΙΚΗ	60
	3 ΜΕΙΩΜΕΝΗ	41
ΔΟΣΗ	1 ΜΟΝΗ	87
	2 ΔΙΠΛΗ	48

Πίνακας 8β: ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗ Μεταβλητές της εξίσωσης								
	B	S.E.	Wald	df	ρ	Relative Risk	95,0% C.I. For EXP(B)	
						Exp(B)		
ΔΙΑΤΡΟΦΗ			7,677	2	,022			
ΔΙΑΤΡΟΦΗ (1) Αυξημένη	1,249	,500	6,234	1	<b>0,013</b>	<b>3,487</b>	<b>1,308</b>	<b>9,298</b>
ΔΙΑΤΡΟΦΗ (2)	,203	,463	,193	1	0,660	1,226	,495	3,037
Constant	-1,131	,364	9,679	1	0,002	,323		
a Variable(s) entered on step 1: ΔΙΑΤΡΟΦΗ.								

Πίνακας 8γ: ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗ Μεταβλητές που δεν συμμετέχουν στην εξίσωση			
			ρ
Step 1	Variables	ΔΟΣΗ (1)	,984
	Overall Statistics		,984

Η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου όταν η διατροφή είναι πλούσια σε λίπη, είναι 2,5 φορές περίπου κατά μέσο όρο μεγαλύτερη [(3,487 – 1 = 2,487), 95%

Διάστημα εμπιστοσύνης του σχετικού ρίσκου ή Confidence Interval (CI) of Relative Risk (RR) = (1,308 – 9,298),  $p = 0,013 < 0,05$ ] από την κανονική και μειωμένη διατροφή (οι οποίες δεν διαφοροποιούνται μεταξύ τους, ( $p = 0,66$ ).

**Πίνακας 9: ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗ**

**Χωρίς αντιφλεγμονώδες. N = 106**

**Μεταβλητές της εξίσωσης**

	B	S.E.	Wald	df	p	Relative Risk	95,0% C.I. for EXP(B)	
						Exp(B)		
ΔΙΑΤΡΟΦΗ			7,930	2	0,019			
ΔΙΑΤΡΟΦΗ (1) Αυξημένη	1,440	0,592	5,913	1	<b>0,015</b>	4,221	1,322	13,47
ΔΙΑΤΡΟΦΗ(2)	0,120	0,541	0,049	1	0,824	1,128	0,391	3,26
Constant	-1,273	0,428	8,862	1	0,003	0,280		

a Variable(s) entered on step 1: ΔΙΑΤΡΟΦΗ.

Από τα δεδομένα φαίνεται ότι χωρίς την χορήγηση αντιφλεγμονώδους ο σχετικός κίνδυνος αυξάνει (3,2 φορές).

Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να συνοψιστούν ως εξής :

Η αγωγή με Celecoxib προστατεύει από την DMBAβασισμένη ογκογένεση σε στατιστικά σημαντικό τρόπο. Ωστόσο, η σχετική αποτελεσματικότητα της προστασίας που παρέχει το Celecoxib μειώνεται σημαντικά όταν διπλασιάζεται η δόση DMBA(δηλαδή από μία δοσολογία DMBA 20 mg DMBA / kg ΒΣ σε μία δοσολογία DMBA των 40 mg DMBA / kg ΒΣ.Από τα δεδομένα φαίνεται ότι χωρίς την χορήγηση αντιφλεγμονώδους, ο σχετικός κίνδυνος αυξάνει (3,2 φορές).

Η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου σε πειραματόζωα που λάμβαναν διατροφή πλούσια σε λίπη, είναι 2,5 φορές περίπου κατά μέσο όρο μεγαλύτερη από την κανονική και μειωμένη διατροφή.

Επιπλέον, είναι προφανές ότι το λίπος που αυξάνει τη θερμιδική περιεκτικότητα της διαίτας επηρεάζει την DMBA επαγόμενη καρκινογένεση



**Δεύτερο πειραματικό πρωτόκολλο: Ασπιρίνη, Celecoxib και DMBA**

Τα στοιχεία του δεύτερου πειραματικού πρωτόκολλου αξιολογήθηκαν στατιστικά με το  $\chi^2$  test του Pearson. Τα αποτελέσματα και η στατιστική σημασία τους παρουσιάζονται στους παρακάτω Πίνακες (Πίνακας 10α έως Πίνακας 11β)

Πίνακας 10α: CELEBREX+ΑΣΠΙΡΙΝΗ * CANCER Crosstabulation						
				CANCER		Total
				OXI	NAI	
ΜΟΝΗ ΔΟΣΗ DMBA	CELEBREX+ ΑΣΠΙΡΙΝΗ	OXI	Count	44	16	60
			%	73.3%	26.7%	100.0%
		NAI	Count	58	2	60
			%	96.7%	3.3%	100.0%
	Total		Count	102	18	120
			%	85.0%	15.0%	100.0%

OXI = χορήγηση μόνο του Celebrex. NAI = ταυτόχρονη χορήγηση Ασπιρίνης και Celebrex

Πίνακας 10β: $\chi^2$ test του Pearson				
		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
	Pearson Chi-Square	12.810	1	.000
	N of Valid Cases	120		

Πίνακας 11α: ΔΙΠΛΗΔΟΣΗ - CANCER						
ΔΟΣΗ			CANCER		Total	
			OXI	NAI		
ΔΙΠΛΗ ΔΟΣΗ DMBA	CELEBREX+ ΑΣΠΙΡΙΝΗ	OXI	Count	38	22	60
			%	63.3%	36.7%	100.0%
		NAI	Count	51	9	60
			%	85.0%	15.0%	100.0%
	Total		Count	89	31	120
			%	74.2%	25.8%	100.0%

OXI = χορήγηση μόνο του Celebrex. NAI = ταυτόχρονη χορήγηση Ασπιρίνης και Celebrex

Πίνακας 11β: Χ2 test του Pearson			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	7.350	1	.007
N of Valid Cases	120		

### **Αποτελέσματα της διερεύνησης για το p53**

Η εξέταση υπό υπεριώδες φως των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης έδειξε ότι η μόνη θετική ζώνη που ταυτοποιήθηκε (σε όλα τα 17 δείγματα από τους διαφορετικούς όγκους που εξετάστηκαν) ήταν εκείνη του ελέγχου του cDNA (205 bp), η οποία παρέχεται με το kit DNA ιστού. Εφόσον δεν κατέσκει δυνατό να εντοπισθεί το γονίδιο p53 σε οποιοδήποτε από τα δείγματα μας θεωρούμε ότι αυτό αποτελεί ένδειξη πως το γονίδιο p53 είτε είναι απών είτε έχει υποστεί μετάλλαξη με αποτέλεσμα την αδρανοποίησή του στους όγκους που είχαν αναπτύξει τα πειραματόζωά μας

### **Αποτελέσματα της διερεύνησης για το Bcl-2**

Η εξέταση υπό υπεριώδες φως των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης έδειξε ότι η μόνη θετική ζώνη που ταυτοποιήθηκε (σε όλα τα 17 δείγματα από τους διαφορετικούς όγκους που εξετάστηκαν) ήταν εκείνη του ελέγχου του cDNA (235 bp) η οποία παρέχεται με το kit DNA ιστού. Εφόσον δεν κατέσκει δυνατό να εντοπισθεί το γονίδιο Bcl-2 σε οποιαδήποτε από τα δείγματα μας ερμηνεύουμε αυτό να σημαίνει ότι το γονίδιο Bcl-2 είτε είναι απών είτε έχει υποστεί μετάλλαξη με αποτέλεσμα την αδρανοποίησή του στους όγκους που είχαν αναπτύξει τα πειραματόζωά μας.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι διαδικασίες με τις οποίες η DMBA προκαλεί την ογκογένεση εξακολουθούν να είναι ακόμη ελάχιστα κατανοητές, παρά το γεγονός ότι έχουν γίνει τεράστια βήματα προόδου στον τομέα αυτό. Ακόμη και σήμερα π.χ., είναι ακόμα ασαφές το πόσο επιτυχή είναι τα πρωτόκολλα διέγερσης της καρκινογένεσης που χρησιμοποιούνται στην έρευνα για την πρόκληση και δημιουργία όγκων με τη χορήγηση DMBA.

Σε μία μελέτη σχετικά με υπερθερμική θεραπεία του επαγόμενου από DMBA καρκίνου του μαστού σε αρουραίους που χρησιμοποιούσε μαγνητικά νανοσωματίδια, οι Motoyama και συνεργάτες (165), σε δημοσίευσή τους, ανέφεραν ότι από τους 20 αρουραίους που χρησιμοποιήθηκαν, μόνο 4 επέδειξαν «πολλαπλή ανάπτυξη όγκων σε 1-3 σημεία του σώματος». Πράγματι, ήδη από το 1969 (166), ήταν γνωστό ότι η παραδοχή πως η ανάπτυξη των νεοπλασμάτων είναι ανεξάρτητη από καρκινογόνο ερέθισμα (από τη στιγμή που τα νεοπλάσματα έχουν πλήρως καθιερωθεί), δεν ισχύει καθολικά. Δεν ισχύει π.χ., στην πρόκληση μιας ευρείας ποικιλίας ηπατωμάτων σχετικά από τις διαφορετικές δόσεις στις οποίες χορηγούνται ή το χρονοδιάγραμμα χορήγησης των ηπατοκαρκινογόνων (168), ή για την επαγωγή των όγκων του μαστού σε αρουραίους που εκτέθηκαν σε διαφορετικές δόσεις και σχήματα χορήγησης του DMBA.

Το πρωτόκολλο μας σχεδιάστηκε με στόχο την ελαχιστοποίηση της αποτελεσματικότητας της καρκινογόνου δράσης του DMBA (μέσω διατροφής ή χορήγησης αντιφλεγμονωδών ουσιών) ενώ ταυτόχρονα αυξήσαμε το μέγεθος

του δείγματος (συνολικά στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκαν 480 πειραματόζωα), έτσι ώστε να είναι δυνατό να διαχωριστούν οι επιπτώσεις της διατροφής από εκείνες της σελεκοξίμπης στην ογκογένεση, χωρίς να επιβαρύνεται υπερβολικά το πείραμα από τη διαδικασία πρόκλησης όγκων. Πράγματι, η ποσότητα του DMBA που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μέσο όρο 3,8 mg ανά ζώο για τα ζώα που έλαβαν 20 mg DMBA / kg ΒΣ δόση και 7,6 mg ανά ζώο για τα ζώα που έλαβαν 40 mg DMBA / kg ΒΣ δόση. Πράγματι, αυτές οι ποσότητες DMBA είναι πολύ χαμηλότερες από εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν τόσο από τους Losher, W και συν. (168), όσο και από εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν στα αρχικά πειράματα πρόκλησης καρκινογένεσης με DMBA (166). Κατά συνέπεια, οι συχνότητες εμφάνισης όγκων στο πείραμά μας ήταν χαμηλότερες από εκείνες που αναφέρθηκαν στην πρόσφατη βιβλιογραφία (168, 169, 170, 171, και 172).

Ένα σημαντικό εύρημα της μελέτης μας είναι το γεγονός ότι η ανάπτυξη των ζώων κατά τη διάρκεια των πρώτων 72 ημερών μετά τη χορήγηση DMBA επηρεάζεται έντονα από το εάν έλαβαν μονή ή διπλή δόση DMBA. Η σχέση αυτή, παύει να ισχύει μόνο στην περίπτωση των ζώων που τρέφονται με υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος δίαιτα καθώς και μόνο στην περίπτωση της διπλής δόσης της DMBA, μπορεί να οφείλεται σε ορμονικές επιδράσεις που προκαλεί η χορήγηση της. Τέτοιες ορμόνες που πιθανώς θα μπορούσαν να προκαλέσουν αυτό το φαινόμενο είναι τα οιστρογόνα, η αυξητική ορμόνη ή η προλακτίνη.

Το γεγονός ότι το Celecoxib προστατεύει από την DMBA προκαλούμενη ογκογένεση σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο δεν αποτελεί έκπληξη και έχει καλά εξηγηθεί (173). Αυτό που είναι ενδιαφέρον είναι ότι η σχετική αποτελεσματικότητα της προστασίας που παρέχει η σελεκοξίμπη μειώνεται σημαντικά όταν η δόση DMBA διπλασιάζεται. Το χαρακτηριστικό αυτό μπορεί να ερμηνευθεί υπό την υπόθεση ότι η επίδραση της DMBA στο επίπεδο των ιστών είναι δόσοεξαρτώμενη. Η μελέτη μας ωστόσο, δεν αποδεικνύει την ύπαρξη συνεργειών μεταξύ της χορήγησης Celecoxib διαιτητικό περιορισμό, σε DMBA που προκαλείται από την καρκινογένεση.

Τέλος, τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν ότι το λίπος που περιέχουν οι δίαιτες που είναι υψηλού θερμιδικού περιεχομένου επηρεάζει δυσμενώς την επίδραση της DMBA, και υπογραμμίζουν την προστατευτική δράση που προκύπτει από τον περιορισμό της θερμιδικής πρόσληψης που προέρχεται από λίπος.

Τα παραπάνω εκτιθέμενα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 12:

#### **Πίνακας 12: Συμπεράσματα**

- 1** Το μέγεθος της χορηγηθείσας δόσης DMBA δεν επηρεάζει, σε στατιστικώς σημαντικό επίπεδο, την πιθανότητα πρόκλησης βλάβης
- 2** Η πλούσια σε λιπαρά διατροφή σαφώς επηρεάζει, σε στατιστικώς σημαντικό επίπεδο, την πιθανότητα πρόκλησης βλάβης. Ειδικότερα, πρέπει να τονιστεί ότι η πλούσια σε λιπαρά διατροφή αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου ή φλεγμονής των πνευμόνων. Έτσι, η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου σε πειραματόζωα που λάμβαναν διατροφή πλούσια σε λίπη, είναι 2,5 φορές περίπου κατά μέσο όρο μεγαλύτερη από ότι με την κανονική και την μειωμένης περιεκτικότητας σε λιπαρά διατροφή.
- 3** Ωστόσο, η μείωση της περιεκτικότητας σε λιπαρά κάτω από το επίπεδο που αντιστοιχεί στην «κανονική» διατροφή, δεν βελτιώνει σημαντικά την πιθανότητα πρόκλησης βλάβης.
- 4** Η αγωγή με Celecoxib προστατεύει από την DMBA προκαλούμενη ογκογένεση κατά στατιστικά σημαντικό τρόπο. Ειδικότερα, η αγωγή με Celecoxib ελαττώνει την πιθανότητα πρόκλησης καρκίνου και, επιπλέον, εμποδίζει τις προκαρκινικές βλάβες (φλεγμονή των πνευμόνων που προκαλείται από DMBA) να εξελιχθούν σε καρκίνο. Χωρίς την χορήγηση αντιφλεγμονώδους ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου ή φλεγμονής των πνευμόνων αυξάνει κατά 3,2 φορές.
- 5** Ωστόσο, η σχετική αποτελεσματικότητα της προστασίας που παρέχει το Celecoxib μειώνεται σημαντικά όταν διπλασιάζεται η δόση DMBA (δηλαδή από μία δοσολογία DMBA 20 mg DMBA/kg ΒΣ σε μία δοσολογία DMBA των 40 mg DMBA/kg ΒΣ).

Αναφορικά με τους μοριακούς μηχανισμούς της DMBA προκαλούμενης καρκινογένεσης, ήδη από το 1992, καθώς προσπαθούσαν να ανιχνεύσουν την

παρουσία της πρωτεΐνης p53 με ανοσοκυτταροχημικές μεθόδους οι Moll και συν. (174) παρατήρησαν ότι ορισμένοι από τους "καρκίνους του μαστού που περιέχουν τη μορφή άγριου τύπου πρωτεΐνης p53 μπορούν να αδρανοποιήσουν τη δραστικότητα της φυσικής ογκοκαταστολής καθώς αυτή η πρωτεΐνη κατακρημνίζεται στο κυτταρόπλασμα, μακριά από την θέση της δράσης της στον πυρήνα του κυττάρου". Με βάση αυτό, πρότειναν ότι η ανίχνευση της κυτταροπλασματικής p53 σε φυσιολογικό ιστό του μαστού που βρίσκεται σε φάση γαλουχίας θα μπορούσε να υποδηλώνει ότι αυτός είναι ο μηχανισμός που χρησιμοποιείται σε συγκεκριμένες φυσιολογικές καταστάσεις για να επιτραπεί ο παροδικός πολλαπλασιασμός των κυττάρων.

Σχεδόν μια δεκαετία αργότερα οι Sivaraman και συν. (175), με βάση τις παρατηρήσεις ότι «η ολοκληρωμένη εγκυμοσύνη νωρίς στην αναπαραγωγική ζωή προσδίδει προστασία έναντι του καρκίνου του μαστού στις γυναίκες» και ότι η εγκυμοσύνη προστατεύει από τον καρκίνο του μαστού (δηλαδή πρόκειται για μια επίδραση που μιμείται τα οιστρογόνα και τη χορήγηση προγεστερόνης), πρότειναν, προς διερεύνηση την «cell-fate hypothesis» (δηλαδή την υπόθεση περί της «μοίρας του κυττάρου» σύμφωνα με την οποία σε μια κρίσιμη περίοδο κατά την εφηβεία «το ορμονικό περιβάλλον της εγκυμοσύνης επηρεάζει την αναπτυξιακή μοίρα ενός υποσυνόλου των μαστικών επιθηλιακών κυττάρων και των απογόνων τους». Σύμφωνα με αυτό το σκεπτικό, οι αλλαγές αυτές «υπαγορεύουν την πολλαπλασιαστική απόκριση στηνδράση του καρκινογόνου και περιλαμβάνουν την αδρανοποίηση του καρκινογόνου όσον αφορά στην αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των μαστικών επιθηλιακών κυττάρων και την αυξημένη και επί μακρόν διατηρούμενη έκφραση της πυρηνικής p53», επισημαίνοντας ταυτόχρονα ότι υπό την υπόθεση αυτή, η ορμόνη που κωδικοποιείται από το πυρηνικό p53 πρέπει να είναι μεταγραφικά ενεργή.

Η πρόταση των Sivaraman και συν. (175) ήρθε αμέσως μετά την επισήμανση από τους Molinari και συν. (176) ότι «η επαγόμενη από την οιστραδιόλη αδρανοποίηση του p53 θα μπορούσε να εμπλέκεται στην ογκογένεση των οιστρογόνο-εξαρτώμενων νεοπλασμάτων» και υποστηρίχθηκε, σχετικά πρόσφατα, από το έργο των Yamamoto και συν. (177), των Xin και Juan



(173) και των Hershey και συν.(178). Πράγματι, οι Yamamoto και συν. (177) πρότειναν ότι η ανώμαλη κυτταροπλασματική εντόπιση του p53 θα μπορούσε να συμβάλει, τουλάχιστον εν μέρει, στην ανάπτυξη του ηπατοβλαστώματος. Οι Xin και Xuan (173) πάλι, αναφέρουν ότι η Thr-55 επαγόμενη φωσφορυλίωση προκαλεί τη σύνδεση της p53 με τον παράγοντα πυρηνικής εξαγωγής CRM1, οδηγώντας στην εξαγωγή του p53 από τον πυρήνα, ενώ η αναστολή της Thr - 55 επαγόμενης φωσφορυλίωσης από ένα συγκεκριμένο διατροφικό φλαβονοειδές, την απιγενίνη, ειδικώς δεσμεύει το σύμπλεγμα CRM1-p53, αποκαθιστά τον πυρηνικό εντοπισμό του p53, και ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα που περιέχουν στο κυτταρόπλασμάτους άγριου τύπου p53 στην βλάβη του DNA. Τέλος, οι Hershey και συν.(178) έδειξαν ότι οι γάτες με όγκους που περιείχαν κυτταροπλασματική p53 είχαν σημαντικά μικρότερο χρόνο μέχρι την υποτροπή του όγκου σε σύγκριση με αυτές τις γάτες με όγκους που παρουσίασαν πυρηνικό εντοπισμό (με βάση τη χρώση) του p53.

Με βάση το έργο του Aoga και συν.(179), η ογκογένεση οφείλεται σε παρεμβολή με P53 μπορεί να αποδοθεί είτε σε μετάλλαξη (οπότε η ογκογένεση μπορεί να αποδοθεί στην επακόλουθη κλωνοποίηση του μεταλλαγμένου γονιδίου) ή στην εξωγενή ή ενδογενή παρεμβολή με την πρωτεΐνη p53. Αν και πρόκειται για έναν πολύ ισχυρό ισχυρισμό, ο ισχυρισμός αυτός υποστηρίζεται από τις παρατηρήσεις ότι η οργανοφωσφορική ένωση διακυλοσουλφίδιο (DAS) ρυθμίζει την έκφραση p53 με τοπική εφαρμογή σε όγκους του δέρματος σε ποντίκια Swiss albino που προκλήθηκαν από προκαλείται από την DMBA. Πράγματι, η ανάλυση Western blot και η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης, σε συνδυασμό με πολυμεταβλητή κυτταρομετρία ροής, δείχνουν ότι η εφαρμογή DAS επάγει την έκφραση του άγριου- τύπου p53 και ρυθμίζει προς τα κάτω την έκφραση του μεταλλαγμένου p53. Επιπλέον, η ανάλυση με ανοσοκλιδωση (immunoblotting) των όγκων έδειξε σημαντική αύξηση στα επίπεδα της άγριου τύπου p53 μετά από την χρήση του DAS, ενώ για το μεταλλαγμένο p53 τα DMBA επαγόμενα επίπεδα της πρωτεΐνης βρέθηκαν μειωμένα μέχρι και σε σχεδόν κανονικά επίπεδα μετά την χρήση του DAS.

Στην περίπτωση μας, με δεδομένη την παρουσία της p53 σε όλους τους υγιείς ιστούς, η απουσία αγρίου τύπου γονίδιο p53 από όλα τα δείγματα όγκων μας δείχνει ότι η παρεμβολή του DMBA στη λειτουργία του p53 μπορεί να αποδοθεί σε μετάλλαξη (και στην επακόλουθη κλωνοποίηση του μεταλλαγμένου γονιδίου) παρά σε κάποια εξωγενή ή ενδογενή παρεμβολή με την πρωτεΐνη p53. Επιπλέον, η απουσία του γονιδίου Bcl- 2 σε όλα τα δείγματα όγκων μας, αν μη τι άλλο, θα μπορούσε δυνητικά να εντείνει την ογκογόνο δραστηριότητα του μεταλλαγμένου γονιδίου p53. Πράγματι, οι Binder και συν. (180), στην μελέτη τους πάνω στην έκφραση της πρωτεΐνης του Bcl - 2 στον καρκίνο του μαστού σε σχέση με τους άλλους καθιερωμένους προγνωστικούς παράγοντες, επισημαίνουν ότι η Bcl - 2 ανιχνεύεται κυρίως στα διαφοροποιημένα καρκινώματα ενώ η έκφραση της συνδέεται με άλλα ευνοϊκά ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά και προγνωστικούς παράγοντες που σχετίζονται με θετική κλινική έκβαση ενώ η απώλεια της έκφρασης του Bcl- 2 «φαίνεται να συνδέεται με την απώλεια της ορμονικής ρυθμιστικότητας, την αυξημένη διαφοροποίηση και τον απορυθμισμένο πολλαπλασιασμό».

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κυριότερη αιτία θανάτου είναι ο καρκίνος και ακολουθούν οι καρδιαγγειακές παθήσεις. Ανάμεσα στις κατηγορίες των αντικαρκινικών φαρμάκων που έχουν δοκιμαστεί, τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη κατέχουν πρωτεύοντα ρόλο. Παράλληλα, είναι πλέον σαφές ότι η διαίτα παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Ωστόσο, οι επιδράσεις της διαίτας, των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων του συνδυασμού τους, στην καρκινογένεση, συνεχίζουν να είναι ουσιαστικά αχαρτογράφητες, αν και σημαντική πρόοδος έχει γίνει στον τομέα αυτό τα τελευταία χρόνια

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η θεραπευτική δράση των αναστολέων της κυκλοοξυγενάσης (COX), σε πειραματικό μοντέλο καρκίνου με επίμυες, καθώς υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι οι αναστολείς της κυκλοοξυγενάσης έχουν έμμεση αντιογκογόνο και αντιαγγειογόνο δράση σε πειραματικό επίπεδο. Παράλληλα το ίδιο πειραματικό μοντέλο, χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί η κυκλοοξυγενάση μόνη της, αλλά και σε συνδυασμό με την ασπιρίνη ως αντιφλεγμονώδες. Η ασπιρίνη επελέγει επιπρόσθετα του εκλεκτικού αναστολέα της κυκλοοξυγενάσης-2, διότι έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχουν συνέργειες μεταξύ του αναστολέα της κυκλοοξυγενάσης και της ασπιρίνης. Τέλος, εξετάστηκε ο ρόλος της διατροφής στον καρκίνο, ενώ έγινε προσπάθεια ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης των ογκογονιδίων p53, και Bcl-2.

Για την πειραματική πρόκληση του καρκίνου χρησιμοποιήθηκε το 7,12-διμεθυλοβενζ-(α)-ανθρακένιο σε επίμυες διότι, παρά το γεγονός ότι η αυτόματη ανάπτυξη όγκων σε εργαστηριακά πειραματόζωα είναι εξαιρετικά σπάνια, έχει αποδειχτεί ότι είναι εφικτή η πρόκληση νεοπλασιών σε αυτά με τη χορήγηση χημικών καρκινογόνων. Όσον αφορά στη διαίτα, κατά τα τελευταία είκοσι χρόνια, οι υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος δίαιτες θεωρείται ότι αυξάνουν τον κίνδυνο διαφόρων καρκίνων. Ως εκ τούτου, η μελέτη μας επικεντρώθηκε στην περιεκτικότητα της διατροφής σε λιπαρά.

Για την επίτευξη των στόχων της παρούσης εργασίας έγιναν δύο μαζικά πειράματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν 480 συνολικά επίμυες (240 σε κάθε πείραμα). Το πρώτο πείραμα αφορούσε στη διερεύνηση της επίδρασης του εκλεκτικού αναστολέα της κυκλοοξυγενάσης-2 (Celebrex), και τριών ειδών δίαιτας (υψηλής περιεκτικότητας σε ζωικά λίπη, κανονικής περιεκτικότητας και χαμηλής περιεκτικότητας) στην καρκινογένεση που προκλήθηκε με μία ή δύο (διπλή δόση) δόσεις DMBA. Το ίδιο πειραματικό μοντέλο, χρησιμοποιήθηκε και στο δεύτερο πείραμα που αφορούσε στη δράση της κυκλοοξυγενάσης, μόνη ή σε συνδυασμό με την ασπιρίνη ως αντιφλεγμονώδες. Η διερεύνησή μας ολοκληρώθηκε με την χρησιμοποίηση του νεκροτομικού υλικού που προέκυψε από τα δύο μαζικά αυτά πειράματα για τον προσδιορισμό της δράσης των p53 και Bcl2 στο μοντέλο καρκινογένεσης που χρησιμοποιήθηκε.

Όσον αφορά στη διατροφή, πειραματόζωα που ανήκαν στις ομάδες με τον περιορισμό στη δίαιτα, κατανάλωναν 40% λιγότερη ενέργεια από ό,τι τα ζώα στην κανονική διατροφή με την αντικατάσταση του λίπους που περιείχε η κανονική διατροφή, από θερμιδικώς αδρανές υλικό (ίνες). Παρόμοια, τα πειραματόζωα που ανήκαν στις ομάδες που ακολουθούσαν δίαιτα υψηλής θερμιδικής περιεκτικότητας, κατανάλωναν 40% περισσότερες θερμίδες, ενώ η αντίστοιχη αύξηση των θερμίδων επιτεύχθηκε μέσω της αύξησης του περιεχομένου της δίαιτας σε λίπος εις βάρος των υδατανθράκων και των ινών που περιείχε η κανονική δίαιτα. Κατά τα άλλα, η τροφή όλων των πειραματόζωων περιείχε τις ίδιες ποσότητες πρωτεΐνης, βιταμινών και μετάλλων. Τέλος, στην τροφή των πειραματόζωων που έλαβαν σελεκοξίμη ή ασπιρίνη, αυτές προστέθηκαν σε μία ημερήσια δόση των 1500 ppm για τη σελεκοξίμη και 350ppm για την ασπιρίνη.

Από δεδομένα του πρώτου πειράματος προέκυψε ότι το μέγεθος της χορηγηθείσας δόσης DMBA δεν επηρεάζει την πιθανότητα πρόκλησης βλάβης ενώ η πλούσια σε λιπαρά διατροφή σαφώς επηρεάζει την πιθανότητα πρόκλησης βλάβης. Ωστόσο, η μείωση της περιεκτικότητας σε λιπαρά (από το επίπεδο που αντιστοιχεί στην «κανονική» διατροφή) δεν βελτιώνει σημαντικά (είτε σε απόλυτες τιμές, είτε υπό την έννοια της στατιστικής σημαντικότητας)

την πιθανότητα πρόκλησης βλάβης. Επίσης, παρατηρήσαμε ότι το Celebrex ελαττώνει την εμφάνιση καρκίνου ενώ εμποδίζει την προ-καρκινική φλεγμονή των πνευμόνων να εξελιχθεί σε καρκίνο. Τέλος, παρατηρήσαμε ότι η αυξημένη σε λιπαρά διατροφή επιδεινώνει (αυξάνει) τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου ή προ-καρκινικής φλεγμονής των πνευμόνων.

Από δεδομένα του πρώτου πειράματος καταδεικνύεται η ισχυρή συνέργεια της ασπιρίνης με το Celebrex

Τέλος, όσον αφορά στη μελέτη του DNA του καρκινικού ιστού για την ταυτοποίηση του p53 και του Bcl-2, δεν κατέσται δυνατό να εντοπισθεί το αντίστοιχο γονίδιο σε οποιοδήποτε από τα δείγματα μας.

Από τα αποτελέσματά μας προκύπτει ότι:

1. Το μέγεθος της χορηγηθείσας δόσης DMBA δεν επηρεάζει, σε στατιστικώς σημαντικό επίπεδο, την πιθανότητα πρόκλησης βλάβης.
2. Η πλούσια σε λιπαρά διατροφή σαφώς επηρεάζει, σε στατιστικώς σημαντικό επίπεδο, την πιθανότητα πρόκλησης βλάβης. Ειδικότερα, πρέπει να τονιστεί ότι η πλούσια σε λιπαρά διατροφή αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου ή φλεγμονής των πνευμόνων. Έτσι, η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου σε πειραματόζωα που λάμβαναν διατροφή πλούσια σε λίπη, είναι 2,5 φορές περίπου κατά μέσο όρο μεγαλύτερη από ότι με την κανονική και την μειωμένης περιεκτικότητας. Ωστόσο, η μείωση της περιεκτικότητας σε λιπαρά κάτω από το επίπεδο που αντιστοιχεί στην «κανονική» διατροφή, δεν βελτιώνει σημαντικά την πιθανότητα πρόκλησης βλάβης.
3. Η αγωγή με Celecoxib προστατεύει από την DMBA προκαλούμενη ογκογένεση κατά στατιστικά σημαντικό τρόπο. Ειδικότερα, η αγωγή με Celecoxib ελαττώνει την πιθανότητα πρόκλησης καρκίνου και, επιπλέον, εμποδίζει τις προκαρκινικές βλάβες (φλεγμονή των πνευμόνων που προκαλείται από DMBA) να εξελιχθούν σε καρκίνο. Χωρίς την χορήγηση αντιφλεγμονώδους ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου ή φλεγμονής των πνευμόνων αυξάνει κατά 3,2

φορές. Ωστόσο, η σχετική αποτελεσματικότητα της προστασίας που παρέχει το Celecoxib μειώνεται σημαντικά όταν διπλασιάζεται η δόση DMBA (δηλαδή από μία δοσολογία DMBA 20 mg DMBA/kg ΒΣ σε μία δοσολογία DMBA).

4. Τέλος, με δεδομένη την παρουσία της p53 σε όλους τους υγιείς ιστούς, η απουσία αγρίου τύπου γονίδιο p53 από όλα τα δείγματα όγκων μας δείχνει ότι η παρεμβολή του DMBA στη λειτουργία του p53 μπορεί να αποδοθεί σε μετάλλαξη (και στην επακόλουθη κλωνοποίηση του μεταλλαγμένου γονιδίου) παρά σε κάποια εξωγενή ή ενδογενή παρεμβολή με την πρωτεΐνη p53, ενώ η απουσία του γονιδίου Bcl- 2 σε όλα τα δείγματα όγκων μας, αν μη τι άλλο, θα μπορούσε δυνητικά να εντείνει την ογκογόνο δραστηριότητα του μεταλλαγμένου γονιδίου p53.

# ABSTRACT

Cancer is the main cause of death, followed by cardiovascular disease. Among the categories of anticancer drugs tested so far, the non-steroidal anti-inflammatory drugs hold a primary role. Furthermore, it is now clear that diet plays an important role in carcinogenesis. However, the effects of diet, of non-steroidal anti-inflammatory drugs or their combination, remain virtually uncharted as far as carcinogenesis is concerned, although significant progress has been made in this area in recent years

The purpose of this study is to elicit the therapeutic effect of the inhibitors of cyclooxygenase (COX), in a rat experimental model of cancer, since there is strong evidence that cyclooxygenase inhibitors have indirect antitumor and anti-angiogenic activity within an experimental setting. In addition, the same experimental model was used to study cyclooxygenase alone, and in combination with aspirin, as an anti-inflammatory agent. Aspirin was selected because it has been observed that there are synergies between the cyclooxygenase inhibitor and aspirin. Finally, we examined the role of diet in cancer, while an attempt was made at immune-histo-chemical detection of oncogene p53, and Bcl-2.

For the experimental induction of cancer we used 7,12 - dimethylbenz-(a)-anthracene (DMBA) in rats because, despite the fact that spontaneous development of tumors in laboratory animals is extremely rare, it has proved possible to induce such neoplasms by administering chemical carcinogens. With regard to diet, during the last twenty years high-fat diets have been shown to increase the risk of various cancers. Hence, our study focused on dietary fat.

To achieve the objectives of our study we conducted two massive experiments in which rats were used (a total of 480 animals or 240 in each experiment). The first experiment involved the investigation of the effect of the

selective cyclooxygenase-2 inhibitors (Celebrex), and three kinds of diet (high in animal fat, normal and low) in carcinogenesis which was induced by one or two (double dose) doses of DMBA . The same experimental model used in the second experiment involved the action of cyclooxygenase, alone or in combination with aspirin as an anti-inflammatory agent. We completed our investigation with the use of autopsy material obtained from two massively these experiments to determine the activity of p53 and Bcl2 in the carcinogenesis model that we used.

With regard to food, animals on restriction diet, consumed 40% less energy than animals on normal diet. This was achieved by replacing the fat contained in the normal diet by calorically inert material (fibers). Similarly, animals on high caloric content diet, consumed 40% more calories with the corresponding increase in calories achieved by increasing the content of dietary fat at the expense of carbohydrates and fibers contained in the normal diet. Otherwise, the food for all animals contained the same amounts of protein, vitamins and minerals. Finally, to the feed of those animals who received aspirin or Celecoxib, we added a daily dose of 1500 ppm Celecoxib and/or 350 ppm for aspirin.

The data of the first experiment showed that the size of the administered dose of DMBA does not affect the likelihood of cancer while the high fat diet clearly affects the likelihood of cancer. However, the reduction of fat (from the level corresponding to the "normal" diet) did not improve significantly (either in absolute terms or in the sense of statistical significance) the potential for harm. We observed that Celebrex reduces cancer while it also prevents pre-cancerous lung inflammation which can develop into cancer. Finally, we observed that the rich-in-fat diet worsens (increases) the chances of getting cancer or pre-cancerous lung inflammation.

The data of the second experiment demonstrated a strong synergy between aspirin and Celebrex. Finally, with regard to the study of the DNA of tumor tissue which was undertaken in order to identify p53 and Bcl-2, we report that it was not possible to identify the corresponding genes in any of our samples.



Therefore, our results show that:

1. The size of the administered dosage does not affect, at a statistically significant level, the DMBA potential for harm.
2. High fat diet clearly affects, at a statistically significant level, the potential of DMBA for harm. In particular, it should be noted that the high-fat diet increases the chances of developing cancer or pre-cancerous lung inflammation. Thus, the probability of developing cancer in animals receiving a fat-rich-diet is, on average, about 2.5 times greater than for the regular or for the reduced fat diet. However, the reduction of fat below the level corresponding to that of a "normal" diet, does not significantly improve the likelihood of damage.
3. Treatment with Celecoxib protects against DMBA-induced tumors, in a statistically significant way. Specifically, treatment with Celecoxib reduces the probability of cancer and prevents premalignant lesions (lung inflammation induced by DMBA) to develop into cancer. Without the administration of anti-inflammatory drugs the relative risk of cancer or inflammation of the lungs increases by 3.2 times. However, the relative effectiveness of the protection provided by Celecoxib is significantly reduced when a doubling of the DMBA dose occurs.
4. Finally, given the presence of p53 in all normal tissues, the absence of wild-type p53 gene in all tumor samples shows that interference of DMBA in the function of p53 can be attributed to a mutation (and subsequent cloning of the mutated gene) rather than to any exogenous or endogenous interfering with the protein p53. At the same time, the absence of Bcl-2 gene in all the tumor samples, potentially increases the oncogenic activity of the mutated p53 gene.



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Ries LAG, Kosary CL, Hankey BF, et al. SEER Cancer statistics Review, 1973-1996. Bethesda, MD: National Cancer Institute 1999
2. Landis SH, Marrey T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 1999; 49 (1): 8-31
3. DuBois RN. New paradigms for cancer prevention. Carcinogenesis 2001; 22:691-2.
4. U.S. Department of Health and Human Services: The Surgeon General's Report on Nutrition and Health, DHHS (PHS) Publ. No. 88-50210. Washington, DC: Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, 1988.
5. National Research Council, Committee on Diet and Health, Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences. Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk. Washington, DC: National Academy Press, 1989.
6. Hursting SD, Thornquist M and Henderson MM: Types of dietary fat and the incidence of cancer at five sites. Prev Med 1990; 19:242-253.
7. Davies G, Salter J, Hills M, Martin L-A, Sacks N, Dowsett M. Correlation between Cyclooxygenase-2 Expression and angiogenesis in human breast cancer. Clin Cancer Res 2003; 9:2651-56.
8. Bodo M, Muzi G, Bellucci C, και συν. Comparative in vitro studies on the fibrogenic effects of two samples of silica on epithelial bronchial cells. J BiolRegulHomeost Agents 2007; 21:97-104.
9. Willett WC. Fat, energy and breast cancer. J Nutr 1997; 127:921-3.
10. Anogianaki A, Negrev NN, Shaik YB, et al. Capsaicin: an irritant anti-inflammatory compound. J BiolRegulHomeost Agents 2007; 21:1-4.
11. Rogers AE. Diet and breast cancer: studies in laboratory animals. J Nutr 1997; 127:933-5.
12. Santagostino A, Saggia C, Migliora P, και συν. Prospective study on prognostic significance of DNA ploidy and Ki-67 expression in colorectal cancer. J BiolRegulHomeost Agents 2007; 21:13-22.

13. Kxitchevsky D. Caloric restriction and experimental mammary carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 46:161-7.
14. Harvell DM, Strecker TE, Xie B, Pennington KL, McComb RD, Shull JD. Dietary energy restriction inhibits estrogen-induced mammary, but not pituitary, tumorigenesis in the ACI rat. *Carcinogenesis* 2002; 23:161-9.
15. Thompson HJ, Zhu Z, Jiang W. Dietary energy restriction in breast cancer prevention. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003; 8:133-42.
16. Zhu Z, Jiang W, Thompson HJ. An experimental paradigm for studying the cellular and molecular mechanisms of cancer inhibition by energy restriction. *MolCarcinog* 2002; 35:51-6.
17. Hursting SD, Kari FW. The anti-carcinogenic effects of dietary energy restriction: mechanisms and future directions. *Mutat Res* 1999; 443:235-49.
18. DuBois RN. New paradigms for cancer prevention. *Carcinogenesis* 2001; 22:691-2.
19. Waddell WR, Loughry RW. Sulindac for polyposis of the colon. *J SurgOncol* 1983; 24:83-87.
20. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, και συν. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 28:1313-6.
21. Giardiello FM, Offerhaus GJA, DuBois RN. The role of non-steroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer prevention. *Eur J Cancer* 1995; 31A:1071-6.
22. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer and development. *Oncogene* 1999; 18:7908-16.
23. Lim JT, Piazza GA, Han EK, και συν. Sulindac derivatives inhibit growth and induce apoptosis in human prostate cancer cell lines. *BiochemPharmacol* 1999; 58:1097-107
24. Wu GD. A nuclear receptor to prevent colon cancer. *N Engl J Med* 2000; 342:651-3.

25. Murray LJ, Abrams TJ, Long KR, και συν. SU11248 inhibits tumor growth and CSF-1R-dependent osteolysis in an experimental breast cancer bone metastasis model. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20:757 - 66.
26. Howe LR, Dannenberg AJ. COX-2 Inhibitors in the prevention of breast cancer. *Jou Mam Glan Bio Neo* 2003; 8:31-43.
27. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl AcadSci USA* 1994;90:11693-7.
28. Kawamori T, Wakabayashi K. COX-2 and prostanoid receptors: good targets for chemoprevention. *J Environ PatholToxicolOncol* 2002; 21:149-53.
29. Miliaras S, Miliaras D, Vrettou E, Zavitsanakis A, Kiskinis D. The effect of aspirin and high fibre diet on colorectal carcinoma: a comparative experimental study. *Tech Coloproctol* 2004; 8:59-61.
30. Davis AE, Patterson F. Aspirin reduces the incidence of colonic carcinoma in the dimethylhydrazine rat animal model. *AustNZ J Med* 1994; 24:301-3.
31. Perse M, Zebic A, Cerar A. Rofecoxib does not inhibit aberrant crypt foci formation but inhibits later steps in the development of experimental colorectal cancer: rofecoxib in experimental colon cancer. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40:61-7.
32. Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Non-steroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:252-66.
33. Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H, Seibert K. The Chemoprevention of Breast Cancer in Rats by Celecoxib, a Cyclooxygenase 2 Inhibitor. *Cancer Res* 2000, 60:2101-03.
34. Moll LM, van Eyk AD, van der Bijl P. *In vitro* effect of permeability of intact and de-epithelialised, human and vaginal mucosa to Tacrolimus and Cyclosporin A. *Eur J Inflamm* 2007; 5:7-13.

35. Alshafie GA, Abou-Issa HM, Seibert K, Harris RE. Chemotherapeutic evaluation of Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in a rat mammary tumor model. *Oncol Rep* 2000; 7:1377-81.
36. Lanza-Jacoby S, Miller S, Flynn J, et al. The Cyclooxygenase-2 Inhibitor, Celecoxib, prevents the development of mammary tumors in HER-2/neu mice. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 1486-91
37. Sunter JP: *Experimental Carcinogenesis and Cancer in Rodent Gut*. Appleton DR, Sunter JP, Watson AJ (ed), *Cell Proliferation in the Gastrointestinal Tract*, 1980. σελ. 255-277, PITMAN MEDICAL
38. Harkness JE, Wagner JE: *The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents*, third edition 1989, σελ 47-166.
39. Festing MFW: *Inbred Strains. The laboratory rat Vol I, Biology and Diseases*, 1979, Academic Press Inc, σελ 56-72.
40. Rogers AE: *Nutrition. The laboratory rat Vol I, Biology and Diseases*, 1979, Academic Press Inc, σελ 123-133.
41. Altaian NH, Goodman DG: *Neoplastic Diseases. The laboratory rat Vol I, Biology and Diseases*, 1979, Academic Press Inc, σελ 333-371.
42. Peckham JC: *Experimental Oncology, The laboratory rat Vol II, Research Applications*, 1979, Academic Press Inc, σελ 122-147.
43. Druckley H: Production of colonic by 1,2-dialkylhydrazines and azoalkanes. *Carcinoma of the colon and Antecedent epithelium*, W J Burnette, Ed Charles S Thomas, σελ. 267-279, 1970.
44. IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISK OF CHEMICALS TO MAN. Some aromatic amines, hydrazine and related substances, N-nitroso compounds and miscellaneous alkylating agents, Vol 4, 1973, International Agency for Research on Cancer, σελ 153-156.
45. Huggins C, Grand LC, Brillantes FP. Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclearhydrocarbons and its suppression. *Nature* 1961; 189: 204-7.

46. Das R, Hossain S, Bhattacharya S. Diphenylmethylselenocyanate inhibits DMBA-croton oil induced two-stage mouse skin carcinogenesis by inducing apoptosis and inhibiting cutaneous cell proliferation. *Cancer Letters* 2005; 230:90-101.
47. Deepak P, Kumar S, Acharya A. IL-13 neutralization modulates function of type II polarized macrophages *in vivo* in a murine T-cell lymphoma. *Eur J Inflamm* 2007; 5:37-45.
48. Aromando RF, Perez MA, Heber EM, Trivillin VA, Tomasi VH, Schwint AE, Itoiz ME. Potential role of mast cells in hamster cheek pouch carcinogenesis. *Oral Oncol* 2008; 44:1080-7.
49. Orciani M, Trabiani O, Cavaletti G, Guarnieri S, Salvolini E, Tredici G, Di Primio R. Expression of CD38 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Int J ImmunopatholPharmacol* 2008; 21:97-106.
50. Walentinsson A, Sjoling A, Helou K, Klinga-Levan K, Levan G. Genomewide assessment of genetic alterations in DMBA-induced rat sarcomas: cytogenetic, CGH, and allelotype analyses reveal recurrent DNA copy number changes in rat chromosomes 1, 2, 4, and 7. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28:184-95.
51. Ki Han Kwon, Avantika Barve, Siwang Yu, Mou-Tuan Huang, Ah-Ng Tony Kong. Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers and animal models. *Acta Pharmacologica Sinica* 2007; 28:1409-21.
52. Capodiferro S, Scully C, Ficarra G, και συν. Orofacial granulomatosis: report of two cases with gingival onset. *Eur J Inflamm* 2007; 5:51-6.
53. Selamoglu Talas Z, Ozdemir I, Yilmaz I, Gok Y, Orun I. The investigation of the antioxidative properties of the novel synthetic organoselenium compounds in the some rat tissues. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233:575-9.
54. Ghoneum M, Matsuura M, Gollapudi S. Modified arabinoxylan rice bran (mgn-3/biobran) enhances intracellular killing of microbes by human phagocytic cells *in vitro*. *Int J ImmunopatholPharmacol* 2008; 21:87-96.
55. Ruggeri B A, Klurfeld DM, Kritchevsky D, Furlanetto RW. Caloric



restriction and 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary tumor growth in rats: alterations in circulating insulin, insulin-like growth factors I and II, and epidermal growth factor. *Cancer Res* 1989; 49:4130-4.

56. Claus EB: The Genetic Epidemiology of Cancer. *Cancer Surveys Volume 25: Genetics and Cancer: A Second Look*, 1995, Imperial Cancer Research Fund.
57. Greenwald P, Kelloff GJ, Boone CW, McDonald SS: Genetic and cellular changes in colorectal cancer: Proposed targets of chemopreventive agents. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995, 4: 691-702.
58. Dove WF, Gould KA, Luongo C, Moser AR, Shoemaker AR: Emergent issues in the genetics of intestinal neoplasia. *Cancer Surveys Volume 25: Genetics and Cancer: A Second Look*, 1995, Imperial Cancer Research Fund.
59. Eeles RA: Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surveys Volume 25: Genetics and Cancer: A Second Look*, 1995, Imperial Cancer Research Fund.
60. Lin XS, Denmeade SR, Isaacs JT: Programmed Cell Death. *Cancer Surveys Volume 25: Genetics and Cancer: A Second Look*, 1995, Imperial Cancer Research Fund.
61. Papaliagkas V, Anogianaki A, Anogianakis G, Ilionidis G. The proteins and the mechanisms of apoptosis: A mini-review of the fundamentals. *Hippokratia* 2007; 11:108-13.
62. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88:323-31
63. Fiala ES, Reddy BS, Weisburger JH: Natural Occurring Anticarcinogenic Substances in Foodstuffs. *Ann Rev Nutr* 1985, 5:295-321.
64. Corea P: Nutrition and Cancer-Epidemiologic Correlations. *Nutrition and Cancer: Etiology and Treatment* by GR Newell, NM Ellison, Raven Press, New York, 1981, σελ 1-9

65. Newell GR: General mechanisms of carcinogenesis. Nutrition and Cancer: Etiology and Treatment by GR Newell, NM Ellison, Raven Press, New York, 1981, σελ 49-57.
66. Carroll KK: Nutrition and Cancer: Fat. Nutrition, Toxicity and Cancer by Ian R Rowland, 1991, CRC Press Inc, σελ 439-463.
67. Reddy BS: Dietary fat and colon cancer: animal model studies. Lipids 1992 27: 807-13.
68. Aylsworth CF, Cullum ME, Zile MH, WelschCW. Influence of dietary retinyl acetate on normal rat mammary gland development and on the enhancement of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary tumorigenesis by high levels of dietary fat. J Natl Cancer Inst. 1986 Feb; 76(2):339-45.
69. Aylsworth CF. Effects of lipids on gap junctionally-mediated intercellular communication: possible role in the promotion of tumorigenesis by dietary fat. Prog Clin Biol Res. 1986; 222:607-22.
70. Leonard A. Cohen, Keewhan Choi, and Chung-Xiou Wang. Influence of Dietary Fat, Caloric Restriction, and Voluntary Exercise on N-Nitrosomethylurea-induced Mammary Tumorigenesis in Rats. Cancer Res August 1, 1988 48; 4276
71. Reddy BS: Fiber and Colon Carcinogenesis-A Critical Review. Vahouny GV, Kritchevsky D: Dietary Fiber in Health and Disease 1982. σελ. 265-285, Plenum Press, New York
72. Singh J, Hamid R, Reddy BS: Dietary fat and colon cancer: modulation of cyclooxygenase-2 by types and amount of dietary fat during the postinitiation stage of colon carcinogenesis. Cancer Res 1997, 57: 3465-70
73. Samaha HS, Hamid R, el-Bayoumy K, Rao CV, Reddy BS: The role of apoptosis in the modulation of colon carcinogenesis by dietary fat and by the organoselenium compound 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1997, 6: 699-704
74. Clinton, Steven K.; Destree, Richard J.; Anderson, David B.; Truex, C. Richard; Imrey, Peter B.; Vissek, Willard J. 1,2-dimethylhydrazine

- induced intestinal cancer in rats fed beef or soybean protein. Nutrition Reports International 20(3) p. 335-342 (1979)
75. Burkitt DP: Epidemiology of the cancer of colon and rectum. Cancer 28:3-13, 1971.
  76. Kritchevsky D, Klurfeld DM: Fat and Cancer. Nutrition and Cancer: Etiology and Treatment by GR Newell, NM Ellison, Raven Press, New York, 1981, σελ 173-188.
  77. Carachi R: Polyposis coli-An Experimental Model. Journal of Pediatric Surgery 1983, 18:51-57.
  78. Krithevsky D: Dietary fiber and colon cancer. Nutrition, Toxicity and Cancer by Ian R Rowland, 1991, CRC Press Inc, σελ 481-489.
  79. Dove WF, Gould KA, Luongo C, Moser AR, Shoemaker AR: Emergent issues in the genetics of intestinal neoplasia. Cancer Surveys Volume 25: Genetics and Cancer: A Second Look, 1995, Imperial Cancer Research Fund.
  80. EcelesRA: Germlinc mutations in the TP53 gene. Cancer Surveys Volume 25: Genetics and Cancer: A Second Look, 1995, Imperial Cancer Research Fund.
  81. Lin XS, Denmeade SR, Isaacs JT: Programmed Cell Death. Cancer Surveys Volume 25: Genetics and Cancer: A Second Look, 1995, Imperial Cancer Research Fund.
  82. Suntr JP: Experimental Carcinogenesis and Cancer in Rodent Gut. Appleton DR, Sunter JP, Watson AJ (ed), Cell Proliferation in the Gastrointestinal Tract, 1980. σελ. 255-277, PITMAN MEDICAL.
  83. Harkness JE, Wagner JE: The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents, third edition 1989, σελ 47-166. IS.Festing MFW: Inbred Strains. The laboratory rat Vol I, Biology and Diseases, 1979, Academic Press Inc, σελ 56-72.
  84. Rogers AE: Nutrition. The laboratory rat Vol I, Biology and Diseases, 1979, Academic Press Inc, σελ 123-133
  85. Altaian NH, Goodman DG: Neoplastic Diseases. The laboratory rat Vol I, Biology and Diseases, 1979, Academic Press Inc, σελ 333-371

86. Peckham JC: Experimental Oncology, The laboratory rat Vol II, Research Applications, 1979, Academic Press Inc, σελ 122-147.
87. IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISK OF CHEMICALS TO MAN. Some aromatic amines, hydrazine and related substances, N-nitroso compounds and miscellaneous alkylating agents, Vol 4, 1973, International Agency for Research on Cancer, σελ 153-156.
88. Lacquer GL: The induction of intestinal neoplasms in rats with the glycoside cycasin and its aglycone. Virchow's Arch. (Pathol. Anat.) 340, σελ. 151-163, 1965.
89. Druckley H: Production of colonic by 1,2-dialkylhydrazines and azoalkanes. Carcinoma of the colon and Antecedent epithelium, W J Burnette, Ed Charles S Thomas, σελ. 267-279, 1970.
90. La Mont TJ, O'Gorman TA: Experimental colon cancer. Gastroenterology 1978 75:1157-1169.
91. Fiala ES: Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane. Cancer 1977, 40:2436-2445
92. Lyon JL, Mahoney AW, West DW, Gardner JW, Smith KR, Sorenson AW, Stanish W. Energy intake: its relationship to colon cancer risk. J Natl Cancer Inst. 1987 May;78(5):853-61
93. Bingham S: Meat, starch and non-starch polysaccharides are epidemiological and experimental findings consistent with acquired genetic alterations in sporadic colorectal cancer? Cancer Letters 1997, 114:25-34.
94. ARP Walker, BF Walker & AJ Walker. Faecal pH, dietary fibre intake, and proneness to colon cancer in four South African populations. Br J Cancer (1986),53,489-495
95. MacDonald L, Freeling P. Bowels: beliefs and behaviour. FamPract. 1986;3 2:80-84
96. Cummings JH, Branch WJ: Postulated Mechanisms whereby Fiber May Protect against Large Bowel Cancer. Dietary Fiber in Health and Disease 1982, σελ. 313-323, Plenum Press, New York.

97. Csordas A: Butyrate, aspirin and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 1996, 5: 221-231.
98. Kruh J, Defer N, Tichonicky L. Molecular and cellular action of butyrate. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1992; 186(1-2):12-25. Review. French.
99. Freeman HJ. Effects of differing concentrations of sodium butyrate on 1,2-dimethylhydrazine-induced rat intestinal neoplasia. *Gastroenterology.* 1986 Sep;91(3):596-602.
100. McIntyre A, Gibson PR, Young GP. (1993) Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut* 34:386–391.
101. Nelson RL: Dietary Minerals and Colorectal Cancer. *Nutrition, Toxicity and Cancer* by Ian R Rowland, 1991, CRC Press Inc, σελ 491-510.
102. G.N. Schrauzer. Selenium and cancer: A review. *Bioinorganic Chemistry* 5, 3, 1976, Pages 275–281
103. Salonen JT, Alfthan G, Huttunen JK and Puska P. Association between serum selenium and the risk of cancer. *Am. J. Epidemiol.* (1984) 120 (3): 342-349
104. Clark LC The epidemiology of selenium and cancer. *Federation Proceedings* [1985, 44(9):2584-2589]
105. Dworkin BM, Rosenthal WS, Wormser GP, Weiss L, Nunez M, Joline C, Herp A. Abnormalities of blood selenium and glutathione peroxidase activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome and aids-related complex. *Biol. Trace Elem. Res.* 15, 167 (1988)
106. Soulier, BK, Wilson, PS, and Nigro, ND Effect of selenium on azoxymethane-induced intestinal cancer. *Cancer Lett.* 12: 343-348,1981
107. Banner WP, DeCosse JJ, Tan QH and Zedeck MS Selective distribution of selenium in colon parallels its antitumor activity. *Carcinogenesis* (1984) 5 (12): 1543-1546.

108. Jacobs MM. Selenium Inhibition of 1,2-Dimethylhydrazine-induced Colon Carcinogenesis. *Cancer Res* April 1983 43; 1646
109. Reddy BS, Tanaka T. Interactions of selenium deficiency, vitamin E, polyunsaturated fat, and saturated fat on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *J Natl Cancer Inst.* 1986 Jun;76(6):1157-62.
110. Cedric Garland, Elizabeth Barrett-Connor, ArthurH. Rossof, RichardB. Shekell, MichaelH. Criqui, Oglesby Paul. Dietary vitamin D and Calcium and risk of colorectal cancer: A 19-year prospective study in men. *The Lancet* Volume 325, Issue 8424, 9 February 1985, Pages 307–309
111. Martinez ME, Mcpherson RS, Levin B, Globber GA: A case -control study of dietary intake and other lifestyle factors for hyperplastic polyos. *Gastroenterology* 1997, 113:423-429
112. Nutter RL, Gridley DS, Kettering JD, Goude AG, Slater JM. BALB/c mice fed milk or beef protein: differences in response to 1,2-dimethylhydrazine carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 1983 Oct;71(4):867-74.
113. Gridley DS, Kettering JD, Slater JM, Nutter RL. Modification of spontaneous mammary tumors in mice fed different sources of protein, fat and carbohydrate. *Cancer Lett.* 1983 Jun;19(2):133-46.
114. Nutter RL, Gridley DS, Kettering JD, Andres ML, Aprecio RM, Slater JM. Modification of a transplantable colon tumor and immune responses in mice fed different sources of protein, fat and carbohydrate. *Cancer Lett.* 1983 Feb;18(1):49-62.
115. Nelson RL. Dietary minerals and colon carcinogenesis (review). *Anticancer Res.* 1987 May-Jun;7(3 Pt A):259-69.
116. Pence BC, Buddingh F. Inhibition of dietary fat-promoted colon carcinogenesis in rats by supplemental calcium or vitamin D3. *Carcinogenesis.* 1988 Jan;9(1):187-90.
117. Nelson RL: Dietary Minerals and Colorectal Cancer. *Nutrition, Toxicity and Cancer* by Ian R Rowland, 1991, CRC Press Inc, σελ 491-510.

118. Newmark HL, Wargovich MJ, Bruce WR: Colon cancer and dietary fat, phosphate and calcium: A hypothesis. *JNCI* 1984, 72:1323-1325.
119. Slivka A, Kang J, Cohen G. Hydroxyl radicals and the toxicity of oral iron. *BiochemPharmacol.* 1986 Feb 15; 35(4):553-6.
120. Kuratko CN. Increasing dietary lipid and iron content decreases manganese superoxide dismutase activity in colonic mucosa. *Nutr Cancer.* 1997; 28(1):36-40.
121. Tuyns AJ, Hu MX, Pequignot G. Alcohol consumption patterns in the department of Calvados (France). *Rev EpidemiolSantePublique.* 1983; 31(2):179-97.
122. Tuyns AJ, Péquignot G, Gignoux M, Valla A. Cancers of the digestive tract, alcohol and tobacco. *Int J Cancer.* 1982 Jul 15; 30(1):9-11.
123. Hayes RB, Swaen GM, Ramioul L, Tuyns AJ. Stomach cancer mortality: geographic comparisons in the Netherlands and in Belgium. *Eur J Cancer ClinOncol.* 1982 Jul;18(7):623-7
124. Tuyns AJ, Hu MX. Changing smoking patterns in Calvados (France). *Br J Addict.* 1982 Jun; 77(2):167-83.
125. Tuyns AJ, Kaaks R, Haelterman M. Colorectal cancer and the consumption of foods: a case-control study in Belgium. *Nutr Cancer.* 1988; 11(3):189-204.
126. Laval G, Tuyns AJ. Environmental factors in childhood leukaemia. *Br J Ind Med.* 1988 Dec; 45(12):843-4.
127. Tuyns AJ, Estève J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F, Boffetta P, Crosignani P, del Moral A, Lehmann W, και συν. Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer.* 1988 Apr 15; 41(4):483-91.
128. Tuyns AJ. Beer consumption and rectal cancer. *Rev EpidemiolSantePublique.* 1988; 36(2):144-5.

129. Jansson B, 1986. Geographic cancer risk and Intracellular Potassium/Sodium ratios. *Cancer detection and prevention*, 9(3-4):171-194
130. Jansson B. Dietary, total body, and intracellular potassium-to-sodium ratios and their influence on cancer. *Cancer Detect Prev*. 1990; 14(5):563-5. Review.
131. Nelson RL: Dietary Minerals and Colorectal Cancer. *Nutrition, Toxicity and Cancer* by Ian R Rowland, 1991, CRC Press Inc, σελ 491-510.
132. Boutron MC, Faivre J, Marteau P, Couillaud C, Senesse P, Quipourt V. Calcium, phosphorus, vitamin D, dairy products and colorectal carcinogenesis: a French case--control study. *Br J Cancer*. 1996 Jul; 74(1):145-51.
133. Chaux P, Moutet M, Faivre J, Martin F, Martin M. Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation. *Lab Invest*. 1996 May; 74(5):975-83.
134. Filali K, Hédelin G, Schaffer P, Estève J, Arveux P, Bouchardy C, Exbrayat C, Faivre J, Lévi F, Macé-Lesech J, Pottier D, Torhorst J. Multiple primary cancers and estimation of the incidence rates and trends. *Eur J Cancer*. 1996 Apr; 32A (4):683-90.
135. Williamson RCN, Malt RA: Promotion of Intestinal Carcinogenesis by Adaptive Mucosal Hyperplasia. *AppletonDR, Sunter JP, Watson AJ (ed): Cell Proliferation in the Gastrointestinal Tract*, 1980, σελ. 303-315, PITMAN MEDICAL
136. Boutron-Ruault MC, Senesse P, Faivre J, Couillaud C, Belghiti C. Folate and alcohol intakes: related or independent roles in the adenoma-carcinoma sequence? *Nutr Cancer*. 1996; 26(3):337-46.
137. Baron JA, Sandler RS, Hailc RW, Mandel JS, Mott LA. Greenberg ER: Folate intake, alcohol consumption, cigarette smoking and risk of colorectal adenomas. *JNCI*1998, 90:57-62
138. Kim YI, Salomon RN, και συν: Dietary folate protects against the development of macroscopic colonic neoplasia in o dose responsive manner in rats. *Gut* 1996, 39:732-740.



139. Greenward P, Kelloff GJ, Boone CW, and McDonald SS: Genetic and cellular changes in colorectal cancer: Proposed targets of chemopreventive agents. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995, 4:691-702.
140. DuBois RN, Smalley WE: Cyclooxygenase, NSAIDs, and colorectal cancer. *J Gastroenterol* 1996, 31:898-906.
141. Paganini-Hill A: Aspirin and Prevention of Colorectal Cancer: A Review of the Evidence. *Semin Surg Oncol* 1994, 10:158-164.
142. Rosenberg L, Loouik C, Shapiro S: Non-steroidal antiinflammatory drugs use and reduced risk of large bowel carcinoma. *Cancer* 1998, 82:2326-2333.
143. Logan RFA, Little J, Hawtin PG, Flardcastle JD: Effect of aspirin and non steroidal antiinflammatory drugs on colorectal adenomas: case-control study of subjects participating in the Nottingham fecal occult blood screening programme. *BMJ* 1993, 307:285-289.
144. Sandler RS, Galanko JC, Murray SC, Helm JF, Woosley JT: Aspirin and non-steroidal antiinflammatory agents and risk for colorectal adenomas. *Gastroenterology* 1998, 114:441-447.
145. Gann PH, Manson JE, Glynn RJ: Low dose aspirin and the incidence of colorectal tumours in a randomised trial. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85:1220-1224
146. Stunner T, Glynn R, Lee IM, Manson JAE, Buring IE, Flennekens H: Aspirin use and post-trial follow-up data from the Physicians' Health Study.
147. Waddell WR, Loughry RW: "Sulindac for polyposis of the colon." *J Surg Oncol*. 1983, 24, S.83
148. Craven PA, DeRubertis FR: Effects of aspirin on 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1992, 13:541-546.
149. Davis AE, Patterson F: Aspirin reduces the incidence of colorectal carcinoma in the dimethylhydrazine rat animal model. *Aust NZ J Med* 1994, 24:301-303.

150. Redely BS, Tokumo K, Kulkarni N, Aligia C, Kelloff G: Inhibition of colon carcinogenesis by prostaglandin synthesis inhibitors and related compounds. *Carcinogenesis* 1992, 13:1019-1023.
151. Barnes CI, Lee M: Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the adenomatous polyposis coli Min mouse model with aspirin. *Gastroenterology* 1998, 114:873-877.
152. Rutland SR, Gendler SJ: Chemoprevention of intestinal adenomas in the Ape Min mouse by piroxicam. *Carcinogenesis* 1999, 20:51-58
153. Reddy BS, Rao CV, Rivenson A, Kelloff G: Inhibitory effect of aspirin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Carcinogenesis* 1993;14:8 1493-7
154. Nigra ND, Bull AW, Boyd ME: Inhibition of intestinal Carcinogenesis in Rats: Effects of Dilluoromethylornithine with Piroxicam or Fish Oil. *JNCI* 1986. 77:1309-1313.
155. DuBois RN, Radhika A, Roddy BS, Entingh A.): Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. *Gastroenterology* 1996. 110:1259-62
156. Ahnen DJ: Colon cancer prevention by NSAIDs: what is the mechanism of action? *Eur J Surg Suppl* 1998, 582:111-114.
157. Maxwell WJ, Killeher D, Keating JJ, Hogan FP, Bloomfield FJ, MacDonald GS, Keeling PWN: Enhanced secretion of prostaglandin E2 by the tissue macrophages on colonic carcinoma. *Digestion* 1990. 47:160-166.
158. Mostafa MFI, Shewcita SA, Abdel-Moneam NM: Influence of some anti-inflammatory drugs on the activity of aryl hydrocarbon hydroxylase and the cytochrome P450 content. *En v Res* 1990. 52:77-82.
159. Reddy BS, Rao CV, Seibert K: Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1996,156: 4566-9
160. Kritchevsky, D Caloric restriction and experimental mammary carcinogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* (1997), 46:161–167.
161. Harvell DM, Strecker TE, Xie B, Pennington KL, McComb RD, Shull JD. Dietary energy restriction inhibits estrogen-induced mammary,

- but not pituitary, tumorigenesis in the ACI rat. *Carcinogenesis*. 2002; 23(1):161-9.
162. Thompson HJ, Zhu Z, Jiang W. Dietary energy restriction in breast cancer prevention. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2003 Jan;8(1):133-42.
163. Zhu Z, Jiang W, Thompson HJ An experimental paradigm for studying the cellular and molecular mechanisms of cancer inhibition by energy restriction. *MolCarcinog*. 2002; 35(2):51-6.
164. Hursting, S.D. and Kari, F.W. The anti-carcinogenic effects of dietary energy restriction: mechanisms and future directions. *Mutat. Res*(1999), 443:235–249
165. Montoyama J, Yamashita N, Morino T, Tanaka M, Kobayashi T, Honda H. Hyperthermic treatment of DMBA-induced rat mammary cancer using nanomagnetic particles. *Biomagn Res Technol* 2006; 25:6-12
166. Shimkin MB, Gruenstein M, Meranze DR, Acuff M, Thatcher D. The effects of schedule and dose of 7, 12-dimethylbenz (a)-anthracene on the induction and growth of mammary carcinomas in Sprague-Dawley female rats. *Cancer Res* 1969; 29:503-5
167. Morris HP. Studies on the development, biochemistry, and biology of experimental hepatomas. *Advan Cancer Res* 1965; 9:228-302
168. Loscher W, Mevissen M, Hauler M. Seasonal influence on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in Sprague-Dawley rats under controlled laboratory conditions. *PharmacolToxicol* 1997; 81:265-70.
169. Gear RB, Yan M, Schneider J, Succop P, Heffelfinger SC, Clegg DJ. Charles Rivers spraguedawley rats lack early age-dependent susceptibility to DMBA-induced mammary carcinogenesis *Int J BiolSci* 2007; 3:408-416.
170. Lee SY, Ng SF, Busby WF, Rogers AE. Mammary gland DNA synthesis in rats fed high lard or control diets. *J Nutr Growth & Cancer* 1987; 4:167-74.

171. Lee SY, Walsh CT, Ng SF and Rogers AE. Toxicokinetics of 7, 12-Dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) in rats fed high lard or control diets. *J Nutri Growth & Cancer* 1986; 3:167-76.
172. Rogers AE. Factors that modulate chemical carcinogenesis in the mammary gland of the female rat, T.C. Jones, U. Mohr and R. D. Hunt, eds. 1989 (Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag).
173. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer and development. *Oncogene* 1999; 18:7908-16.
174. DuBois RN. New paradigms for cancer prevention. *Carcinogenesis* 2001; 22:691-2.
175. Waddell WR, Loughry RW. Sulindac for polyposis of the colon. *J SurgOncol* 1983; 24:83-87.
176. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, και συν. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 28:1313-6.
177. Giardiello FM, Offerhaus GJA, DuBois RN. The role of non-steroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer prevention. *Eur J Cancer* 1995; 31A:1071-6.
178. Lim JT, Piazza GA, Han EK, και συν. Sulindac derivatives inhibit growth and induce apoptosis in human prostate cancer cell lines. *BiochemPharmacol* 1999; 58:1097-107.
179. Wu GD. A nuclear receptor to prevent colon cancer. *N Engl J Med* 2000; 342:651-3.
180. Murray LJ, Abrams TJ, Long KR, και συν. SU11248 inhibit tumor growth and CSF-1R-dependent osteolysis in an experimental breast cancer bone metastasis model. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20:757-66.