



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Συνεργασία με το Εθνικό Ίδρυμα ερευνών (ΕΙΕ) –
Εργαστήριο Μοριακής ενδοκρινολογίας

Διπλωματική εργασία

Σε αναζήτηση συμβολής του υποδοχέα οιστρογόνων στη
νευροπροστατευτική δράση ενώσεων φυτικής προέλευσης

Research on estrogen receptor contribution to the neuroprotective activity
of compounds of plant origin

Επιμελήθηκε ο φοιτητής: Ρίτσος Βασίλειος

Υπεύθυνη καθηγήτρια: Ψαρρά Άννα-Μαρία

Επιβλέπων καθηγητής: Αλέξης Ν. Μιχαήλ

Λάρισα 2015

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

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ερευνητική μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της Διπλωματικής εργασίας, στο εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ) υπό την εποπτεία του Δρ. Μιχαήλ Ν. Αλέξη, με υπεύθυνο καθηγητή από τη σχολή Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Λάρισας την Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία. Κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας εξοικειώθηκα με τους εργαστηριακούς χώρους, απέκτησα εμπειρία τόσο στον επαγγελματικό όσο και στον ερευνητικό τομέα, εφόδια και προσόντα απαραίτητα για την περαιτέρω επαγγελματική μου πορεία. Μέρος της διπλωματικής εργασίας δημοσιεύτηκε σε δύο ανακοινώσεις (poster), στο 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medical Plant and Natural Product Research και στο EFMC-ISMIC 2014 XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry:

1^η Ανακοίνωση:

(Vontzalidou A., Meligova A.K., Makropoulou M., Ritsos V., Cheilari A., Mitsiou D.J., Angelis A., Aligiannis N., Alexis M.N., Mitakou S.) με τίτλο:

Discovery of natural agents potentially effective in preventing postmenopausal osteoporosis based on Greek flora

2^η Ανακοίνωση:

(Zoidis, G., Meligova, A.K., Vontzalidou, A., Dimitrakoudi, S.M., Ritsos, V., Mitsiou, D.J., Aligiannis N., Alexis M.N., Mitakou S.) με τίτλο:

Design, synthesis and biological evaluation of natural products analogues potentially effective in preventing post-menopausal osteoporosis

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Μιχαήλ Ν. Αλέξη, που με συμπεριέλαβε στην ερευνητική του ομάδα για να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία, αλλά και για τις γνώσεις τις οποίες μου μετέφερε. Ευχαριστώ θερμά την καθηγήτρια κ.α Άννα-Μαρία Ψαρρά του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, που αποτέλεσε τον συνδετικό κρίκο ώστε να γίνω δεκτός στο εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας του ΕΙΕ. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστώ την Δρ. Αγγελική Μελίγκοβα καθώς συνέβαλε αποφασιστικά στην εξοικειώσή μου με τις τεχνικές του εργαστηρίου και ήταν πάντα πρόθυμη να βοηθήσει.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε διάφορες νευρολογικές διαταραχές, όπως η νόσος του Parkinson, του Alzheimer και άλλες. Για να μελετηθούν τα αποτελέσματα του οξειδωτικού στρες στα νευρικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HT-22 (νευρωνικά κύτταρα ιππόκαμπου ποντικού) που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στο γλουταμικό οξύ. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν μετασχηματισμένα κύτταρα HT-22 που έφεραν πλασμίδιο έκφρασης του υποδοχέα οιστρογόνων τύπου άλφα (ERα) ή τύπου βήτα (ERβ) ή το κενό πλασμίδιο έκφρασης ως αρνητικό μάρτυρα. Στα τέσσερα αυτά κύτταρα το γλουταμικό σε υψηλές συγκεντρώσεις παρεμποδίζει την πρόσληψη κυστίνης, γεγονός που οδηγεί τελικά σε μείωση της γλουταθειόνης και στη συνέχεια σε θάνατο των κυττάρων, γεγονός που επιτρέπει τη χρησιμοποίησή τους για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής νευροπροστατευτικής δράσης φυσικών και συνθετικών ενώσεων. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν εμβρυονικά νεφρικά κύτταρα (HEK:ERβ1) μετασχηματισμένα με το γονίδιο του ERβ και του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης για τον προσδιορισμό ικανότητας επαγωγής μεταγραφικής δράσης μέσω του υποδοχέα οιστρογόνων βήτα (estrogen receptor-ERβ), όπως επίσης και καρκινικά κύτταρα μαστού (MCF-7:D5L) που έχει πραγματοποιηθεί μετασχηματισμός με το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης για τον προσδιορισμό της ικανότητας επαγωγής μεταγραφικής δράσης μέσω του υποδοχέα οιστρογόνων άλφα (estrogen receptor-ERα). Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω κύτταρα μελετήθηκε η ικανότητα διαφόρων ενώσεων να προστατεύουν τα κύτταρα HT-22 από το οξειδωτικό στρες όταν αυτά βρίσκονται υπό την επίδραση του γλουταμικού. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν 58 εκχυλίσματα φυτών της Ελληνικής χλωρίδας, 70 φυσικές ενώσεις από τα φυτά *Citrus aurantium* (νεράτζι), *Glycyrrhiza glabra* (γλυκόριζα), *Lathyrus clymenum* (λαθούρι), *Genista hassertiana* (γενίστα του Χάσσερτ) καθώς και 75 συνθετικά ανάλογα φυσικών ενώσεων προερχόμενα από τις κατηγορίες των χαλκονών - διυδροχαλκονών, τις ισοφλαβόνες-φλαβάνια, διαρυλοπροπάνια, στυλβένια - διυδροστυλβένια, δεοξυβενζοίνες και τέλος ενώσεις οι οποίες είναι ανάλογα της ραλοξιφαίνης. Στη συνέχεια οι ενώσεις που παρουσίασαν αντιοξειδωτική δραστηριότητα μελετήθηκαν ως προς τη δράση τους στην επαγωγή μεταγραφής μέσω ERα και/ή ERβ.

Έξι φυσικές ενώσεις που προέρχονται από το φυτό *Glycyrrhiza glabra* καθώς και ένα συνθετικό διαρυλοπροπάνιο παρουσίασαν αξιόλογη νευροπροστατευτική δράση. Διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ αγωνισμού ERα και ERβ για τις ενώσεις που δρουν μέσω και των δύο υποδοχέων, ωστόσο δεν υπήρξε αντίστοιχη συσχέτιση του αγωνισμού μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων με τη νευροπροστατευτική δράση των ενώσεων. Επιπρόσθετα, με τη χρήση μετασχηματισμένων HT-22 κυττάρων δεν διαπιστώθηκε συμμετοχή των υποδοχέων ERα ή/και ERβ στη διαμεσολάβηση της αντιοξειδωτικής νευροπροστατευτικής δράσης για τις υπό εξέταση ενώσεις.

Abstract

The oxidative stress is involved in different neurological disorders like Parkinson, Alzheimer etc. In order to study the results of the oxidative stress in neuronal cells, HT-22 cell line was used (neuronal cell of mouse's hippocampal) which are sensitive to glutamic acid. They were used also transfected cells HT-22 which carried expression plasmid of the estrogen receptor type α (ER α) or type β (ER β 1) as well as a void expression plasmid as negative indicator. In these four cells, glutamate in high concentrations hinders the absorptions of cystine, a fact that leads to the decrease of glutathione (GSH) and subsequently to cell's death, a fact that allows their use for the determination of the antioxidant neuroprotective action of natural and synthetic compounds. Additionally, embryonic kidney cells (HEK:ER β 1) transfected with ER β gene and the reference gene of luciferase for the definition of estrogenic induction were used, as well as breast cancer cell line MCF-7:D5L, in which transfection has been effectuated with the reference gene of luciferase for the determination of the induction capability of the transcription activity through the estrogen receptor ER α . Using the above cells, the capacity of different compounds was studied regarding the HT-22 protection from oxidative stress when they are under the effect of the glutamate. Specifically 58 plant extracts of the Greek flora, 70 natural compounds from the plants *Citrus aurantium*, *Glycyrrhiza glabra*, *Lathyrus clymenum*, *Genista hassertiana* as well as 75 synthetics based on natural compounds from the categories of chalcones-dehydrochalcones, isoflavones-flavones, diarylopropanium, stilbenium-dehydrostilbenium,, deoxybenzoines and finally compounds relative to Raloxifene where studied. Consequently compounds which showed antioxidant activity where studied regarding their transcriptional activity through ER α and/or ER β .

Six natural compounds which derived from the plant of *Glycyrrhiza glabra* as well as a synthetic diarylopropanium showed a remarkable neuroprotective activity. It was found an agonism correlation between ER α and ER β for the compounds that act on both estrogen receptors. However none correlation was found between neuroprotection activity and agonism through ER α and ER β . Finally, using transfected HT-22 cells, was found that there was no link between intermediation of neuroprotective activity and estrogen receptors ER α and ER β for the tested compounds.

Περιεχόμενα

Πρόλογος

Περίληψη

1 Εισαγωγή

- 1.1 Εκφυλιστικά νοσήματα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος
- 1.2 Οξειδωτικό στρες και εκφυλισμός ΚΝΣ
- 1.3 Το γλουταμικό οξύ ως οξειδωτικός παράγοντας
- 1.4 Τα οιστρογόνα ως νευροπροστατευτικοί παράγοντες
- 1.5 Δομή και δράση των υποδοχέων οιστρογόνων ERα και ERβ
- 1.6 Κύτταρα HT-22 ως μοντέλο νευροεκφυλισμού μέσω οξειδωτικού στρες
- 1.7 Σκοπός

2 Πειραματικό

- 2.1 Υλικά
 - 2.1.1 Χημικά
 - 2.1.2 Κυτταροκαλλιέργεια
 - 2.1.3 Κυτταρικές σειρές
- 2.2 Πειραματική διαδικασία
 - 2.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων
 - 2.2.2 Μέτρηση νευροπροστατευτικής δράσης
 - 2.2.3 Μέτρηση επαγωγής οιστρογονικότητας

3 Αποτελέσματα-Επεξεργασία

- 3.1 Εκχυλίσματα
- 3.2 Φυσικές ενώσεις
 - 3.2.1 Φυσικές ενώσεις από *Citrus aurantium*
 - 3.2.2 Φυσικές ενώσεις από *Glycyrrhiza glabra*
 - 3.2.3 Φυσικές ενώσεις από *Lathyrus clymenum*
 - 3.2.4 Φυσικές ενώσεις από *Genista hassertiana*
- 3.3 Συνθετικές ενώσεις
 - 3.3.1 Χαλκόνες-διϋδροχαλκόνες
 - 3.3.2 Φλαβάνια-ισοφλαβόνες
 - 3.3.3 Διαρυλοπροπάνια
 - 3.3.4 Στιλβένια-διϋδροστιλβένια
 - 3.3.5 Δεοξυβενζοΐνες
 - 3.3.6 Ανάλογα ραλοξιφαίνης
- 3.4 Ανασκόπηση αποτελεσμάτων για κυτταρική σειρά HT-22
- 3.5 Προσδιορισμός του αγωνισμού μέσω ERα και ERβ των νευροπροστατευτικών ενώσεων
- 3.6 Μελέτη της αντιοξειδωτικής νευροπροστατευτικής δράσης σε μετασηματισμένα κύτταρα HT-22 που υπερεκφράζουν ERα ή ERβ

4 Συμπεράσματα

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εκφυλιστικά νοσήματα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος

Τα εκφυλιστικά νοσήματα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος οφείλονται στην απώλεια λειτουργίας ή τον κυτταρικό θάνατο των νευρικών κυττάρων με χαρακτηριστικές ασθένειες το Alzheimer, Parkinson, Αμυλοτροφική Πλάγια Σκλήρυνση (ALS) και τη νόσο του Huntington. Η πλειοψηφία των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων εμφανίζεται σε άτομα τρίτης ηλικίας αλλά δεν αποκλείεται και η εμφάνισή τους σε νεώτερες ηλικίες. Η συνεχώς αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό σχετίζεται με την αύξηση του μέσου όρου ζωής.

Ο ιππόκαμπος αποτελεί μια εγκεφαλική δομή και είναι ένας από τους βασικούς σχηματισμούς του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) στον οποίο εδρεύουν οι μηχανισμοί της μάθησης και της μνήμης, ενώ αποτελεί σημαντικό στόχο διάφορων παραγόντων με νευροεκφυλιστική δράση. Οι παράγοντες που οδηγούν στην εκφύλιση των νευρώνων του ιππόκαμπου και την απώλεια μνήμης είναι το χρόνιο στρες και η γήρανση. Και για τους δύο αυτούς παράγοντες ο ιππόκαμπος αποτελεί σημαντικό στόχο της νευροτροποποιητικής δράσης των στεροειδών ορμονών των επινεφριδίων και των γεννητικών αδένων. Ο Υποθαλαμο-Υποφυσιο-Επινεφριδιακός (ΥΥΕ) άξονας διεγείρεται σε κατάσταση στρες, όπου σαν αποτέλεσμα έχει να εμπλέκεται σε διαδικασίες γήρανσης του εγκεφάλου. Κατά την διέγερση του ΥΥΕ άξονα απελευθερώνεται η υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (Corticotropin Releasing Hormone, CRH), της υποφυσιακής κορτικοτροπίνης (ACTH) και τέλος των φλοιο-επινεφριδιακών γλυκοκορτικοστεροειδών ορμονών. Πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα τελικά προϊόντα διέγερσης του ΥΥΕ άξονα, που είναι γλυκοκορτικοστεροειδείς ορμόνες, δρουν κυτταροτοξικά στα κύτταρα του ιππόκαμπου, επηρεάζοντας τις φυσιολογικές διαδικασίες της μνήμης (McEwen et al., 1996). Τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την ανάπτυξη νευρώνων της οδοντωτής έλικας και προάγουν την ατροφία των νευρώνων της CA1 και CA3 πυραμιδική περιοχής του ιππόκαμπου. Αυτές οι δράσεις των γλυκοκορτικοειδών αναπτύσσονται σε συνεργασία τόσο με τα νευροτοξικά αμινοξέα διέγερσης του ΚΝΣ όπως είναι το γλουταμικό οξύ, όσο και με τους NMDA και GABA υποδοχείς του ιππόκαμπου. Κατά τη διέγερση του ΥΥΕ άξονα από κάποιο στρεσογόνο παράγοντα, οι γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες αυξάνονται στην κυκλοφορία με αποτέλεσμα τα στεροειδή να ελαττώνουν την έκφραση των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών (GR) στον ιππόκαμπο και κατά συνέπεια την ευαισθησία του στην νευροτοξική τους δράση. Ο ρυθμιστικός αυτός μηχανισμός

επηρεάζεται στις μεγαλύτερες ηλικίες λόγω της διαδικασίας της γήρανσης καθώς επίσης και σε συνθήκες χρόνιας διέγερσης του ΥΥΕ άξονα, καθιστώντας έτσι τον υπόκαμπο ευαίσθητο στην νευροτοξική δράση των γλυκοκορτικοειδών. Η κατάσταση αυτή συνδέεται με την απώλεια μνήμης καθώς και με την έκπτωση της διανοητικής λειτουργίας που παρατηρείται στους ηλικιωμένους αλλά και στους ασθενείς με νόσο Alzheimer.

1.2 Οξειδωτικό στρες και εκφυλισμός ΚΝΣ

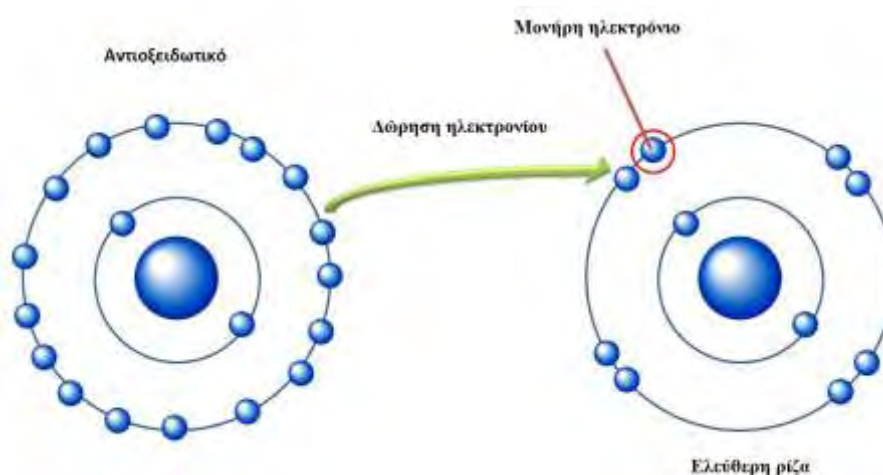
Οι αερόβιοι οργανισμοί παράγουν συνεχώς χαμηλά επίπεδα ενεργών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) που παράγονται στο μιτοχόνδριο και έχουν σημαντικό φυσιολογικό ρόλο στις διαδικασίες μεταγωγής σήματος (Suzuki et al., 1997-Forman and Torres, 2001). Σε περίπτωση όμως που τα επίπεδα των ριζών αυτών είναι υψηλά τότε καθίστανται ιδιαίτερα τοξικές για τα κύτταρα. Αυτή η κατάσταση ορίζεται ως οξειδωτικό στρες. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με συστατικά παρακείμενων κυττάρων, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA και να τους προκαλέσουν οξειδώσεις (Andersen 2004). Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται 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 ελευθέρων ριζών (Schulz et al., 2000).

Οι Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κατηγορίες:στις ελεύθερες ρίζες όπως η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), σε ιόντα όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO^-) που προκύπτει από τη διάσπαση του υποχλωριώδους οξέως (HClO), στο συνδυασμό ελευθέρων ριζών και ιόντων όπως το ανιόν σουπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$) και τέλος σε μόρια όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). Οι ελεύθερες ρίζες χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα και είναι ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής, αφού αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια, παίρνοντας από αυτά ένα ηλεκτρόνιο για να συζευκτεί με το δικό τους. Τα παρακείμενα μόρια μετατρέπονται έτσι τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες και με αυτόν τον τρόπο διαταράσσεται η μοριακή τάξη και ξεκινά μία αλυσιδωτή αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη (J. G. Salway, *Ιατρική Βιοχημεία με μια Ματιά*, 2η Έκδοση. Blackwell Publishing, 2006).

Τα υψηλά επίπεδα ROS είναι υπεύθυνα για διάφορες παθολογικές καταστάσεις συμπεριλαμβανομένων των νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Όπως φαίνεται από τις τιμές διάφορων δεικτών ελευθέρων ριζών, στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες παρατηρείται εκτεταμένο οξειδωτικό στρες. Μεταθανάτιοι εγκεφαλικοί ιστοί από ασθενείς με νευροεκφυλιστικές διαταραχές όπως είναι οι ασθένειες Parkinson, Alzheimer και η Αμυλοτροφική Πλάγια Σκλήρυνση (ALS), εντοπίζονται αυξημένες συγκεντρώσεις ROS στις προσβεβλημένες περιοχές του εγκεφάλου.

Ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρο ακόμα αν το οξειδωτικό στρες είναι η πρωταρχική αιτία για τον νευροεκφυλισμό ή απλά αν αποτελεί μια συνέπεια που σχετίζεται με τον θάνατο των νευρικών κυττάρων (Andersen, 2004 από NeuroSem).

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 ελευθέρων ριζών (Free Radical Scavengers), αναστολείς σχηματισμού ελευθέρων ριζών οξυγόνου, δεσμευτές μετάλλων κ.α. Η προστατευτική αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών εξαρτάται από τον τύπο των ROS που παράγονται, τον τόπο δημιουργίας τους (φραγμοί όπως είναι ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός μειώνουν την ικανότητα διέλευσης των περισσότερων αντιοξειδωτικών) και την σοβαρότητα της προσβολής (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών

Το ΚΝΣ είναι ιδιαίτερα ευπρόσβλητο σε βλάβες από τις ROS εξαιτίας των χαμηλών επιπέδων γλουταθειόνης η οποία δρα ως ένα φυσικό αντιοξειδωτικό, οι κυτταρικές μεμβράνες των νευρώνων είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, η υψηλή μεταβολική δραστηριότητα του εγκεφάλου λόγω της αυξημένης ανάγκης για οξυγόνο και τέλος η ύπαρξη αμινοξέων όπως είναι το γλουταμικό (Andersen, 2004-Barnham et al., 2004). Επίσης υπάρχουν στοιχεία ότι τα μέταλλα της ομάδας των στοιχείων μεταπτώσεως, όπως π.χ ο σίδηρος, είναι μεσολαβητές της παραγωγής των ROS (Zecca et al., 2004). Δεδομένου ότι ο σίδηρος υπάρχει σε αφθονία στον εγκέφαλο, θεωρείται μια δυνητικά ισχυρή τοξίνη. Έχουν αναφερθεί ιστολογικές και ποσοτικές αλλαγές στο σίδηρο στις περισσότερες νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Thompson et al., 2001). Ο σίδηρος καταλύει τον σχηματισμό των ριζών υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) με την αντίδραση τύπου Fenton (Meneghini, 1997). Η ακριβής ενδοκυττάρια θέση του σιδήρου είναι πιθανότατα υψηλής σημασίας για το τελικό αποτέλεσμα καθώς οι ρίζες υδροξυλίου αλληλεπιδρούν με κυτταρικά συστατικά που γειτνιάζουν άμεσα

με την περιοχή του δεσμευμένου μετάλλου (Petrat et al., 2002). Για παράδειγμα ο σχηματισμός ριζών υδροξυλίου κοντά στο DNA έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή αυτού λόγω ρήξης της μονής ή/και της διπλής αλυσίδας του DNA. Εντούτοις, υπάρχουν ενδείξεις ότι ακόμη και η εντόπιση του σιδήρου σε πιο μακρινές θέσεις από το DNA μπορεί να συμβάλλει έμμεσα σε τυχόν βλάβη του και την καταστροφή του (Tenopoulou et al., 2005).

Ο Fenton το 1894 ανακάλυψε ότι ορισμένα μέταλλα έχουν την ιδιότητα να μεταφέρουν οξυγόνο αντιδρώντας έτσι με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Ορισμένα μέταλλα έχουν ισχυρή καταλυτική δράση στη δημιουργία ελευθέρων ριζών υδροξυλίου (OH). Ο σίδηρος καταλύει την αντίδραση με το H₂O₂ σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες σύμφωνα με την αντίδραση Fenton η οποία είναι η παρακάτω:

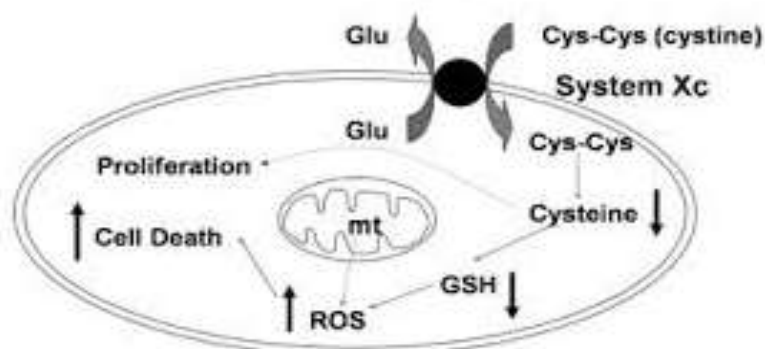


1.3 Το γλουταμινικό οξύ ως οξειδωτικός παράγοντας

Το γλουταμινικό οξύ είναι ο κύριος νευροδιαβιβαστής στον εγκέφαλο και ένα από τα πιο άφθονα ελεύθερα αμινοξέα. Εκτός από την συμμετοχή του στην πρωτεϊνοσύνθεση, το γλουταμινικό είναι ένα μόριο με σύνθετες βιολογικές δράσεις και ένα μεγάλο αριθμό μεμβρανικών υποδοχέων και μεταφορών. Το γλουταμινικό δρα ως νευροδιαβιβαστής μέσω των ιονοτροπικών υποδοχέων όπως είναι οι NMDA, AMPA και οι υποδοχείς του καϊνικού, όπως επίσης και με τους μεταβοτροπικούς υποδοχείς του γλουταμικού (κατηγορία GPCR υποδοχέων) (Gasic and Hollman, 1992). Σε υψηλές συγκεντρώσεις όμως το γλουταμινικό οξύ 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 που εξαρτάται από το νάτριο οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια των νευρικών κυττάρων.

Στην περίπτωση τοξικότητας που προκαλείται από το γλουταμινικό λόγω οξειδωτικού στρες, η πρόσληψη κυστίνης στο κύτταρο μέσω ενός μηχανισμού αντιμεταφοράς κυστίνης/γλουταμινικού αναστέλλεται παρουσία υψηλών εξωκυτταρικών συγκεντρώσεων γλουταμινικού (Εικόνα 2). Η κυστίνη είναι ένα από τα τρία αμινοξέα (gly-cys-gly) που απαιτούνται για τη σύνθεση του φυσικού αντιοξειδωτικού, τη γλουταθειόνη (GSH) (Sagara and Schubert, 1998). Όταν το απόθεμα γλουταθειόνης του κυττάρου μειώνεται περισσότερο από 80% για μια περίοδο μερικών ωρών, παρατηρείται μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού

θανάτου. Στην περίπτωση των νευρικών κυττάρων HT-22 έχει βρεθεί ότι ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να ανασταλεί από αντιοξειδωτικά.



Εικόνα 2: Τοξικότητα προκαλούμενη από το γλουταμινικό οξύ

Η υψηλή εξωκυτταρική συγκέντρωση του γλουταμικού μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες όπως το ενζύμου γλουταμινάση το οποίο διαθέτουν τα νευρικά κύτταρα και μετατρέπει την εξωκυτταρική γλουταμίνη σε γλουταμικό κατά τη λύση των κυττάρων. Ένα άλλο φαινόμενο που παρατηρείται είναι η αναστολή της λειτουργίας των υψηλής χημικής συγγένειας μεταφορέων γλουταμικού στα νευρικά κύτταρα, οι οποίοι κανονικά απαλλάσσουν το κύτταρο από τη υψηλή εξωκυτταρική συγκέντρωση γλουταμικού, από τις προοξειδωτικές καταστάσεις που συναντώνται στην ισχαιμία και στο τραύμα (Trotti et al, 1998). Συνεπώς, στις παθολογικές καταστάσεις η εξωκυτταρική συγκέντρωση του γλουταμικού στο ΚΝΣ μπορεί να φτάσει σε αρκετά υψηλή τιμή, ικανή να θανατώσει τα νευρικά κύτταρα ακόμα και αν δεν εκφράζουν λειτουργικούς ιονοτροπικούς υποδοχείς του γλουταμικού.

1.4 Τα οιστρογόνα ως νευροπροστατευτικοί παράγοντες

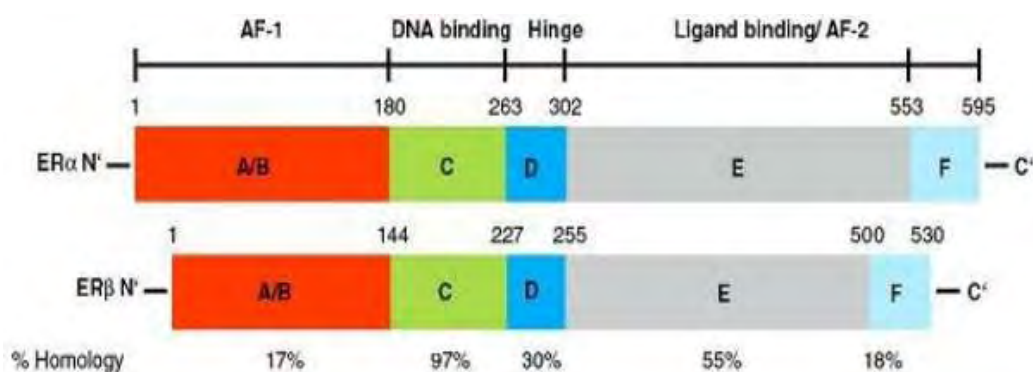
Τα οιστρογόνα θεωρείται ότι δρουν ως νευροπροστατευτικοί παράγοντες στον υπόκαμπο κατά την διαδικασία της γήρανσης. Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την έλλειψη οιστρογόνων κατά τη διάρκεια της εμμηνόπαυσης με την έκπτωση της διανοητικής λειτουργίας και την απώλεια της μνήμης. Όμως, τα τελευταία αποτελέσματα της Αμερικανικής Μελέτης Women's Health Initiative Memory Study (WHIMS) που διεξάχθηκε σε δείγμα 7500 γυναικών άνω των 65 χρόνων που έλαβαν συνεχή θεραπεία με οιστρογόνα και προγεστερόνη (Prempro) ή μόνο οιστρογόνα (σε αυτές που είχαν υποβληθεί στο παρελθόν σε υστερεκτομή) έδειξαν ότι η θεραπεία με οιστρογόνα δεν προστατεύει από την άνοια ή την εξασθένηση των μηχανισμών μνήμης και μάθησης αλλά αντίθετα αυξάνει τον κίνδυνο να εμφανιστούν τα συμπτώματα αυτά. Υπάρχουν βέβαια αμφιβολίες για το ποιο θα ήταν το αποτέλεσμα εάν η μελέτη είχε γίνει σε νεότερες γυναίκες στις οποίες δεν είχε μεσολαβήσει μεγάλο χρονικό διάστημα από την εμμηνόπαυση μέχρι την αρχή της θεραπείας.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα οιστρογόνα ενδέχεται να προστατεύουν από τα ανωτέρω συμπτώματα 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, δηλ. 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. Μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν γενετικά τροποποιημένα ποντίκια πουδενεκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων τύπου α (ERα) ή τύπου β (ERβ), δείχνουν ότι ο ERα είναι ο συνδεδετικός κρίκος που διαμεσολαβεί στην ικανότητα φυσιολογικών επιπέδων οιστραδιόλης να προστατεύει τον εγκέφαλο από ισχαιμική βλάβη (Dubal et al, 2001). Άλλες γενετικές μελέτες, δείχνουν σημαντική απώλεια νευρώνων και πολλαπλασιασμό των νευρογλοιακών κυττάρων στον εγκέφαλο ποντικών που δεν εκφράζουν τον ERβ (Wang et al., 2000).

1.5 Δομή και δράση των υποδοχέων οιστρογόνων ERα και ERβ

Η πολλαπλή, συχνά αποκλίνουσα δράση των οιστρογόνων όπως και των αντιοιστρογόνων στα διάφορα οργανικά συστήματα αρχίζει να γίνεται κατανοητή χάρη στη διευκρίνιση των μοριακών μηχανισμών δράσης των ορμονών αυτών στους ιστούς και τα κύτταρα-στόχους τους. Μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 70 ήταν

αποδεκτό ότι η δράση των οιστρογόνων περιορίζεται στους αναπαραγωγικούς ιστούς και διαμεσολαβείται από μία και μόνο μορφή του υποδοχέα οιστρογόνων, γνωστή σήμερα ως ERα. Αργότερα όμως ανακαλύφθηκε ότι τα οιστρογόνα δρουν και σε μη αναπαραγωγικούς ιστούς και ότι υπάρχει και δεύτερος τύπος υποδοχέα, γνωστός ως ERβ, ο οποίος είναι προϊόν διαφορετικού γονιδίου. Το γεγονός ότι η δράση των οιστρογόνων είναι πολύπλοκη εξηγείται εν μέρει, από την ύπαρξη των δύο τύπων ER, με μη ταυτόσημη δομή και δράση (Katzenellenbogen and Korach, 1997).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση των υποδοχέων οιστρογόνων του ανθρώπου ERα και ERβ. Η περιοχή A/B περιέχει τη μεταγραφική ενεργότητα AF-1, η C την περιοχή πρόσδεσης στο DNA, η D την εύκαμπτη περιοχή (hinge) και η E την περιοχή πρόσδεσης της ορμόνης. Η περιοχή F συνεισφέρει στη μεταγραφική ικανότητα του υποδοχέα.

Οι ERα και ERβ έχουν τη δομή που είναι χαρακτηριστική για όλα τα μέλη της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, στην οποία ανήκουν επίσης οι υποδοχείς των ανδρογόνων (Androgen Receptor, AR), της προγεστερόνης (Progesterone Receptor, PR), των γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR) και των αλατοκορτικοειδών (Mineralocorticoid Receptor, MR) (Εικόνα 3). Η περιοχή που είναι καλύτερα συντηρημένη είναι η C (96% ομολογία) που είναι η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA Binding Domain, DBD). Η περιοχή C περιέχει δύο δακτύλιους 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 E είναι η περιοχή δέσμευσης ορμόνης (Ligand Binding Domain, LBD), παρουσιάζει περίπου 60% ομολογία και περιέχει επίσης περιοχές που καθορίζουν τον διμερισμό του υποδοχέα, την πυρηνική μετατόπιση και την αλληλεπίδρασή του με μια σειρά από μεταγραφικούς συμπαράγοντες (Graupner et al., 1989, Pratt et al., 1988, Webster et al., 1988). Το

καρβοξυτελικό άκρο του LBD περιέχει μια σημαντική μεταγραφική ενεργότητα (AF-2), η ενεργοποίηση της οποίας εξαρτάται από την πρόσδεση του αγωνιστή. 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 (D) (hinge) προσφέρει ευκινησία στον υποδοχέα ανάμεσα στην περιοχή δέσμευσης ορμόνης και στην περιοχή σύνδεσης στο DNA και έχει ακόμα δειχθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις επηρεάζει τις ιδιότητες πρόσδεσης των υποδοχέων στο DNA. Τέλος η καρβοξυτελική περιοχή (F) συνεισφέρει στη δόμηση της μεταγραφικής ενεργότητας AF-2 του υποδοχέα (Vegeto et al., 1992).

Η περιοχή A/B των ER α και ER β έχει πολύ χαμηλή ομολογία της τάξης του 18%. Περιέχει μια δεύτερη μεταγραφική ενεργότητα, την AF-1 (Tora et al., 1989 –Berry et al., 1990 –Kraus et al., 1995 –McInerney and Katzenellenbogen, 1996) η οποία λειτουργεί ανεξάρτητα από την πρόσδεση ορμόνης, αν και η δράση της εμποδίζεται τελείως από ανταγωνιστές που οδηγούν στην αποικοδόμηση του ER, όπως π.χ το ICI. Επίσης η ενεργότητα AF-1 μπορεί να ρυθμιστεί από αυξητικούς παράγοντες που την φωσφορυλιώνουν (Kato et al., 1995). Οι ενεργότητες AF-1 συμπεριφέρονται πολύ διαφορετικά στον ER α απ' ό τι στον ER β , όσον αφορά τη συμβολή τους στη συνολική μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα (McInerney et al., 1998). Συνθετικά αντιστρογόνα όπως η ταμοξιφαίνη και η ραλοξιφαίνη επάγουν τον μερικό αγωνισμό γονιδίων αναφοράς εξαρτώμενων από στοιχεία ERE παρουσία του ER α αλλά πλήρη ανταγωνισμό παρουσία του ER β (Tremblay et al., 1997-Barkhem et al., 1998 – McInerney et al., 1998). Στον ER α , 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 ER β (McInerney et al., 1998). Οι διαφορές λοιπόν της αμινοτελικής περιοχής των δύο υποδοχέων εξηγούν τη διαφορά μεταξύ τους όσον αφορά τη δράση παρουσία ορισμένων οιστρογόνων και αντιστρογόνων.

Για τη μεταγωγή του σήματος της ορμόνης στη βασική μεταγραφική μηχανή απαιτούνται οι συμπαραγοντες ενίσχυσης ή καταστολής του σήματος (coactivators ή corepressors), οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τον ER α και / ή τον ER β . Οι συμπαραγοντες αυτοί είναι πυρηνικές πρωτεΐνες οι οποίες συμβάλουν στη ρύθμιση της μεταγραφής συνδέοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες με τη βασική μεταγραφική μηχανή. Ο πρώτος συμπαραγοντας ενίσχυσης που κλωνοποιήθηκε είναι ο SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator 1) (Onate SA, 1995). Ο SRC-1 αλληλεπιδρά και με τις δύο ενεργότητες, AF-1 και AF-2. Ο SRC-1 ανήκει σε μια μεγαλύτερη οικογένεια συμπαραγόντων ενίσχυσης στην οποία ανήκουν επίσης ο SRC-2, γνωστός και ως TIF2, και ο SRC-3 γνωστός και ως AIB1/TRAM/RAC3/ACTR (Chen et al., 1997 –Li et al., 1997 –Takeshita et al., 1997 –Voegel et al., 1996). Οι SRC πρωτεΐνες δρουν επίσης ως πλατφόρμες (scaffold) για άλλες βοηθητικές πρωτεΐνες όπως η

CBP/p300, βοηθώντας να σχηματιστεί ένα τριμερές σύμπλεγμα (ER- SRC- CBP/p300) που ενισχύει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου στόχου (McKenna et al, 1998). Ο SRC-1 και ο SRC-3 εμπλέκονται στην τροποποίηση της δομής της χρωματίνης η οποία είναι προϋπόθεση για τη μεταγραφή καθώς επιτρέπει την είσοδο των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA (Chen et al., 1997 –Li et al., 1997 –Takeshita et al, 1997). Άλλες πρωτεΐνες με ανάλογη ενισχυτική δράση είναι επίσης και οι ομόλογες των πρωτεϊνών SWI/SNF. Εκτός από τους θετικούς συμπαράγοντες υπάρχουν και αρνητικοί όπως για παράδειγμα ο N-CoR, που καταστέλλει την ενεργοποίηση της μεταγραφής αφού προσδεθεί ο ίδιος στον υποδοχέα. Άλλοι πάλι δρουν παρεμποδίζοντας την πρόσδεση θετικών συμπαράγοντων στον υποδοχέα.

1.6 Κύτταρα HT22 ως μοντέλο νευροεκφυλισμού μέσω οξειδωτικού στρες

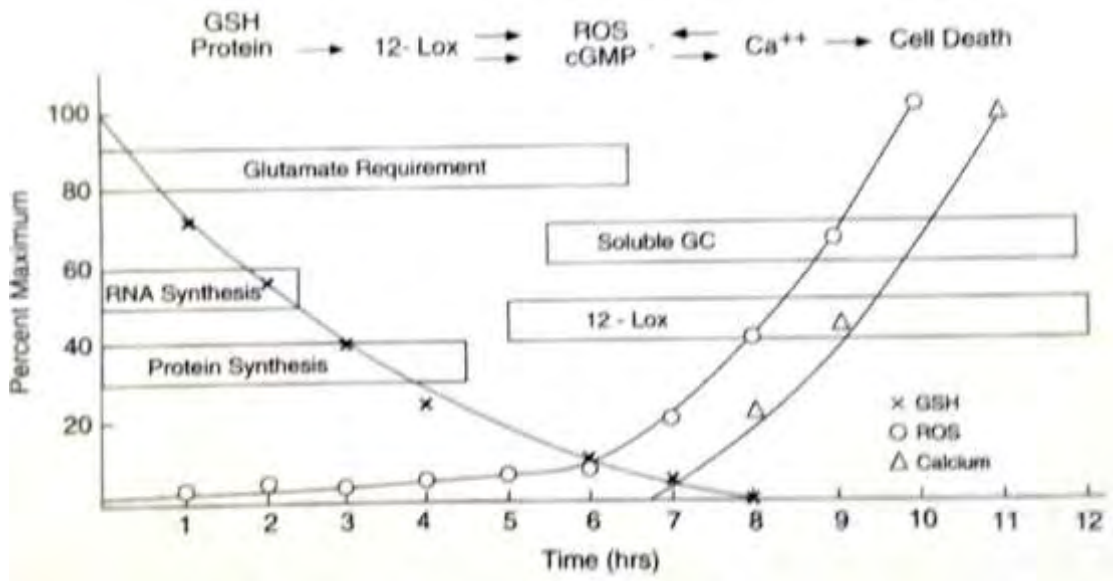
Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) μπορούν να προκαλέσουν άμεση βλάβη στο κύτταρο μέσω της καταστροφής των ακόρεστων δεσμών άνθρακα (C-C) και οξείδωσης των δισουλφιδίων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές σε συνδυασμό με την ικανότητα των ROS να δρουν ως μόρια σηματοδότησης (Tan et al., 1997) οδηγούν σε μια κατάσταση που ονομάζεται οξειδωτικό στρες, η οποία συχνά οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. Ο κυτταρικός θάνατος λόγω οξειδωτικού στρες διαφέρει από το μονοπάτι της απόπτωσης και πιθανότατα εμπλέκεται σε πολλές μορφές εκφύλισης του ΚΝΣ.

Τα κύτταρα HT22 είναι μετασχηματισμένα νευρικά κύτταρα που δεν εκφράζουν λειτουργικούς ιονοτροπικούς υποδοχείς γλουταμικού και γι' αυτό δεν εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα λόγω διέγερσης (Maher and Davis, 1996) αλλά μόνο λόγω οξειδωτικού στρες. Το αρχικό γεγονός στον κυτταρικό θάνατο των HT22 λόγω οξειδωτικού στρες από το γλουταμινικό οξύ είναι η αναστολή της εισόδου κυστίνης. Ενώ μερικά κύτταρα μπορούν να συνθέσουν κυστεΐνη από την κυσταθειονίνη με τη βοήθεια του ενζύμου κυσταθειονίνο-γ- λυάση, τα νευρικά κύτταρα δεν εκφράζουν αυτό το ένζυμο οπότε εξαρτώνται αποκλειστικά από την εξωκυττάρια κυστίνη. Τα αποθέματα γλουταθειόνης εξαντλούνται πολύ γρήγορα λόγω του ότι η σύνθεση πρωτεϊνών συνεχίζεται με αμείωτο ρυθμό στα κύτταρα που έχουν εκτεθεί στο γλουταμινικό οξύ. Χαρακτηριστικά, μετά από 4 ώρες αναστολής της εισόδου κυστίνης από το γλουταμινικό οξύ, υπάρχει πολύ μικρή μείωση στο ρυθμό της πρωτεϊνικής σύνθεσης ενώ τα επίπεδα της γλουταθειόνης έχουν σχεδόν μηδενιστεί. Πράγματι, η αναστολή της σύνθεσης μακρομορίων προστατεύει τα κύτταρα από την τοξικότητα του γλουταμικού. Εάν τα κύτταρα εκτεθούν στο γλουταμινικό οξύ για 7 ή περισσότερες ώρες, το μονοπάτι που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο είναι μη

αναστρέψιμο ενώ για μικρότερο χρόνο τα κύτταρα ανακάμπτουν μετά από την απομάκρυνση του γλουταμικού.

Η έκθεση των κυττάρων HT22 στο γλουταμινικό οξύ οδηγεί σε μια διφασική αύξηση στην παραγωγή των ROS (Εικόνα 4). Μεταξύ 0-6 ωρών μετά την χορήγηση γλουταμικού παρατηρείται μια γραμμική αύξηση στην παραγωγή των ROS που φτάνει περίπου στο 10% της μέγιστης τιμής τους. Μετά τις 6 ώρες παρατηρείται μια εκθετική αύξηση στη συσσώρευση των ROS. Ενώ η αρχική αύξηση των ROS φαίνεται να οφείλεται αποκλειστικά στην εξάντληση της γλουταθειόνης, η μετέπειτα εκθετική αύξηση δεν δικαιολογείται μόνο από αυτή. Η μείωση της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης συνδέεται με την ενεργοποίηση της 12-λιποξυγενάσης (12-LOX). Στο ΚΝΣ, η 12- LOX είναι η επικρατέστερη μορφή και παράγει 12- και 15-υδροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ (12- ή 15-HETE). Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό της 12-LOX είναι ότι η ενζυμική της ενεργότητα επάγεται από χαμηλά επίπεδα της GSH (Shornick and Holtzman, 1993). Πειράματα με τα κύτταρα HT-22 έχουν δείξει ότι η έλλειψη γλουταμικού ενεργοποιεί την LOX και ότι αναστολείς της LOX αναστέλλουν την τοξικότητα από το γλουταμικό (Li et al, 1997). Μετρήσεις της ενζυμικής ενεργότητας της 12-LOX έχουν δείξει ότι παρατηρείται μεγάλη αύξηση 6 ώρες μετά την προσθήκη του γλουταμικού, το χρονικό σημείο δηλαδή που η ενδοκυτταρική GSH προσεγγίζει το μηδέν. Αν και η ενεργοποίηση της LOX δεν αποτρέπει την απώλεια της GSH, συμβάλει στην εκθετική αύξηση των ROS που παρατηρείται μετά τις 6 ώρες επώασης με το γλουταμινικό οξύ. Οι μεταβολίτες της 12- LOX (12- ή 15-HETE), εκτός των άλλων βιολογικών λειτουργιών τους, ενεργοποιούν επίσης τη διαλυτή γουανυλική κυκλάση (sGC). Η sGC παράγει μονοφωσφορική γουανοσίνη (GMP) η οποία συμβάλει στην προαγωγή του θανάτου που προκαλείται στα κύτταρα λόγω του γλουταμικού (Li et al, 1997b- Ishige et al., 2001).

Αν και υπάρχουν πολλές πηγές ROS στα κύτταρα εκτός από τα μιτοχόνδρια στις οποίες συγκαταλέγεται μια πλειάδα ένζυμων, όπως οι MAO (monoamineoxidase), οι λιποξυγενάσες, κυκλοοξυγενάσες κ.ά., φαίνεται ότι η πηγή της τελικής εκθετικής αύξησης των ROS μετά από τις 6 ώρες επώασης με το γλουταμινικό οξύ είναι τα μιτοχόνδρια. Όμως, η πηγή της αρχικής παραγωγής των ROS παραμένει άγνωστη (Maher and Schubert, 2000). Το γλουταμινικό οξύ προκαλεί επίσης μεγάλη αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου (Ca^{2+}) (Li et al., 1997). Αν μειωθεί ο ρυθμός εισόδου του ασβεστίου στα κύτταρα, τότε ο κυτταρικός θάνατος αναστέλλεται έστω και αν έχει συσσωρευτεί μεγάλη ποσότητα από ROS (Li et al., 1997) , πράγμα το οποίο επιβεβαιώνει ότι εκτός από τις ROS απαραίτητη προϋπόθεση για τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από το γλουταμινικό οξύ αποτελεί και η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου λίγο πριν το κύτταρο οδηγηθεί τελικά σε κυτταρικό θάνατο.



Εικόνα 4: Διάγραμμα κυτταρικών λειτουργιών κατά τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από το γλουταμικό στα κύτταρα HT-22

Ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων από αυτούς που εμπλέκονται στο κλασικό αποπτωτικό μονοπάτι φαίνεται να έχει κάποιο ρόλο στον κυτταρικό θάνατο λόγω οξειδωτικού στρες. Οι παράγοντες που δεν εμπλέκονται είναι το προαποπτωτικό γονίδιο Bax, η ενεργοποίηση της κασπάσης 3, η αποπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, η κατάτμηση του DNA, η αποδέσμευση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια καθώς και το μονοξείδιο του αζώτου (NO). Τέλος τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων που υπόκεινται σε θάνατο λόγω οξειδωτικού στρες είναι αρκετά διαφορετικά από αυτά που παρατηρούνται στην κλασική απόπτωση. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι η συρρίκνωση των κυττάρων, η κατάτμηση του πυρήνα και η συμπύκνωση της χρωματίνης. Ενώ ο θάνατος λόγω οξειδωτικού στρες έχει κάποια από τα χαρακτηριστικά της απόπτωσης, όπως είναι η ανάγκη για σύνθεση μακρομορίων, δεν παρουσιάζει άλλα όπως είναι η κατάτμηση του πυρήνα και του DNA και η συμπύκνωση της χρωματίνης. Τα κύτταρα HT-22 μετά από 10 ώρες έκθεσης στο γλουταμικό παρουσιάζουν σοβαρή βλάβη στο ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύμπλεγμα του Golgi, και στα μιτοχόνδρια. Τα τελευταία διογκώνονται και χάνουν τα ακρολόφια όπως επίσης διογκώνεται και το σύμπλεγμα του Golgi. Οι πυρήνες παραμένουν άθικτοι με ελάχιστη διόγκωση ή συμπύκνωση της χρωματίνης. Ενώ ο θάνατος λόγω οξειδωτικού στρες μοιάζει μορφολογικά περισσότερο στη νέκρωση, από βιοχημικής απόψεως έχει πιο πολλά κοινά με την απόπτωση. Το νεκρωτικό κύτταρο διογκώνεται, οι μεμβράνες λύνονται και προκαλείται καταστροφή του. Αντίθετα κατά την κυτταρική απόπτωση παρατηρείται ελάττωση του κυτταρικού όγκου, ενεργοποίηση μιας σειράς ειδικών γονιδίων, διάσπαση της χρωματίνης από ειδικές ενδονουκλεάσες και τέλος η παρουσία αποπτωτικών σωματίων (αποπτωσωμάτων) που ενδοκυτταρώνονται από τα γειτονικά κύτταρα.

1.7 Σκοπός

Η πλειοψηφία των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων (Parkinson, Alzheimer) διαθέτει ως κοινό χαρακτηριστικό το οξειδωτικό στρες των κυττάρων. Πιστεύεται ότι χημικές ενώσεις με αντιοξειδωτική νευροπροστατευτική δράση μπορούν να συμβάλλουν στην πρόληψη των παραπάνω νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής νευροπροστατευτικής δράσης των υπό έλεγχο ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HT-22 υποκάμπου ποντικού. Τα κύτταρα αυτά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στο γλουταμικό οξύ και η ύπαρξη υψηλής εξωκυτταρικής συγκέντρωση γλουταμικού οδηγεί στην αναστολή πρόσληψης κυστίνης, αναστέλλοντας έτσι την σύνθεση ενός βασικού αντιοξειδωτικού παράγοντα του κυττάρου, την γλουταθειόνη, γεγονός που οδηγεί τελικά στον κυτταρικό θάνατο. Πιστεύεται ότι τα οιστρογόνα, μέσω των υποδοχέων τους, προστατεύουν τα νευρικά κύτταρα από το οξειδωτικό στρες. Τα κύτταρα HT-22 εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς οιστρογόνων (estrogens receptors ER α , ER β).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν φυσικές και συνθετικές ενώσεις όπως επίσης και εκχυλίσματα φυτών, για την μελέτη της αντιοξειδωτικής νευροπροστατευτικής τους δράσης παρουσία γλουταμικού οξέως. Ταυτόχρονα μελετήθηκε και η ικανότητά τους να επιδρούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό υπό κανονικές συνθήκες ανάπτυξης, δηλαδή απουσία γλουταμικού. Οι φυσικές και οι συνθετικές ενώσεις που παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική νευροπροστατευτική δράση σε συγκέντρωση 10 μ M, μελετήθηκαν σε δοσοαποκρίσεις των 10-3-1 μ M στις κυτταρικές σειρές HT-22, MCF-7:D5L (εκφράζουν μόνο ER α) και HEK:ER β 1 (εκφράζουν μόνο ER β). Με τον τρόπο αυτό προσδιορίσαμε ενώσεις με νευροπροστατευτική δράση, το φάσμα των δραστικών συγκεντρώσεων τους, όπως επίσης και την ικανότητά τους να δρουν μεταγραφικά ως αγωνιστές του ER α ή/και ER β . Επίσης οι ενώσεις που παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση μελετήθηκαν και στις κυτταρικές σειρές HT22-mock17 (δεν εκφράζουν ER), HT22- α 28 (εκφράζουν μόνο ER α) και HT22- β 25 (εκφράζουν μόνο ER β) σε συγκεντρώσεις 10, 3 και 1 μ M αντίστοιχα. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίσαμε τη σχέση νευροπροστατευτικής δράσης, αγωνισμού μέσω ER α ή/και ER β και της συμβολής του ER α ή/και ER β στην εκδήλωση νευροπροστατευτικής δράσης.

Συνολικά μελετήθηκαν 145 φυσικές ή συνθετικές ενώσεις και 58 φυτικά εκχυλίσματα. Οι φυσικές ενώσεις που μελετήθηκαν προέρχονται από τα φυτά: *Citrus aurantium*, *Glycyrrhiza glabra*, *Lathyrus clymenum* και *Genista hassertiana* ενώ οι συνθετικές ενώσεις ανήκουν στις χαλκόνες και διυδροχαλκόνες, ισοφλαβόνες-φλαβάνια, διαρυλοπροπάνια, στυλβένια και διυδροστυλβένια, δεοξυβενζοΐνες και τέλος ενώσεις οι οποίες είναι ανάλογα της ραλοξιφαΐνης.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

2.1 Υλικά

2.1.1 Χημικά

- Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία:
- Ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum – FBS)
- Ορός CIS (Charcoal Inactivated Serum)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffered Serum – PBS)
- Πλάκες 96 θέσεων μικροκαλλιέργειας διάφανου χρώματος για μέτρηση MTT
- Πλάκες 96 θέσεων μικροκαλλιέργειας λευκού χρώματος για μέτρηση χημειοφωταύγειας
- Τρυβλία Petri διαστάσεων 100X20mm
- Χρωμογόνο MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide}
- Ισοπροπανόλη
- Glo lysis buffer
- Luciferase substrate
- Η φυσική ορμόνη 17β-οιστραδιόλη (E2): αγωνιστής μέσω ERα, ERβ
- DMSO σε αναλογία 1/1000 ως προς το θρεπτικό μέσο
- Φισετίνη (fisetin), χρησιμοποιήθηκε ως ένωση εσωτερικού ελέγχου του οξειδωτικού στρες που προκαλεί το L-γλουταμικό με σκοπό την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων
- TC100 ή (6-χλώρο-3,4-διυδρο-5,7,8-τριμεθυλο-2-φαίνυλο-2H-1,4βενζοξασίνη), όπου χρησιμοποιήθηκε ως ένωση εσωτερικού ελέγχου του οξειδωτικού στρες που προκαλεί το L-γλουταμικό με σκοπό την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων
- Φυτικές ενώσεις προερχόμενες από: *Citrus aurantium*, *Glycyrrhiza glabra*, *Lathyrus clymenum* και *Genista hassertiana*
- Συνθετικές ενώσεις: χαλκόνες-διυδροχαλκόνες, ισοφλαβόνες-φλαβάνια, διαρυλοπροπάνια, στιλβένια-διυδροστιλβένια, δεοξυβενζοΐνες και τέλος ενώσεις οι οποίες είναι ανάλογα της ραλοξιφαίνης
- Εκχυλίσματα από: *S. raeseri* ssp. *Raeseri*, *Sideritis scardica*, *Origanum vulgare* ssp. *Hirtum*, *M. Aquatica*, *Mentha pulegium*, *Mentha longifolia*, *Rosa damascena*, *Crocus sativus*, *Salvia officinalis*, *Salvia fruticosa*, *Lathyrus clymenum*, *Dorycnium hirsutum*, *Chamaecytisus austriacus*, *Chamaecytisus triflorus* (= *Ch.hirsutus*), *Cytisus villosus* (= *C. triflorus*), *Melilotus graecus*, *Teline monspessulana*, *Lembotropis nigricans* ssp. *Nigricans*, *Cercis siliquastrum*, *Galega officinalis*, *Hippocrepis comosa*, *Anagyris foedida*,

Calicotome villosa, Anthyllis Montana, Indigofera secundiflora, Glycyrrhiza glabra, Genista hassertiana, Vitis vinifera, Citrus aurantium.

2.1.2 Κυτταροκαλλιέργεια

Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργούνται σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37 °C και σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% διοξείδιο του άνθρακα (CO₂).

- Τα κύτταρα HT-22, HT22-mock17, HT22-α28, HT22-β25 πολλαπλασιάστηκαν σε υλικό καλλιέργειας:

DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) ελεύθερο ερυθρού φαινόλης, χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη, το οποίο περιέχει επίσης (πλήρες DMEM): όξινο ανθρακικό νάτριο (Sodium bicarbonate), πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη και 1% ή 10% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Bovine Serum, FBS). Διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C και σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% διοξείδιο του άνθρακα (CO₂).

- Τα κύτταρα HEK:ERβ1 πολλαπλασιάστηκαν σε υλικό κυτταροκαλλιέργειας:

DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) παρουσία ερυθρού της φαινόλης, χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη, το οποίο περιέχει επίσης: όξινο ανθρακικό νάτριο (Sodium bicarbonate), πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη και 10% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Bovine Serum, FBS). Διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C και σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% διοξείδιο του άνθρακα (CO₂).

- Τα κύτταρα MCF-7:D5L πολλαπλασιάστηκαν σε υλικό κυτταροκαλλιέργειας:

MEM (Minimum Essential Medium) ελεύθερο ερυθρού της φαινόλης, χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη, το οποίο περιέχει επίσης: όξινο ανθρακικό νάτριο (Sodium bicarbonate), πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη και 10% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Bovine Serum, FBS). Διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C και σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% διοξείδιο του άνθρακα (CO₂).

2.1.3 Κυτταρικές σειρές

- HT-22: αθανατοποιημένα κύτταρα ιππόκαμπου μυός. Χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό ενώσεων που έχουν αντιοξειδωτική δράση
- HT22-mock17: αθανατοποιημένα κύτταρα ιππόκαμπου μυός που έχουν υποστεί τη διαδικασία της διαμόλυνσης με κενό πλασμίδιο και χρησιμοποιήθηκαν ως control
- HT22-α28: αθανατοποιημένα κύτταρα ιππόκαμπου μυός που έχουν διαμολυνθεί με το γονίδιο του υποδοχέα οιστρογόνων άλφα (ERα). Τα κύτταρα HT22 διαμολύνθηκαν με το pcDNA3.1-hERα όπου φέρει το cDNA του ανθρώπινου υποδοχέα ERα όπου κατασκευάστηκε με υποκλωνοποίηση του τμήματος EcoRI από το πλασμίδιο pSG5-hERα στη θέση του EcoRI του pcDNA3.1.
- HT22-β25: αθανατοποιημένα κύτταρα ιππόκαμπου μυός που έχουν διαμολυνθεί με το γονίδιο του υποδοχέα οιστρογόνων βήτα (ERβ). Τα κύτταρα HT-22 διαμολύνθηκαν με το pcDNA3.1-hERβ1 όπου φέρει το cDNA του ανθρώπινου υποδοχέα ERβ1 όπου κατασκευάστηκε με υποκλωνοποίηση του τμήματος BamHI από το πλασμίδιο pSG5-hERβ1 στη θέση του BamHI του pcDNA3.1
- MCF-7:D5L: καρκινικά κύτταρα μαστού όπου έχει πραγματοποιηθεί μετασχηματισμός με το γονίδιο του ERα και του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης για τον ποσοτικό έλεγχο επαγωγής της οιστρογονικότητας μέσω του υποδοχέα οιστρογόνων άλφα (estrogenreceptor-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.
- HEK:ERβ1: εμβρυονικά νεφρικά κύτταρα μετασχηματισμένα με το γονίδιο του ERβ και του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης για τον έλεγχο επαγωγής οιστρογονικότητας μέσω του υποδοχέα οιστρογόνων βήτα (estrogen receptor- ERβ). Πρόκειται για κύτταρα HEK-293 τα οποία έχουν διαμολυνθεί σταθερά με το πλασμίδιο έκφρασης pcDNA3.1-hERβ1. Τα HEK:ERβ1 είναι σταθερά διαμολυσμένα και με το πλασμίδιο αναφοράς pERE-TKLuc.

2.2 Πειραματική διαδικασία

2.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Όλες οι διαδικασίες καλλιέργειας των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής, ενώ στείρα επίσης ήταν και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν.

Για την καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών HT-22, HT22-mock17, HT22-a28 και HT22-β25 ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: τα κύτταρα καλλιεργούνται σε DMEM υλικό που περιέχει 10% FBS και ανακαλλιεργούνται κάθε 2 μέρες με 250.000 κύτταρα ανά τρυβλίο ή με 125.000 κύτταρα ανά τρυβλίο κάθε 3 μέρες. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε πλαστικά τρυβλία Petri 90 mm, με 10 ml πλήρους υλικού, στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται πριν φτάσουν στο 75% της κάλυψης του τρυβλίου. Αρχικά γίνεται έκπλυση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS 1X (Phosphate buffered saline). Στη συνέχεια προστίθεται 1 ml διαλύματος 0,25% τρυψίνης και ακολουθεί μετά από σύντομο χρονικό διάστημα η αποκόλλησή τους από το τρυβλίο. Για κάθε κυτταρική σειρά ο χρόνος τρυψινοποίησης μπορεί να διαφέρει. Στη συνέχεια παραλαμβάνονται τα κύτταρα με 4 ml DMEM 10% FBS και ακολουθεί η μέτρησή τους με τη βοήθεια πλάκας Neubauer. Για τη μέτρηση γίνεται αραιώση 1:3 του κυτταρικού εναιωρήματος και πιο συγκεκριμένα προστίθεται 50 μl trypan-blue και 25 μl από το κυτταρικό αναίωρημα. Γίνεται μέτρηση του αριθμού των ζώντων κυττάρων στα τετράγωνα της πλάκας Neubauer και στη συνέχεια πολλαπλασιάζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων με τον συντελεστή αραιώσης που είναι το 3, επί τη σταθερά 10.000 (M.O*3*10.000) και η τιμή που προκύπτει είναι ο αριθμός των κυττάρων ανά ml. Στη συνέχεια μεταφέρονται 250.000 ή 125.000 κύτταρα για διήμερη ή τριήμερη επώαση αντίστοιχα, σε τρυβλίο petri όπου περιέχει 10 ml DMEM 10% FBS. Για την πειραματική διαδικασία, επιστρώνονται 2.000 κύτταρα ανά θέση σε μια πλάκα μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων που κάθε μια περιέχει 100 μl υλικού DMEM 10% FBS. Ακολουθεί επώαση 24h και στη συνέχεια προστίθενται οι υπό εξέταση ενώσεις στις επιθυμητές συγκεντρώσεις παρουσία και απουσία γλουταμινικού οξέως.

Για την κυτταρική σειρά MCF-7:D5L, τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό MEM λευκό 10% FBS παρουσία 0,1 nM οιστραδιόλης (E2). Κάθε 2 ή 3 μέρες πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια με 1:3 ή 1:4 αραιώση αντίστοιχα. Οι εκπλύσεις με PBS και η τρυψινοποίηση των κυττάρων είναι ίδια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω.

Για την κυτταρική σειρά HEK:ERβ1, η καλλιέργεια πραγματοποιείται σε υλικό DMEM 10% FBS παρουσία ερυθρού της φαινόλης. Η ανακαλλιέργεια γίνεται

κάθε 2 ή 3 μέρες σε αραιώση 1:3 και 1:4 αντίστοιχα. Οι εκπλύσεις με PBS όπως και η τρυψινοποίησή τους είναι ίδια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω. Η διαφορά έγκειται στο ότι χρησιμοποιείται 0,05% τρυψίνη και ότι απαιτείται προσοχή κατά την τρυψινοποίηση των κυττάρων καθώς αποκολλούνται πολύ εύκολα. Τυχόν παράταση της διάρκειας τρυψινοποίησης οδηγεί τα κύτταρα σε κατάσταση στρες.

2.2.2 Μέτρηση της αντιοξειδωτικής νευροπροστατευτικής δράσης

Η αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων και των εκχυλισμάτων καθορίζεται από την ικανότητά τους να καταστέλλουν την κυτταροτοξική δράση του γλουταμικού οξέως. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη αυτής της ικανότητας είναι οι HT22, HT22-mock17, HT22-α28, HT22-β25. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι κοινή και για τις τέσσερις κυτταρικές σειρές.

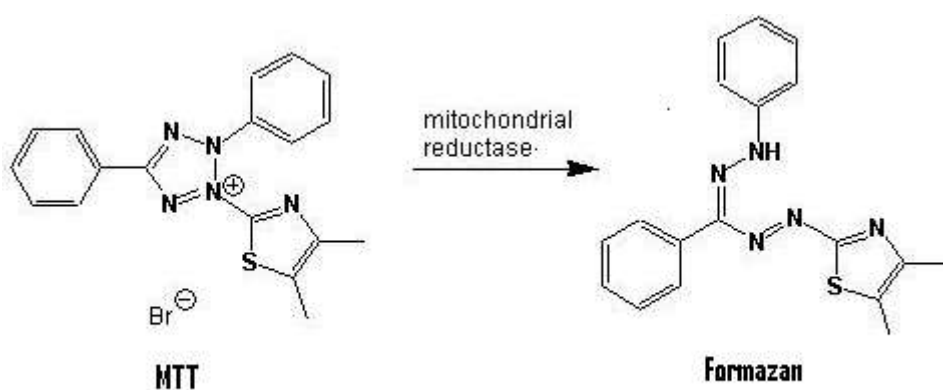
Αρχικά επιστρώνονται 2.000 κύτταρα ανά θέση σε μια πλάκα μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων. Κάθε θέση φέρει 100 μl υλικού DMEM 10% FBS. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 24h ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα. Μετά το πέρας της επώασης, αντικαθίσταται το υλικό με νέο υλικό DMEM 10% FBS, το οποίο περιέχει τις υπό εξέταση ενώσεις. Κάθε ένωση εξετάζεται εις τριπλούν στην πλάκα μικροκαλλιέργειας (triplicates), παρουσία και απουσία 5 mM-γλουταμικού το οποίο προκαλεί οξειδωτικό στρες στα κύτταρα. Σκοπός είναι να εξεταστεί η επίδραση της ένωσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων παρουσία και απουσία γλουταμικού οξέως. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 20h στους 37°C.

Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τα αρχικά πειράματα χρησιμοποιήθηκε DMEM 1% FBS για την προσθήκη ενώσεων αλλά μετά από ένα ορισμένο αριθμό πειραμάτων τα κύτταρα παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην επίδραση του γλουταμικού οξέως. Η ιδιαιτερότητα των HT22 είναι ότι όσο χαμηλά είναι το ποσοστό του ορού τόσο πιο πιθανό είναι να παρουσιάσουν ανθεκτικότητα στην επίδραση του γλουταμικού οξέως. Όσο αυξάνεται το ποσοστό του ορού τόσο περισσότερο ευαίσθητα γίνονται τα κύτταρα HT-22 και συνεπώς τόσο πιο επιλεκτική είναι η μέθοδος για τον προσδιορισμό ενώσεων με νευροπροστατευτική-αντιοξειδωτική δράση.

Μετά το πέρας της επώασης, αφαιρείται το υλικό με τις ενώσεις και αντικαθίσταται με 100 μl DMEM χωρίς ορό όπου περιέχει 10mg MTT ώστε να μετρηθεί ο αριθμός των ζώντων κυττάρων. Ακολουθεί επώαση 4h στους 37°C. Το υλικό χωρίς ορό επιλέγεται για να ανασταλεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ενώ τη μέθοδο MTT γίνεται προσδιορισμός των μεταβολικά ενεργών κυττάρων.

Αναλυτικότερα, η χρωματομετρική μέθοδος MTT (MTT colorimetric assay) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Mosmann το 1983 και βασίζεται στη μετατροπή των αλάτων τετραζολίου σε μη διαλυτά παράγωγα φορμαζάνης (Εικόνα

5). Το κίτρινο χρώματος άλας τετραζολίου, MTT{3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide} οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και παράγονται πορφυρού χρώματος κρύσταλλοι φορμαζάνης, οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Η οξείδωση του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων. Το προϊόν της αντίδρασης διαλυτοποιείται με προσθήκη ισοπροπανόλης και στη συνέχεια λαμβάνεται οπτική απορρόφηση (Optical Density-OD) στα 550 nm. Ως μήκος κύματος αναφοράς χρησιμοποιούνται τα 690 nm.



Εικόνα 5: Μετατροπή MTT σε κρυστάλλους φορμαζάνης

2.2.3 Μέτρηση επαγωγής οιστρογονικότητας

Για την μέτρηση της οιστρογονικότητας, δηλαδή το ποσοστό επαγωγής της οιστρογονικής δράσης, χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές MCF-7:D5L και HEK:ERβ1 για την μελέτη της δράσης των ενώσεων μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων ERα και ERβ1 αντίστοιχα. Και οι δύο κυτταρικές σειρές είναι μετασηματισμένες με το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης ώστε να μπορεί να προσδιοριστεί φωτομετρικά το ποσοστό της οιστρογονικής επαγωγής. Το γονίδιο της λουσιφεράσης (Luciferase) εκφράζει ένα οξειδωτικό ένζυμο το οποίο παρουσία ATP, οξυγόνου και Μαγνησίου (Mg⁺²) οξειδώνει το υπόστρωμα D-λουσιφερίνη

παράγοντας φωτόνια. Ο υποκινητής του γονιδίου αναφοράς είναι κοινός με το γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα που μελετάται στη αντίστοιχη κυτταρική σειρά.

Το στρώσιμο πραγματοποιείται σε πλάκα μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων και είναι κοινό και για τις δύο κυτταρικές σειρές ενώ η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι χρησιμοποιούνται διαφορετικά θρεπτικά υλικά κατά την προσθήκη των ενώσεων. Συγκεκριμένα στα MCF-7:D5L κύτταρα χρησιμοποιείται υλικό MEM ελεύθερο ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 5% CIS, ενώ στα HEK:ERβ1 κύτταρα χρησιμοποιείται DMEM ελεύθερο ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 5% CIS. Ο ορός CIS (Charcoal Inactivated Serum) είναι ορός FBS (Fetal Bovine Serum) ο οποίος έχει επεξεργαστεί με ενεργό άνθρακα ώστε να απομακρυνθούν τυχόν ορμόνες, στεροειδή και αυξητικοί παράγοντες οι οποίες θα απόδιδαν πλασματικές τιμές επαγωγής οιστρογονικότητας στις υπό εξέταση ενώσεις. Κατά την πειραματική διαδικασία επιστρώνονται 12.000 κύτταρα ανά θέση σε πλάκα μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων και επωάζονται για 72h. Ακολουθεί η προσθήκη των υπό εξέταση ενώσεων όπου επωάζονται για 24h. Στη συνέχεια αφαιρείται το υλικό και προστίθεται 25 μl Glo Lysis buffer το οποίο προκαλεί λύση των κυττάρων με σκοπό την απελευθέρωση του ενζύμου της λουσιφεράσης από την ενδοκυτταρική περιοχή. Αφήνεται το σύστημα σε κατάσταση ηρεμίας για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστίθεται υπόστρωμα (λουσιφερίνη) το οποίο αντιδρά με το προϊόν της λουσιφεράσης παράγοντας φωτόνια, ο αριθμός των οποίων είναι ανάλογος της ποσότητας του παραγόμενου ενζύμου της λουσιφεράσης, το οποίο συνδέεται αναλογικά με τη δραστηριότητα των ενώσεων μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων. Αφήνεται για 5 λεπτά 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 μεταφέρουμε 35 μl σε μια λευκή πλάκα μικροκαλλιέργειας στις αντίστοιχες θέσεις όπου βρίσκόντουσαν οι ενώσεις. Για μετρήσεις χημειοφωταύγειας χρησιμοποιούνται πλάκες λευκού χρώματος γιατί αντανάκλουν το φως που παράγεται κατά την αντίδραση επιτρέποντας τη μέτρηση των παραγόμενων φωτονίων. Ακολουθεί ανάδευση για 5 λεπτά ώστε να ομογενοποιηθεί το σύστημα ενώ ταυτόχρονα παρέχεται προστασία από το φως. Τέλος πραγματοποιείται μέτρηση του αριθμού των παραγόμενων φωτονίων (light units).

3. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Για την μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης εκχυλισμάτων, φυσικών και συνθετικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HT-22. Κατόπιν προσδιορισμού των ενώσεων που κατέχουν νευροπροστατευτική δράση στα 10 μΜ, ακολούθησε η δοσοαπόκριση τους σε συγκεντρώσεις 10-3-1 μΜ. Έπειτα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός επαγωγής της εξαρτώμενης από στοιχεία ERE (Estrogen Response Elements) μεταγραφικής δράσης των υπό έλεγχο ενώσεων μέσω του υποδοχέα ERα και ERβ με τη χρήση κυττάρων MCF-7:D5L και HEK:ERβ1 αντίστοιχα. Έγινε συσχέτιση της νευροπροστατευτικής δράσης με τον αγωνισμό μέσω ERα και ERβ και το αποτέλεσμα της συσχέτισης ελέγχθηκε σε μετασχηματισμένα κύτταρα HT-22 όπου υπερεκφράζουν τους υποδοχείς ERα ή ERβ για να μελετηθεί η επίδραση των υποδοχέων οιστρογόνων στην αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων.

Η μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης πραγματοποιήθηκε με κύτταρα HT-22 παρουσία DMEM ±10% FBS απουσία και παρουσία γλουταμικού. Ως ενώσεις εσωτερικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν το έκδοχο (0,1% DMSO αρνητικό δείγμα ελέγχου), όπου παρατηρήθηκε η μέγιστη τιμή κυτταρικού θανάτου παρουσία γλουταμικού, ενώ ως θετικό δείγμα ελέγχου η φισετίνη (fisetin) σε συγκέντρωση 10 μΜ όπου βάση δημοσιευμένων μετρήσεων (Maher, 2006) αναμένεται να προσφέρει μεγάλη νευροπροστασία.

Για τον υπολογισμό του ποσοστού θανάτου των HT-22 κυττάρων παρουσία γλουταμικού χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος τύπος:

$$\text{Κυτταρικός θάνατος \%} = \frac{OD\ 550\ \text{nm}\ \text{απουσία}\ \text{γλουταμικού} - OD\ 550\ \text{nm}\ \text{παρουσία}\ \text{γλουταμικού}}{OD\ 550\ \text{nm}\ \text{απουσία}\ \text{γλουταμικού}} * 100$$

Ενώ για τον υπολογισμό ικανότητας μιας ένωσης να περιορίζει τη νευροτοξική δράση του γλουταμικού στα κύτταρα αξιοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

$$\text{Νευροπροστασία \%} = \frac{\% \text{νεκρά κύτταρα DMSO} - \% \text{νεκρά κύτταρα παρουσία ένωσης}}{\% \text{νεκρά κύτταρα παρουσία DMSO}} * 100$$

Ανάλογα με το ποσοστό προστασίας των HT-22 από θάνατο λόγω οξειδωτικού στρες οι ενώσεις χαρακτηρίστηκαν ως οριακή (νευροπροστασία >10%), μικρής (10% – 33%), μέτριας (34% – 66%) και μεγάλης (>66%) νευροπροστατευτικής δραστηριότητας.

3.1 Εκχυλίσματα

Για τον προσδιορισμό εκχυλισμάτων με αντιοξειδωτική δράση, μελετήθηκαν συνολικά 58 εκχυλίσματα από 29 είδη φυτών, σε συγκέντρωση 10 µg/ml, παρουσίας 500 mM L-γλουταμικού οξέως. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε κατά τον έλεγχο των εκχυλισμάτων ήταν DMEM 10% FBS. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται τα είδη των φυτών απ' όπου προέρχεται το κάθε εκχύλισμα, οι τιμές της επί της εκατό νευροπροστασίας όπως επίσης και η εκάστοτε δραστηκότητα του κάθε εκχυλίσματος.

Πίνακας 1: Νευροπροστατευτική δραστηκότητα φυτικών εκχυλισμάτων

Είδος φυτού	Εκχύλισμα (10 µg/ml)	Νευροπροστασία %	Δραστηκότητα
<i>S. raeseri ssp. raeseri</i>	Th1	6 ^a	Οριακή
	Th2	0	Οριακή
<i>Sideritis scardica</i>	Th3	7	Οριακή
	Th4	1	Οριακή
<i>Origanum. vulgare ssp. hirtum</i>	Th5	13	Μικρή
	Th6	9	Οριακή
<i>M. aquatica</i>	Th7	2	Οριακή
	Th8	1	Οριακή
<i>Mentha pulegium</i>	Th9	1	Οριακή
	Th21	2	Οριακή
<i>Mentha longifolia</i>	Th10	3	Οριακή
<i>Rosa damascena</i>	Th11	0	Οριακή
<i>Crocus sativus</i>	Th12	1	Οριακή
<i>Salvia officinalis</i>	Th13	30 ± 8 ^b	Μικρή
	Th22	102	Μεγάλη
<i>Salvia fruticosa</i>	Th14	41 ± 7	Μέτρια
	Th23	26	Μικρή
<i>Lathyrus</i>	Th15	0	Οριακή

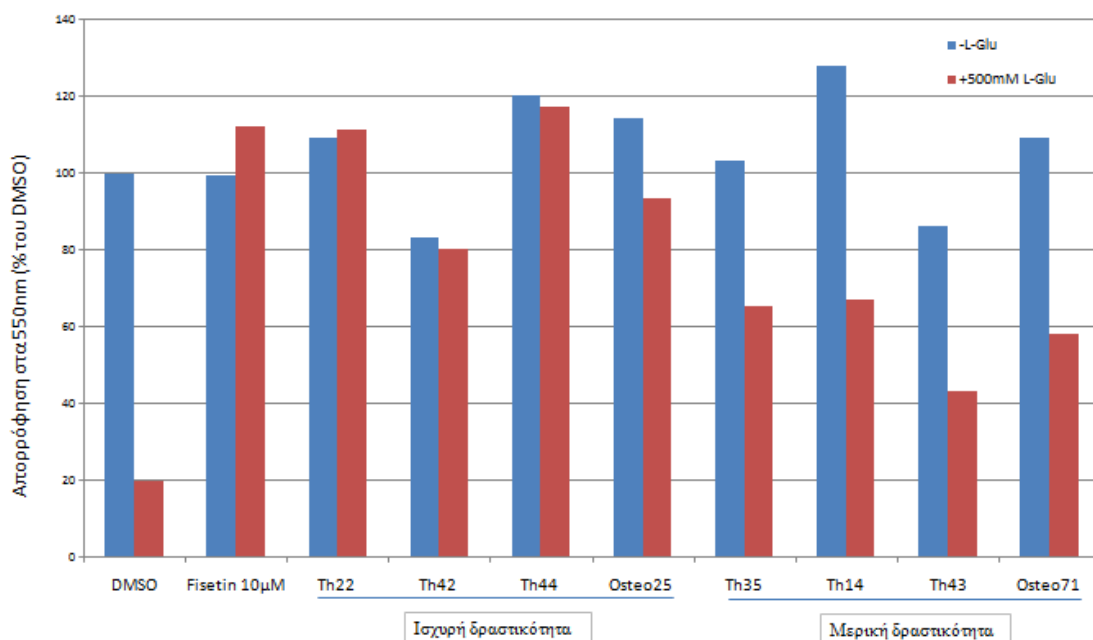
<i>clymenum</i>	Th16	0	Οριακή
<i>Dorycnium hirsutum</i>	Th47	3	Οριακή
	Th17	0	Οριακή
<i>Chamaecytisus austriacus</i>	Th46	3	Οριακή
	Th18	0	Οριακή
<i>Chamaecytisus triflorus</i> (= <i>Ch.hirsutus</i>)	Th37	18	Μικρή
	Th19	4	Οριακή
<i>Cytisus villosus</i> (= <i>C.triflorus</i>)	Th28	9	Οριακή
	Th20	3	Οριακή
<i>Melilotus graecus</i>	Th24	2	Οριακή
	Th25	1	Οριακή
<i>Teline monspessulana</i>	Th26	3	Οριακή
	Th27	-2	Μηδενική
<i>Lembotropis nigricans ssp. nigricans</i>	Th29	6	Οριακή
	Th30	2	Οριακή
<i>Cercis siliquastrum</i>	Th31	30	Μικρή
	Th32	3	Οριακή
<i>Galega officinalis</i>	Th33	7	Οριακή
	Th34	-4	Μηδενική
<i>Hippocrepis comosa</i>	Th35	51	Μέτρια
	Th36	16	Μικρή
<i>Anagyris foedida</i>	Th38	-6	Μηδενική
	Th39	3	Οριακή
<i>Calicotome villosa</i>	Th40	12	Μικρή
	Th41	12	Μικρή
<i>Anthyllis montana</i>	Th42	95	Μεγάλη
	Th43	37	Μέτρια
<i>Indigofera secundiflora</i>	Th44	96	Μεγάλη
	Th45	23	Μικρή
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Osteo 25	74 ± 12	Μεγάλη
	Osteo 26	24 ± 6	Μικρή
<i>Genista hassertiana</i>	Osteo 71	34 ± 2	Μέτρια
	Osteo 70	11 ± 6	Μικρή

<i>Vitis vinifera</i>	Osteo 49	2	Οριακή
<i>Citrus aurantium</i>	Oil 100	-3	Μηδενική
	Ca2-100-H2O	-15	Μηδενική
	Oil 250	-5	Μηδενική
	Ca2-250	-15	Μηδενική
	S1	-3	Μηδενική
	CAa34 (ή CaA418)	-2	Μηδενική

^α Μέσος όρος (ΜΟ) από ένα πείραμα εις τριπλούν

^β Μέσος όρος (ΜΟ) ± σταθερό σφάλμα μέσου όρου (ΣΣΜΟ) από τρία ανεξάρτητα πειράματα εις τριπλούν

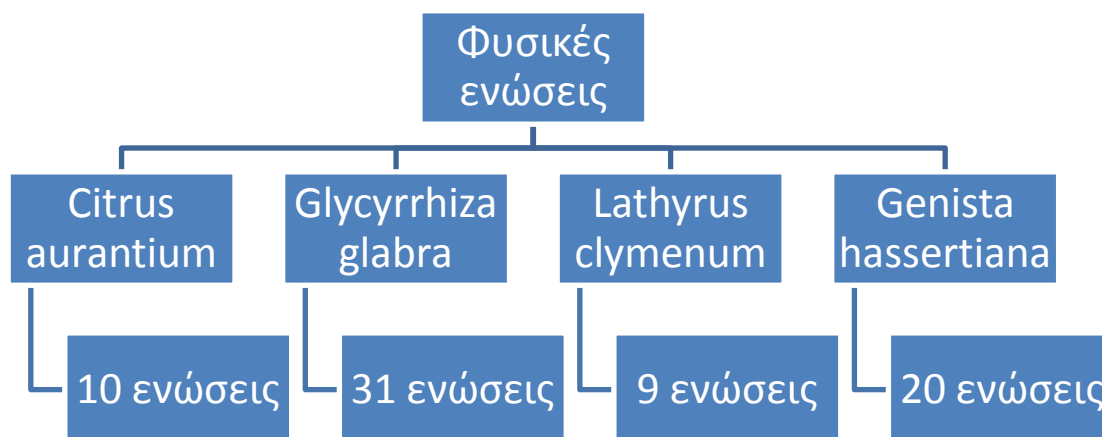
Όπως παρατηρούμε στον παραπάνω πίνακα, μόνο 8 από τα 58 συνολικά εκχύλισματα παρουσίασαν αξιόλογη δράση. Αναλυτικότερα, το εκχύλισμα Th14 από το φυτό *Salvia fruticosa*, Th35 από *Hippocrepis comosa*, Th43 από *Anthyllis Montana* και Osteo71 από *Glycyrrhiza glabra* παρουσίασαν μερική αντιοξειδωτική δράση ενώ το εκχύλισμα Th22 από το φυτό *Salvia officinalis*, Th42 από *Anthyllis montana*, Th44 από *Indigofera secundiflora* και Osteo25 από *Glycyrrhiza glabra* παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Επομένως τα φυτά *Glycyrrhiza glabra* και *Anthyllis Montana* επικράτησαν των άλλων με δύο διαφορετικά εκχύλισματα. Τα εκχύλισμα Th42 και Th43 που προέρχονται από το φυτό *Anthyllis Montana*, παρουσίασαν μία μικρή αρνητική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό χωρίς όμως να χαρακτηρίζονται τοξικές (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Δραστικότερα εκχυλίσματα σε συγκέντρωση 10 µg/ml

3.2 Φυσικές ενώσεις

Συνολικά εξετάστηκαν 70 φυσικές ενώσεις προερχόμενες από 5 είδη φυτών. Οι ενώσεις δοκιμάστηκαν σε DMEM 1% FBS αλλά λόγω ανάπτυξης ανθεκτικότητας των κυττάρων έναντι του γλουταμικού το πείραμα συνεχίστηκε σε DMEM υλικό με 10% FBS. Στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 7) αναφέρεται ο αριθμός των ενώσεων που εξετάστηκαν από κάθε είδος φυτού:



Εικόνα 7: Κατηγορίες φυσικών ενώσεων

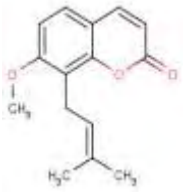
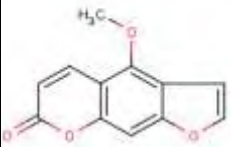
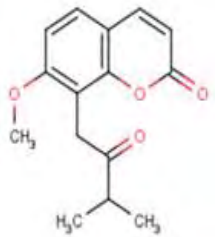
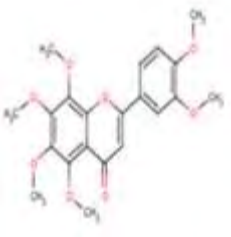
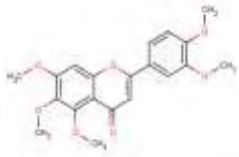
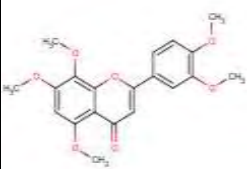
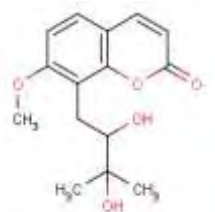
3.2.1 Φυσικές ενώσεις από Citrus aurantium

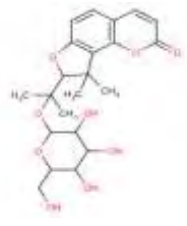
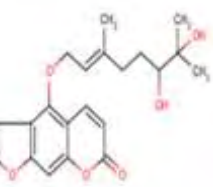
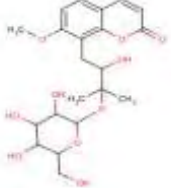
Το φυτό Citrus aurantium, γνωστό και ως νεράτζι, ανήκει στην κατηγορία των δικοτυλήδων φυτών όπου αποτελεί τη κλάση των αγγειοσπέρμων. Χρησιμοποιείται ευρύτατα στον τομέα της κοσμητικής, ως πρόσθετο τροφίμων αλλά και στον τομέα των συμπληρωμάτων διατροφής.

Μελετήθηκαν συνολικά 10 ενώσεις σε DMEM 1% και 10% FBS ενώ εξετάστηκαν ως προς τη νευροπροστατευτική τους δράση σε κύτταρα HT-22, υπό την επίδραση L-γλουταμικού οξέως. Αναλυτικότερα:

Πίνακας 2: Δραστηκότητα ενώσεων από Citrus aurantium

Όνομα	Δομή	% FBS	Νευροπροστασία %	Αποτελεσματικότητα
-------	------	-------	------------------	--------------------

1519		1%	0	Μηδενική
		10%	-9	Μηδενική
1520		1%	0	Μηδενική
		10%	-13	Μηδενική
1521		1%	-3	Μηδενική
		10%	-24	Μηδενική
1522		1%	-3	Μηδενική
		10%	-21	Μηδενική
1523		1%	0	Μηδενική
		10%	-21	Μηδενική
1524		1%	2	Οριακή
		10%	-11	Μηδενική
		1%	-4	Μηδενική

1525		10%	-13	Μηδενική
1526		1%	5	Οριακή
		10%	4	Οριακή
1527		1%	6	Οριακή
		10%	-24	Μηδενική
1528		1%	4	Οριακή
		10%	13	Μικρή

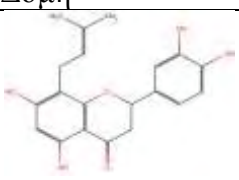
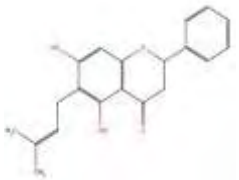
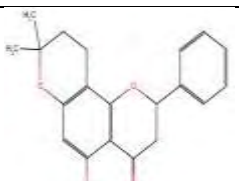
Όπως παρατηρούμε στον παραπάνω πίνακα όλες οι ενώσεις, εκτός της 1528, παρουσία 10% FBS παρουσιάζουν μια μικρή πτώση στην ικανότητα νευροπροστασίας σε σχέση με τις τιμές που παρατηρήθηκαν παρουσία 1% FBS. Η μείωση της νευροπροστατευτικής δραστηριότητας παρουσία 10% FBS παρατηρήθηκε συστηματικά και οφείλεται στη συμβολή παραγόντων του ορού στην επαγωγή κυτταρικού θανάτου λόγω οξειδωτικού στρες. Στα περισσότερα πειράματα η νευροπροστατευτική δράση παρουσία 10% FBS αξιοποιήθηκε για την επιλογή των ενώσεων που συγκριτικά εμφάνισαν μεγάλη δραστηριότητα. Με βάση αυτό το κριτήριο καμία από τις ενώσεις που προέρχονται από το *Citrus aurantium* δεν μελετήθηκε στη συνέχεια σε δοσοαποκρίσεις ή σε άλλες κυτταρικές σειρές λόγω της χαμηλής τους δραστηριότητας.

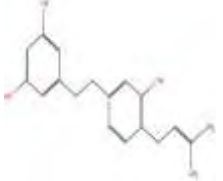
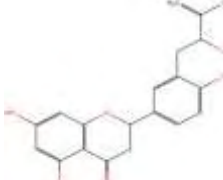
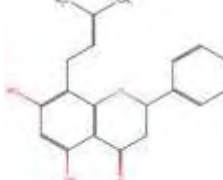
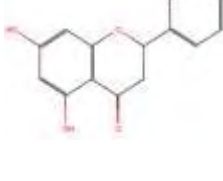
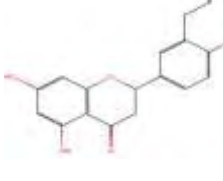
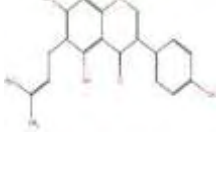
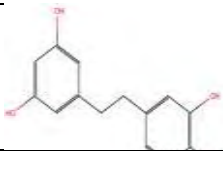
3.2.2 Φυτικές ενώσεις από *Glycyrrhiza glabra*

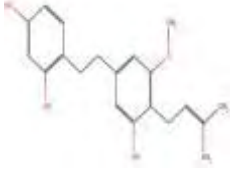
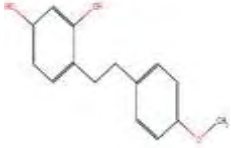
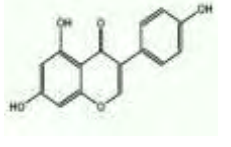
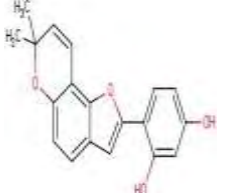
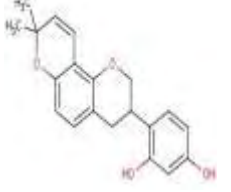
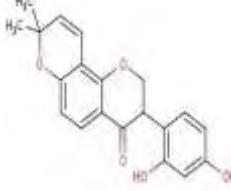
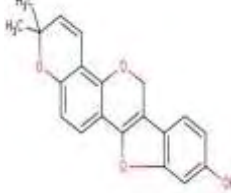
Το όνομα του φυτού *Glycyrrhiza* προέρχεται από την ελληνική λέξη «γλυκύριζα» χαρακτηριστικό το οποίο ορίζει τη γλυκιά γεύση της ρίζας. Πρόκειται για ένα αγγειόσπερμο φυτό που ανήκει στη κατηγορία των ευδίκωτων. Ευδοκίμει σε περιοχές με ηλιοφάνεια και μπορεί να βρεθεί στη Μεσόγειο (Ελλάδα, Λιβύη), στην Ινδία όπως και στις περιφερικές χώρες γύρω απ' αυτήν. Έχει βρεθεί ότι διαθέτει αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν ανιχνεύτηκε ότι κάποιες ενώσεις από το φυτό της *Glycyrrhiza glabra* διαθέτουν νευροπροστατευτική δράση.

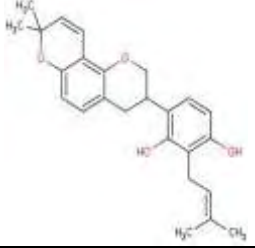
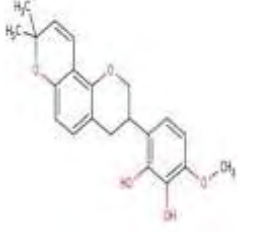
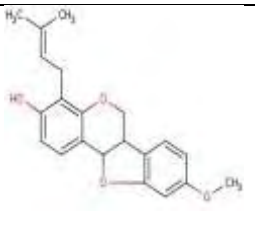
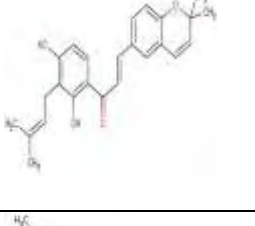
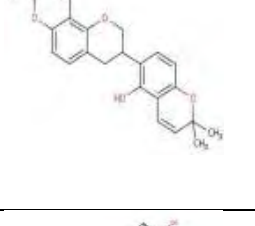
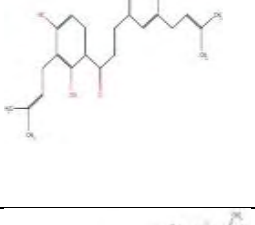
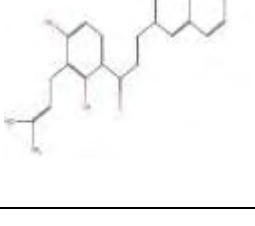
Μελετήθηκαν συνολικά 31 ενώσεις που προέρχονται είτε από το υπέργειο τμήμα του φυτού και αναφέρονται ως GG (*Glycyrrhiza glabra*), είτε από τη ρίζα του φυτού και αναφέρονται ως GGR (*Glycyrrhiza glabra* root). Αρχικά εξετάστηκαν σε DMEM 1% FBS και στη συνέχεια οι ενώσεις που είχαν νευροπροστατευτική δράση μελετήθηκαν σε DMEM 10% FBS, ενώ οι ενώσεις που κατείχαν υψηλό ποσοστό νευροπροστασίας μελετήθηκαν και σε δοσοαπόκριση της τάξης των 10⁻³-1 μΜ. Παρακάτω ακολουθεί αναλυτικός πίνακας με τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από τα πειράματα:

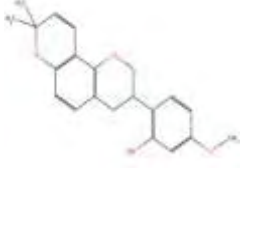
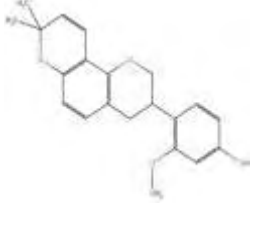
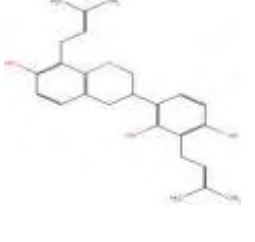
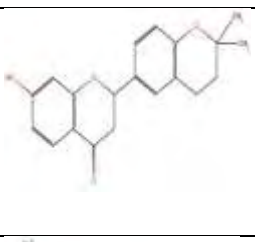
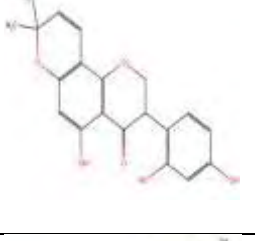
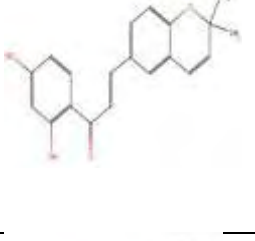
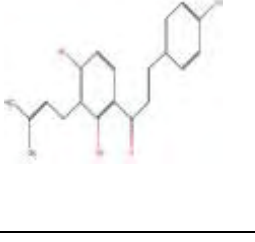
Πίνακας 3: Δραστικότητα ενώσεων από το φυτό *Glycyrrhizaglabra*

Όνομα	Δομή	FBS %	Νευροπροστασία %	Αποτελεσματικότητα
GG1		1%	0%	Οριακή
GG2		1%	11%	Μικρή
GG3		1%	-4%	Μηδενική
		10%	-6%	Μηδενική

GG4		1%	60%	Μέτρια
		10%	7%	Οριακή
GG5		1%	0%	Μηδενική
GG7		1%	58%	Μέτρια
		10%	-3	Μηδενική
GG8		1%	5%	Οριακή
GG10		1%	0%	Μηδενική
GG11		1%	-2%	Μηδενική
		1%	66%	Μεγάλη

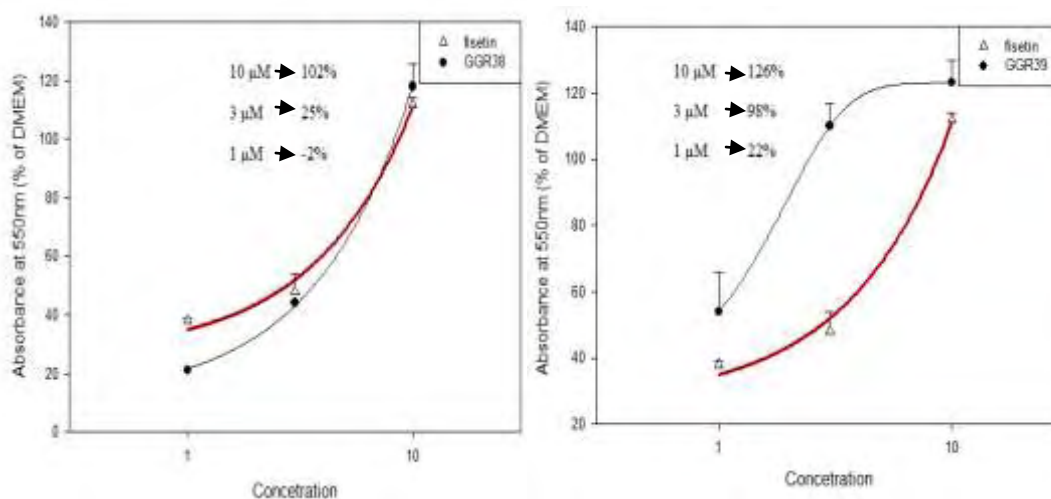
GG12			$10 \mu\text{M} \rightarrow 62\% \pm 5$ $3 \mu\text{M} \rightarrow 18\% \pm 8$ $1 \mu\text{M} \rightarrow -1\% \pm 6$	Μέτρια Μικρή Μηδενική
GG13		1%	84%	Μεγάλη
		10%	20%	Μικρή
GG14		1%	21%	Μικρή
GEN		1%	1%	Οριακή
GGR34		10%	4%	Οριακή
GGR35		10%	45%	Μέτρια
GGR36		10%	11%	Μικρή
GGR37		10%	27%	Μικρή

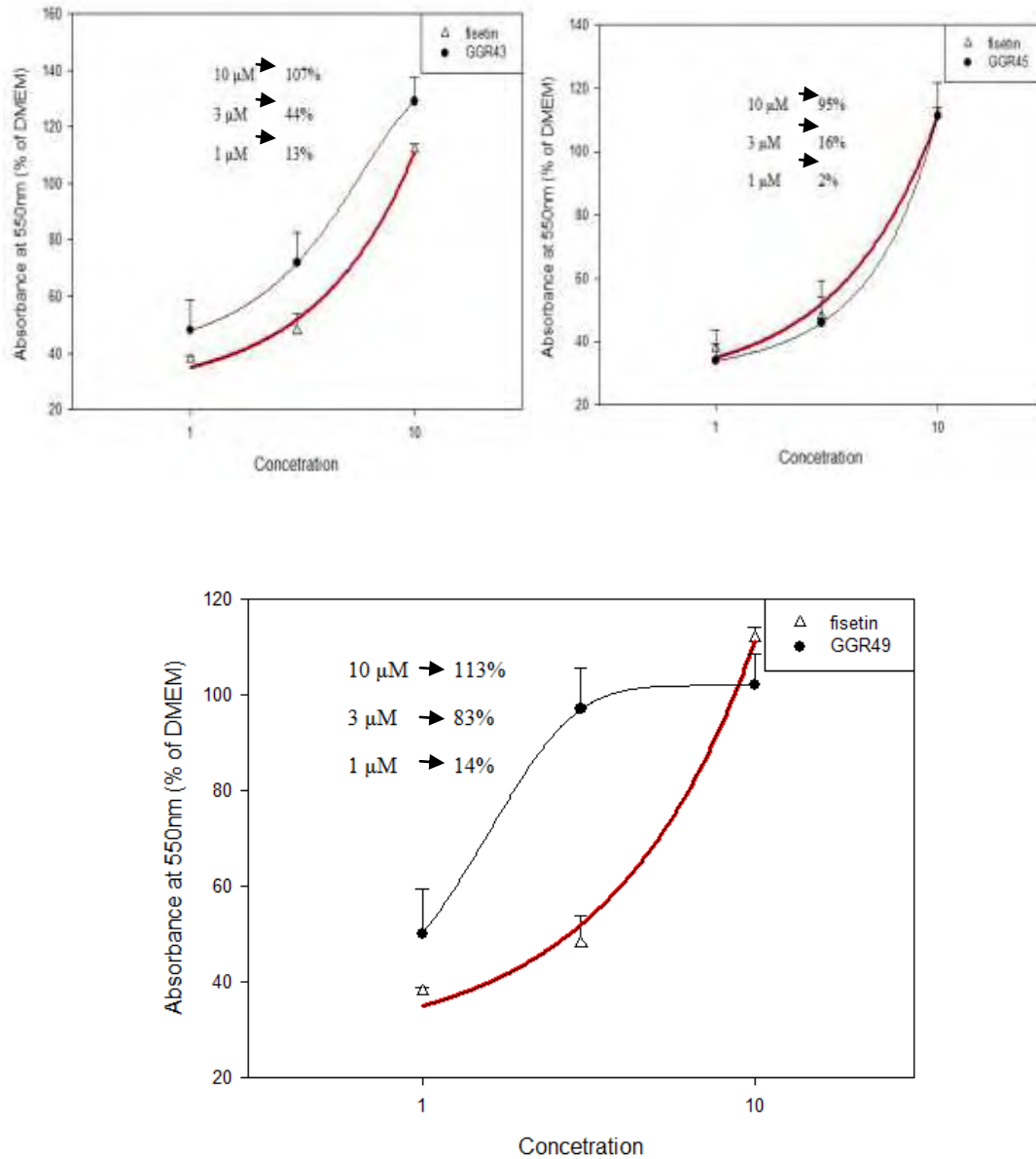
GGR38		10%	$10 \mu\text{M} \rightarrow 102\% \pm 15$ $3 \mu\text{M} \rightarrow 25\%$ $1 \mu\text{M} \rightarrow -2\%$	Μεγάλη Μικρή Μηδενική
GGR39		10%	$10 \mu\text{M} \rightarrow 126\% \pm 10$ $3 \mu\text{M} \rightarrow 98\% \pm 9,1$ $1 \mu\text{M} \rightarrow 22\% \pm 7,3$	Μεγάλη Μεγάλη Μικρή
GGR41		10%	39%	Μέτρια
GGR42		10%	$24\% \pm 9$	Μικρή
GGR43		10%	$10 \mu\text{M} \rightarrow 107\% \pm 4$ $3 \mu\text{M} \rightarrow 44\% \pm 8$ $1 \mu\text{M} \rightarrow 13\% \pm 5$	Μεγάλη Μέτρια Μικρή
GGR45		10%	$10 \mu\text{M} \rightarrow 95\% \pm 5$ $3 \mu\text{M} \rightarrow 16\% \pm 3$ $1 \mu\text{M} \rightarrow 2\% \pm 4$	Μεγάλη Μικρή Οριακή
GGR46		10%	$10 \mu\text{M} \rightarrow 51\% \pm 12$ $3 \mu\text{M} \rightarrow 2\%$ $1 \mu\text{M} \rightarrow 5\%$	Μέτρια Οριακή Οριακή

GGR47		10%	$10 \mu\text{M} \rightarrow 43\% \pm 10$ $3 \mu\text{M} \rightarrow 3\%$ $1 \mu\text{M} \rightarrow 2\%$	Μέτρια Οριακή Οριακή
GGR48		10%	$45\% \pm 3$	Μέτρια
GGR49		10%	$10 \mu\text{M} \rightarrow 113\% \pm 6$ $3 \mu\text{M} \rightarrow 83\% \pm 8$ $1 \mu\text{M} \rightarrow 14\% \pm 5$	Μεγάλη Μεγάλη Μικρή
GGR50		10%	10%	Μικρή
GGR51		10%	7%	Οριακή
GGR52		10%	13%	Μικρή
GGR53		10%	13%	Μικρή

Η αξιολόγηση της δραστηριότητας των ενώσεων πραγματοποιήθηκε αρχικά παρουσία 10% FBS. Συνολικά 5 ενώσεις παρουσίασαν ισχυρή νευροπροστατευτική δράση με τιμές μεγαλύτερες του 66%. Οι ενώσεις αυτές είναι οι GGR38, GGR39, GGR43, GGR45 και GGR49. Επιπρόσθετα 6 ενώσεις: GG12, GGR35, GGR41, GGR46, GGR47, GGR48, παρουσίασαν μέτρια νευροπροστατευτική δράση με τιμές από 33% έως 66%. Για κάθε μία από τις παραπάνω ενώσεις πραγματοποιήθηκε δοσοαπόκριση 10-3-1 μM συγκέντρωσης δραστικής ένωσης, συγκρινόμενη με την αντίστοιχη δοσοαπόκριση της φισετίνης, η οποία αποτελεί ένωση θετικού ελέγχου. Οι ενώσεις GG35, GGR41 και GGR48 δεν μελετήθηκαν σε συγκέντρωση 3 και 1 μM διότι παρουσίασαν <50% αντιοξειδωτική νευροπροστατευτική δράση.

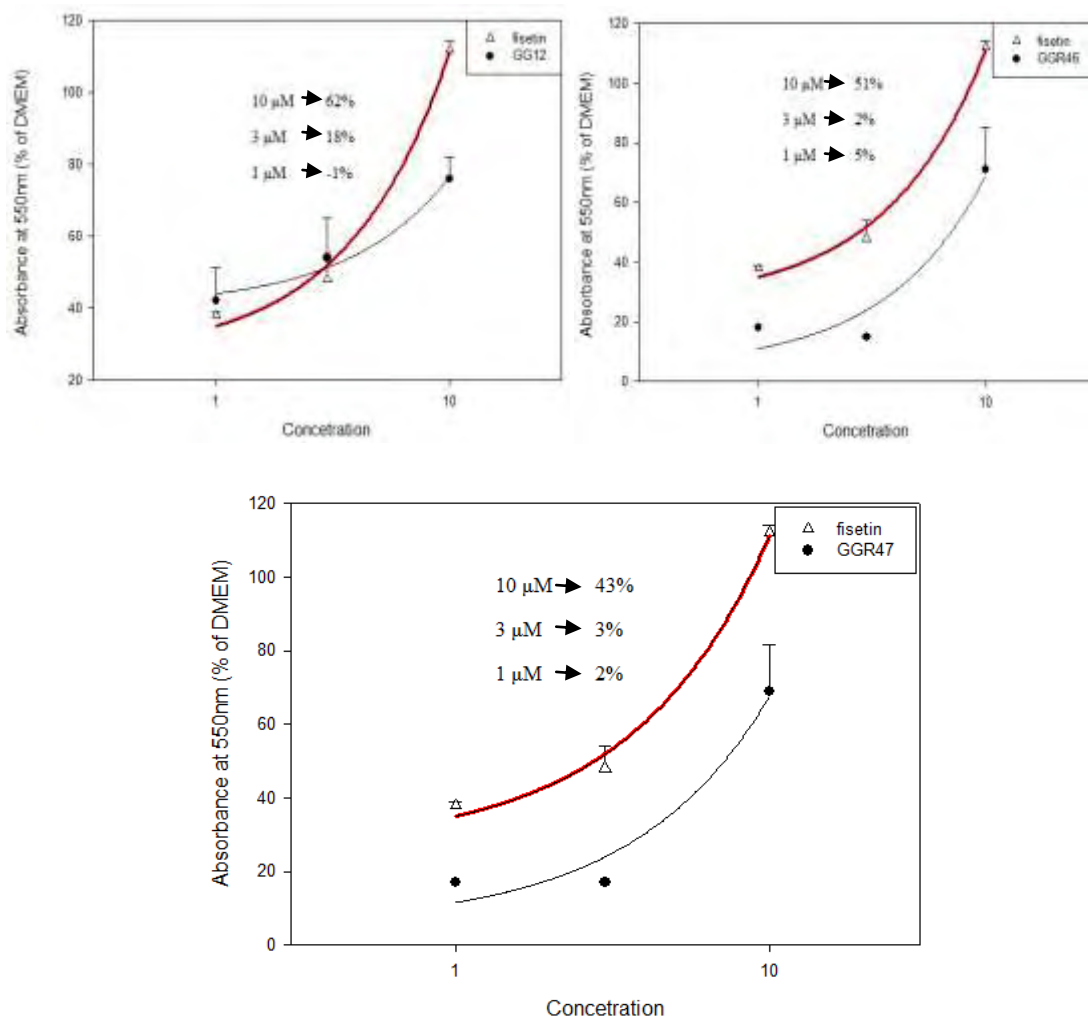
Εικόνα 8: Δοσοαπόκριση ενώσεων με ισχυρή νευροπροστατευτική δράση





Η εικόνα 8 δείχνει ότι απ' όλες τις ενώσεις του φυτού *Glycyrrhiza glabra*, δύο παρουσίασαν ισχυρή δραστηριότητα σε συγκέντρωση 3 μM. Η GGR39 σε συγκέντρωση 3 μM παρουσίασε 98% νευροπροστασία, ενώ η ένωση GGR49 σε συγκέντρωση 3 μM παρουσίασε 83%.

Εικόνα 9: Δοσοαπόκριση ενώσεων με μερική νευροπροστατευτική δράση



Η Εικόνα 9 δείχνει ότι η ένωση GG12 παρουσίασε μέτρια νευροπροστατευτική δράση σε συγκέντρωση 3 μM , ενώ οι ενώσεις GGR46 και GGR47 παρουσίασαν μικρή δράση σε αυτή τη συγκέντρωση.

3.2.3 Φυσικές ενώσεις από *Lathyrus clymenum*

Το φυτό *Lathyrus clymenum* πρόκειται για ένα αγγειόσπερμο φυτό που ευδοκιμεί σε Μεσογειακές περιοχές και το συγκεκριμένο είδος ευδοκιμεί στη νήσο της Σαντορίνης, πιθανότατα λόγω της εδαφικής ιδιαιτερότητας της περιοχής καθώς

εντοπίζεται το ενεργό ηφαίστειο της Θήρας (Εικόνα 9). Πρόκειται για ένα από τα ενδημικά είδη της Ελλάδας.



Εικόνα 9: *Lathyrusclymenum*

Κατά την πειραματική διαδικασία, μελετήθηκαν 9 ενώσεις προερχόμενες από το φυτό *Lathyrus clymenum*. Οι ενώσεις ελέγχθηκαν σε συγκέντρωση 10 μ M παρουσία υλικού DMEM \pm 10% FBS. Καμία από τις 9 ενώσεις δεν παρουσίασε αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση ώστε να μελετηθούν σε δοσοαποκρίσεις. Παρακάτω ακολουθεί ο συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων που πάρθηκαν:

Πίνακας 4: Δραστηκότητα ενώσεων *Lathyrusclymenum*

Όνομα	Νευροπροστασία %	Αποτελεσματικότητα
LC1	-4% \pm 3	Μηδενική
LC2	-2% \pm 5	Μηδενική
LC3	3%	Οριακή
LC4 (ή 1531)	1%	Οριακή
LC5 (ή 1532)	2%	Οριακή
LC6 (ή 1533)	2%	Οριακή
LC7 (ή 1534)	-1,5%	Μηδενική
LC8 (ή 1535)	3,5%	Οριακή
LC9	-31%	Μηδενική

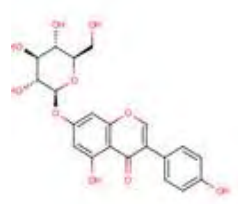
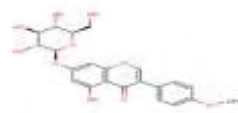
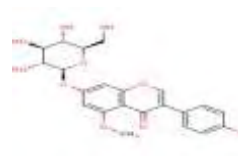
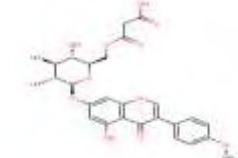
Όπως παρατηρούμε στον παραπάνω πίνακα, καμία ένωση που προέρχεται από το φυτό *Lathyrus clymenum* δεν παρουσίασε αξιόλογη νευροπροστατευτική δράση. Επιπροσθέτως η ένωση LC9 παρουσίασε αρνητική επίδραση στον κυτταρικό

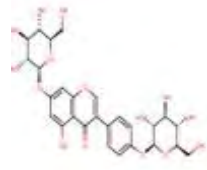
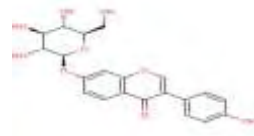
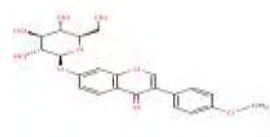
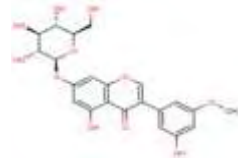
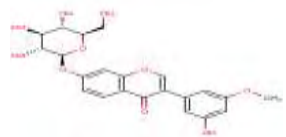
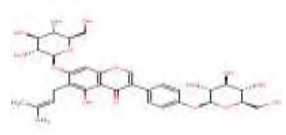
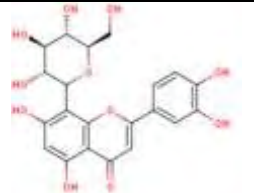
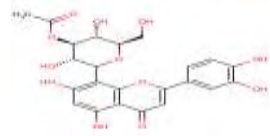
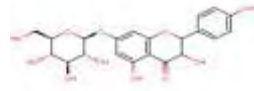
πολλαπλασιασμό των κυττάρων απουσία γλουταμικού. Λόγω της πολύ μικρής δραστηριότητας των ενώσεων αυτών, καμία δεν ελέγχθηκε σε δοσοαπόκριση.

3.2.4 Φυσικές ενώσεις από *Genista hassertiana*

Το φυτό *Genista hassertiana* πρόκειται για ένα θαμνοειδές φυτό όπου φέρει κίτρινο άνθος και ανευρίσκεται σε περιοχές της δυτικής Μεσογείου. Μελετήθηκαν συνολικά 20 ενώσεις σε υλικό DMEM 1% FBS όπου εν συνεχεία 9 εξ αυτών επανεξετάστηκαν σε υλικό με 10% FBS. Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5: Ενώσεις από *Genista hassertiana*

Όνομα	Δομή	FBS %	Νευροπροστασία %	Αποτελεσματικότητα
1585		1%	1%	Οριακή
		10%	3%	Οριακή
1586		1%	2%	Οριακή
1587		1%	3%	Οριακή
1589		1%	-11%	Μηδενική

1590		1%	-4%	Μηδενική
		10%	0%	Μηδενική
1591		1%	-4%	Μηδενική
1592		1%	-10%	Μηδενική
1593		1%	1%	Οριακή
1594		1%	2%	Οριακή
1595		1%	57%	Μέτρια
		10%	16%	Μικρή
1596		1%	4%	Οριακή
1597		1%	7%	Οριακή
1598		1%	9%	Οριακή
		10%	-4% ± 1	Μηδενική

1599		1%	-9%	Μηδενική
		10%	1% ± 5	Οριακή
1600		1%	3%	Οριακή
1601		1%	-18%	Μηδενική
		10%	-4%	Μηδενική
1602		1%	6%	Οριακή
1603		1%	-1%	Μηδενική
		10%	-3%	Μηδενική
1604		1%	-6%	Μηδενική
		10%	-5%	Μηδενική
1605		1%	-3%	Μηδενική
		10%	0%	Μηδενική

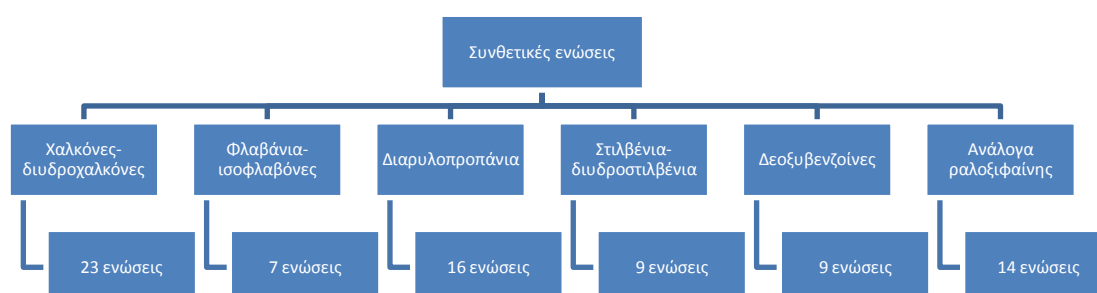
Από τις 20 ενώσεων που προέρχονται από το φυτό *Genistahassertiana*, οι περισσότερες είχαν μηδενική ή οριακή δραστηριότητα. Εξάιρεση αποτελεί η ένωση 1595 η οποία παρουσία 1% ορού FBS κατείχε μερική δραστηριότητα με 57% νευροπροστασία, ενώ παρουσία 10% FBS η νευροπροστασία μειώνεται στο 16%

χαρακτηρίζοντας την συγκεκριμένη ένωση ως μικρής δραστηριότητας με βάση το αυστηρό κριτήριο επιλογής. Συνεπώς καμία ένωση που προέρχεται από το φυτό *Genista hassertiana* δεν μελετήθηκε περαιτέρω.

3.3 Συνθετικές ενώσεις

Συνολικά εξετάστηκαν 78 συνθετικές ενώσεις οι οποίες διακρίνονται σε πέντε κατηγορίες (Εικόνα 10): τις χαλκόνες - διυδροχαλκόνες, φλαβάνια - ισοφλαβόνες, τα διαρυλοπροπάνια, στυλβένια - διυδροστυλβένια, τις δεοξυβενζοΐνες και τέλος τα ανάλογα της ραλοξιφαΐνης. Αρχικά οι ενώσεις δοκιμάστηκαν σε DMEM 1% FBS αλλά λόγω ανάπτυξης ανθεκτικότητας των κυττάρων έναντι του γλουταμικού το πείραμα συνεχίστηκε σε DMEM υλικό με 10% FBS. Στο παρακάτω οργανόγραμμα αναφέρεται ο αριθμός των ενώσεων που εξετάστηκαν σε κάθε κατηγορία:

Πίνακας 10: Κατηγορίες συνθετικών ενώσεων

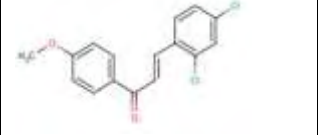
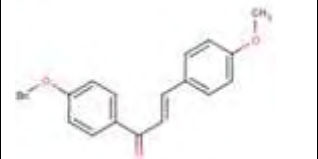
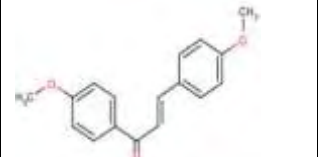
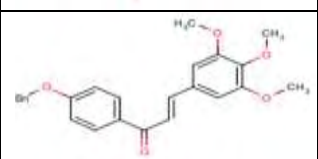
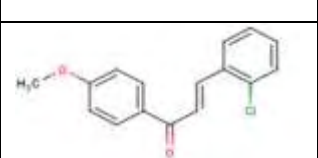
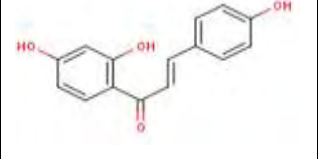
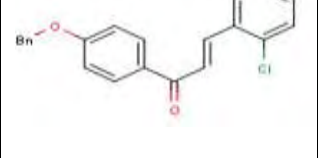
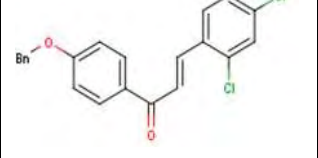


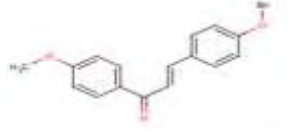
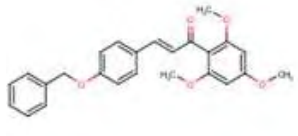
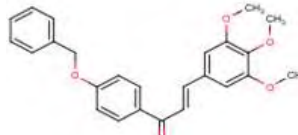
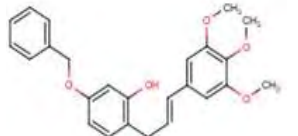
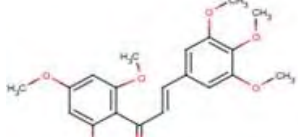
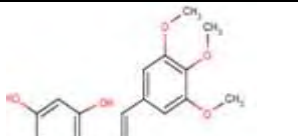
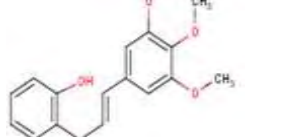
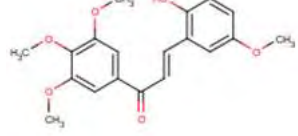
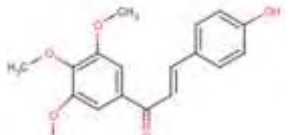
3.3.1 Χαλκόνες και διυδροχαλκόνες

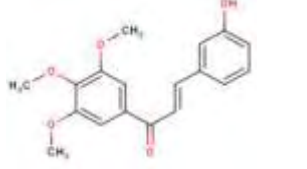
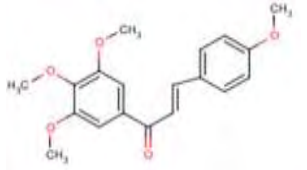
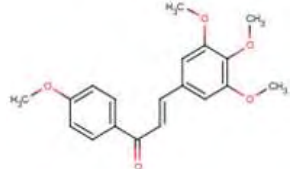
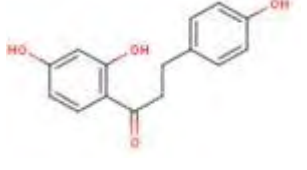
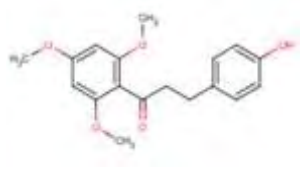
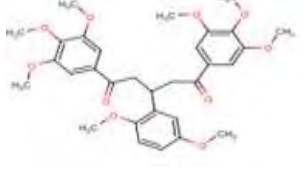
Οι χαλκόνες και οι διυδροχαλκόνες είναι πρόδρομες ενώσεις των φλαβονοειδών και των ισοφλαβονοειδών. Σε φυσικό περιβάλλον, η βιοσύνθεσή τους πραγματοποιείται στα φυτά για να τα προστατεύει από το φωτοσυνθετικό στρες, τις δραστικές μορφές οξυγόνου και τα παράσιτα. Από συνθετική άποψη, οι χαλκόνες ανήκουν στην κατηγορία των ενώσεων που μπορούν να τροποποιηθούν δομικά με μεγάλη ποικιλία υποκαταστατών ούτως ώστε να διαφοροποιείται η βιολογική δράση τους και να μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για τη σχέση δομής-βιολογικής δραστηριότητας. Το πλεονέκτημα αυτό, σε συνδυασμό με τις απλές συνθετικές μεθοδολογίες που οδηγούν στη σύνθεσή τους, καθιστά τις χαλκόνες ελκυστικές

ενώσεις-στόχους στην οργανική και φαρμακευτική χημεία. Κατά την πειραματική διαδικασία μελετήθηκαν συνολικά 23 ενώσεις, σε συγκέντρωση 10 μ M. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές τόσο σε 1% όσο και σε 10% ορό FBS. Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν βρίσκονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 6: Κατηγορία ενώσεων από χαλκόνες-διϋδροχαλκόνες

Όνομα	Δομή	FBS %	Νευροπροστασία %	Αποτελεσματικότητα
738		1%	3%	Οριακή
739		1%	8%	Οριακή
		10%	10% \pm 6	Μικρή
740		1%	-5%	Μηδενική
741		1%	51%	Μέτρια
		10%	28%	Μικρή
742		1%	4%	Οριακή
754		1%	15%	Μικρή
		10%	-19%	Μηδενική
755		1%	20%	Μικρή
756		1%	-5%	Μηδενική
		10%	-5%	Μηδενική

758		1%	-3%	Μηδενική
1475		1%	49%	Μέτρια
		10%	6%	Οριακή
1476		1%	92%	Μεγάλη
		10%	6%	Οριακή
1477		1%	84%	Μεγάλη
		10%	45%	Μέτρια
1478		1%	12%	Μικρή
1479		1%	8%	Οριακή
1480		1%	4%	Οριακή
1485		1%	77%	Μεγάλη
1490		1%	2%	Οριακή

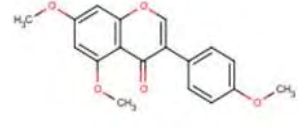
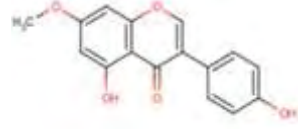
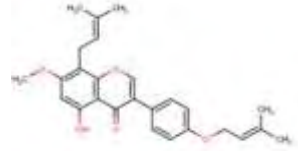
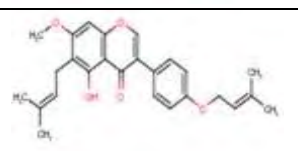
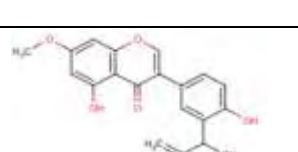
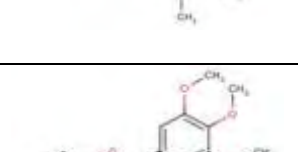
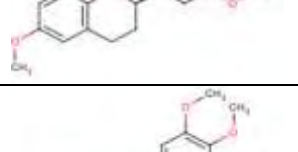
1491		1%	20%	Μικρή
1492		1%	62%	Μέτρια
1516		1%	3%	Οριακή
		10%	18%	Μικρή
752		1%	4%	Οριακή
1483		1%	3%	Οριακή
1518		1%	5%	Οριακή

Παρατηρούμε ότι καμία ένωση που ανήκει στην κατηγορία των χαλκονών-διϋδροχαλκονών δεν παρουσίασε αξιόλογη δράση παρουσία DMEM 10% FBS. Η δραστικότερη ένωση της κατηγορίας των χαλκονών-διϋδροχαλκονών ήταν η 1477 όπου παρουσίασε μερική δραστηριότητα με 45% νευροπροστασία. Για τον λόγο αυτό καμία ένωση δεν μελετήθηκε περαιτέρω.

3.3.2 Φλαβάνια-ισοφλαβόνες

Τα φλαβάνια και τα ισοφλαβάνια ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών και διακρίνονται μεταξύ τους ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης του πυρανικού τους δακτυλίου. Από την κατηγορία αυτή μελετήθηκαν 7 ενώσεις:

Πίνακας 7: Κατηγορία ενώσεων από φλαβάνια-ισοφλαβόνες

Όνομα	Δομή	FBS %	Νευροπροστασία %	Αποτελεσματικότητα
750		1%	-10%	Μηδενική
751		1%	-3%	Μηδενική
765		1%	1%	Οριακή
		10%	-35%	Μηδενική
766		1%	7%	Οριακή
		10%	-41%	Μηδενική
767		1%	95%	Μεγάλη
		10%	32% ± 11	Μικρή
1487		1%	15%	Μικρή
1488		1%	40%	Μέτρια
		10%	11%	Μικρή

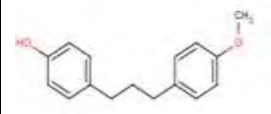
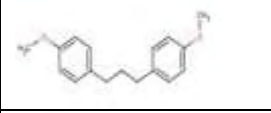
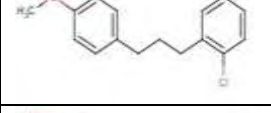
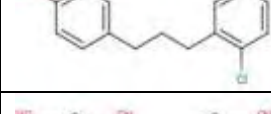
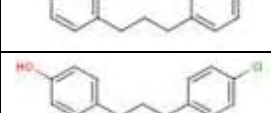
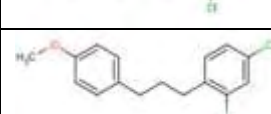
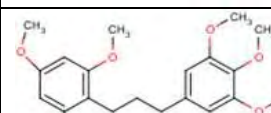
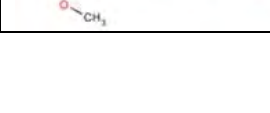
Από την κατηγορία των φλαβανίων-ισοφλαβονών και παρουσία ορού 1% FBS, η ένωση 767 κατείχε ισχυρή δραστηριότητα με 95% νευροπροστασία ενώ

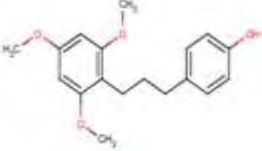
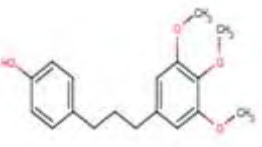
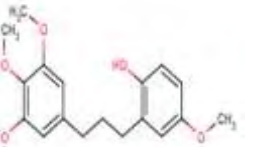
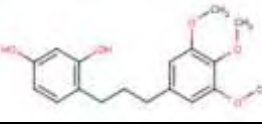
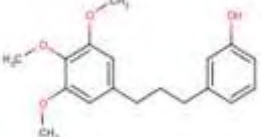
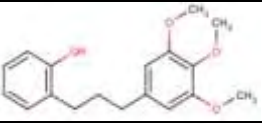
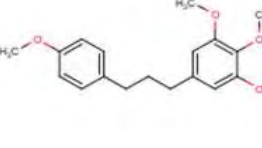
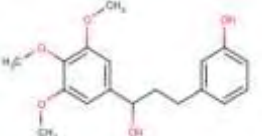
παρουσία 10% FBS είχε αδύναμη δραστηριότητα μειώνοντας την νευροπροστασία σε 32%. Οι ενώσεις 765 και 766 παρουσία 1% ορού είχαν οριακή δραστηριότητα με 1% και 7% νευροπροστασία αντίστοιχα, παρατηρήθηκε όμως παρουσία 10% FBS να δρουν αρνητικά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

3.3.3 Διαρυλοπροπάνια

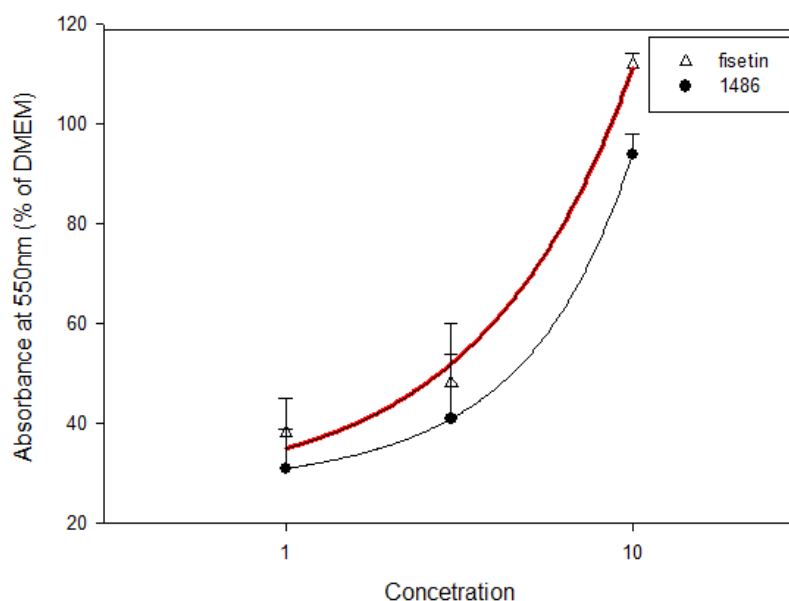
Συνολικά μελετήθηκαν 16 ενώσεις από την κατηγορία των διαρυλοπροπανίων τόσο σε 1% όσο και σε 10% FBS.

Πίνακας 8: Ενώσεις από την κατηγορία των διαρυλοπροπανίων

Όνομα	Δομή	FBS %	Νευροπροστασία %	Αποτελεσματικότητα
743		1%	4%	Οριακή
744		1%	-11%	Μηδενική
745		1%	1%	Οριακή
746		1%	12%	Μικρή
753		1%	1%	Οριακή
759		1%	89%	Μεγάλη
		10%	10% ± 1	Μικρή
760		1%	-10%	Μηδενική
		10%	-11%	Μηδενική
1481		1%	39%	Μέτρια

1482		1%	63%	Μέτρια
		10%	3%	Οριακή
1484		1%	13%	Μικρή
		10%	27%	Μικρή
1486		1%	89%	Μεγάλη
		10%	10 μM → 72% ± 7	Μεγάλη
		10%	3 μM → 21% ± 14	Μικρή
		10%	1 μM → 4% ± 2	Οριακή
1489		1%	19%	Μικρή
1493		1%	10%	Μικρή
1495		1%	8%	Οριακή
1517		1%	72%	Μεγάλη
		10%	6%	Οριακή
1494		1%	-3%	Μηδενική

Από το σύνολο των ενώσεων, η ένωση που παρουσίασε αξιόλογη δράση είναι η 1486 όπου παρουσία 1% FBS παρουσίασε ισχυρή δραστηριότητα με 89% νευροπροστασία, ενώ σε δοσοαπόκριση παρουσία 10% FBS είχε τα ακόλουθα αποτελέσματα: ισχυρή δραστηριότητα με 72% νευροπροστασία στα 10 μM ένωσης, αδύναμη δραστηριότητα με 21% νευροπροστασία στα 3 μM και τέλος οριακή δραστηριότητα με 4% νευροπροστασία στο 1 μM ένωση (Εικόνα 11):

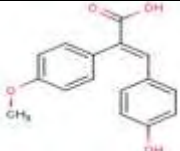
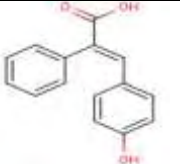


Εικόνα 11: Δοσοαπόκριση ένωσης 1486

3.3.4 Στιλβένια-Διϋδροστιλβένια

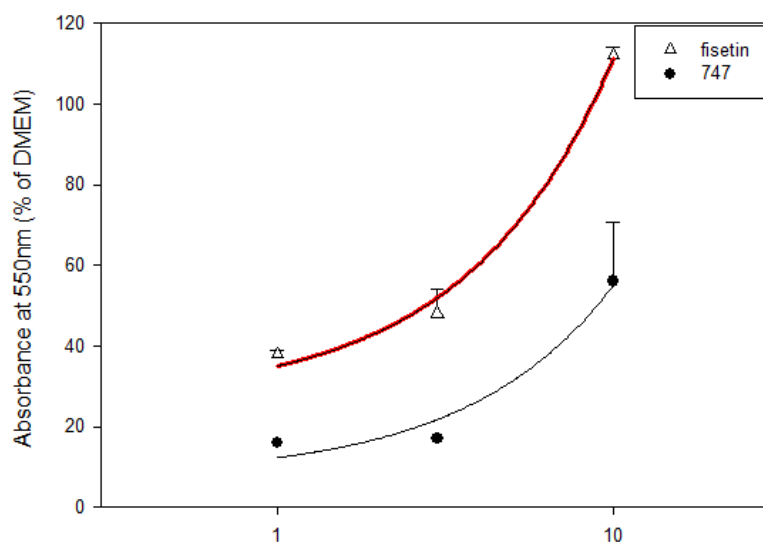
Τα στιλβένια αποτελούνται από δύο φαινυλομάδες, οι οποίες ενώνονται μέσω μιας αλυσίδας δύο ατόμων άνθρακα (C2-C6-C2). Στα φυτά εμφανίζονται σε περιορισμένο βαθμό και χαρακτηρίζονται ως φυτοιστρογόνες ενώσεις, ενώ παρέχουν και προστασία έναντι μυκητολογικών προσβολών (φυτοαλεξίνες). Συνολικά από την κατηγορία των στιλβενίων-διϋδροστιλβενίων μελετήθηκαν 9 ενώσεις. Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν βρίσκονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 9: Ενώσεις από την κατηγορία στιλβένια-διϋδροστιλβένια

Όνομα	Δομή	FBS %	Νευροπροστασία %	Αποτελεσματικότητα
1510		1%	5%	Οριακή
1511		1%	-4%	Μηδενική

1512		1%	10%	Μικρή
1513		1%	-3%	Μηδενική
747		1%	77%	Μεγάλη
		10%	10 μM → 41% ± 16	Μέτρια
		10%	3 μM → 2%	Οριακή
10%	1 μM → 1%	Οριακή		
749		1%	-3%	Μηδενική
762		1%	41%	Μέτρια
1514		1%	3%	Οριακή
1515		1%	6%	Οριακή

Η ένωση 747 παρουσίασε μερική δραστηριότητα παρουσία 10% FBS. Αναλυτικότερα, παρουσία 1% FBS παρουσίασε ισχυρή δραστηριότητα με 77% νευροπροστασία, ενώ σε δοσοαποκρίσεις παρουσία 10% FBS οι τιμές ήταν οι εξής: μερική δραστηριότητα με 41% νευροπροστασία στα 10 μM δραστικής ένωσης, ενώ στα 3 μM και 1 μM παρουσίασε οριακή δραστηριότητα με 2% και 1% νευροπροστασία αντίστοιχα (Εικόνα 12):



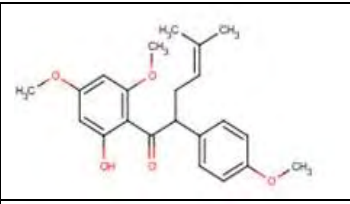
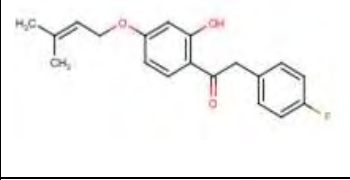
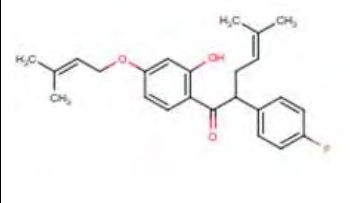
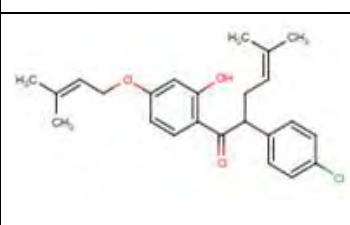
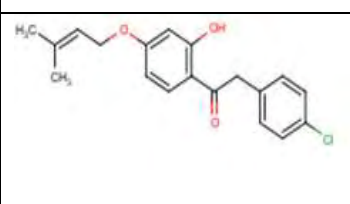
Εικόνα 12: Δοσοαπόκριση ένωσης 747

3.3.5 Δεοξυβενζοΐνες

Από αυτή την κατηγορία ενώσεων μελετήθηκαν 9 ενώσεις παρουσία 1% και 10% FBS. Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν είναι τα ακόλουθα:

Πίνακας 10: Ενώσεις από την κατηγορία των δεοξυβενζοΐνών

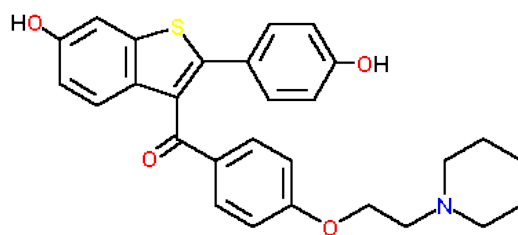
Όνομα	Δομή	FBS %	Νευροπροστασία %	Αποτελεσματικότητα
249	Δεν υπάρχει καταχωρημένη δομή	1%	66%	Μεγάλη
		10%	5%	Οριακή
529		1%	17%	Μικρή
501		1%	31%	Μικρή
761		1%	5%	Οριακή
		10%	3%	Οριακή

1505		1%	2%	Οριακή
1506		1%	19%	Μικρή
1507		1%	49%	Μέτρια
		10%	-19% ± 35	Μηδενική
1508		1%	-78%	Μηδενική
		10%	5%	Οριακή
1509		1%	24%	Μικρή
		10%	0%	Μηδενική

Από την κατηγορία ενώσεων των δεοξυβενζοϊνών, καμία ένωση δεν παρουσίασε αξιόλογη δράση. Αντιθέτως η ένωση 1508 παρουσία 1% FBS έδρασε αρνητικά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, γεγονός που δεν εμφανίζεται σε επανέλεγχο παρουσία 10% FBS.

3.3.6 Ανάλογα ραλοξιφαίνης

Η ραλοξιφαίνη (raloxifene-Evista®) λειτουργεί ως ένας εκλεκτικός ρυθμιστής των οιστρογονικών υποδοχέων SERM (Selective Estrogen Receptor Modulators), δηλαδή έχει δράση είτε εκλεκτικού αγωνιστή είτε εκλεκτικού ανταγωνιστή στους ιστούς που ανταποκρίνονται στα οιστρογόνα (Εικόνα 13). Δρα ως αγωνιστής στα οστά και μερικώς στο μεταβολισμό της χοληστερόλης (μειώνει την ολική και την LDL-χοληστερόλη). Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα των αναλόγων της ραλοξιφαίνης σε σχέση με την αντιοξειδωτική δράση.



Evista (Raloxifene)

Εικόνα 13: Δομή Ραλοξιφαίνης

Συνολικά μελετήθηκαν 14 ανάλογα της ραλοξιφαίνης. Κατά την μελέτη των ενώσεων παρουσία 1% FBS εμφανίστηκε στα κύτταρα ανθεκτικότητα έναντι του γλουταμικού, καθώς οι ενώσεις θετικού εσωτερικού ελέγχου (control), δεν παρατηρήθηκε αποδεκτός κυτταρικός θάνατος. Τα πειράματα συνεχίστηκαν σε υλικό DMEM 10% FBS. Ωστόσο 3 ενώσεις δεν μελετήθηκαν στο υλικό αυτό, λόγω ότι παρουσίασαν κυτταροτοξική δράση. Αναλυτικότερα η ένωση GL285, GL287 και GL310 λειτούργησαν ανασταλτικά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε ποσοστό 41%, 98% και 81%. Για τον λόγο αυτό οι συγκεκριμένες ενώσεις αποκλείστηκαν από περαιτέρω μελέτη στη συγκεκριμένη συνθήκη. Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από τις ενώσεις παρουσία DMEM 10% FBS είναι τα ακόλουθα:

Πίνακας 11: Συνθετικές ενώσεις ανάλογα ραλοξιφαίνης

Όνομα	Συγκέντρωση (μM)	% Νευροπροστασία	Αποτελεσματικότητα
GL141	1	43	Μέτρια
GL158	1	48	Μέτρια
GL297	1	71 ± 10	Μεγάλη
	0,3	5	Οριακή
	0,1	4	Οριακή
GL298	1	61 ± 11	Μέτρια
	0,3	22	Μικρή
	0,1	5	Οριακή
GL308	1	64 ± 4	Μέτρια
	0,3	10	Μικρή
	0,1	-2	Μηδενική
GL309	0,1	-2	Μηδενική
GL349	1	21	Μικρή
GL350	1	24	Μικρή
GL351	1	23	Μικρή
GL352	2	27	Μικρή
GL353	1	60	Μέτρια
	0,3	46	Μέτρια
	0,1	-6	Μηδενική

Συνολικά 4 ενώσεις παρουσίασαν αξιόλογη δηλαδή >50% νευροπροστατευτική δράση σε συγκέντρωση 10 μM οι οποίες και μελετήθηκαν σε δοσοαπόκριση. Αναλυτικότερα η ισχυρότερη ένωση της κατηγορίας αυτής είναι η GL297 με 71% νευροπροστασία στο 1 μM , οριακή νευροπροστασία στα 0,3 μM και 0,1 μM με 5% και 4% νευροπροστασία αντίστοιχα. Ακολουθεί η ένωση GL308 όπου κατέχει μερική δραστηριότητα με 64% νευροπροστασία στο 1 μM , αδύναμη δραστηριότητα με 10% νευροπροστασία στα 0,3 μM και μηδενική δραστηριότητα στα 0,1 μM . Η ένωση GL298 κατέχει μερική δραστηριότητα με 61% νευροπροστασία στο 1 μM , αδύναμη δραστηριότητα με 22% νευροπροστασία στα 0,3 μM και οριακή δραστηριότητα με 5% νευροπροστασία στο 0,1 μM . Τέλος ακολουθεί η ένωση GL353 όπου κατέχει μερική δραστηριότητα με 60% νευροπροστασία στα 1 μM , μερική δραστηριότητα με 46% νευροπροστασία στα 0,3 μM και μηδενική δραστηριότητα στα 0,1 μM .

3.4 Ανασκόπηση αποτελεσμάτων για κυτταρική σειρά HT-22

Μελετήθηκαν συνολικά 70 φυσικές και 78 συνθετικές ενώσεις. Από αυτές 7 παρουσίασαν αξιόλογη νευροπροστατευτική δράση παρουσία DMEM 10% FBS. Σχεδόν όλες οι ενώσεις προέρχονται από το φυτό *Glycyrrhiza glabra* καθιστώντας το ένα πολλά υποσχόμενο είδος για την αντιοξειδωτική του δραστηριότητα. Από τις συνθετικές ενώσεις μόνο μία παρουσίασε αξιόλογη νευροπροστατευτική δράση και ανήκει στην κατηγορία των διαρυλοπροπανίων. Παρακάτω ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας με τις δραστηριότερες. Οι ενώσεις αυτές μελετήθηκαν στη συνέχεια του πειράματος για επαγωγή οιστρογονικότητας μέσω του υποδοχέα οιστρογόνων ER α και ER β .

Πίνακας 12: Δραστικότερες ενώσεις

Ενώσεις	Συγκέντρωση (μM)	Αριθμός ζώντων κυττάρων (%)		Νευροπροστασία (%)
		Απουσία γλουταμικού	Παρουσία γλουταμικού	
Έκδοχο	-	100 ± 0	31 ± 3	0 ± 0
Fisetin	10	102 ± 2	112 ± 2 [#]	115 ± 3 ⁺
	3	114 ± 7 [*]	48 ± 6 [#]	9 ± 11 ⁺
	1	113 ± 5 [*]	38 ± 1	-6 ± 3 ⁺
GGR39	10	104 ± 4	123 ± 7 [#]	126 ± 10 ⁺
	3	113 ± 3	110 ± 7 [#]	98 ± 9
	1	111 ± 1	54 ± 12 [#]	22 ± 7 ⁺
GGR38	10	118 ± 6	118 ± 7 [#]	102 ± 15
	3	113 ± 9	44 ± 4	25 ⁺
	1	120 ± 3 [*]	21 ± 1	-2 ⁺
GGR43	10	123 ± 9 [*]	129 ± 8 [#]	107 ± 4
	3	117 ± 6 [*]	72 ± 10 [#]	44 ± 8 ⁺
	1	109 ± 2	48 ± 11 [#]	13 ± 5 ⁺
GGR49	10	93 ± 6	102 ± 6 [#]	113 ± 6
	3	110 ± 4	97 ± 9 [#]	83 ± 8
	1	111 ± 3	50 ± 9 [#]	14 ± 5 ⁺
GGR45	10	114 ± 7	111 ± 11 [#]	95 ± 5
	3	107 ± 7	46 ± 13	16 ± 3 ⁺
	1	104 ± 7	34 ± 10	2 ± 4 ⁺
1486	10	117 ± 3	94 ± 4 [#]	72 ± 7 ⁺
	3	106 ± 3	41 ± 19	21 ± 14 ⁺
	1	111 ± 2	31 ± 14	4 ± 2 ⁺
GG12	10	101 ± 4	76 ± 6 [#]	62 ± 5 ⁺
	3	108 ± 9	54 ± 11 [#]	18 ± 8 ⁺
	1	108 ± 7	42 ± 9	-1 ± 6 ⁺

* p<0,05 Ένωση έναντι εκδόχου απουσία γλουταμικού

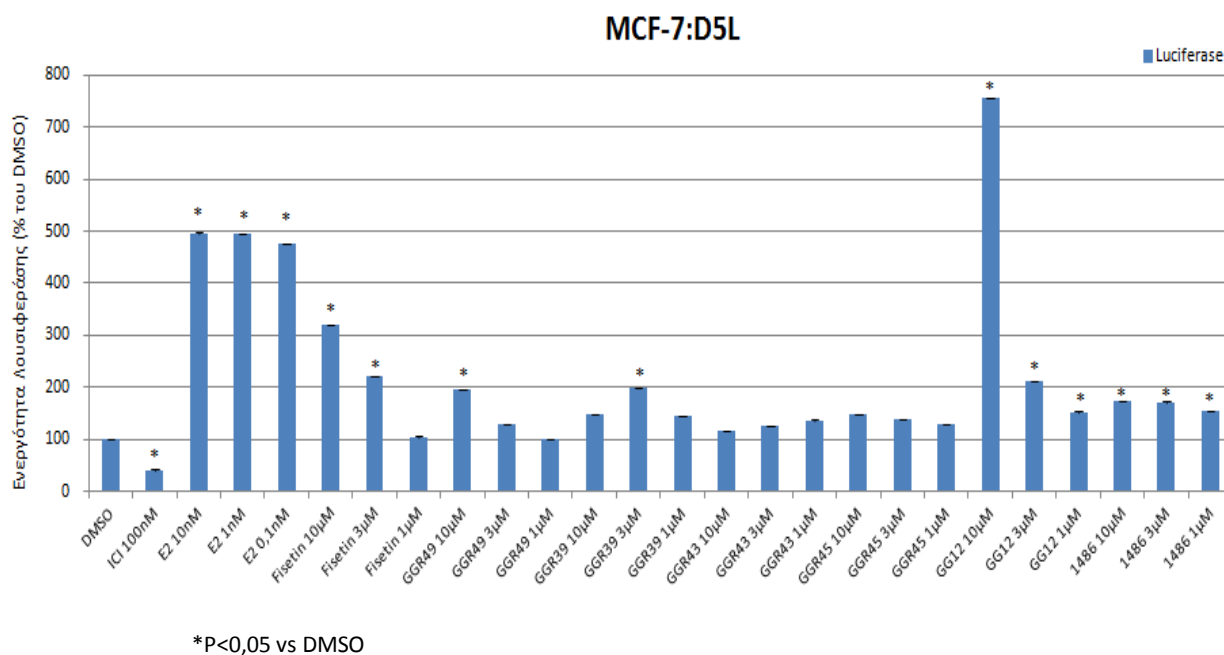
p<0,05 Ένωση έναντι εκδόχου παρουσία γλουταμικού

+ p<0,05 Ένωση με γλουταμικό έναντι ένωση χωρίς γλουταμικό

Αναλυτικότερα οι ενώσεις GGR39 και GGR49 παρουσιάζουν αξιόλογη δραστικότητα στις συγκεντρώσεις των 10μM και 3μM ενώ ακολουθούν οι Fisetin (ένωση εσωτερικού ελέγχου), GGR43, GGR38, GGR45, GG12 και 1486 οι οποίες παρουσίασαν αξιόλογη δραστικότητα μόνο σε συγκέντρωση 10μM. Επομένως η σειρά φθίνουσας νευροπροστατευτικής δραστικότητας των παραπάνω ενώσεων είναι η εξής: GGR39 >GGR49>Fisetin>GGR43>GGR38 >GGR45 >1486> GG12.

3.5 Προσδιορισμός του αγωνισμού μέσω ERα και ERβ των νευροπροστατευτικών ενώσεων

Μετά τον προσδιορισμό των ενώσεων με υψηλή νευροπροστατευτική δράση, ακολούθησε η μελέτη της ικανότητάς τους, καθώς και αυτή της φισετίνης, να επάγουν ERE εξαρτώμενη μεταγραφή μέσω ERα ή/και ERβ στις κυτταρικές σειρές MCF-7:D5L και HEK:ERβ1 αντίστοιχα. Ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε MEM ± 5% CIS (Εικόνα 14). Όλες οι ενώσεις μελετήθηκαν σε δοσοαπόκριση των 10-3-1 μΜ ενώ ως ένωση θετικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η οιστραδιόλη και ως αρνητικού το ICI 182,780 (Fulvestrant).

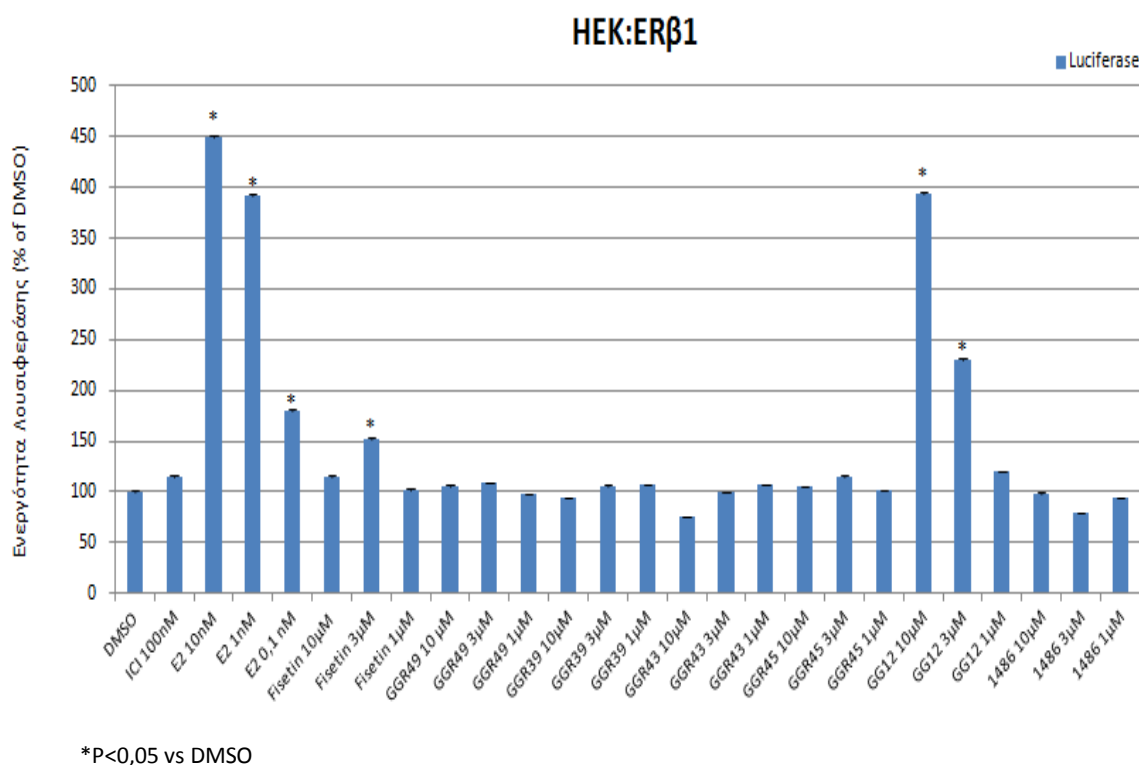


Εικόνα 14: Μέτρηση επαγωγής μεταγραφικής δράσης μέσω του ERα

Παρατηρήθηκε επαγωγή μεταγραφής μέσω του υποδοχέα ERα από τη φισετίνη σε συγκέντρωση των 10μΜ και 3μΜ, την ένωση GGR49 σε συγκέντρωση των 10μΜ, την ένωση GGR39 σε συγκέντρωση 3 μΜ αλλά όχι στα 10 μΜ (πιθανότατα οφείλεται σε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας), την ένωση GG12 σε όλες τις συγκεντρώσεις. Η ένωση GG12 παρουσίασε επαγωγή μεταγραφής μεγαλύτερο της οιστραδιόλης πιθανόν λόγω θετικής επίδρασης στο κυτταρικό

πολλαπλασιασμό. Το ίδιο πιθανόν ισχύει και για την ένωση 1486 η οποία παρουσίασε σταθερά μικρή μεταγραφική δράση ανεξαρτήτως συγκέντρωσης.

Στην Εικόνα 15 παρουσιάζεται η επαγωγή μεταγραφικής δράσης μέσω του ERβ1 στα κύτταρα HEK:ERβ1. Παρατηρήθηκε ότι η ένωση GG12 προκαλεί ισχυρή επαγωγή και μέσω του υποδοχέα ERβ σε συγκέντρωση 10 και 3 μΜ. Η φισετίνη εμφάνισε επαγωγή σε συγκέντρωση 3 μΜ αλλά όχι σε συγκέντρωση 10 μΜ, πιθανόν λόγω αρνητικής επίδρασης στη κυτταρική βιωσιμότητα.



Εικόνα 15: Μέτρηση επαγωγής μεταγραφικής δράσης μέσω ERβ1

Από τα αποτελέσματα μέτρησης της ενεργότητας λουσιφεράσης (ΕΛ) των Εικόνων 14 και 15 υπολογίστηκε ο αγωνισμός μέσω ERα και ERβ βάση του τύπου :

$$\text{Αγωνισμός \%} = \frac{(\text{ΕΛ παρουσία ένωσης} - \text{ΕΛ παρουσία DMSO})}{(\text{ΕΛ παρουσία 10nM E2} - \text{ΕΛ παρουσία DMSO})} * 100$$

Στο Πίνακα 14 παρουσιάζεται ο επί της εκατό αγωνισμός των υπό μελέτη ενώσεων. Παρατηρούμε ότι η ένωση GG12 σε συγκέντρωση 10 μΜ προκαλεί τον ισχυρότερο αγωνισμό σε σχέση με τις υπόλοιπες ενώσεις, τόσο μέσω του υποδοχέα ERα όσο και μέσω του ERβ. Η φισετίνη παρουσιάζει αξιόλογο αγωνισμό κυρίως μέσω του ERα. Διαπιστώθηκε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ αγωνισμού ERα και ERβ (Pearson's correlation coefficient=0,898, p=0,000), όπως θα ανέμενε κάποιος για ενώσεις ικανές να δράσουν μέσω και των δύο υποδοχέων. Αντίστοιχη προσέγγιση για συσχέτιση της νευροπροστατευτικής δράσης των υπό μελέτη ενώσεων (Πίνακας 13)

και τον αγωνισμό τους μέσω ERα (Pearson's correlation coefficient=0,179, p=0,437) και ERβ (Pearson's correlation coefficient= -0,051, p=0,827) δεν έδειξε συσχέτιση μεταξύ τους .

Ένωση	Συγκέντρωση (μM)	Αγωνισμός μέσω ERα %	Αγωνισμός μέσω ERβ1 %
GGR39	10	7	-2
	3	12	2
	1	11	2
GGR49	10	24	2
	3	7	2
	1	0	-1
Fisetin	10	56	4
	3	31	15
	1	2	1
GGR43	10	4	-7
	3	6	0
	1	9	2
GGR45	10	12	1
	3	10	4
	1	7	0
1486	10	19	0
	3	18	-6
	1	14	-2
GG12	10	165	84
	3	28	37
	1	13	6

Πίνακας 14: Αγωνισμός ενώσεων

3.6 Μελέτη της αντιοξειδωτικής νευροπροστατευτικής δράσης σε μετασηματισμένα κύτταρα HT-22 που υπερεκφράζουν ERα ή ERβ

Οι κυτταρικές σειρές HT22-α28 και HT22-β25 υπερεκφράζουν τον ERα και τον ERβ αντίστοιχα. Ως control για τα μετασηματισμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HT-22-mock17 η οποία έχει υποστεί την ίδια επεξεργασία με τα HT22-α28 και HT22-β25 αλλά έχει ενσωματωθεί κενό πλασμίδιο έκφρασης, δηλαδή χωρίς το γονίδιο κάποιου υποδοχέα οιστρογόνων. Παρατηρήθηκε ότι τα μετασηματισμένα HT-22 είναι πιο ευαίσθητα στην οξειδωτική δράση του γλουταμικού γεγονός που πιθανόν οφείλεται στο μετασηματισμό τους.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων του Πίνακα 15 δεν προέκυψε κάποια συστηματική απόκλιση της νευροπροστατευτικής δράσης των ενώσεων μεταξύ HT22-mock17 και HT22-α28 (Pearson's correlation coefficient=0,973, p=0,000) και μεταξύ HT22-mock17 και HT22-β25 (Pearson's correlation coefficient=0,985, p=0,000). Οι συσχετίσεις αυτές υποδηλώνουν ότι η υπερέκφραση των ERα και ERβ δεν μεταβάλλει την νευροπροστατευτική δραστηριότητα των υπό έλεγχο ενώσεων και απαλλάσσει και τους δυο υποδοχείς από τη διαμεσολάβηση της νευροπροστατευτικής δράσης των συγκεκριμένων ενώσεων.

Πίνακας 15: Αντιοξειδωτική νευροπροστατευτική δράση των επιλεγμένων ενώσεων σε κύτταρα HT-22 άγριου τύπου και σε μετασηματισμένα κύτταρα HT-22 που υπερεκφράζουν ERα ή ERβ

Ένωση	Συγκέντρωση (μM)	Νευροπροστασία %			
		HT-22	HT22-mock17	HT22-α28	HT22-β25
Fisetin	10	115 ± 3	63 ± 24	70 ± 20	82 ± 5
	3	9 ± 11	0	1	1
	1	-6 ± 3	-1	0	0
GGR39	10	126 ± 10	92	91	95
	3	98 ± 9	3	0	4
	1	22 ± 7	-2	-1	0
GGR38	10	102 ± 15	87	65	86
	3	25	0	4	4
	1	-2	0	0	1
GGR43	10	107 ± 4	89	100	94
	3	44 ± 8	0	0	1
	1	13 ± 5	-1	0	0
	10	113 ± 6	92	106	74

GGR49	3	83 ± 8	8	5	18
	1	14 ± 5	-1	-1	1
GGR45	10	95 ± 5	4	1	10
	3	16 ± 3	-1	0	1
	1	2 ± 4	-1	-1	0
1486	10	72 ± 7	72	53	72
	3	21 ± 14	3	0	0
	1	4 ± 2	0	0	0
GG12	10	62 ± 5	10	30	20
	3	18 ± 8	1	2	1
	1	-1 ± 6	0	0	0

4. Συμπεράσματα

Από τη μελέτη των 58 εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 10μg/ml, 4 ανιχνεύτηκαν να διαθέτουν μερική νευροπροστατευτική δράση ενώ άλλα 4 ισχυρή. Η μεγάλη δραστηριότητα του εκχυλίσματος Osteo25 της *Glycyrrhiza glabra* δικαιολογείται από την μεγάλη δραστηριότητα των ενώσεων που προέρχονται από το ίδιο φυτό (GG12, GGR39, GGR38, GGR43, GGR49 και GGR45). Αντίστοιχα η μέτρια δραστηριότητα του εκχυλίσματος Osteo71 της *Genista hassertiana* δικαιολογείται από τη μέτρια δραστηριότητα της ένωσης 1595 (Πίνακας 5) που προέρχεται από το ίδιο φυτό. Η μηδενική αποτελεσματικότητα των εκχυλισμάτων που προέρχονται από το φυτό *Citrus aurantium* επαληθεύονται από την μηδενική-οριακή αντιοξειδωτική νευροπροστατευτική δράση των επιμέρους ενώσεων, με εξαίρεση την ένωση 1528 που κατείχε μικρή νευροπροστατευτική ικανότητα της τάξης του 13%. Για τα υπόλοιπα εκχυλίσματα δεν υπήρξε ανάλογη επιβεβαίωση καθώς δεν παρελήφθησαν έγκαιρα προς ανάλυση καθαρές ενώσεις από το ίδιο φυτό.

Εκχύλισμα	Φυτό	% Νευροπροστασία	Αποτελεσματικότητα
Th22	<i>Salvia officinalis</i> (φασκόμηλο)	102%	Μεγάλη
Th44	<i>Indigofera secundiflora</i> (λουλάκι)	96%	Μεγάλη
Osteo25	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (γλυκόριζα)	74%	Μεγάλη
Th42	<i>Anthyllis montana</i> (ανθυλλίς)	95%	Μεγάλη
Th43		37%	Μέτρια
Osteo71	<i>Genista hassertiana</i> (γενίστα του Χάσσερτ)	34%	Μέτρια
Th14	<i>Salvia fruticosa</i> (φασκόμηλο)	41%	Μέτρια
Th35	<i>Hippocrepis comosa</i>	51%	Μέτρια

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν 148 ενώσεις, 6 φυσικές και 1 συνθετική οι οποίες παρουσίασαν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση. Αναλυτικότερα όλες οι φυσικές ενώσεις με υψηλή δραστικότητα προέρχονται από το φυτό *Glycyrrhiza glabra* καθιστώντας το ένα υποσχόμενο είδος για περαιτέρω μελέτη εκχυλισμάτων και ενώσεων κατά του οξειδωτικού στρες, ενώ η μία συνθετική ένωση που ανιχνεύτηκε ως δραστική ανήκει στην κατηγορία των διαρυλοπροπανίων. Όλες οι υπό εξέταση ενώσεις συγκρίθηκαν με την φισετίνη η οποία θεωρείται ότι έχει ισχυρή αντιοξειδωτική νευροπροστατευτική δραστικότητα (Maher, 2006). Η φισετίνη παρουσίασε αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση μόνο σε συγκέντρωση 10 μM ενώ οι ενώσεις GGR39 και GGR49 παρουσίασαν αξιόλογη δράση σε συγκέντρωση 10 μM και 3 μM . Ακολουθούν οι ενώσεις GGR43, GGR38, GGR45, GG12 και 1486 παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική νευροπροστατευτική δράση σε συγκέντρωση 10 μM αλλά όχι 3 μM .

Κατόπιν οι ενώσεις μελετήθηκαν για επαγωγή μεταγραφής μέσω των υποδοχέων ER α και ER β . Οι περισσότερες από τις επιλεγμένες νευροπροστατευτικές ενώσεις (GGR49, GGR39, GG12, φισετίνη και 1486) επάγουν τη μεταγραφή μέσω του ER α , γεγονός που θα μπορούσε να υποκρύπτει συμβολή του συγκεκριμένου υποδοχέα στην ανάδειξη της νευροπροστατευτικής δράσης των παραπάνω ενώσεων.

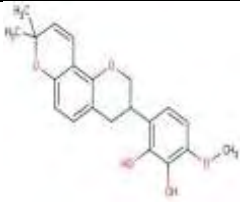
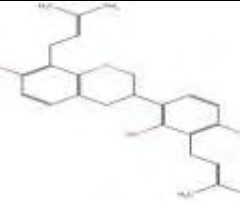
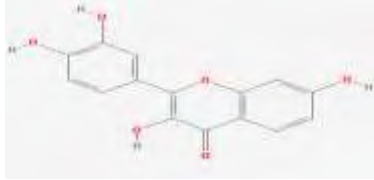
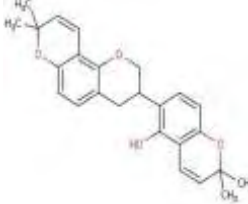
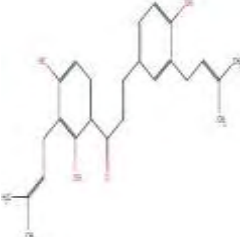
Επίσης ορισμένες ενώσεις (GG12, φισετίνη) επάγουν τη μεταγραφή μέσω του ER β , γεγονός που θα μπορούσε επίσης να υποκρύπτει συμβολή του συγκεκριμένου υποδοχέα στην ανάδειξη της νευροπροστατευτικής δράσης των δύο ενώσεων. Δεν υπήρξε ωστόσο συσχέτιση της νευροπροστατευτικής ικανότητας των ενώσεων και του αγωνισμού τους μέσω ER α και ER β . Αντίστοιχα, όπως ήταν αναμενόμενο, βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση του αγωνισμού των ενώσεων μέσω ER α και ER β σε υψηλή συγκέντρωση των 10 μM , γεγονός όμως που δεν επαναλήφθηκε στις μικρότερες συγκεντρώσεις των 3 και 1 μM .

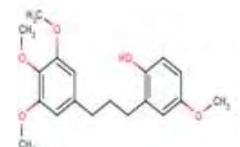
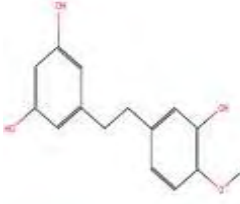
Τέλος, η χρήση μετασηματισμένων HT-22 κυττάρων υπέδειξε ότι δεν υπάρχει απόκλιση της νευροπροστατευτικής δράσης παρουσία των ER α και ER β , γεγονός που υποδηλώνει ότι η υπερέκφρασή τους δεν μεταβάλλει την νευροπροστατευτική δραστικότητα των υπό έλεγχο ενώσεων, γεγονός που δεν υποστηρίζει συμβολή των δύο υποδοχέων οιστρογόνων στη διαμεσολάβηση της νευροπροστατευτικής δράσης των ενώσεων που μελετήθηκαν.

Βασικό χαρακτηριστικό μιας ένωσης, αποτελεί και η χημική της δομή. Ο Πίνακας 17 συγκεντρώνει τα επιμέρους χαρακτηριστικά των δραστικότερων ενώσεων. Μία ένωση με γειτονικά φαινολικά υδροξύλια είναι δυνητικά επιβλαβής για τα κύτταρα λόγω μεταλλαξιγόνου δράσης. Χαρακτηριστικά μια κατεχόλη μπορεί να οξειδωθεί σε ηλεκτρονιόφιλη ορθο-κινόνη όπου παρουσία NAD(P)H ανακυκλώνεται

μέσω μη ενζυμικού μονοπατιού πάλι σε κατεχόλη. Σε περίπτωση σχηματισμού ο-κινόνης μπορεί να προκληθεί μετάλλαξη στο DNA αντικαθιστώντας την γουανίνη (G) με θυμίνη (T) έχοντας καταστροφικές συνέπειες για το κύτταρο (Jong-Heum Park et al., 2008). Η φισετίνη και η GGR39 διαθέτουν γειτονικές φαινολικές ομάδες που μπορούν να δώσουν λαβή στο σχηματισμό ο-κινόνης καθιστώντας τις ενώσεις δυνητικά μεταλλαξιγόνες. Για να καταστεί ασφαλή μια ένωση θα πρέπει να παρεμβάλλεται ηλεκτρονιοδοτική ομάδα όπου μπορεί να ανάγει την ο-κινόνη. Αντίθετα οι ενώσεις GGR49 και GGR45 δεν διαθέτουν γειτονικές φαινολικές ομάδες και επομένως δεν μπορούν να σχηματίσουν ο-κινόνη. Επιπλέον, μεταξύ των δυοφαινολικών ομάδων τους παρεμβάλλεται μια ηλεκτρονιοδοτική ομάδα η οποία αυξάνει την αντιοξειδωτική τους δράση.

Πίνακας 17: Χαρακτηριστικά των επιλεγμένων ενώσεων

Ένωση	Δόμες	Παρατηρήσεις
GGR39		<ul style="list-style-type: none"> • Ισχυρή αντιοξειδωτική νευροπροστατευτική δράση στα 10 και 3 μΜ • Αγωνιστής μέσω ERα • Μεταλλαξιγόνο λόγω ορθο-κινόνης
GGR49		<ul style="list-style-type: none"> • Ισχυρή αντιοξειδωτική νευροπροστατευτική δράση στα 10 και 3μΜ • Αγωνιστής μέσω ERα • Δεν διαθέτει γειτονικά φαινολικά υδροξύλια για το σχηματισμό ο-κινόνης
Fisetin		<ul style="list-style-type: none"> • Ισχυρή αντιοξειδωτική νευροπροστατευτική δράση στα 10μΜ • Αγωνιστής μέσω ERα • Αγωνιστής μέσω ERβ • Μεταλλαξιγόνο λόγω ορθο-κινόνης
GGR43		<ul style="list-style-type: none"> • Ισχυρή αντιοξειδωτική νευροπροστατευτική δράση στα 10μΜ
GGR45		<ul style="list-style-type: none"> • Ισχυρή αντιοξειδωτική νευροπροστατευτική δράση στα 10μΜ • Δεν διαθέτει γειτονικά φαινολικά υδροξύλια για το σχηματισμό ο-κινόνης

1486		<ul style="list-style-type: none"> • Ισχυρή αντιοξειδωτική νευροπροστατευτική δράση στα 10μΜ • Αγωνιστής μέσω ERα
GG12		<ul style="list-style-type: none"> • Μερική αντιοξειδωτική νευροπροστατευτική δράση στα 10μΜ • Ισχυρός αγωνιστής μέσω ERα • Ισχυρός αγωνιστής μέσω ERβ

Βιβλιογραφία

- 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.
- 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.
- Chen, H.,** Lin, R. J., Schiltz, R. L., et al. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*. **90**, 569-580.
- Cheung, E.,** Schwabish, M.A., and Kraus, W.L. (2003). Chromatin exposes intrinsic differences in the transcriptional activities of estrogen receptors α and β . *EMBO J*. **22**, 600-611.
- Dubal, D.B.,** Zhu, H, Yu, J, Rau, S.W., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., Kindy, M.S., Wise, P. M. (2001). Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury *Proc. Natl. Acad. Sd USA*. **13**: 1952-1957.
- Forman, H. J.,** Torres, M. (2001). Redox signaling in macrophages. *Mol.Aspects Med*. **22**, 189-216.
- Graupner, G.,** Wills, K.N., Tzukerman, M., Zhang X-K 8b Pfahl M. (1989). Dual regulatory role for thyroid-hormone receptors allows control of retinoic-acid receptor activity. *Nature*. **340**, 653 - 656.
- Ishige, K.,** Schubert, D., Sagara, Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from Oxidative Stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biol. Med*. **30**, 433-446.
- Jong-Heum Park,** Dipti Mangal, Kirk A. Tacka, Amy M. Quinn, Ronald G. Harvey, Ian A. Blair, Trevor M. Penning (2008). Evidence for the aldo-keto reductase pathway of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol activation in human lung A549 cells. *Vol.105 no.19*, 6846-6851
- 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 mitogen-activated protein kinase. *Science*. **270**, 1491-1494.

Katzenellenbogen, B.S. and Korach, K.S. (1997). Editorial: A New Actor in the Estrogen Receptor Drama—Enter ER- β . *Endocrinology*. **138**, No. 3, 861-86

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.

Li, H., Gomes, P. J., Chen, J. D. (1997). RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . **94**, 8479-8484.

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.

Maher, P., A comparison of the neurotrophic activities of the flavonoid fisetin and some of its derivatives. *Free Radic Res.* 2006 Oct;40(10):1105-11

Maher, P., and Davis J.B. (1996). The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity. *Neuroscience* **16**, 6394- 6408.

Maher, P., Schubert, D. (2000). Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.*, **27**, 1287-1305.

McEwen, BS. (1996). Gonadal and adrenal steroids regulate neurochemical and structural plasticity of the hippocampus via cellular mechanisms involving NMDA receptors. *Cell Mol Neurobiol.* Apr, 16(2): 103-16.

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

McInerney, 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.

McKenna, N.J., Nawaz, Z., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., O'Malley, B.W. (1998). Distinct steady-state nuclear receptor coregulator complexes exist in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **95**, 11697- 11702.

Meneghini, R. (1997). Iron homeostasis, oxidative stress and DNA damage. *Free Radical Biol. Med.* **23**, 783-792.

Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., O'Malley, B. W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*. **270**, 1354-1357.

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.

Petrat, F., de Groot, H., Sustmann, R., Rauen, U. (2002). The chelatable iron pool in living cells: A methodologically defined quantity. *Biol. Chem.* **383**, 489-502.

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.

Pratt, W.B., Jolly, D.J., Pratt, D.V., Hollenberg, S.M., Giguere, V., Cadepond, F.M., Schweizer-Groyer, G., Catelli, M-G., Evans, R.M. and Baulieu, E-E. (1988). A Region in the Steroid Binding Domain Determines Formation of the Non-DNA-binding. 9 S Glucocorticoid Receptor Complex. *J. Biol. Chem.* **263**, No. 1, 267-273.

Sagara, Y., Dargush, R., Chambers, D., Davis, J., Schubert D., and Maher, P. (1998). Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radic. Res.* (in press).

Schulz, et al. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Bioche.* **267**, 4904-4911.

Shornick, L.P., Holtzman, M.J. (1993). A cyptic, microsomal type arachidonate 12-lipoxygenase is tonically inactivated by oxidation-reduction conditions in cultured epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **268**, 371-376.

Suzuki, Y.J., Forman, H.J., Sevanian, A. (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biol Med.*, **22**, 269-285.

Takeshita, A., Cardona, G. R., Koibuchi, N., Suen, C. S., Chin, W. W., (1997). TRAM-1. A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J. Biol. Chem.* **272**, 27629-27634.

Tan, J., Sharief, Y., Hamil, KG., Gregory, CW., Zang, DY., Sar, M., Gumerlock, PH., deVere White, RW., Pretlow, TG., Harris, SE., Wilson, EM., Mohler, JL., French, FS., (1997).

Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells. *Mol Endocrinol* **11**, 450-459.

Tenopoulou, M., Doulias, P.T., Barbouti, A., Brunk, U.T., Galaris, D. (2005). The role of compartmentalized redox-active iron on hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem. J.* **387**, 703-710.

Thompson, K.J., Shoham, S., Connor, J.R. (2001). Iron and neurodegenerative disorders. *Brain Res. Bull* **55**, 155-164.

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.

Vegeto, E., Allan, GF., Schrader, WT., Tsai, MJ., McDonnell, DP., O'Malley, BW. (1992). The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell* **69**, 703-713.

Voegel, J. J., Heine, M. J., Zechel, C., Chambon, P., Gronemeyer, H., (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand- dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J*. **15**, 3667-3675.

Wang, L., Andersson, S., Warner, M., Gustafsson, J.-A. (2001). Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 2792-2796.

Webster, NJ., Green, S., Jin, JR., Chambon, P., (1988). The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell* **54**, 199-207.

Zecca, L., Youdim, Riederer, P., Connor, J.R., Crichton, R.R. (2004). Iron, brain aging and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 863-873.