



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ "ΚΛΙΝΙΚΗ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ"

Επιπτώσεις στον εγκέφαλο πρώιμης έκθεσης μυνών σε ενδοκρινικούς
διαταράκτες.

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ευστάθιος Ρεΐσης

A.M. 61614

ΑΘΗΝΑ, Νοέμβριος 2018

Ο Επιβλέπων Καθηγητής

κ. Σταματάκης Αντώνιος
Καθηγητής Βιολογίας-Βιολογίας Συμπεριφοράς

Τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

κ. Σταματάκης Αντώνιος
Αναπλ. Καθηγητής Βιολογίας-
Βιολογίας Συμπεριφοράς

κ. Κιτράκη Ευθυμία
Καθηγήτρια Βιολογίας

κ. Ευθυμίουπουλος Σπυρίδων
Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων &
Ανθρώπου – Νευροβιολογίας

Περιεχόμενα

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	5
1.Περίληψη.....	5
2.Abstract	6
3.Βιοσύνθεση στεροειδών ορμονών.....	7
3. Ανδρογόνα.....	11
3.1 Κύτταρα Leydig.....	12
3.2 Βιοσύνθεση των ανδρικών ορμονών	15
3.3 Βιοσύνθεση, μεταβολισμός και μεταφορά της τεστοστερόνης	16
3.4 Υποδοχείς των ανδρικών ορμονών.....	21
3.4.1 Μηχανισμοί δράσης του AR.....	23
3.5 Κατανομή υποδοχέων ανδρικών ορμονών (AR) στον εγκέφαλο	25
3.6 Δράσεις ανδρικών ορμονών	25
4.Οιστρογόνα	30
4.1 Υποδοχείς Οιστρογόνων (ERα και ERβ).....	31
4.2 Κατανομή υποδοχέων οιστρογόνων στον εγκέφαλο	37
4.3 Δράσεις Οιστρογόνων στον εγκέφαλο.....	40
5. Ενδοκρινικοί διαταράκτες	41
5.1.1 Μη μονοτονική δράση	45
5.1.2 Δράση σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις	46
5.1.3 Περίοδοι έκθεσης και υπερευαισθησίας.....	47
5.2 Φθαλκικές ενώσεις	47
6. Προοπτική περιοχή υποθαλάμου	49
7. Σκοπός	52
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	52
1.Υλικά και μέθοδοι	52
1.1 Έκθεση των μητέρων στο μείγμα των ορμονικών διαταρακτών	52
1.1.1 Ζώα μελέτης	52
1.1.2 Μείγμα ορμονικών διαταρακτών.....	52
1.1.3 Αναπαραγωγή και έκθεση στο μείγμα των φθαλκικών	53

1.1.4 Συλλογή εγκεφαλικού ιστού	54
2. Ανοσοϊστοχημεία.....	54
Μέθοδος Βιοτίνης- Αβιδίνης.....	56
2α Πρωτόκολλο Ανοσοϊστοχημείας για AR.....	58
2β Πρωτόκολλο Ανοσοϊστοχημείας για ERα και ERβ.....	58
4. ELISA	60
Παραλλαγές ELISA	62
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	71
1 Κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα ανδρογόνων (AR) και εντοπίζονται στην προοπτική περιοχή (POA)	71
2 Κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα ανδρογόνων (AR) και εντοπίζονται στον σωματοαισθητικό φλοιό (somatosensory cortex).....	72
3 Κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα ανδρογόνων (AR) και εντοπίζονται στο ραβδωτό σώμα (CPu/striatum).....	73
4 Κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων άλφα (ERα) και εντοπίζονται στην προοπτική περιοχή (POA) του υποθαλάμου	74
5 Κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων άλφα (ERα) και εντοπίζονται στον σωματοαισθητικό φλοιό (somatosensory cortex).....	76
6 Κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων άλφα (ERα) και εντοπίζονται στο ραβδωτό σώμα (CPu/striatum)	77
7 Τεστοστερόνη (T) πλάσματος.....	78
7. Συζήτηση-Συμπεράσματα	78
8. Βιβλιογραφία-Αναφορές.....	85

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Περίληψη

Οι φθαλικές ενώσεις είναι βιομηχανικές χημικές ουσίες και αποτελούν εδώ και καιρό κομμάτι της καθημερινής ζωής του ανθρώπου, καθώς υπάρχουν σε πληθώρα καταναλωτικών προϊόντων, όπως κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα, συσκευασίες τροφίμων, πλαστικά, φαρμακευτικά είδη, παιχνίδια, καλλυντικά προϊόντα. Χρησιμοποιούνται κυρίως ως πλαστικοποιητές, ως φθαλικοί εστέρες. Οι επιπτώσεις της έκθεσης στις φθαλικές ενώσεις στην ανθρώπινη υγεία δεν έχουν μελετηθεί καλά. Οι ζωικές μελέτες, όμως, έχουν προκαλέσει σοβαρές ανησυχίες για τη δυνατότητα των δυσμενών αποτελεσμάτων στους ανθρώπους. Οι φθαλικές ενώσεις μπορούν να δράσουν σαν ενδοκρινικοί διαταρακτες, προσομοιάζοντας ή παρεμποδίζοντας τη λειτουργία των φυσιολογικών ορμονών του οργανισμού, έχοντας έτσι δυσμενείς επιπτώσεις όπως μειωμένη γονιμότητα, τις δυσμορφίες του Αναπαραγωγικού Συστήματος ιδιαίτερα στα αγόρια καθώς και άμεση και πρωταρχική επίδραση στον προγραμματισμό της ομαλής ανάπτυξης του εμβρύου, λόγω των επιδράσεων στον εγκέφαλο. Η παρούσα διπλωματική εργασία είναι μια προσπάθεια για την καλύτερη κατανόηση του πώς επηρεάζεται ο εγκέφαλος, και κατ' επέκταση ολόκληρος ο οργανισμός, σε αυτά τα αρχικά στάδια εάν εκτεθεί σε φθαλικές ενώσεις, εξετάζοντας περιοχές ενδιαφέροντος, όπως είναι η προοπτική περιοχή του υποθαλάμου, το ραβδωτό σώμα και ο σωματοαισθητικός φλοιός.

2.Abstract

Phthalates are industrial chemicals and have long been a part of everyday life as they exist in a variety of consumer products such as textiles, food packaging, plastics, pharmaceuticals, toys, cosmetics. They are mainly used as plasticizers, in the form of phthalate esters. The effects of exposure to phthalates on human health have not been studied well. Animal studies have, however, raised serious concerns about the potential for adverse effects in humans. Phthalates can act as endocrine disruptors, imitating or inhibiting the function of the organism's normal hormones, thus having adverse effects such as reduced fertility, malformations of the Reproductive System especially in boys, and direct and primary effects on the progression of normal fetal development due to effects on the brain. The present work is an attempt to better understand how the brain, and by extension the whole organism, is affected in these early stages if exposed to phthalates, by examining areas of interest such as the preoptic area of the hypothalamus, the striatum body and somatosensory cortex.

3.Βιοσύνθεση στεροειδών ορμονών

Με βάση τη χημική δομή τους οι ορμόνες κατατάσσονται σε:

α) **Πεπτιδικές** (π.χ. ινσουλίνη)

β) Ορμόνες που προέρχονται από **αμινοξέα** αλλά δεν είναι πεπτίδια (π.χ. επινεφρίνη)

γ) **Στεροειδείς** (π.χ. κορτιζόλη)

δ) Ορμόνες που προέρχονται από **λιπαρά οξέα** ή άλλα λιπίδια (π.χ. προσταγλανδίνες).

Οι ορμόνες κατατάσσονται, επίσης, και με βάση τον αδένα παραγωγής τους (ορμόνες της υπόφυσης, των επινεφριδίων, του θυρεοειδούς, των παραθυρεοειδών, του γενετικού συστήματος, της επίφυσης, του θύμου). Για πολλά ορμονικά συστήματα η πορεία σηματοδότησης ξεκινάει από τον εγκέφαλο και σταδιακά φτάνει στο μέγιστο βαθμό στον τελικό ιστό-στόχο. Η διέγερση μπορεί να προέρχεται από το εξωτερικό περιβάλλον ή από το εσωτερικό του οργανισμού μέσω ειδικού νευρώνα. Αυτό το σήμα μπορεί να διαβιβαστεί ως ηλεκτρικός παλμός ή/και ως χημικό σήμα. Σε πολλές περιπτώσεις, αλλά όχι σε όλες, τέτοια σήματα δημιουργούν έναν αληθινό καταρράκτη (cascade): προωθούνται στον υποθάλαμο ο οποίος απελευθερώνει ορμόνη σε ποσότητα ng, μετά στην υπόφυση, η οποία απελευθερώνει ορμόνη σε ποσότητα μg, ακολουθεί ο αδένας στόχος, για παράδειγμα ο θυρεοειδής ο οποίος απελευθερώνει ορμόνη σε ποσότητα mg που ασκεί τη δράση της στον τελικό ιστό στόχο, για παράδειγμα το ήπαρ. Ο χρόνος ημιζώης (υποδιπλασιασμού των επιπέδων) των αντίστοιχων ορμονών τείνει να γίνεται μεγαλύτερος προοδευτικά από τον υποθάλαμο προς τον τελικό αδένα (Miller, 2013).

Οι **στεροειδείς ορμόνες** προέρχονται από τη χοληστερόλη με σταδιακή απομάκρυνση ατόμων C και υδροξυλίωση. Υπάρχουν πέντε κύριες κατηγορίες στεροειδών ορμονών:

(1) **προγεστίνες** (π.χ. προγεστερόνη) οι οποίες ρυθμίζουν την πορεία της κύησης και είναι οι

πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεση όλων των άλλων στεροειδών ορμονών.

(2) **γλυκοκορτικοειδή** (π.χ. κορτιζόλη και κορτικοστερόνη) τα οποία ευοδώνουν τη

γλυκονεογένεση και σε φαρμακολογικές δόσεις καταστέλλουν τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις.

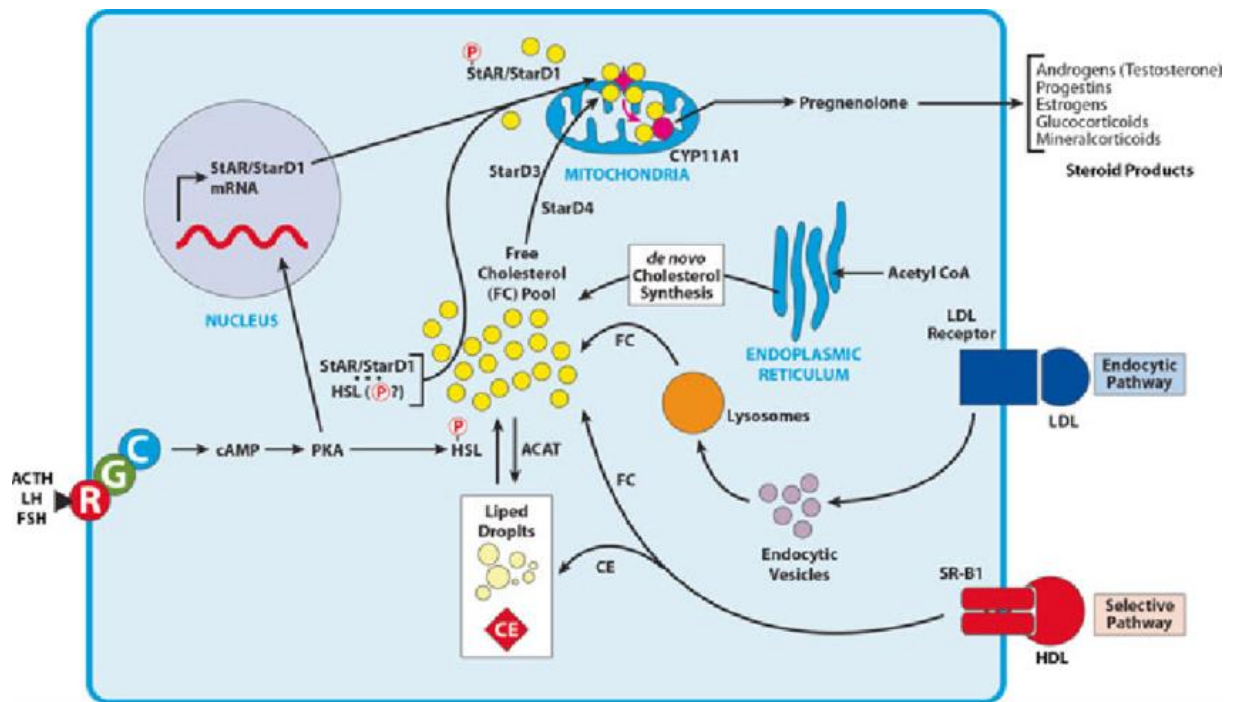
(3) **αλατοκορτικοειδή** (π.χ. αλδοστερόνη), τα οποία ρυθμίζουν την ισορροπία των ιόντων νατρίου και καλίου

(4) **ανδρογόνα** (π.χ. ανδροστενεδιόνη, τεστοστερόνη), τα οποία ευοδώνουν την ανάπτυξη της σεξουαλικότητας του αρσενικού ατόμου και διατηρούν τα χαρακτηριστικά του αρσενικού φύλου.

(5) **οιστρογόνα** (π.χ. οιστρόνη, οιστραδιόλη) τα οποία διατηρούν τα χαρακτηριστικά του θηλυκού ατόμου.

Πολύ γενικά, οι στεροειδείς ορμόνες ρυθμίζουν μεταβολικές πορείες σε επίπεδο γονιδίων. Συνδέονται με ενδοκυτταρικούς πρωτεϊνικούς υποδοχείς και το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα συνδέεται σε εξειδικευμένες περιοχές του γονιδιώματος και επηρεάζει τη μεταγραφή γειτονικών γονιδίων (**γενωμική δράση**). Επιπλέον της γενωμικής, σε αρκετές περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί και **μη-γενωμικές δράσεις** π.χ. σε επίπεδο κυτταρικής μεμβράνης.

Η ορμονική ενεργοποίηση της βιοσύνθεσης των στεροειδών ορμονών εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων και των υποδοχέων και μπορεί να προκαλείται, για παράδειγμα, από την **ACTH (Adrenocorticotropic hormone)** για τη σύνθεση της κορτιζόλης στο φλοιό των επινεφριδίων, από τις **FSH (Follicle-stimulating hormone)** και **LH (Luteinizing hormone)** για τη σύνθεση οιστραδιόλης και τεστοστερόνης στις γονάδες και επί πλέον τον πλακούντα στα κυοφορούντα θηλυκά άτομα. Πρώτο αποτέλεσμα είναι η υδρόλυση των εστέρων της χοληστερόλης, από την ειδική υδρολάση προς **χοληστερόλη** η οποία αποτελεί την πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση όλων των στεροειδών ορμονών. Στη συνέχεια η χοληστερόλη μεταφέρεται στα **μιτοχόνδρια** των κυττάρων-στόχων όπου απομακρύνεται η πλευρική αλυσίδα με τη δράση του ενζυμικού συμπλόκου **δεσμολάση της χοληστερόλης** (κυττόχρωμα P450) η οποία υδροξυλιώνει την πλευρική αλυσίδα σε δυο θέσεις (C-20 και C-22) και την αποσπά, οπότε σχηματίζεται η **πρεγνενολόνη** που αποτελεί την πρόδρομη των άλλων στεροειδών



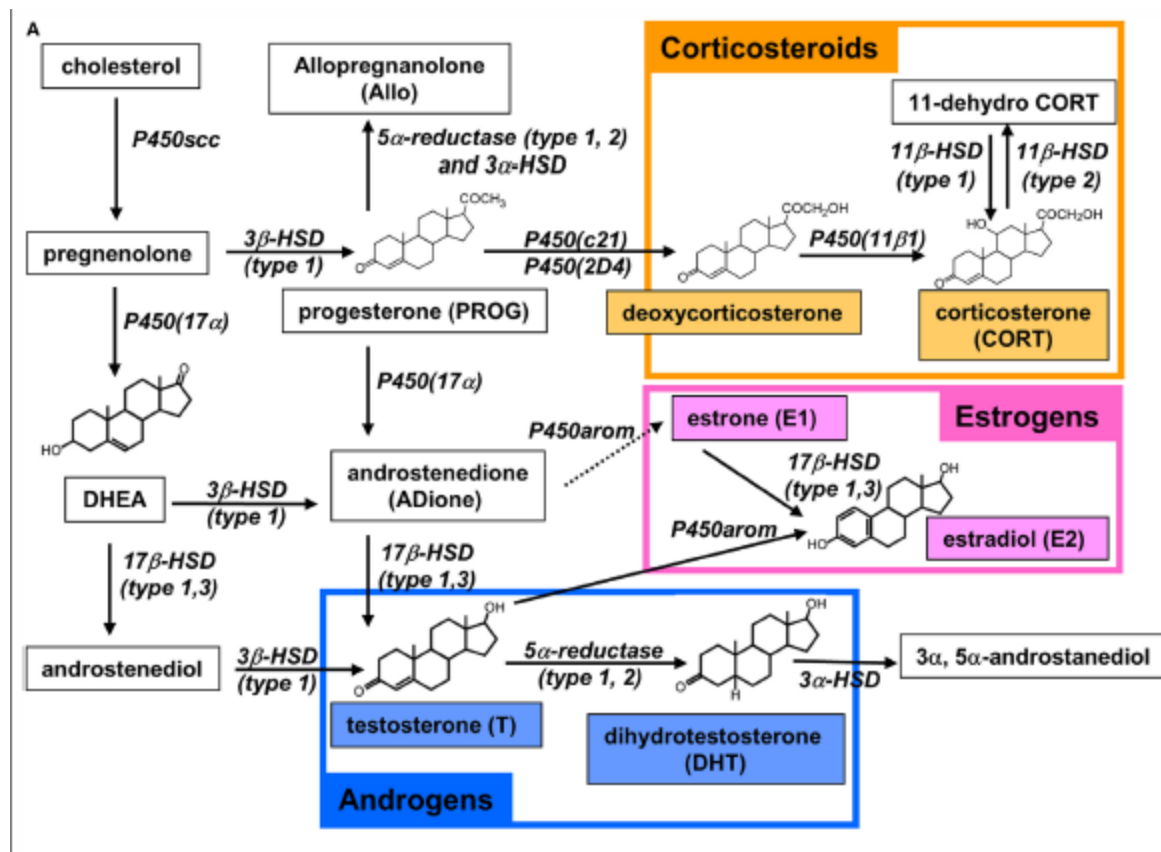
Εικόνα 1 Γενική θεώρηση της βιοσύνθεσης στεροειδών ορμονών μετά από ορμονική διέγερση, *Post-transcriptional and Post-translational Regulation of Steroidogenesis* (Shen et al., 2015)

Η υδρολάση των εστέρων της χοληστερόλης και η δεσμολάση αποτελούν τα ένζυμα κλειδιά για τη βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών τόσο στα επινεφρίδια όσο και στις γονάδες (ωοθήκες, όρχεις). Ρυθμίζονται από την κορτικοτροπίνη (ACTH) στα επινεφρίδια, την ωχρινोटροπίνη (LH) και τη θυλακιοτροπίνη (FSH) στις γονάδες. Κάθε μια από τις πεπτιδικές αυτές ορμόνες ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση. Η υδρολάση είναι γνωστό ότι ενεργοποιείται από πρωτεϊνική κινάση που εξαρτάται από cAMP ενώ η ρύθμιση της δεσμολάσης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Ο ρυθμός της βιοσύνθεσης, ο οποίος συνήθως ελέγχεται από σήματα που προέρχονται από τον εγκέφαλο, ρυθμίζει και την ποσότητα των κυκλοφορούντων στεροειδών αφού αυτά δεν αποθηκεύονται. Τα σήματα αυτά βέβαια ασκούν τη δράση τους μέσω άλλων ενδιάμεσων ορμονών. Για παράδειγμα, η ορμόνη έκλυσης της κορτικοτροπίνης (**corticotrophin releasing hormone, CRH**), εκκρίνεται από κύτταρα του υποθαλάμου ως απόκριση σε διέγερση του ΚΝΣ. Η CRH, με τη σειρά της, προκαλεί την έκκριση κορτικοτροπίνης (**ACTH**) από την υπόφυση, η οποία, στη συνέχεια, διεγείρει την σύνθεση γλυκοκορτικοειδών στον φλοιό των επινεφριδίων συμπεριλαμβανομένης της **κορτιζόλης**. Η κορτιζόλη πάνω από μια συγκέντρωση, δρα ανασταλτικά τόσο στην έκκριση της CRH (στον υποθάλαμο), όσο και στην

έκκριση της ACTH (στην υπόφυση) και η σηματοδοτική πορεία τερματίζεται. Η ανατροφοδοτική αυτή πορεία ελέγχου ονομάζεται αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση (negative feedback control/loop).

Η πρεγνενολόνη (C21) μεταφέρεται από τα μιτοχόνδρια στο **ενδοπλασματικό δίκτυο** όπου με οξείδωση ενός υδροξυλίου και μετανάστευση ενός διπλού δεσμού με τη δράση των ενζύμων 3β-αφυδρογονάση και Δ4,5-ισομεράση δίνει την **προγεστερόνη (C21)** ενδιάμεσο τόσο στη βιοσύνθεση των κύριων στεροειδών ορμονών των επινεφριδίων κορτικοστερόνης (C21), αλδοστερόνης (C21) και κορτιζόλης (C21), όσο και στη βιοσύνθεση των στεροειδών των γονάδων τεστοστερόνης (C19) και οιστραδιόλης (C18). Υδροξυλίωση στον C-21 από ένζυμο του φλοιού των επινεφριδίων, ακολουθούμενη από δύο ακόμα υδροξυλίωσεις και μια αφυδρογόνωση προς σχηματισμό αλδεϋδομάδας, έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της **αλδοστερόνης** (αλατοκορτικοειδές). Υδροξυλίωση της προγεστερόνης στον C-17 δίνει **17α-υδροξυπρογεστερόνη**, την πρόδρομη όλων των άλλων στεροειδών. Δύο υδροξυλίωσεις αυτής της ενδιάμεσης ένωσης δίνουν **κορτιζόλη** (γλυκοκορτικοειδές), κυρίως στα επινεφρίδια. Ένα ένζυμο που βρίσκεται τόσο στα επινεφρίδια όσο και στις γονάδες διασπά την πλευρική αλυσίδα της 17α-υδροξυπρογεστερόνης στον C-17 και δίνει **ανδροστενεδιόνη**, ορμόνη πρόδρομη των ανδρογόνων και των οιστρογόνων με τη δράση του ενζυμικού συμπλόκου **αρωματάση**. Η βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών γίνεται σε εξειδικευμένους ιστούς ή σε ορισμένα κύτταρα των ιστών αυτών ενώ τα εμπλεκόμενα ένζυμα εντοπίζονται σε διάφορα υποκυτταρικά οργανίδια ή στο κυτόπλασμα (Miller 2013).

Οι στεροειδείς ορμόνες εμπλέκονται σε σημαντικές λειτουργίες. Η **τεστοστερόνη** και τα άλλα ανδρογόνα στα αρσενικά άτομα, συντίθενται κυρίως στους όρχεις (και σε πολύ μικρότερες ποσότητες στα επινεφρίδια) και είναι απαραίτητα για την ωρίμαση του σπέρματος ενώ έχουν και σημαντική επίδραση σε μη αναπαραγωγικούς ιστούς (ήπαρ, εγκέφαλος, μυϊκός ιστός). Η τεστοστερόνη στα θηλυκά άτομα συντίθεται κυρίως στις ωοθήκες (και σε πολύ μικρότερες ποσότητες στα επινεφρίδια) ως πρόδρομη της **οιστραδιόλης** και των άλλων οιστρογόνων. Η **προγεστερόνη** εκκρίνεται από το ωχρό σωματίο κατά τη διάρκεια του δεύτερου μισού του έμμηνου κύκλου και προετοιμάζει τη μήτρα για την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου. Στην περίπτωση που το ωάριο εμφυτευθεί, η προγεστερόνη συνεχίζει να εκκρίνεται και αποτελεί την ορμόνη διατήρησης της κύησης.



Εικόνα 2 Βιοσύνθεση και συσχετισμός μεταξύ στεροειδών ορμονών (Hojo and Kawato, 2018)

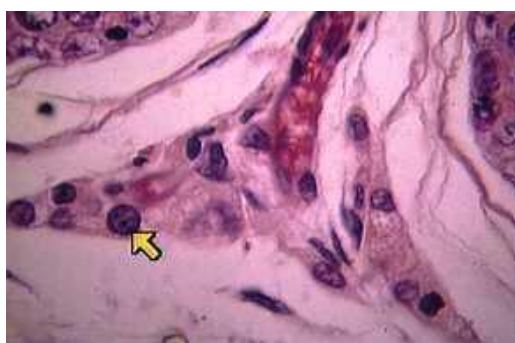
3. Ανδρογόνα

Ανδρογόνα παράγονται τόσο σε άνδρες, όσο και σε γυναίκες, σε διαφορετική αναλογία. Η απόλυτη συγκέντρωση διαφέρει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών ατόμων και είναι συνδυασμός γενετικών παραμέτρων και περιβαλλοντικών επιδράσεων· η συγκέντρωση των ανδρογόνων διαφέρει δε ανά όργανο και ανά ηλικία καθώς και φάση ανάπτυξης. Ο ρόλος των ανδρογόνων (και των οιστρογόνων) δεν αφορά αποκλειστικά τη λειτουργία της αναπαραγωγής, αλλά επεκτείνεται σε ένα ευρύτερο φάσμα λειτουργιών, που αφορούν το μεταβολισμό, τη διακυτταρική επικοινωνία και την ανάπτυξη του οργανισμού εν γένει. Είναι αμφίβολο αν υπάρχει οποιοδήποτε όργανο στο ανθρώπινο σώμα που να μην υπόκειται σε ιστο-ειδική έκφραση των υποδοχέων των στεροειδών του φύλου, η οποία μάλιστα διαφέρει σημαντικά μεταξύ ανδρών και γυναικών. Κατά συνέπεια, η έννοια του φυλετικού διμορφισμού γενικεύεται σε ένα σύνολο προσαρμογών στη λειτουργία ολόκληρου του ανθρώπινου σώματος, χωρίς να είναι πάντοτε εύκολο να ανευρεθεί μια προφανής

εξήγηση-ερμηνεία (από πλευράς εξέλιξης-αναπαραγωγικού πλεονεκτήματος-φυσικής επιλογής) για την επικράτηση των συγκεκριμένων διαφορών στον σύγχρονο άνθρωπο.

3.1 Κύτταρα Leydig

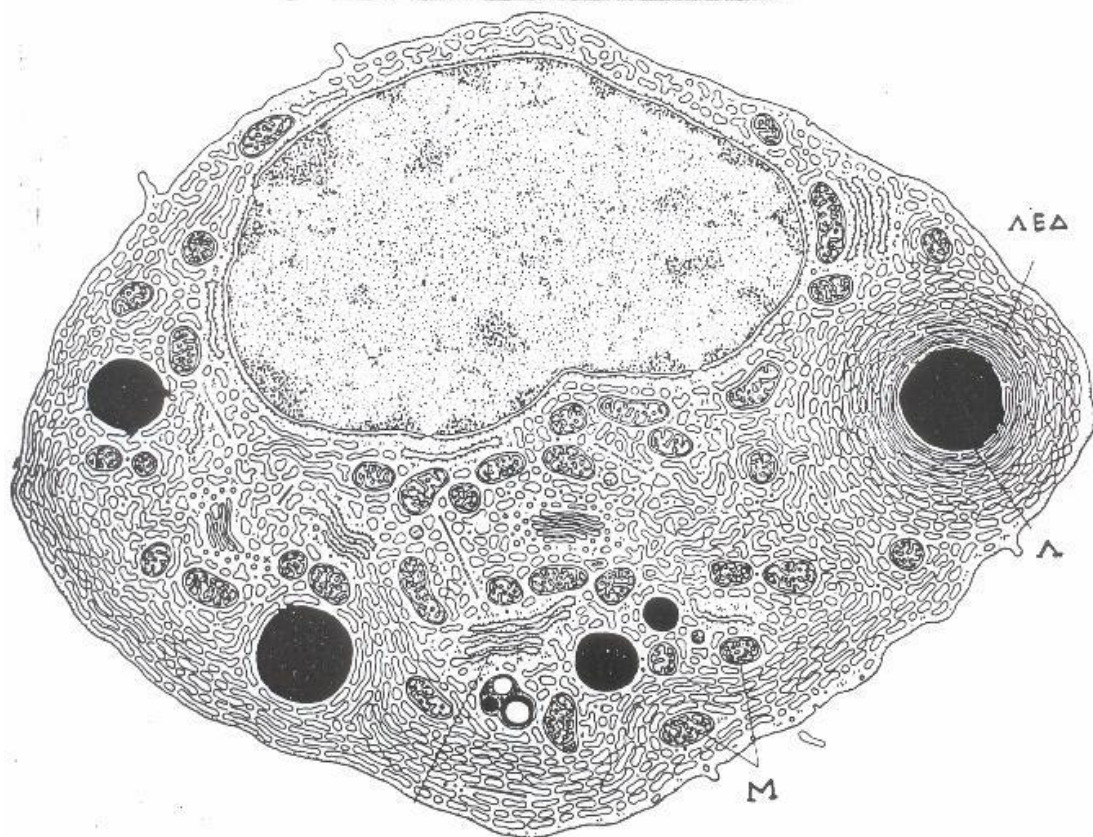
Κεντρικό ρόλο στη βιοσύνθεση των ανδρογόνων διαδραματίζουν τα **κύτταρα του Leydig (Leydig cells)**. Τα κύτταρα Leydig ή κύτταρα του ενδιάμεσου ιστού ή διάμεσα κύτταρα, πήραν το όνομα τους από τον Leydig που τα περιέγραψε το 1850. Η ενδοκρινής λειτουργία τους διαπιστώθηκε από τους Bouin και Ancel το 1903. Εκκρίνουν ανδρογόνα με κύριο εκπρόσωπο την τεστοστερόνη. Στον άνθρωπο πρωτοεμφανίζονται την 55η ημέρα της κύησης ενώ στον αρουραίο τη 15η. Βρίσκονται μεμονωμένα ή σε ομάδες και περιβάλλονται από μεσεγχυματικά κύτταρα και πυκνό δίκτυο αιμοφόρων και λεμφικών τριχοειδών. Ο αριθμός τους είναι μικρός στον άνθρωπο ενώ ο ολικός όγκος που καταλαμβάνουν είναι το 3% του όρχεως. Διαφοροποιούνται αμέσως μετά το σχηματισμό των σπερματικών χορδών και πάντα στον εξωχορδικό ιστό. Βρίσκονται ανάμεσα στα σπερματικά σωληνάρια, στον ενδιάμεσο ιστό του όρχι.



Εικόνα 3 Το βέλος δείχνει κύτταρο Leydig. Διακρίνονται σπερματικά σωληνάρια, τριχοειδές αιμοφόρο αγγείο και κύτταρα του συνδετικού ιστού, (ΙΑΣΠΠΣ, Βιοσύνθεση των ανδρογόνων)

Η παραγωγή της τεστοστερόνης αρχίζει νωρίς. Με την εξέλιξη της ορχικής διαφοροποίησης έχουμε αύξηση του μέσου όγκου των κυττάρων και παράλληλα μεγιστοποίηση των επιπέδων τεστοστερόνης. Τότε τα κύτταρα Leydig είναι πολλά και εντελώς διαφοροποιημένα. Τα κύτταρα Leydig έχουν όλα τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των στεροειδογόνων κυττάρων. Καταρχήν είναι πολυεδρικά. Έχουν έναν κεντρικό στρογγυλό πυρήνα (διάσπαρτη χρωματίνη) με έναν έως δύο πυρηνίσκους στην περιφέρεια. Το έντονα ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα είναι πλούσιο

σε λιποσταγονίδια με χολεστερυλ-εστέρες. Έχουν εξαιρετικά αναπτυγμένο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο που περιέχει τα αναγκαία ένζυμα για τη σύνθεση χοληστερόλης από οξικό οξύ και άλλες ουσίες, και το μετασχηματισμό της πρεγνενολόνης. Τέλος, υπάρχουν μιτοχόνδρια με σωληνώδεις ακρολοφίες που περιέχουν το ένζυμο P450_{scc} για το διαχωρισμό της πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης ώστε να παραχθεί πρεγνενολόνη.

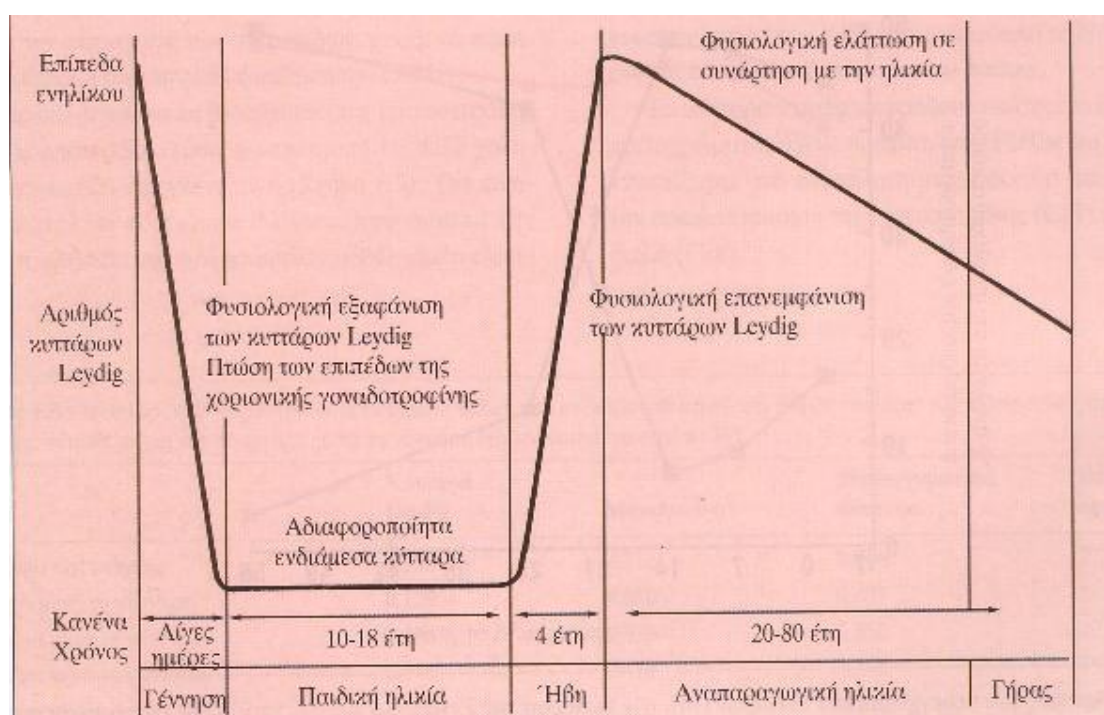


Εικόνα 4

Τυπικό κύτταρο Leydig. Διακρίνονται όλα τα προαναφερθέντα στο κείμενο μορφολογικά χαρακτηριστικά. ΛΕΔ: Λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, Μ: Μιτοχόνδρια, Λ: Λιποσταγονίδια (ΙΑΣΠΙΣ, Βιοσύνθεση των ανδρογόνων)

Τα εμβρυϊκά κύτταρα Leydig προέρχονται από τα μεσεγχυματικά όπως άλλωστε και όλα τα στεροειδογόνα κύτταρα. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι κατά την αύξηση του αριθμού τους αμέσως μετά τον σχηματισμό των σπερματικών χορδών παρατηρείται ελάττωση του αριθμού των μεσεγχυματικών κυττάρων και παράλληλα διακρίνονται ελάχιστες μιτώσεις. Ο πυρήνας τους είναι ωειδής ή ακανόνιστου σχήματος και συχνά περιέχει έναν πυρηνίσκο και εμφανίζουν δακτύλιο

κυτταροπλάσματος γύρω από τον πυρήνα. Οι όρχεις των εμβρύων και των νεογνών στον αρουραίο, σύμφωνα με τους Kerr & Knell το 1988 περιέχουν πολλά ατρακτοειδή κύτταρα (μεσεγχυματικά) μονήρη ή κατά ομάδες. Ορισμένα από αυτά αναπτύσσονται σε ώριμα κύτταρα Leydig. Οι δύο πληθυσμοί κυττάρων Leydig (εμβρυϊκά και ώριμα) έχουν ιδιαίτερα λειτουργικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά. Αυτό αποτελεί βασικό λόγο πρότασης ενός διαφασικού προτύπου ανάπτυξης. Κατά το τέλος της κύησης και μετά τη γέννηση έχουμε βαθμιαία ελάττωση των εμβρυϊκών κυττάρων Leydig λόγω πτώσης των επιπέδων της χοριακής γοναδοτροφίνης. Κατά την παιδική ηλικία δεν παρατηρούνται κύτταρα Leydig αλλά μόνο αδιαφοροποίητα κύτταρα ενδιάμεσου ιστού που είναι πρόδρομες μορφές των κυττάρων Leydig. Με την έναρξη της ήβης έχουμε την εμφάνιση ενός νέου πληθυσμού, των ώριμων κυττάρων Leydig. Σύμφωνα με κάποιες μελέτες έχουμε και ταυτόχρονη μικρή εμφάνιση εμβρυϊκών κυττάρων μαζί με τα ώριμα. Με τη πρόοδο της ηλικίας παρατηρείται φυσιολογική πτώση του αριθμού των κυττάρων Leydig.



Εικόνα 5

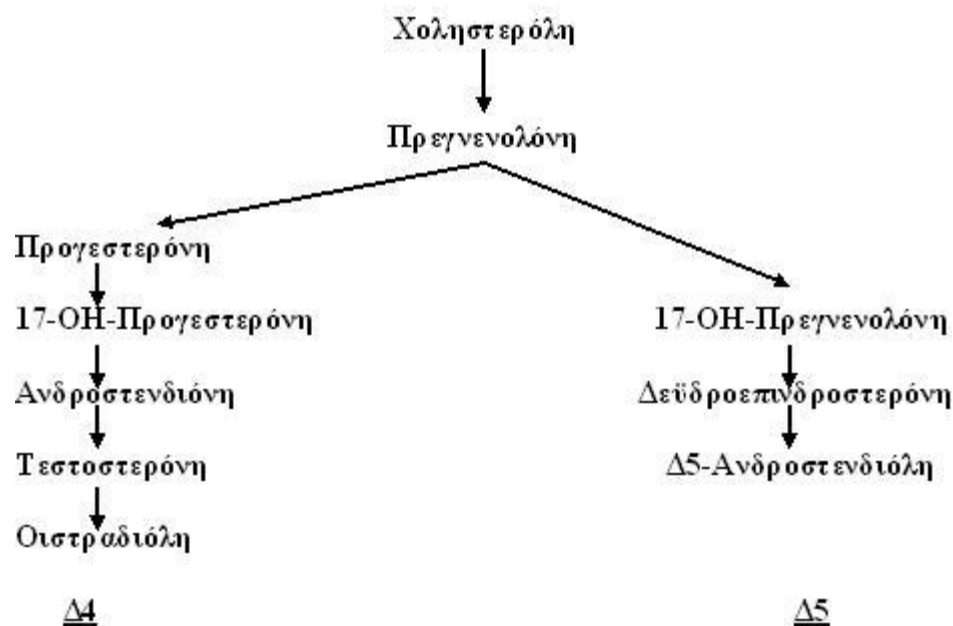
Διαγραμματική πορεία των κυττάρων Leydig (ΙΑΣΠΗΣ, Βιοσύνθεση των ανδρογόνων)

Σε αντίθεση προς τα εμβρυϊκά, τα ώριμα κύτταρα Leydig στον άνθρωπο είναι μεγαλύτερα, δεν συγκεντρώνονται σε ομάδες και από την 8η εβδομάδα και μετά

αποκτούν ακανόνιστο σχήμα με κυτταροπλασματικές προεκβολές και φιλοπόδια. Διαθέτουν εκτεταμένο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, ελάχιστα λιποσταγονίδια στο κυτταρόπλασμά τους, πολλά μιτοχόνδρια με στρογγυλές ακρολοφίες, χοληστερίνη, ασκορβικό οξύ και ένζυμα στεροειδογένεσης. Από τη 14 έως την 28 ημέρα μετά τη γέννηση στον αρουραίο, στον άνηβο όρχι, η αύξηση του αριθμού των ώριμων κυττάρων Leydig οφείλεται στη χρησιμοποίηση των μεσεγχυματικών πρόδρομων μορφών. Μετά την 28η ημέρα τα περισσότερα από τα ήδη νεοσχηματισθέντα κύτταρα διαιρούνται ακόμα μία ή δύο φορές και έτσι συμπληρώνεται ο ώριμος πληθυσμός των κυττάρων Leydig.

3.2 Βιοσύνθεση των ανδρογόνων

Η χοληστερόλη, η οποία είναι απαραίτητη ως πρώτη ύλη για τη βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών του φύλου, προέρχεται είτε από πρόσληψη της κυκλοφορούσας στο πλάσμα χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) από τα κύτταρα Leydig ή από υδρόλυση εστέρων της χοληστερόλης, που είναι αποθηκευμένοι στα σταγονίδια λιπιδίων, ή από *de novo* σύνθεσή της από το οξικό οξύ στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου (να επισημανθεί ότι οι εμβρυϊκοί όρχεις, αντίθετα από τις ωοθήκες, σε όλα τα είδη των θηλαστικών που έχουν μελετηθεί ως σήμερα, παρουσιάζουν την ικανότητα *de novo* σύνθεσης τεστοστερόνης από το οξικό οξύ.) μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στην έσω μεμβράνη του μιτοχονδρίου, με μηχανισμούς που δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Στη διεργασία αυτή φαίνεται να εμπλέκονται διάφορες πρωτεΐνες, όπως η **STAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein)**, η **SCP2 (Sterol Carrier Protein 2)**, η **SAP (Steroidogenesis Activator Polypeptide)**, η **PBR (Peripheral Benzodiazepine Receptor)** και ο προσδέτης της **DBI (Diazepam Binding Inhibitor)**. Στην έσω μεμβράνη του μιτοχονδρίου βρίσκεται το ενζυμικό σύμπλεγμα **CSCC (Side Chain Cleavage Enzyme Complex)**, το οποίο αποτελείται από φλαβοπρωτεΐνες και από την 20-22 δεσμολάση της χοληστερόλης (P450_{scc}), που κωδικοποιείται από το γονίδιο CYP11A στο χρωμόσωμα 15q23-24. Το σύμπλοκο CSCC μετατρέπει τη χοληστερόλη σε πρεγνενολόνη, η οποία, στη συνέχεια, μεταφέρεται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου ολοκληρώνεται η βιοσύνθεση των ανδρογόνων μέσω δύο διαφορετικών οδών: της οδού της Δ4-Ανδροστενδιόνης και της οδού της Δ5 Ανδροστενδιόνης.



Εικόνα 6 Δ4, Δ5 οδοί βιοσύνθεσης ανδρογόνων (ΙΑΣΠΙΣ, Βιοσύνθεση των ανδρογόνων)

Η βιοσύνθεση των ανδρογόνων από την πρεγνενολόνη με τη Δ4 ή τη Δ5 οδό είναι διαφορετική κατά τη διάρκεια της ζωής στα διάφορα είδη. Στον όρχι του ενήλικου ανθρώπου πλέον σημαντική είναι η Δ5 οδός. Στον εμβρυϊκό όρχι υπάρχουν η πρεγνενολόνη και η δεϋδροεπιανδροστερόνη, που αποτελούν ενδιάμεσες ενώσεις της Δ5, όχι όμως η προγεστερόνη, που αποτελεί ενδιάμεση ένωση της Δ4. Συνεπώς και στο ανθρώπινο έμβρυο φαίνεται ότι η Δ5 οδός είναι η πλέον σημαντική.

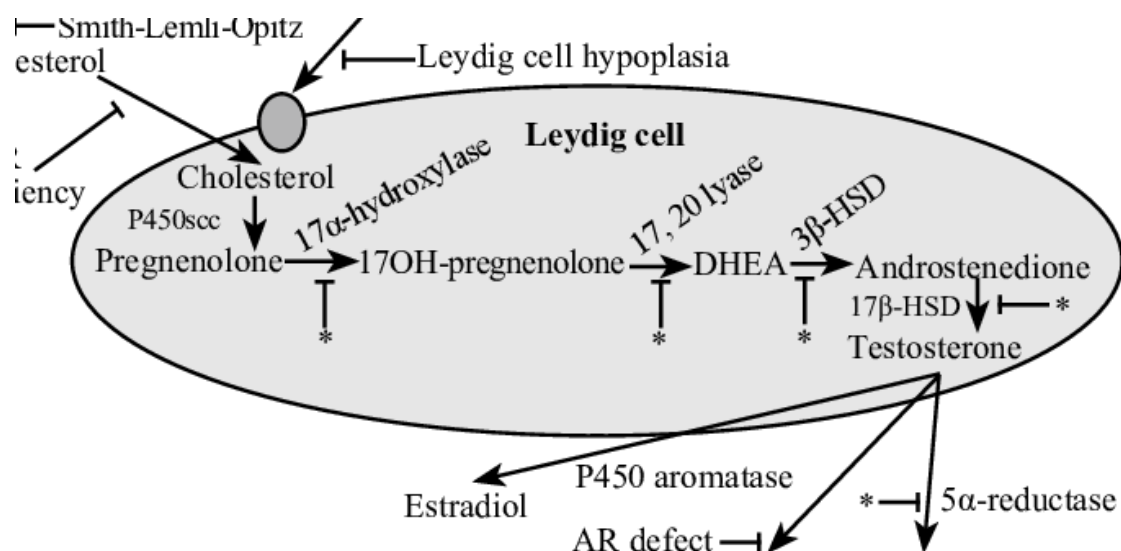
3.3 Βιοσύνθεση, μεταβολισμός και μεταφορά της τεστοστερόνης

Η σύνθεση της τεστοστερόνης (Τ) ρυθμίζεται, κατά κύριο λόγο, από την LH, η οποία εκκρίνεται από τα γοναδοτρόπα κύτταρα του προσθίου λοβού της υπόφυσης κατά εκκριτικά επεισόδια, ως αποτέλεσμα των εκκριτικών επεισοδίων της εκλυτικής των γοναδοτροπινών υποθαλαμικής ορμόνης (**Gonadotropin releasing hormone, GnRH**). Ύστερα από τη σύνδεση της LH με τον μεμβρανικό υποδοχέα της, σε κύτταρο Leydig πυροδοτείται το μονοπάτι της αδενυλικής κυκλάσης, με ενδοκυττάρια αύξηση της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) και με ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης Α (PKA). Επιπλέον, πυροδοτείται το μονοπάτι της φωσφολιπάσης C, με ενδοκυττάρια αύξηση του Ca^{2+} και της διακυλογλυκερόλης (DAG), που οδηγούν σε ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Οι παραπάνω κινάσες ενεργοποιούν, με φωσφορυλίωση, αφενός την

υδρολάση των εστέρων της χοληστερόλης, παράγοντας ελεύθερη χοληστερόλη, και αφετέρου πρωτεΐνες, που εμπλέκονται στη μεταφορά της χοληστερόλης στην έξω μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Επιπλέον, η PKA και η PKC διεγείρουν την *de novo* σύνθεση της STAR πρωτεΐνης, που είναι απαραίτητη για τη μεταφορά της χοληστερόλης από την έξω στην έσω μεμβράνη του μιτοχονδρίου και την παραγωγή του ενζύμου 20-22 δεσμολάσης, που διασπά την πλευρική αλυσίδα της χοληστερόλης μετατρέποντάς την σε πρεγνενολόνη. Ακόμη, η LH διεγείρει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα της στεροειδογένεσης, και, κυρίως, επάγει τα επίπεδα της 17-υδροξυλάσης και της 17-20 δεσμολάσης (κυτόχρωμα P450c17), που καταλύει το κύριο βήμα για τη σύνθεση των ανδρογόνων.

Πλήθος παραγόντων τροποποιούν, θετικά ή αρνητικά, τη δράση της LH στον όρχι, ρυθμίζοντας τη στεροειδογένεση. Στους παράγοντες αυτούς περιλαμβάνονται ορμόνες (ινσουλίνη, προλακτίνη, αυξητική ορμόνη), βιοδραστικά πεπτίδια και αυξητικοί παράγοντες, που δρουν με αυτοκρινικό ή παρακρινικό τρόπο. Οι παράγοντες αυτοί προέρχονται από:

- α) τα κύτταρα Leydig, όπως ο παρόμοιος με την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας-1 (IGF-1), που δρα θετικά, και η αγγειοτενσίνη-II (A-II), η ορμόνη έκλυσης της κορτικοτροπίνης (CRH) η αργινίνη- βαζοπρεσσίνη (AVP) και ο αυξητικός παράγοντας των όγκων-β (TGF-β), που δρουν αρνητικά,
- β) τα κύτταρα Sertoli, όπως ο IGF-1, η ενδοθηλίνη και η ανασταλτίνη με θετική δράση και η ακτιβίνη, η AVP, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο αυξητικός παράγοντας των όγκων-α (TGF-α), η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF) με αρνητική δράση,
- γ) το σπερματοκύτταρο, όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α) με αρνητική δράση και
- δ) τα περισωληναριακά κύτταρα.



Εικόνα 7

Βιοσύνθεση των ανδρογόνων στα κύτταρα Leydig Cools et al., 2009

Η ημερήσια παραγωγή T από τους όρχεις ανέρχεται σε 6-7mg, που αντιστοιχεί στο 95% της ολικής παραγόμενης T στον ενήλικα άνδρα, ενώ τα επινεφρίδια και το ήπαρ έχουν μικρή συμμετοχή στην παραγωγή της. Από τους όρχεις παράγονται επίσης μικρές ποσότητες ασθενών ανδρογόνων, όπως η A (ανδροστερόνη), η DHEA (διϋδροεπιανδροστερόνη), καθώς και μικρή ποσότητα (50-100μg/ημέρα) του πολύ ισχυρού ανδρογόνου διϋδροτεστοστερόνη (DHT). Ανδρογόνα παράγονται και στο επινεφρίδιο με κύριους εκπροσώπους την DHEA-S και την A. Τα ανδρογόνα αυτά είναι υπεύθυνα για την αδρεναρχή (η αύξηση της παραγωγής των ανδρογόνων που ξεκινά περίπου στην ηλικία των 6 ετών στα κορίτσια και 7 έτη στα αγόρια).

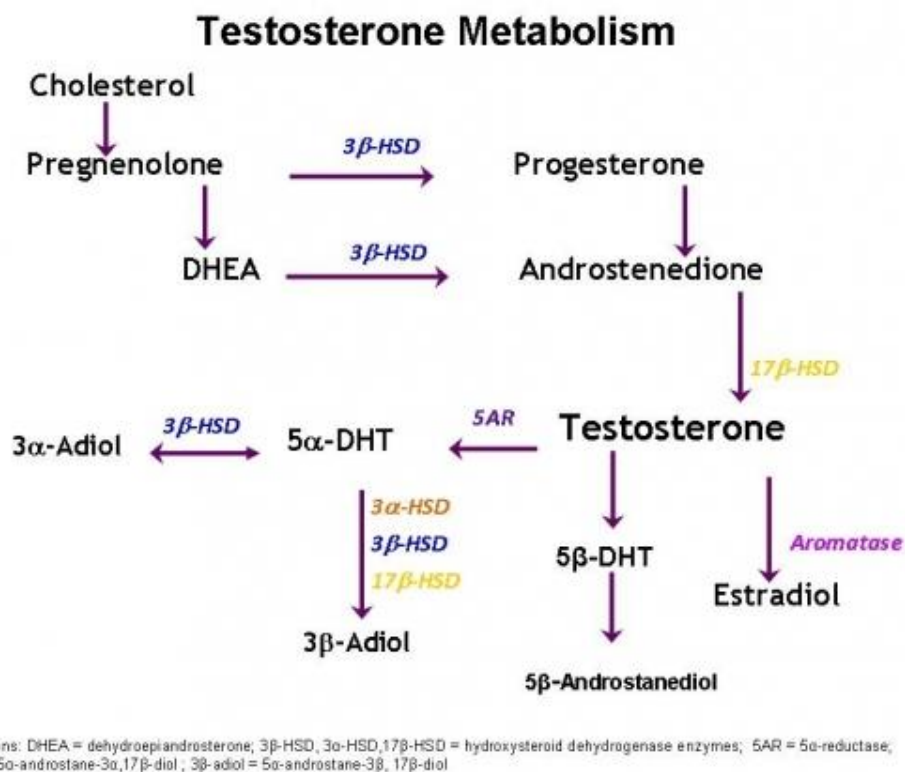
Η T διέρχεται με διάχυση την κυτταρική μεμβράνη και εξέρχεται στο διάμεσο χώρο, όπου σύμφωνα με τη διαφορά συγκέντρωσης και το ρυθμό ροής του φλεβικού αίματος, ο οποίος είναι πολύ υψηλότερος του ρυθμού ροής του υγρού που κατακλύζει τον διάμεσο χώρο, διαχέεται και εγκαταλείπει τον όρχι, μέσω του φλεβικού δικτύου. Τα επίπεδα της T του ορού στους άνδρες, τα οποία κυμαίνονται από 300 έως 1100ng/dl, παρουσιάζουν διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της ημέρας, με τις υψηλότερες τιμές (peak) το πρωί (08.00) και τις χαμηλότερες (nadir) το βράδυ (22.00). Ο εικοσιτετράωρος ρυθμός έκκρισης της T ακολουθεί την κατά ώσεις έκκριση της LH.

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το 44% της T, που κυκλοφορεί στο αίμα, είναι συνδεδεμένο πολύ ισχυρά με μία β-σφαιρίνη, τη σφαιρίνη που δεσμεύει τις ορμόνες

του φύλου (**Sex hormone-binding globulin, SHBG**), το 54% περίπου συνδέεται με μικρότερη συγγένεια με λευκωματίνες και μόλις το 2% κυκλοφορεί σε ελεύθερη μορφή (FT). Το ελεύθερο κλάσμα της T και εκείνο που συνδέεται χαλαρά με λευκωματίνες αποτελούν τη βιοδιαθέσιμη T, ενώ το κλάσμα που είναι συνδεδεμένο με την SHBG αποτελεί απόθεμα T στην κυκλοφορία του αίματος. Η SHBG είναι ετεροδιμερής γλυκοπρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 95kDa. Παράγεται στο ήπαρ και η συγκέντρωσή της στον ορό μεταβάλλεται από διάφορους παράγοντες. Συγκεκριμένα, η SHBG αυξάνεται από τα οιστρογόνα και τη θυροξίνη. Επιπλέον, αυξάνεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως η οξεία και χρόνια ηπατική νόσος και ο υπογοναδισμός. Αντίθετα, τα επίπεδα της SHBG στον ορό ελαττώνονται από τα ανδρογόνα και τα κορτικοειδή. Ακόμη ελαττώνονται στην παχυσαρκία και σε καταστάσεις απώλειας λευκώματος. Η SHBG, εκτός από την T, συνδέει με μικρότερη συγγένεια την E2 και την DHT. Η τελευταία κυκλοφορεί σε ελεύθερη μορφή σε ποσοστό 0,8%.

Το μεγαλύτερο ποσοστό της T (90-95%), που υπάρχει στην κυκλοφορία, μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ αλλά και στον νεφρό, στον λιπώδη ιστό και στους μυες σε ανενεργούς μεταβολίτες με τη δράση οξειδωτικών ενζύμων. Τα κυριότερα προϊόντα του μεταβολισμού της είναι τα 17-κετοστεροειδή, η ανδροστερόνη και η ετιοχολανολόνη, τα οποία, αφού συνδεθούν με θειϊκό ή γλυκουρονικό οξύ στις θέσεις C3 και C17, καθίστανται υδατοδιαλυτά και απεκκρίνονται στα ούρα. Ένα μικρό μέρος της T εκκρίνεται στη χολή, αλλά επαναρροφάται από το έντερο και εισέρχεται εκ νέου στην κυκλοφορία. Μικρό ποσοστό της T μετατρέπεται σε δραστικούς μεταβολίτες: 4% σε DHT, 1-5% σε E2, και περίπου 2% σε A. Η DHT, που είναι ο βιολογικά δραστικός μεταβολίτης της T σε ορισμένους ιστούς-στόχους, προκύπτει από τη δράση του ενζύμου 5α-αναγωγή (αναγωγή στη θέση C4-C5 του διπλού δεσμού της T). Πρόκειται για ενδοπλασματικό ένζυμο με δύο ισομορφές, οι οποίες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και παρουσιάζουν 50% ομολογία. Ο τύπος 1 κωδικοποιείται από το γονίδιο SRD5A1, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5p15, και εκφράζεται στους περιφερικούς μη ανδρογονοεξαρτώμενους ιστούς, όπως το δέρμα του τριχωτού της κεφαλής, το ήπαρ και ο νεφρός. Ο τύπος 2 κωδικοποιείται από το γονίδιο SRD5A2, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2p23, και εκφράζεται στον όρχι, στο πέος, στην ουρήθρα, στο όσχεο, στον προστάτη και στις ανδρογονοεξαρτώμενες περιοχές του δέρματος (εφηβαίο, μασχάλη, πρόσωπο, άκρα). Η 17β-οιστραδιόλη προκύπτει από αρωματοποίηση της T με τη δράση του μικροσωματικού ενζύμου

κυτόχρωμα P450 αρωματάση. Το ένζυμο αυτό, που καταλύει και τη μετατροπή της A σε οιστρόνη (E1), κωδικοποιείται από το γονίδιο CYP19, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 15q21.1 και εκφράζεται σε διάφορους ιστούς (γονάδες, λιπώδης ιστός, εγκέφαλος, μαστός, πλακούντας). Σε ορισμένες περιπτώσεις, η E2 μπορεί να είναι ακόμη και ο πραγματικός διαμεσολαβητής μίας δράσης της T, όπως συμβαίνει με την αρρενοποίηση του εγκεφάλου.



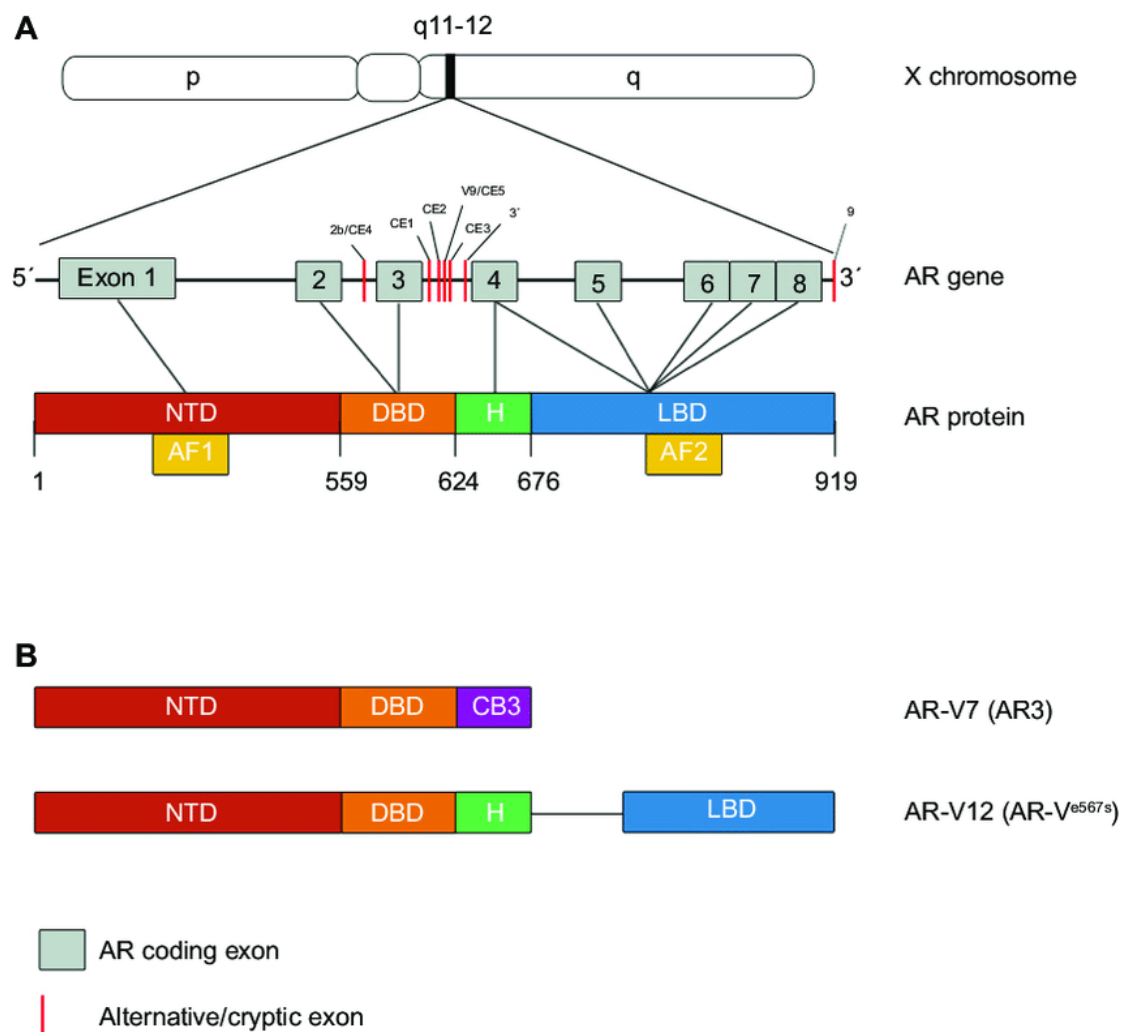
Εικόνα 8

Μεταβολισμός της τεστοστερόνης (In vivo Clinical, Clinical Significance of 5α-Reductase Activity)

Η Τ εισέρχεται στο κύτταρο-στόχο με απλή διάχυση (σε περίπτωση που χρειάζεται, γίνεται ενδοκύτωση του συμπλόκου με SHBG με τη βοήθεια της πρωτεΐνης μεταφοράς megalin) όπου, ανάλογα με τον ιστό, είτε ασκεί από μόνη της την ανδρογονική δράση (μυϊκός και λιπώδης ιστός, οστά, αιμοποιητικό σύστημα, επιδιδυμίδα, σπερματικός πόρος, σπερματοδόχες κύστεις) ή ανάγεται από την 5α-αναγωγή στον δραστικό μεταβολίτη της, τη DHT (προστάτης, πέος, όσχεο, ουρήθρα, δέρμα).

3.4 Υποδοχέας των ανδρογόνων

Οι υποδοχείς μέσω των οποίων δρουν τα στεροειδή του φύλου είναι κυρίως πυρηνικοί, αλλά δευτερευόντως και μεμβρανικοί, ανάλογα με τη φύση του επιδιωκόμενου αποτελέσματος στον ιστό-στόχο. Δεν υπάρχουν αποκλειστικοί υποδοχείς για κάθε ορμόνη, αλλά απλά διαφορετικός βαθμός συγγένειας αυτής για μια σειρά από εναλλακτικούς υποδοχείς. Η Τ και η DHT, εντός του κυτταροπλάσματος του κυττάρου-στόχου, συνδέονται με τον **ανδρογονικό υποδοχέα (Androgen Receptor, AR)**, ο οποίος έχει μεγαλύτερη συγγένεια προς τη DHT παρά προς την Τ. Το σύμπλοκο ανδρογόνου-υποδοχέα εισέρχεται στον πυρήνα, όπου συνδέεται σε ειδικές περιοχές του DNA, υποβοηθούμενο, ενδεχομένως, από επικουρικές πρωτεΐνες. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην πυροδότηση της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων και καταλήγει στη σύνθεση πρωτεϊνών, οι οποίες συντελούν στην εμφάνιση της ανδρογονικής δράσης στο κύτταρο-στόχο. Είναι χαρακτηριστικό ότι όλες, σχεδόν, οι δράσεις των ανδρογόνων αναστέλλονται από αναστολείς σύνθεσης είτε του RNA ή των πρωτεϊνών.



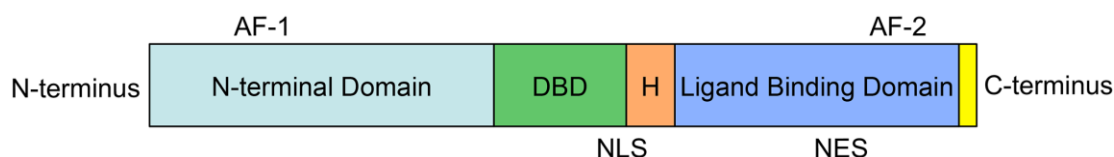
Εικόνα 9

Γονιδιακός τόπος AR και πρωτεϊνική δομή (Greasley et al., 2015)

Ο AR περιλαμβάνει τρεις βασικές λειτουργικές επικράτειες: την επικράτεια ρύθμισης μεταγραφής του αμινοτελικού N-άκρου, την επικράτεια πρόσδεσης του DNA (**DNA Binding Domain, DBD**) και την επικράτεια δέσμευσης του προσδέτη (Ligand Binding Domain, LBD). Η περιοχή του N-άκρου του AR είναι η πιο μεταβλητή, ενώ η DBD είναι η πιο συντηρημένη περιοχή μεταξύ των διαφόρων μελών της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων στεροειδών ορμονών. Όλες οι επικράτειες πρόσδεσης του DNA της οικογένειας αποτελούνται από δύο δάκτυλα ψευδαργύρου (zinc fingers) που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες ακολουθίες DNA. Αυτά τα δάκτυλα ψευδαργύρου διευκολύνουν την άμεση πρόσδεση του AR με τις περιοχές υποκινητή και ενισχυτή των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον AR, με τελικό αποτέλεσμα τη

διέγερση ή την καταστολή της μεταγραφής αυτών των γονιδίων. Η DBD είναι συνδεδεμένη με την επικράτεια δέσμησης προσδέτη από μια περιοχή άρθρωσης (hinge region). Η LBD (Ligand Binding Domain) έχει επίσης παρόμοια δομή ανάμεσα στους πυρηνικούς υποδοχείς και μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ του AR, των πρωτεϊνών θερμικού σοκ και των πρωτεϊνών συνοδών, ενώ αλληλεπιδρά επίσης με το N-τελικό άκρο του AR για τη σταθεροποίηση των δεσμευμένων ανδρογόνων.

Εντός του AR υπάρχουν ορισμένες αλληλουχίες σηματοδότησης. Έχουν ταυτοποιηθεί δύο λειτουργίες ενεργοποίησης της μεταγραφής: η ανεξάρτητη από προσδέτη AF-1, εβρισκόμενη στην επικράτεια του N-άκρου που απαιτείται για τη μέγιστη δραστηριότητα του AR, και η εξαρτώμενη από προσδέτη AF-2, που βρίσκεται στην LBD, η οποία είναι σημαντική για το σχηματισμό της θέσης πρόσδεσης του συρρυθμιστή όπως στη διαμεσολάβηση άμεσων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των επικρατειών του N-άκρου και της LBD (αλληλεπιδράσεις N/C). Διαφορές-κλειδί στη συνεισφορά συγκεκριμένων διατηρημένων καταλοίπων στον πυρήνα AF-2 μεταξύ του AR και άλλων πυρηνικών υποδοχέων στεροειδών ορμονών έχουν αναγνωριστεί, οι οποίες πιθανώς ευθύνονται για τις παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των περιοχών AF-2 του AR και άλλων υποδοχέων της οικογένειας σε σχέση με τη δομή και τη λειτουργία τους, καθώς και με τις συρρυθμιστικές πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν. Ένα πυρηνικό σήμα εντοπισμού (**nuclear localisation signal, NLS**), υπεύθυνο για την εισαγωγή του υποδοχέα στον πυρήνα και ένα πυρηνικό σήμα εξαγωγής (**nuclear export signal, NES**), υπεύθυνο για την έξοδο του AR στο κυτταρόπλασμα μετά την απόσυρση του προσδέτη, βρίσκονται μεταξύ της επικρατείας DBD και της άρθρωσης και της LBD αντίστοιχα.



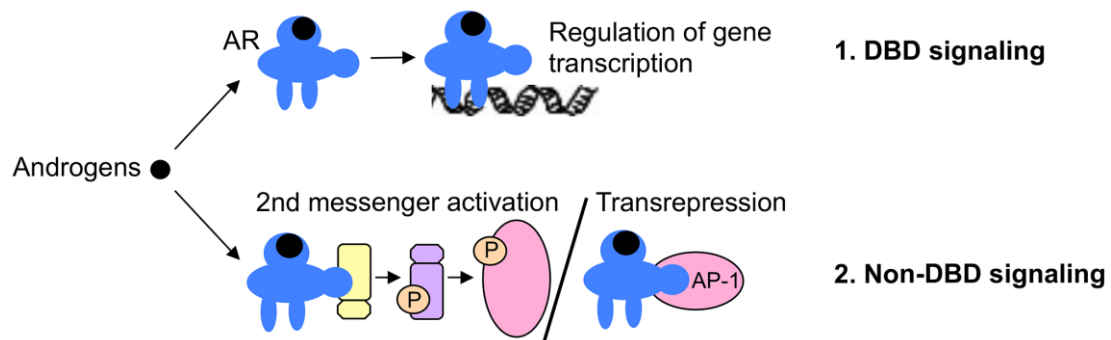
Εικόνα 10 Λειτουργικές επικράτειες του υποδοχέα ανδρογόνων (AR): N-άκρο, επικράτεια δέσμησης DNA (DBD), επικράτεια δέσμησης προσδέτη, (H - περιοχή άρθρωσης, AF-1 - λειτουργία ενεργοποίησης μεταγραφής 1, AF-2 - λειτουργία ενεργοποίησης μεταγραφής 2, NLS - πυρηνικό σήμα εντοπισμού, NES - πυρηνικό σήμα εξαγωγής) Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside, Davey and Grossman, 2016

3.4.1 Μηχανισμοί δράσης του AR

Υπάρχουν 2 διακριτοί μηχανισμοί δράσης του AR εξαρτώμενοι από προσδέτη,

εξαρτώμενοι ή ανεξάρτητοι από την πρόσδεση στο DNA. Απουσία συνδέτη, ο AR είναι κυτταροπλασματικός, συνδεδεμένος με πρωτεΐνες θερμικού σοκ (chaperones). Όταν δεσμευτούν ανδρογόνα στον AR αλλάζει η διαμόρφωσή του, απομακρύνονται οι chaperones και εκτίθεται η NLS. Το σύμπλοκο ανδρογόνου-AR μεταφέρεται στον πυρήνα όπου σχηματίζει διμερή και δεσμεύεται με AREs που βρίσκονται εντός κλασσικών γονιδίων στόχων για τη ρύθμιση της μεταγραφής τους. Η μεταγραφική δραστηριότητα του συμπλόκου ρυθμίζεται από ειδικές πρωτεΐνες γνωστές ως συρρυθμιστές (coregulators), οι οποίοι συνδέονται με τον ενεργοποιημένο AR με έναν εξαρτώμενο από προσδέτη τρόπο και είτε ενισχύουν (συνενεργοποιητές) ή καταστέλλουν (συγκатаστολείς) την ικανότητά του να τροποποιεί τη δραστηριότητα του γονιδίου-στόχου μέσω αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και τροποποιήσεων των ιστονών, καθώς και να εμπλέκεται στη στρατολόγηση της βασικής μεταγραφικής μηχανής.

Το σύμπλοκο ανδρογόνων - AR μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει μονοπάτια σηματοδότησης τα οποία δεν εξαρτώνται από την πρόσδεση σε DNA, όπως μονοπάτια 2^{ου} αγγελιοφόρου συμπεριλαμβανομένων των ERK, Akt και MAPK. Οι επιδράσεις αυτές συμβαίνουν σε διάστημα δευτερολέπτων έως λεπτών μετά τη δράση ανδρογόνων και είναι επομένως πολύ γρήγορες για να έχουν προκύψει μέσω των ενεργειών της DBD του AR για τη ρύθμιση της μεταγραφής και μετάφρασης των γονιδίων-στόχων. Έμμεση καταστολή του γονιδίου μπορεί επίσης να συμβεί, με τον AR να δεσμεύει και να απομονώνει μεταγραφικούς παράγοντες όπως η AP-1 που κανονικά απαιτούνται για την αυξορύθμιση (upregulation) της έκφρασης του γονιδίου στόχου (παράδειγμα *Ngfr* και *Mmp-13*) απουσία της πρόσδεσης AR στο DNA. Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι τουλάχιστον ορισμένες από τις μη εξαρτώμενες από δέσμευση στο DNA δράσεις των ανδρογόνων διαμεσολαβούνται μέσω της ενεργοποίησης πρωτεϊνικών υποδοχέων οι οποίοι είναι δεσμευμένοι στην κυτταρική μεμβράνη για την έναρξη ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης που μπορούν να συμβούν ακόμα και σε παρουσία χαμηλών επιπέδων ανδρογόνων. Για παράδειγμα, ο συζευγμένος με G-πρωτεΐνη υποδοχέας GPRC6A έχειδειχθεί πρόσφατα ότι μεσολαβεί τη μη εξαρτώμενη από DNA δράση της τεστοστερόνης για τη φωσφορυλίωση της ERK σε κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών και σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη *in vitro*. Επίσης έχει αναφερθεί πρόσφατα ότι η προερχόμενη από οστά ορμόνη, οστεοκαλσίνη (osteocalcin), δεσμεύεται στον GPRC6A των κυττάρων Leydig των όρχεων προκαλώντας παραγωγή τεστοστερόνης.



Εικόνα 11

Μηχανισμοί δράσης AR εξαρτώμενοι από προσδέματα: (1) Εξαρτώμενος από την πρόσδεση DNA (DBD) και (2) μη εξαρτώμενος από την πρόσδεση DNA (DBD). (AP-1 - πρωτεΐνη ενεργοποιητής 1) Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside, Davey and Grossman, 2016

3.5 Κατανομή υποδοχέων ανδρογόνων (AR) στον εγκέφαλο

Αναφορικά με την κατανομή του AR στον εγκέφαλο, σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε ενήλικες αρσενικούς και θηλυκούς ποντικούς, εξετάστηκαν 4 περιοχές που έχουν συνδεθεί με τη ρύθμιση της τυπικής συμπεριφοράς του αρσενικού, συγκεκριμένα ο υποκείμενος πυρήνας της μεθορίου ταινίας (bed nucleus of the stria terminalis), η μέση προοπτική περιοχή (medial preoptic area) του υποθαλάμου καθώς και η ραχιαία και κοιλιακή όψη του έξω διαφράγματος (lateral septum). Τα αποτελέσματα έδειξαν εμφανή φυλετικό διμορφισμό, με πολύ πιο έντονη παρουσία του AR στα αρσενικά σε σχέση με τα θηλυκά (Lu et al., 1998), αποτελέσματα που συμφωνούν με αυτά μιας άλλης μελέτης σε αρουραίους (επίμυες), όπου ο υποδοχέας δείχθηκε να έχει γενικά ευρεία κατανομή και ειδικά πρότυπα κατανομής σε κάθε κύρια περιοχή του εγκεφάλου, με τα υψηλότερα επίπεδα να εντοπίζονται στον ιππόκαμπο, το διάφραγμα και τη μέση προοπτική περιοχή του υποθαλάμου (Simerly et al., 1990).

3.6 Δράσεις ανδρογόνων

Οι δράσεις των ανδρογόνων μπορεί να διαιρεθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: α) σε εκείνες που αφορούν το γεννητικό σύστημα, συμπεριλαμβανομένης της σπερματογένεσης και, β) σε εκείνες που αφορούν τα περιφερικά όργανα-στόχους (οστά, μυϊκό σύστημα, λάρυγγας, καρδιαγγειακό σύστημα, λιπώδης ιστός, δέρμα, αιμοποιητικό σύστημα, κεντρικό νευρικό σύστημα).

α) Γεννητικό σύστημα

Μεταξύ της έβδομης και της όγδοης εμβρυϊκής εβδομάδας στα ανθρώπινα έμβρυα αρχίζει η έκκριση της T από τα εμβρυϊκά κύτταρα Leydig, η οποία είναι απαραίτητη:

(i) για τη διαφοροποίηση των πόρων του Wolff προς έσω γεννητικά όργανα άρρενος (επιδιδυμίδα, σπερματικός πόρος, σπερματοδόχες κύστεις) και

(ii) για τη διαφοροποίηση των έξω γεννητικών οργάνων του εμβρύου προς την κατεύθυνση του άρρενος (όσχεο, πέος, σθηραγγώδης μοίρα της ουρήθρας, προστάτης).

Η διαφοροποίηση των έξω γεννητικών οργάνων επιτυγχάνεται από τη DHT και όχι από την T. Έτσι, η απουσία δράσης της T και της DHT κατά την εμβρυϊκή ζωή έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση άρρενος ψευδεμφροδιτισμού.

Στην ήβη, η DHT είναι απαραίτητη για την αύξηση του μεγέθους του πέους, για την αύξηση της μελάγχρωσης και της ρυτίδωσης του οσχέου και για την ανάπτυξη του προστάτη και τη διέγερση εκκρίσεών του. Η T προκαλεί μεγέθυνση των σπερματοδόχων κύστεων και διεγείρει τις εκκρίσεις τους. Τέλος, οι υψηλές συγκεντρώσεις της ενδοορχικής T (400-600mg/gr ιστού) και της DHT, που παράγεται τοπικά, παίζουν σημαντικό ρόλο σε όλα τα στάδια της σπερματογένεσης, της φυσιολογικής ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων, της μεταφοράς τους και της γονιμοποιητικής τους ικανότητας.

β) Σκελετός

Τα ανδρογόνα επηρεάζουν τα οστά, επιδρώντας και στην οστεοβλαστική και στην οστεοκλαστική δραστηριότητα. Κατά την εφηβεία, επιδρούν αρχικά στο φλοιώδες και στο δοκιδώδες οστόν, διεγείροντας τη ραγδαία αύξησή του, έτσι ώστε η αύξηση των επιπέδων της T να ακολουθείται από αύξηση των επιπέδων της αλκαλικής φωσφατάσης και της οστικής μάζας. Προς το τέλος της εφηβείας, η T διακόπτει τη γραμμική αύξηση του σώματος, δεδομένου ότι προκαλεί σύγκλειση των επιφύσεων των μακρών οστών. Τα ανδρογόνα ασκούν τις παραπάνω δράσεις τους στα οστά είτε άμεσα, μέσω των ανδρογονικών υποδοχέων, ή έμμεσα, μέσω της ενίσχυσης της έκκρισης και της δράσης της αυξητικής ορμόνης, καθώς και ύστερα από την αρωματοποίησή τους σε οιστραδιόλη, η οποία δρα στους οιστρογονικούς υποδοχείς των οστών.

γ) Μυϊκός ιστός

Η T ασκεί αναβολική δράση στο μυϊκό ιστό, όπως προκύπτει από μελέτες σε

υπογοναδικούς άνδρες, στους οποίους, ύστερα από εξωγενή χορήγηση T, παρατηρήθηκε αύξηση της μυϊκής μάζας και βελτίωση της μυϊκής ισχύος. Σε επίπεδο μυϊκής ίνας, η T διεγείρει τη σύνθεση πρωτεϊνών, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση της διαμέτρου της. Η δράση αυτή φαίνεται να ασκείται έμμεσα, μέσω διέγερσης της έκφρασης του IGF-1 και καταστολής της έκφρασης της συνδετικής πρωτεΐνης-4 του IGF-1 (IGF-1 BP4). Τέλος, υπάρχουν μελέτες που στηρίζουν την άποψη ότι η T ενδέχεται να δρα ευοδωτικά στο επίπεδο της νευρομυϊκής σύναψης.

δ) Λιπιδαιμικό προφίλ

Τα ανδρογόνα φαίνεται ότι ελαττώνουν τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) ενώ αυξάνουν τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL), καθώς και τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στον ορό.

ε) Λιπώδης ιστός

Η T αποτελεί βασικό ορμονικό παράγοντα, που ρυθμίζει την ποσότητα, την κατανομή και τη μεταβολική δραστηριότητα του λιπώδη ιστού. Συγκεκριμένα, ύστερα από την αύξηση των επιπέδων της T στα έφηβα αγόρια, παρατηρείται σχετική ελάττωση του λιπώδη ιστού, καθώς αυξάνει η ελεύθερη λίπους μάζα, ενώ το ολικό ποσό του λίπους παραμένει σταθερό. Ακόμη, η T είναι υπεύθυνη για την ελάττωση του υποδόριου λίπους στα άκρα και τη σταδιακή εναπόθεση λίπους στην περιοχή της κοιλιάς (κεντρική παχυσαρκία). Ωστόσο, από διάφορες μελέτες, η παχυσαρκία κεντρικού τύπου φαίνεται να σχετίζεται και με χαμηλότερα του φυσιολογικού επίπεδα T στον ορό. Μία επιπλέον δράση της T στο λιπώδη ιστό, η οποία αναγνωρίστηκε την τελευταία δεκαετία, αφορά στη ρύθμιση της έκκρισης της λεπτίνης από το λιποκύτταρο. Έτσι, τα επίπεδα της λεπτίνης βρίσκονται σε αρνητική συσχέτιση με εκείνα των ανδρογόνων και οι άνδρες εμφανίζουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις λεπτίνης στο πλάσμα σε σχέση με τις γυναίκες, σε όλα τα στάδια της ζωής (φυλετικός διμορφισμός).

στ) Δέρμα

Η T, ύστερα από τη μετατροπή της σε DHT υπό την επίδραση της 5α-αναγωγάσης, ασκεί τη δράση της στις ανδρογονοεξαρτώμενες δομές του δέρματος, δηλαδή στους θυλάκους των τριχών, στους σμηγματογόνους αδένες και στους αποκρινείς αδένες. Έτσι, οι αυξημένες συγκεντρώσεις ανδρογόνων στα αγόρια κατά την εφηβεία

διεγείρουν τους θυλάκους των τριχών στις ανδρογονοεξαρτώμενες περιοχές του δέρματος, με αποτέλεσμα την εμφάνιση τρίχωσης στο γένειο, στο εφηβείο, στις μασχάλες και στα άκρα. Παράλληλα, διογκώνονται οι σμηγματογόνοι αδένες και αρχίζει η παραγωγή σμήγματος, ενώ διεγείρονται και οι εκκρίσεις των αποκρινών ιδρωτοποιών αδένων του περινέου και της μασχάλης. Οι δράσεις αυτές κατά την εφηβεία οδηγούν στην εμφάνιση λιπαρότητας του δέρματος, ακμής, σμηγματόρροιας και χαρακτηριστικής οσμής της μασχάλης και των γεννητικών οργάνων.

ζ) Λάρυγγας

Η Τ ασκεί ιδιαίτερη δράση στα ανατομικά στοιχεία του λάρυγγα, μεγεθύνοντάς τον και αυξάνοντας το πάχος των φωνητικών χορδών, με αποτέλεσμα το χαρακτηριστικό ανδρικό βράγχος της φωνής.

η) Αιμοποιητικό σύστημα

Τα ανδρογόνα αυξάνουν τον αριθμό και τη μάζα των ερυθρών αιμοσφαιρίων, μέσω δύο μηχανισμών:

- (i) διεγείρουν τη σύνθεση της ερυθροποιητίνης στο νεφρό και
- (ii) επιδρούν άμεσα στους ερυθροβλάστες του μυελού των οστών, αυξάνοντας την παραγωγή τους.

Επιπλέον, τα ανδρογόνα επηρεάζουν την αιμοστατική λειτουργία του οργανισμού με διάφορους τρόπους. Συγκεκριμένα, φαίνεται να αυξάνουν τη συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων, ευνοώντας τη θρομβογένεση, ενώ αντίθετα, αυξάνουν τη σύνθεση της αντιθρομβίνης III και της πρωτεΐνης C και ελαττώνουν τα επίπεδα ινωδογόνου και του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1 (PAI-1), με αποτέλεσμα να ενισχύουν τις αντιπηκτικές ιδιότητες του αίματος και την ινωδόλυση.

θ) Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

Η αναστολή της έκκρισης των γοναδοτροπινών και της GnRH, μέσω μηχανισμού παλίνδρομης ρύθμισης, οφείλεται κυρίως στην άμεση δράση της Τ, καθώς ο εγκέφαλος δεν μπορεί να παράγει DHT. Ωστόσο, η κυκλοφορούσα στο αίμα DHT, καθώς και η παραγόμενη στον υποθάλαμο E2, συμμετέχουν, σε ορισμένο βαθμό, στις δράσεις της Τ, ασκώντας αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση στον άξονα υποθάλαμος υπόφυση-όρχεις. Επίσης, η αύξηση της σεξουαλικής διάθεσης (libido), η ικανότητα διατήρησης της στύσης και η επιθετική συμπεριφορά, πιστεύεται ότι οφείλονται στις

δράσεις των ανδρογόνων στον εγκέφαλο.

Από όλες τις συμπεριφορικές παραμέτρους, το άγχος (νευρικότητα) φαίνεται να είναι το πιο ευαίσθητο στην τεστοστερόνη. Σε αρσενικά ποντίκια η τεστοστερόνη-είτε εξωγενής είτε ενδογενής- μειώνει το άγχος στη δοκιμασία υπερυψωμένου λαβύρινθο σχήματος σταυρού (elevated plus maze) (Aikey et al., 2002). Επίσης αυτή η αγχολυτική επίδραση της τεστοστερόνης είναι εξαρτώμενη από τη δόση και πολύ πιθανώς μεσολαβούμενη από την 5-α ρεδοουκτάση (αναγωγή) η οποία ανάγει την τεστοστερόνη σε DHT. Παρόμοιες αγχολυτικές επιδράσεις έχουν παρατηρηθεί μετά από μεμονωμένη χορήγηση τεστοστερόνης σε υγιείς γυναίκες με τελικό αποτέλεσμα μειωμένο φόβο (VanHonk et al., 2005).

Αν και η καταθλιπτική διαταραχή είναι πιο διαδεδομένη στις γυναίκες (Bebbington, 1996), ο επιπολασμός της κατάθλιψης στους άνδρες αυξάνεται με την ηλικία (Khera, 2013) καθώς μειώνεται η τεστοστερόνη του πλάσματος. Η τεστοστερόνη βέβαια δεν είναι ο μόνος παράγοντας. Σε καταθλιπτικές διαταραχές με μειωμένη λίμπιντο και χαμηλή τεστοστερόνη, η θεραπεία υποκατάστασης ανδρογόνων ήταν τουλάχιστον εξίσου αποτελεσματική με τους μεταφορείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (Kranz et al., 2015). Πιθανόν, η τεστοστερόνη να ρυθμίζει τη σεροτονινεργική μετάδοση, όπου η σεροτονίνη διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη της κατάθλιψης (Jovanovic et al., 2015).

Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων σε διάφορους τύπους μνήμης: οι γυναίκες έχουν καλύτερη προφορική/λεκτική μνήμη, ενώ οι άντρες έχουν ένα πλεονέκτημα στην οπτική χωρική μνήμη (Lewin et al., 2001). Ειδικά η διαφορά στην χωρική μνήμη έχει μελετηθεί λεπτομερώς (Shah et al., 2013). Σε μια μετα-ανάλυση των πειραμάτων σε ζώα χρησιμοποιώντας λαβυρίνθους και λαβυρίνθους νερού, επιβεβαιώθηκε ότι τα αρσενικά έχουν καλύτερη απόδοση από τα θηλυκά σε έργα και δοκιμασίες χωρικής μνήμης (Jonasson, 2005). Η θετική επίδραση της τεστοστερόνης πάνω στην μνήμη είναι, ωστόσο, καλά τεκμηριωμένη και στα δύο φύλα. Πάρα πολλές κλινικές μελέτες σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και άνδρες στην ανδρόπαυση (υπογοναδισμό) έδειξαν βελτιώσεις στην εκμάθηση και τη μνήμη μετά από τη παροχή συμπληρώματος τεστοστερόνης. Ακόμη και μια σύντομη θεραπεία τεστοστερόνης διάρκειας 6 εβδομάδων, είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της χωρικής και προφορικής μνήμης των ηλικιωμένων ανδρών (Cherrier et al., 2001). Η τεστοστερόνη έδειξε ακόμη και μια θετική επίδραση στη χωρική και προφορική μνήμη σε ασθενείς με νόσο του

Alzheimer (Cherrier et al., 2005). Στις νεαρές γυναίκες, μία εφάπαξ δόση τεστοστερόνης βελτίωσε τη χωρική μνήμη (Postma et al., 2000). Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης είναι ασαφής, καθώς η τεστοστερόνη θεωρείται πλέον πρόδρομος και όχι η τελική ορμόνη. Επιπρόσθετα, μία μελέτη έδειξε ότι η τεστοστερόνη ευνοεί τη στρατολόγηση αστροκυττάρων και την αυθόρμητη, μεσολαβούμενη από ολιγοδενδροκύτταρα, επαναμυελίνωση (Bielecki et al., 2016).

4.Οιστρογόνα

Η βιοσύνθεση των οιστρογόνων αρχίζει στα κύτταρα του ωοθυλακίου, με τη σύνθεση ανδροστενοδιόνης από χοληστερόλη. Η ανδροστενοδιόνη είναι μία ορμόνη με μέτρια ανδρογενή δραστηριότητα. Αυτή περνά τον βασικό υμένα και μπαίνει στα κύτταρα της κοκκιώδους στοιβάδας της ωοθήκης, όπου μετατρέπεται σε οιστρόνη και οιστραδιόλη, είτε κατ'ευθείαν είτε μέσω τεστοστερόνης. Το υπεύθυνο ένζυμο για αυτή την μετατροπή είναι η αρωματάση. Παράλληλα η χοληστερόλη μετατρέπεται σε πρεγνενολόνη και αυτή σε προγεστερόνη. Στη συνέχεια η προγεστερόνη σχηματίζει ανδρογόνα και με αρωματοποίηση των ανδρογόνων σχηματίζονται τα οιστρογόνα. Συνεπώς, κατά τον σχηματισμό των οιστρογόνων μπορούν να παραχθούν προγεστερόνη και τεστοστερόνη.

Στις γυναίκες , έχουμε τρία κύρια φυσικά οιστρογόνα:

1. Η 17β-Οιστραδιόλη(E2), το κύριο και πλέον δραστικό οιστρογόνο της γυναίκας από την αρχή της εμμήνου ρύσεως μέχρι την εμμηνόπαυση. Δρα στο ενδομήτριο.
2. Η Οιστρόνη (E1), η οποία κυριαρχεί μετά την εμμηνόπαυση. Είναι βιολογικά κατά πολύ ασθενέστερη σε δραστικότητα σε σχέση με την E2. Δρα μαζί της έντονα στο ενδομήτριο.
3. Η Οιστριόλη (E3), η οποία κυριαρχεί κατά την κύηση παραγόμενη από τον πλακούντα, φροντίζοντας για την καλή εξέλιξη της κύησης. Αποτελεί ενδιάμεση ορμόνη κατά τη σύνθεση και μεταβολισμό των στεροειδών. Στην υπόλοιπη ζωή της γυναίκας, είναι βιολογικά αδύναμο οιστρογόνο και παράλληλα δεν μετατρέπεται σε

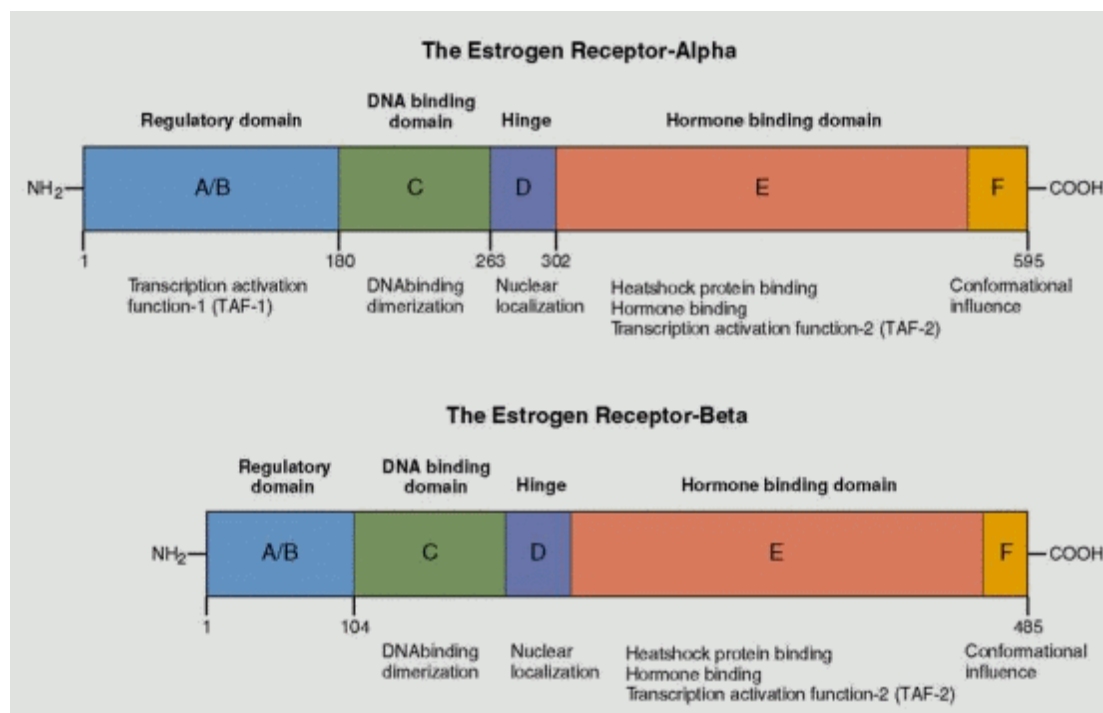
17β-Οιστραδιόλη(E2) που είναι βιολογικά δραστική. Δρα ωστόσο διεγερτικά, σε μεγάλο βαθμό, στον τράχηλο, τον κόλπο και το αιδοίο κατά την κύηση και έχει καρκινοπροστατευτική δράση στο μαστό.

Τα οιστρογόνα παράγεται κυρίως από τα πρωτογενή ωοθυλάκια κατά την διάρκεια της ωρίμανσης τους, το ωχρο σωματίο, και τον πλακούντα. Η ωοθυλακιότροπος ορμόνη (FSH) και η ωχρινότροπος ορμόνη (LH) διεγείρουν την παραγωγή οιστρογόνου στις ωοθήκες. Σε μικρότερες ποσότητες, οιστρογόνο παράγεται σε ιστούς όπως το ήπαρ, τα επινεφρίδια και ο μαστός. Αυτές οι δευτερεύουσες πηγές οιστρογόνου είναι ειδικά σημαντικές σε γυναίκες που έχουν περάσει την εμμηνόπαυση. Στην αρχή του κύκλου ο οργανισμός (συγκεκριμένα η αδενούποφυση) παράγει την FSH, που είναι η κύρια ορμόνη που εμπλέκεται στην παραγωγή των ώριμων ωαρίων. Η FSH διεγείρει τα ωοθυλάκια, ώστε να ξεκινήσουν την παραγωγή οιστρογόνων. Το επίπεδο των οιστρογόνων στον οργανισμό αυξάνεται και τελικά προκαλεί την ταχεία αύξηση της LH. Η ωχρινότροπος ορμόνη LH παρέχει στο ωάριο την τελική ώθηση που χρειάζεται για να ωριμάσει πλήρως και να απελευθερωθεί από το ωοθυλάκιο. Σε περίπτωση που δεν γονιμοποιηθεί το ωάριο, τα επίπεδα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης μειώνονται, επειδή δεν είναι πλέον απαραίτητα. Η ταυτόχρονη δράση της ωοθυλακιότροπου ορμόνης FSH και της ωχρινότροπου ορμόνης LH στην ωοθήκη έχει ως αποτέλεσμα την ωοθυλακιόρρηξη. Η LH μετατρέπει το ώριμο ωοθυλάκιο σε ωχρο σωματίο όπου εκεί παράγονται τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη.

4.1 Υποδοχείς Οιστρογόνων (ERα και ERβ)

Όπως και τα ανδρογόνα, έτσι και τα οιστρογόνα δρουν μέσω ειδικών πρωτεϊνικών υποδοχέων, των **ERs (Estrogen Receptors)**. Οι ERs διακρίνονται σε δύο κύριες μορφές, ERα και ERβ, οι οποίοι έχουν διακριτά πρότυπα έκφρασης στους ιστούς, τόσο στους ανθρώπους όσο και στα τρωκτικά. Επιπλέον, γονιδιακά τροποποιημένα ζωικά μοντέλα στα οποία απουσιάζουν αυτοί οι υποδοχείς δίνουν διακριτούς φαινοτύπους και παρέχουν κάποια από τα πλέον καθοριστικά πειραματικά μοντέλα για την αξιολόγηση του ρόλου του ER σε ασθένειες αλλά και την κανονική φυσιολογία. Οι ERα και ERβ υποδοχείς κωδικοποιούνται από ξεχωριστά γονίδια, *ESR1* και *ESR2*, που βρίσκονται σε διαφορετικές χρωμοσωμικές θέσεις, χρωμόσωμα

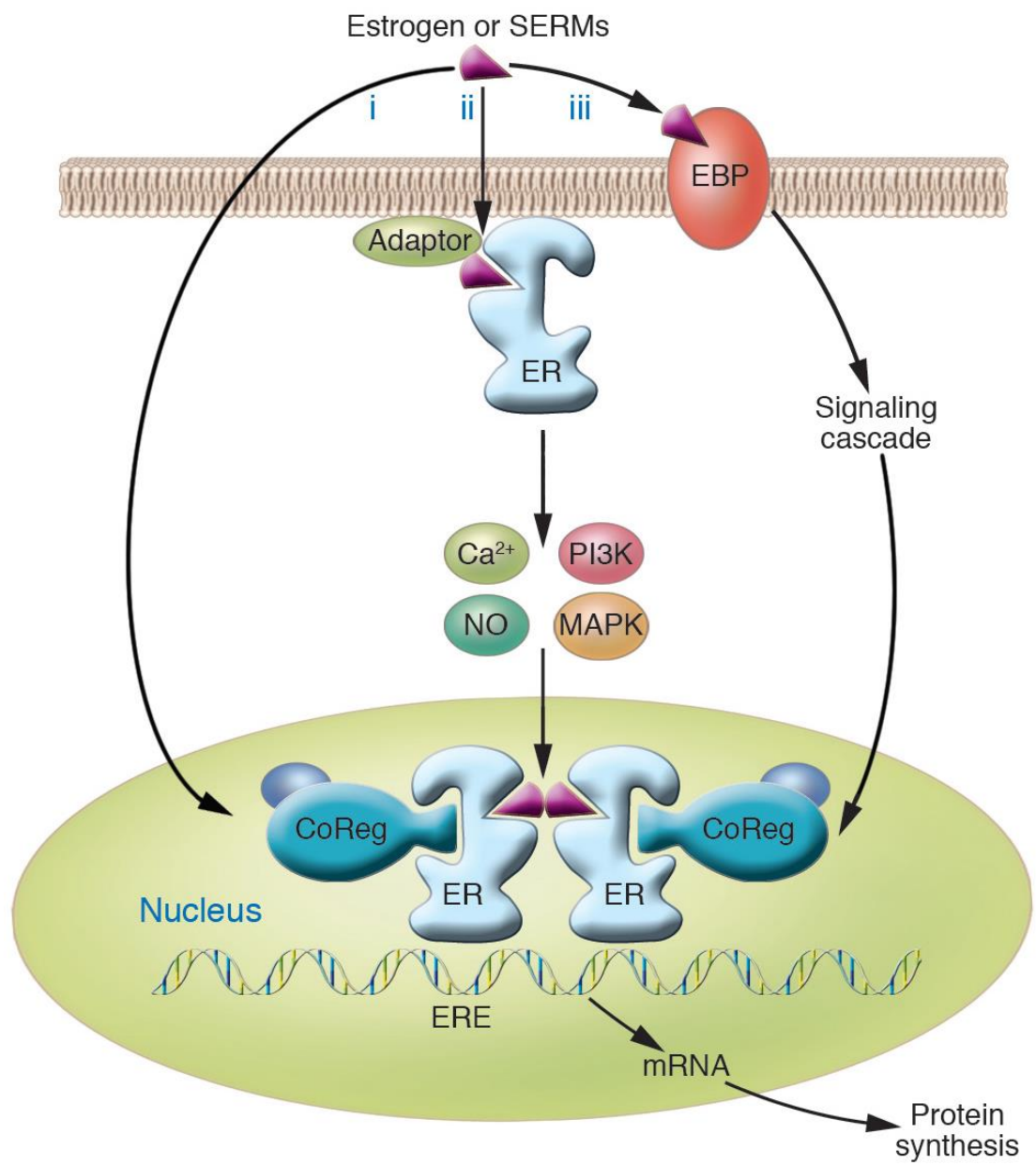
6 (6q25.1) και 14 (14q) αντιστοίχως, και υπάρχουν πολυάριθμες παραλλαγές εναλλακτικού ματίσματος και για τους δύο, τόσο στον ασθενή όσο και στον φυσιολογικό ιστό αν και τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά προϊόντα ήταν δύσκολο να ταυτοποιηθούν. Επειδή αυτές οι παραλλαγές ματίσματος συχνά συνεκφράζονται με τους ομολόγους τους άγριου τύπου (wild type), η ακριβής λειτουργία και ο πιθανός ρόλος αυτών των παραλλαγών στη φυσιολογία και τις ανθρώπινες ασθένειες παραμένουν ασαφείς.



Εικόνα 12 *ER-α* και *ER-β*, mRNA και επικράτειες (<https://obgynkey.com/hormone-biosynthesis-metabolism-and-mechanism-of-action/>)

Τα οιστρογόνα επάγουν κυτταρικές μεταβολές μέσω πολλών διαφορετικών μηχανισμών: Στον "κλασικό" μηχανισμό δράσης, τα λιποδιαλυτά οιστρογόνα διαχέονται μέσα στο κύτταρο και δεσμεύονται σε ER, ο οποίος βρίσκεται στον πυρήνα. Το σύμπλοκο οιστρογόνου-ER δεσμεύεται με τη σειρά του σε αλληλουχίες στοιχείων απόκρισης στα οιστρογόνα (**Estrogen Response Element, ERE**) άμεσα ή έμμεσα μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, όπως για παράδειγμα με την πρωτεΐνη ενεργοποιητή 1 (**Activator Protein 1, AP1**). Τελικό αποτέλεσμα είναι η στρατολόγηση συρρυθμιστικών πρωτεϊνών (συνενεργοποιητές ή συναναστολείς) προς τον υποκινητήτων εμπλεκόμενων γονιδίων, αυξημένα ή μειωμένα επίπεδα mRNA, παραγωγή συσχετιζόμενων πρωτεϊνών και μια φυσιολογική απόκριση. Αυτός ο κλασικός ή "γενωμικός" μηχανισμός συνήθως λειτουργεί σε διάστημα ωρών.

Αντίθετα, το οιστρογόνο μπορεί να δράσει πιο γρήγορα (μέσα σε δευτερόλεπτα ή λεπτά) μέσω "μη γενωμικών" μηχανισμών, είτε μέσω του ER που βρίσκεται μέσα ή παρακείμενα στην πλασματική μεμβράνη ή μέσω άλλων πρωτεϊνών που δεσμεύουν οιστρογόνο και δε σχετίζονται με μεμβρανικούς ERs, με αποτέλεσμα ταχείες κυτταρικές απαντήσεις όπως αυξημένα επίπεδα Ca^{2+} ή $\text{NO}\cdot$ και ενεργοποίηση κινασών. Ο ER ενδεχομένως αποτελεί στόχο στην πλασματική μεμβράνη για πρωτεΐνες προσαρμογείς (adaptor proteins) όπως η caveolin-1 ή η Shc.

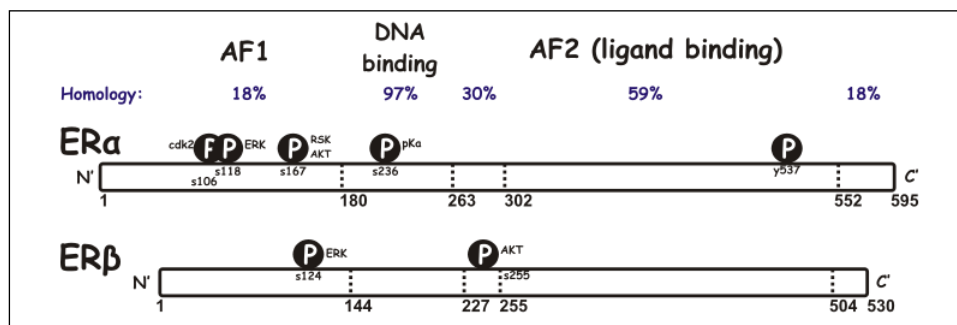


Εικόνα 13 Μοντέλα της δράσης οιστρογόνων. Στην "κλασική" οδό της δράσης οιστρογόνων (i), οιστρογόνο ή άλλοι εκλεκτικοί ρυθμιστές υποδοχέα οιστρογόνου (SERMs) δεσμεύονται στον υποδοχέα οιστρογόνων (ER), έναν μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος ενεργοποιείται με προσδέτη (ligand) που ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων στον πυρήνα με το να προσδένεται σε ρυθμιστικές αλληλουχίες στοιχείου απόκρισης σε οιστρογόνο (Estrogen Response Element, ERE) στα γονίδια-στόχους και στρατολογώντας συρρυθμιστικές (CoRegs) πρωτεΐνες όπως οι συνενεργοποιητές. Οι ταχείες ή "μη-γενωμικές" δράσεις του οιστρογόνου μπορεί επίσης να συμβούν μέσω του ER που βρίσκεται ακριβώς επάνω ή παρακείμενα στη μεμβράνη πλάσματος (ii), η οποία μπορεί να απαιτεί την παρουσία πρωτεϊνών "προσαρμογέων", οι οποίες στοχεύουν τον ER στη μεμβράνη. Η ενεργοποίηση του μεμβρανικού ER οδηγεί σε ραγδαία μεταβολή των κυτταρικών μορίων σηματοδότησης και διέγερση της ενεργότητας κίνησης, η οποία με τη σειρά της μπορεί να επηρεάσει τη μεταγραφή. Τέλος, άλλες πρωτεΐνες δέσμευσης οιστρογόνων (Estrogen Binding Proteins, EBP) που δεν σχετίζονται με μεμβρανικούς ER μπορεί επίσης να προκαλέσουν ενδοκυτταρική απόκριση (iii). (*Deroo and Korach, Estrogen receptors and human disease, 2006*)

Οι οιστρογονικοί υποδοχείς ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των υποδοχέων του κυτταρικού πυρήνα (NR, Nuclear Receptors). Ο υποδοχέας α κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1986, ενώ ο υποδοχέας β ανακαλύφτηκε πιο πρόσφατα, το 1996.

Οι ενεργοποιημένοι οιστρογονικοί υποδοχείς μετά την πρόσδεση της 17 β -οιστραδιόλης, σχηματίζουν διμερή και από τη στιγμή που οι δύο μορφές συνεκφράζονται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, οι υποδοχείς μπορεί να σχηματίσουν ER α ($\alpha\alpha$) ή ER β ($\beta\beta$) ομοδιμερή ή ER $\alpha\beta$ ($\alpha\beta$) ετεροδιμερή. Οι οιστρογονικοί υποδοχείς α και β παρουσιάζουν σημαντική ομολογία της αλληλουχίας τους. Η κεντρική και πλέον συντηρημένη επικράτεια, η επικράτεια δέσμευσης DNA (DBD), είναι που εμπλέκεται στην αναγνώριση και δέσμευση του DNA, ενώ η δέσμευση του προσδέτη (ligand) συμβαίνει στην πολυλειτουργική καρβοξυ-τελική COOH- επικράτεια (LBD). Η NH₂-τελική περιοχή δεν είναι συντηρημένη και αντιπροσωπεύει την πιο μεταβλητή επικράτεια τόσο σε αλληλουχία όσο και σε μήκος. Η μεταγραφική ενεργοποίηση διευκολύνεται από δύο ξεχωριστές λειτουργίες ενεργοποίησης (activation function, AF), τη στοιχειωδώς δραστική AF-1 που βρίσκεται στο NH₂-άκρο του υποδοχέα και την εξαρτώμενη από προσδέτη AF-2 που βρίσκεται στην καρβοξυτελική LBD. Και οι δύο επικράτειες AF προσελκύουν μια σειρά πρωτεϊνικών συμπλόκων συρρυθμιστών στον δεσμευμένο με DNA υποδοχέα. Οι δύο ERs μοιράζονται έναν υψηλό βαθμό ομολογίας στην αλληλουχία τους εκτός

από τις επικράτειες των NH₂- άκρων τους, έχουν παρόμοια συγγένεια με την E2 και δεσμεύουν τα ίδια στοιχεία απόκρισης DNA.



Εικόνα 14 Οι δομικές διαφορές των οιστρογονικών υποδοχέων α και β. (https://en.wikipedia.org/wiki/Estrogen_receptor)

Τουλάχιστον τρεις ERα και πέντε ERβ ισομορφές έχουν ταυτοποιηθεί. Οι ERβ ισομορφές μπορούν να επάγουν τη μεταγραφή όταν σχηματίζεται ένα ετεροδιμερές με τον λειτουργικό ERβ1 υποδοχέα των 59 kDa. Ο ERβ3 υποδοχέας εντοπίστηκε σε υψηλά επίπεδα στους όρχεις. Οι δύο άλλες ERα ισομορφές είναι 36 και 46 kDa. Μόνο στα ψάρια και όχι στους ανθρώπους έχει περιγραφεί ένας ERγ υποδοχέας. Και οι δύο τύποι οιστρογονικών υποδοχέων εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό σε διαφορετικούς τύπους ιστών, ωστόσο υπάρχουν κάποιες εμφανείς διαφορές στην έκφραση τους. Οι ERα εντοπίζονται στο ενδομήτριο, στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, στα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας των ωοθηλακίων και στον υποθάλαμο αλλά και σε άλλες εγκεφαλικές περιοχές. Η έκφραση της ERβ πρωτεΐνης εντοπίζεται στους νεφρούς, στον εγκέφαλο, στα οστά, στην καρδιά, στους πνεύμονες, στον προστάτη και στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Οι οιστρογονικοί υποδοχείς θεωρούνται ως κυτταροπλασματικοί όταν δεν έχει προσδεθεί η κατάλληλη ορμόνη, αλλά έρευνες έχουν δείξει ότι ένα ποσοστό των υποδοχέων αυτών εντοπίζεται στον πυρήνα. Διαφορετικοί προσδέτες ίσως να διαφέρουν στη συνάφεια τους για τις άλφα και βήτα ισομορφές του οιστρογονικού υποδοχέα. Επιπλέον, οι δομικές τους διαφορές συμβάλλουν στην ικανότητα τους να συνδέονται με διαφορετικούς συνδέτες και να εξασφαλίζουν την κυτταρική τους εξειδίκευση. Οι δύο τύποι υποδοχέων παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα στην περιοχή του υποδοχέα που συνδέεται με το DNA αλλά δε συμβαίνει το ίδιο με την περιοχή που συνδέεται με το υπόστρωμα. Μόνο το 55% των αμινοξέων της περιοχής αυτής είναι κοινό στις δύο κατηγορίες υποδοχέων.

- Η 17-β-οιστραδιόλη προσδένεται εξ ίσου καλά και στους δύο τύπους υποδοχέων.
- Η οιστρόνη προσδένεται κατά προτίμηση στον α υποδοχέα.
- Η οιστριόλη στον β υποδοχέα.

Ο όρος εκλεκτικοί διαμορφωτές των οιστρογονικών υποδοχέων (**Selective estrogen receptor modulators, SERMs**) χρησιμοποιείται για να περιγράψει ουσίες μη στεροειδείς, οι οποίες ανταγωνίζονται τη δράση των οιστρογόνων σε ορισμένους ιστούς και τη μιμούνται σε κάποιους άλλους. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η ταμοξιφαίνη μια φαρμακευτική ουσία που ανταγωνίζεται τη δράση των οιστρογόνων στο μαστό, αλλά τη μιμείται στο ενδομήτριο. Μία άλλη ουσία, η ραλοξιφαίνη εμφανίζει παρόμοια με των οιστρογόνων δράση στα οστά και τα επίπεδα των λιπιδίων του ορού, όχι όμως στον μαστό και το ενδομήτριο. Τέτοιες δράσεις είναι επιθυμητές μετά την εμμηνόπαυση, για τη διατήρηση της οστικής πυκνότητας και την καλή λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος.

4.2 Κατανομή υποδοχέων οιστρογόνων στον εγκέφαλο

Με πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε ενήλικες ποντικούς (Mitra et al., 2003), η κατανομή των ERs στον εγκέφαλο βρέθηκε να έχει ως εξής:

	ER α	ER β		ER α	ER β
FOREBRAIN			Rhomboid nu	–	+
Olfactory bulb			Habenular nu	–/+	+
External plexiform layer	–	Fibers	Precommissural nu	+	–/+
Glomerular layer	–	+	Pretectal nu	+	–
Granule layer	–/+	+	Lateral posterior thalamic nu	+	–
Islands of Calleja	++	–	Zona incerta	+	–
Cortex			Subincertal nu	+	–/+
Allocortex			Preoptic area		
Piriform	–	+	Anterovent periventricular nu	++	+
Dorsal endopiriform nu	–	+	Lateral preoptic area	+	–/+
Isocortex			Medial preoptic area	++	–/+
Agranular insular	–/+	+	Magnocellular preoptic area	–/+	++
Cingulate	–	–/+	Medial preoptic nu	+++	+
Dorsal peduncular	–	–/+	Hypothalamus		
Granular insular	–/+	+	Anterior commissural nu	–/+	–
Infra-limbic	–/+	+	Anterior hypothalamic area	+	–/+
Prelimbic	–	+	Arcuate nu	+++	+
Motor	–	–/+	Dorsomedial nu	++	++
Somatosensory	–/+	–/+	Lateral hypothalamic area	+	–/+
Perirhinal	–/+	+	Medial tuberal nu	+	++
Retrosplenial agranular	–	–/+	Paraventricular hypothalamic nu		
Retrosplenial granular	–	–/+	Magnocellular divisions	+	++
Visual	–	–/+	Parvicellular divisions	+	++
Dorsal tenia tecta	–/+	++	Periventricular hypothalamic nu	++	+
Clastrum	–	++	Posterior hypothalamic area	+	+
Striatum			Subthalamic nu	–	–/+
Caudate putamen	+	–/+	Suprachiasmatic nu	–	–/+
Lateral striatal stripe	–	+	Supraoptic nu	–/+	–/+
Globus pallidus	–	++	Tuber cinereum area	+	+
Septal complex			Ventromedial hypothalamic nu		
Lateral nu	++	–	Dorsomedial	–/+	–
Medial nu	–	+	Central	++	–
Septohippocampal nu	++	+	Ventrolateral	+++	+
Diagonal band of Broca			Lateral mammillary nu	+	–
Horiz limb diagonal band	–/+	+++	Medial mammillary nu	–/+	+
Vert limb diagonal band	–/+	+++	Supramammillary nu	+	++
Accumbens nu			Ventral tuberomammillary nu	+	+
Shell	–/+	–	MIDBRAIN/PONS		
Core	+	–/+	Deep mesencephalic nu	+	–/+
Ventral pallidum	+	–/+	Dorsal terminal nu	+	+
Subfornical organ	+	–	Edinger-Westphal nu	–	+
Hippocampal formation–dorsal			Interfascicular nu	+	–/+
CA1	+	Fibers	Interpeduncular nu	–/+	–/+
CA2	–/+	–	Suprageniculate thalamic nu	–/+	–
CA3	+	–/+	Substantia nigra (caudal)		
Stratum lucidum	+	Fibers	Compact	+	++
Dentate gyrus hilus	+	–/+	Lateral	–/+	+
Subiculum	–	+	Reticular	–	+++
Hippocampal formation–ventral			Ventral tegmental area	–	+++
CA1–CA3	++	–/+	Nu brachium inferior colliculus	–/+	–
Entorhinal cortex	–/+	+	Parabrachial pigmented nu	–	+
Internal capsule	–	+	Subbrachial nu	+	+
Bed nucleus of the stria terminalis	+++	+++	Periaqueductal gray	+++	–/+
Interstitial nu post limb ant commissure	+	–	Dorsal medial	++	Fibers
Olfactory tubercle	+	–	Superior colliculus	–/+	–
Substantia innominata	+	+	Inferior colliculus (external ctx, 2)	+	–
Amygdala			Raphe nuclei		
Anterior amygdaloid area	+	+	Rostral linear	–	+
Amygdalohippocampal nu	++	+	Caudal linear	+	++
Basolateral nu	–/+	+	Median/paramedian	+	++
Basomedial nu	+	+	Dorsal raphe	+	+++
Cortical amygdaloid nu	+	–/+	B9 serotonin cells	–/+	+
Central nu	+	–/+	Pontine nuclei	–	+
Medial nu	+++	+++	Pontine reticular nu		
Thalamus			Oral	–/+	+
Anterodorsal nu	–	+	Caudal	–/+	–/+
Mediodorsal nu	–	+	Intercollicular nu	–	–
Central medial nu	–	+	Paralemniscal nu	–	+
Paraventricular nu	–	++			

	ER α	ER β
Lateral lemniscus		
Intermed nu	–	+
Ventral nu	–	–/+
Parabigeminal nu	–/+	+
Laterodorsal tegmental nu	–/+	+
Pedunculopontine tegmental nu	–/+	++
Reticulotegmental nu pons	–	+
Anterior tegmental nu	–	+
Superior Olive		
Medioventral periolivary nu	–	+
Rostral periolivary region	+	–/+
Dorsal periolivary region	–	+
Superior paraolivary nu	–	+
Caudal periolivary nu	–/+	–/+
Nu of trapezoid body	+	–/+
Locus coeruleus	+	+++
Subcoeruleus nu	–/+	+
Parabrachial		
Medial nu	+	–
Lateral nu	++	+
Sensory root trigeminal nerve	–	+
Spinal trigeminal tract	–	+
Medial vestibular nu	–	–/+
Lateral vestibular nu	–	–/+
HINDBRAIN/CEREBELLUM		
Raphe nuclei		
Magnus	–	++
Pallidus	–	++
Obscurus	–	+
Middle cerebellar peduncle	–	+
Cerebellum	–	+
Posterodorsal tegmental nu	+	+
Supratrigeminal nucleus	+	–/+
Facial nerve	–	+
Facial 7 nu	–	Cytoplasmic
Parapyramidal nu	+	+
Intermediate reticular nu	–/+	–/+
Gigantocellular reticular nu, alpha	–	+
Gigantocellular reticular nu	+	–
Lateral reticular nu	+	+
Paragigantocellular reticular nu	+	–
Rostroventrolateral reticular nu	+	+
Nu ambiguous	–	–/+
Prepositus nu	–/+	–/+
Nu solitary tract	++	–
Area postrema	+	Fibers
Inferior olive, principal nu	–	+
Dorsal motor 10 nu of vagus	–/+	++
Spinal 5 nu, oral	–/+	+
Dorsomedial spinal 5 nu	+	–
Spinal 5 nu	+	–

nu, Nucleus.

Πίνακας 1 Κατανομή ανοσοδραστικότητας των ER α και ER β σε εγκέφαλο ενήλικου ποντικού, Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha (Mitra et al., 2003)

Με εξαίρεση τον εγκεφαλικό φλοιό, δεν φαίνονται διακυμάνσεις στην κατανομή των δύο ERs, με τον α να είναι γενικά περισσότερο διαδεδομένος σε σχέση με τον β . Επίσης, δεν παρατηρήθηκε διαφορά σε σχέση με το φύλο.

4.3 Δράσεις Οιστρογόνων στον εγκέφαλο

Το ποσό των οιστρογόνων που συντίθεται στον εγκέφαλο είναι μικρό σε σχέση με αυτό που συντίθεται σε άλλους ιστούς. Παρόλα αυτά, πιστεύεται ότι τα οιστρογόνα που παράγονται στο όργανο αυτό εκδηλώνουν σπουδαίες δράσεις. Ένα παράδειγμα είναι η συνεργιστική τους δράση με τις νευροτροφίνες, η οποία εκδηλώνεται με την αμοιβαία ρύθμιση των υποδοχέων τους και τα συζευγμένα μονοπάτια επικοινωνίας. Με την πάροδο της ηλικίας, τα οιστρογόνα πιστεύεται ότι έχουν νευροπροστατευτική δράση. Σε εγκεφαλικό ιστό από ενήλικους αρουραίους τα οιστρογόνα επάγουν την αναδόμηση των δενδριτών και των συνάψεων και προκαλούν ενεργοποίηση των νευρογλοιακών κυττάρων. Σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων νευροβλαστώματος, τα οιστρογόνα παρουσιάζουν νευροπροστατευτική δράση και μειώνουν την παραγωγή των πεπτιδίων β-αμυλοειδούς. Υπάρχουν επιδημιολογικά δεδομένα που υποδεικνύουν ότι η πτώση στα επίπεδα των οιστρογόνων, η οποία σημειώνεται μετά την εμμηνόπαυση, σχετίζεται με έκπτωση της γνωσιακής λειτουργίας και με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου Alzheimer. Σε μία τυχαιοποιημένη μελέτη, ωστόσο, η εξωγενής χορήγηση οιστρογόνων δεν είχε καμία ευεργετική επίδραση σε γυναίκες με νόσο Alzheimer.

Οι μητρικές συμπεριφορές απαιτούν επαναλαμβανόμενους κύκλους σχετικά σύνθετων δραστηριοτήτων: τη δημιουργία φωλιών, την εύρεση και αναγνώριση των νεογνών, την ανάκτηση των νεογνών στη φωλιά, το γλύψιμο, τη φροντίδα και τη νοσηλεία. Η μητέρα πρέπει να προσελκύεται από τα νεογνά της, μειώνοντας ταυτόχρονα τον φόβο της για τα νεογνά. Τα ορμονικά συμβάντα που επιτρέπουν την εκδήλωση μητρικής συμπεριφοράς σε αρουραίους περιλαμβάνουν τα αυξανόμενα επίπεδα πλακουντιακών γαλακτογόνων, υποφυσιακής προλακτίνης και της E2, που υπερτίθενται σε μια απότομη πτώση της προγεστερόνης, τα οποία συμβαίνουν όλα προς το τέλος της 22ης ημέρας εγκυμοσύνης. Σε σχέση με την εμπλοκή των ERs, η E2 που εμφυτεύεται απευθείας στη μέση προοπτική περιοχή (medial preoptic area, MPOA) διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό τη μητρική συμπεριφορά σε αρουραίους και η απόδοση των μητρικών συμπεριφορών από θηλυκούς ποντικούς εξαρτάται από την έκφραση του γονιδίου ERα στη MPOA. Έτσι, μπορούμε να πούμε ότι τα οιστρογόνα που κυκλοφορούν κατά τα τελευταία στάδια της εγκυμοσύνης εισέρχονται σε προοπτικούς νευρώνες οι οποίοι είναι οι ίδιοι απαραίτητοι για τις μητρικές

συμπεριφορές, δεσμεύονται με ERα και στη συνέχεια μέσω ποικίλων μηχανισμών επιτρέπουν τη συμπεριφορά της μητέρας να συμβεί (Pfaff et al., 2011).

Με βάση νευροενδοκρινικές και συμπεριφορικές μελέτες, τρεις τύποι αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις δύο κατηγορίες των οιστρογονικών υποδοχέων έχουν περιγραφεί. Η πρώτη σχέση είναι **ανταγωνιστική** και αυτό είναι προφανές από έρευνες σχετικά με τον ρόλο των οιστρογόνων στη χωρική μάθηση. Όταν οιστραδιόλη χορηγείται σε υψηλή, χρόνια δόση προκαλεί εξασθένηση της χωρικής μάθησης. Αυτή η δράση της οιστραδιόλης απαιτεί την ύπαρξη των οιστρογονικών υποδοχέων ERα, και όταν οι ERβ δεν είναι λειτουργικοί χαμηλότερες δόσεις οιστραδιόλης έχουν επίσης αυτήν την αρνητική επίδραση. Η δεύτερη σχέση είναι **συνεργιστική**, και αυτό φαίνεται από τις συνδιασμένες δράσεις των δύο τύπων υποδοχέων στην παραγωγή του νευροπεπτιδίου της ωκυτοκίνης και του υποδοχέα της. Συγκεκριμένα οι ERβ μεσολαβούν στην αύξηση της παραγωγής ωκυτοκίνης και οι ERα μεσολαβούν στην αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα της. Τέλος, η τρίτη σχέση είναι **διαδοχική** και συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Ξεχωριστές δράσεις των δύο υποδοχέων συνεπάγονται την ενεργοποίηση φυλετικά διμορφικών αναπαραγωγικών συμπεριφορών (Heldring et al., 2007).

5. Ενδοκρινικοί διαταράκτες

Σύμφωνα με την Αμερικανική Ενδοκρινολογική Εταιρεία: «**Ενδοκρινικός διαταράκτης (Endocrine disrupting chemical, EDC)** είναι ένα εξωγενές χημικό ή ένα μίγμα χημικών που μπορεί να παρέμβει σε οποιοδήποτε στάδιο δράσης των ορμονών». Όπως φανερώνει και το όνομά τους, οι χημικές αυτές ενώσεις, έχουν την ικανότητα να παρεμβαίνουν στη φυσιολογική λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος, διαταράσσοντας τη σύνθεση, έκκριση, μεταφορά, δράση και αποικοδόμηση των ορμονών, γεγονότα που χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλομορφία στη διάρκεια της ζωής (Zoeller et al., 2012). Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες με βάση την ταχύτητα διάσπασής τους και απομάκρυνσής τους από τον οργανισμό και το περιβάλλον:

A) Εμμένοντες EDCs (Persistent EDCs)

Κάποιοι EDCs κατασκευάστηκαν ώστε να έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής, ένα

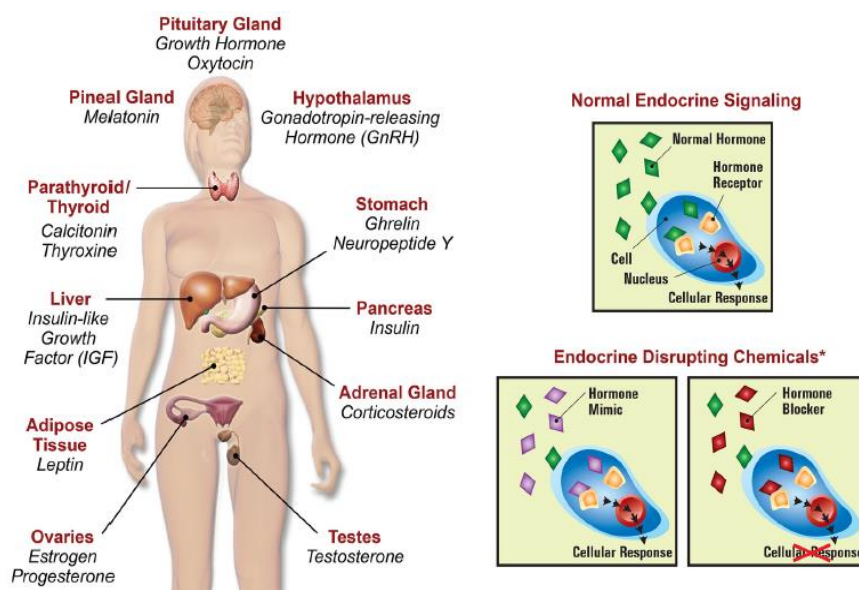
σημαντικό πλεονέκτημα για τη βιομηχανική τους χρήση, αλλά ταυτόχρονα πολύ καταστροφικό για το περιβάλλον. Οι αρνητικές τους επιπτώσεις οφείλονται στο ότι οι ενώσεις αυτές δε μεταβολίζονται εύκολα και, στην περίπτωση που μεταβολιστούν, τα παράγωγα που προκύπτουν μπορεί να είναι ακόμη πιο τοξικά από τη μητρική ένωση (Bergman et al., 2012). Λόγω αυτού, πολλά από τα EDCs που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία εντοπίζονται στο περιβάλλον σε μεγάλες ποσότητες, σε οικοσυστήματα πολύ μακριά από τον τόπο παραγωγής και χρήσης τους, ακόμα και πολλά χρόνια μετά την απαγόρευσή τους (Porte et al., 2006; Calafat et al., 2007). Ένα παράδειγμα αποτελούν τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) που χρησιμοποιούνταν εκτεταμένα μέχρι και τη δεκαετία του '70 οπότε και απαγορεύτηκε η χρήση τους. Λόγω της φύσης τους, παρουσιάζουν μειωμένη διαλυτότητα στο νερό και αυξημένη διαλυτότητα σε ενώσεις λιπιδικής φύσεως, χαρακτηριστικό που υποβοηθά τη βιοσυσσώρευσή τους στον λιπώδη ιστό (Longnecker et al., 1997). Άλλα εμμέμοντα EDCs αποτελούν οι διοξίνες, καθώς και κάποια εντομοκτόνα και παρασιτοκτόνα (Gore et al., 2015).

B) Μη εμμέμοντες EDCs (Non persistent EDCs)

Οι χημικές ενώσεις που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία, μπορούν να διασπαστούν εύκολα με τη βοήθεια της ηλιακής ακτινοβολίας, τη δράση μικροοργανισμών ή μέσω χημικής επεξεργασίας. Μέσα στον οργανισμό, μεταβολίζονται με σχετικά γρήγορο ρυθμό από το ήπαρ και αποβάλλονται μέσω του πεπτικού και του ουροποιητικού συστήματος (Bergman et al., 2012). Σε αυτούς τους ενδοκρινικούς διαταράκτες ανήκουν οι φαινόλες, όπως η διφαινόλη Α (BPA), τα parabens, ουσίες με αντιμικροβιακή δράση που χρησιμοποιούνται συχνά σε προϊόντα προσωπικής υγιεινής και οι φθαλικοί εστέρες. Παρά τη γρήγορη διάσπαση και απέκκρισή τους, η συνεχής έκθεση έχει σημαντικές επιδράσεις στην υγεία των ζωικών και ανθρώπινων πληθυσμών, αλλά και στη φυσιολογική λειτουργία του οικοσυστήματος (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Kabir et al., 2015).

Ενδοκρινικοί διαταράκτες που έχουν μελετηθεί ευρέως μέχρι σήμερα είναι: η διεθυλσιλβεστρόλη (DES), οι διοξίνες, άλλοι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες, όπως το DDT και τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs), η BPA και οι φθαλικοί εστέρες ή φθαλικά (Hannon and Flaws, 2015). Οι χημικές αυτές ουσίες αποτελούν κοινά συστατικά βιομηχανικών, γεωργικών και φαρμακευτικών προϊόντων που

χρησιμοποιούνται ευρέως στην καθημερινότητά μας και κατασκευάστηκαν από τον άνθρωπο για να βελτιώσουν τον τρόπο ζωής του. Κάποιες από αυτές χρησιμοποιήθηκαν χωρίς να είναι γνωστές οι πιθανές αρνητικές συνέπειές τους για το περιβάλλον, κάποιες άλλες όμως δημιουργήθηκαν ακριβώς με στόχο την τροποποίηση της φυσιολογίας των οργανισμών. Κλασσικό παράδειγμα αποτελούν τα αντισυλληπτικά χάπια τα οποία παρασκευάστηκαν με στόχο τον έλεγχο και την τροποποίηση των ορμονικών επιπέδων στις γυναίκες που θέλουν να αποφύγουν μία ανεπιθύμητη εγκυμοσύνη ή που πάσχουν από κάποια ασθένεια όπως το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS). Το ενεργό συστατικό των περισσότερων αντισυλληπτικών χαπιών, η 17α-αιθινυλοιστραδιόλη (EE2), αποβάλλεται μέσω των ούρων στο αποχετευτικό σύστημα, καταλήγει στο θαλάσσιο οικοσύστημα και έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τους οργανισμούς που ζουν σε αυτό (Sanders and Stouffer, 1997; Peijnenburg and Struijs, 2006; Bhattacharya and Keating, 2012). Άλλοι EDCs που συντέθηκαν ώστε να παρεμβαίνουν στη φυσιολογική λειτουργία ενός οργανισμού και να τον καταστρέφουν είναι τα παρασιτοκτόνα και τα ζιζανιοκτόνα (π.χ. DDT, atrazine). Αρχικός τους στόχος ήταν να προστατέψουν τις καλλιέργειες και να αυξήσουν τη γεωργική παραγωγή, όπως ήταν λογικό, όμως, χημικές ουσίες που επηρεάζουν την επιβίωση εντόμων και φυτών, δεν θα μπορούσαν να είναι απόλυτα αβλαβείς για τον άνθρωπο. Συνεπώς, ποικίλες αρνητικές επιδράσεις τους, όπως η πρόωρη έναρξη εφηβείας και εμμηνόπαυσης και η μεγαλύτερη διάρκεια του έμμηνου κύκλου έχουν παρατηρηθεί μέχρι σήμερα (Sowers and LaPietra, 1995; Hoyer, 2005; Craig et al., 2011).



Λόγω της μεγάλης ποικιλίας που παρουσιάζουν ως προς τη δομή και τις χημικές τους ιδιότητες, είναι αναμενόμενο οι ενδοκρινικοί διαταράκτες να έχουν πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Οι αρχικές υποθέσεις έκαναν λόγο για άμεση πρόσδεσή τους σε υποδοχείς ορμονών όπως οι υποδοχείς οιστρογόνων, ανδρογόνων, προγεστερόνης, ρετινοειδών και άλλων, μέσω των οποίων θα μπορούν είτε να δράσουν αγωνιστικά μιμούμενοι τη δράση των ενδογενών ορμονών και επάγοντας τη σηματοδότηση, είτε να δράσουν ανταγωνιστικά παρεμποδίζοντας την πρόσδεση των ορμονών και, άρα, τη φυσιολογική μετάδοση μηνυμάτων σε κυτταρικό επίπεδο (Kabir et al., 2015). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια, συνέλεξαν στοιχεία που υποδεικνύουν και άλλους μηχανισμούς δράσης, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται η παρεμβολή των ενδοκρινικών διαταρακτών στη φυσιολογική σύνθεση αλλά και την απενεργοποίηση των ορμονών και των υποδοχέων τους. Αυτό μπορεί να συμβεί με παρεμπόδιση της γονιδιακής έκφρασης και τροποποίηση της λειτουργίας πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη σύνθεση και το μεταβολισμό των μορίων αυτών (National Institute of Environmental Health Sciences, 2010; UNEP and WHO, 2013). Άλλοι EDCs μπορούν να εμποδίζουν την έκκριση μίας ορμόνης αλλά και τη σωστή μεταφορά της στους ιστούς – στόχους. Όπως είναι λογικό, η παρεμβολή στα επίπεδα και τη σηματοδότηση μέσω των ενδογενών ορμονών, θα παρεμποδίσει και τη φυσιολογική ανατροφοδότηση των συστημάτων του οργανισμού, με αποτέλεσμα την προέκταση των προβλημάτων του ενδοκρινικού συστήματος (Diamanti – Kandarakis et al., 2009). Τέλος, πολλά πρόσφατα επιστημονικά δεδομένα δείχνουν ότι οι EDCs επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση και μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων (Anway et al., 2005; Anway and Skinner, 2006; 2008; Crews and McLachlan, 2006). Οι τροποποιήσεις αυτές έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να επηρεάζουν και τους απογόνους και να μεταφέρουν τις αρνητικές επιδράσεις των ενδοκρινικών διαταρακτών σε επόμενες γενιές.

Κάποιοι EDCs φαίνεται να έχουν διαφορετικές δράσεις στον οργανισμό ανάλογα με την ηλικία στην οποία εκτίθεται αυτός, αλλά και ανάλογα με τη φύση του χημικού στοιχείου. Για παράδειγμα το DTT φαίνεται να έχει οιστρογονική και

αντιανδρογονική δράση, κι αυτό γιατί ενώ η αρχική ένωση αποτελεί αγωνιστή οιστρογόνων, διασπάται μέσα στον οργανισμό σε DDE που δρα ως ανδρογονικός ανταγωνιστής (Rasier et al., 2007).

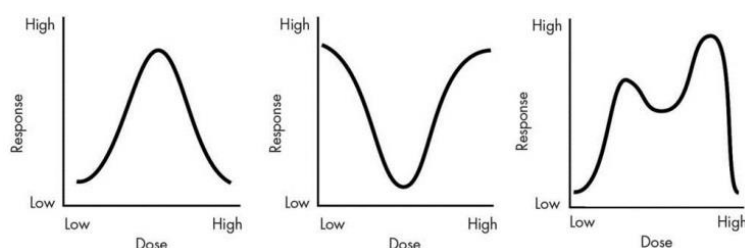
5.1.1 Μη μονοτονική δράση

Οι EDCs παρουσιάζουν, πολλές φορές, μη μονοτονικές καμπύλες όσον αφορά την απάντηση του οργανισμού σε διαφορετικές δόσεις. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να έχουν παρόμοια δράση σε χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ η δράση αυτή να αντιστρέφεται ή να μειώνεται σε ενδιάμεσες συγκεντρώσεις. Ακόμη, σε κάποιες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί αντίθετη δράση ανάλογα με τη δόση στην οποία εκτίθεται ένας οργανισμός. Έχειδειχθεί, για παράδειγμα, ότι η DES σε χαμηλές συγκεντρώσεις επάγει τον καρκίνο του προστάτη, ενώ σε μεγάλες φαίνεται να έχει αντίθετα αποτελέσματα (Bern, 1992; vom Saal et al., 1997). Όλα αυτά είχαν πολύ μεγάλη σημασία, εφόσον διαπιστώθηκε ότι η μελέτη υψηλών δόσεων δεν μπορεί να μας οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα για τις χαμηλότερες δόσεις, θεωρώντας πως η σχέση τους είναι πάντα γραμμική (Schug et al., 2011).

Αυτή η μη μονοτονική απάντηση στα EDCs μπορεί να εξηγηθεί εάν αναλογιστούμε ότι οι ενδογενείς ορμόνες, τις οποίες επηρεάζουν ή μιμούνται, παρουσιάζουν επίσης μη μονοτονικό τρόπο δράσης. Μελέτες έχουν προτείνει διάφορους μηχανισμούς για την κατανόηση του μη μονοτονικού τρόπου δράσης. Ένας από αυτούς προτείνει ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις ο ενδοκρινικός διαταράκτης προσδένεται επιλεκτικά μόνο σε ένα είδος υποδοχέα, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, όμως, μπορεί να προσδεθεί και σε άλλους υποδοχείς. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η BPA η οποία σε χαμηλές συγκεντρώσεις προσδένεται σε υποδοχείς οιστρογόνων (ERs), ενώ σε μεγαλύτερες μπορεί να συνδεθεί και σε υποδοχείς ανδρογόνων (ARs) (Sohoni and Sumpter, 1998; Moriyama et al., 2002; Tilghman et al., 2010).

Σε κάποιες άλλες περιπτώσεις, έχει παρατηρηθεί ότι χαμηλές δόσεις μιας ορμόνης προκαλούν αναστολή της μεταγραφής κάποιων γονιδίων, ενώ υψηλότερες δόσεις επάγουν τη μεταγραφή, με αποτέλεσμα το κύτταρο να ανταποκρίνεται με πολύ διαφορετικό τρόπο σε κάθε περίπτωση. Κάτι τέτοιο έχει παρατηρηθεί στην περίπτωση της οιστραδιόλης και άρα θα μπορούσε να ισχύει και στην περίπτωση των ενδοκρινικών διαταρακτών που τη μιμούνται (Coser et al., 2003). Ένας ακόμη μηχανισμός δράσης είναι και η αποικοδόμηση ή η αποευαισθητοποίηση των

υποδοχέων για τον τερματισμό της ορμονικής σηματοδότησης (Ismail and Nawaz, 2005). Αυτό είναι ένα αρκετά σύνηθες φαινόμενο για τους μεμβρανικούς υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCRs), έχει παρατηρηθεί σε υποδοχείς όπως αυτός της FSH, της hCG και των προσταγλανδινών και μπορεί να συμβάλλει στη διαφορική απόκριση του κυττάρου σε κάποιον ενδοκρινικό διαταράκτη με τη μεταβολή της συγκέντρωσής του (Lohse, 1993; Freedman and Lefkowitz, 1996; Bohm et al., 1997).



Εικόνα 9 Παραδείγματα μη μονοτονικής δράσης (Προσαρμογή από Vandenberg et al., 2012)

5.1.2 Δράση σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις

Εφόσον, όπως ειπώθηκε και προηγουμένως, οι ενδοκρινικοί διαταράκτες επηρεάζουν τη σύνθεση, την απελευθέρωση και τον μεταβολισμό των ορμονών ή αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς τους, είναι αναμενόμενο να ασκούν τη δράση τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τις ορμόνες (Welshons et al., 2003). Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις των ορμονών παρουσιάζουν διακυμάνσεις ανάλογα με την ηλικία του ατόμου αλλά και την κατάσταση της φυσιολογίας του. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί η συγκέντρωση των ορμονών του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης – γονάδων στις γυναίκες, μεταξύ των διαφόρων ηλικιών, αλλά και μεταξύ των διαφορετικών σταδίων του έμμηνου κύκλου (Vandenberg et al., 2012). Θα πρέπει, επομένως, σε σχετικές ερευνητικές μελέτες, να λαμβάνεται υπόψη ότι ακόμα και μικρές δόσεις EDCs μπορούν να επηρεάσουν αυτές τις διακυμάνσεις, έχοντας ποικίλες συνέπειες για τον οργανισμό (Welshons et al., 2003).

Δύο σημαντικά μεγέθη που χρησιμοποιούνται στις σύγχρονες μελέτες των ενδοκρινικών διαταρακτών είναι το LOAEL (**Lowest Observed Adverse Effect Level**) και το NOAEL (**No Observed Adverse Effect Level**). Το πρώτο περιγράφει τη χαμηλότερη δόση στην οποία έχουν παρατηρηθεί τοξικά αποτελέσματα της μελετούμενης χημικής ένωσης, ενώ το δεύτερο αναφέρεται στην υψηλότερη δόση, στην οποία η ίδια ένωση δεν έχει δείξει καμία αρνητική επίδραση. Με βάση τα δύο αυτά μεγέθη, οι επιστήμονες καθορίζουν τα ασφαλή επίπεδα έκθεσης του ανθρώπου

για κάθε ενδοκρινικό διαταράκτη (Gore and Dickerson, 2012).

5.1.3 Περίοδοι έκθεσης και υπερευαισθησίας

Μεταξύ των ερευνητών που ασχολούνται με τις επιδράσεις των EDCs, υπάρχουν κι εκείνοι που δηλώνουν αντίθετοι στον προσδιορισμό «ασφαλούς δόσης». Η άποψή τους βασίζεται στο γεγονός ότι σε κάποια αναπτυξιακά στάδια ο οργανισμός δεν εκτίθεται καθόλου σε συγκεκριμένες ενδογενείς χημικές ενώσεις. Επομένως, ακόμα και έκθεση σε ελάχιστη ποσότητα ενός ενδοκρινικού διαταράκτη, σε αυτά τα αναπτυξιακά στάδια, μπορεί να επηρεάσει τις φυσιολογικές διεργασίες των κυττάρων βραχυπρόθεσμα αλλά και μακροπρόθεσμα (Sheehan, 2006; Vandenberg et al., 2012).

Ανάλογα με το πότε εκτίθεται ένας οργανισμός, τη φύση του διαταράκτη και τα επίπεδά του, οι αρνητικές επιδράσεις μπορεί να γίνονται εμφανείς κατά τη γέννηση ή σε πολύ μετέπειτα στάδια της ζωής. Για παράδειγμα, έχειδειχθεί ότι στους ενήλικες προκαλείται τοξικότητα μετά από έκθεση σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις EDCs και η επίδραση διαρκεί όσο και η έκθεση. Αντιθέτως, η επίδραση χαμηλότερης δόσης σε μία ευαίσθητη αναπτυξιακή περίοδο μπορεί να έχει σοβαρότερα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα στον οργανισμό (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Schug et al., 2011). Αυτό το φαινόμενο αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως DOHaD (**Developmental Origins of Health and Disease**) και αφορά την ενδομήτρια ανάπτυξη και τη μεταγεννητική περίοδο οπότε πολλά συστήματα του οργανισμού συνεχίζουν να διαμορφώνονται (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Gore et al., 2015). Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια, πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν ως στόχο τους την κατανόηση της επίδρασης των EDCs όχι μόνο στα άτομα που εκτίθενται, αλλά και στις μετέπειτα γενιές κι αυτό, γιατί φαίνεται να προκαλούν μη γενωμικές τροποποιήσεις στα γαμετικά κύτταρα, όπως μεθυλίωση του DNA και ακετυλίωση των ιστονών (Schug et al., 2011).

5.2 Φθαλικές ενώσεις

Οι φθαλικές ενώσεις ανήκουν στους πιο κοινούς πλαστικοποιητές, είναι δηλαδή τεχνητές χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή πλαστικών καθώς τους προσφέρουν ευκαμψία και ανθεκτικότητα. Συναντώνται πολύ συχνά σε κοινά καταναλωτικά προϊόντα, όπως πλαστικές συσκευασίες τροφίμων, μπουκάλια νερού, παιδικά παιχνίδια, σε ιατρικά και φαρμακευτικά προϊόντα, όπως συμπληρώματα

διατροφής και χειρουργικά γάντια, σε οικοδομικά υλικά, αλλά και προϊόντα υγιεινής και ομορφιάς, όπως σπρέι μαλλιών και κολόνιες. Οι χημικές αυτές ενώσεις βρίσκονται μη ομοιοπολικά δεσμευμένες στο πλαστικό, με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται εύκολα στον αέρα, στα υγρά και τα τρόφιμα, από όπου μπορούν εύκολα να εισέλθουν στον οργανισμό μέσω κατάποσης, εισπνοής και απορρόφησης από το δέρμα. Είναι επομένως φανερό, ότι η έκθεση του ανθρώπου γίνεται σε καθημερινή βάση και περιλαμβάνει όλα τα στάδια της ζωής του από τη βρεφική, ακόμα, ηλικία (Hannon and Flaws, 2015).

Οι φθαλικές ενώσεις προκύπτουν έπειτα από εστεροποίηση του φθαλικού οξέος με διαφορετικές αλκοόλες. Είναι άχρωμες, άοσμες, έχουν υψηλές λιποφιλικές ιδιότητες και χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, ενώ έχει παρατηρηθεί πως είναι αρκετά σταθερές ενώσεις με αποτέλεσμα να διαλύονται με πολύ αργό ρυθμό στον αέρα και το έδαφος (Hannon and Flaws, 2015). Συνήθως ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες (Ventrice et al., 2013):

α) Φθαλικά υψηλού μοριακού βάρους (DINP, DIDP): αποτελούν το 80% των φθαλικών που χρησιμοποιούνται στην Ευρώπη και δεν θεωρούνται τοξικά για τον άνθρωπο.

β) Φθαλικά χαμηλού μοριακού βάρους (DEHP, DBP, BBzP): περιλαμβάνονται στο REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemical substances) και χαρακτηρίζονται ως πολύ επικίνδυνα για την υγεία.

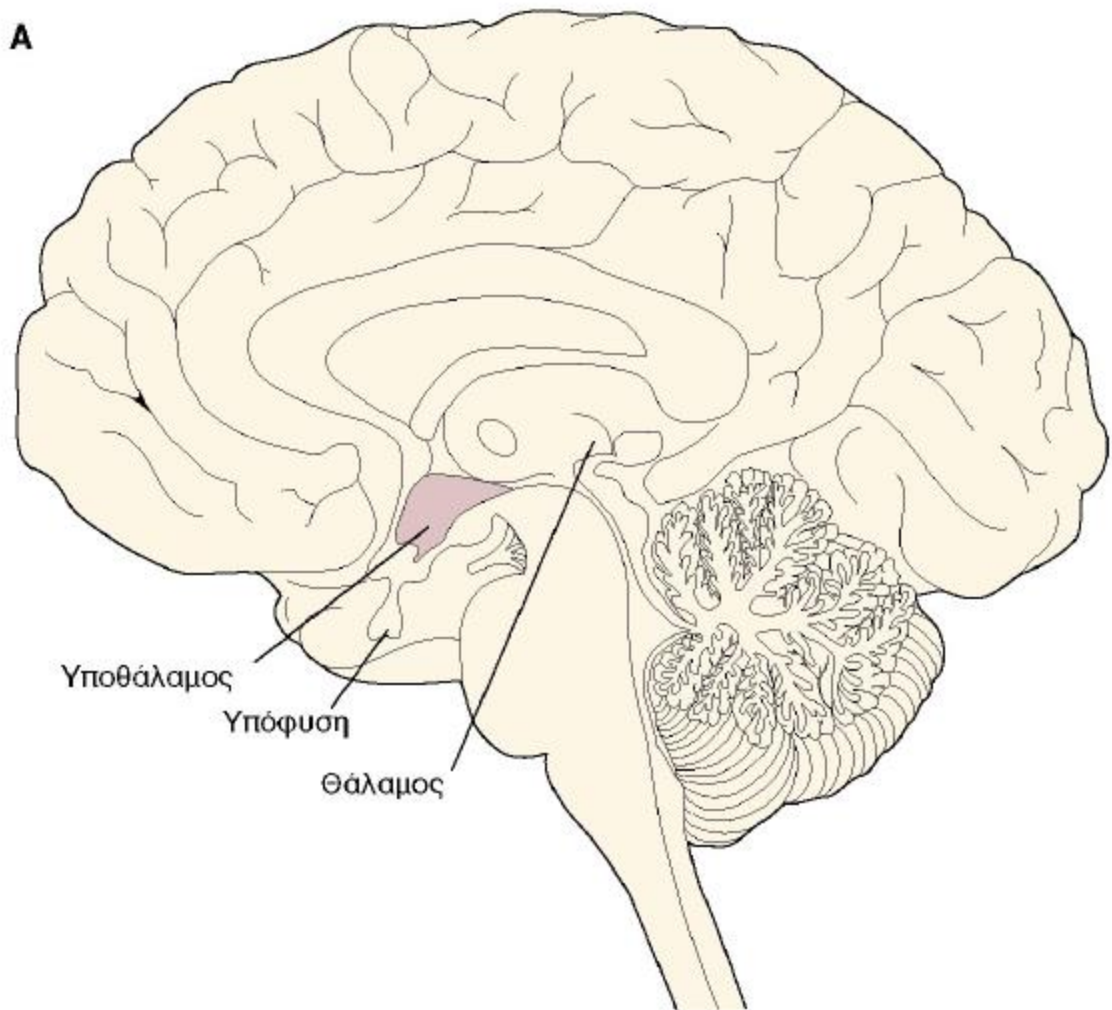
Αφού εισέλθουν στον οργανισμό, οι φθαλικοί διεστέρες μεταβολίζονται στο πεπτικό και το κυκλοφορικό σύστημα από εστεράσες και λιπάσες. Δίνουν μονοεστέρες οι οποίοι στη συνέχεια μπορούν να μεταβολιστούν περαιτέρω, ανάλογα με το μέγεθός τους και το είδος του οργανισμού στον οποίο βρίσκονται, με αποτέλεσμα την εύκολη αποβολή τους στα ούρα (Ventrice et al., 2013; Hannon and Flaws, 2015). Παρότι το πρώτο βήμα της διαδικασίας αυτής έχει ως στόχο την αποτοξίνωση της χημικής ένωσης, στην προκειμένη περίπτωση η μετατροπή σε μονοεστέρες καθιστά τα φθαλικά ακόμα πιο δραστικά και τοξικά για τον οργανισμό (Ventrice et al., 2013). Οι μονοεστέρες, είναι εκείνοι που χρησιμοποιούνται, πέρα από τις αρχικές φθαλικές ενώσεις, ως βιοδείκτες για τη μέτρηση των επιπέδων έκθεσης του ανθρώπου (Koch and Calafat, 2009; Wittassek et al., 2011).

Η πιο κοινή τακτική για τον προσδιορισμό της ανθρώπινης έκθεσης στα φθαλικά, είναι η μέτρηση των μεταβολιτών τους στα ούρα. Παρόλα αυτά οι φθαλικοί εστέρες μπορούν να εντοπιστούν και στον ορό του αίματος, σε δείγματα αμνιωτικού υγρού,

ομφαλοπλακουντιακού αίματος, μητρικού γάλακτος, ακόμα και ενδοωοθηκικού υγρού (Becker et al., 2004; Silva et al., 2004; Marsee et al., 2006; Hogberg et al., 2008; Heudorf et al., 2007; Krotz et al., 2012).

6. Προοπτική περιοχή υποθαλάμου

Ο υποθάλαμος είναι το μέρος του διάμεσου εγκεφάλου που βρίσκεται στη βάση του εγκεφάλου και εκτείνεται από το οπτικό χίασμα μέχρι του οπισθίου ορίου των μαστίων. Καταλαμβάνει αμφοτερόπλευρα, την περιοχή κάτω από την υποθαλάμια αύλακα του έξω τοιχώματος της τρίτης κοιλίας. Ελέγχει και αλληλοσυσχετίζει τις λειτουργίες του αυτόνομου νευρικού συστήματος και του συστήματος των ενδοκρινών αδένων και έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης. Επίσης, συμμετέχει στη ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος, των υγρών του σώματος, της πρόσληψης τροφής και υγρών, της σεξουαλικής συμπεριφοράς, καθώς και της συγκινησιακής κατάστασης.



Εικόνα 17 Θέση και υφή του υποθαλάμου όπου φαίνεται η σχέση του ως προς την υπόφυση και τον θάλαμο (Nieuwenhuys, Voogd and van Huizen, 1981 τροποποιημένη)

Μπροστά από τον υποθάλαμο είναι μια περιοχή η οποία προς τα πρόσω εκτείνεται από το οπτικό χίασμα μέχρι το τελικό πέταλο και τον πρόσθιο σύνδεσμο και ονομάζεται **προοπτική περιοχή** (preoptic area). Η εκλυτική των γοναδοτροφινών ορμόνη GnRH είναι ένα δεκαπεπτίδιο που εκ κρίνεται από υποθαλαμικούς νευρώνες που βρίσκονται στην προοπτική περιοχή (και τον τοξοειδή πυρήνα). Οι νευράξονες της GnRh καταλήγουν, αφού διέλθουν το μέσο έπαρμα, στο πυλαίο αγγειακό σύστημα της υπόφυσης και εκεί συνδέονται με τον υποδοχέα τους στα γοναδοτρόφα κύτταρα. Η επεισοδιακή (κατά ώσεις) έκκριση της GnRh ρυθμίζει τη σύνθεση και έκκριση των γοναδοτροφινών FSH και LH (Ζαπάντη και Τερζίδης, 1990). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο μέσος προοπτικός πυρήνας (medial preoptic nucleus) μελέτη που έγινε στο ορτύκι της Ιαπωνίας χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Nissl, έδειξε ότι υπάρχει σαφής φυλετικός διμορφισμός, καθώς εντοπίστηκε μεγαλύτερος αριθμός έντονα βαμμένων νευρώνων στα αρσενικά, κάτι που ίσως υποδεικνύει διαφορετικούς μεταβολικούς ρυθμούς και όγκος του πυρήνα είναι κατά 40% μεγαλύτερος στα αρσενικά σε σχέση με τα θηλυκά (Panzica et al., 1987). Εκτός από την άμεση επιρροή

στην πρόσθια υπόφυση το κύριο αποτέλεσμα των ανδρογόνων πιστεύεται ότι διαμεσολαβείται μέσω του υποθαλάμου. Η έννοια αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι το περιεχόμενο του υποθαλάμου σε FSH-RH και LH-RH μειώνεται με την τεστοστερόνη και επίσης με την παρατήρηση ότι χορήγηση T ή DHT στον υποθάλαμο (εμφυτεύματα) μειώνουν την έκκριση των γοναδοτροπινών μέσω του AR (Naess, 1975). Η πολύ χαμηλή συγγένεια της 17B-οιστραδιόλης για τον AR δείχνει έντονα ότι οι υποδοχείς ανδρογόνων και οιστρογόνων στο κεντρικό νευρικό σύστημα είναι διαφορετικοί. Στον υποθάλαμο, η τεστοστερόνη μπορεί να μετατραπεί με αρωματοποίηση σε 178-οιστραδιόλη. Επομένως, έχει προταθεί αυτή η μετατροπή της T είναι απαραίτητη για την ανατροφοδότηση του υποθαλάμου και για τη διεγερτική επίδραση στη σεξουαλική συμπεριφορά. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι δεν υπάρχει δέσμευση της 17B-οιστραδιόλης σε υποδοχείς στην προοπτική περιοχή του υποθαλάμου μετά τη χορήγηση (3H)-T *in vivo*. Αυτό δείχνει ότι η τοπική αρωματοποίηση δεν είναι απαραίτητο βήμα στη δράση των ανδρογόνων στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Naess, 1975). Ο AR έχει βρεθεί να είναι περισσότερο διαδεδομένος στους μυς σε σχέση με τους επίμυς στην (μέση) προοπτική περιοχή αλλά και στα δύο είδη παρατηρήθηκε φυλετικός διμορφισμός με τα αρσενικά να επικρατούν, ακολουθώντας όμως διαφορετικά πρότυπα κατανομής (Jahan et al., 2015).

Μία μελέτη ανασκόπησης κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η λειτουργική ακεραιότητα των νευρώνων της (μέσης) προοπτικής περιοχής διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ικανότητα του αρσενικού να αναγνωρίζει τον θηλυκό σύντροφο, στην συντροφική προτίμηση και τελικά στο ζευγάρωμα με το θηλυκό (Paredes, 2003). Στα πρόβατα, τόσο οι κριάρια όσο και οι προβατίνες παρουσιάζουν αρνητική ανταπόκριση στην περιφερική θεραπεία με τεστοστερόνη, και τα δύο φύλα παρουσιάζουν παρόμοιο βαθμό καταστολής στην έκκριση της LH κατά τη διάρκεια της . Η χρόνια θεραπεία τεστοστερόνης μπορεί να προκαλεί τυπική αρσενική συμπεριφορά ζευγαρώματος σε πρόβατα και των δύο φύλων που έχουν υποστεί γοναδεκτομή. Επιπλέον, θεραπεία με τεστοστερόνη μπορεί επίσης να διεγείρει την ωορρηξία σε ανήλικες προβατίνες. Έτσι, η τεστοστερόνη μπορεί να έχει ρυθμιστικό ρόλο στον εγκέφαλο τόσο των ανδρών όσο και των γυναικών. Υψηλές συγκεντρώσεις ανδρογόνων, κυρίως ανδροστενεδιόνη και τεστοστερόνη, εκκρίνονται από την ωοθήκη. Υπάρχει απόδειξη ότι μεγάλο μέρος της δράσης των ανδρογόνων στον εγκέφαλο μπορεί να είναι μέσω της αρωματοποίησης των οιστρογόνων και της αλληλεπίδρασης αυτών με ER. Ωστόσο, μελέτες που αφορούν τη διυδροτεστοστερόνη δείχνουν μια επιπρόσθετη δράση στον υποδοχέα των ανδρογόνων είναι απαραίτητη την επαγωγή της πλήρους σειράς αναπαραγωγικών συμπεριφορών. Η χρόνια θεραπεία με τα ανδρογόνα είναι επίσης σε θέση να προκαλεί αναπαραγωγική συμπεριφορά τύπου αρσενικού σε προβατίνες με ωοθηκεκτομή, αλλά η οξεία μεταχείριση των προβατίνων με τα ανδρογόνα προκαλεί τυπική θηλυκή αναπαραγωγική συμπεριφορά όπως η σεξουαλική δεκτικότητα (Scott et al., 2004). Έχει δειχθεί ακόμα ότι προκαλείται αναστολή της αρσενικής σεξουαλικής συμπεριφοράς σε αρουραίους με μπλοκάρισμα (παρεμπόδιση) του AR στην προοπτική περιοχή αλλά όχι στην αμυγδαλή και το

διάφραγμα (septum) χρησιμοποιώντας υδροξυφλουταμίδη (hydroxyflutamide, OHF) (McGinnis, 1996).

7. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η προσπάθεια μελέτης πιθανών επιπτώσεων που μπορούν να έχουν οι ενδοκρινικοί διαταράκτες στον εγκέφαλο, εάν γίνει πρόωπη έκθεση κατά τα αρχικά κρίσιμα στάδια της ανάπτυξης, χρησιμοποιώντας ως δείκτη τα επίπεδα του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR) και οιστρογόνων (ER) σε επιλεγμένες περιοχές οι οποίες μελετήθηκαν με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Υλικά και μέθοδοι

1.1 Έκθεση των μητέρων στο μείγμα των ορμονικών διαταρακτών

1.1.1 Ζώα μελέτης

Τα ζώα που συμμετείχαν στην μελέτη ήταν μύες του στελέχους C57/Bl6. Η εκτροφή τους έγινε στη μονάδα πειραματοζώων του τμήματος Νοσηλευτικής Αθηνών. Οι συνθήκες διαβίωσής τους ήταν σταθερές και ελεγχόμενες, με θερμοκρασία ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), φωτοπερίοδο (12 ώρες φως : 12 ώρες σκοτάδι) και *ad libitum* πρόσβαση σε τροφή και φαγητό. Ο χειρισμός των ζώων έγινε σύμφωνα με τον κώδικα δεοντολογίας της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, European Communities Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU). Επιπλέον, έγινε προσπάθεια να μειωθεί, όσο το δυνατόν περισσότερο, ο αριθμός των πειραματοζώων και το σωματικό άλγος που τυχόν υπέστησαν.

1.1.2 Μείγμα ορμονικών διαταρακτών

Το μείγμα των φθαλικών εστέρων της παρούσας μελέτης (θα αναφέρεται στο εξής ως μίγμα S) περιείχε τέσσερις διαφορετικούς φθαλικούς μονοεστέρες: mono-butylphthalate (MBP), mono-benzylphthalate (MBzP), mono-ethylhexylphthalate (MEHP) και mono-isononylphthalate (MINP). Η σύσταση του μίγματος που χορηγήθηκε, βασίστηκε στις φθαλικές ενώσεις που εντοπίστηκαν στον ορό του αίματος των εγκύων μητέρων της επιδημιολογικής μελέτης SELMA στη Σουηδία,

όπου συσχετίστηκαν τα επίπεδα χημικών ουσιών στο αίμα των εγκύων με την ουρογεννητική απόσταση των αρρένων απογόνων τους. Ο μέσος όρος της συγκέντρωσης των χημικών του μίγματος στο αίμα των εγκύων χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του μίγματος S (x1 συγκέντρωση).

Οι αραιώσεις του αρχικού μίγματος (συγκέντρωσης 1M) γινόταν σε DMSO/PBS έτσι ώστε η συγκέντρωσή του να είναι 0,4mM 4mM και 20mM για τις δόσεις x10, x100 και x500, αντίστοιχα. Οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν, βασίστηκαν στο γεγονός ότι σε μελέτες εκτίμησης κινδύνου χημικών ενώσεων (Risk Assessment) είναι απαραίτητο να υπολογίζεται ένα διάστημα περίπου 100 μονάδων συγκέντρωσης μεταξύ του NOAEL στα τρωκτικά και τα επίπεδα ασφαλούς έκθεσης του ανθρώπου. Επιπλέον, οι επιλεγμένες δόσεις βρίσκονταν εντός του πλαισίου των δόσεων που χρησιμοποιούνται σε ανάλογες μελέτες της βιβλιογραφίας.

Χρησιμοποιήθηκαν 4 ομάδες ζώων:

1. Ομάδα εκδόχου, DMSO
2. Ομάδα x10 S
3. Ομάδα x100 S
4. Ομάδα x500 S

1.1.3 Αναπαραγωγή και έκθεση στο μείγμα των φθαλικών

Για την απόκτηση νεογνών, τοποθετούνταν σε κάθε κλουβί ένας ενήλικος θηλυκός μυς που βρισκόταν στη φάση του οίστρου και ένας ενήλικος αρσενικός μυς, για μέγιστο διάστημα 6 ημερών. Κάθε πρωί, γινόταν έλεγχος του θηλυκού μυός για παρουσία σπερματικού βύσματος (vaginal plug) και καταμέτρηση του βάρους σώματος. Την 1^η ημέρα ‘αναπαραγωγής’, ξεκινούσε η έκθεση των θηλυκών στο μείγμα των φθαλικών η οποία διαρκούσε μέχρι το τέλος της εγκυμοσύνης. Η έκθεση πραγματοποιούνταν μέσω μίας νιφάδας δημητριακών, εμποτισμένης με μία συγκεκριμένη συγκέντρωση μίγματος ή μόνο με διαλύτη DMSO. Κατά τη διάρκεια των ημερών αναπαραγωγής, ο αρσενικός μυς απομακρυνόταν από το κλουβί μέχρι να καταναλωθεί η νιφάδα από τον θηλυκό και στη συνέχεια επανατοποθετούνταν σε αυτό. Στόχος ήταν να επιβεβαιωθεί η κατανάλωση της νιφάδας από το θηλυκό μυ.

Η ποσότητα διαλύματος με την οποία εμποτιζόταν κάθε νιφάδα εξαρτιόταν από το

βάρος σώματος του θηλυκού, με αποτέλεσμα αυτή να διαφοροποιείται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Για το σωστό προσδιορισμό της ημερήσιας δόσης, οι θηλυκοί μύες ζυγίζονταν κάθε 3 ημέρες και στη συνέχεια υπολογιζόταν η ποσότητα διαλύματος για τον εμποτισμό της νιφάδας. Την 7^η ημέρα ο αρσενικός μυς απομακρυνόταν από το κλουβί και η μητέρα παρέμενε μόνη της για όλη την υπόλοιπη κύηση (συνολική διάρκεια περίπου 20- 21 ημέρες). Η ημέρα της γέννησης οριζόταν ως μεταγεννητική ημέρα 0 (PND 0). Τα νεογνά παρέμεναν υπό τη φροντίδα της μητέρας μέχρι την PND 21 οπότε και λάμβανε χώρα ο απογαλακτισμός και οι νεαροί μύες χωρίζονταν σε διαφορετικά κλουβιά ανάλογα με το φύλο τους.

1.1.4 Συλλογή εγκεφαλικού ιστού

Μετά την πάροδο 20min από την ολοκλήρωση της δοκιμασίας εξαναγκασμένης κολύμβησης, κάθε ζώο αναισθητοποιείται με ισοφλουράνιο, θυσιάζεται και γίνεται η απομόνωση του εγκεφάλου. Οι εγκεφαλοι ψύχθηκαν ακαριαία σε ισοπεντάνιο στους - 40°C. Στη συνέχεια, με τη χρήση ψυχρού μικροκρυοτόμου στους -17°C (Leica CM1900, Nussloch, Germany) πάρθηκαν τομές των 20μm, που συλλέχθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες επικαλυμμένες με σιλάνιο και αποθηκεύτηκαν στους - 80°C.

2. Ανοσοϊστοχημεία

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης των ενδοκρινικών διαταρακτών στον εγκεφαλο μετά από στρες χρησιμοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία

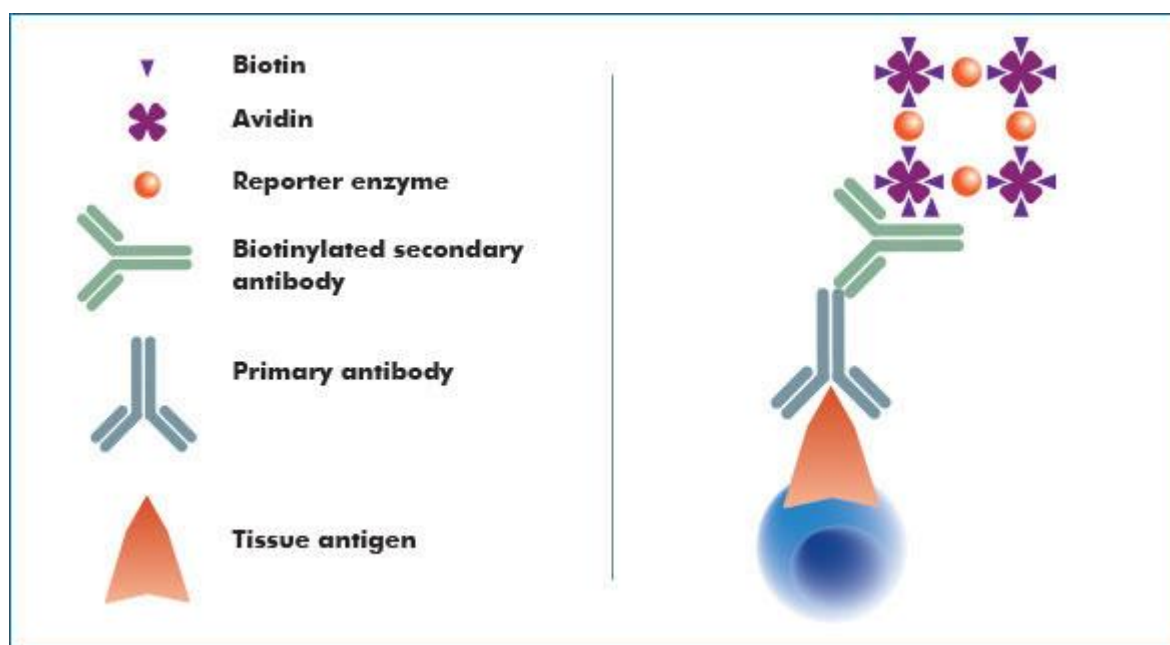
Η ανοσοϊστοχημεία (immunohistochemistry) αποτελεί μία εργαστηριακή τεχνική που συνδυάζει τη βιοχημεία με την ανοσολογία και την ιστολογία. Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση ειδικών αντισωμάτων με τα οποία, μέσω της απόλυτα ειδικής αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος, καθίσταται δυνατός ο εντοπισμός του αντιγόνου τόσο σε κυτταρικό όσο και σε υποκυτταρικό επίπεδο. Τα αντισώματα ή ανοσοσφαιρίνες είναι πρωτεϊνικά μόρια που έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να συνδέονται ειδικά με συγκεκριμένα αντιγόνα. Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται σε ανοσοϊστοχημικές μεθόδους ανήκουν κυρίως στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών IgG και σπανίως στην οικογένεια των IgM, παρασκευάζονται με ανοσοποίηση ζώων με καθαρό αντιγόνο (ολόκληρη πρωτεΐνη, πεπτίδιο, επικράτεια

κλπ.) και διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες: τα μονοκλωνικά και τα πολυκλωνικά. Τα πολυκλωνικά ονομάζονται έτσι καθώς στον παραγόμενο αντιορό περιέχονται IgG που είναι προϊόντα πολλών διαφορετικών κλώνων B-λεμφοκυττάρων και κατά συνέπεια αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους του αντιγόνου. Τα μονοκλωνικά αντισώματα παράγονται συνήθως σε ποντικό. Η ανοσοποίηση ακολουθείται από απομόνωση διακριτών κλώνων B-λεμφοκυττάρων, καθένας εκ των οποίων παράγει ένα μόνο αντίσωμα με την ίδια μοριακή δομή, ειδικότητα και συγγένεια, το οποίο αναγνωρίζει έναν συγκεκριμένο επίτοπο. Το βασικό πλεονέκτημα των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι η μεγάλη τους ειδικότητα για το αντιγόνο ενώ, τα πολυκλωνικά σε σύγκριση με τα μονοκλωνικά εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια και ευρύτερη δραστικότητα, αναγνωρίζοντας πιο αποτελεσματικά το υπό μελέτη αντιγόνο, αφού αναγνωρίζουν περισσότερους επιτόπους πάνω στο αντιγόνο. Η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας χαρακτηρίζεται από μεγάλο βαθμό ακρίβεια και ειδικότητα και επιτρέπει την ανίχνευση ποικιλίας αντιγόνων σε διάφορους τύπους ιστού. Χρησιμοποιείται δε ευρέως τόσο στη διάγνωση μη φυσιολογικών κυττάρων όπως αυτά που εντοπίζονται σε καρκινικούς όγκους όσο και στη βασική έρευνα για τον χαρακτηρισμό του χρονοχρονικού προτύπου έκφρασης μιας πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ενός οργανισμού όπως επίσης και στην ανάλυση της κατανομής ή/και του εντοπισμού διαφορετικών πρωτεϊνών σε διαφορετικές περιοχές ενός ιστού, όπως στην περίπτωση της δικιάς μας μελέτης. Η ανοσοϊστοχημεία συγκεντρώνει πολλά πλεονεκτήματα: Είναι ταχεία, έχει πολύ ικανοποιητική ευαισθησία, ειδικότητα, επαναληψιμότητα και δυνατότητα συσχέτισης του εντοπισμού με μορφολογικές παραμέτρους. Είναι συμβατή με όλα σχεδόν τα μονιμοποιητικά υλικά που χρησιμοποιούνται σήμερα, μπορεί να εφαρμοστεί ακόμα και μετά από αφαλάτωση του υλικού, δίνει αποτελέσματα και σε υλικά που έχουν υποστεί αυτόλυση η ακόμα και νέκρωση και τέλος σε περίπτωση που αυτό απαιτείται μπορεί να εφαρμοσθεί και σε ιστολογική τομή που είχε προηγουμένως υποστεί χρώση ρουτίνας.

Η αρχική μέθοδος ανοσοϊστοχημείας επινοήθηκε από τον A. Coons και τους συνεργάτες του (Coons & Kaplan 1950, Coons et al 1955). Έκτοτε, σε συνδυασμό με τη ραγδαία εξέλιξη στις τεχνικές της παραγωγής, της απομόνωσης και του χαρακτηρισμού της ειδικότητας των αντισωμάτων αναπτύχθηκαν πολλές διαφορετικές μέθοδοι και πρωτόκολλα ανοσοϊστοχημείας. Επιπλέον, η ανακάλυψη νέων φθορίζοντων μορίων επέτρεψε τη σήμανση των αντισωμάτων ενώ, η ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης του συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος και ενίσχυσης του σήματος, οδήγησαν στη δημιουργία πολλών τεχνικών σήμανσης των αντισωμάτων με σύνδεση ομάδων, ενζύμων ή ενζυμικών συστημάτων πάνω στα αντισώματα. Έτσι, η επιλογή της κατάλληλης κάθε φορά μεθόδου θα πρέπει να βασίζεται τόσο στο είδος του υπό μελέτη δείγματος, όσο και στο βαθμό της ευαισθησίας που απαιτείται. Επομένως, η επιλογή του αντισώματος, του τρόπου προετοιμασίας του δείγματος και των μαρτύρων που θα χρησιμοποιηθούν είναι οι βασικές αποφάσεις που πρέπει να ληφθούν πριν την εφαρμογή της μεθόδου.

Πιο συγκεκριμένα, στα πειράματα ανοσοϊστοχημείας έναντι των AR, ERα και ERβ, χρησιμοποιήθηκε η έμμεση μέθοδος ανοσοϊστοχημείας αβιδίνης-βιοτίνης. Η επιλογή

μεθόδου ανοσοϊστοχημείας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως από τον ιστό που μελετάται, από την προετοιμασία του δείγματος, από τα επίπεδα έκφρασης του υπό μελέτη αντιγόνου, από το είδος και τα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου αντισώματος και τα διαθέσιμα συστήματα ανίχνευσης καθώς και από τον διαθέσιμο εξοπλισμό και την οικονομική δυνατότητα του εκάστοτε εργαστηρίου. Λαμβάνοντας όλα τα παραπάνω στοιχεία υπόψη επιλέχθηκε η έμμεση μέθοδος Ανοσοϊστοχημείας Αβιδίνης-Βιοτίνης. Χρησιμοποιήθηκε ως δεύτερο αντίσωμα ένα βιοτινυλιωμένο αντίσωμα IgG κατσίκας έναντι αντισωμάτων IgG λαγού για τον AR, ομοίως για τον ERα και βιοτινυλιωμένο δεύτερο αντίσωμα IgG γαϊδάρου έναντι IgG αντισωμάτων κατσίκας για τον ERβ. Οι έμμεσες μέθοδοι είναι μέθοδοι δύο ή περισσότερων βημάτων: το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του αντισώματος με το αντιγόνο που αναγνωρίζει, ενώ το δεύτερο βήμα επώαση του συμπλέγματος αντιγόνου-πρώτου αντισώματος με δεύτερο αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει το σταθερό τμήμα των IgG του ζωικού είδους στο οποίο έχει δημιουργηθεί το πρώτο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με μια φθορίζουσα ομάδα ή κάποιο ένζυμο (π.χ. υπεροξειδάση) ή άλλο μόριο (π.χ. βιοτίνη) που καθιστά δυνατή την ανίχνευση του συμπλέγματος. Συνήθως, ειδικά όταν τα επίπεδα του υπό μελέτη αντιγόνου είναι χαμηλά χρησιμοποιούνται έμμεσες μέθοδοι ενίσχυσης περισσότερων βημάτων.



Εικόνα 19 Η έμμεση ανοσοϊστοχημική μέθοδος με την συμβολή του συμπλόκου Αβιδίνης-Βιοτίνης.

Μέθοδος Βιοτίνης- Αβιδίνης (Biotin – Avidin procedure): Στη μέθοδο αυτή εκμεταλλευόμαστε τον υψηλό βαθμό συγγένειας μεταξύ βιοτίνης και αβιδίνης. Με χημική διαδικασία συνδέεται η βιοτίνη με το πρωτογενές αντίσωμα

σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο. Με την τοποθέτηση της ένωσης αυτής στον ιστό γίνεται σύνδεσή της με το ανάλογο αντιγόνο, όπου και αν υπάρχει αυτό. Στην συνέχεια, προστίθεται η αβιδίνη, η οποία έχει σημανθεί με το ένζυμο υπεροξειδάση. Η αβιδίνη εντοπίζει το σύμπλοκο βιοτίνης-αντισώματος με το οποίο ενώνεται σταθερά, μεταφέροντας την υπεροξειδάση στη θέση όπου βρίσκεται το αντιγόνο.

Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι μερικοί ιστοί διαθέτουν σημαντικές ποσότητες ενδογενούς βιοτίνης, με αποτέλεσμα να συνδέουν άμεσα το σύμπλοκο αβιδίνης-υπεροξειδάσης, δίνοντας ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Επιπλέον, φαίνεται ότι οι διαφορετικές παρτίδες βιοτίνης και αβιδίνης εμφανίζουν μεταξύ τους ποικίλης έντασης συγγένεια με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η αναπαραγωγικότητα της μεθόδου σε διαφορετικά εργαστήρια. Αρκετά από τα προβλήματα αυτά επιλύονται με τη χρήση στρεπταβιδίνης αντί της βιοτίνης (BSA method). Η στρεπταβιδίνη είναι ένα τετραμερές ανάλογο της αβιδίνης που απομονώθηκε από το βακτήριο *Streptomyces avidinii* και έχει την ιδιότητα να συνδέεται με τη βιοτίνη με πολύ υψηλή συγγένεια.

Θεωρητικά, η συγγένεια αυτή είναι περίπου 10 φορές μεγαλύτερη από τη συγγένεια των περισσοτέρων αντισωμάτων προς τα αντιγόνα τους και παρέχει ανίχνευση της σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος με αυξημένη ειδικότητα. Το μόριο της στρεπταβιδίνης δεν περιέχει υδατάνθρακες, γεγονός που εμποδίζει την μη ειδική σύνδεση με μόρια ανάλογα των λεκτινών που βρίσκονται σε αρκετούς ιστούς όπως νεφροί, ήπαρ, εγκέφαλος και κύτταρα όπως τα σιτευτικά. Το σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-βιοτίνης, σχηματίζει ένα πολύ σταθερό αντιδραστήριο, που μπορεί να αραιωθεί και να αποθηκευθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα και δεν δημιουργεί μη-ειδικούς ηλεκροστατικούς δεσμούς. Το μόριο της στρεπταβιδίνης δεν περιέχει υδατάνθρακες, γεγονός που εμποδίζει την μη ειδική σύνδεση με μόρια ανάλογα των λεκτινών που βρίσκονται σε αρκετούς ιστούς όπως νεφροί, ήπαρ, εγκέφαλος και κύτταρα όπως τα σιτευτικά. Το σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-βιοτίνης, σχηματίζει ένα πολύ σταθερό αντιδραστήριο, που μπορεί να αραιωθεί και να αποθηκευθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα και δεν δημιουργεί μη-ειδικούς ηλεκροστατικούς δεσμούς.

2α Πρωτόκολλο Ανοσοιστοχημείας για AR

1^η μέρα

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές:

- ✓ 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- ✓ 1 ώρα σε παραφολμαδεΰδη (parafolmadeyde, PFA) 4% στους 4°C (μονιμοποίηση των ιστών)
- ✓ 3x10 λεπτά Phosphate-buffered saline, PBS, pH 7,5 (ενδιάμεσο ξέπλυμα, περιχαράκωση(καλύτερη τοποθέτηση διαλύματος blocking και αντισώματος)
- ✓ 2x10 λεπτά PBS-Triton 0,5%
- ✓ 1 ώρα σε Blocking 10% φυσικό ορό κατσίκας (Natural Goat Serum, NGS) σε PBS-Triton 0,2% (επικάλυψη μη ειδικών θέσεων)
- ✓ επώαση με 1:200 Ab AR (N-20): sc-816, Santa Cruz Biotechnologies σε 4% NGS, PBS-Triton 0,2% για 48 ώρες στους 4°C (κάλυψη ειδικών θέσεων).

2β Πρωτόκολλο Ανοσοιστοχημείας για ERα και ERβ

1^η μέρα

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές:

- ✓ 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- ✓ 1 ώρα σε PFA 4% στους 4°C (μονιμοποίηση των ιστών)
- ✓ 3x5 λεπτά PBS Ph 7,5 (ενδιάμεσο ξέπλυμα, περιχαράκωση)
- ✓ 5 + 10 λεπτά PBS-Triton 0,4%
- ✓ 1 ώρα σε Blocking 10% NGS σε PBS-Triton 0,2% (επικάλυψη μη ειδικών θέσεων)
- ✓ επώαση με 1:200 Ab ER-α (MC-20) sc-542 και ER-β (Y-19) sc-6821, Santa Cruz Biotechnologies, αντίστοιχα σε 4% NDS, PBS-Triton 0,2% για 48 ώρες.

2^η μέρα (κοινή και για τα 3)

- ✓ Συλλογή αντισώματος για επαναχρησιμοποίηση
- ✓ 3x10 λεπτά PBS
- ✓ επώαση για 2 ώρες με το κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα 1:200 σε PBS, 2% NGS.
- ✓ 3x10 λεπτά PBS
- ✓ Επώαση για 1 ώρα με διάλυμα blocking αβιδίνης-βιοτίνης (AB) της Abcam 1:100 A και 1:100 B σε PBS.
- ✓ 3x10 λεπτά PBS
- ✓ 5 λεπτά τουλάχιστον σε διάλυμα Tris-HCl.
 - **Χρώση DAB**(3,3'-diaminobenzidine) (δίνει χαρακτηριστικό καφέ ίζημα εάν η αντίδραση ήταν επιτυχημένη)
- ◆ 10 mgDAB
- ◆ 15 mLTris
- ◆ 12 λ Υπεροξειδίου του υδρογόνου.(οξειδωση της DAB για την αντίδραση)
 - **Αφυδάτωση**

1x5 min 50% αλκοόλη

2x5 min 70% αλκοόλη

2x5 min 95% αλκοόλη

3x5 min 100% αλκοόλη

3x5 min ξυλόλη

Επικάλυψη με ξυλόλη (kalochem) και μία καλυπτρίδα.

Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν: Androgen Receptor (N-20), sc-816 Lot#G1916, rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnologies, Estrogen Receptor- α (MC-20), sc-542, Lot#C1314, rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnologies και Estrogen Receptor- β (Y-19), sc-6821, Lot#B1513, goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnologies.

3. Μορφομετρία

-Φωτογράφιση των περιοχών ενδιαφέροντος (CA1 και CA3 του ιπποκάμπου, προοπτική περιοχή υποθαλάμου, φλοιός και ραβδωτό σώμα, κεντρικός πυρήνας αμυγδαλής) με το βιολογικό μικροσκόπιο Eclipse E400 της εταιρείας Nikon (κατασκευασμένο στην Ιαπωνία). Οι φωτογραφίες πάρθηκαν στη μεγένθυση 20x.

-Καταμέτρηση των κυττάρων σε H/Y με το πρόγραμμα ImageJ. Για κάθε αντιγόνο και εγκεφαλική περιοχή, η ποσοτικοποίηση έγινε σε τουλάχιστον 3 οπτικά πεδία, ένα ανά τομή.

4. ELISA

Μία σημαντική πρόοδος, σε επίπεδο λειτουργικών μελετών, επιτεύχθηκε στην Ανοσολογία με την ανάπτυξη διαφόρων ανοσοδοκιμασιών (Immunoassays). Ορισμένες ανοσοδοκιμασίες στηρίχτηκαν στην ειδικότητα αναγνώρισης και αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός αντιγόνου και ειδικού αντισώματος. Η ενζυμική ανοσοδοκιμασία **ELISA** (ή **Δοκιμασία ΕνζυμοΣυζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης, Enzyme-linked Immunosorbent Assay**) πρωτοπεριγράφηκε από τους Engvall και Perlman το 1971 και αποτελεί μία ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μέθοδο τόσο για ερευνητικούς όσο και για διαγνωστικούς σκοπούς. Η ELISA έχει εφαρμογές στην τεχνολογία τροφίμων ώστε να εντοπιστούν αλλεργιογόνες τροφές όπως το γάλα, τα καρύδια, τα φιστίκια τα αυγά και τα αμύγδαλα. Επιπρόσθετα, η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον τομέα της τοξικολογίας για μία ταχεία και προκαταρκτική διάγνωση για ορισμένες κατηγορίες ναρκωτικών και φαρμάκων. Ακόμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για διάγνωση δυσανεξίας των τροφών, αλλά η εγκυρότητα του εν λόγω τεστ είναι αμφιλεγόμενη.

Η ELISA είναι μέθοδος υψηλής ευαισθησίας, η οποία επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων, αντιγόνων, κυτταροκινών, χημικών ουσιών, ορμονών σε βιολογικά υγρά με τη χρήση συζευγμένων με ένζυμα αντισωμάτων και χρωμογόνου υποστρώματος. Τα βασικά πλεονεκτήματά της έναντι των άλλων ανοσοδοκιμασιών είναι:

(α) κυρίως, η **υψηλότερη ευαισθησία** της και η **επαναληψιμότητά** της,

(β) η **μη χρησιμοποίηση ραδιενέργειας**, όπως στις μεθόδους RIA (Radioimmunoassay) και

(γ) στην περίπτωση χρήσης έτοιμων kits (πακέτων αντιδραστηρίων) του εμπορίου όπως στην παρούσα εργασία, **δεν απαιτείται η κατανάλωση προμηθειών του εργαστηρίου.**

Η αρχή της μεθόδου έγκειται στην ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Η ELISA αποτελεί μία ιδιαίτερα προσαρμόσιμη τεχνική δεδομένου ότι ανάλογα με την εφαρμογή, τα αντιδραστήρια και την ευαισθησία που επιδιώκεται, η μέθοδος παρουσιάζει πολλαπλές παραλλαγές, όπως η ELISA τύπου sandwich, η ανταγωνιστική ELISA, και η άμεση (ή έμμεση) ELISA. Σε όλες τις παραλλαγές της μεθόδου, τα βασικά στοιχεία που τη χαρακτηρίζουν είναι:

(1) η πρόσδεση και ακινητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεή επιφάνεια (Ανοσοπροσρόφηση, Immunosorbent),

(2) η χρήση ενζυμο-συζευγμένου (Enzyme-Linked) αντισώματος και

(3) η χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων, τα οποία μετά από αντίδραση με το ένζυμο παράγουν διαλυτό έγχρωμο προϊόν (χρώμα ή φθορισμό) επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος.

A. Πρόσδεση/Ακινητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεά επιφάνεια

(Ανοσοπροσρόφηση)

Το εξεταζόμενο αντιγόνο ή αντίσωμα αρχικά ακινητοποιείται σε στερεά επιφάνεια. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω χημικού δεσμού (προσκόλληση σε σφαιρίδια κυτταρίνης, αгарόζης, πολυακρυλαμιδίου) ή μέσω φυσικής προσρόφησης με υδρόφοβο δεσμό (προσρόφηση σε πλαστική επιφάνεια). Η πρακτική απλότητα χειρισμού των πλαστικών σκευών και η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιώντας πλάκες μικροτιτλοδότησης καθιστά τον δεύτερο τρόπο προσρόφησης ευρύτερα χρησιμοποιούμενο στις ανοσοδοκιμασίες ELISA. Μειονέκτημά του αποτελεί η διαφορά προσρόφησης του αντιγόνου ή αντισώματος που μπορεί να εμφανίζουν διαφορετικά πλαστικά σκεύη ή διαφορετικά φρεάτια του ίδιου πλαστικού σκεύους. Ωστόσο, η χρήση πρωτεϊνών για τον αποκλεισμό της μη ειδικής προσρόφησης και απορρυπαντικών κατά τις επώσεις και τις εκπλύσεις καθιστούν το προαναφερόμενο πρόβλημα αμελητέο.

B. Χρήση ενζυμο-συζευγμένου αντισώματος

Η χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων αποτελεί ένα βασικό χαρακτηριστικό της μεθόδου ELISA, σε σύγκριση με άλλες ανοσοδοκιμασίες που χρησιμοποιούν ραδιενέργεια για την ανίχνευση των προϊόντων. Η σύζευξη ενζύμων στα αντισώματα προβλέπει το σχηματισμό ενός σταθερού ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του ενζύμου και του αντισώματος, ο οποίος δεν επηρεάζει την ικανότητα του αντισώματος να

αναγνωρίζει το αντιγόνο αλλά ούτε την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου. Ένας σημαντικός αριθμός ενζύμων χρησιμοποιείται επιτυχώς στη μέθοδο ELISA, όπως η ραφανική υπεροξειδάση (HRP), η αλκαλική φωσφατάση (AP), η β-γαλακτοσιδάση (β-Gal), και διακρίνονται σε άμεσα δραστικά στο υπόστρωμα (αλκαλική φωσφατάση, β-γαλακτοσιδάση) και αυτά που δρουν έμμεσα (ραφανική υπεροξειδάση). Η επιλογή του ενζύμου εξαρτάται από την εφαρμογή της μεθόδου.

Γ. Χρήση χρωμογόνου υποστρώματος

Η ανίχνευση του εξεταζόμενου αντιγόνου ή αντισώματος πραγματοποιείται με την προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος που αντιδρά με το ένζυμο παράγοντας έγχρωμο προϊόν (φως ή φθορισμό). Η επιλογή του ζεύγους ενζύμου-υποστρώματος της χρωμογόνου αντίδρασης καθορίζει την ευαισθησία της δοκιμασίας. Παράμετροι που συντελούν στην επιλογή ενζύμου-υποστρώματος και εξασφαλίζουν την υψηλότερη ευαισθησία της δοκιμασίας είναι: (i) η ταχύτατη αντίδραση μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος προκειμένου να παράγεται έγχρωμο προϊόν σε μεγάλη ποσότητα, (ii) το έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης να ανιχνεύεται με μεγάλη ευαισθησία και (iii) η ενζυμική δραστηριότητα να μην επηρεάζεται από παράγοντες του εξεταζόμενου δείγματος.

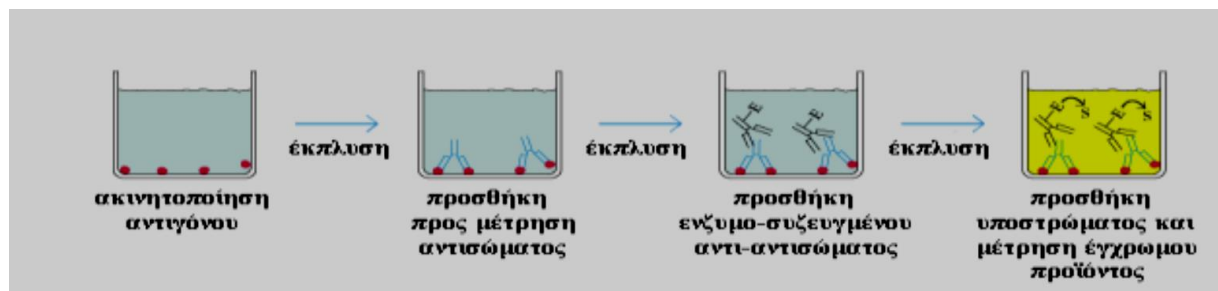
Δ. Ανίχνευση προϊόντος

Η επιλογή του ενζύμου και του υποστρώματος καθορίζουν τη μέθοδο ανίχνευσης και μέτρησης του προϊόντος της ανοσοδοκιμασίας. Θα πρέπει να τονιστεί ότι σε κάθε περίπτωση το προϊόν της ανοσοδοκιμασίας είναι διαλυτό, γεγονός που αποτελεί ιδιαίτερο και το σημαντικότερο χαρακτηριστικό της μεθόδου. Η μέτρηση του τελικού προϊόντος μπορεί να πραγματοποιηθεί με φωταύγεια, φθορισμομετρία ή χρωματομετρία. Μολονότι, η χημειοφωταύγεια παρέχει αυξημένη ευαισθησία στη δοκιμασία, οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι μέτρησης είναι οι χρωματομετρικές. Ο λόγος της ευρύτατης χρήσης τους είναι ότι παρέχουν: (1) γρήγορη οπτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων, (2) σταθερότητα του έγχρωμου προϊόντος για αρκετό χρόνο μετά τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης και (3) απλή και οικονομική μέτρηση μέσω φωτομέτρησης. Η μέτρηση του προϊόντος της χρωμογόνου αντίδρασης πραγματοποιείται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, OD)

των δειγμάτων. Βασικό ρόλο στην ακρίβεια της δοκιμασίας διαδραματίζει ο χρόνος ανάπτυξης του προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης, ο οποίος κυμαίνεται ανάλογα με την ενζυμική δράση και την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (οξέος ή βάσης). Έτσι, η ακρίβεια βασίζεται αφενός στην προσθήκη του διαλύματος τερματισμού στην κατάλληλη χρονική στιγμή και αφετέρου στην προσθήκη σταθερού όγκου του προαναφερόμενου διαλύματος.

Παραλλαγές ELISA

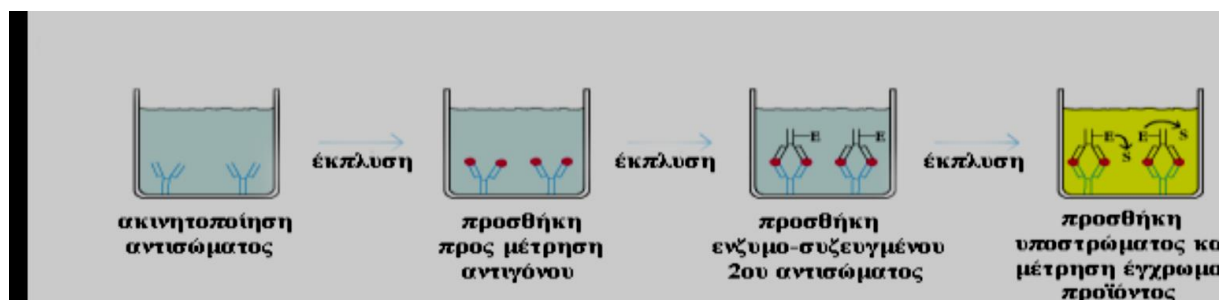
I. Έμμεση ELISA. Για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένου αντιγόνου σε βιολογικά υγρά εφαρμόζεται η παραλλαγή της έμμεσης ELISA.



Εικόνα 20 Σχηματική απεικόνιση Έμμεσης ELISA (από R.A. Goldsby, T.J. Kindt, B.A. Osborne, J. Kuby, *Immunology*).

Κατά την παραλλαγή αυτή, ακινητοποιείται το αντιγόνο στη στερεά επιφάνεια και ακολουθεί η επώαση με το εξεταζόμενο βιολογικό υγρό. Η ύπαρξη αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων στο εξεταζόμενο δείγμα ανιχνεύεται με τη χρήση ενός **αντι-αντισώματος** συζευγμένου με ένζυμο. Η ποσότητα του ενζύμου που θα προσκολληθεί στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο "αντιγόνο-αντίσωμα-ένζυμο-συζευγμένο αντι-αντίσωμα" είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του υπό εξέταση αντισώματος στο βιολογικό υγρό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν **τίτλος αντισώματος**. Η παραλλαγή αυτή εφαρμόζεται για: (α) ανίχνευση αντισωμάτων έναντι λοιμογόνων παραγόντων, όπως ο ιός HIV, (β) προσδιορισμό τίτλου αντισωμάτων μετά από εμβολιασμό ή ανοσοποίηση ζώων, (γ) ανίχνευση αυτοαντισωμάτων, (δ) ανίχνευση αντισωμάτων έναντι αλλεργιογόνων και (ε) ανίχνευση αντισωμάτων έναντι αντιγόνων, όπως στην περίπτωση της λεισμανίασης. Να σημειωθεί ότι **έμμεση** ονομάζεται η ELISA όταν χρησιμοποιείται δεύτερο αντίσωμα έναντι του πρώτου. Στην περίπτωση που υπάρχει μόνο ένα αντίσωμα, τότε ονομάζεται **άμεση**.

II. ELISA τύπου Sandwich. Για την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένου αντιγόνου σε βιολογικά υγρά εφαρμόζεται η παραλλαγή της ELISA τύπου Sandwich. Η παραλλαγή αυτή χαρακτηρίζεται από τη χρησιμοποίηση δύο διαφορετικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους του αντιγόνου.

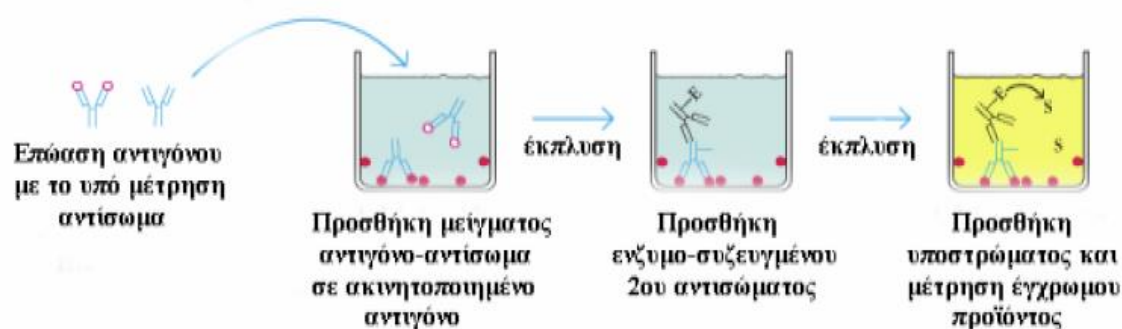


Εικόνα 21 Σχηματική απεικόνιση ELISA τύπου Sandwich (από R.A. Goldsby, T.J. Kindt, B.A. Osborne, J.Kuby, *Immunology*).

Το πρώτο αντίσωμα ακινητοποιείται στην στερεά επιφάνεια, στη συνέχεια προστίθεται το εξεταζόμενο δείγμα που περιέχει το υπό ανίχνευση αντιγόνο σε άγνωστη συγκέντρωση. Μετά την αντίδραση του πρώτου αντισώματος με το εξεταζόμενο αντιγόνο, ακολουθεί η προσθήκη του ενζυμο-συζευγμένου δευτέρου αντισώματος. Η ποσότητα του δευτέρου αντισώματος που θα προσδεθεί, άρα και ενζύμου, είναι ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου που έχει προσδεθεί στο πρώτο αντίσωμα. Στη συνέχεια, προστίθεται το κατάλληλο υπόστρωμα και μέσω ενζυμικής αντίδρασης ανιχνεύεται ποσότητα προϊόντος ανάλογη αυτής του αντιγόνου που έχει συνδεθεί με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Για την ποσοτικοποίηση των

εξεταζόμενων δειγμάτων χρησιμοποιείται καμπύλη αναφοράς που γίνεται με διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αναφοράς του αντιγόνου, δηλαδή διαλύματος που περιέχει γνωστή συγκέντρωση του αντιγόνου, και τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν σε διεθνή μονάδα συγκέντρωσης (g/l ή υποδιαίρεσεις, π.χ. ng/ml, pg/ml). Η ELISA τύπου Sandwich εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό ορμονών, κυτταροκινών, ανοσοσφαιρινών και άλλων πρωτεϊνών σε βιολογικά υγρά και σε υπερκείμενα καλλιιεργιών.

III. ELISA ανταγωνιστικού τύπου. Αν είναι απαραίτητη η ποσοτική μέτρηση του αντιγόνου αλλά διαθέτουμε μόνο ένα αντίσωμα ή το αντιγόνο δεν διαθέτει περισσότερους από έναν επιτόπους τότε εφαρμόζουμε την ανταγωνιστικού τύπου ELISA. Οι ανταγωνιστικές ELISA χαρακτηρίζονται από τον ανταγωνισμό μεταξύ διαλυτού και ακινητοποιημένου σε στερεά επιφάνεια αντιγόνου για την πρόσδεση στο αντίσωμα.



Εικόνα 22 Σχηματική απεικόνιση Ανταγωνιστικής ELISA (από R.A. Goldsby, T.J. Kindt, B.A. Osborne, J.Kuby, *Immunology*).

Το αντιγόνο σε διαλυτή μορφή αναμειγνύεται με περίσσεια ενζυμο-συζευγμένου αντισώματος. Το μείγμα επωάζεται μαζί με το ακινητοποιημένο σε στερεά επιφάνεια αντιγόνο, σε συνθήκες που επιτρέπουν να αναπτυχθεί ανταγωνισμός μεταξύ του ακινητοποιημένου και του διαλυτού αντιγόνου για την πρόσδεση με το αντίσωμα. Η ενζυμική αντίδραση είναι μέγιστη απουσία του διαλυτού αντιγόνου και μειώνεται αυξανόμενης της συγκέντρωσής του.

Για την παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το ELISA kit για μέτρηση τεστοστερόνης στο πλάσμα αίματος της Elabscience (αριθμός καταλόγου E-EL-0072 96T). Αναλυτικά, η διαδικασία, με βάση το εγχειρίδιο, έχει ως εξής:

Προβλεπόμενη χρήση

Αυτό το kit ELISA εφαρμόζεται για τον *in vitro* ποσοτικό προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της τεστοστερόνης (T) στον ορό, το πλάσμα και άλλα βιολογικά υγρά.

Ευαισθησία

Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη δόση της T είναι 0.188ng / mL. Η ευαισθησία αυτής της ανάλυσης ή το χαμηλότερο ανιχνεύσιμο όριο (lowest detectable limit, LDL) ορίστηκε ως η χαμηλότερη συγκέντρωση ορμόνης που θα μπορούσε να διαφοροποιηθεί από το μηδέν.

Εύρος ανίχνευσης

0.313-20ng / mL

Ειδικότητα

Το παρόν kit αναγνωρίζει φυσική και ανασυνδυασμένη T. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ή παρέμβαση μεταξύ T και αναλόγων. Σημείωση: Περιορισμένη από τις υπάρχουσες τεχνικές, διασταυρούμενη αντίδραση μπορεί ακόμα να υπάρξει, καθώς είναι αδύνατο για την εταιρεία παραγωγής να ολοκληρώσει τον έλεγχο διασταυρούμενης αντιδραστικότητας μεταξύ της T και όλων των αναλόγων.

Επαναληψιμότητα

Ο συντελεστής μεταβλητότητας βρέθηκε να είναι <10%.

Αποθήκευση: Όλα τα αντιδραστήρια στο kit θα πρέπει να αποθηκεύονται σύμφωνα με τις ετικέτες στα φιαλίδια. Τα αχρησιμοποίητα φρεάτια θα πρέπει να επιστραφούν στη θήκη με τη συσκευασία ξηραντικού και να σφραγιστούν ξανά κατά μήκος ολόκληρης της άκρης του φερμουάρ. Το αντιδραστήριο υποστρώματος δεν πρέπει να διατηρείται στους -20 °C (Ελέγχος!). Η έκθεση των αντιδραστηρίων σε έντονο φως πρέπει να αποφεύγεται κατά τη διαδικασία επώασης και αποθήκευσης. Όλα τα πώματα των αντιδραστηρίων θα πρέπει να συσφίγγονται για να αποφευχθεί η εξάτμιση και η μικροβιακή μόλυνση. Αν δεν αποθηκευτούν τα αντιδραστήρια σύμφωνα με τις παραπάνω οδηγίες, ενδέχεται να προκύψουν εσφαλμένα αποτελέσματα.

Αρχή δοκιμής

Το παρόν kit ELISA χρησιμοποιεί τη μέθοδο της ανταγωνιστικής ELISA. Η πλάκα μικροτιτλοδότησης που παρέχεται σε αυτό το kit έχει προ-επικαλυφθεί με T. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, η T στο δείγμα ή το πρότυπο συναγωνίζεται με μια σταθερή ποσότητα T επί του υποστηρικτή στερεής φάσης για θέσεις επί του βιοτινυλιωμένου Ab ανίχνευσης ειδικού προς την T. Περίσσειμα συμπλόκου και μη δεσμευμένο δείγμα ή πρότυπο πλένονται από την πλάκα και Αβιδίνη συζευγμένη σε υπεροξειδάση αγριοραπανίδας (HRP) προστίθεται σε κάθε φρεάτιο μικροπλακών και επωάζεται. Κατόπιν προστίθεται ένα διάλυμα υποστρώματος TMB σε κάθε φρεάτιο.

Η αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος θεικού οξέος και η αλλαγή χρώματος μετράται φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος $450 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$. Η συγκέντρωση του T στα δείγματα προσδιορίζεται με σύγκριση της OD των δειγμάτων με την πρότυπη καμπύλη.

Συλλογή και φύλαξη δειγμάτων

Τα δείγματα πρέπει να είναι διαυγή και διαφανή και να υπόκεινται σε φυγοκέντρωση για να απομακρυνθούν τα αιωρούμενα στερεά.

Πλάσμα: Συλλέξτε το πλάσμα χρησιμοποιώντας EDTA ή ηπαρίνη ως αντιπηκτικό. Φυγοκεντρίστε τα δείγματα για 15 λεπτά στα $1000 \times g$ στους $2 - 8^\circ \text{C}$ μέσα σε 30 λεπτά από τη συλλογή. Συλλέξτε το υπερκείμενο υγρό και εκτελέστε αμέσως τον προσδιορισμό. Τα δείγματα αιμόλυσης δεν είναι κατάλληλα για προσδιορισμό ELISA!

Άλλες απαιτούμενες προμήθειες

Αναγνώστης μικροπλακιδίων με φίλτρο μήκους κύματος 450 nm

Πιπέττα μεταφοράς υψηλής ακρίβειας, σωλήνες EP και άκρες (tips) μίας χρήσης πιπέτας

Επωαστήρας 37°C

Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό

Απορροφητικό χαρτί

Υποδοχή φόρτωσης για ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης

Προετοιμασία αντιδραστηρίων Φέρτε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου ($18-25^\circ \text{C}$) πριν τη χρήση.

Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (Wash Buffer) - Αραιώστε 30 mL συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης σε 750 mL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό. Βάλτε το αχρησιμοποίητο διάλυμα πίσω στους 4°C . Εάν έχουν σχηματιστεί κρύσταλλοι στο συμπύκνωμα, μπορείτε να το θερμάνετε με υδατόλουτρο 40°C (η θερμοκρασία θέρμανσης δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 50°C) και ανακατέψτε απαλά μέχρι να διαλυθούν πλήρως οι κρύσταλλοι. Το διάλυμα πρέπει να ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.

Πρότυπο (Standard) - Προετοιμάστε το πρότυπο εντός 15 λεπτών πριν τη χρήση. Φυγοκεντρίστε σε $10.000 \times g$ για 1 λεπτό και ανασυστήστε το Πρότυπο με **1.0mL** διαλύματος Προτύπου Αναφοράς & Αραιωτικού Δείγματος. Σφίξτε το καπάκι, αφήστε το να παραμείνει για 10 λεπτά και γυρίστε το ανάποδα για αρκετές φορές. Αφού διαλυθεί πλήρως, ανακατέψτε καλά με μια πιπέτα. Αυτή η ανασύσταση παράγει ένα αποθεματικό διάλυμα $20 \text{ ng} / \text{mL}$. Στη συνέχεια, κάντε σειριακές

αραιώσεις ανάλογα με τις ανάγκες (δεν επιτρέπεται η απευθείας αραιώση στα φρεάτια). Οι συνιστώμενες συγκεντρώσεις έχουν ως εξής: **20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0 ng / mL**. Εάν θέλετε να κάνετε πρότυπο διάλυμα σε συγκέντρωση 10ng / mL, θα πρέπει να πάρετε πρότυπο 0.5mL στα 20ng / mL, προσθέστε το σε ένα σωλήνα EP με 0.5mL Προτύπου Αναφοράς & Αραιωτικού Δείγματος και αναμίξτε το. Οι διαδικασίες για την προετοιμασία των υπολειπόμενων συγκεντρώσεων είναι όλες οι ίδιες. Το μη αραιωμένο πρότυπο χρησιμεύει ως το υψηλότερο πρότυπο (20ng / mL). Το Πρότυπο Αναφοράς & Αραιωτικό Δείγματος χρησιμεύει ως μηδέν (0 ng / mL). (Τα πρότυπα μπορούν επίσης να αραιωθούν σύμφωνα με την πραγματική ποσότητα, όπως 200 μ L / σωλήνα).

Βιοτινυλιωμένο Ab ανίχνευσης- Υπολογίστε την απαιτούμενη ποσότητα πριν από το πείραμα (50 μ L / φρεάτιο). Στην πραγματική προετοιμασία, θα πρέπει να προετοιμάσετε 100 ~ 200 μ L περισσότερο. Φυγοκεντρήστε το σωληνάριο με το απόθεμα πριν από τη χρήση, αραιώστε το συμπυκνωμένο βιοτινυλιωμένο Ab ανίχνευσης στην κατάλληλη συγκέντρωση χρησιμοποιώντας αραιωτικό βιοτινυλιωμένου Ab ανίχνευσης (1: 100).

Συμπυκνωμένο σύμπλοκο HRP - Υπολογίστε την απαιτούμενη ποσότητα πριν από το πείραμα (100 μ L / φρεάτιο). Στην πραγματική προετοιμασία, θα πρέπει να προετοιμάσετε 100 ~ 200 μ L περισσότερο. Αραιώστε το Συμπυκνωμένο σύμπλοκο HRP στην κατάλληλη συγκέντρωση χρησιμοποιώντας αραιωτικό σύμπλοκου HRP (1: 100).

Αντιδραστήριο υποστρώματος: Καθώς είναι ευαίσθητο στο φως και τους ρύπους, δεν πρέπει να ανοίγετε το φιαλίδιο μέχρι να το χρειαστείτε! Η απαραίτητη δοσολογία του αντιδραστήριου μπορεί να αναρροφηθεί με αποστειρωμένα άκρα και το μη χρησιμοποιημένο εναπομείναν αντιδραστήριο δεν πρέπει να απορρίπτεται πίσω στο φιαλίδιο και πάλι.

Σημείωση: Μην προετοιμάζετε το αντιδραστήριο απευθείας στα φιαλίδια αραιωτικού που παρέχονται στο κιτ. Το μολυσμένο νερό ή το δοχείο για την προετοιμασία του αντιδραστήριου θα επηρεάσει το αποτέλεσμα.

Διαδικασία πλύσης:

1. **Αυτόματο πλύσιμο:** Προσθέστε 350 μ L ρυθμιστικό πλύσης σε κάθε φρεάτιο, το διάστημα μεταξύ ένεσης και αναρρόφησης θα πρέπει να ρυθμιστεί σε περίπου 60s.
2. **Χειροκίνητη πλύση:** Προσθέστε 350 μ L ρυθμιστικό πλύσης σε κάθε φρεάτιο, βυθίστε το για 1 ~ 2 λεπτά. Μετά την τελευταία πλύση, αποχύστε τυχόν υπόλοιπο ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης αναστρέφοντας την πλάκα και στεγνώνοντας τη, χτυπώντας την σθεναρά σε καθαρό απορροφητικό χαρτί πάνω σε μια σκληρή επιφάνεια.

Διαδικασία ανάλυσης

Φορτώστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση. Φυγοκεντρήστε ξανά το δείγμα μετά την απόψυξη πριν από τη δοκιμασία.

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αναμειγνύονται προσεκτικά με ελαφρά περιστροφή πριν από τη χορήγηση με πιπέτα. Αποφύγετε τον αφρισμό.

Συνιστάται όλα τα δείγματα και τα πρότυπα να αναλύονται εις διπλούν.

1. Προσθέστε δείγμα και βιοτινυλιωμένο Ab ανίχνευσης: Προσθέστε 50 μl προτύπου, τυφλού ή δείγματος ανά φρεάτιο. Το τυφλό φρεάτιο προστίθεται με Πρότυπο Αναφοράς & Αραιωτικό Δείγματος. Προσθέστε αμέσως 50 μl διαλύματος εργασίας βιοτινυλιωμένου Ab ανίχνευσης σε κάθε φρεάτιο. Καλύψτε με σφραγιστικό πλακών. Χτυπήστε απαλά την πλάκα για να εξασφαλίσετε την καλή ανάμιξη. Επώαστε για 45 λεπτά στους 37 ° C. (Τα διαλύματα προστίθενται στον πυθμένα της μικροπλάκας ELISA, αποφεύγετε να αγγίζετε το εσωτερικό τοίχωμα και τον αφρισμό όσο το δυνατόν περισσότερο).

2. Πλύση: Αναρροφήστε κάθε φρεάτιο και πλύνετε, επαναλαμβάνοντας τη διαδικασία τρεις φορές. Πλύνετε γεμίζοντας κάθε πηγάδι με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (περίπου 350 μl) με τη χρήση μίας φιάλης ψεκασμού, μιας πιπέτας πολλαπλών καναλιών, διανομέας πολλαπλών καναλιών ή αυτοματοποιημένου πλυντηρίου. Η πλήρης απομάκρυνση του υγρού σε κάθε βήμα είναι απαραίτητη για την καλή απόδοση. Μετά την τελευταία πλύση, αφαιρέστε τυχόν υπόλειμμα ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης με αναρρόφηση ή απόχυση. Αναποδογυρίστε την πλάκα και χτυπήστε τη πάνω στο παχύ καθαρό απορροφητικό χαρτί.

3. Σύμπλοκο HRP: Προσθέστε 100 μl διαλύματος εργασίας συμπλόκου HRP σε κάθε φρεάτιο. Καλύψτε με ένα νέο σφραγιστικό πλάκας. Επώαστε επί 30 λεπτά στους 37 ° C.

4. Πλύσιμο: Επαναλάβετε τη διαδικασία αναρρόφησης / πλύσης πέντε φορές όπως εκτελέστηκε στο βήμα 4.

5. Υπόστρωμα: Προσθέστε 90 μl διαλύματος υποστρώματος σε κάθε φρεάτιο. Καλύψτε με ένα νέο σφραγιστικό πλάκας. Επώαστε για περίπου 15 λεπτά στους 37 ° C. Προστατεύστε από το φως. Ο χρόνος αντίδρασης μπορεί να μειωθεί ή να επεκταθεί σύμφωνα με την πραγματική αλλαγή χρώματος, αλλά όχι περισσότερο από 30 λεπτά. Όταν εμφανίζεται εμφανές κλινές χρώματος στα φρεάτια με τα πρότυπα διαλύματα, μπορείτε να τερματίσετε την αντίδραση.

6. Τερματισμός: Προσθέστε 50 μl διαλύματος τερματισμού σε κάθε φρεάτιο. Το χρώμα γίνεται αμέσως κίτρινο. Η σειρά προσθήκης του διαλύματος τερματισμού θα πρέπει να είναι ίδια με τη σειρά προσθήκης του διαλύματος υποστρώματος.

7. Μέτρηση OD: Καθορίστε την οπτική πυκνότητα (τιμή OD) κάθε φρεατίου ταυτόχρονα, χρησιμοποιώντας έναν αναγνώστη μικροπλάκων που έχει ρυθμιστεί στα 450 nm. Θα πρέπει να ανοίξετε τον αναγνώστη μικροπλάκων εκ των προτέρων, να προθερμάνετε το όργανο και να ρυθμίσετε τις παραμέτρους ελέγχου.

8. Μετά το πείραμα, τοποθετήστε όλα τα μη χρησιμοποιημένα αντιδραστήρια πίσω στο ψυγείο σύμφωνα με την καθορισμένη θερμοκρασία αποθήκευσης κατ’

αντιστοιχία μέχρι τη λήξη τους.

Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Υπολογίστε τον μέσο όρο των διπλών αναγνώσεων για κάθε πρότυπο και τα δείγματα. Δημιουργήστε μια πρότυπη καμπύλη σχεδιάζοντας τη μέση τιμή OD για κάθε πρότυπο στον άξονα y σε σχέση με τη συγκέντρωση στον άξονα x και σχεδιάστε την καμπύλη που ταιριάζει καλύτερα στα σημεία του γραφήματος. Συνιστάται να χρησιμοποιήσετε κάποιο επαγγελματικό λογισμικό για να κάνετε αυτόν τον υπολογισμό, όπως το curve expert 1.3. Με το λογισμικό, θα υπολογιστεί η καλύτερη εξίσωση προσαρμογής της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιώντας τιμές OD και συγκεντρώσεις προτύπου (γνωστού) δείγματος. Το λογισμικό θα υπολογίσει τη συγκέντρωση των δειγμάτων αφού εισάγετε την τιμή OD των δειγμάτων. Εάν τα δείγματα έχουν αραιωθεί, η συγκέντρωση που υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη πρέπει να πολλαπλασιάζεται επί τον συντελεστή αραιώσης. Αν η OD του δείγματος ξεπεράσει το ανώτερο όριο της πρότυπης καμπύλης, θα πρέπει να το δοκιμάσετε ξανά μετά από κατάλληλη αραιώση. Η πραγματική συγκέντρωση είναι το γινόμενο της συγκέντρωσης που υπολογίζεται επί τον συντελεστή αραιώσης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1. Προσθήκη προτύπου ή δείγματος 50 μL σε κάθε φρεάτιο.
2. Προσθήκη άμεσα 50 μL βιοτινυλιωμένου Ab ανίχνευσης σε κάθε φρεάτιο.
3. Επώαση για 45 λεπτά στους 37 ° C.
4. Αναρρόφηση και πλύση 3 φορές.
5. Προσθήκη 100 μL συμπλόκου HRP σε κάθε φρεάτιο. Επώαση για 30 λεπτά στους 37 ° C.
6. Αναρρόφηση και πλύση 5 φορές.
7. Προσθήκη 90 μL αντιδραστηρίου υποστρώματος. Επώαση για 15 λεπτά στους 37 ° C.
8. Προσθήκη 50 μL διαλύματος τερματισμού. Ανάγνωση άμεσα στα 450nm.
9. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων.

([https://www.elabscience.com/p-t\(testosterone\)_elisa_kit-17620.html](https://www.elabscience.com/p-t(testosterone)_elisa_kit-17620.html))

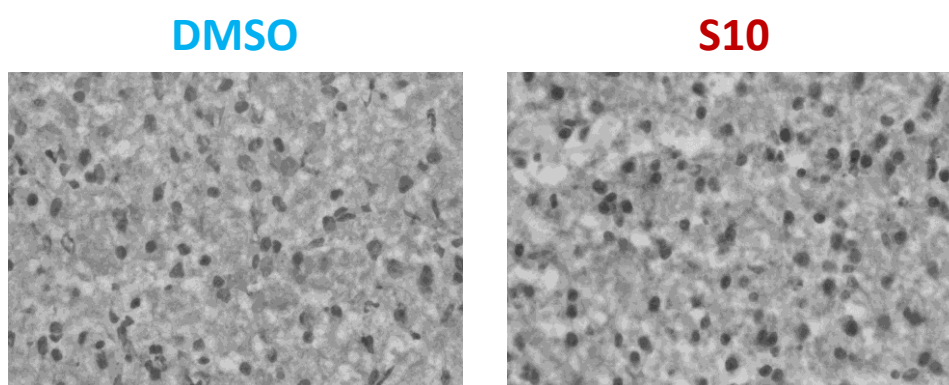
5. Στατιστική επεξεργασία

Για τη διενέργεια της στατιστικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS 22 (Windows). Οι δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν ήταν η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης (με ανεξάρτητη μεταβλητή την πειραματική ομάδα) και η post-hoc στατιστική δοκιμασία Dunnett. Το όριο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5% ($p < 0.05$).

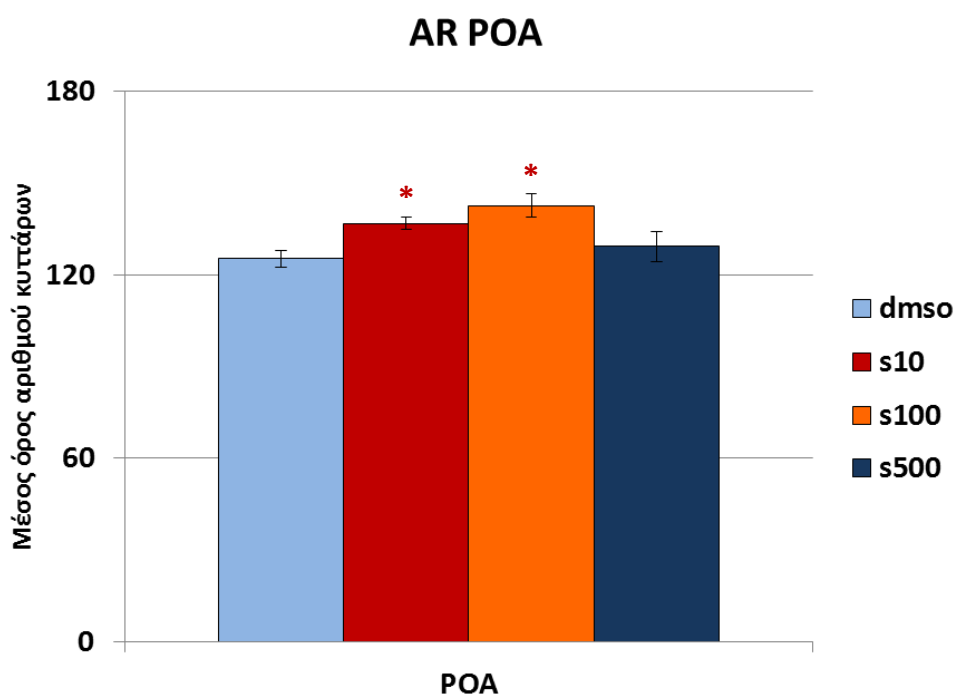
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον εντοπισμό των υποδοχέων ανδρογόνων (AR) και οιστρογόνων-τύπου α (ERα) με την τεχνική της Ανοσοϊστοχημείας, έπειτα από στατιστική επεξεργασία και στις περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, παραθέτονται και φωτογραφίες.

1 Κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα ανδρογόνων (AR) και εντοπίζονται στην προοπτική περιοχή (POA)



Εικόνα 23. Κύτταρα της προοπτικής περιοχής ανοσοθετικά για τον υποδοχέα ανδρογόνων (AR).

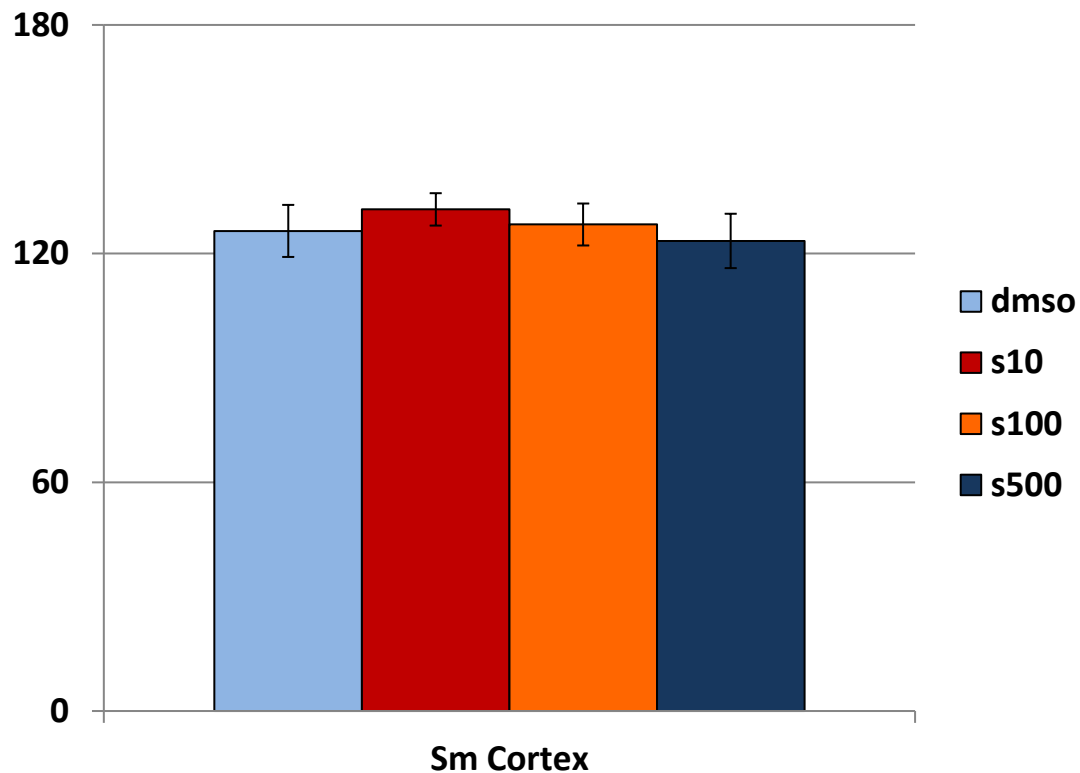


Γράφημα 1. Μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα αριθμού κυττάρων που εκφράζουν τον

υποδοχέα AR στην προοπτική περιοχή (POA) για κάθε μία από τις τέσσερις ομάδες ζώων (DMSO, S10, S100 και S500). * vs. dmsο $p < 0.05$

Όπως φαίνεται στο γράφημα, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά του μέσου όρου των ομάδων s10 και s100 (σε σχέση με την ομάδα ελέγχου DMSO) όπως φάνηκε σε ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης ($F=6.604$, $p=0.002$) καθώς και σε τεστ Dunnet ($p_{S10}=0.044$, $p_{S100}=0.001$).

2 Κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα ανδρογόνων (AR) και εντοπίζονται στον σωματοαισθητικό φλοιό (somatosensory cortex)



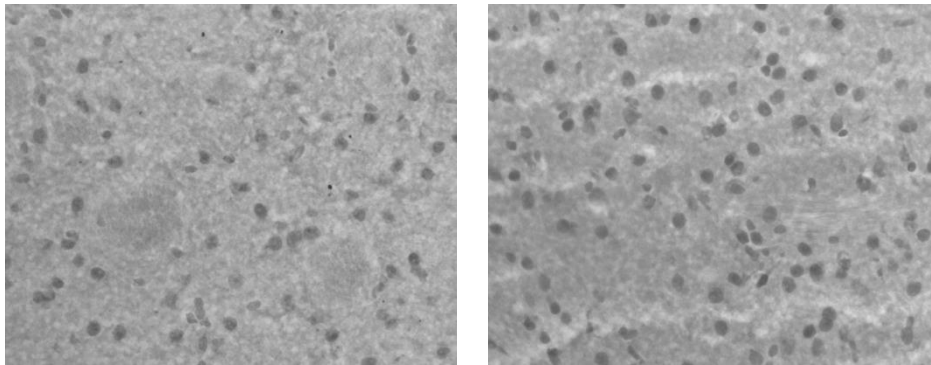
Γράφημα 2. Μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα αριθμού κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα AR στον σωματοαισθητικό φλοιό (somatosensory cortex) για κάθε μία από τις τέσσερις ομάδες ζώων (DMSO, S10, S100 και S500).

Εδώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. ($F=0.220$, $p=0.882$).

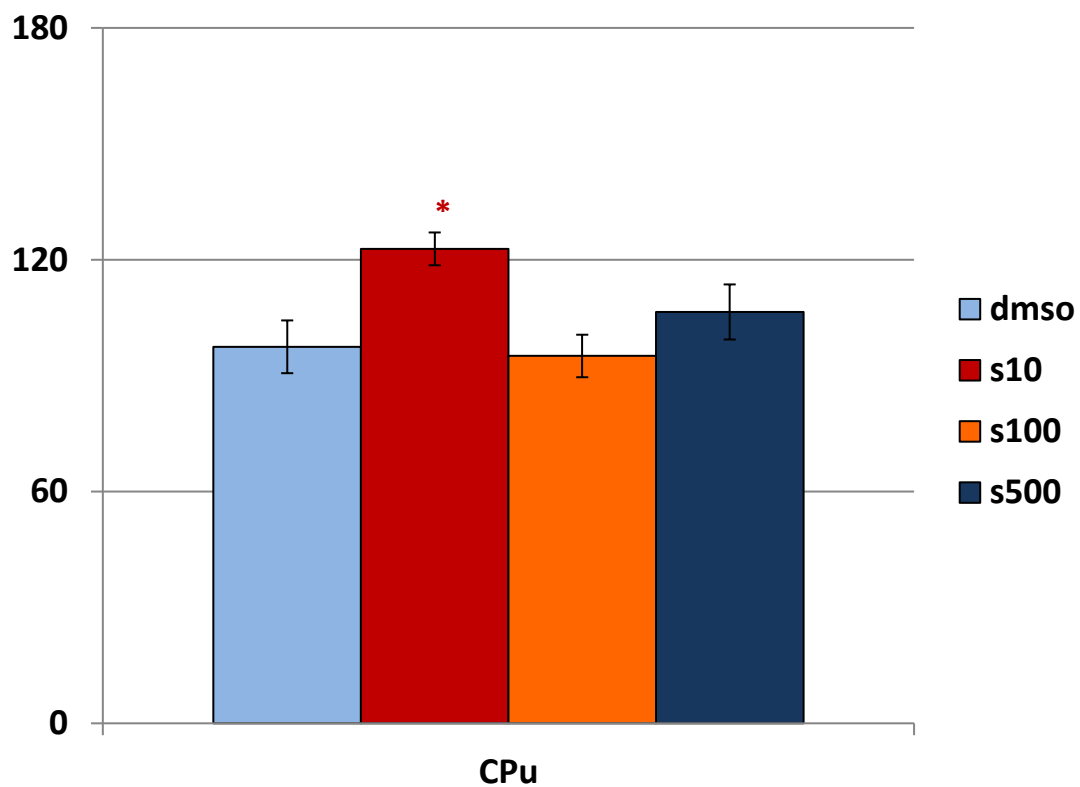
3 Κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα ανδρογόνων (AR) και εντοπίζονται στο ραβδωτό σώμα (CPu/striatum)

DMSO

S10



Εικόνα 24. Κύτταρα στο ραβδωτό σώμα ανοσοθετικά για τον υποδοχέα ανδρογόνων (AR).



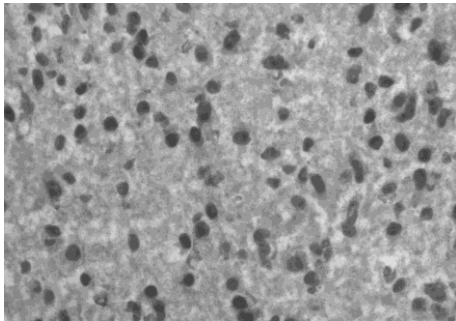
Γράφημα 3. Μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα αριθμού κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα AR στο ραβδωτό σώμα (CPu/striatum) για κάθε μία από τις τέσσερις

ομάδες ζώων (DMSO, S10, S100 και S500). * vs. dmsο $p < 0.05$

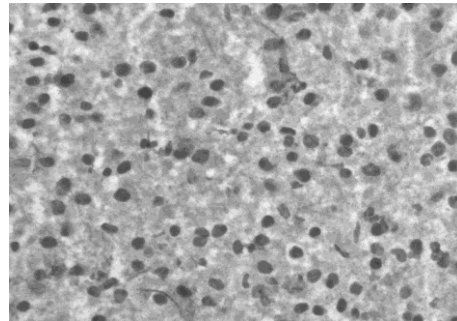
Εδώ έχουμε στατιστικά σημαντική διαφορά για την ομάδα s10 συγκριτικά με την ομάδα DMSO που επιβεβαιώνεται και πάλι από τη στατιστική δοκιμασία ($F=6.598$, $p=0.02$, $p_{s10}=0.01$ στο τεστ Dunnett).

4 Κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων άλφα (ERα) και εντοπίζονται στην προοπτική περιοχή (POA) του υποθαλάμου

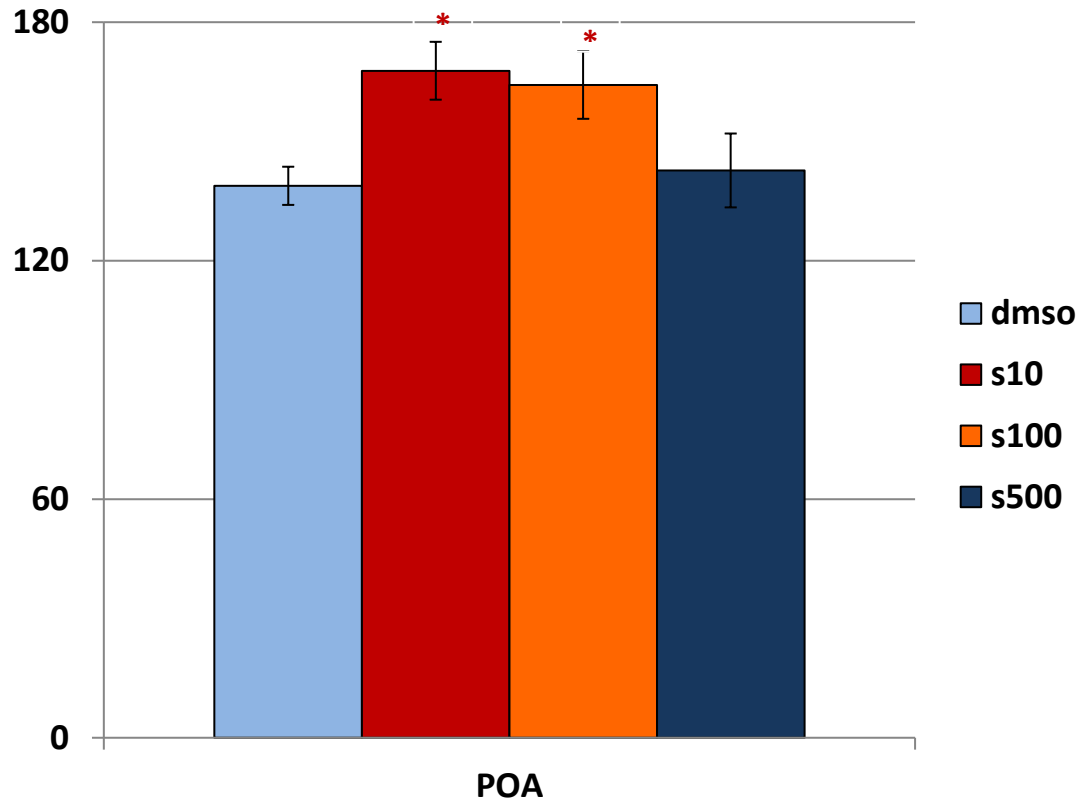
DMSO



S10



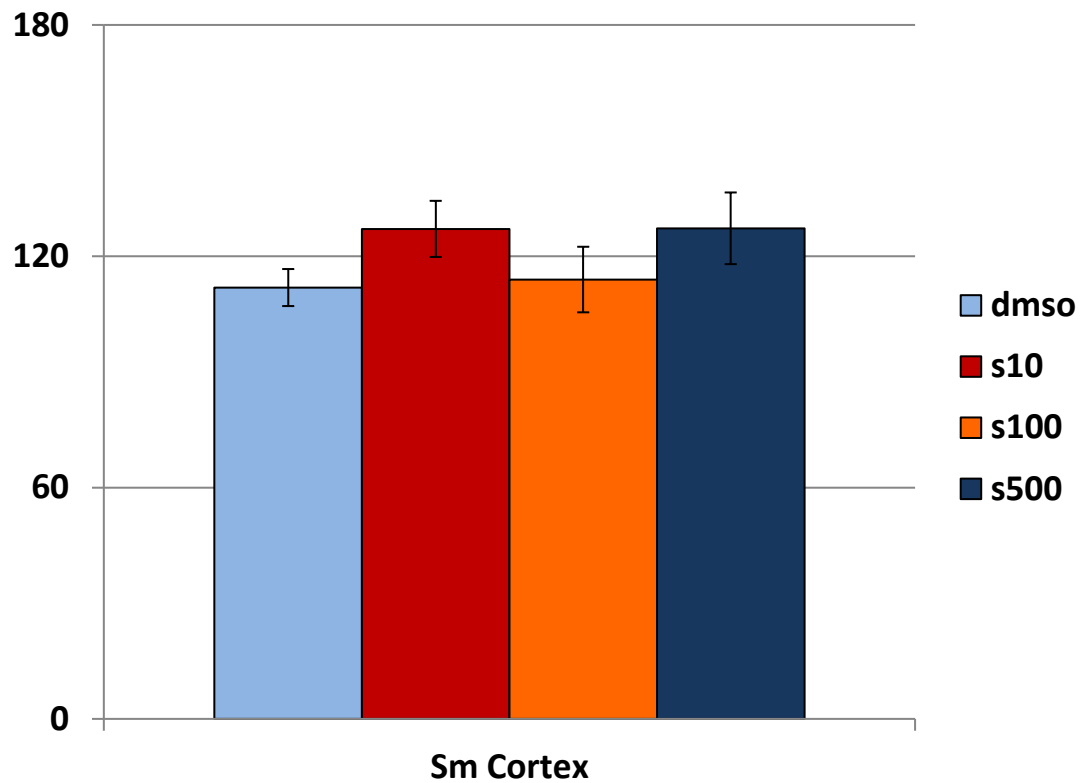
Εικόνα 25. Κύτταρα της προοπτικής περιοχής ανοσοθετικά για τον υποδοχέα οιστρογόνων τύπου α (ERα).



Γράφημα 4. Μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα αριθμού κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα ERα στην προοπτική περιοχή (POA) του υποθαλάμου για κάθε μία από τις τέσσερις ομάδες ζώων (DMSO, S10, S100 και S500). * vs. dms $p < 0.05$

Παρατηρούμε σημαντική διαφορά στις ομάδες s10 και s100, την οποία επιβεβαιώνουν τα δεδομένα στατιστικής ανάλυσης ($F=5.064$, $p=0,008$) και του τεστ Dunnett ($p_{s10}=0.009$, $p_{s100}=0.42$).

5 Κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων άλφα (ERα) και εντοπίζονται στον σωματοαισθητικό φλοιό (somatosensory cortex)



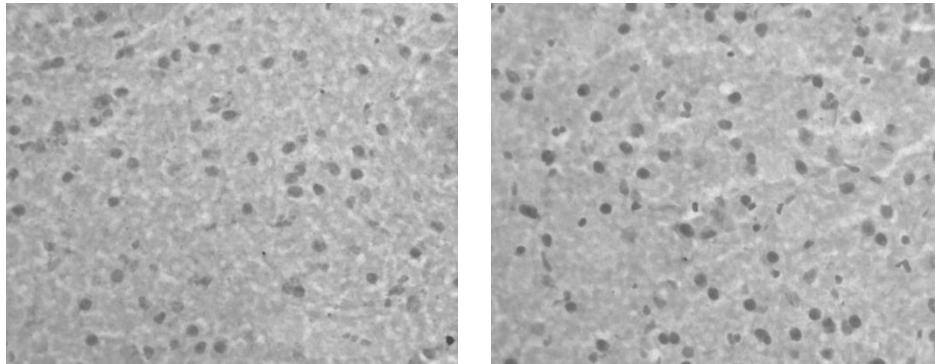
Γράφημα 7 Μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα αριθμού κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα ERα στο σωματοαισθητικό φλοιό (somatosensory cortex) για κάθε μία από τις τέσσερις ομάδες ζώων (DMSO, S10, S100 και S500).

Όπως και για τον AR, δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφορά σε αυτήν την περιοχή.

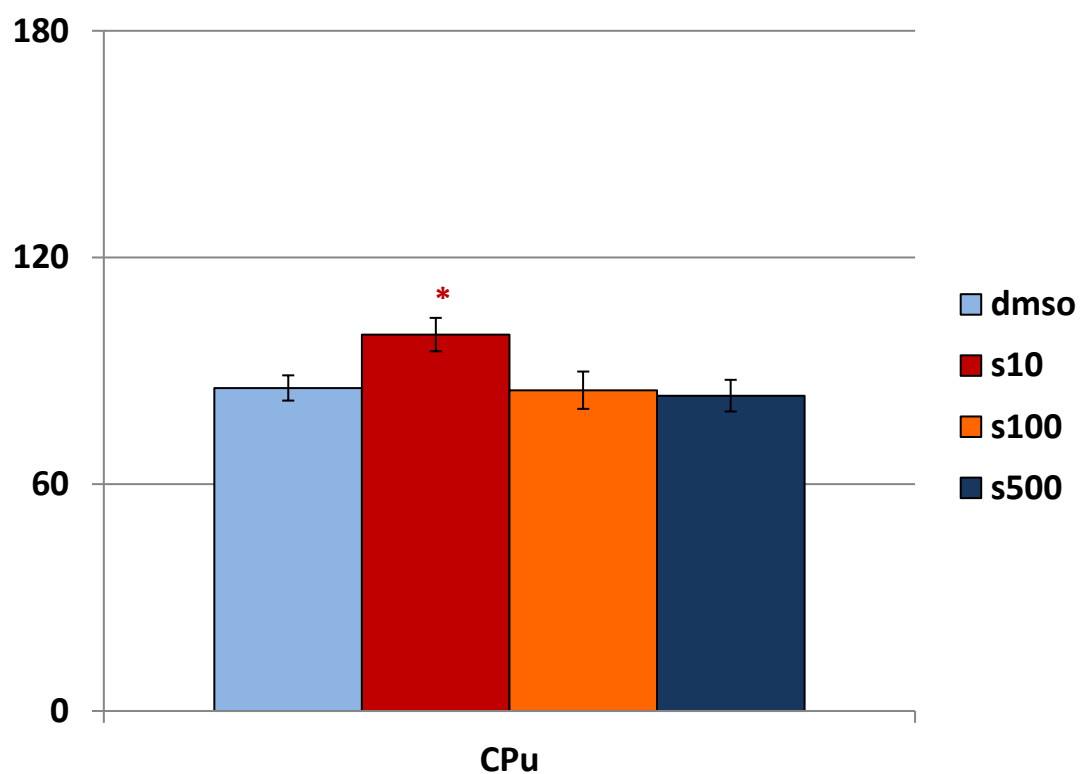
6 Κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων άλφα (ERα) και εντοπίζονται στο ραβδωτό σώμα (CPu/striatum)

DMSO

S10



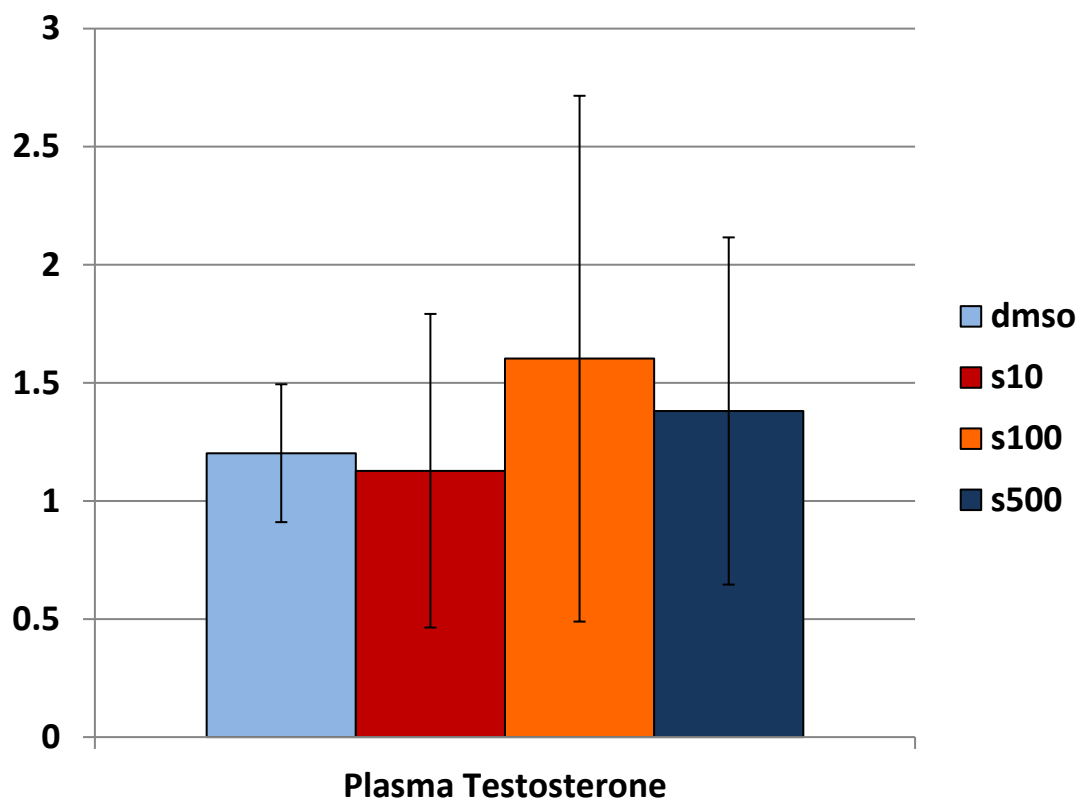
Εικόνα 26. Κύτταρα στο ραβδωτό σώμα ανοσοθετικά για τον υποδοχέα οιστρογόνων τύπου α (ERα).



Γράφημα 6. Μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα αριθμού κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα ERα στο ραβδωτό σώμα (CPu/striatum) για κάθε μία από τις τέσσερις ομάδες ζώων (DMSO, S10, S100 και S500). * vs. dms0 $p < 0.05$

Και πάλι η ομάδα s10 παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση σε αυτήν την περιοχή, συγκριτικά με την ομάδα DMSO όπως και για τον AR, όπως δείχνουν ($F=3.589$, $p=0.027$) και Dunnett ($p_{s10}=0.037$).

7 Τεστοστερόνη (T) πλάσματος



Γράφημα 7. Μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα επιπέδων τεστοστερόνης στο πλάσμα αίματος (OD) για κάθε μία από τις τέσσερις ομάδες ζώων (DMSO, S10, S100 και S500).

Τέλος, παρατίθεται το γράφημα για την τεστοστερόνη πλάσματος, η οποία προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ELISA. Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδά της μεταξύ των τεσσάρων ομάδων ζώων. Αξιοσημείωτη είναι η μεγάλη διακύμανση των τιμών μεταξύ των ζώων κάθε ομάδας.

7. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας έδειξαν ότι, έπειτα από χορήγηση μίγματος φθαλικών εστέρων κατά την εμβρυϊκή ζωή, παρατηρείται σημαντική διαφορά στον

αριθμό των κυττάρων που είναι ανοσοθετικά για τους ανδρογονικούς ή τους οιστρογονικούς υποδοχείς σε δύο από τις τρεις εγκεφαλικές περιοχές των πειραματόζωων που εξετάστηκαν. Αναλυτικότερα, στην προοπτική περιοχή (POA) του υποθαλάμου διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων, τόσο του υποδοχέα ανδρογόνων (AR) όσο και του άλφα οιστρογονικού υποδοχέα (ERα) στις ομάδες s10 και s100. Στο ραβδωτό σώμα (CPu) παρατηρήθηκε αύξηση και για τους δύο τύπους υποδοχέων, αλλά μόνο στην ομάδα s10, ενώ στον σωματοαισθητικό φλοιό δεν ανιχνεύθηκε κάποια σημαντική μεταβολή για κανέναν από τους υποδοχείς. Να σημειωθεί ότι η μεγαλύτερη αλλαγή στα επίπεδα υποδοχέων εντοπίστηκε στην προοπτική περιοχή, τόσο για τον AR όσο και για τον ERα. Τέλος, η τεστοστερόνη (T) πλάσματος δεν έδειξε κάποια σημαντική μεταβολή μετά από προσδιορισμό της με τη δοκιμασία ELISA.

Όσον αφορά την ομάδα ελέγχου (control group) DMSO, τα σχετικά επίπεδα του υποδοχέα AR στις διάφορες εγκεφαλικές περιοχές συμφωνούν με τη μέχρι τώρα βιβλιογραφία με την προοπτική περιοχή (POA) και σωματοαισθητικό φλοιό να κυμαίνονται γενικά σε ίδια επίπεδα και το ραβδωτό σώμα να έπεται (Simerly et al., 1990, Lu et al., 1998). Συμφωνούν επίσης και τον υποδοχέα ERα, με την POA να έχει τα υψηλότερα επίπεδα, τον σωματοαισθητικό φλοιό να ακολουθεί και τελευταίο το CPu (Simerly et al., 1990, Mitra et al., 2003). Οι περισσότερες γνώσεις προέρχονται από μελέτες σε ποντίκια και αρουραίους νεαρής σχετικά ηλικίας.

Η έκθεση στους ενδοκρινικούς διαταράκτες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης έχει συνδεθεί με επιβλαβή αποτελέσματα στο Αναπαραγωγικό και το Νευρικό Σύστημα των ζώων και των ανθρώπων καθώς και τον μεταβολισμό. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι φθαλικές ενώσεις μπορούν να δράσουν ως ενδοκρινικοί διαταράκτες (ΕΔ) και να προκαλέσουν μειωμένη γονιμότητα, ελαττωματική ανάπτυξη του εμβρύου, ορμονική διαταραχή και δυσμορφίες του αναπαραγωγικού συστήματος ιδιαίτερα στα αγόρια (Bay et al., 2006, Fisher 2004). Επίσης, οι ενώσεις αυτές μπορεί να βλάψουν το αναπνευστικό σύστημα, το ήπαρ, τα νεφρά και την καρδιά (Bornehag et al., 2004). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ακόμα τα καρκινογόνα δράση που εμφανίζουν οι φθαλικοί εστέρες (David et al., 1999). Οι ΕΔ μπορούν να διαφοροποιήσουν την παραγωγή ή τον μεταβολισμό μιας ορμόνης μιμούμενοι τις φυσικές ορμόνες και έχουν επιπτώσεις κυρίως στις στεροειδείς ορμόνες και τις ορμόνες του θυρεοειδούς. Πιο συγκεκριμένα, οι ΕΔ μπορούν να διαταράξουν το ορμονικό σύστημα με πολλούς τρόπους, (α) να μιμηθούν μια ορμόνη και να

δεσμευτούν στον υποδοχέα της και να παράγουν την ίδια απάντηση στο σώμα με αυτή που έχει η φυσική ορμόνη, (β) να δεσμευθούν σε έναν υποδοχέα και να τον αναστείλουν, έτσι ώστε η φυσική ορμόνη να μην μπορεί να δεσμευτεί σε αυτόν και (γ) να αλλάξουν την παραγωγή ή τον μεταβολισμό μιας ορμόνης. Επειδή οι ορμόνες ρυθμίζουν πολλές διαφορετικές λειτουργίες του οργανισμού, οποιαδήποτε διαταραχή θα έχει επιπτώσεις στις ρυθμιστικές λειτουργίες του σώματος, με αποτέλεσμα δυσμενείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Ιδιαίτερα ανησυχητικό είναι στα έμβρυα και τα μικρά παιδιά, στα οποία η ανάπτυξη πολλών ιστών και οργάνων (Νευρικό Σύστημα και εγκέφαλος, Αναπαραγωγικό και Ανοσοποιητικό Σύστημα & Μεταβολισμός) ελέγχεται από τις στεροειδείς ορμόνες και τις ορμόνες του θυρεοειδή. Πιθανολογείται ότι οι οιστρογονικές χημικές ουσίες είναι εν μέρει αρμόδιες για τις αυξανόμενες διαταραχές του ανδρικού Αναπαραγωγικού Συστήματος στους ανθρώπους κατά τα τελευταία 50 χρόνια, αφού συμπίπτουν με την απελευθέρωση αυτών των ουσιών στο περιβάλλον.

Η υπάρχουσα βιβλιογραφία διευκρινίζει ότι οι ενδοκρινικοί διαταράκτες μπορεί να ενεργήσουν ως οιστρογόνα, αντιοιστρογόνα, αντιανδρογόνα, στεροϊδικοί ενζυμικοί ανασταλτικοί παράγοντες και μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσουν με τις ορμόνες του θυρεοειδή και τους υποδοχείς τους, μέσα στον εγκέφαλο και το βασικό άξονα υποθάλαμο-υπόφυση-γονάδες, καθώς επίσης και στο Ανοσοποιητικό Σύστημα (Jobling et al., 1995, Kim et al., 2004) Ορισμένοι φθαλικοί εστέρες, οι οποίοι μειώνουν τη σύνθεση ανδρογόνων, δοκιμαζόμενοι σε έγκυα θηλυκά πειραματόζωα, προκαλούν το σύνδρομο γοναδικής δυσγενεσίας στον αρσενικό απόγονο. Αυτό εμφανίζεται, όχι λόγω οποιασδήποτε εγγενούς ορμονικής δραστηριότητας των φθαλικών εστέρων, αλλά επειδή μπορούν να καταστείλουν την ενδογενή παραγωγή τεστοστερόνης από τους όρχεις του εμβρύου, παρεμποδίζοντας κατά συνέπεια τη σεξουαλική διαφοροποίηση. Οι γονάδες του εμβρύου διαφοροποιούνται ενδομητρίως. Οι όρχεις αναπτύσσονται γρηγορότερα στο αρσενικό έμβρυο από ό,τι οι ωθήκες στο θηλυκό, εξασφαλίζοντας γρηγορότερα την παραγωγή της τεστοστερόνης, διότι έχει μεγάλη σημασία ο χρόνος παραγωγής της. Αν αυτή δεν παραχθεί την κατάλληλη χρονική στιγμή, τότε το έμβρυο εκτίθεται σε υψηλά επίπεδα οιστρογόνου από τον πλακούντα, με αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού κυττάρων Sertoli, την ανεπιτυχή ανάπτυξη των αρσενικών αναπαραγωγικών οργάνων, όπως είναι η κρυψορχία, η υποσπαδία, μειωμένο ορχικό βάρος, μειωμένα σπερματικά επίπεδα και υπογονιμότητα στην ενήλικη ζωή, καθώς και μια αύξηση των ορχικών όγκων. Έχει

αποδειχθεί ότι ο φθαλικός δι-βουτυλεστέρας DBP και το φθαλικό δι-αιθυλεξυλίο DEHP είναι σε θέση να καταστείλουν την παραγωγή της τεστοστερόνης στους εμβρυϊκούς όρχεις αρουραίων (Howdeshell et al., 2008).

Οι φθαλικές ενώσεις φαίνεται ότι επηρεάζουν καθοριστικά και την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) του εμβρύου, η οποία αρχίζει από πολύ νωρίς, ήδη από το πρώτο τρίμηνο της κύησης στους ανθρώπους. Τα μέχρι τώρα επιστημονικά δεδομένα δεικνύουν ότι οι φθαλικοί εστέρες πιθανόν να διαταράσσουν τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών (Huang et al., 2007) καθώς και την ιστική δομή των ίδιων των αδένων, με επιπτώσεις στην οργανογένεση και στον προγραμματισμό της ανάπτυξης και του μεταβολισμού (Hinton et al., 1986). Αρκετές μάλιστα μελέτες περιγράφουν πιθανή ανταγωνιστική δράση των συγκεκριμένων ουσιών με τη λειτουργία του θυρεοειδούς αδένα, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (Sugiyama et al., 2005, Pereira et al., 2007). Η δυσλειτουργία του θυρεοειδούς αδένα της μητέρας κατά τα πρώτα στάδια της κυοφορίας, ακόμη και χωρίς εμφανή κλινική συμπτωματολογία, μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς την ανάπτυξη του ΚΝΣ του εμβρύου με αποτέλεσμα την πρόκληση σοβαρών νευρολογικών παθήσεων όπως κώφωση, νοητική υστέρηση, εγκεφαλική δυσλειτουργία, με συνοδές διαταραχές της κινητικότητας (Haddow et al., 1999). Αντίστοιχη αρνητική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων του μονο-2-αιθυλεξυλικού φθαλικού εστέρα (MEHP), των επιπέδων της θυροξίνης (T4) και της ελεύθερης θυροξίνης (FT4) έχει παρατηρηθεί και στο ανδρικό φύλο (Meeker et al., 2007) υποδεικνύοντας ότι οι φθαλικοί εστέρες μπορεί να διαταράζουν τη θυρεοειδική λειτουργία όχι μόνο των γυναικών αλλά και των ανδρών.

Ορισμένα φθαλικά που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή PVC, βρέθηκε ότι δεσμεύονται επίσης από υποδοχείς οιστρογόνων και προκαλούν ατροφία του σπερματικού επιθηλίου και της σπερματογένεσης σε πειραματόζωα. Χορήγηση DHEP είχε ως αποτέλεσμα μείωση της έκφρασης του AR και ERα mRNA στην ωοθήκη ενήλικων αρουραίων που αποδόθηκε στα μειωμένα επίπεδα των αντίστοιχων στεροειδών ορμονών (ο ERα εκτός από την ομόλογη ρύθμιση με οιστρογόνα ρυθμίζεται και από την FSH και την προγεστερόνη που επίσης βρέθηκαν μειωμένες). Μεγαλύτερες δόσεις DEHP είχαν αντίστροφα αποτελέσματα για τους ERα και ERβ (Somasundaram et al., 2016).

Οι φθαλικές ενώσεις αναστέλλουν τους υποδοχείς των ανδρογόνων, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη γυναικείων χαρακτηριστικών. Ποντίκια στα

οποία χορηγήθηκε DHEP παρουσίασαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις τεστοστερόνης στην κυκλοφορία και εμφάνιζαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα ανδρογόνων στον εγκέφαλο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Barakat et al., 2018). Οι αγχώδεις συμπεριφορές και οι μειωμένες αποδόσεις σε αντίληψη και μνήμη αποδόθηκαν σε αποδόμηση νευρώνων του ιπποκάμπου λόγω οξειδωτικού στρες. Εμείς δεν παρατηρήσαμε σημαντικές μεταβολές στην τεστοστερόνη της κυκλοφορίας πιθανότατα λόγω του ότι δεν χρησιμοποιήσαμε τον συγκεκριμένο φθαλικό εστέρα.

Μία μελέτη σε εμβρυονική κυτταρική σειρά ανθρώπινου ήπατος αναφέρει ότι, σε γενικές γραμμές, οι φθαλικές ενώσεις προκαλούν ενεργοποίηση των οιστρογονικών υποδοχέων άλφα και βήτα και καταστολή του υποδοχέα ανδρογόνων, ενώ οι μεταβολίτες τους δεν έχουν κάποια επίδραση (Engel et al., 2017). Οι περισσότερες ουσίες από αυτές που δοκιμάστηκαν ενεργούν στους υποδοχείς οιστρογόνων σε σχέση με άλλους υποδοχείς. Εκτός από αυτές τις δύο κατηγορίες υποδοχέων, φθαλικές ενώσεις (συγκεκριμένα, το δι-βουτυλ-φθαλικό και το δι-ισοβουτυλ-φθαλικό) έδειξαν ενεργότητα αγωνιστή για τους υποδοχείς PPARs (Peroxisome Proliferation-Activated Receptor) άλφα και γάμμα (Pereira-Fernandes et al., 2013). Οι υποδοχείς αυτοί είναι πυρηνικοί, λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες και διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση, την ανάπτυξη, τον μεταβολισμό καθώς και την ογκογένεση στους ανώτερους οργανισμούς. Τέλος, οι φθαλικές ενώσεις είναι δυνατόν να επάγουν οξειδωτικό στρες με το να αλλοιώνουν την έκφραση και λειτουργία σημαντικών για την αντιοξειδωτική άμυνα ενζύμων όπως η δεσμουτάση του σουπεροξειδίου SOD, η καταλάση CAT και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης GPX (Wang et al., 2012).

Πιο αναλυτικά όσον αφορά τα επίπεδα των υποδοχέων, αρκετές *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι φθαλικές ενώσεις όπως ο φθαλικός δι-κ-βουτυλεστέρας (DBP) και ο φθαλικός βουτυλοβενζυλεστέρας (BBeP) δεσμεύονται στον ER των καρκινικών κυττάρων MCF-7 του μαστού που έχει σαν αποτέλεσμα την έκφραση μεγάλων ποσοτήτων ER από αυτά τα κύτταρα (Andersen et al., 1999, Jobling et al., 1995, Nishihara et al., 2000). Με ανάλογο τρόπο, τα φθαλικά επηρεάζουν και τον AR, με τη έκφραση του, σε αντίθεση με τα αποτελέσματά μας, μειώνεται (McKinnell et al., 2001, Bonefeld-Jørgensen et al., 2007). Σε μοριακό επίπεδο, φαίνεται ότι με τη δράση τους επάνω στους υποδοχείς, οι φθαλικές ενώσεις προκαλούν, μεταξύ άλλων, αναδιάρθρωση της χρωματίνης και κατ'επέκταση, αλλαγές στη μεταγραφή και έκφραση γονιδίων και διαφοροποιημένη επιγενετική αποτύπωση. Πιο συγκεκριμένα,

φαίνεται να προκαλούν ατελή μεθυλίωση σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Σε συμπεριφορικές μελέτες με knock-out του γονιδίου του ERα, η σεξουαλική συμπεριφορά των αρσενικών βρέθηκε μερικώς διαταραγμένη ή ουσιαστικά φυσιολογική. Ενώ η εκσπερμάτωση ήταν σπάνια και τα πειραματόζωα στείρα, η συχνότητα του ζευγαρώματος ήταν η ίδια ή ελαφρώς μειωμένη (Ogawa et al., 1998). Σε αντίθεση, η επιθετική συμπεριφορά των αρσενικών βρέθηκε εξαιρετικά μειωμένη στην ίδια ομάδα, καταδεικνύοντας τη σημασία του υποδοχέα (Ogawa et al., 2000). Τόσο η περίσσεια όσο και η έλλειψη επηρεάζουν την ανάπτυξη του φύλου, τον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-όρχις, την σπερματογένεση και τελικά, τη γονιμότητα (Rochira et al., 2016).

Τα πειραματικά αποτελέσματα για τους υποδοχείς AR και ERα μπορούν σε μεγάλο βαθμό να αποδοθούν σε μια εκ των ιδιοτήτων που έχουν οι ενδοκρινικοί διαταράκτες, η οποία είναι η μη μονοτονική δράση. Ως γνωστόν, οι ενδοκρινικοί διαταράκτες είναι ικανοί να δράσουν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Ειδικά δε, όταν βρίσκονται περισσότεροι του ενός σε μείγμα, η δράση τους αυτή είναι εντονότερη. Αν όμως, η συγκέντρωση τους αυξηθεί, είναι πιθανόν να παρουσιάσουν εκ διαμέτρου αντίθετα αποτελέσματα. Τα παραπάνω καταδεικνύονται στην πράξη, με το μείγμα S10, το οποίο είναι το χαμηλότερο σε συγκέντρωση, να επηρεάζει τις περισσότερες περιοχές του εγκεφάλου από εκείνες που εξετάστηκαν σε σχέση με τα μείγματα υψηλότερων συγκεντρώσεων, κυρίως σε σχέση με το S100 το οποίο επίσης έδειξε αποτελέσματα, ενώ οι υψηλότερες συγκεντρώσεις (S500) δεν διέφεραν από την ομάδα ελέγχου.

Αναφορικά με το γιατί παρατηρούμε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην προοπτική περιοχή και το ραβδωτό σώμα αλλά όχι τον φλοιό, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η κάθε περιοχή υπόκειται σε διαφορετική ρύθμιση όσον αφορά τους υποδοχείς και το ενδοκρινικό σύστημα γενικότερα. Το τελευταίο θα μπορούσε να ειπωθεί και σαν υπόθεση γιατί το μείγμα S10 έχει επίδραση τόσο στο ραβδωτό σώμα όσο και την προοπτική περιοχή ενώ το μείγμα S100 μόνο στην προοπτική περιοχή. Η προοπτική περιοχή εμφανίζεται ως η πιο ευαίσθητη στη δράση του μίγματος φθαλικών ενώσεων που χρησιμοποιήσαμε, πιθανόν λόγω της δομής, λειτουργίας της και κατανομής υποδοχέων, καθώς τα επίπεδα των υποδοχέων ERα και AR είναι υψηλότερα σε αυτήν υπό κανονικές συνθήκες, σε σχέση με τις άλλες εγκεφαλικές περιοχές που μελετήθηκαν (Simerly et al., 1990, Lu et al., 1998, Mitra et al., 2003).

Είναι γνωστό ότι η τεστοστερόνη (T) μετατρέπεται σε οιστραδιόλη μέσω της αρωματάσης στον εγκέφαλο, κάτι που είχε οδηγήσει πολλούς να πιστεύουν ότι η αρσενική ορμόνη του φύλου δεν είναι η τεστοστερόνη αλλά κάποιο οιστρογόνο (υπόθεση αρωματοποίησης, aromatization hypothesis). Όπως αποδείχθηκε, φυσιολογικές δόσεις οιστραδιόλης δεν αποκατέστησαν την σεξουαλική συμπεριφορά των αρσενικών μετά από αφαίρεση των όρχεων, ενώ φυσιολογικές δόσεις τεστοστερόνης ήταν πολύ αποτελεσματικές (McGinnis and Dreifuss, 1989). Ωστόσο, οι φυσιολογικές σεξουαλικές συμπεριφορές των αρσενικών επίσης παρεμποδίζονται με καταστολή της αρωματοποίησης (Vagell and McGinnis, 1997), αναδεικνύοντας τελικά τη σπουδαιότητα και του ER. Η προοπτική περιοχή (POA) των θηλυκών βρέθηκε να έχει μεγαλύτερη ποσότητα ERα υποδοχέων (Brown et al., 1999). Επομένως, μεγαλύτερα επίπεδα ERα σε συνδυασμό με την αντιανδρογονική δράση των φθαλικών θα μπορούσε να προκαλέσει «θυλεοποίηση» του εγκεφάλου των αρσενικών. Τελικά, η λειτουργία τόσο του AR όσο και του ER εμφανίζεται να είναι απαραίτητη για την φυσιολογική σεξουαλική συμπεριφορά των αρσενικών αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους τα οιστρογόνα συμβάλλουν στη δράση του AR δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Ο AR φαίνεται να διαδραματίζει πιο κρίσιμο ρόλο για τις τυπικές συμπεριφορές των αρσενικών στα πρωτεύοντα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Thornton and Goy, 1986, Sato et al., 2004). Τα αυξημένα επίπεδα του υποδοχέα AR στη μελέτη μας θα μπορούσαν να αποδοθούν ως απόκριση του οργανισμού στην αντιανδρογονική δράση των φθαλικών.

Παρότι οι περισσότερες γνώσεις για τους μηχανισμούς δράσης και των κινδύνων των φθαλικών ενώσεων έχουν προέλθει από ζωικές μελέτες, οι οποίες στην πλειονότητά τους είναι *in vitro*, καθίσταται έκδηλη η ανησυχία της επιστημονικής κοινότητας αναφορικά με τη δράση των φθαλικών ως ενδοκρινικών διαταρακτών, στην ανθρώπινη υγεία. Υπάρχουν σοβαρές ανησυχίες για τη δυνατότητα των δυσμενών αποτελεσμάτων στους ανθρώπους, ιδιαίτερα για το αναπτυσσόμενο έμβρυο και τα μικρά παιδιά. Φθαλικές ενώσεις συναντώνται στα περισσότερα προϊόντα που χρησιμοποιεί ο άνθρωπος ευρέως και καθημερινά, όπως τα κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα, χαλιά και κουρτίνες, συσκευασίες τροφίμων, πλαστικά PVC, εξοπλισμός τηλεόρασης και υπολογιστών, φαρμακευτικά είδη, παιχνίδια, χρώματα, απορρυπαντικά, λιπαντικά και καλλυντικά προϊόντα και χρησιμοποιούνται για να προσδώσουν στο προϊόν διάρκεια, μακροζωία και

χαμηλότερο κόστος. Περισσότερο από ένα εκατομμύριο τόνοι περίπου φθαλικών εστέρων παράγονται στη Δυτική Ευρώπη κάθε χρόνο.

Οι μέχρι τώρα ερευνητικές και επιδημιολογικές μελέτες συμφωνούν στο ότι η αποδιοργάνωση των εμβρυϊκών προγραμμάτων και η διατάραξη της ανάπτυξης που επιτελείται κατά την εμβρυϊκή ηλικία, συνεπεία της τοξικής δράσης των φθαλικών, επιφέρουν πολλαπλές λειτουργικές διαταραχές, οι οποίες εκδηλώνονται κυρίως κατά την ενήλικη ζωή. Καθώς εμπεριέχονται σε πληθώρα καθημερινών προϊόντων και αφ' ετέρου δεν είναι υποχρεωτική η αναγραφή τους στις ετικέτες των προϊόντων αυτών, η έκθεσης του γενικού πληθυσμού στις σχετικές χημικές ουσίες κρίνεται ιδιαίτερα δυσχερής. Απαιτείται διεξοδικότερη έρευνα, με στόχο την πληρέστερη κατανόηση του μηχανισμού δράσης της εκάστοτε φθαλικής ένωσης, μιας και διαπιστώνεται ότι η κεκτημένη γνώση είναι περιορισμένη σε συγκεκριμένα είδη φθαλικών ενώσεων, ενώ για άλλα κρίνεται παντελώς ανύπαρκτη. Η Ευρωπαϊκή Ένωση, για προληπτικούς λόγους, έχει απαγορεύσει τη χρήση ορισμένων ενώσεων της οικογένειας. Η αντικατάσταση τους επομένως επιβάλλεται και η χρήση άλλων αβλαβών ουσιών είναι αναγκαία για την προστασία της ανθρώπινης υγείας και γενικότερα του περιβάλλοντος. Οι βιομηχανίες πρέπει να αναθεωρήσουν ουσιαστικά τις διαδικασίες και τα πρωτόκολλα και να εξετάσουν τις πιθανές επιδράσεις της έκθεσης σε φθαλικά συσσωρευτικά. Οι κυβερνητικές πολιτικές, σύμφωνα με την αρχή της πρόληψης, οφείλουν να πάρουν μέτρα για να αποτραπεί η έκθεση στις χημικές ουσίες που υπάρχει η βεβαιότητα ή η υποψία ότι είναι επιβλαβείς για την υγεία.

8. Βιβλιογραφία-Αναφορές

Aikey JL, Nyby JG, Anmuth DM, James PJ. Testosterone rapidly reduces anxiety in male house mice (*Mus musculus*). *Horm Behav.* Dec;42(4):448-60.(2002)

Andersen, H. R., Andersson, A.-M., Arnold, S. F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N. A., ... Grandjean, P. (1999). Comparison of Short-Term Estrogenicity Tests for Identification of Hormone-Disrupting Chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 107, 89

Anway, M. D., & Skinner, M. K. (2006). Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors. *Endocrinology*, 147(6), s43–s49

- Anway, M. D., & Skinner, M. K. (2008). Epigenetic programming of the germ line: effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease. *Reproductive BioMedicine Online*, 16(1), 23–25.
- Barakat, R., Lin, P.-C., Park, C. J., Best-Popescu, C., Bakry, H. H., Abosalem, M. E., Ko, C. (2018). Prenatal Exposure to DEHP Induces Neuronal Degeneration and Neurobehavioral Abnormalities in Adult Male Mice. *Toxicological Sciences*, 164(2), 439–452.
- Bay K., Asklund C., Skakkebaek N.E., Andersson A.M.: Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 20(1): 77-90 (2006)
- Bebbington, P. (1996). The origins of sex differences in depressive disorder: bridging the gap. *International Review of Psychiatry*, 8(4), 295–332.
- Becker, K., Seiwert, M., Angerer, J., Heger, W., Koch, H. M., Nagorka, R., Ullrich, D. (2004). DEHP metabolites in urine of children and DEHP in house dust. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 207(5), 409–417.
- Bergman, Å., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K., & Zoeller, R. T. (2012). State of the science of endocrine disrupting chemicals, 2012. *Toxicology Letters*, 211, S3.
- Bern, H. A., Mills, K. T., Dorothy, H. L., Ostrander, P. L., & Iguchi, T. (1992). Altered mammary responsiveness to estradiol and progesterone in mice exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Cancer Letters*, 63(2), 117–124.
- Bhattacharya, P., & Keating, A. F. (2012). Protective role for ovarian glutathione S-transferase isoform pi during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced ovotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 260(2), 201–208.
- Bielecki, B., Mattern, C., Ghomari, A. M., Javaid, S., Smietanka, K., Abi Ghanem, C., Traiffort, E. (2016). Unexpected central role of the androgen receptor in the spontaneous regeneration of myelin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(51), 14829–14834.
- Bohm A, Gaudet R, Sigler PB. Structural aspects of heterotrimeric G-protein signaling. *Curr Opin Biotechnol.* 1997;8:480–487.
- Bonefeld-Jørgensen, E. C., Long, M., Hofmeister, M. V., & Vinggaard, A. M. (2007). Endocrine-Disrupting Potential of Bisphenol A, Bisphenol A Dimethacrylate, 4-n-Nonylphenol, and 4-n-Octylphenol in Vitro: New Data and a Brief Review. *Environmental Health Perspectives*, 115(S-1), 69–76.
- Bornehag C.G, Sundell J, Weschler CH, Sigsgaard T, Lundgren B, Hasselgren M, Hagerhed-Engman L. The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case-control study. *Environ. Health Perspect.* 112: 1393-1397 (2004)

Brown A. E., Mani S., Tobet S. A. (1999). The preoptic area/anterior hypothalamus of different strains of mice: sex differences and development. *Dev. Brain Res.* 115, 171-182.

Butala, J. H., David, R. M., Gans, G., McKee, R. H., Guo, T. L., Peachee, V. L. and White, K. L., Jr. 2004. Phthalate treatment does not influence levels of IgE or TH2 cytokines in B6C3F1 mice. *Toxicology* 201:77–85.

Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L.-Y., Reidy, J. A., & Needham, L. L. (2007). Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003–2004. *Environmental Health Perspectives*, 116(1), 39–44.

Cherrier, M. M., Asthana, S., Plymate, S., Baker, L., Matsumoto, A. M., Peskind, E., Craft, S. (2001). Testosterone supplementation improves spatial and verbal memory in healthy older men. *Neurology*, 57(1), 80–88.

Cherrier, M. M., Matsumoto, A. M., Amory, J. K., Asthana, S., Bremner, W., Peskind, E. R., Craft, S. (2005). Testosterone improves spatial memory in men with Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology*, 64(12), 2063–2068.

Coons, A. H. (1949). LOCALIZATION OF ANTIGEN IN TISSUE CELLS: II. IMPROVEMENTS IN A METHOD FOR THE DETECTION OF ANTIGEN BY MEANS OF FLUORESCENT ANTIBODY. *Journal of Experimental Medicine*, 91(1), 1–13.

Coons, A. H. (1955). STUDIES ON ANTIBODY PRODUCTION: I. A METHOD FOR THE HISTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF SPECIFIC ANTIBODY AND ITS APPLICATION TO A STUDY OF THE HYPERIMMUNE RABBIT. *Journal of Experimental Medicine*, 102(1), 49–60.

Craig, Z. R., Wang, W., & Flaws, J. A. (2011). Endocrine-disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. *REPRODUCTION*, 142(5), 633–646.

Crews, D., & McLachlan, J. A. (2006). Epigenetics, Evolution, Endocrine Disruption, Health, and Disease. *Endocrinology*, 147(6), s4–s10.

David R.M., Moore M., Cifone M., Finney D., Guest D.: Chronic Peroxisome proliferation and hepatomegaly associated with the hepatocellular tumorigenesis of di(2-ethyl-hexyl) phthalate and the effects of recovery. *Toxicol. Sci.* 50: 195-205 (1999)

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Gore, A. C. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293–342.

Engel, A., Buhrke, T., Imber, F., Jessel, S., Seidel, A., Völkel, W., & Lampen, A. (2017). Agonistic and antagonistic effects of phthalates and their urinary metabolites on the steroid hormone receptors ER α , ER β , and AR. *Toxicology Letters*, 277, 54–63.

European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General Scientific Committee on Toxicity, Eco-toxicity and the Environment (CSTEE) Opinion on the results of a second Risk Assessment of: Bis(2-Ethylhexyl) phthalate (DEHP) Human Health Part. 8 January 2004.

Fisher J.S.: Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction* 127: 305-315 (2004)

Freedman NJ, Lefkowitz RJ. Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res.* (1996);51:319–351.

Gore AC, Dickerson S. *Endocrine Disruptors and The Developing Brain*. Biota Publishing; 2012.

Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., Zoeller, R. T. (2015). EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*, 36(6), E1–E150.

Hannon P. R. , Flaws J. A. (2015). The effects of phthalates on the ovary. *Front. Endocrinol.* 6, 8. Peijnenburg, W. J. G. M., & Struijs, J. (2006). Occurrence of phthalate esters in the environment of the Netherlands. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(2), 204–215.

Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Gustafsson, J.-Å. (2007). Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiological Reviews*, 87(3), 905–931.

Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V., & Angerer, J. (2007). Phthalates: Toxicology and exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(5), 623–634.

Hinton, R. H., Mitchell, F. E., Mann, A., Chescoe, D., Price, S. C., Nunn, A., Bridges, J. W. (1986). Effects of Phthalic Acid Esters on the Liver and Thyroid. *Environmental Health Perspectives*, 70, 195.

Högberg J, Hanberg J, Berglund M, Skerfving S, Remberger M, Calafat AM, et al. Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environ Health Perspect.* 2008;116:334–339.

Hojo Y, Kawato S (2018) Neurosteroids in hippocampus of male and female rodents: biosynthesis and actions of sex steroids. *Front Endocrinol* 9:183

Howdeshell, K. L., Wilson, V. S., Furr, J., Lambright, C. R., Rider, C. V., Blystone, C. R., ... Gray, L. E. (2008). A Mixture of Five Phthalate Esters Inhibits Fetal Testicular Testosterone Production in the Sprague-Dawley Rat in a Cumulative, Dose-Additive Manner. *Toxicological Sciences*, 105(1), 153–165.

Hoyer, P. B. (2005). Damage to ovarian development and function. *Cell and Tissue Research*, 322(1), 99–106
Anway, M. D. (2005). Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. *Science*, 308(5727), 1466–1469.

Huang, P.-C., Kuo, P.-L., Guo, Y.-L., Liao, P.-C., & Lee, C.-C. (2007). Associations between urinary phthalate monoesters and thyroid hormones in pregnant women. *Human Reproduction*, 22(10), 2715–2722.

Ismail, A., & Nawaz, Z. (2005). Nuclear hormone receptor degradation and gene transcription: An update. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 57(7), 483–490.

Jane A. Hoppin, Ross Ulmer and Stephanie J. London Phthalate Exposure and Pulmonary Function. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 112, No. 5 (Apr. 2004), pp. 571-574

Jobling S., Reynolds T., White R., M. G. Parker M.G., Sumpter J.P.: A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalates plasticizers are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* 103: 582-587 (1995)

Jonasson, Z. (2005). Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(8), 811–825.

Jovanovic, H., Kocoska-Maras, L., Rådestad, A. F., Halldin, C., Borg, J., Hirschberg, A. L., & Nordström, A.-L. (2015). Effects of estrogen and testosterone treatment on serotonin transporter binding in the brain of surgically postmenopausal women – a PET study. *NeuroImage*, 106, 47–54.

K. Marsee, T.J. Woodruff, D.A. Axelrad, A.M. Calafat, S.H. Swan Estimated daily phthalate exposures in a population of mothers of male infants exhibiting reduced anogenital distance *Environ Health Perspect.* 114 (2006), p.805

Kabir, E. R., Rahman, M. S., & Rahman, I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(1), 241–258.

Kathryn R. Coser, Jessica Chesnes, Jingyung Hur, Sandip Ray, Kurt J. Isselbacher and Toshi Shioda (2003) Global Analysis of Ligand Sensitivity of Estrogen Inducible and Suppressible Genes in MCF7/BUS Breast Cancer Cells by DNA Microarray

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 100, No. 24 (Nov. 25, 2003), pp. 13994-13999

Khera M1. Patients with testosterone deficit syndrome and depression. *Arch Esp Urol.* Sep;66(7):729-36. (2013)

Kim I.Y., Han S.Y., Moon A.: Phthalates inhibit tamoxifen-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 67: 2025-2035 (2004)

Koch, H. M., & Calafat, A. M. (2009). Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2063–2078.

Kranz, G. S., Wadsak, W., Kaufmann, U., Savli, M., Baldinger, P., Gryglewski, G., Lanzenberger, R. (2015). High-Dose Testosterone Treatment Increases Serotonin Transporter Binding in Transgender People. *Biological Psychiatry*, 78(8), 525–533.

Krotz S. P., Carson S. A., Tomey C., Buster J. E. (2012). Phthalates and bisphenol do not accumulate in human follicular fluid. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29, 773–777.

Lapinskas, P.J., Brown, S., Leesnitzer, L.M., Blanchard, S., Swanson, C., Cattley, R.C., and Corton, J.C. (2005). Role of PPARalpha in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology* 207(1):149–163.

Lewin, C., Wolgers, G., & Herlitz, A. (2001). Sex differences favoring women in verbal but not in visuospatial episodic memory. *Neuropsychology*, 15(2), 165–173.

Lohse MJ. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta.* (1993);1179:171–188.

Longnecker, M. P., Rogan, W. J., & Lucier, G. (1997). THE HUMAN HEALTH EFFECTS OF DDT (DICHLORODIPHENYLTRICHLOROETHANE) AND PCBS (POLYCHLORINATED BIPHENYLS) AND AN OVERVIEW OF ORGANOCHLORINES IN PUBLIC HEALTH. *Annual Review of Public Health*, 18 (1), 211–244.

Lu SF, McKenna SE, Cologer-Clifford A, Nau EA, Simon NG. Androgen receptor in mouse brain: sex differences and similarities in autoregulation. *Endocrinology* Apr;139(4):1594-601. (1998)

Magliozzi, R., Nardacci, R., Scarsella, G., Di Carlo, V., & Stefanini, S. (2003). Effects of the plasticiser DEHP on lung of newborn rats: catalase immunocytochemistry and morphometric analysis. *Histochemistry and Cell Biology*, 120(1), 41–49.

Maternal Thyroid Deficiency during Pregnancy and Subsequent Neuropsychological Development of the Child. (1999). *New England Journal of Medicine*, 341(26), 2015–2017.

McGinnis, M. Y., Christina Mirth, M., Zebrowski, A. F., & Dreifuss, R. M. (1989). Critical exposure time for androgen activation of male sexual behavior in rats. *Physiology & Behavior*, 46(2), 159–165.

McGinnis, M. Y., Williams, G. W., & Lumia, A. R. (1996). Inhibition of male sex behavior by androgen receptor blockade in preoptic area or hypothalamus, but not amygdala or septum. *Physiology & Behavior*, 60(3), 783–789.

McKinnell C, Saunders PT, Fraser HM, Kelnar CJ, Kivlin C, Morris KD, Sharpe RM. Comparison of androgen receptor and oestrogen receptor beta immunoexpression in the testes of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) from birth to adulthood: low androgen receptor immunoexpression in Sertoli cells during the neonatal increase in testosterone concentrations. *Reproduction*. 2001;122:419–429.

Medeiros AM, Devlin DJ, & Keller LH (1999) Evaluation of skin sensitisation response of dialkyl (C6-C13) phthalate esters. *Contact Dermatitis*, 41:287-289.

Meeker JD, Godfrey-Bailey L, Hauser R. Relationships between serum hormone levels and semen quality among men from an infertility clinic. *J Androl*. 2007;28(3):397–406.

Miller WL, Steroid hormone synthesis in mitochondria, *Mol Cell Endocrinol*. Oct 15;379(1-2):62-73 (2013)

Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, Pfaff DW, Ogawa S, Rohrer SP, Schaeffer JM, McEwen BS, Alves SE. (2003) Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology*. May;144(5):2055-67.

Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Nakao, K. (2002). Thyroid Hormone Action Is Disrupted by Bisphenol A as an Antagonist. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(11), 5185–5190.

NAESS, O., HANSSON, V., DJOESLAND, O., & ATTARMADAL, A. (1975). Characterization of the Androgen Receptor in the Anterior Pituitary of the Rat. *Endocrinology*, 97(6), 1355–1363.

Ogawa S, Chester AE, Hewitt SC, Walker VR, Gustafsson JA, Smithies O. Abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha beta ERKO) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:14737–14741.

Ogawa S, Washburn TF, Taylor J, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW. Modification of testosterone-dependent behaviors by estrogen receptor-alpha gene disruption in male mice. *Endocrinology*. 1998;139:5058–5069.

- Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Calacagni M, Anselmetti GC, Schumacher M, Balthazart J. Sexual differentiation and hormonal control of the sexually dimorphic medial preoptic nucleus in the quail. *Brain Res.* 1987;416:59–68.
- Paredes, R. G. (2003). Medial preoptic area/anterior hypothalamus and sexual motivation. *Scandinavian Journal of Psychology*, 44(3), 203–212.
- Pereira C, Mapuskar K, Rao CV. A two-generation chronic mixture toxicity study of Clophen A60 and diethyl phthalate on histology of adrenal cortex and thyroid of rats. *Acta Histochem* (2007);109:29–36.
- Pereira-Fernandes, A., Demaegdt, H., Vandermeiren, K., Hectors, T. L. M., Jorens, P. G., Blust, R., & Vanparys, C. (2013). Evaluation of a Screening System for Obesogenic Compounds: Screening of Endocrine Disrupting Compounds and Evaluation of the PPAR Dependency of the Effect. *PLoS ONE*, 8(10), e77481.
- Pfaff, D., Waters, E., Khan, Q., Zhang, X., & Numan, M. (2011). Minireview: Estrogen Receptor-Initiated Mechanisms Causal to Mammalian Reproductive Behaviors. *Endocrinology*, 152(4), 1209–1217.
- Porte, C., Janer, G., Lorusso, L. C., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M. P., Fossi, M. C., & Canesi, L. (2006). Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(3), 303–315.
- Postma, A., Meyer, G., Tuiten, A., van Honk, J., Kessels, R. P., & Thijssen, J. (2000). Effects of testosterone administration on selective aspects of object-location memory in healthy young women. *Psychoneuroendocrinology*, 25(6), 563–575.
- Rasier, G., Parent, A.-S., Gérard, A., Denooz, R., Lebrethon, M.-C., Charlier, C., & Bourguignon, J.-P. (2007). Mechanisms of Interaction of Endocrine Disrupting Chemicals with Glutamate-Evoked Secretion of Gonadotropin-Releasing Hormone. *Toxicological Sciences*, 102(1), 33–41.
- Rochira V, Madeo B, Diazzi C, Zirilli L, Santi D, Carani C. Estrogens and male reproduction. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, editors. *Endotext*. South Dartmouth: MDText.com; 2016.
- Saal, F. S. v., Timms, B. G., Montano, M. M., Palanza, P., Thayer, K. A., Nagel, S. C., Welshons, W. V. (1997). Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(5), 2056–2061.
- Sanders, S.L. and Stouffer, R.L. (1997) Localization of steroidogenic enzymes in macaque luteal tissue during the menstrual cycle and simulated earlypregnancy:

Immunohistochemical evidence supporting the two-cell model for estrogen production in the primate corpus luteum. *Biol. Reprod.*, 56, 1077–1087.

Sato T, Matsumoto T, Kawano H, Watanabe T, Uematsu Y, Sekine K, Fukuda T, Aihara K, Krust A, Yamada T, et al. Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:1673–1678.

Schug, T. T., Janesick, A., Blumberg, B., & Heindel, J. J. (2011). Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(3-5), 204–215.

Scott, C. J., Clarke, I. J., Rao, A., & Tilbrook, A. J. (2004). Sex Differences in the Distribution and Abundance of Androgen Receptor mRNA-Containing Cells in the Preoptic Area and Hypothalamus of the Ram and Ewe. *Journal of Neuroendocrinology*, 16(12), 956–963.

Shah, D. S., Prados, J., Gamble, J., De Lillo, C., & Gibson, C. L. (2013). Sex differences in spatial memory using serial and search tasks. *Behavioural Brain Research*, 257, 90–99.

Sheehan, D. M. (2006). No-threshold dose–response curves for nongenotoxic chemicals: Findings and applications for risk assessment. *Environmental Research*, 100(1), 93–99.

Silva, M. J., Reidy, J. A., Herbert, A. R., Preau, J. L., Needham, L. L., & Calafat, A. M. (2004). Detection of Phthalate Metabolites in Human Amniotic Fluid. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(6).

Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*. Apr 1;294(1):76-95. (1990)

Sohoni, P. (1998). Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *Journal of Endocrinology*, 158(3), 327–339.

Somasundaram, D.B., Selvanesan, B.C., Ramachandran, I., Bhaskaran, R.S., (2016) Lactational exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate impairs the ovarian and uterine function of adult offspring rat. *Reprod. Sci.* 23, 549–559.

Sowers, M. R., & La Pietra, M. T. (1995). Menopause: Its Epidemiology and Potential Association with Chronic Diseases. *Epidemiologic Reviews*, 17(2), 287–302.

Sugiyama, S., Shimada, N., Miyoshi, H., & Yamauchi, K. (2005). Detection of Thyroid System–Disrupting Chemicals Using in Vitro and in Vivo Screening Assays in *Xenopus laevis*. *Toxicological Sciences*, 88(2), 367–374.

- Thornton, J., & Goy, R. . (1986). Female-typical sexual behavior of rhesus and defeminization by androgens given prenatally. *Hormones and Behavior*, 20(2), 129-147.
- Tilghman, S. L., Nierth-Simpson, E. N., Wallace, R., Burow, M. E., & McLachlan, J. A. (2010). Environmental hormones: Multiple pathways for response may lead to multiple disease outcomes. *Steroids*, 75(8-9), 520–523.
- Vagell, M. E., & McGinnis, M. Y. (2003). Inhibition of Brain Oestrogen Receptors by RU 58668. *Journal of Neuroendocrinology*, 9(10), 797–800.
- van Honk J, Peper JS, Schutter DJ. Testosterone reduces unconscious fear but not consciously experienced anxiety: implications for the disorders of fear and anxiety. *Biol Psychiatry*. Aug 1;58(3):218-25. (2005)
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D.-H., Myers, J. P. (2012). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*, 33(3), 378–455.
- Ventrice, P., Ventrice, D., Russo, E., & De Sarro, G. (2013). Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(1), 88–96.
- Wang, W., Craig, Z. R., Basavarajappa, M. S., Hafner, K. S., & Flaws, J. A. (2012). Mono-(2-Ethylhexyl) Phthalate Induces Oxidative Stress and Inhibits Growth of Mouse Ovarian Antral Follicles¹. *Biology of Reproduction*, 87(6).
- Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, vom Saal FS. (2003) Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect*. Jun;111(8):994-1006.
- Wittassek, M., Koch, H. M., Angerer, J., & Brüning, T. (2011). Assessing exposure to phthalates - The human biomonitoring approach. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(1), 7–31
- Zoeller, R. T., Brown, T. R., Doan, L. L., Gore, A. C., Skakkebaek, N. E., Soto, A. M., Vom Saal, F. S. (2012). Endocrine-Disrupting Chemicals and Public Health Protection: A Statement of Principles from The Endocrine Society. *Endocrinology*, 153(9), 4097–4110.
- Ηλεκτρονική Πύλη του Ασκληπιακού Πάρκου, <http://panacea.med.uoa.gr/topic.aspx?id=623>
- Νευροενδοκρινολογική ρύθμιση του αναπαραγωγικού κύκλου στη γυναίκα Ε. Ζαπάντη, Κ. Τερζίδης, 1990, Α' Ενδοκρινολογικό Τμήμα, Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα»

