



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Αντιοξειδωτική, οιστρογονική και μεταγραφική δράση
επιλεγμένων ενώσεων από φυτά της ελληνικής χλωρίδας**

**Antioxidant, estrogenic and transcriptional activity of selective
compounds from plants of the Greek flora**

Επιμελήθηκε η φοιτήτρια: Αλεξάνδρα Βαβουλίδου

Υπεύθυνη Καθηγήτρια: Ψαρρά Άννα –Μαρία

Επιβλέπων καθηγητής : Αλέξης Ν. Μιχαήλ

Λάρισα 2016

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ).

Υπεύθυνοι Καθηγητές

Αλέξης Μιχαήλ, Ερευνητής Α΄, Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, ΕΙΕ

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας, ΤΒΒ, ΠΘ

Τριμελής επιτροπή

Αλέξης Μιχαήλ, Ερευνητής Α΄ στο ΕΙΕ

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας, ΤΒΒ, ΠΘ

Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας, ΤΒΒ, ΠΘ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ	6
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 ΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΗ - ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ: ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	7
1.2 ΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΙΑΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	8
1.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ	8
1.4 ΤΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΩΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	9
1.5 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ.....	10
1.6 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ.....	13
1.7 ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΙ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ (SERMS).....	14
1.8 ΦΥΤΟ-ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ.....	14
1.9 ΣΚΟΠΟΣ	15
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ.....	17
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ	17
2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
2.1.1 Υλικά.....	18
2.1.2 Κυτταρικές σειρές	19
2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	20
2.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων	20
2.2.2 Ανακαλλιέργεια κυττάρων	21
2.2.3 Προετοιμασία των ενώσεων.....	22
2.2.4 Προσδιορισμός αριθμού ζώντων και νεκρών κυττάρων με χρήση μικροσκοπίου.....	23
2.2.5 Προσδιορισμός της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στα κύτταρα Ishikawa.....	23
2.2.6 Προσδιορισμός της έκφρασης Λουσιφεράσης στα κύτταρα MCF-7:D5L και HEK:ERβ	24
2.2.7 Προσδιορισμός του πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων HT22 .	25
2.2.8 Στατιστική ανάλυση	26

2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ –ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	27
2.3.1 Αξιολόγηση της νευροπροστατευτικής αντιοξειδωτικής δράσης	27
2.3.2 Αξιολόγηση οιστρογονικής δράσης φυσικών και συνθετικών ενώσεων -Επαγωγή της Αλκαλικής Φωσφατάσης στα Ishikawa κύτταρα	32
2.3.3 Αξιολόγηση αντι-οιστρογονικής δράσης επιλεγμένων ενώσεων φυσικών και συνθετικών - Καταστολή της επαγωγής της Αλκαλικής Φωσφατάσης στα Ishikawa κύτταρα	46
2.3.4 Αξιολόγηση της δράσης των ενώσεων μέσω των Οιστρογονικών Υποδοχέων ERα και ERβ.....	48
3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	69
4. Βιβλιογραφία.....	71

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ερευνητική αυτή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας (ΕΜΕ) του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (ΙΒΦΧΒ) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ), διευθυντής ερευνών του οποίου είναι ο Δρ. Μιχάλης Ν. Αλέξης προς τον οποίο εκφράζω τις θερμές ευχαριστίες για την συμπαράσταση, το σχεδιασμό της ερευνητικής αυτής εργασίας καθώς και για τις πολύτιμες υποδείξεις του.

Επίσης ευχαριστώ, την επίκουρη καθηγήτρια κ. Άννα-Μαρία Ψαρρά, για την πολύτιμη συμβολή της στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ πραγματικά τη Δρ. Αγγελική Μελίγκοβα για την καθοδήγηση και τη βοήθεια που μου παρείχε καθώς και για την υπομονή της καθ' όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας.

Τέλος, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου της Μοριακής Ενδοκρινολογίας για την βοήθειά τους με οποιονδήποτε τρόπο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η συμβολή των οιστρογόνων τόσο στην προστασία από εκφυλιστικά νοσήματα του ΚΝΣ όσο και στη βελτίωση των εμμηνοπαυσιακών συμπτωμάτων έχει τεκμηριωθεί. Δεδομένης της αρνητικής συμβολής των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στη βιωσιμότητα των νευρικών κυττάρων και της πιθανότητας ενώσεις που δρουν μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων (ER) αλλά έχουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από την οιστραδιόλη να προστατεύουν καλλίτερα τα νευρικά κύτταρα, αναζητήθηκαν ενώσεις που συνδυάζουν νευροπροστατευτική αντιοξειδωτική δράση και δράση μέσω ER. Αρχικά αξιοποιήθηκε η στενή σχέση μεταξύ οιστρογονικής – αντιοιστρογονικής δράσης και δράσης μέσω ERα και ERβ προκειμένου να εντοπιστούν αγωνιστές ή/και ανταγωνιστές των δύο υποδοχέων. Μετρήθηκε η οιστρογονική– αντιοιστρογονική δράση και η δράση αγωνιστή ή/και ανταγωνιστή των ER συνολικά 53 φυσικών και 11 συνθετικών ενώσεων. Διαπιστώθηκε ότι από τις 15 που βρέθηκε να έχουν ασθενική έως ισχυρή οιστρογονική ή αντιοιστρογονική δράση, οι 8 ήταν μερικοί ή ισχυροί αγωνιστές του ERα και του ERβ, οι 5 ισχυροί ή μερικοί αγωνιστές του ERα αλλά ασθενικοί ή όχι αγωνιστές ERβ και 2 πολύ ασθενικοί αγωνιστές και των δυο ER. Ισχυρή νευροπροστατευτική αντιοξειδωτική δράση εμφάνισαν οι 2 από τις 8 πρώτες (καμπερόλη και OSC-19) και η μια από τις δυο τελευταίες (καμπερόλη από εκχύλισμα Ράμνου). Η καμπερόλη και η OSC-19 ήσαν οι μόνες από τις 15 ενώσεις που εμφανίζουν ισχυρό αγωνισμό μέσω ERβ και μερικό μέσω ERα. Αυτό υποδηλώνει πως ο συνδυασμός αντιοξειδωτικής και επιλεκτικής αγωνιστικής δράσης μέσω ERβ είναι πιθανό να προσφέρει αυξημένη νευροπροστασία, πιθανόν μέσω του μιτοχονδριακού ERβ.

ABSTRACT

The contribution of estrogens in the protection against degenerative diseases of the CNS and the improvement of menopausal symptoms has been established. Due to the negative contribution of ROS in the viability of nerve cells and the likelihood that there are some compounds that can act through estrogen receptors (ER) but have stronger antioxidant activity than estradiol to protect better the nerve cells, we searched compounds that combine neuroprotective antioxidant effect and act through ER. Initially we utilize the close relationship between estrogen - anti-estrogen action and action by ER α and ER β , to identify agonists and / or antagonists of both receptors. We evaluated the estrogenic- non-estrogenic effect and the agonist and/or antagonist action on ERs, of 57 natural and 11 synthetic compounds. It was found that out of 15 compounds that were found to have weak to strong estrogenic or anti-estrogenic action, eight were partial or full agonists of ER α and ER β , 5 were full or partial agonists of ER α but weak or no agonists of ER β and 2 were very weak agonists of both ERs. Two of the first 8 (kaempferol and OSC -19) and one of the last two (kaempferol from Ramnos extract) showed strong neuroprotective antioxidant activity. Kaempferol and OSC-19 were the only compounds out of the 15 that exhibited strong agonism through ER β and partial via ER α . This suggests that the combination of antioxidant and selective agonist action via ER β is likely to offer enhanced neuroprotection , possibly through mitochondrial ER β .

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΗ - ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ: ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Στην εποχή μας οι γυναίκες περνούν το ένα τρίτο της ζωής τους στο στάδιο της εμμηνοπαυσιακής μετάβασης. Με την προοδευτική γήρανση του πληθυσμού, το ποσοστό των γυναικών που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση αναμένεται να συνεχίσει να αυξάνεται. Έτσι η εύρεση νέων εναλλακτικών για τη βελτίωση της συνολικής ποιότητας ζωής των γυναικών γίνεται ολοένα και σημαντικότερος στόχος. Κατά το στάδιο της εμμηνοπαυσιακής μετάβασης τα επίπεδα των οιστρογόνων μειώνονται δραματικά και η κλινική εικόνα αυτής της μείωσης περιλαμβάνει πολλά σημαντικά σωματικά και ψυχικά συμπτώματα όπως καρδιαγγειακά προβλήματα, ιστολογικές αλλαγές σε ιστούς ευαίσθητους στη δράση των οιστρογόνων, κολπική ατροφία, αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης οστεοπόρωσης, αϋπνία, διαταραχές της διάθεσης και εξάψεις. Τα συμπτώματα αυτά μπορούν να βελτιωθούν με τη θεραπεία οιστρογόνων. Ωστόσο τα τελευταία 10 χρόνια υπάρχει μια δραματική μείωση του ενθουσιασμού όσον αφορά την ορμονοθεραπεία, παρά την υψηλή αποτελεσματικότητά της συγκριτικά με άλλες θεραπείες. Οι ανησυχίες σχετικά με τον κίνδυνο της έκθεσης σε οιστρογόνα κατά την ορμονοθεραπεία έχουν αυξήσει την αναζήτηση μη-στεροειδών οιστρογονικών μιμητικών παραγόντων όπως είναι τα φυτοοιστρογόνα, ως εναλλακτική λύση για την πρόληψη ή την μείωση των εμμηνοπαυσιακών συμπτωμάτων. Υπάρχουν όλο και περισσότερα στοιχεία που υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητα των φυτοοιστρογόνων στη μείωση των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης. Όμως καθώς η δημοτικότητα και η διαθεσιμότητά τους αυξάνονται, μεγαλώνουν και οι ανησυχίες όσον αφορά την ασφάλεια της μακροχρόνιας έκθεσης σε επίπεδα που υπερβαίνουν τα φυσιολογικά. Έτσι, είναι ζωτικής σημασίας η αξιολόγηση των δεδομένων που αφορούν τόσο την αποτελεσματικότητα όσο και την ασφάλεια των θεραπειών με φυτοοιστρογόνα.

1.2 ΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΙΑΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Τα συμπτώματα που σχετίζονται με την εμμηνόπαυση και επηρεάζουν τη συναισθηματική και κοινωνική ζωή των γυναικών, είναι αποτέλεσμα ορμονικών αλλαγών και κυρίως της μείωσης των οιστρογόνων. Η αύξηση του βάρους, η κούραση και οι εξάψεις αποτελούν σημαντικά συμπτώματα καθώς επίσης και κλινικές καταστάσεις όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις και η οστεοπόρωση. Με σκοπό να ξεπεραστούν ή να μετριαστούν τα συμπτώματα αυτά εφαρμόζεται θεραπεία με τη χρήση οιστρογόνων σε γυναίκες που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση ή σε προεμμηνοπαυσιακό στάδιο. Η ορμονοθεραπεία είναι η πιο αποτελεσματική θεραπεία για τη μείωση της συχνότητας και της έντασης συμπτωμάτων όπως οι εξάψεις καθώς επίσης εμφανίζει θετικά αποτελέσματα στην πρόληψη της οστεοπόρωσης και των καρδιαγγειακών παθήσεων. Παρά τα παραπάνω θετικά, περισσότερες από το 80% των γυναικών δεν είναι πρόθυμες ή δεν μπορούν να δεχτούν αυτή τη θεραπεία για διάφορους προσωπικούς ή ιατρικούς λόγους, όπως ο φόβος για εμφάνιση καρκίνου και οι ηπατικές παθήσεις. Για χρόνια πίστευαν πως οι καρδιαγγειακές παθήσεις προλαμβάνονται στις γυναίκες που ακολουθούν ορμονοθεραπεία. Ωστόσο, αποτελέσματα της Αμερικανικής Μελέτης Women's Health Initiative (WHI) έδειξαν ότι η θεραπεία με οιστρογόνα εμφάνιζε αυξημένο ποσοστό εμφράγματος και είχε αρνητικές επιδράσεις στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, όπως αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού ή/και καρκίνου του ενδομητρίου (Chlebowski RT et al., 2010).

1.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Τα οιστρογόνα είναι στεροειδής ορμόνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την δημιουργία και τη ρύθμιση του έμμηνου κύκλου. Η 17β-οιστραδιόλη (E2, οιστραδιόλη), η οποία παράγεται στις ωοθήκες είναι το κύριο οιστρογόνο και έχει τη μεγαλύτερη συγγένεια για τους υποδοχείς των οιστρογόνων. Στις γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση, τα επίπεδα της οιστραδιόλης στην κυκλοφορία κυμαίνονται από 40 έως 200–400 pg/mL κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου. Η μετάβαση στην εμμηνόπαυση οδηγεί σε δραστική μείωση των επιπέδων οιστρογόνων, με την οιστραδιόλη να πέφτει σε επίπεδα χαμηλότερα από 20 pg/mL. Τα οιστρογόνα αποτελούν σημαντικότερους για τη φυσιολογία του οργανισμού παράγοντες. Ο πρωταρχικός τους ρόλος συνίσταται στην ανάπτυξη,

διαφοροποίηση και λειτουργία των ιστών του αναπαραγωγικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των μαστών, της μήτρας, του κόλπου και των ωοθηκών στις γυναίκες και των όρχεων, της επιδιδυμίδας και του προστάτη στους άνδρες. Επιπλέον, συμβάλλουν στη διατήρηση της οστικής μάζας, στην παραγωγή παραγόντων της πήξης και άλλων πρωτεϊνών του ορού καθώς και στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων και του τόνου των αγγείων. Στον εγκέφαλο επάγουν την απελευθέρωση των γοναδοτροφινών, ρυθμίζουν την ψυχική διάθεση και συμπεριφορά και, πιθανά, επιβραδύνουν την έναρξη και εξέλιξη της νόσου του Alzheimer. Τα οιστρογόνα θεωρείται ότι δρουν ως νευροπροστατευτικοί παράγοντες και η έλλειψή τους κατά τη διάρκεια της εμμηνόπαυσης έχει συσχετιστεί με την μειωμένη διανοητική λειτουργία και την απώλεια μνήμης.

1.4 ΤΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΩΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικά, ασταθή μόρια, τα οποία φέρουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και είναι δυνατόν να βρίσκονται σε οξειδωμένη ή ανηγμένη μορφή. Αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και παίζουν διττό ρόλο: υπό συγκεκριμένες συνθήκες είναι ευεργετικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς και υπό άλλες συνθήκες βλαπτικές (Valko M et al., 2006). Ένα παράδειγμα είναι το γλουταμινικό οξύ που αποτελεί τον κύριο νευροδιαβιβαστή στον εγκέφαλο και ένα από τα πιο άφθονα ελεύθερα αμινοξέα. Εκτός από την συμμετοχή του στην πρωτεϊνολύση, το γλουταμινικό είναι ένα μόριο με σύνθετες βιολογικές δράσεις και ένα μεγάλο αριθμό μεμβρανικών υποδοχέων και μεταφορέων. Σε υψηλές συγκεντρώσεις όμως μπορεί να είναι τοξικό για τα νευρικά κύτταρα. Για τον λόγο αυτό οι εξωκυτταρικές συγκεντρώσεις του διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα από μια οικογένεια μεταφορέων γλουταμινικού οξέως.

Όταν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών αυξηθούν ανεξέλεγκτα καθίστανται ιδιαίτερα τοξικές για τα κύτταρα, οδηγώντας τα στο οξειδωτικό στρες. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με συστατικά των κυττάρων, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA και να τους προκαλέσουν οξειδώσεις (Andersen JK, 2004). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει διάφορα ενδογενή συστήματα άμυνας έναντι των ελευθέρων ριζών. Τα συστήματα αυτά περιλαμβάνουν ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα (όπως είναι η καταλάση, η αναγωγάση του γλουταθείου, η υπεροξειδάση του γλουταθείου), ενδογενείς παράγοντες (όπως γλουταθείο, ουρικό οξύ, χολερυθρίνη, συνένζυμο Q) (Mate JM

et al., 1999) και διατροφικούς ή εξωγενείς παράγοντες (όπως πολυφαινόλες, καροτενοειδή, βιταμίνη C, βιταμίνη E, σελήνιο) (Rao LG , 2006).

Όταν οι κυτταρικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δεν είναι ικανοί να κρατήσουν τα επίπεδα των ελεύθερων ριζών κάτω από το ανώτατο όριο τοξικότητάς τους ή όταν υπάρχει υψηλή παραγωγή ελεύθερων ριζών εμφανίζεται το οξειδωτικό στρες (Schulz et al., 2000). Το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με την εμφάνιση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων. Οι βλάβες λόγω οξειδωτικού στρες και η πρόοδος των διάφορων ασθενειών μπορεί να επιβραδυνθεί με τη χορήγηση εξωγενών προστατευτικών ενώσεων, οι οποίες δρουν ως αλιευτές ελεύθερων ριζών (Free Radical Scavengers), αναστολείς σχηματισμού ελεύθερων ριζών οξυγόνου κ.α.

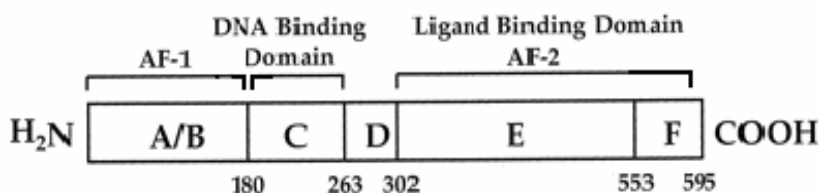
Τα οιστρογόνα θεωρείται ότι δρουν ως νευροπροστατευτικοί παράγοντες στον ιππόκαμπο κατά την διαδικασία της γήρανσης. Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα οιστρογόνα ενδέχεται να έχουν προστατευτικό ρόλο δεν έχουν πλήρως κατανοηθεί. Η οιστραδιόλη εκτός από το ότι μπορεί να δρα η ίδια ως αντιοξειδωτικό, μπορεί επίσης να ενεργοποιεί τη μεταγραφή νευροπροστατευτικών γονιδίων μέσω του ER άμεσα ή έμμεσα, μέσω αλληλεπίδρασης της ίδιας ή των μεταβολιτών της, με τον υποδοχέα και μέσω αυτού με διάφορα ενδοκυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος (Behl, 2003). Όμως, το εάν οι υποδοχείς οιστρογόνων εμπλέκονται στο μηχανισμό της νευροπροστασίας καθώς και το ποιος τύπος ER διαμεσολαβεί την νευροπροστατευτική δράση των οιστρογόνων είναι ακόμα αντικείμενο μελέτης.

1.5 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Οι ενδοκυτταρικές επιδράσεις των οιστρογόνων διαμεσολαβούνται μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων (ER) που ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων με τη σύνδεση σε συγκεκριμένες ακολουθίες στο DNA που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης σε οιστρογόνα (ERE). Υπάρχουν δυο οιστρογονικοί υποδοχείς (Estrogen Receptors, ERs), ERα και ERβ, στους οποίους προσδένονται τα οιστρογόνα και εκδηλώνουν την βιολογική δράση τους. Οι υποδοχείς αυτοί ανήκουν στην υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, η δράση πολλών από τους οποίους ρυθμίζεται από πρόσδεμα (Heldring N et al. ,

2007). Αρχικά, ήταν γνωστός μόνο ένας από τους οιστρογονικούς υποδοχείς, ο οιστρογονικός υποδοχέας τύπου άλφα (Estrogen Receptor α , ER α). Το 1996 ταυτοποιήθηκε ένας δεύτερος οιστρογονικός υποδοχέας, γνωστός σήμερα ως οιστρογονικός υποδοχέας τύπου β (Estrogen Receptor β , ER β) (Kuiper, 1996 – Moore, 1998). Οι ER α και ER β δρουν κυρίως ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, έχουν τη δομή που είναι χαρακτηριστική για όλα τα μέλη της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων και συγκροτούνται από διακριτές περιοχές με εξειδικευμένες λειτουργίες.

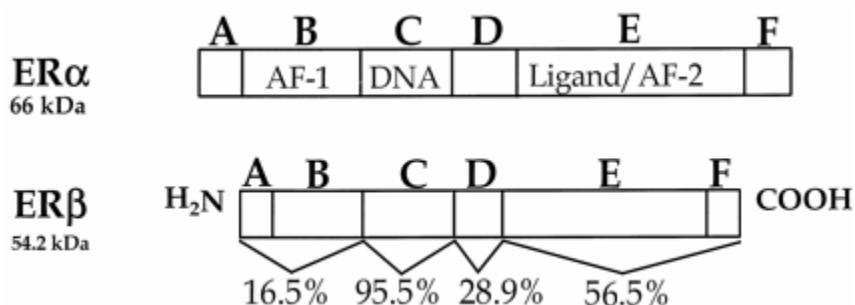
Ο ER α ταυτοποιήθηκε το 1966, αποτελείται από 595 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 66 kDa, και το γονίδιό του εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6, στη θέση 6q25.1 (εικόνα A). Ο ER α περιλαμβάνει 6 διαφορετικά, από λειτουργική άποψη, τμήματα. Το τμήμα A βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα και μαζί με το γειτονικό του B τμήμα συνιστούν την αμινοτελική λειτουργία ενεργοποίησης 1 (Activation Function1, AF-1). Το τμήμα C συνιστά την περιοχή σύνδεσης του υποδοχέα με το DNA ενώ το τμήμα D (hinge) προσφέρει ευκινησία στον υποδοχέα ανάμεσα στην περιοχή δέσμευσης ορμόνης και στην περιοχή σύνδεσης στο DNA και συμβάλλει στην ενδοπυρηνική εντόπιση του υποδοχέα. Τα τμήματα E και F περιλαμβάνουν την περιοχή σύνδεσης με τον ειδικό προσδέτη (ligand), την περιοχή που εμπλέκεται στο σχηματισμό ομοδιμερών ή ετεροδιμερών με τον ER β , καθώς και την καρβοξυτελική λειτουργία ενεργοποίησης 2 (AF-2).



Εικόνα A: Σχηματική παράσταση του ER α .

Ο υπότυπος ER β ανακαλύφθηκε το 1996,13 και η δομή του είναι παρόμοια με εκείνη του ER α , με βραχύτερα όμως τμήματα A/B και F. Αποτελείται από 530 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 54,2 kDa, και το γονίδιό του εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14q.14Aν και η συνολική ομολογία σε αμινοξέα μεταξύ των δύο τύπων είναι 47%, ωστόσο είναι ιδιαίτερα υψηλή στην περιοχή της σύνδεσης των

υποδοχέων με το DNA (C) και στην περιοχή της σύνδεσης με την ορμόνη (E,95,5% και 56,5%, αντίστοιχα).



Εικόνα Β: Σχηματική παράσταση του ERα και του ERβ.

Η περιοχή C περιέχει δύο δακτυλίους ψευδαργύρου (zinc fingers) οι οποίοι εμπλέκονται στην πρόσδεση του υποδοχέα σε ειδική αλληλουχία του DNA γνωστή ως στοιχείο απόκρισης στα οιστρογόνα (Estrogen Responsive Element, ERE). Ως συνέπεια της υψηλής ομολογίας τους στην περιοχή C, οι δύο υποδοχείς προσδένονται στο ERE και σε ανάλογες περιοχές του DNA (Pettersson et al., 1997 –Pace et al., 1997), με παρόμοια χημική συγγένεια. Επίσης, οι δακτύλιοι ψευδαργύρου εμπλέκονται στο διμερισμό του υποδοχέα (Luisi et al., 1991).

Η περιοχή A/B των ERα και ERβ έχει πολύ χαμηλή ομολογία της τάξης του 16,5% και περιέχει μια μεταγραφική ενεργότητα, AF-1 (Toraetal., 1989 –Berryetal., 1990 –Krausetal, 1995 –McInerney and Katzenellenbogen, 1996) η οποία λειτουργεί ανεξάρτητα από την πρόσδεση ορμόνης, αν και η δράση της εμποδίζεται από ανταγωνιστές που οδηγούν στην αποικοδόμηση του ER, όπως το ICI. Επίσης η ενεργότητα AF-1 μπορεί να ρυθμιστεί και με φωσφορυλίωση από αυξητικούς παράγοντες (Kato et al, 1995).Οι διαφορές της αμινοτελικής περιοχής των δύο υποδοχέων εξηγούν τη διαφορά μεταξύ τους όσον αφορά τη δράση παρουσία ορισμένων οιστρογόνων και αντιοιστρογόνων. Συνθετικά αντιοιστρογόνα όπως η ταμοξιφαίνη επάγουν τον μερικό αγωνισμό γονιδίων αναφοράς εξαρτώμενων από στοιχεία ERE παρουσία του ERα αλλά πλήρη ανταγωνισμό παρουσία του ERβ (Tremblay et al., 1997-Barkhem et al., 1998 –McInerney et al., 1998). Στον ERα, τα μέρη της AF-1

που απαιτούνται για να διαμεσολαβήσουν τον αγωνισμό της E2 ή τον μερικό αγωνισμό της ταμοξιφαίνης είναι διαφορετικά (McInerney and Katzenellenbogen, 1996), και λείπουν από τον ERβ (McInerney et al., 1998).

Το καρβοξυτελικό άκρο (E, F) περιέχει μια σημαντική μεταγραφική ενεργότητα (AF-2), η ενεργοποίηση της οποίας εξαρτάται από την πρόσδεση του αγωνιστή καθώς επίσης και τμήματα που είναι υπεύθυνα για το διμερισμό. Μόνο η πρόσδεση του αγωνιστή έχει ως αποτέλεσμα μια αλλαγή στη διαμόρφωση του υποδοχέα η οποία παρέχει μια επιφάνεια αλληλεπίδρασης για τους μεταγραφικούς παράγοντες ενίσχυσης, γεγονός που συνιστά βάση της ενεργότητας AF-2. Οι ανταγωνιστές αποτυγχάνουν να προκαλέσουν αυτή την αλλαγή διαμόρφωσης και γι' αυτό δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν την AF-2. Η περιοχή F, η οποία δεν είναι αναγκαία για την πρόσδεση του συνδέτη, είναι σημαντική για τη διάκριση των προσδεμάτων σε αγωνιστές και ανταγωνιστές.

1.6 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Ο ER βρίσκεται, υπό αδρανή μορφή, εντός του πυρήνα, συνδεδεμένος με διάφορα μόρια τα οποία «αποκρύπτουν» τη θέση σύνδεσής του με το DNA. Μετά τη σύνδεση του ER με τον ειδικό προσδέτη-οιστρογόνο λαμβάνει χώρα η ενεργοποίησή του, που περιλαμβάνει την αποσύνδεση της πρωτεΐνης θερμού σοκ 90 (heatshockprotein 90) και άλλων μικρομοριακών και μεγαλομοριακών μορίων, την φωσφορύλιωση και την τροποποίηση της διαμόρφωσής του. Στη συνέχεια, τα ενεργοποιημένα πλέον συμπλέγματα ER/ορμόνης σχηματίζουν διμερή τα οποία συνδέονται με ειδικές αλληλουχίες του DNA, τα στοιχεία ανταπόκρισης στα οιστρογόνα (Estrogen Response Elements – EREs), τα οποία εντοπίζονται στον υποκινητή (promotor) των ελεγχόμενων από τα οιστρογόνα γονιδίων. Τα συνδεδεμένα στα ERE διμερή ενώνονται με συνρρυθμιστικές πρωτεΐνες και από κοινού ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων που αποκρίνονται στα οιστρογόνα. Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες συμπεριφέρονται σαν συνενεργοποιητές και επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων ενώ άλλες λειτουργούν σαν συνκαταστολείς και αναστέλλουν τη μεταγραφή των γονιδίων. Η τελική απάντηση ενός κυττάρου, φυσιολογικού ή νεοπλασματικού, στα οιστρογόνα (ήτα αντιοιστρογόνα) εξαρτάται, σε μεγάλο βαθμό, από την περιεκτικότητά του σε συν-ενεργοποιητές και συν-κατασταλείς καθώς και από τη μεταξύ τους αναλογία.

1.7 ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΙ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ (SERMS)

Η δράση των οιστρογόνων στα διάφορα κύτταρα και ιστούς ποικίλει και σχετίζεται με την πρόσδεσή τους, στους οιστρογονικούς υποδοχείς ERα και ERβ (Frasor J et al., 2003- Hamilton KJ et al., 2013- Hewitt SC et al., 2015). Οι εκλεκτικοί ρυθμιστές των οιστρογονικών υποδοχέων (Selective Estrogen Receptor Modulators, SERMS) είναι μια ομάδα ενώσεων που δρουν σαν αγωνιστές/ανταγωνιστές των οιστρογονικών υποδοχέων και έχουν ιστοειδική δράση (Dahlman-Wright K et al., 2006 – Katzenellenbogen BS et al., 2000). Πολλά από τα διαθέσιμα SERMS έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά όπλα για τη θεραπεία του ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου στο μαστό καθώς και για την πρόληψη και θεραπεία της οστεοπόρωσης (Mirkin S & Pickarb JH, 2015). Έχει αποδειχθεί ότι πολλά από αυτά εμφανίζουν αντι-οιστρογονική δράση στο μαστό και στο ενδομήτριο, δρώντας ως ανταγωνιστές των ERs (Sato M et al., 1996) και οιστρογονική δράση στα οστά, δρώντας ως αγωνιστές.

1.8 ΦΥΤΟ-ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ

Ο όρος φυτο-οιστρογόνα χρησιμοποιείται ευρύτερα για να περιγράψει, φυσικά προϊόντα (μη στεροειδή), μεταβολίτες τους, ημισυνθετικά παράγωγα και συνθετικά ανάλογα, τα οποία εμφανίζουν δομικές και κυρίως λειτουργικές ομοιότητες με ενδογενή οιστρογόνα και SERMs. (Brzezinski A et al., 1999 - Yildiz F , 2005). Τα φυτο-οιστρογόνα, αν και λιγότερο ισχυρά από την οιστραδιόλη, διαθέτουν ικανότητα πρόσδεσης στον ένα ή και στους δύο τύπους του οιστρογονικού υποδοχέα ERα και ERβ και μπορούν να λειτουργήσουν ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές των ER (Turner JV et al., 2007 , Lagari VS, 2014). Τα φυτο-οιστρογόνα ανήκουν στην κατηγορία των μη στεροειδών πολυφαινολικών ενώσεων. Με βάση τη χημική δομή τους κατατάσσονται σε τέσσερις υποκατηγορίες : τα φλαβονοειδή (πχ καμπφερόλη), τα ισοφλαβονοειδή (πχ γενιστεΐνη, δαϊδζεΐνη, βιοχανίνη Α), οι κουμεστάνες (πχ. κουμεστρόλη) και οι λιγνάνες θηλαστικών (πχ. εντερολακτόνη). Στις μέρες μας, όλο και περισσότερες γυναίκες χρησιμοποιούν συμπληρώματα διατροφής πλούσια σε φυτο-οιστρογόνα, έχοντας ως στόχο την πρόληψη και την ανακούφιση των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης, συμπεριλαμβανομένης της οστεοπόρωσης. Η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητά τους είναι ακόμα θέμα συζήτησης (Bedell S et al., 2014 – Lagari VS, 2014 - Phrakonkham P et al.,

2007). Η μακροπρόθεσμη πρόσληψη φυσικών προϊόντων θεωρείται ασφαλέστερη από οποιαδήποτε φαρμακολογική παρέμβαση.

1.9ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής, οιστρογονικής και μεταγραφικής δράσης φυσικών ενώσεων και συνθετικών προκειμένου να αναδειχθούν ενώσεις που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την πρόληψη ή/και την αντιμετώπιση σημαντικών εμμηνοπαυσιακών συμπτωμάτων. Τα παραπάνω μελετήθηκαν με τη χρήση τεσσάρων κυτταρικών σειρών.

- Κύτταρα HT-22. Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των υπό έλεγχο ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HT-22 ιπποκάμπου ποντικού. Τα κύτταρα αυτά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στο γλουταμικό οξύ και η ύπαρξη υψηλής εξωκυτταρικής συγκέντρωση γλουταμικού οδηγεί τελικά στον κυτταρικό θάνατο. Πιστεύεται ότι τα οιστρογόνα, μέσω των υποδοχέων τους, προστατεύουν τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες. Τα κύτταρα HT-22 εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς οιστρογόνων (estrogens receptors ER α , ER β).
- Κύτταρα Ishikawa. Τα Ishikawa είναι ανθρώπινα κύτταρα αδενοκαρκινώματος του ενδομητρίου που παράγουν πλακούντια αλκαλική φωσφατάση υπό την επίδραση οιστρογόνων. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ικανότητας των ενώσεων να μιμούνται την οιστρογονική δράση στη μήτρα.
- Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Ishikawa παρουσία 0,1nM E2 (συγκέντρωση της ορμόνης στην κυκλοφορία γυναικών που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση) για τον έλεγχο της ικανότητας ορισμένων ενώσεων να παρεμποδίζουν την οιστρογονική δράση στη μήτρα.
- Κύτταρα MCF-7:D5L. Τα MCF-7:D5L είναι κύτταρα MCF-7 στα οποία έχει ενσωματωθεί μόνιμα το πλασμίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της γλοβίνης. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ικανότητας των ενώσεων να μιμούνται την αγωνιστική δράση της οιστραδιόλης μέσω ER α .
- Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα MCF-7:D5L παρουσία 0,1nM (συγκέντρωση της ορμόνης στην κυκλοφορία γυναικών που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση) για τον έλεγχο της

ικανότητας συγκεκριμένων ενώσεων να δρουν ως αντιοιστρογόνα παρεμποδίζοντας την αγωνιστική δράση της οιστραδιόλης μέσω ERα.

- Κύτταρα HEK:ERβ1. Τα HEK:ERβ1 είναι κύτταρα HEK-293 (ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα νεφρού) σταθερά διαμολυσμένα με το πλασμίδιο έκφρασης pcDNA3.1-hERβ1 και με το πλασμίδιο αναφορά pERE-TKLuc. Αναπτύχθηκαν στο Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας του ΕΙΕ. Τα κύτταρα HEK:ERβ1 χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ικανότητας των ενώσεων να μιμούνται την αγωνιστική δράση της οιστραδιόλης μέσω ERβ.
- Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HEK:ERβ1 παρουσία 0,1nM E2(συγκέντρωση της ορμόνης στην κυκλοφορία γυναικών που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση) για τον έλεγχο της ικανότητας των αντιοιστρογόνων να παρεμποδίζουν την αγωνιστική δράση της οιστραδιόλης μέσω ERβ.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν από τις παρακάτω εταιρείες:

- Τα υλικά της καλλιέργειας των κυττάρων (MEM, MEM κατά Dulbecco, πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη, πυροσταφυλικό νάτριο, τρυψίνη, όξινο ανθρακικό νάτριο) από την Sigma-Aldrich.
- Ο ορός εμβρύου βοός (FBS) και το ρυθμιστικό διάλυμα PBS από την Gibco (Invitrogen, USA).
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffered Serum – PBS)
- Τα πλαστικά είδη της κυτταροκαλλιέργειας (τρυβλία διαμέτρου 100 mm, 60 mm πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων) από την Greinerbio-one.
- Το χρωμογόνο MTT από την Sigma-Aldrich.
- Ισοπροπανόλη
- Το κιτ λουσιφεράσης από την Promega.
- Το p-nitro-phenylphosphate (υπόστρωμα αλκαλικής φωσφατάσης) από την Sigma-Aldrich (Germany).

2.1.2 Κυτταρικές σειρές

- Ishikawa: Ανθρώπινα κύτταρα αδenoκαρκινώματος ενδομητρίου. Παράγουν πλακούντια αλκαλική φωσφατάση υπό την επίδραση οιστρογόνων (ECACC, EuropeanCollectionofAnimalCellCultures).
- HEK:ERβ:εμβρυονικά νεφρικά κύτταρα μετασχηματισμένα με τογονίδιο του ERβ και του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης για τον έλεγχο επαγωγής οιστρογονικότητας μέσω του υποδοχέα οιστρογόνων βήτα (estrogen receptor-ERβ).Είναι κύτταρα HEK-293 (ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα νεφρού) σταθερά διαμολυσμένα με το πλασμίδιο έκφρασης pcDNA3.1-hERβ1. Τα HEK:ERβ είναι σταθερά διαμολυσμένα και με το πλασμίδιο αναφοράς pERE-TK-Luc. Αναπτύχθηκαν στο Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας του ΕΙΕ.
- MCF-7:D5L: Είναι καρκινικά κύτταρα μαστού όπου έχει πραγματοποιηθεί μετασχηματισμός με το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης για τον ποσοτικό έλεγχο επαγωγής της οιστρογονικότητας μέσω του υποδοχέα οιστρογόνων άλφα (Estrogen Receptor-ERα).Αναλυτικότερα, σε κύτταρα MCF-7 έχει ενσωματωθεί μόνιμα το πλασμίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της γλοβίνης (pERE-Glob-Luc) και το πλασμίδιο pWL2neo που περιέχει το γονίδιο της νεομυκίνης που προσφέρει ανθεκτικότητα στη γενετισίνη (Fokialakis, 2004). Αναπτύχθηκαν στο Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας του ΕΙΕ.
- HT22: αθανατοποιημένα κύτταρα ιππόκαμπου μυός (Παραχωρήθηκαν από τον Dr. David Schubert / The Salk Institute). Χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό ενώσεων που έχουν αντιοξειδωτική δράση.

2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

2.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Η καλλιέργεια των κυττάρων απαιτεί αποστειρωμένα υλικά. Τα γυάλινα καθώς και τα πλαστικά σκεύη πολλαπλών χρήσεων αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο στους 120 °C για 30 min (υγρή αποστείρωση). Όλες οι διαδικασίες καλλιέργειας των κυττάρων πραγματοποιούνται υπό στείρες συνθήκες. Όλα τα κύτταρα καλλιεργούνται, σε επωαστή CO₂ στους 37°C και σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂.

- Ishikawa: Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλαστικά τρυβλία Petri 90 mm, με 10 ml πλήρους υλικού. Για την καλλιέργεια τους χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό MEM ελεύθερο ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 5% FBS (GIBCO) και 1 mg/l Ινσουλίνης(Sigma). Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται κάθε 2-3 ημέρες, όταν φτάσουν στο 75% της κάλυψης του τρυβλίου και η αποκόλληση από την επιφάνεια προσκόλλησης γίνεται με χρήση τρυψίνης 0,25%.
- HEK-ERβ: Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλαστικά τρυβλία Petri 90 mm με 10 ml πλήρους υλικού. Για την καλλιέργεια τους χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) με ερυθρό της φαινόλης το οποίο περιέχει 10% FBS (GIBCO), γλουταμίνη (20 mM), στρεπτομυκίνη (50 mg/l), πενικιλίνη (50.000 IU/l), πυροσταφυλικό νάτριο (1 mM), NaHCO₃ (2 g/l). Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται κάθε 2-3 ημέρες, όταν φτάσουν στο 75% της κάλυψης του τρυβλίου και η αποκόλληση από την επιφάνεια προσκόλλησης γίνεται με χρήση τρυψίνης 0.05%.
- MCF-7:D5L: Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλαστικά τρυβλία Petri 90 mm με 10 ml πλήρους υλικού. Για την καλλιέργεια τους χρησιμοποιείται θρεπτικό

υλικό MEM ελεύθερο ερυθρού της φαινόλης παρουσία 10% FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO) 1 mg/l ινσουλίνης(Sigma) και 0,1 nM οιστραδιόλης (E2). Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται κάθε 3-4 ημέρες, όταν φτάσουν στο 75% της κάλυψης του τρυβλίου και η αποκόλληση από την επιφάνεια προσκόλλησης γίνεται με χρήση τρυψίνης 0.25%.

- HT22: Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλαστικά τρυβλία Petri 90 mm με 10 ml πλήρους υλικού. Για την καλλιέργεια τους χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) ελεύθερο ερυθρού της φαινόλης, χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη, το οποίο περιέχει 10% FBS (GIBCO), γλουταμίνη (20 mM), στρεπτομυκίνη (50 mg/l), πενικιλίνη (50.000 IU/l), πυροσταφυλικό νάτριο (1 mM), NaHCO₃ (2 g/l). Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται κάθε 2-3 ημέρες, πριν φτάσουν στο 75% της κάλυψης του τρυβλίου και η αποκόλληση από την επιφάνεια προσκόλλησης γίνεται με χρήση τρυψίνης 0.05%.

2.2.2 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Η ανακαλλιέργεια γίνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα, ανάλογα με το είδος της κυτταρικής σειράς και σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή, έτσι ώστε να διασφαλίζεται η ομαλή καλλιέργεια των κυττάρων χωρίς την αλλοίωση των χαρακτηριστικών τους. Όταν τα κύτταρα πλησιάζουν στο να καλύψουν την επιφάνεια της φιάλης, αραιώνονται με τρυψινοποίηση. Αρχικά, η φιάλη εκπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS (14,7 mM KH₂PO₄/80,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,5, 2,68 mM KCl, 136,7 mM NaCl). Κατόπιν, προστίθεται 1 ml διαλύματος τρυψίνης 0,25 % ή τρυψίνης 0,05 % (ανάλογα με την κυτταρική σειρά) και ακολουθεί επώαση μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα (ανάλογα με την κυτταρική σειρά, απαιτείται χρόνος επώασης 2-5 min). Τα κύτταρα παραλαμβάνονται με πλήρες υλικό καλλιέργειας και μοιράζονται σε νέες φιάλες για να συνεχιστεί η καλλιέργεια ή σε τρυβλία petri ή πλάκες μικροκαλλιέργειας για να χρησιμοποιηθούν σε συγκεκριμένα πειράματα. Για τη συλλογή ιζήματος κυττάρων ακολουθείται η ίδια

διαδικασία και στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 600 g για 5 min, έκπλυση με PBS και φύλαξη σε υγρό άζωτο.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων που απαιτούνται συνθήκες απουσίας στεροειδών, τα κύτταρα μεγαλώνουν παρουσία ορού ελευθέρου στεροειδών, ο οποίος προκύπτει μετά από κατεργασία του FBS με ενεργό άνθρακα (Charcoal Inactivated Serum, CIS). Συγκεκριμένα, ο ορός επωάζεται με το ίζημα διαλύματος ενεργού άνθρακα (2,5% κ.β. ενεργός άνθρακας και 0,25% κ.β. δεξτράνη σε 10 mM Tris-HCl pH 7,4) ίσου με το 1/5 του όγκου του ορού για 30 min στους 56°C υπό ανάδευση και το εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 10000 g για 10 min. Το υπερκείμενο υφίσταται ξανά την ίδια διαδικασία και μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης αποστειρώνεται με φίλτρο αποστείρωσης Sartorius, μεγέθους πόρων 0,22 μm. Ο ελεύθερος στεροειδών ορός προστίθεται στα κύτταρα 48-72 h πριν την έναρξη των πειραμάτων, ώστε να προλάβουν να μεταβολίσουν τυχόν παρόντα στεροειδή.

2.2.3 Προετοιμασία των ενώσεων

Οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται στα πειράματα διαλύονται αρχικά σε διαλύτη DMSO σε συγκέντρωση 10-2 M και στη συνέχεια αραιώνονται διαδοχικά με διαλύτη για την παρασκευή ενδιάμεσων αραιώσεων των ενώσεων σε συγκέντρωση 1000 φορές μεγαλύτερη αυτής που επιδιώκεται να ελεγχθεί. Η τελική αραιώση προκύπτει με την προσθήκη 1 μl της ένωσης σε DMSO σε 1 ml υλικού καλλιέργειας, διασφαλίζοντας ότι η συγκέντρωση του DMSO στην οποία εκτίθενται τα κύτταρα δεν ξεπερνά το 0,1%. Τα κύτταρα που δεν έχουν υποστεί επώαση με τις υπό εξέταση ενώσεις αλλά μόνο με το διαλύτη DMSO (έκδοχο).

2.2.4 Προσδιορισμός αριθμού ζώντων και νεκρών κυττάρων με χρήση μικροσκοπίου

Για τον προσδιορισμό του αριθμού των ζώντων και νεκρών κυττάρων χρησιμοποιείται η χρωστική TrypanBlue. Το TrypanBlue ανήκει στην κατηγορία των χρωστικών που δεν διαπερνούν την μεμβράνη των ζώντων κυττάρων και χρωματίζουν μόνο τα νεκρά ή αποδιοργανωμένα κύτταρα. Για τη μέτρηση της βιωσιμότητας συλλέγονται τα κύτταρα μετά την τρυψινοποίηση και μέρος του τελικού εναιωρήματος των κυττάρων αραιώνεται με προσθήκη ίσου όγκου 0,4% TrypanBlue σε PBS και γίνεται καταμέτρηση χρησιμοποιώντας αιμοκυττόμετρο (Neubauer). Ο αριθμός των κυττάρων ανά ml εναιωρήματος υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{Αριθμός κυττάρων/ml εναιωρήματος} = \text{αριθμός κυττάρων} \times \text{αραίωση} \times 10^4$$

2.2.5 Προσδιορισμός της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στα κύτταρα Ishikawa

Για την αξιολόγηση της οιστρογονικής δράσης των φυσικών ενώσεων μελετάται η επαγωγή της Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP) στα κύτταρα Ishikawa.

Αρχή της μεθόδου: Η μέθοδος μέτρησης της επαγωγής της AlkP από τα οιστρογόνα στα κύτταρα Ishikawa βασίζεται στον προσδιορισμό της υδρόλυσης του φωσφορικού εστέρα της νιτροφαινόλης από την αλκαλική φωσφατάση που προκαλεί την μετατροπή στο χρωμογόνο νιτροφαινόλη η οποία έχει μέγιστη απορροφητικότητα φωτός στα 405 nm (Littlefield, 1990; Markiewicz, 1993).

Πειραματική πορεία: Τα πειράματα επαγωγής της AlkP πραγματοποιούνται σε πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων. Κατά την πειραματική διαδικασία στα Ishikawa κύτταρα χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό MEM ελεύθερο ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 5% CIS. Συγκεκριμένα επιστρώνονται 12×10^3 κύτταρα ανά θέση στην πλάκα μικροκαλλιέργειας και επώάζονται για 24h. Ακολουθεί η προσθήκη των υπό εξέταση ενώσεων και επώαση για 72h. Μετά το τέλος της επώασης ακολουθούν δυο εκπλύσεις των κυττάρων με διάλυμα PBS (100 μ l ανά θέση), απομακρύνονται τυχόν υπολείμματα του PBS και οι πλάκες τοποθετούνται στους -20°C τουλάχιστον για 16-24h έτσι ώστε να προκληθεί λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια, η πλάκα αφήνεται για περίπου 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και μετά τοποθετείται στον πάγο όπου επώάζεται με κρύο διάλυμα (50 μ l ανά θέση) που περιέχει 5 mM φωσφορικό εστέρα της νιτροφαινόλης (pNPP), 0,24 mM MgCl_2 και 1 M διαιθανολαμίνης (pH 9,8). Τα κύτταρα που επώάζονται μόνο με διαλύτη (DMSO) αποτελούν το δείγμα αναφοράς, ενώ τα κύτταρα που επώάζονται με 0,1 nM οιστραδιόλης αποτελούν το θετικό δείγμα αναφοράς. Το κίτρινο χρώμα του προϊόντος παρακολουθείται και μετράται κάθε 15 min στα 405 nm χρησιμοποιώντας τον πολυμετρητή SafireII (TECAN) μέχρι το θετικό δείγμα αναφοράς να δείξει απορρόφηση (OA405) της τάξης του 1,2.

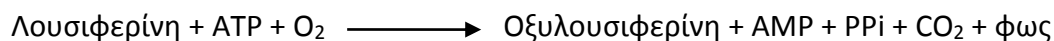
2.2.6 Προσδιορισμός της έκφρασης Λουσιφεράσης στα κύτταρα MCF-7:D5L και HEK:ER β

Για την αξιολόγηση της δράσης των φυσικών ενώσεων μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων οιστρογόνων ER α ή/και ER β μελετάται η επαγωγή της λουσιφεράσης στα MCF-7:D5L και HEK:ER β κύτταρα, αντίστοιχα. Και οι δύο κυτταρικές σειρές είναι μετασχηματισμένες με το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης ώστε να μπορεί να προσδιοριστεί φωτομετρικά το ποσοστό της οιστρογονικής επαγωγής.

Αρχή της μεθόδου: Για τη μελέτη της επαγωγής της λουσιφεράσης από τις υπό εξέταση ενώσεις χρησιμοποιείται το kit της Promega. Για τη μέτρηση της

ενεργότητας της λουσιφεράσης γίνεται μέτρηση των παραγόμενων φωτονίων που προκύπτουν από την αντίδραση:

Λουσιφεράση



Πειραματική πορεία: Τα πειράματα επαγωγής της λουσιφεράσης πραγματοποιείται σε πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων. Κατά την πειραματική διαδικασία στα MCF-7:D5L κύτταρα χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό MEM ελεύθερο ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 5% CIS, ενώ στα HEK:ERβ κύτταρα χρησιμοποιείται DMEM ελεύθερο ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 5% CIS. Συγκεκριμένα επιστρώνονται 12x10³ κύτταρα ανά θέση στην πλάκα μικροκαλλιέργειας και επωάζονται για 72h. Ακολουθεί η προσθήκη των υπό εξέταση ενώσεων όπου επωάζονται για 16-24h. Μετά το τέλος της επώασης αφαιρείται το υλικό των κυττάρων και προστίθεται 25 μl διάλυμα λύσης των κυττάρων (GloLysisbuffer) και επωάζονται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη της λουσιφερίνης ως υπόστρωμα και ακολουθεί επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου προστατευμένο από το φως καθώς πρόκειται για φωτοευαίσθητη αντίδραση. Στη συνέχεια με μια πολυπιπέτα αποξύνουμε και αναδεύουμε τις θέσεις τις μικροπλάκας που περιέχει το κυτταρικό εκχύλισμα και το υπόστρωμα και μεταφέρουμε 35 μl σε μια λευκή πλάκα μικροκαλλιέργειας. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται μέτρηση των παραγόμενων φωτονίων στον πολυμετρητή SafireII (TECAN).

2.2.7 Προσδιορισμός του πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων HT22

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των ενώσεων ελέγχεται η επίδραση αυτών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των HT22 κυττάρων, απουσία και παρουσία γλουταμικού οξέος (οξειδωτικός παράγοντας).

Αρχή της μεθόδου: Ο προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού γίνεται με τη μέτρηση των μεταβολικά ενεργών κυττάρων με χρήση του χρωμογόνου MTT. Η μέθοδος αυτή αρχικά περιγράφηκε από τον Mosmann (1983) και βασίζεται στην ικανότητα του μιτοχονδριακού ενζύμου αφυδρογονάση να ανάγει το διαλυτό υποκίτρινου χρώματος MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) σε μπλε-μωβ φορμαζάνη που συσσωρεύεται στα μεταβολικά ενεργά κύτταρα σε βαθμό ανάλογο του αριθμού τους.

Πειραματική πορεία: Για τη μελέτη της επίδρασης ενώσεων στον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των κυττάρων χρησιμοποιούνται πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων. Κατά την πειραματική διαδικασία επιστρώνονται 2x10³ κύτταρα ανά θέση στην πλάκα μικροκαλλιέργειας και επώάζονται για 24h. Στη συνέχεια, αντικαθίσταται το υλικό με νέο υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS, το οποίο περιέχει τις υπό εξέταση ενώσεις. Κάθε ένωση εξετάζεται παρουσία και απουσία 5 mM-γλουταμικού οξέος το οποίο προκαλεί οξειδωτικό στρες στα κύτταρα. Σκοπός είναι να εξεταστεί αφενός η επίδραση της ένωσης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων κατά την απουσία γλουταμικού οξέος, αλλά και η ικανότητα της ένωσης να προστατεύει τα κύτταρα από τον θάνατο λόγω οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το γλουταμικό οξύ. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 20h στους 37°C. Μετά το πέρας της επώασης, αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται το MTT σε συγκέντρωση 1 mg/ml και ακολουθεί επώαση 4h στους 37°C. Μετά το τέλος της επώασης προστίθεται ισοπροπανόλη (100 μl ανά θέση) για τη διαλυτοποίηση της φορμαζάνης και γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης (OA) στα 550 nm χρησιμοποιώντας τον πολυμετρητή SafireII (TECAN).

2.2.8 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SPSS και τα γραφήματα γίνονται με το πρόγραμμα SigmaPlot

2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ –ΣΥΖΗΤΗΣΗ

2.3.1 Αξιολόγηση της νευροπροστατευτικής αντιοξειδωτικής δράσης

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με συστατικά των κυττάρων, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA και να τους προκαλέσουν οξειδώσεις (Andersen JK, 2004). Δεδομένης της αρνητικής συμβολής των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) στη βιωσιμότητα των νευρικών κυττάρων, όταν τα επίπεδά τους αυξηθούν ανεξέλεγκτα, και της πιθανότητας ενώσεων που δρουν μέσω του ER αλλά έχουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από την ορμόνη να προστατεύουν καλλύτερα τα νευρικά κύτταρα μέσω του μιτοχονδριακού ER, κρίθηκε αναγκαίο να γίνει έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης των 20 ενώσεων που διαπιστώσαμε ότι διαθέτουν δράση αγωνιστή ή/και ανταγωνιστή των ER, από τις 64 που ελέγξαμε συνολικά, για να συσχετίσουμε τον αγωνισμό ή τον ανταγωνισμό μέσω ERα ή/και ERβ με την νευροπροστατευτική αντιοξειδωτική δράση. Τα αποτελέσματα του ελέγχου της νευροπροστατευτικής δράσης των 20 ενώσεων παρουσιάζονται σε σχέση με αυτή της φισετίνης στο Διάγραμμα 1.

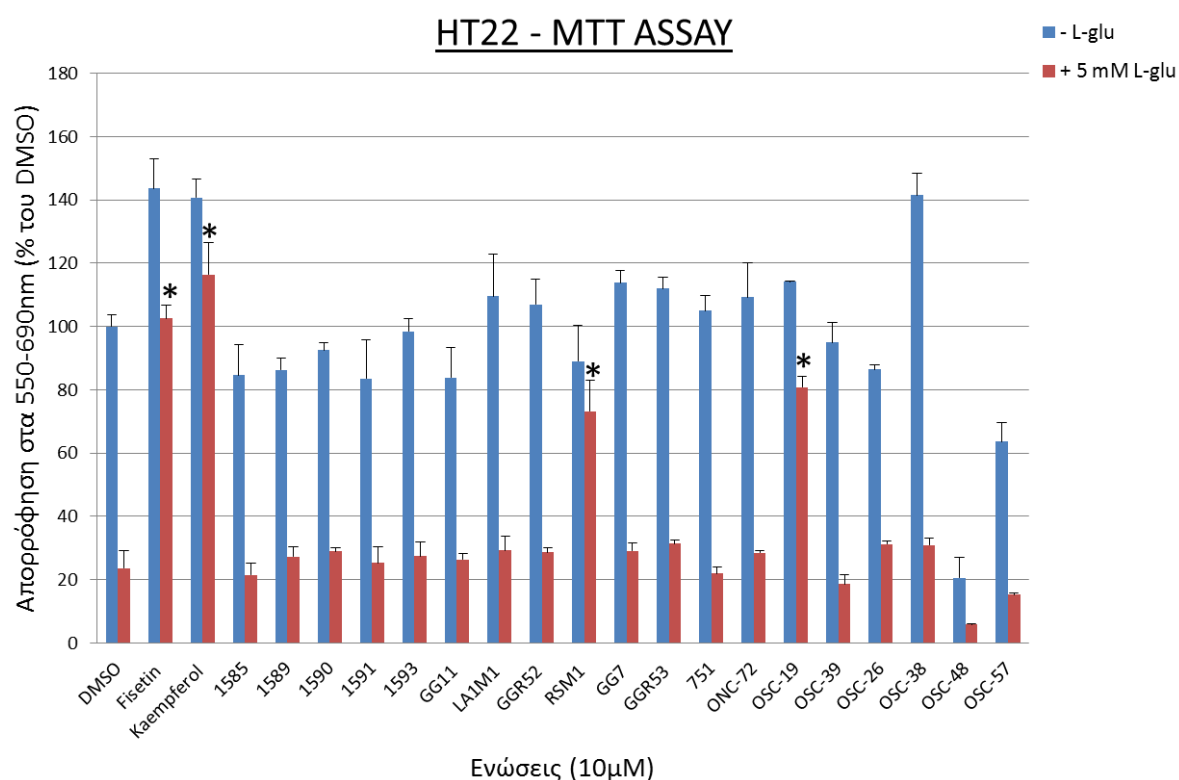
Για τον έλεγχο της νευροπροστατευτικής αντιοξειδωτικής δράσης, αξιολογήθηκε η δυνατότητα 20 ενώσεων, 14 φυσικών και 6 συνθετικών, να προστατεύουν τα HT22 νευρικά κύτταρα υπόκαμψου από το θάνατο λόγω έντονου οξειδωτικού στρες παρουσία γλουταμικού οξέος.

Για τον υπολογισμό του ποσοστού θανάτου των HT22 κυττάρων παρουσία γλουταμικού οξέος χρησιμοποιήθηκε η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 550 nm (μέτρο του αριθμού των ζωντανών κυττάρων) και ο ακόλουθος τύπος:

$$\text{Κυτταρικός θάνατος \%} = \frac{OD\ 550\ \text{nπαπουσ. γλουταμικού} - OD\ 550\ \text{nπαρουσ. γλουταμικού}}{OD\ 550\ \text{nπαπουσ. γλουταμικού}} * 100$$

Ενώ για τον υπολογισμό της ικανότητας μιας ένωσης να προστατεύει τα κύτταρα HT22 από τη κυτταροτοξική δράση του γλουταμικού χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

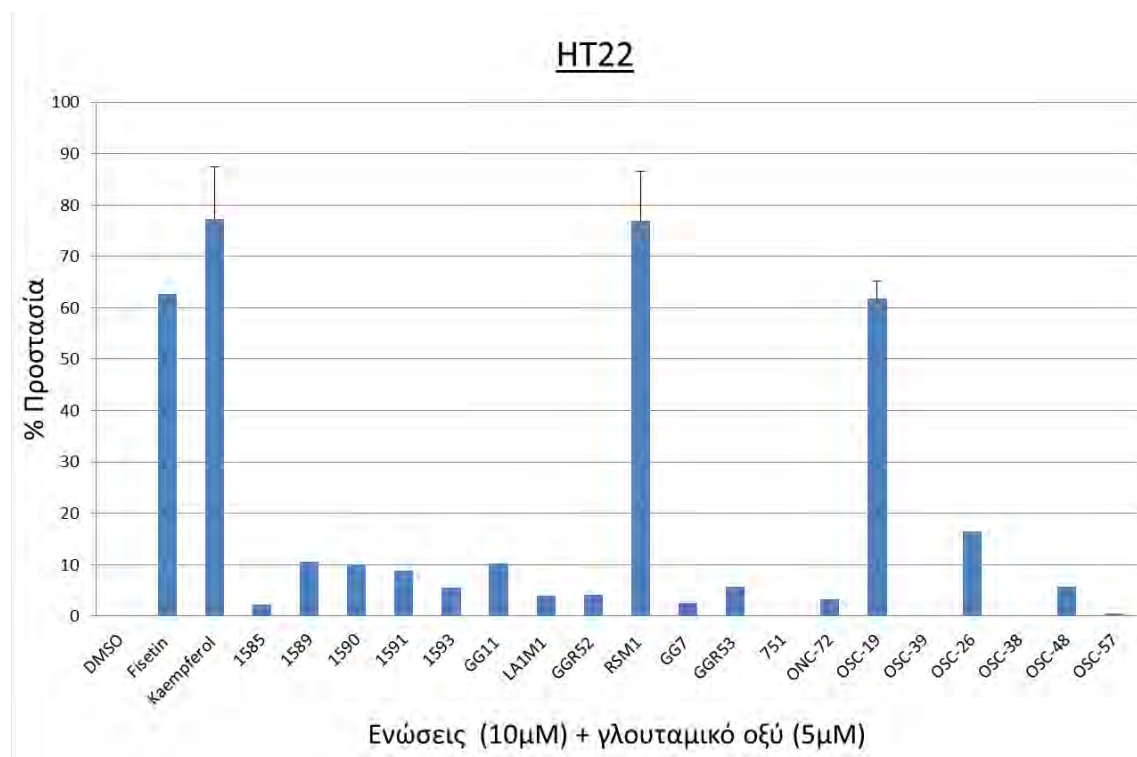
$$\text{Προστασία \%} = \frac{\% \text{ θάνατος παρουσία εκδόχου} - \% \text{ θάνατος παρουσία ένωσης}}{\% \text{ θάνατος παρουσία εκδόχου}} * 100$$



Διάγραμμα 1: Η βιωσιμότητα των HT22 κυττάρων, ύστερα από προσθήκη ενώσεων, παρουσία/απουσία γλουταμικού οξέος

Στο Διαγράμμα 1 παρουσιάζεται η βιωσιμότητα των HT22 μετά την επίδραση των υπό έλεγχο φυσικών και συνθετικών ενώσεων ή μόνο του εκδόχου (0,1% DMSO) στην απουσία ή την παρουσία 5mM γλουταμικού οξέος. Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η φισετίνη, μια φλαβονόλη με γνωστή αντιοξειδωτική/νευροπροστατευτική δράση στα κύτταρα HT22 (Maher P, 2006). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό επί τοις εκατό (%) της βιωσιμότητας των κυττάρων στο

έκδοχο απουσία γλουταμικού. Συγκεκριμένα, οι ενώσεις οι οποίες στη συγκέντρωση των 10μM αυξάνουν στατιστικά σημαντικά (* $p < 0,05$ vs έκδοχο + γλουταμικό) την βιωσιμότητα των κυττάρων παρουσία γλουταμικού είναι η καμπερόλη (Sigma-Aldrich), η RSM1 (καμπερόλη από Ράμνο, Rhamnus) και η συνθετική ένωση OSC-19 (ΣΗΜ. οι δομές όλων των ενώσεων που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 στη σελ. 58). Οι υπόλοιπες ενώσεις δεν είναι αποτελεσματικές στην παρεμπόδιση του προκαλούμενου από το γλουταμικό οξύ κυτταρικού θανάτου.

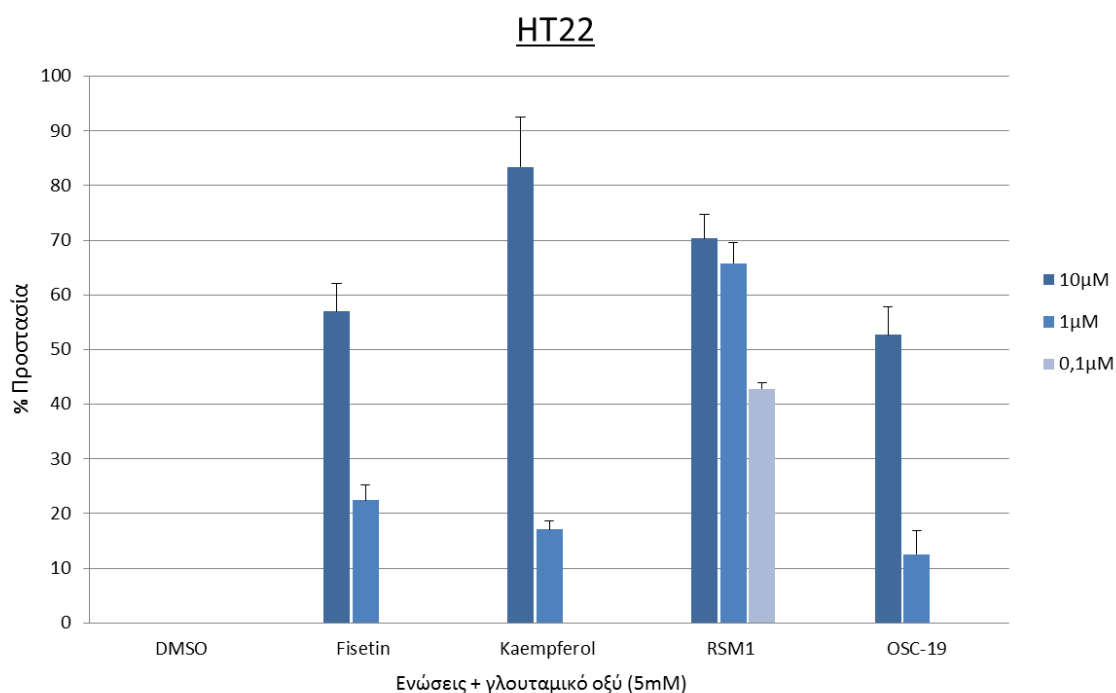


Διάγραμμα 2: Προστασία (%) των κύτταρων HT22 έναντι του προκαλούμενου από το γλουταμικό έντονου οξειδωτικού στρες, παρουσία των φυσικών ενώσεων.

Εναλλακτικά, στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζεται η Προστασία (%) που προσφέρουν οι ενώσεις από το έντονο οξειδωτικό στρες, παρουσία γλουταμικού, στα HT22 κύτταρα. Προστασία ίση με, <10% ορίζεται ως οριακή, 10-33% ως μικρή, 34-66 % ως μέτρια, 67-100% ως ισχυρή. Στην συγκέντρωση των 10μM οι ενώσεις που προσδίδουν προστασία σε ποσοστά παρόμοια με την φισετίνη είναι, κατά φθίνουσα σειρά οι εξής: οι καμπερόλη (77±10%), RSM1 (77±9%), OSC-19 (62±4%). Οι

υπόλοιπες ενώσεις, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, προσδίδουν οριακή ή καθόλου προστασία στα HT22 κύτταρα.

Στη συνέχεια, οι 3 ενώσεις που εμφάνισαν αντιοξειδωτική δράση μελετήθηκαν στα HT22 κύτταρα σε συγκεντρώσεις 10 μ M, 3 μ M και 1 μ M με σκοπό να δειχθεί εάν η αντιοξειδωτική τους δράση εμφανίζεται και σε μικρότερες συγκεντρώσεις.

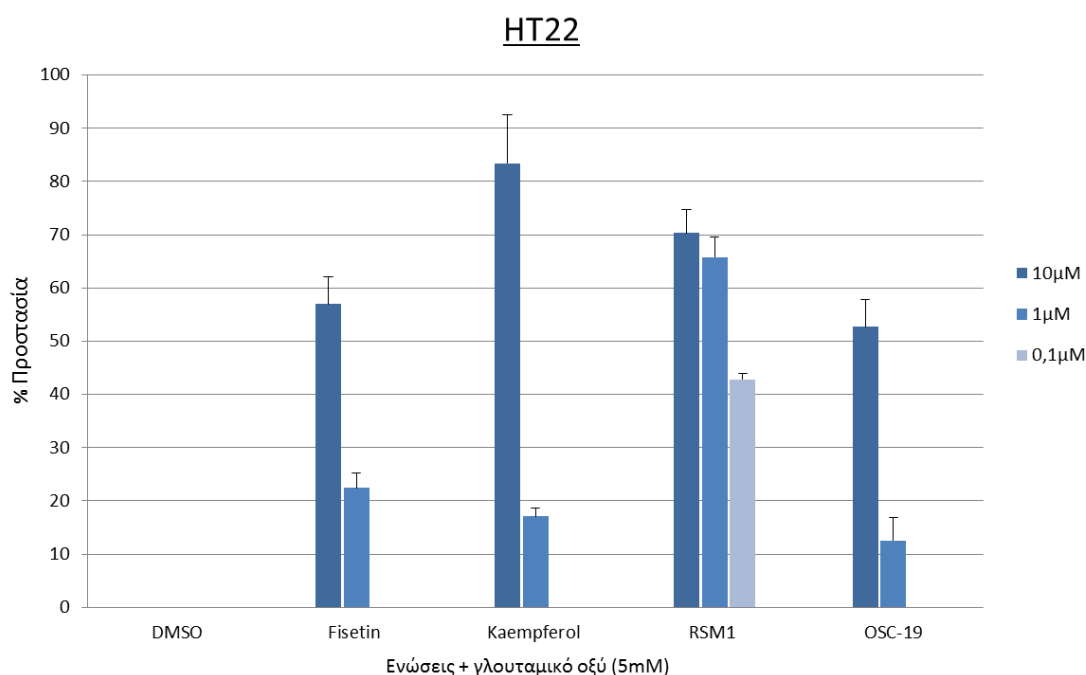


Διάγραμμα 3: Προστασία (%) των κύτταρων HT22 έναντι του προκαλούμενου από το γλουταμικό έντονου οξειδωτικού στρες, παρουσία των φυσικών ενώσεων, σε συγκέντρωση 10, 3 και 1 μ M.

Στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζεται συγκεντρωτικά η Προστασία (%) που προσφέρουν οι 3 φυσικές ενώσεις από το έντονο οξειδωτικό στρες, παρουσία γλουταμικού, στα HT22 κύτταρα. Οι ενώσεις μελετήθηκαν στις συγκεντρώσεις των 10 μ M, 3 μ M και 1 μ M στα HT22. Παρατηρείται ότι όσο μειώνεται η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών ενώσεων, φθίνει και η ικανότητά τους να παρέχουν προστασία

από το έντονο οξειδωτικό στρες που προκαλεί το γλουταμικό οξύ. Ωστόσο, και οι 3 ενώσεις φαίνεται να εμφανίζουν προστατευτική δράση στην συγκέντρωση των 1μM.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η αντιοξειδωτική τους δράση και στη συγκέντρωση των 0,1μM.



Διάγραμμα 4: Προστασία (%) των κύτταρων HT22 έναντι του προκαλούμενου από το γλουταμικό έντονου οξειδωτικού στρες, παρουσία των φυσικών ενώσεων, σε συγκέντρωση 10, 1 και 0, 1μM.

Στο Διάγραμμα 4 παρουσιάζεται συγκεντρωτικά η Προστασία (%) που προσφέρουν οι 3 φυσικές ενώσεις από το έντονο οξειδωτικό στρες, παρουσία γλουταμικού, στα HT22 κύτταρα, στις συγκεντρώσεις των 10μM, 1μM και 0,1μM. Παρατηρείται ότι η μόνη που εμφανίζει προστατευτική δράση στην συγκέντρωση των 0,1μM είναι η RSM1.

2.3.2 Αξιολόγηση οιστρογονικής δράσης φυσικών και συνθετικών ενώσεων - Επαγωγή της Αλκαλικής Φωσφατάσης στα Ishikawa κύτταρα .

Δεδομένης της συμβολής των οιστρογόνων τόσο στην προστασία από εκφυλιστικά νοσήματα του ΚΝΣ όσο και στη βελτίωση των εμμηνοπαυσιακών συμπτωμάτων, εξετάστηκε καταρχήν εάν και κατά πόσον φυσικές ενώσεις που προέρχονται από τα φυτά και ορισμένες συνθετικές ενώσεις εμφανίζουν οιστρογονική δράση. Η ρύθμιση της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα Ishikawa κύτταρα καρκίνου της μήτρας από μια ένωση είναι ένα σύστημα που χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη μέτρηση της οιστρογονικής καθώς και της αντιοιστρογονικής δράσης ενώσεων. Η επαγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης σε αυτά τα κύτταρα από μια ένωση θεωρείται δείκτης της εγγενούς οιστρογονικής δράσης της υπό εξέταση ένωσης, ενώ η καταστολή της επαγωγής της από την οιστραδιόλη θεωρείται δείκτης αντιοιστρογονικής δράσης της ένωσης (Markiewicz, 1993).

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα δοσοαπόκρισης προκειμένου να μετρηθεί η επαγωγική ικανότητα των 64 ενώσεων και εάν παρουσιάζουν συμπεριφορά οιστρογόνου, να υπολογιστεί η αποτελεσματικότητά τους (efficacy) καθώς και η συγκέντρωση στην οποία προκαλούντο 50% του μέγιστου δυνατού αποτελέσματος (EC50-potency). Επίσης για ορισμένες ενώσεις εξετάστηκε εάν και κατά πόσο μπορούν να παρεμποδίσουν τη δράση της οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 0,1nM(συγκέντρωση της ορμόνης στην κυκλοφορία γυναικών που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση)καθώς και υπολογίστηκε στη συνέχεια η συγκέντρωση στην οποία μπορούν να προκαλέσουν το 50% της μέγιστης καταστολής της δράσης της οιστραδιόλης(IC50).

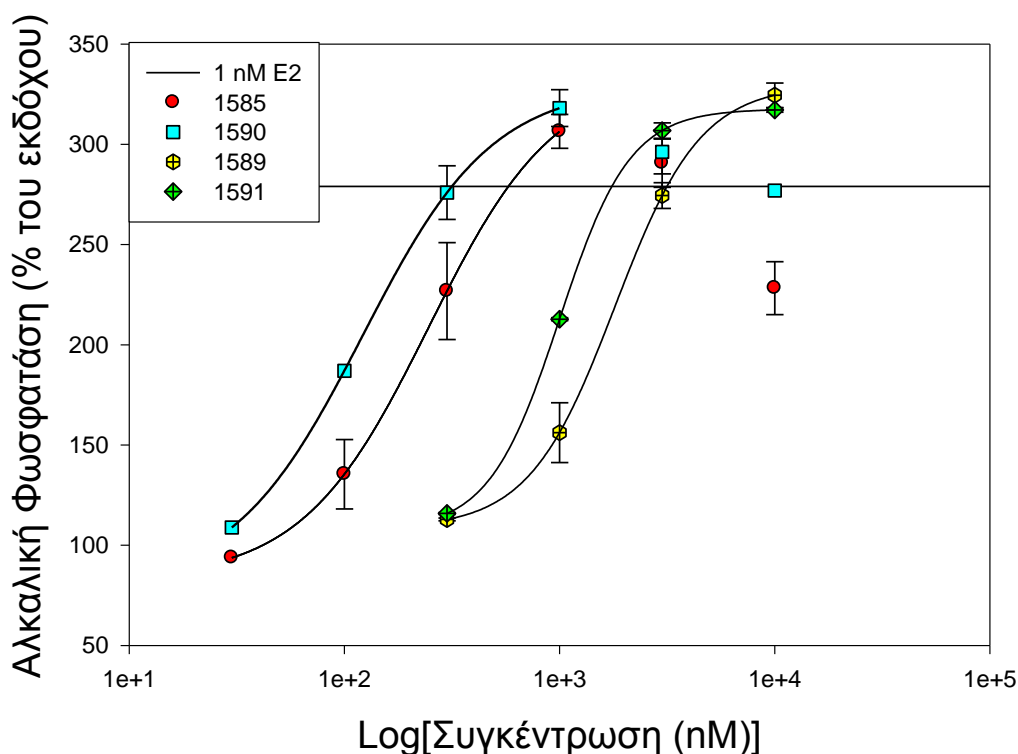
- 53 φυσικές ενώσεις και 11 συνθετικές ελέγχθηκαν ως προς την επαγωγή της Αλκαλικής Φωσφατάσης (AlkP), που είναι δείκτης οιστρογονικότητας στα Ishikawa κύτταρα αδενοκαρκινώματος της μήτρας. Τα κύτταρα Ishikawa εκφράζουν τους ERα και ERβ. Για τον έλεγχο της οιστρογονικής δράσης χρησιμοποιείται υλικό καλλιέργειας εμπλουτισμένο με ορό απαλλαγμένο από

στεροειδή. Οι φυσικές ενώσεις δοκιμάστηκαν σε 5 τουλάχιστον διαφορετικές συγκεντρώσεις έτσι ώστε για κάθε ένωση να προκύψει η καμπύλη δοσοαπόκρισης από την οποία στη συνέχεια υπολογίζεται το EC50.

Η οιστραδιόλη όντας ισχυρό οιστρογόνο ενισχύει στο μέγιστο την επαγωγή της AlkP. Ενώσεις που επάγουν την AlkP ορίζονται ως ασθενικοί, μερικοί ή ισχυροί αγωνιστές των οιστρογόνων όταν σε συγκ. 1 μM παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα <33%, 33-66%, ≥67, αντίστοιχα, της δράσης της οιστραδιόλης¹. Οι 37 από τις 64 συνολικά ενώσεις επάγουν την AlkP, όμως μόνο 8 από αυτές εμφάνισαν μέτρια ή ισχυρή οιστρογονική δράση που μιμείται αυτή της οιστραδιόλης: η 1585 (97%), η 1589(48%), η 1590 (116%), η 1591(96%), η 1593(179%), η GG7(53%), η GG11(71%) και η LA1M1(113%). Οι υπόλοιπες ενώσεις εμφάνισαν ασθενική ή καθόλου οιστρογονική δράση. Για τις παραπάνω 8 ενώσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SigmaPlot και κατασκευάστηκε η σιγμοειδής καμπύλη δοσοαπόκρισης της κάθε ένωσης με τη βοήθεια της οποίας υπολογίστηκε το EC50 για κάθε μια από αυτές τις ενώσεις.

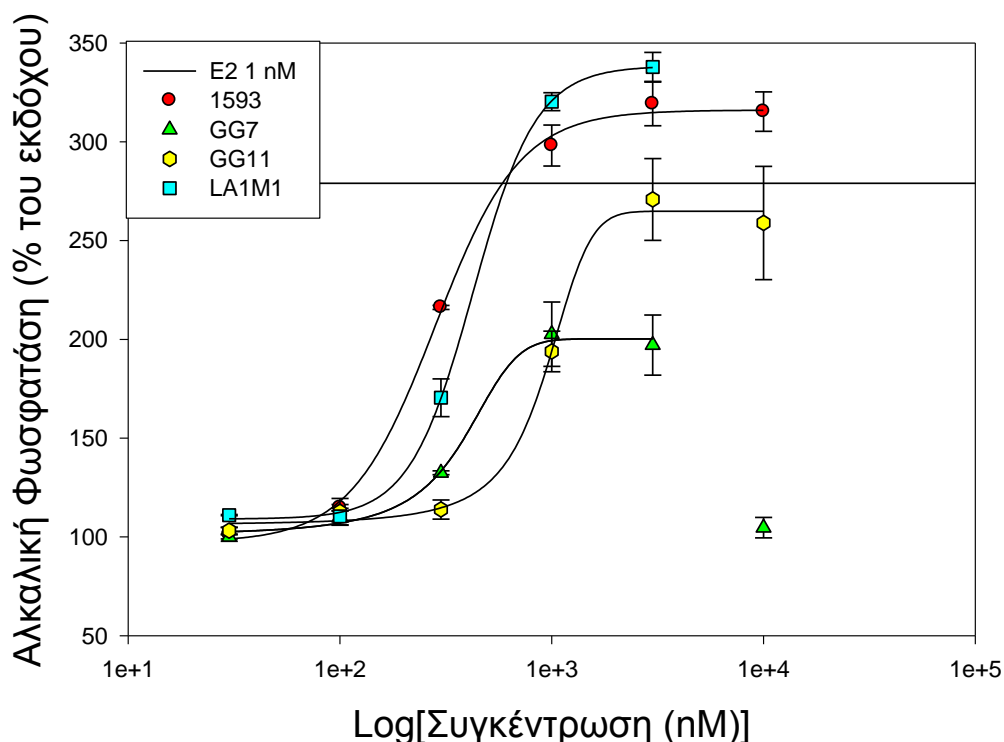
Στην εικόνα 1 παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα δοσοαπόκρισης όπου εξετάζεται η επαγωγή της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης, στα κύτταρα Ishikawa, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των φυσικών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν. Οι ενώσεις 1590, 1585, 1591 εμφανίζουν αποτελεσματικότητα >67% επομένως έχουν ισχυρή οιστρογονική δράση ενώ η 1589 εμφανίζει αποτελεσματικότητα 33-67% και άρα έχει μέτρια οιστρογονική δράση.

1 Η αποτελεσματικότητα επαγωγής της AlkP συγκριτικά με αυτή της οιστραδιόλης (E2) σε συγκέντρωση 1nM υπολογίζεται από το τύπο: **%Αποτελεσματικότητα= 100x(%ένωσης - %εκδόχου) / (%E2 - %εκδόχου)**



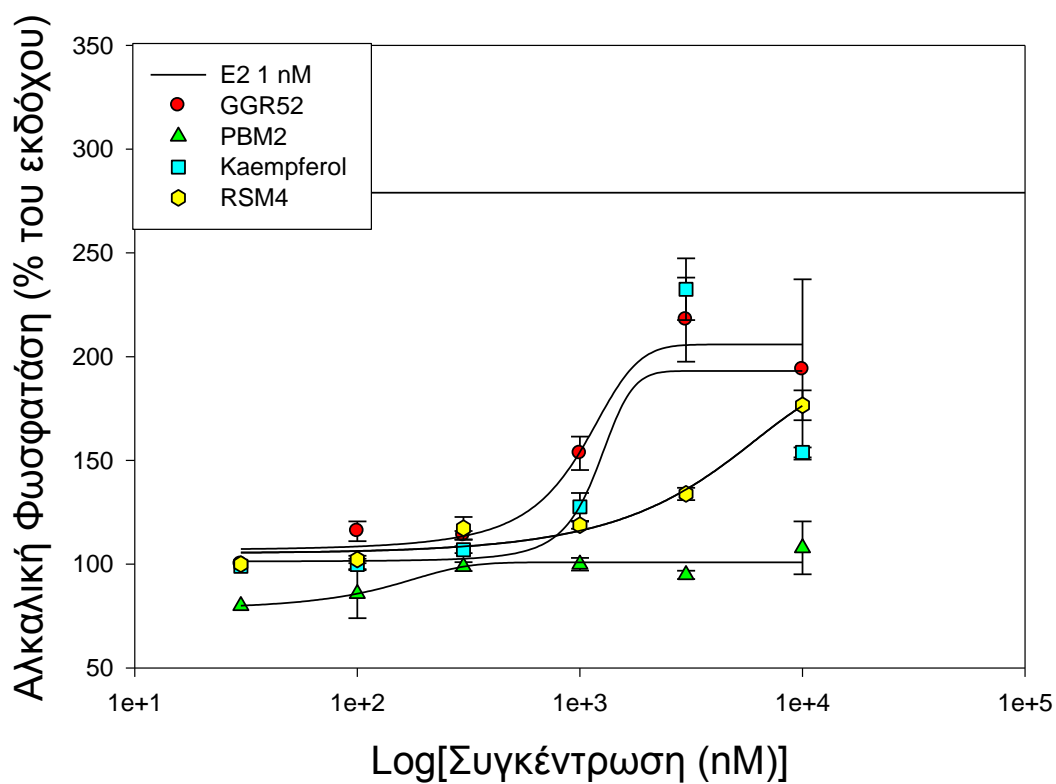
Εικόνα 1:Επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό MEM χωρίς κόκκινο της φαινόλης εμπλουτισμένο με 5% CIS (Charcoal-inactivated Serum δηλ FBS που έχει υποστεί κατεργασία για την απομάκρυνση των οιστρογόνων και των άλλων ενδογενών στεροειδών ορμονών). Μετά από 24h γίνεται η προσθήκη των ενώσεων και ακολουθεί επώαση 72h. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης όπως περιγράφεται στην §2.2.5. Η ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο του εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ (Σταθερό Σφάλμα Μέσης Τιμής, Standard Error of the Mean) από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (εγγενής απόκλιση μετρήσεων, intra-assay variation).

Στην εικόνα 2 παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα δοσοαπόκρισης όπου εξετάζεται η επαγωγή της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης, στα κύτταρα Ishikawa, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των φυσικών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν. Οι ενώσεις 1593 (179%), LA1M1 (113%) και η GG11 (71%) εμφανίζουν αποτελεσματικότητα >67% επομένως έχουν ισχυρή οιστρογονική δράση ενώ η GG7 (53%) εμφανίζει αποτελεσματικότητα 33-67% και άρα έχει μέτρια οιστρογονική δράση.



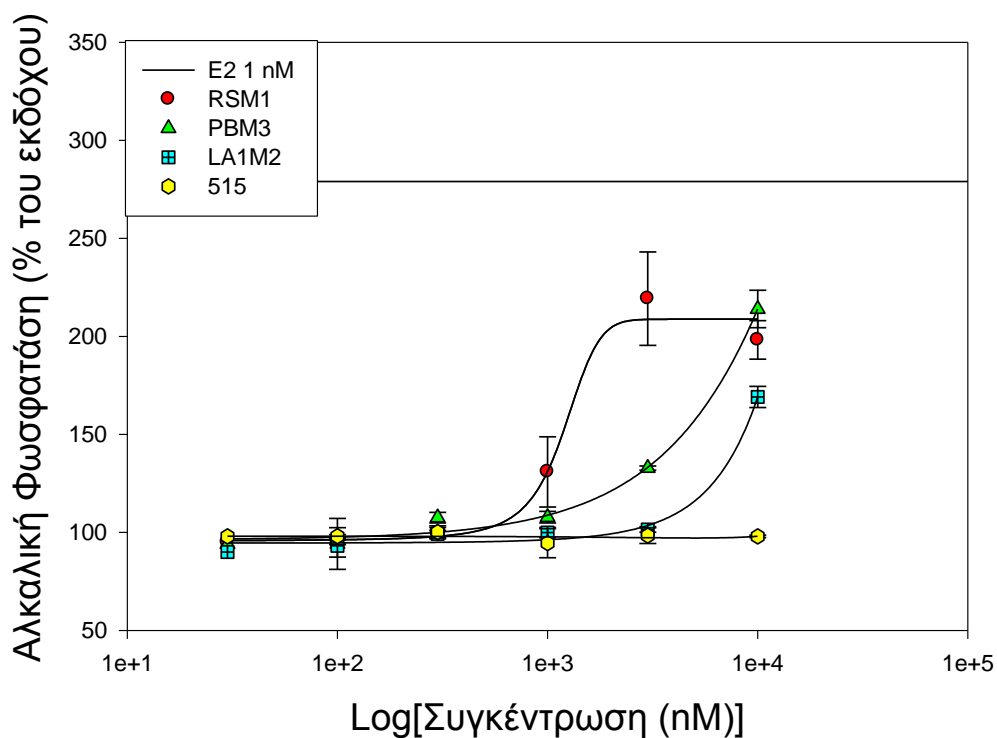
Εικόνα 2: Επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Ακολούθηθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 1. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης όπως περιγράφεται στην §2.2.5. Η ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο του εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

Στις Εικόνες 3-14 παρουσιάζεται η οιστρογονική δράση των υπολοίπων ενώσεων που εξετάστηκαν. Οι ενώσεις δεν εμφάνισαν σημαντική οιστρογονική δράση στα κύτταρα Ishikawa δηλ παρουσίασαν είτε πολύ μικρή οιστρογονική δράση είτε δεν εμφάνισαν καμία επαγωγή της AlkP και επομένως έχουν ασθενική ή καμία οιστρογονική δράση. Πιο συγκεκριμένα οι ενώσεις GGR52 (28%), καμπερόλη (15%), RSM1 (16%), GGR53 (29%), 751(15%), 752 (28%), ONC-72 (20%), OSC-19 (15%) και OSC-30 (13%) παρουσίασαν μικρή οιστρογονική δράση ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις είτε δεν προκάλεσαν καμία επαγωγή της AlkP είτε ξεκίνησαν να εμφανίζουν οιστρογονική δράση σε συγκεντρώσεις αρκετά πιο υψηλές από αυτές που έχουν αναφερθεί για ανάλογες φυσικές ενώσεις στο επίπεδο κυκλοφορίας ή/και ιστών του οργανισμού του ανθρώπου (~ 1 μ M).



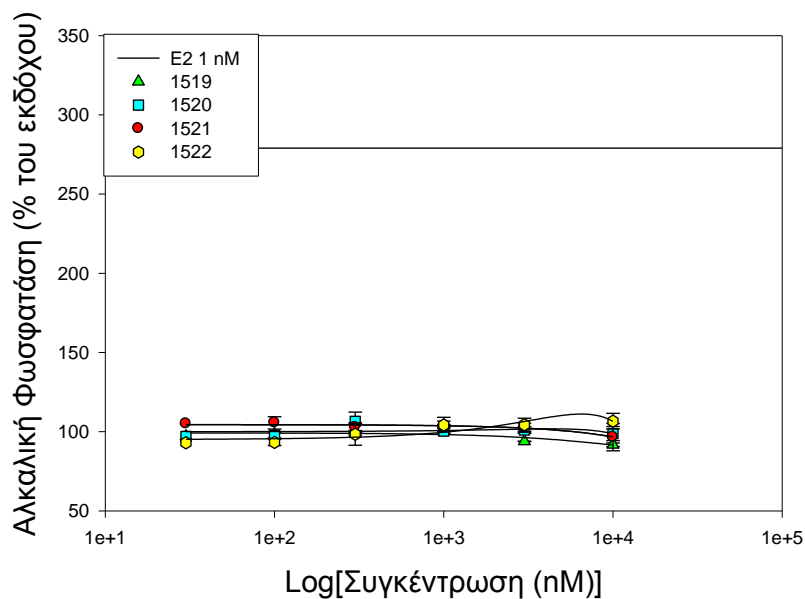
Εικόνα 3: Επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 1. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης όπως περιγράφεται στην §2.2.5. Η ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο του εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή \pm ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

Από τα αποτελέσματα της Εικόνας 3 συμπεραίνεται ότι οι ενώσεις GGR52 (28%) και καμπφερόλη (15%) παρουσίασαν μικρή οιστρογονική δράση.



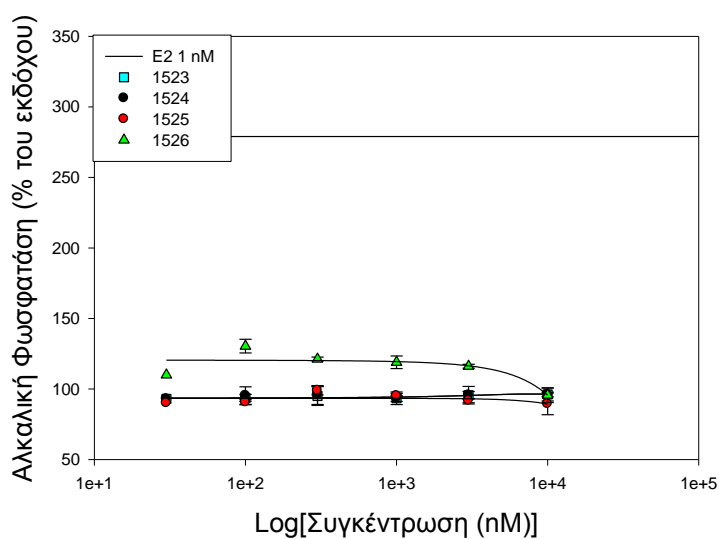
Εικόνα 4: Επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 1. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης όπως περιγράφεται στην §2.2.5. Η ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο του εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή \pm ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

Από τα αποτελέσματα της Εικόνας 4 συμπεραίνεται ότι η ένωση RSM1 (16%) παρουσίασε μικρή οιστρογονική δράση.



Εικόνα 5: Επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 1. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης όπως περιγράφεται στην §2.2.5. Η ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο του εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή \pm ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

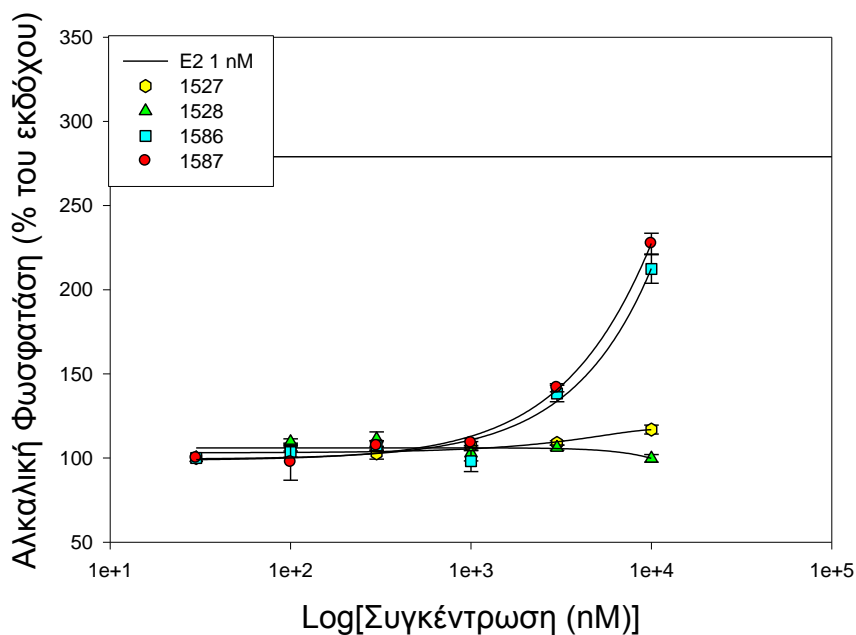
Καμία ένωση δεν προκάλεσε επαγωγή της AlkP.



Εικόνα 6: Επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 1. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης όπως περιγράφεται στην §2.2.5. Η ενεργότητα της αλκαλικής

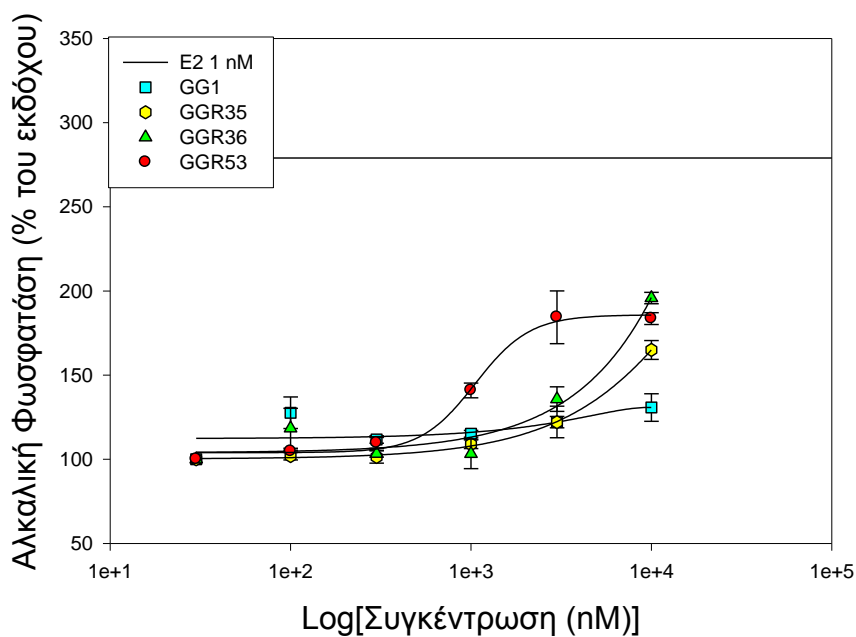
φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο του εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή \pm ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

Καμία ένωση δεν προκάλεσε επαγωγή της AlkP.



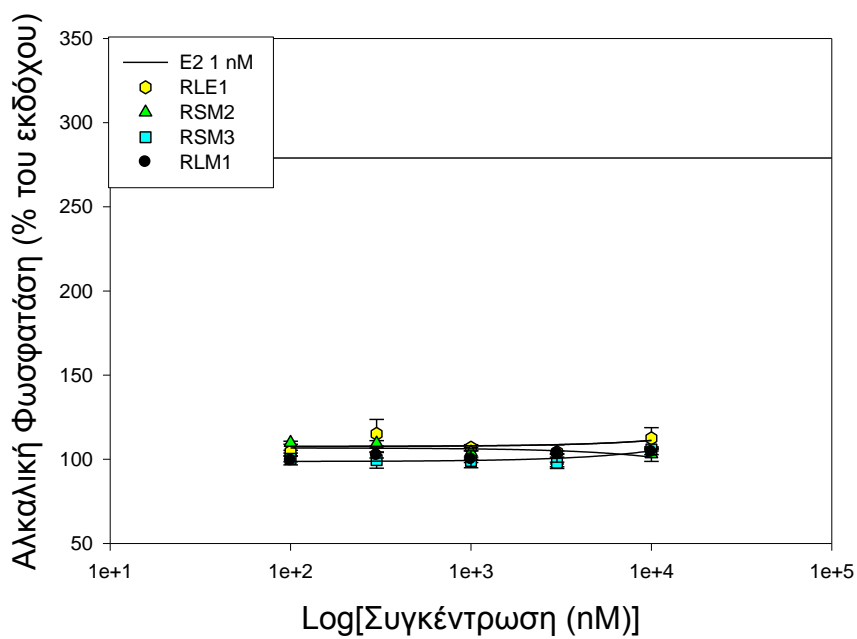
Εικόνα 7: Επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 1. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης όπως περιγράφεται στην §2.2.5. Η ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο του εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή \pm ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

Οι ενώσεις 1586 και 1587 ξεκινούν να εμφανίζουν κάποιο αποτέλεσμα σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις ενώ οι 1527 και 1528 δεν έχουν καμία επίδραση.



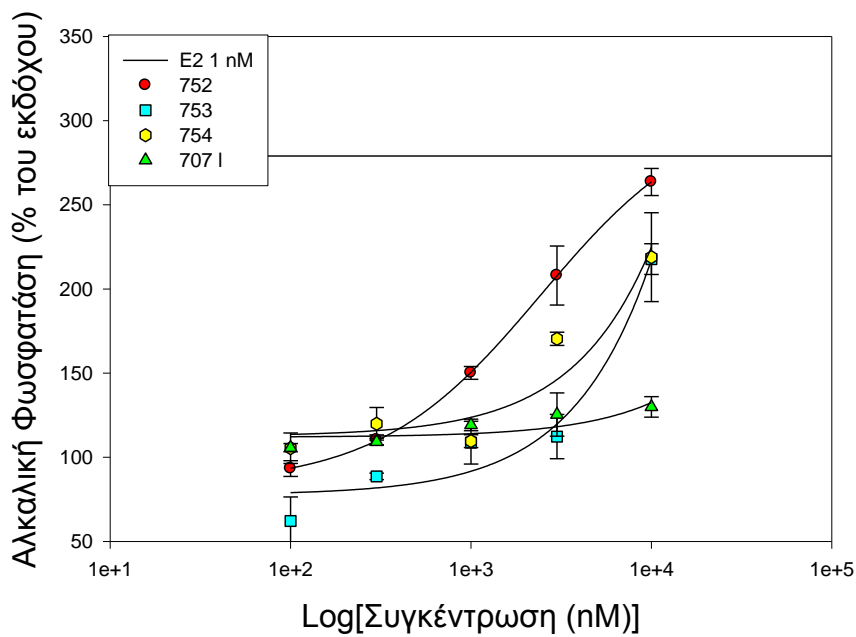
Εικόνα 8: Επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 1. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης όπως περιγράφεται στην §2.2.5. Η ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο του εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή \pm ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

Η ένωση GGR53 (29%) παρουσίασε μικρή οιστρογονική συμπεριφορά ενώ οι ενώσεις GG1, GGR35 και GGR36 ξεκινούν να εμφανίζουν κάποιο αποτέλεσμα σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις.



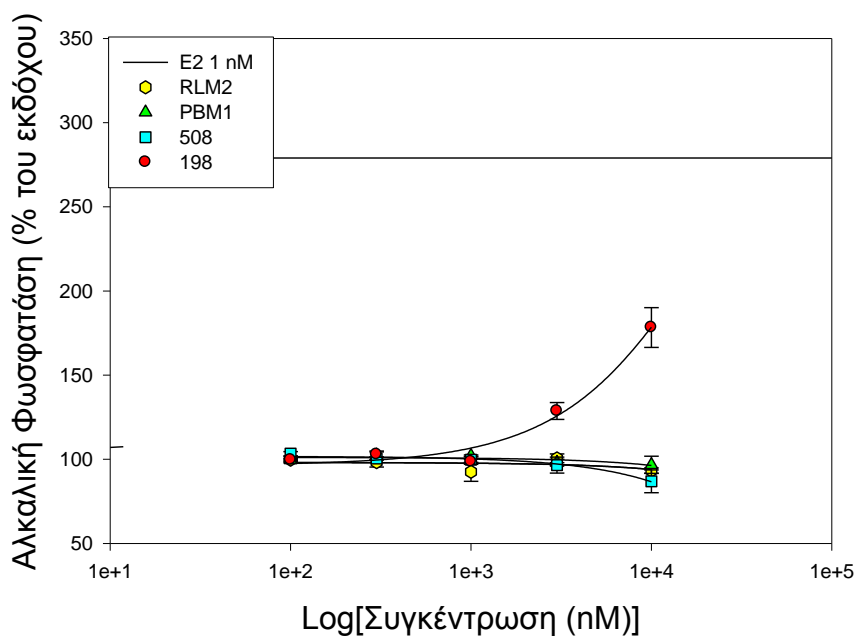
Εικόνα 9: Επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 1. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης όπως περιγράφεται στην §2.2.5. Η ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο του εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή \pm ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

Καμία ένωση δεν προκάλεσε επαγωγή της AlkP.



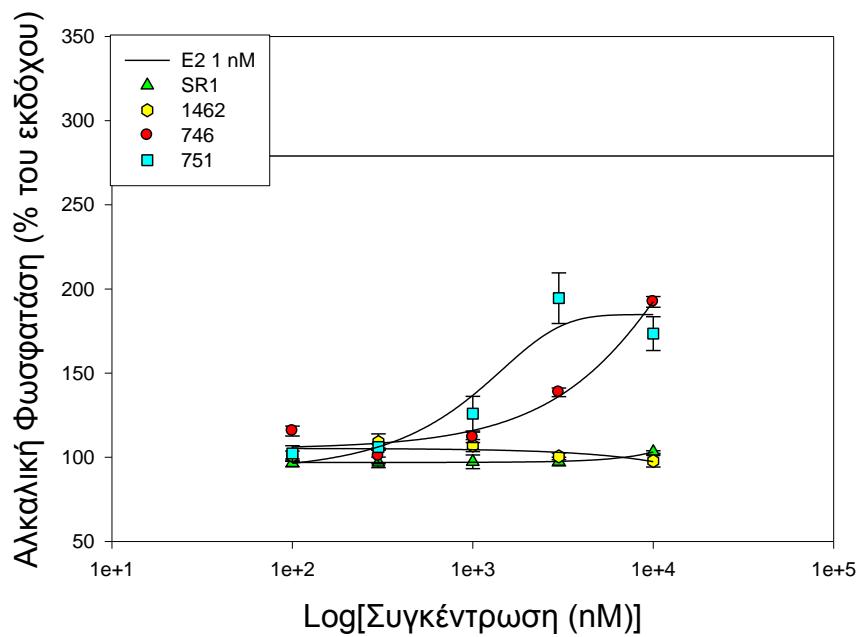
Εικόνα 10: Επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 1. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης όπως περιγράφεται στην §2.2.5. Η ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο του εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή \pm ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

Η ένωση 752 (28%) παρουσίασε μικρή οιστρογονική συμπεριφορά ενώ οι ενώσεις 753, 754 και 707 ξεκινούν να εμφανίζουν κάποιο αποτέλεσμα σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις.



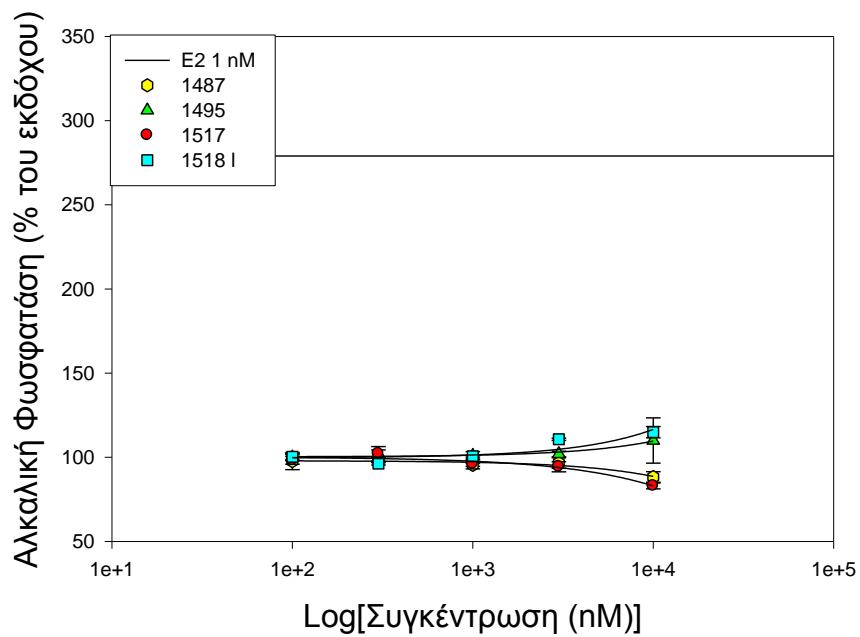
Εικόνα 11: Επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 1. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης όπως περιγράφεται στην §2.2.5. Η ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο του εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή \pm ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

Η ένωση 198 ξεκινά να εμφανίζει κάποιο αποτέλεσμα σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις ενώ οι RLM2, PBM1 και 508 δεν έχουν καμία επίδραση.



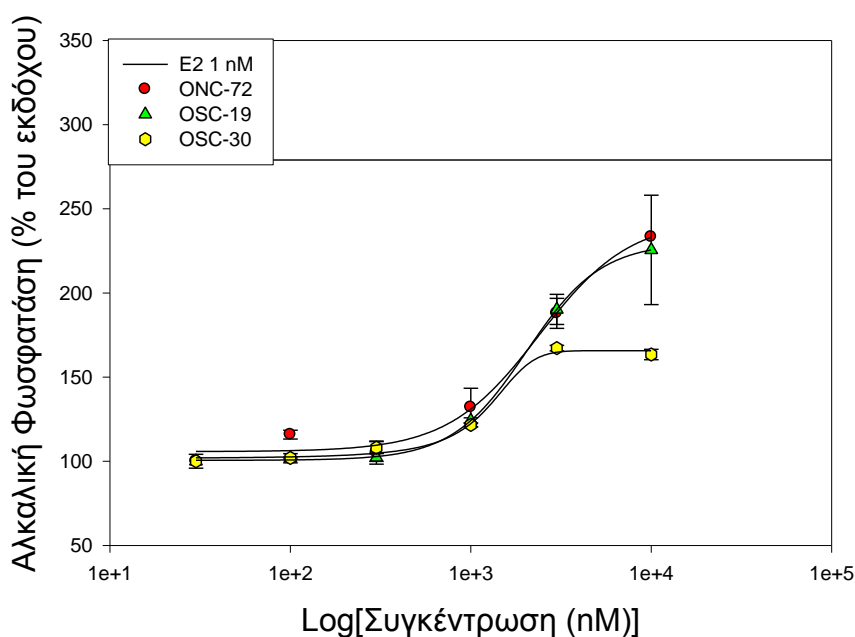
Εικόνα 12: Επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 1. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης όπως περιγράφεται στην §2.2.5. Η ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο του εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή \pm ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

Η ένωση 751 (15%) παρουσίασε μικρή οιστρογονική συμπεριφορά, η ένωση 746 ξεκινά να εμφανίζει κάποιο αποτέλεσμα σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις ενώ οι ενώσεις 1462 και SR1 δεν έχουν καμία επίδραση.



Εικόνα 13: Επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 1. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης όπως περιγράφεται στην §2.2.5. Η ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο του εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή \pm ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

Καμία ένωση δεν προκάλεσε επαγωγή της AlkP.



Εικόνα 14: Επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 1. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης όπως περιγράφεται στην §2.2.5. Η ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο του εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή \pm ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

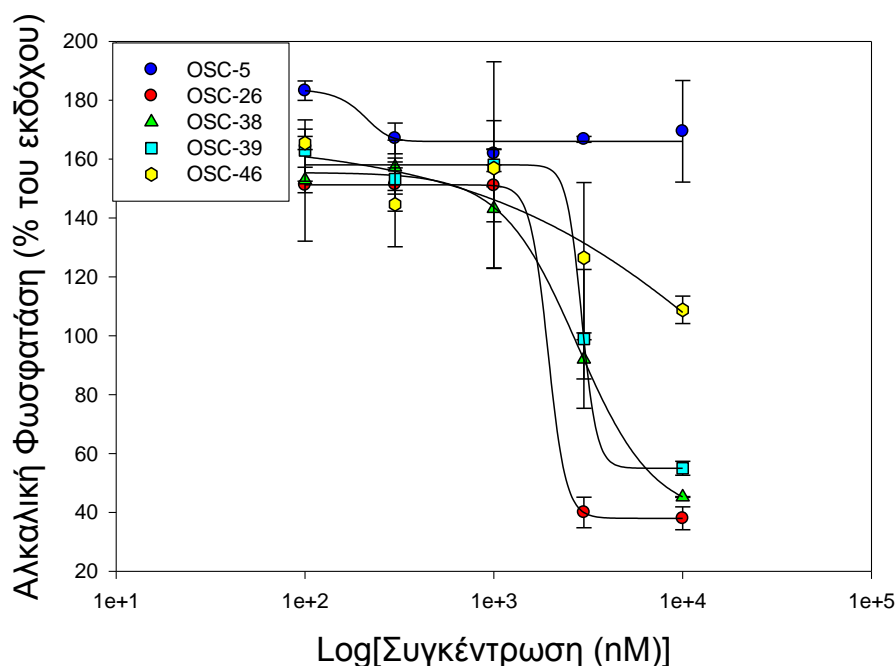
Οι τρεις ενώσεις ONC-72 (20%), OSC-19 (15%) και OSC-30 (13%) παρουσίασαν μικρή οιστρογονική συμπεριφορά.

2.3.3Αξιολόγηση αντι-οιστρογονικής δράσης επιλεγμένων ενώσεων φυσικών και συνθετικών - Καταστολή της επαγωγής της Αλκαλικής Φωσφατάσης στα Ishikawa κύτταρα .

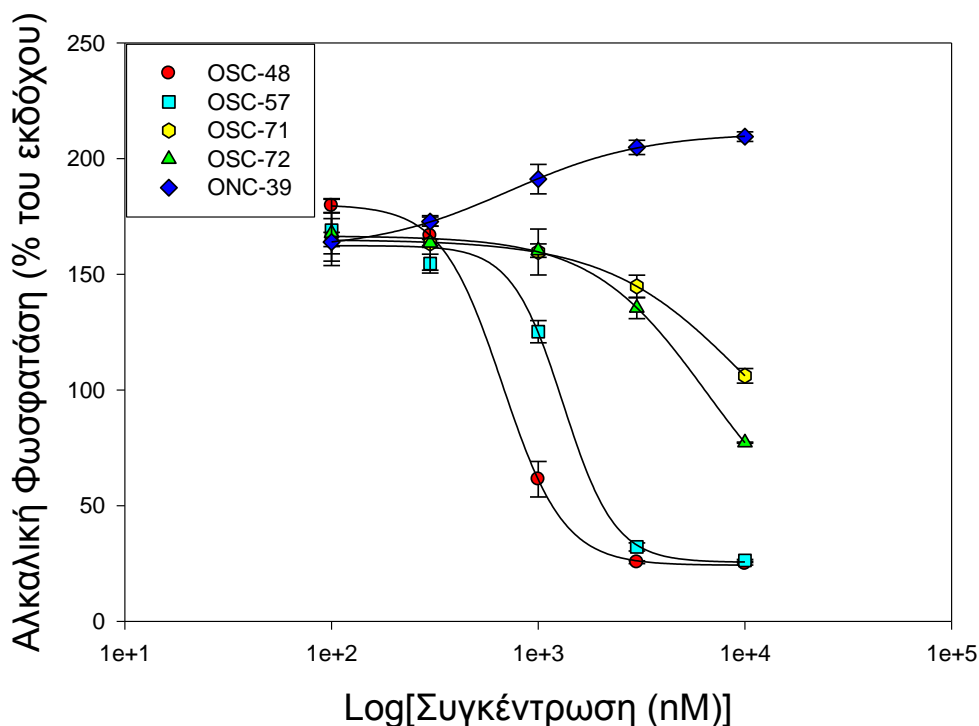
Στη συνέχεια έγιναν πειράματα δοσοαπόκρισης με 10 ενώσεις επιλεγμένες για πιθανή αντιοιστρογονική δράση, παρουσία οιστραδιόλης 0,1 nM (συγκέντρωση της ορμόνης στην κυκλοφορία γυναικών που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση), προκειμένου να επιβεβαιωθεί η δράση τους ως αντιοιστρογόνα και να διαπιστωθεί με

ποια αποτελεσματικότητα μπορούν να καταστείλουν τη δράσης της οιστραδιόλης. Επιπλέον από τα διαγράμματα υπολογίστηκε η κατασταλτική τους ικανότητα (IC50), δηλ. η συγκέντρωση στην οποία προκαλούν 50% καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης.

Στις εικόνες 15 και 16 παρουσιάζονται τα πειράματα δοσοαπόκρισης όπου εξετάζεται η καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης (0,1 nM) στην επαγωγή της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα ishikawa, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν. Οι ενώσεις OSC-38 (67%), OSC-48 (113%) και OSC-57 (68%) φαίνεται να καταστέλλουν σε μεγάλο βαθμό τη επαγωγή της AlkP από την οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 0,1nM στα κύτταρα Ishikawa.



Εικόνα 15: Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (0,1 nM) στην επαγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό MEM χωρίς κόκκινο της φαινόλης εμπλουτισμένο με 5% FBS+ 0,1 nM οιστραδιόλη. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 2. Η έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο του εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intra-assay variation).



Εικόνα 16: Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (0,1 nM) στην επαγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 15. Η έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο του εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intra-assay variation).

2.3.4 Αξιολόγηση της δράσης των ενώσεων μέσω των Οιστρογονικών Υποδοχέων ERα και ERβ

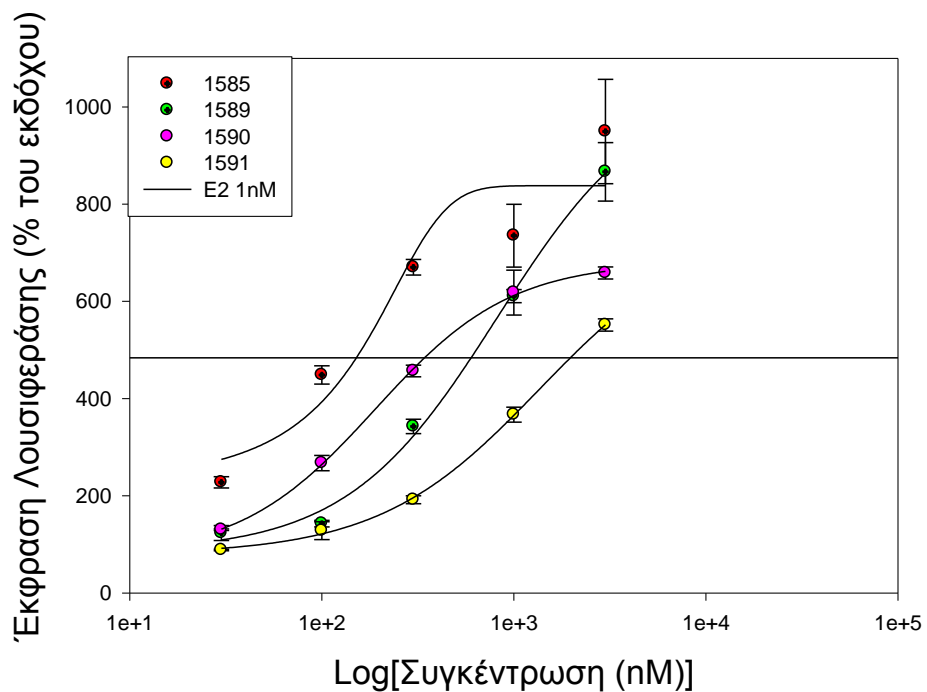
Οι φυσικές ενώσεις που εμφάνισαν οιστρογονική δράση στα κύτταρα Ishikawa ελέγχθηκαν για τη δράση τους μέσω του οιστρογονικού υποδοχέα α (ERα), χρησιμοποιώντας τα κύτταρα MCF-7:D5L (εκφράζουν ενδογενώς μόνο ERα) και μέσω του οιστρογονικού υποδοχέα β (ERβ), χρησιμοποιώντας τα κύτταρα HEK:ERβ (κύτταρα HEK293 που δεν εκφράζουν ενδογενώς κανένα από τους ER αλλά έχουν τροποποιηθεί γενετικά για να εκφράζουν τον ERβ).

Τα κύτταρα MCF-7:D5L και HEK:ERβ φέρουν μόνιμα ενσωματωμένο το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή της γλοβίνης (Glob) ή της θυμιδίνης (TK) αντίστοιχα, και ενός Στοιχείου Απόκρισης στα Οιστρογόνα (Estrogen Response Element, ERE). Αυτές οι κυτταρικές σειρές χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της δράσης των ενώσεων μέσω της ενεργοποίησης των ERα ή ERβ αντίστοιχα. Για τον έλεγχο της οιστρογονικής δράσης χρησιμοποιείται υλικό καλλιέργειας εμπλουτισμένο με ορό απαλλαγμένο από στεροειδή.

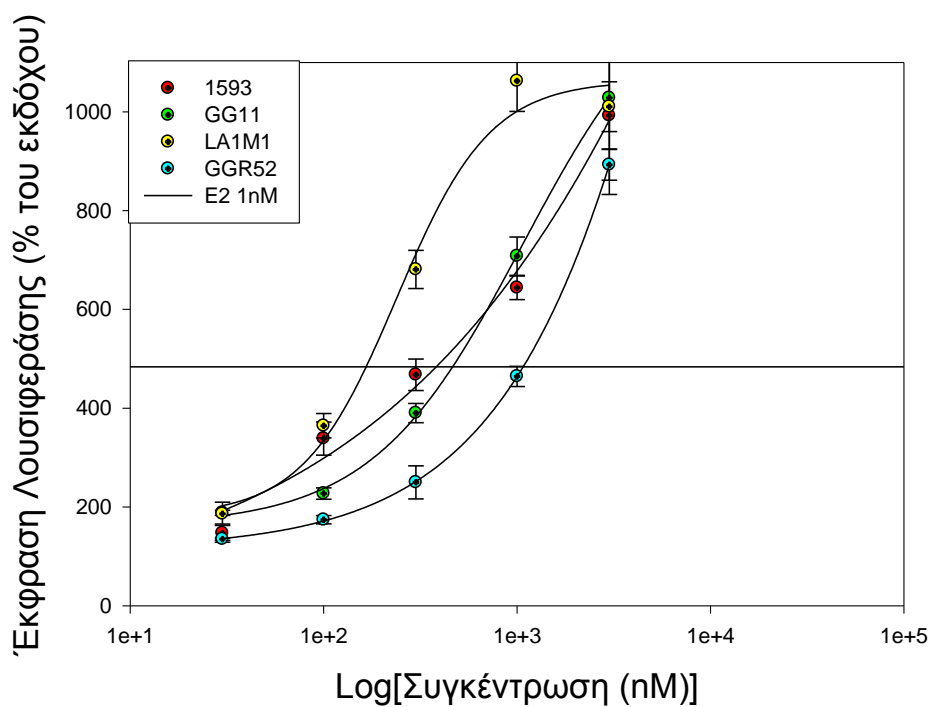
Στις Εικόνες 17-20 παρουσιάζεται η επαγωγή της Λουσιφεράσης μέσω ERα στα κύτταρα MCF-7:D5L από τις ενώσεις που εμφάνισαν οιστρογονική δράση στα κύτταρα Ishikawa. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό επί τοις εκατό (%) της επαγωγής της Λουσιφεράσης παρουσία του εκδόχου (DMSO). Η οιστραδιόλη αυξάνει την επαγωγή της Λουσιφεράσης μέσω του ERα. Οι οιστρογονικές ενώσεις που μιμούνται την δράση της οιστραδιόλης μέσω ERα χαρακτηρίζονται ως αγωνιστές του ERα δεδομένου ότι ενεργοποιούν τη μεταγραφή του. Οι αγωνιστές² ορίζονται ως ασθενικοί, μερικοί ή ισχυροί όταν σε συγκέντρωση 1 μM παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα <33%, 33-66%, ≥67, αντίστοιχα, της δράσης της οιστραδιόλης..

Συγκεκριμένα, η επαγωγή της Λουσιφεράσης που προκαλούν σε συγκέντρωση 1μM οι ενώσεις 1585 (143±3%), 1589 (123±10%), 1590 (114%), 1593 (125±5%), GG7 (112±6%), GG11 (98±24%), LA1M1 (146±29%) και η 751 (116±1%) μέσω του ERα τους κατατάσσει στους ισχυρούς αγωνιστές της οιστραδιόλης. Οι ενώσεις 1591, GGR52, καμπερόλη, GGR53 και OSC-19 προκαλούν μέτρια επαγωγή της λουσιφεράσης και εμφανίζουν μερικό αγωνισμό μέσω ERα στη συγκέντρωση του 1μM. Επιπλέον, οι ενώσεις RSM1 και ONC-72 δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική επαγωγή της λουσιφεράσης και χαρακτηρίζονται ως ασθενικοί αγωνιστές του ERα.

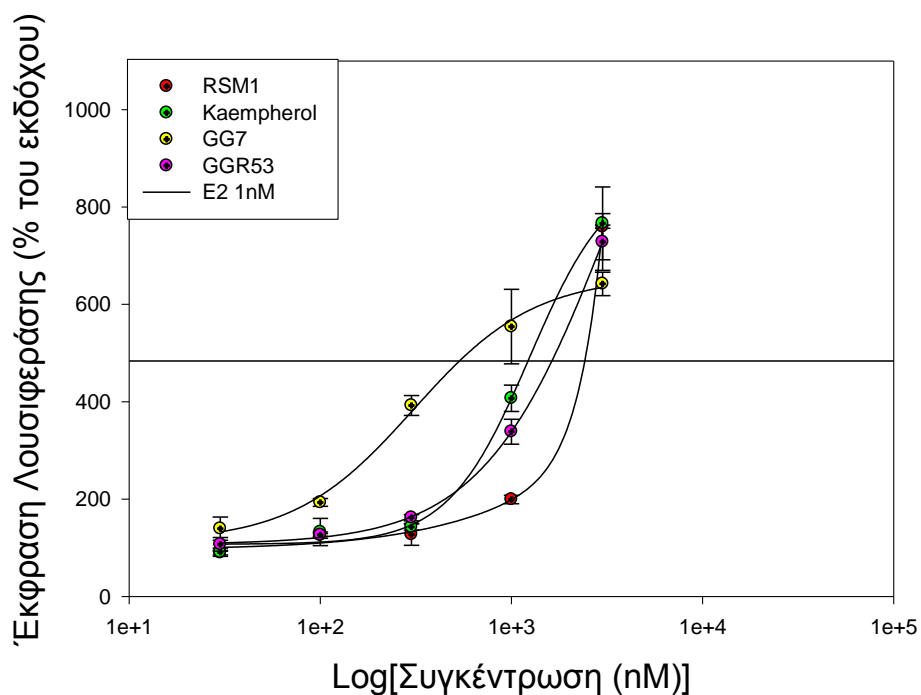
2%Αγωνισμός στους ERs, συγκριτικά με την οιστραδιόλη(E2)(1nM)=100x (%ένωσης - %εκδόχου) / (%E2 - %εκδόχου)



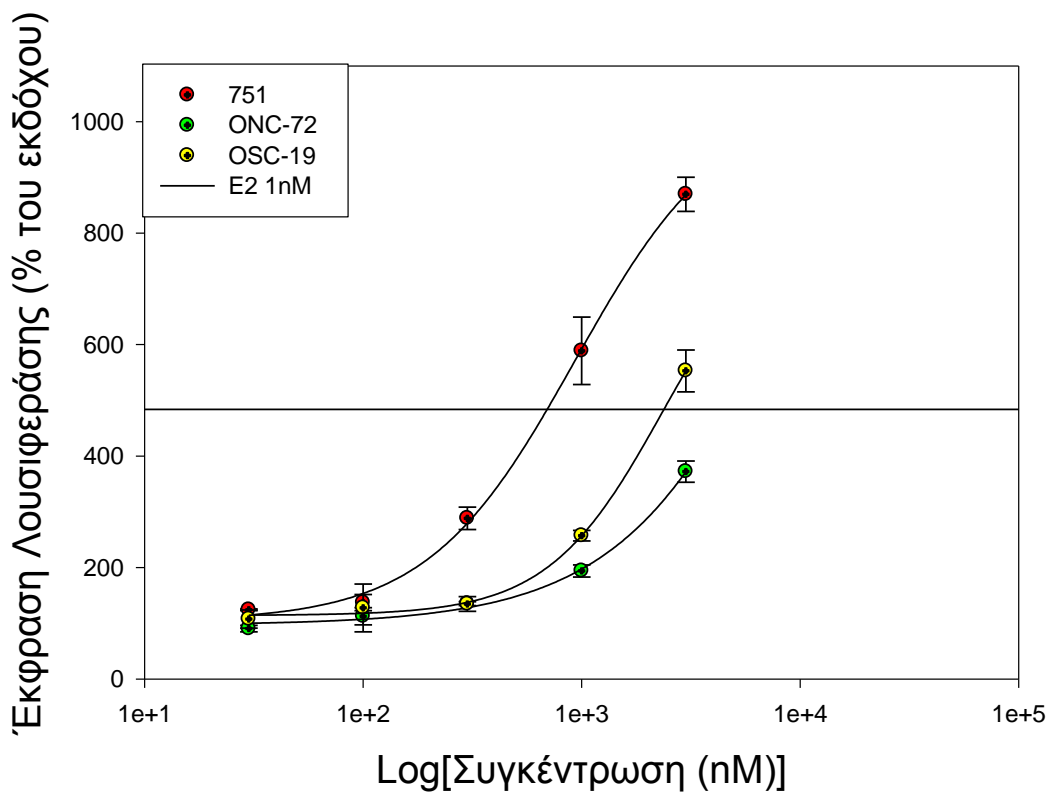
Εικόνα 17: Έλεγχος ERα αγωνισμού των ενώσεων μέσω της επαγωγής της έκφρασης λουσιφεράσης, στα κύτταρα MCF-7:D5L. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό MEM απουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% CIS. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην §2.2.6. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από ανεξάρτητα πειράματα εις τριπλούν (inter-assay variation).



Εικόνα 18: Έλεγχος του ERα αγωνισμού των ενώσεων μέσω της επαγωγής λουσιφεράσης, στα κύτταρα MCF-7:D5L. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό MEM απουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% CIS. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην §2.2.6. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από ανεξάρτητα πειράματα τριπλούν (inter-assay variation).



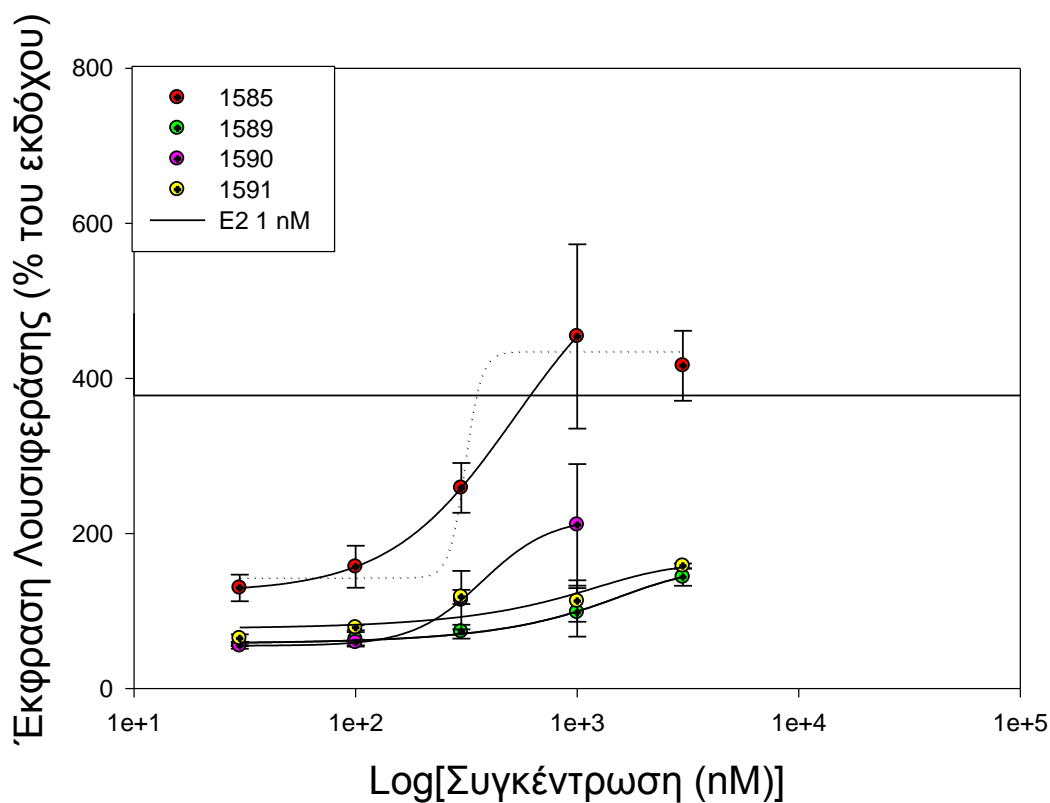
Εικόνα 19: Έλεγχος του ERα αγωνισμού των ενώσεων μέσω της επαγωγής λουσιφεράσης, στα κύτταρα MCF-7:D5L. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό MEM απουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% C1S. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην §2.2.6. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από ανεξάρτητα πειράματα τριπλούν (inter-assay variation).



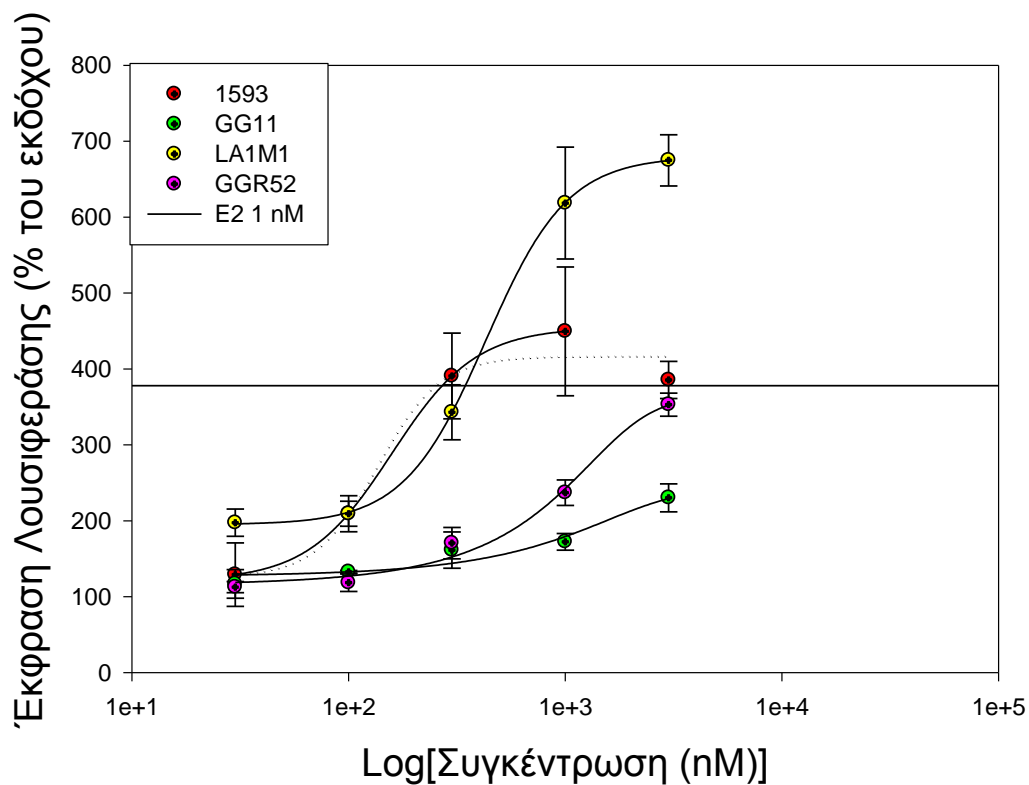
Εικόνα 20: Έλεγχος του ERα αγωνισμού των ενώσεων μέσω της επαγωγής λουσιφεράσης, στα κύτταρα MCF-7:D5L. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό MEM απουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% CIS. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην §2.2.6. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από ανεξάρτητα πειράματα εις τριπλούν (inter-assay variation).

Στις Εικόνες 21-24 παρουσιάζεται η επαγωγή της Λουσιφεράσης μέσω ERβ στα HEK:ERβ κύτταρα από τις ενώσεις που εμφάνισαν μέτρια, ισχυρή και ασθενική οιστρογονική δράση στις συγκεντρώσεις στα κύτταρα ishikawa. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό επί τοις εκατό (%) της επαγωγής της Λουσιφεράσης παρουσία του εκδόχου. Η οιστραδιόλη (1nM) αυξάνει την επαγωγή της Λουσιφεράσης μέσω του ERβ. Οι οιστρογονικές ενώσεις που μιμούνται τη δράση της οιστραδιόλη, χαρακτηρίζονται ως αγωνιστές του ERβ. Οι ERβ αγωνιστές ορίζονται ασθενικοί, μερικοί ή ισχυροί όταν σε συγκέντρωση 1 μ M παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα <33%, 33-66%, \geq 67, αντίστοιχα, της δράσης της οιστραδιόλης..

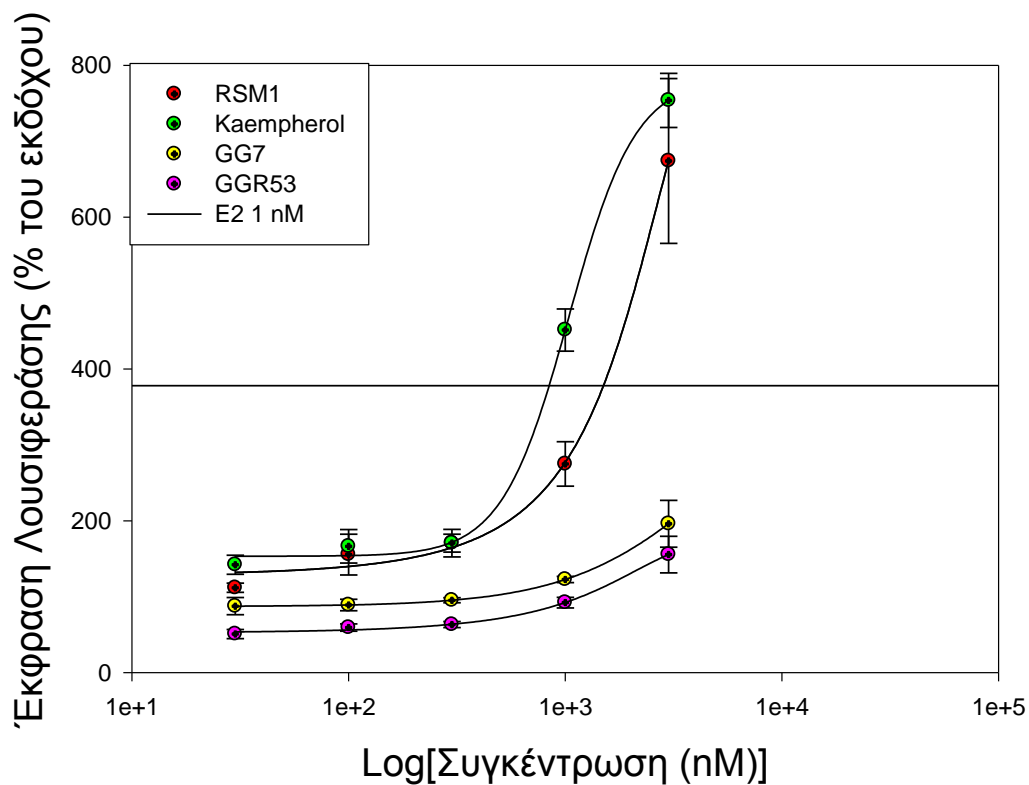
Συγκεκριμένα, η επαγωγή της λουσιφεράσης που προκαλούν οι ενώσεις(σε συγκ. 1 μ M) 1585 (135 \pm 25%) , 1593 (131 \pm 26%), LA1M1 (109 \pm 10%),καμπερόλη (74 \pm 7%)και OSC-19 (71 \pm 1%) μέσω του ER β τους κατατάσσει στους ισχυρούς αγωνιστές της οιστραδιόλης. Οι ενώσεις 1590, GGR52, και 751 προκαλούν μέτρια επαγωγή της λουσιφεράσης και εμφανίζουν μερικό αγωνισμό μέσω ER β στη συγκέντρωση του 1 μ M. Επιπλέον, οι ενώσεις 1591 και GG7, GG11, RSM1, καιONC-72 δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική επαγωγή της λουσιφεράσης και χαρακτηρίζονται ως ασθενικοί αγωνιστές του ER β . Ενώ οι ενώσεις 1589 και GGR53 δεν εμφανίζουν καμία επαγωγή της λουσιφεράσης.



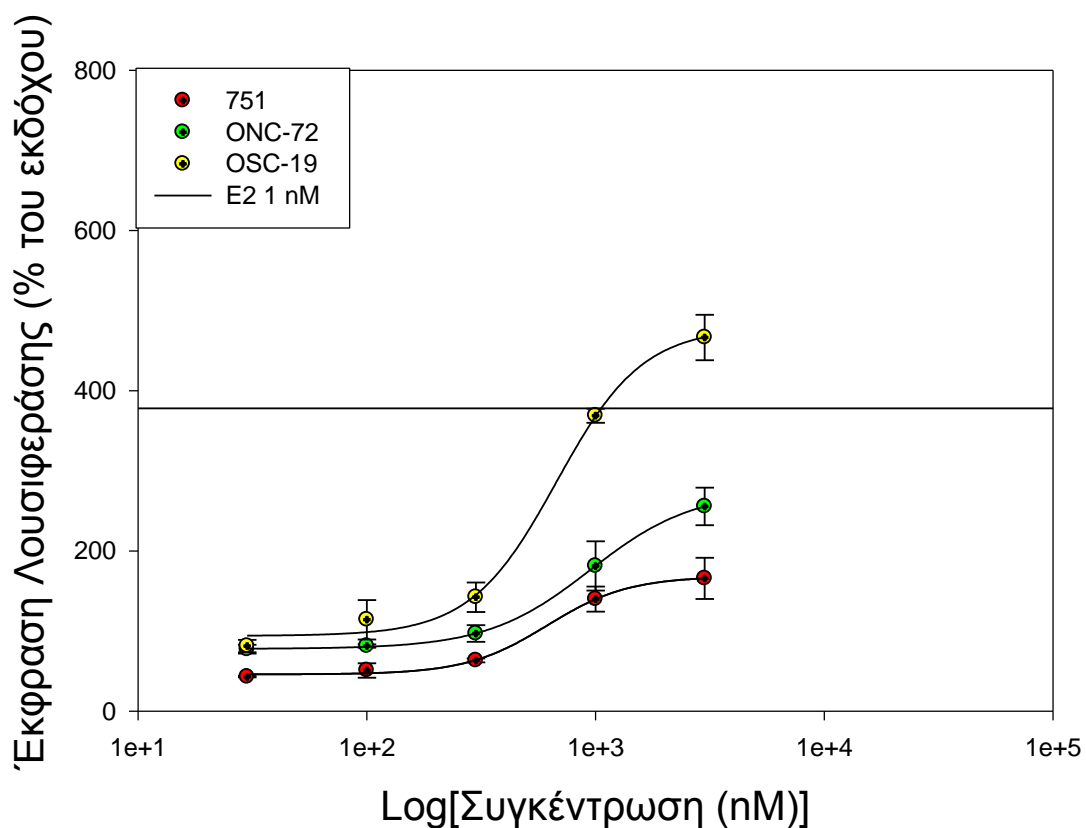
Εικόνα 21:Έλεγχος του ER β αγωνισμού των ενώσεων μέσω της επαγωγής της έκφρασης λουσιφεράσης στα κύτταρα HEK:ER β 1. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό DMEM παρουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% CIS. Μετά από 72 h καλλιέργειας γίνεται η προσθήκη των ενώσεων και ακολουθεί επώαση 16-20 h. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης λουσιφεράσης όπως περιγράφεται στην § 2.2.6. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή \pm ΣΣΜΤ, από ανεξάρτητα πειράματα εις τριπλούν (inter-assay variation).



Εικόνα 22: Έλεγχος του ERβ αγωνισμού των ενώσεων μέσω της επαγωγής της έκφρασης λουσιφεράσης στα κύτταρα HEK:ERβ1. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό DMEM παρουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% CIS. Μετά από 72 h καλλιέργειας γίνεται η προσθήκη των ενώσεων και ακολουθεί επώαση 16-20 h. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης λουσιφεράσης όπως περιγράφεται στην § 2.2.6. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από ανεξάρτητα πειράματα εις τριπλούν (inter-assay variation).



Εικόνα 23: Έλεγχος του ERβ αγωνισμού των ενώσεων μέσω της επαγωγής της έκφρασης λουσιφεράσης στα κύτταρα HEK:ERβ1. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό DMEM παρουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% CIS. Μετά από 72 h καλλιέργειας γίνεται η προσθήκη των ενώσεων και ακολουθεί επώαση 16-20 h. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης λουσιφεράσης όπως περιγράφεται στην § 2.2.6. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από ανεξάρτητα πειράματα εις τριπλούν (inter-assay variation).



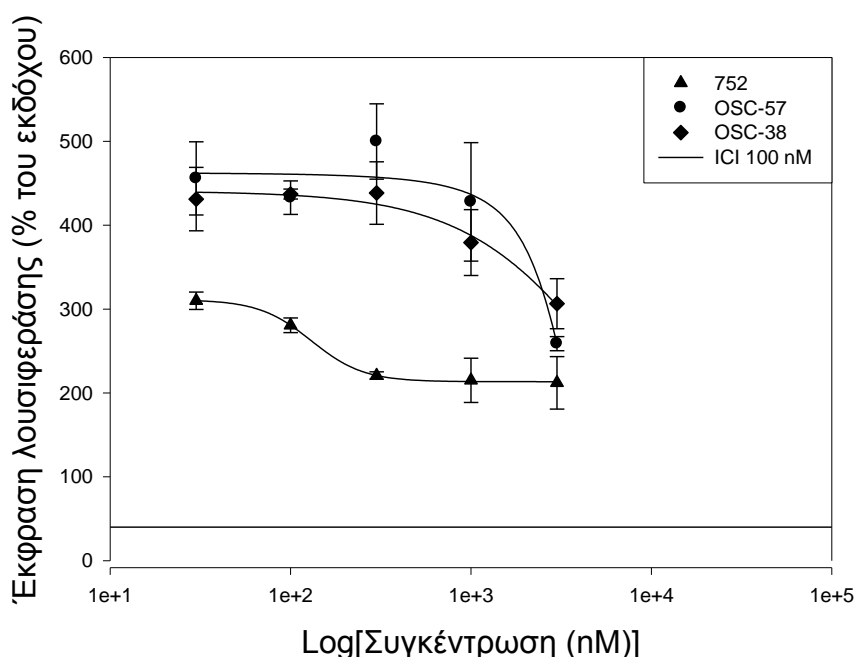
Εικόνα 24: Έλεγχος του ERβ αγωνισμού των ενώσεων μέσω της επαγωγής της έκφρασης λουσιφεράσης στα κύτταρα HEK:ERβ1. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό DMEM παρουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% CIS. Μετά από 72 h καλλιέργειας γίνεται η προσθήκη των ενώσεων και ακολουθεί επώαση 16-20 h. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης λουσιφεράσης όπως περιγράφεται στην § 2.2.6. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από ανεξάρτητα πειράματα εις τριπλούν (inter-assay variation).

Στη συνέχεια οι ενώσεις που εμφάνισαν αντιοιστρογονική δράση στα κύτταρα Ishikawa καθώς και ορισμένες επιπλέον ελέγχθηκαν για δράση τους ανταγωνισμού της οιστραδιόλης (0,1nM) μέσω του ERα, χρησιμοποιώντας τα κύτταρα MCF-7:D5L και μέσω του ERβ, χρησιμοποιώντας τα κύτταρα HEK:ERβ.

Στην Εικόνα 25 παρουσιάζεται η καταστολή της επαγωγής, από την οιστραδιόλη (0,1M) της έκφρασης της λουσιφεράσης, μέσω ERα στα κύτταρα MCF-7:D5L από τρεις από τις υπό εξέταση ενώσεις. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό επί τοις εκατό (%) της επαγωγής της λουσιφεράσης παρουσία του εκδόχου. Η οιστραδιόλη αυξάνει την επαγωγή της λουσιφεράσης μέσω του ERα. Αντιθέτως,

το ICI που δρα ως αντι-οιστρογόνο, δεν προκαλεί την επαγωγή της λουσιφεράσης. Οι ενώσεις που καταστέλλουν την επαγόμενη από την οιστραδιόλη(0,1 nM) λουσιφεράση μέσω ERα χαρακτηρίζονται ως ανταγωνιστές και αναστέλλουν τη μεταγραφή. Οι ανταγωνιστές³ ορίζονται ως ασθενικοί, μερικοί ή ισχυροί όταν σε συγκέντρωση 1 μM παρουσιάζουν κατασταλτική αποτελεσματικότητα <33%, 33-66%, ≥67, αντίστοιχα.

Από τα αποτελέσματα της Εικόνας 25 προκύπτει ότι, η καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης (0,1nM) που προκαλεί η ένωση 752 (±13%) μέσω του ERα την κατατάσσει στους μερικούς ανταγωνιστές της οιστραδιόλης. Επιπλέον, οι ενώσεις OSC-38 (18±5%) και OSC-57 (13%) δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης (0,1nM) και χαρακτηρίζονται ως ασθενικοί ανταγωνιστές του ERα. Οι υπόλοιπες ενώσεις δεν εμφανίζουν καμία καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης.



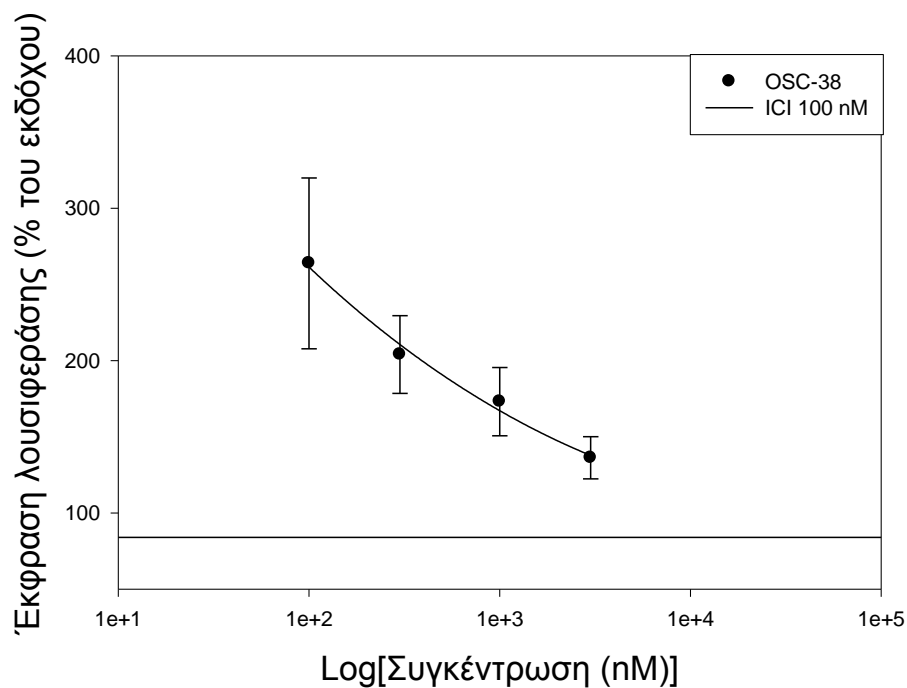
Εικόνα 25: Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (0,1 nM) στην επαγωγή της έκφρασης λουσιφεράσης, στα κύτταρα MCF-7:D5L. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό MEM απουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% FBS + 0,1 nM οιστραδιόλης. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 17. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο του εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 2 ανεξάρτητα πειράματα (interassay variation).

$$3\% \text{Ανταγωνισμός στους ERs, συγκριτικά με το ICI}(1\text{nM}) = (\Delta_{E2} - \Delta_{E2+ \text{ένωση}}) * 100 / (\Delta_{E2} - \Delta_{DMSO})$$

Στην Εικόνα 26 παρουσιάζεται η καταστολή της επαγωγής, από την οιστραδιόλη (0,1nM) της έκφρασης της λουσιφεράσης, μέσω ERβ στα κύτταρα HEK:ERβ από τη μόνη από τις υπό εξέταση ενώσεις που παρουσίασε ανταγωνιστική δράση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό επί τοις εκατό (%) της επαγωγής της λουσιφεράσης παρουσία του εκδόχου. Η οιστραδιόλης αυξάνει την επαγωγή της λουσιφεράσης μέσω του ERβ. Αντιθέτως, το ICI που δρα ως αντι-οιστρογόνο, δεν προκαλεί την επαγωγή της λουσιφεράσης. Οι ενώσεις που καταστέλλουν την επαγόμενη από την οιστραδιόλη (0,1 nM) λουσιφεράση μέσω ERβ χαρακτηρίζονται ως ανταγωνιστές και αναστέλλουν τη μεταγραφή. Οι ανταγωνιστές⁴ ορίζονται ως ασθενικοί, μερικοί ή ισχυροί όταν σε συγκέντρωση 1 μM παρουσιάζουν κατασταλτική αποτελεσματικότητα <33%, 33-66%, ≥67, αντίστοιχα.

Από τα αποτελέσματα της Εικόνας 26 προκύπτει ότι, η καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης (0,1nM) που προκαλεί η ένωση OSC-38 (61±21%) την κατατάσσει στους μερικούς ανταγωνιστές του ERβ. Οι υπόλοιπες ενώσεις δεν εμφανίζουν καμία καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης.

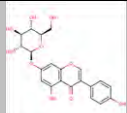
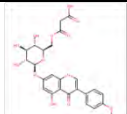
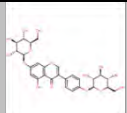
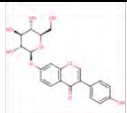
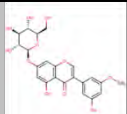
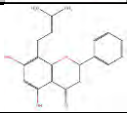
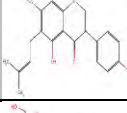
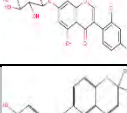
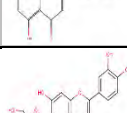
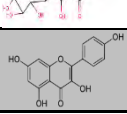
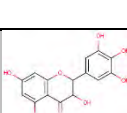
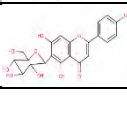

⁴%Ανταγωνισμός στους ERs, συγκριτικά με το ICI (1nM)= $(\Delta_{E2} - \Delta_{E2+ \text{ένωση}}) * 100 / (\Delta_{E2} - \Delta_{DMSO})$

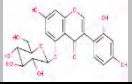
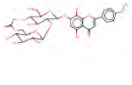
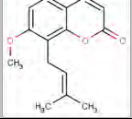
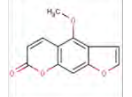
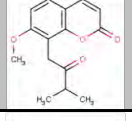
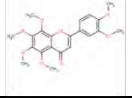
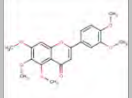
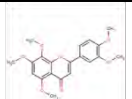
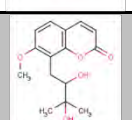
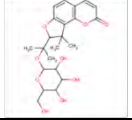
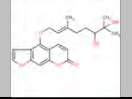
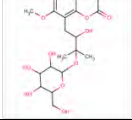
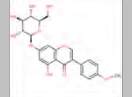
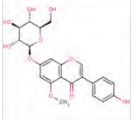
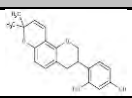


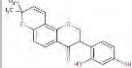
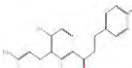
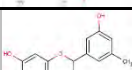
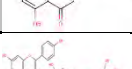
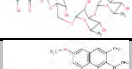
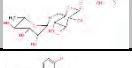
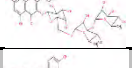
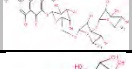
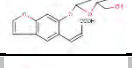
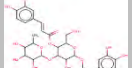
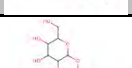
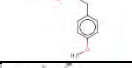
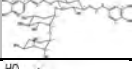
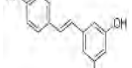
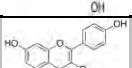
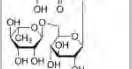
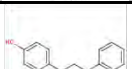
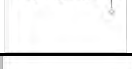
Εικόνα 26: Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (0,1 nM) στην επαγωγή της έκφρασης λουσιφεράσης στα κύτταρα HEK:ERβ1. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 21. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο εκδόχου (DMSO). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 2 ανεξάρτητα πειράματα (interassay variation).

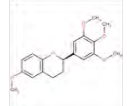
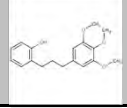
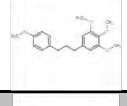
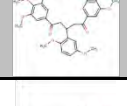
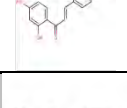
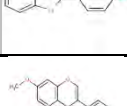
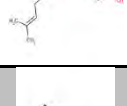
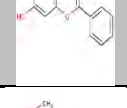
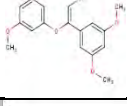
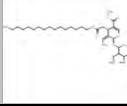
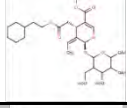
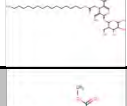
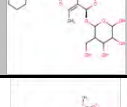
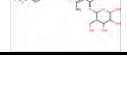
Ο Πίνακας 1 συνοψίζει τα αποτελέσματα από τα πειράματα που περιγράφονται στις Εικόνες (1-26) και απεικονίζει την κατάταξη όλων των ενώσεων που μελετήθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητά τους να δρουν ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές της οιστραδιόλης στις 3 κυτταρικές σειρές (MCF-7:D5L, HEK:ERβ και Ishikawa).

Πίνακας 1: Αποτελεσματικότητα γνωστών και νέων ενώσεων με οιστρογονική ή αντι-οιστρογονική δράση.

ΕΝΩΣΕΙΣ	ΔΟΜΕΣ	Έκφραση Λουσιφεράσης (MCF-7:D5L)		Έκφραση Λουσιφεράσης (HEK:ERβ)		Έκφραση ΑλκΦ (Ishikawa)	
		ΑΓΩΝΙΣΜΟΣ (% του DMSO)	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΣ (% του DMSO) Οιστραδιόλη 0,1nM	ΑΓΩΝΙΣΜΟΣ (% του DMSO)	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΣ (% του DMSO) Οιστραδιόλη 0,1nM	ΑΓΩΝΙΣΜΟΣ (% του DMSO)	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΣ (% του DMSO) Οιστραδιόλη 0,1nM
1585		143±3 (ι)		135±25 (ι)		97 (ι)	
1589		123±10 (ι)		0		48 (μ)	
1590		114 (ι)		56±6 (μ)		116 (ι)	
1591		56±3 (μ)		6 (α)		96 (ι)	
1593		125±5 (ι)		131±26 (ι)		179 (ι)	
GG7		112±6 (ι)	0	6 (α)	41±40 (μ)	53 (μ)	
GG11		98±24 (ι)		6 (α)		71 (ι)	
LA1M1		146±29 (ι)		109±10 (ι)		113 (ι)	
GGR52		56±12 (μ)	0	33±7 (μ)	0	28 (α)	
PBM2						0	
Kaempferol		56±19 (μ)	0	74±7 (ι)	0	15(α)	
RSM1		14±2 (α)	26±15 (α)	30±4 (α)	2 (α)	16 (α)	
RSM4						10 (α)	
PBM3						3 (α)	

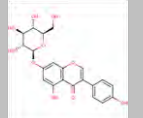
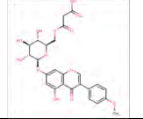
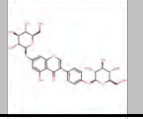
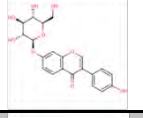
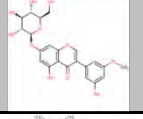
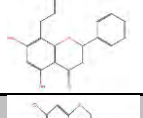
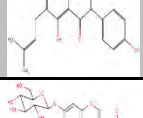
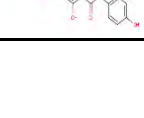
LA1M2						0	
515						0	
1519						2 (α)	
1520						0	
1521						2 (α)	
1522						2 (α)	
1523						0	
1524						0	
1525						0	
1526						14 (α)	
1527						5 (α)	
1528						2 (α)	
1586						0	
1587						7 (α)	
GG1						11 (α)	
GGR35						6 (α)	

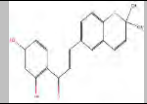
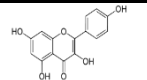
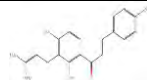
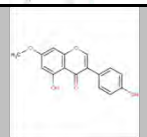
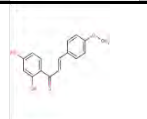
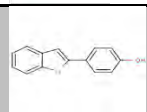
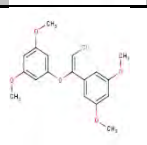
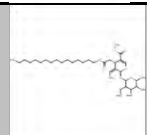
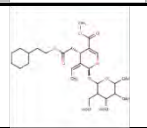
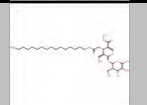
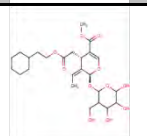
GGR36						2 (α)	
GGR53		59±3 (μ)	0	0	16±3 (α)	29 (α)	
RLE1						5 (α)	
RSM2						2 (α)	
RSM3						0	
RLM1						0	
RLM2						0	
PBM1						1 (α)	
508						0	
517						0	
SR1						0	
198						0	
1462						3 (α)	
746						7 (α)	
751		116±1 (ι)	6 (α)	35±24 (μ)	0	15 (α)	
752			13 (α)		90±4 (ι)	28 (α)	
753						0	
754						5 (α)	
707						10 (α)	

1487						0	
1495						1(α)	
1517						0	
1518						0	
ONC-72 , 1335		29±7 (α)	43±2 (μ)	28±7 (α)	59±27 (μ)	20(α)	
OSC-19 , 665		46±9 (μ)	31±30 (α)	71±1 (ι)	86 (ι)	15(α)	
OSC-30 , 770			0		102±6 (ι)	13 (α)	
OSC-5 , 523							50 (μ)
OSC-26 , 731			17±3 (α)		0		53 (μ)
OSC-38 , 1188			18±5 (α)		61±21 (μ)		67 (ι)
OSC-39 , 1189			0		0		0
OSC-46 , 1196							54 (μ)
OSC-48 , 1198			26±2 (α)		73±12 (ι)		113 (ι)
OSC-57 , 1250			13 (α)		45±26 (μ)		68 (ι)
OSC-71 , 1320							44 (μ)

OSC-72 , 1321							43 (μ)
ONC-39 , SEP9							21 (α)

Με βάση τα πειράματα δοσο-απόκρισης που έγιναν υπολογίστηκε το EC50 των ενώσεων που εμφάνισαν ισχυρό, μερικό ή ασθενικό αγωνισμό στις 3 κυτταρικές σειρές (Πίνακας 2). Όσο μικρότερη είναι η τιμή EC50 μιας ένωσης, τόσο μικρότερη συγκέντρωση της εν λόγω ένωσης απαιτείται ώστε να προκαλέσει το μέγιστο δυνατό αποτέλεσμα και επομένως τόσο περισσότερο δραστική είναι. Όσον αφορά τους ανταγωνισμούς στις 3 κυτταρικές σειρές δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός της τιμής IC50 από τα διαγράμματα στα κύτταρα MCF-7:D5L, και HEK:ERβ αλλά μπόρεσε να προσδιοριστεί η τιμή IC50 για ορισμένες ενώσεις που εμφάνισαν αντι-οιστρογονική δράση στα κύτταρα Ishikawa.

ΕΝΩΣΕΙΣ	ΔΟΜΕΣ	Έκφραση Λουσιφεράσης (MCF-7:D5L)		Έκφραση Λουσιφεράσης (HEK:ERβ)		Έκφραση ΑλκΦ (Ishikawa)				ΜΤΤ (HT-22)		
		ΑΓΩΝΙΣΜΟΣ		ΑΓΩΝΙΣΜΟΣ		ΑΓΩΝΙΣΜΟΣ		ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΣ		ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ-ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ % (10μΜ)	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ-ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ% (1μΜ)	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ-ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ% (0,1μΜ)
		Αποτελεσματικότητα	EC50 (nM)	Αποτελεσματικότητα	EC50 (nM)	Αποτελεσματικότητα	EC50 (nM)	Αποτελεσματικότητα	EC50 (nM)			
1585		143±3 (ι)	115,2	135±25 (ι)	237,35	97 (ι)	129,91			2%		
1589		123±10 (ι)	487,59	0	-	48 (μ)	1072,39			11%		
1590		114 (ι)	147,09	56±6 (μ)	275,94	116 (ι)	72,08			10%		
1591		56±3 (μ)	568,39	6 (α)	-	96 (ι)	650,12			9%		
1593		125±5 (ι)	400,05	131±26 (ι)	110,21	179 (ι)	180,16			5%		
GG7		112±6 (ι)	213,14	6 (α)	-	53 (μ)	-			3%		
GG11		98±24 (ι)	514,63	6 (α)	-	71 (ι)	560,29			10%		
LA1M1		146±29 (ι)	187,93	109±10 (ι)	294,65	113 (ι)	298,65			4%		

GGR52		56±12 (μ)	931,77	33±7 (μ)	487,59	28 (α)	-			4%		
Kaempferol		56±19 (μ)	931,77	74±7 (l)	821,52	15(α)				77%	28%	0
RSM1		14±2 (α)	-	30±4 (α)	-	16 (α)	599,76			77%	52%	43%
GGR53		59±3 (μ)	1110,41	0	-	29 (α)	-			6		
751		116±1 (l)	583,69	35±24 (μ)	437,7	15 (α)	-			0		
ONC-72 , 1335		29±7 (α)	-	28±7 (α)	-	20(α)	550,29			3%		
OSC-19 , 665		46±9 (μ)	1095,52	71±1 (l)	528,98	15(α)	695,35			62%	26,50%	0
OSC-26 , 731								53 (μ)	2090,8	16%		
OSC-38 , 1188		18±5 (α)		61±21 (μ)				67 (l)	3785,51	0		
OSC-39 1189		-			-					0		
OSC-48 , 1198								113 (l)	749,89	6%		
OSC-57 , 1250		13 (α)						68 (l)	1470,37	0		

Πίνακας 2:Αποτελεσματικότητα και ικανότητα (EC50-IC50) των ενώσεων που μιμούνται τη δράση της οιστραδιόλης ή καταστέλουν τη δράση της, δρώντας ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές αντίστοιχα.Αντιοξειδωτική δράση- Νευροπροστασία των επιλεγμένων ενώσεων σε συγκεντρώσεις 10,1 και 0,1μM.EC50/IC50 είναι η συγκέντρωση στην οποία προκαλούν το 50% του μέγιστου δυνατού αποτελέσματος.

3.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με δεδομένο το ότι η έλλειψη οιστρογόνων και το οξειδωτικό στρες συσχετίζονται με την εμφάνιση δυσάρεστων εμμηνοπαυσιακών συμπτωμάτων, και ότι πολλές πολυφαινόλες έχουν εκτός της αντιοξειδωτικής και οιστρογονική δράση, ελέγξαμε με ειδικές κυτταρικές δοκιμασίες την αντιοξειδωτική, οιστρογονική και μεταγραφική δράση 53 πολυφαινολών φυτικής προέλευσης καθώς και 11 συνθετικών. Διαπιστώσαμε ότι:

- Από τις 15 ενώσεις που εμφάνισαν οιστρογονική δράση στα κύτταρα Ishikawa και επιλέχθηκαν να αξιολογηθούν εάν είναι αγωνιστές του ERα (MCF-7:D5L) ή/και του ERβ (HEK:ERβ), οι 8 ενώσεις 1585, 1590, 1593, LA1M1, 751, GGR52, Kaempferol και OSC-19 ήταν μερικοί ή ισχυροί αγωνιστές του ERα και επίσης μερικοί ή ισχυροί αγωνιστές του ERβ.
- Επιπλέον, 5 ενώσεις 1589, 1591, GG7, GG11 και GGR53 βρέθηκαν ισχυροί ή μερικοί αγωνιστές του ERα αλλά είχαν πολύ ασθενική ή καμία επίδραση στον ERβ. Έτσι αποδεικνύεται ότι όλοι οι αγωνιστές του ERβ είναι και αγωνιστές ERα, ενώ δεν συμβαίνει το αντίστροφο. Αυτό πιθανότατα είναι αποτέλεσμα της διαφοράς μεγέθους στην περιοχή σύνδεσης προσδέματος των δυο υποδοχέων. Είναι γνωστό ότι η περιοχή σύνδεσης προσδέματος του ERα είναι μεγαλύτερη σε σχέση με του ERβ με αποτέλεσμα να είναι ευκολότερο για μια ένωση να προσδεθεί στον πρώτο σε σχέση με τον δεύτερο.
- Επίσης, 2 ενώσεις RSM1(μερικώς καθαρή καμπφερόλη) και ONC-72 εμφάνισαν πολύ ασθενικό αγωνισμό τόσο μέσω ERα όσο και μέσω ERβ.
- Η καμπφερόλη και η OSC-19 οι οποίες εμφάνισαν αντιοξειδωτική δράση και στη συγκέντρωση των 1 μM δρουν ως σημαντικοί αγωνιστές των ERs και συγκεκριμένα οι μόνες που εμφανίζουν ισχυρό αγωνισμό μέσω ERβ και μερικό μέσω ERα. Αυτό υποδηλώνει πως ο συνδυασμός αντιοξειδωτικής και επιλεκτικής αγωνιστικής δράσης μέσω ERβ είναι πιθανό να προσφέρει αυξημένη νευροπροστασία. .

- Η ένωση RSM1, η οποία μελετήθηκε και ως προς την αντιοξειδωτική της δράση στα κύτταρα HT-22 τα οποία εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς ERs, βρέθηκε να έχει προστατευτικό ρόλο για τα κύτταρα ακόμα και στη συγκέντρωση των 0,1 μ M. Ωστόσο, βρέθηκε πολύ ασθενικός αγωνιστής και για τους δύο υποδοχείς αλλά και στα κύτταρα Ishikawa εμφάνισε μικρή οιστρογονική δράση. Επομένως, είναι πιθανό η αντιοξειδωτική της δράση να οφείλεται σε κάποια πρόσμιξη και να μην αφορά στην ίδια την καμπερόλη με τους οιστρογονικούς υποδοχείς.
- Όσον αφορά τον ανταγωνισμό μέσω ERs μόνο η ένωση OSC-38 εμφάνισε μερικό ανταγωνισμό μέσω και των δύο υποδοχέων οιστρογόνων σε αρμονία με την αντιοιστρογονική της δράση στα κύτταρα Ishikawa. Αντίθετα οι αντιοιστρογονικές ενώσεις OSC-26, OSC-39, OSC-48 και OSC-57 δεν εμφάνισαν δράση μέσω ER. Επομένως η καταστολή της ορμονικής επαγωγής της έκφρασης της AlkP δεν συναρτάται μόνο με την ικανότητα πρόσδεσης στον αντίστοιχο υποδοχέα αλλά και από άλλες παραμέτρους.

Από τα παραπάνω ευρήματα προκύπτει ότι οι ενώσεις που πιθανόν θα μπορούσαν να αποτελέσουν αντικείμενο περαιτέρω έρευνας προκειμένου να επιβεβαιωθεί η νευροπροστατευτική τους δράση ως αποτέλεσμα συνδυασμού επιλεκτικού αγωνισμού του ER β και αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι η καμπερόλη και η ένωση OSC-19.

4.Βιβλιογραφία

Ana C.Moreira AnaM.Silva , MariaS.Santos, VilmaA.Sardão. Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 143 (2014) 61–71

Andersen JK. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence. *Nature Reviews Neuroscience*. 5, S18-S25(a).

Barnham, K.J. Masters, C.L., Bush, A. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 3, 205- 214.

Barkhem, T., Carlsson, B., Nilsson, Y., et al. (1998). Differential response of estrogen receptor a and estrogen receptor b to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol*.54,105—112.

Bedell, S., Nachtigall, M., Naftolin, F.The pros and cons of plant estrogens for menopause.*J Steroid Biochem Mol Biol*. **2014**, 139:225-36.

Behl, C. (2003). Estrogen can protect neurons: modes of action *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* .83, 195—197.

Berry, M., Metzger, D., Chambon, P. (1990).Role of the two activating domains of the estrogen receptor in the cell-type and promoter context dependent agonistic activity of the anti-estrogen 4-hydroxytamoxifen.*EMBO J*. **9**,2811-2818.

Bolger, R. et al. Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ Health Perspect* 1998, 106, 551-7.

Brzezinski, A., Debi, A. Phytoestrogens: the natural selective estrogen receptor modulators. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology.* **1999**, 85: 47–51.

Brzozowski, A. M. et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 1997, 389, 753-8.

Carson-Jurica, M. A. et al. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev* 1990, 11, 201-20.

Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, SA., et al. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev.* **2006**, 58:773–81.

Frasor, J., Barnett, DH., Danes, JM., Hess, R., Parlow, AF., Katzenellenbogen, BS. Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) alpha activity by ERbeta in the uterus. *Endocrinology.* **2003**, 144:3159-3166

Hamilton, KJ., Arao, Y., Korach, KS. Estrogen hormone physiology: reproductive findings from estrogen receptor mutant mice. *Reprod Biol.* **2014**, 14:3-8.

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* **2007 Jul**;87(3):905-31.

Hewitt, SC., Winuthayanon, W., Pockette, B., Kerns, RT., Foley, JF., Flagler, N., Ney, E., Suksamrarn, A., Piyachaturawat, P., Bushel, P.R, Korach KS. Development of phenotypic and transcriptional biomarkers to evaluate relative activity of potentially estrogenic chemicals in ovariectomized mice. *Environ Health Perspect.* **2015**, *123*, 344-352.

Johnson, S. M. et al. Ishikawa cells exhibit differential gene expression profiles in response to oestradiol or 4-hydroxytamoxifen, *Endocr Relat Cancer* 2007, *14*, 337–350.

Job Tchoumtchoua, et al.. Estrogenic activity of isoflavonoids from the stem bark of the tropical tree *Amphimas pterocarpoides*, a source of traditional medicines. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 158 (2016) 138–148.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D., Chambon, P. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogenactivated protein kinase. *Science.* **270**, 1491-1494.

Katzenellenbogen, BS., Choi, I., Delage-Mourroux, R., et al. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **2000**, *74*:279–85.

Kraus, WL., McInerney, EM., Katzenellenbogen, BS. (1995). Ligand-dependent transcriptionally productive association of the amino- and carboxy-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**, 12314-12318.

Lagari VS., Levis S. Phytoestrogens for menopausal bone loss and climacteric symptoms. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **2014**, *139*:294-301.

Luisi, B.F., Xu, W.X., Otwinowski, Z., Freedman, L.P., Yamamoto, K.R., Sigler, P.B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature.* **352**, 497 | 505.

Mate J. M., & Perez-gomez, C. Nunez de Castro I. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*.**1999**, 32(8): 595-603.

Mirkin S, Pickarb JH. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): A review of clinical data.*Maturitas*.**2015**, 80(1):52-7.

Mclnerney, EM., Katzenellenbogen, BS. (1996). Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen-and estradioldependent transcription activation. *J Biol Chem*. **271**, 24172-24178.

Mclnerney, EM., Weis, KE., Sim, J., Mosselman, S., Katzenellenbogen, BS. (1998). Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras. *Endocrinology*.**139**, 4513-4522.

Moore, J. T. et al. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms.*Biochem Biophys Res Commun* 1998, 247, 75-8.

Nikolas Fokialakis, et al. A New Class of Phytoestrogens: Evaluation of the Estrogenic Activity of Deoxybenzoins.*Chemistry & Biology*, Vol. 11, 397–406, March, 2004, □2004 Elsevier Science Ltd. All rights reserved. DOI 10.1016/j.chembiol .2004.02.014.

Phrakonkham P, Chevalier J, Desmetz C, Pinnert MF, Bergès R, Jover E, Davicco MJ, Bennetau-Pelissero C, Coxam V, Artur Y, Canivenc-Lavier MC, 2007. Isoflavonoid-based bone-sparing treatments exert a low activity on reproductive organs and on hepatic metabolism of estradiol in ovariectomized rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 224, 105-115. doi:10.1016/j.taap.**2007.06.012**

Pettersson, K., Grandien, K., Kuiper, G. G., Gustafsson, J. A., (1997). Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol. Endocrinol*. **11**, 1486.

Pace, P., Taylor, J., Suntharalingam, S., Coombes, R. C., Ali, S. (1997). Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* **272**, 25832.

Rao, L.G. Lycopene and **Sato, M.**, Rippey, MK., Bryant, HU. Raloxifene, tamoxifen, nafoxidine, or estrogen effects on reproductive and nonreproductive tissues in ovariectomized rats. *FASEB J.* **1996**, *10*:905–12.

Schulz, et al. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *67*:4904-4911. the Prevention of Osteoporosis. *AV R, editor. Scotland: Caledonia Science.* **2006**.

Sarah Bedell, Margaret Nachtigall, Frederick Naftolin. Review. The pros and cons of plant estrogens for menopause. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **139** (2014) 225– 236.

Tora, L., White, J., Broum C., et al. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic activation functions. *Cell.* **59**, 477-487.

Tremblay, GB., Tremblay, A., Copeland, NG., et al. (1997). Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor b. *Mol Endocrinol.* **11**, 352-365.

Turner, JV., Agatonovic-Kustrin, S., Glass, B.D. Molecular aspects of phytoestrogen selective binding at estrogen receptors. *J Pharm Sci* **2007**, *96* (8): 1879–1885.

Yildiz Fatih. Phytoestrogens in Functional Foods. *Taylor & Francis Ltd.* **2005**, 3–5: 210–211.