

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

FACOLTÀ DI FARMACIA

Dipartimento di Farmacologia Sperimentale

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZA DEL FARMACO**

**SENNA: STUDI DI TOSSICITÀ
*IN VIVO ED IN VITRO***

**Tutor:
Ch.mo Prof.
Francesco Capasso**

**Coordinatore
Ch.mo Prof.
Enrico Abignente**

*Candidata:
Dott.ssa Gabriella Aviello*

XIX CICLO 2003-2006

RINGRAZIAMENTI

Al termine di questi tre anni di attività di ricerca desidero ringraziare coloro che hanno permesso la realizzazione del mio progetto di dottorato.

In primo luogo ringrazio il Prof. Francesco Capasso per la Sua supervisione nell'impostazione della ricerca.

Il Prof. Nicola Mascolo, il Prof. Angelo Izzo e la Dott.ssa Francesca Borrelli che mi hanno sostenuto e seguito durante tutto il lavoro di ricerca.

Il Dott. Raffaele Capasso, la Dott.ssa Valeria Ascione, la Dott.ssa Natasa Milić e la studentessa interna Annamaria Tipaldi per il sostegno e l'amicizia.

La Prof. Angela Acquaviva e la Dott.ssa Gabriella Caruso per avermi ospitato nei loro Istituti e, quindi di aver permesso lo svolgimento di una parte della mia ricerca.

Il gruppo di ricerca del Prof. Ian Rowland (Irlanda del Nord) per avermi permesso di acquisire nuove ed interessanti metodiche sperimentali.

La mia famiglia per aver sempre creduto in me ed avermi incoraggiato nelle decisioni più importanti.

Infine ringrazio il coordinatore del dottorato, il Prof. Enrico Abignente per la sensibilità ai problemi di tutti i dottorandi a Lui affidati.

INDICE

	Pag.	
1.0	INTRODUZIONE	1
1.1	Senna	1
1.1.1	Botanica	2
1.1.2	Farmacologia	10
1.1.3	Tossicologia	12
2.0	OBIETTIVI DELLA RICERCA	16
3.0	MATERIALI	18
3.1	Animali	18
3.2	Colture cellulari	18
3.3	Sostanze e farmaci utilizzati	19
4.0	METODI	22
4.1	Trattamento con farmaci <i>in vivo</i>	22
4.2	Determinazione del contenuto di acqua fecale	24
4.3	Foci di cripte aberranti e tumori	26
4.4	Esposizione ai farmaci <i>in vitro</i>	28
4.5	Saggi di citotossicità ed integrità del monolayer epiteliale	29
4.5.1	Saggio dell'MTT	29
4.5.2	Saggio di resistenza elettrica trans-epiteliale	30
4.6	Saggi di proliferazione cellulare	32
4.6.1	Incorporazione di [H^3]-timidina	32
4.6.2	Analisi di western blot	33
4.7	Saggio della cometa (Comet assay)	35

4.8	Determinazione dell'attività catalitica dell'enzima saccarasi-isomaltasi	38
4.9	Determinazione dei livelli di malondialdeide	39
4.10	Analisi statistica	41
5.0	RISULTATI	43
5.1	Valutazione del peso corporeo degli animali e dell'effetto lassativo	43
5.2	Determinazione di foci di cripte aberranti e tumori	45
5.3	Saggi di citotossicità	48
5.3.1	Valutazione della respirazione mitocondriale	50
5.3.2	Valutazione dell'integrità e permeabilità del monolayer epiteliale	50
5.4	Proliferazione cellulare	55
5.4.1	Incorporazione di [H ³]-timidina	55
5.4.2	Valutazione dell'espressione di pERK ₁ e pERK ₂	55
5.5	Saggio della cometa (Comet assay)	57
5.6	Determinazione dell'attività catalitica dell'enzima saccarasi-isomaltasi	59
5.7	Determinazione dei livelli di malondialdeide	59
6.0	DISCUSSIONE	66
7.0	CONCLUSIONI	87
8.0	BIBLIOGRAFIA	89

1.0 INTRODUZIONE

1.1 Senna

La senna è data dalle foglie e dai frutti di *Cassia angustifolia* Vahl (anche nota come senna di Tinnevelly) e *Cassia acutifolia* Delile (anche nota come senna Alessandrina). *Cassia* deriva dal greco κασία, termine usato da Dioscoride per indicare la corteccia del *Laurus cassia* (Cannella della Cina). *Senna* deriva dall'arabo *senha*, *sinha* o *sen*, antica denominazione locale della pianta la cui foglia era considerata propria a dare salute. Entrambe le specie di *Cassia* appartengono alla famiglia delle Cesalpiniaceae e sono originarie delle regioni predesertiche dell'Africa Orientale (Sudan). La *C. acutifolia* cresce spontanea lungo la regione dell'alto Nilo mentre la *C. angustifolia* cresce spontanea nell'Africa Orientale, dall'Arabia alla Somalia fino al Mozambico. La *C. acutifolia* viene coltivata nel Sudan, mentre la seconda è coltivata abitualmente in Pakistan ed in India (Capasso e coll., 2000).

1.1.1 Botanica

Entrambe le specie di Cassia sono arbusti alti 1.5-2 metri (fino ad 1 metro nel caso di *Cassia acutifolia*), con caule eretto verde pallido (Figura 1); le foglie sono composte, paripennate (5-9 paia di foglioline nel caso della *C. angustifolia*; 4-5 paia di foglioline nel caso di *C. acutifolia*) ed alterne (Figura 2).

Le foglioline di *C. angustifolia* sono strette (0.7-1.2 cm) e molto lunghe (3-6 cm), lanceolate, a punta aguzza, con peduncolo brevissimo, glabre o poco pelose (Figura 3a). Le foglioline di *C. acutifolia* sono alquanto strette e corte (2-3 cm), ovate ed appuntite all'apice, finemente pubescenti e con peduncolo breve (Figura 3b).

Il frutto della *C. angustifolia*, di dimensioni 1.2-1.82 x 4-6 cm, è appiattito, quasi dritto, con margini arrotondati e superficie liscia appena bozzoluta in corrispondenza dei semi (6-8 semi per legume); osservato in

a



b



Figura 1. *Cassia angustifolia* (a) e *Cassia acutifolia* (b)



Figura 2. Foglia di *Cassia acutifolia*

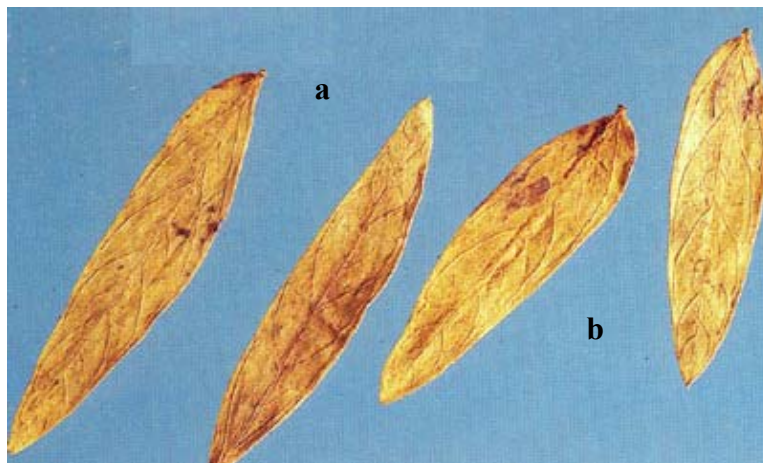


Figura 3. Foglioline di *Cassia angustifolia* (a) e *Cassia acutifolia* (b).

trasparenza mostra, oltre alle ombre dei semi, una venatura trasversale che corre dall'una all'altra nervatura longitudinale (Figura 4). Il frutto di *C. acutifolia*, di dimensioni 1.8-2.5 x 4-5 cm, ha margini alquanto incurvati (il ventrale appare concavo o dritto, il dorsale, fortemente convesso, con aspetto reniforme del legume) e superficie liscia e rigonfia in corrispondenza dei semi (4-9 per legume). In trasparenza mostra una venatura trasversale (Figura 4 e 5).

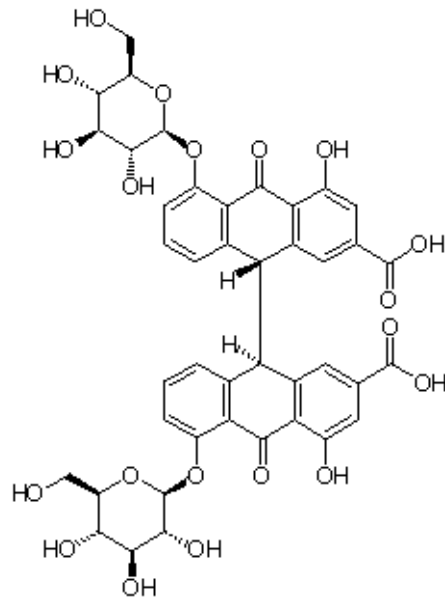
I principali costituenti farmacologici della senna sono i sennosidi A e B (Figura 6). I sennosidi chimicamente sono dei β -glucosidi di agliconi a struttura diantronica. Tali composti si comportano da profarmaci, ovvero per agire devono essere metabolizzati in prodotti farmacologicamente attivi. Il metabolismo avviene nel colon dopo che i sennosidi, somministrati per via orale, transitano immutati attraverso lo stomaco e l'intestino tenue. A livello del colon, la flora batterica ivi presente (in particolare le β -glucosidasi e reduttasi batteriche),



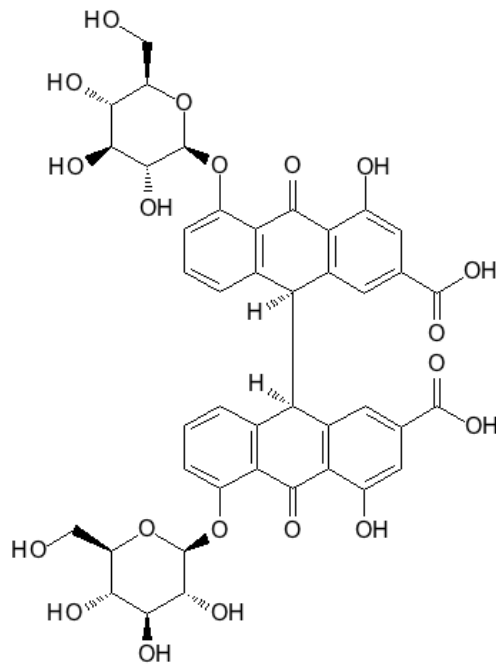
Figura 4. Frutto di *Cassia angustifolia*



Figura 5. Frutti essiccati di *Cassia angustifolia* (a) e *Cassia acutifolia* (b)



Sennoside A



Sennoside B

Figura 6. Struttura chimica dei sennosidi A e B

metabolizza i sennosidi (A e B) in reina antrone e reina antrachinone (Figura 7), attraverso due vie metaboliche che portano alla formazione di differenti prodotti intermedi, quali sennidina (A e B) e 8-glucosil-reinantrone (Kobashi e coll., 1980; Hattori e coll., 1988). I metaboliti così ottenuti sono scarsamente assorbiti ed inducono modificazioni della secrezione e della motilità (Hardcastle e Wilkins, 1970; Leng-Peschlow, 1980; Beubler e Kollar 1985; Leng-Peschlow 1986; Frexinos e coll., 1986; de Witte e coll., 1991); in particolar modo la reina antrone, al contrario del suo equivalente antrachinonico così come dell'antrachinone libero, è scarsamente assorbita a livello intestinale ed è il principale responsabile dell'azione farmacologica.

Nella senna, oltre ai sennosidi, sono presenti, anche se in piccole quantità, monoantroni (emodina, aloe-emodina) e sostanze non antrachinoniche (kaefecina, β -sitosterolo, acido salicilico, saponine ed

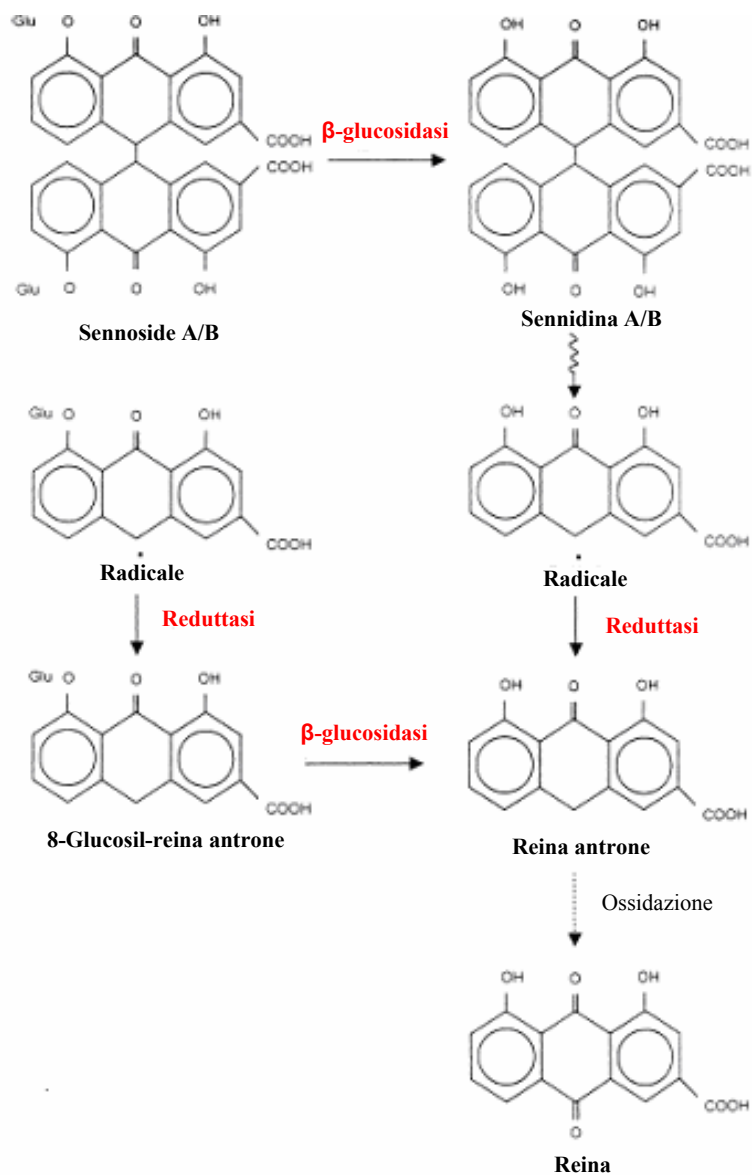


Figura 7. Metabolismo dei sennosidi A e B.

idrocolloidi polisaccaridici) (Capasso e coll., 2000).

1.1.2 Farmacologia

Al giorno d'oggi gli estratti secchi di senna (foglie e baccelli) entrano, da soli od in associazione con altre sostanze, nella composizione di numerosi farmaci utilizzati per la cura ed il trattamento della stipsi. La senna, a livello del colon, esercita il suo effetto lassativo mediante due meccanismi d'azione: aumento della motilità intestinale ed accumulo di acqua ed elettroliti. Si ritiene che l'accumulo di liquidi e di elettroliti nel lume intestinale, sia uno dei primi eventi dell'effetto lassativo della senna, seguito passivamente da un aumento della motilità intestinale e quindi del transito. L'aumentata presenza di liquidi e di elettroliti nel lume intestinale è la conseguenza di: (i) un'aumentata secrezione intraluminale di acqua ed elettroliti, (ii) un rallentato assorbimento intraluminale di acqua ed elettroliti o (iii) di un'alterazione di entrambi questi meccanismi. L'azione idrofora della senna è stata chiarita

studiando il ruolo che l'enzima ATPasi svolge a livello del colon. È noto, infatti, che l'ATPasi regola l'assorbimento di sodio, cloro ed acqua a livello intestinale e che una sua inibizione provoca un accumulo di acqua intraluminale. Wanitschke e coll. (1988), hanno anche dimostrato che il metabolita attivo della senna, la reina, è in grado di inibire l'attività della pompa Na^+/K^+ -ATPasi determinando una riduzione dell'assorbimento di acqua ed elettroliti a livello del colon. L'effetto di tale lassativo antrachinonico sulla motilità (Autore e coll., 1984; Capasso e coll., 1986; Staumont e coll., 1988; Yagi e coll., 1988) e sulla secrezione intestinale (Beuber e Juan 1979; Capasso e coll., 1986; Autore e coll., 1990a, 1990b; Nijs e coll., 1991) è, inoltre, probabilmente la conseguenza dell'aumentata biosintesi di prostaglandine e rilascio di autacoidi quali istamina e serotonina a livello intestinale. L'istamina, infatti, determina contrazione della muscolatura liscia intestinale sia nel ratto che nell'uomo (Percy e coll., 1990) ed è stato, inoltre, dimostrato

che pazienti il cui quadro clinico evidenziava elevati livelli di serotonina a causa di patologie neoplastiche, presentavano un accelerato transito intestinale (Van der Ohe e coll., 1993). Diversi studi condotti *in vivo* hanno confermato un coinvolgimento della biosintesi delle prostaglandine nel meccanismo d'azione alla base dell'effetto lassativo delle droghe antrachinoniche (Capasso e coll., 1983). Tale coinvolgimento è confermato anche dal fatto che l'istamina e la serotonina mediano la biosintesi delle prostaglandine E₂ (PGE₂) (Nijs e coll., 1992; Yagi e coll., 1988).

1.1.3 Tossicologia

Studi clinici e pre-clinici hanno dimostrato che l'uso cronico (o l'abuso) di lassativi antrachinonici è responsabile di diversi effetti collaterali quali: dolore addominale, nausea, vomito, diarrea, ipokalemia ed insorgenza di una patologia reversibile, quale la *Pseudomelanosis coli* (Cummings, 1974). La *Pseudomelanosis coli* è caratterizzata dalla

formazione di granuli pigmentati simili alla melanina, noti come lipofuscina, nei macrofagi situati nella lamina propria della mucosa del colon (Speare, 1951; Ghadially, 1994). Questa pigmentazione del colon, tuttavia, gradualmente scompare dopo 6-11 mesi dall'interruzione dell'assunzione dei lassativi antrachinonici.

Negli ultimi anni, l'uso cronico di lassativi antrachinonici è stato considerato un fattore a rischio nell'insorgenza del cancro colon-rettale (Siegers, 1992; Westendorf, 1993). Tuttavia la letteratura a riguardo risulta essere piuttosto contraddittoria (Lyden-Sokolowsky, 1993; Lin, 2003; Cichewicz, 2004; Mitchell, 2006).

Studi sperimentali condotti su animali da laboratorio hanno evidenziato un aumento della proliferazione cellulare nel ceco, nel retto e nel colon in seguito ad un trattamento con senna e/o sennosidi sia in caso di un trattamento acuto che cronico (Geboes e coll., 1993; Toyoda e coll., 1994; Kleibeuker e coll., 1995; Van Gorkom e coll., 2000). È stato

ipotizzato che tale effetto fosse dovuto ad un'induzione del rilascio di mediatori, specialmente le prostaglandine (Nijs e coll., 1992, 1993), i quali oltre ad avere un effetto citoprotettivo, incrementano la proliferazione cellulare della mucosa gastrica e del colon. Inoltre, sempre su animali sottoposti ad un trattamento a lungo termine con senna, sono stati individuati cambiamenti morfologici a livello delle cellule epiteliali. Tra questi abbiamo un aumento del contenuto totale di mucina (indicatore della funzione secretoria del colon) ed un aumento dell'espressione della citocheratina AE1 (marker strutturale nelle cellule epiteliali) (Yang 1993). Tuttavia due recenti studi condotti *in vivo* dimostrano che la senna, somministrata per 6-24 mesi nel ratto, non possiede effetti carcinogenici (Mascolo e coll., 1999; Mitchell e coll., 2006). Questi ultimi dati sembrano supportati da studi *in vitro* in cui è stato osservato che la reina, il metabolita attivo della senna, è in grado di inibire l'attivazione della proteina AP-1 e quindi la proliferazione e la

trasformazione cellulare mediata da JNK, ERK e p38 (Lin e coll., 2003).

Più recentemente è stato anche evidenziata una inibizione da parte della
reina della proliferazione delle cellule neuronali, della mammella, del
polmone e del colon con un valore di concentrazione inibente la
proliferazione (Growth Inhibition 50) compreso tra 1.8 e 21.1 µg/ml
(Cichewicz e coll., 2004).

2.0 OBIETTIVI DELLA RICERCA

Considerando gli studi contrastanti presenti in letteratura circa la relazione tra un uso cronico di lassativi antrachinonici ed insorgenza del cancro colon-rettale, lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare *in vivo*:

- L'effetto della senna sulla formazione di lesioni pre-neoplastiche (foci di cripte aberranti) e di tumori a livello del colon;
- L'effetto della senna sull'incidenza di lesioni pre-neoplastiche e tumori indotti nel ratto dall'azossimetano (AOM), una sostanza promotrice ed iniziatrice del cancro colon-rettale.

Allo scopo di indagare il meccanismo molecolare alla base di un possibile effetto della senna sul danno cellulare e sulla genesi dei tumori, sono stati, inoltre, effettuati studi *in vitro* sulla reina, metabolita attivo della senna, utilizzando una linea di adenocarcinoma di colon umano.

Sono stati, quindi, effettuati studi di:

- Vitalità cellulare in condizioni di proliferazione;
- Integrità e permeabilità del tessuto epiteliale;
- Proliferazione cellulare;
- Genotossicità e/o genoprotezione.

3.0 MATERIALI

3.1 Animali

Sono stati utilizzati ratti maschi albini, di ceppo Wistar e del peso iniziale di 120 ± 10 g (Harlan Italy, Milano). Gli animali sono stati stabulati in locali termoregolati (temperatura di $23 \pm 2^\circ\text{C}$, umidità del 50 ± 2 %, cicli di luce-buio di 12 ore) ed alimentati con una dieta fornita dalla ditta Mucedola Mangimi (Settimo Milanese, Milano). I ratti avevano libero accesso a cibo ed acqua durante tutta la durata della sperimentazione.

3.2 Colture cellulari

Sono state utilizzate cellule di adenocarcinoma umano, Caco-2. Le cellule sono state tenute in coltura in fiasche da 75 cm^2 in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplementato con siero fetale bovino (FBS) al 10%, 100 Unità/ml di penicillina, 100 $\mu\text{g/ml}$ di streptomicina, soluzione tamponata di HEPES 1M (acido 4-(2-idrossietil)-

1-piperazinil-etansolfonico) al 2.5%, amminoacidi non-essenziali (NEAA) 1X ed infine glutamina 2mM all'1%. Le cellule sono state coltivate in un incubatore contenente atmosfera al 5% di CO₂ e 95% di O₂ e regolato alla temperatura di 37 °C ed il mezzo cellulare è stato cambiato ogni due giorni. Per il piastramento, dopo un lavaggio in tampone fosfato salino (PBS), le Caco-2 sono state tripsinizzate con una soluzione di tripsina-EDTA (Versene 200 mg/L – Tripsina 500 mg/L) ed incubate a 37°C per 5 minuti. Le cellule così separate, venivano poi centrifugate a 1200 rpm per 5 minuti e risospese nel mezzo cellulare e piastrate. La conta cellulare e la rispettiva vitalità sono state eseguite utilizzando un emocitometro di Neubauer ed il colorante trypan blu, che permetteva l'esclusione delle cellule morte.

3.3 Sostante e farmaci utilizzati

L' estratto secco di senna, contenente il 45 % di sennosidi A e B, è stato gentilmente offerto dalla ditta Indena SpA (Milano, Italia). La reina

(acido 4,5-di-idrossi-antrachinone-2-carbossilico), l'acido desossicolico (DCA), l'azossimetano (AOM), il 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT), lo ioduro di propidio (PI), l'1,1,3,3-tetrametossipropano (MDA standard) sono stati ottenuti dalla Sigma-Aldrich S.r.l. (Milano, Italia). Gli anticorpi primari policlonali anti-pERK₁ ed anti-pERK₂ sono stati forniti dalla ditta Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, USA) mentre gli anticorpi secondari HRP-anti-rabbit IgG coniugati alle perossidasi sono stati ottenuti dalla ditta Amersham Biosciences Inc. (UK). I reagenti per le culture cellulari sono stati acquistati dalla ditta Microtech Research Products (Napoli, Italia). Le cellule Caco-2 sono state ottenute dall'American Type Culture Collection (LGC Promochem S.r.l., Milano, Italia). Tutti gli altri reagenti, compresi quelli utilizzati per i saggi di western blot e per gli estratti proteici sono stati ottenuti dalle ditte Sigma-Aldrich SpA (Milano, Italia), Bio-Rad Laboratories (USA) ed Amersham Biosciences

(UK). L'estratto di senna contenente il 45 % di sennosidi A e B è stato solubilizzato in acqua di fonte mentre la reina è stata solubilizzata in dimetilsolfossido (DMSO). Le successive diluizioni della reina sono state effettuate sempre in DMSO (la cui concentrazione massima nel mezzo cellulare era dello 0.1%).

4.0 METODI

4.1 Trattamento con farmaci *in vivo*

I ratti sono stati casualmente (random) suddivisi in 6 gruppi di 10 animali secondo lo schema riportato nella tabella 1. Il gruppo 1 è stato utilizzato come gruppo di controllo, pertanto gli animali sono stati trattati con il solo veicolo (acqua di fonte per *os*); il gruppo 2 è stato trattato con azossimetano (AOM) alla dose di 7.5 mg/kg (*ip*) il primo ed il quinto giorno dall'inizio del trattamento (dose totale di 15 mg/kg); i gruppi 3 e 4 sono stati trattati con l'estratto di senna 30 e 60 mg/kg/die (*os*); infine i gruppi 5 e 6 sono stati trattati con azossimetano (AOM) alla dose di 7.5 mg/kg (*ip*) il primo ed il quinto giorno dall'inizio del trattamento ed estratto di senna alle dosi di 30 e 60 mg/kg/die (*os*). Gli animali sono stati trattati quotidianamente per 110 settimane con l'estratto di senna alle dosi di 30 e 60 mg/kg per via orale.

Tabella 1. Protocollo sperimentale adottato nello studio *in vivo*.

Gruppo	Trattamenti e dosi	N° di animali
1	Veicolo (acqua)	10
2	AOM 15 mg/kg	10
3	Senna 30 mg/kg	10
4	Senna 60 mg/kg	10
5	AOM + Senna 30 mg/kg	10
6	AOM + Senna 60 mg/kg	10

Le due dosi di senna da noi utilizzate rappresentano una dose moderatamente lassativa, che determina accumulo di acqua ed elettroliti a livello del colon (30 mg/kg) ed una dose fortemente lassativa, che determina accumulo di massa fecale a livello del colon (60 mg/kg). La somministrazione dell'agente iniziatore e promotore della cancerogenesi del colon, l'azossimetano, alla dose di 7.5 mg/kg, è stata effettuata, per via intraperitoneale, il primo ed il quinto giorno dall'inizio del trattamento per via intraperitoneale (Figura 8).

Il peso corporeo dei ratti è stato controllato settimanalmente e l'effetto lassativo è stato misurato il primo giorno del trattamento e dopo 55 e 110 settimane dall'inizio del trattamento. Al termine del trattamento (110 settimane) tutti gli animali sono stati sacrificati in atmosfera satura di anidride carbonica.

4.2 Determinazione del contenuto di acqua fecale

Per la determinazione del contenuto di acqua fecale nelle feci, gli

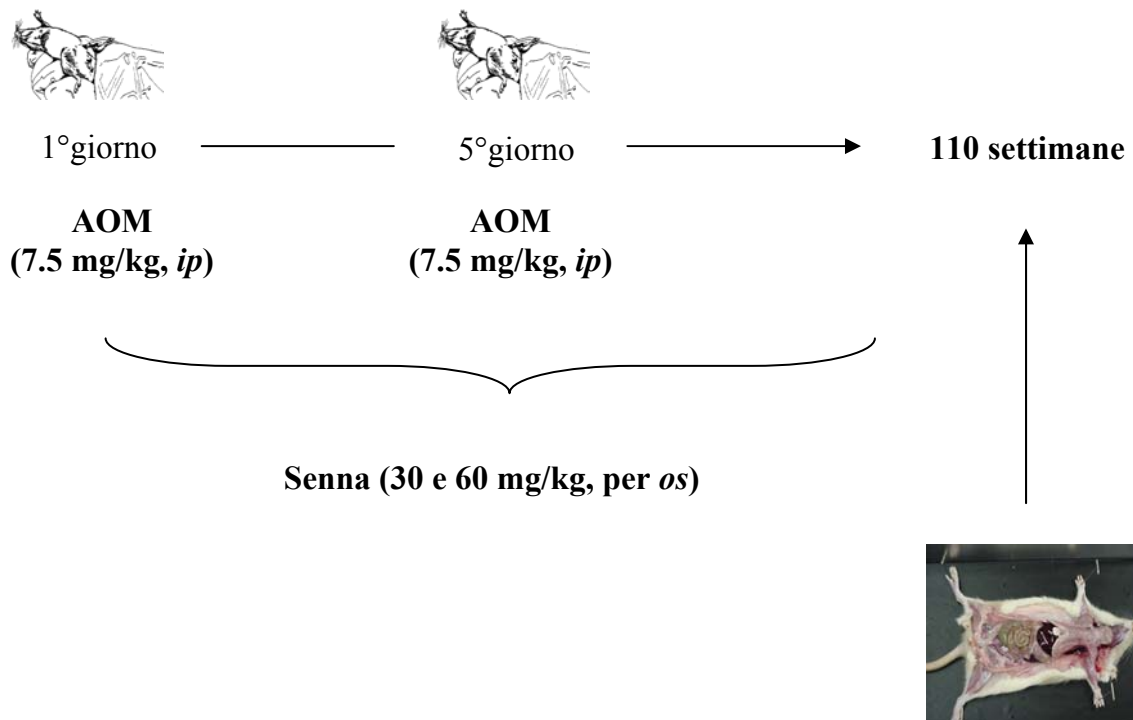


Figura 8. Schema grafico del protocollo sperimentale adottato nello studio *in vivo*.

animali sono stati posti individualmente in gabbie singole provviste sul fondo di una rete posta 5 cm al di sopra di un foglio di carta non assorbente. Le feci sono state raccolte il primo giorno (10 ore dopo il trattamento con senna) e dopo 55 e 110 settimane. La quantità di feci normali o soffice è stata determinata mediante analisi macroscopica. Il contenuto di acqua nelle feci è stato determinato misurando il peso delle feci immediatamente dopo la raccolta e dopo l'essiccamento in stufa a 60°C per 24 ore.

4.3 Foci di cripte aberranti e tumori

I colon rimossi dagli animali sacrificati, dopo 110 settimane dall'inizio del trattamento, sono stati sezionati longitudinalmente, lavati con una soluzione fisiologica (sodio cloruro 0.9 %), distesi su un supporto di polistirolo e fissati in soluzione tamponata di formalina al 10 %. Successivamente 9 cm di colon a partire dall'estremità distale del

retto sono stati suddivisi in 3 segmenti uguali e colorati con blu di metilene alla concentrazione dello 0.2 %.

L'analisi quantitativa degli FCA è stata eseguita considerando i seguenti parametri: (i) numero totale di FCA per animale; (ii) numero di FCA costituiti da 4 o più cripte; (iii) numero di cripte costituenti ogni *focus*.

Dopo l'analisi quantitativa degli FCA i colon degli animali sono stati decolorati dal blu di metilene con etanolo al 70%, inclusi in paraffina ed è stato eseguito l'esame istopatologico su sezioni seriate colorate con ematossilina/eosina.

L'analisi quantitativa dei tumori, invece, è stata eseguita considerando i seguenti parametri: (i) il numero di animali manifestanti il tumore; (ii) il numero di tumori per animale ed (iii) il tipo di tumore (diviso istopatologicamente in adenoma ed adenocarcinoma).

4.4 Esposizione ai farmaci *in vitro*

Le cellule Caco-2 sono state trattate con la reina alle concentrazioni di 0.1-10 µg/ml per 24 ore a 37°C ed in atmosfera al 5% di CO₂ e 95% di O₂. Per i saggi di citotossicità è stato utilizzato come controllo positivo (farmaco di riferimento) l'acido desossicolico alla concentrazione di 250 µM. L'acido desossicolico è un acido biliare secondario citotossico ad azione pro-apoptotica alle concentrazioni da noi utilizzate (Redlak e coll., 2003). Per il saggio del ciclo cellulare è stato, invece, utilizzato l'etoposide come controllo positivo alla concentrazione di 10 µM. Il suo principale effetto sembra manifestarsi durante la fase G2 del ciclo cellulare. Si possono manifestare due effetti dose-dipendenti: a concentrazioni elevate (pari o superiori a 10 mg/ml) si nota una lisi delle cellule che iniziano la mitosi; mentre a basse concentrazioni (inferiori a 10 mg/ml) viene inibita la profase cellulare. L'effetto macromolecolare predominante è rappresentato dall'inibizione della sintesi del DNA.

4.5 Saggi di citotossicità ed integrità del monolayer epiteliale

4.5.1 Saggio dell'MTT

Il potenziale effetto citotossico della reina è stato valutato sulle cellule Caco-2 in fase proliferante mediante il saggio dell'MTT. Tale metodica, sviluppata originariamente da Mosmann (1983), si basa sulla trasformazione del bromuro di 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT), sostanza di colore giallo, in formazano, sostanza di colore viola. Le deidrogenasi mitocondriali delle cellule vive sono in grado di tagliare l'anello tetrazolico dell'MTT determinando la formazione di sali violacei insolubili in soluzione acquosa che sono dosati spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda (λ) di 490 nm. Per il saggio dell'MTT le cellule Caco-2 sono state piastrate in multiwell da 96 pozzetti alla densità cellulare di 1×10^4 cellule per pozzetto. Dopo incubazione per 24 ore con la reina alle concentrazioni di 0.1-10 $\mu\text{g/ml}$, è stato effettuato un lavaggio delle cellule con PBS per allontanare il

mezzo di coltura. In seguito le cellule sono state incubate per 1 ora a 37°C con 200 µl/pozzetto di mezzo di coltura contenente una soluzione di MTT di 0.25 mg/ml. Le cellule sono poi state lisate aggiungendo 100 µl/pozzetto di dimetilsolfossido (DMSO), il quale è in grado di dissolvere i cristalli di formazano metabolizzati a livello mitocondriale. Il contenuto in formazano per pozzetto (dal colore viola) è stato valutato spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda (λ) di 490 nm. L'intensità della colorazione viola dei cristalli di formazano è indicativa del numero di cellule vive che hanno metabolizzato l'MTT a tale prodotto. L'acido desossicolico (DCA), utilizzato come controllo positivo, è stato usato alla concentrazione di 250 µM.

4.5.2 Saggio di resistenza elettrica trans-epiteliale

Il valore di resistenza elettrica trans-epiteliale (Trans-Epithelial Electrical Resistance, TEER) del monolayer, costituito da cellule Caco-2 differenziate, rappresenta un'indicazione del livello di integrità del

monolayer stesso e quindi della formazione delle tight junctions presenti tra gli enterociti. La misurazione del valore di resistenza trans-epiteliale (espresso in Ωcm^2) è stata effettuata utilizzando un voltohmmetro EVOM (World Precision Instruments Inc., New Haven). Le cellule Caco-2 (passaggio compreso tra 57 e 63) sono state piastrate in multiwell da 6 pozzetti e più precisamente in inserti alloggiati nei pozzetti delle piastre (BD Bioscience) pre-trattati con una soluzione di collagene derivante da coda di ratto allo 0.1 % in PBS (densità di 2.5×10^5 cellule/inserto). Le cellule sono state tenute in coltura alla temperatura di 37 °C in atmosfera al 5% di CO₂ ed il 95% di O₂ ed il mezzo cellulare è stato cambiato ogni due giorni. Dal 14° giorno dal piastramento fino al 21°-25° giorno è stato misurato quotidianamente il valore di resistenza trans-epiteliale del monolayer. Un valore stabile di TEER era indice di completa differenziazione delle cellule Caco-2 in una popolazione omogenea di enterociti umani. Una volta stabilizzatosi il valore di TEER,

le cellule Caco-2 sono state trattate con reina alla concentrazione di 0.1-10 µg/ml ed è stato valutato il valore di resistenza trans-epiteliale al momento del trattamento (tempo 0) e dopo 24 e 48 ore. L'acido desossicolico (DCA), utilizzato come controllo positivo, è stato usato alla concentrazione di 250 µM.

4.6 Saggi di proliferazione cellulare

4.6.1 Incorporazione di [³H]-timidina

Le cellule Caco-2 sono state piastrate in multiwell da 24 pozzetti alla densità di 1×10^4 cellule per pozzetto in un mezzo di coltura cellulare completo. Le cellule sono state poi incubate con reina (0.1-10 µg/ml) ed una soluzione di timidina triziata in DMEM completo (1 µCi/pozzetto). Dopo 24 ore di incubazione a 37°C il mezzo è stato rimosso dai pozzetti ed è stato effettuato un lavaggio in ghiaccio con PBS. Successivamente le cellule sono state allontanate meccanicamente dal fondo del pozzetto (mediante aggiunta di 100µl di NaOH 1 N per pozzetto) e raccolte in tubi

in polipropilene contenenti un liquido di scintillazione. Il contenuto di radioattività ^3H è stato determinato utilizzando uno scintillatore per le emissioni β (β -counter, Tricarb, modello 1500, Packard). I trattamenti sono stati effettuati in triplicato ed i risultati sono stati espressi come conte per minuto (CPM) di cellule incorporanti timidina triziata normalizzate sul contenuto proteico delle cellule espresso in mg (CPM/mg_{prot}).

4.6.2 Analisi di Western Blot

Le cellule Caco-2 sono state piastrate in dischi di Petri (diametro di 100 mm) alla densità di 3.5×10^5 cellule per piastra. In seguito a trattamento con reina alle concentrazioni di 0.1-10 $\mu\text{g/ml}$ per 24 ore alla temperatura di 37°C ed in atmosfera al 5% di CO_2 , è stato allontanato il mezzo di coltura ed è stato effettuato un lavaggio con PBS. Le cellule sono state, poi, raccolte in un buffer di lisi (Tris-HCl pH=7.4 50mM, sodio desossicolato 0.25 %, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, NaF 1 mM,

NP-40 1 %, PMSF 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM ed una miscela completa di inibitori delle proteasi) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania) e centrifugate a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il surnatante è stato prelevato ed un' aliquota è stata utilizzata per la determinazione proteica dei campioni eseguita con la metodica di Bradford (Bio-Rad, CA). L'estratto proteico (70 µg) è stato sottoposto ad elettroforesi su gel di poliacrilamide al 12 % (SDS-PAGE) e successivamente trasferito su una membrana di nitrocellulosa per 2.5 ore a 350 mA, utilizzando un Bio-Rad Transblot. La membrana, è stata poi colorata con una soluzione Ponceau-S per verificare l'uniforme trasferimento delle proteine. I filtri sono stati bloccati in una soluzione di milk (5% non-fat dry milk in PBS 1X/Tween 0.1%) per 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente le membrane sono state incubate overnight a 4°C con un anticorpo primario policlonale anti-pERK₁ ed anti-pERK₂ alla diluizione di 1:1000 (Santa Cruz, CA). Dopo 6 lavaggi (uno ogni 10 minuti) effettuati con una

soluzione di PBS 1X/Tween 0.1%, le membrane sono state incubate con un anticorpo secondario HRP-anti-rabbit IgG (1:2000) coniugato ad una perossidasi (Amersham Biosciences Inc., UK) e nuovamente lavate con una soluzione di PBS 1X/Tween 0.1%. Infine gli immunocomplessi antigene-anticorpo sono stati visualizzati mediante reazione di chemiluminescenza e successivamente autoradiografia (Kodak Industrie, Francia). Le bande così ottenute, sono state infine quantificate attraverso analisi densitometrica mediante GS 700 Imaging Densitometer (Bio-Rad) ed un programma di analisi computerizzata (Molecular Analyst, IBM). La normalizzazione dei risultati è stata ottenuta incubando in parallelo le membrane di nitrocellulosa con un anticorpo specifico per la proteina ERK-2 (ERK totale).

4.7 Saggio della cometa (Comet assay)

Le cellule Caco-2 sono state piastrate in fiasche da 25 cm² alla densità di 1.0×10^5 cellule per fiasca e tenute in coltura per 48 ore.

Raggiunta una percentuale di confluenza desiderata (non superiore al 70%), le cellule sono state trattate con la reina alla concentrazione di 0.1-10 $\mu\text{g/ml}$ per 24 ore a 37°C ed in atmosfera al 5% di CO_2 .

Successivamente le cellule sono state rimosse dal fondo della fiasca mediante una soluzione di tripsina-EDTA e risospese in mezzo di coltura alla concentrazione finale di 1.0×10^5 cellule/ml. Le Caco-2 sono state, poi, incubate per 5 minuti in ghiaccio con PBS (controllo negativo) o H_2O_2 75 μM (controllo positivo) e centrifugate a 1250 rpm per 5 min. Il pellet così ottenuto è stato, poi, risospeso in una soluzione di agarosio allo 0.85 % in PBS (low melting point agarose; LMA). Tale soluzione di agarosio è stata posta su un vetrino da microscopio smerigliato su cui precedentemente era stato disteso un gel di agarosio all'1% (normal melting point agar; NMA). I vetrini così preparati sono stati trasferiti in vaschette di vetro contenenti un buffer di lisi (2.5 M NaCl; 0.1 M EDTA; 0.01 M Tris; Triton X 1%) e successivamente

incubati a 4°C per 1 ora. Dopo aver ambientato la cella elettroforetica con una soluzione alcalina di elettroforesi (300 mM NaOH; 1mM EDTA; pH>12), i vetrini sono stati trasferiti nella cella ed è stata avviata l'elettroforesi (26 V; 300 mA a voltaggio ed amperaggio costante per 20 min) del DNA contenuto nel nucleo delle cellule danneggiate o meno dal perossido d'idrogeno (Laky e coll., 2002). Dopo l'elettroforesi, i gel sono stati lavati con 0.4 M Tris e colorati con 20 µl di una soluzione di etidio bromuro 2 mg/ml. Entro e non oltre 4 giorni dalla colorazione dei gel, sono state analizzate 100 cellule singole per gel. Ogni trattamento è stato effettuato in triplicato. La quantità di DNA danneggiato, frammentato e migrato durante l'elettroforesi lontano dal nucleo centrale (così da formare la coda di una cometa), è stata espressa come percentuale della fluorescenza totale della coda della cometa sulla fluorescenza totale di ogni nucleo (% DNA nella coda).

4.8 Determinazione dell'attività catalitica dell'enzima

saccarasi-isomaltasi

La saccarasi-isomaltasi è un enzima (e più precisamente una disaccaridasi che idrolizza il saccarosio) sito sulla membrana dei microvilli delle cellule epiteliali intestinali. Essa rappresenta un marker dello stato di differenziazione degli enterociti, in quanto le cellule Caco-2 in proliferazione presentano un'attività ridotta dell'enzima saccarasi-isomaltasi rispetto alle cellule in stato differenziato. L'attività della saccarasi-isomaltasi è stata determinata secondo la metodica di Dahlqvist (1970). Le cellule Caco-2 sono piastrate in dischi di Petri (diametro di 35 mm) alla densità di 4.0×10^5 cellule per piastra e tenute in coltura a 37°C ed in atmosfera al 5% di CO₂ per 3, 5, 7, 10, 12 e 14 giorni. È stato allontanato il mezzo di coltura mediante un lavaggio con PBS e le cellule sono state raccolte in un buffer di lisi (Tris-HCl pH=7.4 50mM, sodio desossicolato 0.25 %, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, NaF 1 mM, NP-40 1

%, PMSF 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM ed una miscela completa di inibitori delle proteasi) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania). Successivamente le cellule sono state centrifugate a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C ed una parte dell'estratto proteico così ottenuto è stato utilizzato per la determinazione proteica mediante metodica di Bradford (Bio-Rad, CA). Un'aliquota dell'estratto proteico è stata incubata con una soluzione di saccarosio per 1 ora a 37 °C. Successivamente i campioni sono stati incubati con una soluzione costituita da glucosio ossidasi/perossidasi ed o-diamisidina per rendere possibile la reazione di conversione del glucosio e fruttosio in un cromoforo di colore arancio-marrone, il quale è stato valutato spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda (λ) di 430 nm.

4.9 Determinazione dei livelli di malondialdeide

La malondialdeide (MDA) è un prodotto della perossidazione lipidica. Essa è un componente tossico capace di causare “cross-linkage”

di proteine ed enzimi, alterandone la loro funzione biologica. Le cellule Caco-2 sono state piastrate in multiwell da 6 pozzetti ad una densità di 4×10^5 cellule per pozzetto e lasciate differenziare per 7-8 giorni. Dopo l'allontanamento del mezzo e due lavaggi con PBS, le cellule sono state incubate per tre ore alla temperatura di 37°C con differenti concentrazioni di $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ (250-1500 μM) al fine di individuare la concentrazione ottimale in grado di indurre stress ossidativo e quindi aumento della concentrazione citosolica di MDA. Scelta la concentrazione idonea di $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{+2}$ (1 mM), le cellule differenziate sono state trattate con reina alle concentrazioni di 0.1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ per 24 ore. Successivamente si sono ottenuti estratti proteici raccogliendo le cellule dal fondo dei pozzetti con 150 $\mu\text{l}/\text{pozzetto}$ di PBS e sei cicli di congelamento/scongelo in ghiaccio secco. La sospensione cellulare ottenuta è stata poi centrifugata a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C per allontanare i detriti cellulari. Gli estratti citosolici così ottenuti

sono stati incubati a temperatura ambiente per 15 min con una soluzione di acido tricloracetico al 10 % per la precipitazione delle proteine. Dopo una seconda centrifugazione a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C, una aliquota di surnatante è stata prelevata ed incubata con una soluzione di acido tiobarbiturico 0.67 % (p/v) ad 80 °C per 30 minuti per favorire la reazione di ossidazione delle specie reattive presenti nell'estratto citosolico (tra cui la malondialdeide) (Janero, 1990). La reazione origina un cromoforo di colore rosa, il quale viene valutato spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda (λ) di 532 nm. Su una seconda aliquota di surnatante è stata effettuata la determinazione proteica mediante il saggio di Bradford. I livelli di MDA sono stati espressi come μmol di MDA normalizzati sul contenuto proteico delle cellule espresso in mg ($\mu\text{M}_{\text{MDA}}/\text{mg}_{\text{prot}}$).

4.10 Analisi statistica

Ogni dato rappresenta la media \pm errore standard medio (SEM) di 3 o più esperimenti. Per determinare le differenze statistiche è stato utilizzato il t-test di Student. L'analisi della varianza è stata invece utilizzata per confrontare più di due medie. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo. Per il saggio di genotossicità (Comet assay) i dati sono stati analizzati statisticamente in maniera quantitativa, utilizzando un software di analisi di immagine in grado di calcolare parametri come "tail length" (lunghezza della coda) e "tail moment" (momento della coda). La media % della coda del DNA è stata calcolata su 100 cellule per gel, ognuna in triplicato e la media di ognuna è stata usata per l'analisi statistica.

5.0 RISULTATI

5.1 Valutazione del peso corporeo degli animali e dell'effetto

lassativo

Nella tabella 2 sono riportati i dati relativi all'incremento del peso corporeo degli animali. L'AOM, somministrato alla dose di 7.5 mg/kg il primo ed il quinto giorno di trattamento, non determinava nessuna variazione dell'incremento del peso corporeo degli animali, rispetto al controllo, dopo 55 e 110 settimane. L'estratto di senna (30 e 60 mg/kg), rispetto al controllo, produceva una dose-dipendente riduzione dell'incremento del peso corporeo degli animali dopo 55 e 110 giorni di trattamento. Tale riduzione risultava statisticamente significativa ($p < 0.05$) alla dose di 60 mg/kg. Allo stesso modo, l'estratto di senna (60 mg/kg) somministrato in associazione con l'AOM, riduceva significativamente ($p < 0.05$) l'incremento del peso corporeo degli animali

Tabella 2. Aumento del peso corporeo degli animali trattati con senna (SE, 30 e 60 mg/kg) dopo 55 e 110 settimane.

Aumento del peso corporeo		
	55 settimane	110 settimane
Controllo (acqua)	560 ± 21	743 ±38
AOM	555 ± 25	725 ±24
SE 30 mg/kg	530 ± 23	685 ± 21
SE 60 mg/kg	500 ± 14*	635 ± 20*
AOM + SE 30 mg/kg	540 ± 16	690 ± 32
AOM + SE 60 mg/kg	495 ± 16*	630 ± 17*

Media ± errore standard (ES); *P<0.05 vs controllo.

Nella figura 9 è riportato l'effetto della senna sul contenuto di acqua fecale misurato il primo giorno di trattamento e dopo 55 e 110 settimane dall'inizio del trattamento. Il contenuto di acqua nelle feci degli animali trattati con AOM 15 mg/kg o con il solo veicolo era pari al 50 %. La somministrazione di senna, alla dose di 30 e 60 mg/kg, determinava un aumento del contenuto di acqua fecale pari al 65% e 68% rispettivamente. Nessuna variazione significativa nel contenuto di acqua fecale è stata riscontrata tra gli animali trattati con la senna (30 e 60 mg/kg) e la senna in presenza di AOM (15 mg/kg).

5.2 Determinazione di foci di cripte aberranti e tumori

Nella tabella 3 sono riportati i risultati relativi al numero di FCA/ratto ed al numero al numero di cripte/focus osservati negli animali trattati con senna, AOM e senna in presenza di AOM. I risultati mostrano che l'AOM (15 mg/kg), somministrato da solo era in grado di indurre in tutti gli animali la formazione di FCA. Al contrario la senna,

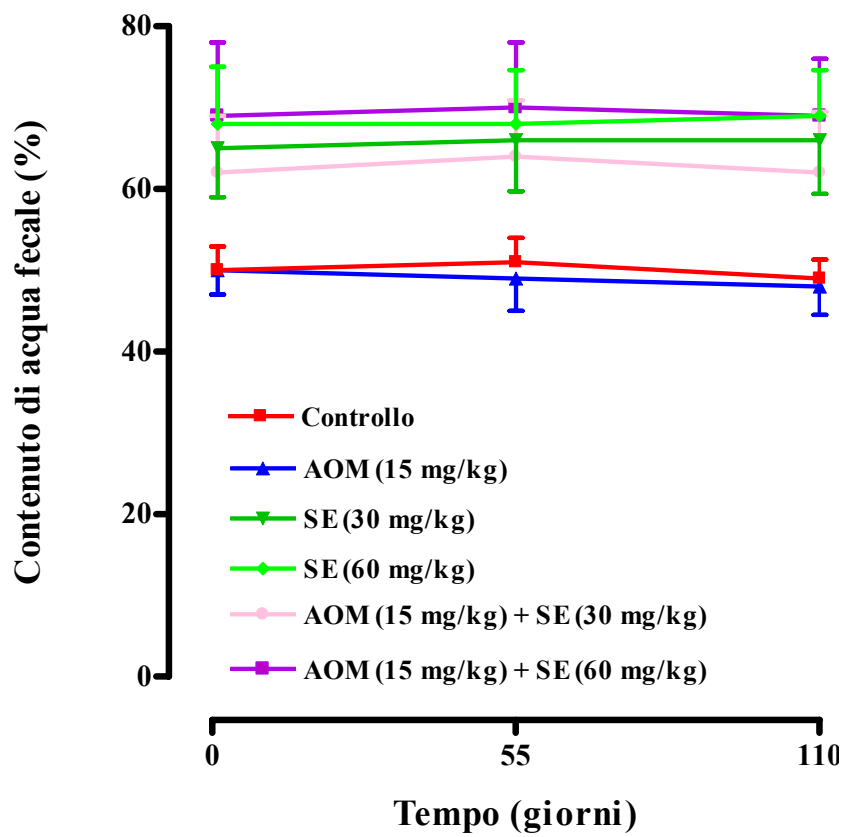


Figura 9. Effetto dell'azossimetano (AOM), della senna (SE) ed AOM + SE sul contenuto di acqua fecale

Tabella 3. Effetto della senna (SE, 30 e 60 mg/kg, somministrata per 110 settimane) sulla formazione di foci di cripte aberranti (FCA) in ratti trattati o meno con azossimetano (AOM, 15 m/kg).

Trattamento e dose	NR	FCA/ratto ^a		Cripte/focus (N) ^a
		N° foci totali	N° foci \geq 4 cripte	
Veicolo (acqua)	10	0	0	0
AOM 15 mg/kg	10	90.3 \pm 12.6	49.1 \pm 6.39	4.92 \pm 0.45
SE 30 mg/kg	10	0	0	0
SE 60 mg/kg	10	0	0	0
AOM + SE 30 mg/kg	10	25.0 \pm 4.22**	18.7 \pm 3.88**	5.93 \pm 0.61
AOM + SE 60 mg/kg	10	34.2 \pm 7.04**	22.1 \pm 5.96**	6.29 \pm 0.71

NR= numero di ratti; ^a Media \pm errore standard (ES); **p<0.01 vs AOM

somministrata alle dosi di 30 e 60 mg/kg, non determinava la formazione di tali lesioni pre-neoplastiche. L'estratto di senna (30 e 60 mg/kg), in presenza di AOM riduceva significativamente sia il numero di foci di cripte aberranti totali che il numero di foci di cripte aberranti con più di 4 cripte.

Nella tabella 4 sono riportati i risultati relativi al numero ed al tipo di tumore osservato negli animali trattati con senna, AOM e senna in presenza di AOM. I risultati mostrano che l'AOM (15 mg/kg), somministrato da solo induceva nell'80 % degli animali la formazione di tumori. L'estratto di senna, somministrato alle dosi di 30 e 60 mg/kg, non induceva la formazione di tumori. La senna (30 e 60 mg/kg), in presenza di AOM riduceva significativamente la percentuale di ratti con tumore (50% di ratti con tumori per entrambe le dosi di senna rispetto all'80 % del controllo) ed il numero di tumore/ratto.

5.3 Saggi di citotossicità

Tabella 4. Numero e tipo di tumore osservato a livello della mucosa del colon di ratti trattati con senna (SE, 30 e 60 mg/kg) per 110 settimane in presenza ed assenza di azossimetano (AOM, 15 mg/kg).

Trattamenti e dosi	NR	Ratti con tumori (%)	Tumori/ratto (N) ^a	Tipo di tumore	
				Adenoma ^b	Adenocarcinoma
Veicolo (acqua)	10	0	0	0	0
AOM 15 mg/kg	10	80	2.20± 0.29	8 (↑) 6 (↓)	8
SE 30 mg/kg	10	0	0	0	0
SE 60 mg/kg	10	0	0	0	0
AOM + SE 30 mg/kg	10	50	1.20 ± 0.18**	4 (↓) 5 (↓)	3
AOM + SE 60 mg/kg	10	50	1.30 ± 0.21*	5 (↓) 5 (↓)	3

NR=numero di ratti; ^a Media ± errore standard (ES); ^b Tutti gli adenomi erano tubulo-villosi con un livello alto (↑) o basso (↓) di displasia; *p<0.05 e **p<0.01 vs AOM.

5.3.1 Valutazione della respirazione mitocondriale

Nella figura 10 è riportato l'effetto della reina sulla respirazione mitocondriale. La reina, alle concentrazioni di 0.1-10 µg/ml, non determinava una riduzione significativa della vitalità delle cellule Caco-2 in fase proliferante, dopo 24 ore di incubazione. Al contrario, l'acido desossicolico (DCA, 250 µM), utilizzato come farmaco di riferimento, riduceva significativamente ($p < 0.001$) la respirazione mitocondriale e quindi la vitalità cellulare.

5.3.2 Valutazione dell'integrità e permeabilità del monolayer

epiteliale

L'effetto della reina sulla integrità e permeabilità del monolayer epiteliale è stato studiato utilizzando cellule Caco-2 differenziate, che in tali circostanze mimano le condizioni fisiologiche dell'epitelio intestinale umano.

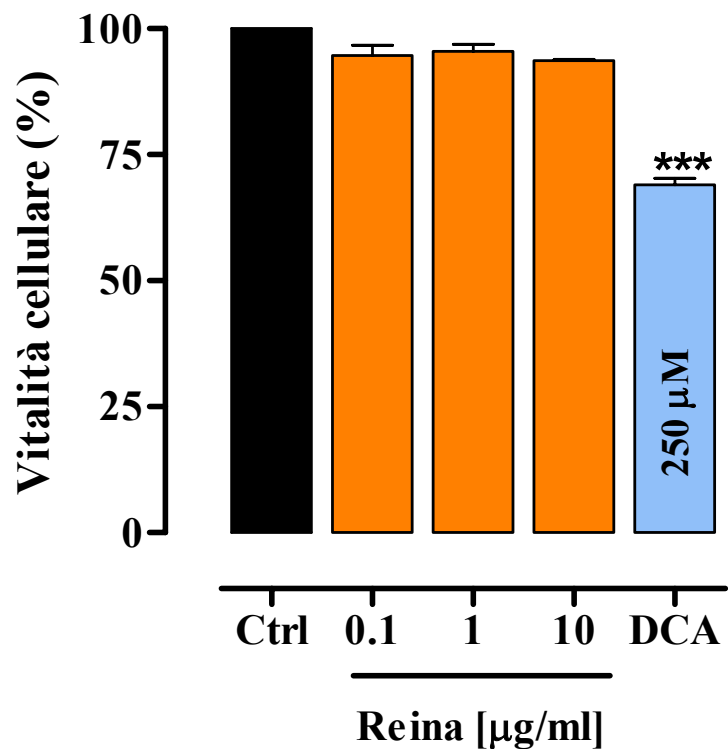


Figura 10. Effetto della reina (0.1-10 μg/ml) e dell'acido desossicolico (DCA, 250 μM) sulla vitalità cellulare. n=3, media ± S.E.M., ***P<0.001 vs controllo (Ctrl).

La reina, utilizzata alle concentrazioni di 0.1-10 $\mu\text{g/ml}$, non determinava variazioni della resistenza elettrica trans-epiteliale (TEER) misurata tra il compartimento apicale e quello basolaterale del monolayer epiteliale, indicando, quindi, un mantenimento dell'integrità del monolayer epiteliale (Figura 11). Tali risultati sono stati osservati sia dopo 24 che 48 ore di incubazione con reina. L'acido desossicolico (250 μM), utilizzato come farmaco di riferimento, riduceva significativamente ($P < 0.001$) la TEER dopo 24 ore e 48 ore di trattamento.

La reina (0.1-10 $\mu\text{g/ml}$) non modificava la permeabilità del monolayer epiteliale, in quanto non determinava un aumento del flusso di fluoresceina dal compartimento apicale a quello basolaterale (Figura 12). Tali risultati sono stati osservati sia dopo 24 che 48 ore di incubazione con reina. L'acido desossicolico (250 μM) aumentava significativamente ($P < 0.001$) la permeabilità del monolayer epiteliale dopo 24 ore e 48 ore di trattamento.

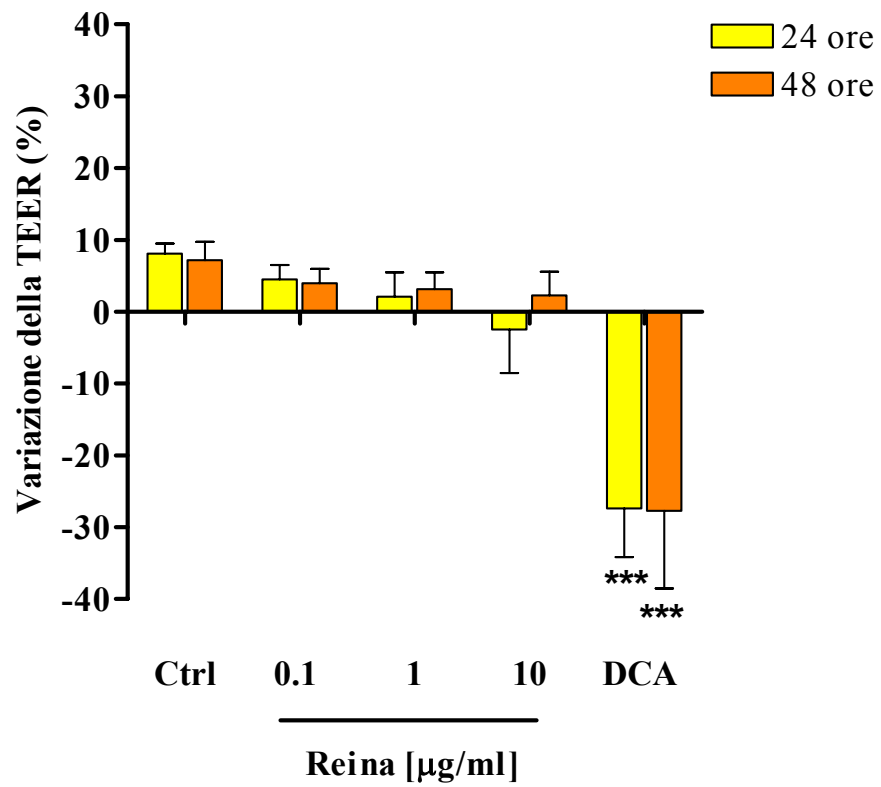


Figura 11. Effetto della reina (0.1-10 µg/ml) sulla integrità del monolayer epiteliale. n=3, media ± S.E.M., ***P<0.001 vs controllo (Ctrl).

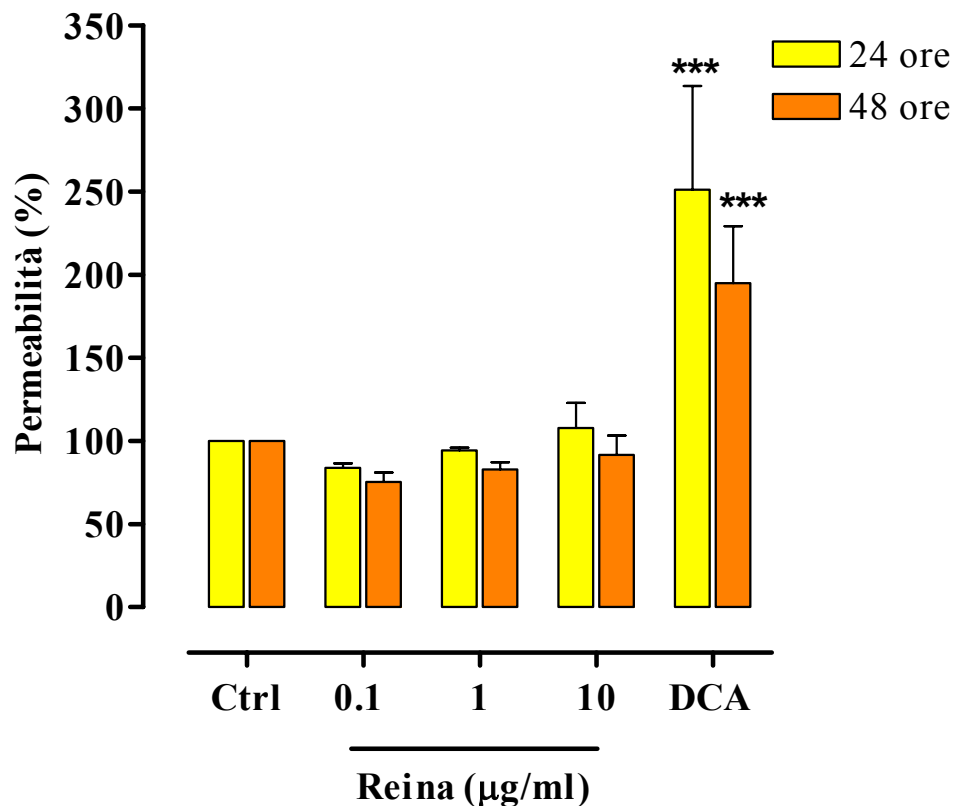


Figura 12: Effetto della rena (0.1-10 µg/ml) sulla permeabilità del monolayer epiteliale. n=3, media ± S.E.M., ***P<0.001 vs controllo (Ctrl).

5.4 Proliferaazione cellulare

5.4.1 Incorporazione di [³H]-timidina

Gli studi di proliferazione cellulare sono stati effettuati incubando le cellule con reina (0.1-10 µg/ml) in un mezzo di coltura contenente timidina triziata (³H). La reina alle basse concentrazioni (0.1 e 1 µg/ml) determinava una riduzione significativa (P<0.001) della incorporazione di timidina triziata da parte delle cellule Caco-2 proliferanti (riportato come conte per minuto di cellule incorporanti timidina triziata su mg di proteina, CPM/mg_{prot}) (Figura 13). Al contrario, la reina, alla concentrazione di 10 µg/ml, determinava un significativo (P<0.001) aumento dell'incorporazione di timidina triziata e quindi un aumento della proliferazione cellulare (Figura 13).

5.4.2 Valutazione dell'espressione di pERK₁ e pERK₂

Il meccanismo molecolare alla base dell'effetto modulatore della reina sulla proliferazione cellulare è stato indagato studiando

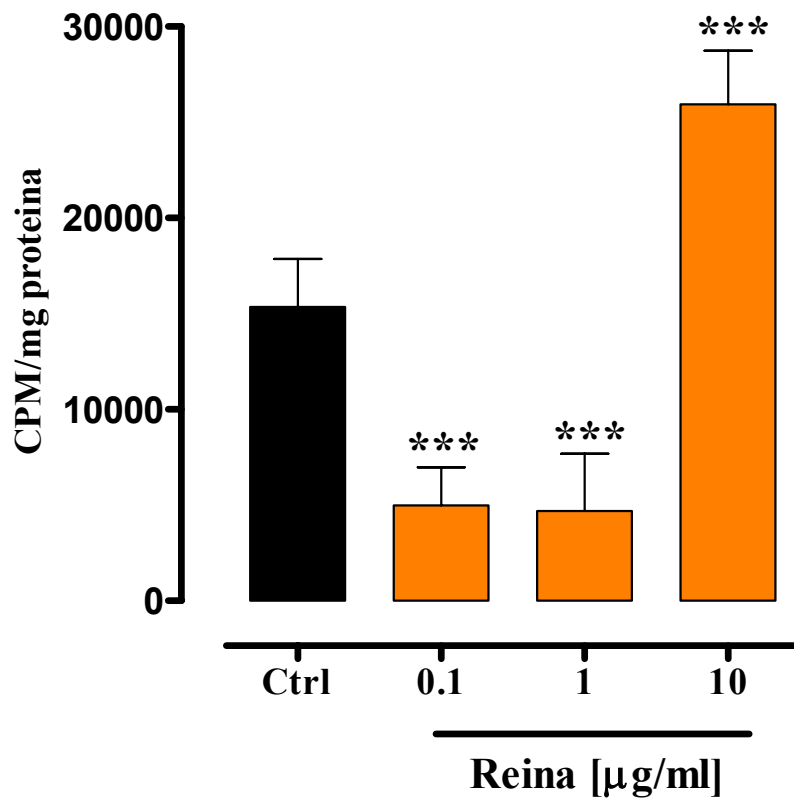


Figura 13. Effetto della reina (0.1-10 µg/ml) sulla proliferazione cellulare. n=3, media ± S.E.M., ***P<0.001 vs controllo (Ctrl).

l'espressione delle proteine ERK₁ ed ERK₂ fosforilate.

La reina, alle concentrazioni di 0.1 e 1 µg/ml, riduceva significativamente (P<0.001) l'espressione delle proteine ERK₁ ed ERK₂ fosforilate. Al contrario, la reina alla concentrazione di 10 µg/ml, determinava un aumento significativo (P<0.001) dell'espressione di ERK₁ e ERK₂, quindi una attivazione della via delle chinasi MAP (Figura 14). L'effetto della reina sull'espressione delle seguenti proteine fosforilate (che sono coinvolte nella via di trascrizione del segnale cellulare mediato dalle chinasi MAP) chiarisce l'azione modulatoria della reina sulla proliferazione cellulare.

5.5 Saggio della cometa (Comet assay)

La reina, alla concentrazione di 0.1-10 µg/ml, non determinava danno al DNA delle cellule Caco-2 dopo 24 ore di incubazione (Figura 15). Il trattamento delle cellule Caco-2 con perossido d'idrogeno (H₂O₂, 75 µM) induceva una rottura della doppia elica del DNA, evidenziata

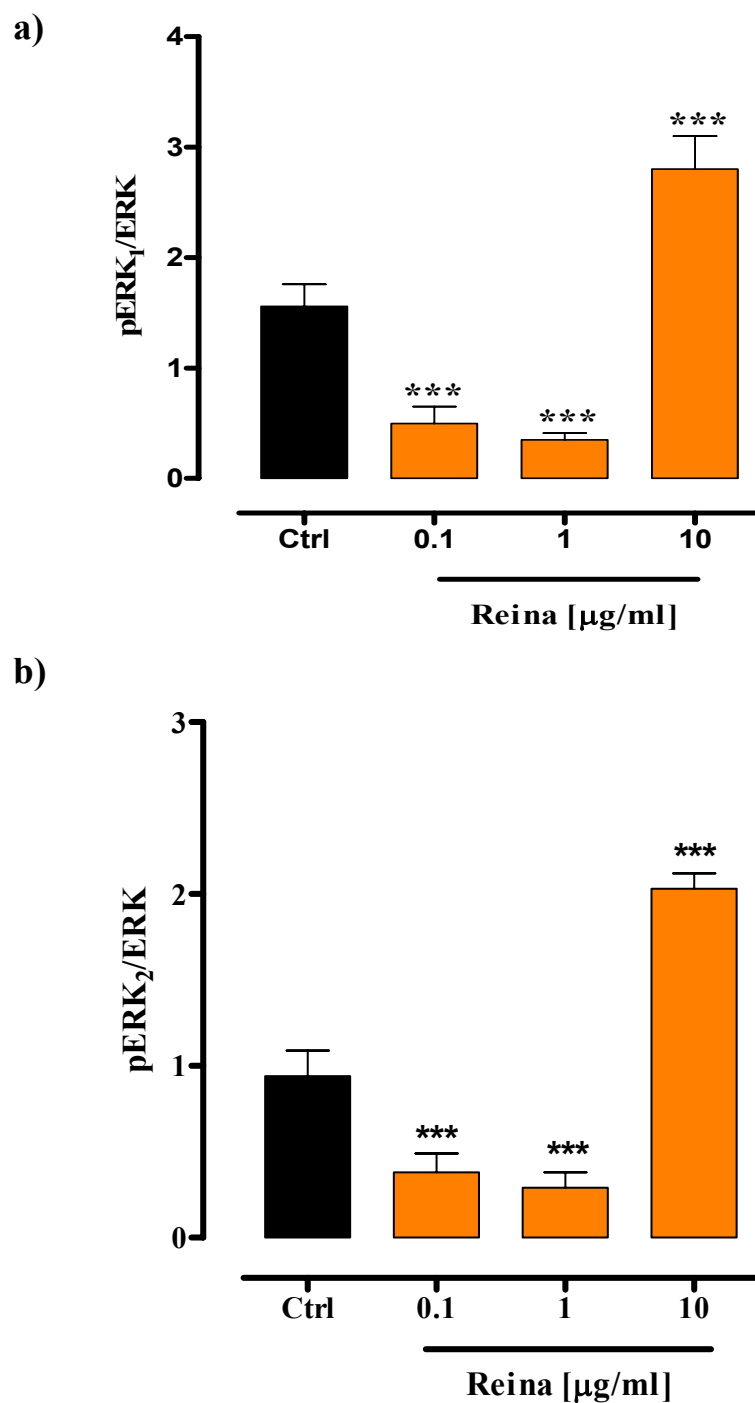


Figura 14. Effetto della reina sulla espressione di pERK1 (a) e pERK2 (b), appartenenti alla via della chinasi MAP. $n=3$, media \pm S.E.M., *** $P<0.001$ vs controllo (Ctrl).

dall'aumento della lunghezza della coda delle comete. Un pre-trattamento delle cellule con reina (0.1-10 µg/ml) per 24 ore, determinava una riduzione significativa ($P < 0.05$) e concentrazione dipendente del danno al DNA indotto dal perossido d'idrogeno. Tali dati suggeriscono che la reina, alle concentrazioni da noi utilizzate, presenta un potenziale effetto genoprotettivo (Figura 16).

5.6 Determinazione dell'attività catalitica della saccarasi-isomaltasi

Al fine di valutare il grado di differenziazione delle cellule Caco-2 è stato effettuato un time-course di valutazione dell'attività dell'enzima saccarasi-isomaltasi. L'attività di tale enzima aumentava in maniera tempo-dipendente fino al 12° giorno dal piastramento. Al 15° giorno si è osservata una riduzione dell'attività della saccarasi-isomaltasi (Figura 17).

5.7 Determinazione dei livelli di malondialdeide

Il trattamento delle Caco-2 con H_2O_2/Fe^{2+} (250-1500 µM)

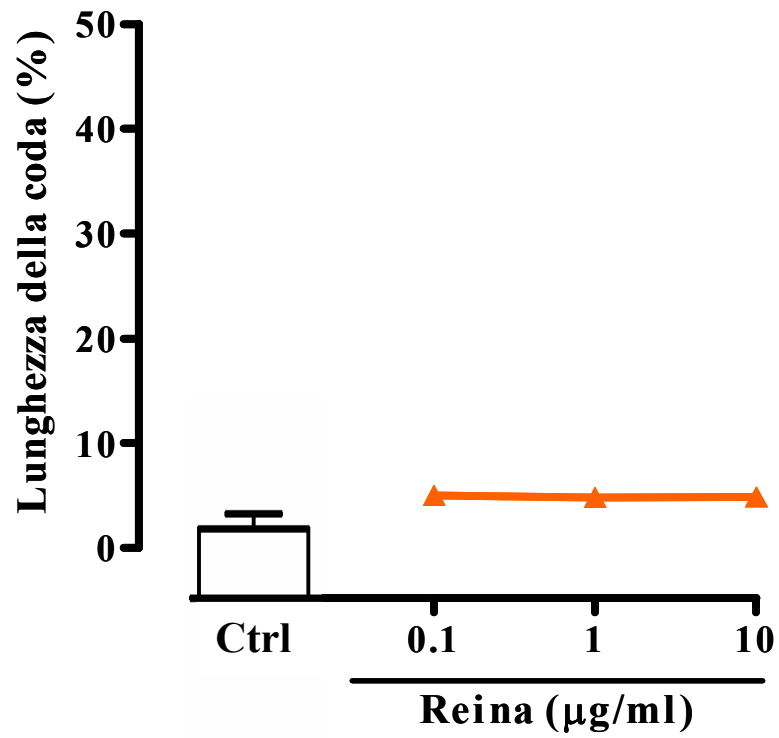


Figura 15. Effetto della reina (0.1-10 µg/ml) sul DNA. n=4, media ± S.E.M.

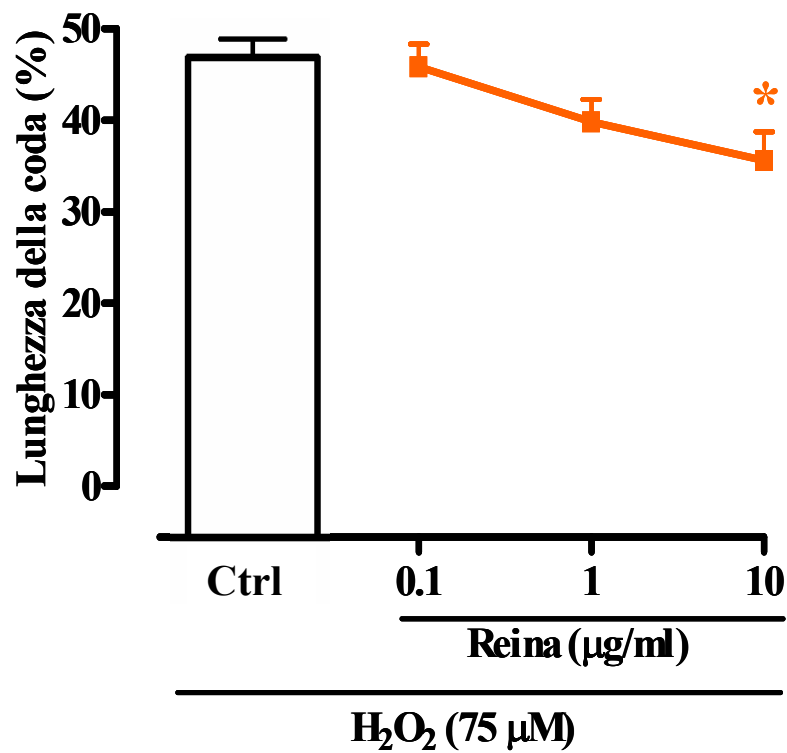


Figura 16. Effetto della reina (0.1-10 µg/ml) sul danno al DNA indotto da perossido d'idrogeno (H_2O_2 , 75 µM). n=4, media ± S.E.M., *P<0.05 vs controllo (Ctrl).

determinava uno stress ossidativo con conseguente aumento significativo ($P < 0.001$) e concentrazione dipendente dei livelli di malondialdeide (Figura 18).

Un pre-trattamento delle Caco-2 con reina (0.1-10 $\mu\text{g/ml}$) riduceva significativamente ($P < 0.001$) l'aumento dei livelli citosolici di tale biomarker indotto da $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 1000 μM (Figura 19).

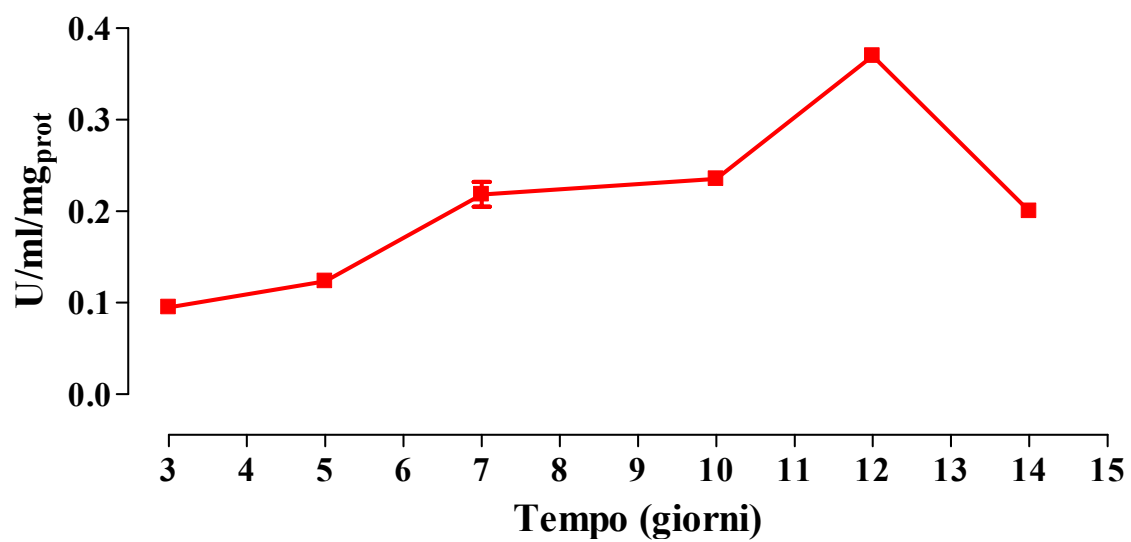


Figura 17. Attività catalitica dell'enzima saccarasi-isomaltasi in funzione del tempo. n=4, media \pm S.E.M.

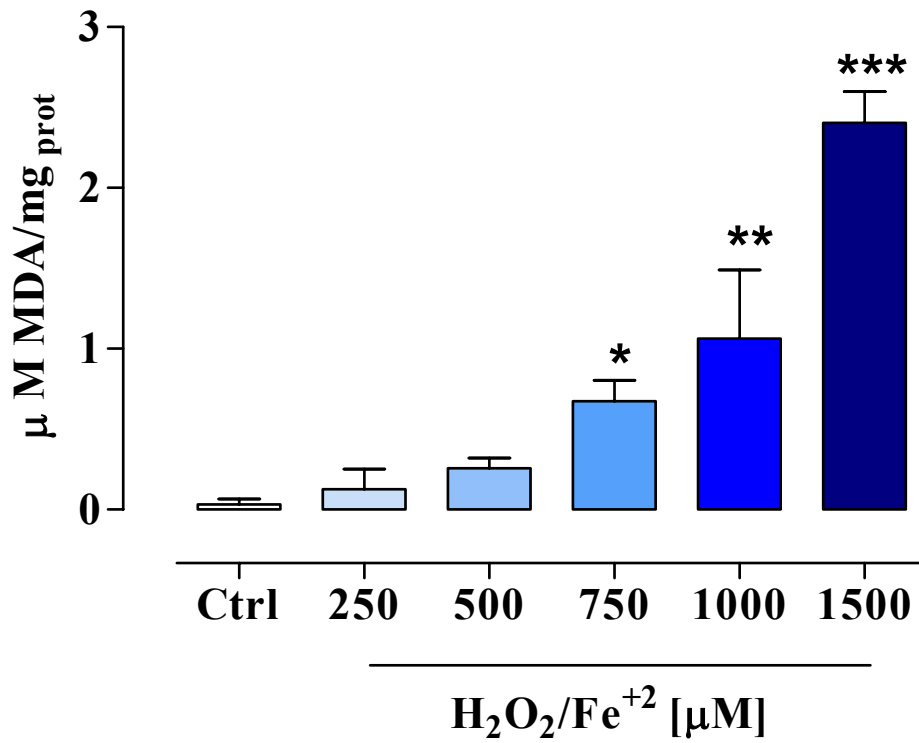


Figura 18. Aumento concentrazione-dipendente dei livelli citosolici di MDA indotti da H₂O₂/Fe⁺². n=3, media ± S.E.M., *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs controllo (Ctrl).

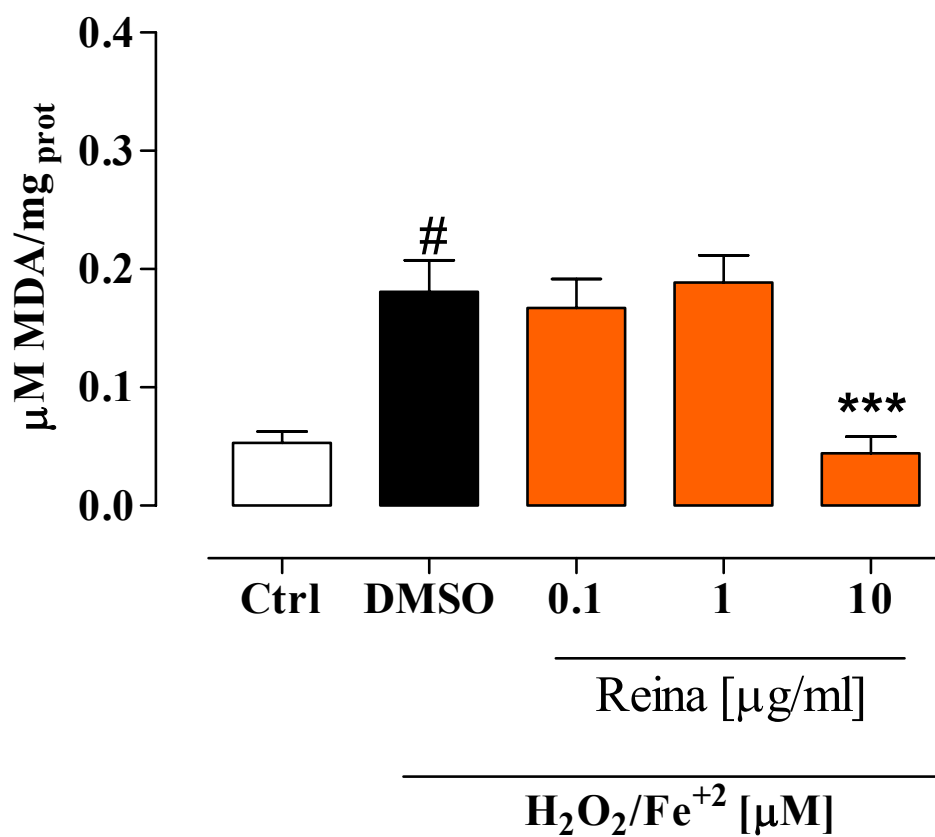


Figura 19. Effetto della reina (0.1-10 µg/ml) sulla formazione di malondialdeide indotta da $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{+2}$ (1000 µM). $n=3$, media \pm S.E.M., # $P<0.01$ vs controllo (Ctrl) e *** $P<0.001$ vs DMSO.

6.0 DISCUSSIONE

Al giorno d'oggi gli estratti secchi di senna (foglie e baccelli) entrano, da soli od in associazione con altre sostanze, nella composizione di numerosi farmaci utilizzati per la cura ed il trattamento della stipsi. In base alla natura chimica dei suoi principi attivi, la senna viene classificata fra le droghe antrachinoniche ad azione lassativa.

È stato ipotizzato che il meccanismo molecolare alla base dell'effetto lassativo della senna sia strettamente correlato ad un danno cellulare (Yagi e coll., 1988).

I primi studi che hanno dimostrato la tossicità dei lassativi antrachinonici a livello del plesso mienterico nel topo e nell'uomo risalgono al 1968 (Smith e coll., 1968). Successivamente è stato riportato che i lassativi antrachinonici determinano un aumento del numero dei macrofagi a livello del tessuto connettivo della mucosa colonica (Steer e coll., 1975) ed evidenti cambiamenti ultrastrutturali che a livello delle

fibre nervose si presentano come riduzione degli organelli cellulari, aumento dell'attività lisosomiale e aumento del volume assonico (Riemann e coll., 1980a; 1980b). Utilizzando il saggio dell'MTT, metodica ampiamente usata per valutare la respirazione mitocondriale (e quindi la vitalità cellulare), nel presente studio abbiamo dimostrato che la reina, sostanza responsabile dell'effetto lassativo della senna, non possiede effetti citotossici su cellule proliferanti.

Il tessuto intestinale umano è formato da enterociti differenziati e legati tra loro da giunzioni denominate gap junctions. Tali giunzioni sono contatti specializzati tra le cellule eucariote che (i) provvedono alla diretta comunicazione intercellulare ed al passaggio di ioni e piccole molecole e (ii) garantiscono l'integrità del monolayer epiteliale. Nei nostri esperimenti sono state utilizzate cellule di adenocarcinoma umano che tra il 14° e il 21° giorno si presentavano completamente differenziate in enterociti e che quindi in tali circostanze mimavano le condizioni

fisiologiche dell'epitelio intestinale umano. Nel nostro studio è stato dimostrato che la reina non determinava danno al monolayer epiteliale sia perchè non induceva variazioni nella resistenza elettrica trans-epiteliale e sia perchè non ne aumentava la permeabilità. Questi risultati escludono che la reina, sostanza responsabile dell'effetto lassativo della senna, possa indurre un danno cellulare nello svolgimento dell'azione lassativa.

Nei paesi più industrializzati, compresa l'Italia, il cancro colon-rettale rappresenta il tumore gastrointestinale maligno più frequente. In Italia, nel quinquennio compreso tra il 1998 ed il 2002, il tumore del colon ha rappresentato il quarto più comune tipo di cancro sia nell'uomo (dopo quello del polmone, della prostata e dello stomaco) che nella donna (dopo quello della mammella, del polmone e delle sedi maldefinite incluse le metastasi) (Associazione Italiana Registri Tumori, AIRT, 2006). Una stima internazionale vede i tassi di incidenza in Italia

per gli uomini, posizionarsi tra i più elevati in Europa (anche se notevolmente più bassi di quelli statunitensi) mentre per le donne i tassi di incidenza si localizzano in posizione intermedia ma più elevati di quelli di altri paesi mediterranei come Grecia, Spagna o Portogallo.

Fattori di rischio e quindi potenzialmente cancerogeni sia per l'uomo che per la donna sono rappresentati dallo stile di vita (dieta, fumo, alcool e sedentarietà), dai fattori ambientali o "lavorativi" (radiazioni, inquinamento elettromagnetico, amianto) oppure da virus e/o patologie varie (il papilloma virus umano, l'epatite B e C, la colite ulcerosa, il morbo di Chron e le sindromi polipose del colon).

Recentemente l'uso cronico di lassativi antrachinonici è stato considerato un fattore a rischio nell'insorgenza del cancro colon-rettale (Sieggers e coll., 1993; Westendorf e coll., 1993); tuttavia le informazioni a riguardo, presenti in letteratura, sono piuttosto contraddittorie.

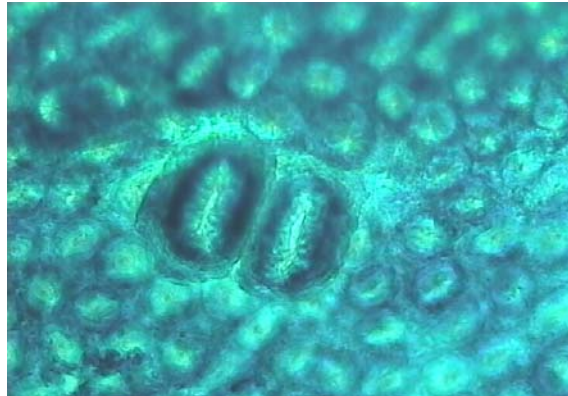
Nel presente studio sono stati effettuati studi *in vivo* ed *in vitro* per valutare i potenziali effetti genotossici della senna. Siamo andati, quindi, a valutare l'effetto di un estratto di senna, contenente il 50 % di sennosidi A e B, sulla formazione di lesioni pre-neoplastiche (foci di cripte aberranti) e tumori; inoltre è stato valutato l'effetto dell'estratto di senna sull'incidenza dei foci di cripte aberranti e tumori la cui formazione è stata indotta da un agente cancerogeno, quale l'azossimetano.

Da diversi anni l'azossimetano, una sostanza ad attività iniziatrice e promotrice, è utilizzato sperimentalmente per indurre tumori a livello intestinale. Tale metodica è, quindi, ampiamente utilizzata per valutare le capacità induttrici e promotrici di una sostanza o ancora per valutare l'attività antineoplastica di un farmaco. È stato dimostrato che l'azossimetano induce, già dopo 4 settimane dalla sua somministrazione, alterazioni dell'epitelio del colon. Queste lesioni della mucosa del colon,

definite “foci di cripte aberranti” (FCA) sono state inizialmente individuate da Lipkin nel 1976. Solo nel 1987, Bird quantizzò queste alterazioni e dimostrò l’esistenza di una correlazione tra il numero, le dimensioni di esse e la probabilità di insorgenza del cancro colon-rettale.

Le cripte aberranti, considerate delle lesioni pre-neoplastiche precoci della mucosa del colon, sono ben distinguibili al microscopio ottico mediante colorazione della mucosa con blu di metilene già dopo 3-4 settimane dall’esposizione ad uno o più agenti cancerogeni. Nel tempo, esse aumentano in numero ed in dimensioni raggruppandosi in foci. Le caratteristiche delle cripte aberranti, che le rendono facilmente distinguibili rispetto alle cripte normali, sono: (i) diametro doppio, (ii) presenza di un lume ellittico, (iii) ispessimento dell’epitelio ed infine (iv) compressione del tessuto circostante (Figura 20). I foci di cripte aberranti sono, inoltre, facilmente distinguibili poiché appaiono più intensamente colorati e sopraelevati rispetto alla mucosa circostante. Sono state anche

a)



b)



Figura 20. *Focus* costituito da 2 cripte (a) e 5 cripte aberranti (b).

messe in evidenza ulteriori caratteristiche dei foci di cripte aberranti, che supportano la tesi che esse siano da considerarsi delle lesioni pre-neoplastiche precoci della mucosa del colon.

I foci di cripte aberranti, caratterizzati da un aumento della proliferazione cellulare, sono indotti da cancerogeni specifici in maniera dose e tempo dipendente (Mc Lellan e coll., 1991a; 1991b). L'insorgenza degli FCA è associata ad un aumento dell' espressione di alcuni oncogeni (Stopera e coll., 1992); inoltre essa è stata osservata in pazienti affetti da neoplasie maligne del colon (Roncucci e coll., 1991).

I nostri risultati hanno mostrato che la senna, somministrata per 110 settimane a dosi terapeutiche (dosi in grado di determinare un effetto lassativo), non induceva la formazione di alterazioni della mucosa intestinale (FCA) e tumori, così da ritenere che la senna non debba essere considerata una sostanza iniziatrice del cancro colon-rettale.

Inoltre sempre nel presente studio è stato dimostrato che la senna, a dosi

terapeutiche non aumentava l'incidenza degli FCA e tumori quando gli animali venivano pre-trattati con un agente cancerogeno, quale l'azossimetano (così da escludere un effetto promotore della senna sulla formazione del cancro colon-rettale). I nostri risultati, infine, hanno mostrato che la senna riduceva la formazione di foci di cripte aberranti e tumori in animali trattati con azossimetano. Pertanto tali risultati sembrano suggerire che la senna non possiede effetti carcinogenici ma, al contrario, è in grado di ridurre la formazione di lesioni pre-neoplastiche e tumori e quindi agire da potenziale agente antitumorale.

Pur non esistendo una eziologia unica, quale causa della genesi del cancro colon-rettale, alla base dell'insorgenza di tale fenomeno neoplastico esiste sempre una mutazione genetica. L'alterazione dell'espressione genica può coinvolgere degli oncogeni o dei geni onco-soppressori. Gli oncogeni sono coinvolti nella regolazione della crescita cellulare (stimolazione della proliferazione) mentre i geni onco-

soppressori la inibiscono. Quando intervengono delle mutazioni (variazioni della sequenza del DNA) a carico di questi geni, la crescita cellulare non viene più regolata correttamente e questo dà luogo alla formazione neoplastica (Figura 21).

Il cancro colon-rettale è causato da una proliferazione incontrollata delle cellule della mucosa che rivestono la porzione terminale dell'intestino. I nostri esperimenti hanno dimostrato che la reina alle concentrazioni di 0.1 e 1 µg/ml (concentrazioni che corrispondono alla quantità di reina presente nel colon in seguito all'assunzione di un dosaggio terapeutico di senna) riduceva la proliferazione cellulare. I dati inerenti la capacità della reina di ridurre la proliferazione delle cellule tumorali supportano i risultati ottenuti *in vivo*, dove la senna riduceva l'incidenza delle lesioni pre-neoplastiche e dei tumori. Una concentrazione di reina pari a 10 µg/ml (concentrazione che corrisponde

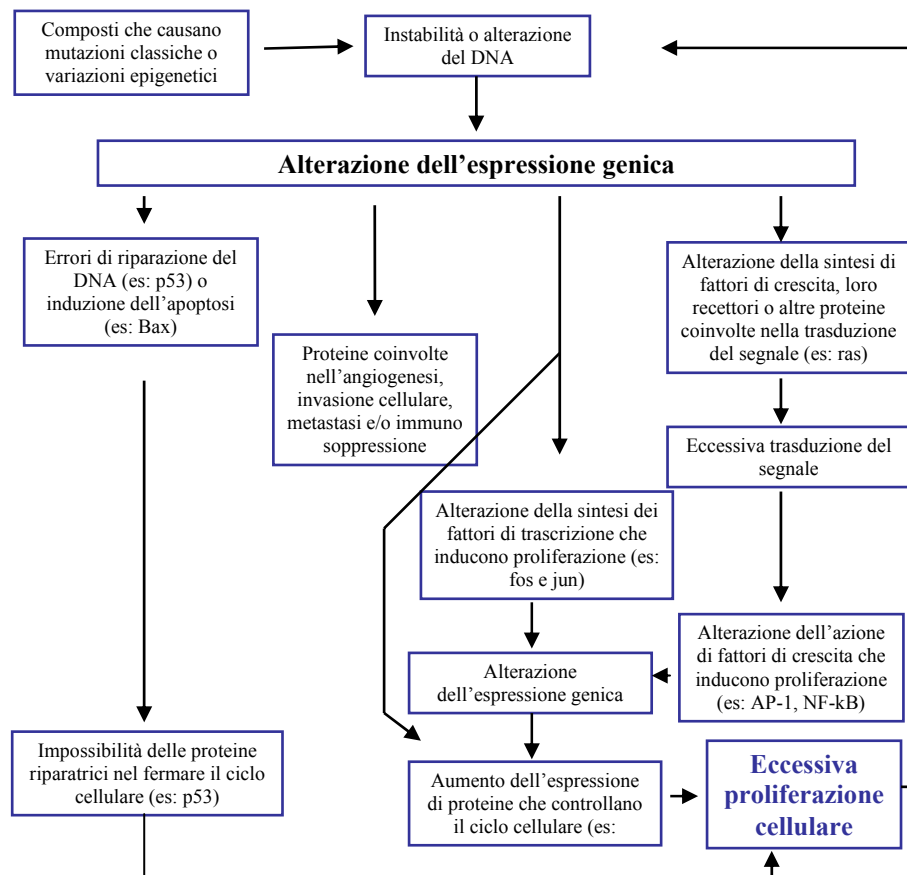


Figura 21. Segnali biochimici coinvolti nella proliferazione delle cellule tumorali.

alla quantità di reina presente nel colon in caso di sovradosaggio) determinava un aumento della proliferazione cellulare.

Tra i diversi pathway oggetto di alterazioni genetiche responsabili dell'insorgenza del cancro colon-rettale, la via delle chinasi MAP svolge un ruolo fondamentale. Le chinasi MAP (Mitogen-Activated Protein Kinases) rappresentano una famiglia di chinasi a serina e treonina ampiamente presenti nel citosol delle cellule eucariote. Questi enzimi sono connessi a recettori di membrana e modulano diverse attività biologiche all'interno della cellula, come la proliferazione ed il differenziamento cellulare, il processo apoptotico e meccanismi di regolazione complessi come ad esempio l'infiammazione. La cascata di attivazione degli enzimi delle chinasi MAP svolge un ruolo centrale nella trasduzione del segnale intracellulare, ovvero nella traduzione di segnali che hanno origine da una serie di stimoli extracellulari e che si traducono nell'attivazione di proto-oncogeni. Quest'ultimi, a livello

nucleare regolano la sintesi proteica di numerosi mediatori coinvolti nei più complessi processi cellulari. L'avvio di questa cascata enzimatica comporta l'attivazione sequenziale di almeno tre famiglie di chinasi diverse, ciascuna delle quali fosforila e quindi attiva la componente immediatamente a valle.

In particolar modo la MAP chinasi (MAPK) è costituita da enzimi che vengono fosforilati ed attivati dalla MAP chinasi chinasi (MAPKK), enzimi che a loro volta vengono fosforilati ed attivati dalla MAP chinasi chinasi chinasi (MAPKKK).

Quest'ultimi enzimi vengono a loro volta attivati in seguito all'interazione con nucleotidi guaninici, dotate di attività guanosinotrifosfato (GTP) intrinseca e coinvolti in numerosi fenomeni di attivazione di diversi tipi cellulari. Gli stimoli extracellulari in questione, come ad esempio, i fattori di crescita, attraverso la via delle chinasi MAP portano all'attivazione di un enzima ERK (Extracellular Receptor-

Activated Kinase), che rappresenta il componente prototipico della famiglia delle chinasi MAP. Una volta attivato, ERK fosforila una proteina denominata Elk, che a sua volta stimola la trascrizione di Fos, un componente del fattore di trascrizione noto con la sigla AP-1 (Figura 22). I pathway delle chinasi MAP regolano diverse patologie a livello cellulare tra cui i tumori. La via delle chinasi MAP, che coinvolge ERK, JNK e p38 regola fenomeni come la trasformazione neoplastica, l'apoptosi, l'invasività di un tumore ed infine la metastaticità dello stesso. Anche se i meccanismi molecolari alla base di molte risposte della cellula a stimoli esterni sono tutt'ora sconosciuti, è noto che le proteine ERK₁ ed ERK₂ fosforilate (e quindi attivate) stimolano la crescita cellulare e riducono la capacità della cellula di andare in apoptosi. Considerando il ruolo fondamentale delle chinasi MAP nella proliferazione cellulare, nel nostro studio siamo andati a valutare

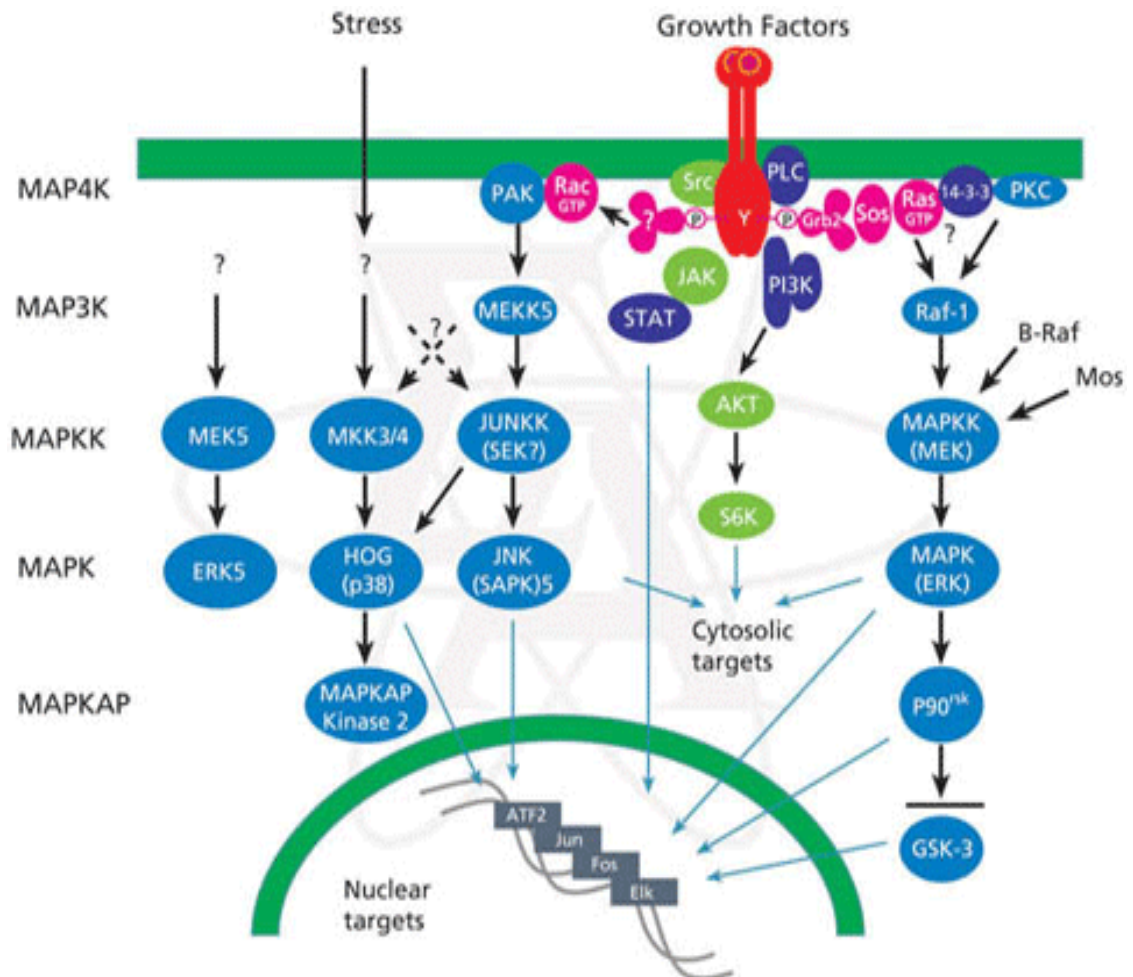


Figura 22. La via delle chinasi MAP.

l'effetto della reina sull'espressione delle proteine ERK₁ ed ERK₂ fosforilate. I nostri esperimenti hanno dimostrato che la reina alle concentrazioni di 0.1 e 1 µg/ml (concentrazioni che corrispondono alla quantità di reina presente nel colon in seguito all'assunzione di un dosaggio terapeutico di senna) riduceva l'espressione delle proteine ERK₁ ed ERK₂ fosforilate (e quindi attivate). La reina, alla concentrazione di 10 µg/ml, determinava un aumento dell'attivazione di ERK₁ ed ERK₂. Tali risultati sembrano, quindi, confermare che il meccanismo molecolare alla base dell'effetto modulatore della reina sulla proliferazione cellulare sia una azione diretta sulla via delle chinasi MAP.

È noto che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono implicate nell'eziologia di molte patologie, tra cui il cancro. Esse, insieme alle specie reattive dell'azoto (RNS) sono i radicali liberi maggiormente prodotti dal nostro organismo come difesa da agenti eziologici di natura

principalmente batterica. In particolar modo i ROS possono formarsi spontaneamente per reazione diretta dell'ossigeno molecolare con cationi (generalmente Fe^{+2}) non chelati presenti nel circolo sanguigno, nell'interstizio cellulare o nei fluidi intracellulari, oppure enzimaticamente, mediante appunto l'enzima *NADPH ossidasi*, per poi andare incontro ad una serie di reazioni biochimiche. Tra i ROS ricordiamo:

- l'anione superossido;
- il radicale idroperossido;
- il radicale ossidrilico;
- il perossido d'idrogeno.

Le specie reattive dell'azoto di maggior interesse sono, invece, l'ossido nitrico ed il perossinitrito, formato dalla reazione tra ossido nitrico e superossido.

Diversi studi sperimentali hanno dimostrato che il danno indotto al DNA da specie ossidanti rappresenta un importante fattore di mutagenicità e cancerogenicità (Loft e coll., 1996). Lo stress ossidativo indotto da perossido di idrogeno rappresenta una metodica ampiamente utilizzata per lo studio del danno al DNA (Zhu e coll., 2001; Gill e coll., 2004; Gill e coll., 2005).

Il saggio della cometa permette di quantificare il danno indotto al DNA da un agente genotossico, mediante la misurazione della lunghezza della coda che rappresenta il DNA frammentato e migrato per elettroforesi su gel di agarosio all'esterno del nucleo. Il DNA nucleare subisce una rottura singola o doppia, a livello di siti labili originatisi in seguito a trattamento con perossido d'idrogeno con conseguente srotolamento della doppia elica (Loft e coll., 1996; Stenkellner e coll., 2001; Verhagen e coll., 1997; Verhoeven e coll., 1997). Il DNA così srotolato, è in grado di migrare lontano dal nucleo centrale durante l'elettroforesi. Le cellule che hanno subito un danno al genoma, grazie alla colorazione con etidio bromuro, si presentano come comete in cui la

coda rappresenta il DNA frammentato e decondensato; le cellule sane, al contrario, si presentano con un nucleo più sferico e condensato (Figura 23). Nel presente studio è stato investigato il potenziale effetto genotossico e/o genoprotettivo (in caso di danno al DNA indotto da un agente genotossico, quale il perossido d'idrogeno) della reina. I nostri risultati hanno dimostrato la reina non era in grado di determinare danno al DNA (pertanto non possiede effetto genotossici), ma al contrario, riduceva il danno al DNA indotto da perossido d'idrogeno. Tali risultati sembrano suggerire un potenziale effetto genoprotettivo della reina.

Generalmente i radicali liberi sono causa di danni cellulari di varia natura, agendo principalmente sugli acidi grassi che formano i lipidi di membrana. La perossidazione lipidica è uno dei principali fattori responsabili delle alterazioni funzionali e strutturali della membrana cellulare dovute a stress ossidativo (Ames e coll., 1993; Cotelle e coll., 1996; Halliwell e coll., 2000; Brand-Williams e coll., 1995) e la formazione di malondialdeide a livello citosolico ne è la dimostrazione.

La malondialdeide è il principale prodotto aldeidico dei processi ossidativi di lipoperossidazione ed è in grado di determinare diverse

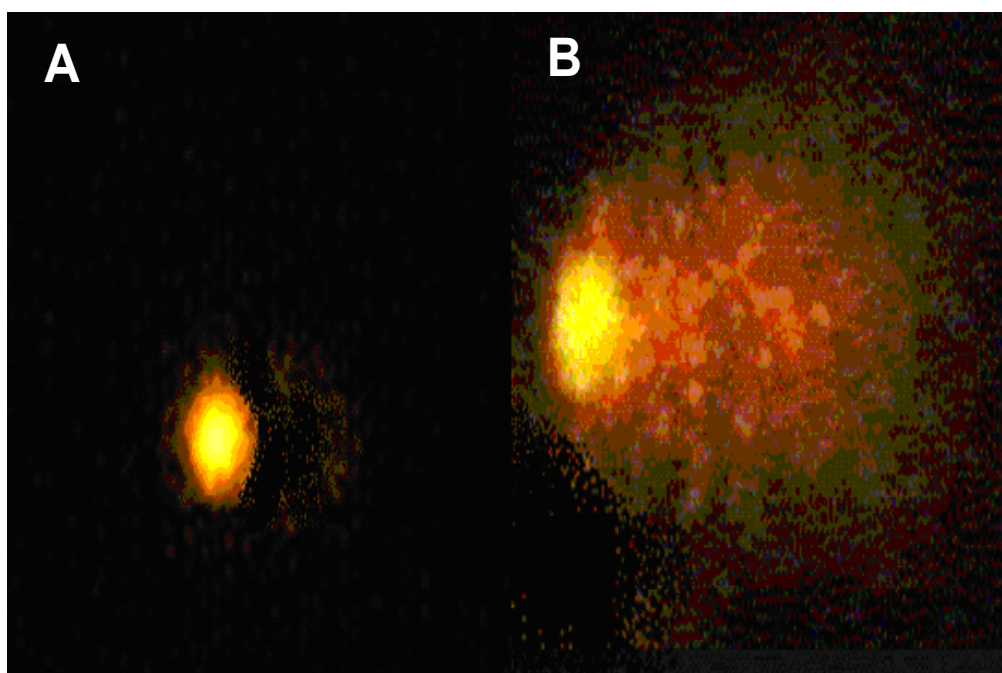


Figura 23. Saggio della cometa (Comet assay): esempio di cellula intatta (A) e di cellula danneggiata dal perossido di idrogeno (B).

patologie, tra cui il cancro.

Al fine di individuare un meccanismo d'azione alla base dell'effetto genoprotettivo della reina sul danno da perossido di idrogeno, nel nostro studio abbiamo determinato l'effetto della reina sui livelli citosolici di malondialdeide ed in generale sulle specie reagenti con l'acido tiobarbiturico (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBAR_S) (Janero e coll., 1990). Il trattamento delle cellule Caco-2 con perossido di idrogeno e solfato di Fe⁺², induceva un danno di tipo ossidativo con conseguente aumento dei livelli citosolici di malondialdeide (Kuo e coll., 1996; Kameota e coll., 1999; Fahey e coll., 1997). Un pre-trattamento con reina riduceva la formazione di malondialdeide, così da suggerire una componente antiossidante nell'effetto genoprotettivo della reina.

7.0 CONCLUSIONI

I nostri risultati indicano che la senna, un lassativo antrachinonico ampiamente utilizzato in terapia, nell'esplicare il suo effetto lassativo non induce danni cellulari e tissutali. Inoltre, sebbene la senna sia stata additata come possibile fattore a rischio della carcinogenesi del cancro colon rettale, i nostri studi *in vivo* escludono un'attività cancerogena della senna in quanto tale lassativo non induce la formazione di lesioni pre-neoplastiche e tumori; al contrario, la senna riduce l'incidenza di lesioni preneoplastiche e tumori intestinali indotti da un agente cancerogeno. Gli esperimenti *in vitro* confermano tali risultati in quanto hanno mostrato che la reina, il metabolita attivo della senna (a concentrazioni che corrispondono alla quantità di reina presente nel colon in seguito all'assunzione di un dosaggio terapeutico di senna), inibisce la proliferazione di cellule di adenocarcinoma intestinale umano.

Un'inibizione diretta dell'attivazione delle chinasi MAP sembra essere il meccanismo alla base dell'effetto antiproliferativo della senna.

I nostri risultati hanno, inoltre, mostrato che la reina era in grado di proteggere il DNA dall'azione nociva del perossido di idrogeno. Tale azione genoprotettiva è il risultato di un effetto antiossidante che si esplica attraverso l'inibizione della perossidazione lipidica.

I risultati da noi ottenuti identificano la reina come un nuovo potenziale farmaco antitumorale; pertanto tale composto potrebbe rappresentare un approccio alternativo per lo studio e lo sviluppo di farmaci ad azione antineoplastica.

8.0 BIBLIOGRAFIA

Ames B.N., Shigenaga M.K. & Hagen T.M. Oxidants, Antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 7915-7922

Associazione Italiana Registri Tumori (AIRT). I tumori in Italia. Rapporto 2006

Autore G, Capasso F, Mascolo N. Phenolphthalein stimulates the formation of histamine, 5-hydroxytryptamine and prostaglandin-like material by rat jejunum, ileum and colon. *Br J Pharmacol*. 1984; 81 (2): 347-9

Autore G, Caliendo G, Pepe A, Capasso F. Perfusion of rat colon with sennosides, rhein and rheinanthrone. Concentration-related histamine release. *Eur J Pharmacol*. 1990; 191 (1): 97-9

Autore G, Mascolo N, Capasso F. Laxatives and the production of kinins by rat colon. *Acta Physiol Hung*. 1990; 75:17-8

Beubler E, Juan H. Effect of ricinoleic acid and other laxatives on net water flux and prostaglaandin E release by the rat colon. *J Pharm Pharmacol.* 1979; 31 (10): 681-5

Beubler E, Kollar G. Stimulation of PGE₂ synthesis and water and electrolyte secretion by senna anthraquinones is inhibited by indomethacin. *J Pharm Pharmacol.* 1985; 37 (4): 248-51

Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogenesis: preliminary findings. *Cancer Lett.* 1987; 37 (2): 147-51

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., & Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie.* 1995; 28: 25-30

Capasso F, Mascolo N, Autore G, Duraccio MR. Effect of indomethacin on aloin and 1,8 dioxianthraquinone-induced production of prostaglandins in rat isolated colon. *Prostaglandins.* 1983; 26 (4): 557-62

Capasso F, Mascolo N, Autore G, Romano V. Laxatives and the production of autacoids by rat colon. *J Pharm Pharmacol.* 1986; 38 (8): 627-9

Capasso F., De Pasquale R., Grandolini G., Mascolo N. Farmacognosia. Ed. Springer 2000.

Cichewicz RH, Seeram NP, Zhang Y, Nair MG. Anti-tumor effects of novel anthraquinones from daylilies against human cancer cell lines. *Life Sci.* 2004; 74: 1791-1799

Cotelle N, Bernier JL, Catteau JP, Pommery J, Wallet JC, Gaydou EM. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20(1): 35-43.

Cummings JH. Laxative abuse. *Gut* . 1974; 15: 758-766

Dahlqvist A. Assay of intestinal disaccharidases. *Enzymol Biol Clin (Basel).* 1970; 11(1): 52-66

De Witte P, Dreessen M, Lemli J. The influence of some anthracene and diphenylmethane derivatives on water and electrolyte movement in rat colon. *Pharm Acta Helv.* 1991; 66 (3): 70-3

Fahey J.W., Zhang Y., Talalay P. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 10367-72

Frexinos J, Fioramonti J, Bueno L. Colonic response to eating. Regulation and anomalies. *Gastroenterol Clin Biol.* 1986; 10 (12): 837-40

Geboes K, Nijs G, Meng U, Geboes KP, Van Damme A. Effect of contact laxative on intestinal and colonic epithelial cell proliferation. *Pharmacology.* 1993; 47 (1): 187-95

Ghadially FN, Walley VM. Melanoses of the gastrointestinal tract. *Histopathology.* 1994; 25 (3): 197-207

Gill CIR, Haldar S, Porter S, Matthews S, Sullivan S, Coulter J, McGlynn H, Rowland IR. The effect of cruciferous and leguminous

sprouts on genotoxicity, *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 2004; 13: 1199-1205

Gill C, Boyd A, McDermott E, McCann M, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposito S, Montedoro GF, McGlynn H, Rowland I. Potential anti-cancer effects of virgin olive oil phenols on colorectal carcinogenesis models *in vitro*. *Int J. Cancer* 2005; 117: 1-7

Halliwell B., Clement M.V. & Long L.H. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 2000; 486 10-13

Hardcastle JD, Wilkins JL. The action of sennosides and related compound on human colon and rectum. *Gut* 1970; 11 (12): 1038-42

Hattori M, Namba T, Akao T, Kobashi K. Metabolism of human intestinal bacteria. *Pharmacology* 1988; 36 (1): 172-9

Janero D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990; 9: 515-540

Kameota S., Leavitt P., Chang C. & Kuo S.M. Expression of antioxidant proteins in human intestinal Caco-2 cells treated with dietary flavonoids. *Cancer Lett.* 1999; 146: 161-167

Kleibeuker JH, Cats A, Zwart N, Mulder NH, Hardonk MJ, de Vries EG. Excessively high cell proliferation in sigmoid colon after an oral purge with anthraquinone glycosides. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87(6): 452-3

Kobashi K, Nishimura T, Kusaka M, Hattori M, Namba T. Metabolism of sennosides by human intestinal bacteria. *Planta Med.* 1980; 40 (3): 225-36

Kuo S.M. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 1996; 110: 41-48

Laky B, Knasmuller S, Gminski R, Mersch-Sundermann V, Scharf G, Verkerk R, Freywald C, Uhl M, Kassie F. Protective effects of Brussels sprouts towards B[a]P-induced DNA damage: a model study with the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/Hep G2 assay. *Food Chem Toxicol.* 2002; 40(8):1077-83

Leng-Peschlow E. Inhibition of intestinal water and electrolyte absorption by senna derivatives in rats. *J Pharm Pharmacol.* 1980; 32 (5): 330-5

Leng-Peschlow E. Dual effect of orally administered sennosides on large intestine transit and fluid absorption in the rat. *J Pharm Pharmacol* 1986; 38: 606-10

Lin S, Li JJ, Fujii M, Hou DX. Rhein inhibits TPA-induced activator protein-1 activation and cell transformation by blocking the JNK-dependent pathway. *Int J Onc.* 2003; 22(4): 829-33

Lin S, Li JJ, Fujii M, Hou DX. Rhein induces apoptosis in HL-60 cells via reactive oxygen species-independent mitochondrial death pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003; 418 (2): 99-107

Lipkin M, Deschner E. Early proliferative changes in intestinal cells. *Cancer Res.* 1976; 36: 2665-8

Loft S, Poulsen H E. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.* 1996; 74: 297-312

Lyden-Sokolowski A, Nilsson A, Sjoberg P. Two years carcinogenicity study with Sennosides in the rat: Emphasis on gastrointestinal alterations. *Pharmacol.* 1993; 47 (Suppl. 1): 209-215

Mascolo N, mereto E, Borrelli F, Orsi P, Sini D, Izzo AA, Massa B, Boggio M, Capasso F. Does senna extract promote growth of aberrant crypt foci and malignant tumors in rat colon? *Dig Dis Sci.* 1999; 44 (11): 2226-30

Mc Lellan EA, Medline A, Bird RP. Dose response and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions in rat colon. *Carcinogenesis.* 1991; 12 (11): 2093-8

Mc Lellan EA, Medline A, Bird RP. Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions. *Cancer Res.* 1991; 51 (19): 5270-4

Mitchell JM, Mengs U, McPherson S, Zijlstra, Dettmar P, Gregson R, Tigner JC. An oral carcinogenicity and toxicity study of senna (Tinnevelly senna fruits) in the rat. *Arch Toxicol* 2006; 80: 34-44

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65 (1-2): 55-63

Nijs G, de Witte P, Van Hoestenbergh A, Geboes K, Lemli J. Direct and indirect evidence for the involvement of prostaglandins in the secretagogue action of rhein anthrone in the small intestine. *Acta Gastroenterol Belg*. 1991; 54 (2): 184-90

Nijs G, de Witte P, Geboes K, Lemli J. Influence of rhein anthrone and rhein on small intestine transit rate in rats: evidence of prostaglandin mediation. *Eur J Pharmacol*. 1992; 218 (2-3): 199-203

Nijs G, de Witte P, Geboes K, Meulemans A, Schuurkes J, Lemli J. Influence of rhein anthrone on peristaltic reflex of guinea pig isolated ileum: Involvement of prostaglandins. *Br J Pharmacol*. 1993; 108: 269-273

Percy WH, Burton MB, Fallick F, Burakoff R. A comparison *in vitro* of human and rabbit distal colonic muscle responses to inflammatory mediators. *Gastroenterology*. 1990; 99 (5):1324-32.

Redlak MJ, Dennis MS, Miller TA. Apoptosis is a major mechanism of deoxycholate-induced gastric mucosal cell death.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003; 285 (5): G870-9

Riemann JF. The colon in laxative abuse. *Fortschr Med.* 1980; 98 (13):456-61

Riemann JF, Schmidt H, Zimmermann W. The fine structure of colonic submucosal nerves in patients with chronic laxative abuse. *Scand J Gastroenterol.* 1980; 15(6):761-8

Roncucci L, Stamp D, Medline A, Cullen JB, Bruce WR. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol.* 1991; 22 (3): 287-94

Siegers CP. Anthranoid laxatives and colorectal cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 1992; 13: 229-231

Siegers CP, Von Hertzberg-Lottin E, Otte M, Scheneider B. Anthranoid laxative abuse – a risk for colorectal cancer? *Gut.* 1993; 34; 1099-1101

Smith B. Effect of irritant purgatives on the myenteric plexus in man and the mouse. *Gut*. 1968; 9 (2): 139-43

Speare GS. Melanosis coli: experimental observations on its production and elimination in 23 cases. *Am J Surg* 1951; 82: 631-7

Staumont G, Frexinos J, Fioramonti J, Bueno L. Sennosides and human colonic motility. *Pharmacology*. 1988; 36 (1) :49-56

Steer HW, Colin-Jones DG. Melanosis coli: studies of the toxic effects of irritant purgatives. *J Pathol*. 1975; 115 (4): 199-205

Stenkellner H., Rabot S., Freymald C. Effects of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutat Res*. 2001 ; 480: 285-97

Stopera SA, Bird RP. Expression of ras oncogene mRNA and protein in aberrant crypt foci. *Carcinogenesis*. 1992; 13 (10): 1863-8

Stopera SA, Davie JR, Bird RP. Colonic aberrant crypt foci are associated with increased expression of c-fos: the possible rule of

modified c-fos expression in pre-neoplastic lesions in colon cancer.

Carcinogenesis. 1992; 13 (4): 573-8

Toyoda K, Nishikawa A, Furukawa F, Kawanishi T, Hayashi Y, Takahashi M. Cell proliferation induced by laxatives and related compounds in the rat intestine. *Cancer Lett*. 1994; 83 (1-2): 43-9

Van der Ohe MR, Camilleri M, Kvols LK, Thomforde GM. Motor dysfunction of the small bowel and colon in patients with the carcinoid syndrome and diarrhea. *N Engl J Med*..1993; 329 (15):1073-8

van Gorkom BA, Karrenbeld A, van Der Sluis T, Koudstaal J, de Vries EG, Kleibeuker JH. Influence of a highly purified senna extract on colonic epithelium. *Digestion*. 2000; 61(2):113-20

Verhagen H., de Vries A., Nijhoff W.A. Effects of Brussel sprouts on oxidative DNA damage in man. *Cancer Lett*. 1997; 114: 127-30

Verhoeven D.T., Verhagen H., Goldbohm R.A., Van den Brandt P.A., Van Poppel G.A. Review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem-Biol. Interact*. 1997: 103: 79-129

Wanitschke R, Karbach U. Influence of rhein on rat colonic Na⁺,K⁺-ATPase and permeability *in vitro*. *Pharmacology*. 1988; 36 (1): 98-103

Westendorf J. Pharmakologische und toxicologische Bewertung von Anthranoiden. *Pharm Z*. 1993; 138: 3891-3902

Yagi T, Miyawaki Y, Yamauchi K, Kuwano S. Involvement of prostaglandin E-like material in the propulsive action of rhein anthrone, the intraluminal active metabolite of Sennosides A and B in mice. *J Pharm Pharmacol*. 1988; 40: 27-30

Yang K, Fan K, Mengs U, Lipkin M. Effects of sennosides and nonanthranoid laxatives on cytochemistry of epithelial cells in rat colon. *Pharmacology*. 1993; 47 (1): 196-204

Zhu C. Y., Loft S. Effects of Brussels sprouts extracts on hydrogen peroxide-induced DNA strand breaks in human lymphocytes. *Food Chem. Toxicol*. 2001; 39: 1191-1197