

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTMENTUL XII OBSTETRICĂ-GINECOLOGIE**

SIMU SEBASTIAN CLAUDIU



TEZĂ DE DOCTORAT

**IMPACTUL HORMONILOR SEXUALI FEMININI ÎN
DEZVOLTAREA CANCERULUI DE PIELE ȘI DE SÂN.
MODELE EXPERIMENTALE**

REZUMAT

Conducători de doctorat

**PROF. UNIV. DR. DAN-BOGDAN NAVOLAN
PROF. UNIV. DR. CRISTINA ADRIANA DEHELEAN**

**Timișoara
2022**

Cuprins

Introducere	3
Motivația studiului	4
Studiul 1. Procesul de degradare termică a etinilestradiolului – studiu cinetic	4
Obiective:	4
Materiale și metode:	4
Rezultate:	5
Studiul 2. Perspective asupra comportamentului celulelor de carcinom mamar MDA-MB-231 triplu negativ după tratamentul cu 17 β -etinilestradiol și levonorgestrel	6
Obiective:	6
Materiale și metode:	6
Rezultate	7
Studiul 3. Afinitatea de legare a 17- β -etinilestradiolului la tipurile normale și mutante de receptori de estrogeni	8
Obiective:	8
Materiale și metode:	8
Rezultate:	9
Studiul 4. Etinilestradiolul și levonorgestrelul ca agenți activi în pielea normală și stări patologice induse de expunerea la UVB: evaluări in vitro și in ovo	9
Obiective:	9
Materiale și metode:	9
Rezultate:	10
General Conclusions	14

Cuvinte cheie: Etinilestradiol, levonorgestrel, melanom, cancer de sân

Introducere

Cancerul reprezintă un grup boli ale căror principale caracteristici sunt creșterea și multiplicarea anormală a celulelor, care persistă după îndepărtarea declanșatorului inițial, având ca efect formarea unei mase tumorale. Aceste tumori pot fi fie benigne (nu se pot răspândi din locația lor inițială) fie maligne (pot invada alte țesuturi). Tumorile maligne sunt denumite cancere și, în funcție de tipul de celule din care provin, pot fi împărțite în mai multe categorii: carcinoame, sarcoame, blastoame, tumori cu celule germinale, limfoame și leucemii.

Pielea este una dintre componentele organului cutanat, împreună cu anexele cutanate. Pielea este cel mai mare organ din organism, care acoperă suprafața sa externă și îndeplinește o serie de funcții: barieră fizică, chimică și mecanică, organ senzorial pentru o serie de stimuli, secreție, sinteza vitaminei D și termoreglare. Pielea este un organ complex, compus din trei straturi, cu structuri și roluri diferite.

Incidența cancerelor de piele a crescut în ultimii ani. Cauza lor principală este expunerea la radiații ultraviolete, deși factorii ereditari joacă un rol important în creșterea riscului cancerigen. Cancerele de piele pot fi clasificate în cancere de piele non-melanomice, sau melanoame maligne, fiecare categorie principală având un număr de subtipuri.

Cancerul de sân reprezintă cea mai frecventă formă de cancer diagnosticată la femei și a doua cauză de deces provocată de tumori maligne la femei. Cancerele de sân pot fi împărțite în carcinoame in situ și invazive, care pot fi împărțite în mai multe subcategorii, în funcție de tipul lor original de țesut.

Estradiolul și progesteronul sunt cei mai importanți hormoni steroizi la femeile adulte. Efectele estrogenului la nivel țesut depind de receptorii de care se leagă. Există două tipuri de receptori de estrogeni, ER α și ER β , cu profiluri genetice diferite, dar afinități egale pentru estradiol, iar efectele activării lor sunt diferite și depind de raportul de semnalizare dintre cele două subtipuri.

Estrogenul are multe funcții fiziologice, dar nivelurile hormonale crescute au fost legate de incidența crescută a unor tipuri de cancer, în special a cancerelor de sân și endometrial.

Etinilestradiolul, un estrogen exogen semisintetic, este utilizat pe scară largă în contraceptivele orale. Pe lângă acțiunea contraceptivă, scade nivelul de testosteron și poate întârzia progresia cancerului de prostată și a demonstrat un efect protector împotriva osteoporozei și a cancerului de sân.

Progesteronul este un hormon sexual endogen care joacă un rol important în reglarea ciclului menstrual, fertilitate și embriogeneză.

Levonorgestrelul este un progestativ sintetic utilizat în contraceptivele orale combinate sau ca agent unic în contracepția de urgență.

Contraceptivele orale reprezintă cea mai comună și sigură formă de contracepție reversibilă și pot fi utilizate pentru tratarea acneei, controlul dismenoreei și reducerea riscului de cancer ovarian, de colon și endometrial. În ciuda numeroaselor beneficii, contraceptivele orale au o serie de efecte secundare grave, cum ar fi infarctul miocardic sau tromboembolismul.

Motivația studiului

Scopul general al tezei mele de doctorat a fost de a evalua influența hormonilor sexuali feminini asupra evoluției unor forme de cancer dependente de hormoni.

În acest scop, am folosit variante sintetice ale celor doi hormoni care se găsesc în mod obișnuit în contraceptivele orale, Etinilestradiol, Levonorgestrel și o combinație a celor doi pe celule de melanom uman și murin și pe linii celulare de cancer de sân. În plus, am evaluat stabilitatea termică a etinilestradiolului găsit în contraceptivele orale și am comparat afinitatea de legare a receptorilor de estrogen prin andocare moleculară, folosind software-ul PyRx.

Studiul 1. Procesul de degradare termică a etinilestradiolului – studiu cinetic

Obiective:

Obiectivul principal al acestui studiu a fost realizarea unui studiu cinetic izoconversial pentru etinilestradiol, deoarece datele din literatură nu au oferit informații cu privire la procesele de descompunere heterogenă pentru acest compus.

Materiale și metode:

Studiul a fost realizat folosind etinilestradiol achiziționat de la Sigma-Aldrich (St. Louise, MO, SUA), fără purificare suplimentară.

Studiile FT-IR au fost efectuate folosind un spectrometru Shimadzu Prestige-21 (Duisburg, Germania), la 24 °C. Parametrii de funcționare stabiliți au fost: rezoluție de 4 cm⁻¹ în intervalul spectral de 400–4000 cm⁻¹, folosind granule de KBr.

Au fost efectuate investigații termo-analitice pentru a evalua stabilitatea probelor, folosind un instrument Netzsch STA 449 C (Netzsch-Gerätebau GmbH, Selb, Germania), în intervalul 20–500 °C, atmosferă de aer, la rate de încălzire de 2, 4, 6, 8 și 10 °C/min. Fiecare probă a fost cântărită în creuzete de aluminiu și analiza a fost efectuată sub aer artificial la un debit de 20 mL/min.

Studiul cinetic asupra procesului principal de descompunere a etinilestradiolului a fost realizat folosind AKTS—Thermokinetics Software (AKTS AG TechnoArk, Siders, Elveția) pentru metodele Friedman și Flynn-Wall-Ozawa, în timp ce metoda clasică Kissinger a fost aplicată utilizând un fișier șablon creat de echipa noastră de cercetare.

Rezultate:

O metodă exploratorie pentru caracterizarea EE a fost spectroscopia FTIR.

În regiunea spectrală $3650\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$, vibrațiile de întindere $\nu(\text{O-H})$ pentru ambele fragmente OH din structura EE sunt văzute ca o bandă largă, sugerând legăturile puternice de H între moleculele în stare solidă, suprapuse cu benzile înguste, coresunzătoare apei adsorbite superficial.

Benzile de la $2972,31$, $2935,66$ și $2866,22\text{ cm}^{-1}$ reflectă vibrațiile de întindere simetrice și asimetrice pentru diferite legături C-H, în special (C-H), inclusiv cele de la fragmentul CH_3 și cele CH_2 .

Spectrele FTIR ale compuşilor care conțin fragmente -CC-, cum ar fi fragmentul etinil al compusului, prezintă benzi caracteristice care sunt foarte individualizate la $2357,01$ și $2322,29\text{ cm}^{-1}$. Aceste benzi sunt clare și sunt bine definite. Benzile de la $1614,42$, $1585,49$, $1500,62$, $1471,69$, $1446,61$ și $1435,04\text{ cm}^{-1}$, precum și pentru $\text{as}(\text{CH}_3)$ și $\text{as}(\text{C}=\text{C})$, sunt cauzate de întinderea simetrică C-C (CH_2). Benzile la $1373,32$, $1357,89$, $1298,09$ și $1286,52\text{ cm}^{-1}$ rezultă din îndoirea simetrică a metilului, primele două benzi corespunzând hidroxililor (COH). Benzile la $1255,66$ și $1056,99\text{ cm}^{-1}$ sunt probabil cauzate de vibrații (C-O), în timp ce celelalte benzi ale amprenteii sunt cauzate de vibrații ale scheletului și de diferite benzi combinate.

EE este stabil termic până la o temperatură de $71\text{ }^\circ\text{C}$, moment în care începe un proces de pierdere de masă ce durează până la o temperatură de $101\text{ }^\circ\text{C}$. Primul pas al acestui proces este inițiat de eliminarea apei adsorbite superficial a probei.

EE anhidru este stabil până la o temperatură de $177\text{ }^\circ\text{C}$, moment în care începe un proces de descompunere ce se suprapune cu topirea compusului. Aceasta sugerează prezența formei polimorfe II mai degrabă decât a formei polimorfe I, care se topește la $146\text{ }^\circ\text{C}$. Descompunerea primară a EE are loc între 187 și $324\text{ }^\circ\text{C}$, care este însoțită de un efect exotermic asupra curbei DSC cu un vârf la $287\text{ }^\circ\text{C}$. Pe măsură ce temperatura crește, are loc procesul de degradare termică suprapusă, complicând și mai mult profilul termooanalitic.

Analiza cinetică a fost efectuată pe curba DTG prelucrată, obținut în atmosferă dinamică de aer pentru următoarele cinci viteze de încălzire β : 2 , 4 , 6 , 8 și $10\text{ }^\circ\text{C/min}$. Principalul proces de descompunere a EE care a fost supus analizei cinetice este cel care are loc după formarea formei anhidre. Un studiu cinetic preliminar a fost realizat folosind metoda

Kissinger, care presupune că gradul de conversie este constant și independent de viteza de încălzire la vârful DTG.

Pentru etapa principală a degradării EE, valoarea pentru E_a (energia de activare) este de 107,91 kJ/mol.

Metoda diferențială Friedman (Fr) și metoda integrală Flynn–Wall–Ozawa (FWO), două metode izoconversionale, au fost utilizate pentru evaluarea valorilor lui E_a ale descompunerii vs. gradul de conversie α . Procesul de descompunere este deplasat la temperaturi mai ridicate din cauza inerției termice a probei, pe măsură ce viteza de încălzire crește.

Comparând rezultatele obținute prin metoda cinetice Kissinger și cele două metode de izoconversie, valorile obținute pentru energiile de activare a descompunerii sunt în acord bun. Ajustarea punctelor T_{max} din metoda Kissinger sugerează că mecanismul de degradare al EE sub stres termic este independent de viteza de încălzire.

Metoda izoconversiei a lui Friedman relevă o variație în afara limitei de $\pm 10\%$, în afara valorii medii a E_a pentru EE numai la conversii mai mari de 85%. Această variație nu se observă în cazul metodei integrale a lui Flynn–Wall–Ozawa, chiar dacă valorile individuale ale E_a au tendința de a scădea odată cu avansul reacției.

Studiul 2. Perspective asupra comportamentului celulelor de carcinom mamar MDA-MB-231 triplu negativ după tratamentul cu 17 β -etinilestradiol și levonorgestrel

Obiective:

Obiectivul acestui studiu a fost de a evalua in vitro impactul 17 β -etinilestradiolului și al levonorgestrelului asupra proliferației și comportamentului metastatic al liniei celulare MDA-MB-231 de cancer de sân triplu negativ, o formă extrem de agresivă și invazivă.

Materiale și metode:

17 β - Etinilestradiol, Levonorgestrel, PBS, soluție de tripsină-EDTA, DMSO, FBS, amestec penicilină/streptomicină și reactiv MTT au fost achiziționate de la Sigma Aldrich, Merck KgaA. Mediul de cultură celulară, DMEM-ATCC® 30-2002™, a fost cumpărat de la ATCC. Toți reactivii utilizați în studiul de față au fost de puritate de grad analitic și sunt potrivite pentru utilizarea în culturi celulare.

Studiul nostru a fost efectuat folosind linia celulară de cancer de sân MDA-MB-231, care a fost achiziționată de la ATCC, apoi cultivată în mediul lor de creștere specific - DMEM suplimentat cu 10% FCS și 1% amestec de antibiotice.

Evaluarea viabilității celulare a fost efectuată prin intermediul testului MTT, valorile absorbantei au fost măsurate la 570 și 630 nm folosind Cytation 5.

Impactul potențial al tratamentului hormonal asupra morfologiei și confluenței celulelor MDA-MB-231 a fost evaluat folosind un microscop inversat Olympus IX73. Analiza fotografiilor a fost efectuată utilizând cellSens Dimensions v.1.8. Software.

Testul de colorare Hoechst 33342 a fost efectuat pentru a analiza efectele EE, LNG și EE-LNG la nivelul nuclear al celulelor MDA-MB-231 după 24 de ore de tratament. Protocolul experimental a fost aplicat conform recomandărilor producătorului.

Influența contraceptivelor orale asupra caracterului migrator al celulelor MDA-MB-231 a fost evaluată prin intermediul testului 'scratch assay' utilizând instrumentul AutoScratch™ Wound Making Tool furnizat de BioTek® Instruments Inc., Winooski, VT, SUA. Protocolul a fost efectuat conform recomandărilor producătorului.

Pentru a cuantifica efectul contraceptivelor în ceea ce privește migrarea celulelor, s-a determinat diferența dintre lățimea zgârieturii inițiale și după 24 de ore. Rata de migrare (%) a fost calculată conform unei formule descrise anterior de Felice și colab.

Pentru a evalua impactul OC asupra expresiei genelor, a fost efectuată o reacție în lanț a polimerazei cu transcripție inversă (RT-PCR).

Rezultate:

În studiul de față, linia celulară de cancer de sân MDA-MB-231 a fost tratată exogen cu soluții EE, LNG și EE-LNG în DMSO. Concentrații diferite (0.05-10 μ M) au fost testate pentru trei intervale de timp: 24, 48 și 72 de ore.

Deși rezultatele la 24 de ore indică un efect citotoxic, un efect stimulator a fost observat după tratamentul de 48 de ore. Efectul a fost dependent de doză. Procentele de viabilitate celulară evaluate după tratamentul de 72 de ore cu EE-LNG au fost similare cu cele ale matorului. Cu toate acestea, o scădere ușoară a fost indusă de EE-LNG 10 μ M.

Imaginile celulelor și nucleelor MDA-MB-231 luate după 24 de ore de tratament sugerează o pierdere a confluenței celulare după tratamentul cu soluții EE, LNG și EE-LNG, în comparație cu controlul (STP și TRX) și DMSO. Rotunjimea și neaderența celulelor observate după stimularea cu OC sugerează moartea celulelor și sunt mai proeminente în cazul EE 10 μ M, LNG 0,05 μ M și EE-LNG 0,05 μ M. Spre deosebire de STP și TRX, OC nu au indus modificări vizibile în aspectul morfologic al celulelor aderente viabile.

După stimularea cu EE, LNG și EE-LNG la 0,05 μ M și 10 μ M, am observat modificări relevante ale aspectului nucleelor, cum ar fi fragmentarea nucleară, blebbingul membranei și corpurile apoptotice. Nu au fost observate semne de necroză după tratamentul celulelor cu OC.

Pentru a determina impactul contraceptivelor asupra capacității de migrare a celulelor canceroase de sân MDA-MB-231, a fost aplicat testul de zgârietură, folosind două concentrații (0,05 μ M și 1 μ M) pentru fiecare probă. Celulele netratate (martor) au prezentat cea mai mare rată de migrare (85,97%), urmate de celulele tratate cu LNG 0,05 μ M (85,01%) și EE-LNG 1 μ M (81,67%). Cel mai puternic efect anti-migrator a fost observat în cazul EE 0,05 μ M și 1 μ M cu rate de vindecare a rănilor de 46,38% și respectiv 13,91%.

Inhibarea semnificativă a ratei de vindecare a rănilor a fost observată în celulele tratate cu LNG 1 μ M (70,73%) și, respectiv, EE-LNG 0,05 μ M (53,04%).

Modificările în expresia vimentinei au fost analizate prin tehnica RT-qPCR după o perioadă de stimulare de 48 de ore cu soluție de EE, LNG și EE-LNG, utilizând cele mai mici și cele mai mari concentrații testate. OC au indus modificări relevante în expresia vimentinei după cum urmează: EE și LNG au crescut expresia ARNm a vimentinei, modificări semnificative fiind observate pentru EE 0,05 μ M și LNG 10 μ M. Deși diferențele dintre grupurile de control și EE-LNG nu au fost semnificative statistic, asocierea EE cu LNG a scăzut expresia genelor la ambele concentrații.

Studiul 3. Afinitatea de legare a 17- β -etinilestradiolului la tipurile normale și mutante de receptori de estrogeni

Obiective:

Scopul acestui studiu a fost acela de a compara modul de legare și afinitatea EE2 cu ER α , unele dintre izoformele sale mutante, și ER β , deoarece aceste informații ar putea ajuta la înțelegerea aspectelor specifice privind legătura dintre activitatea biologică EE2 și anumite ER care semnalează patologii corelate.

Materiale și metode:

Structurile proteice corespunzătoare ER α și ER β au fost obținute din RCSB Protein Data Bank. Acestea au fost pregătite ca ținte adecvate pentru andocare moleculară folosind Autodock Tools 1.5.6.

Andocarea moleculară a fost efectuată cu software-ul PyRx (Versiunea 0.8) folosind funcția de scoring Vina. Moleculele au fost andocate în domeniul de legare a ligandului de estrogen al fiecărei structuri de proteine, utilizând parametrii de andocare implicați. Scorurile înregistrate pentru moleculele andocate au fost date ca valori ale energiei de legare liberă (kcal/mol). Particularitățile de legare la proteina ligandului au fost analizate utilizând Accelrys Discovery Studio 4.1 (Dassault Systemes Biovia).

Rezultate:

Energiile de legare calculate (ΔG) ale celor doi compuși ancorați sunt sub valoarea pragului de -6 kcal/mol sugerată de Shityakov și colab., care se corelează cu activitatea lor estrogenică.

Acomodările EE2 în ambele domenii de legare ER α și ER β sunt extrem de similare cu cele ale E2. În ambele cazuri, -OH fenolic este responsabil pentru formarea legăturii de hidrogen (HB) cu resturile Glu353, Arg394; totuși, în cazul lui E2, se formează un HB suplimentar între -OH alcoolic și His524.

La suprapunerea celor două molecule andocate poate fi observată o similitudine topologică. Ambele molecule sunt orientate într-un mod similar, iar coplanaritatea celor două structuri este relativ mare.

Aceleași caracteristici și asemănări sunt prezente atunci când cele două molecule au fost andocate în ER β . În ambele cazuri, -OH fenolic este responsabil pentru formarea HB cu resturile Glu305, Arg346 dar, în cazul E2, se formează un HB suplimentar între -OH alcoolic și His475. Asemănarea orientării structurii, între E2 și EE2, este prezentă și aici.

Rezultatele noastre au indicat o scădere a afinității de legare (valori ΔG mai mari) în cazul formelor mutante ale ER α în comparație cu structura nemutantă, dar scăderea nu este suficient de semnificativă pentru a concluziona că există o diminuare a activității EE2 care implică legarea la ER α mutant

În formele mutante care adoptă conformația specifică de legare a antagonistului, modul obișnuit de legare a EE2 este afectat semnificativ.

Studiul 4. Etinilestradiolul și levonorgestrelul ca agenți activi în pielea normală și stări patologice induse de expunerea la UVB: evaluări in vitro și in ovo

Obiective:

În acest studiu, ne-am concentrat pe evaluarea profilului citotoxic al EE, LNG și asocierea lor (EE + LNG), cu și fără iradiere UVB, pe linii celulare sănătoase și linii de celule tumorale prin tehnici in vitro și in vivo.

Materiale și metode:

EE și GNL au fost achiziționate de la Sigma Aldrich (München, Germania).

Liniile celulare sănătoase utilizate au fost: HaCaT – keratinocite umane imortalizate (ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel, Germania), 1BR3 – fibroblast de piele umană (90011801, ECACC General Collection, Salisbury, Marea Britanie), HEMa – melanocite

epidermice umane primare (ATCC). , LGC Standards GmbH), JB6Cl41-5a - epidermă de șoareci nou-născuți (CRL-2010™, ATCC, LGC Standards GmbH).

Liniile de celule tumorale au fost: A375 - melanom uman (CRL-1619™, ATCC, LGC Standards GmbH) și B164A5 - melanom murin (94042254; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Germania).

Reactivii specifici pentru cultura celulară (DMEM, EMEM, Dermal Cell Bazal Medium și Adult Melanocyte Growth Kit) au fost achiziționați de la ATCC (LGC Standards GmbH); aminoacizii neesențiali, FBS, amestec de antibiotice (penicilină/streptomicina), PBS, tripsină/EDTA și albastru de tripan au fost achiziționați de la Sigma-Aldrich (München, Germania).

Expunerea la UVB a fost efectuată la 312 nm, la o doză de 40 mJ/cm² prin intermediul sistemului Biospectra (Vilber Lourmat, Franța). Imediat după iradiere, PBS a fost înlocuit cu mediu de cultură ± compuși de testare. Stimularea cu compuși de testat (LNG, EE și EE + LNG) a fost efectuată după iradierea UVB.

Testul Alamar blue a fost utilizat pentru a evalua viabilitatea celulelor.

Caracterul migrator al celulelor utilizate în studiul de față a fost evaluat prin intermediul unui test „scratch assay”. Imaginile reprezentative au fost înregistrate utilizând un microscop inversat Olympus IX73 echipat cu cameră DP74 (Olympus, Tokyo, Japonia) și lățimile plăgii au fost măsurate cu CellSense Dimension 1.17 (Olympus, Tokyo, Japonia).

Analiza citometriei în flux a fost efectuată pentru a testa impactul compușilor noștri de testat asupra apoptozei celulare, folosind un kit de detectare a apoptozei anexine V-FITC (eBioscience, Viena, Austria).

Celulele au fost analizate prin citometrie în flux (FACSCalibur; Becton Dickson, Franklin Lakes, NJ, SUA) și celulele nestimulate au fost utilizate ca martori. Rezultatele au fost procesate utilizând versiunea 2.5.1 a software-ului Flux (dezvoltat de Perttu Terho, Cell Imaging Core, Centrul Turku pentru Biotehnologie, Turun Yliopisto, Finlanda).

Evaluarea biocompatibilității și a toxicității hormonilor a fost evaluată in ovo prin Testul membranei corioalantoide pe ouă de găină (HET-CAM), care a fost efectuat urmând recomandările ICCVAM și adaptat condițiilor noastre.

Rezultate:

Efectul indus de compușii testați (EE, LNG și EE + LNG) asupra celulelor sănătoase ale pielii umane și murine (HaCaT, 1BR3, HEMa și JB6 Cl 41-5a) și asupra viabilității celulelor melanomului (A375 și B164A5) în prezență/absență de iradiere UVB, a fost evaluată folosind testul Alamar blue. Iradierea celulelor HaCaT, 1BR3, HEMa și JB6 Cl 41-5a cu UVB (40

mJ/cm²) a dus la o reducere semnificativă a viabilității celulelor (HaCaT viabilitate 66,30%, 1BR3 viabilitate 74,75%, HEMA viabilitate 58,25%, respectiv JB6 CI41-5a viabilitate 60,85%) în comparație cu celulele martor.

Stimularea celulelor sănătoase cu EE (1 și 10 μM) timp de 24 de ore a condus la următoarele rezultate: celule HaCaT—o scădere ușoară a viabilității într-o manieră dependentă de doză (92,90% la 1 μM și 82,01% la 10 μM), 1BR3 celule - 88,04% celule viabile la 10 μM, celule HEMA - 82,25% celule viabile la 10 μM, celule JB6 CI 41-5a - viabilitatea nu a fost afectată în comparație cu celulele martor.

LNG nu a avut nicio influență asupra viabilității celulelor HaCaT, 1BR3 și JB6 CI 41-5a după 24 de ore de stimulare la cea mai mică concentrație testată - 1 μM, în timp ce la 10 μM s-a înregistrat o scădere pentru HEMA.

Cele mai scăzute rate de viabilitate au fost observate în grupurile de celule care au fost iradiate cu UVB și stimulate cu combinația de hormoni—EE + LNG (la 10 μM), dar aceste procente de viabilitate au fost mai mari decât cele înregistrate pentru celulele care au fost doar expuse la UVB (HaCaT: 78,55% vs. 69,30%; 1BR3: 83,31% vs. 74,75%, HEMA: 82,46% vs. 58,25% și JB6 CI 41-5a: 79,83% vs. 60,85%), ceea ce ar putea indica un efect de recuperare indus de EE+ LNG.

Condiții experimentale similare au fost aplicate pentru celulele melanomului A375 și B164A5 pentru a evalua efectele induse de compușii de testat ± iradierea UVB asupra viabilității celulelor într-un cadru de 24 de ore. Iradierea UVB a celulelor melanomului uman și murin a determinat o scădere semnificativă a viabilității celulare (aproximativ 75%) în comparație cu celulele martor.

Expunerea la radiații UVB urmată de stimularea cu EE, LNG sau EE + LNG a condus la o scădere semnificativă dependentă de doză a procentului de viabilitate a celulei A375, în comparație cu efectele induse de fiecare compus testat/UVB singur, (EE vs. EE + UVB : 66,54% față de 58,72%; GNL față de GNL + UVB: 69,78% față de 67,59%; EE + LNG față de EE + LNG + UVB: 56% față de 49,69%).

În cazul celulelor B164A5, iradierea UVB urmată de stimularea cu compuși testați a produs o creștere a viabilității celulelor în comparație cu valorile obținute pentru fiecare compus testat (EE vs. EE + UVB: 56,84% vs. 74,46%; LNG vs. LNG + UVB: 59,27% față de 78,06%, EE + LNG față de EE + LNG + UVB: 47,23% față de 80,59%). Un efect similar a fost observat în cazul celulelor pigmentate de melanom uman - RPMI-7951

O activitate apoptotică dependentă de doză a fost observată în cazul ambelor linii celulare. În comparație cu celulele martor, cel mai puternic efect apoptotic asupra celulelor de

melanom uman A375 neiradiate cu UVB a fost indus de EE și EE + LNG la cele mai mari concentrații testate - 10 pM.

GNL a exercitat o activitate pro-apoptotică mai scăzută la aceeași concentrație. Expunerea la UVB a celulelor A375, urmată de adăugarea a 1 uM de compuși de testat a condus la un procent semnificativ crescut de celule apoptotice timpurii: 22,62% pentru LNG; 31% pentru EE și 27% pentru EE + GNL. Iradierea UVB combinată cu cea mai mare concentrație de compuși de testat a declanșat procente din populația apoptotică timpurie precum cele înregistrate pentru compușii de testat în populația de celule neexpuse la UVB.

Celulele HaCaT nu au prezentat modificări morfologice semnificative după stimularea cu EE, LNG și EE + LNG (1 pM). După iradierea UVB, celulele HaCaT și-au schimbat drastic aspectul morfologic. Cele mai afectate celule au fost cele stimulate cu EE + LNG.

Rezultatele pentru celulele 1BR3 au fost similare cu cele obținute pentru HaCaT.

Stimularea celulelor HEMa cu EE și LNG (1 μM) nu a avut efecte asupra morfologiei celulelor. EE + LNG a indus o ușoară modificare a morfologiei celulelor HEMa. Iradierea UVB a influențat forma melanocitelor și confluența lor, iar asocierea cu EE + LNG părea a fi cea mai nocivă.

La 24 de ore după expunerea la UVB, celulele HEMa stimulate cu EE și LNG și-au recuperat parțial forma inițială. Celulele JB6 Cl 41-5a de epiderm murin au prezentat o bună confluență în absența radiației UVB, iar compușii de testat nu au perturbat forma celulelor; în timp ce după expunerea la UVB, celulele stimulate cu compușii de testat păreau să fie protejate de efectele dăunătoare UVB.

Cel mai afectate au fost celulele martor expuse la UVB, prezentând un nivel scăzut de confluență și modificări majore ale aspectelor morfologice ale acestora, caracteristici care au fost parțial recuperate după 24 de ore post-iradiere.

În cazul A375, celulele de control au prezentat o morfologie epitelială normală, după 24 de ore. O scădere a confluenței celulelor de control A375 a fost înregistrată după iradierea cu UVB și au fost observate unele celule detașate, ce pluteau. Stimularea cu EE și LNG a celulelor expuse la UVB a dus la unele modificări ale formei celulelor, în principal după tratamentul cu EE + LNG indicând procesul de apoptoză, rezultatele fiind în acord cu datele raportate de viabilitate celulară. În cazul celulelor pigmentate de melanom uman—RPMI-7951, compușii de testat nu au avut nici un impact asupra morfologiei celulelor, dar după iradierea UVB s-au observat modificări semnificative în toate grupurile, efecte care au fost aproape complet inversate după 24 de ore și stimularea compusului de testat.

În cazul celulelor melanomului murin — B164A5, celulele expuse la iradierea UVB păreau a fi cele mai afectate din punct de vedere al morfologiei celulare, prezentând o formă rotundă cu dendrite și contracție. Modificări ale formei celulelor melanomului B164A5 au fost de asemenea observate după stimularea cu compuși de testat, în celulele neiradiate UVB. Pe de altă parte, celulele B164A5 expuse la UVB urmată de stimulare cu compuși de testat au evidențiat o creștere a confluenței și modificări minore în morfologia celulelor.

Stimularea cu LNG nu a interferat cu migrarea celulelor sănătoase ale pielii umane și murine, lățimile plăgii la 24 de ore fiind similare cu cele măsurate pentru celulele martor.

După stimularea EE, o tendință de stimulare în toate liniile celulare ar putea fi menționată în comparație cu celulele martor; totuși, cea mai semnificativă stimulare a fost observată cu celulele 1BR3 (52,37% față de 40,09% pe celulele 1BR3).

Combinarea celor doi hormoni, EE + LNG a indus un efect inhibitor asupra migrării celulelor HaCaT, arătând o rată de închidere a plăgii de 58,18%, în timp ce în cazul 1BR3 și JB6 Cl 41-5a, efectul a fost stimulator. Rata foarte scăzută de vindecare a rănilor (40,08%) a celulelor martor 1BR3 sa datorat capacității lor scăzute de proliferare în condiții specifice de cultură pe zi.

Un efect stimulator asupra migrării celulelor HEMa a fost observat după stimularea EE și LNG (decalajul a fost aproape acoperit - în principal după EE) în comparație cu celulele de control. Mai mult, combinația EE + LNG a crescut și capacitatea de migrare a celulelor HEMa.

Testul in vitro a relevat că abilitatea de migrare a celulelor melanomului (A375—melanom uman, B164A5—melanomul murin) nu a fost inhibată de stimularea EE și EE + LNG (1 μ M). În plus, se poate menționa un efect stimulator, dar trebuie luat în considerare faptul că rana a fost acoperită și cu niște celule desprinse.

Pentru EE, rata de închidere a plăgii a fost de 82,81% pe celulele melanomului uman și de 85,29% pe linia celulară de melanom murin. În contrast, aceeași concentrație de LNG (1 μ M) a arătat o rată de vindecare a rănilor de numai 63,98% în cazul celulelor melanomului uman și de 53,94% în cazul liniei celulare de melanom murin. Rezultate similare au fost obținute pentru celulele de melanom pigmentate umane - RPMI-7951.

Toxicitatea potențială a compușilor testați (EE, LNG și EE + LNG) a fost, de asemenea, evaluată in vivo, folosind membrana corioalantoidă a oului de găină ca mediu biologic.

Efectele induse de compușii testați, împreună cu controalele pozitive și negative au fost înregistrate ca fotografii reprezentând suprafața superioară a membranelor corioalantoide înainte și după 5 minute de contact cu soluțiile. Înainte de determinarea scorului de iritație, au fost luate în considerare rezultatele înregistrate pentru severitatea iritației.

PBS, DMSO 1%, LNG (1 și 10 μM) și cea mai mică concentrație de EE (1 μM) nu au prezentat niciunul dintre cele trei obiective (hemoragie, coagulare și liză). Pentru aceste probe, am înregistrat o viabilitate de peste 24 de ore.

EE (10 μM) a prezentat semne tardive și limitate de hemoragie sau coagulare și semne precoce, deși limitate de vasodilatație. Aplicarea EE + LNG (1 și 10 μM) a indus coagulare ușoară și limitată, într-o manieră dependentă de doză. Cel mai mare scor mediu de iritare a fost înregistrat pentru controlul pozitiv, SDS. Pentru probele care au indus un efect iritant slab decesul a fost înregistrat în primele 24 de ore.

SDS a indus leziuni vasculare majore pe membrana corioalantoidiană. Toate cele trei obiective: hemoragie, coagulare și liză, au fost raportate numai pentru SDS. Moartea specimenului a fost înregistrată în 60 min.

General Conclusions

EE anhidru are o stabilitate termică bună (până la 177 °C), procesul principal de descompunere având loc în intervalul 175–375 °C într-un proces într-o singură etapă, invariabil cu modificarea vitezei de încălzire a probei.

Influența potențială a EE, LNG și asocierea lor asupra comportamentului celulelor canceroase de sân independente de hormoni MDA-MB-231, extrem de agresive depind în mare măsură de timpul de expunere, compusul testat și concentrația acestuia. La 24 de ore, EE a prezentat cea mai mare citotoxicitate, LNG a prezentat o tendință stimulatorie în ceea ce privește supraviețuirea celulară, în timp ce EE + LNG s-a comportat similar cu EE. La 48 de ore, toate probele au crescut viabilitatea și numărul celulelor. EE și LNG au suprareglat expresia vimentinei, sugerând o stimulare a migrației celulare, în timp ce combinația lor a fost asociată cu un efect anti-migrator.

În ceea ce privește afinitatea de legare a EE, prin intermediul andocării moleculare împotriva ER de tip normal și mutant. chiar dacă variantele mutante ale ER suferă modificări conformaționale din cauza modificărilor aminoacizilor, energiile de legare obținute ale E2 nu au scăzut semnificativ. Este probabil ca modificările conformaționale să nu afecteze legarea agonistului, doar atunci când modificările aminoacizilor afectează direct domeniul de legare a ligandului.

EE, LNG și combinația lor (EE + LNG) nu au interferat cu viabilitatea celulelor sănătoase ale pielii umane și murine la cea mai mică concentrație testată, dar au indus un efect citotoxic semnificativ asupra celulelor melanomului. Concentrații mai mari de hormoni și

adăugarea de iradiere UVB au crescut efectul citotoxic atât în celulele sănătoase de melanom uman, cât și în cele A375.

În cazul celulelor melanomului murin — B164A5, asocierea hormonilor și stresului UVB a condus la o creștere a procentului de celule viabile și la o scădere a celulelor apoptotice timpurii, ceea ce sugerează un posibil rol al melaninei în protecția celulelor melanomului împotriva tratamentului hormonal.

Experimentele in ovo au confirmat activitatea inofensivă a hormonilor la doze mici, dar la concentrații mai mari au produs un efect iritant slab.